

## مطالعه مصرف همزمان اپالرستت و سیتاگلیپتین در کاهش توسعه و درد موجود در مدل درد نوروپاتیک در رت: نقش اثرات ضدالتهابی و آنتی اکسیداتیو

ابوالفضل عباس زاده<sup>۱</sup> ID، فرشید ترک زبان<sup>۲</sup> ID، محمودرضا مرادخانی<sup>۳</sup> ID، ستایش فرهادی<sup>۴</sup> ID، امین حسنونند<sup>۵</sup> ID  
۱-دانشیار، گروه جراحی پلاستیک و ترمیمی، بیمارستان حضرت فاطمه(س)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
۲-دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران  
۳-دانشیار، گروه بیهوشی، بیمارستان شهدای عشایر، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران  
۴-دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران  
۵-مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران  
۶-دانشیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

یافته / دوره ۲۴ / شماره ۱ / بهار ۱۴۰۱ / مسلسل ۹۱

### چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۲/۱۳

مقدمه: دردهای نوروپاتیک از مهمترین پیامدهای آسیب عصبی هستند که با تظاهرات مختلف از جمله هایپرآلژزیا و آلودینیا نمایان می گردند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر مصرف همزمان اپالرستت و سیتاگلیپتین در کاهش توسعه درد موجود در مدل درد نوروپاتیک CCI در رت از طریق مسیرهای ضد التهابی و آنتی اکسیداتیو می باشد.

مواد و روش ها: جهت انجام آزمایش ۵۰ سر رت نر به ۵ گروه تقسیم شدند: گروه اول: شاهد، گروه دوم: CCI، گروه سوم: CCI+اپالرستت با دوز ۱۰۰ mg/kg، گروه چهارم: CCI+سیتاگلیپتین با دوز ۱۰ mg/kg، گروه پنجم: CCI+اپالرستت با دوز ۱۰۰ mg/kg+سیتاگلیپتین با دوز ۱۰ mg/kg. تست های رفتاری حیوانات در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ پس از جراحی انجام گردید و با نمونه های نخاعی تهیه شده در روز ۱۴، فاکتورهای التهابی و اکسیداتیو بررسی گردید.

یافته ها: نتایج مطالعه ما نشان داد که تزریق همزمان این دو دارو در گروه ۵ نسبت به گروه های ۳ و ۴ بیشترین اثر نوروپروتکتیو را دارا می باشد. نتایج پاسخ های دینامیک به تحریکات مکانیکی در روز چهاردهم نشان داد که در گروه های سوم و چهارم تفاوت معناداری ایجاد نگردید، ولی در گروه پنجم تفاوت معناداری در همه فاکتورها مشخص گردید. نتایج نشان داد که مصرف توأم اپالرستت و سیتاگلیپتین سبب کاهش سطح TNF- $\alpha$ ، IL-6 و MDA و نیز افزایش سطح GPx می شود.

بحث و نتیجه گیری: مصرف همزمان اپالرستت و سیتاگلیپتین می تواند به عنوان داروهای موثر و ایمن برای درمان درد نوروپاتیک با مهار قدرتمند فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو باشند.  
واژه های کلیدی: درد نوروپاتیک، اپالرستت، سیتاگلیپتین، فاکتورهای التهابی، استرس اکسیداتیو.

\*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی.

پست الکترونیک: dr.hasanvand@yahoo.com

## مقدمه

دردهای نوروپاتی از متداولترین مشکلات متعاقب برخی اختلالات از قبیل پلی‌نوروپاتی دیابتیک، سکت، آسیب طناب نخاعی و بافت‌های عصبی محیطی می‌باشد، که متأسفانه موجب کاهش کیفیت زندگی و عدم کارآمدی افراد مبتلا در انجام فعالیت‌های روزمره می‌شود (۱، ۲). از جمله مهمترین علائم کلینیکی و بالین افراد مبتلا به این عارضه، ایجاد اختلال در حس درد می‌باشد که می‌تواند خود را بصورت‌های مختلف از جمله به شکل هایپرآلژزیا، آلودینیا و گاهاً هایپوآلژزیا نمایان گرداند (۳، ۴). با این اوصاف و علیرغم تلاش‌های صورت گرفته، پیدا کردن درمانی مؤثر برای بیماران دچار دردهای نوروپاتی به عنوان چالشی بزرگ مطرح شده است و علت این چالش هم عدم شناسایی مکانیزم دقیق ایجاد و گسترش آن می‌باشد (۵). بررسی‌های متعدد نشان داده‌اند که فعالیت‌های نوروالتهابی شدید ایمنی بخصوص فعالیت فاکتور نسخه‌برداری NF-kB و به دنبال آن تولید مدیاتورهای التهابی نظیر فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور (TNF- $\alpha$ )، اینترلوکین‌های ۱ و ۶ و آنزیم نیتریک اکسید سنتاز قابل القا (iNOS)، و همچنین استرس‌های اکسیداتیو و نیتروژاتیو در شروع و گسترش التهاب در محل آسیب و نهایتاً ایجاد دردهای نوروپاتی نقش اساسی دارند (۶، ۷). مدل آزمایشگاهی آسیب انقباضی مزمن (CCI) که با بروز تغییرات متعدد مولکولی و بیوشیمیایی در سلول‌های عصبی همراه است، به منظور بررسی دردهای نوروپاتی بکار می‌رود (۱).

اپالرستت نوعی داروی مهارکننده‌ی برگشت‌پذیر آنزیم آلدوز ردوکتاز است، که به منظور درمان نوروپاتی دیابتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). در مطالعه‌ی انجام شده در سال ۲۰۱۵ توسط Kaori Yama و همکاران نشان داده شد که اپالرستت قادر به افزایش سطح گلوکاتیون (GSH)، به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت مهم، در سطح سلول‌های

شوان و اندوتلیال است (۹). همچنین در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۸ مشخص شد که دریافت اپالرستت در موش‌های رت دیابتی شده می‌تواند بطور معنی‌داری سطوح GSH و آنزیم کاتالاز را افزایش دهد (۱۰). در مطالعه‌ی دیگر بیان شد که این دارو باعث به تأخیر انداختن پیشرفت نوروپاتی دیابتی شده و همچنین از گسترش رتینوپاتی و نفروپاتی بخوبی می‌تواند جلوگیری کند (۱۱). سیتاگلیپتین از جمله داروهای خوراکی مورد استفاده در بیماران دیابتی است که می‌تواند باعث افزایش ترشح انسولین و کاهش قند خون می‌شود (۱۲). از سویی دیگر، پژوهش‌های مختلف مشخص کرده‌اند که سیتاگلیپتین با مهار مولکول سطحی دی‌پپتیدیل پپتیداز ۴ (DPP-4) و به دنبال آن مهار NF-kB قادر به کنترل فرآیندهای التهابی و آپوپتوز سلولی می‌باشد (۱۳). مطالعه‌ی ای در سال ۲۰۱۳ نشان داد که سیتاگلیپتین می‌تواند بصورت معنی‌داری باعث کاهش سطوح فاکتورهای التهابی مانند TNF- $\alpha$  و پروتئین فعال سی (CRP) شود (۱۴).

