



# بررسی نقش گیرنده گلوتاماتی NMDA و میکروگلیای نخاعی در تفاوت های وابسته به سن درد نوروپاتیک در مدل SNL در موش صحرائی نر

حسین زینلی<sup>۱</sup> و<sup>۵</sup>، هما شاردی مناهجی<sup>۲\*</sup>، صمد ناظمی<sup>۳</sup>، مهدی صادقی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

<sup>۳</sup> گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

<sup>۴</sup> گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

<sup>۵</sup> گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قم

(دریافت مقاله: ۹۲/۳/۳۰- پذیرش مقاله: ۹۲/۷/۴)

## چکیده

**زمینه:** درد نوروپاتیک ایجاد شده متعاقب آسیب عصبی، دارای علایم رفتاری مثل آلودینیا و هیپرالژزیا می باشد. در شدت، میزان بروز و حتی پاسخ به درمان این درد، تفاوت های وابسته به سن گزارش شده است. در این مطالعه تلاش شده است تا به تفاوت های رفتاری درد، در گروه های سنی متفاوت در یک مدل نوروپاتی القا شده، با توجه به نقش مهم گیرنده NMDA و میکروگلیا در ایجاد و توسعه درد نوروپاتیک، پرداخته شود.

**مواد و روش ها:** موش های صحرائی نر در دو گروه سنی جوان (۶-۵ هفته) و بالغ (۱۱-۱۰ هفته) زیر بیهوشی عمومی، مورد جراحی SNL روی پای راست قرار گرفتند. اثر دوزهای متفاوت دکسترومتورفان (مهارکننده NMDA) و مینوسیکلین (مهارکننده میکروگلیا) در روز ۵ بعد از جراحی روی آلودینیا مکانیکی و هیپرالژزیا حرارتی در دو گروه سنی، مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. یافته ها: این مطالعه نشان می دهد که مینوسیکلین و دکسترومتورفان به صورت وابسته به دوز، علایم درد نوروپاتیک را در دو گروه سنی کاهش می دهند. مینوسیکلین بر عکس دکسترومتورفان، در گروه سنی جوان مؤثرتر بود. استفاده توأم دوزهای غیر مؤثر مینوسیکلین و دکسترومتورفان توانست مؤثر واقع شود.

**نتیجه گیری:** عملکرد میکروگلیا و گیرنده NMDA بر روی درد نوروپاتیک در سنین مختلف، متفاوت است و نقش میکروگلیا بارزتر به نظر می رسد. از طرفی می توان مهار توأم میکروگلیا و گیرنده NMDA را برای کاهش درد نوروپاتیک مد نظر قرار داد.

**واژگان کلیدی:** NMDA، میکروگلیای نخاعی، آلودینیا، هیپرالژزیا، دکسترومتورفان، مینوسیکلین

\* تهران، گروه نوروفیزیولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

## مقدمه

مربوط به تفاوت‌های وابسته به سن درد نوروپاتییک به خوبی شناخته نشده است (۱۲ و ۱۳). گیرنده گلوتاماتی (NMDA (N-methyl, D-aspartate) در القاء و توسعه درد نوروپاتییک نقش ویژه بازی می‌کند (۱۴ و ۱۵). این گیرنده در شکل‌پذیری سیناپسی در شاخ خلفی نخاع در شرایط پردردی و ایجاد تغییراتی موسوم به حساس شدن مرکزی (Central sensitization) که عامل اصلی ایجاد درد نوروپاتییک شناخته شده است، نقش اصلی ایفا می‌کند (۱۳).

به نظر می‌رسد گیرنده گلوتاماتی NMDA در تفاوت‌های وابسته به سن درد نوروپاتییک نیز نقش داشته باشد. پاره‌ای از مطالعات نقش گیرنده NMDA را در انتقال درد در سنین مختلف، متفاوت ارزیابی کرده‌اند. در این مطالعات از مهار کننده‌های رقابتی گیرنده NMDA برای تعیین نقش آن در سنین متفاوت استفاده شده است (۱۶ و ۱۷). دکسترومتورفان (Dextromethorphan) یک آنتاگونیست غیر رقابتی گیرنده NMDA می‌باشد که توانسته است به صورت وابسته به دوز رفتارهای درد نوروپاتییک (آلودینیا و هیپرالژزیا) را کاهش دهد (۵، ۱۸ و ۱۹). از طرفی در سال‌های اخیر بیشتر مطالعات، بر روی نقش سلول‌های گلیا خصوصاً میکروگلیا و آستروسیت تمرکز داشته است و شواهد موجود نقش آن را مورد تأیید قرار داده است (۲ و ۹).

به‌طور کلی در یک مطالعه مروری انجام شده توسط ژو (zhuo) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نقش گیرنده NMDA و همچنین میکروگلیا در درد نوروپاتییک مورد تأیید و تأکید قرار گرفته است (۱۵). از بین مدل‌های مولد درد نوروپاتییک، مدل آسیب مزمن فشاری (CCI) و آسیب عصبی محدود (SNI) در زمینه تفاوت‌های وابسته به سن درد نوروپاتییک، بیشتر

درد نوروپاتییک یک نوع درد مزمن است که به دنبال آسیب سیستم عصبی ایجاد می‌شود و با علایم رفتاری مثل درد خودبخودی، هیپرالژزیا و آلودینیا همراه است (۳-۱).

افراد زیادی در سراسر جهان به این نوع درد مبتلا می‌باشند به طوری که تعداد آن‌ها تنها در ایالات متحده به حدود ۵ میلیون نفر می‌رسد (۴). درمان‌های مرسوم ضد درد معمولاً بر این نوع درد مؤثر نبوده یا کمتر اثر می‌گذارند (۵).

