

RINGKASAN

Hubungan Antara Analgesik Bekam pada Nyeri Neuropatik dengan Reseptor Opioid- μ , Reseptor P2X₃, Reseptor GABA-A, GLT-1, dan pNR1 pada Tikus *Rattus Norvegicus* yang Mengalami Cidera Konstriksi Kronik

Nyeri neuropatik atau *neuropathic pain* (NP) menurut *The International Association for the Study of Pain* (IASP) didefinisikan sebagai nyeri yang timbul akibat konsekuensi langsung dari penyakit atau lesi yang mempengaruhi sistem saraf somatosensori. NP merupakan nyeri patologis, kompleks, kronik yang ditandai oleh allodinia dan hiperalgesia. NP kronik sangat mengganggu kinerja, hobi, proses kognitif, hubungan sosial, tidur, kesehatan, suasana hati, kegiatan kehidupan sehari-hari dan kualitas hidup pasien dan berhubungan dengan mekanisme *coping* yang buruk, kecemasan dan depresi.

Tikus dengan cidera konstriksi kronik atau *Chronic Constriction Injury* (CCI) dipilih sebagai model NP dalam penelitian ini karena dalam praktek klinis trauma fisik merupakan penyebab NP paling umum. Konstriksi saraf skiatik pada model CCI dikaitkan dengan iskemia fokal, edema intraneural, degenerasi Wallerian dan gangguan transmisi sinyal nosiseptif. Cidera saraf pada model CCI menyebabkan inflamasi dan sensitisasi baik pada serabut A δ maupun C yang menyebabkan perubahan perilaku nyeri tikus dan ambang nyerinya. Ambang nyeri dari hiperalgesia termal pada model hewan dapat diuji dengan memberikan rangsangan termal pada telapak kaki tikus yang menghasilkan perilaku *withdrawal* pada tikus yang dapat diamati. Ambang nyeri, yang disebut dengan *Thermal Withdrawal Latency* (TWL), dihitung dari saat menempatkan tikus pada permukaan yang dipanaskan sampai tikus menunjukkan respons nosifensif. Sejumlah penelitian pada hewan menunjukkan bahwa tikus dengan CCI dikaitkan dengan adanya peningkatan nyeri atau ambang nyeri yang rendah.

Cidera saraf juga menghasilkan peningkatan aktivitas ektopik dari saraf di lokasi cidera dan atau pada ganglion akar dorsal atau *Dorsal Root Ganglion* (DRG) dari akson yang terluka dan menghasilkan perubahan rangsangan di kornu dorsalis medulla spinalis. DRG, memiliki peran penting dan integral pada modulasi proses sensorik perifer NP, merupakan target klinis yang sangat baik untuk mengendalikan NP. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa ATP, sebuah neurotransmitter penting yang berhubungan dengan nyeri neuropatik, mengkomunikasikan informasi sensorik di dalam neuron DRG. ATP mengaktifkan reseptor P2X₃ purinergik di dalam neuron DRG dan mentransmisikan informasi sensorik dari perifer ke medulla spinalis. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tikus dengan CCI menyebabkan terjadinya perubahan nilai ambang nyeri dan perubahan ekspresi reseptor P2X₃ di neuron sensorik DRG. Kornu dorsalis spinal adalah *relay* pertama dalam Sistem Saraf Pusat (SSP), mengintegrasikan antara input nosiseptif dari aferen sensorik primer dengan jalur *descending* untuk menghasilkan keluaran yang selanjutnya akan ditransmisikan ke pusat otak di mana persepsi nyeri muncul. Beberapa perubahan di kornu dorsalis medulla spinalis setelah cidera saraf berperan penting pada terjadinya dan pemeliharaan NP. Banyaknya interneuron inhibitorik di medulla spinalis sangat mendukung pada adanya dugaan peran fungsional penghambatan utama dalam memproses informasi nyeri. *γ -Aminobutyric Acid* (GABA)

merupakan neurotransmitter inhibitorik utama pada sistem saraf, termasuk laminae II kornu dorsalis spinalis di mana serabut saraf nosiseptif berakhir. Kadar GABA menurun setelah cedera saraf perifer. Kadar glutamat meningkat setelah CCI pada saraf skiatik. Glutamat memulai perubahan neuroplastik, berkontribusi tidak hanya pada induksi eksitasi neuron postinaptik tetapi juga pada kematian neuronal eksitotoksik serta bertanggung jawab untuk banyak penyakit termasuk nyeri kronik. Pembersihan kelebihan glutamat dimediasi oleh *Glutamate Transporter (GT)*. *Glutamate Transporter-1 (GLT-1)* adalah salah satu tipe GT. Sejumlah penelitian pada hewan menunjukkan bahwa tikus dengan CCI berhubungan dengan terjadinya perubahan histologis pada DRG dan medulla spinalis. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa ekspresi GLT-1 spinal yang berlebihan melemahkan induksi NP. Desensitisasi dan/ atau *downregulasi* fungsional reseptor opioid- μ pada kornu dorsalis medula spinalis tampak pada neuropati akibat cedera saraf. Obat-obatan, seperti *fluoxetine*, dapat meningkatkan ekspresi subunit NR1 pada membran sinaptik sedangkan Elektroakupunktur (EA) secara kontinyu memperbaiki defisit tingkah laku pada tikus dengan CCI ini secara signifikan dan efektif memblokir penurunan kadar pNR1.

