مقاله پژوهشی

اثر تزریق داخل صفاقی هیستیدین بر آلودینی سرما، آزمون درد فرمالین و آسیب‌شناسی عصب سیاتیک له‌شده در موش صحرایی

امیر امنیت طلب[1*]، اسماعیل تمدنفرد[2]، سیامک چراغیان[3]، احد درستقول[4]، الهام بابادوست ثانی[5]، مهرزاد مهر[6]، زهره نجفی[7]

تاریخ دریافت 1394/02/24 تاریخ پذیرش 1394/04/25

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: اثر محافظتی هیستیدین بر روی سیستم عصبی به‌خوبی مشخص شده است. در این مطالعه کارآیی آزمون‌های آلودینی سرما و فرمالین همراه با آسیب‌شناسی در تزریق داخل صفاقی هیستیدین به موش‌های صحرایی دارای له‌شدگی عصب سیاتیک ارزیابی شد.

مواد و روش کار: از ۵۷ سر موش صحرایی برای ارزیابی آلودینی سرما و آزمون فرمالین استفاده شد. مقاطع هیستوپاتولوژی نیز با دو روش رنگ‌آمیزی و تعداد سلول‌های شوان، فیبرهای عصبی میلینه برای ارزیابی روند ترمیم بررسی شدند.

یافته‌ها: آلودینی سرما و آزمون فرمالین در گروه دریافت‌کننده هیستیدین mg/kg۴۰۰ بهترین نتایج را داشتند که با نتایج آسیب‌شناسی مطابقت داشتند. در این گروه، آلودینی ناشی از سرما از روز ۷ پس از ایجاد ضایعه در عصب سیاتیک شروع و در روزهای ۱۴ و ۲۱ به حداکثر رسیده و پس‌ازآن تا آخر تجربه (روز ۴۲) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p<0.05$). همچنین پاسخ درد فرمالینی در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ نسبت به قبل از ایجاد ضایعه با توجه به گروه کنترل کاهش یافت ($p<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد آزمون‌های آلودینی سرما و فرمالین همراه با آسیب‌شناسی تأییدکننده اثر هیستیدین mg/kg۴۰۰ در ترمیم عصب سیاتیک له‌شده بود. همچنین نتایج این تحقیق و مطالعات پیشین نشان داد در مقایسه آزمون‌های فیزیولوژیک برای دردهای نوروپاتیک، شاخص عمل، آلودینی سرما و درد فرمالین به ترتیب دارای کارایی بهتر و نتایج با همخوانی بیشتر با آسیب‌شناسی می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: آلودینی سرما، آزمون درد فرمالین، هیستیدین، عصب سیاتیک له‌شده، موش صحرایی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره ششم، ص 541-531، شهریور 1394

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده دامپزشکی، صندوق پستی ۹۶۹ تلفن: ۰۹۱۴۴۴۱۴۶۱۳

Email: a.amniattalab@iaurmia.ac.ir

مقدمه

هیستیدین به‌عنوان یک اسیدآمینه نیمه ضروری دارای اعمال بیولوژیکی زیادی شامل ضدالتهابی، ضد آدم (خیز)، مسکن و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد که باعث حذف رادیکال‌های آزاد و نیز فلزات سنگین می‌شود (۱،۲). ایجاد ضایعه در یک عصب محیطی یک جراحت معمول می‌باشد. علی‌رغم بیش از ۱۵۰ سال تجربه در مدیریت جراحی عصب محیطی، ترمیم عصب مسئله‌ای است که هنوز در جراحی میکروسکوپی مطرح است (۳). جراحت عصب محیطی در حدود ۲،۸درصد از کل بیماران دارای جراحات ضربه‌ای (Trauma) را شامل می‌شود (۴).

[1] استادیار پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه (نویسنده مسئول)

[2] استاد فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[3] کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

[4] آزمایشگاه بافت شناسی و آسیب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

[5] دانش آموخته کارشناسی پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

[6] دانش آموخته کارشناسی پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

[7] دانش آموخته کارشناسی پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

ایجاد ضایعات عصبی در اثر دیابت، ضربه، سموم عصبی، عفونت، کمبود ویتامین‌ها، هجوم سلول‌های سرطانی و یا ایجاد تجربی ضایعاتی مثل له کردن، گره زدن، قطع کردن و تزریق مواد التهابی به داخل اعصاب محیطی باعث ایجاد اختلال در اعمال حسی، حرکتی و حتی خودمختار می‌شوند و در کل درد نوروپاتیک محیطی را ایجاد می‌نمایند (۵،۶). درد نوروپاتیک محیطی با آلودینی (درد ناشی از محرکی که در حالت طبیعی دردزا نیست) و هیپرآلژزی (پاسخ بیش از حد به محرک دردزا) مشخص می‌شود (۷). به دنبال ایجاد ضایعه در اعصاب محیطی به‌ویژه عصب سیاتیک آلودینی ایجاد می‌شود. آلودینی به حالتی از درد گفته می‌شود که به محرک‌های طبیعی مثل لامسه، پاسخ مشابه درد داده می‌شود. آلودینی به آلودینی مکانیکی و آلودینی حرارتی تقسیم می‌شود. آلودینی ناشی از استون در هر دو نوع آلودینی قرار می‌گیرد ولی به علت ایجاد سرما جزو آلودینی سرما محسوب شده است (۸،۹). آزمون فرمالین یک آزمون استاندارد برای بررسی مکانیسم‌های درد پیکری می‌باشد. در این آزمون، حجم ۵۰ میکرولیتر از فرمالین رقیق (۱ تا ۵ درصد) در کف پای حیوان تزریق و پاسخ‌های درد شامل لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پا، مدت‌زمان نگه‌داشتن پا در نزدیکی بدن، گذاشتن و بلند کردن مداوم پا به مدت یک ساعت در فواصل زمانی پنج‌دقیقه‌ای ثبت می‌شود. در اکثر مطالعات مربوط به درد فرمالین، مدت‌زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پا به‌عنوان رفتار درد ثبت می‌شود. (۱۱،۱۰).

