

## ارزیابی روش جدید ایجاد نوریت و مقایسه علایم آن با روش معمول گره زدن حول عصب سیاتیک در موش صحرایی نر بالغ

علی قنبری<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، فاطمه شاهسون<sup>۲</sup> (M.D Student)، حسینعلی صفاخواه<sup>۳</sup> (M.Sc)

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۷

ghanbari@semums.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۷۳۱۳۹۷۰

### چکیده

هدف: مدل‌های حیوانی متعددی برای مطالعه درد نوروپاتییک معرفی شده است که معمول‌ترین آن‌ها روش گره‌زدن روی عصب است. هدف از این مطالعه بررسی درد نوروپاتییک به دنبال پیچیدن نخ کرومیک به دور عصب سیاتیک بدون گره‌زدن آن به عنوان یک مدل بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۱۸۰-۲۲۰ گرم، در ۳ گروه (شم، گره روی عصب، پیچاندن نخ حول عصب) استفاده گردید. جهت ایجاد ضایعه فشاری مزمن (CCI) با استفاده از نخ کرومیک چهار گره قابل حرکت به فاصله یک میلی‌متر بر روی عصب ایجاد نمودیم. در گروه پیچاندن نخ حول عصب، نخ کرومیک را چهار دور بدون گره زدن حول عصب پیچانده و در گروه شم پس از رؤیت عصب، پوست و عضلات دوخته شد. آلودینیای مکانیکی و هایپرآلژی حرارتی به ترتیب توسط فیلامان‌های وون فری و دستگاه پلانتر هر ۴ روز یک‌بار به مدت ۳ هفته آزمایش شد.

یافته‌ها: گره بر روی عصب به‌طور معناداری موجب آلودینیای مکانیکی ( $P < 0/01$ ) و هایپرآلژی حرارتی ( $P < 0/001$ ) نسبت به گروه شم گردید. هم‌چنین در گروهی که نخ کرومیک بدون گره زدن به دور عصب پیچیده شده بود، هایپرآلژی حرارتی به‌طور معناداری ( $P < 0/001$ ) رخ داد و آلودینیای مکانیکی ( $P < 0/05$ ) به‌طور گذرا اتفاق افتاد. آلودینیای مکانیکی در گروه CCI به‌طور معنی‌داری شدیدتر از گروه نخ حول عصب بود ( $P < 0/01$ ) در حالی‌که از نظر هایپرآلژی حرارتی تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد. آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات به‌کار برده شد. نتیجه‌گیری: پیچیدن نخ حول عصب بدون گره‌زدن و ایجاد فشار موجب هایپرآلژی حرارتی مشابه روش معمول گره‌زدن می‌گردد اما آلودینیای مکانیکی ضعیف‌تر و گذرا ایجاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: درد نورپاتییک، آلودینیای مکانیکی، هایپرآلژی حرارتی

### مقدمه

کلسیمی، فعال شدن فیبرهای ضایعه ندیده مجاور، ایجاد کلافه‌های نورونی در انتهای عصب قطع شده، استرس اکسیداتیو، فعال شدن سیستم ایمنی و تحریک مداوم نورون‌های آسیب‌دیده با عوامل التهابی و بیان گیرنده‌های مرتبط با درد در نواحی آسیب‌دیده عصبی و نواحی نخاعی و فوق نخاعی در بروز درد نوروپاتییک طولانی‌مدت نقش دارند [۶-۸]. به علت عدم امکان انجام تحقیق بر روی انسان، اکثر نتایج به‌دست آمده در خصوص مکانیسم‌های درد نوروپاتییک حاصل مطالعات حیوانی می‌باشد. عمده اطلاعات حاصل شده در این زمینه با دخالت بر روی اعصاب محیطی و خصوصاً عصب سیاتیک انجام شده است [۹، ۱۰]. روش‌های متعددی برای بررسی درد نوروپاتییک و

درد نوروپاتییک یک نوع درد مزمن است که ناشی از ضایعه عصبی محیطی یا مرکزی بوده و علی‌رغم مطالعات گسترده‌ای که تاکنون انجام شده هنوز به عنوان یک چالش درمانی پیش روی دست‌اندرکاران درمانی قرار دارد. دلایل متعددی در بروز درد نوروپاتییک وجود دارد که از آن جمله می‌توان به ضایعات تروماتیک به اعصاب محیطی یا مرکزی، بیماری‌های درگیرکننده اعصاب محیطی مانند دیابت، بیماری‌های درگیرکننده اعصاب مرکزی مانند مولتیپل اسکلروز و سکنه مغزی، وجود تومورهای درگیرکننده اعصاب مرکزی یا محیطی اشاره نمود [۱-۵]. مکانیسم‌های مختلفی مانند افزایش بیان کانال‌های سدیمی یا

شرایط ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب، با درجه حرارت ثابت ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

#### داروهای مورد استفاده

کنتامین هیدروکلراید و زایلازین جهت ایجاد بی‌هوشی مورد استفاده قرار گرفت.

گروه اول: گروه کنترل شم است که برش پوست و عضلات تا رویت عصب سیاتیک انجام شده و سپس بدون هر گونه دخالتی بر روی عصب، پوست بخیه می‌شد. سن و وزن این گروه در زمان انجام این آزمایشات معادل گروه‌های نورپاتی بود.

