

Combination of Lidocaine and Chloral Hydrate as a New Method of Anesthesia in a Rat Model of Ischemic Stroke

Nooshin Sadeghiani¹,
Javad Shadman¹,
Hamdollah Panahpour^{2,3}

¹ MSc in Physiology, Physiological Studies Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

² Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

³ Pharmaceutical Sciences Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

(Received November 11, 2019 ; Accepted December 22, 2019)

Abstract

Background and purpose: In experimental studies, proper choice of anesthesia method is important for both validity of results and improving the rate of success and mortality. In current study, we examined the effects of lidocaine combined with chloral hydrate for induction of anesthesia in a rat model of ischemic stroke.

Materials and methods: In this research, 30 male rats were studied as sham, chloral hydrate, and chloral hydrate + lidocaine groups. Focal cerebral ischemia was induced by intraluminal filament method. Twenty four hours following ischemia, the animals were assessed for sensorimotor neurological deficits and infarct volume. Coronal sections of the brain tissue were stained using triphenyltetrazolium chloride and quantified by an image analysis system.

Results: Combination of lidocaine and chloral hydrate for induction of anesthesia resulted in better sensorimotor performance compared with chloral hydrate alone ($P < 0.01$), while no significant different was found between these two groups in infarct volume ($P = 0.41$). Additionally, combination of lidocaine with chloral hydrate produced safe anesthesia in animals with low mortality rate.

Conclusion: Combination of lidocaine with chloral hydrate produced safe anesthesia and analgesia, better sensorimotor performance, and low mortality rate in the animals studied.

Keywords: ischemic stroke, anesthesia, lidocaine, chloral hydrate, anesthesia method

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29 (181): 113-119 (Persian).

* Corresponding Author Hamdollah Panahpour - Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran (E-mail: Panahpour.h@gmail.com)

کاربرد توام لیدوکائین و کلرال هیدرات به عنوان روش جدید بیهوشی در ایجاد مدل آزمایشگاهی سکنه مغزی در موش صحرایی

نوشین صادقیان^۱

جواد شادمان^۱

حمداله پناهپور^{۳و۲}

چکیده

سابقه و هدف: انتخاب روش بیهوشی مناسب در مطالعات آزمایشگاهی در تعیین اعتبار نتایج کسب شده، میزان موفقیت تکنیک و مرگ و میر حائز اهمیت بالایی است. در این مطالعه اثرات کاربرد توام لیدوکائین به عنوان یک بی حس کننده موضعی با کلرال هیدرات به عنوان یک داروی بیهوشی عمومی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، ۳۰ سر موش صحرایی نر در سه گروه شاهد، کلرال هیدرات و کلرال هیدرات + لیدوکائین مورد مطالعه قرار گرفتند. ایسکمی موضعی مغز با استفاده از تکنیک انسداد شریان میانی مغز ایجاد شد. ۲۴ ساعت پس از ایسکمی، حیوانات از نظر اختلالات نورولوژیک حسی و حرکتی و همچنین حجم ضایعه مغزی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: حیوانات گروه بیهوش شده با لیدوکائین + کلرال هیدرات در مقایسه با حیوانات بیهوش شده با کلرال هیدرات عملکرد بهتری در آزمون‌های حسی و حرکتی داشتند ($P < 0/01$)، هر چند حجم ضایعه مغزی ایجاد شده در دو گروه تفاوت معنی داری نداشت ($P = 0/41$). همچنین در حیوانات گروه لیدوکائین + کلرال هیدرات، میزان مرگ و میر کم تر بود.

استنتاج: کاربرد لیدوکائین همراه با کلرال هیدرات ضمن ایجاد بیهوشی و بی‌دردی مناسب در حین جراحی، تاثیر منفی جراحی بر عملکرد حسی و حرکتی را کاهش داده و میزان مرگ و میر ناشی از تکنیک را کاهش می‌دهد.

