دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۱، صفحه ۲۶ - ۱۵ (فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴)

ISMJ 2015; 18(1): 15-26

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

حسین زینلی [۱ و ۵]، هما شاردی‌مناهجی [۲*]، صمد ناظمی [۳]، مهدی صادقی [۴]

[۱] گروه نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
[۲] مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشی تهران
[۳] گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار
[۴] گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
[۵] 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 هیپرآلژزیا می‌باشد. در شدت، میزان بروز و حتی پاسخ به درمان این درد، تفاوت‌های وابسته به سن گزارش شده است. در این مطالعه تلاش شده است تا به تفاوت‌های رفتاری درد، در گروه‌های 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 روش‌ها: موش‌های صحرایی 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 (مهار کننده **NMDA**) و مینوسیکلین (مهار کننده میکروگلیا) در روز ۵ بعد از جراحی روی آلودینیا مکانیکی و هیپرآلژزیای حرارتی در دو گروه سنی، مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: این مطالعه نشان می‌دهد که مینوسیکلین و دکسترومتورفان به‌صورت وابسته به دوز، علایم درد نوروپاتیک را در دو گروه سنی کاهش می‌دهند. مینوسیکلین بر عکس دکسترومتورفان، در گروه سنی جوان مؤثرتر بود. استفاده توأم دوزهای غیر مؤثر مینوسیکلین و دکسترومتورفان توانست مؤثر واقع شود.

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

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

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

Email :hshardimanaheji@yahoo.com

مقدمه

درد نوروپاتیک یک نوع درد مزمن است که به‌دنبال آسیب سیستم عصبی ایجاد می‌شود و با علایم رفتاری مثل درد خودبخودی، هیپرآلژزیا و آلودینیا همراه است (۳-۱).

افراد زیادی در سراسر جهان به این نوع درد مبتلا می‌باشند به‌طوری 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 نوروپاتیک را مورد تأیید قرار می‌دهد (۷). این تغییرات هم در میزان بروز، توسعه و ادامه درد (۷)، و هم در پاسخ به درمان درد نوروپاتیک دیده شده است (۸). بر اساس شواهد موجود، میزان بروز درد نوروپاتیک در کودکان در مقایسه با بزرگسالان کمتر است (۹). با افزایش سن، میزان بروز و همچنین شدت درد نوروپاتیک افزایش می‌یابد (۱۰ و ۱۱).

بزرگسالانی که علایم درد نوروپاتیک را در کودکی داشته‌اند در مقایسه با کسانی که در بزرگسالی به درد نوروپاتیک مبتلا می‌شوند اقدامات درمانی کمتری نیاز دارند (۸). شواهدی هم وجود دارد که ناقض مطالب فوق می‌باشد، به‌طوریکه در مطالعه‌ای موش‌های مسن در پاسخ به آسیب عصبی، درد کمتری نسبت به موش‌های جوان از خود نشان دادند (۱۰). ارتباط بین درد نوروپاتیک و سن از مباحث نوین محافل علمی مرتبط با درد بوده و سؤالات زیادی دراین مورد به وجود آورده است. با وجود بیش از سه دهه تلاش و بررسی پیرامون درد نوروپاتیک هنوز مکانیسم‌های فیزیوپاتولوژیک این نوع درد به‌خصوص مکانیسم‌های مربوط به تفاوت‌های وابسته به سن درد نوروپاتیک به خوبی شناخته نشده است (۱۲ و ۱۳). گیرنده گلوتاماتی NMDA (N-methyl ،D-aspartate) در القاء و توسعه درد نوروپاتیک 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 نوروپاتیک شناخته شده است، نقش اصلی ایفا می‌کند (۱۳).

به‌نظر می‌رسد گیرنده گلوتاماتی NMDA در تفاوت‌های وابسته به سن درد نوروپاتیک 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 به‌صورت وابسته به دوز رفتارهای درد نوروپاتیک (آلودینیا و هیپرآلژزیا) 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 نوروپاتیک مورد تأیید و تأکید قرار گرفته است (۱۵). از بین مدل‌های مولد درد نوروپاتیک، مدل آسیب مزمن فشاری (CCI) و آسیب عصبی محدود (SNI) در زمینه تفاوت‌های وابسته به سن درد نوروپاتیک، بیشتر

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 نوروپاتیک 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 نوروپاتیک 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 نوروپاتیک، 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 کرست 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 رنزور 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 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 هیپرآلژزیای 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± انحراف معیار بیان شده‌اند.