مطالعات انسانی (۶) و همچنین بررسی‌های انجام شده در حیوانات آزمایشگاهی، تغییرات وابسته به سن در درد نوروپاتییک را مورد تأیید قرار می‌دهد (۷). این تغییرات هم در میزان بروز، توسعه و ادامه درد (۷)، و هم در پاسخ به درمان درد نوروپاتییک دیده شده است (۸). بر اساس شواهد موجود، میزان بروز درد نوروپاتییک در کودکان در مقایسه با بزرگسالان کمتر است (۹). با افزایش سن، میزان بروز و همچنین شدت درد نوروپاتییک افزایش می‌یابد (۱۰ و ۱۱).

بزرگسالانی که علایم درد نوروپاتییک را در کودکی داشته‌اند در مقایسه با کسانی که در بزرگسالی به درد نوروپاتییک مبتلا می‌شوند اقدامات درمانی کمتری نیاز دارند (۸). شواهدی هم وجود دارد که ناقص مطالب فوق می‌باشد، به طوری که در مطالعه‌ای موش‌های مسن در پاسخ به آسیب عصبی، درد کمتری نسبت به موش‌های جوان از خود نشان دادند (۱۰). ارتباط بین درد نوروپاتییک و سن از مباحث نوین محافل علمی مرتبط با درد بوده و سؤالات زیادی در این مورد به وجود آورده است. با وجود بیش از سه دهه تلاش و بررسی پیرامون درد نوروپاتییک هنوز مکانیسم‌های فیزیوپاتولوژیک این نوع درد به خصوص مکانیسم‌های

آزمایش‌ها حداقل ۲۴ ساعت بعد انجام گردید. آزمایشات رفتاری آلودینیای مکانیکی با استفاده از تارهای ون‌فری (von frey) و با روش بالا و پایین دیکسون (۲۲) و هیپرالژیای حرارتی با استفاده از دستگاه حرارتی تشعشعی (Radiant heat) با شدت ثابت ۵۰ و به‌صورت سه مرتبه متوالی با فاصله ۳ دقیقه با حد بالایی (Cut off) ۳۰ ثانیه انجام گرفت. با استفاده از میانگین سه مرتبه متوالی، از پای مورد جراحی یک روز قبل و سپس در روز پنجم بعد از SNL و همچنین قبل و بعد از تزریق داروها، آزمایش انجام و آستانه درد محاسبه شد.

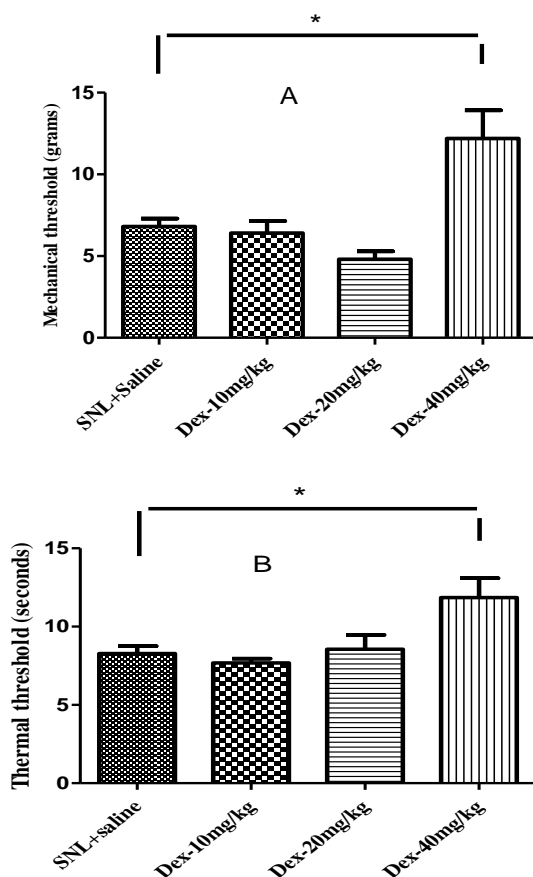
موش‌هایی که آستانه درد آن‌ها به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه شم کاهش پیدا کرده بود مبتلا به نوروپاتی تلقی شده و در روز پنجم بعد از جراحی تزریق داخل صفاقی دکسترومتورفان (شرکت سیگمای ایتالیا) با دوزهای متفاوت (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بر روی آن‌ها انجام شد. همچنین برای مهار میکروگلیا، مینوسیکلین (شرکت سیگمای ایتالیا) داخل صفاقی با دوزهای ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بلافاصله بعد از جراحی SNL و سپس تا روز ۵ بعد از جراحی روزانه تزریق شد. در روز پنجم، قبل و نیم ساعت بعد از تزریق دکسترومتورفان و همچنین قبل و ۴۵ دقیقه بعد از آخرین تزریق مینوسیکلین آزمایش رفتاری انجام شد. سالین (شرکت داروپخش) به‌عنوان حلال دکسترومتورفان و مینوسیکلین به‌عنوان گروه شاهد و مشابه تزریق داروهای اصلی مورد آزمایش قرار گرفت. این مطالعه با رعایت کامل اصول و پروتکل‌های کار با حیوانات آزمایشگاهی (قوانین اخلاقی زیمرمن ۱۹۸۳) صورت گرفت. همچنین استفاده از حیوانات در این پژوهش بر اساس قوانین رفتار با حیوانات آزمایشگاهی انجمن بین‌المللی مطالعه درد (IASP) صورت گرفت. نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

