**IranJPP**
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۱ (٤)، ۲۳۱- ۲۲۲ زمستان ۱۳۹٦

مقاله پژوهشی

# بررسی نقش گیرنده گلوتاماتی NMDA درالقای LTP در نرون های شاخ خلفی نخاع پس از قطع عصب نخاعی L5 در موش صحرایی نر

لاله رضایی[۱]، هما مناهجی*[۳،۲]، شهربانو عریان[۱]، سید محمد نوربخش[۴]، زهرا بهاری[۳]

۱. دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۴. موسسه پرتو دانش، تهران

دریافت: ۱۹ دی ۹۴ پذیرش: ۹ اسفند ۹۴

## چکیده

**مقدمه:** از نقش گیرنده NMDA، در ارتباط با تداوم دردهای پاتولوژیک اطلاعات روشنی در دست نیست. بعلاوه پدیده تقویت طولانی مدت یا LTP در نخاع درحفظ و توسعه دردهای نوروپاتیک نقش مهمی دارد. هدف از این مطالعه بررسی نقش گیرنده گلوتاماتی NMDA و تغییرات الکتروفیزیولوژیک شاخ خلفی نخاع به دنبال ایجاد آسیب عصب نخاعی L5 می باشد.

**روش‌ها:** در این مطالعه از مدل نوروپاتیSNL استفاده گردید. در آزمایشات رفتاری از تارهای فون فری جهت سنجش آلودینیای مکانیکی از یک روز قبل از ایجاد مدل نوروپاتی و تا روز ۷ بعداز آن استفاده شد. تزریق داخل صفاقی ممانتین 10 mg/Kgبه عنوان آنتاگونیست گیرنده NMDA از یک ساعت قبل از ایجاد SNL تا هفت روز پس ازآن ادامه داشت. القای LTP و ثبت از نورون های WDR شاخ خلفی در روز ۷ پس از SNL بوسیله بساط ثبت تک واحدی نخاع به دنبال اعمال محرک پر فرکانس صورت گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که به دنبال ایجاد SNL آلودینیای مکانیکی ایجاد می گردد. تزریق روزانه ممانتین باعث افزایش معنی دار ($p < ۰/۰۱$) آستانه درد در روزهای ۵، ۶ و ۷ (روزهای اوج درد) گردید. نتایج بررسی های الکتروفیزیولوژی نشان داد که در روز ۷ پس از SNL کاهش معنی داری ($p < ۰/۰۰۱$) در آستانه فعال سازی و یا به عبارتی تقویت طولانی مدت LTP فیبرهای C و Aδ در مقایسه با گروه شم ایجاد شده است. تجویز روزانه ممانتین توانست مانع القایLTP شود.

**نتیجه‌گیری:** به نظر میرسد که گیرنده های NMDA در پیدایش پلاستیسیته حاصل ازتداوم درد نوروپاتی نقش داشته باشند. استفاده از ممانتین با کنترل درد نوروپاتیک می تواند چشم انداز جدیدی برای درمان دردهای نوروپاتیک باز کند.

**واژه های کلیدی:** آلودینیا، ممانتین، نورون های NMDA، WDR، LTP

## مقدمه

درد نوروپاتی اشاره به دردی است که از آسیب سیستم عصبی سرچشمه می‌گیرد و ناشی ازمکانیسم حساسیت محیطی و مرکزی است که حساسیت به محرک های دردناک (هایپر آلجزیا) و محرک‌های غیردردناک (آلودینیا ) مهمترین علائم آن می‌باشد [۱، ۲]. فعالیت گیرنده N-متیل-D-آسپارتات (NMDA) در حفظ درد پاتولوژیک به خوبی شناخته شده است [۳]. گیرنده گلوتاماتی NMDA در حقیقت یکی از گیرنده‌های مهم و مسئول انتقالات عصبی تحریکی سریع در سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد که نقش مهمی در پدیده حساسیت مرکزی (central sensitization) ایفا می‌کند. مدارک و شواهد موجود نشان داده است که گیرنده NMDA در

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Manahejih@sbmu.ac.ir
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

برانگیخته شدن درد پس از آسیب عصب نقش مهمی دارد [۴]. پس از قطع عصب، فعالیت خود بخودی در محل آسیب و در گانگلیون ریشه پشتی ایجاد می‌شود. آنتاگونیست گیرنده NMDA، درکاهش تحریک‌پذیری سلول‌های عصبی شاخ پشتی نخاع نقش داشته و باعث مهار پاسخ نورونی حاصل از ورودی‌های فیبرهای C می‌شود. در مدل‌های حیوانی درد نوروپاتیک، آنتاگونیست‌های گیرنده NMDA درکاهش خود به خودی رفتارهای مرتبط با درد و پاسخ برانگیخته درد نقش دارند [۵]. ممانتین آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA است. مطالعات الکتروفیزیولوژیک نشان داده است که ممانتین پاسخ نورون‌های شاخ خلفی را به تحریکات دردناک کاهش می‌دهد [۶]. ممانتین برای اولین بار در امریکا و اروپا به عنوان داروی بالینی به دلیل عوارض کم آن برای درمان بیماری آلزایمر استفاده شد. از آنتاگونیست‌های دیگر گیرنده‌های NMDA، مانند کتامین و دکسترومتورفان نیز در کاهش انواع مختلفی از علائم درد نوروپاتیک در بیماران استفاده شده است [۷]. از طرفی تقویت طولانی مدت یا LTP در نخاع در پاسخ به درد پس از اعمال محرک پر فرکانس پدیده مهمی است که اولین بار توسط Svendsen در سال ۱۹۹۹ مطرح گردید و آن را برای تغییرات بلند مدت در انتقال درد وحتی برای توسعه درد مزمن مسئول دانست. او نقش LTP در پاسخ نورون‌های WDR بعد از اعمال تحریکات تتانیک به عصب سیاتیک در فیبر Aδ و C در موشهای سالم را نشان داد [۷، ۸]. از آنجایی که مکانیسم دردهای نوروپاتیک و درمان آن نامشخص می‌باشد دراین مطالعه تلاش گردیده است تا با بررسی نقش گیرنده NMDA و همچنین القای LTP در پیدایش و تداوم دردهای نوروپاتیک گامی جهت شناخت مکانیسم های درگیر در دردهای نوروپاتیک برداشته شود.

## مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی۲۰۰-۱۸۰ گرم استفاده گردید. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. حیوانات همگی در شرایط یکسان و در اتاق کنترل شده از نظر حرارت و رطوبت، در سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در قفس‌های جداگانه در گروه‌های ۳ تائی از یک هفته قبل از آزمایش نگهداری شده و در تمام مدت دسترسی راحت به آب و غذای استاندارد و کافی داشتند.

