



Research Article

## Effects of Methylprednisolone Administration on the Regenerative Capacity of the Distal Segment of the Transected Sciatic Nerve in Conditions of Delayed Nerve Repair

Samira Bolandghamat <sup>1</sup> , Morteza Behnam-Rassouli <sup>2,\*</sup> , Nasser Mahdavi-Shahri <sup>2</sup> , Ali Moghimi <sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Ph.D. Candidate in Animal Science (Animal Physiology), Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

\* **Corresponding author:** Morteza Behnam-Rassouli, Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. E-mail: [behnam@um.ac.ir](mailto:behnam@um.ac.ir)

DOI: [10.52547/nkums.13.2.16](https://doi.org/10.52547/nkums.13.2.16)

### How to Cite this Article:

Bolandghamat S, Behnam-Rassouli M, Mahdavi-Shahri N, Moghimi A. Effects of Methylprednisolone Administration on the Regenerative Capacity of the Distal Segment of the Transected Sciatic Nerve in Conditions of Delayed Nerve Repair. *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2021;**13**(2):16-23. DOI: [10.29252/nkjms-13023](https://doi.org/10.29252/nkjms-13023)

Received: 09 Jan 2021

Accepted: 13 Mar 2021

### Keywords:

Methylprednisolone, Nerve Repair, Delayed Nerve Repair, Sciatic Nerve

### Abstract

**Introduction:** Pharmacotherapy is a cheap, accessible and non-invasive treatment that can be used in the first hours after the nerve injury. Although using some drugs after nerve injury accelerates the nerve repair process. But their functional outcomes are still not satisfactory. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of methylprednisolone (MP) administration on maintaining the regenerative capacity of the distal segment of the transected sciatic nerve in conditions of delayed nerve repair.

**Methods:** The sciatic nerve of male rats (250-300 g) was transected and the animals were interaperitoneally administrated MP succinate (2 mg/kg, n=8) and saline (control group, n=8) for 1 month. In the sham group (Control group, n=5), the sciatic nerve was only exposed. After 1 month, the transected nerve was repaired. Fourteen weeks after surgical repair, morphometric and electron microscopic evaluations were performed on the nerve.

**Results:** In the present study, the mean axonal cross-section area, myelinated fiber diameter, axonal diameter and myelin thickness were significantly higher in the MP distal segment compared to that of the control group ( $P<0.01$ ). Also, the majority of the fibers in the MP group had a normal myelin sheath and normal Schwann cell nuclei in the electron micrographs.

**Conclusions:** The results of this study showed that, in the situations that immediate nerve repair using surgery is not possible, methylprednisolone administration preserves the axonal regenerative capacity of the distal segment of the transected nerve.



## بررسی اثرات تجویز متیل پردنیزولون بر ظرفیت ترمیمی بخش دیستال عصب سیاتیک قطع شده، در شرایط ترمیم عصب با تأخیر

سمیرا بلندقامت<sup>۱</sup>، مرتضی بهنام رسولی<sup>۲\*</sup>، ناصر مهدوی شهری<sup>۲</sup>، علی مقیمی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکترای علوم جانوری گرایش فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

<sup>۲</sup> استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

\* نویسنده مسئول: مرتضی بهنام رسولی، استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران. ایمیل:

behnam@um.ac.ir

DOI: 10.52547/nkums.13.2.16

### چکیده

**مقدمه:** دارو درمانی تیماری ارزان، در دسترس و غیرتهاجمی است که می تواند در اولین ساعات بعد از آسیب عصبی مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه استفاده از برخی از داروها پس از آسیب عصبی منجر به تسریع روند ترمیم عصب می شود، اما نتایج عملکردی آنها هنوز رضایت بخش نمی باشد. از اینرو، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثرات تجویز متیل پردنیزولون بر حفظ ظرفیت ترمیمی بخش دیستال عصب قطع شده، در شرایط ترمیم عصب با تأخیر بوده است.

**روش کار:** عصب سیاتیک موش های صحرایی نر (۳۰۰-۲۵۰ گرم) قطع گردید و حیوانات متیل پردنیزولون سوکسینات (با دوز ۲mg/kg (n=8) و سالین (کنترل، n=8) را به صورت داخل صفاقی به مدت ۱ ماه دریافت کردند. در گروه شم (n=5)، عصب فقط آشکار شد. بعد از یک ماه، عصب قطع شده با یک الیوگرافت ترمیم شد. چهارده هفته بعد از ترمیم عصب، ارزیابی های ریزخت سنجی و میکروسکوپ الکترونی بر روی عصب انجام شد.

**یافته ها:** در پژوهش حاضر، میانگین مساحت سطح مقطع فیبر، قطر فیبر، قطر آکسون و ضخامت میلین در بخش دیستال عصب در گروه متیل پردنیزولون به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود ( $P < 0.01$ ). همچنین اکثریت فیبرها در گروه متیل پردنیزولون دارای غلاف میلین طبیعی و هسته سلول های شوان طبیعی در میکروگراف های الکترونی بودند.

**نتیجه گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد در موقعیت هایی که ترمیم فوری عصب با جراحی امکان پذیر نیست، تجویز متیل پردنیزولون باعث حفظ ظرفیت رژنراسیون آکسونی بخش دیستال عصب قطع شده می شود.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳

واژگان کلیدی:

