

Research Article

Investigating the effects of chrysin on hypothalamic orexin and melanin-concentrating hormone gene expression in a rat model of formalin- induced pain

Khadijeh Haghighat ¹, Fariba Mahmoudi ^{1*}, Homayoun Khazali ²¹Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran²Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Key Words

Hcrt
Pmch
Pain
Formalin
Chrysin

Abstract

Introduction: Chrysin is a flavonoid with neuroprotective effects and its analgesic potential has been reported. The intracerebral molecular mechanism of chrysin in pain relief is unknown. Therefore, the aim of the present study is to investigate the effect of chrysin on hypothalamic *Hcrt* and *Pmch* genes expression in rat model of formalin.**Materials & Methods:** In this study, 20 male Wistar rats weighing 200±10 g were divided into four groups (n=5). The cannula was implanted in the third cerebral ventricle of rats. After recovery period, pain was induced by injecting 50 µl formalin into the hind paw. The group I as control and group II as formalin-induced pain group received saline. Groups III or IV as a formalin-induced pain groups received 20 and 40 µg chrysin via third cerebral ventricle. The hypothalamic samples were removed and frozen. Real-time PCR was performed to measure gene expression.**Results:** In the present study, genes expression level of *Hcrt* and *Pmch* increased significantly in the formalin- induced pain group compared to the control. Intracerebral injection of chrysin caused a significant decrease in genes expression level of *Hcrt* and *Pmch* in comparison to formalin- induced pain group.**Conclusion:** Intra hypothalamic molecular mechanisms upstream hypothalamus- pituitary-adrenal axis, may be involved in mediating the analgesic effects of chrysin.

Article info

* Corresponding Author's
email:
f.mahmoudi@uma.ac.ir

Received: 1 October 2024

Reviewed: 6 November

2024 Revised: 10 January

2025 Accepted: 18

February 2025

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات کرایزین بر بیان ژن‌های ارکسین و هورمون تغلیظ‌کننده ملانین در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مدل درد القایی با فرمالین

خدیجه حقیقت^۱، فریبا محمودی^{۱*}، همایون خزعلی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲ گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

Hcrt

درد

فرمالین

کرایزین

Pmch

مقدمه: کرایزین یک فلاونوئید با اثرات محافظت‌کننده عصبی است و پتانسیل ضد دردی آن گزارش شده است. مکانیسم مولکولی داخل مغزی کرایزین در تسکین درد ناشناخته می‌باشد. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات کرایزین بر بیان ژن‌های *Hcrt* و *Pmch* در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مدل فرمالین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۲۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن 20.0 ± 1.0 گرم به چهار گروه تقسیم شدند ($n=5$). در بطن سوم مغزی موش‌های صحرایی کانول‌گذاری انجام شد. بعد از دوره بهبودی، درد با تزریق زیر پوستی ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۵ درصد به پای عقب مدل حیوان القا شد. موش‌های صحرایی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه کنترل سالم و گروه دوم به عنوان مدل درد القایی با فرمالین سالین تزریق شد. گروه سوم و چهارم به عنوان گروه‌های درد القایی با فرمالین، به ترتیب ۲۰ و ۴۰ میکروگرم کرایزین را از طریق بطن سوم مغزی دریافت کردند. نمونه‌های هیپوتالاموسی جداسازی و فرین شدند. برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها، RT-PCR انجام گرفت.

نتایج: در مطالعه حاضر سطح بیان ژن‌های *Hcrt* و *Pmch* در گروه مدل درد القایی با فرمالین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت. تزریق داخل مغزی کرایزین سبب کاهش معنی‌دار سطح بیان ژن‌های *Hcrt* و *Pmch* در مقایسه با گروه مدل درد القایی با فرمالین شد.

بحث و نتیجه‌گیری: در اعمال اثرات ضد دردی کرایزین ممکن است مکانیسم‌های مولکولی داخل هیپوتالاموسی در بالادست محور هیپوتالاموس هیپوفیز آدرنال دخالت داشته باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

f.mahmoudi@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۰ مهر ۱۴۰۳

تاریخ داوری: ۱۶ آبان ۱۴۰۳

تاریخ اصلاح: ۲۱ دی ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۳۰ بهمن ۱۴۰۳