در این پژوهش از مدل نوروپاتی SNL که در سال ۱۹۹۲ بوسیله Kim و Chung توصیف شده است، استفاده گردید [۹]. بطور خلاصه، ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی سدیم پنتو باربیتال با دوز ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش گردیده، سپس روی تخته جراحی به پشت قرار داده می‌شدند. در شرایط استریل، روی پشت حیوان یک برش طولی به طول ۳ سانتی متر از خط وسط از بخش دمی مهره L5 تا اولین مهره خاجی در سمت چپ ایجاد می‌شد. سپس با ایجاد یک برش عضلات موازات نخاع سمت چپ ستون مهره ظاهر می‌شدند. با استفاده از قیچی کوچک با نوک گرد عضلات موازات نخاع از سطح زائده خاری مهره L5 تا ساکروم را کنار زده و سپس در زیر لوپ، با استفاده از استخوان بر کوچک، زائده عرضی مهره L6 بطور کامل برداشته می‌شد. با برداشته شدن زائده عرضی مهره L6 تنه اعصاب L4 و L5 نزدیک به ستون مهره، قابل مشاهده بود. با نخ بخیه سیلک عصب L5 را که در ناحیه دیستال نسبت به گانگلیون ریشه خلفی قرار گرفته محکم گره زده و سپس محل زخم را ضد عفونی نموده و عضله و پوست بخیه می‌شدند. آنگاه پس از گذاشتن حیوانات در قفس های تمیز، به حیوانخانه واقع در گروه منتقل می‌گردیدند. آزمایشات رفتاری از ۱ روز قبل از ایجاد مدل نوروپاتی و سپس روزانه در روزهای ۰ تا ۷ بعد از نوروپاتی انجام می‌گرفت. به منظور بررسی نقش گیرنده NMDA در رفتارهای درد ناشی از نوروپاتی، ممانتین با دوز ۱۰mg/kg به صورت داخل صفاقی ازحدود یک ساعت قبل جراحی SNL تا ۷ روز بعد از آن تزریق می گردید.

در مطالعات رفتاری از ۳ گروه ۶ تایی از حیوانات شامل گروه شم، گروه نوروپاتی، و گروه نوروپاتی همراه با ممانتین استفاده شد. به منظور اطمینان از ایجاد درد نوروپاتیک در حیوانات و ارزیابی وضعیت رفتارهای ناشی از جراحی SNL تست رفتاری فون فری برای سنجش آلودینیای مکانیکی انجام گرفت.

### تست رفتاری فون فری برای سنجش آلودینیای مکانیکی

حساسیت مکانیکی به محرک‌های غیردردناک با اعمال فیلامنت‌های فون فری ۶۰، ۲۶، ۱۵، ۸، ۶، ۴، ۲ گرم

(Stoelting, Wood dale.IL) به کف پای حیوان اندازه‌گیری می‌شد. برای این کار از روش بالا–پایین Chaplan استفاده گردید [۱۰]. حیوانات روی یک صفحه مشبک فلزی و در داخل یک محفظه پلاستیکی به ابعاد ۲۰ در ۲۰ سانتیمتر و ارتفاع ۳۰ سانتیمتر قرار گرفته و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه و تطابق حیوان با محیط جدید فیلامنت‌های فون فری به پای آسیب دیده اعمال می‌شد. هر فیلامنت سه بار متوالی به فاصله ۵ ثانیه و هر بار به مدت زمان حدود دو تا سه ثانیه به کف پای نوروپاتی اعمال می‌گردید. اگر حیوان دو بار از سه بار اعمال فیلامنت پای خود را از محرک عقب می‌کشید (پاسخ مثبت) آن فیلامنت به عنوان آستانه مکانیکی درد 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 ایجاد نماید، به عنوان پاسخ مثبت به حساب می‌آمد. پاسخ هایی که در اثر حرکت و سایر رفتار های طبیعی حیوان بود، در نظر گرفته نمی‌شد. در صورتیکه حیوان به فیلامنت شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی داد، عدد ۶۰ به عنوان cut off آستانه پاسخ در نظر گرفته می شد.

در مطالعات الکتروفیزیولوژی از سه گروه ۵ تایی شامل گروه شم، نوروپاتی و نوروپاتی همراه با ممانتین استفاده شد. با استفاده از تکنیک Extracellular Single Unit Recordings، در محیط *in vivo* تغییرات LTP در فیبرهای Aδ و C در نورون‌های WDR شاخ خلفی نخاع در روز ۷ بعد از جراحی نوروپاتی بر اساس روش Svendsen مورد بررسی قرار گرفت [۷].

در ابتدا، حیوانات با تزریق داخل صفاقی اورتان ۱/۵گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس جهت رویت عصب سیاتیک یک برش ۳ سانتیمتری روی پوست ناحیه پارامدیال در لگن ایجاد گردید. عصب سیاتیک حدود ۷ تا ۸ میلیمتر در زیر فاشیای عضلات ران تا ساق پای حیوان عبور می کند که با برداشتن این عضلات عصب آشکار می‌گردد. سپس با استفاده از میکروسکوپ تشریح عصب جدا گردیده و یک جفت الکترود نقره (فاصله دو الکترود ۲ میلیمتر) جهت تحریک الکتریکی در زیر عصب سیاتیک، در نزدیکی محل سه شاخه شدن عصب،قرار می گرفت. برای جلوگیری از تماس الکترود با عضلات حیوان، از یک ورقه پارافیلم که زیر عصب و الکترود قرار می‌گرفت استفاده می‌گردید. جهت لامینکتومی، حیوان به دستگاه استرئوتاکس مخصوص نخاع (برج صنعت ایران) منتقل شده و پس از ثابت کردن سر حیوان، به کمک اسکالپل یک شکاف طولی ۸– ۷ سا نتی متراز ناحیه پشت گردن تا ۳ سانتی متری بالای ریشه دم ایجاد می‌گردید.

در مرحله بعد دو طرف ستون مهره‌ها (در بالای آخرین دنده) به طور طولی شکافته شده و ستون مهره از بالا ثابت می‌شد. سپس از پایین با برداشتن زوائد عرضی مهره‌های T13, L1 قطعات کمری L4,L5,L6 نخاع (برجستگی کمری) آشکار می‌شد. این قطعات کمری محل خروج ریشه‌های عصب سیاتیک می‌باشد. بعد از آشکار شدن برجستگی های کمری، به کمک پنس ظریفی سخت شامه کنار زده شده و دقت می‌گردید تا به نرم شامه آسیبی وارد نشود. در این قسمت ستون مهره از سمت پایین به کمک کلامپ های کمری ثابت می گردید و دقت می‌شد تا سر و ستون مهره ها در یک راستا قرار بگیرند. سطح آشکار نخاع توسط روغن معدنی پوشانده می‌شد.

