



مطالعه اثر آگونیست گیرنده GABA A و مهار گلیا بر پاسخ‌های رفتاری درد نوروپاتی مدل CCI در موش صحرایی

مهدی صادقی^۱، هما مناهجی^{۱*}، عباس حق‌پرست^۲، جلال زرین‌قلم^۳، صمد ناظمی^۴، زهرا بهاری^۱

^۱ گروه نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۳ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

^۴ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

(دریافت مقاله: ۹۲/۳/۵- پذیرش مقاله: ۹۲/۴/۲)

چکیده

زمینه: مکانیسم‌های مسئول ایجاد درد نوروپاتی پیچیده و بحث برانگیزند. از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها می‌توان به کاهش اثر مهار گلیا و فعال شدن گلیا در شاخ خلفی نخاع، به دنبال نوروپاتی اشاره کرد. با توجه به پیچیدگی مکانیسم‌های مربوط به تغییرات عوامل گاباآرژیک و فعال شدن گلیا در درد نوروپاتی و عدم وجود نتایج همسو، در این مطالعه تلاش گردیده تا به بررسی نقش موسیمول به‌عنوان آگونیست گیرنده گابا A و پنتوکسی فیلین به‌عنوان مهار کننده گلیا در مدل درد نوروپاتی (CCI (Chronic Constriction Injury) پرداخته شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از موش‌های صحرایی نر ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) استفاده شد و جهت ایجاد نوروپاتی از مدل CCI (روش Bennett, ۱۹۸۸) استفاده گردید. در گروه شم پس از باز کردن و رؤیت عصب سیاتیک، ناحیه جراحی دوباره بسته شد. پنتوکسی فیلین از یک روز قبل از نوروپاتی و تا ۱۴ روز بعد از CCI (روزانه ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تزریق گردید. تست‌های رفتاری (پلاتنار تست و فونفری) یک روز قبل و سپس به ترتیب در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ بعد از جراحی و نیم ساعت پس از تزریق پنتوکسی فیلین انجام شد. در گروه‌هایی که موسیمول را با دوزهای ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز ۱۴ بعد از CCI دریافت نمودند، تست‌های رفتاری قبل از تزریق و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق دارو انجام می‌شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ایجاد CCI باعث بروز نشانه‌های درد نوروپاتی گردیده ولی تزریق پنتوکسی فیلین و موسیمول توانسته است پاسخ‌های رفتاری درد را کاهش دهد. به نظر می‌رسد که این کاهش در مورد اثر موسیمول (۲، ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) روی هیپرالژزیای حرارتی مؤثرتر از پنتوکسی فیلین، و در مورد اثر پنتوکسی فیلین (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) روی آلودینیای مکانیکی مؤثرتر از موسیمول باشد. **نتیجه‌گیری:** موسیمول با تحریک گیرنده گابا A و پنتوکسی فیلین با مهار گلیا باعث کاهش علائم رفتاری درد نوروپاتی به دنبال آسیب عصبی می‌شود.

واژگان کلیدی: درد نوروپاتی، هیپرالژزیای، آلودینیا، CCI، موسیمول، پنتوکسی فیلین

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

مقدمه

درد نوروپاتیک با تخریب یا اختلال در عملکرد سیستم عصبی مرکزی یا محیطی همراه است (۱ و ۲). این درد نوعی درد مزمن است که بیماران زیادی از آن رنج می‌برند و به دلیل مشخص نبودن مکانیسم و عوامل مربوط به آن، هنوز درمان مناسب و قطعی ارائه نشده است. علائم بیان شده توسط این بیماران متفاوت و گسترده می‌باشد ولی تقریباً همه این بیماران در وجود دردهای خودبخودی، افزایش حساسیت نسبت به محرک‌های دردزا (هیپرالژیا) و احساس درد نسبت به محرک‌های غیردردزا (آلودینیا) اتفاق نظر دارند (۱، ۳-۶). داروهای تجویز شده در درمان این دردها بر اساس علائم مشاهده شده در بیماران متفاوت می‌باشند. از بین این داروها، ضدافسردگی‌های سه حلقه‌ای، مسدود کننده‌های کانال سدیم، گاباپنتین، اپیوئیدها و بلاکرهای کانال‌های NMDA بیشترین موارد استفاده را دارند ولی هیچ‌یک به‌طور مؤثر نتوانسته‌اند باعث تسکین درد نوروپاتیک شوند. گذشته از این، استفاده از هر یک از داروهای نامبرده به دلیل اثرات جانبی گوناگون محدودیت‌هایی را ایجاد می‌نماید (۶ و ۷). به مکانیسم‌های متفاوتی مانند ترشح بیش از حد اسید آمینه‌های تحریکی، فعال شدن سلول‌های گلیا، تغییر در عملکرد کانال‌های سدیمی و کلسیمی، حساس شدن مرکزی، ایجاد تقویت طولانی مدت (LTP)^۱ و تحریک‌پذیری آکسون‌های آسیب دیده، در ایجاد دردهای نوروپاتیک اشاره شده است. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌ها، کاهش اثر مهارتی نورون‌های گاباآرژیک نخاع می‌باشد (۱، ۳ و ۴). بررسی‌ها کاهش سطح گابای نخاع، ایترونورون‌ها،

ترانسپورترها، آنزیم‌های سازنده و رسپتورهای آن را گزارش نموده‌اند (۱، ۳، ۶، ۸ و ۹). کوهنو (Kohno) و همکاران (۲۰۰۳) کاهش اثر مهارتی گابا را بعد از آسیب عصبی، در نتیجه کاهش ورودی آوران‌های اولیه به نورون‌های گاباآرژیک شاخ خلفی نخاع عنوان کردند (۱۰). از سوی دیگر برخلاف یافته‌های فوق، برخی بررسی‌ها در حیوانات نوروپاتیک عدم تغییر رسپتورهای گابا، ایترونورون‌های گاباآرژیک، آنزیم‌های سازنده آن و مقدار گابا را نشان داده‌اند (۱ و ۱۱). پژوهش‌ها نیز افزایش سطح گابا در شاخ خلفی نخاع و حتی افزایش اثر مهارتی آن را در نورون‌های شاخ خلفی، به دنبال آسیب عصب محیطی گزارش نموده‌اند (۱ و ۱۲).

گابا مهم‌ترین نوروترانسمیتر مهارتی در CNS می‌باشد (۵، ۹، ۱۳ و ۱۴) و می‌تواند با سه گیرنده گابا A، گابا B و گابا C تداخل نماید (۲، ۱۴ و ۱۵). هر دو گیرنده گابا A و B در طناب نخاعی موش صحرائی وجود دارند (۹ و ۱۶). به‌طوری که تحریک این گیرنده‌ها در شاخ خلفی نخاع ایجاد بی‌دردی می‌کند (۱۷). گیرنده‌های گابا A روی فیبرهای آوران اولیه A دلتا و C قرار دارند (۹ و ۱۷) و تحریک این گیرنده‌ها هیپرالژیا را کاهش می‌دهد (۱۸). موسیمول آگونیست گیرنده گابا A می‌باشد (۸، ۱۲ و ۱۹) و تزریق داخل نخاعی آن بر آلودینیای مکانیکی موش‌های دیابتی، بی‌تأثیر بود (۱۲) ولی آلودینیای مکانیکی را به دنبال ایجاد نوروپاتی دم کاهش داد (۱). اثرات ضددردی موسیمول همچنین در آزمون‌هایی مانند Tail flick (۱۲)، آزمون صفحه داغ و تست فرمالین پیش از این نشان داده شده است (۹ و ۲۰). برخی بررسی‌ها به بی‌اثر بودن موسیمول بر درد نوروپاتی نیز اشاره کرده‌اند (۱۳).