متیل پردنیزولون، ترمیم عصب، ترمیم عصب با تأخیر، عصب سیاتیک

### مقدمه

اگرچه مدل های آسیب عصبی در جوندگان درک ما را از ترمیم اعصاب محیطی افزایش داده است، اما کاربردهای بالینی آن ها نادر بوده اند، زیرا این مدل ها با وضعیت آسیب های عصبی انسانی منطبق نیستند (۱). بر خلاف مدل موشی، ترمیم فوری در آسیب های عصبی انسانی، به دلیل التهاب، وضعیت کلی بیمار یا انجام تست های تشخیصی امکان پذیر نیست (۲، ۳). همچنین در آسیب های انسانی، آکسون ها باید مسافت طولانی تری را برای ترمیم طی کنند که باعث می شود بخش دیستال عصب و بافت هدف به مدت طولانی بدون تماس آکسونی باقی بمانند (۱). سلولهای شوان در بخش دیستال عصب به علت عدم تماس با نورون های پروکسیمال در طولانی مدت دچار آتروفی می شوند که با کاهش بیان فاکتورهای رشد عصبی، تغییر در ماتریکس خارج سلولی و از بین رفتن لایه بازال سلول شوان همراه است. از طرف دیگر، بروز آتروفی و سایر تغییرات ناشی از فقدان عصب در بافت هدف، بازایی عملکرد را حتی در صورت رشد مجدد آکسونها دشوار می سازد. بنابراین استفاده از روش هایی به منظور افزایش سرعت رشد آکسونی و نیز حفظ سلول های شوان و بافت های هدف در حالت سالم تا عصب دهی

مجدد مورد نیاز است (۱). از اینرو مدل های جانوری تأخیر در ترمیم عصب بیشتر به مدل های انسانی ترمیم عصب شباهت دارند و قابل ترجمه به آن هستند (۴). از طرف دیگر، کاهش عملکرد اندام به دنبال تأخیر در ترمیم عصب (۴)، لزوم مداخلات دارویی در این زمینه را آشکار می سازد. متیل پردنیزولون دارویی از خانواده گلوکوکورتیکوئیدها است که به عنوان درمانی استاندارد برای آسیب نخاعی حاد، فلج عصب صورت با علت نامشخص و اسکروز چندگانه در نظر گرفته می شود (۵-۸). گلوکوکورتیکوئیدها دارو های ضد التهابی و کاهش دهنده ادم هستند (۹، ۱۰). علاوه بر این، متیل پردنیزولون از طریق مکانیزم هایی فراتر از اثر ضد التهابی خود عمل می کند. مطالعات بر روی اعصاب محیطی نشان داده است تیمار با متیل پردنیزولون باعث افزایش بیان پروتئین همراه رشد-۴۳ (GAP-43) (۱۱)، فاکتور رشد عصبی (NGF) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) (۱۲) در اعصاب آسیب دیده می شود. متیل پردنیزولون همچنین باعث کاهش استرس اکسیداتیو (۱۳، ۱۴) و مانع از افزایش کلانژ اندونوریالی (۱۵، ۱۶) پس از آسیب اعصاب محیطی می شود. تزریق متیل پردنیزولون به صورت

۲ mg/kg، ملوکسی ویت، داروسازی رازک، ایران) را به صورت زیر جلدی دریافت کردند. این دارو نیز روزانه به مدت ۲ روز تزریق شد (۲۰). شروع تیمار های دارویی بلافاصله بعد از پایان جراحی بود و سپس روزانه به مدت یک ماه به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. بعد از یک ماه، حیوانات دوباره بیهوش شده و عصب سیاتیک نمایان شد. ۲ میلیتر از انتهای پروکسیمال و دیستال عصب برداشته شد تا بافت نرم حذف شود. سپس شکاف بین دو انتهای عصب با یک آلواگرافت به طول ۶ میلیتر از عصب سیاتیک موش های سالم به روش اپی نورال ترمیم شد (نخ بخیه ۸-۰). پوست و عضله بسته شد و حیوانات به مدت ۱۴ هفته بعد از آن نگهداری شدند. به دلیل اتوتومی (خوردن انگشتان پا)، انجام تست های رفتاری مقدور نبود. در پایان هفته چهاردهم، حیوانات کشته شدند و از بخش های گرافت و دیستال عصب نمونه برداری شد. سه حیوان از هر یک از گروه های متیل پردنیزولون و کنترل به دلیل جداشدگی گرافت پیوندی از ادامه پژوهش حذف شدند.

### ارزایی ریخت سنجی عصب

۵ میلیتر نمونه از گرافت و بخش دیستال عصب جدا شد و برای تثبیت شدن در فیکساتور گلو تار آلد هید ۲/۵٪ قرار گرفت. آماده سازی نمونه ها در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت. نمونه ها در بافری که در آن فیکساتور تهیه شده بود شسته شده و مراحل آبگیری با اتانول صعودی انجام شد. سپس نفوذ تدریجی با حلال استاندارد اکسید پروپیلن به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد تا جایگزین الکل ۱۰۰٪ گردد. در مرحله بعد نفوذ تدریجی با رزین انجام شد تا در نهایت بافت در رزین خالص قرار گرفت. سپس نمونه ها در رزین قالب گیری شده و برش های عرضی نیمه نازک از نمونه ها با اولترا میکروتوم تهیه شد. پس از آن، نمونه ها با رنگ تولوئیدین بلو ۱٪ رنگ آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری (مدل Olympus Bx51، ژاپن) بررسی شدند (۲۱). عکسبرداری از برش ها با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ (مدل Olympus DP71، ژاپن) انجام شد (شکل ۱). بررسی مورفومتری تصاویر با استفاده از نرم افزار های ImageJ (نسخه ۱.51h) و Digimizer (نسخه 5.4.1) انجام شد (۲۲). تراکم فیبرها در چهار ناحیه غیر مجاور که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، در بزرگنمایی ۴۰۰× اندازه گیری شد (۲۲). همچنین میانگین مساحت سطح مقطع فیبرهای میلین دار، قطر فیبر میلین دار، قطر آکسون، ضخامت میلین و مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی (فضای بین فیبرهای میلین دار) در چهار ناحیه با بزرگنمایی ۱۰۰۰× محاسبه شد. قطر فیبر از روی مساحت فیبر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۳).

$$(\pi/\text{مساحت فیبر}) = (2 \times \sqrt{\text{قطر فیبر}})$$

ضخامت میلین نیز از فرمول  $(D-d)/2$  (ضخامت میلین) محاسبه شد که در آن D قطر فیبر و d قطر آکسون می باشد (۲۴). با توجه به اینکه مساحت پایه هر خانه مورد بررسی  $1000 \mu\text{m}^2$  بود، مساحت خالص فضای داخل فاسیکولی در هر خانه طبق فرمول  $(a - b)$  محاسبه شد. در این فرمول a فضای داخل فاسیکولی خالص و b مجموع مساحت های سطحی تمام فیبرهای میلین دار در هر خانه است.