برای پیدا کردن نورون مناسب و جمع‌آوری سیگنال از روش ثبت LTP بوسیله بساط ثبت تک واحدی نخاع استفاده گردید [۷]. بدین ترتیب که به کمک منیپولیتور، الکترود ثبات (میکروالکترود تنگستن با مقاومت ۲–۵ مگا اهم) به صورت عمودی و نزدیک به خط وسط در سمت ضایعه (سمت چپ شاخ خلفی) نزدیک به نخاع قرار می‌گرفت. سپس به آرامی با گام‌های ۱۰ میکرونی از سطح خلفی وارد نخاع می‌شد. سیگنال‌های الکتریکی ناشی از فعالیت نورون به وسیله میکروالکترود دریافت شده و به وسیله آمپلی فایر تقویت گردیده و سپس از طریق دستگاه Data Aquisition, مدل D3111 (شرکت پرتو دانش، تهران، ایران) در محدوده پهنای باند (۳۰۰ تا ۳۰۰۰ هرتز فیلتر و با بزرگنمایی ۱۰۰۰) به کامپیوتر انتقال می‌یافت. آنگاه بوسیله مانیتور و با کمک نرم افزار eProbe نسخه 1.17 نمایش داده شده و صدای آن نیز توسط کارت صوت کامپیوتر پخش می‌گردید. با شنیدن صدای سیگنال از طریق بلندگو و مشاهده امواج و جدا نمودن آنها به کمک پنجره‌های جداکننده مخصوصی که برای جدا کردن سیگنال یک نورون از بقیه سیگنالها و نویز پایه طراحی شده بود فعالیت نورون مناسب جدا و ثبت می‌گردید. کل جریان ثبت شده در کامپیوتر ذخیره و بصورت off line جهت رسم منحنی post stimulus time histogram (PSTH) پاسخ نورونی و آنالیز

داده ها مورد استفاده قرار می‌گرفت. بیشترین تراکم نورون‌ها ی WDR در عمق ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرونی از سطح نخاع بوده و بر اساس فعالیت خود بخودی، میدان پذیرنده و آستانه پاسخ مشخص می‌شدند. از آنجایی که نورون های WDR به طیف وسیعی از محرکها از قبیل لمس، فشار و تحریک دردناک پاسخ میدهند؛ نورونی به عنوان نورون WDRدر نظرگرفته می‌شدکه به هر دو محرک لمس و فشار پاسخ می‌داد. بعد از پیدا کردن نورون WDR مناسب، ده دقیقه صبر کرده تا فعالیت نورون پایدار شود، سپس آستانه تحریک فیبرهای C, Aδ در شروع آزمایش مشخص می‌شد. جهت تعیین آستانه فیبرهای C, Aδ تحریکات الکتریکی به صورت موج‌های مربعی ۲ میلی ثانیه‌ای از کمترین شدت جریان ۱۰۰ میکرو آمپر هر ۴ دقیقه به عصب سیاتیک اعمال می‌شد. در صورت عدم پاسخ دهی فیبرهای C, Aδ جریانی با شدت بیشتر به عصب سیاتیک، اعمال می‌شد. شدت جریانی که منجر به ۳ پتانسیل عمل ناشی از فیبرهای C, Aδ می‌شد، به عنوان آستانه فعال سازی فیبرهای مذکور در نظر گرفته می‌شد. بعد از پیدا کردن آستانه فیبرها، در ابتدا پاسخ پایه نورون WDR با اعمال ۱۲ تحریک الکتریکی که به عصب سیاتیک با شدت جریانی ۱/۵ برابرآستانه فیبر C به صورت موج مربعی۲ میلی ثانیه هر ۴ دقیقه یک بار ثبت می‌گردید. سپس جهت القای LTP، محرک الکتریکی پر فرکانس (HFS) با مشخصات۲۰ Train، و فاصله بین هر دو Train ۱۰ثانیه، با تریال‌های ۲ ثانیه‌ای و شدت جریان ۶ برابر آستانه فعال‌سازی فیبر C و فرکانس ۱۰۰ هرتز به عصب سیاتیک اعمال می شد.

بعد از تحریک HFS ده دقیقه به نورون استراحت داده می‌شد. سپس ۲۴ تحریک الکتریکی با شدت جریان ۱/۵ برابرآستانه فیبر C مجدداً هر ۴ دقیقه یکبار به عصب سیاتیک اعمال و ثبت می‌گردید. پاسخ نورون‌های WDR بعد از هر تحریک الکتریکی به عصب سیاتیک، که توسط الکترود ثبات و در محدوده ۳۰۰ میلی ثانیه در نخاع ثبت و آنالیز می‌گردید. این مدت زمان بر اساس تاخیر در پاسخ فعالیت فیبرهای C و Aδ بود؛ بدین ترتیب که پتانسیل‌های عمل ظاهر شده در محدوده زمانی ۲۰ تا ۹۰ میلی ثانیه پس از هر تحریک الکتریکی ۱۲ تحریک قبل و ۲۴ تحریک بعد از محرک (HFS) ناشی از فیبرهای Aδ و نیز پتانسیل های عمل ظاهر شده در محدوده زمانی ۹۰ تا۳۰۰ میلی ثانیه ناشی از فعال شدن فیبرهای C بود [۱۱]. بنابراین تعداد پتانسیل عمل مربوط به فعالیت فیبرهای C و Aδ قبل و بعد از محرک HFS مورد آنالیز قرار می‌گرفتند. به منظور بررسی نقش گیرنده NMDA داروی ممانتین با دوز mg/kg ۱۰ به صورت داخل صفاقی از حدود یک ساعت قبل جراحی SNL تا ۷ روز بعد از آن و سپس در روز ثبت (روز۷) ۲ ساعت قبل از بررسی الکتروفیزیولوژی تزریق می‌گردید.

