

## Evaluation of TNF- $\alpha$ and IL-6 Release in the Ventroposterolateral Nucleus of the Thalamus during Central Neuropathic Pain Induced by Electrical Injury of the Spinothalamic Tract in Male Rats: A Microdialysis Study

Ali Ghanbari<sup>1</sup>, Ali Reza Asgari<sup>2</sup>, Gholam Reza Kaka<sup>3</sup>, Hamid Reza Falahat Pishhe<sup>4</sup>,  
Asieh Naderi<sup>5</sup>, Masoumeh Jorjani<sup>6\*</sup>

- 1- Ph.D. Candidate, Applied Neuroscience Research Center, Baqiyatallah (a.c) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 2- Professor, Faculty of Aerospace and Subaquatic Medicine, AJA Medical Sciences University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Applied Neuroscience Research Center, Baqiyatallah (a.c) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4- Ph.D. Candidate, Biopharmacy Pars Research Company, Tehran, Iran
- 5- Ph.D. Candidate, Department of physiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah (a.c) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 6- Professor, Department of Pharmacology and NeuroBiology Research Center, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 1983963113, Department of Pharmacology and NeuroBiology Research Center,  
Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
Email: msjorjani@sbmu.ac.ir

Received: 08/Dec/2013, Accepted: 15/Feb/2014

### Abstract

**Objective:** Inflammation and proinflammatory cytokines play an important role in the initiation and maintenance of central neuropathic pain. There are several reports that cytokine production is increased at the lesion site following spinal injury. A few studies have investigated the supraspinal levels of these cytokines. This study intended to determine TNF- $\alpha$  and IL-6 release in the ventroposterolateral nucleus of the thalamus in spinal cord injury-related neuropathic pain in rats.

**Methods:** Male Sprague-Dawley rats that weighed 200-230 g were used. Following administration of anesthesia, spinothalamic tract injury was performed by a laminectomy at the T9-T10 level in male rats. Mechanical allodynia and motor performance were evaluated at 3, 7, 14, 21 and 28 days after spinal injury by Von Frey filament and the open field test, respectively, in the sham and lesion groups. Concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the VPL microdialysate were detected by ELISA in both spinal cord injured and sham groups during four weeks after surgery.

**Results:** Mechanical pain threshold reduced in both hind paws following lateral spinothalamic tract injury. Paw withdrawal threshold in the Spinothalamic tract-injured group was significantly ( $P<0.05$ ) lower than in sham group at day 14 post-surgery. Motor performance did not show any significant change after surgery. In the microdialysate, TNF- $\alpha$  reduced significantly ( $P<0.05$ ) at days 3 and 7 post-injury compared to the sham group which returned to a level close to the pre-surgery level. VPL concentration of IL-6 increased significantly ( $P<0.05$ ) at day 21 post-injury compared to the sham group.

**Conclusion:** Lesions in spinal pathways that contain afferent pain fibers appear to change the supraspinal levels of inflammatory mediators, including VPL, concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 which are consistent with spinal injury related pain behavior. Cytokine production results in hyperexcitability of the thalamocortical neurons, a decrease in pain threshold, and persistent neuropathic pain after spinal injury.

**Keywords:** Spinal cord injury, Central neuropathic pain, TNF- $\alpha$ , IL-6, Brain microdialysis

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 4, Winter 2014, Pages: 83-97

# بررسی تغییرات رها شدن سایتوکین‌های فاکتور نکروز تومور آلفا و اینترلوکین ۶ در هسته شکمی پستی - جانبی تالاموس به دنبال درد ناشی از آسیب عصبی مرکزی ناشی از ضایعه الکتریکی مسیر نخاعی - تالاموسی جانبی در موش صحرایی نر به روش میکرودیالیز

علی قنبری<sup>۱</sup>، علیرضا عسگری<sup>۲</sup>، غلامرضا کاکا<sup>۳</sup>، حمیدرضا فلاحت‌پیشه<sup>۴</sup>، آسیه نادری<sup>۵</sup>، معصومه جرجانی<sup>۶\*</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۲- استاد، دانشکده طب هوا فضا و زیردریایی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری تخصصی، شرکت تحقیقاتی زیست دارویی پارس، تهران، ایران

۵- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۶- استاد، گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات نورویولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات نورویولوژی

Email: msjorjani@sbmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۰۹/۱۷

پذیرش مقاله: ۹۲/۱۱/۲۶

## چکیده

هدف: با توجه به اهمیت نقش التهاب و سایتوکین‌های پیش التهابی محل ضایعه بافت عصبی در ایجاد و تداوم درد ناشی از آسیب عصبی و وجود گزارش‌های اندک در خصوص تغییرات غلظتی این عوامل در مناطق دورتر از محل آسیب، در این تحقیق تغییرات رها شدن سایتوکین‌های فاکتور نکروز تومور آلفا و اینترلوکین ۶ در هسته شکمی پستی - جانبی تالاموس به دنبال درد ناشی از آسیب عصبی حاصل از ضایعه نخاعی در موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley و با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۳۰ گرم انتخاب و پس از بیهوشی و لامینکتومی در قطعه نخاعی T۱۰-T۹، تحت ضایعه مسیر نخاعی - تالاموسی قرار گرفتند. آلودینایی مکانیکی و حرکت حیوان ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از ضایعه به ترتیب با استفاده از تارهای وون‌فری و آزمون میدان باز در هر دو گروه ضایعه دیده و کنترل شم ارزیابی شد. غلظت اینترلوکین ۶ و فاکتور نکروز تومور آلفا نمونه‌های دیالیزی هسته شکمی پستی - جانبی تالاموس طی چهار هفته بعد از آسیب نخاعی با روش الایزا تعیین مقدار شد.

نتایج: آسیب مسیر جانبی نخاعی - تالاموسی موجب کاهش آستانه درد مکانیکی در هر دو پای خلفی حیوان شد به نحوی که دو هفته بعد از آسیب، آستانه عقب کشیدن پا در گروه دارای ضایعه تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شم نشان داد ( $P < 0.05$ ). آسیب مسیر نخاعی - تالاموسی جانبی تأثیری بر عملکرد حرکتی حیوانات نداشت. در بررسی میکرودیالیز، میزان فاکتور نکروز تومور آلفا هسته شکمی پستی - جانبی در روزهای ۳ و ۷ بعد از آسیب کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شم نشان داد ( $P < 0.05$ ) ولی با افزایش تدریجی به میزان پایه قبل از آسیب نزدیک شد. غلظت اینترلوکین ۶ در نمونه‌های دیالیزی روز ۲۱ بعد از آسیب افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری با گروه شم داشت ( $P < 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تخریب مسیر آوران‌های درد در نخاع موش صحرایی، موجب تغییر در تولید عوامل التهابی در مناطق فوق نخاعی دورتر از ضایعه می‌شود. این تغییرات احتمالاً موجب افزایش تحریک‌پذیری نورون‌های پس‌سیناپسی در مسیر تالاموسی - قشری و در نهایت به کاهش آستانه درد و بروز درد ناشی از آسیب عصبی مداوم منتهی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ضایعه نخاعی، درد ناشی از آسیب عصبی مرکزی، فاکتور نکروز تومور آلفا، اینترلوکین ۶، میکرودیالیز مغزی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات: ۸۳-۹۷

نشانگان درد مرکزی نوعی درد ناشی از آسیب عصبی مزمن است که یکی از مهم‌ترین مشکلات بیماران مبتلا به ضایعات تروماتیک سیستم عصبی به‌ویژه مبتلایان به آسیب طناب نخاعی (Spinal Cord Injury: SCI) است [۱]. این نوع درد، پیامد مستقیم یک ضایعه یا بیماری است که سیستم حسی-پیکری را درگیر می‌کند [۲]. درد مرکزی ناشی از ضایعه نخاعی معمولاً چند هفته یا چند ماه پس از ضایعه آغاز می‌شود [۳] و با وجود بهبود ضایعه اولیه، گاه به صورت دردی شدید و طاقت‌فرسا بیمار را رنج می‌دهد [۴، ۵] احساس درد بدون حضور محرک محیطی نشان دهنده واکنش‌های غیر طبیعی و آسیب شناختی در پاسخ به ضایعه است [۶] که منجر به بروز آلودینیا (Allodynia)، هایپرآلژزیا (Hyperalgesia) و درد خودبه‌خودی می‌شود [۷]. متأسفانه تاکنون درمان مؤثر و قابل قبولی برای درد ناشی از آسیب عصبی مرکزی وجود ندارد [۸] که این موضوع تا حد زیادی به علت ناشناخته بودن مکانیسم‌های پایه‌ای مسئول در بروز و گسترش این نوع درد است.