مقدمه

جوندگان که با مدارهای تنظیم کننده درد مرتبط هستند و میزان سنتز ارکسین به میزان قابل توجهی در پاسخهای دردزا افزایش می یابد (۸). هورمون تغلیظ کننده ملانین (MCH) نوروپپتید ۱۹ اسید آمینه ای است که دارای دو گیرنده MCH-R1 و MCH-R2 می باشد. این هورمون توسط ژن *Pmch* کد می شود. ژن آن در انسان روی کروموزوم ۱۲ و در موش صحرایی روی کروموزوم ۷ قرار دارد (۹). ژن *Pmch* به ویژه در هیپوتالاموس جانبی و در بافت های محیطی نظیر کلیه، ریه ها و بافت چربی بیان می شود (۱۰). ورودی های نورون های MCHergic به نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی از جمله کورتکس، پوتامن، هیپوکامپ، هسته اکومبنس و آمیگدال، نشان می دهد که سیستم MCH ممکن است در طیف وسیع تری از عملکردهای فیزیولوژیکی مانند تغذیه، فعالیت متابولیکی، خواب، خلق و خو و پاداش شرکت کند. مطالعات قبلی نشان دادند که MCH نقش مهمی در تعدیل درد دارد و القای درد در جوندگان با افزایش سنتز MCH همراه است (۱۰). با توجه به این که تاکنون مکانیسم های مولکولی اثرات تزریق داخل مغزی کرایزین در موش های صحرایی مدل درد مطالعه نشده است. بنابراین در تحقیق حاضر، برای اولین بار اثرات کرایزین بر تغییرات بیان ژن های *Hcrt* و *Pmch* ناشی از درد القایی با فرمالین در موش های صحرایی نر بررسی شد.

مواد و روش ها

حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری: در این مطالعه، ۲۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن 20 ± 10 گرم به مدت دو هفته در شرایط استاندارد آزمایشگاه نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. دما در 22 ± 2 درجه سانتی گراد تحت چرخه ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد. کلیه آزمایشات زیر نظر کمیته اخلاق دانشگاه محقق اردبیلی (IR.UMA.REC.1400) انجام شد.

روش جراحی و کانول گذاری: برای کانول گذاری، موش های صحرایی با تجویز داخل صفاقی کتامین (80 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) بی هوش شدند. سر حیوان در استریوتاکسی ثابت شد. ناحیه کوچکی از پوست بین دو گوش بریده شد سر حیوان در استریوتاکسی ثابت شد. با استفاده از نواحی براگما و لامبدا در سطح مجسمه و مختصات اطلس واتسون و پاکسینوس ($AP=0.84 \text{ mm}$, $ML=00$, $DV=6.5 \text{ mm}$) کانول در ناحیه بطن سوم قرار داده شد. برای بهبودی کامل، موش های صحرایی به مدت یک هفته در قفس های جداگانه در آزمایشگاه نگهداری شدند. سپس تزریق با استفاده از سرنگ هامیلتون صورت گرفت. همه گروه ها کانول گذاری شدند (۱۱، ۱۲).

درد احساس ناخوشایندی است که هزینه زیادی بر سیستم مراقبت های بهداشتی و همچنین کیفیت زندگی فرد در سراسر جهان وارد می کند. درد با تغییرات در سیستم عصبی مرکزی و محیطی مرتبط است. شواهد نشان می دهد تعداد زیادی از پروتئین های عملکردی و مسیرهای پیام رسانی در سیستم عصبی مرکزی در افراد مبتلا به درد تغییر می کنند که ممکن است به طور مستقیم و غیر مستقیم به بروز درد کمک کنند (۱). داروهای رایج برای تسکین درد مانند اپیوئیدها و داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی معمولاً عوارض جانبی (اختلالات گوارشی و کلیوی) یا تداخل جدی با سایر داروها دارند، به همین دلیل اکثر مردم داروهای جدیدی را ترجیح می دهند که عوارض جانبی کمتری داشته باشند. امروزه تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی رو به گسترش است به خصوص مشاهده خواص دارویی متنوع گیاهان مانند اثرات محافظت کننده عصبی، آنتی اکسیدانی و ضد درد، نظر محققان را بیش تر به خود جلب کرده است (۲). کرایزین ($5,7\text{-di-hydroxy-flavone}$)، ترکیب فیتوشیمیایی است که در عسل، بره بوم و بسیاری از گیاهان از جمله گل ساعتی (*Passiflora incarnate*) و *Passiflora coerulea* وجود دارد. به نظر می رسد کرایزین دارای اثرات دارویی مختلف مانند خواص ضدسرطان، ضدآپوپتوز، تعدیل کننده ایمنی، محافظت کننده عصبی و آنتی اکسیدانی است (۳). در مطالعه ای نشان داده شده است که در موش های صحرایی تحت درمان با بره بوم که عمده ترکیب تشکیل دهنده آن کرایزین است رفتارهای مرتبط با درد کاهش می یابد. علاوه بر این، مطالعه دیگر نیز نشان داده است که کرایزین در موش های مدل درد القا شده با فرمالین باعث کاهش درد می شود (۴). ارکسین که به عنوان هیپوکرتین نیز شناخته می شود، شامل دو نوروپپتید ارکسین A (۳۳ اسید آمینه) و ارکسین B (۲۸ اسید آمینه) است که توسط ژن *Hcrt* کد می شود. ژن کدکننده ارکسین در انسان بر روی کروموزوم ۱۷ و در موش صحرایی بر روی کروموزوم ۱۰ قرار دارد (۵). ارکسین دو گیرنده شامل ارکسین ۱ (OXIR-1) و ارکسین ۲ (OXIR-2) دارد که عملکردهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله کنترل فعالیت قلبی-عروقی، تولیدمثل، استرس، پاداش و درد را واسطه گری می کنند. ژن *Hcrt* در سیستم عصبی مرکزی در نواحی مختلف از جمله هیپوتالاموس جانبی، هیپوکامپ، آمیگدال و در بافت های محیطی در کلیه، بیضه، تخمدان و غده فوق کلیوی بیان می شود. هم چنین مطالعات در جوندگان نشان می دهد که ارکسین و گیرنده های آن، در بسیاری از نواحی مغز مرتبط با درد، از جمله هیپوتالاموس جانبی، تالاموس، سیستم لیمبیک، هسته رافه پشتی و لوکوس سرولئوس وجود دارند (۶، ۷). فعالیت نورون های ارکسین در