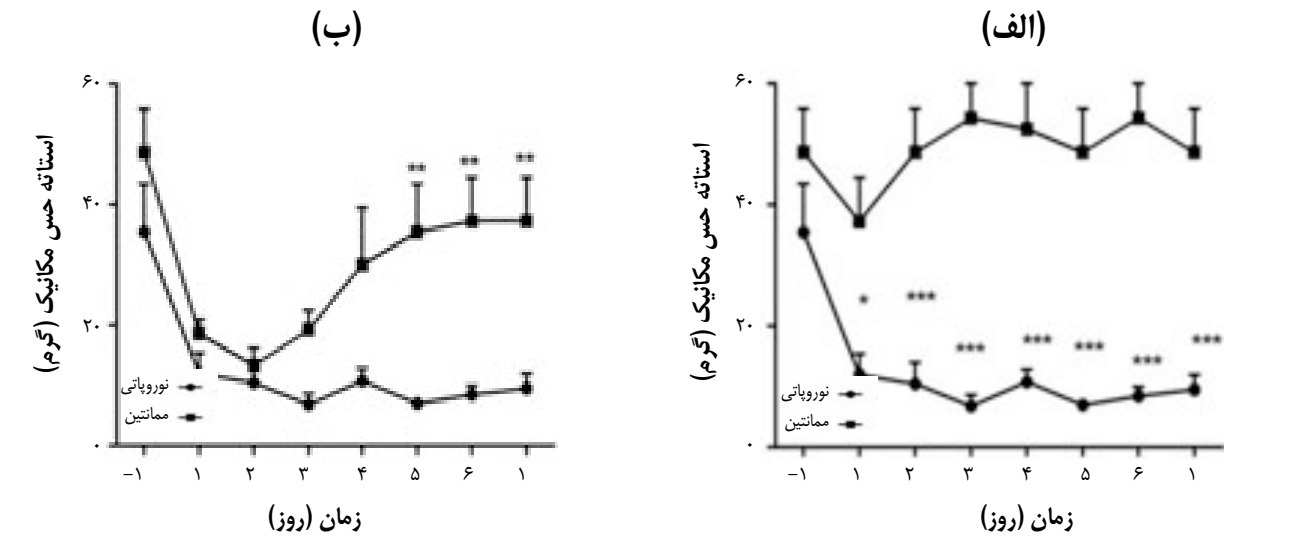
داده‌های این پژوهش در مطالعات رفتاری با استفاده از آزمون TWO-way ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. در مطالعات الکتروفیزیولوژی از آزمون One-way ANOVA و تست متعاقب Tukey استفاده گردید. $p < ۰/۰۵$ سطح معنی دار اختلاف داده ها در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

نتایج رفتاری حاصل از پاسخ حیوان به تحریکات مکانیکی توسط تارهای فون فری، در مدل نوروپاتی SNL نشان داد که آستانه عقب کشیدن پای آسیب دیده Paw Withdrawal Threshold، در تمامی روزهای مورد آزمایش پس از نوروپاتی، در گروه نوروپاتی در مقایسه با گروه شم کاهش معنی‌داری داشته است ($p < ۰/۰۰۱$) که بیشترین شدت آلودینیای مکانیکی در روزهای ۷-۲ پس از نوروپاتی بوده است (نمودار ۱الف). استفاده روزانه از ممانتین به مدت ۷ روز پس از جراحی SNL افزایش آستانه درد را در روزهای اوج درد ( ۵، ۶ و ۷) در گروه نوروپاتی در مقایسه با گروه شم ($p < ۰/۰۱$) نشان داده است ( نمودار ۱ب).

منحنی سطح زیر نمودار در گروه‌های شم و نوروپاتی و نوروپاتی همراه با ممانتین نتایج فوق را تایید می‌کند (نمودار ۲). تغییرات LTP در فیبرهای Aδدر گروه‌های شم و نوروپاتی و نوروپاتی همراه با ممانتین ۷ روز پس از SNL بررسی شد. نتایج نشان داد که محرک HFS باعث القای LTP و نیز کاهش معنی‌دار آستانه فعال‌سازی فیبرهای Aδ در گروه نوروپاتی در مقایسه با شم شد ($p < ۰/۰۰۱$). استفاده از ممانتین بامهار القای LTP و کاهش معنی‌دار آستانه فعال‌سازی فیبر Aδ، تفاوت معنی‌داری را با گروه نوروپاتی نشان داد (نمودار ۳).

تغییرات LTP در فیبرهای C در بازه زمانی ۳۰۰- ۹۰ میلی ثانیه در گروه‌های شم و نوروپاتی ونوروپاتی همراه با ممانتین




**نمودار ۱**- (الف) تغییرات آلودینیای مکانیکی در گروه نوروپاتی و گروه شم. (ب )تغییرات آلودینیای مکانیکی درگروه نوروپاتی همراه با ممانتین از یک روز قبل از نوروپاتی (روز ۱-) تا روز ۷ بعد از نوروپاتی. نتایج بصورت Mean ± SEM بیان شده است (n = 6). از آزمون two-way ANOVA و تست متعاقب Bonferroni استفاده شده است. ***: تغییر معنا دار با $p < ۰/۰۰۱$ و**: $p < ۰/۰۱$ و *: $p < ۰/۰۵$.

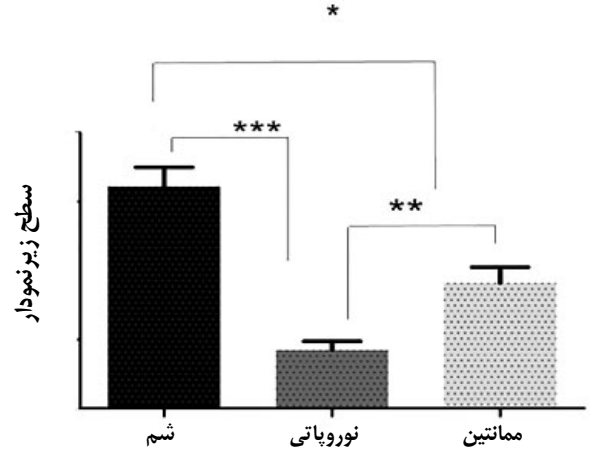
۷ روز بعد از نوروپاتی بررسی شد. آزمون یک طرفه One-way ANOVA نشان داد که محرک HFS باعث القای LTP و نیز کاهش معنی‌دار آستانه فعال‌سازی فیبرهای *C* در گروه نوروپاتی نسبت به شم شد ($p < ۰/۰۰۱$). ممانتیتن با کاهش آستانه فعال‌سازی فیبر C از القاء LTP ممانعت نمود (نمودار ۴).

نمونه‌ای از پاسخ ثبت شده مربوط به یک نورون WDR و نمودار PSTH آن در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. پانل $A_1, B_1, C_1$ پاسخ پایه نورون را بعد از اعمال اولین تحریک نشان می‌دهد و پانل $A_2$، $B_2$ و $C_2$ پاسخ پایه نورون را بعد از اعمال محرک پرفرکانس نشان می‌دهد. تعداد اسپایک‌های پایه در موش نوروپاتی بیشتر از موش شم است ولی تغییرات LTP در موش نوروپاتی نسبت به موش شم کمتر است. در گروه نوروپاتی همراه با ممانتین نه تنها تعداد اسپایک‌های پایه کمتر است بلکه داروی ممانتین مانع ایجاد LTP در این گروه نیز شده است (شکل‌های ۱ و ۲).