¹ Long Term Potentiation

اثری بر پاسخ‌های رفتاری و الکتروفیزیولوژی حیوان به محرک‌های مکانیکی یا حرارتی دردناک ندارد، ولی پس از آسیب عصب، فعال شده و فاکتورهای گوناگونی مانند کموکلین‌ها، سیتوکین‌ها و BDNF تولید می‌کنند که با اثر بر نورون‌ها، فعالیت سیستم درد را تغییر داده و تغییرات ساختمانی، الکتروفیزیولوژی و مولکولی در شاخ خلفی نخاع به وجود می‌آورند که منجر به پیدایش آلودینیا و هیپرالژیا می‌شوند (۲۱، ۲۳، ۲۴ و ۲۵). میکروگلیا و آستروسیت‌ها در القاء و تداوم درد نوروپاتی نقش دارند (۲۱، ۲۶ و ۲۷) و تحریک این سلول‌ها در شاخ خلفی نخاع موجب درد می‌شود (۲۱). استفاده از داروهای مهار کننده فعال شدن گلیاها و یا عوامل خنثی کننده اثر کموکلین‌ها و سیتوکین‌های پیش التهابی علائم رفتاری و الکتروفیزیولوژیک حاصل از آسیب‌های عصبی را کاهش می‌دهد و در بهبود دردهای نوروپاتی مؤثر می‌باشد (۲۴) و (۲۸). پروپتوفیلین، پتوکسی‌فیلین، مینوسیکلین و ایبودیلات از مهم‌ترین ترکیباتی هستند که با مهار تولید سیتوکین‌ها و فعال شدن گلیا موجب مهار روند ایجاد نوروپاتی می‌شوند (۲۹ و ۳۰).

برخی بررسی‌ها نیز تأثیر مهار سلول‌های گلیا را بعد از ایجاد نوروپاتی مورد بررسی قرار داده‌اند ولی نشان داده شده است که استفاده از ترکیبات مهار کننده سلول‌های گلیا قبل از نوروپاتی و قبل از فعال شدن این سلول‌ها، اثر درمانی بهتری ایجاد می‌کند (۳۱).

در پژوهشی که در نوروپاتی حاصل از قطع عصب L5 انجام شد، تزریق پتوکسی‌فیلین به مدت هفت روز بعد از نوروپاتی، هیپرالژزیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی را کاهش داد (۲۲). محققان نشان داده‌اند که پتوکسی‌فیلین بروز درد نوروپاتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۹) و زمانی که به صورت پیش درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌تواند دردهای پس از عمل جراحی را در

برخی از پژوهشگران به کاهش بیان کوترانسپورتر کلر-پتاسیم (KCC2) در نورون‌ها، به دنبال آسیب عصبی اشاره نموده‌اند (۱، ۴ و ۸). این کوترانسپورتر یکی از چهار نوع کوترانسپورتر کلر-پتاسیم غشاء سلولی می‌باشد که باعث خروج کلر از سلول شده و موجب می‌شود سطح کلر داخل سلول کاهش یابد. به دنبال تحریک رسپتور گابا A، با توجه به غلظت کلر داخل سلول عصبی، انتقال کلر به سمت خارج یا داخل سلول صورت می‌گیرد و بدین‌گونه هیپرپلاریزاسیون یا دپلاریزاسیون ایجاد می‌گردد (۴، ۵ و ۱۲).

گزارش‌هایی نیز در مورد تغییر نکردن بیان KCC2 بعد از نوروپاتی وجود دارد (۴). همچنین در نوروپاتی کاهش بیان KCC2 دیده شده که در نتیجه آن تحریک گیرنده گابا A به جای ورود کلر به داخل سلول و ایجاد هیپرپلاریزاسیون که در حالت طبیعی دیده می‌شود، به دلیل کاهش بیان KCC2 و تجمع کلر در داخل سلول، بر اساس شیب غلظت، کلر از سلول خارج شده و سلول دپلاریزه و تحریک می‌گردد (۱، ۳، ۴، ۶ و ۱۲). بر اساس این مکانیسم، به دنبال نوروپاتی نه تنها اثر مهاری گابا برداشته می‌شود بلکه، اثر تحریکی نیز پیدا می‌کند. در صورت تأیید این مکانیسم انتظار می‌رود که تحریک گیرنده گابا A با موسیمول، سلول را دپلاریزه و تحریک نموده و علائم نوروپاتی را تشدید نماید.

شواهد اخیر نشان می‌دهند که سلول‌های گلیال به عنوان سلول پشتیبان سیستم عصبی نقش مهمی در اعمال سیناپسی و در پاتورنز درد نوروپاتی به عهده دارند. درد نوروپاتی افزایش تعداد و هیپرتروفی سلول‌های گلیا، تغییرات مورفولوژیکی و همچنین افزایش مارکرهای آستروسیتی و میکروگلیایی را به دنبال دارد (۲۱ و ۲۲). این سلول‌ها در شرایط طبیعی، نقش چندانی در تعدیل و کنترل سیستم درد ندارند. در این شرایط داروهای مهار کننده گلیا

بیماران کاهش دهد (۳۲ و ۳۳).

از آنجائی که مکانیسم و عوامل مرتبط با نوروپاتی در مدل‌های مختلف ایجاد درد نوروپاتی، متفاوت بوده و حتی در یک مدل نوروپاتی در زمان‌های مختلف بعد از نوروپاتی، مکانیسم‌های متفاوتی نقش دارند (۱، ۳ و ۶) و نیز از آنجائی که مکانیسم‌های مربوط به کاهش اثر مهارى گابا به دنبال نوروپاتی، بستگی به مدل ایجاد درد نوروپاتی دارد (۳۴) و با توجه به گزارشات متناقض مربوط به نقش گیرنده گابا A در انواع مدل‌های درد نوروپاتی که در بالا ذکر شد و نیز مشخص نبودن نقش موسیمول به‌عنوان آگونیست این گیرنده در مدل نوروپاتی CCI^۲، در این بررسی اثر موسیمول بر پاسخ‌های رفتاری درد نوروپاتی مدل CCI مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین با توجه به نتایج گوناگون حاصل از تزریق پنتوکسی فیلین قبل و یا بعد از نوروپاتی که در مدل‌های مختلف نوروپاتی دیده می‌شود و از آنجائی که در مورد اثر پیش‌درمانی پنتوکسی فیلین در مدل نوروپاتی CCI مطالعه چندانی انجام نشده است، در این پژوهش تلاش شد تا به بررسی اثر پیش‌درمانی پنتوکسی فیلین از یک روز پیش از ایجاد نوروپاتی و ادامه تزریق آن تا ۱۴ روز پس از ایجاد نوروپاتی، بر علائم درد نوروپاتی در مدل حیوانی CCI پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این آزمایش از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰ - ۲۰۰ گرم استفاده گردید. حیوانات همگی در شرایط یکسان و در اتاقی کنترل شده از نظر حرارت و رطوبت در یک سیکل ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و در

قفس‌های جداگانه در گروه‌های ۲ تا ۳ تائی از یک هفته قبل از آزمایش نگهداری شده و در تمام مدت به‌جز زمان انجام آزمایش دسترسی راحت به آب و غذای استاندارد و کافی داشتند. کلیه آزمایش‌ها بین ساعت ۱۴-۸ انجام شدند و در تمامی موارد اعم از جراحی یا بررسی آزمون‌های رفتاری روش‌های استاندارد مربوط به قوانین اخلاقی رعایت گردید و این روش‌ها نیز مورد تأیید کمیته اخلاق تحقیق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بود.