با توجه به اینکه تا کنون هیچ مطالعه‌ی اثر مصرف همزمان این دو دارو را روی فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو بررسی نکرده‌اند و با توجه به نقش مهم هر دو عامل التهاب و استرس اکسیداتیو در آغاز و گسترش دردهای نوروپاتی، در این مطالعه اثر مصرف همزمان دو داروی سیتاگلیپتین و اپالرستت بصورت جداگانه و همچنین اثر مصرف همزمان دو دارو در کاهش توسعه و درد موجود در مدل درد نوروپاتی در رت با استفاده از تست‌های رفتاری Von ferry، Radiant Heat Plantar Test و Acetone Test و تغییرات هیستولوژیکی و مورفولوژیکی اعصاب مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه از رت‌های نر نژاد Wistar به وزن ۲۴۰-۲۶۰ گرم که در حیوان‌خانه نگهداری می‌شدند،

### تست‌های رفتاری

#### ۱-۱- Radiant Heat Plantar Test

هر پنج گروه رتهای موردنظر در زمان‌های ۴، ۷ و ۱۴ روز بعد از القای CCI تحت آزمون Radiant Heat Plantar Test قرار گرفتند. در این روش با ایجاد محرک حرارتی توسط دستگاه Radiant heat، تغییرات واکنش‌پذیری غیراختصاصی (پس‌کشیدن پنجه‌ی پا) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶).

#### ۱-۲- Acetone Test

به منظور بررسی حساسیت رت‌ها به آلودینیای حرارتی از تست استون استفاده گردید. برای انجام این تست، ۱۰۰ میکرولیتر استن را به کف پای رت‌ها اسپری کرده و واکنش مورد نظر با استفاده از نمره‌بندی زیر مورد بررسی قرار دادیم:

- ۱- پا کوبیدن سریع، تکان دادن یا پس کشیدن پنجه
  - ۲- تکان دادن مکرر یا پس کشیدن طولانی مدت ۳- تکان دادن مکرر و لیسیدن پنجه.
- در این تست ۳ مرتبه با فواصل زمانی ۵ دقیقه از استون استفاده شد و به منظور بدست آوردن تک نمره برای یک دوره‌ی اضافی ۶۰ ثانیه‌ای، نمرات فردی در فواصل ۲۰ ثانیه‌ای جمع شدند. دامنه نوسان نمرات از صفر تا نه تعریف گردیده است (۱۷).

#### ۱-۳- Von ferry Test

به منظور سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Ferry (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۶ و ۶۰ گرمی) استفاده شد. هر آزمایش، با تار دارای کمترین وزن شروع شده و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به ترتیب از تارهای با وزن بالاتر استفاده گردید. چنانچه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلندکردن پا) توسط حیوان مشاهده می‌گردید، همان وزنه به عنوان آستانه‌ی پس کشیدن پنجه (PWT) یا آستانه‌ی پاسخ ثبت شده

استفاده گردید. تعداد ۵۰ سر رت به وزن رسیده را به مدت ۲۴-۲۰ ساعت گرسنه نگه داشته و بصورت تصادفی و مساوی (n=10)، آن‌ها را در پنج گروه قرار دادیم. گروه اول، رت‌های کنترل سالم دریافت‌کننده‌ی سالیین بود. گروه دوم شامل رت‌هایی بود که به روش جراحی در آن‌ها Chronic Constriction Injury (CCI) را القا کردیم و سالیین دریافت می‌کردند. گروه سوم، رت‌های CCI بود که اپالرستت را با دوز mg/kg ۱۰۰ بصورت داخل صفاقی (Intraperitoneal=IP) دریافت می‌کردند. گروه چهارم شامل رت‌های CCI دریافت‌کننده‌ی سیتاگلیپتین با دوز mg/kg ۱۰ بصورت IP بود. گروه پنجم، رت‌های CCI بود که اپالرستت و سیتاگلیپتین را به ترتیب با دوزهای mg/kg ۱۰۰ و mg/kg ۱۰ بصورت IP دریافت می‌کردند. در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی اپالرستت و سیتاگلیپتین، مصرف داروها از یک روز قبل از القای CCI تا ۱۴ روز پس از آن بود. حلال مورد استفاده در رابطه با اپالرستت و سیتاگلیپتین، سالیین بود و تست‌های رفتاری در حیوانات در زمان‌های ۴، ۷ و ۱۴ روز بعد از القای CCI مورد ارزیابی قرار گرفتند.

#### روش جراحی مدل CCI

برای القاء درد نوروپاتییک از مدل CCI به روش Bennett و Xie استفاده شد. در این روش، بعد از بیهوش کردن حیوانات و با استفاده از تیغ جراحی، شکافی بر روی ران پای حیوان ایجاد کرده و عصب سیاتیک را نمایان نموده و بوسیله نخ بخیه ۴/۰، چهار گره شل را به فواصل یک میلی متر بر روی عصب سیاتیک ایجاد کرده و در انتها عضلات و پوست را بصورت جداگانه بخیه زدیم. نکته مهم این است که گره‌های ایجاد شده بر روی عصب سیاتیک نایستی باعث اختلال در جریان خون شده و آنرا قطع نماید (۱۵).