گروه دوم: در گروه CSS (حیوانات را با پیچیدن نخ کرومیک حول عصب سیاتیک دچار نوریت کرده) پس از جراحی، هر چهار روز یک‌بار به مدت سه هفته حیوان از نظر وجود درد نورپاتی و سیر زمانی درد مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. (جهت تسهیل در خواندن، این گروه به اختصار به صورت CSS=Chronic Spiral Suturing بیان خواهد شد).

گروه سوم: در این گروه CCI ایجاد کرده و هر چهار روز یک‌بار به مدت سه هفته حیوان از نظر وجود درد نورپاتی و سیر زمانی درد مورد ارزیابی قرار می‌گرفت.

#### روش ایجاد نورپاتی

جراحی با ایجاد گره بر روی عصب (CCI) طبق روشی که Bennett and Xie در سال ۱۹۸۸ توصیف کردند انجام شد [۱۱]. ابتدا موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی مخلوط کنتامین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. بعد از اطمینان از عمیق بودن بی‌هوشی موهای بالا و پشت ران حیوان را کاملاً تراشیده و با استفاده از تیغ جراحی شکافی به طول ۲ سانتی‌متر بر روی ران پای چپ ایجاد کرده و پس از بریدن عضلات ناحیه، و رویت قسمت مشترک سه شاخه عصب سیاتیک، با استفاده از ۲ لوله موئینه کوچک شیشه‌ای بافت‌های اطراف عصب را جدا کرده و به وسیله نخ بخیه کاتگوت کرومیک ۴/۰، چهار گره شل به فواصل یک میلی‌متر قبل از محل سه شاخه شدن عصب زده شد. گره‌ها به شکلی ایجاد گردید که اختلالی در جریان خون عصب به وجود نیابد. سپس با استفاده از نخ بخیه سیلک ۴/۰ عضله و پوست به صورت جداگانه دوخته شد.

برای گروه مربوط به پیچیدن نخ حول عصب، جهت تعدیل روش فوق که فشار مکانیکی به عصب وارد نشود، تمام روش فوق تا قبل از گره بر روی عصب انجام شده ولی به جای گره‌زدن روی عصب، نخ بخیه کاتگوت کرومیک ۴/۰، بدون گره‌زدن و فقط به اندازه ۴ دور حول عصب سیاتیک پیچیده شد (چون که در روش CCI چهار گره حول عصب اعمال می‌شود در این

شبیه‌سازی با درد نورپاتیکی انسانی معرفی شده و تحت بررسی قرار گرفته است که از بین آن‌ها می‌توان به ایجاد ضایعه نخاعی، ایجاد نورپاتی دیابتی، قطع کامل عصب سیاتیک، برش ناکامل عصب سیاتیک، قطع یکی از شاخه‌های عصب سیاتیک، ایجاد گره بر روی تنه عصب سیاتیک یا یکی از شاخه‌های آن، تزریق داروهای شیمی‌درمانی یا التهاب‌زا و سمی عصبی در اطراف عصب یا به صورت داخل صفاقی یا زیر جلدی اشاره نمود [۱۱-۱۶]. بررسی خصوصیات هر کدام از روش‌های معرفی شده نشان از هزینه‌بر بودن و یا پیچیدگی‌های خاص آن دارد. مثلاً در روش ایجاد گره بر روی عصب (Chronic Constriction Injury=CCI) که یکی از معمول‌ترین روش‌های ایجاد درد نورپاتیکی است [۱۷] گره‌های ایجاد شده توسط آزمایشگران متفاوت و در آزمایشگاه‌های مختلف ممکن است با شدت‌های متفاوتی ایجاد شود که این می‌تواند در شدت و ضعف درد ایجاد شده یا در زمان شروع و به حداکثر رسیدن درد تفاوت ایجاد کرده و به این ترتیب تفسیر نتایج نهایی را تحت‌الشعاع قرار داده و به عبارتی یک روش مشابه ایجاد درد منجر به نتایج کاملاً مشابه نشده و فهم از موضوع را دچار چالش نماید [۱۸-۲۰]. با توجه به این‌که ضایعه تروماتیک عصب سیاتیک به خاطر عمقی بودن آن در انسان نادر است [۱۰] و از طرف دیگر حدود نیمی از افراد نورپاتیکی که به کلینیک مراجعه می‌کنند، دردشان حاصل ترومای فیزیکی به عصب نبوده بلکه ناشی از التهاب عصبی و یا بافت‌های اطراف عصب است [۲۱] این موضوع ارجح بودن روش‌های ایجاد و مطالعه درد نورپاتی بدون ایجاد ضایعه مکانیکی را مطرح می‌کند. بر این اساس یافتن روش‌هایی که در عین ایجاد درد و التهاب، حتی‌الامکان چنین چالش‌هایی را نداشته باشد امری منطقی و ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این موضوع و نیز هزینه و زمان‌بر بودن روش‌های موجود، در این تحقیق با تعدیل روش CCI از طریق پیچیدن نخ کاتگوت حول عصب سیاتیک بدون ایجاد گره و اعمال فشار بر آن به عنوان یک مدل اقدام به ایجاد نوریت و درد نورپاتیکی و بررسی علایم آن نمودیم. لازم به ذکر است که از این پس به جهت سهولت درک مطلب در تمام مقاله از عبارت CSS که مخفف Chronic Spiral Suturing و به معنای پیچاندن مزمن نخ است در مقابل CCI استفاده خواهد شد.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