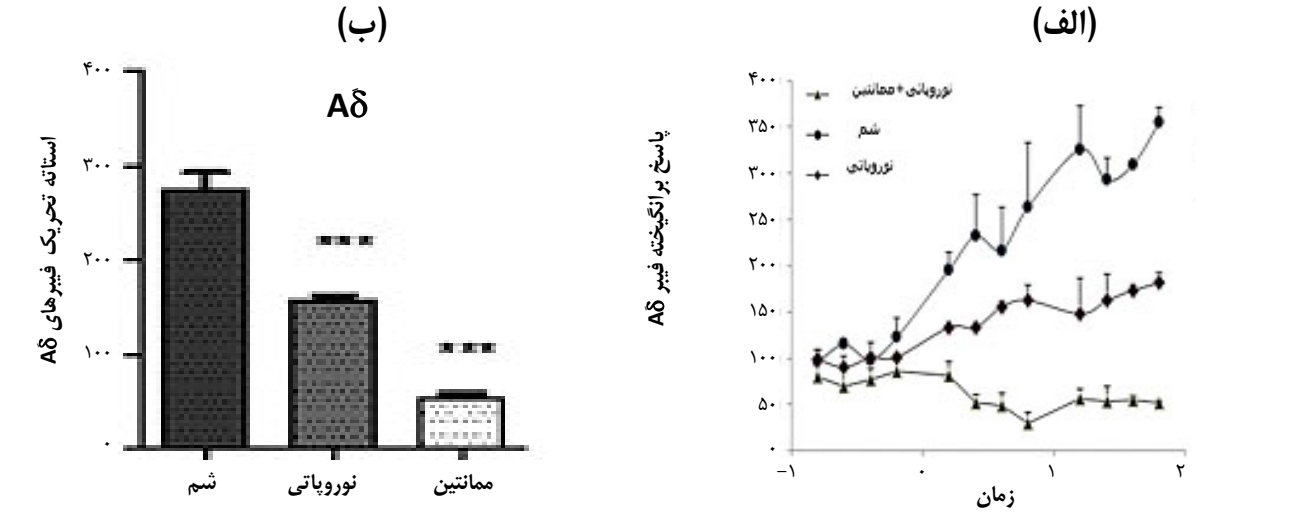
## بحث

یکی از مکانیسم‌های دخیل در دردهای نوروپاتی فعالیت گیرنده NMDA گلوتامات می‌باشد که در تحریک‌پذیری نورون‌های شاخ خلفی نخاع به دنبال آسیب عصبی اهمیت ویژه دارد. این گیرنده در القاء و در تداوم پر دردی نقش محوری دارد. نتایج رفتاری حاصل از مطالعه هفت روزه مدل نوروپاتی SNL در این پژوهش نشان داد که آسیب به عصب سبب پیدایش آلودینیای مکانیکی شده است. تجویز داروی ممانتین از یک ساعت قبل از جراحی و به مدت هفت روز آستانه تحریک را بالا برده بعبارتی درد راکاهش داده است. در بررسی الکتروفیزیولوژی ۷ روز پس از SNL تقویت طولانی مدت یا به عبارتی LTP در فیبرهای C و Aδ کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شم نشان داده است که با تجویز ممانتین آستانه فعال‌سازی این فیبرها کاهش بیشتری یافته و از القاء LTP ممانعت شده است.

تحقیقات نشان داده است که آنتاگونیست های NMDA

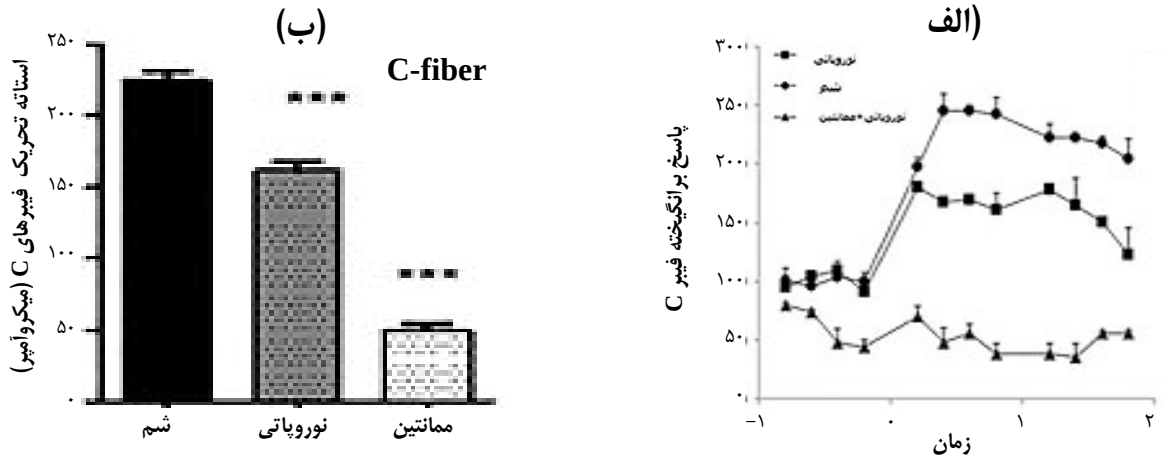



**نمودار ۲**- منحنی سطح زیر نمودار در گروه‌های شم و نوروپاتی و نوروپاتی همراه با ممانتین. ***: $p < ۰/۰۰۱$ ، **: $p < ۰/۰۱$ و *: $p < ۰/۰۵$.