مراحل، سوپرناتنت آن را جدا کرده و به منظور اندازه‌گیری مقادیر فاکتورهای TNF- $\alpha$ ، IL-6، GPx و MDA با روش الایزا مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

### نحوه تجزیه و تحلیل اطلاعات

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph-pad prism software (ver. 6) و تست one-way ANOVA و پست تست Dunnett: Compare all columns vs. Control column انجام شد و نتایج بصورت Mean  $\pm$  SD ارائه و سطح معنی‌دار بودن  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### نتایج اپالرستت، سیتاگلیپتین و ترکیب آن‌ها بر هایپرآلزیای حرارتی

پاسخ به تحریکات دردناک اشعه مادون قرمز ناشی از دستگاه Radiant heat plantar test در گروه CCI نسبت به گروه شاهد اختلاف معناداری داشت و این پاسخ‌ها در روز چهاردهم به اوج خود رسید (P < ۰,۰۰۱). همانگونه که در شکل ۱ نشان داده شده است تزریق اپالرستت و سیتاگلیپتین در روز چهارم تفاوت معناداری با گروه دوم ایجاد نکرده ولی تزریق همزمان دو داروی فوق موجب بهبود عملکرد در رابطه با تحریکات دردناک ناشی از اشعه شد. در روز هفتم تفاوت معناداری بین گروه سوم و چهارم با گروه دوم ایجاد نشد ولی گروه پنجم تفاوت معنادار مشاهده گردید. در روز چهاردهم، در هر سه گروه دریافت کننده دارو تفاوت معناداری نسبت به گروه دوم ایجاد شد. بررسی‌های آماری نتایج نشان داده که تزریق همزمان اپالرستت و سیتاگلیپتین در گروه پنجم نسبت به گروه‌های سوم و چهارم بیشترین اثر را بر کاهش سرعت پاسخ نشان داده است.

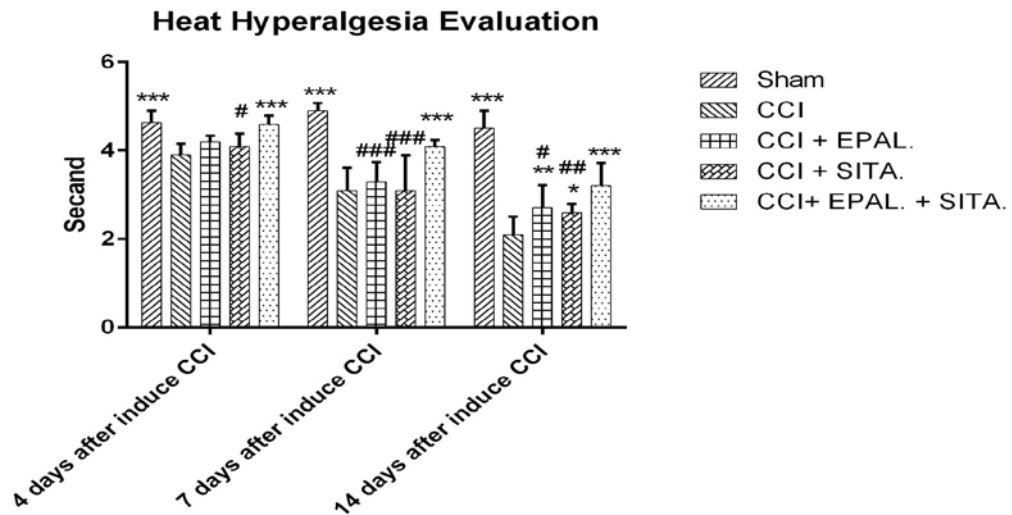
و آزمون خاتمه می‌یابد. چنانچه حیوان به هیچ یک از تارها، از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ ندهد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شود. همچنین، هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار شده و میانگین آن‌ها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور گردید (۱۸).

#### ۲- مطالعات هیستولوژیکی و مورفولوژیکی

بعد از آزمایشات رفتاری در روز چهاردهم، با بی‌هوش کردن رت‌ها بوسیله ایزوفلوران، آنها را به روی شکم خوابانده و با برش عضله ران، اعصاب سیاتیک را پیدا کرده و آنها را جدا کرده و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. سپس با استفاده از دستگاه، بافت‌های مذکور را در قطعات ۵ میکرونی برش داده، و با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد و برای آنالیز مورفولوژی و ترازبندی التهاب اطراف اعصاب و علائم آسیب عصبی و با استفاده از میکروسکوپ، لام‌های موردنظر مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹).

#### ۳- اندازه‌گیری سایتوکاین‌های التهابی و اکسیداتیو بوسیله روش الایزا

در پایان روز چهاردهم پس از القای CCI، حیوانات را با ایزوفلوران بیهوش کرده، به شکم خوابانده و از بین دو دست با قیچی نخاع و ستون مهره‌ها را از ناحیه گردنی جدا کرده و در ناحیه بالای لگن، ستون مهره‌ها را قطع کرده و به آرامی حد فاصل این دو ناحیه از ستون مهره‌ها را برش داده و از بافت‌های اطراف جداسازی شد. سر کانال نخاعی بایستی از دو طرف باز باشد. سپس با سرنگ حاوی سالین، از ناحیه بالای (گردنی) با فشار آب را تزریق کرده بصورتی که این فشار باعث خارج شدن نخاع در ناحیه کمری شود. نخاع را درون اپندرف قرار داده و بعد از شستشو و سایر

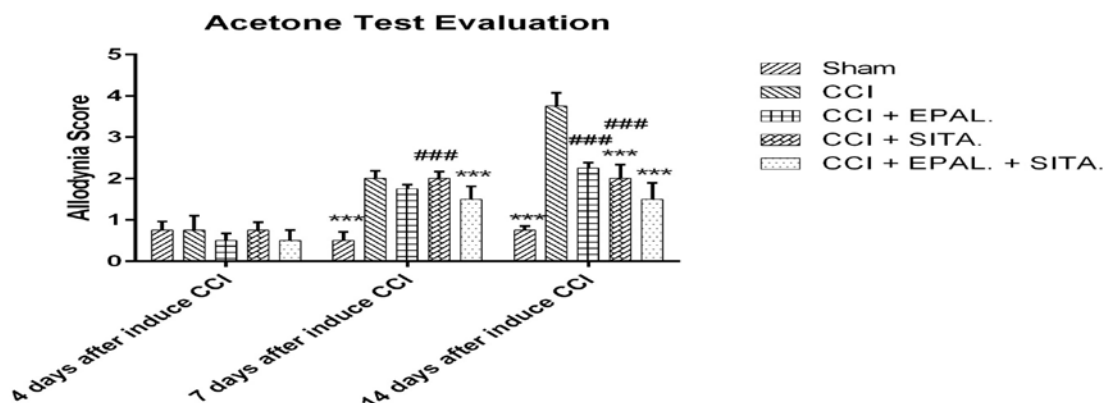


شکل ۱. مقایسه پاسخ های رفتاری در گروه های کنترل سالم (شام)، CCI، و گروه های CCI دریافت کننده اپالرستت و سینتاکلیپتین نسبت به گرمای ناشی از دستگاه Radiant heat (EPAL\_اپالرستت، SITA\_سینتاکلیپتین) در مقایسه با گروه دوم (CCI) و  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  و در مقایسه با گروه پنجم (CCI).  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  و در مقایسه با گروه پنجم (CCI).