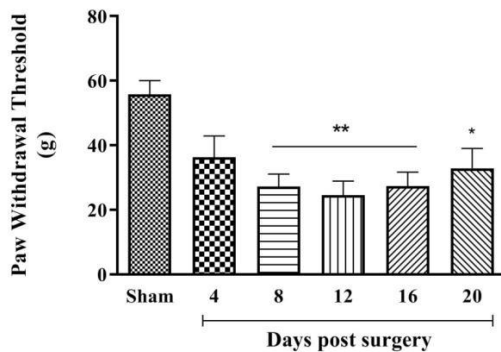
در این مطالعه از موش‌های صحرایی (Rat) نر بالغ از نژاد Wistar در محدوده وزنی ۱۸۰-۲۲۰ گرم استفاده گردید. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد و در

ثانیه نشان می‌دهد. این آزمایش بر روی پای ضایعه‌دیده حیوان و سه بار متوالی به فاصله ۵ دقیقه انجام شده و میانگین آن ارزیابی می‌گردد. زمان قطع آزمایش ۶۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شد [۲۳].

بررسی آماری. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از برنامه آماری Graphpad Prism (Graphpad, San Diego, CA, USA) ورژن ۸ استفاده گردید. به توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی و هم‌چنین از آنالیز واریانس دو طرفه و تست تعقیبی بون فرونی استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است و سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج آلودینیای مکانیکی. نتایج آزمایشات با تحریک مکانیکی نشان داد که آستانه پاسخ به تحریک مکانیکی در گروه CCI به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شم کاهش یافت ( $F_{5,51} = 4/45, P = 0/01$ ). آستانه پاسخ به درد حیوان در روز هشتم پس از جراحی به طور معنی‌داری نسبت به شم کاهش یافت ( $P < 0/01$ ) که تا پایان آزمایشات (روز ۲۰) ادامه یافت اگر چه در روز بیستم از معنی‌داری آن کاسته شد و به سطح  $P < 0/05$  رسید (شکل ۱).



شکل ۱. ضایعه فشاری مزمن موجب آلودینیای مکانیکی نسبت به گروه شم گردید. آستانه پاسخ به تحریک مکانیکی در گروهی که روی عصب سیاتیکشان گره ایجاد شده بود بطور معنی‌داری ( $P < 0/01$ ) نسبت به گروه کنترل شم پایینتر بود. اطلاعات بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار پاسخ حیوان بیان شد. هر گروه شامل تعداد ۸-۱۰ سر حیوان بود.

(ضایعه فشاری مزمن) CCI

\* $P < 0/05$ , \*\* $P < 0/01$

نتایج آزمایشات ما در خصوص گروهی که نخ کرومیک حول عصب سیاتیک پیچیده شده بود (گروه CSS) نشان داد که آلودینیای مکانیکی به طور معنی‌داری نسبت به گروه شم ایجاد گردید ( $F_{5,45} = 4/49, P = 0/002$ ). نتایج ما نشان داد که روز چهارم متعاقب جراحی آستانه پاسخ به درد حیوان به طور

روش چهار دور نخ کرومیک حول عصب پیچیده می‌شود) طوری که هیچ فشار مکانیکی به عصب وارد نکند و در اطراف عصب آزاد باشد. سپس با استفاده از نخ بخیه سیلک ۴/۰ عضله و پوست به صورت جداگانه دوخته شد. در این روش سعی شد تا فاصله بین هر پیچ نخ با بعدی در حد ۱ میلی‌متر رعایت گردد و بنابراین طولی از عصب که درگیر می‌شود تقریباً معادل مقداری است که در روش CCI می‌باشد.

گروه‌های مورد مطالعه و پروتکل اجرای آزمایش

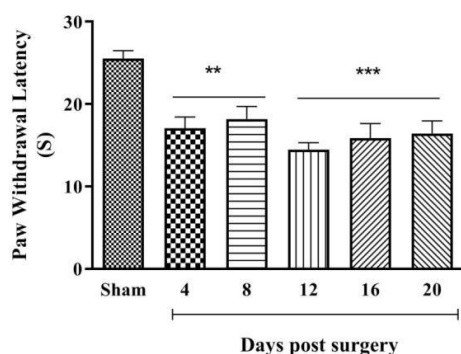
در این مطالعه از ۳۰ سر موش صحرایی که به طور تصادفی به ۳ گروه (گروه کنترل شم، گروه CSS، و گروه CCI) ۱۰ تایی تقسیم شدند استفاده گردید. در حین مطالعه ۲ سر حیوان مرد که اطاعات آن از مطالعه خارج گردید.

روش بررسی درد

آلودینیای مکانیکی. نیم ساعت قبل از انجام آزمایش حیوانات را داخل آزمایشگاه قرار داده و بعد از عادت کردن حیوان به محیط جدید، از تارهای مختلف Von - Frey (Stoelting, USA) جهت سنجش آلودینیای مکانیکی استفاده می‌گردید. این تارها به شکلی ساخته شده‌اند که هر کدام میزان مشخصی نیرو به سطح وارد می‌کنند و هر چه قدر نیروی وارده از طرف آزمایشگر به آن افزایش یابد، به خاطر انعطاف‌پذیر بودن آن میزان نیروی وارده افزایش نمی‌یابد. نیروی وارد به سطح توسط تارهای مورد استفاده در محدوده ۶۰-۲۶-۱۵-۱۰-۲-۴-۶-۸ گرم بود. از کم‌ترین شماره تار شروع کرده و به ترتیب در صورت عدم پاسخ شماره‌های بالاتر انتخاب می‌گردید. هر تار را سه دفعه متوالی به فاصله ۵ ثانیه و هر دفعه به مدت ۱ ثانیه به پشت پای ضایعه‌دیده حیوان بر روی پرده بین انگشتان ۲ و ۳ فشار داده که اگر ۲ بار متوالی پاسخ می‌داد (پای خود را بلند می‌کرد یا می‌کشید) به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته و دیگر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد و در غیر این صورت با شماره بالاتر آزمایش ادامه می‌یافت. در صورتی که حیوان به تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد. نتایج در جدول جمع‌آوری و مورد آنالیز قرار گرفت [۲۲].