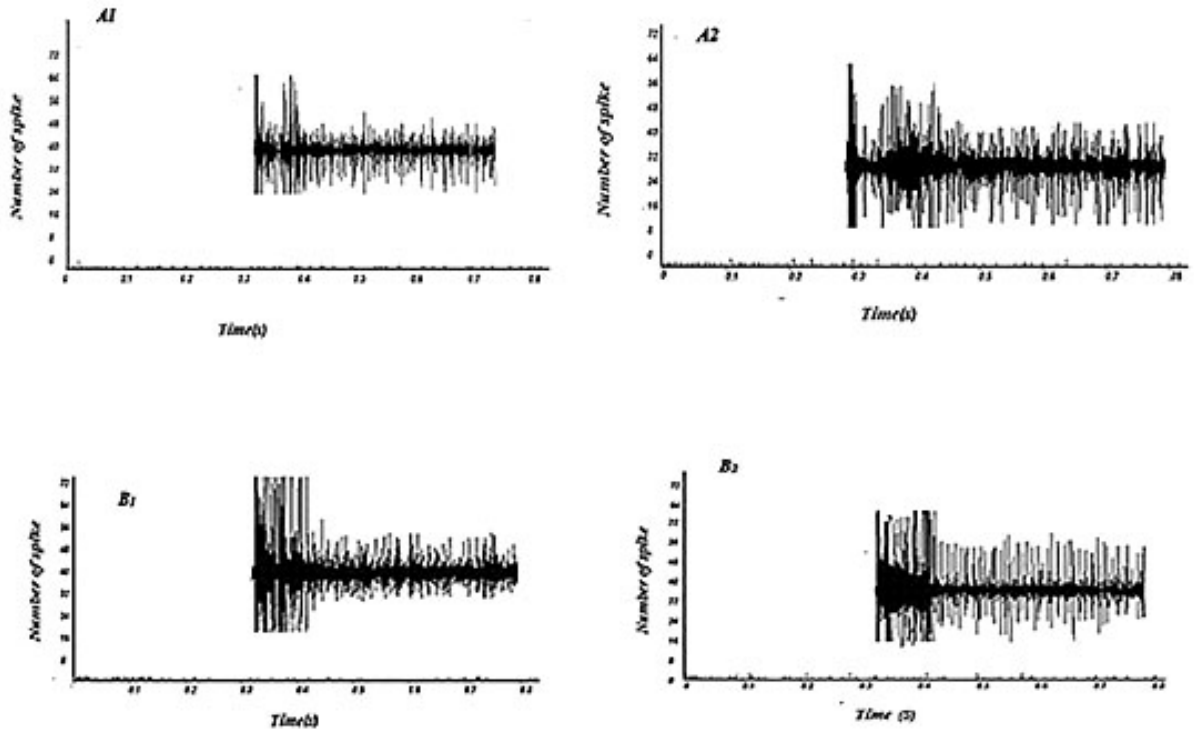



**نمودار ۳-** (الف) مقایسه تغییرات LTP در فیبرهای Aδ پس از القای نوروپاتی در گروه‌های شم و نوروپاتی و نوروپاتی همراه با ممانتین ۷ روز بعد از نوروپاتی. میانگین هر ۳ تحریک از ۱۲ تحریک حالت پایه به صورت یک عدد بیان شد. نتایج به صورت درصد تعداد اسپایک‌ها در ثبت پایه بیان شده است. (ب) آزمون One-way ANOVA نشان داد که تغییرات LTP در فیبرهای Aδ در گروه‌های نوروپاتی کمتر از گروه شم بوده است. آزمون One-way ANOVA همچنین مهار معنی دار القاء LTP را در گروه نوروپاتی همراه با ممانتین نشان داده است. ***: $p < ۰/۰۰۱$.

درد نوروپاتیک را به صورت موثری کاهش می‌دهند و پیش درمانی با آن‌ها از بروز این نوع درد جلوگیری می نماید. استفاده از داروی MK801 (آنتاگونیست گیرنده NMDA) باعث کاهش معنی دار هایپرآلژزیا در مدل های حیوانی درد نوروپاتی می شود [۱۲]. ممانتین آنتاگونیست دیگر NMDA نیز در کاهش معنی دار دردهای نوروپاتیک نقش داشته است [۱۳]. ولی از طرفی تزریق ممانتین بلافاصله پس از جراحی نتایج متناقضی را در کاهش درد نوروپاتیک نشان داده است. در پژوهش حاضر به منظور بررسی نقش گیرنده NMDA روی آلودینیای مکانیکی حاصل از نوروپاتی مدل SNL، از روزقبل جراحی تا ۷ روز بعد از آن، ممانتین با دوز ۱۰ mg/Kg تزریق گردید. نتایج نشان داد که آستانه درد در گروه‌های دریافت‌کننده ممانتین در روز های اوج درد افزایش معنی داری داشته و یا به عبارتی درد کاهش یافته است. همسو با این نتایج Morel و همکاران در سال ۲۰۱۳ با تزریق ۲۰ mg/kg/day و با استفاده از پروتکل‌های مختلف نشان دادند تجویز ممانتین قبل از جراحی افزایش معنی‌داری را در آستانه درد نشان داده است ولی تجویز آن بلافاصله پس از جراحی و به مدت ۷ روز تاثیر

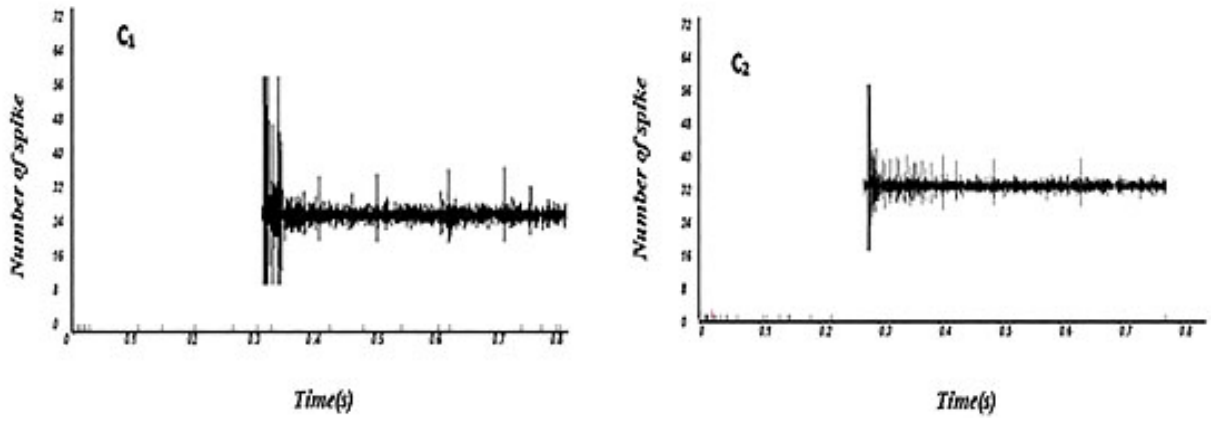



**نمودار ٤-** (الف ) مقایسه تغییرات LTP در فیبرهای C پس از القای نوروپاتی در گروه‌های شم و نوروپاتی و نوروپاتی همراه با ممانتین در روز ۷ بعد از نوروپاتی. میانگین هر ۳ تحریک از ۱۲ تحریک حالت پایه به صورت یک عدد بیان شد. نتایج به صورت درصد تعداد اسپایک‌ها در ثبت پایه بیان شده است. (ب) آزمون One-way ANOVA نشان داد که تغییرات LTP در فیبرهای C در گروه‌های نوروپاتی کمتر از گروه شم بود و تفاوت معناداری را با گروه شم نشان می دهد. مهار القاء LTP در گروه نوروپاتی همراه با ممانتین، تفاوت معناداری را در مقایسه با گروه نوروپاتی نشان داد. ***: $p < ۰/۰۰۱$.