تاکنون مطالعات محدودی بر روی اثرات هیستیدین بر روی ضایعات اعصاب محیطی و ارزیابی آزمون‌های مختلف فیزیولوژیک همراه با آسیب‌شناسی آن انجام شده است. در یک مطالعه که در آن شاخص عملکرد و هیستوپاتولوژی اثر هیستیدین بر روی عصب سیاتیک له‌شده موش صحرایی انجام شد مشخص گردید نتایج آزمون شاخص عملکرد با نتایج هیستوپاتولوژی همخوانی داشته و هیستیدین در مقدار ۴۰۰ mg/kg بهترین اثر را در ترمیم عصب سیاتیک داشته است (۱۲). در یک بررسی اثر جدا و توأم تزریقات داخل صفاقی هیستیدین و ان استیل سیستئین بر روی آسیب تجربی القاشده توسط دوکسوروبیسین (Doxorubicin) در عصب سیاتیک موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت. درمان توأم با هیستیدین و ان استیل سیستئین پاسخ‌های بهتری در مقایسه با استفاده آن‌ها به‌تنهایی نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده اثرات محافظتی عصب محیطی برای هیستیدین و ان استیل سیستئین بود (۱۳). هدف از این بررسی، ارزیابی و مقایسه توأم آزمون‌های فیزیولوژیک آلودینی سرما و درد فرمالینی با هیستوپاتولوژی برای اثرات ترمیمی هیستیدین در عصب سیاتیک له‌شده موش صحرایی می‌باشد تا کارایی این آزمون‌ها در مقایسه با هیستوپاتولوژی و نیز آزمون شاخص عمل عصب سیاتیک بررسی شود.

مواد و روش کار

۱. حیوانات:

۵۷ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن بین ۳۰۰-۲۵۰ گرم پس از تهیه در قفس‌های پرورشی به تعداد سه موش صحرایی در هر قفس، در آزمایشگاه با درجه حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد چرخه روشنایی ـ تاریکی ۱۲ ساعت (شروع روشنایی ساعت ۷ و شروع تاریکی ساعت ۱۹) نگهداری شدند. غذای پلتی استاندارد و آب به‌طور آزاد در اختیار حیوانات قرار داشت. گروه‌بندی حیوانات به‌صورت ۳ گروه ۱۸ تایی به شکل زیر بود.

گروه اول: جراحی و له کردن عصب سیاتیک انجام و از روز اول تا هفتم پس از جراحی، تزریق داخل صفاقی سالین نرمال انجام شد. به علت بررسی آسیب‌شناسی در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی، این گروه به سه زیرگروه دیگر تقسیم شدند.

گروه دوم: جراحی و له کردن عصب سیاتیک انجام شد و از روز اول تا هفتم پس از جراحی، از هیستیدین در مقدار ۵۰ mg/kg به روش داخل صفاقی دریافت کردند. به علت بررسی آسیب‌شناسی در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی، این گروه نیز به سه زیرگروه تقسیم شدند.

گروه سوم: به مدت ۷ روز پس از عمل جراحی و له کردن عصب سیاتیک، هیستیدین در مقدار ۴۰۰ mg/kg به روش داخل صفاقی تزریق شد. به علت بررسی آسیب‌شناسی در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی، این گروه نیز به سه زیرگروه تقسیم شدند. در بررسی‌های رفتاری، رفتارهای موردنظر قبل از جراحی از حیوانات گرفته شد و به‌عنوان گروه‌های شاهد مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. برای بررسی هیستوپاتولوژیک، گروه شاهد شامل ۳ سر موش صحرایی بود. در این تجربه از محصول سالین نرمال (کلرور سدیم ۰،۹ درصد) استریل و پودر هیستیدین دی هیدروکلراید (تهیه‌شده از شرکت دارویی سیگمای آمریکا) استفاده شد. از سالین نرمال در گروه کنترل به روش تزریق داخل صفاقی و نیز برای حل کردن پودر هیستیدین استفاده شد. همچنین از محلول فرمالین ۳۸درصد مرک آلمان به‌منظور تهیه فرمالین ۱درصد استفاده شد. محصول استون از داروخانه‌های محلی تهیه شد.

۲. روش جراحی له کردن عصب سیاتیک: پس از اعمال پرهیز غذایی چرخه تاریکی (۱۲ ساعت) موش‌ها با مخلوط کتامین (۸۰mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg) بیهوش شدند. موهای قسمت مورد جراحی از ناحیه پایین برآمدگی هانش تا بالای مفصل

زانو تراشیده و با بتادین رقیق ضد عفونی و سپس ناحیه موردنظرشان بندی شد. پوست قسمت مذکور به طول ۲-۳ سانتی متر برش و پس از جدا کردن پوست از قسمت‌های دیگر زیر پوست ناحیه جراحی با چهار قلاب به پوست وصل شده و گشاد شد. یک برش طولی بر روی عضله چهار سر ران به‌منظور رسیدن به عصب سیاتیک داده شد و سپس در زیر قلاب‌ها قرار داده شد. عصب سیاتیک را بعد از جدا سازی از بافت‌های اطرافی، تنه عصب سیاتیک در فاصله یک سانتی متر از بالای محل سه شاخه شدن این عصب با پنس هموستاتیک متوسط جراحی تحت فشار قرار گرفت. میزان فشار ایجاد شده ۲-۲،۵ (kg/mm^2) و مساحت محل له‌شدگی ۳-۴ (mm^2) محاسبه شد. قبل و پس از عمل له کردن عصب سیاتیک، عصب سیاتیک با محلول سالین نرمال استریل شستشو داده شد. پس از باز کردن پنس و مشاهده میزان له‌شدگی عصب سیاتیک، عضلات توسط بخیه سر تا سری و پوست توسط ۳ عدد بخیه ساده تکی توسط نخ کاتکوت شماره ۴ صفر بخیه شدند. روی بخیه‌های پوست اسپری اکسی تتراسیکلین اسپری شد. حیوانات تا به هوش آمدن کامل تحت مراقبت قرار گرفتند.