مورد استفاده قرار گرفته است (۷ و ۹). اما از مدل درد بستن عصب نخاعی (SNL) به‌دلیل محدودیت‌های اجرا در سنین پایین، کمتر استفاده شده است. با توجه به تغییر ویژگی‌های درد نوروپاتیکی وابسته به نوع مدل و سن، نقش مؤثر سن (۲۰) و مشخص نبودن مکانیسم‌های درگیر در این‌گونه دردها، به بررسی نقش گیرنده NMDA و میکروگلیا در تفاوت‌های وابسته به سن درد نوروپاتیکی در مدل SNL پرداخته‌ایم.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش موش‌های صحرایی نر در دو گروه سنی - وزنی جوان (۶-۵ هفته با وزن ۱۶۰-۱۱۰ گرم) و بالغ (۱۱-۱۰ هفته با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم) مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر گروه ۶ موش قرار داده شد. برای ایجاد درد نوروپاتیکی، تحت بیهوشی عمومی، مدل درد SNL به‌روش چانگ (Chung) (۲۱)، روی پای راست حیوانات اجرا شد، به این‌صورت که در پشت حیوان برشی به طول ۳ تا ۴ سانتی‌متر در خط وسط، حد فاصل بین مهره‌های پنجم کمری (محاذات خطی که دو کمرست ایلیاک را به هم وصل می‌کند) تا مهره اول خاجی، انجام شد. فاشیا و عضلات جنب مهره‌ای سمت راست مهره‌ها با یک اسکالپر ظریف خارج شد. پس از نمایانده شدن زائده عرضی مهره ششم کمری یا یک رنזור ظریف اقدام به برداشتن آن شد که درست زیر آن ریشه‌های عصبی چهارم و پنجم کمری قرار داشت. بعد از آن با احتیاط ریشه پنجم را با یک قطعه نخ سیلک شش صفر بسته و ۲ میلی‌متر دیستال‌تر آن قطع شد. عمل جراحی شم (Sham) دقیقاً مانند جراحی SNL انجام گردید و فقط مرحله بستن و قطع عصب انجام نشد. در پایان، عضلات، فاشیا و پوست با سیلک ۴ صفر دوخته شد و حیوان در قفس انفرادی به هوش آمد. اولین سری

بر اساس شکل ۱ (A)، دکسترومتورفان با دوز ۴۰ میلی-گرم بر کیلوگرم وزن بدن، در موش‌های جوان آستانه درد مکانیکی را در مقایسه با گروه سالین به صورت معنی‌داری افزایش داده است ( $P < 0.05$ ). دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، دکسترومتورفان نیز باعث کاهش آستانه درد مکانیکی در این سن شده است ولی معنی‌دار نبوده است. بر اساس شکل ۱ (B) دکسترومتورفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، آستانه درد حرارتی را نیز در گروه سنی جوان در مقایسه با گروه سالین به صورت معنی‌داری افزایش داده است ( $P < 0.05$ ) ولی دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیری نداشته است.



شکل ۱ اثر دکسترومتورفان (Dex) با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر آستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش‌های جوان (۵-۶ هفته) در گروه SNL (\*:  $P < 0.05$ ) (n=۶)

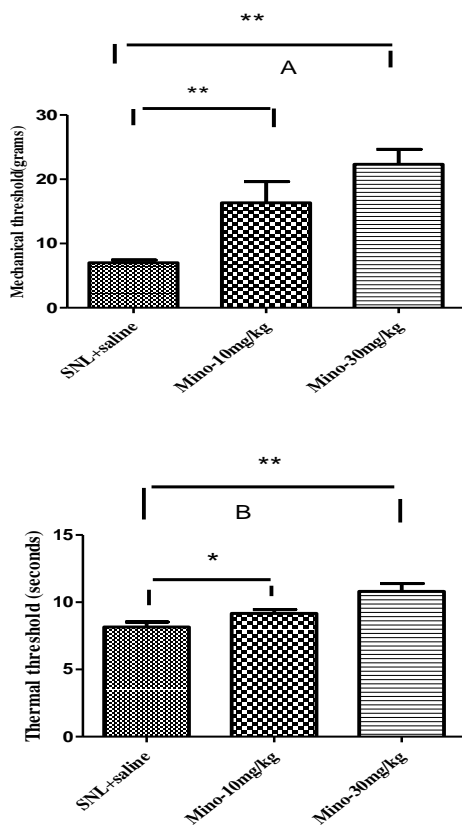
برای مقایسه گروه شم و SNL در روزهای قبل و بعد از جراحی از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه‌ی داده‌های تکراری (Two Way ANOVA Repeated measure) و برای مقایسه گروه‌ها قبل و بعد از تجویز داروها و مقایسه گروه‌ها با یکدیگر به ترتیب از آزمون تی زوجی (paired t-test) و تی مستقل (Unpaired t-test) استفاده شد. در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال نبود یا تساوی واریانس‌ها تأیید نشد برای اطمینان از دقت نتایج حاصله، از آزمون‌های کمکی و ناپارامتریک استفاده گردید. برای رسم نمودارها و آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار پریم ۵ (Graph pad prism 5) استفاده شده است. ( $P < 0.05$ ) به صورت معنی‌دار تلقی شده است.

لازم به ذکر است که در این مطالعه با محدودیت‌هایی از قبیل مشکل بودن تهیه داروها به دلیل گرانی و تحریم، عدم توانایی استفاده از رده‌های سنی نابالغ به دلیل نیاز به تجهیزات میکروسکوپی و احتمال قطع اشتباه ریشه عصبی چهارم به جای پنجم کمری مواجه بودیم که در این صورت باید حیوان را از مطالعه خارج می‌کردیم.