جدول ۱: توالی سنس و آنتی سنس پرایمرها

نام ژن‌ها	توالی پرایمرها
سنس: <i>Hprt</i> آنتی سنس	5'- CTCCTTCAGGCCAACGGTAA -3' 5'- AGGGCAGGGATATGGCTCTA -3'
سنس: <i>Pmch</i> آنتی سنس	5'- TCAGAAGGAAGATACCGCAGA -3' 5'- ACTGCTGGTCTTTTCAGAGC -3'
سنس: <i>GAPDH</i> آنتی سنس	5'- AAGTTCAACGGCACAGTCAAG -3' 5'- CATACTCAGCACAGCATCAC -3'

آنالیز آماری: داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۳) و آنالیز واریانس یک طرفه آنالیز شد. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین ($\pm$ SEM) ارائه شدند. $P \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان بیان نسبی ژن *Hprt* در گروه مدل درد القایی با فرمالین نسبت به گروه کنترل از نظر آماری افزایش معنی داری پیدا کرد ($P=0.000$) (شکل ۱). تزریق داخل مغزی ۲۰ و ۴۰ میکروگرم کرایزین در هر دو گروه باعث کاهش معنی دار میانگین بیان نسبی ژن *Hprt* نسبت به گروه مدل درد القایی با فرمالین شد (به ترتیب $P=0.000$ یا $P=0.000$) (شکل ۱). هم چنین کاهش معنی داری در بیان ژن *Hprt* در گروه دریافت کننده ۴۰ میکروگرم کرایزین نسبت به گروه دریافت کننده ۲۰ میکروگرم مشاهده شد ($P=0.003$) (شکل ۱). میزان بیان نسبی ژن *Pmch* در گروه مدل درد القایی با فرمالین نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که این میزان افزایش از نظر آماری معنی دار بود ($P=0.000$) (شکل ۲). در گروه‌های دریافت کننده ۲۰ و ۴۰ میکروگرم کرایزین به صورت داخل مغزی بیان ژن *Pmch* نسبت به گروه مدل درد القایی با فرمالین کاهش معنی داری یافت (به ترتیب $P=0.000$ یا $P=0.000$) (شکل ۲). کاهش معنی داری در بیان ژن *Pmch* در گروه دریافت کننده ۴۰ میکروگرم کرایزین نسبت به گروه دریافت کننده ۲۰ میکروگرم مشاهده شد ($P=0.018$) (شکل ۲).

القای درد: کرایزین (Cas No. 480-40-0, Co, USA) از سیگما

آلد ریچ خریداری شد ($n=5$). برای القای درد فرمالین ۵ درصد تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر فرمالین با استفاده از سرنگ ۳۰ گیج به صورت زیر جلدی به کف پای عقب موش‌های صحرایی تزریق شد (۱۳).

گروهبندی و تزریق دارو: موش‌های صحرایی به چهار گروه تقسیم

شدند به گروه اول به عنوان گروه کنترل سالم و گروه دوم به عنوان مدل درد القایی با فرمالین سالیین تزریق شد. ۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین گروه سوم و چهارم به عنوان گروه‌های درد القایی با فرمالین، به ترتیب ۲۰ و ۴۰ میکروگرم کرایزین را از طریق بطن سوم مغزی دریافت کردند (۱۴).

جداسازی نمونه هیپوتالاموس: در پایان مطالعه، دو ساعت بعد

از تزریق فرمالین حیوانات بی‌هوش شدند (۱۵). برای برداشتن مغز جمجمه شکافته شد. سپس سطح شکمی مغز به سمت بالا قرار داده شد و یک برش به ضخامت ۴ میلی‌متر حاوی هیپوتالاموس (از جلو از مجاورت اپتیک کراسما، از پشت تا مجاورت دستگاه پستانی - تالاموسی و به طور جانبی تا شیار هیپوتالاموسی) تهیه شد. بلافاصله نمونه هیپوتالاموس در نیتروژن مایع قرار گرفت و سپس به یخچال ۸۰- منقل شد.

