"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1932265.1308

Histopathological and immunohistochemical evaluation of the effect of tacrolimus on nerve regeneration following crushed sciatic nerve in mice

Khomejani Farahani, F.[1]*, Fattahian, H.R.[2], Asghari, A.[3], Mortazavi, P.[4]

1- D.V.M, DVS.c. Graduate, Department of Clinical Science, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
*Corresponding author's email: Fereshtehfarahani@yamail.com
(Received: 2021/06/29 Accepted: 2021/10/16)

Abstract

Studies have been conducted to find effective agents for nerve regeneration. The present study was conducted on sixteen adult male Syrian mice with the aim of assessment of the effects of tacrolimus on crushed sciatic nerve injury and its comparison with spontaneous repair. After exposure of the left sciatic nerve, crushing was performed using a 2 mm wide mosquito hemostatic forceps tip for 10 seconds. Animals were randomized into two groups of treatment group (Group I), and the control (Group II) with eight mice each. The treatment group received tacrolimus (5 mg/kg, q24h, SC) until the end of the study, and the control group received no therapeutic agents. Histopathological and immunohistochemical assessment was performed on second and fourth post-operative weeks, and suggested that perineurium formation did not show a significant difference between the study groups ($p>0.05$). At the end of the second week in the treatment group, the reduction of axon inflammation and swelling, and the increase in axonal count showed a significant difference with the control group ($p<0.05$). At the end of the fourth week, the difference in inflammation severity between the groups was not significant ($p>0.05$) but the decrease in axonal swelling and increase in axonal count in the treatment group showed a significant difference with the control group ($p<0.05$). Increase of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression showed significant difference between the treatment group and the control group at the end of the study ($p<0.05$). Based on the present results, the use of tacrolimus was responsible for reduction of inflammation in a two week period, and at the end of the fourth week, increase of axonal count and edema suppression caused regeneration of injured nerve.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Histopathology, Immunohistochemistry, Mice, Sciatic nerve, Tacrolimus.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1932265.1308

بررسی هیستوپاتولوژی و ایمنوهیستوشیمی اثرات داروی تاکرولیموس در بهبود ضایعات عصبی متعاقب کراش عصب سیاتیک در موش سوری

فرشته خمجانی‌فراهانی[۱]، حمیدرضا فتاحیان[۲*]، احمد اصغری[۳]، پژمان مرتضوی[٤]

۱-دانش‌آموخته دکترای تخصصی جراحی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

٤- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: fatahian_1349@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱٤۰۰/٤/۸ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/۷/۲٤)

چکیده

مطالعاتی با هدف شناسایی پروتکل دارویی موثر در ترمیم اعصاب انجام گردیده‌است. بررسی حاضر با هدف ارزیابی اثرات داروی تاکرولیموس بر ترمیم عصب سیاتیک متعاقب له‌شدگی و مقایسه آن با ترمیم خودبخودی، روی ۱٦ سر موش سوری نر بالغ انجام شد. بدین منظور، بعد از مشاهده عصب سیاتیک چپ هر موش، له‌شدگی عصب مذکور در همه موش‌های مورد آزمایش با استفاده از پنس هموستات با پهنای دهانه ۲ میلی‌متر، به مدت ۱۰ ثانیه انجام گردید. در ادامه حیوانات فوق به‌طور تصادفی به دو گروه ۸تایی شامل گروه تحت درمان (گروه اول) و گروه کنترل (گروه دوم) تقسیم شدند. موش‌های گروه اول، تاکرولیموس(۵ mg/kg، زیرجلدی، روزانه) را تا پایان مطالعه دریافت کردند. در گروه دوم از هیچ داروی درمانی استفاده نگردید. ارزیابی هیستوپاتولوژی و ایمنوهیستوشیمی در پایان هفته‌های دوم و چهارم انجام و مشخص شد که تشکیل پرینوریوم بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵). در پایان هفته دوم در گروه درمانی کاهش التهاب و تورم آکسون، و افزایش شمارش آکسونی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد (p<۰/۰۵). در پایان هفته چهارم، تفاوت شدت التهاب بین گروه‌ها معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵) اما کاهش تورم آکسونی و افزایش شمارش آن در گروه درمانی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد (p<۰/۰۵). در پایان مطالعه، افزایش بیان ژن GFAP (glial fibrillary acidic protein) در گروه درمانی اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل داشت (p<۰/۰۵). نتایج حاصله مشخص کرد مصرف تاکرولیوس در مدت ۲ هفته، سبب کاهش التهاب و در پایان هفته چهارم با افزایش تعداد آکسون‌ها و کاهش تورم آن، سبب بهبود سریع جراحات عصبی می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: ایمنوهیستوشیمی، تاکرولیموس، عصب سیاتیک، موش، هیستوپاتولوژی.