ایجاد مدل نوروپاتی

در این پژوهش از مدل نوروپاتی CCI (مدل Bennett, ۱۹۸۸) استفاده شد (۳۵). تمام اعمال جراحی در محیط استریل انجام گردید. به‌طور خلاصه ابتدا موش‌ها با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بی‌هوش شده، پس از اطمینان از بیهوشی کامل موهای بالا و پشت ران حیوان را کاملاً تراشیده و موضع برش با الکل ضدعفونی شد. سپس با استفاده از تیغ بیستوری شکافی به‌طول ۲ سانتی‌متر بر روی ران پای راست ایجاد کرده و پس از آن به موازات خار ایلیاک شکافی بر روی عضله دو سر ران ایجاد گردید. بعد از کنار زدن عضله دسترسی به عصب سیاتیک فراهم شد، پس از رؤیت قسمت مشترک عصب، عصب سیاتیک با دقت از بافت‌های هم‌بند اطراف خود جدا شد و قبل از محل سه شاخه شدن، به‌وسیله نخ بخیه کرومیک ۰-۴، چهار گره شل به فواصل تقریبی ۱ میلی‌متر روی عصب زده می‌شد. فشار گره‌ها به قدری اعمال می‌شد که اختلالی در جریان خون عصب به وجود نیاید. سپس عصب سیاتیک در محل خود قرار گرفته و با استفاده از نخ بخیه ۰-۴ سیلک، عضلات و پوست به‌طور جداگانه دوخته می‌شدند. در

² Chronic Constriction Injury

ایجاد نماید، به‌عنوان پاسخ به حساب می‌آید. در صورتی که حیوان به تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد عدد ۶۰ به‌عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد.

پایان، محل جراحی توسط سالین استریل شسته و ضدعفونی می‌گردید و حیوانات پس از به هوش آمدن به حیوان‌خانه منتقل می‌شدند.

مطالعات رفتاری

به‌منظور ارزیابی وضعیت تغییرات درد ایجاد شده طی روند نوروپاتی، و پاسخ‌دهی به موسیمول و پنتوکسی‌فیلین، آزمون‌های رفتاری فون‌فری برای سنجش آلودینیای مکانیکی و پلانتر تست برای سنجش هیپرالژیای حرارتی انجام شد. در صورتی که حیوانات علائم مربوط به مدل CCI مانند جمع شدن انگشتان پا و عدم برقراری وزن بر روی پای آسیب دیده را نشان نمی‌دادند، از مطالعه کنار گذاشته می‌شدند.

تست رفتاری فون‌فری برای سنجش آلودینیای مکانیکی

حساسیت مکانیکی به محرک‌های غیر دردناک با اعمال تارهای فون‌فری ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۵، ۲۶ و ۶۰ گرمی (Stoelting, wood dale.II) به کف پای حیوان اندازه‌گیری شده و برای این کار حیوانات روی یک صفحه مشبک فلزی و در داخل یک محفظه پلاستیکی گلاس به ابعاد ۲۰ در ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار گرفته و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه که حیوان با محیط جدید عادت کرد و فعالیت grooming و کاوش محیط جدید متوقف شد، هر تار سه بار متوالی به فاصله ۵ ثانیه و هر بار به مدت زمان حدود یک ثانیه به کف پای آسیب دیده اعمال شد. اگر حیوان دو بار از سه بار اعمال تار پاسخ می‌داد (پای خود را از محرک عقب می‌کشید)، آن تار به‌عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد و در غیر این صورت بعد از پنج دقیقه محرک با شدت بالاتر اعمال می‌گردید. کمترین شدت محرک بر حسب گرم که بتواند ۲ پاسخ مثبت را از مجموع ۳ بار اعمال تحریک

آزمون رفتاری پلانتر تست برای سنجش هیپرالژیای حرارتی

تغییرات هیپرالژیای طی روند پیشرفت نوروپاتی با استفاده از دستگاه Radiant heat test (ساخت شرکت Ugo basil ایتالیا) انجام شد. حیوانات درون محفظه‌های مخصوص دستگاه قرار گرفتند و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه که حیوان به محیط جدید عادت کرد یک منبع متحرک تابش اشعه مادون قرمز را، در زیر کف پای آسیب دیده قرار داده و محرک حرارتی را با شدت ثابت، برای همه گروه‌ها اعمال شد. وقتی حیوان پا را از منبع حرارتی عقب می‌کشید تایمر دستگاه متوقف و منبع حرارتی خاموش می‌شد. مدت زمان تحمل در برابر تابش اشعه گرمایی به کف پا بیانگر آستانه تحمل درد حیوان می‌باشد که بر حسب ثانیه ثبت می‌گردید. اینکار سه بار با فواصل زمانی حداقل ۵ دقیقه برای پای آسیب دیده انجام شد و میانگین این سه بار به‌عنوان آستانه پاسخ برحسب زمان در نظر گرفته شد.

به‌منظور جلوگیری از آسیب بافتی زمان قطع آزمایش (Cut-Off) ۳۳ ثانیه تنظیم گردید.

گروه‌های آزمایشی

گروه‌های شم، نوروپاتی، پنتوکسی‌فیلین و حامل

۳۲ سر موش صحرایی نر در چهار گروه ۸ تایی به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. گروه اول به‌عنوان شم بوده که در این گروه پوست و عضله تا عمقی که عصب نمایان شود برش داده شده و بعد از رؤیت عصب سیاتیک، بدون آسیب به عصب و بدون هیچ‌گونه

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (USA, Il, Chicago, SPSS Inc) ویرایش ۱۹ مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه گروه شم و گروه‌های دریافت کننده دارو و حلال از آزمون One-way ANOVA و repeated measure و برای مقایسه آزمون‌های رفتاری قبل و بعد از تزریق دارو از paired t test استفاده شد. ($p < 0/05$) به عنوان سطح معنی‌دار بوده و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است.

یافته‌ها

در مدل درد نوروپاتی به روش CCI پاسخ حیوانات به تحریک‌های حرارتی و مکانیکی که به ترتیب توسط پلاننار تست و تارهای Von Frey (فون‌فری) اعمال می‌شد، بررسی گردید.

هایپرآلژیای حرارتی

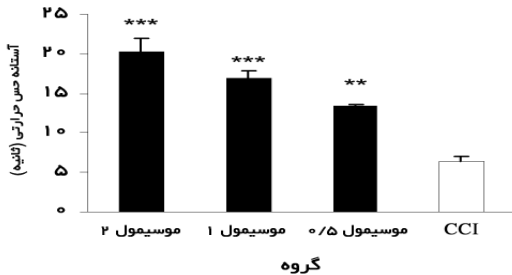
نمودار ۱ اثرات ایجاد نوروپاتی به روش CCI را بر هایپرآلژیای حرارتی نشان می‌دهد. تحریکات درد ناک ناشی از تابش حرارتی که توسط دستگاه پلاننار تست اعمال می‌شد، موجب گردید تا حیوانات ضمن عقب کشیدن پا، رفتارهای تهاجمی مانند تکان دادن و گاز گرفتن پای تحریک شده را نیز از خود نشان بدهند. آنالیز آماری نشان می‌دهد که آستانه تحمل محرک حرارتی در گروهی که آسیب عصبی ایجاد شده (گروه CCI)، به طور معنی‌داری در روزهای چهارم ($p < 0/01$)، هفتم و چهاردهم ($p < 0/001$) پس از آسیب عصبی، نسبت به گروه شم کاهش داشته است.

