



## Ağrının İletilmesinde N-Metil D- Aspartat Reseptörlerinin Rolü

### The Role of N-Methyl D-Aspartate Receptors on Pain Transmission

Yasemin Güneş<sup>1</sup>, Tufan Mert<sup>2</sup>, Dilek Özcengiz<sup>1</sup>, İsmail Günay<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon, Biyofizik Anabilim Dalları, ADANA

<sup>3</sup> Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, KAHRAMANMARAŞ

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (Journal of Cukurova University Faculty of Medicine) 2012; 37(1):9-16*

#### ABSTRACT

**Aim :** In the experimental studies, NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors play important role in the mechanism of action among the drugs used for the treatment of pain. The NMDA receptors in the dorsal horn of spinal cord is essential for central sensitization and the central facilitation of pain transmission produced by peripheral injury. The aim of this study was to evaluate the contributions of peripheral NMDA receptor agonist and antagonists in peripheral pain transmission.

**Material-Method :** In the present study, N methyl aspartic acid (NMDA) and antagonist ( MK-801) were administered intraplantarly to investigate withdrawal effects, the dose and time dependent latency using thermal plantar test method in rats.

**Results :** MK-801 caused dose-dependent thermal anti-nociceptive effects, whereas NMDA led to reduction in the thermal nociceptive latency and hyperalgesia.

**Conclusion :** Peripheral NMDA receptors may play a dominant role in the transmission of pain information.

**Key Words:** NMDA, MK-801, intraplantar, hyperalgesia, antinociception

#### ÖZET

**Amaç :** Yapılan deneysel çalışmalar, NMDA (N-methyl-D-aspartate) reseptörlerinin ağrı tedavilerine yönelik kullanılan ilaçların etki mekanizmalarında en önemli etken mekanizmalardan biri olabileceğini gösterilmiştir. Spinal kord dorsal boynuzda yer alan NMDA reseptörleri santral sensitizasyon için esastır, periferik yaralanmada santral sensitizasyon ağrının iletilmesinde rol oynar. Bu çalışmada NMDA reseptör agonisti ve antagonisti kullanarak periferik NMDA reseptörlerinin ağrı bilgisinin iletilmesindeki katkılarına yönelik yeni bilgilere ulaşmak amaçlandı.

**Gereç-Yöntem :** Çalışmada, sıçanlara intraplantar olarak uygulanan N metil aspartik asit (NMDA) ve antagonisti olan MK-801'nin doz ve zamana bağlı olarak sıçanların geri çekme latansına etkileri termal plantar test yöntemi kullanılarak araştırıldı.

**Bulgular :** MK-801 doza bağlı olarak termal anti-nosiseptif etkiler oluştururken, NMDA termal latensta azalma meydana getirerek hiperaljezinin ortaya çıkmasına neden oldu.

**Sonuç :** Periferik NMDA reseptörlerinin ağrı bilgisinin iletilmesinde dominant bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** NMDA, MK-801, İntraplantar, Hiperaljezi, Antinosisepsiyon

## GİRİŞ

Klinik çalışmalar ve deneysel modellerde deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, NMDA (N-methyl-D-aspartate) reseptörlerinin hiperaljezinin ortaya çıkmasında çok önemli görevler aldığı belirlenmiş ve ilaveten ağrıda tedaviye yönelik ilaçların, özellikle opioidlerin, analjezik etki mekanizmalarında en önemli etken mekanizmalardan biri olduğu gösterilmiştir<sup>1,2</sup>.

Yapılan çalışmalarda NMDA reseptörlerinin blokajının hem opioidlerin antinoseptif etkinliğini artırdığı hem de opioid hiperaljezinin ortaya çıkmasını engellediği gösterilmiştir. Ketamin, magnezyum spesifik olmamakla beraber NMDA reseptör blokörü olarak kullanılmaktadır. Fentanilin geç etkisi olan termal hiperaljezinin magnezyum tarafından engellenmesi NMDA reseptörlerinin hiperaljezide rol alabileceğini göstermektedir<sup>3</sup>.