**شکل ۱** – مقایسه پانل $A_1$-$A_2$ در گروه شم و پانل $B_1$-$B_2$ در گروه نوروپاتی، قبل و بعد از اعمال محرک پرفرکانس.

معنی‌داری در افزایش آستانه درد نداشته است یا به عبارتی درد تسکین نیافته است [۱۴] . Chen و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ممانتین با دوز ۲۰ mg/Kg برای کاهش آلودینیای مکانیکی در مدل نوروپاتی دیابتی به مدت دو هفته استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که اثر دارو طی ۳ روز آشکار شده و در طول دوره دو هفته‌ای درمان باقی مانده است [۱۵]. Takeda و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند تزریق روزانه ممانتین ۱۰ mg/Kg به صورت داخل صفاقی در یک گروه تا ۳ روز متوالی بعد از جراحی و همچنین در گروه دیگری تا ۵ روز متوالی توانسته است آلودینیا مکانیکی را در مدل نوروپاتی CCI کاهش دهد [۱۶]. پس بنظر می‌رسد علیرغم روش های مختلف و گزارشات متناقض تجویز این دارو می تواند در بهبود آلودینیای مکانیکی پس از ایجاد درد نوروپاتی نقش داشته باشدکه نتایج ما نیز همسو با آن نتایج کاهش آستانه درد را با مصرف ممانتین نشان داده است. در بخش دیگر این پژوهش نتایج حاصل از مطالعه الکتروفیزیولوژی (تقویت طولانی مدت یا LTP) نورون های WDR نخاع نشان داد هفت روز پس از SNL ایجاد تقویت طولانی مدت فیبرهای C و Aδ کاهش معنی‌داری نشان داده است و تجویز روزانه و ۲ ساعت قبل از اعمال تحریک پر فرکانس والقای LTP به عصب سیاتیک، ممانتین آنتاگونیست گیرنده NMDA ، کاهش معنی‌داری در آستانه فعال‌سازی فیبرهای Aδ و C در گروه نوروپاتی در




**شکل ۲** – مقایسه پانل $C_1$-$C_2$ در گروه نوروپاتی همراه با ممانتین قبل و بعد از اعمال محرک پرفرکانس.

مقایسه با شم نشان داده است . تحقیقات بیانگر آن است که احتمالاً گیرنده NMDA نقش مهمی درپاسخ به تحریکات مکرر حاصل از دپولاریزاسیونهای مداوم درشاخ خلفی نخاع بدنبال ضایعه عصب را داشته باشد. Svedsen و همکاران در سال ۲۰۰۰ به نقش گیرنده NMDA در القا LTP در نورون‌های WDR اشاره نمودند که پیش درمانی با آنتاگونیست‌های NMDA باعث مهار القای LTP می‌شود. بنظر می رسد بی دردی ناشی از پیش درمانی با آنتاگونیست NMDA می‌تواند در کاهش شلیک نورونی پس سیناپسی نقش داشته باشد [۱۷]. Liu و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش کردند LTP در نخاع و سایر مناطق مغز ممکن است خواص مشابهی را به اشتراک بگذارند. آن‌ها با استفاده از تکنیک ثبت پتانسیل‌های میدانی نشان دادند تزریق آنتاگونیست گیرنده NMDA حدود ۳۰ دقیقه قبل از اعمال محرک پر فرکانس می‌تواند LTP را بطور کامل در حیوانات قطع نخاع مهار کند. بنابراین نتیجه گرفتند که گیرنده NMDA نقش مهمی در شکل‌پذیری عصبی شاخ خلفی نخاع و در القای LTP داشته باشد [۱۸] . یکی از مکانیسمهای دخیل در ایجاد پدیده LTP در نوروپاتی فعالیت گیرنده NMDA می باشدکه باعث افزایش تحریک‌پذیری نورون‌های شاخ خلفی نخاع بدنبال آسیب عصبی می‌شود. بنظر میرسد که افزایش و تداوم تحریکات دردناک بعد از آسیب اعصاب با واسطه گیرنده NMDA منجر به تغییرات دراز مدتی در نورونهای انتقال درد نخاع می شود که بسیار شبیه LTP سلولهای هیپوکمپ به هنگام یادگیری می‌باشد [۱۴] . Barnes و همکاران در سال ۱۹۹۶ در مطالعات الکتروفیزیولوژیک با استفاده از ممانتین روی بهبود عملکرد حافظه کوتاه مدت در موش توانسته اند نقش ممانتین را بطور انتخابی در ترمیم و حفظ شکل‌پذیری سیناپسی نشان دهند [۱۹]. Suzuki و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند با تزریق زیرجلدی آنتاگونیست های گیرنده‌های NMDA شامل ممانتین، MK801 و کتامین دو هفته بعد ازSNL طیف وسیعی از پاسخ‌های نورونی بر انگیخته شده WDR کاهش یافته است که نشان دهنده درگیر بودن سیستم گلوتاماتی NMDA در فعالیت نورونی به دنبال آسیب عصبی می‌باشد [۱۱].

نتایج حاصل از پژوهش ما نیز نشان داد که بدنبال اعمال محرک پرفرکانس و القای LTP در گروه SNL کاهش آستانه فعال‌سازی فیبرهای Aδ و C در مقایسه با گروه شم دیده می‌شود. پیش‌درمانی با ممانتین از القای LTP جلوگیری نمود. نتایج این پژوهش چه در نتایج رفتاری و چه در نتایج الکتروفیزیولوژی نشان داد که ممانتین آنتاگونیست گیرنده NMDA در کاهش رفتارهای درد و کاهش آلودینیای مکانیکی و مهار القای LTP نقش داشته است. ممانتین، ترکیبی است مشتق از آمانتادین که برای اولین بار از سال ۱۹۷۸ برای درمان بیماری‌هایی از قبیل جنون، اسپاسم عضلات و پارکینسون در انسان استفاده شده است [۱۶]. مکانیسم اصلی ممانتین، بلوک جریان کلسیم از طریق کانال-های یونی گیرنده NMDA می‌باشد. مکانیسم عمل NMDA بدینگونه است که با تحریک این گیرنده منیزیم از جایگاه خود رها شده و با باز شدن کانال کلسیم یون کلسیم به داخل سلول سرازیر می‌شود. کلسیم به عنوان پیامبر ثانویه فعالیت پروتیئن کیناز C، فسفولیپاز C و NO سنتتاز را سبب شده که در نهایت با افزایش پاسخ سیستم درد، افزایش حساسیت به درد را موجب می‌شود [۲۰]. لذا استفاده ازممانتین به عنوان آنتاگونیست گیرنده NMDA می تواند علائم دردهای نوروپاتیک از جمله آلودینیای مکانیکی را کاهش دهد.

