

## Effect of trigeminal nucleus caudalis orexin 1 receptor on capsaicin orofacial pain- induced and expression of C-fos in adult male rats

Mehri Bahaaddini<sup>1</sup>, Saeed Esmaeili-Mahani<sup>2\*</sup>,  
Saeed Khatamsaz<sup>1</sup>, Mehdi Abbasnejad<sup>2</sup>,  
Maryam Raof<sup>3</sup>

1. Professor, Department of Biology, College of Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran and Department of Biology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3. Associate Professor, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran and Department of Endodontics, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

(Received: Nov. 26, 2016 - Accepted: Aug. 4, 2018)

### Abstract

Orexin A and orexin B are hypothalamic neuropeptides that have critical roles in the regulation of physiological responses such as pain. C-fos is neural activity markers in painful situations. This study was designed to evaluate the role of trigeminal nucleus caudalis (TNC) orexin 1 receptor on capsaicin-induced orofacial pain and c-fos expression in TNC. In this experimental study, 70 male Wistar rats (200-250 g) were randomly allocated into 10 groups: control, pain, sham surgery, sham capsaicin, surgery and pain, sham orexin A and pain, orexin A (50 pM/rat) and pain, sham SB-334867 and pain, SB-334867 (40 nM/rat) as antagonist and pain, orexin A plus SB-334867 and pain. Following cannula implantation and recovery period, the drugs were administration 20 min before capsaicin injection. C-fos expression in TNC was evaluated using immunohistochemistry. The capsaicin-injected rats showed a significant pain behavior and expression c-fos ( $p < 0.001$ ). Orexin A significantly inhibited capsaicin-induced pain and decreased c-fos expression ( $p < 0.001$ ). Pretreatment with SB-334867 could prevent the effects of orexin A. SB-334867 alone exaggerated capsaicin-induced pain responses. The level of c-fos was high in SB-334867-treated rats some as capsaicin group. SB-334867 could partially inhibit the effect of orexin A on c-fos orexin A expression.

**Keywords:** C-FOS, Orexin A, orofacial pain, SB-334867, trigeminal nucleus caudalis.

## بررسی نقش گیرنده ارکسین ۱ هسته دمی عصب سه قلو بر بروز درد دهانی - صورتی ناشی از کاپسایسین و بیان c-fos در موش‌های صحرائی نر بالغ

مه‌ری به‌الدینی<sup>۱</sup>، سعید اسماعیلی‌ماهانی<sup>۲\*</sup>، سعید خاتم‌ساز<sup>۱</sup>،  
مه‌دی عباس‌نژاد<sup>۲</sup>، مریم رئوف<sup>۳</sup>

۱. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران و گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
  ۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
  ۳. دانشیار، مرکز علوم و اعصاب دانشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران و گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۵/۱۳)

### چکیده

ارکسین A و ارکسین B، نوروپپتیدهای هیپوتالاموسی می‌باشند که نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیک از جمله درد دارند. C-fos یکی از شاخص‌های فعالیت نورونی در شرایط بروز درد می‌باشد. پژوهش حاضر به منظور بررسی نقش گیرنده ارکسین ۱ هسته دمی عصب سه قلو در بروز درد دهانی صورتی ناشی از کپسایسین و بیان c-fos در این ناحیه طراحی شد. در این مطالعه تجربی از ۷۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار، در محدوده وزنی ۲۵۰ - ۲۰۰ گرم استفاده شد، که به طور تصادفی در ۱۰ گروه ۷ تایی شامل: کنترل، درد، شام جراحی، شام کاپسایسین، جراحی و درد، شام ارکسین A و درد، ارکسین A (50 pM/rat) و درد، شام SB-334867 و درد، شام SB-334867 (40 nM/rat) به عنوان آنتاگونیست و درد و گروه دریافت‌کننده ارکسین A و SB-334867 به صورت توأم و درد، قرار گرفتند. پس از کانول‌گذاری و دوره بهبودی، تزریق داروها و ۲۰ دقیقه بعد تزریق کاپسایسین صورت پذیرفت. میزان بیان c-fos با روش ایمونوهیستوشیمی در هسته دمی عصب سه قلو ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان داد که تزریق کاپسایسین به صورت معنی‌داری موجب افزایش پاسخ‌های درد و افزایش بیان c-fos می‌گردد ( $p < 0.001$ ). ارکسین A منجر به مهار درد القا شده توسط کاپسایسین و بیان c-fos گردید ( $p < 0.001$ ). پیش‌درمانی با SB-334867 این اثر را حذف نمود ( $p < 0.001$ ). تزریق SB-334867 به تنهایی سبب تشدید پاسخ‌های درد ناشی از کپسایسین گردید ( $p < 0.001$ ). بیان c-fos در گروه دریافت‌کننده SB-334867 همانند گروه درد بالا بود ( $p < 0.001$ ). SB-334867 باعث مهار نسبی اثر کاهشی ارکسین A بر c-fos گردید.

**واژه‌های کلیدی:** درد دهانی - صورتی، هسته دمی عصب سه قلو، ارکسین A، SB-334867، C-fos.

## مقدمه

درد دهانی- صورتی از سر، صورت، گردن و تمام بخش‌های داخل دهانی منشا گرفته و دربردارنده طیف وسیعی از اختلالات شدید درد می‌باشد، که تأثیر مهمی بر جنبه‌های روانی و اجتماعی افراد می‌گذارد (Siqueira et al., 2017) و از مهمترین انواع آن می‌توان به درد دندان و دردهای میگرنی و درد نواحی مختلف دهان اشاره نمود (Tarsa et al., 2010). بخش نخاعی سیستم عصب سه قلو از جمله هسته دمی این عصب *Trigeminal Nucleus Caudalis* نقش مهمی در تنظیم و انتقال درد ناشی از منطقه دهانی- صورتی دارد (Balam et al., 2005; Krishnan, 2007). ساختار هسته دمی عصب سه قلو و بخش اتصالی آن به هسته میان قطبی نه تنها در انتقال درد دهانی- صورتی مهم است، بلکه یکی از نواحی تنظیمی این نوع درد می‌باشد، که فیبرهای نزولی تنظیم درد را دریافت می‌کند (Sessle, 2000). ارکسین A و ارکسین B، نوروپپتیدهای هیپوتالاموسی می‌باشند و از پیش‌ساز ۱۳۱-۱۳۰ اسیدآمینوای پری‌پره ارکسین سنتز می‌شوند و دارای دو گیرنده جفت‌شونده با G پروتئین می‌باشند. مطالعات بافت‌شناسی نشان داده است که نورون‌های ارکسین A در مناطق گوناگون مغزی وجود دارد و دارای ویژگی‌های عملکردی متفاوتی هستند (Sakurai et al., 1998). شواهد زیادی نقش سیستم ارکسینرژیک بر درد را تأیید می‌کند (Berridge et al., 2010). شواهد تجربی در نقش احتمالی ارکسین در تعدیل پردازش پروسه درد متناقض است، اما به هر حال نوروپپتیدهای ارکسین A و B که در بخش پشتی و جانبی هیپوتالاموس ساخته می‌شوند، در پروسه درد نقش دارند (Holland et al., 2005). مشخص شده است که سیستم ارکسینرژیک در شرایط التهابی منجر به افزایش آستانه درد می‌گردد و مسلماً این اثر در سیستم عصبی مرکزی میانجی‌گری می‌شود (Wantabe et al.,