۳. طریقه انجام آزمون آلودینی سرمای ناشی از استون: برای انجام این آزمون، حیوانات در روزهای ۷ قبل و ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ پس از جراحی در جعبه‌های شیشه‌ای به ابعاد (۲۵×۲۵×۲۵) سانتیمتر با کف فلزی مشبک قرار داده شدند. پانزده دقیقه پس از عادت کردن به محیط، یک قطره استون توسط سر سوزن تزریق شماره ۲۵ نوک بریده از فاصله نیم سانتیمتری به کف پای دارای ضایعه در عصب سیاتیک پاشیده شد. سپس به مدت پنج دقیقه مدت‌زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پا به وسیله کرونومتر دیجیتال دستی اندازه گیری شد (۱۴).

۴. طریقه انجام آزمون درد فرمالین: این آزمون در روزهای ۱۴ قبل و ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی انجام گرفت. برای انجام این آزمون، حیوانات در جعبه‌های شیشه‌ای به اندازه 25×30×25 سانتیمتر قرار داده شدند. جعبه شیشه‌ای بر روی چهارچوبی قرار داشت که در داخل چهارچوب یک آینه با زاویه ۴۵ درجه قرار داشت. آینه به‌منظور دیدن و ارزیابی کف پاهای حیوان بود. نیم ساعت پس از عادت کردن به محیط، به کف پای حیوانات از محصول یک درصد فرمالین به حجم ۵۰ میکرولیتر با سر سوزن شماره ۲۹ به روش زیر جلدی تزریق شد. بلافاصله مدت‌زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده در فواصل زمانی دقایق صفر تا پنج (مرحله اول) و دقایق ۱۵ تا ۴۵ (مرحله دوم) اندازه گیری شد. تقسیم بندی پاسخ درد ناشی از فرمالین به مراحل اول و دوم بر اساس مطالعات قبلی انجام گرفت (۱۶،۱۵).

۵. روش تهیه و رنگ‌آمیزی مقاطع آسیب‌شناسی: برای بررسی مقاطع آسیب‌شناسی، در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از معدوم نمودن حیوانات که به روش مرگ با ترحم بعد از جراحی، با مخلوط کتامین و زایلازین و سپس با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم انجام شد، پس از مشاهده تنه عصب سیاتیک در موضع جراحی باز شده دو رشته نخ به طول ۱۰ cm از دو طرف ناحیه له‌شده عصب عبور داده و گره زده شد. اعصاب از قسمت خلفی گره‌ها بریده شده و به همراه نخ‌ها بر روی اسلایدهای شیشه ای طوریکه مسیر عصب از مرکز به محیط توسط پیکان مشخص شده بود قرار داده شدند. قابل ذکر اینکه هیچ گونه فشاری در طی این مراحل بر روی اعصاب وارد نشد. نمونه‌های تنه عصب سیاتیک در بافر فرمالین ۱۰درصد قرار داده شد و برای تهیه مقاطع و بررسی ضایعات به آزمایشگاه پاتولوژی تحویل داده شدند. پس از ۴۸ ساعت و ثبوت نمونه‌ها از اعصاب سیاتیک از ناحیه له‌شده به‌صورت طولی و عرضی برش داده شده و به دو روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و لوکسول فست بلو (Luxol fast blue) با روش‌های استاندارد و طی مراحل معمول رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده پس از چسبانیده شدن بر روی اسلایدهای شیشه ای و خشک شدن، توسط میکروسکوپ نوری نیکون مدل (YS2-T) برای بررسی آسیب‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تجزیه‌وتحلیل آماری:

به دلیل اینکه در آزمونهای رفتاری و بررسی هیستوپاتولوژیک، پارامترهای موردنظر به کرات در زمانهای مشخص اندازه گیری شدند، داده‌های به‌دست‌آمده با آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) با اندازه گیری مکرر و سپس آزمون دانکن تجزیه‌وتحلیل شدند. داده‌ها به‌صورت Mean+SEM آورده شده‌اند و در سطح معنی دار $p<۰.۰۵$ ارزیابی شده‌اند.

یافته‌ها

اثر هیستیدین بر آلودینی سرمای ناشی از استون: درجدول شماره ۱ که نشان‌دهنده ارتباط بین تزریق داخل صفاقی هیستیدین و پاسخ آلودینی سرما در موش‌های صحرایی دارای له‌شدگی عصب سیاتیک می‌باشند، در هر ۳ گروه در روز ۷ قبل از جراحی پاسخ آلودینی ۰/۰±۰/۰ به دست آمد. در هر ۳ گروه در روز ۱۴ پس از جراحی در مقایسه با سایر روزهای پس از جراحی، افزایش معنی دار ($p<۰/۰۵$) را نشان داد. گروه دریافت کننده هیستیدین در تعداد ۵۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن اختلاف معنی‌داری را با گروه دریافت کننده سالین نرمال نشان نداد. در گروه دریافت کننده هیستیدین در مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن در روزهای ۲۱، ۲۸ و ۳۵ و ۴۲

کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۵) در پاسخ آلودینی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. در گروه دریافت کننده هیستیدین در مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن در روزهای ۲۸، ۳۵ و ۴۲ جراحی نسبت به روز ۷ قبل از جراحی و ۷ پس از جراحی اختلاف معنی دار نشان نداد.

