

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۵، فروردین ۱۳۹۵، ۶۲-۵۱

# تأثیر کاهش فعالیت بدنی از طریق لیگاتوربندی عصب نخاعی بر بیان ژن گیرنده‌های نوروتروفینی تیروزین کینازی در عصب سیاتیک موش‌های صحرایی نر دارای درد نوروپاتیک

عبدالرضا کاظمی<sup>۱</sup>

دریافت مقاله: ۹۴/۲/۲۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۴/۴/۱۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۴/۱۱/۴ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۲/۹

### چکیده

زمینه و هدف: نوروپاتی حالتی است که از آسیب یا بیماری سیستم عصبی حاصل شده و بیماران مبتلا را در معرض بسیاری از عوارض عملکردی مانند کاهش فعالیت بدنی و عوارض ناشی از آن نظیر بیماری قلبی-عروقی و عضلانی قرار می‌دهد. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر کاهش فعالیت به روش لیگاتوربندی عصب نخاعی بر بیان ژن گیرنده‌های نوروتروفینی در عصب سیاتیک موش‌های صحرایی نر مبتلا به درد نوروپاتیک بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده که ۱۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به دو گروه کنترل و گروه فعالیت کاهش یافته از طریق لیگاتوربندی عصب نخاعی تقسیم شدند. طی شش هفته آزمون‌های رفتاری، درد نوروپاتیک در دو گروه انجام شد. در پایان هفته ششم تغییرات بیان ژن‌های TrkA، TrkB و TrkC در عصب سیاتیک با تکنیک Real time PCR اندازه‌گیری گردید. تغییرات بیان ژن‌ها با روش  $2^{-CT}$  و با استفاده از آزمون t مستقل در دو گروه مقایسه شد. به منظور مقایسه نتایج آزمون‌های رفتاری در دو گروه، از تحلیل واریانس دوطرفه با اندازه‌های مکرر استفاده شد.

یافته‌ها: آزمون‌های رفتاری نشان داد که فعالیت کاهش یافته سبب آلوداینیای مکانیکی و هایپرالژیای حرارتی و همچنین کاهش آستانه درد در گروه SNL گردید ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این، در مقایسه با گروه کنترل، بیان ژن گیرنده‌های تیروزین کینازی در عصب سیاتیک گروه SNL بالاتر بود ( $p < 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: فعالیت کاهش یافته به شکل SNL با افزایش بیان ژن TrkA، TrkB و TrkC و علایم تخریب عصبی پردردی حرارتی، آلوداینیای مکانیکی همراه است. به نظر می‌رسد در اثر آسیب عصبی بیان گیرنده‌های نوروتروفینی نیز دچار تغییر شود. هر چند سازوکارهای دقیق به خوبی مشخص نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: موش صحرایی، درد نوروپاتیک، گیرنده تیروزین کینازی، کاهش فعالیت بدنی

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی تربیت بدنی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

تلفن: ۰۳۴-۳۱۳۱۲۳۳۶، دورنگار: ۰۳۴-۳۱۳۱۲۳۳۶، پست الکترونیکی: a.kazemi@vru.ac.ir

## مقدمه

درد نوروپاتی شرایط مزمنی است که به علت آسیب سیستم عصبی ایجاد می‌شود. برخلاف درد حاد که جهت محافظت از بدن می‌باشد، درد مزمن نوروپاتی علت مفیدی نداشته و اثرات عمیقی بر کیفیت زندگی و میزان هزینه درمانی بیماران می‌گذارد. [۱].

سطوح بالای فعالیت بدنی با افزایش کیفیت زندگی و سلامتی مرتبط بوده و برای داشتن زندگی خوب، افراد نیازمند انجام فعالیت بدنی منظم و کافی در زندگی روزانه‌شان می‌باشند [۲]. فعالیت بدنی شامل دامنه گسترده‌ای از فعالیت‌ها از جمله ورزش، فعالیت‌های تفریحی و بدنی مانند پیاده‌روی، باغبانی، شستن ظرف و انجام دیگر کارها می‌باشد [۳]. با این حال، معمولاً در بیماران دچار درد مزمن نظیر بیماران مبتلا به نوروپاتی محیطی، کاهش فعالیت بدنی امری شایع به نظر می‌رسد که این حالت به شدت سبب کاهش کیفیت زندگی بیماران شده [۴] و موجب ایجاد عوارضی مانند چاقی، کاهش ظرفیت عملکردی تنفسی، قلبی-عروقی، آتروفی عضلانی و اسکلتی می‌شود [۵].