## یافته‌ها

در این مطالعه برای تأیید ایجاد نوروپاتی توسط مدل SNL قبل از آزمایشات اصلی یک گروه شم (کاذب) و یک گروه SNL از هر سن مورد مقایسه قرار گرفتند و نتایج حکایت از ایجاد حداکثر درد در روز پنجم بعد از جراحی SNL و عدم ایجاد درد در گروه شم داشت. به همین دلیل آزمایشات تا روز پنجم یا در روز پنجم بعد از جراحی صورت می‌گرفت. به دلیل نتایج مشابه در بسیاری از مطالعات قبلی که منابع آن ذکر شده و طولانی شدن مطلب از آوردن نمودارها و پرداختن به این بخش صرف نظر شده است.

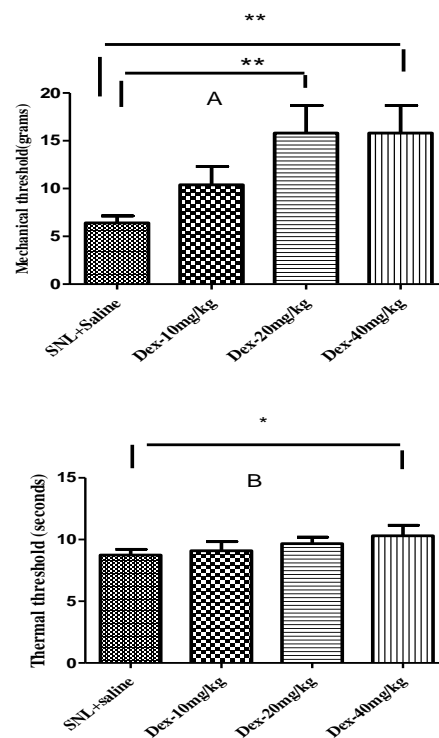
نوروپاتیک توانسته است آستانه درد مکانیکی را نسبت به گروه سالیین به صورت معنی دار افزایش دهد ( $P < 0.01$ ). با توجه به شکل ۳ (B)، مینوسیکلین با دوز ۱۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم توانسته است در گروه سنی جوان آستانه درد حرارتی را نیز نسبت به گروه سالیین به صورت معنی دار افزایش دهد اما میزان معنی داری آن در مورد دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.01$ ) بیشتر از دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.05$ ) بوده است.



شکل ۳ تزریق داخل صفاقی روزانه مینوسیکلین (Mino) تا روز ۵ بعد از جراحی SNL و تأثیر آن بر آستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش های جوان (۶-۵ هفته): \*Unpaired t-test: ( $P < 0.05$ ) ( $n=6$ )\*\* ( $P < 0.01$ )

با توجه به شکل ۴ (A) در گروه سنی بالغ، مینوسیکلین با دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم توانسته است آستانه مکانیکی درد را به صورت معنی داری نسبت به گروه سالیین افزایش دهد ( $P < 0.01$ ) اما دوز

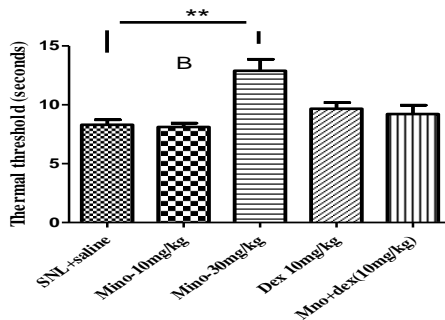
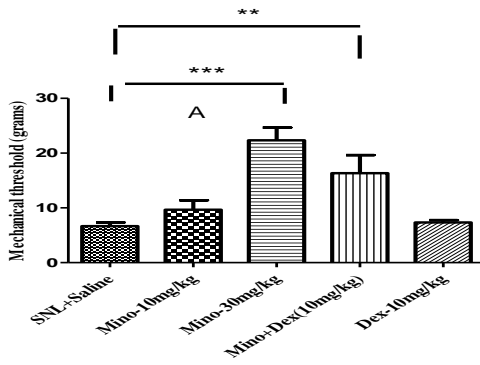
بر اساس شکل ۲ (A) در گروه سنی بالغ (۱۱-۱۰ هفته)، دکسترومتورفان با دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، در مقایسه با گروه سالیین افزایش معنی داری در آستانه درد مکانیکی ایجاد کرده است ( $P < 0.05$ ). دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اگر چه آستانه مکانیکی درد را افزایش داده اما معنی دار نبوده است. در گروه سنی بالغ، دکسترومتورفان با دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن آستانه درد حرارتی را نسبت به گروه سالیین افزایش داده اما معنی دار نبوده است. دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن توانسته است به صورت معنی داری آستانه حرارتی درد را افزایش دهد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲) (B).



شکل ۴ اثر دکسترومتورفان (Dex) با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر آستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش های بالغ (۱۱-۱۰ هفته) جراحی SNL: \*Unpaired t-test: ( $P < 0.05$ ) ( $n=6$ )

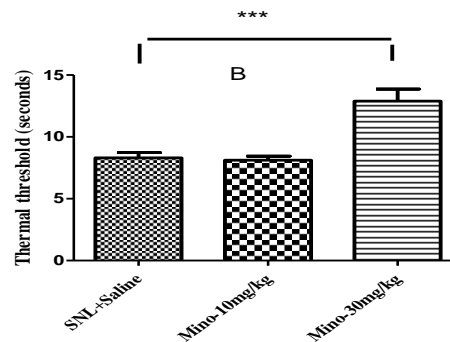
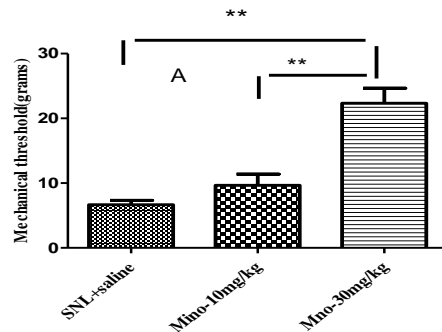
بر اساس شکل ۳ (A) تزریق مینوسیکلین با دوز ۱۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در موش های جوان