دستکاری، عضله و پوست دوخته شد. گروه دوم، سوم و چهارم برای ایجاد نوروپاتی CCI تحت جراحی قرار گرفتند، گروه دوم به عنوان گروه نوروپاتی بوده و گروه سوم به منظور بررسی تغییرات در پاسخ‌دهی به پنتوکسی فیلین طی روند نوروپاتی از یک روز قبل از جراحی (روز -۱) تا روز ۱۴ بعد از CCI هر روز مقدار ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتوکسی فیلین (Sigma-Aldrich) به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. گروه چهارم به همین ترتیب از یک روز قبل از جراحی (روز -۱) تا روز ۱۴ بعد از جراحی هر روز سالین، به عنوان حلال پنتوکسی فیلین به صورت داخل صفاقی دریافت داشتند. در این چهار گروه آزمون‌های رفتاری فون‌فری و پلاننار تست یک روز قبل از جراحی (روز -۱) و سپس به ترتیب در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ بعد از جراحی انجام گردید (در گروه‌های دریافت کننده پنتوکسی فیلین و سالین آزمون‌های فوق حداقل ۳۰ دقیقه بعد از آخرین تزریق در روزهای یاد شده انجام شد).

گروه‌های نوروپاتی و دوزهای مختلف موسیمول

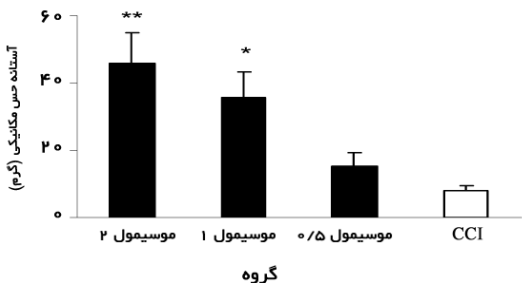
به منظور بررسی نقش موسیمول به عنوان آگونیست گیرنده گابا A بر آلودینیای مکانیکی و هایپرآلژیای حرارتی ناشی از نوروپاتی ایجاد شده با مدل CCI، ۲۴ سر موش صحرایی در سه گروه ۸ تایی تقسیم شده و دوزهای ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم موسیمول (Tocris) به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. در این سه گروه آزمون‌های رفتاری در روز ۱۴ بعد از جراحی که هایپرآلژیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی در حداکثر خود می‌باشد (۳۶)، بررسی شد، بدین ترتیب که ابتدا آزمون‌های رفتاری انجام شده و سپس دوزهای مختلف موسیمول تزریق شده و در فاصله زمانی ۳۰ تا ۶۰ دقیقه بعد از تزریق موسیمول، آزمون‌های رفتاری دوباره انجام شد.

($p < 0.001$) میلی گرم بر کیلوگرم قادر بوده است آستانه درد حرارتی را در موش های CCI شده، افزایش دهد.



نمودار ۳) مقایسه هایپرآلژزای حرارتی بین گروه های مختلف دریافت کننده موسیمول با دوزهای ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر کیلوگرم و گروه CCI در روز چهاردهم بعد از نوروپاتی ($p < 0.001$ و $p < 0.01$)

نمودار ۴) نشان دهنده آلودینیای مکانیکی است که توسط تارهای فونفری اندازه گیری شده است. مقایسه پاسخ گروه های دریافت کننده موسیمول با گروه CCI در روز چهاردهم بعد از نوروپاتی، اختلاف معنی داری را در آلودینیای مکانیکی نشان می دهد، به نحوی که موسیمول با دوز ۱ ($p < 0.05$) و ۲ ($p < 0.01$) میلی گرم بر کیلوگرم توانسته است آستانه درد مکانیکی را افزایش دهد.

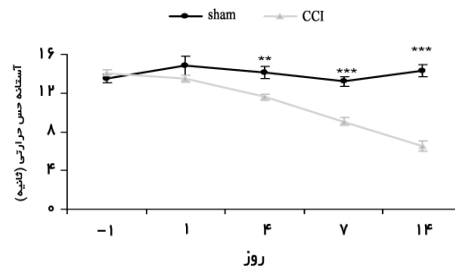


نمودار ۴) مقایسه آلودینیای مکانیکی بین گروه های مختلف دریافت کننده موسیمول با دوزهای ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر کیلوگرم و گروه CCI در روز چهاردهم بعد از نوروپاتی ($p < 0.05$) و ($p < 0.01$)

اثر پنتوکسی فیلین بر هایپرآلژزای حرارتی و

آلودینیای مکانیکی

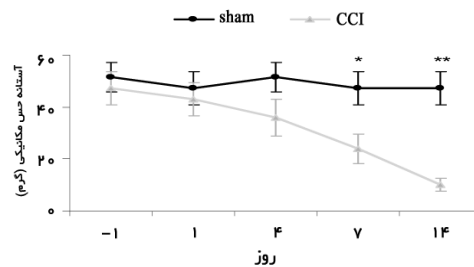
همان طور که نمودار ۵ نشان می دهد تزریق پنتوکسی فیلین از یک روز قبل از CCI و سپس تا روز چهاردهم بعد از آن، هایپر آلژزای حرارتی را کاهش داد. مقایسه هایپر آلژزای حرارتی بین گروه پنتوکسی



نمودار ۱) اثر ایجاد نوروپاتی به روش CCI بر هایپرآلژزای حرارتی که به صورت آستانه حس حرارتی نشان داده شده است. ($p < 0.01$) و ($p < 0.001$)

آلودینیای مکانیکی

نمودار ۲) آستانه تحمل آلودینیای مکانیکی را که با تست فونفری سنجیده شده است، در دو گروه شم و CCI با یکدیگر مقایسه می کند. همان گونه که مشاهده می شود در گروه CCI، کاهش معنی داری در آستانه حس مکانیکی در روز هفتم ($p < 0.05$) و چهاردهم ($p < 0.001$) پس از آسیب عصبی، نسبت به گروه شم دیده می شود.

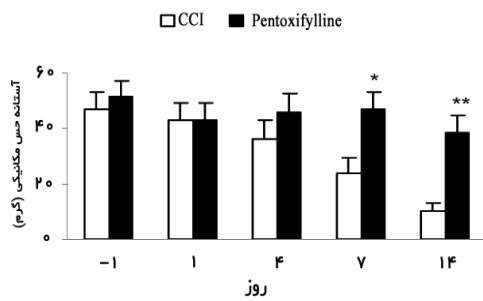


نمودار ۲) اثر ایجاد نوروپاتی به روش CCI بر آلودینیای مکانیکی که به صورت آستانه حس مکانیکی نشان داده شده است. ($p < 0.05$) و ($p < 0.01$)

اثر موسیمول بر هایپرآلژزای حرارتی و آلودینیای

مکانیکی

نمودار ۳) نشان دهنده هایپرآلژزای حرارتی است که با دستگاه پلانتر تست اندازه گیری شده است. یافته ها تفاوت معنی داری را در هایپرآلژزای حرارتی بین گروه های دریافت کننده موسیمول با گروه CCI در روز چهاردهم پس از آسیب عصبی نشان می دهد، به گونه ای که موسیمول در دوزهای ۰/۵ ($p < 0.01$)، ۱ و ۲



نمودار ۶) مقایسه آلودینیای مکانیکی بین گروه دریافت کننده پنتوکسی‌فیلین و گروه CCI. ($p < * / 0.05$ و $p < ** / 0.01$)

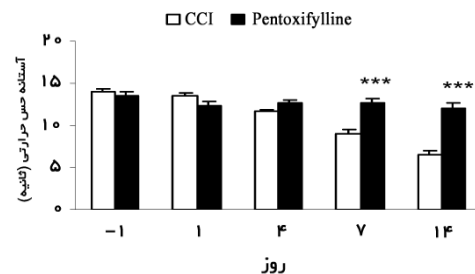
بحث

بررسی کنونی نشان داد که به دنبال CCI، میزان درد و همچنین پاسخ به محرک‌های حرارتی و مکانیکی به‌طور مشخصی افزایش می‌یابد. همچنین تزریق موسیمول با دوزهای ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم هایپرالژزیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی را کاهش می‌دهد و این کاهش در دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشتر از دوز دیگر است. علاوه بر آن تزریق پنتوکسی‌فیلین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان مهار کننده گلیا، هایپرالژزیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی ایجاد شده در اثر نوروپاتی CCI را، کاهش داد.