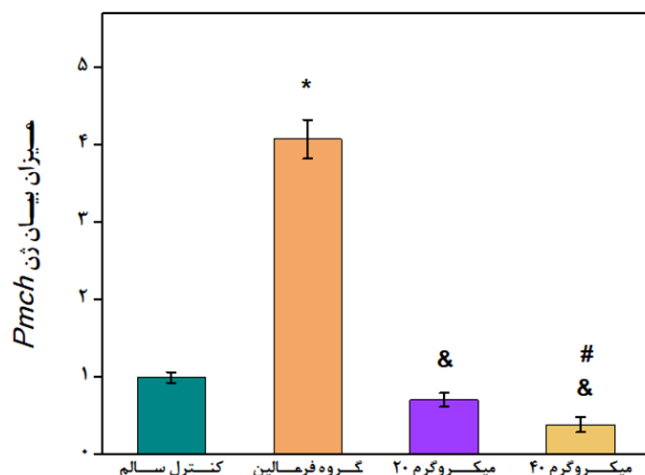
واکنش زنجیره‌های پلی‌مراز (RT-PCR): جداسازی RNA

مطلق براساس روش گوانیدین تیوسیانات- فنل- کلروفرم بر طبق دستورالعمل کیت تریزول (تریزول، آلمان) انجام شد. سپس غلظت RNA با استفاده از نانودراپ تعیین گردید. طبق دستورالعمل کیت یک میکروگرم از RNA برای سنتز cDNA استفاده شد (بایوتک ریت، آلمان). پس از سنتز cDNA قطعه مورد نظر ژن‌ها بر حسب دستورالعمل کیت مستر میکس سایبرگرین (شرکت تاکارا، ژاپن) و با استفاده از دستگاه RT-PCR تکثیر شد. برنامه زمانی برای واکنش PCR کمی شامل یک چرخه 95°C برای ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه 95°C برای ۲۰ ثانیه، 60°C به مدت ۱۵ ثانیه و 72°C برای ۱۰ ثانیه بود. پرایمرها از شرکت ژن فناوری ایران تهیه شدند. توالی پرایمرهای سنس و آنتی سنس مورد استفاده طبق جدول ۱ می‌باشد (۱۶). محصولات گلیسرید آلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH)، *Hprt* و *Pmch* حاصل به ترتیب ۱۲۰، ۸۷ و ۱۹۵ جفت باز هستند. برای ارزیابی سطح بیان نسبی ژن‌ها از فرمول زیر استفاده شد:

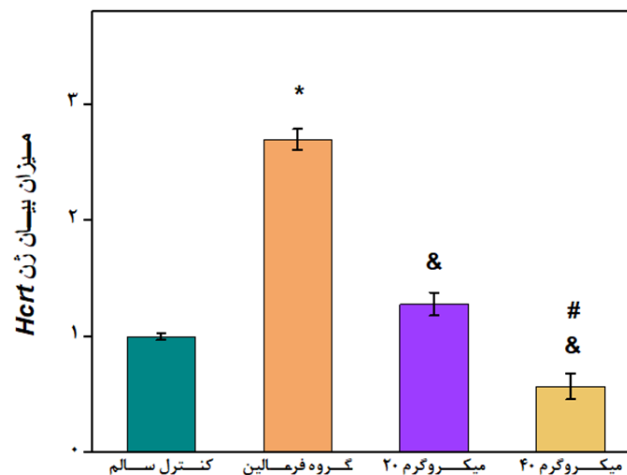
$$\Delta C_t = C_t (\text{GAPDH}) - C_t (\text{ژن مورد نظر})$$

$$R = 2^{-\Delta C_t} \quad (\text{گروه ها}) \quad \Delta C_t$$

$$R = 2^{-\Delta C_t} \quad (\text{میزان بیان نسبی ژن هدف})$$



شکل ۲: اثرات ۲۰ و ۴۰ میکروگرم کرایزین بر میانگین بیان نسبی ژن Pmch در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مدل درد القایی با فرمالین
 نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM ارائه شده است $n=5$ و $P \leq 0.05$. * برای آنالیز داده‌ها آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. #: در مقایسه با کنترل، &: در مقایسه با گروه مدل درد القایی با فرمالین



شکل ۱: اثرات ۲۰ و ۴۰ میکروگرم کرایزین بر میانگین بیان نسبی ژن Hcrt در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی مدل درد القایی با فرمالین
 نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM ارائه شده است $n=5$ و $P \leq 0.05$. * برای آنالیز داده‌ها آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. #: در مقایسه با گروه کنترل، &: در مقایسه با گروه درد القایی با فرمالین، #: در مقایسه با گروه دریافت کننده ۲۰ میکروگرم کرایزین