در موش‌های بالغ توانسته است به صورت معنی‌داری آستانه درد مکانیکی را بهبود بخشد ( $P < 0.01$ ). اما در مقایسه با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین کمتر معنی‌دار بوده است ( $P < 0.01$ ). بر اساس شکل ۵ (B)، دکسترومتورفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه سالین نتوانسته است تغییر معنی‌داری در آستانه درد حرارتی ایجاد کند. همچنین مینوسیکلین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه سالین نتوانسته است افزایش معنی‌داری در آستانه درد حرارتی ایجاد کند. تجویز توام دکسترومتورفان و مینوسیکلین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه سالین نیز در موش‌های بالغ نتوانسته است به صورت معنی‌دار آستانه درد حرارتی را بهبود بخشد.



شکل ۵) تأثیر دکسترومتورفان (Dex) داخل صفاقی در روز ۵ بعد از جراحی و مینوسیکلین (Mino) (روزانه تا روز ۵) به صورت مفرد و یا با هم و تأثیر آن روی آستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش‌های بالغ (۱۰-۱۱ هفته) (Unpaired t-test:  $P < 0.01$ ) (\*\*\*) ( $P < 0.001$ ) (\*\*\*) (n=۶)

۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نتوانسته است افزایش معنی‌داری ایجاد کند. بر اساس شکل ۴ (B)، مینوسیکلین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نتوانسته است افزایش معناداری در آستانه درد حرارتی نسبت به گروه سالین ایجاد کند ( $P < 0.01$ ) اما دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نتوانسته است تغییری ایجاد کند.



شکل ۴) تزریق داخل صفاقی روزانه مینوسیکلین (Mino) تا روز ۵ بعد از جراحی SNL و تأثیر آن روی آستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش‌های بالغ (۱۰-۱۱ هفته) (Unpaired t-test:  $P < 0.01$ ) (\*\*\*) ( $P < 0.001$ ) (\*\*\*) (n=۶)

بر اساس شکل ۵ (A)، دکسترومتورفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه سالین نتوانسته است تغییر معنی‌داری در آستانه درد مکانیکی ایجاد کند. همچنین مینوسیکلین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه سالین نتوانسته است افزایش معنی‌داری در آستانه درد مکانیکی ایجاد کند. اما تجویز همزمان دکسترومتورفان و مینوسیکلین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه سالین

## بحث

نتایج حاصل از تزریق دوزهای متفاوت دکسترومتورفان در موش‌های بالغ و جوان مبتلا به نوروپاتی نشان داد که دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان در موش‌های جوان (۶-۵ هفته) نه تنها منجر به افزایش آستانه مکانیکی و حرارتی درد نشده بلکه تا حدودی نیز آن را کاهش داده است (هیپرالژیای خفیفی ایجاد کرده است) اما در موش‌های بالغ، باعث افزایش خفیف آستانه درد مکانیکی و حرارتی شده است. دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان نیز در موش‌های جوان بر آستانه درد مکانیکی و حرارتی تأثیر قابل ملاحظه نداشته یا بی‌تأثیر بوده است اما در موش‌های بالغ باعث افزایش قابل ملاحظه آستانه درد مکانیکی شده و آستانه درد حرارتی را اندکی افزایش داده است. دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان در هر دو رده سنی توانسته است آستانه درد مکانیکی و حرارتی را به میزان زیادی افزایش دهد.

بنابراین با توجه به تأثیر دوزهای متفاوت دکسترومتورفان در دو رده سنی جوان و بالغ می‌توان گفت که دکسترومتورفان در رده سنی بالغ نسبت به رده سنی جوان به صورت مؤثرتری توانسته است علائم درد نوروپاتی را کاهش دهد. مهار کننده‌های متفاوت گیرنده NMDA در موش‌های بالغ و جوان با روش‌های متفاوت (پیش درمانی، پس از آسیب، داخل نخاعی و استفاده سیستمیک) توانسته‌اند علائم درد نوروپاتی (هیپرالژیای و آلودینیا) را کاهش دهند (۳، ۱۴، ۲۳ و ۲۴).

مشابه نتایج مطالعه حاضر، مطالعات قبلی تأثیر وابسته به دوز دکسترومتورفان و هم خانواده آن دکستروتران (Dextrophan) را نیز در کاهش آلودینیا و هیپرالژیای

نشان داده‌اند. زو و هاوو (XU & Hao) (۱۹۹۵) تأثیر دکسترومتورفان داخل صفاقی را با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش‌های صحرایی بالغ که با روش آسیب نخاعی مبتلا به آلودینیا شده بودند مورد بررسی قرار دادند. دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیری نداشته، دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در تعدادی از موش‌ها توانسته بود آلودینیا را کاهش دهد و دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در تمامی موش‌ها توانست مؤثر واقع شود (۵). کریمی (۲۰۰۹) تأثیر دوزهای ۱۰، ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دکسترومتورفان را روی هیپرالژیای متعاقب نوروپاتی با روش CCI در موش‌های کوچک (mice) مورد آزمایش قرار داد. در این آزمایش مشابه مطالعه حاضر دکسترومتورفان به صورت وابسته به دوز توانست هیپرالژیای حرارتی را کاهش دهد (۱۸).