به نظر می‌رسد که کاهش علائم درد در مورد اثر موسیمول (۱، ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) روی هایپرالژزیای حرارتی مؤثرتر از پنتوکسی‌فیلین، و در مورد اثر پنتوکسی‌فیلین (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) روی آلودینیای مکانیکی مؤثرتر از موسیمول باشد.

این نتایج با نتایج بررسی‌های دیگر از جمله تحقیق بنت (Bennett) و همکاران در سال ۱۹۸۸، مطابقت دارد (۳۵). به‌علاوه در این مطالعه مشخص شد که هایپرالژزیای حرارتی چهار روز و آلودینیای مکانیکی هفت روز بعد از جراحی ظاهر شده و تا روز چهاردهم روند رو به افزایشی را نشان داده‌اند. تفاوت دیده شده بین آلودینیا و هایپرالژزیای می‌تواند به‌علت تفاوت در فیبرهای دخیل در انتقال درد در این دو

فیلین و گروه CCI در یک روز قبل از نوروپاتی (روز -۱) و در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ بعد از نوروپاتی نشان می‌دهد که این کاهش در روزهای هفتم و چهاردهم بعد از نوروپاتی کاملاً معنی‌دار بود ($p < 0.001$). به‌عبارت دیگر پنتوکسی‌فیلین از روز هفتم به بعد آستانه درد حرارتی را افزایش داد.



نمودار ۵) مقایسه هیپرالژزیای حرارتی بین گروه دریافت کننده پنتوکسی‌فیلین و گروه CCI ($p < *** / 0.001$)

نمودار ۶ آلودینیای مکانیکی را بین گروه دریافت کننده پنتوکسی‌فیلین و گروه CCI در یک روز قبل از نوروپاتی (روز -۱) و در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ بعد از نوروپاتی CCI مقایسه می‌نماید. تا روز هفتم تفاوت معنی‌داری بین دو گروه دیده نمی‌شود ولی در گروه پنتوکسی‌فیلین کاهش معنی‌دار آماری در آلودینیای مکانیکی نسبت به گروه CCI در روز هفتم ($p < 0.05$) و چهاردهم ($p < 0.01$) دیده می‌شود و پنتوکسی‌فیلین قادر بوده است از روز هفتم به بعد آستانه درد مکانیکی را افزایش داده است.

یافته‌های آزمون‌های رفتاری گروهی که به جای پنتوکسی‌فیلین، حلال آن یعنی سالین دریافت نمودند، با نتایج گروه CCI اختلاف معنی‌داری نداشت و نتایج آن نشان داده نشده است.

پدیده باشد (۳۷).

مانند دیگر بررسی‌ها، در روز چهاردهم این پاسخ‌ها به حداکثر میزان خود می‌رسید (۳۶). رویتا (Roytta) و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که علائم آلودینیای مکانیکی در مدل CCI سه روز بعد از جراحی دیده می‌شود (۳۸). مطالعات دیگر نشان داده است که آلودینیای مکانیکی از روز پنجم و هیپرالژیای حرارتی بین روزهای هفتم تا چهاردهم، بعد از ایجاد CCI شروع می‌شود (۳۹). علت نا همخوانی این بررسی‌ها با یافته‌های این پژوهش می‌تواند مربوط به تفاوت در گونه حیوان و نوع نخ استفاده شده برای گره زدن عصب باشد و یا می‌تواند مربوط به میزان فشاری باشد که گره‌ها به عصب اعمال می‌کنند. در این صورت شدت آسیب عصبی که توسط گره‌ها به وسیله افراد مختلف ایجاد می‌شود، متغیر می‌باشد (۴۰).

بررسی‌های گوناگونی، نبود تون مهاری در شاخ خلفی نخاع بر مسیرهای انتقال دهنده حس درد را در القاء درد نوروپاتیک نشان داده‌اند (۱۷). مشخص شده که گابا در نخاع در نقل و انتقالات اطلاعات درد بین آوران‌های اولیه و نرون‌های نخاعی - تالاموسی اثر تعدیل‌کنندگی دارد (۲ و ۱۸). گابا به ویژه با اثر روی گیرنده‌های گابا A، پتانسیل‌های پس سیناپسی مهاری در نرون‌های نخاع تولید می‌کند (۳) و تحریک این گیرنده‌ها هیپرالژیای را کاهش می‌دهد (۱۸). با بررسی‌های صورت گرفته، دریافته‌اند که تجویز یا تحریک ترشح سروتونین در فیبرهای مهاری پایین رو نخاعی سبب ترشح گابا از نرون‌های بینابینی نخاع شده و گابا نیز سبب فعالیت گیرنده‌های گابا B و گابا A شده و مانع انتقال حس درد در نخاع می‌شود (۹). گزارش‌هایی نیز وجود دارد که نشان داده است نرون‌های گابا آرژیک در نخاع با انتهای فیبرهای A بتا

و Wide Dynamic Range (WDR) سیناپس‌های آکسواکسونیک تشکیل می‌دهند (۴۱). برخی بررسی‌ها وجود یک مدار خاموش بین آوران‌های A بتا و فیبرهای بالارو مسئول انتقال درد را در شاخ خلفی نخاع گزارش نموده‌اند که در صورت فعال شدن این مدار، حس تماس به صورت حس درد احساس شده و می‌تواند پدیده آلودینیا را توجیه نماید. این مدار شامل ایترنرون تحریکی بوده که پروتئین کیناز C نوع γ را بیان می‌کند (γ -PKC) و تحریکات فیبرهای A بتا را دریافت می‌نماید و به فیبرهای بالارو مسئول انتقال درد، انتقال می‌دهد. اعتقاد بر این است که در حالت عادی این ایترنرون‌های تحریکی، به وسیله ایترنرون‌های مهاری گابا آرژیک و گلیسینرژیک مهار شده و این مدار خاموش می‌ماند و تحریکات فیبرهای A بتا به فیبرهای بالارو درد منتقل نمی‌شود، اما در حالت نوروپاتی که اثر مهاری گابا برداشته می‌شود، ایترنرون‌های (γ -PKC) تحریک شده و تحریکات فیبرهای A بتا را به فیبرهای بالارو درد انتقال داده و حس تماس به صورت حس درد تلقی می‌شود (۴۲).