Planlanan bu projede amaç özgül NMDA reseptör agonisti olan NMDA ve antagonisti olan MK-801 (10,20, 50uM) kullanılarak periferik NMDA reseptörlerinin ağrı bilgisinin iletilmesindeki katkılarını ortaya koymak ve etki mekanizmalarına yönelik bilgilere ulaşmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bütün deneyler için yetişkin dişi Wistar sıçanlar (230-270 g'lık, her kafeste dörder adet olmak üzere su ve yiyecek kısıtlaması olmaksızın, 22-24 °C oda sıcaklığında ve 12:12 aydınlık-karanlık döngüde tutularak yetiştirilmiş) kullanıldı. Dişi sıçanlar, erkek sıçanlara nazaran daha az agresif, daha az hareketli olmaları nedeniyle tercih edildi.

Çalışmalar, AISP (International Association for the Study of Pain) ve Çukurova Üniversitesi Hayvan Kullanımı ve Bakımı Komitesi tarafından deklare edilen kurallara uygun olarak yürütüldü.

Bütün deneyler 22-24 °C oda sıcaklığında, sessiz ortamda gerçekleştirildi. Deneye başlanmasından 5 gün önce, deneyin yapıldığı ortama getirilerek sıçanların ortama oryantasyonu sağlandı. Aynı şekilde, deney düzeneklerine alışmalarını

sağlamak için, sıçanlar deney yapılmadan önce üç defa en az 30 dakika test cihazlarında herhangi bir uygulama yapılmadan (Şekil.1) bekletildi.

İlaç uygulamaları sıçanların arka pençelerinden intraplantar olarak yapıldı. Aynı sıçanın hiçbir uygulama yapılmayan sağ pençelerinden alınacak test verileri, lokal ilaç uygulamalarının sistemik bir etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi için kullanıldı<sup>1</sup>.

### Nosiseptif değişikliklerin değerlendirilmesi

Termal plantar test kullanılarak yapılan çalışmalarda, deride herhangi bir hasar oluşturmadan ağrı hissi oluşturan, sıçanların arka pençelerine uygulanacak termal bir uyarı sonrasında hayvanın vereceği bir refleks yanıt, pençesini uyarandan geri çekme süresi ölçüldü. Bu testler kullanılarak daha önce yapılan pek çok çalışmada elde edilen bulgular, ilaçların insanlarda antinoseptif aktivitesini değerlendirmek için oldukça etkili ve anlamlı olabileceğini göstermektedir.

### Termal Plantar Test

Termal plantar testte, radyan ısı kaynağından sıçanın pençesini geri çekme latansı ölçülerek değerlendirmeler yapılır (Plantar Test). Bu test yönteminde, herhangi bir kısıtlama olmadan serbestçe hareket edebilen sıçanların arka pençelerine uygulanacak, deride herhangi bir hasar oluşturmadan ağrı hissi oluşturan, termal bir uyarı sonrasında hayvanın vereceği bir refleks yanıt olan pençesini uyarandan geri çekme süresi ölçülmektedir.

Termal hiperaljezinin varlığı, 25°C ye ayarlanmış ve sabitlenmiş pürüzsüz cam zemin üzerine plastik bölmeler (10x20x24 cm) konularak oluşturulmuş termal uyarı sisteminde, hayvanın ayağını geri çekme latansı ölçülerek belirlendi.

Cam tabakanın altında bulunan hareketli tutucudaki radyan ısı kaynağı (8 V- 50 W halojen ampul), hayvanın arka pençesinin plantar bölgesinin orta kısmına termal uyarıyı vermek üzere yerleştirildi. Sıçan ağrıyı hissedip ayağını

çektğinde, bir fotosel yansıyan ışık demetindeki kesintiyi dedekte ederek infrared radyasyon (IR) jeneratörünün otomatik olarak kapanmasını ve zaman sayacın durdurarak gecikme zamanının (latans) belirlenmesini sağlamakta olup, bu

yöntemde, gecikme zamanı 0,1 s duyarlık ölçülebilmektedir. Hayvana fazla acı çektirmemek için eğer hayvan ayağını 20 s'de (cut-off latansı, CL) çekmemişse ısı kaynağı otomatik olarak duracak şekilde ayarlandı.