جدول (1): ارتباط تزریق داخل صفاقی هیستدین به مدت ۷ روز و پاسخ آلودینی سرمای ناشی از استون در موش‌های صحرایی دارای لەشدگی تجربی در عصب سیاتیک (Mean±SEM)

روز / گروه	-۷	+۷	+۱۴	+۲۱	+۲۸	+۳۵	+۴۲
NS	۰/۰±۰/۰	۵±۱/۴*	۱۴/۳±۲/۷**	۱۱/۹±۳/۳*	۱۰/۷±۲/۳*	۷/۸±۱/۸*	۵/۱±۱/۳
His 50	۰/۰±۰/۰	۷/۷±۲/۱*	۱۲/۸±۱/۶**	۸/۸±۱/۱*	۸/۳±۲/۸*	۶/۴±۲/*	۳/۲±۱/۸
His 400	۰/۰±۰/۰	۳/۲±۱/۲	۱۳/۱±۱/۸**	۵±۱/۲*	۳/۹±۱/۶*	۲/۲±۱/۵*	۲/۷±۱/۱

*) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ با سایر روزها می‌باشد.

**) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ با گروه دریافت کننده سالین نرمال می‌باشد. تعداد حیوان در هر گروه به ۶ سر موش صحرائی

اثر هیستیدین بر پاسخ درد فرمالینی: در جدول شماره ۲ که ارتباط بین تزریق داخل صفاقی هیستیدین و پاسخ درد ناشی از فرمالین در موش‌های صحرایی دارای لەشدگی عصب سیاتیک می‌باشند، در هر ۳ گروه قبل از جراحی، در مرحله اول و دوم درد فرمالینی تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. در گروه درمان شده با سالین نرمال، کاهش معنی دار (p<۰/۰۵) در هر دو مرحله درد در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی نسبت به قبل از جراحی مشاهده شد. گروه‌های درمان شده با هیستیدین ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن در روزهای ۱۴، ۲۸ پس از جراحی و نه در روز ۴۵ پس از جراحی، کاهش معنی دار در مرحله اول درد فرمالینی نشان دادند و در مورد مرحله دوم کاهش معنی دار (p<۰/۰۵) بود. در گروه درمان شده با هیستیدین ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن، از روز ۲۸ پس از جراحی نسبت به سالین نرمال، در مرحله اول و دوم درد تفاوت معنی دار (p<۰/۰۵) نشان داد و در روز ۴۲ پس از جراحی فقط در مرحله دوم تفاوت معنی دار (p<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

جدول (2): ارتباط تزریق داخل صفاقی هیستدین به مدت ۷ روز و پاسخ درد ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین در موش‌های صحرایی دارای لەشدگی تجربی در عصب سیاتیک (Mean±SEM)

	-۱۴		+۱۴		+۲۸		+۴۲	
روز / گروه	مرحله اول دقایق (۵-۰)	مرحله دوم دقایق (۵۰-۱۵)	مرحله اول دقایق (۵-۰)	مرحله دوم دقایق (۵۰-۱۵)	مرحله اول دقایق (۵-۰)	مرحله دوم دقایق (۵۰-۱۵)	مرحله اول دقایق (۵-۰)	مرحله دوم دقایق (۵۰-۱۵)
NS	۶۷±۷/۱	۱۹۲±۱۷/۴	۶/۰±۲/۱*	۴/۶±۱/۴*	۱۶/۴±۳/۸*	۸/۹±۲/۲*	۳۶±۵/۹*	۷۵±۸/۳*
His 50	۷۲/۸±۶/۴	۱۸۵±۱۹/۲	۱۰/۹±۱/۹*	۶/۲±۱/۶*	۲۴/۱±۴/۲*	۱۰/۸±۳/۶*	۴۵/۱±۸/۶*	۶۸/۳±۷/۶*
His 400	۵۸±۸/۱	۲۰۶±۱۶/۸	۱۱/۸±۳/۲*	۷/۸±۲/۱*	۳۶/۴±۵/۵**	۳۱/۲±۴/۳**	۶۴/۵±۷/۲*	۱۰۴±۱۲/۲**

*) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ با روز ۱۴- می‌باشد.

**) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ با سالین نرمال در روزهای ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی می‌باشد. تعداد حیوان در هر گروه به ۶ سر موش صحرائی

اثر هیستیدین بر تعداد سلول‌های شوان عصب سیاتیک: در جدول شماره ۳، که اثر تزریق داخل صفاقی هیستیدین ۵۰ و ۴۰۰ mg/kg را بر تعداد سلول‌های شوان در موش‌های صحرایی با له‌شدگی عصب سیاتیک نشان می‌دهد، تعداد سلول‌های شوان در مقاطع آسیب‌شناسی اخذ شده از حیوانات سالم، تفاوت معنی‌داری در روزهای ۲۸،۱۴ و ۴۲ نشان نداد. در مقاطع موش های دارای له شدگی عصب سیاتیک، پس از تزریق سالین نرمال بصورت داخل صفاقی، در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ افزایش معنی داری در تعداد سلول‌های شوان نسبت به گروه سالم مشاهده شد. در تزریق مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ mg/kg هیستیدین به مدت ۷ روز، اثر معنی داری بر روی افزایش تعداد سلول های شوان ناشی از له‌شدگی عصب سیاتیک نداشت. همچنین در گروه‌های با له‌شدگی عصب ساتیک، درمان شده با سالین نرمال و هیستیدین ۵۰ و ۴۰۰ mg/kg کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های شوان در روزهای ۲۸ و ۴۲ نسبت به روز ۴۲ ($p<0.05$) مشاهده شد.

جدول (3): اثر تزریق داخل صفاقی هیستیدین در مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن بر تعداد سلول‌های شوان در عصب سیاتیک دارای له‌شدگی تجربی در موش‌های صحرایی (Mean±SEM)

روز / گروه	۱۴	۲۸	۴۲
سالم	۲۶۷±۲۸	۲۹۰±۲۲	۲۵۰±۳۴
کراش + NS	۷۲۰±۸۶*	۳۹۸±۳۲**	۲۲۹±۱۹*
کراش + His 50	۵۴۵±۷۶*	۳۸۱±۲۶**	۲۴۶±۲۷*
کراش + His 400	۶۳۹±۶۹*	۳۹۲±۳۳**	۲۰۸±۲۸*

*) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح $p<۰/۰۵$ با گروه سالم در همان روز می‌باشد.

**) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح $p<۰/۰۵$ با روز ۱۴ پس از جراحی می‌باشد. تعداد حیوان در هر گروه به ۶ سر موش صحرائی

اثر هیستیدین بر تعداد فیبرهای میلین دار در عصب سیاتیک: جدول شماره ۴ اثر هیستیدین بر تعداد فیبرهای میلین دار را در مقاطع بافتی عصب سیاتیک دارای ضایعه تجربی له‌شدگی نشان می‌دهد. تعداد فیبرهای میلین دار در مقاطع آسیب‌شناسی موش‌های سالم، تفاوت معنی‌داری را در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ نشان نداد. در گروه با له شدگی عصب سیاتیک و درمان شده با سالین نرمال، در تعداد فیبرهای میلین دار نسبت به گروه سالم در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ کاهش معنی دار ($p<0.05$) مشاهده شد. همچنین در این گروه، در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ در تعداد فیبرهای میلین دار افزایش معنی دار ($p<0.05$) مشاهده شد. در گروه دارای له‌شدگی عصب و درمان شده با هیستیدین ۵۰ mg/kg نسبت به گروه سالم در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ کاهش معنی دار ($p<0.05$) و در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ افزایش معنی دار ($p<0.05$) مشاهده گردید. در گروه دارای له شدگی در عصب و درمان شده با هیستیدین ۴۰۰mg/kg در روزهای ۱۴ و ۲۸ در مقایسه با گروه‌های سالم، دارای له‌شدگی عصب سیاتیک درمان شده با سالین نرمال و با هیستیدین ۵۰ میلی‌گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن، افزایش معنی دار ($p<0.05$) بروز کرد. در گروه دریافت کننده هیستیدین در مقدار ۴۰۰ میلی گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن، در تعداد فیبرهای میلین دار در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ افزایش معنی دار ($p<0.05$) ایجاد شد.

جدول (4): اثر تزریق داخل صفاقی هیستدین در مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن بر تعداد فیبرهای میلین دار عصب سیاتیک دارای له‌شدگی تجربی در موش‌های صحرایی (Mean±SEM)

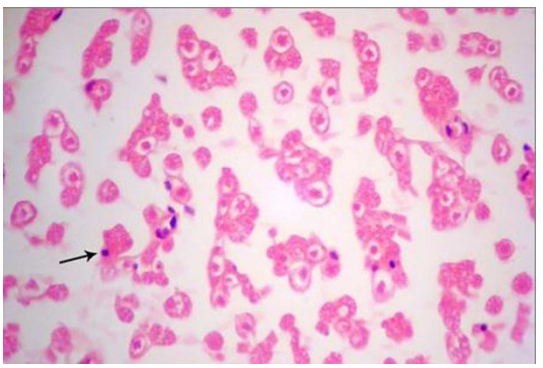
روز / گروه	۱۴	۲۸	۴۲
سالم	۱۳۵۸±۱۵۰	۱۴۷۶±۱۲۵	۱۳۹۸±۱۴۰
کراش + NS	۲۹۷±۴۴*	۳۶۵±۶۷**	۶۵۸±۸۱*
کراش + His 50	۳۳۰±۳۱*	۳۷۲±۷۴**	۵۸۰±۶۷*

کراش + His 400	۶۹۱±۸۶*	۸۴۲±۱۱۰**	۱۱۶۸±۱۲۷*

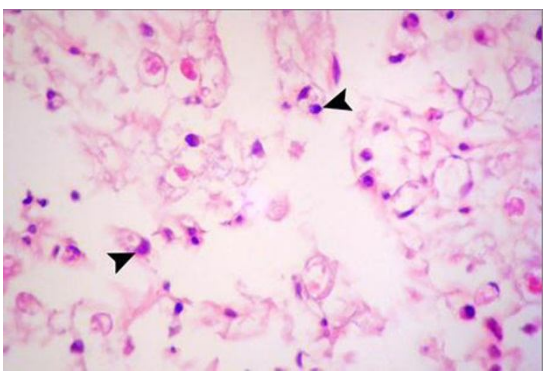
*) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ با گروه سالم می‌باشد.

**) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ با گروه‌های دریافت کننده سالین نرمال و هیستیدین در مقدار ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد. تعداد حیوان در هر گروه به ۶ سر موش صحرائی

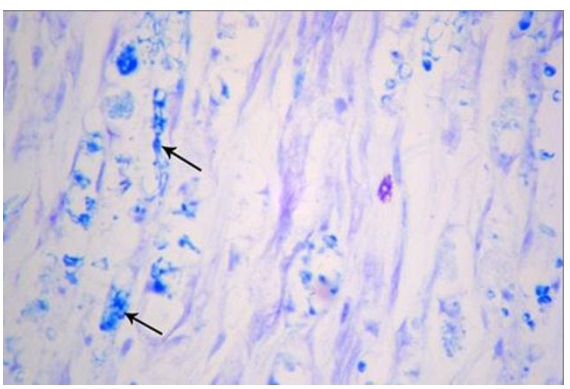
اشکال آسیب‌شناسی:



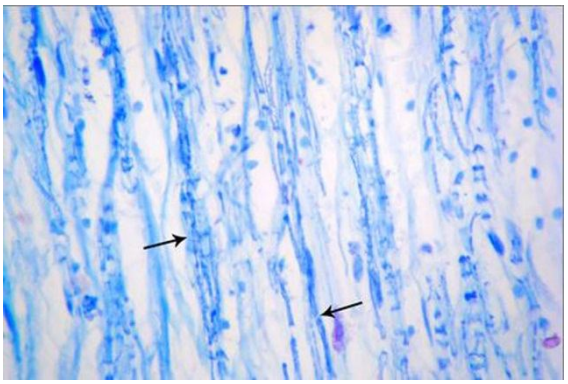
شکل (1): مقطع عرضی عصب سیاتیک سالم. وجود تعداد زیادی از آکسون‌های میلینه به همراه تعداد محدودی از سلول‌های شوان (پیکان)؛ رنگ‌آمیزی (H&E) بزرگنمایی X۱۳۲۰