با این حال، درمان‌های حال حاضر در بیماران مبتلا به نوروپاتی دردناک کارایی ناچیزی داشته و عمدتاً موجب تسکین درد می‌شوند تا درمان؛ علاوه بر این دارای عوارض بسیاری نیز هستند [۶]. کشف این که نوروتروفین‌ها نقش مهمی در بیماری‌شناسی درد نوروپاتی دارند نشان‌دهنده این است که این مسیرها می‌توانند نقطه درمانی مهم و جدیدی را ارائه دهند. علاوه بر این، نوروتروفین‌ها به طور بالقوه پاتوفیزیولوژی درد نوروپاتی و از این رو مهار یا معکوس‌سازی روند بیماری را نشان می‌دهند [۷].

نوروتروفین‌ها تنظیم کننده‌های مهم حیات، نمو، عملکرد و شکل‌پذیری سلول‌های عصبی هستند [۸] و تأثیر تنظیمی حادی بر ره‌ایش ناقل‌های عصبی، ارتباط و قدرت سیناپسی دارند [۹] و موجب ارتقای شاخه‌زایی آکسونی و دندریتی می‌شوند [۱۰]. نوروتروفین‌ها شامل عامل رشد عصبی (nerve growth factor; NGF)، عامل تغذیه عصبی مشتق شده از مغز (brain derived neurotrophin factor; BDNF)، نوروتروفین-۳ (NT-3) و نوروتروفین-۵ (NT-5 یا NT4/5) می‌باشند [۱۱].

اعمال نوروتروفین‌ها به وسیله دو کلاس از گیرنده جداگانه وساطت می‌شود: خانواده گیرنده کینازی تروپومبوزین (Trk family) که از گیرنده‌های تیروزین کینازی هستند و شامل TrkA، TrkB و TrkC و گیرنده نوروتروفین p75 (عضوی از خانواده گیرنده عامل نکروز توموری) می‌باشند [۱۲]. تمام نوروتروفین‌ها تأثیرات خود را از طریق یک یا بیش از یک گیرنده Trk اعمال می‌کنند. NGF گیرنده TrkA را فعال می‌کند، و BDNF و NT4/5 به گیرنده TrkB متصل می‌شوند و NT-3 غالباً گیرنده TrkC را فعال می‌کند اما NT-3 نیز می‌تواند به دیگر گیرنده‌های Trk متصل شود [۱۱]. Kalb و همچنین Capsoni و همکاران گزارش کردند که اختلال در عملکرد گیرنده‌های نوروتروفینی Trk به اختلالات رفتاری، تقویت بلند مدت، شاخه‌زایی دندریتی و آکسونی و حیات نورون‌ها منجر می‌شود [۱۳-۱۴]. درد مزمن نوروپاتی علت مفیدی نداشته و اثرات عمیقی بر کیفیت زندگی و همچنین هزینه‌های درمانی بیماران ایجاد می‌کند [۵].

با این حال، مطالعاتی که بر نقش گیرنده‌های نوروتروفینی در نوروپاتی همراه با لیگاتوربندی عصب نخاعی (Spinal; Nerve Ligation SNL) انجام شده باشد،

یافت نشد و مشخص نیست بیان گیرنده‌های نوروتروفینی Trk در حالت درد نوروپاتی با چه تغییراتی همراه هستند. بنابراین، هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر فعالیت کاهش یافته به صورت لیگاتوربندی عصب نخاعی بر بیان گیرنده‌های نوروتروفینی Trk در عصب سیاتیک موش‌های صحرایی نر می‌باشد.

**مواد و روش‌ها**

این مطالعه از نوع تجربی است که در سال ۱۳۹۴ در دانشگاه تربیت مدرس تهران بر روی ۱۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی  $20 \pm 250$  گرم انجام گرفت. جهت آشنایی با محیط حیوان‌خانه، حیوانات پس از خریداری در شرایط دمایی  $4 \pm 22$  درجه سانتی‌گراد و تحت چرخه ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس نگهداری و با غذای مخصوص و آب تغذیه شدند. رت‌ها به طور تصادفی به دو گروه کنترل (تعداد=۵) و گروه فعالیت کاهش یافته (SNL) (تعداد=۵) تقسیم شده و هر روز به وضعیت بهداشتی حیوانات رسیدگی می‌شد. در سراسر دوره پژوهش موش‌ها توسط دو نفر نیز جابه‌جا و دستکاری شدند و تمام فرآیندهای پژوهش حاضر مطابق با کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات که توسط کمیته اخلاق دانشگاه مورد بررسی و تأیید قرار گرفته بود، انجام گردید.