**Şekil 1.** Plantar test sistemi. Sistem gövde, zaman ölçme aleti ve ısıtıcıdan oluşmaktadır. Gövde, sıçanların konduğu cam tabaka ve bunun altında bir kolla istenen konuma hareket ettirelebilen termal radyan kaynağından oluşur. Zaman ölçme sistemi radyant enerjinin uygulanmaya başlaması ve sıçanın pençesini çekmesi arasındaki süreyi ölçer. Isıtıcı sıçanların bulunduğu cam plakanın ayarlanan sıcaklıkta kalmasını sağlar.

### **İntraplantar uygulamalar ve deney prosedürü**

Deneylerde kullanılan test ajanları serum fizyolojik içerisinde hazırlanacak, gerektiğinde NaOH/HCl kullanılarak pH ları 7,2-7,4 olacak şekilde ayarlandı. Subkutanöz intraplantar enjeksiyonda sıçanların arka pençelerine araştırılacak test bileşiği (100 µl) sıçanlara herhangi bir anestezi yapılmadan verildi. Kontrol çalışmalarında ise test ajanı yerine eşit miktarda serum fizyolojik enjekte edildi.

Deneylerde sıçanlarda uygulamanın yapılmadığı sağ pençeden alınacak kayıtlar sol tarafa uygulanacak ajanların sistemik bir etkisinin olup olmadığını değerlendirmek için kullanıldı. İlaç uygulama öncesinde alınacak veriler ilaç etkinliğini belirlemek amacıyla kontrol verileri olarak değerlendirildi. Ayrıca, ilaçlarla aynı miktarda (100

µl) uygulanacak olan serum fizyolojik enjeksiyonu sonrasında alınan veriler plasebo ilaç uygulamanın etkisini değerlendirmek ve uygulanan ilacın hacimden bağımsız etkinliğini değerlendirmek için kullanıldı.

Çalışmalarda, spesifik NMDA reseptör agonisti olan NMDA( 0,2,05,1 mM) ve antagonist MK-801 (10,20, 50µM) kullanıldı. Her bir doz çalışması 10 (n) sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