واژه های کلیدی: سکنه مغزی، بیهوشی، لیدوکائین، کلرال هیدرات، مدل بیهوشی

مقدمه

پیشنهاد روش‌های درمانی جدید فراهم می‌کند (۴،۳). در مطالعات آزمایشگاهی سکنه مغزی، انتخاب روش بیهوشی اهمیت بسیار بالایی دارد. روش‌های بیهوشی مختلف ممکن است از طریق مکانیسم‌های مختلفی همچون اثر بر فعالیت کانال‌های یونی، تنظیم متابولیسم، آپوپتوزیس و کاهش التهاب اثرات محافظتی ایجاد کنند (۵) و یا

سکنه ایسکمیک مغزی، سومین علت مرگ و معلولیت در جوامع صنعتی است که در اثر انسداد یکی از شریان‌های مغز و توقف دائمی یا موقت جریان خون به قسمتی از مغز ناشی می‌شود (۲،۱). مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد ایسکمی مغزی ابزار ارزشمندی است که شرایط لازم را جهت مطالعه عوامل پاتوفیزیولوژیک موثر و

E-mail: Panahpour.h@gmail.com

مؤلف مسئول: حمداله پناهپور - انتهای خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات مطالعات فیزیولوژیک، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۳. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۸/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱۰/۱

ممکن است از طریق افت فشار خون و اختلال در خودتنظیمی جریان خون مغز، اثرات منفی بر نتایج مطالعات ایجاد کنند (۵). مطالعات پیشین، وجود اثرات محافظتی برای داروهایی چون کتامین، باریتورات‌ها و ایزوفلوران را گزارش نموده‌اند (۶-۸) و کاربرد این داروها را در مطالعات آزمایشگاهی سکته مغزی با محدودیت مواجه کرده است. لذا معرفی روشی که ضمن ایجاد بیهوشی و بی‌دردی مناسب، نتایج تحقیق را تحت تأثیر قرار ندهد، برای مطالعات سکته مغزی بسیار ارزشمند خواهد بود. کلرال‌هیدرات داروی خواب‌آوری است که اثرات تضعیف‌کننده کم‌تری نسبت به سایر داروها دارد و اثرات محافظتی نیز برای آن گزارش نشده است (۹). اما استفاده از این دارو به تنهایی با مشکلاتی روبرو است. دوزهای پایین داور ممکن است بی‌دردی مناسبی ایجاد نکند و دوزهای بالا ممکن است مرگ و میر حیوانات مورد مطالعه را افزایش دهد. استفاده از داروهای بی‌حس‌کننده موضعی چون لیدوکائین می‌تواند ضمن ایجاد بی‌دردی مناسب، دوز مورد نیاز از داروی کلرال‌هیدرات و عوارض آن را کاهش دهد. بنابراین در این مطالعه برای اولین بار، استفاده از لیدوکائین در کنار کلرال‌هیدرات مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley با محدوده وزنی ۳۲۰-۴۰۰ گرم برای انجام آزمایشات استفاده شد. آزمایشات بر اساس آئین‌نامه تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل برای مطالعات حیوانی در سه گروه به شرح ذیل انجام شد:

گروه شاهد ($n=10$): در این گروه پس از بیهوشی با کلرال‌هیدرات (400 mg/kg - محلول ده درصد) (شرکت سیگما، استرالیا) جراحی ناحیه گردن انجام شد، اما انسداد شریان میانی مغز صورت نگرفت.