بحث

در مطالعه حاضر، اثر کرایزین بر بیان ژن‌های *Pmch* و *Hcrt* در موش‌های صحرایی نر مدل فرمالین بررسی شد. در گروه مدل فرمالین بیان ژن *Hcrt* نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. این یافته مطابق با مطالعات قبلی است که فعال شدن نورون‌های ارکسین به دنبال درد مزمن را نشان می‌دهد (۵، ۶). مطالعات توزیع نورون‌های ارکسین در نواحی مختلف مغز مرتبط با درد مانند ناحیه هیپوتالاموس جانبی، قشر اینسولا و ساقه مغز را نشان می‌دهند. گزارش شده است هیپوتالاموس جانبی پتانسیل کنترل پاسخ‌های مرتبط با درد را دارد (۱۷). نورون‌های هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (CRH) در هسته پاراونتریکولار (PVN) هیپوتالاموس نقش مهمی در پاسخ‌های درد و استرس ایفا می‌کنند. هم‌چنین، نورون‌های ارکسین در هسته PVN در بالادست نورون‌های CRH قرار دارند که نشان دهنده تعامل بین نورون‌های CRH با نورون‌های ارکسین می‌باشد، طوری که شواهد آزمایشگاهی نشان می‌دهد به دنبال تزریق ارکسین فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) و سیستم سمپاتیکی افزایش می‌یابد (۱۸، ۱۹). هم‌چنین هیپوتالاموس با سایر نواحی مغز در کنترل درد مشارکت می‌کند. قشر اینسولا یکی از نواحی مهم دریافت ورودی‌های مربوط به درد است و ورودی‌هایی از هیپوتالاموس جانبی را دریافت می‌کند. در واقع ورودی‌های ارکسین‌ژیک از هیپوتالاموس جانبی به این ناحیه می‌رسند که احتمالاً در تعدیل درد نقش دارند (۲۰). در هسته PVN هیپوتالاموس تعدادی از انتقال دهنده‌های

عصبی تحریکی و مهاری وجود دارند که با همکاری یکدیگر فعالیت عصبی آن را کنترل می‌کنند. گلوتامات یک انتقال دهنده عصبی تحریکی شناخته شده در سیستم عصبی مرکزی است. مطالعات نشان داده است که گیرنده‌های گلوتاماتی از نوع N-متیل-دی-آسپارات (NMDA) در PVN اثر تحریکی بر فعالیت محور HPA و به دنبال آن فعال شدن مسیر سمپاتیکی و القای درد دارند (۲۱). گلوتامات در ارتباط با سیستم ارکسین‌ژیک نقش مهمی در کنترل درد ایفاء می‌کند. نشان داده شده است که پاپانه‌های آکسون گلوتاماترژیک با نورون‌های ارکسین سیناپس برقرار می‌کنند طوری که گلوتامات باعث افزایش سنتز و آزاد سازی ارکسین می‌شود (۲۲). علاوه بر سیستم گلوتاماترژیک نورون‌های ارکسین با سیستم گابارژیک نیز در تعامل هستند. گزارش شده است که نورون‌های گابارژیک در هیپوتالاموس جانبی با نورون‌های ارکسین ارتباط دارند به این صورت که تحریک نورون‌های گابارژیک در مغز جوندگان باعث کاهش فعالیت نورون‌های ارکسین می‌گردد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که نورون‌های گابارژیک پیام‌های مهاری مستقیمی را به نورون‌های ارکسین ارسال می‌کنند (۲۳). به علاوه، اهمیت گیرنده‌های GABA_B در پردازش درد با تزریق باکلوفن (آگونیست گیرنده GABA_B) در مدل‌های درد حاد و مزمن تایید شده است (۲۴). مطالعات قبلی نشان می‌دهد کرایزین نقش تنظیمی روی سیستم گابارژیک و گلوتاماترژیک دارد. اثرات کرایزین بر کاهش سطح گلوتامات در هیپوکمپ و تحریک فعالیت سیستم گابارژیک نشان داده شده است (۲۵). هم‌چنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که کرایزین با فعال سازی گیرنده گابا می‌تواند اثرات ضد درد

افزایش فعالیت نورون‌های MCH می‌شود (۳۴). هم‌چنین بررسی‌ها نشان می‌دهد اکثر نورون‌های MCH هیپوتالاموس جانبی تحت کنترل اثرات تحریکی گلوتامات و اثرات مهاري نورون‌های گابا هستند (۳۵). بنابراین، تزریق داخل مغزی کرایزین به دلیل عملکرد گاباژئیک و ضد گلوتاماترژیک ممکن است از طریق سرکوب فعالیت نورون‌های CRH منجر به مهار بیان ژن *Pmch* هیپوتالاموس در موش‌های مدل در القایی با فرمالین شود. به‌طور خلاصه نتایج تحقیق حاضر نشان داد درد القایی با فرمالین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *Hert* و *Pmch* در هیپوتالاموس شد. تزریق داخل مغزی کرایزین بیان‌ژن‌های *Hert* و *Pmch* را در مقایسه با گروه درد به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در اعمال اثرات ضد دردی کرایزین ممکن است مکانسیم‌های مولکولی داخل هیپوتالاموسی در بالادست محور هیپوتالاموس هیپوفیز آدرنال دخالت داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی و معنوی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