گروه پنجم، تفاوت معناداری در روز هفتم مشاهده نگردید، ولی در روز چهاردهم تفاوت معنادار گردید ( $P < 0.001$ ). تزریق سینتاکلیپتین در روزهای هفتم اثری بر کاهش پاسخ به تست استون نداشت، اما در روز چهاردهم شاهد کاهش چشمگیر میزان پاسخ در این گروه بوده و موجب تفاوت معناداری گردید. تزریق توأم این دو دارو بیشترین اثر را بر کاهش پاسخ نسبت به گروه های سوم و چهارم داشت و این کاهش در روز ۱۴ پس از جراحی، دامنه‌ی تغییر بیشتری داشت (شکل ۲).

### نتایج اپالرستت، سینتاکلیپتین و ترکیب آن‌ها بر آلودینبای حرارتی:

با القای CCI در رت‌های مورد بررسی در مقایسه با گروه شاهد، میزان پاسخ به تحریکات ناشی از تست استون افزایش یافت و این افزایش در روزهای ۷ و ۱۴ پس از جراحی معنادار بود ( $P < 0.001$ ) و در روز چهارم هیچگونه تفاوت معناداری بین گروه های مختلف مشاهده نگردید. تزریق داخل صفاقی اپالرستت به حیوانات در گروه سوم منجر به کاهش پاسخ شد، ولی این کاهش در هیچکدام از روزهای پس از جراحی معنادار نبود و در مقایسه با

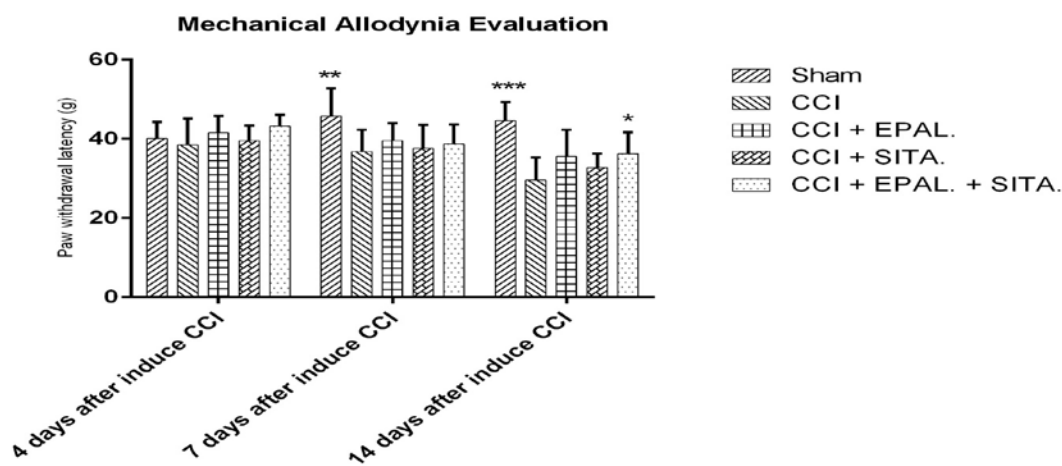


شکل ۲. مقایسه پاسخ های رفتاری در گروه های کنترل سالم (شام)، CCI، و گروه های CCI دریافت کننده اپالرستت و سینتاکلیپتین نسبت به پاشیدن استون (آلودینبای حرارتی). (EPAL\_اپالرستت، SITA\_سینتاکلیپتین) در مقایسه با گروه دوم (CCI) و  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  و در مقایسه با گروه پنجم (CCI).  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  و در مقایسه با گروه پنجم (CCI).

اپالرستت، سیتاگلیپتین و ترکیب این دو با هم، به ترتیب در گروه‌های سوم، چهارم و پنجم، میزان پاسخ نسبت به تحریکات در مقایسه با گروه CCI در روز هفتم کاهش یافت، اما معنادار نبود. در بررسی آماری نتایج روز چهاردهم مشخص گردید که در گروه‌های سوم و چهارم تفاوت معناداری ایجاد نگردید، ولی در گروه پنجم تفاوت معناداری مشخص گردید ( $P < 0,05$ ).

### نتایج اثر اپالرستت، سیتاگلیپتین و ترکیب آن‌ها بر آلودینیای مکانیکی

با روش Von ferry، آلودینیای مکانیکی یا پاسخ‌های دینامیک به تحریکات مکانیکی بررسی شد. همانگونه که در شکل سوم نشان داده شده است، در روزهای هفتم و چهاردهم، گروه CCI نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری در پاسخ حیوانات مشاهده شد (به ترتیب  $P < 0,01$  و  $P < 0,001$ ). با تزریق داخل صفاقی