هایپرآلژزیای حرارتی. در این تست حیوان را در محفظه مخصوص دستگاه Plantar Test قرار داده و بعد از عادت کردن حیوان به محیط جدید، منبع تابش اشعه مادون قرمز را در زیر پای حیوان قرار داده و تاباندن اشعه مادون قرمز با شدت ۶۰ شروع می‌شد. با روشن شدن دستگاه اشعه به پای حیوان تابیده شده و دستگاه زمان تابیده شدن اشعه را محاسبه می‌نماید و در صورتی که حیوان پای خود را حرکت دهد دستگاه خاموش و تایمر دستگاه مدت تاخیر پاسخ به درد حرارتی حیوان را به

به شم کاهش یافت ( $P < 0.01$ ) که از روز دوازده پس از جراحی میزان معنی داری آن افزایش یافت ( $P < 0.001$ ) و تا پایان آزمایشات (روز ۲۰) ادامه یافت (شکل ۴).



شکل ۴. ضایعه فشاری مزمن موجب هایپرالژزی حرارتی نسبت به گروه شم گردید. آستانه پاسخ به تحریک حرارتی در گروهی که روی عصب سیاتیکشان گره ایجاد شده بود بطور معنی داری ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل شم پایینتر بود. اطلاعات بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار پاسخ حیوان بیان شد. هر گروه شامل تعداد ۸-۱۰ سر حیوان بود.

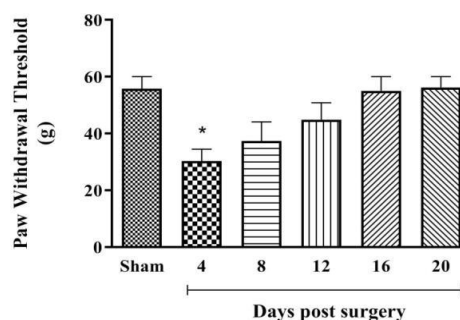
(ضایعه فشاری مزمن) CCI

\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$

نتایج آزمایشات ما در خصوص گروهی که نخ کرومیک حول عصب سیاتیک پیچیده شده بود (گروه CSS) نشان داد که هایپرالژزی حرارتی به طور معنی داری نسبت به گروه شم ایجاد گردید ( $F_{5,42} = 11/14$ ,  $P < 0.001$ ). نتایج ما نشان داد که روز چهارم متعاقب جراحی آستانه پاسخ به درد حیوان به طور معنی داری کاهش می یابد ( $P < 0.01$ ) که این آستانه پاسخی از روز هشت به بعد افزایش یافته و به سطح معنی داری  $P < 0.001$  رسیده و تا پایان آزمایشات در همین سطح حفظ می گردد (شکل ۵).

نتایج ما در خصوص مقایسه دو گروه CCI و گروه CSS از نظر هایپرالژزی حرارتی نشان داد که، آستانه پس کشیدن پا در پاسخ به تحریک حرارتی در دو گروه در روزهای مختلف تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر ندارد ( $P = 0.18$ ,  $F_{7,9,1} = 1/786$ ) (شکل ۶).

معنی داری کاهش می یابد  $P < 0.05$  که این آستانه پاسخی در روز هشت به بعد به تدریج افزایش می یابد طوری که روز ۱۶ پس از جراحی به سطح شم رسیده و پس از آن تغییری نمی کند (شکل ۲).

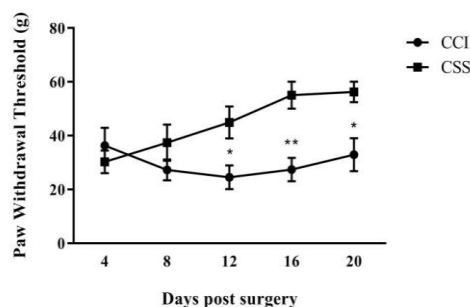


شکل ۲. پیچاندن نخ کرومیک حول عصب بدون گره زدن موجب آلودینایی مکانیکی گذرا در روز چهارم پس از جراحی نسبت به گروه شم گردید. اطلاعات بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار پاسخ حیوان بیان شد. هر گروه شامل تعداد ۸-۱۰ سر حیوان بود.

(نخ پیچ مزمن) CSS

\* $P < 0.05$

نتایج ما نشان داد که آلودینایی مکانیکی در گروه CCI به طور معنی داری ( $F_{1,82} = 20/57$ ,  $P < 0.001$ ) شدیدتر از گروه CSS بود. تفاوت معنی دار آستانه پاسخ به تحریک مکانیکی در روز ۱۲ پس از جراحی آغاز و تا پایان زمان آزمایش ادامه داشت (شکل ۳).