نتایج بسیاری از تحقیقات بیانگر نقش مهم واسطه‌های التهابی مانند سایتوکین‌های پیش التهابی در ایجاد و تداوم درد ناشی از آسیب عصبی بوده است [۹، ۱۰]. سایتوکین‌های پیش التهابی آزاد شده به دنبال آسیب نخاعی در انسان به ظهور درد ناشی از آسیب عصبی مرکزی کمک می‌کند [۱۱]. با توجه به محدودیت‌های موجود برای انجام تحقیقات در انسان، در اکثر مطالعات انجام شده از مدل‌های حیوانی ضایعه نخاعی استفاده کرده‌اند. بیان سایتوکین‌ها در سیستم عصبی محیطی و مرکزی چونندگان با استفاده از مدل‌های مختلف درد ناشی از آسیب عصبی نشان داده شده است [۱۲، ۱۳]. سایتوکین‌ها به دنبال ضایعه نورونی محیطی نه تنها در محل آسیب بلکه به صورت مستقل از آن در سیستم عصبی مرکزی نیز تولید می‌شود [۱۴]. ضایعه تروماتیک (Traumatic Injury)، التهاب و تحریک بیش از حد سلول عصبی موجب فعال شدن سلول‌های گلیال (Glial Cells) به ویژه میکروگلیاها (Microglia) در

## سایتوکین‌های هسته VPL به دنبال آسیب نخاعی

سیستم عصبی می‌شود [۱۵، ۱۶] که این سلول‌ها نیز با افزایش تولید سایتوکین‌های پیش التهابی در افزایش کارآیی سیناپسی و تحریک‌پذیری نورونی نقش دارند [۱۷]. به علاوه؛ افزایش رها شدن و غلظت نوروترانسمیترها (Neurotransmitters)، نوروپپتیدها و سایتوکین‌های پیش التهابی مانند فاکتور نکروز تومور آلفا (Tumor Necrosis Factor alpha: TNF- $\alpha$ )، اینترلوکین ۶ (Interleukin 6: IL-6) و IL-1 $\beta$  از جمله مهم‌ترین عوامل افزایش مدارهای تحریکی حسی و افزایش حساسیت به درد متعاقب ضایعه نورونی هستند [۱۸]. بنابراین درد مرکزی نتیجه مستقیم تقابل عمل نورون-گلیا است [۱۹]. تا کنون در مطالعات انجام شده، تغییرات سطوح و رهایش سایتوکین‌ها به طور عمده در محل ضایعه در عصب محیطی یا نخاع یا در چند قطعه نخاعی بالاتر یا پایین‌تر از محل ضایعه بررسی شده است ولی تغییرات سطوح این سایتوکین‌ها به دنبال ضایعه نخاعی در مراکز دور دست از ضایعه و مناطق فوق نخاعی مرتبط با مسیر درد کمتر مطالعه شده است. تالاموس به عنوان یک مرکز مهم مغزی دریافت کننده پیام درد از نورون‌های درجه دوم که انتقال و هدایت درد را در نخاع به عهده دارند، نقش مهمی در پردازش و درک درد دارد؛ بنابراین توجه به رخدادهای سلولی و مولکولی این هسته به دنبال ضایعه نخاعی به ما کمک می‌کند تا درک بهتری از مکانیسم‌های هدایت و پردازش درد ناشی از آسیب عصبی مرکزی داشته باشیم. به همین دلیل در مطالعه حاضر تغییرات رهایش سایتوکین‌های TNF- $\alpha$  و IL-6 در هسته شکمی پستی-جانبی (Ventral posterolateral: VPL) تالاموس به دنبال ضایعه الکتریکی مسیر نخاعی-تالاموسی (Spinothalamic Tract) جانبی و ارتباط آن با درد ناشی از آسیب عصبی مرکزی ایجاد شده در حیوان آزمایشگاهی بررسی شد. قابل ذکر است که محققان حاضر در مطالعات قبلی خود با استفاده از این مدل ضایعه نخاعی بروز هایپرآلژزیا و آلودینیا را که از مشخصات دردهای نخاعی هستند، مشاهده نمودند و هدف اصلی در این مقاله پی بردن به مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مرتبط با رفتار درد در حیوان است [۲۰].

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

از موش صحرایی نر، نژاد Sprague-Dawley و با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۳۰ گرم برای انجام آزمون‌ها استفاده شد. این موش‌ها در حیوانخانه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی پرورش داده می‌شوند. تمام تحقیقات بر اساس دستورالعمل کار با حیوانات آزمایشگاهی اعلام شده توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، بدون محدودیت در آب و غذا و در حرارت تقریبی ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. در مجموع از ۷۸ سر موش صحرایی (۳۵ سر برای گروه ضایعه، ۳۵ سر برای گروه شم و ۸ سر برای گروه سالم) و در هر گروه ۶-۸ سر استفاده شد. لازم به ذکر است که هر کدام از گروه‌های ضایعه و شم طبق روزهای مورد آزمایش به پنج زیر گروه تقسیم شدند. در هر گروه پس از آزمایش در روز مورد نظر بافت مغز حیوان برای انجام آزمایش‌های بعدی خارج شد. نمونه‌گیری به صورت تصادفی ساده انجام شد. میزان مرگ و میر در حین جراحی و ایجاد ضایعه نخاعی کمتر از ۳ درصد بود.

### ایجاد ضایعه در مسیر نخاعی - تالاموسی جانبی

حیوانات یک ساعت قبل از آزمایش برای سازگاری با محیط به آزمایشگاه منتقل شدند. ایجاد ضایعه در مسیر نخاعی - تالاموسی با روش معرفی شده توسط ناصری در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت [۲۰]. ابتدا حیوانات با تزریق مخلوط کتامین (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند و در دستگاه استرئوتکس (Stereotax) (Stoelting، آمریکا) ثابت نگهداشته شدند. موهای ناحیه پشت حیوان [در ناحیه مهره‌های توراسیک (Thoracic)] چیده شد و سپس با اسکالپل در محدوده T۹-T۱۰، شکافی به طول ۲