مقدمه

آسیب عصبی یک چالش بزرگ در جوامع امروزی می‌باشد که عموماً در پی تصادف با اتومبیل، آسیب‌های نافذه مثل شلیک گلوله، افتادن از ارتفاع، شکستگی‌ها، له‌شدگی و ... رخ می‌دهد و متعاقب آنها نقصان‌های حسی، حرکتی، از کار افتادن اندام با درجات مختلف، کاهش عملکرد اندام و نهایتاً کاهش کیفیت زندگی فرد رخ می‌دهد (Devesa *et al*., 2012; Mekaj *et al*., 2014; Alvites *et al*., 2018; Shabeed *et al*., 2018). علی‌رغم این‌که اعصاب محیطی قادر به بازسازی و ترمیم خودبخودی می‌باشند، ولی این توانایی به تنهایی در بهبود کامل، عملکرد مناسب و کیفیت زندگی بیماران کافی نیست. عواملی از جمله شدت، میزان و محل آسیب، سن بیمار و فاصله زمانی بین آسیب و مداخلات درمانی از جمله معیارهای مهم انتخاب پروتکل‌های درمانی می‌باشد. از این رو انتخاب روش‌های مناسب نقش اساسی در ترمیم و نوزایش اعصاب دارد (Dewey and Costa, 2003; Devesa *et al*., 2012; Platt and Costa, 2012). محققان در دهه‌های اخیر به دنبال ارائه روش‌های درمانی مناسب برای افزایش سرعت ترمیم و بهبودی عملکرد طبیعی در بیماران بوده‌اند (Mekaj *et al*., 2014; Mesquit Cotinho *et al*., 2016). اگرچه مطالعات بسیاری در این زمینه انجام گرفته و تلاش‌هایی از جمله به‌کار گرفتن انواع درمان‌های تهاجمی و غیرتهاجمی با صرف هزینه‌های فراوان انجام گردیده است، اما همچنان موفقیت آن‌ها تحت بررسی بوده و بهبود و بازگشت فعالیت اعصاب پس از آسیب، از چالش‌های بزرگ حل نشده در جوامع پزشکی و دامپزشکی می‌باشد. همچنین گرچه بسیاری از مطالعات، نتایج قابل قبولی را ارائه می‌کنند ولی همچنان عاری از مشکل نبوده‌اند و حتی در بهترین روش‌های جراحی علاوه بر صرف هزینه‌ها و لزوم امکانات فراوان، معضلاتی از جمله حضور التهاب و اسکار در محل ترمیم وجود خواهد داشت (Devesa *et al*., 2012; Mekaj *et al*., 2014; Suchyta *et al*., 2017; Shabeed *et al*., 2018). در سال‌های اخیر انواع مختلفی از داروها به منظور سرعت بخشیدن به روند ترمیم عصبی، افزایش نوزایش آکسون و نیز کاهش التهاب و اسکار در محل، مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله داروهای مورد بررسی می‌توان به تضعیف‌کننده‌های سیستم ایمنی، کورتیکواستروئیدها، استروئیدهای آنابولیک و آندروژن‌ها، بلاک‌کننده‌های سدیم و پتاسیمی و ویتامین B_{12} اشاره نمود (Islamov *et al*., 2002; Islamov *et al*., 2003; Fargo *et al*., 2009; Devesa *et al*., 2012; Mekaj *et al*., 2014; Mesquit Cotinho *et al*., 2016; Shabeed *et al*., 2018).

تاکرولیموس که در منابع مختلف با اسامی گوناگونی از جمله FK506 و نیز فوجیمایسین (Fujimicin) نیز شناخته می‌شود از دسته داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی بوده که در سال ۱۹۸٤ اولین بار از سویه باکتری به‌نام *استرپتومایسس تسوکوبائنسیس* (*Streptomyces tsukubaensis*) در تسوکوبای ژاپن به‌دست آمده است. در طول زمان و بر اساس ساختار تشکیل‌دهنده این لاکتون ماکرولیدی اسامی مخفف و متنوعی بر آن اطلاق شد که جدیدترین نام را برای FK506، تاکرولیموس انتخاب کردند. با توجه به تاریخچه نامگذاری این دارو حروف به‌کار رفته در آن برگرفته از نام فوجیمایسین (Fujimicin) و سویه باکتری *تسوکوبائنسیس* (*Tsukubaensis*) می‌باشد.

Wallemacq and Reding, 1993; Mekaj *et al.*, 2014). تاکرولیموس برای جلوگیری از پس‌زدگی اندام بعد از پیوند مورد استفاده قرارگرفته، اما در مطالعاتی که در سال‌های اخیر در الگوهای گوناگون حیوانی و نیز بخش‌های مختلف سیستم عصبی انجام گردیده، به نقش حفاظتی و حمایتی آن در سیستم عصبی، تسریع بهبود ساختار عصب و نیز اهمیت آن در نوزایش بافت عصبی متعاقب آسیب، پی برده شده‌است (Mekaj *et al.*, 2014; Mesquit Coutinho *et al.*, 2016; Suchyta *et al.*, 2017; Shabeed *et al.*, 2018). در بررسی‌ها مشخص شده که تاکرولیموس با اتصال به گیرنده‌های پروتئین ۱۲ یا همان FKBP12، (FK506 Binding Protein 12)، به ایفای نقش تضعیف‌کننده سیستم ایمنی می‌پردازد. همچنین این دارو با اتصال به گیرنده‌های پروتئین ۵۲ یا همان FKBP52، (FK506 Binding Protein 52) که مجزا از نقش تضعیف‌کنندگی سیستم ایمنی عمل می‌کند، به القای نقش حمایتی و حفاظتی سیستم عصبی می‌پردازد (Grand *et al.*, 2002; Mekaj *et al.*, 2014; Suchyta *et al.*, 2017; Shabeed *et al.*, 2018).

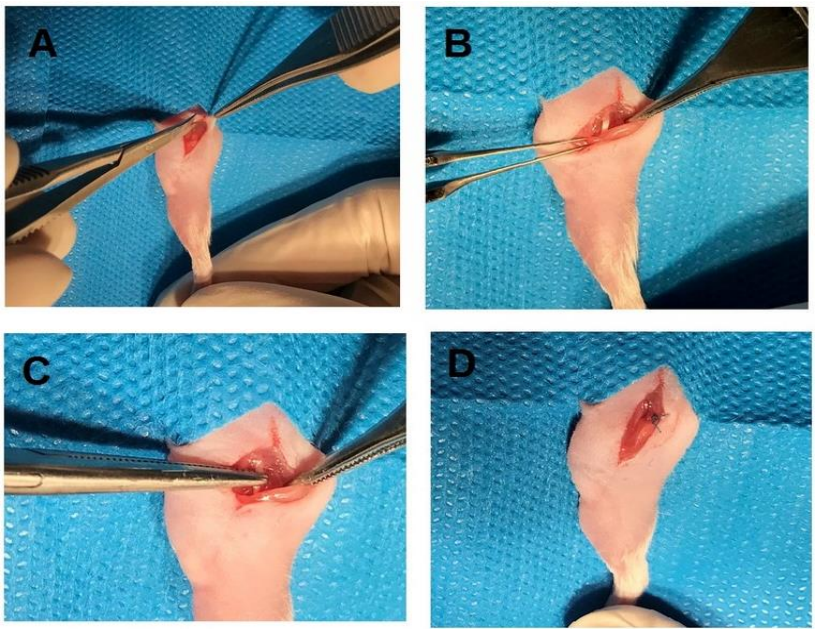
با توجه به رخداد بالای آسیب‌های اعصاب محیطی و مراجعات بالینی مکرر و نیز نقش موثر دارو درمانی در بهبود ضایعات عصبی، در مطالعه حاضر تلاش برای بررسی عملکرد داروی تاکرولیموس، به عنوان یکی از داروهای موثر در بهبود ضایعات عصبی با هدف ارزیابی هیستوپاتولوژی و ایمنوهیستوشیمی عملکرد این دارو و نیز بررسی میزان سرعت بهبودی و کیفیت ترمیم، متعاقب آسیب ناشی از لهشدگی عصب سیاتیک در موش سوری و مقایسه اثرات آن با ترمیم خودبخودی عصب در مدت زمان ٤ هفته، انجام گردیده‌است.