شکل ۳. ضایعه فشاری مزمن بطور معنی داری ( $P < 0.05$ ) آستانه پاسخ به تحریک مکانیکی را نسبت به گروه دریافت کننده نخ حول عصب بدون فشار بر آن کاهش می دهد. اطلاعات بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار پاسخ حیوان بیان شد. هر گروه شامل تعداد ۸-۱۰ سر حیوان بود.

(نخ پیچ مزمن) CCI, (ضایعه فشاری مزمن) CSS

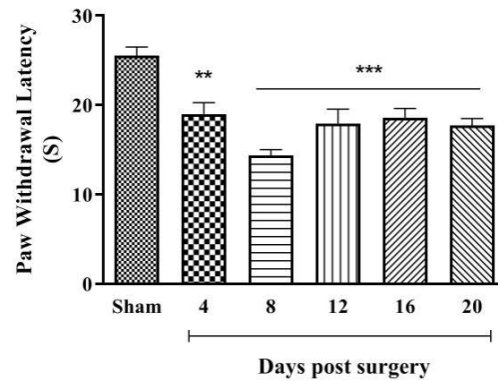
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

نتایج هایپرالژزی حرارتی. نتایج آزمایشات با تحریک حرارتی نشان داد که آستانه پاسخ به تحریک حرارتی در گروه CCI به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل شم کاهش یافت ( $F_{5,50} = 7/278$ ,  $P = 0.001$ ). آستانه پاسخ به درد حرارتی حیوان در روز چهارم پس از جراحی به طور معنی داری نسبت

نتایج ما نشان داد که روش معمول گره زدن روی عصب (CCI) به طور معنی داری آستانه پاسخ به محرک مکانیکی و حرارتی را نسبت به گروه شم کاهش می دهد. این نتیجه همخوان با نتایج قبلی ماست که نشان داد CCI موجب آلودینیای مکانیکی و هایپرالژیای حرارتی می گردد [۲۵،۲۴]. همچنین مطالعات دیگری نیز وجود دارد که نشان داده CCI موجب کاهش آستانه پاسخ به تحریک مکانیکی و حرارتی در موش صحرایی [۲۷،۲۶] و موش سوری [۲۸] می گردد.

نتایج ما در خصوص آلودینیای مکانیکی در گروه نخ پیچ حول عصب سیاتیک بدون ایجاد فشار بر آن نشان داد که حضور نخ کاتگوت کرومیک حول عصب و بدون ایجاد گره بر روی آن، آستانه درد مکانیکی را به طور گذرا و فقط در روز چهارم پس از جراحی کاهش می دهد و بعد از آن زمان، آستانه پاسخ به سطح گروه شم نزدیک شده و در ادامه هم سطح گروه شم می گردد. مطالعات نشان داده اند که تخریب سیتوتوکسیک نورون های نخاعی بیان کننده ماده پی (Substance P) موجب تضعیف هایپرالژیای مکانیکی متعاقب CCI در موش های صحرایی می گردد [۲۹]. همین محققین نشان دادند که در مایس های دچار ضایعه فشاری عصب ۵ نخاعی، متعاقب ناک اوت گیرنده نوروکینین ۱ (NK-1R)، هایپرالژیای مکانیکی دیده نمی شود [۲۹]. گزارشات دیگری نشان داده که حذف نورون های بیان کننده NK-1R نخاعی از القای آلودینیای مکانیکی ناشی از ضایعه عصبی جلوگیری می کند [۳۰،۲۹]. مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان داده که گره زدن روی عصب سیاتیک موجب افزایش بیان NK-1R در نخاع می گردد [۳۱]. وجود این گزارشات حاکی از آن است که اعمال ضایعه مکانیکی به عصب با افزایش بیان گیرنده های نوروکینین موجب بروز آلودینیای مکانیکی می گردد. در خصوص آزمایش آلودینیای مکانیکی در گروه نخ پیچ بدون اعمال ضایعه فشاری، نتیجه ما با گزارشات فوق همخوان است چرا که در روش پیشنهادی مورد آزمایش ما هیچ گونه ضایعه فشاری به عصب وارد نشده و بنابر گزارشات ذکر شده نباید آلودینیای مکانیکی دیده می شد. از طرف دیگر Cao و همکاران گزارش مخالفی ارائه نمودند مبنی بر این که به دنبال ناک اوت NK-1R در مایس، کاهش هایپرالژیای مکانیکی را مشاهده نکردند [۳۲]. دلیل این نتیجه متفاوت با نتایج دیگران ممکن است وابسته به مدل ایجاد درد متفاوت و یا استفاده از حیوان متفاوت بوده باشد.