2005). در تحقیقات متعددی که توسط Bingham et al. (2001) صورت پذیرفت، نشان داده شد که تزریق وریدی ارکسین A در موش‌های صحرایی موجب پردردی القا شده توسط کارگینان و موجب کاهش درد در مدل صفحه داغ شد و آنها نتیجه گرفتند که این عمل در اثر تحریک گیرنده‌های محیطی ارکسین A انجام می‌شود. در مطالعه دیگری اثرات بی‌دردی ناشی از تزریق داخل نخاعی ارکسین A به‌وسیله پیش‌درمانی با آنتاگونیست ارکسین A (SB334867) مهار و تزریق داخل نخاعی ارکسین A موجب کاهش بیان fos ناشی از تزریق فرمالین در نخاع شد (Yamamoto et al., 2003). همچنین وجود استتاله‌های ارکسین A در هسته‌های مغزی درگیر در تعدیل درد به‌عنوان دلایل اثرات ضد دردی ارکسین A بیان شده و واکنش‌های ایمنوهیستوشیمی این اثرات را تأیید نمود (Ciriello et al., 2003). در تحقیقی که در مورد آسیب‌شناسی میگرن در هسته دمی عصب سه قلو و فعالیت گیرنده ارکسین ۱ صورت پذیرفت، نشان داده شد که تحریک الکتریکی رگ‌های خونی در انسان باعث فعال شدن هسته دمی عصب سه قلو می‌گردد و ارکسین A می‌تواند منجر به مهار پاسخ فیبرهای A از طریق گیرنده ارکسین ۱ گردد (Holland et al., 2005). پایانه‌های ارکسینی به بخش‌های متفاوتی از سیستم عصبی مرکزی ختم می‌شوند. گیرنده ارکسین ۱ در هیپوتالاموس خلفی دارای ترمینال‌هایی به هسته دمی عصب سه قلو می‌باشد که موجب اثر ضددردی می‌گردد (Bartsch et al., 2004).

امروزه بررسی مکانیسم‌های مولکولی در برابر تحریکات محیطی، یکی از پر اهمیت‌ترین موضوعات بیولوژی نوین محسوب می‌شود. گاهی محرک موجب تحریک مولکول‌های پیامبر و ایجاد اثرات مستقیمی بر ژنوم می‌شود، ولی در مواردی دیگر، گروهی از محرک‌های خارج سلول از طریق ژن‌های بیان فوری باعث فعال شدن و ایجاد پاسخ‌های مناسب می‌گردند

چگونگی عملکرد ارکسین A بر این هسته و همچنین ارتباط بیان c-fos به عنوان یک شاخص ارزشمند فعالیت نورون‌های درد (Suprinsinchai *et al.*, 2015)، مطالعه حاضر در این ناحیه صورت پذیرفت و تلاش بر آن است که با شناسایی مسیرهای مغزی و شناخت هر چه بهتر هورمون‌ها و مارکرهای درگیر در پدیده درد بتوان راهگشایی هر چند کوچک در این مسیر بود.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات مورد استفاده

در این مطالعه تجربی از ۷۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد، موش‌ها به آب و غذا دسترسی کامل داشتند. حیوانات در دمای  $(23 \pm 2)$  درجه سانتیگراد و در شرایط روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری می‌شوند. قبل از شروع تست‌ها، موش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار می‌گرفتند تا استرس ناشی از محیط جدید به حداقل برسد. تمامی تست‌ها بین ساعت ۸ تا ۱۴ انجام می‌گرفت و قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی در طی همه مراحل رعایت می‌گردید.

### روش جراحی و کانول گذاری

به منظور انجام جراحی استریوتاکسی حیوانات، توسط تزریق درون صفاقی با مخلوط کتامین ۱۰ درصد و گزیلازین ۲ درصد (به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان، کتامین ۶۰ میلی‌گرم و گزیلازین ۴ میلی‌گرم) بی‌هوش شدند. سپس جراحی استریوتاکسی با استفاده از اطلس پاکسینوس انجام گردید و کانول گذاری دوطرفه در هسته دمی عصب سه قلو، با مختصات  $DV = 7.5$ ،  $ML = \pm 2.2$  mm،  $AP = 13.8$  mm انجام گردید. از سر سوزن شماره ۲۲ به عنوان کانول راهنما و از سر سوزن ۲۷ به‌عنوان درپوش کانول تزریقی و برای تثبیت کانول‌ها از پیچ عینک و

(Smith *et al.*, 1992). در این مورد، پروتئین C-fos یک شاخص ارزشمند جهت بررسی چگونگی عملکرد محرک‌ها در سیستم عصبی به حساب می‌آید. C-fos به‌عنوان یک عامل نسخه‌بردار توسط محرک‌های محیطی تولید و موجب تنظیم بیان ژن‌های هدف می‌گردد (Suprinsinchai *et al.*, 2015). تحریکات آسیب‌رسان در نخاع منجر به بیان پروتئین C-fos می‌گردند که می‌تواند به‌عنوان یک ابزار ارزشمند مطالعه درد مورد استفاده قرار گیرد (Munglani *et al.*, 1995). مسلماً شناسایی هر چه بهتر هورمون‌ها و مارکرهای درگیر در پدیده درد می‌تواند در شناسایی مسیرهای کنترل‌کننده مغزی درد و جهت معالجه و پیشگیری از درد راهگشا باشد. تحقیق حاضر به بررسی نقش ارکسین A و آنتاگونیست آن در هسته کوداليس در شرایط درد دهانی-صورتی القاشده با کاپسایسین و همچنین بررسی چگونگی بیان c-fos می‌پردازد. مطالعات متعددی بر روی درد دهانی-صورتی انجام پذیرفته که نشان‌دهنده تأثیرات رفتاری جدی از قبیل بروز اختلالات روانی و اجتماعی (Siqueira *et al.*, 2017)، بیکاری و کاهش کارایی شغلی (Wong *et al.*, 2011; Kramer *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2014) و همچنین ایجاد درد و ناراحتی در سایر نواحی بدن (Maixner *et al.*, 2011) در افراد می‌باشد، لذا این پژوهش به دلیل اهمیت درد دهانی-صورتی و شیوع آن و نیز با توجه به اثبات وجود نقش کنترلی ارکسین بر درد (Berridge *et al.*, 2010) صورت پذیرفته است. از آنجایی که وجود ارتباط بین سیستم ارکسینرژیک مغز با نواحی کنترلی درد از جمله شاخ پشتی نخاع، ناحیه خاکستری دور قنات مغزی، هسته رافه، هیپوکمپ و هیپوتالاموس (Van Den Pol, 1999) نشان داده شده است و از سویی دیگر هسته دمی عصب سه قلو اهمیت بسیار زیاد در انتقال درد و کنترل دردهای دهانی-صورتی دارد (Balam *et al.*, 2007; Krishnan, 2007)، لذا جهت بررسی

سیمان دندانپزشکی استفاده شد (Kooshki *et al.*, 2016; Paxinos & Watson, 1998).

### تزریق داروها

تزریق دارو و آزمایش پس از دوره بهبودی یک هفته‌ای صورت گرفت. تزریق داروها با تکنیک پیش راندن حباب به کمک سرنگ هاملتون ۱۰ میکرولیتری و با استفاده از لوله پلی‌اتیلن شماره ۱۰ با سرعت یک میکرولیتر دارو در هر دقیقه انجام شد. تزریقات بین ساعات ۸ تا ۹ صبح صورت می‌گرفت و ۲۰ دقیقه بعد از دریافت داروها، تزریق کاپسایسین ( $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) در لب بالا انجام می‌پذیرفت. پس از انجام آزمایشات حیوانات کشته شده و مغز آنها به صورت تازه در فرمالین ۲۰ درصد جهت فیکس شدن قرار داده می‌شد. جمع‌آوری مغز حیوان جهت بررسی صحت جایگاه تزریق انجام می‌گرفت. پس از فیکس شدن با تهیه برش‌های ۱۵۰-۲۰۰ میکرونی و با روش رنگ‌آمیزی نیسل این روند مورد بررسی قرار می‌گرفت و در مواقعی که تزریق در محل مورد نظر نبود، داده‌ها مد نظر قرار نمی‌گرفت و آزمایشات مربوطه برای تعداد مورد نظر تکرار می‌گردید.