مواد و روش‌ها

-**طرح مطالعه**: مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده که تمامی مراحل اجرایی آن در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و روی ١٦ سر موش سوری نر بالغ با محدوده سنی یکسان و میانگین وزنی مشابه (۲±۲۵ گرم) انجام گردیده‌است. حیوانات مذکور از بخش تکثیر و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه شده و به مدت یک هفته به دور از استرس و تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان (دمای محیطی ۳±۲۳ درجه سلسیوس، نور کافی، رطوبت مناسب، جیره غذایی استاندارد با استفاده از پلت آماده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی و تعداد دفعات یکسان، دسترسی آزاد به آب سالم و در چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی) نگه‌داری شدند. پس از یک هفته نگه‌داری در شرایط ذکرشده، موش‌ها برای جراحی آماده شدند. تمامی حیوانات به منظور انجام جراحی تحت بی‌هوشی، تزریق عضلانی مقدار ٤ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن از ترکیب دارویی کتامین هیدروکلراید۱۰ درصد (آلفاسان، هلند) و نیز مقدار۱۰میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن از داروی مدتومیدین (سیوا، اسپانیا) را دریافت نمودند. تمامی مراحل اعمال جراحی، تحت شرایط آسپسی و نیز مطابق اصول اخلاقی مورد تایید کمیته حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی و تحت کد اخلاقی با شماره IAEC6-32/12 (Animal ethics committee of Iranian laboratory)، انجام گردید.

-**انجام جراحی**: برای ایجاد آسیب عصب سیاتیک، تمامی حیوانات تحت برش جراحی روی ناحیه جانبی ران چپ قرار گرفتند. در این مرحله، پس از کندکاری

عضلات، عصب سیاتیک در زیر عضله دوسر ران در معرض دید قرارگرفته و پس از جداسازی عصب به روش آتروماتیک، بخش میانی عصب سیاتیک هر موش، با پنس هموستات ماسکیتو (شرایبر، آلمان) به پهنای دهانه ۲ میلی‌متر به مدت ۱۰ ثانیه روی دندانه اول قفل و تحت فشار قرار داده می‌شد(Sun *et al.*, 2009; Danzi *et al.*, 2016). بلافاصله بعد از آسیب وارده بر عصب، پنس هموستات برداشته شده و محل آسیب با استفاده از نخ نایلون ۰-۵ (سوپا، ایران) بر روی عضله دوسران نشانه‌گذاری می‌گردید. سپس بافت زیرجلدی با نخ پلی‌گلاکتین ۹۱۰ (ویکریل) ۰-۵ (سوپا، ایران) به روش سرتاسری و پوست هم با نخ نایلون ۰-۵ (سوپا، ایران) به روش تکی ساده بخیه می‌شد (شکل ۱). از آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف انروفلوکساسین (هیپرولونا، اسپانیا) به میزان ۰/۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن و ملوکسی‌کام ۲ درصد (رازک، ایران) به عنوان داروی ضد درد و التهاب به مقدار ۰/۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، در اولین روز عمل جراحی و سپس به میزان ۰/۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن در ۲ روز بعدی، به مدت ۳ روز، روزانه و به صورت زیرجلدی برای تمامی حیوانات تحت مطالعه به عنوان مراقبت‌های بعد از جراحی استفاده می‌گردید. همچنین پس از انجام عمل جراحی، موش‌ها به صورت تصادفی به ۲ گروه هشت‌تایی تقسیم شدند که حیوانات در گروه اول داروی تاکرولیموس(آستلا، هلند) را به مقدار ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، روزانه و به صورت زیرجلدی تا مدت ۲۸ روز دریافت نمودند (Wang *et al.*, 1997). اما حیوانات گروه دوم هیچ داروی درمانی دریافت نکرده و فقط به مدت ۳ روز بعد از عمل جراحی، مراقبت‌های لازم مشترک با موش‌های گروه اول را دریافت کردند.



شکل ۱- مراحل جراحی جهت ایجاد له‌شدگی در عصب سیاتیک: A) رهیافت جراحی برای دسترسی به عصب سیاتیک. B) در معرض دید قرارگرفتن عصب سیاتیک. C) له‌شدن عصب به‌وسیله پنس هموستات ماسکیتو با دهانه ۲ میلی‌متر، طی مدت ۱۰ ثانیه. D) نشانه‌گذاری محل آسیب با نخ نایلون ۰-۵.

-**نمونه‌گیری بافتی و آماده‌سازی آن‌ها**: در پایان هفته دوم، تعداد ٤ سر موش از هر گروه و در پایان هفته چهارم، مابقی موش‌های هر ۲ گروه، با استفاده از پنبه آغشته به اتر (مرک، آلمان)، در محفظه بسته، تحت عمل آسان‌کشی قرارگرفتند (Blackshaw *et al*., 1988). در این مرحله، برای تهیه نمونه بافتی، ناحیه جراحی باز شده و پس از رسیدن به عصب سیاتیک، نخ نشانگر در محل ضایعه شناسایی و ناحیه له‌شدگی عصب جداسازی و در محلول فرمالین ۱۰ درصد (مرک، آلمان) قرار داده‌می‌شد. نمونه‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند و سپس به روش معمول تهیه مقاطع بافتی، آبگیری با اتانول (مرک، آلمان) به ترتیب الکل ۵۰، ۷۰، ۹۰ درجه و مطلق و آغشته‌سازی با پارافین (نوترون، ایران)، انجام شده و بلوک پارافینی از آن‌ها تهیه گردید. مقطع‌گیری از بلوک‌های پارافینی به کمک دستگاه میکروتوم بافتی (مدل ۱۵۱۲ لیتز، آلمان)، و با ایجاد برش‌هایی با ضخامت ٦ میکرون انجام شد و نهایتاً از برش‌ها، لام بافتی برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین تهیه شد. پارافین‌زدایی با زایلن (مرک، آلمان)، رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین (مرک، آلمان)، شستشو با آب، رنگ‌آمیزی با ائوزین (مرک، آلمان)، شستشو با زایلن (مرک، آلمان) برای شفاف‌سازی انجام شد. همچنین بلوک‌های پارافینی برای انجام رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران ارسال شدند.