### **İstatistiksel Analiz**

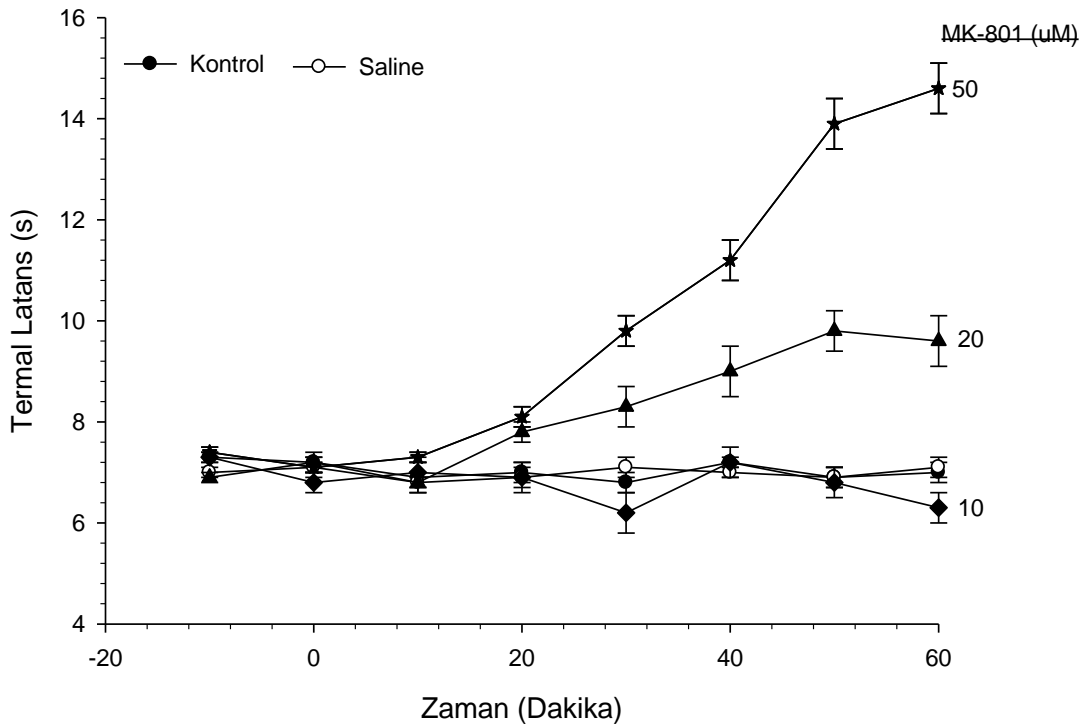
Deneyler sonrasında elde edilecek veriler ortalama ±standart ortalama hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirmeler repeated measures of ANOVA ve post-hoc testleri kullanılarak yapıldı.

## BULGULAR

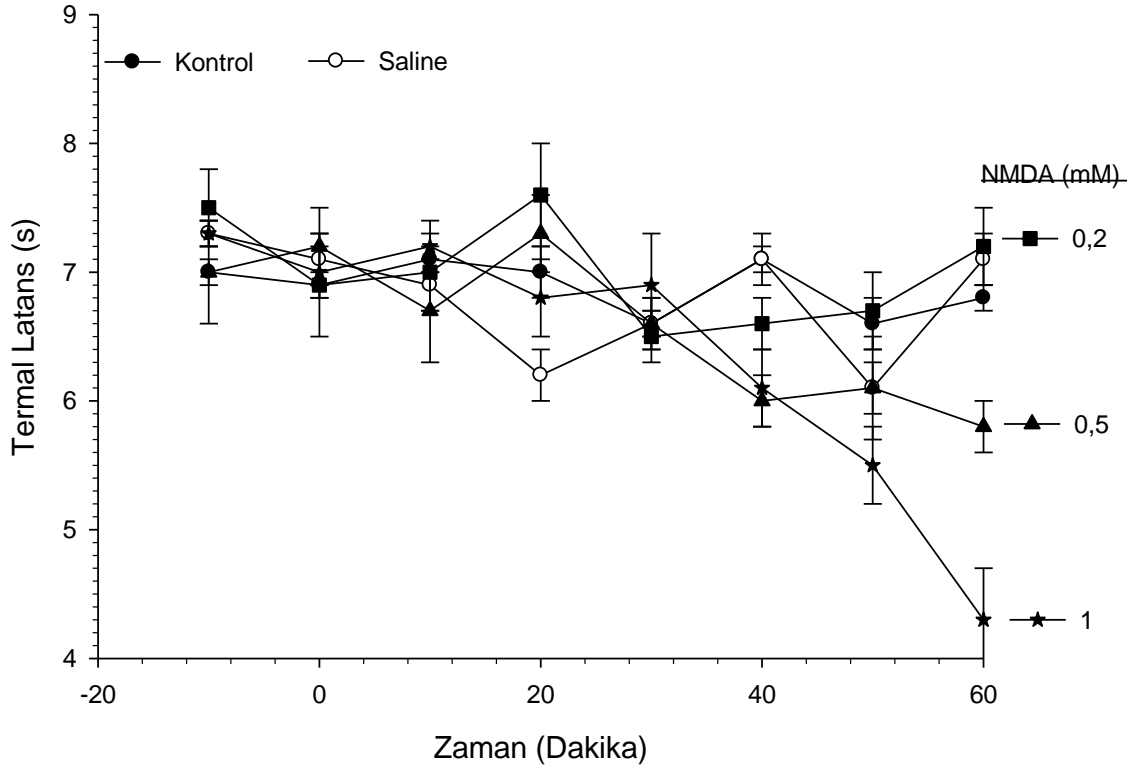
Termal plantar test uygulanan sıçanlardan alınan 60 dakikalık test sonuçları herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hayvanlarında ve ilaçlarla aynı hacimde (100 µl) intraplantar olarak