تال و بنت (Bennett & Tal) (۱۹۹۲) نیز نشان دادند که دکستروتران به صورت وابسته به دوز، هیپرالژیای حرارتی متعاقب نوروپاتی با روش CCI را در موش صحرایی مهار می‌کند (۲۵). اما در مورد اثرات وابسته به سن دکسترومتورفان موارد مشابهی در مطالعات قبلی دیده نشد. برخلاف نتایج این پژوهش، عبدالرزاق (Abdul-Razak) (۱۹۹۴) تأثیر AP5 (آنتاگونیست رقابتی NMDA) را در محیط آزمایشگاه (Invitro) در همستر (Hamster) نابالغ نسبت به گروه بالغ مؤثرتر ارزیابی کرده است (۱۶). اورچ (Urch) (۲۰۰۱) نیز اثر AP5 را در محیط طبیعی (Invivo) و به صورت داخل نخاعی در مهار ورودی فیبرهای C و تشدید (Wind up) آن پس از تحریک در موش‌های صحرایی سالم و غیرنوروپاتیکی مورد ارزیابی قرار داده است که در آن مطالعه تأثیر AP5 در موش‌های نابالغ نسبت به موش‌های بالغ بیشتر بوده

حساسیت گیرنده NMDA به گلوتامات در سنین متفاوت باشد.

گونزالس (Gonzalez) (۱۹۹۲) میزان حساسیت گیرنده NMDA به گلوتامات را در نخاع موش‌های نابالغ و بالغ مورد بررسی قرار داده است. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان باند شدن گلوتامات با گیرنده NMDA در شاخ خلفی نخاع در روز ۶ تا ۱۲ بعد از تولد حداکثر و سپس تا سن بلوغ کاهش می‌یابد (۲۸).

مینوسیکلین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش‌های جوان (۶-۵ هفته) توانسته است آستانه درد مکانیکی را به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد اما در موش‌های بالغ (۱۱-۱۰ هفته) نتوانست تغییر معنی‌داری ایجاد کند. دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین در هر دو رده سنی توانسته است آستانه درد مکانیکی و حرارتی را به‌طور معنی‌دار افزایش دهد.

راگواندرا (Raghavandra) (۲۰۰۳) دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به‌صورت داخل صفاقی و پیش‌درمانی از یک ساعت قبل تا ۱۰ روز بعد از جراحی در مدل SNL مورد استفاده قرار داد. نتایج نشان داد که دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با میزان کمتر ( $P < 0.05$ ) و دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با میزان بیشتری ( $P < 0.01$ ) آلودینیا و هیپرالژزیا را کاهش دادند اما همین دوزها وقتی از روز ۵ بعد از جراحی به بعد مورد استفاده قرار گرفت نتوانستند از ایجاد آلودینیا یا هیپرالژزیا ممانعت کنند یا آن را کاهش دهند (۲۹). میکا (Mika) (۲۰۱۰) دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین را به‌صورت داخل صفاقی، ۱ و ۱۶ ساعت قبل از جراحی CCI و سپس دو بار در روز تا روز ۷ بعد از جراحی مورد استفاده قرار داد. نتایج، کاهش ۱۵ و ۲۵ درصد در آلودینیا و ۲۲ و ۲۵ درصد در هیپرالژزیا را به‌ترتیب در

است. تفاوت در نتایج این مطالعه با مطالعات عبدالرزاق و اورچ می‌تواند به تفاوت‌های مطالعه حاضر و مطالعات قبلی برگردد. مطالعه حاضر در محیط طبیعی (Invivo) و با استفاده از دکسترومتورفان که آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA می‌باشد و همچنین در موش‌های مبتلا به نوروپاتی انجام شده است اما مطالعات قبلی با استفاده از یک مهارکننده رقابتی و در شرایط غیرنوروپاتی در محیط آزمایشگاهی (Invitro) انجام پذیرفته است، بنابراین بخشی از این تناقضات می‌تواند به این موارد برگردد (۱۷).

هیپرالژزیا ایجاد شده توسط دکسترومتورفان در دوزهای غیر مؤثر می‌تواند ناشی از افزایش درک درد در دوزهای پایین باشد. اما اینکه چرا دکسترومتورفان که یک آنتاگونیست غیر رقابتی NMDA می‌باشد در موش‌های بالغ نسبت به موش‌های جوان مؤثرتر بوده است می‌تواند با کاهش میزان بیان گیرنده NMDA در موش‌های بالغ نسبت به موش‌های جوان در ارتباط باشد.

براون (Brown) (۲۰۰۲) میزان بیان نخاعی گیرنده NMDA را از بدو تولد تا سن بلوغ در موش‌های صحرايي مورد بررسی قرار داده است، در این آزمایش میزان بیان کلیه زیر واحدهای گیرنده NMDA تا دو هفتهگی افزایش داشته و سپس تا رسیدن به سن بلوغ کاهش یافته است (۲۶).