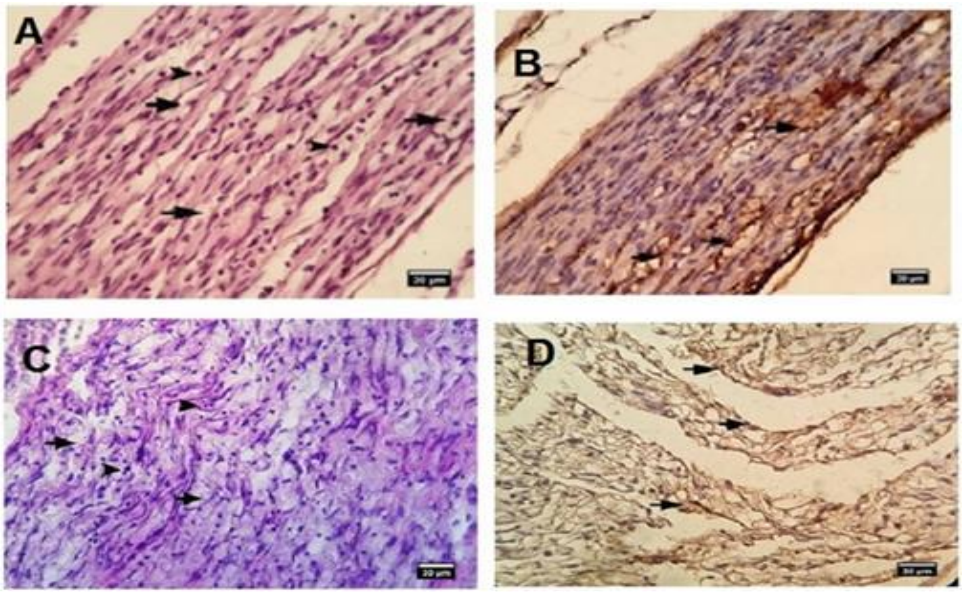
در تحقیق حاضر، ارزیابی هیستوپاتولوژی و نیز ایمنوهیستوشیمی نمونه‌ها با استفاده از میکروسکپ نوری (cx33، الیمپوس، آلمان) انجام گردید. همچنین میزان ترمیم بافت عصب از دیدگاه هیستوپاتولوژی با بررسی معیار تشکیل پرینوریوم (با امتیاز صفر به‌عنوان عدم تشکیل تا امتیاز ٤ به‌عنوان تشکیل کامل) و نیز شاخص‌های تورم آکسون، شمارش آکسون و شدت حضور سلول‌های التهابی (با امتیاز صفر به‌عنوان حداکثر حضور تا امتیاز ٤ به‌عنوان عدم حضور)، مورد ارزیابی قرارگرفت. بررسی ایمنوهیستوشیمی نیز با ارزیابی میزان بیان ژن GFAP (glial fibrillary acidic protein)، با امتیاز صفر به‌عنوان عدم بیان ژن تا امتیاز ٤ به‌عنوان بیان شدید ژن، انجام گردید(Reyhani Rad *et al*., 2009; Caner *et al*., 2012; Yadegar *et al*., 2013; Darzian Rotami *et al*., 2019; Mahloujiyan *et al*., 2020). این روش برای شناسایی پروتئین هدف در برش‌های بافتی انجام می‌شود. در این تکنیک، شاخص افزایش ترمیم و تکثیر سلول‌های عصبی با افزایش بیان ژن مذکور، نشان‌دهنده روند مثبت بافت عصبی به سمت ترمیم و نوزایش عصبی می‌باشد. در این روش با اتصال اندیکاتورهای رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی به پروتئین گلیالی حاصل از آکسون‌های تازه تشکیل‌شده، رسوب رنگی در محل پروتئین ایجاد می‌گردد که با میکروسکوپ نوری قابل بررسی است (Alvites *et al*., 2018).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: داده‌های حاصله از تحقیق به صورت میانگین± انحراف استاندارد ارائه گردیده و با استفاده از آزمون‌های آماری غیرپارامتری کروسکال والیس (Kruskal- wallis) و مان ویتنی (Mann Whitney U tests) و با کمک نسخه ۱۸ نرم‌افزار SPSS مورد تحلیل آماری قرارگرفتند. همچنین مقادیر$p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