داخل صفاقی منجر به بهبود شاخص های ریخت شناسی و الکتروفیزیولوژی عصب آسیب دیده می شود (۱۲). علاوه بر این، کاربرد موضعی هیدروژل های حاوی متیل پردنیزولون با بهبود شاخص های عملکردی و ریخت شناسی عصب آسیب دیده همراه است (۱۱، ۱۶). هر چند مطالعات قبلی اثرات مفید متیل پردنیزولون را بر ترمیم عصب به دنبال جراحی ترمیمی فوری عصب نشان داده اند (۱۱-۱۶)، اما اثرات آن در مدل تأخیر در جراحی ترمیمی عصب تاکنون مطالعه نشده است. از اینرو، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثرات تجویز متیل پردنیزولون بر حفظ ظرفیت ترمیمی بخش دیستال عصب قطع شده، در شرایط ترمیم عصب با تأخیر بوده است.

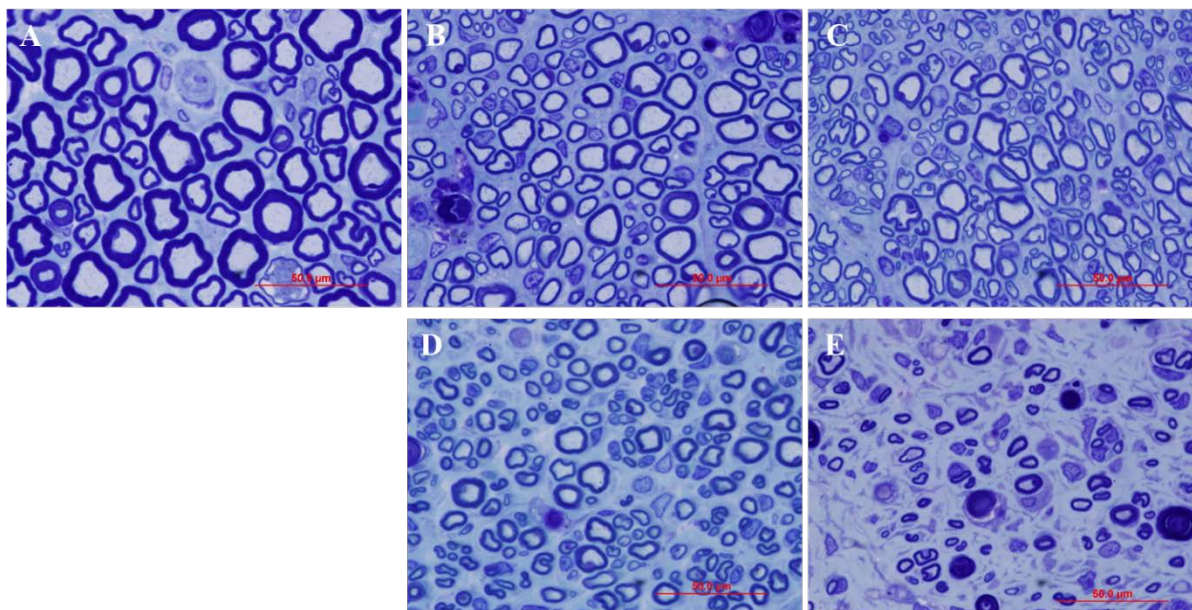
## روش کار

### حیوانات آزمایشی

۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار، با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم (سن ۳ ماهه) در حیوانخانه دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد پرورش داده شدند. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $21 \pm 1$  درجه سانتیگراد با دسترسی آزادانه به آب و خوراک نگهداری شدند. در کلیه مراحل پژوهش، مقررات اخلاق زیستی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. دستور العمل آزمایشی توسط کمیته ملی اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی به تصویب رسید. (ID: IR.UM.REC.1398.090) حیوانات به سه گروه تقسیم شدند: ۱- گروه متیل پردنیزولون ( $n=8$ ): حیوانات تحت جراحی قطع عصب سیاتیک قرار گرفتند و سپس دوز ۲ mg/kg متیل پردنیزولون سوکسینات (مدولین، داروسازی روناک، ایران) را به صورت محلول در سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی به مدت یک ماه دریافت کردند (۱۲، ۱۷). ۲- گروه کنترل ( $n=8$ ): پس از قطع عصب سیاتیک، حیوانات سرم فیزیولوژی را به صورت داخل صفاقی به مدت یک ماه دریافت کردند. ۳- گروه شم ( $n=5$ ): در این گروه عصب سیاتیک فقط آشکار شد و قطع نشد.

### روش جراحی

جراحی تحت شرایط آسپتیک انجام شد. بعد از بیهوشی عمیق حیوانات (کتامین ۹۰ mg/kg + زایلازین ۵ mg/kg، آلفاسان، هلند)، عصب سیاتیک پای راست آنها نمایان شده و در قسمت میانی ران با تیغ جراحی برش داده شد. برای جلوگیری از ترمیم عصب، هر انتهای عصب بر روی خودش برگردانده شده و با استفاده از نخ بخیه نایلون ۸-۰ به صورت اپی نورال به خودش بخیه شد (به شکل حلقه مانند) (۱۷). جهت اطمینان بیشتر از جوش نخوردن دو انتهای عصب در صورت پارگی نخ بخیه، انتهای پروکسیمال عصب در زیر عضله سدادی درونی قرار گرفت. عضله و پوست به طور جداگانه با نخ بخیه سیلک ۴-۰ بخیه شدند. در گروه شم، عصب سیاتیک فقط نمایان شد و قطع نشد. به منظور پروفیلاکسی، آنتی بیوتیک سفازولین (دارو سازی اکسیر، ایران) با دوز ۳۰ mg/kg به صورت زیر جلدی نیم ساعت قبل از شروع جراحی تزریق شد (۱۸، ۱۹) و پس از آن روزانه به مدت ۲ روز تزریق شد. همچنین حیوانات بعد از پایان جراحی داروی ضد درد ملوکسیکام