salin uygulanmış hayvanlarda termal latans değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 2).

Spesifik NMDA reseptör antagonisti olan MK-801 doza bağlı olarak termal anti-nosiseptif etkinin olduğu gözlemlendi. Özellikle 50 µM dozda termal latansı yaklaşık 2 katına kadar uzattı (Şekil 2).



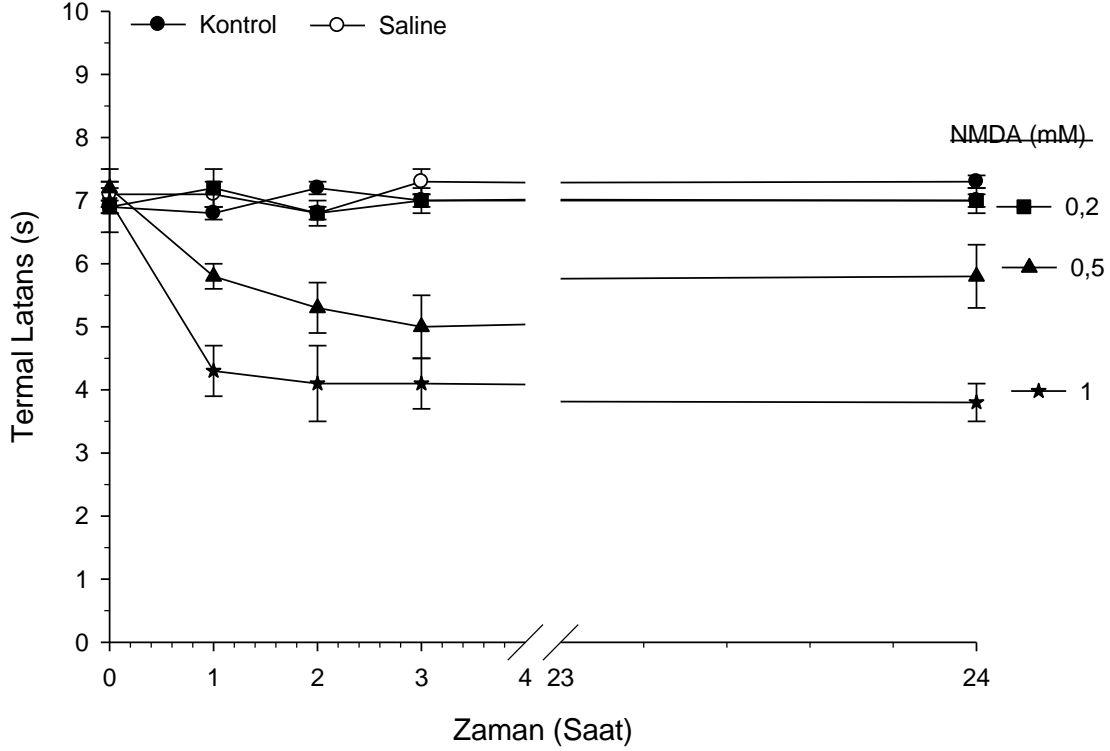
Şekil 2. NMDA reseptör antagonisti MK-801'in doza bağlı olarak termal latansa etkisi.



**Şekil 3.** NMDA reseptörleri için spesifik bir agonist olan N-metil aspartik asitin (NMDA) intraplantar uygulamanın ardından 60 dakika süresince termal latansa etkisi.