1. Du, J., Yi, M., Xi, D., Wang, S., Liu, B., Shao, X., Liang, Y., He, X., Fang, J. and Fang, J., 2023. Satellite glial cells drive the transition from acute to chronic pain in a rat model of hyperalgesia priming. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 16: 1-13. doi.org/10.3389/fnmol.2023.1089162.
2. Mohammadi, S., Zarei, M., Zarei, M.M. and Salehi, I., 2016. Effect of hydroalcoholic leaves extract of *Rhus Coriaria* on pain in male rats. *Anesthesiology and pain medicine*. 6(1): 1-5. doi: 10.5812/aapm.32128.
3. Skindar, H., Jaspreet, K., Singh, B.S. and Deepak, K., 2022. Evaluation of Chronic Constriction Injury Induced Neuropathic Pain Using Chrysin in Rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 56(3): S462-S468. doi: 10.5530/ijper.56.3s.154.
4. Hong, J.S., Feng, J.H., Park, J.S., Lee, H.J., Lee, J.Y., Lim, S.S. and Suh, H.W., 2020. Antinociceptive effect of chrysin in diabetic neuropathy and formalin-induced pain models. *Animal Cells and Systems*. 24(3): 143-150. doi.org/10.1080/19768354.2020.1765019.
5. Soya, S. and Sakurai, T., 2020. Evolution of orexin neuropeptide system: structure and function. *Frontiers in Neuroscience*. 14: 1-9. doi.org/10.3389/fnins.2020.00691.
6. Ten-Blanco, M., Flores, A., Cristino, L., Pereda Pérez, I. and Blendowski, F., 2023. Targeting the orexin/hypocretin system for the treatment of neuropsychiatric and neurodegenerative diseases: From animal to clinical studies. *Front Neuroendocrinol*. 69: 101066. doi: 10.1016/j.yfrne.2023.101066.
7. Tsunematsu, T. and Yamanaka, A., 2012. The role of orexin/hypocretin in the central nervous system and peripheral tissues. *Vitamins & Hormones*. 89: 19-33. doi: 10.1016/B978-0-12-394623-2.00002-0.
8. Shin, H., Kim, J., Choi, S.R., Kang, D.W., Moon, J.Y., Roh, D.H., Bae, M., Hwang, J. and Kim, H.W., 2023. Antinociceptive effect of intermittent fasting via the orexin pathway on formalin-induced acute pain in mice. *Scientific Reports*. 13(1): 20245. doi.org/10.1038/s41598-023-47278-3.

خود را اعمال کند. طوری که تجویز خوراکی کرایزین منجر به کاهش درد می‌شود. به‌علاوه بهبود رفتارهای مربوط به درد با آزمایش صفحه داغ در موش‌های دریافت‌کننده کرایزین نشان داده شده است (۲۶). کرایزین ممکن است از طریق مهار فعالیت سیستم گلوتاماترژیک و تحریک فعالیت سیستم گاباژئیک که با نورون‌های CRH در تعامل هستند باعث کاهش بیان ژن *Hert* در موش‌های صحرایی مدل درد شود. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که فعالیت سیستم سمپاتیکی در ارتباط با القای درد می‌باشد. نورون‌های نوراپی‌نفرین در هسته‌های PVN و سوپراپتیک هیپوتالاموس ممکن است نقش مهمی در پاسخ‌های هیپوتالاموس به محرک‌های درد داشته باشند (۲۷). مشاهده شده است که فرایند درد غلظت نوراپی‌نفرین را در این هسته‌ها افزایش می‌دهد (۲۸). هم‌چنین ارتباط بین کاتاکول‌آمین‌ها و سیستم‌ارکسینرژیک ثابت شده است. نورون‌های کاتاکول‌آمین مغز، نورون‌های ارکسین در موش‌های صحرایی را فعال می‌کنند (۲۹). از طرف دیگر کرایزین با سیستم سمپاتیکی در ارتباط است و باعث مهار فعالیت آن می‌شود (۳۰). در نتیجه مکانسیم احتمالی دیگر در اعمال اثرات مهاري کرایزین بر بیان ژن *Hert* و مهار درد می‌تواند از طریق سرکوب فعالیت سیستم سمپاتیکی اعمال شود. نتایج حاضر نشان داد که در موش‌های صحرایی مدل درد القایی با فرمالین میزان بیان ژن *Pmch* نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. مطالعات قبلی نشان دادند که القای درد در جوندگان با افزایش سنتز MCH همراه است (۱۰). مطالعات نشان داده است که MCH نقش مهمی در تعدیل درد دارد، به‌منظور تایید اثرات ضد دردی MCH، از تزریق آنتاگونیست گیرنده آن استفاده کرده و نشان دادند که آنتاگونیست MCH اثرات ضد دردی ناشی از MCH را بلوکه می‌کند (۱۰). به‌نظر می‌رسد بین سیستم دوپامینرژیک و MCH رابطه نزدیکی وجود دارد. فقدان MCH منجر به افزایش آزادسازی دوپامین و افزایش تنظیم گیرنده‌های دوپامین می‌شود. از سوی دیگر، دوپامین آزادسازی MCH را کاهش می‌دهد (۳۱). هم‌چنین گزارش شده است که درد مزمن منجر به تحریک آزادسازی دوپامین می‌شود (۳۲). مطالعات قبلی نشان داده است درمان با کرایزین تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون را به شدت کاهش می‌دهد (۳۳). بر این اساس کرایزین ممکن است فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک را افزایش دهد که به دنبال افزایش دوپامین بیان ژن *Pmch* کاهش می‌یابد. براساس شواهد پیشین، نورون‌های MCH واقع در هسته جانبی هیپوتالاموس نقش مهمی در کنترل درد دارند. نورون‌های MCH در هسته PVN مجاور نورون‌های CRH قرار گرفته است که نشان‌دهنده ارتباط بین سیستم MCH با محور HPA می‌باشد. ثابت شده است که MCH فعالیت محور HPA را از طریق نورون‌های CRH تحریک می‌کند و از سوی دیگر تزریق کورتیکواسترون باعث