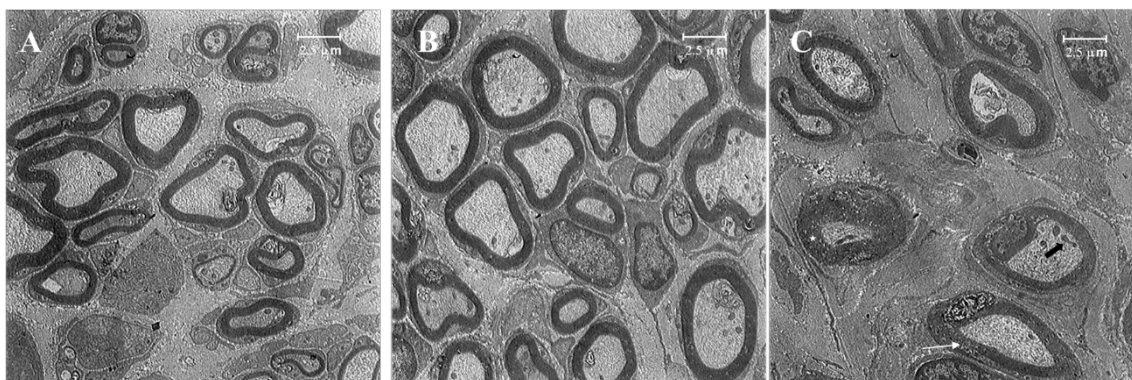


شکل ۱. برش های عرضی نیمه نازک از عصب سیاتیک با رنگ آمیزی تولوئیدین بلو در پایان هفته ۱۴ پس از ترمیم عصب. (A) گروه شم، (B) بخش گرافت عصب در گروه متیل پردنیزولون، (C) بخش دیستال عصب در گروه متیل پردنیزولون، (D) بخش گرافت عصب در گروه کنترل، (E) بخش دیستال عصب در گروه کنترل. مقیاس خطی ۵۰ μm.

بندی، درجه صفر برای طبیعی بودن غلاف میلین، درجه یک برای وزیکول دار بودن غلاف میلین، درجه دو برای جداسازی لایه های میلین، درجه سه برای نمای لانه زنبوری میلین و درجه چهار برای فروریختگی کلی ساختار میلین به کار برده شد (۱۲). همچنین غیر طبیعی بودن هسته سلول های شوان (شکل نامنظم و تاخورد) بررسی شد (شکل ۲) (۲۵). درجه تغییرات هسته سلول شوان بر حسب - (فاقد تغییر)، + (تغییر کم)، ++ (متوسط) و +++ (زیاد) بیان شد (۲۶).

### ارزیابی عصب با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

آماده سازی نمونه ها در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. برای بررسی بخش دیستال عصب با TEM (مدل LEO-912AB، Zeiss، آلمان)، برش های نازک (با ضخامت ۴۰-۳۰ نانومتر) از قالب های رزینی زده شد. برش ها با اورانیل استات ۲٪ و سیترات سرب ۰/۴٪ رنگ آمیزی شدند و زیر TEM مشاهده شدند (۲۱). میکروگراف های الکترونی تهیه گردید و ارزیابی کمی ساختار میلین با استفاده از یک سیستم درجه بندی انجام شد (شکل ۲). طبق این درجه



شکل ۲. میکروگراف های الکترونی بخش دیستال عصب سیاتیک در پایان هفته ۱۴ پس از ترمیم عصب. (A) گروه شم دارای فیبرهای میلینه و غیر میلینه طبیعی است. درجات کمی از تخریب غلاف میلین در برخی از فیبرها مشاهده می شود که احتمالاً ناشی از تأخیر در فیکس شدن بافت است. (B) گروه متیل پردنیزولون که دارای فیبر های میلینه بزرگ با غلاف میلین طبیعی می باشد. تعداد کمی از فیبرها دارای غلاف میلین با درجه تخریب ۲ و ستاره غلاف میلین با درجه تخریب ۳ را نشان می دهد. فلش سیاه رنگ یک میتوکندری غیر طبیعی را نشان می دهد. مقیاس خطی ۲/۵ μm.

جداگانه انجام شد. در صورت معنی دار بودن تفاوت ها در این آزمون ( $P\text{-value} < 0/05$ )، گروه ها دو به دو با استفاده از آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney U مقایسه شدند (۲۷). در این آزمون برای کاهش خطای نوع اول، سطح معنی دار ۰/۰۱ و سطح اطمینان ۹۹٪ در نظر

### تجزیه و تحلیل آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics 25 تجزیه و تحلیل شدند. به دلیل کاهش تعداد نمونه ها در هر گروه ( $n=5$ )، مقایسه گروه ها با استفاده از آزمون غیر پارامتری Kruskal-Wallis برای نمونه های مستقل برای بخش های گرافت و دیستال به طور

گرفته شد ( $P\text{-value} < 0/01$ ) از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد (۲۸).