### آزمون ارزیابی درد

برای ارزیابی درد از یک جعبه پلکسی گلاس به ابعاد  $35 \times 35 \times 35$  سانتی‌متر استفاده شد، که در کف آن آئینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه قرار داده شده است که اجازه مشاهده بهتر حرکات حیوان را می‌دهد. قبل از اجرای آزمون به حیوان اجازه داده شد که ۳۰ دقیقه با محیط انجام آزمون آشنا شود و رفتار نرمال آن بررسی گردد. تحت شرایط کنترل حیوان ابتدا به جستجو در محیط آزمون با حرکات پاکسازی (grooming) پرداخته و در نهایت در حالت استراحت یا خواب در گوشه جعبه قرار می‌گرفت. ۲۰ دقیقه بعد از تزریق داروها به داخل هسته دمی عصب سه قلو، درد با تزریق کاپسایسین در لب بالا ایجاد می‌گردید و رفتار

حیوان به مدت ۲۰ دقیقه کنترل و زمان درد محاسبه می‌شد. القای درد در این مدل می‌تواند با کمک فرمالین و کاپسایسین انجام شود، اما از آنجایی که مطالعه چیدپاک و همکاران نشان داده که کاپسایسین در مدل درد دهانی - صورتی باعث القای درد بهتری نسبت به فرمالین می‌گردد و حداکثر اثر پیک درد در حضور کاپسایسین در ۲۰ دقیقه است (Chidiac *et al.*, 2002)، در پروژه حاضر از کاپسایسین در مدت زمان ۲۰ دقیقه استفاده شد و مدت زمان مالش صورت (Tamaddonfard *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2017) به عنوان رفتار درد در نظر گرفته شد.

### بررسی بیان پروتئین C-fos با استفاده از روش

#### ایمونوهیستوشیمی در هسته دمی عصب سه قلو

در این روش موش‌ها با مخلوطی از کتامین ۱۰ درصد و زایلازین ۲ درصد بیهوش می‌گردند، در مرحله بعد تزریق ترانس کاردیال سالین ۰/۹ درصد با پارافرم‌آلدهید ۴ درصد در بافر فسفات انجام می‌شود، در مرحله بعد از فیکس شدن، حیوانات کشته و سر آنها جدا و مغز حیوان خارج می‌گردد و مغزها بعد از فیکس شدن در بافر پارافرم‌آلدهید برای ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده می‌شود. برش‌های هیستولوژیک ۲ میکرونی تهیه شده روی لام‌های مخصوص سیالانیزد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها جهت پارافین‌زدایی، ابتدا به مدت یک ساعت در فور با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در گزبلول قرار گرفتند. با قرار گرفتن در غلظت‌های متفاوت اتانول از زیاد به کم (۱۰۰ درصد، ۹۶ درصد، ۷۰ درصد و ۵۰ درصد) و هر مرحله به مدت یک دقیقه، آبدهی صورت پذیرفت.

نمونه‌ها پس از شست‌وشو با بافر تی‌بی‌اس (TBS)، جهت بازیابی آنتی‌ژنی، در بافر  $(\text{Ph}=8)$  Tris-EDTA و به مدت ۲۰ دقیقه در ماکروویو در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، قرار گرفتند. بعد از سرد شدن در محیط، به مدت ۵ دقیقه با بافر تی‌بی‌اس شست و شو داده شدند.

اختصاصی گیرنده ارکسین ۱ ( $50 \text{ pM/rat}$ ) و آب مقطر به عنوان حلال ارکسین A می باشد. محلول SB-334867 (Tocris) 334867 به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده ارکسین ۱ ( $40 \text{ nM/rat}$ ) و dimethyl sulfoxide به عنوان حلال داروی SB-334867 می باشد.

### گروه‌های مورد آزمایش

موش‌های صحرایی به طور تصادفی در ۱۰ گروه ۷ تایی قرار گرفتند. گروه‌ها شامل: گروه کنترل (موش‌های سالم و بدون جراحی)، گروه دریافت‌کننده درد (بدون جراحی، تنها تزریق کاپسایسین در لب بالا)، گروه شاهد جراحی (جراحی در ناحیه TNC، بدون ایجاد درد)، گروه شاهد کاپسایسین (جراحی در ناحیه TNC و تزریق حلال کاپسایسین در لب بالا)، گروه انجام جراحی در ناحیه TNC و دریافت‌کننده کاپسایسین در لب بالا، گروه شاهد ارکسین A (جراحی در ناحیه TNC و تزریق حلال ارکسین A در ناحیه TNC و سپس دریافت کاپسایسین در لب بالا)، گروه‌های دریافت‌کننده ارکسین A در ناحیه TNC (دریافت‌کننده ارکسین A ( $50 \text{ pM/rat}$ ) در TNC و پس از ۲۰ دقیقه دریافت کاپسایسین در لب بالا)، گروه شاهد آنتاگونیست گیرنده ارکسین ۱ (دریافت‌کننده کاپسایسین و دریافت‌کننده حلال گیرنده آنتاگونیست گیرنده ارکسین ۱ (SB334867) در TNC و پس از ۲۰ دقیقه دریافت کاپسایسین در لب بالا)، گروه‌های دریافت‌کننده کاپسایسین و آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) در TNC (دریافت‌کننده SB334867 ( $40 \text{ nM/rat}$ ) در TNC و پس از ۲۰ دقیقه دریافت کاپسایسین در لب بالا)، گروه دریافت‌کننده مؤثرترین دوز آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) ( $40 \text{ nM/rat}$ ) و دریافت‌کننده مؤثرترین دوز آگونیست ارکسین A ( $50 \text{ pM/rat}$ ) به صورت توام در هسته دمی عصب سه قلو و پس از آن کاپسایسین در لب بالا تزریق می‌شد، که این گروه

فعالیت آنزیم پراکسیداز بافتی با استفاده از محلول متانول مطلق  $\text{H}_2\text{O}_2$ ، به مدت ۱۰ دقیقه بلوکه شد. سپس در یک محیط مرطوب، انکوباسیون با آنتی‌بادی اختصاصی اولیه به مدت ۶۰ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد شست‌وشو با بافر TBS، به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از ۳۰ دقیقه Envision که حاوی آنتی‌بادی ثانویه باند شده به بیوتین و استرپتاویدین باند شده به پراکسیداز است، اضافه گردید. برای مشخص شدن باندهای آنتی‌ژن-آنتی‌بادی از کروموژن دی‌آمینوبنزیدین (DAB)، به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه استفاده شد.

برای رنگ‌آمیزی هسته از هماتوکسیلین استفاده شد. بعد از شست‌وشوی نمونه‌ها با آب، مراحل آبیگری و شفاف‌سازی انجام شد. برای آبیگری و شفاف کردن، ابتدا نمونه‌های بافت در اتانول ۵۰٪، بعد اتانول ۷۰٪ و سپس اتانول ۹۶٪ و بعد از آن در بوکال حاوی اتانول ۱۰۰٪ به مدت دو دقیقه قرار گرفتند. بعد از آن در الکل گزیلول به مدت ۱ دقیقه و سپس در دو ظرف حاوی گزیلول هر کدام به مدت ۵ دقیقه جهت شفاف شدن بافت‌ها، قرار داده شدند. برای مونت لام، ابتدا پشت لام‌ها را خشک و سپس یک تا دو قطره چسب مخصوص گزیلول‌فلوئید که به نسبت ۲/۱ با گزیلول رقیق شده بود، لام‌ها مونت و برای بررسی میکروسکوپی آماده شدند (Chamani, 2014).