سانتی‌متر روی پوست حیوان ایجاد شد. بافت‌های اضافی اطراف مهره به آرامی تمیز شده و به کمک رانجری (Rongeur) با نوک خمیده و بسیار ظریف، لامینکتومی (Laminectomy) انجام شد تا بافت نخاع آشکار شود. برداشت مهره توراسیک در نهایت دقت و با احتیاط کامل صورت گرفت تا هیچ‌گونه صدمه‌ای به بافت نخاع وارد نشود. آن‌گاه با قیچی جراحی مخصوص، سخت شامه شکافته شد و میکروالکترودی از جنس تنگستن (با قطر ۵ میکرومتر، ۱ مگا اهم) که از یک طرف متصل به سیم رابط دستگاه Lesion Maker (Grass، آمریکا) بود و از سوی دیگر روی بازوی نگهدارنده دستگاه استرئوتاکسی ثابت شده بود، به آرامی به سمت پایین هدایت شد تا بر سطح بافت نخاع مماس شود. سپس میکروالکتروده به میزان ۰/۵-۰/۷ میلی‌متر به سمت راست و به میزان ۱/۶-۱/۹ میلی‌متر عمقی وارد نخاع شد تا نوک الکتروده در مسیر نخاعی - تالاموسی جانبی قرار گیرد. الکتروده دیگر روی بافت عضلانی اطراف قرارداد شد و شدت جریان معادل ۳۰۰ میکروآمپر در ۱/۵ دقیقه از طریق میکروالکتروده بر مسیر نخاعی - تالاموسی نخاع وارد شد. سپس الکترودها خارج و محل جراحی با بتادین یا ساولن ضدعفونی شد و یک قطعه کوچک ژل فوم (Gelfoam) در محل لامینکتومی قرار داد شد تا از خونریزی و عفونت موضعی جلوگیری شود. در ادامه بافت عضلانی و جلدی بخیه و ناحیه با بتادین ضد عفونی شد. حیوان جراحی شده زیر نور لامپ گرم نگه داشته شد و پس از به هوش آمدن به اتاق مخصوص نگهداری حیوانات منتقل شد. برای اطمینان از درستی محل ضایعه وارده و ارزیابی وسعت ناحیه تخریب شده حیوان بیهوش و با تزریق تدریجی محلول پارافرمالدیید ۴ درصد از راه قلب، بافت نخاع تثبیت شد و با برداشتن قطعه‌ای از ستون مهره‌ها که در برگیرنده ناحیه ضایعه دیده بود، بافت نخاع خارج شد. آن‌گاه یک قطعه ۱ سانتی‌متری در محل ضایعه برش داده شد و بافت جدا شده در محلول پارافرمالدیید در یخچال نگهداری شد. پس از تهیه برش‌های بافتی با میکروتوم و رنگ‌آمیزی با روش همتوکسیلین - انوزین، ناحیه تخریب

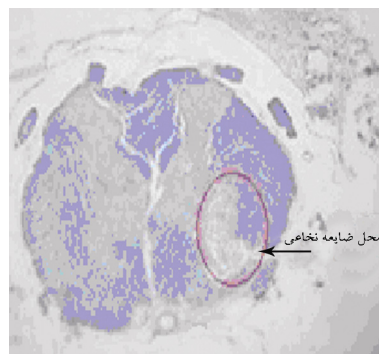
## سایتوکین‌های هسته VPL به دنبال آسیب نخاعی

طول غشای متناسب با هسته VPL بوده به نحوی که ناحیه دیالیز کاملاً درون هسته قرار گیرد. بدیهی است طول تمام پروب‌ها یکسان بوده است.

### ارزیابی توان استخراج یا سرعت بازیابی پروب

پروب دیالیزی که در بافت قرار گرفته است به طور یکنواخت با محلول مایع مغزی-نخاعی مصنوعی تحت تزریق تدریجی قرار داده می‌شود و مولکول‌های داخل و خارج لومن غشا بسته به شیب غلظتی از منافذ غشا عبور می‌کند. در صورتی که غلظت ماده‌ای در محیط احاطه کننده غشا یا در فضای حاوی مایع خارج سلولی بیشتر از غلظت آن در مایع پرفیوژن باشد، این ماده بر اساس شیب غلظتی و با روش انتشار ساده به سمت داخلی غشا هدایت می‌شود؛ بنابراین همراه با مایع پرفیوژن از طریق مسیر خروجی پروب به بیرون هدایت می‌شود که می‌توان آن را در یک میکروتیوب متصل به انتهای مسیر خروجی پروب جمع‌آوری نمود. نسبت بین غلظت ماده در محیط پرفیوژن به غلظت آن در مایع یا محیط اطراف غشای دیالیز را بازیابی (Recovery) نسبی یا کارایی پروب می‌گویند که به صورت درصد بیان می‌شود [۲۲]. بازیابی نسبی را در صورتی می‌توان تعیین کرد که غلظت ماده در محیط اطراف غشا، مشخص یا قابل اندازه‌گیری باشد. در این تحقیق، برای تعیین بازیابی نسبی پروب ساخته شده، مسیر ورودی پروب به یک پمپ تزریق (Stoelting، آمریکا) متصل شد؛ سپس هر پروب به طور جداگانه درون محلول‌هایی که حاوی غلظت مشخصی از IL-6 و TNF- $\alpha$  بود قرار گرفت. مایع مغزی-نخاعی مصنوعی تهیه شده با سرعت ۲ میکرولیتر در دقیقه از مسیر ورودی پروب به مدت سه ساعت به‌طور تدریجی تزریق شد که نمونه مربوط به ساعت اول که برای پایدار شدن شرایط حیوان در نظر گرفته می‌شد حذف شد و پس از تهیه مایع میکرودیالیز با حجم کافی (۱۰۰ میکرولیتر) میزان IL-6 و TNF- $\alpha$  موجود در نمونه میکرودیالیزی با روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) تعیین

شده زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد (شکل ۱). در ضمن در حیوانات گروه ششم فقط لامینکتومی انجام شد. بررسی نمونه‌های بافتی رنگ‌آمیزی شده نشان داد که وسعت تخریب ناحیه آسیب دیده در نمونه‌های گروه ضایعه نخاعی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت. در طول مدت مطالعه، سه سر از حیوانات دچار فلجی پا شدند و از مطالعه خارج شدند.



شکل ۱ محل ایجاد ضایعه نخاعی

## آزمون میکرودیالیز

### تهیه پروب میکرودیالیز

پروب (Probe) میکرودیالیز را می‌توان به صورت تجاری تهیه کرد ولی از آن‌جا که چنین پروب‌هایی گران بوده و نیز ممکن است که اندازه طول مؤثر غشای دیالیز یا طول بخشی از پروب که وارد بافت مغزی و هسته هدف می‌شود با شرایط آزمون سازگار نباشد؛ بنابراین پروب مورد نیاز در آزمایشگاه توسط محققین ساخته شد. در این مطالعه از پروب‌های به شکل Y استفاده شد.

تهیه پروب به روشی که هورن (Horn) در سال ۲۰۰۱ در نشریه Methods توضیح داده است [۲۱] صورت گرفت. مسیرهای ورودی و خروجی مایع پرفیوژن، با استفاده از لوله‌های پلی اتیلنی شماره ۲۰ و میکروتیوبی از جنس سیلیکا ساخته شد. غشای دیالیز نیز از جنس پلی سولفون و با حداکثر قطر منافذ (Cut off): ۱۰۰۰ کیلودالتون انتخاب شد.

مقدار شد [۲۳]. درصد بازیابی پروب برای هر دو سائتوکین در محدوده قابل قبول بود (۴ درصد برای IL-6 و ۲ درصد برای  $\alpha$ -TNF).