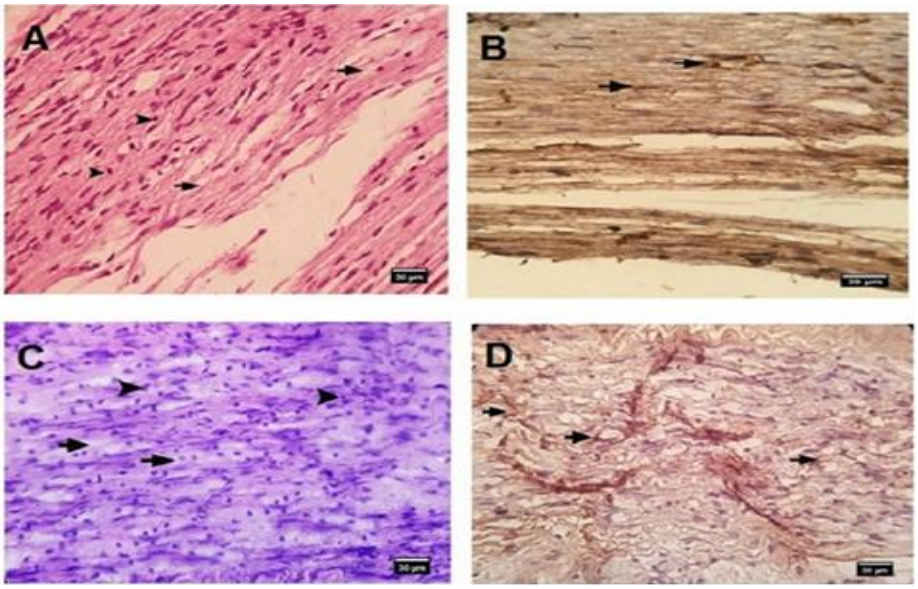
یافته‌ها

امتیازدهی و ارزیابی شاخص‌های هیستوپاتولوژی و ایمنوهیستوشیمی در مورد نمونه‌های مربوط به حیوانات گروه‌های تحت مطالعه در پایان هفته‌های دوم و چهارم، در جدول ۱ ارائه شده است. همچنین مقاطع طولی عصب سیاتیک در محل له‌شدگی در پایان هفته‌های دوم و چهارم برای حیوانات گروه‌های مورد مطالعه که با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و نیز به منظور بررسی بیان ژن GFAP به روش ایمنوهیستوشیمی تهیه گردیده بودند، در اشکال ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند.

مشاهدات ریزبینی تشکیل پرینوریوم در حیوانات گروه‌های تحت مطالعه در پایان هفته دوم، اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$)، در حالی‌که در گروه اول در همین زمان شاخص‌های هیستوپاتولوژی حضور التهاب و تورم آکسونی روند کاهشی، و شمارش آکسونی سیر افزاینده داشته و اختلاف آماری معنی‌داری را با موش‌های گروه‌های دوم نشان داد ($p<۰/۰۵$). همچنین بیان ژن GFAP در این زمان در گروه دوم، متوسط بود که در مقایسه با گروه اول اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$)، (جدول ۱، شکل ۲). از طرف دیگر نتایج مشاهدات ریزبینی در پایان هفته چهارم نشان داد که شاخص التهاب و نیز تشکیل پرینوریوم در بین حیوانات گروه‌های اول و دوم اختلاف آماری معنی‌داری ندارد ($p>۰/۰۵$). تورم آکسون در حیوانات گروه درمانی به میزان زیادی کاهش داشت و نیز شمارش آکسون افزایش چشم‌گیری را در پایان مطالعه در موش‌های این گروه نشان داد که از این نظر، اختلاف آماری معنی‌داری با حیوانات گروه کنترل داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین در پایان هفته چهارم شدت بیان ژن GFAP در گروه اول به میزان متوسط بود و نسبت به همین گروه در پایان هفته دوم سیر پیشرونده داشت، درحالی که در این بازه زمانی در گروه دوم، روند پیشروی ثابت بود. همچنین در پایان هفته چهارم، حیوانات گروه اول در خصوص شاخص مذکور، اختلاف آماری معنی‌داری را با موش‌های گروه دوم نشان داد ($p<۰/۰۵$)، (جدول ۱، شکل ۳).



شکل ۲- نمای ریزبینی از برش طولی عصب سیاتیک در محل له‌شدگی عصب در پایان هفته دوم: A) گروه آزمایش تحت درمان با تاکرولیموس، تورم جزئی آکسون (پیکان‌ها) و نیز حضور خفیف سلول‌های التهابی (نوک پیکان‌ها) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠). B) گروه آزمایش تحت درمان با تاکرولیموس، بیان ژن GFAP (پیکان‌ها) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی، درشت‌نمایی ×٤٠٠). C) گروه کنترل، تورم شدیدتر آکسونی (پیکان‌ها) و نیز حضور برجسته‌تری از سلول‌های التهابی (نوک پیکان‌ها) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠). D) گروه کنترل، بیان ژن GFAP (پیکان‌ها) مشخص می‌باشد (رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی، درشت‌نمایی ×٤٠٠).



شکل ۳ - نمای ریزبینی از برش طولی عصب سیاتیک در محل له‌شدگی عصب در پایان هفته چهارم: A) گروه آزمایش تحت درمان با تاکرولیموس، تورم جزئی آکسونی (پیکان‌ها) و نیز حضور خفیفی از سلول‌های التهابی (نوک پیکان‌ها) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠). B) گروه آزمایش تحت درمان با تاکرولیموس، بیان ژن GFAP (پیکان‌ها) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی، درشت‌نمایی ×٤٠٠). C) گروه کنترل، تورم آکسون (پیکان‌ها) و حضور خفیفی از سلول‌های التهابی (نوک پیکان‌ها) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠). D) گروه کنترل، بیان ژن GFAP (پیکان‌ها) مشخص می‌باشد (رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی، درشت‌نمایی ×٤٠٠).

جدول ۱- درجه‌بندی شاخص آسیب عصبی و مقایسه نتایج هیستوپاتولوژی و ایمنوهیستوشیمی در حیوانات گروه‌های مورد مطالعه در پایان هفته‌های دوم و چهارم (نتایج به صورت میانگین± انحراف استاندارد ارائه شده‌است)