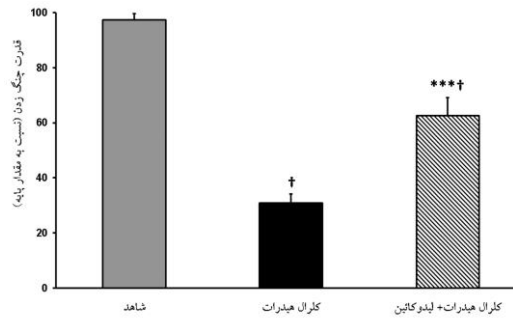
گروه ایسکمیک یک ($n=10$): در این گروه پس از بیهوشی حیوان با تزریق داخل صفاقی کلرال‌هیدرات،

ایسکمی مغزی به مدت ۹۰ دقیقه ایجاد شد. گروه ایسکمیک دو ($n=10$): در این گروه، حیوان با تزریق داخل صفاقی کلرال‌هیدرات بیهوش شد. پس از باز کردن پوست و لایه‌های زیرین، محلول لیدوکائین کلراید (0.2 میلی‌لیتر از محلول ۲ درصد) در ناحیه جراحی پاشیده شد. ایسکمی مغزی به مدت ۹۰ دقیقه ایجاد شد و محلول لیدوکائین مجدداً در پایان جراحی مورد استفاده قرار گرفت.

ایجاد ایسکمی مغزی و ارزیابی اختلالات نورولوژیک
در این مطالعه برای ایجاد ایسکمی، شریان میانی مغز با استفاده از تکنیک انسداد داخل عروقی با استفاده از فیلامان مخصوص به صورت موقت مسدود شد (۱۰-۱۲). با سقوط جریان خون موضعی به کم‌تر از ۲۰ درصد مقدار پایه، وقوع ایسکمی تأیید شد. پس از ۹۰ دقیقه، با خارج کردن نخ مخصوص از مسیر عروقی، جریان خون دوباره در ناحیه ایسکمیک برقرار شد. ۲۴ ساعت پس از پایان ایسکمی، حیوانات از نظر بروز اختلالات حرکتی ناشی از ایسکمی با استفاده از آزمون لونگا با ایجاد کمی تغییرات مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۳). همچنین از آزمون ارزیابی قدرت چنگ زدن برای تعیین شدت فلج عضلانی در اندام جلوی سمت مقابل ضایعه استفاده شد و عملکرد حسی حیوانات در پاسخ به درد با استفاده از آزمون صفحه داغ مورد بررسی قرار گرفت (۱۴).

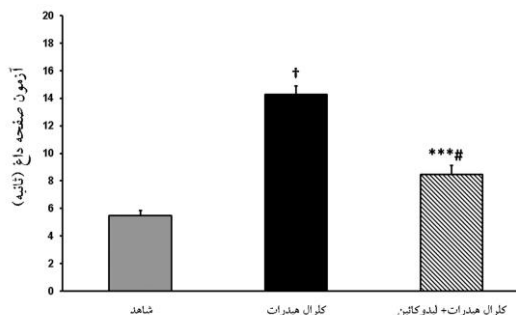
تعیین حجم ضایعه مغزی

۲۴ ساعت پس از پایان دوره ایسکمی، حیوان زیر بیهوشی عمیق کشته شد. شش برش به ضخامت ۲ میلی‌متر از بافت مغز حیوان تهیه شده و با استفاده از محلول ۲ درصد تری‌فنیل ترازولیوم کلراید، رنگ‌آمیزی شدند. پس از آن از برش‌ها تصاویر دیجیتال تهیه شده و با استفاده از نرم افزار، سطح ناحیه ضایعه و درصد وقوع ضایعه ایسکمیک در کورتکس و نواحی زیرقشری مغز محاسبه شد.



نمودار شماره ۲: ارزیابی قدرت چنگ زدن در حیوانات گروه های مورد مطالعه ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی مغزی. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان شده است و تعداد در گروه های مورد مطالعه ۸-۱۰ حیوان می باشد ($P < 0.001$)† نسبت به گروه شاهد، ($P < 0.001$)*** نسبت به گروه کلرال هیدرات).