### نصب پروب میکرودیالیز

پس از انجام لامینکتومی و ایجاد ضایعه نخاعی، نصب مسیر راهنما (Guide Cannula) برای ورود پروب با روش استرئوتاکسی انجام شد. پس از ثابت کردن حیوان در دستگاه استرئوتاکسی، بافت جلدی روی سر در خط وسط در جهت قدامی-خلفی (در فاصله بین چشم‌ها و گوش‌ها) برش داده شد، سطح ججمه کاملاً از بافت‌های اضافی تمیز شد تا شیارها و نقاط برگما (Bregma) و لامبدا (Lambda) آشکار شود. با استفاده از اطلس پاکسینوس (Paxinos Atlas) [۲۴] مشخصات هسته VPL تالاموس (۲/۵۲ میلی‌متر عقب تر از برگما، ۳/۴ میلی‌متر از خط وسط در سمت راست و ۶-۴/۵ میلی‌متر از سطح ججمه) را مشخص شد و سپس با استفاده از دریل دندانپزشکی استخوان ججمه در محل مورد نظر سوراخ شد و یک کانول راهنما (برای وارد کردن پروب در روز آزمایش) جاگذاری و با سیمان دندانپزشکی روی ججمه ثابت شد. سپس حیوان در قفسی مناسب و به صورت انفرادی تا زمان آزمایش نگهداری شد. ۴۸-۷۲ ساعت پس از جراحی استرئوتاکسی و بهبودی عوارض جراحی که به عنوان زمان بازیابی نیز تلقی می‌شود، آزمون میکرودیالیز در حیوانات انجام شد.

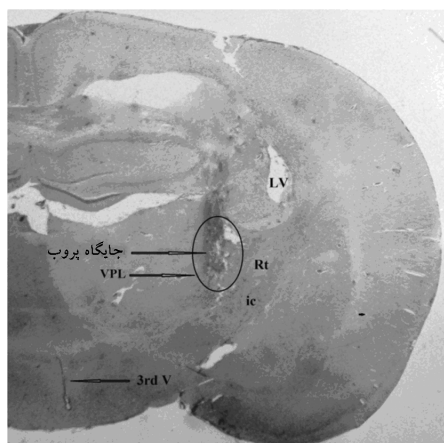
### استخراج و نگهداری نمونه دیالیزی

مایع مغزی-نخاعی مصنوعی طبق فرمولاسیون زیر: Artificial CerebroSpinal Fluid (ACSF): ۱/۳ میلی مول  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۲/۶ میلی مول KCl، ۰/۹ میلی مول  $\text{MgCl}_2$ ، ۲۱ میلی مول  $\text{NaHCO}_3$ ، ۲/۵ میلی مول  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۲۵ میلی مول NaCl، تهیه شده در آب مقطر، pH=۷/۴ [۱۷] به صورت تازه تهیه و پس از صاف نمودن، از طریق پمپ تزریق، با سرعت جریان ۲ میکرولیتر در دقیقه به داخل مسیر ورودی

پروب میکرودیالیز به‌طور تدریجی تزریق شد. مایع مغزی نخاعی مصنوعی پس از عبور در طول مسیر پروب، به لومن غشای نیمه تراوای دیالیز وارد شد و در آنجا مولکول‌های مواد منتشره در مایع خارج سلولی اطراف غشا بر اساس شیب غلظتی خود از منافذ غشا عبور و به داخل لومن غشا وارد شد و سپس همراه مایع مغزی-نخاعی مصنوعی در مسیر خروجی پروب حرکت نمود و در انتها در یک میکروتیوب اپندورف (Eppendorf) که درون ظرفی پر از یخ قرار داشت، جمع‌آوری شد. پس از آن نمونه‌ها در یخچال و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان تعیین مقدار نگهداری شد.

### تهیه برش‌های مغزی و کنترل محل ورود پروب

پس از اتمام میکرودیالیز، برای حصول اطمینان از ورود پروب در ناحیه مورد نظر، حیوانات با اتر بیهوش شدند و با پرفیوژن داخل قلبی (Transcardiac) محلول پارافرمالدید ۴ درصد، بافت مغزی تثبیت شد. پس از خارج ساختن بافت تثبیت شده، با تهیه برش‌های مطلوب از بافت مغزی حاوی ناحیه تالاموس، محل ورود پروب در زیر میکروسکوپ ارزیابی شد (شکل ۲). نمونه‌هایی که در آن‌ها غشای میکرودیالیزی به نحوی آسیب دیده یا آن‌که پروب در ناحیه مورد نظر قرار نگرفته بود، کنار گذاشته شد و نتایج به‌دست آمده از آن‌ها از آزمون حذف شد.



شکل ۲ محل قرار گرفتن پروب میکرودیالیز در هسته VPL تالاموس

محفظه شفاف قرار گرفتند. هنگامی که پنجه پاهای عقبی به راحتی روی سطح قرار گرفت، تارهای VFF به ترتیب از شماره‌های ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۶، ۶۰، ۱۰۰، ۱۸۰ و ۳۰۰ (هر شماره مربوط به یک تار بوده و بیانگر میزان نیروی وارد شده به سطح بر حسب گرم می‌باشد) مورد استفاده قرار گرفت. تارها در راستای افزایش قطر به صورت ملایم در سطح پستی هر دو پای عقبی در محل بین انگشت ۲ و ۳ فشار داده می‌شد و آستانه کشیدن پا (Paw Withdrawal Threshold: PWT) به عنوان حداقل گرم نیروی وارده برای پای تحت فشار در نظر گرفته شد که به عبارت دیگر حداقل فشار مورد نیاز برای واکنش کشیدن پا است. هر کدام از تارها ۵ نوبت آزمایش شد و در صورتی که حیوان ۳ نوبت از ۵ نوبت واکنش عقب کشیدن پا را نشان داد، نیروی وارده توسط آن تار به عنوان آستانه احساس درد در نظر گرفته شد. آزمون درد مکانیکی در زمان قبل از ایجاد جراحی در گروه‌های ضایعه دیده و شام و در روز سوم پس از جراحی و پایان هفته ۱، ۲، ۳، ۴ در تمام گروه‌ها انجام شد.

### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه، Bonferroni Post Test و نیز آنالیز واریانس یک طرفه و Tukey's Post Test و برنامه آماری Graph pad prism 5 استفاده شد و  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری اختلاف داده‌ها گزارش شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار متغیر مورد نظر گزارش شد.

### نتایج

ایجاد ضایعه الکتریکی در مسیر نخاعی - تالاموسی، اختلال معنی‌داری در فعالیت حرکتی حیوانات ایجاد نکرد.

### درد و آلودینیای مکانیکی

ضایعه الکتریکی مسیر نخاعی - تالاموسی جانبی موجب کاهش آستانه درد مکانیکی و بروز آلودینیا در گروه ضایعه شد.

### تعیین میزان سایتوکین‌ها

اندازه‌گیری سایتوکین‌های  $TNF-\alpha$  و IL-6 با استفاده از کیت الایزای مخصوص رت (Rat) مطابق دستور سازنده انجام شد. برای سنجش IL-6 از کیت الایزای شرکت Invitrogen (Catalog#KRC0061، آمریکا) و برای تعیین  $TNF-\alpha$  از کیت الایزای Invitrogen (Catalog#KRC3011، آمریکا) استفاده شد.

### آزمایش‌های رفتاری

آزمون‌های رفتاری شامل بررسی فعالیت حرکتی حیوان و عملکرد حسی به صورت پاسخ به محرک مکانیکی دردناک قبل و پس از عمل جراحی نخاع بود.

### آزمون ارزیابی فعالیت حرکتی

برای اطمینان از سالم بودن مسیر حرکتی بعد از ایجاد ضایعه در مسیر اوران‌های درد نخاعی - تالاموسی فعالیت حرکتی حیوان با استفاده از آزمون Open Field بررسی شد [۲۵]. برای انجام این آزمون یک جعبه به ابعاد  $60 \times 60$  و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر، دوربین و نرم‌افزار Ethovision نیاز است. دیواره داخلی جعبه بهتر است به رنگ تیره و قابل تمیز کردن و در زاویه دید دوربین باشد. این دوربین به کامپیوتر دارای نرم‌افزار Ethovision وصل است. به کمک دوربین و نرم‌افزار یاد شده حرکات حیوان ثبت و ضبط و تجزیه و تحلیل شد و مسافت طی شده در زمان ۵ دقیقه برای هر حیوان محاسبه شد.

### آزمون درد مکانیکی

در این روش از VFF (Von Frey Filaments) (Stoelting، آمریکا) برای ارزیابی پاسخ حیوان به تحریکات تماسی و فشاری استفاده شد [۲۶]. این تارها در هنگام اعمال فشار در راستای خصوصیات نیروی خمش آن‌ها کالیبره شده است. حیوانات ۱۵ دقیقه قبل از آزمایش برای آشنایی و سازگاری با محیط، درون

این کاهش از روز سوم بعد از آسیب مشاهده شد و در طول دورهٔ آزمون ادامه داشت (جدول ۱).

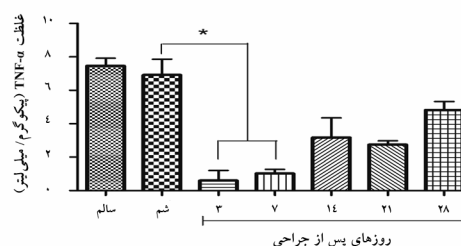
جدول ۱ اثر ضایعه الکتریکی مسیر نخاعی- تالاموسی جانبی بر پاسخ به تحریک مکانیکی

| روزهای پس از جراحی |                |                     |                |                |                | آستانه عقب کشیدن پا (گرم) |
|--------------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------|
| ۲۸                 | ۲۱             | ۱۴                  | ۷              | ۳              | ۰              |                           |
| $53/2 \pm 6/8^*$   | $42 \pm 7/5$   | $43 \pm 7^*$        | $41/5 \pm 8/5$ | $34/5 \pm 8/5$ | $48/7 \pm 3/1$ | شم- همسو                  |
| $20/5 \pm 3/2$     | $16/7 \pm 3/2$ | $20/5 \pm 2/5$      | $18/3 \pm 2/8$ | $16/5 \pm 3/4$ | $40/3 \pm 3/5$ | ضایعه- همسو               |
| $46/4 \pm 8/3^*$   | $40/5 \pm 5/7$ | $48/7 \pm 5/3^{**}$ | $43 \pm 12/3$  | $20/5 \pm 3/2$ | $46/1 \pm 3/3$ | شم- مقابل                 |
| $18/4 \pm 3/2$     | $17/7 \pm 3/7$ | $22/2 \pm 2$        | $18/1 \pm 2$   | $23/3 \pm 2/8$ | $39 \pm 3/5$   | ضایعه- مقابل              |

آسیب نخاعی موجب کاهش معنی دار آستانه پاسخ درد مکانیکی هم در پای راست (همسو با ضایعه) و هم در پای چپ (مقابل به سمت ضایعه) شد. کاهش معنی دار آستانه درد نسبت به گروه شم از پایان هفته دوم آغاز و تا پایان هفته چهارم ادامه داشت. برای آزمودن ارزش آماری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه و استفاده Bonferroni post test استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار میزان نیروی لازم (گرم) برای ایجاد درد مکانیکی بود و با  $n=6$  در هر گروه ارایه شده است.  $P < 0/01^{**}$ ,  $P < 0/05^*$

مقادیر به دست آمده در روزهای مختلف به عنوان مقدار TNF- $\alpha$  در این گروه در نمودار آمده است. در ضمن مقدار سایتوکین در گروه شم با گروه کنترل سالم و دست نخورده تقریباً مشابه بود و اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۳). در گروه دارای ضایعه نخاعی، میزان سایتوکین TNF- $\alpha$  در روزهای ۳ و ۷ پس از ضایعه نسبت به گروه شم کاهش یافت ( $P < 0/05$ ) ولی از روز ۱۴ به بعد، طی روندی تدریجی و افزایشی مجدداً به میزان اولیه بازگشت؛ به طوری که طی هفته دوم تا چهارم مقدار آن تفاوت معنی داری نسبت به گروه شم نداشت.

در مورد تغییرات IL-6 به دنبال ضایعه الکتریکی مسیر نخاعی- تالاموسی جانبی، چنان که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان این سایتوکین در هفته‌های اول تا سوم بعد از آسیب تغییر قابل توجهی نداشت، اما در روز ۲۱ و پایان هفته سوم افزایش چشمگیر میزان IL-6 در هسته VPL تالاموس مشاهده می‌شود به نحوی که تفاوت غلظت سایتوکین در این زمان نسبت به گروه شم معنی دار بود ( $P < 0/05$ ) (شکل ۴). نکته قابل توجه این که غلظت اینترلوکین ۶ در گروه شم در روزهای مختلف بررسی با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشت و میانگین مقدار سایتوکین در تمام روزها نیز با میزان به دست آمده در گروه کنترل سالم فاقد هر گونه اختلاف معنی دار بود.



شکل ۳ تغییرات میزان TNF- $\alpha$  در هسته VPL تالاموس متعاقب تخریب یک طرفه مسیر نخاعی- تالاموسی در نخاع موش صحرایی نر؛ میزان TNF- $\alpha$  در هفته اول پس از ایجاد ضایعه نخاعی کاهش معنی داری نسبت به گروه شم نشان داد ( $P < 0/05$ ). مقدار گروه شم بیانگر میانگین میزان سایتوکین در این گروه در روزهای مختلف پس از ضایعه است. برای آزمودن ارزش آماری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و استفاده Tukey's post test استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار غلظت TNF- $\alpha$  بود و با  $n=8-3$  در هر گروه ارایه شده است.  $P < 0/05^*$

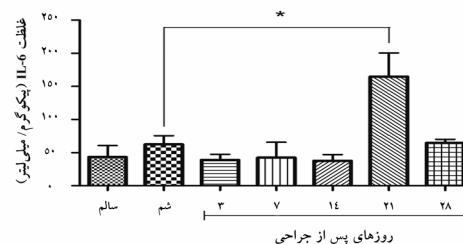
## تغییرات رهایش سایتوکین‌های TNF- $\alpha$ و IL-6

### به دنبال آسیب نخاعی

ضایعه الکتریکی مسیر نخاعی- تالاموسی جانبی منجر به کاهش معنی دار سطح TNF- $\alpha$  در نمونه‌های دیالیزی به دست آمده از هسته VPL تالاموس شد (شکل ۳). در گروه شم با توجه به این که میزان سایتوکین در روزهای مختلف بررسی با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشت، بنابراین میانگین مجموع

## سایتوکین‌های هسته VPL به دنبال آسیب نخاعی

دهنده پیام درد در مقایسه با سایر مدل‌های آسیب نخاعی که در آن‌ها تمامی بستر نخاع در قطعه بافتی هدف آسیب می‌بیند، به محقق اجازه می‌دهد تا تغییرات سلولی و مولکولی مرتبط با احساس و درک درد را به طور جداگانه پس از ضایعات نخاعی در مدل حیوانی بررسی نماید. اما در رابطه با درد مکانیکی که مدل مناسبی برای ارزیابی دردهای ناشی از آسیب عصبی ناشی از آسیب‌های عصبی است، یافته‌های این تحقیق کاهش آستانه درد یا افزایش درد ناشی از آسیب عصبی را در هر دو پای خلفی حیوان طی چهار هفته پس از آسیب نخاعی نشان داده است. مطالعات متعددی بروز آلودینیا را به دنبال مدل‌های مختلف آسیب نخاعی نشان داده‌است. وانگ و تامسون (Wang and Thompson) در سال ۲۰۰۸ نیز با بهره‌گیری از مدل آسیب نخاعی مشابه با این تحقیق، گزارش کردند که ۳ روز پس از ایجاد ضایعه الکتریکی مسیر نخاعی - تالاموسی، آلودینیای مکانیکی در هر دو پای خلفی حیوان ایجاد می‌شود [۲۸]. گرچه کاهش آستانه درد در هر دو گروه آسیب دیده و شرم در روزهای اولیه پس از ضایعه نخاعی دیده می‌شود اما اختلاف آستانه درد در این دو گروه با میزان پایه درد قبل از آسیب، معنی‌دار نبود. در ضمن آستانه درد در گروه شرم در انتهای هفته اول به سطح کنترل نزدیک می‌شود، اما در گروه ضایعه دیده تا پایان هفته چهارم کماکان پایین باقی می‌ماند و در این مدت تفاوت معنی‌داری را با گروه شرم نشان می‌دهد. این نوع احساس درد موقت و گذرا در مطالعات سایر محققانی که از مدل مشابه آسیب نخاعی استفاده کرده‌اند نیز گزارش شده است [۲۸، ۲۰]. وی (Wei) و همکاران در سال ۲۰۰۸ نتایج مشابهی را با استفاده از مدل درد ناشی از آسیب عصبی ضایعه فشاری مزمن (Chronic Constriction Injury: CCI) در عصب تحت حلقه‌ای (Infraorbital Nerve: ION) گزارش دادند، بدین ترتیب که آستانه عقب کشیدن گونه در گروه شرم طی ۳ روز اول پس از آسیب عصبی کاهش می‌یابد ولی بعد از آن به حالت معمول قبل از ضایعه بازمی‌گردد؛ در حالی که در گروه CCI، آلودینیای ایجاد شده طی ۳۰ روز بعد از ضایعه همچنان



**شکل ۴** تغییرات میزان IL-6 در هسته VPL تالاموس متعاقب تخریب یک طرفه مسیر نخاعی - تالاموسی جانبی در نخاع موش صحرایی نر؛ میزان IL-6 تا دوهفته پس از ضایعه تغییر قابل توجهی در مقایسه با گروه شرم نداشت اما در هفته سوم به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). مقدار گروه شرم بیانگر میانگین میزان سایتوکین در این گروه در روزهای مختلف پس از ضایعه است. برای آزمون ارزش آماری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و Tukey's post test استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار غلظت IL-6 بود و با  $n=3-8$  در هر گروه ارائه شده است.

## بحث

تقابل بین سیستم عصبی و ایمنی در گسترش و پردازش درد اهمیت زیادی دارد و در مطالعات مختلف نشان داده شده است. به دنبال ضایعه عصبی، تولید سایتوکین‌های مختلف توسط سلول‌های التهابی و نیز سلول‌های گلیا موجب تغییر تحریک‌پذیری نورونی می‌شود و به این ترتیب مستقیماً به ایجاد و گسترش درد ناشی از آسیب عصبی کمک می‌کند [۲۷]. در این مطالعه با بهره‌گیری از نوعی مدل آسیب نخاعی که به طور اختصاصی مسیر آوران‌های حسی نخاعی - تالاموسی را در نخاع تخریب می‌نماید، تغییرات تولید سایتوکین‌های التهابی در هسته VPL تالاموس که در واقع اولین ناحیه آناتومیک مغزی دریافت‌کننده نورون‌های درجه دوم درد است، بررسی شد. بر اساس نتایج، عدم مشاهده آثار فلجی پا در حیوان و نیز عدم تفاوت معنی‌دار فعالیت حرکتی حیوان در مقایسه با گروه کنترل شرم طی چهار هفته پس از ایجاد آسیب نشان دهنده دست نخوردن مسیر اعصاب حرکتی بود؛ بنابراین تغییرات ایجاد شده صرفاً منعکس‌کننده تخریب اختصاصی آوران‌های درد در مسیر نخاعی - تالاموسی خواهد بود. به عبارت دیگر؛ می‌توان گفت در این مدل، تخریب انتخابی اعصاب انتقال

پا برجاست. از آنجا که آلودینیای ایجاد شده در گروه شم با کاربرد بی حس کننده موضعی در اطراف محل جراحی (برای مهار افزایش فعالیت نورونی) کاملاً حذف شده است آن‌ها نتیجه گرفتند که درد مشاهده شده ناشی از اعمال جراحی و تحریک ورودی عصبی بافت‌های اطراف موضع به دنبال برش جراحی یا التهاب ناحیه بوده است [۲۹]. این موضوع می‌تواند در درد گذرای به وجود آمده در گروه شم در تحقیق حاضر نیز مطرح باشد.

در مطالعه حاضر، براساس نتایج میکرودیالیز هسته VPL، میزان TNF- $\alpha$  در هفته اول پس از ایجاد ضایعه نسبت به گروه شم به طور معنی‌داری کاهش یافت ولی از روز ۱۴ به بعد افزایش یافت و به سطح سایتوکین در گروه شم نزدیک شد.

در گزارش‌های برخی محققین افزایش بیان TNF- $\alpha$  در ساعات اولیه بعد از آسیب در ناحیه آسیب دیده عصب سیاتیک گزارش شده است [۳۰، ۳۱] که طی ۲۴ ساعت به سطح حداکثر رسیده و ۳ روز در این سطح باقی مانده و سپس به سطح پایه باز گردیده است [۳۱-۳۳]. تغییرات مشابه در سطح mRNA و گیرنده TNF- $\alpha$  نیز توسط لی (Li) و همکارانش گزارش شده است. آن‌ها دریافتند که mRNA سایتوکین TNF- $\alpha$  و گیرنده آن، یک روز پس از ضایعه عصب سیاتیک در گانگلیون ریشه خلفی همان طرف به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و سپس شروع به کاهش می‌کند به طوری که روز ۷ و ۱۴ به سطح پایه می‌رسد [۳۴]. در این مطالعه نشان داده شد که آلودینیای مکانیکی روز اول پس از ضایعه، به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و در روز ۷ به حداکثر می‌رسد. در گزارشی دیگر به دنبال ضایعه تروماتیک عصب سیاتیک، میزان پروتئین TNF- $\alpha$  در محل ضایعه بلافاصله افزایش یافت، طی ۱-۳ روز به حداکثر رسید و ۷ روز پس از ضایعه مجدداً به سطح پایه باز گشت [۳۵] تفاوت نتایج این مطالعه با نتایج سایر محققین می‌تواند به چند علت باشد: اول این که چنان که گفته شد نوع ضایعه متفاوت بوده و مسیر خاصی از اعصاب بالارو و به ویژه آوران‌های درد تخریب شده است، دوم تفاوت در ناحیه

آناتومیک و محل تعیین این سایتوکین‌ها است و سوم نیز روش استخراج، اندازه‌گیری و مهم‌تر از آن، زمان نمونه‌برداری آن‌هاست. در واقع پس از قرار دادن پروب میکرودیالیز در حیوان زنده (*In vivo*)، برای استخراج مایع خارج سلولی از نظر زمانی با برخی محدودیت‌های تکنیکی مواجه هستیم؛ بدین معنی که برای به حداقل رساندن عوارض ناشی از جراحی استرئوتاکسی و تغییرات بیوشیمیایی در محل ورود پروب و تثبیت وضعیت، نیاز به گذشت زمان حداقل ۲۴ ساعت بعد از قراردادن کانول راهنما است. در ضمن مسیر راهنما و پروب میکرودیالیز بعد از ایجاد ضایعه نخاعی کار گذاشته می‌شود؛ بنابراین تهیه نمونه میکرودیالیز در روز اول پس از ضایعه منطقی نبود و احتمالاً می‌توانست نتایج کاذب ایجاد نماید. در صورت عدم وجود این محدودیت و امکان تهیه نمونه میکرودیالیزی در ساعات یا روزهای اول بعد از آسیب نخاعی، چه بسا افزایش تولید سایتوکین‌های مورد مطالعه در نمونه‌ها دیده می‌شد. به دلایل محدودیت‌های مشابه، بررسی آلودینیا تا قبل از روز سوم صورت نگرفت؛ چرا که درد و التهاب ناشی از برش جراحی ممکن بود به عنوان یک متغیر مداخله‌گر نتایج را مخدوش نماید و بنابراین در روز ۳ پس از ضایعه آزمون رفتاری برای بررسی آلودینیای ایجاد شده متناسب با زمان انجام میکرودیالیز انجام شد.