همه این پژوهش‌ها نشان می‌دهند که نرون‌های گابا آرژیک اثر مهاری تونیک بر انتقال درد دارند. در بررسی که بر روی موش‌های دیابتی صورت گرفت، تزریق داخل نخاعی موسیمول به عنوان آگونیست گیرنده گابا A، سبب افزایش زمان Tail flick در نوروپاتی دیابتی گردید (۱۴) و تزریق داخل نخاعی آن آلودینیای مکانیکی را نیز به دنبال نوروپاتی دم کاهش داد (۱). موسیمول همچنین توانسته است پاسخ رفتاری در آزمون فرمالین را کاهش دهد (۹ و ۲۰).

جی‌واک (Gwak) و همکاران (۲۰۰۶) اعلام نمودند که تزریق داخل نخاعی موسیمول آلودینیای مکانیکی را در آسیب‌های نخاعی (Spinal Cord Injury) یا

مکانیکی و الکتریکی می‌شود ولی موسیمول نتوانست آلودینیای افزایش یافته را کاهش دهد (۴۴). این دارو بر آلودینیای مکانیکی در نوروپاتی دیابتی نیز بی‌تأثیر بود (۱۲) و در مطالعات مشابه دیگری بی‌اثر بودن موسیمول بر درد نوروپاتی گزارش گردیده است (۱۳). متناقض بودن نتایج فوق با نتایج این بررسی را می‌توان به عواملی مانند تفاوت در پروتکل آزمایشگاهی و گونه موش، نوع نوروپاتی ایجاد شده، زمان مطالعه، آزمون درد سنجی و همچنین به علت تفاوت‌های رفتاری در شدت و نحوه بروز درد در مدل‌های مختلف نوروپاتی دانست (۱، ۳۴ و ۳۷).

از آنجائی که با تحریک گیرنده گابا A کانال کلر باز می‌شود و با ورود این یون به داخل، سلول هیپرپلاریزه می‌شود، بنابراین شیب کلر در دو طرف غشاء سلول‌های عصبی برای اعمال اثر مهاری گیرنده گابا A مهم می‌باشد (۱۵). اخیراً برخی عنوان نموده‌اند که شیب کلر بعد از نوروپاتی در نورون‌های شاخ خلفی تغییر می‌کند، به گونه‌ای که تحریک گیرنده گابا A با آگونیسست آن، به جای ورود کلر و هیپرپلاریزه شدن سلول موجب خروج کلر از سلول شده و در پی آن سلول دیپلاریزه و تحریک می‌گردد. گر چه این محققان علت تغییر شیب کلر را به دنبال آسیب عصبی کاهش بیان کوترانسپورتر کلر- پتاسیم (KCC2) می‌دانند (۳۴ و ۴۵) ولی توافق کلی بر سر زمان کاهش بیان کوترانسپورتر مذکور بعد از نوروپاتی وجود ندارد (۴۵)، مثلاً در مطالعه میلتيک (Miletic) و همکاران (۲۰۰۸) کاهش بیان KCC2 فقط در ساعات اولیه بعد از نوروپاتی دیده شد (۴) در حالی که در بررسی که توسط جانسن (Janssen) و همکاران (۲۰۱۱) صورت گرفت کاهش بیان آن ۱۶ روز پس از نوروپاتی گزارش گردید (۳۴). در پژوهش کنونی

(SCI) کاهش می‌دهد و تحریک‌پذیری نورون‌های WDR را که در اثر تحریکات اعمال شده افزایش یافته بود، کاهش می‌دهد و با این نتایج رفتاری و الکتروفیزیولوژی، این پژوهشگران شواهدی را برای کاهش تون مهاری نخاع در آسیب‌های نخاعی نشان دادند (۴۳). در مطالعه دیگری تزریق داخل Cistern Magna و داخل نخاعی موسیمول هیپرالژیای حرارتی و آلودینیا را در آزمون صفحه داغ (۴۱) کاهش داد که تأکیدی است بر این فرضیه که کاهش اثر مهاری گابا در افزایش درد نقش دارد. موسیمول باعث تضعیف تقویت طولانی مدت (LTP) در شاخ خلفی نخاع بعد از تحریکات تتانیک در موش‌های CCI شده، می‌گردد. بر این اساس به نظر می‌رسد که مهار سیستم گاباژیک در پلاستیسیته سیناپسی نقش دارد (۸). بدون اثر مهاری گابا که ورودی‌های دردناک را کاهش می‌دهد، تحریکات تتانیک سبب افزایش طولانی مدت تحریک‌پذیری نورون‌های شاخ خلفی نخاع شده و افزایش حساسیت نسبت به تحریکات دردناک (هیپرالژیای) و غیردردناک (آلودینیا) به وجود می‌آید (۸).

رد (Rode) و همکاران (۲۰۰۵) کاهش آلودینیای مکانیکی را بعد از تزریق سیستمیک موسیمول در نوروپاتی نوع Spared Nerve Injury یا SNI نشان دادند و گزارش نمودند که این کاهش ۳۰ دقیقه بعد از تزریق شروع شد (۱۳). نتایج فوق تأییدی است بر یافته‌های این پژوهش که در آن موسیمول به صورت وابسته به دوز هیپرالژیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی را در نوروپاتی نوع CCI کاهش داد.

یافته‌های پژوهش هاو (Hao) و همکاران (۱۹۹۱) نشان داد که ایسکمی نخاع باعث افزایش آلودینیا و افزایش فعالیت نرون‌های WDR به تحریکات

(۲۲، ۲۷ و ۲۹) و سنتز سیتوکین‌های پیش التهابی مانند IL-1، IL-6 و TNF- α را کاهش می‌دهد (۲۲ و ۲۷). کاهش درد فرمالین به وسیله پنتوکسی‌فیلین و پروپتوفیلین گزارش گردیده است (۲۲ و ۲۷).

همچنین پنتوکسی‌فیلین حساسیت نسبت به سرما و لمس را در نوروپاتی کاهش می‌دهد و از پیشرفت نوروپاتی جلوگیری می‌کند (۲۷). این دارو هیپراآلژزیای حرارتی و مکانیکی ایجاد شده در اثر نوروپاتی (SNL) (Spinal Nerve Ligation) را نیز کاهش می‌دهد (۲۲).

در این پژوهش نتایج آزمون‌های رفتاری نشان داد که تزریق مداوم پنتوکسی‌فیلین از یک روز قبل از CCI تا روز چهاردهم، هیپراآلژزیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی را به طور معنی‌داری کاهش داده است که مشابه نتایج سایر محققان می‌باشد. احتمالاً پنتوکسی‌فیلین با مهار فعالیت سلول‌های گلیا و کاهش میزان واسطه‌های التهابی در نخاع، تحریک‌پذیری نرون‌ها را کاهش می‌دهد و می‌تواند علائم درد نوروپاتی را بهبود بخشد. در بررسی پیش رو، تزریق روزانه پنتوکسی‌فیلین از روز قبل از نوروپاتی، به طور مؤثری سلول‌های گلیا را مهار نموده و پاسخ‌های رفتاری درد نوروپاتی را که از روز هفتم تا چهاردهم افزایش یافته بود، کاهش داده است. مشابه این حالت به دنبال استفاده از مینوسیکلین از یک روز قبل از CCI تا چهارده روز پس از آن، گزارش شده است (۴۶).