### داروها

داروهای مورد استفاده عبارتند از: کاپسایسین عصاره سوزناک یک نوع فلفل قرمز و به صورت پودر سفید رنگ کریستالی است که خوردن یا تزریق آن باعث درد می‌شود. در مطالعه حاضر کاپسایسین (Sigma-Aldrich, Swiss) در محلولی شامل ۸۰ درصد آب مقطر، ۱۰ درصد توپین ۸۰ (Merck, Germany)، ۱۰ درصد اتانول خالص (داروپخش، ایران) حل گردید (Chidiac et al., 2009). محلول ارکسین A (Sigma-Aldrich, Swiss) به عنوان آگونیست

ابتدا آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) و سپس آگونیست ارکسین A را در هسته دمی عصب سه قلو دریافت کرده و ۲۰ دقیقه بعد کاپسایسین در لب بالا تزریق می‌شد. جهت سنجش بیان c-fos در هسته دمی عصب سه قلو نیز ۱۰ گروه موش صحرایی دیگر با همین گروه‌بندی مورد ارزیابی قرار گرفتند. دوزهای مورد استفاده داروها بر اساس پژوهش قبلی انتخاب شده‌اند (Bahaaddini et al., 2016).

### محاسبات آماری

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شده‌اند. اختلاف در میانگین مدت زمان درد بین گروه‌های آزمایشی با آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون Tukey تجزیه و تحلیل شدند. در بخش مولکولی نیز میزان بیان c-fos در هسته دمی به وسیله ایمنوهیستوشیمی در گروه‌های مورد مطالعه با کمک آزمون یک‌طرفه ANOVA سنجیده شد.  $P < 0.05$  به عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### نتایج

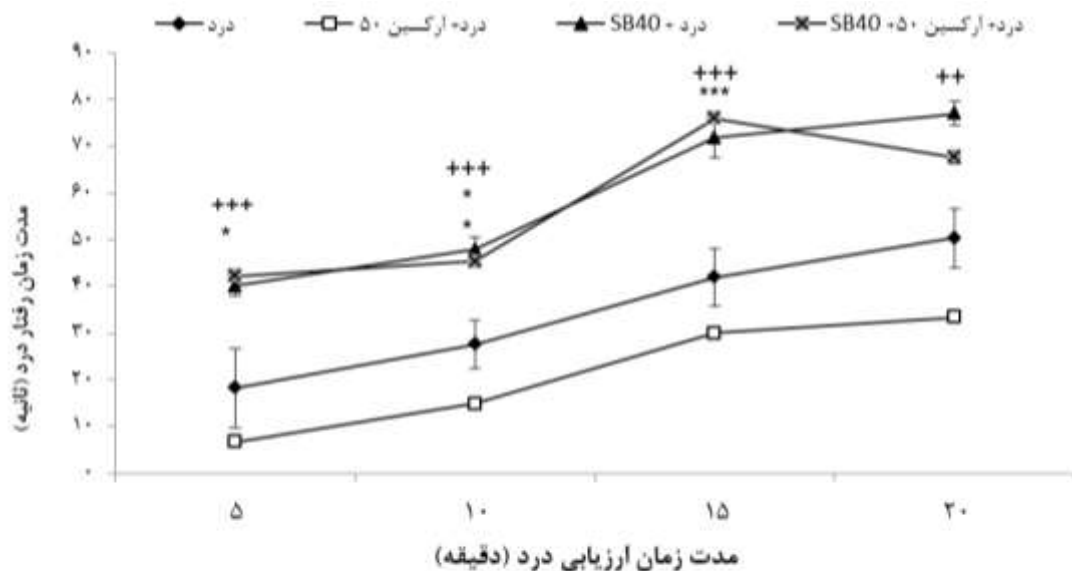
اثر تزریق توام ارکسین A (۵۰ pM/rat) و آنتاگونیست ارکسین A (۴۰ nM/rat) به داخل هسته دمی عصب سه قلو بر مدت زمان رفتار درد دهانی صورتی ناشی از کاپسایسین

مقایسه مدت زمان رفتار درد در ۵ دقیقه اول بین گروه دریافت‌کننده توام ارکسین A (۵۰ pM/rat) و (۴۰ SB-334867 nM/rat) و گروه دریافت‌کننده (۴۰ SB-334867 nM/rat) با گروه دریافت‌کننده کاپسایسین، افزایش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) زمان درد و افزایش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) نسبت به گروه دریافت‌کننده ارکسین A و درد را نشان می‌دهد [f(3,20)=15.382, p=0.0001]. همچنین مقایسه مدت زمان رفتار درد در مدت ۱۰ دقیقه بین گروه دریافت‌کننده توام ارکسین A (۵۰ pM/rat) و (۴۰ SB-334867 nM/rat) و گروه دریافت‌کننده

(۴۰ SB-334867 nM/rat) با گروه دریافت‌کننده کاپسایسین، افزایش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) زمان درد را نشان می‌دهد و افزایش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) نسبت به گروه دریافت‌کننده ارکسین A و درد را نشان می‌دهد [f(3,20)=26.083, p=0.0001]. در ادامه مقایسه مدت زمان رفتار درد در مدت ۱۵ دقیقه بین گروه دریافت‌کننده توام ارکسین A (۵۰ pM/rat) و (۴۰ SB-334867 nM/rat) و گروه دریافت‌کننده (۴۰ SB-334867 nM/rat) با گروه دریافت‌کننده کاپسایسین، افزایش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) زمان درد را نشان می‌دهد و افزایش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) نسبت به گروه دریافت‌کننده ارکسین A و درد را نشان می‌دهد [f(3,20)=34.025, p=0.0001]. مقایسه مدت زمان رفتار درد در مدت ۲۰ دقیقه بین گروه دریافت‌کننده توام ارکسین A (۵۰ pM/rat) و (۴۰ SB-334867 nM/rat) و گروه دریافت‌کننده (۴۰ SB-334867 nM/rat) با گروه دریافت‌کننده کاپسایسین، اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد در صورتی که گروه دریافت‌کننده SB-334867 (۴۰ nM/rat) افزایش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) نسبت به گروه دریافت‌کننده ارکسین A و درد را نشان می‌دهد [f(3,20)=6.926, p=0.002] (شکل ۱).

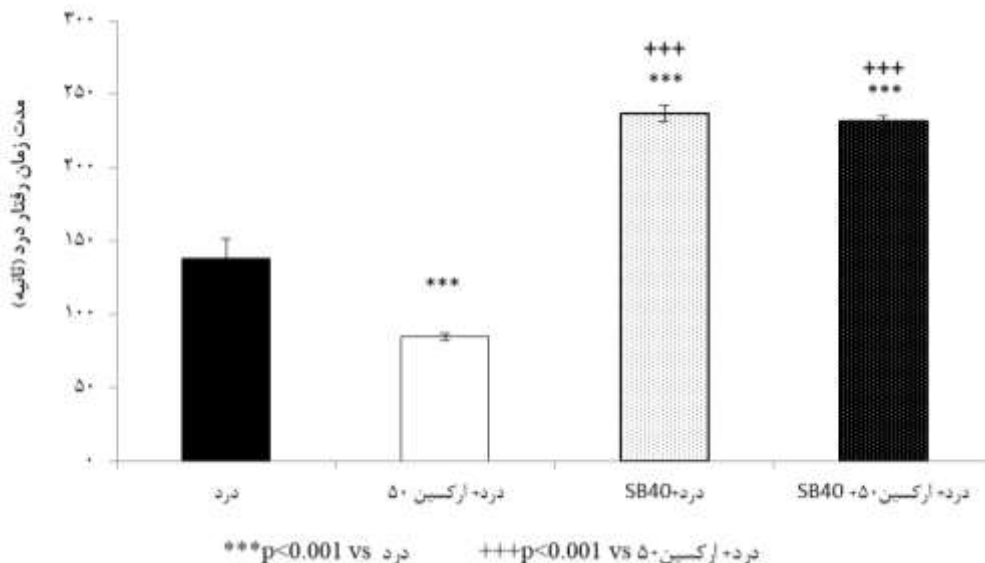
اثر تزریق توام ارکسین A (۵۰ pM/rat) و آنتاگونیست ارکسین A (۴۰ nM/rat) به داخل هسته دمی عصب سه قلو بر مجموع مدت زمان رفتار درد دهانی صورتی ناشی از کاپسایسین مقایسه مجموع مدت زمان رفتار درد بین ارکسین A (۵۰ pM/rat) و درد با گروه دریافت‌کننده کاپسایسین، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0.01$ ). آنتاگونیست ارکسین (SB-334867) A (۴۰ nM/rat) و درد و گروه دریافت‌کننده توام ارکسین A و (SB-334867) و درد افزایش معنی‌داری را در مجموع مدت زمان رفتار درد نسبت به گروه دریافت‌کننده کاپسایسین در مدت ۲۰ دقیقه نشان