### شکل ۳.

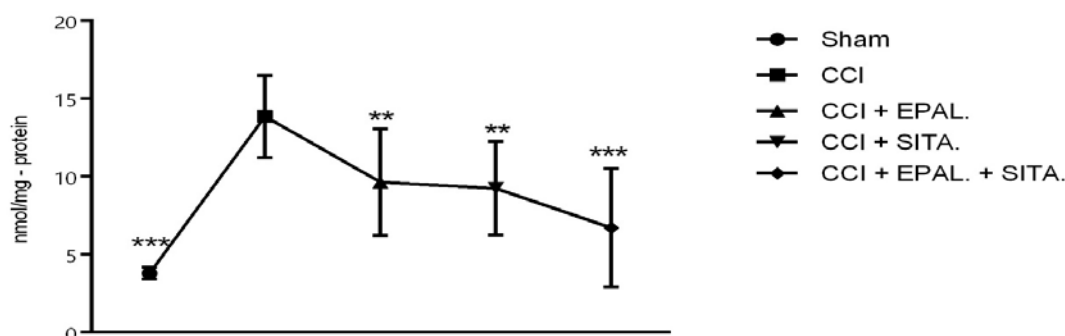
مقایسه پاسخ‌های رفتاری در گروه‌های کنترل سالم (شم)، CCI، و گروه‌های CCI در یافت کننده اپالرستت و سیتاگلیپتین نسبت به فیلامان‌های Von Ferry (آلودینیای مکانیکی). (EPAL\_اپالرستت، SITA\_سیتاگلیپتین)  $P < 0,05$ ،  $P < 0,01$ ،  $P < 0,001$  و  $P < 0,001$  در مقایسه با گروه دوم (CCI) و  $P < 0,05$ ،  $P < 0,01$ ،  $P < 0,001$  و  $P < 0,001$  در مقایسه با گروه پنجم (CCI).

مارکر آنتی‌اکسیداتیو، در رت‌ها شد. با نمونه‌گیری در روز ۱۴ بعد از القاء CCI و بررسی اثر اپالرستت بر فاکتورهای نامبرده در گروه سوم، شاهد کاهش مقدار MDA و افزایش GPx در مقایسه با گروه CCI بودیم ( $P < 0,01$ ). با بررسی اثر سیتاگلیپتین در گروه چهارم نیز تقریباً نتایج مشابه بدست آمد. همچنین در گروه پنجم مطالعه، در مقایسه با گروه دوم مشاهده شد که تزریق توأم این دو دارو باعث کاهش هرچه بیشتر MDA و افزایش GPx می‌شود ( $P < 0,001$ ).

### نتایج اثر اپالرستت، سیتاگلیپتین و ترکیب آن‌ها بر استرس اکسیداتیو

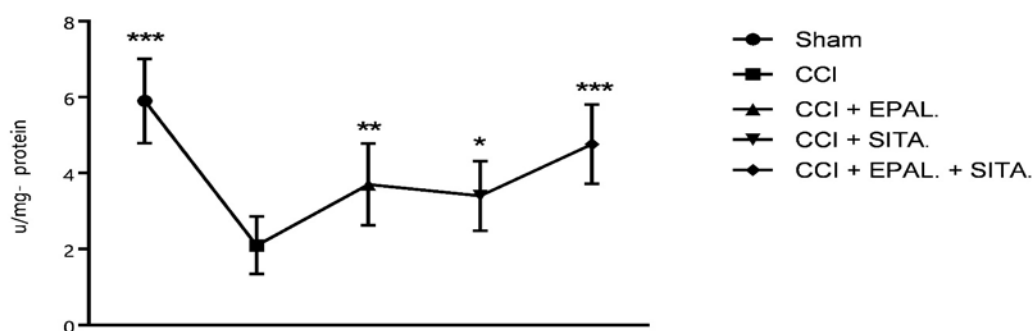
در این مطالعه به منظور بررسی اثر حفاظتی اپالرستت، سیتاگلیپتین و ترکیب این دو با هم بر استرس اکسیداتیو، سطوح فاکتورهای اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانت را ارزیابی نمودیم. همانطور که در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است، ایجاد CCI در گروه دوم موجب افزایش قابل توجه MDA، به عنوان مارکر پراکسیداسیون لیپیدی، و کاهش GPx، به عنوان

## MDA assessment



شکل ۴. بررسی پاسخ های مختلف در گروه های کنترل سالم (شام)، CCI، و گروه های CCI دریافت کننده اپالرستت و سیتاگلیپتین نسبت به تغییرات سطح MDA (EPAL=اپالرستت، SITA=سیتاگلیپتین) در مقایسه با گروه دوم (CCI) \* $P < 0,05$ ، \*\* $P < 0,01$  و \*\*\* $P < 0,001$  در مقایسه با گروه دوم (CCI)

## GPx assessment



شکل ۵

بررسی پاسخ های مختلف در گروه های کنترل سالم (شام)، CCI، و گروه های CCI دریافت کننده اپالرستت و سیتاگلیپتین نسبت به تغییرات سطح GPx (EPAL=اپالرستت، SITA=سیتاگلیپتین) در مقایسه با گروه دوم (CCI) \* $P < 0,05$ ، \*\* $P < 0,01$  و \*\*\* $P < 0,001$  در مقایسه با گروه دوم (CCI)

با گروه دوم باعث کاهش سایتوکاین های التهابی شد (به ترتیب  $P < 0,01$  و  $P < 0,001$ ).

### نتایج اثر اپالرستت، سیتاگلیپتین و ترکیب آن ها بر روی بافت عصب سیاتیک

بررسی لام های تهیه شده از عصب سیاتیک، با استفاده از میکروسکوپ نشان داد که القاء درد نوروپاتیک در گروه دوم، موجب التهاب و آسیب به عصب سیاتیک شده است. این در حالی است که تجویز اپالرستت و سیتاگلیپتین بصورت جداگانه در گروه های سوم و چهارم، التهاب اطراف عصب سیاتیک را کاهش

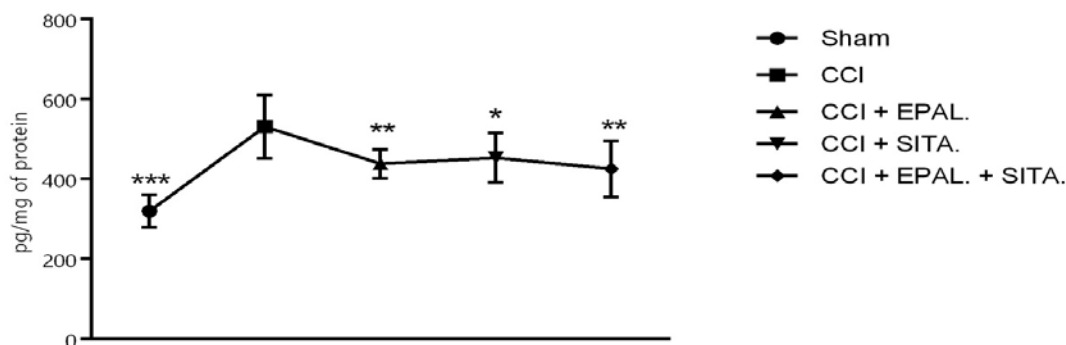
### نتایج اثر اپالرستت، سیتاگلیپتین و ترکیب آن ها بر فاکتورهای التهابی

بررسی سطوح سایتوکاین های التهابی بیولوژیک شامل IL-6 و TNF- $\alpha$  در طناب نخاعی، افزایش قابل توجهی را در گروه CCI نسبت به گروه شاهد نشان داد ( $P < 0,001$ ). با تزریق داخل صفاقی اپالرستت و سیتاگلیپتین، به ترتیب در گروه های سوم و چهارم، شاهد کاهش این مقادیر بودیم و در هر دو مورد اثر اپالرستت از سیتاگلیپتین بیشتر بود. همچنین تزریق همزمان دو دارو (شکل ۶ و ۷) در مقایسه

التهاب عصب سیاتیک را بخوبی کاهش یافته بود و هم از آسیب عصبی جلوگیری کرده بودند.

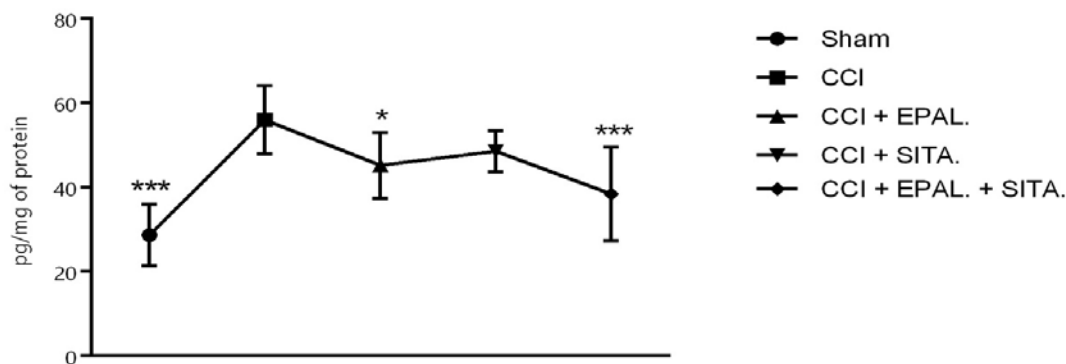
داده بودند، ولی آسیب عصبی در عصب سیاتیک قابل مشاهده بود. با این حال در گروه پنجم که بصورت همزمان اپالرستت و سیتاگلیپتین را گرفته بودند، هم

### IL-6 assessment



شکل ۶. بررسی پاسخ های مختلف در گروه های کنترل سالم (شام)، CCI، و گروه های CCI دریافت کننده اپالرستت و سیتاگلیپتین نسبت به تغییرات سطح IL-6. (EPAL\_اپالرستت، SITA\_سیتاگلیپتین)  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه دوم (CCI)

### TNF-alpha assessment



شکل ۷. بررسی پاسخ های مختلف در گروه های کنترل سالم (شام)، CCI، و گروه های CCI دریافت کننده اپالرستت و سیتاگلیپتین نسبت به تغییرات سطح TNF-alpha. (EPAL\_اپالرستت، SITA\_سیتاگلیپتین)  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه دوم (CCI)

معناداری از روز هفتم در آنها مشاهده شد. همچنین مشخص شد که در گروه دوم، سطح بیان فاکتورهای التهابی نظیر TNF- $\alpha$  و IL-6، و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) افزایش یافته است که در نتیجهی آنها علائم درد نوروپاتیک بروز پیدا کردند. در مقابل، القاء CCI

### بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که با شروع و پیشرفت CCI طی مدت ۱۴ روز مطالعه و با بررسی آزمایشات رفتاری، تفاوت معناداری بین گروه دوم و گروه اول در القاء درد نوروپاتیک بوجود آمد و بطور کلی تفاوت



باعث کاهش مقدار GPx و فرآیندهای آنتی‌اکسیداتیو شد. بر اساس این یافته‌های مطالعه حاضر و در گروه‌های دیگر با تزریق داخل صفاقی اپالرستت، سیتاگلیپتین و یا ترکیب این دو در گروه‌های مختلف آزمایشگاهی، شاهد بهبود پاسخ‌های رفتاری بودیم که در گروه پنجم که اپالرستت و سیتاگلیپتین که بصورت همزمان مصرف می‌شدند اثرات و پاسخ‌های درمانی در رفتار حیوانات بیشتر بوده و کاهش سطح فاکتورهای التهابی و اکسیداتیو، و به دنبال آن کاهش علائم بالینی ناشی از CCI مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر مشخص کرد که مصرف همزمان اپالرستت و سیتاگلیپتین بخوبی می‌توانند اثرات درمانی همدیگر را تقویت و بهبود ببخشند.

پژوهش‌های متعددی به نقش اساسی استرس اکسیداتیو و واکنش‌های التهابی در شروع و گسترش تغییرات پاتولوژیک مغز و عملکردهای شناختی طی فرآیندهای نوروپاتی‌ک تاکید داشته‌اند (۲۲، ۲۱). در پژوهش انجام شده توسط Hideo Sasaki و Kyuzi Kamoi اثر اپالرستت و سیتاگلیپتین بر بهبود CVN در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که احتمالاً سیتاگلیپتین نسبت به اپالرستت در بهبود CVN مؤثرتر بوده و ترکیب این دو، دارای اثر مضاعف و بهتری می‌باشد (۲۳). این در حالی می‌باشد که نتایج حاصل از مطالعه‌ی ما بر نقش سینرژیک اپالرستت و سیتاگلیپتین در بهبود علائم بالینی و رفتاری ناشی از CCI تأکید داشت. در بررسی دیگر توسط Manar A. Nader و همکاران، نشان داده شد که تجویز سیتاگلیپتین در کنار پره‌گابالین منجر به تشدید اثرات آنتی‌اکسیداتیو و ضدالتهابی در سگته مغزی حاد القاشده با پنتیلین تترازول خواهد شد (۲۴). تحقیقات متعدد بیان داشته‌اند که اثر مہاری اپالرستت در مقابله با استرس‌های اکسیداتیو ناشی از تنظیم منفی آلدوز ردوکتاز می‌باشد، و این مسأله ممکن است نشان دهنده این باشد که اپالرستت در سرکوب

استرس اکسیداتیو اختصاصی بافت یا سلول بخوبی ایفای نقش می‌نماید. نقش این آنزیم محدود کردن سرعت در مسیرهای پلی‌ال است (۲۶، ۲۵، ۹). در بررسی‌های انجام شده توسط Kaori Yama در سال ۲۰۱۴ نشان داده شد که اپالرستت از طریق تنظیم مثبت فاکتور نسخه‌برداری Nrf2، که در تولید عوامل آنتی‌اکسیدانت نقش دارد، قادر به افزایش سطح GSH است (۹). همچنین Ge Zhao و Min-Xiu Yao نشان دادند که استفاده از اپالرستت در بیماران مبتلا به نوروپاتی اولیه دیابتی سبب بهبود عملکرد کلیه و کاهش پاسخ‌های اکسیداتیو سیستمیک می‌شود (۲۷). ما نیز در این مطالعه نقش اپالرستت را در کاهش استرس اکسیداتیو از طریق افزایش GPx و کاهش MDA نشان دادیم. سیتاگلیپتین به عنوان مهارکننده‌ی دی‌پپتیدیل پپتیداز می‌تواند نقش سرکوبگر را در التهاب داشته باشد (۱۳). Ayman E. El-Sahar و همکاران در سال ۲۰۱۵ نقش ضدالتهابی و آنتی‌اکسیداتیو سیتاگلیپتین را در آسیب گذرای مغزی ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن نشان دادند و دریافتند که این دارو با کاهش سطح TNF- $\alpha$ ، IL-6 و MDA در رت‌های دیابتی باعث بهبود عملکرد شناختی می‌شود (۲۸). همچنین مشخص شده است که مهار مسیر لیپوآکسیژناز و فسفودی استراز ۲، می‌تواند نقش مهمی در بهبود دردهای نوروپاتی‌ک شود. در مطالعه‌ی ای که توسط نادری تهرانی و همکارانشان داشتند به بررسی کافئین بعنوان آنتاگونیست غیرانتخابی آدنوزین پرداخته شد که در این مطالعه مشخص شد که مهار گیرنده‌های درد می‌تواند نقش اساسی در درمان این نوع دردها داشته باشد (۲۹). مشخص شده که مهار تولید نیتریک اکساید و مهار دی‌آمین اکسیداز و یا اثرات آنتی‌اکسیدانی نیز می‌توانند در کاهش دردهای نوروپاتی‌ک موثر باشند و یاری‌گر روش هم در تحقیقی به اثرات آمینوگوانیدین به عنوان یکی از مهارکننده‌های سنتز نیتریک اکساید پرداخت که نشان دادند آمینوگوانیدین می

تواند نقش موثری در کاهش دردهای نوروپاتیک داشته باشد (۳۰).

به طور خلاصه، نتایج مطالعه ما نشان داد که تجویز همزمان اپالرستت و سیتاگلیپتین در مدل تجربی درد نوروپاتیک باعث تقویت اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیداتیو و بهبود علائم درد ناشی از القای CCI می‌شود. این مسأله می‌تواند باعث کاهش هرچه بیشتر عوارض ناشی از آسیب‌های نوروپاتیک و بهبود کیفیت زندگی شود. در پایان لازم بذکر است که با توجه به اینکه در این مطالعه از رت‌های ماده استفاده نشده است و همچنین عدم استفاده از تجویز خوراکی داروهای مورد نظر، پیشنهاد می‌شود

سایر پژوهشگران با انجام سایر تحقیقات، این مطالعه را تکمیل نمایند.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد اخلاق IR.LUMS.REC.1395.184 مورد تایید دانشگاه علوم پزشکی لرستان بوده و بدین وسیله کلیه نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و همچنین پرسنل مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان کمال تشکر را دارند.

## References

1. Farghaly H, Abd-Ellatief RB, Moftah MZ, Mostafa MG, Khedr EM, Kotb HI. The effects of dexmedetomidine alone and in combination with tramadol or amitriptyline in a neuropathic pain model. *Pain Physician*. 2014;17(2):187-95.
2. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*. 2010;9(8):807-19.
3. Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C. Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*. 2012;22(2):81-91.
4. Zhou X, Cheng H, Xu D, Yin Q, Cheng L, Wang L, et al. Attenuation of neuropathic pain by saikosaponin a in a rat model of chronic constriction injury. *Neurochemical research*. 2014;39(11):2136-42.
5. Liu M, Zhou L, Chen Z, Hu C. Analgesic effect of iridoid glycosides from *Paederia scandens* (LOUR.) MERRILL (Rubiaceae) on spared nerve injury rat model of neuropathic pain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2012;102(3):465-70.
6. He Z-W, Wei W, Li S-P, Ling Q, Liao K-J, Wang X. Anti-allodynic effects of obtusifolin and gluco-obtusifolin against inflammatory and neuropathic pain. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2014;37(10):1606-16.
7. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain . *European journal of pharmacology*. 2013;716(1-3):106-19.
8. Sharma SR, Sharma N. Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, in diabetic neuropathy: an Indian perspective. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2008;11(4):231-5.
9. Yama K, Sato K, Abe N, Murao Y, Tatsunami R, Tampo Y. Epalrestat increases glutathione, thioredoxin, and heme oxygenase-1 by stimulating Nrf2 pathway in endothelial cells. *Redox biology*. 2015;4:87-96.
10. Jaiswal S, Mishra S, Torgal SS, Shengule S. Neuroprotective effect of epalrestat mediated through oxidative stress markers, cytokines and TAU protein levels in diabetic rats. *Life Sci*. 2018;207:364-71.
11. Hotta N, Kawamori R, Fukuda M, Shigeta Y. Aldose Reductase Inhibitor-Diabetes Complications Trial Study Group. Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on progression of diabetic neuropathy and other microvascular complications: multivariate epidemiological analysis based on patient background factors and severity of diabetic neuropathy. *Diabet Med*. 2012;29(12):1529-33.
12. Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, Buse JB, Engel SS, Garg J, et al. Effect of sitagliptin on cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(3):232-42.
13. Hu X, Liu S, Liu X, Zhang J, Liang Y, Li Y. DPP-4 (CD26) inhibitor sitagliptin exerts anti-inflammatory effects on rat insulinoma

- (RINm) cells via suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Endocrine*. 2017;55(3):754-63.
14. Satoh-Asahara N, Sasaki Y, Wada H, Tochiya M, Iguchi A, Nakagawachi R, et al. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, exerts anti-inflammatory effects in type 2 diabetic patients. *Metabolism*. 2013;62(3):347-51.
  15. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
  16. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988;32(1):77-88.
  17. Kukkar A, Singh N, Jaggi AS. Neuropathic pain-attenuating potential of aliskiren in chronic constriction injury model in rats. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2013;14(2):116-23.
  18. 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(2):411-8.
  19. Brummett CM, Padua AK, Amodeo FS, Welch KB, Lydic R. Perineural dexmedetomidine added to ropivacaine causes a dose-dependent increase in the duration of thermal antinociception in sciatic nerve block in rat. *Anesthesiology*. 2009;111(5):1111-9.
  20. Darabi S, Hasanvand A, Nourollahi A. Assessment of the effects of anti-inflammatory of garlic; nettle leaves and olives extracts in STZ-induced diabetic rat. *Complementary Medicine Journal of Faculty of Nursing and Midwifery*. 2016;1(6):1452-60.
  21. Dong Y-F, Kataoka K, Toyama K, Sueta D, Koibuchi N, Yamamoto E, et al. Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension*. 2011;58(4):635-42.
  22. Pimentel-Coelho PM, Michaud J-P, Rivest S. Effects of mild chronic cerebral hypoperfusion and early amyloid pathology on spatial learning and the cellular innate immune response in mice. *Neurobiology of aging*. 2013;34(3):679-93.
  23. Kamoi K, Sasaki H. Effects of Epalrestat as Aldose Reductase Inhibitor (ARI), Sitagliptin as Incretin-Based Therapy (IBT), or Combined Epalrestat and Sitagliptin on Cardiac Vagal Neuropathy (CVN) in Patients with Type 2 Diabetic Mellitus. *International Journal of Diabetes & Clinical Diagnosis*. 2014;2014.
  24. Nader MA, Ateyya H, El-Shafey M, El-Sherbeeney NA. Sitagliptin enhances the neuroprotective effect of pregabalin against pentylentetrazole-induced acute epileptogenesis in mice: Implication of oxidative, inflammatory, apoptotic and autophagy pathways. *Neurochemistry international*. 2017.
  25. Sato K, Yama K, Murao Y, Tatsunami R, Tampo Y. Epalrestat increases intracellular glutathione levels in Schwann cells through transcription regulation. *Redox biology*. 2014;2:15-21.

26. Yama K, Sato K, Murao Y, Tatsunami R, Tampo Y. Epalrestat upregulates heme oxygenase-1, superoxide dismutase, and catalase in cells of the nervous system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2016;39(9):1523-30.
27. Zhao G, Yao M-X. Evaluation of renal function and oxidative stress after adjuvant epalrestat treatment of early diabetic nephropathy. *Journal of Hainan Medical University*. 2017;23(4):69-73.
28. El-Sahar AE, Safar MM, Zaki HF, Attia AS, Ain-Shoka AA. Sitagliptin attenuates transient cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic rats: Implication of the oxidative-inflammatory-apoptotic pathway. *Life sciences*. 2015;126:81-6.
29. Naderi Tehrani M, Heydari A, Nasrollahi S, Esmaili Z, hamidi g. Effect of acute caffeine administration on hyperalgesia and allodynia in a rat neuropathic pain model. *Koomesh*. 2020;22(2):334-40.
30. Yarigaravesh MH, Safakhah HA, Rashidi-Pour A, Dehghanian M. Effects of aminoguanidin on the neuropathic behavioral responses of chronic constriction injury model in rat. *Koomesh*. 2009;10(3):207-12.

## Co-administration of Epalrestat and Sitagliptin attenuate development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: Role of anti-inflammatory and antioxidative effects

**Abbaszadeh A<sup>1</sup>, Torkzaban F<sup>2</sup>, Morad khani MR<sup>3</sup>, Farhadi S<sup>4</sup>, Hasanvand A<sup>5,6\*</sup>**

1. Associate Professor, Department of Plastic and Reconstructive surgery, Hazrat Fatemeh Hospital, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Student of medicine, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

3. Associate Professor, Anesthesia Department, Shohaday-e- Ashayer hospital, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

4. Student of medicine, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

5. Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

6. Associate Professor, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran, dr.hasanvand@yahoo.com

Received: 2022/03/07

Accepted: 2022/05/21

### Abstract

**Background:** Neuropathic pain is one of the most important consequences of nerve damage, manifesting itself as various demonstrations, including hyperalgesia and allodynia. The present study aimed to investigate the effect of concomitant use of Epalrestat and Sitagliptin on pain reduction in the chronic constriction injury (CCI) model in rats through anti-inflammatory and antioxidant effects.

**Materials and Methods:** The present study was conducted on a total of 50 male rats that were randomly assigned to five groups: sham, CCI, CCI+Epalrestat(100 mg/kg, IP injection, for 14 days), CCI+Sitagliptin(10 mg/kg, IP injection, for 14 days), and CCI+Epalrestat(100 mg/kg)+Sitagliptin(10 mg/kg). Rats underwent behavioral tests on days 4, 7, and 14 after the surgery. After 14 days, the spinal cord was collected to measure anti-inflammatory and antioxidant tissue concentrations.

**Results:** The results of this study demonstrated that simultaneous injection of these two drugs in group 5 had the most neuroprotective effect, compared to that in groups 3 and 4. The results of dynamic responses to mechanical stimulation on the 14th day illustrated that there was no significant difference in groups 3 and 4. Nonetheless, in Group 5, a significant difference was detected in all factors. The results pointed out that the combined use of Epalrestat and Sitagliptin decreased the levels of Tumor necrosis factor, Interleukin 6, and MDA, and also increased the level of glutathione peroxidase

**Conclusion:** As evidenced by the obtained results, the concomitant use of Epalrestat and Sitagliptin can be considered effective and safe for the treatment of neuropathic pain with strong inhibition of inflammatory factors and oxidative stress.

**Keywords:** Neuropathic pain, Epalrestat, Sitagliptin, Inflammatory factors, Oxidative stress.

**\*Citation:** Abbaszadeh A, Torkzaban F, Morad khani MR, Farhadi S, Hasanvand A. Co-administration of Epalrestat and Sitagliptin attenuate development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: Role of anti-inflammatory and antioxidative effects. *Yafte*. 2022; 24(1):84-98.