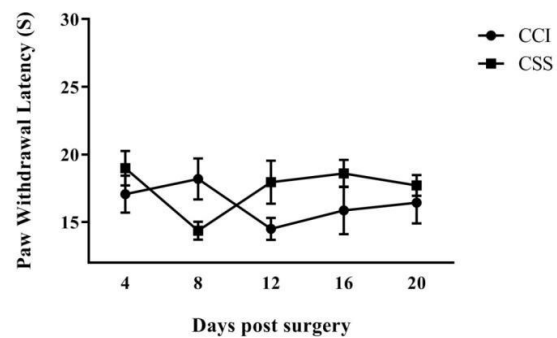
نتایج آلودینیای مکانیکی در گروه CSS حاکی از بروز یک آلودینیای مکانیکی گذرا در روز چهارم متعاقب جراحی بود. این نتیجه ما همخوان با گزارش Isabel Arevalo و همکاران است که نشان دادند، حیوانات دچار نوریت متعاقب تزریق داخل



شمس. پیچیدن نخ بر روی عصب بدون بره رس موجب هایپرالژیای حرارتی نسبت به گروه شم گردید. آستانه پاسخ به تحریک حرارتی در گروهی که روی عصب سیاتیکشان نخ پیچانده شده بود، بطور معنی داری ( $P < 0.01$ ) نسبت به گروه کنترل شم پایینتر بود. اطلاعات بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار پاسخ حیوان بیان شد. هر گروه شامل تعداد ۸-۱۰ سر حیوان بود.

(نخ پیچ مزمن) CSS

\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$



شکل ۶. آستانه پاسخ به تحریک حرارتی در گروه ضایعه فشاری مزمن نسبت به گروه دریافت کننده نخ حول عصب بدون فشار بر آن تفاوت معنی داری ندارد. اطلاعات بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار پاسخ حیوان بیان شد. هر گروه شامل تعداد ۸-۱۰ سر حیوان بود.

(ضایعه فشاری مزمن) CCI, (نخ پیچ مزمن) CSS

## بحث و نتیجه گیری

بیشتر مطالعات مربوط به نوروپاتی محیطی بر روی عصب سیاتیک انجام شده و در بین آنها بیشترین روش مورد استفاده، روش CCI می باشد. از آنجا که میزان فشار گره روی عصب در مطالعات مختلف که توسط افراد مختلف انجام می شود متفاوت است لذا حصول نتایج یکسان را غیر ممکن کرده و به این ترتیب تفسیر نتایج ممکن است با مغایرت هایی همراه باشد. علاوه بر این با توجه به این که بیشترین نوروپاتی های سیاتیک در انسان حاصل تروما نبوده و در نتیجه التهاب عصب یا بافت اطراف آن است [۲۱] بر این اساس در مطالعه حاضر به ارزیابی روش جدیدی از ایجاد درد نوروپاتی محیطی که مشکل ذکر شده در روش CCI را نداشته باشد پرداختیم.



بر این اساس در مطالعه ما در روش پیچاندن نخ حول عصب به دلیل عدم وارد کردن ضایعه مکانیکی و فقط به علت التهاب، و احتمالاً ایجاد ضایعه بر اعصاب بدون میلین C، حساسیت حرارتی دیده شده ولی آلودینیای مکانیکی رخ نداده و برعکس در روش ضایعه گره روی عصب، احتمالاً آسیب به فیبرهای بزرگ میلین دار موجب بروز آلودینیای مکانیکی گردیده است. برخی محققین این احتمال را مطرح می کنند که با توجه به نقش فیبرهای میلین دار واسطه کننده حس تماس در ایجاد آلودینیای مکانیکی، این موضوع ممکن است موجب حساسیت نخاعی (Spinal sensitization) گردد در حالی که هایپراآلژی حرارتی می تواند به واسطه حساس شدن گیرنده های محیطی رخ دهد [۳۸]. بنابراین ضایعه مکانیکی به عصب ممکن است با ایجاد حساسیت نخاعی منجر به آلودینیای مکانیکی گردد که در گروه CSS مشاهده نشده است.

با توجه به این که حدود نیمی از نوروپاتی هایی که در کلینیک با آن مواجه هستیم حاصل تروما به عصب نبوده بلکه ناشی از التهاب و یا عفونت در بافت های اطراف عصب است [۲۱] لذا تعمیم نتایج مطالعات حاصل از ضایعه تروماتیک عصبی جهت تصمیم گیری درمانی ممکن است تا حدی گمراه کننده باشد و اقدامات درمانی این افراد ممکن است آن چنان که باید سودمند نباشد به این معنی که ممکن است درمان هایی و رای نیاز این گروه مورد استفاده قرار گیرد که عوارض جانبی ایجاد شده اثر درمانی مورد نظر را تحت الشعاع خود قرار دهد. بنابراین، مطالعه بر روی روش هایی که به شرایط بالینی نزدیک تر است، مشابه سازی دقیق تری نسبت به شرایط بالینی ایجاد نموده و راهنمای مؤثرتری در یافتن روش های مدیریت و درمان نوروپاتی های مرتبط به دست می دهد. بر این اساس در انتها باید گفت که روش پیشنهادی ما نیازمند مطالعه رفتاری بیش تر و نیز مطالعات بیوشیمی، سلولی- مولکولی و بافتی است تا با قطعیت بیش تری بتوان این روش جدید را به عنوان یک روش ساده تر از روش CCI که مشکلات ذکر شده در آن را نداشته باشد جهت مطالعه درد نوروپاتیک معرفی کرد. با توجه به این که مقاله حاضر از یک طرح تحقیقاتی کمیته تحقیقات دانشجویی با حمایت مالی محدود حاصل شده است لذا به علت محدودیت های مالی امکان آن را نداشتیم که مواردی همچون سرعت هدایت عصبی و یا بررسی سطح عوامل التهابی در بافت و یا سایر تست های سلولی که به درک بهتر مقایسه دو روش کمک کند را مورد بررسی قرار دهیم که این یکی از محدودیت های این مطالعه بود. بررسی سطح سایتوکاین های التهابی در بافت یا سرم یا مایع مغزی- نخاعی، بررسی تغییرات بافتی از نظر میزان آسیب احتمالی فیبرهای عصبی میلین دار و