پارامترها	امتیازدهی		هفته نمونه‌گیری	نتایج در گروه‌های مورد مطالعه	
				اول (تاکرولیموس)	دوم (عدم مصرف دارو)
تشکیل پرینوریوم	عدم تشکیل	۰	هفته دوم	۳/۷۵±۰/۲۵[a]	۳/۷۵±۰/۲[a]
	کمتر از ۲۵ درصد (کم)	۱			
	بین ۵۰-۲۵ درصد (متوسط)	۲	هفته چهارم	٤[a]	٤[a]
	بین ۷۵-۵۰ درصد (زیاد)	۳			
	تشکیل کامل	٤			
حضور سلول التهابی	بیش از ۷۵ درصد (برجسته)	۰	هفته دوم	۲/۷٦±۰/٦٦[a]	۱/۲۵±۰/۱[b]
	بین ۷۵-۵۰ درصد (متوسط)	۱			
	بین ۵۰-۲۵ درصد (خفیف)	۲	هفته چهارم	۳/۲۵±۰/۵۹[a]	۳/۲۵±۰/۵٤[a]
	کمتر از ۲۵ درصد (جزئی)	۳			
	عدم حضور	٤			
تورم آکسون	بیش از ۷۵ درصد (برجسته)	۰	هفته دوم	۲/۷۵±۰/٦۷[a]	۱/۵±۰/۳[b]
	بین ۷۵ تا ۵۰ درصد (متوسط)	۱			
	بین ۵۰ تا ۲۵ درصد (خفیف)	۲	هفته چهارم	۳/۲۵±۰/۲۱[a]	۲/۷۵±۰/۳٤[b]
	کمتر از ۲۵ درصد (جزئی)	۳			
	عدم تورم	٤			
شمار آکسون	کمتر از ۲۵ درصد عصب طبیعی	۰	هفته دوم	۲/۷۵±۰/۵۷[a]	۱/۵±۰/۱۵[b]
	۲۵ درصد عصب طبیعی	۱			
	۵۰ درصد عصب طبیعی	۲	هفته چهارم	۳/۵±۰/۳۵[a]	۲/۲۵±۰/۲[b]
	۷۵ درصد عصب طبیعی	۳			
	مشابه عصب طبیعی	٤			
بیان ژن GFAP	عدم بیان	۰	هفته دوم	+۲/۲۵±۰/۱٤[a]	+۲/۷۵±۰/۵۱[b]
	بیان پراکنده	+۱			
	بیان ملایم (کمتر از ۲۵ درصد)	+۲	هفته چهارم	+۳/۲۵±۰/۲۵[a]	+۳±۰/۱۲[b]
	بیان متوسط (بین ۲۵-۵۰ درصد)	+۳			
	بیان شدید (بیش از ۵۰ درصد)	+٤			

a و b: حروف غیرهمسان نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثرات داروی تاکرولیموس بر ترمیم ضایعات عصب سیاتیک در موش سوری مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد در پایان مطالعه گروه درمانی دریافت‌کننده تاکرولیموس در شاخص‌های ارزیابی حضور التهاب، تورم آکسونی و شمارش آن نتایج بهتری را در مقایسه با گروه کنترل دارد، همچنین ارزیابی شاخص میزان بیان ژن GFAP در گروه تحت درمان با تاکرولیموس نتایج بهتری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد.

آسیب اعصاب محیطی از مهم‌ترین مشکلاتی است که سالیانه درصد بالایی از انسان‌ها وحیوانات را متاثر می‌کند (Mekaj *et al*., 2014; Shabeed *et al*., 2018). با وجود توانایی اعصاب محیطی در بازسازی خودبخودی، بعد از وارد آمدن آسیب، عموماً این ترمیم به تنهایی کافی نیست (Mekaj *et al*., 2014; Mesquit Coutinho *et al*., 2016; Suchyta *et al*., 2017). روش‌های درمانی متنوعی با هدف تقویت نوزایش آکسون و افزایش میزان عصب‌رسانی مجدد ناحیه هدف، مورد آزمون قرار گرفته است. در سال‌های اخیر نقش دارودرمانی به منظور تسریع بهبود اندام‌ها و کاهش دوران نقاهت در بیماران مورد توجه می‌باشد (Islamov *et al*., 2002; Islamov *et al*., 2003; Fargo *et al*., 2009; Devesa *et al*., 2012; Mekaj *et al*., 2014; Suchyta *et al*., 2017; Shabeed *et al*., 2018). با توجه به رخداد بالای آسیب‌های اعصاب محیطی و مراجعات بالینی فراوان در پی تصادفات در انسان‌ها وحیوانات و نیز اهمیت دارودرمانی در بهبود ضایعات عصبی، در بررسی حاضر تلاش برای ارزیابی عملکرد داروی تاکرولیموس، به عنوان یکی از داروهای موثر در بهبود ضایعات عصبی، با هدف سرعت بخشیدن به روندهای التیام اعصاب آسیب دیده و کاهش شدت التهاب، در مقایسه با ترمیم خودبخودی اعصاب، در الگوی حیوانی موش سوری متعاقب آسیب له‌شدگی عصب سیاتیک انجام پذیرفته است.

دو مدل گیرنده برای تاکرولیموس وجود دارد، گیرنده‌های پروتئینی ۱۲ (FKBP12) که مسئول اثرات تضعیف‌کنندگی سیستم ایمنی هستند و با اتصال تاکرولیموس به این دسته از گیرنده‌ها، مکانیسم تضعیف‌کنندگی سیستم ایمنی، با مهار واسطه‌های ایمنی کلسی‌نورینی و کاهش تولید سایتوکین‌های التهابی، انجام می‌گردد. در مقابل، مکانیسم دقیق و مجزای دیگری با اتصال تاکرولیموس به گیرنده‌های پروتئینی ۵۲ (FKBP52) انجام می‌گردد که در ارتباط با اثرات رژانراسیون عصبی و مجزا از عملکرد تضعیف‌کنندگی سیستم ایمنی می‌باشد. این دو عملکرد مجزا و اختصاصی، در بررسی‌های وانگ وهمکاران در سال ۱۹۹۷ (Wang *et al*., 1997)، گراند و همکاران در سال۲۰۰۲ (Grand *et al*., 2002) و نیز مکاج و همکاران در سال ۲۰۱٤ (Mekaj *et al*., 2014) بیان شده است. در بررسی‌های فراوان در الگوهای گوناگون حیوانی و بخش‌های مختلف سیستم عصبی، نقش حمایتی و حفاظتی تاکرولیموس در اعصاب شناخته شده است، به‌طوری که اتصال دارو به گیرنده‌های اختصاصی پروتئین ۵۲ (FKBP52)، سبب افزایش روند نوزایش آکسون و تحریک رشد آکسونی با واسطه‌های پروتئینی، بروز عملکردهای حفاظتی از نورون در پی آسیب، کاهش التهاب از طریق روندهای کاهشی

اینترلوکین ۲ و نیز کاهش روند تشکیل اسکار و نیز افزایش سرعت بازسازی عصب می‌گردد (Mekaj *et al*., 2014; Mesquit Coutinho *et al*., 2016; Suchyta *et al*., 2017; Shabeed *et al*., 2018).