## نتایج

### نتایج حاصل از ارزیابی ریخت سنجی عصب سیاتیک

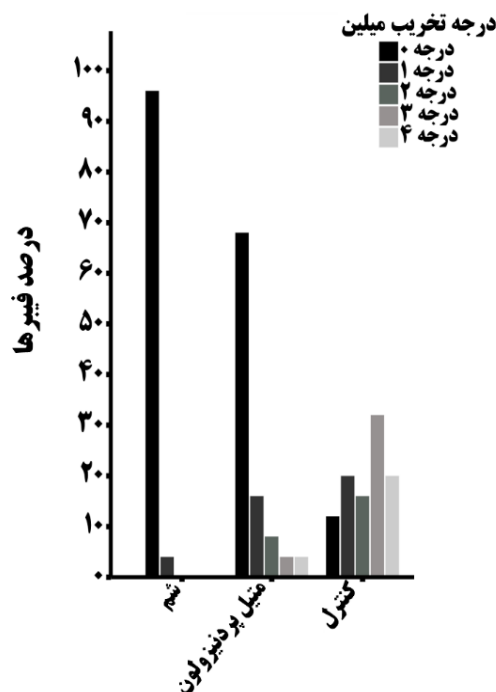
نتایج حاصل از ارزیابی ریخت سنجی عصب در جدول ۱ آمده است. گروه های کنترل و متیل پردنیزولون تفاوت معنی داری را از لحاظ شاخص های ریخت سنجی عصب با گروه شم (سالم) نشان می دادند ( $P < 0/01$ ). مقایسه گروه ها با استفاده از آزمون Mann-Whitney

U نشان داد در پایان هفته چهاردهم، هیچ تفاوت معنی داری از لحاظ میانگین تراکم فیبرها در بخش دیستال عصب در گروه متیل پردنیزولون در مقایسه با گروه کنترل (حلال متیل پردنیزولون) وجود ندارد. از طرفی در بخش دیستال عصب در گروه متیل پردنیزولون افزایش معنی دار قطر فیبرها، قطر آکسون ها، ضخامت میلین، مساحت سطحی فیبر و کاهش معنی دار مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0/01$ ) (جدول ۱). در بخش گرافت، تفاوت معنی داری از لحاظ شاخص های ریخت سنجی عصب بین گروه های متیل پردنیزولون و کنترل مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج حاصل از ارزیابی ریخت سنجی بخش های گرافت و دیستال عصب سیاتیک در پایان هفته ۱۴ پس از پیوند عصب.

| گروه ها                | میانگین تراکم فیبر در $(\mu m^2 \times 5000)$ | میانگین قطر فیبر $(\mu m)$ | میانگین قطر آکسون $(\mu m)$ | میانگین ضخامت میلین $(\mu m)$ | میانگین مساحت فیبر $(\mu m^2)$ | مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی $(1000 \mu m^2)$ |
|------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------|
| شم                     | ۱۳/۵                                          | ۱۹/۸۰                      | ۱۲/۴۹                       | ۳/۶                           | ۳۰۷/۸۱                         | ۳۰۰/۱۴                                         |
| گرافت متیل پردنیزولون  | ۴۱ <sup>a</sup>                               | ۹/۳۴ <sup>a</sup>          | ۶/۸۴ <sup>a</sup>           | ۱/۲۵ <sup>a</sup>             | ۶۸/۵۳ <sup>a</sup>             | ۴۹۰/۱۴ <sup>a</sup>                            |
| دیستال متیل پردنیزولون | ۲۶/۴۹ <sup>a</sup>                            | ۸/۲۳ <sup>a, c, d</sup>    | ۵/۹۳ <sup>a, c, d</sup>     | ۱/۱۶ <sup>a, c, d</sup>       | ۵۳/۱۳ <sup>a, c, d</sup>       | ۶۳۹/۸۴ <sup>a, c, d</sup>                      |
| گرافت کنترل            | ۳۴ <sup>a, b, d</sup>                         | ۸/۳۷ <sup>a, d</sup>       | ۵/۳۷ <sup>a, d</sup>        | ۱/۵ <sup>a, d</sup>           | ۵۴/۸۶ <sup>a, d</sup>          | ۵۰۴/۶۸ <sup>a, b, d</sup>                      |
| دیستال کنترل           | ۱۹ <sup>a</sup>                               | ۵/۹۰ <sup>a</sup>          | ۴/۱۸ <sup>a</sup>           | ۰/۸۶ <sup>a</sup>             | ۲۷/۳۸ <sup>a</sup>             | ۸۶۹/۵۵ <sup>a</sup>                            |

داده ها به صورت میانه نشان داده شده است. مقایسه بخش های گرافت و دیستال گروه ها با استفاده از Mann-Whitney U صورت گرفت.  $n = 5$  و  $a$  در مقایسه با گروه شم معنادار در نظر گرفته شده است ( $P < 0/01$ ).



شکل ۳. پراکنش فیبرهای میلین دار با درجات متفاوتی از تخریب میلین در بخش دیستال عصب سیاتیک پس از ارزیابی میکروگراف های الکترونی در پایان هفته ۱۴ پس از پیوند عصب. ارزیابی کمی ساختار میلین با استفاده از یک سیستم درجه بندی انجام شد طبق این درجه بندی، درجه صفر برای طبیعی بودن غلاف میلین، درجه یک برای وزیکول دار بودن غلاف میلین، درجه دو برای جداسازی لایه های میلین، درجه سه برای نمای لانه زنبوری میلین و درجه چهار برای فروریختگی کلی ساختار میلین به کار برده شد.

### نتایج حاصل از ارزیابی بخش دیستال عصب سیاتیک با

#### استفاده از TEM

نتایج حاصل از ارزیابی میکروگراف های الکترونی بخش دیستال عصب در شکل ۳ و جدول ۲ آمده است. در گروه شم تقریباً تمام فیبرها دارای غلاف میلین سالم (تخریب درجه صفر) بودند. فقط ۴ درصد فیبرها تخریب میلین درجه یک (غلاف میلین وزیکول دار) نشان دادند که احتمالاً ناشی از تأخیر در تثبیت بافت است. همچنین در گروه شم، هسته سلول های شوان طبیعی بودند (شکل ۳، جدول ۲).

در بخش دیستال عصب گروه متیل پردنیزولون، ۶۸٪ فیبرها غلاف میلین سالم داشتند در حالی که ۱۶٪ فیبرها تخریب میلین درجه یک، ۸٪ فیبرها تخریب میلین درجه دو (جداسازی غلاف میلین)، ۴٪ فیبرها تخریب میلین درجه سه (نمای لانه زنبوری میلین) و ۴٪ فیبرها تخریب میلین درجه چهار (فروریختگی کلی ساختار میلین) نشان می دادند (شکل ۳) علاوه بر این در این گروه، اغلب هسته سلول های شوان طبیعی بودند و فقط تعداد کمی از آن ها غیر طبیعی به نظر می رسیدند (جدول ۲).

در گروه کنترل، ۱۲٪ فیبرها دارای غلاف میلین سالم بودند. ۲۰٪ تخریب میلین درجه یک، ۱۶٪ تخریب میلین درجه دو، ۳۲٪ تخریب میلین درجه ۳ و ۲۰٪ تخریب میلین درجه چهار نشان می دادند (شکل ۳). در این گروه اغلب هسته های سلول های شوان غیر طبیعی بودند (جدول ۲).

جدول ۲. میزان تغییرات هسته سلول های شوان پس از ارزیابی الکترون میکروگراف های بخش دیستال عصب سیاتیک در پایان هفته ۱۴ پس از ترمیم عصب.

| گروه ها                | غیر طبیعی بودن هسته سلول شوان |
|------------------------|-------------------------------|
| شم                     | -                             |
| دیستال متیل پردنیزولون | +                             |
| دیستال کنترل           | +++                           |

علامه به معنای عدم وجود تغییرات (-)، تغییرات کم (+) و تغییرات خیلی زیاد (+++). است.

## بحث

یافته های این پژوهش نشان دادند در حالی که تراکم فیبرها در بخش دیستال عصب در دو گروه متیل پردنیزولون (۲ mg/kg) و کنترل (حلال) تفاوت معنی داری را نشان نداد، ولی قطر فیبر ها، قطر آکسون ها، ضخامت میلین و مساحت سطح مقطع فیبر در گروه متیل پردنیزولون به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود. از آنجا که مقایسه گرفت ها تفاوت معنی داری را از لحاظ شاخص های ریخت سنجی عصب نشان نداد، چنین به نظر می رسد که تفاوت بین دو گروه ناشی از تفاوت در ظرفیت رژنراسیون آکسونی بخش دیستال عصب باشد. افزایش قطر فیبر به تدریج در طی رشد آکسون اتفاق می افتد (۲۹). در گروه متیل پردنیزولون، وجود فیبر های قطور در بخش دیستال عصب می تواند نشان دهنده این باشد که ورود آکسون ها به بخش دیستال عصب در این گروه زودتر از گروه کنترل اتفاق افتاده است. به همین ترتیب می توان گفت فیبر های با قطر کم در گروه کنترل، در واقع فیبرهای تازه وارد به بخش دیستال عصب هستند. برای ورود آکسون ها به بخش دیستال باید لوله های اندونوریومی سالم باشند (۳۰). قطع عصب طولانی مدت باعث می شود فضای اندونوریومی دچار تغییرات ساختاری شده و از فیبریل های کلاژن و سلولهای شبه فیبروبلاستی اندونوریومی پر شود (۳۱). بعد از آسیب عصبی، افزایش بیان کلاژن همراه با فاکتور رشد دهنده بتا ( $TGF-\beta$ ) و پروتئولیکان های کندرویتین سولفات در ماتریکس خارج سلولی منجر به ایجاد فیبروز می شود. فیبروز خارج عصبی و داخل عصبی مهمترین مانع برای ورود آکسون های در حال رشد به بخش دیستال عصب است (۳۲). بنابراین مخروط رشد مجبور است با ترشح آنزیم هایی بافت اسکار را حل کند (۳۳) که منجر به تأخیر در ورود آکسون ها به بخش دیستال می شود. این می تواند توضیحی برای کاهش مشاهده شده در قطر آکسون ها در گروه کنترل باشد.

در پژوهش حاضر، مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی (فضای بین فیبرهای میلین دار) در بخش دیستال عصب در گروه متیل پردنیزولون به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود. از آنجا که هیچ تفاوت معنی داری در تراکم فیبرها بین دو گروه مشاهده نشد، افزایش فضای داخل فاسیکولی (در گروه کنترل) می تواند نشان دهنده فیبروز بخش دیستال عصب باشد (۲۹، ۳۴). پژوهش های قبلی نشان داده است تجویز متیل پردنیزولون مانع از افزایش کلاژن اندونوریومی و تشکیل اسکار در محل آسیب عصب محیطی می شود (۱۳، ۱۴). علاوه بر این

تجویز متیل پردنیزولون بعد از آسیب عصب محیطی باعث کاهش استرس اکسیداتیو، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و جلوگیری از آتروفی سلول شوان می شود (۱۲، ۱۷). علاوه بر این، گلوکوکورتیکوئیدها می توانند به عنوان میتوژن های قوی برای تکثیر سلول شوان عمل کنند (۳۵). در مجموع لازم است به این موضوع اشاره شود که اگرچه پژوهش های قبلی اثرات مفید تجویز متیل پردنیزولون را بر ترمیم عصب بعد از پیوند فوری عصب نشان داده اند (۱۱، ۱۲، ۱۵، ۱۶)، اما تا کنون اثرات آن بعد از تأخیر در پیوند عصب مطالعه نشده بود. یافته های این پژوهش نشان داد یک ماه تجویز متیل پردنیزولون قبل از پیوند عصب منجر به بهبود شاخص های ریخت سنجی بخش دیستال عصب سیاتیک می شود.

از طرف دیگر، یافته های مطالعه ی فراساختاری عصب با استفاده TEM نشان داد در گروه متیل پردنیزولون، اکثریت فیبرها در بخش دیستال عصب دارای غلاف میلین و هسته سلول شوان طبیعی می باشند. تنها درصد کمی از فیبر ها در این گروه دارای غلاف میلین در حال تخریب (با درجه تخریب کم) و هسته سلول شوان غیر طبیعی بودند که می تواند مربوط به فیبر هایی باشد که به اندام هدف خود نرسیده اند (۳۶). یافته های این پژوهش همسو با پژوهش های قبلی است که نشان می دهند تجویز متیل پردنیزولون از تشکیل نوروما و تغییرات فراساختاری در عصب آسیب دیده جلوگیری می کند (۱۲، ۳۷). از طرف دیگر در گروه کنترل اگرچه تراکم فیبر ها در زیر میکروسکوپ نوری مشابه گروه متیل پردنیزولون بود اما بررسی عصب با میکروسکوپ الکترونی نشان می دهد که اکثریت فیبرها در این گروه دارای غلاف میلین با درجه تخریب بالا و هسته سلول شوان غیرطبیعی بوده و تعداد فیبر های سالم خیلی کم است. این تفاوت بر ضروری بودن مطالعات فراساختاری عصب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اشاره دارد. تغییرات فراساختاری عصب در گروه های کنترل می تواند ناشی از فیبروز بخش دیستال عصب، آتروفی سلول شوان یا ماهیچه هدف باشد (۴).

از آنجا که شروع تیمارها یک ماه قبل از پیوند گرافت و شروع رژنراسیون آکسونی بود، و نیز عدم تفاوت گرافت ها از نظر کیفیت رژنراسیون آکسونی، می توان نتیجه گرفت اثرات تیمارها فقط ناشی از حفظ ظرفیت رژنراسیون آکسونی بخش دیستال عصب است. یافته های این پژوهش نشان می دهد در شرایطی که ترمیم فیبرها امکان پذیر نیست (تأخیر در جراحی ترمیمی)، تیمار دارویی متیل پردنیزولون با حفظ ساختار بخش دیستال عصب باعث تقویت رشد آکسون ها و ترمیم عصب بعد از پیوند عصب می شود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد (پژوهانه شماره ۳/۴۶۳۸۹) بخاطر پشتیبانی مالی از پژوهش انجام شده اعلام می دارند. (کد اخلاق IR.UM.REC.1398.090).

## References

- Scheib J, Hoke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(12):668-676. doi: 10.1038/nrneurol.2013.227 pmid: 24217518
- Martins RS, Bastos D, Siqueira MG, Heise CO, Teixeira MJ. Traumatic injuries of peripheral nerves: a review with emphasis

- on surgical indication. *Arq Neuropsychiatr.* 2013;**71**(10):811-814. [doi: 10.1590/0004-282X20130127](#) [pmid: 24212521](#)
3. Dahlin LB, Wiberg M. Nerve injuries of the upper extremity and hand. *EFORT Open Rev.* 2017;**2**(5):158-170. [doi: 10.1302/2058-5241.2.160071](#) [pmid: 28630754](#)
4. Jonsson S, Wiberg R, McGrath AM, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN, et al. Effect of delayed peripheral nerve repair on nerve regeneration, Schwann cell function and target muscle recovery. *PLoS One.* 2013;**8**(2):e56484. [doi: 10.1371/journal.pone.0056484](#) [pmid: 23409189](#)
5. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med.* 1990;**322**(20):1405-1411. [doi: 10.1056/NEJM199005173222001](#) [pmid: 2278545](#)
6. Fehlings MG, Wilson JR, Cho N. Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: counterpoint. *Neurosurgery.* 2014;**61** Suppl 1(1):36-42. [doi: 10.1227/NEU.0000000000000412](#) [pmid: 25032529](#)
7. de Almeida JR, Al Khabori M, Guyatt GH, Witterick IJ, Lin VY, Nedzelski JM, et al. Combined corticosteroid and antiviral treatment for Bell palsy: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2009;**302**(9):985-993. [doi: 10.1001/jama.2009.1243](#) [pmid: 19724046](#)
8. Liu S, Liu X, Chen S, Xiao Y, Zhuang W. Oral versus intravenous methylprednisolone for the treatment of multiple sclerosis relapses: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2017;**12**(11):e0188644. [doi: 10.1371/journal.pone.0188644](#) [pmid: 29176905](#)
9. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol.* 2017;**17**(4):233-247. [doi: 10.1038/nri.2017.1](#) [pmid: 28192415](#)
10. Franco LM, Gadkari M, Howe KN, Sun J, Kardava L, Kumar P, et al. Immune regulation by glucocorticoids can be linked to cell type-dependent transcriptional responses. *J Exp Med.* 2019;**216**(2):384-406. [doi: 10.1084/jem.20180595](#) [pmid: 30674564](#)
11. Chao X, Fan Z, Han Y, Wang Y, Li J, Chai R, et al. Effects of local application of methylprednisolone delivered by the C/GP-hydrogel on the recovery of facial nerves. *Acta Otolaryngol.* 2015;**135**(11):1178-1184. [pmid: 26235110](#)
12. Sevik L, Vayisoglu Y, Korlu S, Comelekoglu U, Bozdogan Arpacı R, Aktas S, et al. The Effects of Methylprednisolone and Vitamin A on the Healing of Traumatic Peripheral Nerve Paralysis. *The Journal of International Advanced Otolaryngol.* 2015;**10**(3):275-280. [doi: 10.5152/iao.2014.146](#)
13. Chen YS, Tseng FY, Tan CT, Lin-Shiau SY, Hsu CJ. Effects of methylprednisolone on nitric oxide formation and survival of facial motor neurons after axotomy. *Brain Res.* 2008;**1197**:23-31. [doi: 10.1016/j.brainres.2007.12.046](#) [pmid: 18221735](#)
14. Yanilmaz M, Akduman D, Sagun OF, Haksever M, Yazıcılar O, Orhan I, et al. The effects of aminoguanidine, methylprednisolone, and melatonin on nerve recovery in peripheral facial nerve neurotomy. *J Craniofac Surg.* 2015;**26**(3):667-672. [doi: 10.1097/SCS.0000000000001503](#) [pmid: 25933145](#)
15. Li Q, Li T, Cao XC, Luo DQ, Lian KJ. Methylprednisolone microsphere sustained-release membrane inhibits scar formation at the site of peripheral nerve lesion. *Neural Regen Res.* 2016;**11**(5):835-841. [doi: 10.4103/1673-5374.182713](#) [pmid: 27335571](#)
16. Mehrshad A, Shahraki M, Ehteshamfar S. Local Administration of Methylprednisolone Laden Hydrogel Enhances Functional Recovery of Transected Sciatic Nerve in Rat. *Bull Emerg Trauma.* 2017;**5**(4):231-239. [doi: 10.18869/acadpub.beat.5.4.509](#) [pmid: 29177169](#)
17. Ozturk O, Tezcan AH, Adali Y, Yildirim CH, Aksoy O, Yagmurdu H, et al. Effect of ozone and methylprednisolone treatment following crush type sciatic nerve injury. *Acta Cir Bras.* 2016;**31**(11):730-735. [doi: 10.1590/S0102-865020160110000005](#) [pmid: 27982260](#)