NMDA reseptörleri için spesifik bir agonist olan N-metil aspartik asit (NMDA) ancak 1 mM lık doz değerinde termal latansta anlamlı değişimlere neden oldu. Bu dozda 60 dakikanın sonrasında termal latansta anlamlı seviyede azalma meydana geldi. Bu azalma NMDA ya bağlı olarak gelişen hiperaljezinin göstergesi olarak kabul edildi (Şekil 3).

İntraplantar NMDA uygulamasının ardından sıçanlardan 1, 2, 3 ve 24 saat sonra alınan termal plantar test sonuçları Şekil 4'te gösterildi. 0,5 mM ve 1 mM NMDA hiperaljezik durumun ortaya çıkmasına neden oldu. Özellikle 1 mM dozunda başlangıç termal latans değeri yaklaşık yarı yarıya azaldı (Şekil 4).



Şekil 4. N-metil aspartik asit (NMDA) in intraplantar uygulanması sonrası 1, 2, 3, ve 24 saat sonra alınan termal latans değerleri.

## TARTIŞMA

Ağrı bilgisinin iletilmesinde başlangıç noktası olan primer afferent nosiseptörler mekanik, termal veya kimyasal uyarılara yanıt veren sinir uçlarıdır. Bilginin iletiminden sorumlu duysal nöronlar, zararlı ve zararlı olmayan uyarılara hassas olmalarına, ileti hızlarına, kalınlıklarına ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılabilirler. Aβ lifleri; miyelinli, kalın, hızlı iletimli liflerdir. Normal olarak zararlı olmayan uyarıyı iletirler ve düşük eşikli mekanik uyarılara hassastırlar. Aδ lifleri; ince miyelinli, orta kalınlıkta ve orta ileti hızındadırlar, hem zararlı hem zararlı olmayan uyarıyı iletirler. Mekanik ve termal uyarılara hassas olan bu lifler ani keskin ağrıdan sorumludurlar. C lifleri; miyelinsiz, ince, yavaş iletimli liflerdir. Zararlı uyarıları iletirler, hem mekanotermik hem de

kimyasal uyarıya hassastırlar (polimodal nosiseptörler) ve yanıcı ağrıdan sorumludurlar<sup>4-6</sup>.

Çalışmamızda spesifik NMDA reseptör agonisti olan NMDA ve antagonisti olan MK-801 kullanıldı. NMDA reseptörleri korteks, bazal ganglion ve nervöz sistemin duysal yollarında bulunmasının yanı sıra non-nöral yapılarda ve periferik lokasyonlarda yer almaktadır<sup>7</sup>. Çalışmamızda intraplantar agonist NMDA uygulaması bu reseptörlerin harekete geçmesine ve ağırlı bir uyarının daha ağırlı olarak algılanmasına (hiperaljezi) neden olmuştur. Agonist NMDA'nın hiperaljezik etkisi doza bağlı olarak (1 mM'lık doz değerinde termal latansta anlamlı seviyede azalma) hem erken dönemde (ilk 1 saat) hem de geç dönemde (2-24 saat) ortaya çıkmaktadır. Bilindiği gibi NMDA reseptörü kalsiyuma sodyumdan daha geçiren olan bir

proteindir. Hücre içine giren kalsiyum bir ikinci haberci olarak birçok kimyasal süreçte rol almaktadır.

NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücrede bir takım yeni olaylara yol açmaktadır. NMDA reseptör kanalı dinlenme halinde magnezyum tıkaçı ile bloke edilmektedir. NMDA reseptörünün harekete geçmesi; nörokinin reseptörlerinin hareketine ve magnezyum tıkaçının oradan kalkarak hücre içerisine kalsiyum girmesine ve onkojen indüksiyonu, nitrik oksit (NO) oluşumu ve sekonder mesajcıların, fosfolipaz, polifosfoinosit, cGMP, ekosanoidler ve proteinkinaz C gibi maddelerin aktivasyonuna yol açmaktadır<sup>8-12</sup>.