شکل (2): مقطع عرضی عصب سیاتیک له‌شده در روز ۱۴ دیستروفی شدید و از بین رفتن تعداد زیادی از رشته‌های عصبی و نمایان بودن دبریس ناشی از آن‌ها. افزایش تعداد سلول‌های شوان (سر پیکان)؛ رنگ‌آمیزی (H&E) بزرگنمایی X۱۳۲۰



شکل (3): مقطع طولی عصب سیاتیک له‌شده. دژنره شدن اکثر فیبرهای عصبی و رنگ پذیری بسیار کم. در برخی از فیبرها بقایای میلین به رنگ آبی مشاهده می‌شود (پیکان)؛ رنگ‌آمیزی (Luxol Fast Blue) بزرگنمایی X۱۳۲۰



شکل (4): مقطع طولی عصب سیاتیک له‌شده و دریافت کننده هیستیدین به مقدار ۴۰۰mg/kg در روز ۴۲. افزایش تعداد فیبرهای عصبی میلینه (پیکان) و پیشرفت دژنراسیون عصبی درمقایسه با گروه‌های دیگر؛ رنگ‌آمیزی (Luxol Fast Blue) بزرگنمایی X۱۳۲۰

بحث و نتیجه‌گیری

نقش تعدادی از اسیدهای آمینه شامل هیستیدین، لوسین، ایزولوسین، لیزین، ترئونین، گلوتامین، فنیل آلانین، تریپتوفان و والین در واکنش‌های التهابی ایجادشده در کولیت، عفونت‌های حاد و مزمن، سوختگی و جراحات ضربه‌ای به‌خوبی به اثبات رسیده است. هیستیدین یکی از معمول‌ترین اسیدهای آمینه طبیعی است و دارای اعمال بیولوژیکی زیادی می‌باشد (۱۷). از آزمون پاسخ به استون در بررسی پاسخ‌های آلودینی درد در انواع مختلف تجربی دردهای نوروپاتیک استفاده شده است. گزارش شده است که آلودینی ناشی از استون بسته به نوع ضایعه عصب سیاتیک از روز اول تا چهارم شروع می‌شود و تا روزهای ۲۱، ۲۸ و یا ۳۵ ادامه می‌یابد و بالاترین شدت آن بین روزهای ۷ تا ۲۸ می‌باشد (۱۹،۱۸،۹). در مطالعه حاضر آلودینی ناشی از سرما از روز ۷ پس از ایجاد ضایعه در عصب سیاتیک شروع و در روزهای ۱۴ و ۲۱ به حداکثر رسیده و پس‌ازآن تا آخر تجربه (روز ۴۲) کاهش می‌یابد که با یافته‌های دیگران مطابقت می‌کند (۱۸،۹). ارزیابی دقیق و کامل رژنراسیون عصبی با آزمون فرمالینی کمتر انجام شده است و گزارش‌ها حاکی از افزایش و یا کاهش درد فرمالینی در برخی از ضایعات تجربی اعصاب محیطی می‌باشد.

به دنبال ایجاد ضایعه در عصب L5 با روش لیگاتور زدن در موش‌های صحرایی، افزایش پاسخ نسبت به تزریق کف‌پایی فرمالین گزارش شده است (۲۰). درحالی‌که به دنبال ایجاد ضایعه در تنه عصب سیاتیک با روش لیگاتور زدن، پاسخ درد فرمالینی کاهش یافته است (۲۱). در مطالعه حاضر پس از ایجاد ضایعه به روش له کردن در عصب سیاتیک، پاسخ درد فرمالینی در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ نسبت به قبل از ایجاد ضایعه کاهش یافت. علت کاهش را می‌توان چنین توجیه کرد که به دنبال له کردن عصب سیاتیک رشته‌های حسی و حرکتی عصب سیاتیک آسیب می‌بینند و تا برطرف شدن آسیب نسبت به عوامل ایجادکننده درد واکنش ضعیفی را نشان می‌دهند.

هیستیدین و خصوصاً ان استیل سیستئین باعث بهبودی ضایعات عصب سیاتیک، سرکوب کردن درد نوروپاتیک و کاهش سطوح MDA پلاسما ناشی از دوکسوروبیسین شده است. هیستیدین و ان استیل سیستئین هر دو آنتی‌اکسیدانت قوی هستند. مطالعات اخیر نشان‌دهنده اثر ضد درد و ضدالتهابی هیستیدین می‌باشد. تجویز توأم هیستیدین و ان استیل سیستئین پاسخ‌های بهتری در سرکوب کردن آلودینی سرما، آدم و سطوح MDA و بهبود سطوح TAC از استفاده به‌تنهایی این عوامل تولید کرده است. علاوه بر این هیستیدین اثرات ویتامین C را بر روی بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک مثانه، MDA پلاسما و تغییرات سطوح TAC پلاسما در اثر سیکلوفسفامید در موش‌های صحرایی افزایش داده است. توأم نمودن آنتی‌اکسیدانت‌های متعدد در مقادیر مناسب ضروری است چراکه اشکال مختلف رادیکال‌های آزاد تولید می‌شوند و قابلیت آنتی‌اکسیدانت‌ها در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد متفاوت می‌باشد (13).