مدل SNL روشی است که به طور گسترده برای مطالعه مکانیسم‌های درد نوروپاتیک و تأثیر داروها و رفتارهای مرتبط با درد مورد استفاده قرار می‌گیرد. جهت ایجاد مدل SNL، ابتدا رت‌ها با سدیم پنتوباریتول (۶۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی) بیهوش شده و سپس عصب پنجم کمری نخاعی آنها بر اساس روش Kim و Chung [۱۵] به طور محکم گره زده شد. به

طور خلاصه در این روش، پس از اطمینان از بیهوشی حیوان عضلات بین مهره‌ای در سطح مهره چهارم کمری و دوم خاجی جدا شده و زائده عرضی مهره ششم کمری برداشته شد. عصب پنجم کمری سمت چپ نخاع مشخص و با ظرافت از اعصاب مجاور جدا گردید. عصب پنجم کمری به طور محکم با استفاده از نخ مخصوص Thread silk (ساخت کشور ژاپن)، دقیقاً در انتهای دیستال جهت اطمینان از ایجاد اختلال در تمام فیبرها گره زده شد. همچنین، جهت اجتناب از آسیب به عصب چهارم کمری، دقت بالایی مبذول شد. تنها حیواناتی در ادامه آزمایش لحاظ شدند که درد نوروپاتی را در آزمون‌های رفتاری نشان دادند (در هر گروه ۵ سر). در گروه کنترل نیز پوست و عضله در ناحیه بالای ران برش داده شد و پس از نمایان شدن عصب سیاتیک، پوست و عضله بدون دستکاری عصب با نخ بخیه ۰/۴ سیلک بخیه زده شد. به منظور سازگاری جهت آزمایش‌های رفتاری نیز حیوانات پیش از لیگاتوربندی نخاع به مدت ۳ روز و در هر روز ۲ بار در معرض هر یک از آزمون‌های آلوداینیای مکانیکی و هایپرآلژزیای حرارتی قرار گرفتند. بدین صورت که حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه رفتار درد، بدون اجرای واقعی آزمایش، به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در محیط اصلی آزمایش قرار می‌گرفتند. سرانجام، به منظور ثبت اولیه میزان رفتارهای درد، پس از اجرای اولیه آزمون‌ها، عملیات لیگاتوربندی انجام شد [۱۵]. هر هفته پس از لیگاتوربندی، با اجرای مجدد آزمون‌های رفتاری درد و پس از اطمینان یافتن از وقوع درد نوروپاتیک، حیواناتی که پردردی و آلوداینیا را در گروه SNL نشان دادند به عنوان آزمودنی در پژوهش در نظر گرفته شدند. تا پایان ۶

هفته، آزمون‌های رفتاری به منظور تأیید وجود درد نوروپاتی در آزمودنی‌ها هر هفته اجرا گردید.

به منظور اندازه‌گیری آلودینیای مکانیکی، حیوان بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار گرفتند. به منظور سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Ferry (شرکت Stolting ساخت کشور آمریکا) در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۵، ۲۶، ۶۰) جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کمترین وزن شروع شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده گردید. چنانچه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌گردید، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (Paw Withdrawal Threshold; PWT) ثبت شد و آزمون خاتمه یافت. چنانچه حیوان به هیچ یک از تارها، از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته شد. همچنین، هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار شد و میانگین آنها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور گردید [۱۶].

پردردی حرارتی با استفاده از روش Hargreaves و همکاران [۱۷] با کمی تغییر (ضمن استفاده از دستگاه مجهز به تایمر)، مورد سنجش قرار گرفت. به طور خلاصه، با استفاده از دستگاه Radiant Heat Plantar Test (Ugo Bassil, Italy) حیوانات در سه اتاقک از جنس پلکسی گلاس (طول و عرض ۲۲ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر) و بر روی یک صفحه پلکسی گلاس تمیز قرار گرفتند. پس از ۳۰

دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، با جابه‌جایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار گرفت. پس از تابش نور حرارتی توسط دستگاه به کف پای حیوان، تایمر فعال شد و با کشیدن پا، تابش نور قطع و تایمر متوقف گردید و با ثبت PWT میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب‌رسان حرارتی مورد سنجش قرار گرفت. هر پا به طور متناوب و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه، برای سه بار آزمایش و میانگین آنها به عنوان آستانه درد حرارتی ثبت شد. همچنین، جهت جلوگیری از آسیب بافت، نقطه نهایی آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. همچنین، میانگین سه اندازه‌گیری اولیه به عنوان تأخیر پایه در نظر گرفته شد. جهت جلوگیری از آسیب بافت، نقطه برش (Cut off) آزمایش ۴۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در نهایت، پردردی حرارتی به عنوان درصد حداکثر اثر ممکن (Maximum Possible Effect) %MPE با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید: (تأخیر پایه - زمان cut off) / (تأخیر پایه - تأخیر پس از لیگاتوربندی نخاع) × ۱۰۰ = %MPE [۱۸]. همچنین میانگین سه اندازه‌گیری اولیه به عنوان تأخیر پایه در نظر گرفته شد [۱۸].