MK-801 potent nonkompetitif NMDA antagonistidir. MK 801, reseptörün iyon kanallarına bağlanır, böylece iyon akışını engeller (Ca<sup>+2</sup>). Serebral iskemi oluşturulan hayvan modellerinde ve doku kültürlerinde iskeminin eksitotoksik sekellerini bloke etmekte, infarkt alanını azalmakta ve nörolojik sonuçlarda düzelme sağlamaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda da NMDA reseptörlerinin tedaviye yönelik ilaçların, özellikle opioidlerin, analjezik etki mekanizmalarında en önemli etken mekanizmalardan olduğu gösterilmiştir ve NMDA reseptörlerinin blokajının hem opioidlerin anti-nosiseptif etkinliğini artırdığı hem de opioid hiperaljezinin ortaya çıkmasını engellediği gösterilmiştir (12.,13). Kronik opioid tedavisi uygulaması hastalarda opioidlere karşı toleransa ve/veya hiperaljeziye neden olabilmektedir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada tek doz uygulananan MK-801'in spinal koddaki proinflamuar sitokin artışını azaltarak nöronların re-sensitizasyonu ile morfinin antinosiseptif etkisinin olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda uyguladığımız intarplantar antagonist MK-801, doza bağlı olarak anti-nosiseptif etkinin meydana gelmesine neden olmuştur. Özellikle 50 µM dozda termal latansı yaklaşık 2 katına kadar uzattığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; periferel NMDA reseptörleri ağrı bilgisinin iletilmesinde dominant bir rol

oynamaktadır ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinde en önemli hedeflerden biri olabilir.

**Teşekkür:** Projeye verdiği destekten dolayı Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonuna teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Lee M, Silverman SM, Hansen H, Patel VB, Manchikanti L. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician*. 2011;14:145-61.
2. Mitra S. Opioid-induced hyperalgesia: pathophysiology and clinical implications. *J Opioid Manag*. 2008; 4:123-30.
3. Mert T, Gunes Y, Ozcengiz D, Gunay I. Magnesium modifies fentanyl-induced local antinociception and hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009; 380:415-20.
4. Martin, T.J., Eisenach, J.C., Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 299: 811-817.
5. Sawynok J., Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55: 1-20.
6. Hargreaves, K., Dubner, R., Broun, F., Flores, C., Joris, J.,. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1998;32: 77-8.
7. Angst MS, Clark J D Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology*. 2006;104: 570-87.
8. Galbraith, J.A., Mrosko, B.J., Myers, R.R.,. A system to measure thermal nociception. *J. Neurosci. Methods*. 1993; 49: 63-8.
9. Janson W, Stein C Peripheral opioid analgesia. *Curr Pharm Biotechnol*. 2003; 4:270-4.
10. Mao J Opioid-induced abnormal pain sensitivity: Implications in clinical opioid therapy. *Pain*. 2002; 100:213-7.
11. Mert T, Gunes Y, Gunay I., Local analgesic efficacy of tramadol following intraplantar injection. *European Journal of Pharmacology*. 2007, 558, 68-72.
12. Simonnet G, Rivat C Opioid-induced hyperalgesia: Abnormal or normal pain? *NeuroReport*. 2003; 14:1-6.
13. Van Elstraete AC, Sitbon P, Mazoit JX, Conti M, Benhamou D Protective effect of prior administration of magnesium on delayed hyperalgesia induced by fentanyl in rats. *Can J Anesth*. 2006; 53:1180-85.

**Yazışma Adresi /Address for Correspondence:**

Dr. Yasemin GÜNEŞ

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı

01330 Balcalı-ADANA

Tel-faks : 0 322 3386742

E mail :ygunes@cu.edu.tr

geliş tarihi/received :09.04.2012

kabul tarihi/accepted:11.04.2012