جلدی مایکوباکتریوم بوتریکوم، دچار آلودینیای مکانیکی گذرا گردیدند [۳۳]. آلودینیای مکانیکی مشاهده شده در گروه CSS ما در روز ۴ متعاقب جراحی اتفاق افتاد که ممکن است ناشی از برش جراحی بوده باشد که با التیام زخم از بین رفته است. نتایج ما در خصوص پاسخ به تحریک حرارتی در گروه CSS نشان داد که پیچیدن نخ کاتگوت کرومیک حول عصب سیاتیک بدون گره زدن، موجب کاهش معنی دار آستانه پاسخ به تحریک حرارتی می گردد که تا پایان زمان آزمایش ادامه یافت. این نتیجه ما هم خوان با نتایجی است که نشان داده، در نوریت متعاقب تزریق مایکوباکتریوم بوتریکوم هایپراآلژی حرارتی طولانی مدت ایجاد می شود [۳۳].

گزارش شده است که به دنبال التهاب، ماکروفاژها و بعضی از سلول های مشابه مانند سلول های شوان اقدام به رهائش فاکتورهای التهابی مانند سایتوکاین های پیش التهابی، پروستاگلاندین ها و نیتریک اکساید نموده که با اثر بر پایانه های عصبی محیطی موجب حساس شدن آن ها به محرک های حرارتی دردناک و غیر دردناک می گردد [۳۴]. بر این اساس احتمالاً در مطالعه ما نیز به دنبال پیچیدن نخ به دور عصب سیاتیک، تحریک و رهائش واسطه گرهای التهابی از سلول های ایمنی و دیگر سلول ها از جمله سلول های شوان موجب هایپراآلژیای حرارتی شده است.

در مطالعه حاضر، آلودینیای مکانیکی مشاهده شده در گروه CCI به طور معنی داری بیش تر از گروه CSS (نخ پیچ حول عصب) بود در حالی که هایپراآلژی حرارتی ایجاد شده در دو گروه تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر نشان نداد. بلوک عصبی تشخیصی در بیماران نشان داده که آلودینیای مکانیکی از طریق فیبرهای غیر درد بزرگ A-Beta که حس تماس را انتقال می دهند واسطه می شود در حالی که هایپراآلژی حرارتی توسط فیبرهای نوسیسپتور C بدون میلین واسطه می گردد [۳۵]. از طرف دیگر آنچه در CCI موجب بروز علائم می گردد شامل واکنش های ایمنی و التهابی و در نتیجه ادم عصب و فشار به آن و نیز آکسوتومی و دژنراسیون والرین [۳۶] می باشد که در CSS به دلیل عدم اعمال فشار احتمالاً فقط واکنش های التهابی موجب بروز آلودینیای مکانیکی ضعیف تر می باشد.

هم چنین گزارش شده که در رت هایی که روی عصب نخاعی آن ها گره ایجاد شده (Spinal Nerve Ligation)، حساسیت زدایی انتخابی فیبرهای C یا مهار پیش سیناپسی فیبرهای C با استفاده از مورفین نخاعی، موجب حذف حساسیت شدید حرارتی می شود ولی بر حساسیت شدید مکانیکی ایجاد شده اثری ندارد [۳۷].

- [19] Challa SR. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int J Neurosci* 2015; 125: 170-174.
- [20] Kumar A, Kaur H, Singh A. Neuropathic Pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. *Pharmacol Rep* 2018; 70: 206-216.
- [21] Said G, Hontebeyrie-Joskowicz M. Nerve lesions induced by macrophage activation. *Res Immunol* 1992; 143: 589-599.
- [22] Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav* 1999; 67: 711-716.
- [23] Tal M, Bennett GJ. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 1994; 57: 375-382.
- [24] Safakhah HA, Bazargani A, Ghanbari A. Effects of forced exercise on neuropathic pain induced by chronic constriction injury of sciatic nerve in male rat. *Koomesh* 2016; 17: 411-418. (Persian).
- [25] Safakhah HA, Tamimi F, Bandegi AR, Ghanbari A. Hypoalgesic effect of *Spirulina platensis* on the sciatic neuropathic pain induced by chronic constriction injury in male rats. *Biomed Res Ther* 2018; 5: 2671-2679. (Persian).
- [26] He Z, Guo Q, Xiao M, He C, Zou W. Intrathecal lentivirus-mediated transfer of interleukin-10 attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain through modulation of spinal high-mobility group box 1 in rats. *Pain Physician* 2013; 16: E615-625.
- [27] Grace PM, Fabisiak TJ, Green-Fulgham SM, Anderson ND, Strand KA, Kwilas AJ, et al. Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain. *Pain* 2016; 157: 2012-2023.
- [28] Cobianchi S, Marinelli S, Florenzano F, Pavone F, Luvisetto S. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 2010; 168: 273-287.
- [29] Mansikka H, Sheth R, DeVries C, Lee H, Winchurch R, Raja S. Nerve injury-induced mechanical but not thermal hyperalgesia is attenuated in neurokinin-1 receptor knockout mice. *Exp Neurol* 2000; 162: 343-349.
- [30] Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 613-617.
- [31] Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 1998; 76: 215-222.
- [32] Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, Basbaum AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 1998; 392: 390.
- [33] Arevalo MI, Escibano E, Calpena A, Domenech J, Queralt J. Thermal hyperalgesia and light touch allodynia after intradermal *Mycobacterium butyricum* administration in rat. *Inflammation* 2003; 27: 293-299.
- [34] Watkins LR, Maier SF. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 2002; 82: 981-1011.
- [35] Koltzenburg M, Torebjork HE, Wahren LK. Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain. *Brain J Neurol* 1994; 117: 579-591.
- [36] Sousa AM, Lages GV, Pereira CL, Slullitel A. Experimental models for the study of neuropathic pain. *Revista Dor* 2016; 17: 27-30.
- [37] Ossipov MH, Bian D, Malan TP, Jr., Lai J, Porreca F. Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain* 1999; 79: 127-133.
- [38] Zhang ET, Ossipov MH, Zhang DQ, Lai J, Porreca F. Nerve injury-induced tactile allodynia is present in the absence of FOS labeling in retrogradely labeled post-synaptic dorsal column neurons. *Pain* 2007; 129: 143-154.