می‌دهد ( $p < 0.001$ ). SB-334867 در گروه توام توانست اثرات بی‌دردی ناشی از ارکسین A را به صورت معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) مهار نماید [f(3,20)=94.751, p=0.0001] (شکل ۲).



\*\*\*p<0.001 SB40 + درد , SB40 + ارکسین ۵۰ درد VS درد  
 +++p<0.001 SB40 + درد , SB40 + ارکسین ۵۰ درد VS درد + ارکسین ۵۰  
 \*\*p<0.01 SB40 + درد , SB40 + ارکسین ۵۰ درد VS درد

شکل ۱. مقایسه رفتار درد بین گروه‌های دریافت‌کننده ارکسین A (۵۰ pM/rat)، آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) (۴۰ nM/rat)، گروه دریافت‌کننده توام (SB-334867) و ارکسین A با گروه دریافت‌کننده کاپسایسین در طول ۲۰ دقیقه. نمودار بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار مقادیر هر گروه رسم گردیده است ( $p < 0.05$ )، (n=7). (SB40 = SB334867 (40 nM/rat), orexin50 = orexin (50 pM/rat).



شکل ۲. مقایسه مجموع مدت زمان رفتار درد بین گروه‌های دریافت‌کننده ارکسین A (۵۰ pM/rat)، آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) (۴۰ nM/rat) گروه دریافت‌کننده توام SB-334867 و ارکسین A با گروه دریافت‌کننده کاپسایسین در طول ۲۰ دقیقه. از نظر آماری اختلاف معنی‌دار در سطح ( $p < 0.05$ ) توسط آزمون ANOVA و پس آزمون Tukey صورت پذیرفته است. نمودار بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار مقادیر هر گروه رسم گردیده است (n=7). (Orexin 50= Orexin (50 pM/rat) SB40= SB334867 (40 nM/rat).

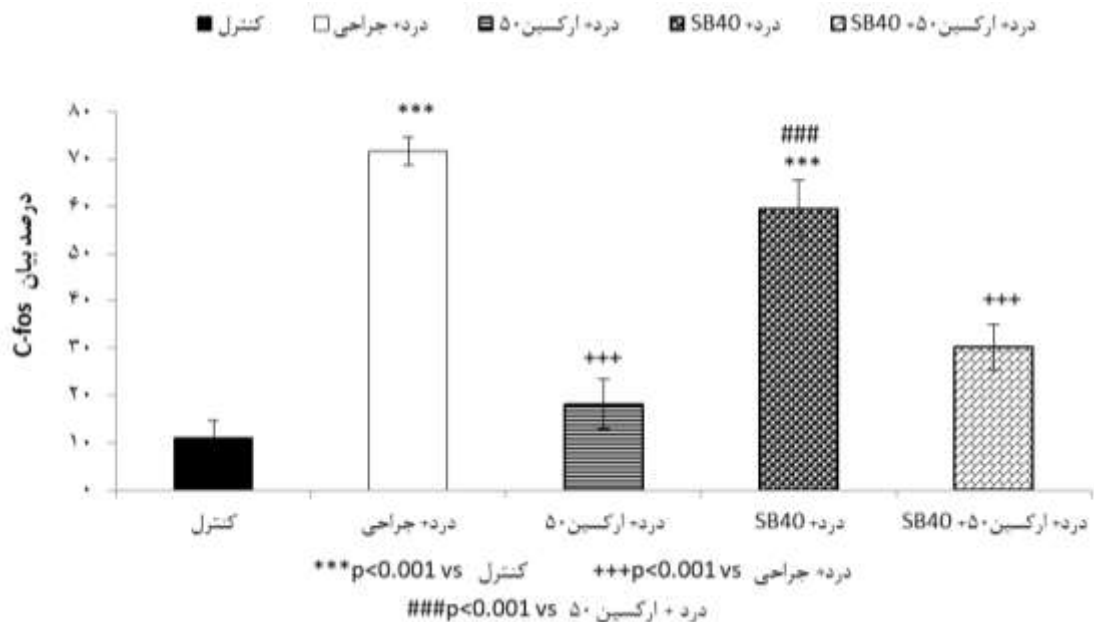
### مقایسه نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی در بیان پروتئین C-fos در هسته دمی عصب سه قلو

#### بررسی بیان ژن C-fos در هسته دمی عصب سه قلو

هدف از انجام ایمونوهیستوشیمی، بررسی بیان پروتئین C-fos در هسته دمی عصب سه قلو و مقایسه نتایج به دست آمده می‌باشد. نتایج، بیان این پروتئین را در هسته دمی عصب سه قلو بعد از تزریق کاپسایسین (شکل ۴-B) در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۴-A) نشان می‌دهد. همچنین مشاهده شد که بیان این پروتئین در بافت تزریق شده ارکسین A و درد کاهش (شکل ۴-C) و برعکس آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) و درد میزان بیان پروتئین C-fos را افزایش داد (شکل ۴-D) و گروه توام ارکسین A و SB-334867 و درد میزان بیان پروتئین C-fos را نسبت به گروه ارکسین A افزایش داد (شکل ۴-E).