## نتیجه‌گیری

به نظر میرسد که گیرنده‌های NMDA در پیدایش پلاستیسیته حاصل از تداوم درد نوروپاتی نقش داشته باشند. استفاده از ممانتین با کنترل درد نوروپاتیک می‌تواند چشم انداز جدیدی را برای درمان دردهای نوروپاتیک نشان دهد.

## تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## سهم نویسندگان

ل.ر: انجام مطالعه و نگارش مقاله; ه.م: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; ش.ع: مشاوره; س.م.ن و ز.ه: اجرای بخشی از مطالعه.

# فهرست منابع

[1] Swieboda P, Filip R, Prystupa A, Drozd M, Assessment of pain: types, mechanism and treatment. ***Ann Agric Environ Med*** 1 (2013) 2-7.

[2] Whalley K, Pain: Transplanted precursors halt neuropathic pain. ***Nat Rev Neurosci*** 13 **(**2012) 447.

[3] Christoph T, Schiene K, Englberger W, Parsons CG, Chizh BA, The antiallodynic effect of NMDA antagonists in neuropathic pain outlasts the duration of the in vivo NMDA antagonism. ***Neuropharmacolog*** 51(1) (2006) 12-17.

[4] Kew JN, Kemp JA, Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. ***Psychopharmacology*** 179 (2005) 4-29.

[5] Nikolajsen L, Gottrup H, Kristensen AG, Jensen TS, Memantine (a N-methyl-D-aspartate receptor antagonist) in the treatment of neuropathic pain after amputation or surgery: a randomized, double-blinded, cross-over study. ***Anaesth Analg*** 91 (2000) 960-966.

[6] Carlton SM, Hargett GL, Treatment with the NMDA antagonist memantine attenuates nociceptive responses to mechanical stimulation in neuropathic rats. ***Neurosci Lett*** 198 (1995) 115-118.

[7] Svendsen F, Tjølsen A, Rykkja F, Hole K, Behavioural effects of LTP-inducing sciatic nerve stimulation in the rat. ***Eur J Pain*** 3 (1999) 355-363.

[8] Svendsen F, Tjølsen A ,Gjerstad J, Hole K, Long term potentiation of single WDR neurons in spinalized rats. ***Brain Res*** 816 (1999) 487-892.

[9] Kim SH, Chung JM, An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. ***Pain*** 63 (1992) 350-355.

[10] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL, Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. ***J Neurosci Methods*** 53 (1994) 55-63.

[11] Suzuki R, Matthews EA, Dickenson AH, Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy. ***Pain*** 91(2001) 101-109.

[12] Eide PK, Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. ***Eur J Pain*** 4 (2000) 5-15.

[13] Jevtovic-Todorovic V, Wozniak D, Powell S, Nardi A, Olney J, Clonidine potentiates the neuropathic pain-relieving action of MK-801 while preventing its neurotoxic and hyperactivity side effects. ***Brain Res*** 781(1998) 202-211.

[14] Morel V, Etienne M, Wattiez AS, Dupuis A, Privat AM, Chalus M, Eschalier A, Daulhac L, Pickering G, Memantine, a promising drug for the prevention of neuropathic pain in rat. ***Eur J Pharmacol*** 721(2013) 382-390.

[15] Chen SR, Samoriski G, Pan HL, Antinociceptive effects of chronic administration of uncompetitive NMDA receptor antagonists in a rat model of diabetic neuropathic pain. ***Neuropharmacology*** 57(2009) 121-126.

[16] Takeda K, Muramatsu M, Chikuma T, Kato T, Effect of memantine on the levels of neuropeptides and microglial cells in the brain regions of rats with neuropathic pain. ***J Mol Neurosci*** 39 (2009) 380-390.

[17] Svendsen F, Hole K, Tjølsen A, Long-term potentiation in single wide dynamic range neurons induced by noxious stimulation in intact and spinalized rats. ***Prog Brain Res*** 129 (2000) 153-161.

[18] Liu XG, Sandkühler J, Long-term potentiation of C-fiber–evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. ***Neurosci Lett*** 191(1995) 43-46.

[19] Barnes CA, Danysz W, Parsons CG, Effects of the Uncompetitive NMDA Receptor Antagonist Memantine on Hippocampal Long-term Potentiation, Short-term Exploratory Modulation and Spatial Memory in Awake, Freely Moving Rats. ***Eur J Neurosci*** 8 (1996) 565-571.

[20] Fundytus ME. Glutamate receptors and nociception. ***CNS drugs*** 15 (2001) 29-58.

Research paper

# Role of NMDA receptors in induction of LTP in spinal WDR neurons after L5 spinal nerve transection in male wistar rats

Laleh Rezaee[1], Homa Manaheji[2,3*], Shahrbanoo Oryan[1], Syyed Ali Noorbakhsh[4], Zahra Bahari[2]

*1. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran*
*2. Neurophysiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*3. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*4. Sciense Beam Company, Tehran, Iran*

Received: 8 January 2016 Accepted: 27 February 2016

## Abstract

**Introduction:** Role of NMDA receptors in persistence of pathological pain is not clear. In addition, long-term potentiation (LTP) has a crucial role in development and maintenance of neuropathic pain. The aim of this study was to investigate the role of glutamate NMDA receptor and electrophysiological changes in spinal dorsal horn following L5 spinal nerve ligation.

**Methods:** The model of spinal nerve ligation (SNL) was used in this study. In behavioral experiments to evaluate mechanical allodynia, Von frey filaments were used from a day before induction of neuropathy up to 7 days after neuropathy. Memantin 10 mg/Kg, i.p., as NMDA antagonist, was injected one hour before SNL up to 7 days afer SNL. LTP induction and dorsal horn WDR neurons recording was performed by spinal single unit set up on day 7 after high frequeny stimulus (HFS) induction.

**Results:** SNL induced mechanical allodynia . Daily injection of memantin increased thershold of pain significantly ($p < 0.01$) at the period of maximum pain (days 5, 6 and 7). Electrophsiological recording showed a significant decrease in the thershold of activation of C and Aδ fibers or LTP induction ($p < 0.001$) 7 days after SNL, compared to sham group. Daily administration of memantin prevented induction of LTP.

**Conclusion:** It seems that NMDA receptors are involved in development of plasticity during neuropathic pain. Control of neuropathic pain by memantin might open a new insight in treatment of neuropathic pain.

**Keywords:** Allodynia, LTP, Memantin, NMDA receptors, WDR

**Please cite this article as follows:**
Rezaee L, Manaheji H, Oryan S, Noorbakhsh SA, Bahari Z, Role of NMDA receptors in induction of LTP in spinal WDR neurons after L5 spinal nerve transection in male wistar rats. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 1 (2017) 222-231.

*Corresponding author e-mail: Manahejih@sbmu.ac.ir
Available online at: http://ijpp.phypha.ir
E-mail: ijpp@phypha.ir