استگنگا (Stegenga) (۲۰۰۱) میزان بیان رسپتور NR1 را در نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در موش‌های صحرايي بالغ و جوان مورد بررسی قرار داد، نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان رسپتور مذکور در موش‌های بالغ نسبت به موش‌های جوان کمتر است (۲۷). دلیل دیگر می‌تواند تفاوت در



بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که تجویز توأم این دو دارو از کاربرد تک تک آن‌ها مؤثرتر است (۱۹). میکا (۲۰۰۷) نشان داد که استفاده مینوسیکلین به همراه مورفین می‌تواند اثر بی‌دردی مورفین در کاهش آلودینیا و هیپرالژزیا در شرایط نوروپاتیک را تقویت کند. در آن مطالعه تزریق داخل صفاقی مینوسیکلین با دوز ۱۶ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، یک ساعت قبل از بستن عصب و سپس دو بار در روز تا روز هفتم بعد از جراحی به همراه مورفین مورد استفاده قرار گرفت (۳۱). با توجه به اینکه مکانیسم‌های وابسته به میکروگلیا و همچنین گیرنده NMDA هر دو در درد نوروپاتی تأثیر بسزایی دارند (۱۵)، کاربرد توأم مهارکننده‌های آن‌ها توانسته است اثرات یکدیگر را تقویت کند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که میکروگلیا و گیرنده NMDA در تفاوت‌های وابسته به سن درد نوروپاتیک دخیل می‌باشند، ولی نقش میکروگلیا در پیدایش و حفظ دردهای نوروپاتیک بارزتر بوده است. از طرفی مهار میکروگلیا و گیرنده NMDA به تنهایی و یا به صورت توأم روی کاهش علائم درد نوروپاتیک مؤثر بوده است.

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد فیزیولوژی بوده که تمامی مراحل آزمایشگاهی و نگارش آن در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران با راهنمایی دانشیار محترم گروه سرکار خانم دکتر هما مناهجی صورت پذیرفته و از تمامی اساتید و همکاران گروه که در انجام این مطالعه مساعدت کردند صمیمانه سپاس‌گزاریم.

## References:

1. Back SK, Kim MA, Kim HJ, et al. Developmental characteristics of neuropathic pain induced by peripheral nerve injury of rats

روز ۳ و ۷ بعد از جراحی نشان داد (۳۰). در مطالعه‌ی حاضر مینوسیکلین در موش‌های جوان در مقایسه با موش‌های بالغ (عکس دکسترومتورفان)، مؤثرتر عمل کرده است. علت اثرگذاری بهتر مینوسیکلین در کاهش آلودینیا مکانیکی و هیپرالژزیا حرارتی در موش‌های جوان در مقایسه با موش‌های بالغ احتمالاً به فعال شدن بیشتر میکروگلیا در پاسخ به آسیب عصبی در موش‌های بالغ مربوط می‌شود. نتایج مولکولی مطالعه حاضر و مطالعات وگا و موس (Vega & Moss) (۲۰۰۷)، این موضوع را نشان داده است (۲ و ۹). با توجه به مطالعات قبلی و مطالعه حاضر دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین و دکسترومتورفان در کاهش آلودینیا در موش‌های بالغ تأثیری نداشته یا اثر آن کم بوده است. بنابراین در مطالعه حاضر، محققین نتیجه کاربرد توأم این دو دارو را در موش‌های بالغ مورد بررسی قرار دادند. تجویز توأم این دو دارو مؤثرتر از هر یک به تنهایی در کاهش آلودینیا عمل کرده است، اما در مورد تأثیر توأم این دو دارو بر هیپرالژزیا این تأثیر مشهود نبوده است. در مورد استفاده همزمان مینوسیکلین و دکسترومتورفان در مطالعات قبلی مورد مشابهی دیده نشد اما استفاده همزمان هر یک از این داروها با داروهای دیگر به چشم می‌خورد و استفاده آن‌ها با داروهای دیگر توانسته است به صورت مؤثرتری بر درد نوروپاتیک تأثیر بگذارد.

وانگ (Wang) (۲۰۰۹) تأثیر تجویز توأم دکسترومتورفان و ملاتونین را در موش‌های صحرائی و در مدل درد CCI بر آلودینیا و هیپرالژزیا مورد

during neonatal period. *Neurosci res* 2008; 61: 412-9.