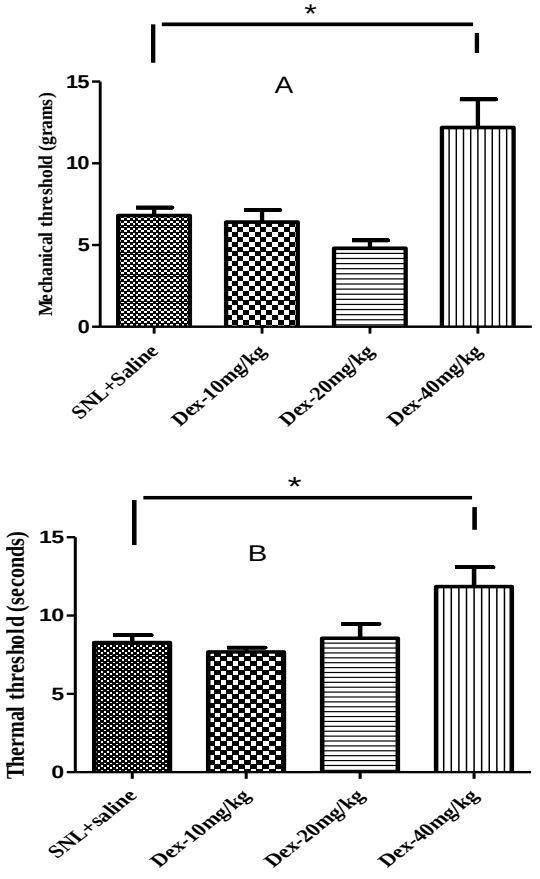
برای مقایسه گروه شم و SNL در روزهای قبل و بعد از جراحی از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه‌ی داده‌های تکراری (Two Way ANOVA Repeated measure) و برای مقایسه گروه‌ها قبل و بعد از تجویز داروها و مقایسه گروه‌ها با یکدیگر به‌ترتیب از آزمون تی زوجی (paired t-test) و تی مستقل (Unpaired t-test) استفاده شد. در مواردی 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 پریزم ۵ (Graph pad prism 5) استفاده شده است. (P<۰/۰۵) به‌صورت معنی‌دار تلقی شده است.

لازم به‌ذکر 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 به‌دلیل 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

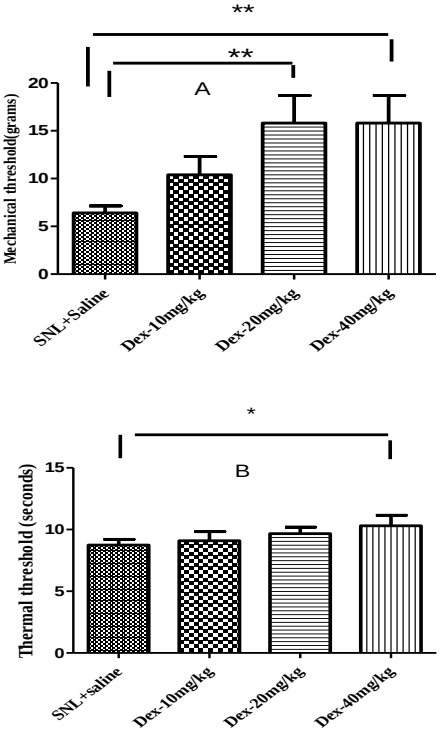
در این مطالعه برای تأیید ایجاد نوروپاتی توسط مدل SNL قبل از آزمایشات اصلی یک گروه شم (کاذب) و یک گروه SNL از هر سن مورد مقایسه قرار گرفتند و نتایج حکایت از ایجاد حداکثر درد در روز پنجم بعد از جراحی SNL و عدم ایجاد درد در گروه شم داشت. به همین دلیل آزمایشات تا روز پنجم یا در روز پنجم بعد از جراحی صورت می‌گرفت. به‌دلیل 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.

بر اساس شکل ۱ (A)، دکسترومتورفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، در موش‌های جوان آستانه درد مکانیکی را در مقایسه با گروه سالین به‌صورت معنی‌داری افزایش داده است (P<۰/۰۵). 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 به‌صورت معنی‌داری افزایش داده است (P<۰/۰۵) ولی دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیری نداشته است.