در مطالعه حاضر تغییرات سایتوکین IL-6 قدری با تغییرات TNF- $\alpha$  متفاوت بود و غلظت آن با تأخیر بیشتر و سه هفته بعد از آسیب (روز ۲۱) با اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شم افزایش یافت.

در مطالعه‌ای که توسط ایواتسوک (Iwatsuki) و همکارانش در سال ۲۰۱۳ گزارش شد، یک هفته پس از ضایعه تروماتیک در عصب سیاتیک، افزایش معنی‌داری در میزان IL-6 در محل ضایعه ایجاد شد که به مدت ۲۱ روز طول کشید و روز ۳۵ پس از ضایعه به سطح پایه بازگشت [۳۵]. همچنین ژائو (Zhao) و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش دادند که ۴ هفته پس از ضایعه ناشی از کوفتگی بافت ناحیه T9 نخاع در موش

هائپرآلرژی شود [۲۹]. از سوی دیگر؛ ژانگ (Zhang) و همکاران در سال ۱۹۹۰ گزارش کردند که  $TNF-\alpha$  و IL-1B نسخه‌برداری از IL-6 را آغاز می‌کنند [۴۱]. این گزارش نقش IL-6 را در تداوم بخشیدن به درد تقویت می‌کند. دتلوف (Detloff) و همکاران نیز با مشاهده افزایش معنی‌دار میزان  $TNF-\alpha$  در ناحیه L5 نخاع در روز ۷ و افزایش IL-6 در روز ۲۱ پس از ضایعه نخاعی در ناحیه توراسیک، این فرضیه را مطرح نمودند که افزایش اولیه  $TNF-\alpha$  ممکن است موجب القای آلودینیا شود ولی افزایش تأخیری IL-6 در زمانی که درد کاملاً استقرار یافته است به مداومت درد کمک می‌کند [۱۸]. در تحقیق حاضر کاهش معنی‌دار میزان  $TNF-\alpha$  طی روزهای ۳-۷ پس از ضایعه نخاعی، ممکن است نوعی واکنش خود تنظیمی یا جبرانی در مقابل یک افزایش شدید احتمالی سایتوکین در روز اول پس از ضایعه باشد که در این صورت  $TNF-\alpha$  سبب تحریک روند نسخه‌برداری از ژن دیگر سایتوکین‌ها و از جمله IL-6 می‌شود [۴۱] که این اثر در روز ۲۱ پس از ضایعه با افزایش IL-6 مشاهده شده است. متأسفانه چنان که پیش‌تر نیز ذکر شد به علت تقارن با دوره بازبایی پس از قرار دادن کانول راهنمای پروب میکرودیالیز مغزی، در مطالعه حاضر امکان اندازه‌گیری میزان  $TNF-\alpha$  در ساعات اولیه پس از آسیب و بررسی درستی این فرضیه فراهم نشد. امیدواریم در آینده‌ای نزدیک با استفاده از روش‌هایی مثل وسترن‌بلات (Western Blot) که این قبیل محدودیت‌ها را ندارد، این موضوع مشخص شود.

افزایش حساسیت اعصاب آوران درد، پیامد رفتاری وجود ضایعه یا التهاب بوده [۲۷، ۴۳] و به واسطه فعالیت نورونی غیر عادی مرتبط با ضایعه یا التهاب ایجاد می‌شود. با توجه به افزایش تعداد و فعالیت سلول‌های گلیال در پاسخ به آسیب بافتی، واسطه‌گرهای التهابی آزاد شده از سلول‌های گلیال فعال شده سیستم عصبی مرکزی یا محیطی ممکن است در ایجاد این چنین درد غیرعادی نقش کلیدی داشته باشد. بر اساس یک گزارش،  $TNF-\alpha$  تولید شده توسط سلول‌های گلیال، با افزایش فرکانس جریان‌ات خودبه‌خودی پس سیناپسی تحریکی و

صحرائی، مقدار IL-6 در تالاموس به طور معنی‌داری نسبت به کنترل افزایش یافت [۳۶]. سایتوکین‌های تولید شده در محل ضایعه قابلیت انتقال در طول آکسون را دارد، بنابراین ممکن است تأثیرات خود را در نواحی دورتر از ضایعه نیز اعمال نماید. در یک مطالعه نشان داده شد که  $TNF-\alpha$  مشتق از ضایعه عصب سیاتیک، از طریق آکسون از محل ضایعه محیطی به شاخ خلفی نخاع انتقال می‌یابد و با فعال نمودن میکروگلیاهای نخاع در بروز پاسخ به ضایعه عصبی دردناک محیطی نقش دارد [۳۷]. این قبیل یافته‌ها ممکن است توجیه‌کننده مکانیسم‌های تأخیری فعال شدن سلول‌های گلیال سیستم عصبی مرکزی و در نتیجه تولید سایتوکین‌های مرتبط با ضایعه نورونی باشد [۳۸، ۳۹]. در مطالعه حاضر نیز افزایش IL-6 در تالاموس هم می‌تواند مربوط به افزایش IL-6 در محل ضایعه باشد که از طریق انتقال آکسونی از نورون‌های دسته دوم درد در مسیر نخاعی - تالاموسی به تالاموس انتقال یافته یا ممکن است با مکانیسم متفاوتی در نتیجه رخدادهای سلولی مولکولی درون تالاموس ایجاد شده باشد.

در مورد ارتباط تغییرات غلظت سایتوکین‌های مورد بررسی با تغییرات آستانه درد به دنبال ضایعات بافتی و مکانیسم‌های پیام رسانی مربوط گزارش‌های متعددی منتشر شده است. مواردی همچون تحریک کینازهای داخل سلولی مانند P38MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)، افزایش فعالیت گیرنده‌های نوروترانسمیتری، تحریک ره‌های سایتوکین‌های دیگر و تغییر جریان‌ات پس سیناپسی تحریکی و مهار [۴۰-۴۲] از این جمله است. وی و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که به دنبال ضایعه عصبی مدل ضایعه فشاری مزمن (CCI) در عصب تحت حلقه‌ای موش‌های صحرائی میزان  $TNF-\alpha$  و IL-1B در ناحیه قدامی - شکمی بصل‌النخاع (Rostral Ventromedial Medulla: RVM) افزایش می‌یابد که این به نوبه خود موجب افزایش فسفریلاسیون زیر واحد NR1 گیرنده‌های NMDA (N-Methyl-D-Aspartate Receptors) و افزایش فعالیت آن‌ها می‌شود و می‌تواند منجر به بروز

خود می‌تواند موجب کاهش آستانه تحریک نورون‌های انتقال دهنده پیام درد یا به عبارت دیگر افزایش تحریک‌پذیری این اعصاب و بروز درد ناشی از آسیب عصبی مرکزی شود. براساس نتایج این بررسی به نظر می‌رسد به دنبال تخریب مسیر حاوی آوران‌های درد در نخاع موش صحرایی، تولید عوامل التهابی در مناطق فوق نخاعی دورتر از ضایعه دستخوش تغییراتی شده است که در نهایت به کاهش آستانه درد و بروز درد ناشی از آسیب عصبی مداوم منتهی می‌شود.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. نویسندگان مقاله مراتب تشکر خود را از مهندس مزدا نیک‌نفس به خاطر تهیه غشای میکرودیالیز با منافذ بالا اعلام می‌نمایند.