همچنین در حیوانات ایسکمیک، تاخیر زمانی واکنش به درد به طور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد بیشتر بود ($P < 0.001$). حیوانات گروه کلرال هیدرات + لیدوکائین در مقایسه با گروه کلرال هیدرات، عملکرد حسی بهتری داشتند ($P < 0.001$) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: ارزیابی تاخیر در پاسخ به درد در آزمون صفحه داغ در حیوانات گروه های مورد مطالعه ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی مغزی. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان شده است و تعداد در گروه های مورد مطالعه ۸-۱۰ حیوان می باشد ($P < 0.001$)† نسبت به گروه شاهد، ($P < 0.001$)*** نسبت به گروه کلرال هیدرات).

تعیین حجم ضایعه مغزی و مرگ و میر

حجم ضایعه مغزی ایجاد شده در مغز حیوانات گروه کلرال هیدرات با گروه کلرال هیدرات + لیدوکائین تفاوت معنی داری نداشت (نمودار شماره ۴). میزان

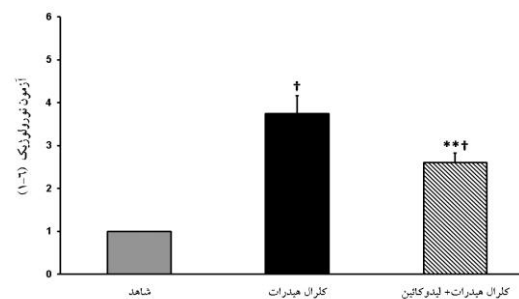
تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز آماری نتایج از نرم افزار آماری Sigma stat و Excel استفاده شد. برای مقایسه نتایج از آزمونهای آماری آنالیز واریانس و T-test استفاده شد و مقادیر $P < 0.05$ معنی دار تلقی شد. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار استاندارد بیان شده است.

یافته ها و بحث

ارزیابی اختلالات حسی و حرکتی ناشی از وقوع ایسکمی مغزی

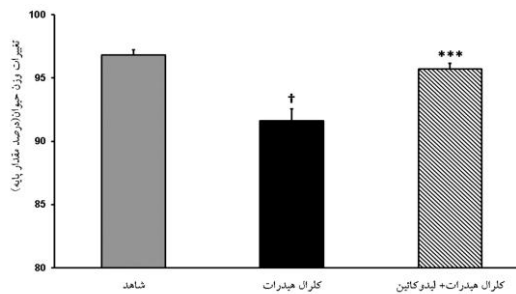
وقوع ایسکمی مغزی باعث ایجاد ناتوانی های حرکتی شدید در حیوانات گروه های ایسکمیک نسبت به حیوانات گروه شاهد شد ($P < 0.001$). نمره اختلالات نورولوژیک حیوانات گروه کلرال هیدرات + لیدوکائین به صورت معنی داری کم تر از گروه کلرال هیدرات بود که ناشی از تاثیر کم بیهوشی و جراحی بر عملکرد این حیوانات می باشد ($P < 0.001$) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: نمره آزمون نورولوژیک در حیوانات گروه های مورد مطالعه ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی مغزی. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان شده است و تعداد در گروه های مورد مطالعه ۸-۱۰ حیوان می باشد ($P < 0.001$)† نسبت به گروه شاهد، ($P < 0.001$)*** نسبت به گروه کلرال هیدرات).

قدرت چنگ زدن در حیوانات گروه های کلرال هیدرات و کلرال هیدرات + لیدوکائین به طور معنی داری از گروه شاهد کم تر بود ($P < 0.001$)، اما حیوانات گروه کلرال هیدرات + لیدوکائین عملکرد حرکتی بهتری داشتند ($P < 0.001$) (نمودار شماره ۲).