18. Stenberg L, Stossel M, Ronchi G, Geuna S, Yin Y, Mommert S, et al. Regeneration of long-distance peripheral nerve defects after delayed reconstruction in healthy and diabetic rats is supported by immunomodulatory chitosan nerve guides. *BMC Neurosci.* 2017;**18**(1):53. [doi: 10.1186/s12868-017-0374-z](#) [pmid: 28720074](#)
19. Citak MS, Cue JI, Peyton JC, Malangoni MA. The critical relationship of antibiotic dose and bacterial contamination in experimental infection. *J Surg Res.* 1992;**52**(2):127-130. [doi: 10.1016/0022-4804\(92\)90292-8](#) [pmid: 1740934](#)
20. Livingston DH, Wang MT. Continuous infusion of cefazolin is superior to intermittent dosing in decreasing infection after hemorrhagic shock. *The American Journal of Surgery.* 1993;**165**(2):203-207. [doi: 10.1016/s0002-9610\(05\)80507-0](#)
21. Nunamaker EA, Goldman JL, Adams CR, Fortman JD. Evaluation of Analgesic Efficacy of Meloxicam and 2 Formulations of Buprenorphine after Laparotomy in Female Sprague-Dawley Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2018;**57**(5):498-507. [doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-17-000129](#) [pmid: 30092855](#)
22. Dykstra MJ. Biological Electron Microscopy 1992.
23. Moharrami-Kasmaie FM, Jahromi Z, Gazor R. Comparison of melatonin and curcumin effect at the light and dark periods on regeneration of sciatic nerve crush injury in rats. *EXCLI J.* 2019;**18**:653-665.
24. Duval T, Saliani A, Nami H, Nanci A, Stikov N, Leblond H, et al. Axons morphometry in the human spinal cord. *Neuroimage.* 2019;**185**:119-128. [doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.10.033](#) [pmid: 30326296](#)
25. Sakita M, Murakami S, Fujino H, Hayashi S, Kameyama K, Saito T, et al. Remodeling of myelinated fibers and internal capillaries in distal peripheral nerves following aerobic exercise in aged rats. *J Appl Physiol* (1985). 2018;**125**(4):1051-1061. [doi: 10.1152/japplphysiol.00257.2018](#) [pmid: 30024334](#)
26. Kaptanoglu E, Tuncel M, Palaoglu S, Konan A, Demirpence E, Kilinc K. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg.* 2000;**93**(1 Suppl):77-84. [doi: 10.3171/spi.2000.93.1.0077](#) [pmid: 10879762](#)
27. Karlidag T, Yildiz M, Yalcin S, Colakoglu N, Kaygusuz I, Sapmaz E. Evaluation of the effect of methylprednisolone and N-acetylcysteine on anastomotic degeneration and regeneration of the facial nerve. *Auris Nasus Larynx.* 2012;**39**(2):145-150. [doi: 10.1016/j.anl.2011.03.004](#) [pmid: 21601394](#)
28. Saito H, Dahlin LB. Expression of ATF3 and axonal outgrowth are impaired after delayed nerve repair. *BMC Neurosci.* 2008;**9**:88. [doi: 10.1186/1471-2202-9-88](#) [pmid: 18801180](#)
29. Howell DC. Sampling distributions and hypothesis testing. In: *Fundamental statistics for the behavioral sciences.* Cengage Learn. 2014:167-170.
30. Xu C, Kou Y, Zhang P, Han N, Yin X, Deng J, et al. Electrical stimulation promotes regeneration of defective peripheral nerves after delayed repair intervals lasting under one month. *PLoS One.* 2014;**9**(9):e105045. [doi: 10.1371/journal.pone.0105045](#) [pmid: 25181499](#)
31. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.* 2013;**29**(3):317-330. [doi: 10.1016/j.hcl.2013.04.002](#) [pmid: 23895713](#)
32. Ashley Z, Sutherland H, Lanmuller H, Russold MF, Unger E, Bijak M, et al. Atrophy, but not necrosis, in rabbit skeletal muscle denervated for periods up to one year. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;**292**(1):C440-451. [doi: 10.1152/ajpcell.00085.2006](#) [pmid: 17218372](#)
33. Wang ML, Rivlin M, Graham JG, Beredjiklian PK. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connect Tissue Res.* 2019;**60**(1):3-9. [doi: 10.1080/03008207.2018.1489381](#) [pmid: 30187777](#)
34. Santiago-Medina M, Gregus KA, Nichol RH, O'Toole SM, Gomez TM. Regulation of ECM degradation and axon guidance by growth cone invadosomes. *Development.* 2015;**142**(3):486-496. [doi: 10.1242/dev.108266](#) [pmid: 25564649](#)

35. Neuberger TJ, Kalimi O, Regelson W, Kalimi M, De Vries GH. Glucocorticoids enhance the potency of Schwann cell mitogens. *J Neurosci Res.* 1994;**38**(3):300-313. [doi: 10.1002/jnr.490380308](#) [pmid: 7932865](#)
36. Ikeda M, Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav.* 2012;**2**(4):382-390. [doi: 10.1002/brb3.61](#) [pmid: 22950042](#)
37. Becker KW, Kienecker EW, Andrae I. [Effect of locally applied corticoids on the morphology of peripheral nerves following neurotmesis and microsurgical suture]. *Neurochirurgia (Stuttg).* 1987;**30**(6):161-167. [doi: 10.1055/s-2008-1054088](#) [pmid: 3320790](#)