افزایش دامنه جریان‌ات القا شده با واسطه گیرنده‌های AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) و NMDA، هدایت سیناپسی تحریکی را افزایش می‌دهد [۴۰]. IL-6 نیز با کاهش فرکانس جریان‌ات خودبه‌خودی پس سیناپسی مهاری و کاهش دامنه جریان‌ات القا شده به وسیله گابا (Gaba) و گلیسین (Glycine)، هدایت سیناپسی مهاری را مهار می‌کند و در واقع همسو با  $TNF-\alpha$  سبب تحریک نورونی می‌شود. این نتایج نقش مهم این سایتوکین‌های پیش التهابی را در تنظیم شکل‌پذیری سیناپسی و تحریک‌پذیری نورونی نشان می‌دهد [۴۴]. بنابراین با توجه به الگوی درد ناشی از آسیب عصبی مشاهده شده پس از ضایعه نخاعی، احتمال می‌رود تغییرات میزان سایتوکین‌ها به صورت کاهش سایتوکین  $TNF-\alpha$  در هفته اول پس از آسیب و سپس افزایش تولید آن از هفته دوم به بعد و نیز افزایش تولید IL-6 بعد از گذشت سه هفته از شروع ضایعه منجر به تشدید آثار گلوتامات و تحریک مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی شده باشد که این

## منابع

- [1] Beric A. Spinal cord injury pain. *Eur J Pain* 2003; 7(4): 335-8.
- [2] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 2008; 70(18): 1630-5.
- [3] Tasker RR, Dostrovsky JO, Dolan EJ. Computerized tomography (CT) is just as accurate as ventriculography for functional stereotactic thalamotomy. *Stereotact Funct Neurosurg* 1991; 57(4): 157-66.
- [4] Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2008; 136(3): 380-7.
- [5] Toth C, Lander J, Wiebe S. The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population. *Pain Med* 2009; 10(5): 918-29.
- [6] Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev* 2009; 60(1): 202-13.
- [7] Gwak YS, Hains BC, Johnson KM, Hulsebosch CE. Effect of age at time of spinal cord injury on behavioral outcomes in rat. *J Neurotrauma* 2004; 21(8): 983-93.
- [8] Harden N, Cohen M. Unmet needs in the

- management of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 2003; 25(5 Suppl): S12-7.
- [9] Watkins LR, Maier SF. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. *J Intern Med* 2005; 257(2): 139-55.
- [10] Hulsebosch CE. Gliopathy ensures persistent inflammation and chronic pain after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008; 214(1): 6-9.
- [11] Davies AL, Hayes KC, Dekaban GA. Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88(11): 1384-93.
- [12] Jancálek R, Dubový P, Svízenská I, Klusáková I. Bilateral changes of TNF-alpha and IL-10 protein in the lumbar and cervical dorsal root ganglia following a unilateral chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 11.
- [13] Zelenka M, Schäfers M, Sommer C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* 2005; 116(3): 257-63.
- [14] McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol* 2005; 192(2): 444-62.
- [15] Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci* 2005; 28(2): 101-7.
- [16] Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 2001; 21(8): 2580-8.
- [17] Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006; 26(16): 4308-17.
- [18] Detloff MR, Fisher LC, McGaughy V, Longbrake EE, Popovich PG, Basso DM. Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2008; 212(2): 337-47.
- [19] Gwak YS, Hulsebosch CE. Gliopathy" Maintains Persistent Hyperexcitability of Spinal Dorsal Horn Neurons after Spinal Cord Injury: Substrate of Central Neuropathic Pain. In: Costa A, Villalba E (Editors). *Horizons in Neuroscience Research*. New York: Nova Science Publishers, 2010; p:195-224.
- [20] Naseri K, Saghaei E, Abbaszadeh F, Afhami M, Haeri A, Rahimi F, Jorjani M. Role of microglia and astrocyte in central pain syndrome following electrolytic lesion at the spinothalamic tract in rats. *J Mol Neurosci* 2013; 49(3): 470-9.
- [21] Horn TF, Engelmann M. In vivo microdialysis for nonapeptides in rat brain--a practical guide. *Methods* 2001; 23(1): 41-53.
- [22] Ungerstedt U. Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med* 1991; 230(4): 365-73.
- [23] Ao X, Stenken JA. Microdialysis sampling of cytokines. *Methods* 2006; 38(4): 331-41.
- [24] Paxinos G, Watson C. The rat brain in

- stereotaxic coordinates. 5<sup>th</sup> ed, San Diego: Elsevier Academic Press, 2005; p; 94.
- [25] Saghaei E, Abbaszadeh F, Naseri K, Ghorbanpoor S, Afhami M, Haeri A, Rahimi F, Jorjani M. Estradiol attenuates spinal cord injury-induced pain by suppressing microglial activation in thalamic VPL nuclei of rats. *Neurosci Res* 2013; 75(4): 316-23.
- [26] Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav* 1999; 67(5): 711-6.
- [27] Watkins LR, Maier SF. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 2002; 82(4): 981-1011.
- [28] Wang G, Thompson SM. Maladaptive homeostatic plasticity in a rodent model of central pain syndrome: thalamic hyperexcitability after spinothalamic tract lesions. *J Neurosci* 2008; 28(46): 11959-69.
- [29] Wei F, Guo W, Zou S, Ren K, Dubner R. Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. *J Neurosci* 2008; 28(42): 10482-95.
- [30] Sacerdote P<sup>1</sup>, Franchi S, Trovato AE, Valsecchi AE, Panerai AE, Colleoni M. Transient early expression of TNF-alpha in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 2008; 436(2): 210-3.
- [31] Kato K, Kikuchi S, Shubayev VI, Myers RR. Distribution and tumor necrosis factor-alpha isoform binding specificity of locally administered etanercept into injured and uninjured rat sciatic nerve. *Neuroscience* 2009; 160(2): 492-500.
- [32] George A, Buehl A, Sommer C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol* 2005; 192(1): 163-6.
- [33] Lee HL, Lee KM, Son SJ, Hwang SH, Cho HJ. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport* 2004; 15(18): 2807-11.
- [34] Li J, Xie W, Zhang JM, Baccei ML. Peripheral nerve injury sensitizes neonatal dorsal horn neurons to tumor necrosis factor-alpha. *Mol Pain* 2009; 5: 10.
- [35] Iwatsuki K, Arai T, Ota H, Kato S, Natsume T, Kurimoto S, Yamamoto M, Hirata H. Targeting anti-inflammatory treatment can ameliorate injury-induced neuropathic pain. *PLoS One* 2013; 8(2): e57721.
- [36] Zhuo M. Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol Pain* 2007; 3: 14.
- [37] Shubayev VI, Myers RR. Anterograde TNF alpha transport from rat dorsal root ganglion to spinal cord and injured sciatic nerve. *Neurosci Lett* 2002; 320(1-2): 99-101.
- [38] Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 1997; 79(2): 163-75.
- [39] DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ. Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy. *Brain Res* 1997; 759(1): 50-7.
- [40] Abbadie C, Bhangoo S, De Koninck Y,

- Malcangio M, Melik-Parsadaniantz S, White FA. Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev* 2009; 60(1): 125-34.
- [41]Zhang YH, Lin JX, Vilcek J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Mol Cell Biol* 1990; 10(7): 3818-23.
- [42]Inoue K, Tsuda M. Microglia and neuropathic pain. *Glia* 2009; 57(14): 1469-79.
- [43]Willis WDJ. Hyperalgesia and Allodynia. New York: Raven Press, 1992.
- [44]Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* 2008; 28(20): 5189-94.