در مطالعه حاضر با توجه به عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در تشکیل پرینوریوم در گروه‌های مطالعه در پایان هفته‌های دوم و چهارم (جدول ۱)، به نظر می‌رسد روند ترمیم پرینوریوم با توجه به شدت آسیب تا قبل از دو هفته انجام شده است که این نتیجه با بررسی الویتز و همکاران در سال ۲۰۱۸، مطابقت دارد (Alvites *et al*., 2018). همچنین از آنجایی که نفوذ سلول‌های التهابی، تورم آکسون و شمارش آن در پایان هفته دوم در گروه درمانی اختلاف آماری معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داده است (جدول ۱)، می‌توان به نقش ضدالتهابی تاکرولیموس و نیز نقش آن در تسریع بهبودی ضایعات عصبی با کاهش تورم آکسون و نوزایش سریع آن در مدت دو هفته اشاره نمود که این امر با نتایج بررسی‌های انجام شده در مطالعات یانگ و همکاران در سال ۲۰۰۱ (Yang *et al*., 2001)، سوچیتا و همکاران در سال ۲۰۱۷ (Suchyta *et al*., 2017) و شابید و همکاران در سال ۲۰۱۸ (Shabeed *et al*., 2018) در مورد نقش ضدالتهابی و حفاظتی اعصاب با مصرف تاکرولیموس، مطابقت دارد. در مطالعات گسترده‌ای که مکاج و همکاران پیرامون عوامل دارویی مختلف و موثر در بهبود ضایعات عصبی در سال ۲۰۱٤ انجام دادند (Mekaj *et al*., 2014) به اهمیت تاکرولیموس، به عنوان یکی از عوامل دارویی موثر بر نوزایش عصب اشاره نمودند و بیان کردند که تاکرولیموس با نقش ضدالتهابی و کمک به کاهش اسکار در محل ترمیم، می‌تواند سبب بهبود سریع‌تر ضایعات عصبی گردد. همچنین نتایج مشابهی نیز در مطالعات جداگانه سوچیتا و همکاران در سال ۲۰۱۷ (Suchyta *et al*., 2017) و شابید و همکاران در سال ۲۰۱۸ (Shabeed *et al*., 2018) به‌دست آمده و نقش ضدالتهابی تاکرولیموس و اهمیت آن در ترمیم عصب را تایید نموده‌اند. با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد تاکرولیموس توانسته در مدت دو هفته به تسریع بهبودی ضایعات عصبی بپردازد که این امر وابسته به کاهش فاز التهابی و اسکار در محل ضایعات بوده‌است، در حالی که کاهش التهاب در گروه کنترل، طولانی‌تر بود و حاکی از آن است که روند ترمیم خودبخودی، کندتر بوده و در مدت زمان چهار هفته‌ای، فاز التهابی کاهش یافته‌است. این یافته با تایید مجدد نتایج مطالعات انجام شده (مطالعات مکاج وهمکاران در سال ۲۰۱٤ و نیز شابید و همکاران در سال ۲۰۱۸)، تاکرولیموس را داروی موثری در کاهش فاز التهاب در مدت زمان دو هفته در نظر می‌گیرد که سبب کمک در بهبودی ضایعات عصبی می‌شود (Mekag *et al*., 2014; Shabeed *et al*., 2018).

از طرف دیگر همان طور که در بررسی‌های مکاج و همکاران در سال ۲۰۱٤ (Mekaj *et al*., 2014)، سوچیتا و همکاران در سال ۲۰۱۷ (Suchyta *et al*., 2017) و شابید و همکاران در سال ۲۰۱۸ (Shabeed *et al*., 2018) به نقش کاهش ادم آکسون و متعاقباً افزایش تعداد آکسون با مصرف تاکرولیموس به عنوان دارویی موثر در حفاظت اعصاب در پی آسیب عصبی اشاره گردیده‌است، نتایج بررسی حاضر نیز تایید می‌نماید که تاکرولیموس توانسته است با کاهش شاخص ادم آکسون

و افـزایش شـمار آن در پایـان هفتـه چهـارم، بهبـودی مناسبی و سریع در ضایعات عصبی ایجاد نماید.

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان بیان نمود کـه تـاکرولیموس از دسـته داروهـای مـوثر در بهبـود ضایعات عصبی می‌باشد کـه بـا کـاهش فـاز التهـابی در محل ضایعه، به برقراری جریان عصبی کمک می‌نماید و نیز با کاهش تـورم آکسـون و افـزایش شـمارش آن، در نوزایش ضایعات عصبی نقش موثری دارد، به طوری که مصرف این دارو در طـی دو هفتـه توانسـته اسـت فـاز التهابی را به میـزان چشـمگیری کـاهش داده و سـرعت ترمیم را در مقایسه با گروهی کـه ایـن دارو را دریافـت نکرده انـد، بیشـتر نمایـد و نیـز در پایـان هفتـه چهـارم کاهش تورم آکسون و شمار نـوزایش را بـه طـور قابـل ملاحظه‌ای بهبود بخشد. از این‌رو می تـوان بیـان نمـود مصرف این دارو با کاهش فاز التهابی و تورم آکسونی و نیز افزایش تعداد آکسون در برقراری سریع و در فاصـله زمانی کوتاه‌تری نسبت به ترمیم خودبخودی موثر واقـع می‌شود و مصرف آن در ضایعات عصبی سبب افـزایش سرعت بهبودی عصبی و کاهش دوران نقاهـت بیمـاران می‌گردد.

با توجـه بـه نتـایج حاصـله از مطالعـه حاضـر و نقـش تسریع‌کنندگی بهبود ضایعات عصبی بـا مصـرف داروی تاکرولیموس در مدت زمان دو هفتـه، می‌تـوان مصـرف این دارو را با میزان درجات مختلفی از آسـیب عصـبی، در الگوی‌هـای گونـاگون حیـوانی، در سـایر اعصـاب محیطی مثل عصب رادیال پیشـنهاد نمـود. همچنـین بـه نظر می‌رسد که مصرف توام تاکرولیموس همراه با سـایر روش‌هـــا، از جملـــه فیزیـــوتراپی، می‌توانـــد نتـــایج مطلوب‌تری در زمینه تسریع بهبودی و نوزایش ضایعات عصبی حاصل کند.