### مقایسه نتایج ایمونوهیستوشیمی مربوط به درصد بیان ژن C-fos در هسته دمی عصب سه قلو

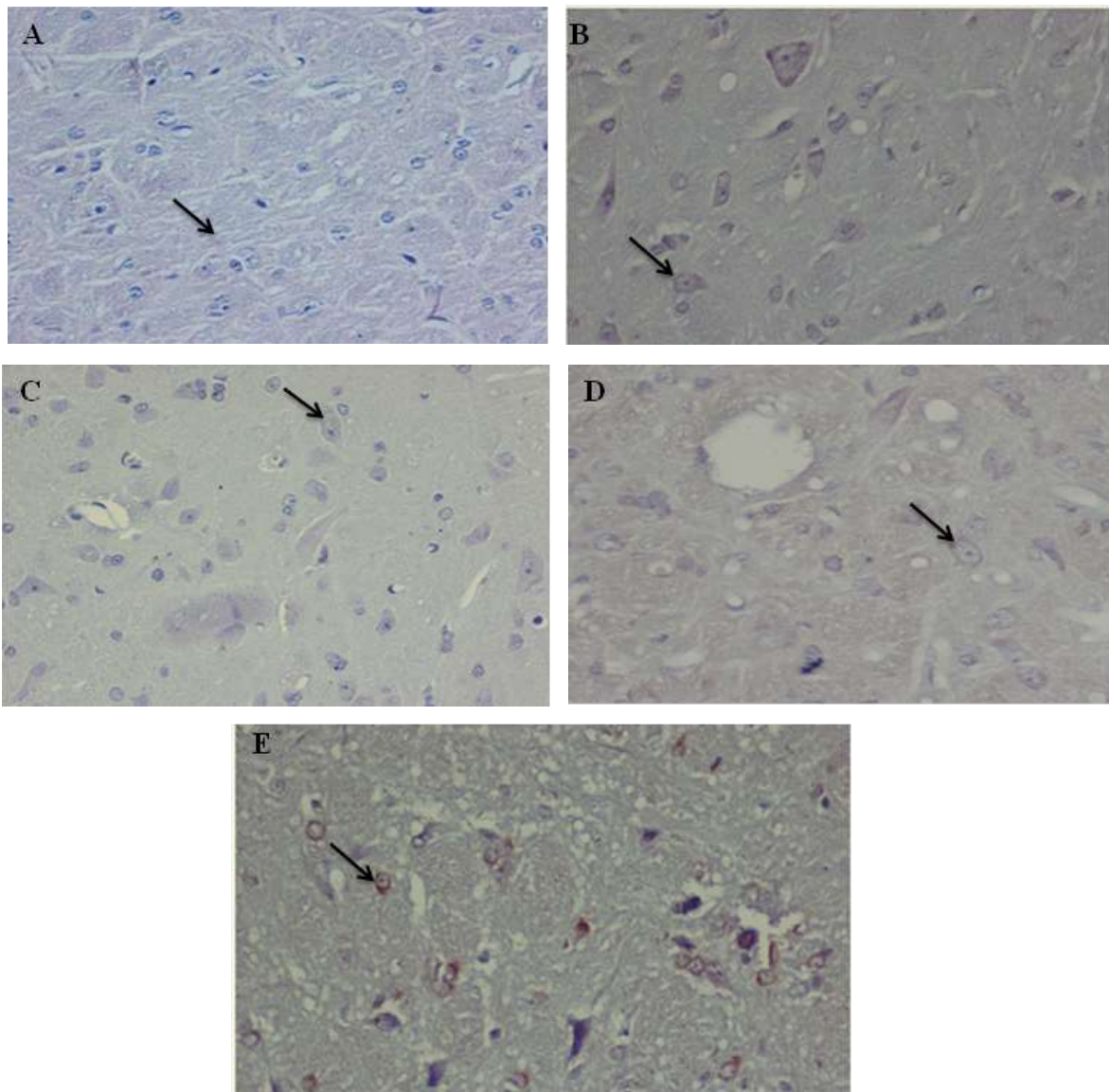
مقایسه درصد بیان C-fos در گروه دریافت‌کننده کاپسایسین، نسبت به گروه کنترل نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.001$ ). گروه دریافت‌کننده ارکسین A ( $50 \mu\text{M}/\text{rat}$ ) و درد نسبت به گروه دریافت‌کننده کاپسایسین کاهش معنی‌داری در درصد بیان C-fos نشان می‌دهد ( $p < 0.001$ ). در حالی که گروه دریافت‌کننده آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) ( $40 \text{ nM}/\text{rat}$ ) و درد، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری در بیان C-fos نشان می‌دهد ( $p < 0.001$ ). گروه دریافت‌کننده تزریق توام ارکسین A و آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) و درد نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) در بیان C-fos نسبت به گروه دریافت‌کننده ارکسین A می‌باشد ( $f(4,20)=20.650, p=0.0001$ ) (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسه میزان بیان ژن C-fos بین گروه توام ارکسین A و SB-334867 [توأم ارکسین A ( $50 \mu\text{M}/\text{rat}$ ) و آنتاگونیست ارکسین A ( $40 \text{ nM}/\text{rat}$ ) (SB-334867)، ارکسین A ( $50 \mu\text{M}/\text{rat}$ )، آنتاگونیست ارکسین A ( $40 \text{ nM}/\text{rat}$ ) (SB-334867) با گروه‌های کنترل و درد، در هسته دمی عصب سه قلو. از نظر آماری اختلاف معنی‌دار در سطح ( $p < 0.05$ ) توسط آزمون ANOVA و پس آزمون Tukey صورت پذیرفته است. نمودار بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار مقادیر هر گروه رسم گردیده است ( $n=7$ ). orexin50= orexin 50

SB40= SB-334867 40 nM/ratpM/rat





**شکل ۴.** نمای میکروسکوپی مربوط به بیان پروتئین C-fos در هسته دمی عصب سه قلو. (A) در گروه کنترل، (B) در گروه دریافت کننده کاپسایسین، (C) در گروه دریافت کننده ارکسین A (۵۰ pM/rat) و درد، (D) در گروه دریافت کننده آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) (۴۰ nM/rat) و درد، (E) در گروه دریافت کننده توام ارکسین A (۵۰ pM/rat) و آنتاگونیست ارکسین A (SB-334867) (۴۰ nM/rat) و درد. عکسها توسط میکروسکوپ نوری با درشت نمایی میکروسکوپ  $\times 400$  تهیه شده‌اند.

(2014) و همچنین در تحقیق مشابهی تزریق اینترادنتال کپسایسین توانست باعث افزایش معنی دار نمره درد در موش‌های صحرایی نر بالغ شود (Raouf *et al.*, 2016).

ثابت شده است کاپسایسین گیرنده‌های درد چند کیفیتی نوع C و A دلتا را فعال می‌کند (Chidiac *et al.*, 2002). این فیبرها دارای گیرنده‌های وانیلوئید ۱ می‌باشند، که این گیرنده‌ها از انواع کانال‌های یونی

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که تزریق کاپسایسین به داخل لب بالا توانست به تدریج از زمان صفر تا بیست دقیقه سبب بروز پاسخ‌های درد گردد (شکل‌های ۱ و ۲). نتایج این تحقیق در راستای بسیاری از پژوهش‌های صورت گرفته در این رابطه می‌باشد. چنانچه در مطالعه‌ای تزریق کپسایسین در ناحیه دهانی - صورتی (Amirkhosravi *et al.*,

تحریکی می‌باشند و به پتانسیل گیرنده گذرا مشهورند و عمدتاً به کلسیم نفوذپذیرند. کلسیم به عنوان یک پیامبر ثانویه گیرنده‌های متصل به G پروتئین و تیروزین کیناز را تحت تأثیر قرار می‌دهد. کاپسایسین با اتصال به کانال‌های کلسیمی گیرنده‌های درد را فعال و منجر به آزادسازی ماده P و پپتید وابسته به ژن کلسی‌تونین می‌شود که تحریک شیمیایی گیرنده‌های پاپی، پردردی و التهاب عصبی را به دنبال دارند (Pellow *et al.*, 1985). بیشتر فیبرهای آوران دهانی - صورتی از الیاف حساس به کاپسایسین تشکیل شده‌اند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فرمالین هم موجب تحریک کوتاه مدت فیبرهای میلین‌دار بزرگ و فعالیت طولانی مدت آوران‌های C و A دلتا می‌شود. در این رابطه شباهت عمل بین عملکرد کاپسایسین و فرمالین در تحریک گیرنده‌های پاپی دندان‌های نیش موش‌های صحرایی گزارش شده است (Chidiac *et al.*, 2002).

به دنبال تحریک فیبرهای حساس به کاپسایسین در لب بالا توسط کاپسایسین، ترشح سیتوکین‌ها، *Nerve Growth factor* و پروستاگلاندین صورت می‌پذیرد و باعث هیپرآلجریا می‌شود (Schellinck *et al.*, 2003). کاپسایسین سبب افزایش رهایش سایتوکاین‌های التهابی همچون *Tumor Necrosis Factor alpha* و *Interleukin-1β* و *Interleukin-6* می‌شود (Yamaguchi *et al.*, 2004).