رقاوندرا (Raghavendra) و همکاران (۲۰۰۳) نیز نشان دادند که در مدل نوروپاتی SNL تزریق مینوسیکلین به مدت ۱۰ روز آلودینیای مکانیکی را در پای آسیب دیده حیوان کاهش می‌دهد (۳۱). همچنین تزریق پنتوکسی‌فیلین در موش سوری و مینوسیکلین در رت و موش سوری به مدت هفت روز هیپراآلژزیای

موسیمول ۱۴ روز بعد از نوروپاتی CCI تزریق شد و هایپراآلژزیای و آلودینیا را کاهش داد که به نظر می‌رسد احتمالاً با مکانیسم فوق عمل نموده است، زیرا اگر در این زمان کاهش بیان کوترانسپورتر KCC2 رخ می‌داد، با تزریق موسیمول انتظار می‌رفت هایپراآلژزیای و آلودینیا افزایش نشان دهد. گرچه اثرات ضددردی آگونیست‌های گیرنده گابا A با توجه به نتایج متفاوتی که در مدل‌های مختلف نوروپاتی ارائه شده، هنوز دقیقاً مشخص نمی‌باشد (۱۳)، ولی از آنجائی‌که بررسی‌های زیادی کاهش تون مهاری گابا را به دنبال نوروپاتی گزارش نموده‌اند، به نظر می‌رسد در این مطالعه اثر مهاری موسیمول بر درد نوروپاتی CCI، احتمالاً از طریق تحریک گیرنده گابا A میانجی‌گری می‌شود و موسیمول توانسته است با تحریک این گیرنده، هایپراآلژزیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی را به صورت وابسته به دوز کاهش دهد.

در اکثر مطالعات انجام شده به استفاده از داروهای مهار کننده فعالیت سلول‌های گلیا به صورت پیش درمانی و قبل از آسیب عصبی، و یا بلافاصله بعد از آسیب عصبی اشاره شده است (۳۱). برخی دیگر از مطالعات نیز تأثیر مهار سلول‌های گلیا را بعد از ایجاد نوروپاتی مورد بررسی قرار داده‌اند.

پژوهشگران نشان داده‌اند در مدل نوروپاتی SNI تعداد سلول‌های گلیال افزایش نشان داده، آستروسیت‌ها و میکروگلیاها فعال می‌شوند. از زمانی که اثر درمانی پنتوکسی‌فیلین در سیستم عصبی گزارش شده است، مطالعات فراوانی برای بررسی اثر ضددردی آن انجام شده است. پنتوکسی‌فیلین به عنوان یک مهار کننده غیراختصاصی با مهار فرآیندهای متابولیسمی سلول و مهار آنزیم فسفودی‌استراز می‌تواند فعالیت سلول‌های آستروسیت و میکروگلیا را مهار کند

بعد از نوروپاتی می‌تواند در پیشگیری از ایجاد نوروپاتی مؤثر باشد ولی در روزهای بعد از آن به تدریج اثر آن کم می‌شود (۴۸).

به‌طور خلاصه نتایج بررسی پیش رو نشان می‌دهد که موسیمول به‌عنوان آگونیست گیرنده گابا A، به‌صورت وابسته به دوز، و پنتوکسی‌فیلین به‌عنوان مهار کننده سلول‌های گلیا و به‌صورت پیش درمانی، هایپرالژیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی را در نوروپاتی مدل CCI کاهش می‌دهند. به‌نظر می‌رسد کاهش تون مهاری گابا و فعال شدن گلیا به‌عنوان مکانیسم‌های احتمالی در ایجاد درد نوروپاتی CCI می‌تواند مطرح باشند و با توجه به گزارشات متناقض و متفاوتی که در مورد مکانیسم‌های مختلف مربوط به درد نوروپاتی وجود دارد، این پژوهش می‌تواند پایه‌ای برای مطالعات بیشتر و دقیق‌تری جهت بررسی مکانیسم‌های دخیل در روند دردهای مذکور باشد.

سپاس و قدردانی

از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت حمایت مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

آلودینیا را به‌دنبال ایجاد نوروپاتی مدل CCI کاهش داد (۲۹). نتایج این مطالعه و بسیاری از مطالعات گذشته تأیید می‌کنند که فعال شدن سلول‌های گلیا نقش مهمی در ایجاد درد نوروپاتی بعد از آسیب‌های عصبی دارد. در مطالعه‌ای که قبلاً در آزمایشگاه نویسندگان انجام شد، نشان داده شد که تزریق داروهای مهار کننده گلیا از روز ششم بعد از نوروپاتی CCI، تا روز سیزدهم، سبب کاهش هیپرالژیای و آلودینیا در روز سیزدهم بعد از نوروپاتی گردید (۴۷)، در حالی‌که در پژوهش کنونی کاهش معنی‌دار هیپرالژیای و آلودینیا از روز هفتم بعد از نوروپاتی دیده شد. تفاوت نتیجه این دو مطالعه را می‌توان مربوط به طول مدت و زمان تجویز دارو دانست زیرا همان‌گونه که پیشتر گفته شد در این بررسی پنتوکسی‌فیلین به‌صورت پیش درمانی و از یک روز قبل از نوروپاتی استفاده شد. احتمالاً استفاده از داروهای مهار کننده فعالیت سلول‌های گلیا به‌صورت پیش درمانی و قبل از آسیب عصبی اثر بخش‌تری نسبت به استفاده آنها بعد از ایجاد نوروپاتی دارد. به‌نظر می‌رسد برای مهار گلیاها در شرایط نوروپاتی یک پنجره زمانی خاصی وجود دارد به نحوی که استفاده از ترکیبات مهار کننده فعالیت گلیاها تا روز ۷

References:

- Lee J, Back SK, Lim EJ, et al. Are spinal GABAergic elements related to the manifestation of neuropathic pain in rat? *Korean J Physiol Pharmacol* 2010; 14: 59-69.
- Park JH, Han JB, Kim SK, et al. Spinal GABA receptors mediate the suppressive effect of electroacupuncture on cold allodynia in rats. *Brain Res* 2010; 1322: 24-9.
- Polgar E, Todd AJ. Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA A receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn. *Neuroscience* 2008; 156: 193-202.
- Miletic G, Miletic V. Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain* 2008; 137: 532-9.
- Sandkuhler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 2009; 89: 707-58.
- Shih A, Miletic V, Miletic G, et al. Midazolam administration reverses thermal hyperalgesia and prevents gamma-aminobutyric acid transporter loss in a rodent model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 2008; 106: 1296-302.
- Guindon J, Walczak JS, Beaulieu P. Recent