22. Eyigor, O., Minbay, Z. and Kafa, I.M., 2012. Glutamate and orexin neurons. *Vitamins & Hormones*. 89: 209-22. doi.org/10.1016/B978-0-12-394623-2.00011.1.
23. Saito, Y.C., Tsujino, N., Hasegawa, E., Akashi, K., Abe, M., Mieda, M., Sakimura, K. and Sakurai, T., 2013. GABAergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. *Frontiers in neural circuits*. 7: 192. doi.org/10.3389/fncir.2013.00192.
24. Goudet, C., Magnaghi, V., Landry, M., Nagy, F., Gereau, I.V. R.W., Pin, J.P., 2009. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain research reviews*. 60(1): 43-56. doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.007.
25. Bortolotto, V.C., Araujo, S.M., Pinheiro, F.C., Poetini, M.R. and de Paula, M.T., 2020. Meichtry, L.B., de Almeida, F.P., Musachio, E.A., Guerra, G.P., Prigol, M., Modulation of glutamate levels and Na⁺, K⁺-ATPase activity contributes to the chrysin memory recovery in hypothyroidism mice. *Physiology & behavior*. 222: 112892. doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112892.
26. Rayiti, R.K., Munnangi, S.R., Bandarupalli, R., Chakka, V., Nimmagadda, S.L., Sk, L.S., Uppalapati, S., Bolla, R. and Challa, S.R., 2020. Effect of chrysin on mechanical hyperalgesia in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rat model. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 10(3): 189. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR.58.19
27. Cunningham, J.R.E.T. and Sawchenko, P.E., 1988. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *Journal of comparative neurology*. 274(1): 60-76. doi.org/10.1002/cne.902740107.
28. Yang, J., Yuan, H.F., Liu, W.Y., Zhang, X.X., Feng, J.P., Ni, N., Yang, D.W., Song, C.Y., Xu, H.T., Wang, G. and Song, C., 2009. Norepinephrine regulates arginine vasopressin secretion in hypothalamic paraventricular nucleus relating with pain modulation. *Neuropeptides*. 43(4): 259-265. doi.org/10.1016/j.npep.2009.06.003.
29. Li, A.J., Wang, Q., Elsarelli, M.M., Brown, R.L. and Ritter, S., 2015. Hindbrain catecholamine neurons activate orexin neurons during systemic glucoprivation in male rats. *Endocrinology*. 156(8): 2807-2820. doi.org/10.1210/en.2015.1138.
30. Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Azimin-Nezhad, M. and Samini, F., 2015. Effect of chrysin on nociception in formalin test and serum levels of noradrenalin and corticosterone in rats. *International journal of clinical and experimental medicine*. 8(2): 2465. PMID: PMC4402837.
31. Torterolo, P., Benedetto, L. and Monti, J.M., 2016. Functional interactions between MCHergic and dopaminergic neurons: role in the control of wakefulness and sleep. *Dopamine and Sleep: Molecular, Functional, and Clinical Aspects*. 47-63. doi.org/10.1007/978-3-319.46437-4.4.
32. Taylor, A.M., Becker, S., Schweinhardt, P. and Cahill, C., 2016. Mesolimbic dopamine signaling in acute and chronic pain: implications for motivation, analgesia, and addiction. *Pain*. 157(6): 1194. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000494.
33. Ahmed, M.R., Shaikh, M.A., Haq, S.H. and Nazir, S., 2018. Neuroprotective role of chrysin in attenuating loss of dopaminergic neurons and improving motor, learning and memory functions in rats. *International Journal of Health Sciences*. 12(3): 35-43. doi.org/10.1008/ID: 4835 2700.
34. He, X., Li, Y., Zhang, N., Huang, J., Ming, X., Guo, R., Hu, Y., Ji, P. and Guo, F., 2022. Melanin-concentrating hormone promotes anxiety and intestinal dysfunction via basolateral amygdala in mice. *Frontiers in Pharmacology*. 13: 1-17. doi.org/10.3389/fphar.2022.906057.
35. Chee, M.J., Hebert, A.J., Briançon, N., Flaherty, S.E., Pissios, P. and Maratos-Flier, E., 2019. Conditional deletion of melanin-concentrating hormone receptor 1 from GABAergic neurons increases locomotor activity. *Molecular Metabolism*. 29: 114-123. doi.org/10.1016/j.molmet.2019.08.018.