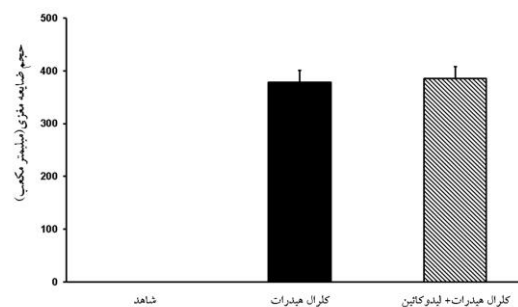
ارزیابی تغییرات وزن حیوانات نشان داد که کاهش وزن ناشی از بیهوشی و ترومای جراحی در حیوانات گروه کلرال هیدرات+ لیدوکائین به طور معنی داری کم تر از گروه کلرال هیدرات بود ($P < 0/001$) که حاکی از تجربه کم تر درد، تروما و عوارض منفی بیهوشی توسط این حیوانات بود (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵: ارزیابی تغییرات وزن در حیوانات گروه های مورد مطالعه ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی مغزی. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان شده است و تعداد در گروه های مورد مطالعه ۸-۱۰ حیوان می باشد ($P < 0/001$) نسبت به گروه شاهد، ($P < 0/001$ *** نسبت به گروه کلرال هیدرات).

انتخاب روش بیهوشی در مطالعات آزمایشگاهی اهمیت ویژه ای دارد. در همین رابطه گزارش شده است که استفاده از باریتورات ها (۶)، پروپوفول (۱۵، ۱۶)، کتامین (۷)، ایزوفلوران و نیتروس اکساید (۸، ۱۷) با ایجاد اثرات محافظتی در برابر ایسکمی، نتایج مداخلات جدید مورد مطالعه را مخدوش می نماید. کلرال هیدرات داروی خواب آوری است که فاقد اثرات محافظتی در برابر سکته ایسکمیک مغزی بوده و نتایج به دست آمده از تحقیقات را تحت تاثیر قرار نمی دهد (۹)، اما استفاده از این دارو به تنهایی، بیهوشی و بی دردی مطلوبی ایجاد نمی کند و دوزهای بالای آن ممکن است مرگ و میر حیوانات مورد مطالعه را افزایش دهد. در این مطالعه داروی لیدوکائین در کنار کلرال هیدرات برای ایجاد بی حسی و بی دردی در ناحیه جراحی مورد استفاده قرار گرفت تا بیهوشی ایجاد شده با کلرال هیدرات کیفیت مطلوبی پیدا کند.

مرگ و میر حیوانات مورد مطالعه در گروه کلرال هیدرات بیست درصد بود، در حالی که میزان مرگ میر در حیوانات گروه کلرال هیدرات+ لیدوکائین صفر درصد بود. بررسی وضعیت حیوانات در حین بیهوشی و جراحی نشان داد که حیوانات بیهوش شده با کاربرد کلرال هیدرات+ لیدوکائین بیهوشی و بی دردی مطلوبی را تجربه کردند و در این حیوانات سبکی بیهوشی و احساس درد که به شکل حرکات ناخواسته اندام ها یا دیسترس تنفسی بود، ثبت نشد، در حالی که حیوانات گروه کلرال هیدرات در ۵۰ درصد موارد (۵ مورد از ۱۰ حیوان مورد مطالعه)، واکنش به درد حین جراحی داشته و نیاز به تزریق دوز مجدد کلرال هیدرات داشتند.



نمودار شماره ۴: حجم صابیه مغزی ایجاد شده در نیمکره چپ مغز در حیوانات گروه های مورد مطالعه ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی مغزی به مدت ۹۰ دقیقه. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان شده است و تعداد در گروه های مورد مطالعه ۸-۱۰ حیوان می باشد.

همچنین بررسی نشان داد که تمام حیوانات مورد مطالعه در گروه کلرال هیدرات+ لیدوکائین در طی ساعت اول پس از پایان جراحی، هوشیاری و بیداری کامل را نشان دادند و ۸۰ درصد حیوانات (۸ مورد از ۱۰ حیوان مورد مطالعه) شروع به آب خوردن و مصرف غذای نرم آماده شده کردند که علامت خوبی از وضعیت سلامت عمومی حیوانات تلقی می گردد، اما هیچ کدام از حیوانات گروه کلرال هیدرات در طی ساعت اول پس از جراحی، هوشیاری قابل قبولی نداشتند.

هیدرات+ لیدوکائین برای ایجاد بیهوشی مطلوب با بی دردی و ریکاوری مناسب می تواند گزینه مناسبی برای مطالعات سکنه مغزی باشد و شرایط مطلوبی را برای برای ارزیابی اختلالات حسی و حرکتی ناشی از ایسکمی ایجاد می کند.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از نتایج طرح تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به شماره ۹۶۰۷ می باشد که با کد اخلاق در پژوهش IR.ARUMS.REC.1396.52 به ثبت رسیده است.

References

- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Secondary prevention of stroke—Authors' reply. *Lancet* 2008; 372(9643): 1036.
- Mitsios N, Gaffney J, Kumar P, Krupinski J, Kumar S, Slevin M. Pathophysiology of acute ischaemic stroke: an analysis of common signalling mechanisms and identification of new molecular targets. *Pathobiology* 2006; 73(4): 159-175.
- Zivin JA, Grotta JC. Animal stroke models. They are relevant to human disease. *Stroke* 1990; 21(7): 981-983.
- Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 87(1): 179-197.
- Hoffmann U, Sheng H, Ayata C, Warner DS. Anesthesia in experimental stroke research. *Transl Stroke Res* 2016; 7(5): 358-367.
- Nehls DG, Todd MM, Spetzler RF, Drummond JC, Thompson RA, Johnson PC. A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and barbiturates during temporary focal ischemia in primates. *Anesthesiology* 1987; 66(4): 453-464.
- Hudetz JA, Pagel PS. Neuroprotection by ketamine: a review of the experimental and clinical evidence. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2010; 24(1): 131-142.
- Wen XR, Fu YY, Liu HZ, Wu J, Shao XP, Zhang XB, et al. Neuroprotection of sevoflurane against ischemia/reperfusion-induced brain injury through inhibiting JNK3/caspase-3 by enhancing Akt signaling pathway. *Mol Neurobiol* 2016; 53(3): 1661-1671.
- Wang-Fischer Y. Manual of stroke models in rats. 1st ed. CRC Press; 2008.
- Panahpour H, Nouri M. Post-Ischemic Treatment with candesartan protects from cerebral ischemic/reperfusion injury in normotensive rats. *Int J Pharm Pharm Sci* 2012; 4(4):286-289.
- Hungerhuber E, Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, Schmid-Elsaesser R. Simultaneous bilateral laser Doppler fluxmetry and electrophysiological recording during middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods* 2006; 154(1-2): 109-115.

12. Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, et al. BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(26): 15318-15323.
13. Bachour SP, Hevesi M, Bachour O, Sweis BM, Mahmoudi J, Brekke JA, et al. Comparisons between Garcia, Modo, and Longa rodent stroke scales: Optimizing resource allocation in rat models of focal middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci* 2016; 364: 136-140.
14. Haghnejad Azar A, Oryan S, Bohlooli S, Panahpour H. Alpha-tocopherol reduces brain edema and protects blood-brain barrier integrity following focal cerebral ischemia in rats. *Medical Principles and Practice* 2017; 26(1): 17-22.
15. Fan W, Zhu X, Wu L, Wu Z, Li D, Huang F, et al. Propofol: an anesthetic possessing neuroprotective effects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19(8): 1520-1529.
16. Wang H, Luo M, Li C, Wang G. Propofol post-conditioning induced long-term neuroprotection and reduced internalization of AMPAR GluR2 subunit in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Neurochem* 2011; 119(1): 210-219.
17. David HN, Leveille F, Chazalviel L, MacKenzie ET, Buisson A, Lemaire M, et al. Reduction of ischemic brain damage by nitrous oxide and xenon. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23(10): 1168-1173.