در تحقیق حاضر نتایج به‌دست آمده از سنجش مجموع مدت زمان رفتار درد، نشان‌دهنده اثرات بی‌دردی ناشی از ارکسین A تزریق شده در هسته دمی عصب سه قلو به صورت معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) در مقایسه با گروه کاپسایسین می‌باشد که این اثر توسط تزریق SB-334867 در TNC افزایش یافت ( $p < 0.001$ ). همچنین اثرات بی‌دردی ناشی از ارکسین 50 pM/rat در تزریق توام ارکسین A و SB-334867 به صورت معنی‌داری توسط SB-334867 مهار گردید ( $p < 0.001$ ) (شکل ۲).

مطالعات مربوط به کنترل درد نشان‌دهنده اثر مهارری ارکسین A در صورت تزریق مرکزی می‌باشند. تزریق داخل بطنی ارکسین A در موش‌های سوری، اثرات بی‌دردی را در همه انواع مدل‌های درد شامل: درد گرمایی، مکانیکی، شیمیایی و کشش شکم نشان داد ولی اثر تزریق زیر جلدی آن بی‌معنی بود (Mobarake *et al.*, 2005). تزریق ارکسین A به درون هسته پارازیگانتوسولولاریس و ماده خاکستری دور قنات مغزی موجب کاهش رفتارهای درد ناشی از آزمون فرمالین و صفحه داغ گردید (Azhdari Zarmehri *et al.*, 2008; Sadeghi *et al.*, 2013). ممکن است علت این بی‌دردی تحریک رشته‌های عصبی باشد که از هیپوتالاموس پستی به نخاع و دیگر مناطق مغزی ارسال شده‌اند (Sadeghi *et al.*, 2013). اطلاعات پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد که در اکثر موارد ارکسین A به کار برده شده در شرایط دردهای غیر دهانی - صورتی توانسته اثرات ضد درد داشته باشد و یافته‌های ما نیز در اینجا نشان داد که علی‌رغم اختلاف در انتقال و پردازش و شروع سیگنال‌های دهانی - صورتی، ارکسین A در هسته دمی عصب سه قلو در کنترل درد مؤثر است.

گیرنده‌های ارکسین ۱ هیپوتالاموس در شکل گرفتن و تلفیق فیبرهای نزولی کنترل درد به هسته دمی عصب سه قلو نقش دارد (Bartsch *et al.*, 2004). علاوه بر این، گزارش شده است که مهار ترشح پپتید وابسته به ژن کلسی‌تونین از سلول‌های عصبی سه قلو، می‌تواند منجر به فعال شدن گیرنده ارکسین ۱ و مهار دردهای دهانی صورتی گردند (Holland *et al.*, 2005)، که این مسیر می‌تواند یکی از دلایل مهم مهار درد توسط ارکسین A در پژوهش حاضر باشد.

همچنین گزارش شده که سیستم ارکسینرژیک در فعال شدن مسیرهای گابائترژیکی که در کنترل درد نقش دارند نیز مؤثر است (Korotkova *et al.*, 2002)، بنابراین شاید بخشی از اثر ضد درد ارکسین

داده شده است که C-fos از طریق فرم پروتئین آن، FOS، منجر به بیان ژن و پروتئین دینورفین می‌گردد و پس از آن پروتئین دینورفین در کنترل درد نقش دارد (Hayati et al., 2002; Suprongsinchai et al., 2015)، بنابراین بیان FOS به‌عنوان یک پروتئین هسته‌ای که قادر به اتصال به DNA و اعمال تغییراتی در تعداد گیرنده‌ها و یا مدارهای هسته دمی عصب سه قلو گردد، دور از انتظار نیست.

در جانوران، محرک‌های بسیار دردناک، منجر به ایجاد رفتارهای مرتبط با درد و بیان Fos گردیده و البته شدت محرک با مقدار بیان Fos رابطه مستقیمی دارد (Coggeshall et al., 2005). بسیاری از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در رت‌ها، موش‌های سوری، گربه‌ها و خوکچه‌های هندی، محرک‌های مضر مکانیکی، گرمایی و شیمیایی منجر به افزایش بیان C-Fos در مغز و نخاع می‌گردند. بیان fos به دنبال تحریکات دردناک در هسته نورن‌های نخاع صورت می‌پذیرد (Harris et al., 1998). بنابراین C-Fos به‌عنوان یکی از عمده‌ترین شاخص‌های آناتومیکی - عملکردی در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که می‌تواند به نوبه خود در معالجه و یا پیش‌گیری از درد راهگشا باشد.

نتایج این پژوهش برای اولین بار نشان داد که درد دهانی صورتی ناشی از کاپسایسین منجر به افزایش بیان c-fos در هسته دمی عصب سه قلو می‌گردد. گیرنده ارکسین ۱ دردهای دهانی صورتی و در نتیجه بیان C-fos در TNC را کاهش و آنتاگونیست گیرنده ارکسین ۱ اثرات مهارتی ارکسین A بر درد را آنتاگونیزه می‌کند.

A در هسته دمی عصب سه قلو از این طریق اعمال شده باشد.

در پژوهش حاضر نتایج حاصل از ایمنوهیستوشیمی در درصد بیان C-fos نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار بیان C-fos در گروه دریافت‌کننده کاپسایسین نسبت به گروه کنترل ( $p < 0.001$ ) و تزریق توام ارکسین A و SB-334867 منجر به کاهش معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) بیان C-fos نسبت به گروه ارکسین A گردید، که نشان‌دهنده اثرات مهارکنندگی SB-334867 بر ارکسین A می‌باشد (شکل ۳). نتایج حاصل در این پژوهش یافته‌های قبلی توسط محققین در مورد چگونگی بیان ژن C-fos در مورد درد را تایید کرده و در راستای نتایج مشاهده شده در این زمینه می‌باشد (شکل‌های ۴ و ۳)، که تعدادی از تحقیقات به شرح زیر هستند:

یکی از تنظیم‌کننده‌های عمومی که در هسته با سرعت و به صورت گذرا در پاسخ به تحریکات خارج سلولی بیان می‌شود، ژن C-fos می‌باشد و از طریق ساختن پروتئین نسخه‌بردار FOS موجب بیان ژن‌های هدف که با محرک در ارتباط می‌باشند، می‌گردد. محرک‌هایی مانند فاکتورهای رشد و میتوژن‌ها موجب فعالیت پروتوانکوژن C-fos شده و در سطحی گسترده، به عنوان مارکر و شاخص آناتومیکی جهت مطالعه مناطقی که توسط محرک فعال شده‌اند، استفاده می‌گردند (Smith et al., 1992; Suprongsinchai et al., 2015)، همچنین تحقیقات نشان داده که C-fos به‌عنوان یک پروتوانکوژن، نقش مهمی در مطالعه درد دارد، کشف این مطلب منجر به بررسی چگونگی بیان C-fos گردید. نشان

## REFERENCES

- Amirkhosravi, L.; Raof M.; Raof, R.; Abbasnejad, M.; Esmaeili Mahani, S.; Ramazani, M.; (2014). Is inflammatory pulpal pain a risk factor for amnesia? Iranian Journal of Veterinary Science and Technology (IJVS); 6: 62-76.
- Azhdari Zarmehri, H.; Semnanian, S.; Fathollahi, Y.; (2008). Comparing the analgesic effects of periaqueductal gray matter injection of orexin A and morphine on formalin-induced nociceptive behaviors. *Physiol*