۴۸ ساعت پس از پایان دوره ۶ هفته، موش‌های صحرایی (۵ سر در هر گروه) توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش و سگمنت‌های نخاعی تشکیل‌دهنده عصب سیاتیک (L4-L6) که در موش‌های صحرایی، میان مهره‌های T10-T12 (۲۰ تا ۲۵ میلی‌متر) قرار گرفته‌اند، با برش در پایین‌ترین بخش ممکن بلافاصله استخراج شد. تمامی نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شدند.

استفاده در Real time PCR شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش  $2^{-CT}$  محاسبه شد [۱۸].

داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مفروضه‌های استفاده از آمار پارامتریک شامل طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها و تجانس واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) و لوین (Levene) مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از احراز این مفروضه‌ها توسط این دو آزمون ( $p > 0.05$ )، جهت تعیین معنی‌داری تفاوت بین متغیرها از آزمون t مستقل (برای بررسی تغییرات بیان ژن)، تحلیل واریانس دوطرفه با اندازه‌های مکرر (جهت مقایسه آزمون‌های رفتاری در دو گروه در طول دوره مطالعه) استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج تحلیل واریانس دوطرفه با اندازه‌های مکرر نشان داد که ۶ هفته لیگاتوربندی عصب نخاعی (SNL) موجب آلوداینیای مکانیکی ( $p=0.002$ ) (نمودار ۱) و پردردی حرارتی ( $p=0.002$ ) (نمودار ۲) در رت‌های گروه SNL در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. ضمن اینکه هیچ گونه اثر تعاملی (متقابل) نیز مشاهده نشد ( $p=0.060$ ). همچنین آزمون t مستقل نشان داد میزان بیان ژن TrkA ( $p=0.002$ )، TrkB ( $p < 0.001$ ) و TrkC ( $p=0.001$ ) نیز در رت‌های گروه SNL در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود (نمودار ۳).

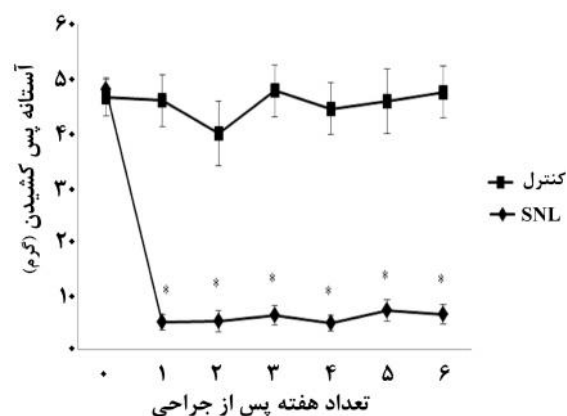
سنجش حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت نخاع جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموزن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه با دستگاه یونیورسال مدل PIT320 ساخت ایران سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دور در دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته شده و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها شد. سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ میکرولیتر آب RNase-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفت (Eppendorf, Germany) و نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmuv Reverse transcriptase انجام گرفت. اندازه‌گیری سطوح بیان mRNA TrkA, TrkB, TrkC با روش کمی Real time PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد (USA Applied Bio systems). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های گیرنده‌های تیروزین کینازی و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی انجام شد. از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد

\* آزمون *t* مستقل، اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ).

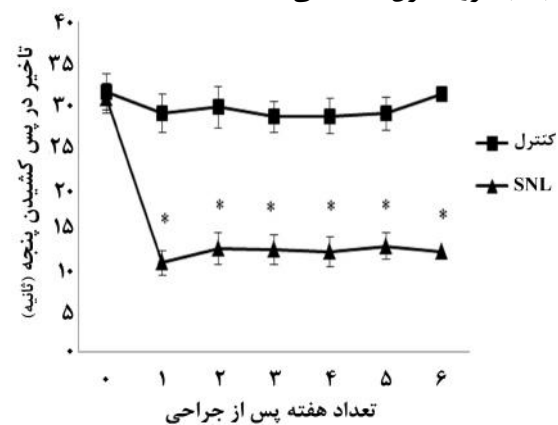
### بحث

در مطالعه حاضر مشاهده شد که ۶ هفته فعالیت کاهش‌یافته به شکل SNL موجب افزایش بیان ژن گیرنده‌های نوروتروفینی Trk در عصب سیاتیک موش‌های صحرایی نر می‌شود. افزایش بیان ژن با درد نوروپاتی به شکل آلوداینیا مکانیکی و پردردی حرارتی همراه بوده است.