بدون میلین، و ارزیابی سرعت هدایت عصبی از جمله مواردی است که می‌توان برای طرح‌های پیش رو پیشنهاد نمود.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سمنان انجام شد و نویسندگان مقاله به این وسیله مراتب تشکر خود را به‌عمل می‌آورند.

## منابع

- [1] Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006; 52: 77-92.
- [2] Gordon Smith A, Robinson Singleton J. Idiopathic neuropathy, prediabetes and the metabolic syndrome. *J Neurol Sci* 2006; 242: 9-14.
- [3] Khan N, Smith MT. Multiple sclerosis-induced neuropathic pain: pharmacological management and pathophysiological insights from rodent EAE models. *Inflammopharmacology* 2014; 22: 1-22.
- [4] Watson JC, Sandroni P. Central neuropathic pain syndromes. *Mayo Clin Proc* 2016; 91: 372-385.
- [5] Yoon SY, Oh J. Neuropathic cancer pain: prevalence, pathophysiology, and management. *Korean J Intern Med* 2018; 33: 1058-1069.
- [6] Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neurosci* 2007; 10: 1361-1368.
- [7] Negi G, Kumar A, Joshi RP, Sharma SS. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: old perspective with a new angle. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 408: 1-5.
- [8] Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunology* 2010; 229: 26-50.
- [9] Ma F, Zhang L, Lyons D, Westlund KN. Orofacial neuropathic pain mouse model induced by Trigeminal Inflammatory Compression (TIC) of the infraorbital nerve. *Mol Brain* 2012; 5: 44.
- [10] Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin* 2013; 29: 317-330.
- [11] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87-107.
- [12] Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355-363.
- [13] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990; 43: 205-218.
- [14] Devor M. Sensory basis of autotomy in rats. *Pain* 1991; 45: 109-110.
- [15] Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004; 109: 150-161.
- [16] Kernisant M, Gear RW, Jasmin L, Vit JP, Ohara PT. Chronic constriction injury of the infraorbital nerve in the rat using modified syringe needle. *J Neurosci Methods* 2008; 172: 43-47.
- [17] Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 1-28.
- [18] Ro LS, Jacobs JM. The role of the saphenous nerve in experimental sciatic nerve mononeuropathy produced by loose ligatures: a behavioural study. *Pain* 1993; 52: 359-369.

## Evaluation of new method to induce neuritis and comparison its symptoms with current chronic constriction injury method in male rat

Ali Ghanbari (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Fatemeh Shahsavani (M.D Student)<sup>2</sup>, Hossein Ali Safakhah (M.Sc)<sup>1,3</sup>

1 - Research Center of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2 - Student research Committee, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

3- Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

\* Corresponding author. +98 9127313970 ghanbari@semums.ac.ir

Received: 13 Apr 2019; Accepted: 16 Jun 2020

**Introduction:** There are various animal models to investigate neuropathic pain which the most usual one is chronic constriction injury method. The aim of the present study was the evaluation of neuropathic pain following chronic spiral suturing around the sciatic nerve without ligation as a new model.

**Materials and Methods:** Thirty Wistar male rats, weighting 180-220 gram randomly were divided into three groups as sham, chronic constriction injury (CCI), and chronic sciatic spiral suturing (CSS). CCI was performed by four loose ligation using catgut chromic suture around sciatic nerve. CSS was performed through spirally suturing of catgut chromic four times around the sciatic nerve without any ligation. In the sham group, muscle and skin were sutured after exposing the nerve. To determine mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, Von Frey filaments and plantar test device were used respectively every four days during three weeks.

**Results:** CCI led to significant mechanical allodynia ( $P<0.01$ ) and thermal hyperalgesia ( $P<0.001$ ) compared to sham group. On the other side CSS led to a transient mechanical allodynia ( $P<0.05$ ) but permanent thermal hyperalgesia ( $P<0.001$ ) in comparison with sham group. Considerably, the mechanical allodynia in the CCI group was reduced significantly ( $P<0.01$ ) against that in CSS group, however thermal hyperalgesia were the same in both of CCI and CSS groups.

**Conclusion:** Chronic spiral suturing around the sciatic nerve without ligation led to thermal hyperalgesia as chronic constriction injury method, but unlike CCI method, led to a temporary mechanical allodynia.

**Keywords:** Neuropathic Pain, Mechanical Allodynia, Thermal Hyperalgesia.