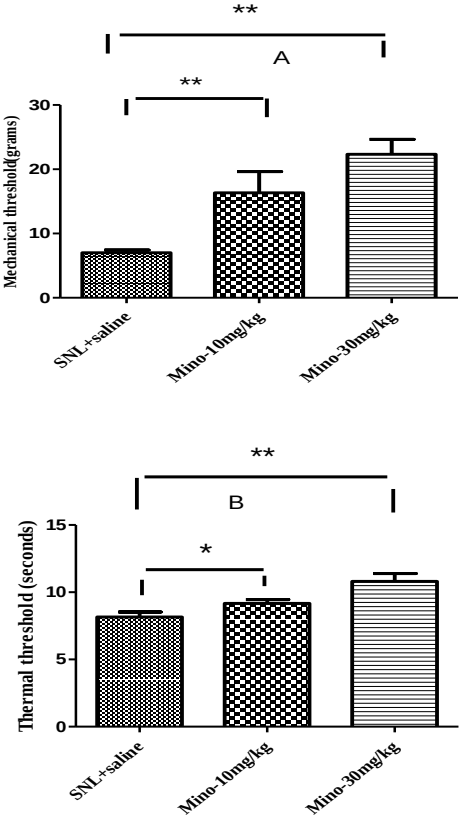
شکل ۱) اثر دکسترومتورفان (Dex) با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر آستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش‌های جوان (۶-۵ هفته) در گروه SNL (Unpaired t- test، *:P<۰/۰۵) (n=۶)

بر اساس شکل ۲(A) در گروه سنی بالغ (۱۱-۱۰ هفته)، دکسترومتورفان با دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، در مقایسه با گروه سالین افزایش معنی‌داری در آستانه درد مکانیکی ایجاد کرده است (P<۰/۰۵). دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اگر چه آستانه مکانیکی درد را افزایش داده اما معنی‌دار نبوده است. در گروه سنی بالغ، دکسترومتورفان با دوز ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن آستانه درد حرارتی را نسبت به گروه سالین افزایش داده است اما معنی‌دار نبوده است. دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن توانسته است به‌صورت معنی‌داری آستانه حرارتی درد را افزایش دهد (P<۰/۰۵) (شکل ۲)(B).



شکل ۲) اثر دکسترومتورفان (Dex) با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر آستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش‌های بالغ (۱۱-۱۰ هفته) جراحی SNL (P<۰/۰۵)*Unpaired t- test: (n=۶)

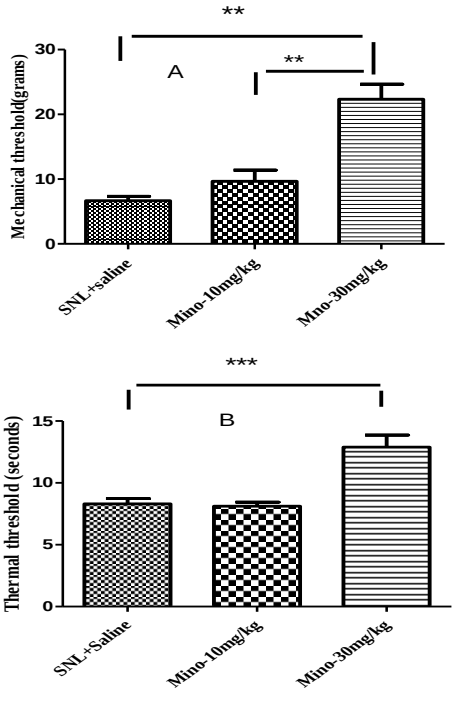
بر اساس شکل ۳ (A) تزریق مینوسیکلین با دوز ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در موش‌های جوان نوروپاتیک توانسته است آستانه درد مکانیکی را نسبت به گروه سالین به‌صورت معنی‌دار افزایش دهد (P<۰/۰۱). با توجه به شکل ۳ (B)، مینوسیکلین با دوز ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانسته است در گروه سنی جوان آستانه درد حرارتی را نیز نسبت به گروه سالین به‌صورت معنی‌دار افزایش دهد اما میزان معنی‌داری آن در مورد دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (P<۰/۰۱) بیشتر از دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (P<۰/۰۵) بوده است.



شکل ۳) تزریق داخل صفاقی روزانه مینوسیکلین (Mino) تا روز ۵ بعد از جراحی SNL و تأثیر آن برآستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش‌های جوان (۶-۵ هفته) (P<۰/۰۵)*Unpaired t- test: (n=۶) (P<۰/۰۱)**

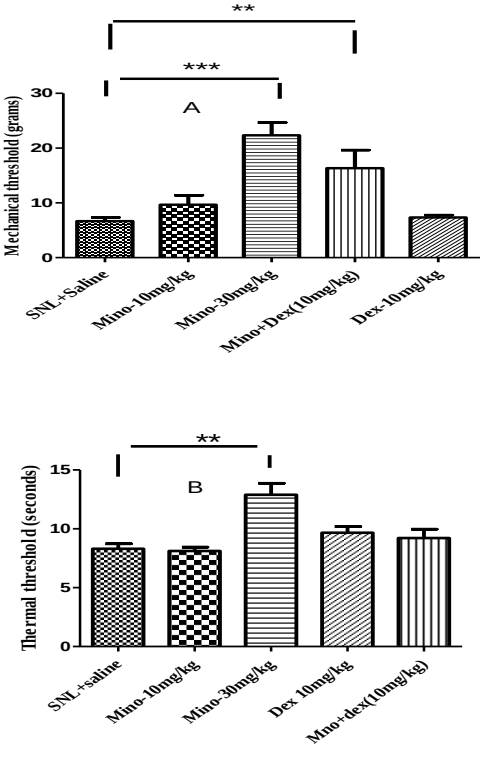
با توجه به شکل ۴ (A) در گروه سنی بالغ، مینوسیکلین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانسته است آستانه مکانیکی درد را به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه سالین افزایش دهد (P<۰/۰۱) اما دوز

۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نتوانسته است افزایش معنی‌داری ایجاد کند. بر اساس شکل ۴ (B)، مینوسیکلین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانسته است افزایش معناداری در آستانه درد حرارتی نسبت به گروه سالین ایجاد کند (P<۰/۰۰۱) 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 (۱۱-۱۰ هفته) (Unpaired t- test، **: (P<۰/۰۱)، ***: (P<۰/۰۰۱) (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 در موش‌های بالغ توانسته است به‌صورت معنی‌داری آستانه درد مکانیکی را بهبود بخشد (P<۰/۰۱). اما در مقایسه با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین کمتر معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۰۱). 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 به‌صورت معنی‌دار آستانه درد حرارتی را بهبود بخشد.



شکل ۵) تأثیر دکسترومتورفان (Dex) داخل صفاقی در روز ۵ بعد از جراحی SNL و مینوسیکلین (Mino) (روزانه تا روز ۵) به‌صورت منفرد و یا با هم و تأثیر آن روی آستانه درد مکانیکی (A) و حرارتی (B) در موش‌های بالغ (۱۱-۱۰هفته) (Unpaired t-test، **: (P<۰/۰۱) ***(P<۰/۰۰۱) (n=۶)

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 (هیپرآلژزیای 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 به‌میزان 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 به‌صورت مؤثرتری توانسته است علایم درد نوروپاتیک 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 علایم درد نوروپاتیک (هیپرآلژزیا 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 دکسترورفان (Dextrorphan) را نیز در کاهش آلودینیا و هیپرآلژزیا 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 هیپرآلژزیا متعاقب نوروپاتی با روش CCI در موش‌های کوچک (mice) مورد آزمایش قرار داد. در این آزمایش مشابه مطالعه حاضر دکسترومتورفان به‌صورت وابسته به دوز توانست هیپرآلژزیای حرارتی را کاهش دهد (۱۸).

تال و بنت (Bennett & Tal) (۱۹۹۲) نیز نشان دادند که دکسترورفان به‌صورت وابسته به دوز، هیپرآلژزیای 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 (Hamester) 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 غیرنوروپاتیک مورد ارزیابی قرار داده است که در آن مطالعه تأثیر AP5 در موش‌های نابالغ نسبت به موش‌های بالغ بیشتر بوده

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 غیرنوروپاتیک و در محیط آزمایشگاهی (Invitro) انجام پذیرفته است، بنابراین بخشی از این تناقضات می‌تواند به این موارد برگردد (۱۷).

هیپرآلژزیای 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 صحرایی مورد بررسی قرار داده است، در این آزمایش میزان بیان کلیه زیر واحدهای گیرنده NMDA تا دو هفتگی 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 صحرایی 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 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.

راگاواندرا (Raghavandra) (۲۰۰۳) دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به‌صورت داخل صفاقی و پیش درمانی 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 ($P<۰/۰۵$) و دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با میزان بیشتری ($P<۰/۰۱$) آلودینیا و هیپرآلژزیا را کاهش دادند اما همین دوزها وقتی از روز ۵ بعد از جراحی به بعد مورد استفاده قرار گرفت نتوانستند از ایجاد آلودینیا یا هیپرآلژزیا 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 هیپرآلژزیا را به‌ترتیب در

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 آلودینیای مکانیکی و هیپرآلژزیای 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 هیپرآلژزیا 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 به‌صورت مؤثرتری بر درد نوروپاتیک تأثیر بگذارد.

وانگ (Wang) (۲۰۰۹) تأثیر تجویز توام دکسترومتورفان و ملاتونین را در موش‌های صحرایی و در مدل درد CCI بر آلودینیا و هیپرآلژزیا مورد 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 هیپرآلژزیا 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 مهار کننده‌های 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 به‌صورت 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 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.

ISMJ 2015; 18(1): 15-26

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 [1,5], H. Shardi-Manaheji [2], S. Nazemi [3], M. sadeghi [4]*

[1] Department of Neurophysiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science
[2] Neuroscience Research Center, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science
[3] Department of physiology, School of Medicine,Sabzevar University of Medical Science
[4] Department of physiology, School of Medicine, Boushehr University of Medical Science
[5] 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 5th 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