در مطالعه حاضر به دنبال ایجاد ضایعه له کردن عصب سیاتیک، تعداد سلول‌های شوان و تعداد فیبرهای عصبی میلین دار در روزهای ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ پس از ایجاد ضایعه شمارش شد. تعداد سلول‌های شوان در روز ۱۴ پس از جراحی در حداکثر بود و در روزهای ۲۸ و ۴۲، کاهش در تعداد سلول‌های شوان مشاهده شد به‌عبارت‌دیگر به‌طرف انتهای تجربه، تعداد سلول‌های شوان کاهش یافت. در بررسی میکروسکوپی اعصاب سیاتیک له‌شده عوارضی

مثل خونریزی در اپی نوریوم، دژنراسیون والرین، سلول‌های کف‌آلود و نیز دیستروفی فیبرهای عصبی مشاهده شد که با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارند (۲۲،۱۲). همچنین در مطالعه قبلی نتایج نشان دادند که در ضایعه له‌شدگی عصب سیاتیک یک بازگشت طبیعی عمل عصب سیاتیک ایجاد شد (۱۲). تعداد فیبرهای میلین دار در گروه دارای ضایعه له‌شدگی در عصب سیاتیک نسبت به گروه سالم (بدون ضایعه) در روزهای ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ کاهش یافت. در گروه اول دارای ضایعه له‌شدگی در عصب سیاتیک، تعداد فیبرهای عصبی میلین دار در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) نشان داد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده به‌طور کامل مشخص می‌شود که در ضایعه له‌شدگی عصب سیاتیک یک بازگشت طبیعی عمل عصب سیاتیک ایجاد می‌شود. آلودینی افزایش می‌یابد و پاسخ درد فرمالینی کاهش می‌یابد. تغییرات رفتاری به‌طرف بهبودی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر با تغییرات هیستوپاتولوژیک یافت شده در مطالعه حاضر مثل افزایش تعداد فیبرهای میلین دار قابل توجیه می‌باشد به‌عبارت‌دیگر با تغییرات هیستوپاتولوژیک تغییرات رفتاری تأیید می‌گردد. عصب سیاتیک دارای فیبرهای عصبی میلین دار و بدون میلین می‌باشد. فیبرهای حسی عصب سیاتیک به‌منظور انتقال پیام‌های حسی از قسمت‌های مختلف اندام خلفی را به مراکز بالاتر و فیبرهای حرکتی آن به‌منظور انتقال پیام‌های حرکتی از مراکز بالاتر به قسمت‌های مختلف اندام حرکتی خلفی عمل می‌کنند. به دنبال ایجاد ضایعه در عصب سیاتیک کار هر دو سیستم‌های حسی و حرکتی آن به‌هم‌خورده و بر روی اعمال رفتاری اثر می‌گذارد (۲۳،۲۲). در مطالعه حاضر، هیستیدین در مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن به مدت ۷ روز پس از ایجاد ضایعه له‌شدگی در عصب سیاتیک، به موش‌های صحرایی تزریق شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند که هیستیدین در مقدار ۴۰۰ و نه ۵۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن، موجب کاهش پاسخ آلودینی ناشی از سرما از روز ۲۱ تا انتهای تجربه شد. پاسخ مرحله اول و دوم درد فرمالینی را در روز ۴۲ پس از جراحی نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ پس از جراحی افزایش داد ولی پاسخ در هر سه روز ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی نسبت به روز ۱۴ قبل از جراحی، کاهش یافت. بر روی تزاید و سپس کاهش سلول‌های شوان اثر نگذاشت ولی تعداد فیبرهای میلین دار را در روزهای ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی افزایش داد بطوریکه در روزهای ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی تعداد فیبرهای میلین دار به نزدیکی تعداد آن‌ها در گروه سالم رسید. این یافته‌ها مبین این نکته‌اند که هیستیدین یک اثر پیش برنده در رژنراسیون عصبی دارد. این احتمال وجود دارد که در مطالعه حاضر، هیستیدین با افزایش تعداد فیبرهای میلین دار، موجب بهبودی پاسخ‌های آلودینی و درد فرمالینی شده باشد. اثر کاهش‌دهنده هیستیدین بر آلودینی سرما و درد فرمالینی مشاهده‌شده در این مطالعه ناشی از این موضوع است که هیستیدین ازیک‌طرف موجب رژنراسیون عصبی و بهبودی عمل عصب سیاتیک شده از طرف دیگر دارای اثر ضد دردی می‌باشد. در درد فرمالینی موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی، اثر ضد درد از هیستیدین گزارش شده است (۲۴).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات پیشین در ارتباط با ارزیابی رفتاری و هیستوپاتولوژیک رژنراسیون عصبی ناشی از له کردن تجربی عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی و اثر هیستیدین بر رژنراسیون عصبی می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که شاخص عمل عصب سیاتیک آزمون مناسبی برای ارزیابی رفتاری دژنراسیون عصبی می‌باشند. پس‌ازآن آزمون‌های آلودینی سرما و درد فرمالین دارای کارایی خوبی برای ارزیابی رفتاری به همراه آسیب‌شناسی می‌باشند. همچنین هیستیدین با اثر افزایش‌دهنده بر تعداد فیبرهای عصبی میلین دار می‌تواند موجب بهبودی عملی عصب سیاتیک شود. در ضمن پیشنهاد می‌شود برای اثربخشی بهتر هیستیدین بر روی اعصاب صدمه‌دیده، آن را همراه با سایر آنتی‌اکسیدانت‌ها در مقادیر مناسب استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه به انجام رسیده است که بدین‌وسیله از آن معاونت محترم تقدیر می‌شود.

References:

1. Farshid AA, Tamaddonfard E, Simaee N, Mansouri S, Najafi S, Asri-Rezari S et al. Effects of histidine and N-acetylcycteine on doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. Crdiovasc Toxicol 2014; 14: 153-61.

2. Obata K, Katsura H, Miyoshi K, Kondo T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. J Neurochem 2008; 105(6): 2249-59.

3. Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. Injury, Int Care Injured 2005; 36S: S24- S29.
4. Wei GJ, Yao M, Wang YS, Zhou CW, Wan DY, Lei PZ et al. Promotion of peripheral nerve regeneration of a peptide compound hydrogel scaffold. Int J Nanomedicine 2013; 8:3217-25.
5. Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. Prog Neurobiol 2007; 82(4): 163-201.
6. Woolf CJ, Mannion RJ. Pain: neuropathic pain, symptoms, mechanisms and management. Lancet 353(9168): 1959-64.
7. Jessen TS, Gotrrup H, Sindrup SH, Bach FW. The clinical picture of neuropathic pain. Eur J Pharmacol 2001; 429(1-3): 1-11.
8. Chapman V, Suzuki R, Dickenson AH. Electrophysiological characterization of spinal neuronal response properties in anaesthetized rats after ligation of spinal nerves L5-L6. J Physiol 1998; 507: 881-94.
9. Tamaddonfard E, Cheraghiyan S. Comparision of cold allodynia in ligature and crush models of neuropathic pain in rats. Indian Vet J 2006; 83: 952-954.
10. Lee IO, Jeong YS. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats. J Korean Med Sci 2002; 17(1): 81-5.
11. Capone F, Aloisi AM. Refinement of pain evaluation techniques: The formalin test. Ann Ist Super Sanita 2004; 40: 223-9.
12. Amniattalab A, Tamaddonfard E, Cheraghian S. Behavioral (function index) and histopathological study of histidine effect on regeneration of experimental crushed sciatic nerve of rats. Urmia Med J 2010; 21(2): 103-11.
13. Farshid AA, Tamaddonfard E, Najafi S. Effects of histidine and n-acetylcysteine on experimental lesions induced by doxorubicin in sciatic nerve of rats. Drug Chem Toxicol 2014;1–6.
14. Tamaddonfard E, Samadi F, Egdami K. The effects of vitamin B12 and diclofenac and their combination on cold and mechanical allodynia in a neuropathic pain model in rats. Vet Res Forum 2013; 4(1): 19-24.
15. Mojtahedin A, Tamaddonfard E, Zanbouri A. Role of central muscarinic cholinergic receptors in the formalin induced pain in rats. Indian J Pharmacol 2008; 41: 143-6.
16. Tamaddonfard E, Hamzeh-Gooshchi N. Effect of crocin on the morphine-induced antinociception in the formalin test in rats. Phytother Res 2010; 24: 410-3.
17. Farshid AA, Tamaddonfard E, Yahyaee F. Effects of histidine and N-acetylcycteine on diclofenac-induced anti-inflammatory response in acute inflammation in rats. Indian J Exp Biol 2010; 48: 1136-42.
18. Dowdall T, Robinson I, Meert TF. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury, Pharmacol Biochem Behav 2005; 80(1): 93-108.
19. Vierck CJ, Acosta-Rua AJ, Johnson RD. Bilateral chronic constriction of the sciatic nerve: A model of long-term cold hyperalgesia. J Pain 2005; 6(8): 507-17.
20. LaBuda CJ, Donahue R, Fuchs PN. Enhanced formalin nociceptive responses following L5 nerve ligation in the rat reveals neuropathy-induced inflammatory hyperalgesia. Pain 2001; 94(1): 59-63.
21. Vissers K, Adriaensen H, De Coster R, De Deyne C, Meert TF. A chronic-constriction injury of the sciatic nerve reduces bilaterally the responsiveness to formalin in rats: a behavioral and hormonal evaluation. Anesth Analg 2003; 97(2): 520-5.

22. Schmalbrush H. Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in rats. Anat Rec 1987; 219: 323-9.

23. Varejao SA, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. J Neurosci Meth 2001; 108: 1-9.

24. Tamaddonfard E, Rahimi S. Central effect of histamine and peripheral effect of histidine on the formalin- induced pain response in mice. Clin Exp Pharmacol Physiol 2004; 31(8): 518-22.

Original Article

EFFECT OF INTRA PERITONEAL INJECTION OF HISTIDINE ON COLD ALLODYNIA, FORMALIN PAIN TEST AND PATHOLOGY OF CRUSHED SCIATIC NERVE IN RAT

Amir Amniattalab[1], Esmail Tamaddonfard[2], Siamak Cheraghian[3], Ahad Dorostghol[4], Elham Babadoust-Sani[5], Mehrzad Mehr[6], Zohre Najafi[7]*

Received: 14 May , 2015; Accepted:16 Jul , 2015

Abstract

***Background & Aims*:** Protective effect of histidine on nervous system is well studied. We aimed to evaluate the efficiency of cold allodynia and formalin pain tests with pathology in histidine injection as intra peritoneal method in rat's crushed sciatic nerve.

***Materials & Methods*:** 57 rats were used for evaluating cold allodynia and formalin pain tests. Histopathological sections were stained with two staining methods. Numbers of schwann cells and myelinated nerve fibers were evaluated for repair processing.

***Results*:** Cold allodynia and formalin pain tests in histidine 400mg/kg group had the best results and most likeness with pathology. In this group, cold allodynia was started on the 7th day after lesion creation in sciatic nerve and achieved to maximum on the 14th and 28th days and then decreased till the end of the experiment (42nd day) and compared with the control group ($p<0.05$). Also formalin pain response decreased on 14th, 28th and 42nd days compared with before lesion creation according to the control group ($p<0.05$).

***Conclusion*:** Results of the current study showed that cold allodynia and formalin pain tests with pathology confirmed effect of histidine 400mg/kg on repair of crushed sciatic nerve. Also results of this and previous studies showed that physiological tests for neuropathic pain, function index, cold allodynia and formalin pain have more efficiency with pathological results, respectively.

***Keywords*:** Cold allodynia, Formalin pain test, Histidine, Crushed sciatic nerve, Rat

***Address*:** Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
Tel: +98 9144414613
Email: a.amniattalab@iaurmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2015: 26(6): 541 ISSN: 1027-3727

[1] *Assistant Professor , Pathology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Professor , Physiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[3] *B.Sc in Laboratory Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran*
[4] *Histology and Pathology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran*
[5] *B.Sc in Nursing, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran*
[6] *B.Sc in Nursing, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran*
[7] *B.Sc in Nursing, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran*