

## مقاله پژوهشی

## بررسی اثر تجویز بنفوتیامین در حفظ استحکام کششی عصب سیاتیک و داربست سلول زدایی شده آن در موش‌های صحرایی مدل دیابتی القاء شده با استرپتوزوتوسین

لیلا وفادار قاسمی، مرتضی بهنام رسولی<sup>\*</sup>، مریم مقدم متین، ناصر مهدوی شهری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

پذیرش: ۲۸ خرداد ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳ اسفند ۱۳۹۶

## چکیده

**زمینه و هدف:** نورپاتی به عنوان یکی از عوارض بیماری دیابت احتمالاً به دلیل تغییرات پاتولوژیک ماتریکس خارج سلولی مثل ضخیم شدن غشاء پایه اعصاب محیطی و افزایش تولید محصولات نهایی گلیکاسیون به وجود می‌آید. هدف از این تحقیق، بررسی اثر بنفوتیامین روی استحکام کششی عصب سیاتیک و داربست سلول زدایی شده آن در موش صحرایی دیابتی می‌باشد.

**روش‌ها:** ۶۰ موش صحرایی نر بالغ به گروه کنترل، گروه شم، گروه دیابت ۴ هفته‌ای و ۸ هفته‌ای (بدون تیمار یا با تیمار با بنفوتیامین با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تقسیم شدند. دیابت با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین القاء شد. در پایان دوره آزمایش (هفته ۴ و ۸) از بخش میانی عصب سیاتیک یک قطعه به طول یک سانتی متر جدا شد. نیمی از آن‌ها به روش ساندل سلول زدایی شدند و سپس نمونه‌ها جهت بررسی استحکام کششی تحت آزمون‌های کششی توسط دستگاه تست کششی قرار گرفتند. همچنین برش‌های نازک و نیمه‌نازک جهت بررسی بافت‌شناسی تهیه شدند.

**یافته‌ها:** میانگین بیشینه نیرو جهت پاره شدن عصب در گروه‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل بطور معناداری کاهش یافته، همچنین میزان ازدیاد طول تا نقطه پارگی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل بطور معناداری کاهش یافته اما در گروه‌های دیابتی تیمار شده با بنفوتیامین، در مقایسه با گروه کنترل، در میزان ازدیاد طول و بیشینه نیرو اختلاف معناداری مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** در شرایط دیابت، تغییر ماتریکس خارج سلولی ممکن است ساختار فیبرهای کلاژن را تغییر دهد و بنابراین موجب کاهش استحکام کششی عصب سیاتیک شود.

واژه‌های کلیدی: بنفوتیامین، دیابت، عصب سیاتیک، نورپاتی

## مقدمه

دیابت در قرن ۲۱ به یک بیماری همه گیر تبدیل شده است و پیش‌بینی می‌شود شیوع جهانی آن تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۴٪ برسد. حداقل ۳۰٪ افراد دیابتی نورپاتی دیابتی دارند. نورپاتی دیابتی یکی از عوارض شایع در بیماران مبتلا به دیابت بوده و شامل چندین نشانه بالینی است که اعصاب حسی، حرکتی و اتونوم را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تغییرات پاتولوژیک معمول شامل آتروفی آکسونی، دمیالینه شدن و از

دست رفتن فیبرهای عصبی و اختلال در ترمیم عصب می‌باشد [۱]. هیپرگلیسمی مرتبط با دیابت تاثیر زیادی روی ساختار و عملکرد اعصاب محیطی دارد. یکی از عوارض هیپرگلیسمی طولانی مدت، تغییر بافت پیوندی و ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی می‌باشد. اگر چه مکانیسمی که موجب این تغییرات می‌شود کاملاً مشخص نشده است، اما پیشنهاد شده که تغییر بیان ژن‌های ماتریکس خارج سلولی و گلیکاسیون غیرآنزیمی ممکن است در این امر نقش داشته باشند. اتصالات عرضی پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی آن‌ها را به هضم

محیط به مرکز در اعصاب و دستجات فیبرهای عصبی نیز می‌گردد. این چنین، کاهش فشار سبب تضعیف ارتباطات سلولی می‌شود. این موضوع به نوبه خود ممکن است سبب جداسدن غلاف میلین از آکسولما<sup>۷</sup> شود. متعاقب این جدایی، غلاف میلین در مسیر دژنره‌شدن قرار می‌گیرد [۶].

هدف از این پژوهش بررسی اثر تجویز بنفوتیامین بر حفظ ساختار بافتی و استحکام کششی عصب سیاتیک در موش‌های دیابتی و همچنین داربست‌های سلول زدایی شده حاصل از آن‌ها می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به صورت تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی ترمیم اعصاب، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی انجام گرفت. کلیه آزمایش‌ها با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی (مصوب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد با کد اخلاقی ۸۸۸) انجام گردید و تلاش شد که از تعداد حیوانات کمتری استفاده گردد.

## داروها

بنفوتیامین از شرکت داروسازی امین خریداری شد، همچنین کتامین و زایلازین از شرکت آلفاسان<sup>۸</sup> هلند خریداری شدند.

## حیوانات آزمایشگاهی

تمامی آزمایش‌ها بر روی موش‌های نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم و سن تقریبی سه ماه انجام شد. موش‌ها در حیوانخانه دانشگاه فردوسی مشهد تحت شرایط استاندارد (دمای  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت  $5 \pm 60\%$ ) بدون محدودیت دسترسی به غذا و آب در قفس‌های جنس پلکسی گلاس نگهداری شدند. تمامی آزمایش‌ها بین ساعت ۹ تا ۱۲ ظهر انجام شد و برای هر گروه، ۱۰ موش صحرایی مورد استفاده قرار گرفت.

## گروه‌های آزمایشی و نحوه تیمار دارویی

۶۰ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به ۶ گروه (۶ موش در هر گروه) تقسیم شدند. گروه کنترل سالم،

پروتئازها مقاوم کرده و منجر به تجمع این پروتئین‌ها از جمله کلاژن و افزایش ضخامت غشاء پایه می‌شود [۳، ۲]. همچنین مطالعات نشان داده در رت‌های<sup>۱</sup> دیابتی، میزان سختی در عصب بینایی و عصب سیاتیک افزایش یافته است [۴].

مطالعات اخیر نشان داده است که بیماران دیابتی از نظر ویتامین B1 دچار نقص هستند. در مقایسه بین بیماران دیابتی و افراد سالم، کاهش سطح پلاسمایی ویتامین B1 با افزایش ۱۶ تا ۲۴ برابری کلیرنس کلیوی تیامین همراه بوده است. این نشانه‌ها می‌تواند به وسیله یکی از مشتقات تیامین به نام بنفوتیامین که محلول در چربی است درمان شود. بررسی‌ها نشان داده تجویز بنفوتیامین در بیماران مبتلا به نوروپاتی دیابتی باعث بهبود شدت درد، کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود آسیب‌های مربوط به قشر مغز می‌گردد. بنفوتیامین احتمالاً با تغییر متابولیسم سلولی گلوکز از طریق مسیر پنتوز فسفات، باعث دفع متابولیت‌های آسیب‌رسان سلولی از بدن و کاهش تولید AGes<sup>۲</sup> می‌شود [۵]. کاهش AGes اختلال اعصاب محیطی را کاهش می‌دهد. AGes از طریق مکانیسم‌های مختلف به سلول‌ها و بافت‌ها آسیب می‌رساند. تجمع AGes در ماتریکس خارج سلولی منجر به اتصالات عرضی پروتئین‌ها و منجر به تغییرات مکانیکی، کاهش الاستیسیته و افزایش سختی بافت می‌شود [۶]. بنفوتیامین بسیاری از مسیرهای آسیب‌رسان هیپرگلیسمی مانند مسیر هگزوز آمین، تشکیل AGes، فعالیت پروتئین کیناز C و NF-KB<sup>۳</sup> را مهار می‌کند، در حالی که باعث افزایش فعالیت آنزیم ترانس کتولاز می‌شود. بنابراین بنفوتیامین ممکن است برای درمان اختلال نوروپاتی مرتبط با دیابت مفید باشد [۵].

علاوه بر صدمات ناشی از هیپرگلیسمی بر فیبرهای عصبی، کاهش مقاومت در برابر کشیدگی می‌تواند بیانگر کاهش تراکم الیاف کلاژن و یا دیپلمریزه‌شدن آن‌ها (در اپی‌نوریوم<sup>۴</sup>، پری‌نوریوم<sup>۵</sup> و آندونوریوم<sup>۶</sup>) و تبدیل الیاف کلاژن به مونومرهای کلاژنی، احتمالاً در نتیجه گلیکاسیون پیشرفته، باشد. به طور مشابه این وضعیت احتمالاً سبب کاهش فشار از

<sup>۱</sup> Rats

<sup>۲</sup> Advanced glycation end product (AGEs)

<sup>۳</sup> Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-KB)

<sup>۴</sup> Epineurium

<sup>۵</sup> Perineurium

<sup>۶</sup> Endoneurium

<sup>۷</sup> Axolemma

<sup>۸</sup> Alfasan

محلول سدیم دزوکسی کولات انتقال یافته و فرآیند مورد نظر بار دیگر تکرار گردید. پس از شستشوی نهایی با آب، قطعات عصب سلول زدایی شده در بافر نمکی فسفات ۱۰ میلی مولار حاوی پنی سیلین/جنتامایسین با pH ۷/۲ و دمای ۴ °C ذخیره شدند.

### مطالعه بافت شناسی داربست های سلول زدایی شده

به منظور اطمینان از حذف سلول ها از داربست های سلول زدایی شده عصب سیاتیک، پس از مراحل فیکس کردن بافت ها، بلوک های پارافینی از آن ها تهیه گردید و توسط رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین کیفیت سلول زدایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مطالعه بافت شناسی عصب سیاتیک با استفاده از رنگ آمیزی آبی تولوئیدین

به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیک در گروه های مختلف، عصب سیاتیک جدا شد و به قطعات ۲ میلی متری تقسیم گردید. آن ها فوراً در محلول گلو تار آلدئید ۲/۵٪ در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (PBS) برای ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس قطعات عصب ۳ بار با محلول PBS شسته شد. پس از آن مراحل آبیگری با اتانول صعودی انجام و در مرحله بعد نفوذ تدریجی با رزین انجام گردید تا در نهایت بافت در رزین خالص قرار بگیرد. سپس نمونه ها در رزین قالب گیری شده و برش های عرضی از نمونه با اولترامیکروتوم تهیه شد، سپس نمونه ها توسط رنگ آبی تولوئیدین ۱٪ رنگ آمیزی شدند.

### بررسی استحکام کششی

نمونه های عصب سیاتیک و نیز داربست های سلول زدایی شده آن ها به آزمایشگاه مواد دندان دانشکده دندانپزشکی به منظور اندازه گیری استحکام کششی توسط دستگاه تست کششی مدل SANTAM-STM20 انتقال داده شدند. قطر نمونه ها توسط میکرومتر دیجیتالی اندازه گیری شد، سپس قطعات عصب سیاتیک و همچنین داربست های سلول زدایی شده به طول یک سانتی متر بر روی دستگاه فیکس شد، پس از آن نمونه ها توسط دستگاه با سرعت ثابت ۰/۱ میلی متر بر ثانیه تا زمان پاره شدن تحت کشش قرار گرفت. میزان نیروی استفاده شده برای کشیده شدن

گروه شم (گروه کنترل با دریافت دارو)، گروه دیابت ۴ هفته ای و گروه دیابت ۸ هفته ای (القای دیابت با استرپتوزوتوسین)، گروه دیابت ۴ هفته ای و ۸ هفته ای تیمار شده با بنفوتیامین دوز ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم. در گروه های تیمار شده با بنفوتیامین، دارو به صورت خوراکی به مدت ۴ هفته و ۸ هفته به روش گاواژ، روزانه در زمان مشخصی به حیوانات تجویز شد. گروه کنترل سالم دارو دریافت نکرده و گروه شم شامل رت های سالم بود که دارو دریافت کردند.

### القاء دیابت

در گروه های دیابتی، موش های صحرایی با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین با دوز ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان در بافر سیترات دیابتی شدند. برای تایید دیابتی شدن ۷۲ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوتوسین گلوکز خون حیوان اندازه گیری و حیوانات با گلوکز پلاسمای بیشتر از ۳۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر مورد استفاده قرار گرفته و بقیه حذف شدند.

### مراحل جراحی

تمامی آزمایش ها در شرایط استریل و توسط یک محقق انجام شد. تمامی حیوانات با تزریق کتامین (۷۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) عمیقاً بی هوش شدند، سپس موهای پوست ناحیه کمر و پای چپ تراشیده شده و توسط بتادین ۱۰٪ ضد عفونی گردید. سپس موش ها در شرایط دراز کش از ناحیه شکمی بر روی میز جراحی در شرایط استریل ثابت شدند. عصب سیاتیک سمت چپ از طریق یک برش طولی از ناحیه تروکانتر بزرگ به وسط ران باز و نمایان شد. سپس عصب سیاتیک به طول دو سانتی متر قطع گردید. و برای بررسی آزمون کششی و تهیه داربست مورد استفاده قرار گرفت.

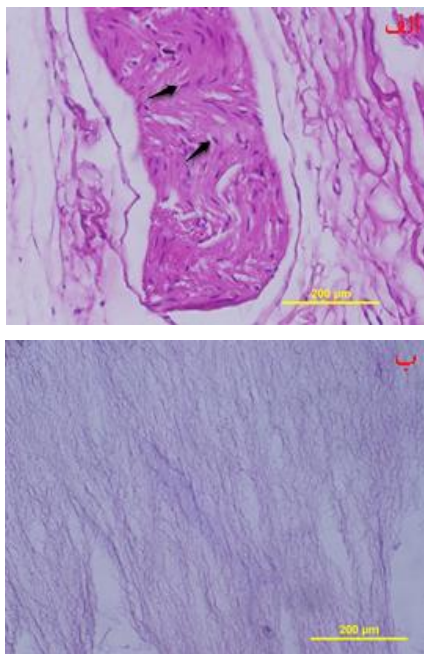
### تهیه داربست های سلول زدایی شده

داربست های سلول زدایی شده عصب سیاتیک به روش ساندل<sup>۹</sup> تهیه گردید [۷]. به طور خلاصه، در این روش ابتدا قطعات عصب سیاتیک به مدت ۷ ساعت در آب مقطر دیونیزه غوطه ور شدند. سپس به مدت ۱۲ ساعت به محلول تریتون X-100 منتقل شده و به دنبال آن به مدت ۲۴ ساعت به

<sup>۹</sup>Sondell

آنالیز آماری نتایج حاصل از آزمون استحکام کششی نشان داد، میانگین بیشینه نیروی مورد نیاز (Fmax) جهت پاره شدن عصب در گروه‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل بطور معناداری کاهش یافته است ( $p < 0/05$ ). در گروه دیابت ۸ هفته‌ای تیمار شده با بنفوتیامین، میانگین بیشینه نیرو افزایش یافته است و اختلاف معناداری با گروه کنترل نداشت (نمودار ۲الف). همچنین، نتایج نشان داد که میزان ازدیاد طول تا نقطه پارگی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش یافته است ( $p < 0/05$ ). اما در گروه‌های دیابتی تیمار شده با بنفوتیامین میزان ازدیاد طول افزایش یافته و اختلاف معناداری بین این گروه‌ها با گروه کنترل مشاهده نشد (نمودار ۲ب).

نتایج حاصل از آنالیز آزمون استحکام کششی نشان داد که هیچگونه اختلاف معناداری از نظر میانگین بیشینه نیرو در داربست‌های تهیه شده از گروه‌های مختلف در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با بنفوتیامین وجود ندارد (نمودار ۳). نتایج حاصل از آنالیز آزمون استحکام کششی نشان داد که هیچگونه اختلاف معناداری از نظر میزان ازدیاد طول تا نقطه پارگی، در داربست‌های تهیه شده از گروه‌های دیابتی و گروه‌های دیابتی تیمار شده با بنفوتیامین نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (نمودار ۴).



**شکل ۱ -** مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده با عصب دست‌نخورده به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. تصویر (الف) عصب دست‌نخورده، که پیکان‌ها هسته سلول‌ها را نشان می‌دهد. تصویر (ب) در داربست سلول‌زدایی شده هیچگونه سلولی دیده نمی‌شود.

عصب و تغییر طول عصب در زمان کشش به وسیله دستگاه ثبت گردید.

## تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز داده‌ها از آزمون واریانس یکطرفه استفاده شد. پس از تایید وجود اختلاف معنی‌دار و به منظور تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند از آزمون تعقیبی توکی<sup>۱۰</sup> استفاده شد.  $p < 0/05$  بعنوان حداقل سطح معناداری در نظر گرفته شده و کلیه تحلیل‌های آماری توسط نرم افزار SPSS ویراست ۱۶ انجام شد.

## یافته‌ها

### مقایسه بافت‌شناسی داربست‌های سلول‌زدایی شده

#### و عصب سیاتیک در سطح میکروسکوپ نوری

مقایسه بافت‌شناسی در گروه داربست‌های سلول‌زدایی شده در مقایسه با گروه عصب سالم با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین نشان داد که در گروه عصب سالم هسته سلول‌ها باقی مانده است ولی در داربست‌های سلول‌زدایی شده هیچگونه هسته سلولی دیده نمی‌شود، که نشان‌دهنده سلول‌زدایی کامل داربست‌ها می‌باشد (شکل ۱).

### مقایسه بافت‌شناسی عصب سیاتیک در گروه‌های

#### دیابت، تیمار با بنفوتیامین و کنترل با استفاده از

#### رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین

در مقایسه برش‌های نیمه‌نازک تهیه شده از عصب سیاتیک در گروه مربوط به دیابت، میلین نسبت به گروه کنترل حالت کروی خود را از دست داده و تورفتگی و بیرون‌زدگی در غلاف میلین مشاهده می‌شود، اما در گروهی که بنفوتیامین دریافت کرده‌اند این تغییرات مشاهده نمی‌شود (شکل ۲).

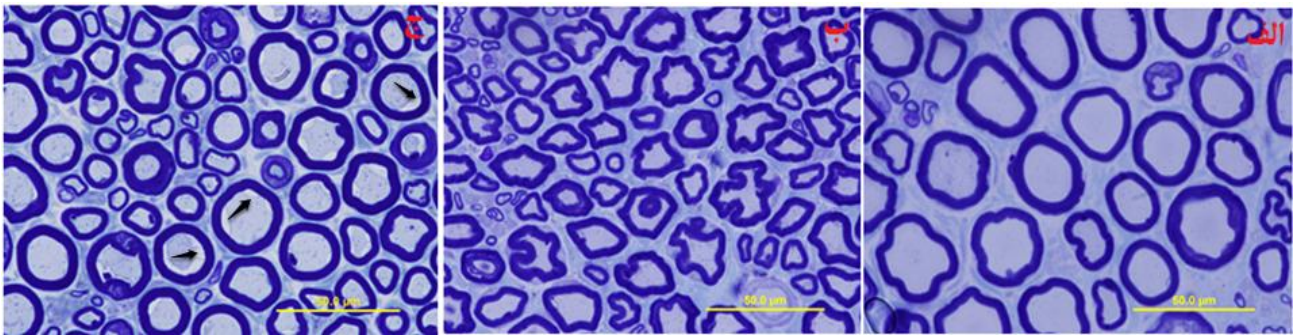
### مقایسه استحکام کششی داربست‌های

#### سلول‌زدایی شده و عصب سیاتیک با استفاده از

#### آزمون کششی

در بررسی نتایج حاصل از قطر عصب در گروه‌های مختلف هیچ اختلاف معناداری در بین گروه‌های تیمار شده با گروه کنترل مشاهده نشد (نمودار ۱).

<sup>10</sup> Tukey

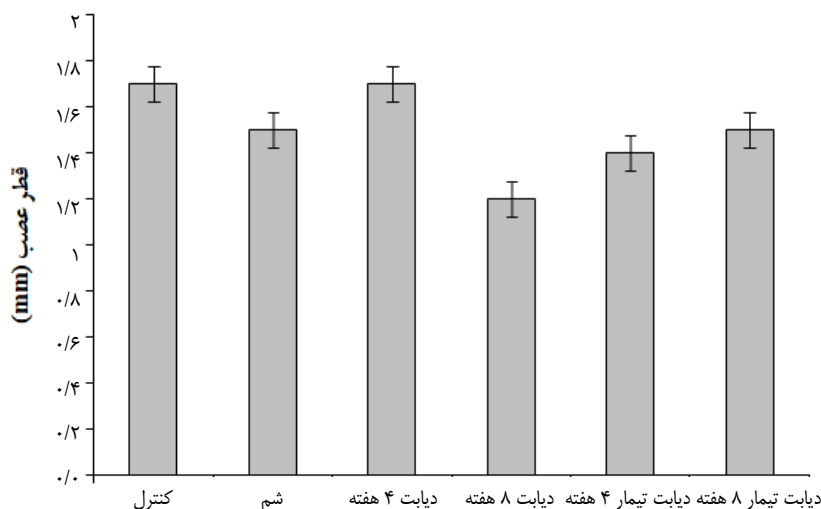


**شکل ۲-** مقایسه غلاف میلین عصب سیاتیک در گروه کنترل (الف)، گروه دیابت ۸ هفته‌ای (ب) و گروه دیابت تیمار با بنفوتیامین ۸ هفته‌ای (ج) با استفاده از برش‌های نیمه‌نازک. چروکیدگی غلاف میلین در گروه دیابتی (ب) بیانگر تغییرات ساختاری غلاف میلین، آندونوریوم و احتمالاً جداشدگی آکسولما از غلاف میلین است. جداشدگی نسبی آکسولما از غلاف میلین در گروه بنفوتیامین (ج، پیکان‌ها) مشهود است. رنگ آمیزی آبی تولوئیدین، بزرگنمایی:  $\times 1000$ .

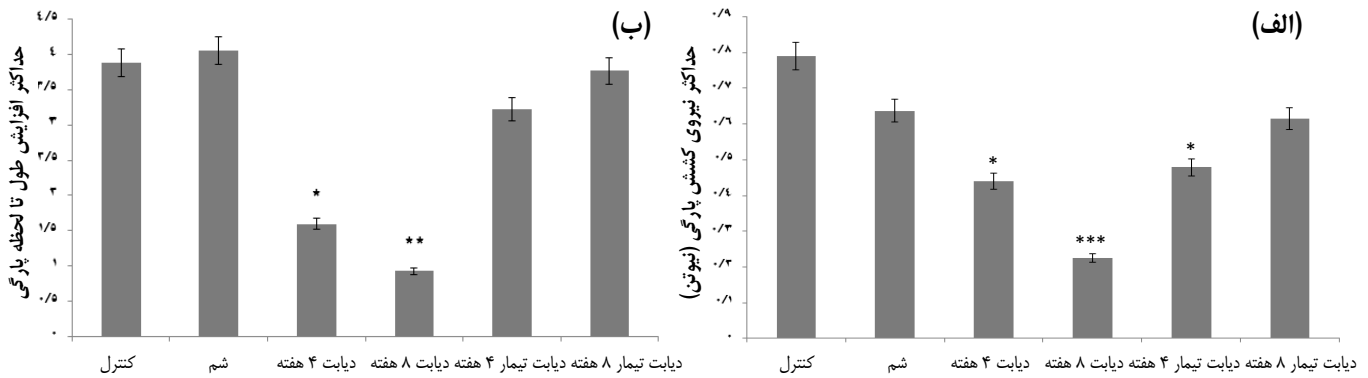
## بحث

نوروپاتی یکی از عوارض ناتوان‌کننده و معلولیت‌زای بیماری دیابت است که به دلیل اختلالات متابولیکی و به دنبال آن تغییرات پاتولوژیک ماتریکس خارج سلولی بوجود می‌آید. از جمله تغییراتی که به دنبال دیابت در ماتریکس خارج سلولی بوجود می‌آید، می‌توان به کاهش میزان هیپران سولفات، و افزایش لامینین، فیبرونکتین و کلاژن نوع IV اشاره کرد [۸]. این نوع نوروپاتی دیابتی تقریباً نیمی از افراد دیابتی را گرفتار می‌کند. از آنجا که پاتوژنز نوروپاتی دیابتی بطور دقیق مشخص نیست، مطالعات زیادی برای شرح سازوکارهای درگیر در آن انجام شده است [۲]. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در گروه‌های تیمار شده با بنفوتیامین در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده میانگین بیشینه نیروی مورد نیاز جهت پاره‌شدن عصب، افزایش یافته است. همچنین میزان ازدیاد طول تا نقطه

پارگی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است، اما در گروه‌های دیابتی تیمار شده با بنفوتیامین میزان ازدیاد طول افزایش یافته است و اختلاف معناداری با گروه کنترل ندارد. نتایج پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که هیپیرگلیسمی باعث افزایش سنتز دی‌آسیل‌گلیسرول می‌شود، دی‌آسیل‌گلیسرول فعالیت پروتئین کیناز C را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت پروتئین کیناز C با افزایش نفوذپذیری عروق و افزایش ضخامت غشاء پایه باعث القاء ایسکمی در اعصاب محیطی می‌شود [۹]. همچنین در شرایط هیپیرگلیسمی، ضخامت غشاء پایه در بسیاری از بافت‌های بدن از جمله بافت عصبی افزایش می‌یابد. افزایش ضخامت غشاء پایه موجب تغییر در ویژگی‌های نفوذپذیری پرینوریوم شده و می‌تواند سرعت عبور ماکرومولکول‌های ضروری را از پرینوریوم به آندونوریوم آهسته‌تر کند [۹، ۱۰]. ضخیم شدن غلاف اپی و



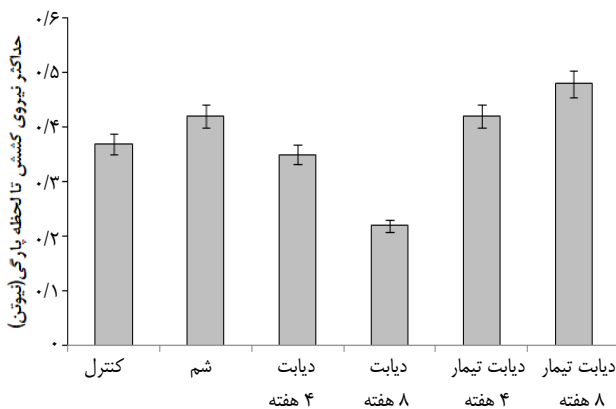
**نمودار ۱-** قطر عصب در گروه‌های دیابتی و سالم. داده‌ها بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است.



**نمودار ۲-** بیشینه نیروی مورد نیاز جهت پاره شدن عصب در گروه‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل (قسمت الف). میزان ازدیاد طول تا نقطه پارگی در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل (قسمت ب). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است.  $p < 0.05$ : \*،  $p < 0.01$ : \*\*،  $p < 0.001$ : \*\*\* و  $p < 0.01$ : \*\*.

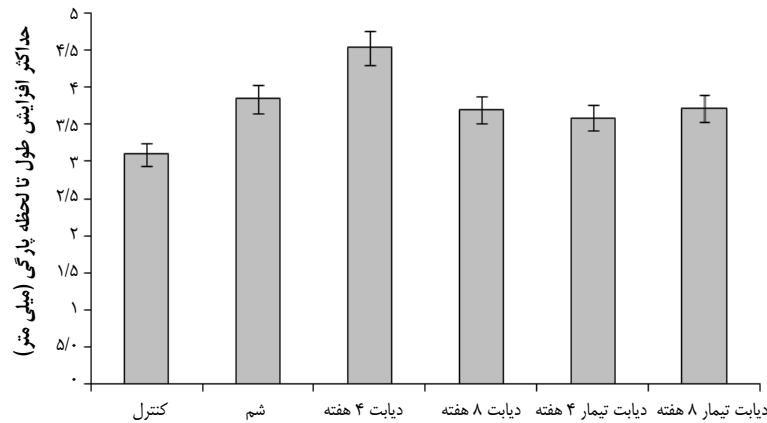
احتمالاً بنفوتیامین از طریق مهار مسیر پلی‌ال باعث دفع متابولیت‌های آسیب‌رسان سلولی از بدن و به دنبال آن کاهش تولید AGEs و استرس اکسیداتیو می‌شود [۱۴]. بررسی‌ها نشان داده تجویز خوراکی بنفوتیامین در بیماران دیابتی موجب افزایش فعالیت آنزیم ترانس‌کتولاز که یک آنزیم مهم در مسیر پنتوز فسفات است، می‌شود. آنزیم ترانس‌کتولاز، گلیسرآلدئید ۳ فسفات و فروکتوز ۶ فسفات را به پنتوز ۵ فسفات و دیگر قندها تبدیل می‌کند [۱۵]. سه مسیر بیوشیمیایی (مسیر هگزوز آمین، مسیر AGE و مسیر دی‌اسیل‌گلیسرول- پروتئین کیناز C) در پاتوژنز آسیب‌های ایجاد شده به وسیله هیپرگلیسمی نقش دارند [۱۵]. تحقیقات نشان داده که بنفوتیامین سه مسیر اصلی اختلال ناشی از هیپرگلیسمی را مهار می‌کند، بدین ترتیب که از افزایش فعالیت مسیر هگزوز آمین جلوگیری کرده و AGEs را کاهش می‌دهد، فعالیت پروتئین کیناز C را به حالت طبیعی برمی‌گرداند و فعالیت آنزیم

پری‌نوریوم در عصب سورال<sup>۱۱</sup> در دیابت نوع ۲ گزارش شده است. تغییری که در لایه‌های عصبی ایجاد می‌شود می‌تواند روی عملکرد فیبر عصبی تاثیر بگذارد [۱۱]. این ضخیم شدن فیبرها در غلاف‌های عصب محیطی ممکن است منجر به استرس مکانیکی شود. بررسی‌ها نشان داده عصب سیاتیک در موش‌هایی که با استرپتوزوتوسین دیابتی شده‌اند سخت‌تر است و انعطاف‌پذیری کمتری دارد و همینطور قطر کلاژن در بافت اپی‌نوریوم عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی دیابتی بیشتر است [۱۲]. در بیماران دیابتی بدون نوروپاتی عصب تیبیال سخت‌تر شده و انعطاف‌پذیری آن کمتر است و میزان سختی در بیماران دیابتی که نوروپاتی دارند بیشتر می‌شود، در نتیجه میزان الاستیسیته اعصاب محیطی در بیماران دیابتی کاهش می‌یابد. این می‌تواند روی ویژگی‌های مکانیکی اعصاب محیطی تاثیر بگذارد [۱۳]. همانطور که مشاهده شد در مطالعه حاضر میزان استحکام کششی عصب سیاتیک در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد، که با توجه به مطالعات قبلی ممکن است در نتیجه کاهش الاستیسیته اعصاب محیطی باشد. بعلاوه در این تحقیق میزان کشیده شدن عصب سیاتیک در گروه دیابت نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد که احتمالاً در نتیجه سخت و شکننده شدن و کاهش الاستیسیته اعصاب محیطی در شرایط دیابتی می‌باشد که نتایج ما با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. هیپرگلیسمی همچنین مسئول افزایش فعالیت در مسیر پلی‌ال می‌باشد [۱۴]. در این پژوهش نیز در گروه‌های تیمار شده با بنفوتیامین میزان استحکام کششی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت،



**نمودار ۳-** بیشینه نیروی مورد نیاز جهت پاره شدن داربست‌های تهیه شده از گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است.

<sup>11</sup> Sural



**نمودار ۴-** میزان ازدیاد طول تا نقطه پارگی، در داربست‌های تهیه شده از گروه‌های دیابتی و گروه‌های دیابتی تیمار شده با بنفوتیامین نسبت به گروه کنترل. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است.

خارج سلولی باعث شده داربست‌های به دست آمده از گروه‌های دیابتی و سالم از نظر مقاومت مکانیکی به صورت مشابه عمل کنند. از آنجا که تاکنون بررسی مشابهی در این زمینه انجام نشده است لازم است در آینده این موضوع مورد توجه بیشتری قرار گیرد. همچنین بررسی بافت‌شناسی عصب سیاتیک نشان داد غلاف میلین در گروه دیابت نسبت به گروه سالم دچار تغییر شده است. چروکیدگی غلاف میلین در گروه دیابتی بیانگر تغییرات ساختاری غلاف میلین، آندونوریوم و احتمالاً جداشدگی آکسولما از غلاف میلین است. بعلاوه تغییر در بهم پیوستگی میلین، حالت دندان‌دندانه وسیع غیرطبیعی نیز مشاهده شد. این تغییرات در گروهی که با بنفوتیامین تیمار شده‌اند مشاهده نشد. به نظر می‌رسد بنفوتیامین توانسته تا حدودی از آسیب به غلاف میلین پیشگیری نماید.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد دیابت موجب کاهش استحکام کششی در اعصاب محیطی می‌شود که با توجه به مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است احتمالاً در نتیجه افزایش میزان سختی غشاء پایه عصب، کاهش انعطاف‌پذیری و کاهش میزان الاستیسیته عصب می‌باشد. به نظر می‌رسد افزایش ضخامت غشاء پایه و سخت شدن بافت عصب به دنبال افزایش تولید محصولات نهایی گلیکاسیون باعث شده عصب استحکام کششی کمتری داشته و در نتیجه کاهش الاستیسیته، تغییر طول کمتری نسبت به گروه‌های سالم داشته باشد. از طرف دیگر، براساس بررسی‌هایی که تاکنون صورت گرفته است مشخص شده بنفوتیامین می‌تواند مانع افزایش تولید

آلدوزدوکتاز را کاهش و در نتیجه غلظت سوربیتول را کم می‌کند [۱۶]. توانایی بنفوتیامین برای مهار سه مسیر اصلی ممکن است در ممانعت از پیشرفت عوارض دیابتیک مفید باشد [۱۵]. در مقایسه بین بیماران دیابتی و غیردیابتی کاهش سطح پلاسمایی تیامین نشان داده شده است، و مشخص شده کلیرنس کلیوی تیامین در شرایط دیابت ۱۶ تا ۲۴ برابر افزایش داشته است [۱۷]. پژوهش‌های پیشین نشان داده که مصرف بنفوتیامین باعث افزایش معنی‌دار در تیامین و مشتقات آن در خون، پوست و ماهیچه می‌شود. هیپرگلیسمی ناشی از دیابت تاثیر زیادی روی ساختار و عملکرد عصب محیطی دارد. یکی از عوارض ناشی از هیپرگلیسمی طولانی‌مدت تغییر بافت پیوندی و ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی می‌باشد. به ویژه افزایش سطوح کلاژن در پرنوریوم، در غشاء پایه و در آندونوریوم اتفاق می‌افتد [۱۹، ۱۸]. اگر چه مکانیسمی که منجر به تغییرات در بافت پیوندی و ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی در دیابت می‌شود هنوز به طور کامل مشخص نشده، پیشنهاد شده که افزایش تولید محصولات نهایی گلیکاسیون ممکن است در ایجاد آن نقش داشته باشد [۱۵]. در این پژوهش از روش سلول‌زدایی ساندل استفاده شد. بررسی‌ها نشان داده سلول‌زدایی باعث کاهش استحکام و افزایش شکنندگی داربست نسبت به عصب طبیعی می‌شود که گفته شده احتمالاً مراحل سلول‌زدایی باعث حذف یک یا تعداد بیشتری از اجزاء ماتریکس خارج سلولی شده است [۲۰]. در این پژوهش، مقایسه داربست‌های تهیه شده از گروه‌های دیابتی و سالم نشان داد که این داربست‌ها از نظر مقاومت مکانیکی و میزان ازدیاد طول هیچ اختلاف معنی داری با هم نداشتند که با توجه به تحقیقات گذشته احتمالاً حذف برخی اجزاء ماتریکس

محل طرح شماره ۳/۴۱۸۵۳ انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را اعلام می‌نمایند.

## تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## نقش نویسندگان

ل.و.ق: انجام مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله؛ م.ب.ر: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ م.م.م: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ ن.م.ش: انجام مطالعه و نگارش مقاله.

## فهرست منابع

- [1] He Z, King GL, Microvascular complications of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33 (2004) 215-238.
- [2] Hill R, Extracellular matrix remodelling in human diabetic neuropathy. *J Anat* 214 (2009) 219-225.
- [3] Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S, Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des* 14 (2008) 953-961.
- [4] King R, The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *Mol Pathol* 54 (2001) 400-408.
- [5] Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thomalley PJ, Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes* 52 (2003) 2110-2120.
- [6] Nenna A, Nappi F, Singh SSA, Sutherland FW, Di Domenico F, Chello M, Spadaccio C, Pharmacologic approaches against advanced glycation end products (AGEs) in diabetic cardiovascular disease. *Res Cardiovasc Med* 4 (2015) e26949.
- [7] Sondell M, Lundborg G, Kanje M, Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res* 795 (1998) 44-54.
- [8] Hill R, Williams P, A quantitative analysis of perineurial cell basement membrane collagen IV, laminin and fibronectin in diabetic and non-diabetic human sural nerve. *J Anat* 201 (2002) 185-192.
- [9] Kawano T, A Current overview of diabetic neuropathy—mechanisms, symptoms, diagnosis, and Treatment. In: Armada-Da-Silva P, ed, *Peripheral Neuropathy*. IntechOpen, 2014: 89-105.
- [10] Aldaghi MR, Jalali M, Nikravesh MR, Fazel A, Sankian M, Comparison of insulin and alpha lipoic acid treatment on laminin expression in sciatic nerve of diabetic rats. *J Cell Animal Biol* 7 (2013) 102-108.
- [11] Kundalic B, Ugrenovic S, Jovanovic I, Stefanovic N, Petrovic V, Kandalic J, Stojanovic V, Morphometric analysis of connective tissue sheaths of sural nerve in diabetic and nondiabetic patients. *BioMed Res Int* 2014 (2014) 870930.
- [12] Wang H, Layton B, Sastry A, Nerve collagens from diabetic and nondiabetic Sprague-Dawley and biobreeding rats: an atomic force microscopy study. *Diabetes Metab Res Rev* 19 (2003) 288-298.
- [13] Ishibashi F, Taniguchi M, Kojima R, Kawasaki A, Kosaka A, Uetake H, Elasticity of the tibial nerve assessed by sonoelastography was reduced before the development of neuropathy and further deterioration associated with the severity of neuropathy in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Invest* 7 (2016) 404-412.
- [14] Zychowska M, Rojewska E, Przewlocka B, Mika J, Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy—experimental and clinical studies. *Pharmacol Rep* 65 (2013) 1601-1610.
- [15] Hammes H-P, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nature Med* 9 (2003) 294-299.
- [16] Stracke H, Hammes H, Werkmam D, Mavrakis K, Bitsch I, Netzel M, Geyer J, Kopcke W, Sauerland C, Bretzel RG, Federlin KF, Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (2001) 330-336.
- [17] Zhu Z, Varadi G, Carter SG, Pharmacokinetics of the transdermal delivery of benfotiamine. *Acta Diabetol* 53 (2016) 317-322.
- [18] Layton B, Sastry A, Wang H, Sullivan K, Feldman E, Komorowski T, Philbert MA, Differences between collagen morphologies, properties and distribution in diabetic and normal biobreeding and Sprague-Dawley rat sciatic nerves. *J Biomech* 37 (2004) 879-888.
- [19] Bradley JL, King RH, Muddle JR, Thomas PK, The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy. *Acta Neuropathol* 99 (2000) 539-546.
- [20] Zhao Z, Wang Y, Peng J, Ren Z, Zhang L, Guo Q, Xu W, Lu S, Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in fibrin. *Cell Transplant* 23 (2014) 97-110.

## ملاحظات مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد و از

## Research paper

**The effect of benfotiamine administration on tensile strength of sciatic nerve and its acellular scaffold in streptozotocin-induced diabetes in rat**

Leila Vafadar-Ghasemi, Morteza Behnam-Rassouli\*, Maryam Moghadam-Matin, Naser Mahdavi-Shahri

*Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Ira*

Received: 4 March 2018

Accepted: 18 June 2018

**Abstract**

**Background and aims:** Neuropathy as a common complication of diabetes might be induced by changes in the extracellular matrix, including the thickening of the basal membrane of the peripheral nerve and elevation of the advanced glycation end products in the extracellular matrix. Benfotiamine inhibits nerve damages induced by hyperglycemia through several pathways. The purpose of this study was to study the effect of Benfotiamine administration on the tensile strength of the sciatic nerve and its acellular scaffold in diabetic rat model.

**Methods:** Sixty rats were divided into control, sham and 4 and 8 weeks diabetic groups (with and/or without benfotiamine oral treatment; 100 mg /kg). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin. At the end of the experimental periods (4 and 8 weeks) 1 cm segment of the middle part of the sciatic nerve was removed, half of it was decellularized by the Sandal method and then subjected to tensile strength test. Thin and semi-thin sections were also prepared for histological examinations.

**Results:** The mean force for the breaking of nerve segment in the diabetic groups was significantly reduced compared to control group. Also, the length increase up to the breaking point in diabetic groups was significantly shorter than control group. There were no significant differences in the length increase and maximum force in benfotiamine-treated diabetic groups compared to control group

**Conclusion:** Alteration of extracellular matrix in diabetes condition, might affect the structure of the collagen fibers and therefore reduce the strength of the nerve against the stretch.

**Keywords:** Benfotiamine, Diabetes, Sciatic nerve, Neuropathy

**Please cite this article as follows:**

Vafadar-Ghasemi L, Behnam-Rassouli M, Moghadam-Matin M, Mahdavi-Shahri N, The effect of benfotiamine administration on tensile strength of sciatic nerve and its acellular scaffold in streptozotocin-induced diabetes in rat. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 25-33.

\*Corresponding author: behnam@ferdowsi.um.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-6580-7620)