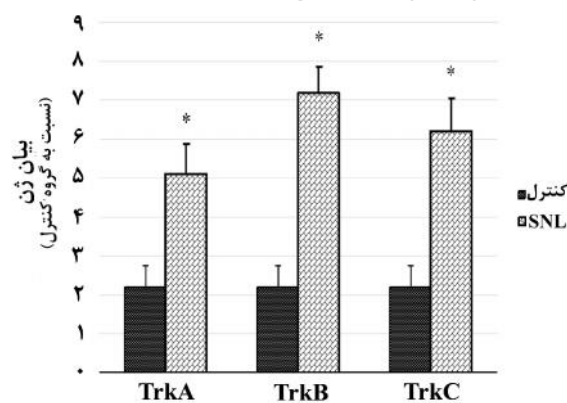
هرچند مطالعه‌ای که به بررسی بیان و میزان پروتئین‌های TrkA، TrkB و TrkC در حالت درد نوروپاتی پرداخته باشد، یافت نشده، با این حال، Yajima و همکاران گزارش کردند که تزریق مکرر آنتی‌بادی ویژه BDNF، قبل و پس از بستن عصب موجب مهار پردردی حرارتی می‌شود [۱۹]. همچنین در مطالعه آن‌ها در اثر بستن عصب، افزایشی در سطوح پروتئینی TrkB ایجاد شد که این افزایش با تزریق آنتی‌بادی ویژه BDNF مهار گردید. علاوه بر آن، تزریق آنتی‌بادی ویژه TrkB و مهارکننده فعالیت تیروزین کینازی گیرنده‌های نوروتروفینی (K-252a)، موجب سرکوب پردردی حرارتی ایجاد شده توسط بستن عصب گردید. در آخر محققان نتیجه گرفتند که اتصال BDNF به TrkB و در نتیجه فعال‌سازی آن نقش مهمی در توسعه درد نوروپاتی که به وسیله آسیب عصبی در موش ایجاد شده بود، بازی می‌کند [۱۹]. Ghilardi و همکاران نیز این پرسش را مطرح کردند که آیا تزریق مهارکننده فعالیت کینازی TrkA، TrkB و TrkC یک ساعت پس از شکستگی اسکلتی موجب کاهش درد می‌شود یا خیر؟ آن‌ها دریافتند که پس از گذشت ۸ ساعت از شکستگی، تزریق مهارکننده موجب کاهش ۵۰



نمودار ۱- مقایسه میزان درد نوروپاتیک به شکل آلوداینیا مکانیکی در دو گروه کنترل و فعالیت کاهش یافته (SNL) \* تحلیل واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر، اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد ( $p = 0.002$ ).



نمودار ۲- مقایسه میزان درد نوروپاتیک به شکل پردردی حرارتی در دو گروه کنترل و فعالیت کاهش یافته (SNL). \* تحلیل واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر، اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد ( $p = 0.002$ ).



نمودار ۳- مقایسه TrkA، TrkB و TrkC در دو گروه کنترل و فعالیت کاهش یافته (SNL).

گیرنده‌های غشایی، کانال‌های یونی و مولکول‌های پیامی تعیین کننده فرآیند درد شده و آنتاگونیست‌ها کردن مسیر پیام‌رسانی آن موجب تعدیل و بهبود درد مزمن می‌شود [۲۴]. از سوی دیگر گزارش شده که ممکن است BDNF درد را به عنوان عامل مرکزی تنظیم کرده و تزریق برون‌زاد آن موجب ارتقای پردازش درد شده [۲۵] و بیان آن در مدل دردهای نوروپاتیک دچار اختلال می‌شود [۲۶].

با این حال، نقش TrkC و اتصال NT-4 با TrkB، در فرآیند درد نورپاتی نامشخص مانده است. در همین راستا نشان داده شده است که تزریق مکرر آنتی بادی NT-4 در مهار پردردی حرارتی که به وسیله لیگاتوربندی عصب نخاعی ایجاد شده، ناتوان بوده است [۱۹]. از سوی دیگر در مطالعات رفتاری نشان داده شده است که تزریق برون‌زاد NT-3 (لیگاند ویژه TrkC و نیز دیگر گیرنده‌های تیروزین کینازی) تغییری در آستانه حرارتی [۲۷] و یا در آلوداینی مکانیکی [۲۷] ایجاد نمی‌کند. با این حال این رویکرد، رهایش ماده P را کاهش داده و تزریق یک واحد دوز بالای سیستمیک آن موجب ایجاد پردردی مکانیکی، ۲۴ ساعت پس از تزریق می‌شود [۲۸]. تزریق داخل نخاعی NT-3 نیز تأثیری بر افزایش حساسیت گرمایی و لامسه‌ای در موش‌های صحرایی دچار SNL نداشته است [۲۹]. در موش‌های صحرایی دچار قطع عصب نخاعی L5، تزریق سیستمیک سرم ضد NT-3 [۳۰] و آنتی‌بادی ضد NT-3 [۳۱] در DRG (Dorsal Root Ganglion) تأثیر کمی بر آلوداینی داشته است. همچنین گزارش شده است که مهار عملکرد NT-3 به طور اساسی موجب کاهش آلوداینی مکانیکی ناشی از SNL می‌شود [۳۲]. در مجموع می‌توان با توجه به گزارشات انجام شده در مورد

درصدی رفتارهای مرتبط با درد می‌گردد [۲۰]. نتایج این گزارشات هم‌سو با نتایج تحقیق حاضر بود که نشان می‌دهد گیرنده‌های نوروتروفینی TrkA، TrkB و TrkC در هدایت و فرآیند درد دخالت دارند.

همچنین مشابه با مطالعه حاضر به نظر می‌رسد در اثر آسیب عصبی، بیان گیرنده‌های نوروتروفینی نیز دچار تغییر می‌شوند؛ به طور مثال، Cui و همکاران میزان پروتئین‌های TrkA، TrkB و TrkC را در سلول‌های عقده‌ای شبکیه در زمان‌های مختلف پس از قطع عصب بینایی اندازه‌گیری کردند و گزارش نمودند که میزان TrkA، TrkB و TrkC در RGCs (Retinal Ganglion Cells) پس از آسیب سریعاً افزایش یافته و پس از سه تا ۵ روز به اوج مقادیر خود می‌رسند [۲۱]. همچنین در طول سه هفته بعد، مقادیر TrkA و TrkB تدریجاً کاهش یافته اما مقادیر TrkC در مقادیر افزایش یافته باقی‌مانده بود در حالی که در عصب شبکیه، میزان TrkA mRNA و به میزان کمتر TrkC mRNA دچار تنظیم کاهشی شده و TrkB mRNA بدون تغییر باقی می‌ماند. همچنین میزان بالاتری از بیان TrkA و TrkB در RGCs و تمام Trk mRNAs در عصب شبکیه در شرایط نوزایشی مشاهده شد [۲۱]. به طور کلی، با توجه به مطالعات انجام شده می‌توان گفت درد نورپاتی و فعالیت کاهش‌یافته ناشی از آن با افزایش بیان گیرنده‌های نوروتروفینی Trk همراه می‌باشد و مهار کردن آن‌ها ممکن است راه درمانی بالقوه‌ای به نظر برسد [۲۲]. هم‌سو با این ادعا مدارک بسیاری وجود دارند که نشان می‌دهند نوروتروفین‌ها مخصوصاً عامل رشد نورونی (NGF) و BDNF فرآیند درد را تنظیم می‌کنند [۲۳]. به طور مثال نشان داده شده است که اتصال NGF به گیرنده خود (TrkA) موجب تنظیم بسیاری از

شکل SNL با بیان ژن افزایش‌یافته TrkA، TrkB و TrkC و علائم تخریب عصب نظیر پردردی حرارتی، آلوداینیای مکانیکی همراه است. با این حال، سازوکارهای دقیق این تأثیر و ارتباط به خوبی مشخص نمی‌باشد. درک این ارتباط و احتمالاً راه‌کارهای مهاری بر این گیرنده‌ها جهت جلوگیری از پیامدهای پاتولوژیک و به ویژه فعالیت بدنی کاهش‌یافته آن موضوعی جالب جهت تحقیقات آینده به نظر می‌رسد.

#### تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر مستخرج از طرح پژوهشی مصوب دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان است که با کمک مالی آن دانشگاه انجام شده است. نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان (عج) به جهت حمایت مالی و آزمایشگاه گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ابراز می‌دارند.

NT-3 و NT-4 این نتیجه‌گیری را انجام داد که هم‌سو با مطالعه حاضر ممکن است TrkC (و نه ترکیب NT-4 با TrkB)، در فرآیند ایجاد درد مزمن از جمله حالت درد نوروپاتی و در نتیجه فعالیت کاهش‌یافته حاصل از آن درگیر باشد.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری بیان ژن نروتروفین‌های مؤثر بر گیرنده‌های تیروزین کینازی بود. لذا پیشنهاد می‌گردد مطالعاتی به منظور اندازه‌گیری هم‌زمان بیان ژن و محتوی پروتئینی نروتروفین‌ها و گیرنده‌های تیروزین کینازی انجام شود. علاوه بر این، به افراد مبتلا به درد نوروپاتیک پیشنهاد می‌گردد پس از تأیید نتایج پژوهش حاضر بر روی انسان، در تمرینات ورزشی و فعالیت‌های بدنی به منظور بهبود وضعیت بیماری شرکت کنند.

#### نتیجه‌گیری

به طور کلی به نظر می‌رسد که فعالیت کاهش‌یافته به

## References

- [1] Perruchoud C, Buchser E, Johaneck LM, Aminian K, Paraschiv Ionescu A, Taylor RS. Assessment of Physical Activity of Patients With Chronic Pain. *Neuromodulation* 2014; 17(1): 42-7.
- [2] Bize R, Johnson JA, Plotnikoff RC. Physical activity level and health-related quality of life in the general adult population: a systematic review. *Prev Med* 2007; 45(6): 401-15.
- [3] Organization WH. Steps to health: a European framework to promote physical activity for health. Copenhagen, Denmark . *WHO Regional Office for Europe* 2007.

- [4] van den Berg-Emons RJ, Schasfoort FC, de Vos LA, Bussmann JB, Stam HJ. Impact of chronic pain on everyday physical activity. *Eur J Pain* 2007; 11(5): 587-93.
- [5] Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 2006; 174(6): 801-9.
- [6] Sawynok J. Topical Analgesics for Neuropathic Pain in the Elderly: Current and Future Prospects. *Drugs & aging* 2014; 31(12): 853-62.
- [7] Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29(1): 507-38.
- [8] Spedding M, Gressens P. Neurotrophins and cytokines in neuronal plasticity, Growth factors and psychiatric disorders. *Novartis Foundation Symposium* 2007; 289(1): 222-37.
- [9] Gomez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Neurogenesis and Neural Plasticity: Springer* 2013; 15(1): 117-36.
- [10] Russo SJ, Mazei-Robison MS, Ables JL, Nestler EJ. Neurotrophic Factors and Structural Plasticity in Addiction. *Neuropharmacology* 2009; 56(1): 73-82.
- [11] Hennigan A, O'callaghan R, Kelly A. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(2): 424-7.
- [12] Lee FS, Chao MV. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(6): 3555-60.
- [13] Kalb R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci* 2005; 28(1): 5-11.
- [14] Capsoni S, Tiveron C, Vignone D, Amato G, Cattaneo A. Dissecting the involvement of tropomyosin-related kinase A and p75 neurotrophin receptor signaling in NGF deficit-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(27): 299-304.
- [15] Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50(3): 35-63.
- [16] Calcutt NA, Jorge MC, Yaksh TL, Chaplan SR. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 1996; 68(2-3): 293-309.
- [17] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32(1): 77-88.

- [18] Rahmati M, Gharakhanlou R, Movahedin M, Mowla SJ, Khazeni A, Mazaheri Z. Effects of Endurance Training on mRNA levels of the KIF1B Motor Protein in Sensory areas of the Spinal Cord of Rats with Diabetic Neuropathy. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*. 2013; 16(2): 25-38.
- [19] Yajima Y, Narita M, Narita M, Matsumoto N, Suzuki T. Involvement of a spinal brain-derived neurotrophic factor/full-length TrkB pathway in the development of nerve injury-induced thermal hyperalgesia in mice. *Brain Res* 2002; 958(2): 338-46.
- [20] Ghilardi JR, Freeman KT, Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Bouhana KS, et al. Sustained blockade of neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC reduces non-malignant skeletal pain but not the maintenance of sensory and sympathetic nerve fibers. *Bone* 2011; 48(2): 389-98.
- [21] Cui Q, Tang LS, Hu B, So K-F, Yip HK. Expression of trkA, trkB, and trkC in injured and regenerating retinal ganglion cells of adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(6): 1954-64.
- [22] Abdel-Magid AF. Inhibitors of Tropomyosin-Receptor Kinases (Trk's): Potential Pain Therapy and More. *ACS Med Chem Lett* 2013; 5(1): 8-9.
- [23] Ru-Ping Dai, Xin-Fu Zhou. Neurotrophins and Pain. *Handbook of Neurotoxicity*. New York: Springer. 2014: 1805-23.
- [24] Hefti FF, Rosenthal A, Walicke PA, Wyatt S, Vergara G, Shelton DL, et al. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27(2): 85-91.
- [25] Marcol W, Kotulska K, Larysz-Brysz M, Kowalik JL. BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection. *Neurosurg Rev* 2007; 30(3): 235-43.
- [26] Ha SO, Kim JK, Hong HS, Kim DS, Cho HJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. *Neuroscience* 2001; 107(2): 301-9.
- [27] Malcangio M, Ramer MS, Boucher TJ, McMahon SB. Intrathecally injected neurotrophins and the release of substance P from the rat isolated spinal cord. *Eur J Neurosci* 2000; 12(1): 139-44.
- [28] Malcangio M, Garrett NE, Cruwys S, Tomlinson DR. Nerve growth factor-and neurotrophin-3-induced changes in nociceptive threshold and the release of substance P from the rat isolated spinal cord. *J Neurosci* 1997; 17(21): 8459-67.

- [29] Boucher TJ, Okuse K, Bennett DL, Munson JB, Wood JN, McMahon SB. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science* 2000; 290(5489): 124-7.
- [30] Deng Y-S, Zhong J-H, Zhou X-F. Effects of endogenous neurotrophins on sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia and allodynia following spinal nerve injury. *Exp Neurol* 2000; 164(2): 344-50.
- [31] Zhou XF, Deng YS, Xian C, Zhong JH. Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* 2000; 12(1): 100-5.
- [32] White DM. Neurotrophin-3 antisense oligonucleotide attenuates nerve injury-induced A -fibre sprouting. *Brain Res* 2000; 885(1): 79-86..

## The Effect of the Decreased activity by Spinal Nerve Ligation on Tyrosine kinase Neurotrophin Receptors Gene Expression in Sciatic Nerve Fiber of Male Rats with Neuropathic Pain

**A.R. Kazemi<sup>1</sup>**

Received: 10/05/2015

Sent for Revision: 07/07/2015

Received Revised Manuscript: 24/01/2016

Accepted: 26/02/2016

**Background and Objectives:** Neuropathy is a state that results from nervous system disease or injury and exposes patients to the various functional complications such as decreased physical activity and its complication such as muscular and cardiovascular diseases. The purpose of the present study was determining the chronic effect of decreased activity by spinal nerve ligation (SNL) on Trk neurotrophin receptors gene expression in sciatic nerve fiber of male rats.

**Materials and Methods:** The present study was an experimental research in which ten neuropathic adult male wistar rats in the weight range of  $250 \pm 20$  were randomly divided into two groups including control and SNL. Over six weeks, neuropathic pain behavior tests conducted continually in the two groups. At the end of the sixth week, changes of TrkA, TrkC and TrkB gene expressions in sciatic nerve were measured with Real time PCR technique. The changes in gene expressions were measured with  $2^{-CT}$  and were analyzed using independent t-test in the two groups. In order to compare the results of the behavioral tests in the two groups, two-way repeated measures ANOVA was performed.

**Results:** The behavioral tests demonstrated that decreased activity in the SNL group induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia as well as decreased pain threshold ( $p < 0.05$ ). In addition, compared with the control group, tyrosine kinase receptors gene expression in sciatic nerve fiber was higher in SNL group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results revealed that decreased activity in the form of SNL was associated with the increased TrkA, TrkB and TrkC gene expressions. Also, it seemed that these neurotrophin receptors changed by neural injury. Although, the precise mechanisms were not well understood.

**Key words:** Rats, Neuropathic pain, Trk receptors, Decreased physical activity

**Funding:** This research was funded by Vali-e-Asr University of Rafsanjan.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Tarbiat Modares University approved the study.

**How to cite this article:** Kazemi Ar. The Effect of Decreased Activity by Spinal Nerve Ligation on Tyrosine Kinase Neurotrophin Receptors Gene Expression in Sciatic Nerve Fiber of Male Rats with Neuropathic Pain. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2016; 15(2): 51-62. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Physical Education, Faculty of Literature & Humanities, Vali e Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran  
(Corresponding Author) Tel: (034) 31312336, Fax: (034) 31312336, Email: a.kazemi@vru.ac.ir