9. Nahon, J.L., Joly, C., Levan, G., Szpirer, J. and Szpirer, C., 1992. Pro-melanin-concentrating hormone gene (PMCH) is localized on human chromosome 12q and rat chromosome 7. *Genomics*. 12(4): 846-848. doi.org/10.1016/0888-7543(92)90323-K.
10. Jang, J.H., Park, J.Y., Oh, J.Y., Bae, S.J., Jang, H., Jeon, S., Kim, J. and Park, H.J., 2018. Novel analgesic effects of melanin-concentrating hormone on persistent neuropathic and inflammatory pain in mice. *Scientific Reports*. 8(1): 707. doi.org/10.1038/s41598-018-19145-z.
11. Nezhaddadgar, L., Mahmoudi, F. and Khazali, H., 2024. Effects of dopamine and L-dopa on ghrelin gene expression in the hypothalamus and ovary in a polycystic ovarian syndrome rat model. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 28(6): 1-11. http://sjku.muk.ac.ir/article-1-7361-en.html.
12. Bagheripoor, M., Khazali, H., Mahmoudi, F. and Samiee, K., 2018. The effects of morphine sulphate on hypothalamic glutamate levels and serum LH hormone concentration in male rats. *Journal of Animal Environment*. 10(2): 45-50. 20.1001.1.27171388.1397.10.2.6.1 (In Persian)
13. Fathalipour, M., Delnavazi, M.R., Safa, O., Zarifinia, N. and Rafiee, B., 2020. Antioxidant and antinociceptive effects of hydroalcoholic root extract of *Asparagus officinalis* L. *Physiology and Pharmacology*. 24(4): 322-330. doi.org/10.32598/ppj.24.4.30
14. Medina, J.H., Paladini, A.C., Wolfman, C., de Stein, M.L., Calvo, D., Diaz, L.E. and Peña, C., 1990. Chrysin (5, 7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. *Biochemical pharmacology*. 40(10): 2227-2231. doi.org/10.1016/0006-2952(90)90716-X.
15. Lu, X., Geng, X., Zhang, Y., Dong, H. and Yu, H., 2009. Substance P expression in the distal cerebrospinal fluid-contacting neurons & spinal trigeminal nucleus in formalin-induced the orofacial inflammatory pain in rats. *Brain research bulletin*. 78(4-5): 139-144. 10.1016/j.brainresbull.2008.11.011.
16. Haghighat, K.H., Mahmoudi, F., Bayrami, A. and Zahri, S., 2020. Influences of L-DOPA and blocking dopamine receptors on aromatase gene expression and serum concentration of LH in rat model of polycystic ovary syndrome. *Journal of Advanced Biomedical Sciences*. 10(3): 2448-2455. https://orcid.org/0000-0001.6092-1352.
17. Wang, D., Pan, X., Zhou, Y., Wu, Z., Ren, K., Liu, H., Huang, C., Yu, Y., He, T., Zhang, X. and Yang, L., 2023. Lateral septum-lateral hypothalamus circuit dysfunction in comorbid pain and anxiety. *Molecular Psychiatry*. 28(3): 1090-1100. doi.org/10.1038/s41380.022-01922-y.
18. Plaza-Zabala, A., Flores, Á., Maldonado, R. and Berrendero, F., 2012. Hypocretin/orexin signaling in the hypothalamic paraventricular nucleus is essential for the expression of nicotine withdrawal. *Biological Psychiatry*. 71(3): 214-223. doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.025.
19. Lungwitz, E.A., Molosh, L., Johnson, P.L., Harvey, B.P., Dirks, R.C., Dietrich, A., Minick, P. and Shekhar, A., 2012. Truitt, W.A., Orexin-A induces anxiety-like behavior through interactions with glutamatergic receptors in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Physiology & behavior*. 107(5): 726-732. doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.05.019.
20. Usui, M., Kaneko, K., Oi, Y. and Kobayashi, M., 2019. Orexin facilitates GABAergic IPSCs via postsynaptic OX1 receptors coupling to the intracellular PKC signalling cascade in the rat cerebral cortex. *Neuropharmacology*. 149: 97-112. doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.012.
21. Li, Y.F., Jackson, K.L., Stern, J.E., Rabeler, B. and Patel, K.P., 2006. Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1(6): H2847-H2856. doi.org/10.1152/ajpheart.00625.2005.