- advances in the pharmacological management of pain. *Drugs* 2007; 67: 2121-33.
8. Miletic G, Draganic P, Pankratz MT, et al. Muscimol prevents long-lasting potentiation of dorsal horn field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA transporter GAT-1. *Pain* 2003; 105: 347-53.
 9. Sokal DM, Chapman V. Effects of spinal administration of muscimol on C- and A-fibre evoked neuronal responses of spinal dorsal horn neurones in control and nerve injured rats. *Brain Res* 2003; 962: 213-20.
 10. Kohno T, Moore KA, Baba H, et al. Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *J Physiol* 2003; 548: 131-8.
 11. Pitcher GM, Henry JL. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. *Exp Neurol* 2004; 186: 173-97.
 12. Jolivald CG, Lee CA, Ramos KM, et al. Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain* 2008; 140: 48-57.
 13. Rode F, Jensen DG, Blackburn-Munro G, et al. Centrally-mediated antinociceptive actions of GABA A receptor agonists in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2005; 516: 131-8.
 14. Reis G, Pacheco D, Francischi J, et al. Involvement of GABA A receptor-associated chloride channels in the peripheral antinociceptive effect induced by GABA A receptor agonist muscimol. *Eur J Pharmacol* 2007; 564: 112-5.
 15. Gwak SY, Hulsebosch CE. GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2011; 60: 799-808.
 16. Chen SR, Pan HL. Spinal GABA B receptors mediate antinociceptive actions of cholinergic agents in normal and diabetic rats. *Brain Res* 2003; 965: 67-74.
 17. Smith CG, Bowery NG, Whitehead KJ. GABA transporter type 1 (GAT-1) uptake inhibition reduces stimulated aspartate and glutamate release in the dorsal spinal cord in vivo via different GABAergic mechanisms. *Neuropharmacology* 2007; 53: 975-81.
 18. da Motta PG, Veiga AP, Francischi JN, et al. Evidence for participation of GABA(A) receptors in a rat model of secondary hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 2004; 483: 233-9.
 19. Judge SJ, Young RL, Gartside SE. GABA A receptor modulation of 5-HT neuronal firing in the median raphe nucleus: implications for the action of anxiolytics. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16: 612-9.
 20. Bagust J, Willis WD. Differential effects of muscimol upon the firing frequency of large and small amplitude antidromic dorsal root action potentials in rat spinal cord in vitro. *Neurosci Lett* 2002; 330: 139-42.
 21. Obata H, Sakurazawa S, Kimura M, et al. Activation of astrocytes in the spinal cord contributes to the development of bilateral allodynia after peripheral nerve injury in rats. *Brain Res* 2010; 1363: 72-80.
 22. Liu J, Feng X, Yu M, et al. Pentoxifylline attenuates the development of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2007; 412: 268-72.
 23. Ledebor A, Sloane EM, Milligan ED, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 2005; 115: 71-83.
 24. Pabreja K, Dua K, Sharma S, et al. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2011; 661: 15-21.
 25. Jiang F, Liu T, Cheng M, et al. Spinal astrocyte and microglial activation contributes to rat pain-related behaviors induced by the venom of scorpion *Buthus martensi* Karch. *Eur J Pharmacol* 2009; 623: 52-64.
 26. Liu FY, Sun YN, Wang FT, et al. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. *Brain Res* 2012; 1427: 65-77.
 27. Mika J, Osikowicz M, Rojewska E, et al. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2009; 623: 65-72.
 28. Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, et al. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev* 2009; 60: 202-13.
 29. 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.
 30. Schafers M, Geis C, Svensson CI, et al. Selective increase of tumour necrosis factor- α in injured and spared myelinated primary

- afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 791-804.
31. 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.
32. Dobrogowski J, Wrzosek A, Wordliczek J. Radiofrequency denervation with or without addition of pentoxifylline or methylprednisolone for chronic lumbar zygapophysial joint pain. *Pharmacol Rep* 2005; 57: 475-80.
33. Szczepanik AM, Wordliczek J, Serednicki W, et al. Pentoxifylline does not affect nociception if administered postoperatively. *Pol J Pharmacol* 2004; 56: 611-6.
34. Janssen SP, Truin M, Van Kleef M, et al. Differential GABAergic disinhibition during the development of painful peripheral neuropathy. *Neuroscience* 2011; 184: 183-94.
35. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87-107.
36. Mirzaei V, Manaheji H, Maghsoudi N, et al. Comparison of changes in mRNA expression of spinal glutamate transporters following induction of two neuropathic pain models. *Spinal Cord* 2010; 48: 791-7.
37. Pascual D, Goicoechea C, Burgos E, et al. Antinociceptive effect of three common analgesic drugs on Peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 95: 331-7.
38. Roytta M, Wei H, Pertovaara A. Spinal nerve ligation-induced neuropathy in the rat: sensory disorders and correlation between histology of the peripheral nerves. *Pain* 1999; 80: 161-70.
39. Ro LS, Jacobs JM. The role of the saphenous nerve in experimental sciatic nerve mononeuropathy produced by Loose ligatures : a behavioural study. *Pain* 1993; 52: 359-69.
40. Gabay E, Tal M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain* 2004; 110: 354-60.
41. Lee IO, Lim ES. Intracisternal or intrathecal glycine, taurine, or muscimol inhibit bicuculline-induced allodynia and thermal hyperalgesia in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31: 907-14.
42. Casals-Diaz L, Vivo M, Navarro X. Nociceptive responses and spinal plastic changes of afferent C-fibers in three neuropathic pain models induced by sciatic nerve injury in the rat. *Exp Neurol* 2009; 217: 84-95.
43. Gwak YS, Tan HY, Nam TS, et al. Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006; 23: 1111-24.
44. Hao JX, Xu XJ, Yu YX, et al. Hypersensitivity of dorsal horn wide dynamic range neurons to cutaneous mechanical stimuli after transient spinal cord ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 1991; 128: 105-8.
45. Berger JV, Knaepen L, Janssen SP, et al. Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain Hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Res Rev* 2011; 67: 282-310.
46. Zanjani TM, Sabetkasaei M, Mosaffa N, et al. Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2006; 538: 66-72.
47. Nazemi S, Manaheji H, Zaringhalam J, et al. Post-injury repeated administrations of minocycline improve the antinociceptive effect of morphine in chronic constriction injury model of neuropathic pain in rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 102: 520-5.
48. Mei XP, Xu H, Xie C, et al. Post-injury administration of minocycline: an effective treatment for nerve-injury induced neuropathic pain. *Neurosci Res* 2011; 70: 305-12.

Original Article

Study of the effect of GABAA receptore and glial inhibition on behavioral responses in CCI model of neuropathic pain in rat

M. Sadeghi^{1,3}, H. Manaheji^{1,2*}, A. Haghparast², J. Zaringhalam^{1,2},
S. Nazemi⁴, Z. Bahari¹

¹ Department of Neurophysiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

² Neuroscice Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

³ Department of physiology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, IRAN

⁴ Department of physiology, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, IRAN

(Received 26 May, 2013 Accepted 23 Jun, 2013)

Abstract

Background: The mechanisms underlying neuropathic pain are complex and remain controversial. From the proposed mechanisms we can refer to loss of GABAergic inhibition and glial activation in the spinal dorsal horn. As for the discrepancies in the neuropathic pain mechanisms, in the present study, we examined whether the GABA-A receptor agonist muscimol and glial inhibitor pentoxifylline would modify behavioral tests in rats with Chronic Constriction Injury (CCI).

Material and Methods: In this study male wistar rats (200-250 g) were used and for neuropathy induction, the CCI model (Bennett method, 1988) was used. In the sham group, after exposing the sciatic nerve, surgery region was closed. Pentoxifylline was administered one day before neuropathy to 14 days after CCI (30 mg/kg daily) and behavioral tests (plantar test and von frey) were performed one day before surgery and then on days 1, 4, 7 and 14 after surgery and 30 minutes after pentoxifylline administration. In groups that received muscimol with doses 0.5, 1 and 2 mg/kg on day 14 after CCI, behavioral tests were experienced before and 30 minutes after drug administration.

Results: Behavioral assessment indicated that CCI induce symptoms of neuropathic pain but both muscimol and pentoxifylline could reduce pain behavioral responses. It seems that this reduction of muscimol (1 and 2 mg/kg) was more effective in thermal hyperalgesia than pentoxifylline, and for pentoxifylline (30 mg/kg) was more effective in mechanical allodynia than muscimol.

Conclusion: present data showed that muscimol via activation of GABA-A receptors and pentoxifylline via glial inhibition reduced behavioral symptoms of neuropathic pain after spinal cord injury.

Key words: neuropathic pain, hyperalgesia, allodynia, CCI, muscimol, pentoxifylline

*Address for correspondence: Department of Neurophysiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, IRAN; E-mail: hshardimanaheji@yahoo.com