- Pharmacol; 12:188-193. (in Persian)
- Bahaaddini, M.; Khatamsaz, S.; Esmaeili-Mahani, S.; Abbasnejad, M.; Raoof, M. (2016). The role of trigeminal nucleus caudalis orexin 1 receptor in orofacial pain-induced anxiety in rat. *Neuroreport*; 19; 27(15):1107-13.
- Balam, T.A.; Yamashiro, T.; Zheng, L.; Murshid, A.S.; Fujiyoshi, Y.; Takano-Yamamoto, T.; (2005). Experimental tooth movement upregulates preproenkephalin mRNA in the rat trigeminal nucleus caudalis and oralis. *Brain Res*; 1036:196-201.
- Bartsch, T.; Levy, M.J.; Knight, Y.E., Goadsby, P.J.; (2004). Differential modulation of nociceptive dural input to [hypocretin] orexin A and B receptor activation in the posterior hypothalamic area. *Pain*; 109(3):367-378.
- Berridge, C.W.; Espana, R.A.; Vittoz, N.M.; (2010). Hypocretin/Orexin in arousal and stress. *Brain Res*; 1314:91-102.
- Bingham, S.; Davey, P.T.; Babbs, A.J., Irving, E.A.; Sammons, M.J.; Wyles, M.; (2001). Orexin A, hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain*; 92: 81-90.
- Chamani Gelyan, S.; (2014). Evaluation of Apelin Receptor Gene Expression by MCF-7 Breast Cancer Cell Line and Breast Cancer. Thesis. Shahid Bahonar University of Kerman.
- Chidiac, J.J.; Rifai, K.; Hawwa, N.N.; Massaad, C.A.; Jurjus, A.R.; Jabbur, S.J.; *et al.*; (2002). Nociceptive behaviour induced by dental application of irritants to rat incisors: A new model for tooth inflammatory pain. *Eur. J. Pain*; 6: 55-67.
- Chidiac, J.J.; Al-Asmar, B.; Rifai, K.; Jabbur, S.J.; Saade, N.E.; (2009). Inflammatory mediators released following application of irritants on the rat injured incisors, the effect of treatment with anti-inflammatory drugs. *Cytokine*; 46: 194-200.
- Ciriello, J.; de, Oliveira, C.V.; (2003). Cardiac effects of hypocretin-1 in nucleus ambiguus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 284:R1611-1620.
- Coggeshall, R.E.; (2005). Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol*; 77(5): 299-352.
- Gomes, M.C.; Pinto-Sarmento, T.C.; Costa, E.M.; Martins, C.C.; Granville-Garcia, A.F.L.; Paiva, S.M.; (2014). Impact of oral health conditions on the quality of life of preschool children and their families: A cross-sectional study. *J Health Quality Life Outcomes*; 12(1): 55.
- Harris, J.A.; (1998). Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull*; 45(1): 1-8.
- Hayati, A.; Ismail, A; Ismail, Z.; (2002). C-fos and its Consequences in Pain. *Malays J Med Sci. Jan*; 9(1): 3-8.
- Holland, P.R.; Akerman, S.; Goadsby, P.J.; (2005). Orexin 1 receptor activation attenuates neurogenic dural vasodilation in an animal model of trigeminovascular nociception. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 315(3): 1380-1385.
- Kooshki, R.; Abbasnejad, M.; Esmaeili-Mahani, S.; Raoof, M.; (2016). The role of trigeminal nucleus caudalis orexin 1 receptors in orofacial pain transmission and in orofacial pain-induced learning and memory impairment in rats. *Physiology & Behavior*; 157: 20-27.
- Korotkova, T.M.; Eriksson, K.S.; Haas, H.L.; Brown, R.E.; (2002). Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin in vitro. *Regul Pept*; 104: 83-89.
- Kramer, P.F.; Feldens, C.A.; Ferreira, S.H.; Bervian, J.; Rodrigues, P.H.; Peres, M.A.; (2013). Exploring the impact of oral diseases and disorders on quality of life of preschool children. *J Community Dent Oral Epidemiol*; 41(4): 235-7.
- Krishnan, V.; (2007). Orthodontic pain: from causes to management—a review. *Eur J Orthod*; 29: 170-179.
- Maixner, W.; Diatchenko, L.; Dubner, R.; Fillingim, R.B.; Greenspan, J.D.; Knott, C. *et al.*; (2011). Orofacial pain prospective evaluation and risk assessment study the OPPERA study. *J Pain*; 12(11): 4-11.

- Mobarakeh, J.I.; Takahashi, K.; Sakurada, S.; Nishino, S.; Watanabe, H.; Kato, M.; Yanai, K.; (2005). Enhanced antinociception by intracerebroventricularly and intrathecally-administered orexin A and B (hypocretin-1 and -2) in mice. *Peptides*; 26: 767-777.
- Munglani, R.; Hunt, S.P.; (1995). *Molecular biology of pain*. Br. J. Anaes; 75: 186-192.
- Paxinos, G.; Watson, C.A.; (1998). *Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*, Academic, New York.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M.; (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*; 14(3): 149-167.
- Raouf, M.; Ebrahimnejad, H.; Abbasnejad, M.; Amirhosravi, L.; Raouf, R.; Ramazani, M.; (2016). The effects of inflammatory tooth pain on anxiety in adult male rats. *Basic and Clinical Neuroscience*; accepted.
- Sadeghi, S.; Raieisi, Z.; Azhdari-Zarmehri, H.; Haghparast, A.; (2013). Involvement of orexin-1 receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens in antinociception induced by lateral hypothalamus stimulation in rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 105: 193-198.
- Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R.M.; Tanaka, H.; (1998). Orexin and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*; 92: 573-585.
- Schellinck, H.M.; Stanford, L.; Darrach, M.; (2003). Repetitive acute pain in infancy increases anxiety but does not alter spatial learning ability in juvenile mice. *Behav Brain Res*; 142(1-2):157-65.
- Sessle, B.J.; (2000). Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*; 11: 57.
- Siqueira-Lima, P.S.; Silva, J.C.; Quintans, J.S.S.; Antonioli, A.R.; Shanmugam, S.; Barreto, R.S.S. *et al.*; (2017). Natural products assessed in animal models for orofacial pain-a systematic review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*; 27: 124-134.
- Smith, M.A.; Banerjee, S.; Glowa, J.; (1992). Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. *Brain Res*; 578: 135-141.
- Suprongsinchai, W.; Storer, R.J.; (2015). C-Fos: A neural activity marker for craniofacial pain research. *CU Dent J*; 38: 77-92.
- Tamaddonfard, E.; Erfanparast, A.; Khalilzadeh, E.; (2012). Effect of pilocarpine on the formalin-induced orofacial pain in rats. *Veterinary Research Forum*; 3(2): 91-95.
- Tarsa, L.; Balkowiec-Iskra, E.; Kratochvil, Lii, F.J.; Jenkis, V.K.; Mclean, A.; Brown, A.L.; (2010). Tooth pulp inflammation increases brain-derived neurotrophic factor expression in rodent trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience*; 167: 1205-1215.
- Van Den Pol, A.N.; (1999). Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervations of the spinal cord. *J Neurosci*; 19: 3171.
- Watanabe, S.; Kuwaki, T.; Yanagisawa, M.; Fukuda, Y.; Shimoyama, M.; (2005). Persistent pain and stress activate pain-inhibitory orexin pathways. *Neuroreport*; 16(1): 5-8.
- Wong, H.M.; McGrath, C.P.; King, N.M.; Lo, E.C.; (2011). Oral health-related quality of life in Hong Kong preschool children. *Caries Res*; 45(4): 370-6.
- Yamaguchi, M.; Kojima, T.; Kanekawa, M.; Aihara, N.; Nogimura, A.; Kasai, K.; (2004). Neuropeptides stimulate production of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in human dental pulp cells. *Inflamm Res*; 53: 199-204.
- Yamamoto, T.; Saito, O.; Shono, K.; Hirasawa, S.; (2003). Activation of spinal orexin-1 receptor produces anti-allodynic effect in the rat carrageenan test. *Eur J Pharmacol*; 481: 175.