سپاسگزاری

نویسـندگان بـر خـود لازم می‌داننـد از کارکنـان و پرسنل محترم بخش آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده علـوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسـلامی واحـد علـوم وتحقیقات تهران، تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعـلام می‌دارنـد کـه هـیچ‌گونـه تضـاد منافع‌ای ندارند.

منابع

- Alvites, R., Caseiro, A.R., Pedrosa, S.S., Branquinho, M.V., Ronchi, G., Geuna, S., *et al*. (2018). Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. Cogent Medicine, 5(1): 1-45.
- Blackshaw, J.K., Fenwick, D.C., Beattie, A.W. and Allan, D.J. (1988). The behavior of chicken, mice and rats during euthanasia with chloroform, carbon dioxide and ether. Laboratory Animals, 22(1): 67-75.
- Caner, B., Kafa, M.I., Bekar, A., Kurt, M.A., Karli, N., Cansev, M., *et al*. (2012). Intraperitoneal administration of CDP- choline or a combination of cytidine plus choline improves nerve

regeneration and functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. Neuro Research, 34(3): 238-245.

- Danzi, M.C., Motti, D., Avison, D.L., Bixby, J.L. and Lemmon, V.P. (2016). Treatment with analgesics after mouse sciatic nerve injury does not alter expression of wound healing-associated genes. Neural Regeneration Research, 11(1): 144-149.
- Darzian Rostami, Z., Asghari, A., Jahandideh A., Mortazavi, P. and Akbarzadeh, A. (2020). Effect of oat (Avena Sativa L.) extraction on experimental sciatic nerve injury in rats. Archive of Razi Institute, 75(2): 249-256.
- Devesa, P., Gelabert, M., Gonzlez-Mosquera, T., Gallego, R., Relova, J.L., Devesa, J., *et al*. (2012). Growth hormone treatment enhances the functional recovery of sciatic nerves after transection and repair. Muscle & Nerve, 45(3): 385-392.
- Dewey, C.W. and Coates, J.R. (2003). Miscellaneous spinal condition and peripheral nerve injuries. In: Textbook of Small Animal Surgery. Sharp, N.J.H. editor. 3rd ed., USA, Philadelphia: Elsevier Science, pp: 1209-1226.
- Fargo, K.N., Foecking, EM., Jones, K.J. and Sengelaub, D.R. (2009). Neuroprotective action of androgen on motoneurons. Frontiers in Neuroendocrinology, 30(2): 130-141.
- Grand, A.G., Myckatyn, T.M., Mackinnon, S.E. and Hunter, D.A. (2002). Axonal regeneration after cold preservation of nerve allografts and immunosuppression with tacrolimus in mice. Journal of Neurosurgery, 96 (5): 944-932.
- Islamov, R.R., Hendricks, W.A., Jones, R.J., Lyall, G.J., Spanier, N.S. and Murashov, A.K. (2002). 17B-estradiol stimulation regeneration of sciatic nerve in female mice. Brain Research, 943(2): 283- 286.
- Islamov, R.R., Hendricks, W.A., Katwa, L.C., McMurray, R.J., Pak, E.S., Spanier, N.S., *et al*. (2003). Effect of 17B- estradiol in lumbar spinal cord following sciatic nerve crush injury in ovariectomized mice. Brain Research, 966(1): 65-75.
- Mahloujiyan, A., Jahandideh, A., Asghari, A. and Mortazavi, P. (2020). Experimental evaluation of the effect of folic acid on corneal burn ulcer healing in New Zealand white rabbit. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 13(52): 371-383. [In Persian]
- Mekaj, A.Y., Morina, A.A., Bytyqi, C.I., Mekaj, Y.H. and Duci, S.B. (2014). Application of topical pharmacological agents at the site of peripheral nerve injury and methods used for evaluating the success of the regenerative process. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 9(94): 1-7.
- Mesquit Coutinho, P.R., Cristante, A.F., Barros Filho, T.E.P., Ferreira, R. and Santos, G.B. (2016). Effect of tacrolimus and erythropoietin in experimental spinal cord lesion in rats: functional and histological evaluation. Spinal Cord, 54(6): 439- 444.
- Platt, S.R. and Costa, R.C. (2012). Cervical Spine. In: Veterinary Surgery: Small Animal. Tobias, K.M. and Johnston, S.A. editors. First ed., USA, Maryland: Elsevier Saunders, pp: 410-448.
- Reyhani Rad, S., Mohajeri, D., Mousavi, Gh., Mahmoudi, J., Rezaie, A. and Yazdchi, S. (2009). Histometric and histopathological evaluation of the effect of Sertraline following cutaneous surgical trauma in the rat. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 3(2): 465-477. [In Persian]
- Shabeed, D., Najafi, M., Keshavarz, M., Musa. A.E, Hassanzadeh, G., Hadian. M.R., *et al*. (2018). Recent finding in repair of peripheral nerve lesions using pharmacological agents: Common methods for evaluating the repair process. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 18(3): 1-12.
- Suchyta, M.A., Sabbagh, M.D., Morsy, M., Mardini, S. and Moran, S.L. (2017). Advances in peripheral nerve regeneration as it relates to VCA. Vascularized Composite Allotransplantation, 3(1,2): 75-88.
- Sun, W., Sun, C., Lin, H., Zhao, H., Wang, J., Ma, H., et al. (2009). The effect of collagen-binding NGF-β on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model. Biomaterials, 30(27): 4649-4656.
- Wallemacq P.E. and Reding R. (1993). FK506 (Tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. Clinical Chemistry, 39(11): 2219- 2228.

- Wang, M.S., Zeleny-Pooley, M. and Gold, B.G. (1997). Comparative dose- dependence study of Fk506 and cyclosporine A on the rate of axonal regeneration in the Rat Sciatic Nerve. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 282(2): 1084-1093.
- Yadegar, O., Asghari, A. and Hesaraki, S. (2013). Evaluation of wound healing activity of Commiphoramyrrha extract compared with silver sulfadiazine on experimental skin burn healing in rat. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 7(3): 173-182. [In Persian]
- Yang, R.K., Lowe, J.B., Sobol, J.B., Sen, S.K., Hunter, D.A. and Mackinnon, S.E. (2001). Dose-dependent effects of Fk506 on neuroregeneration in a rat model. Plastic and Reconstructive Surgery, 112(7): 1832-1840.