2. Vega-Avelaira D, Moss A, Fitzgerald M. Age-

- related changes in the spinal cord microglial and astrocytic response profile to nerve injury. *Brain, behav, immun* 2007; 21: 617-23.
3. Wilson JA, Garry EM, Anderson HA, et al. NMDA receptor antagonist treatment at the time of nerve injury prevents injury-induced changes in spinal NR1 and NR2B subunit expression and increases the sensitivity of residual pain behaviours to subsequently administered NMDA receptor antagonists. *Pain* 2005; 117: 421-32.
  4. Tawfik VL, Nutile-McMenemy N, LaCroix-Fralish ML, et al. Efficacy of propentofylline, a glial modulating agent, on existing mechanical allodynia following peripheral nerve injury. *Brain, behav, immun* 2007; 21: 238-46.
  5. Jing-Xia H, Xiao-Jun X. Treatment of a chronic allodynia-like response in spinally injured rats: effects of systemically administered excitatory amino acid receptor antagonists. *Pain* 1996; 66: 279-85.
  6. Anand P, Birch R. Restoration of sensory function and lack of long-term chronic pain syndromes after brachial plexus injury in human neonates. *Brain* 2002; 125: 113-22.
  7. Howard RF, Walker SM, Michael Mota P, et al. The ontogeny of neuropathic pain: postnatal onset of mechanical allodynia in rat spared nerve injury (SNI) and chronic constriction injury (CCI) models. *Pain* 2005; 115: 382-9.
  8. Resnick DK, Levy EI, Jannetta PJ. Microvascular decompression for pediatric onset trigeminal neuralgia. *Neurosurgery* 1998; 43: 804-7.
  9. Moss A, Beggs S, Vega-Avelaira D, et al. Spinal microglia and neuropathic pain in young rats. *Pain* 2007; 128: 215-24.
  10. Pickering G, Jourdan D, Millecamps M, et al. Age-related impact of neuropathic pain on animal behaviour. *Eur J Pain* 2006; 10: 749-55.
  11. Novak JC, Lovell JA, Stuesse SL, et al. Aging and neuropathic pain. *brain res* 1999; 833: 308-10.
  12. Crisp T, Giles JR, Cruce WL, et al. The effects of aging on thermal hyperalgesia and tactile-evoked allodynia using two models of peripheral mononeuropathy in the rat. *Neurosci lett* 2003; 339: 103-6.
  13. Qu XX, Cai J, Li MJ, et al. Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp neurol* 2009; 215: 298-307.
  14. Huang C, Li HT, Shi YS, et al. Ketamine potentiates the effect of electroacupuncture on mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci lett* 2004; 368: 327-31.
  15. Zhuo M, Wu G, Wu LJ. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain*. 2011; 4: 1-12.
  16. Abdul-Razzak R, Bagust J, Kerkut GA. Postnatal changes in the role of NMDA in the isolated spinal cord of the hamster, *Mesocricetus auratus*. *Comp Biochem Physiol* 1994; 107: 205-12.
  17. Urch C, Rahman W, Dickenson A. Electrophysiological studies on the role of the NMDA receptor in nociception in the developing rat spinal cord. *Brain Res* 2001; 126: 81-9.
  18. Karimi G, Tabrizian K, Rezaee R. Evaluation of the analgesic effect of dextromethorphan and its interaction with nitric oxide on sciatic nerve ligated rats. *J Acupunct Meridian* 2010; 3: 38-42.
  19. Wang S, Zhang L, Lim G, et al. A combined effect of dextromethorphan and melatonin on neuropathic pain behavior in rats. *Brain Res*. 2009; 1288: 42-9.
  20. Svensson CI, Schafers M, Jones TL, et al. Covariance among age, spinal p38 MAP kinase activation and allodynia. *J Pain* 2006; 7: 337-45.
  21. Ho Kim S, Mo Chung J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355-63.
  22. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J neurosci methods* 1994; 53: 55-63.
  23. Munglani R, Hudspith M, Fleming B, et al. Effect of pre-emptive NMDA antagonist treatment on long-term Fos expression and hyperalgesia in a model of chronic neuropathic pain. *Brain res* 1999; 822: 210-19.
  24. Osikowicz M, Mika J, Makuch W, et al. Glutamate receptor ligands attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate morphine effects in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 2008; 139: 117-26.
  25. Tal M, Bennett GJ. Dextrorphan relieves

- neuropathic heat-evoked hyperalgesia in the rat. *Neurosci lett* 1993; 151: 107-10.
26. Brown KM, Wrathall JR, Yasuda RP, et al. Quantitative measurement of glutamate receptor subunit protein expression in the postnatal rat spinal cord. *Brain Res* 2002; 137: 127-33.
27. Stegenga SL, Kalb RG. Developmental regulation of N-methyl-D-aspartate- and kainate-type glutamate receptor expression in the rat spinal cord. *Neuroscience* 2001; 105: 499-507.
28. Gonzalez DL, Fuchs JL, Droge MH. Distribution of NMDA receptor binding in developing mouse spinal cord. *Neurosci lett* 1993; 151: 134-7.
29. Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 624-30.
30. Mika J, Rojewska E, Makuch W, et al. Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2010; 165: 1420-8.
31. Mika J, Osikowicz M, Makuch W, et al. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur J pharmacol* 2007; 560: 142-9.

*Original Article*

# The evaluation of role of NMDA receptor and spinal microglia on age dependent differences of neuropathic pain in SNL model in male rats

*H. zeinali*<sup>1,5</sup>, *H. Shardi-Manaheji*<sup>2\*</sup>, *S. Nazemi*<sup>3</sup>, *M. sadeghi*<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Department of Neurophysiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science*

<sup>2</sup> *Neuroscience Research Center, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science*

<sup>3</sup> *Department of physiology, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Science*

<sup>4</sup> *Department of physiology, School of Medicine, Boushehr University of Medical Science*

<sup>5</sup> *Department of physiology, School of Medicine, Qom University of Medical Science*

(Received 20 Jul, 2013      Accepted 26 Sep, 2013)

## *Abstract*

**Background:** Induced neuropathic pain following nerve injury has behavioral signs such as allodynia and hyperalgesia. There are reports about the age dependent differences in severity and incidence and even therapeutic response of this pain. In this study, we have tried to evaluate behavioral differences of this pain in an induced neuropathic model in different ages, according to important role of N-methyl, D-aspartate (NMDA) receptor and spinal microglia on induction and maintenance of pain.

**Material and methods:** Male rats were grouped in young (5-6 week) and mature (10-11 week). Under general anesthesia, the spinal nerve ligation (SNL) surgery was operated on right leg. The effect of different doses of dextromethorphan (NMDA blocker) and minocycline (microglia inhibitor) on 5<sup>th</sup> day after surgery was evaluated and compared in two age-groups.

**Results:** In this study, both Minocycline and dextromethorphan diminished neuropathic pain in a dose dependent manner in these two ages. Minocycline in contrast to dextromethorphan was more effective in young rats. The co-administration of ineffective doses of minocycline and dextromethorphan could be effective.

**Conclusion:** Microglia and NMDA receptor function in neuropathic pain is different in different ages and the role of microglia is more evident. On the other hand the inhibition of both microglia and NMDA receptor can be considered for lowering neuropathic pain.

**Key words:** NMDA, Spinal microglia Allodynia, Hyperalgesia, Dextromethorphan, Minocycline.

\*Address for correspondence: Tehran, Department of Neurophysiology and Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Science. E-mail address: [hshardimanaheji@yahoo.com](mailto:hshardimanaheji@yahoo.com)