Secara umum pengobatan NP saat ini masih mengecewakan akibat kronisitas penyakit, gagal (resistensi atau tidak adekuatnya) dalam merespon obat-obatan konvensional farmasi serta adanya efek samping obat yang tidak menyenangkan. Banyak pasien dengan nyeri kronik, seperti pada NP, mencari obat alternatif lain. Terapi bekam, salah satu obat alternatif dan komplementer, telah diterapkan untuk kondisi yang berhubungan dengan nyeri selama bertahun-tahun di berbagai negara di dunia. Terapi bekam mungkin memiliki peran yang bermanfaat untuk kondisi nyeri. Bekam juga dikenal sebagai Al-Hijama atau Al-hijamah, *cupping therapy* atau *cupping method*, ventusyngge atau ventouza, βεντούζα, dan 拔罐 療法 bagu a li ao fā is. Baru-baru ini, penggunaan bekam mengalami peningkatan, banyak digunakan oleh olahragawan dan masyarakat umum. Meskipun bekam telah banyak digunakan untuk mengurangi rasa nyeri, namun mekanismenya dalam mengurangi rasa nyeri masih belum jelas.

Desain penelitian eksperimental ini menggunakan *Randomized Posttest-Only Control Group Design*, model hewan menggunakan *Rattus norvegicus* strain Wistar, berusia \pm 4 bulan dengan berat 220-250 gram. Hewan dibagi menjadi 5 kelompok dengan jumlah sampel masing-masing kelompok sebanyak 10 hewan. Kelompok K0 adalah kelompok standar atau kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apa pun. P1 adalah kelompok kontrol negatif yang diterapi dengan perlakuan bekam basah. P2 adalah kelompok sham-CCI (CCI palsu). P3 adalah kelompok dengan prosedur CCI. P4 adalah kelompok CCI dan diterapi dengan pengobatan bekam basah. Penilaian hiperalgesia termal dilakukan dengan menggunakan *hot plate* dan hasilnya dinyatakan sebagai TWL. Penentuan ekspresi reseptor opioid- μ , reseptor P2X3, reseptor GABA-A, GLT-1 dan pNR1 dilakukan dengan menggunakan metode imunohistokimia.

Hasil percobaan pada tikus dengan CCI menunjukkan bahwa pemberian terapi bekam basah secara signifikan ($p < 0,05$) meningkatkan TWL seperti yang tampak pada P4 (kelompok CCI yang diberi perlakuan bekam basah) dibandingkan dengan P3, P2, P1 dan K0. Hasil analisis imunohistokimia menunjukkan bahwa pemberian terapi bekam basah dapat menurunkan ekspresi

reseptor P2X3 di DRG dan meningkatkan beberapa ekspresi di medulla spinalis seperti reseptor opioid- μ , reseptor GABA-A, GLT -1 dan pNR1

SUMMARY

The Relationship between Cupping Therapy Analgesia in Neuropathic Pain with Opioid- μ Receptors, P2X₃ Receptor, GABA-A Receptor, GLT-1, and pNR1 of Rattus Norvegicus with Chronic Constriction Injury

Neuropathic pain (NP) according to The International Association for the Study of Pain (IASP) is defined as pain arising from a direct consequence of a disease or lesion affecting the somatosensory nervous system. It is a pathological, complex, chronic pain state and characterized by allodynia and hyperalgesia. Chronic NP greatly impairs performance at work, hobby, cognitive process, social relationship, sleep, health, mood, activities of daily life and quality of life of the patients and is associated with bad of coping mechanism, anxiety and depression.

The rats with chronic constriction injury (CCI) was selected as NP models in this study because the most common cause of NP in clinical practice is physical trauma. The constriction of sciatic nerve in the CCI model is associated with focal ischemia, intraneural edema, Wallerian degeneration and transmission disturbances of nociceptive signal. Nerve injury in the CCI models cause inflammation and sensitization both of A and C fibers results in changes of rat pain behavior and the pain threshold. Pain threshold of thermal hyperalgesia in animal models can be tested by giving thermal stimuli to the paw which result in observable withdrawal of rat pain behavior. Pain threshold, which is called by Thermal Withdrawal Latency (TWL), was counted from the time of placing the rats on to heated surface until the rat show a nocifensive response. Numerous animal studies have shown that rats with CCI is associated with the increased-pain or lowered-thresholds.

Nerve injury also results in increase of ectopic activity from the nerve at the site of injury and or at the Dorsal Root Ganglion (DRG) of the injured axons and produces alterations in dorsal horn excitability in dorsal horn neurons of the spinal cord. DRG, a pivotal and integral role in modulation of peripheral sensory processes of NP, is a very good clinical target for controlling NP. Previous study stated that ATP, an important transmitter associated with neuropathic pain, communicates sensory information in DRG neurons. It activates purinergic P2X₃ receptors in DRG neurons and transmits sensory information from the periphery to the spinal cord. Previous study has been demonstrated that CCI rats results in alteration of pain threshold values and changes in expression of P2X₃ receptors in sensory neurons in DRG. Spinal dorsal horn is the first relay in the Central Nervous System (CNS), integrates between nociceptive input from primary sensory afferents and the descending pathway to produce output that further transmitted to the brain centers where conscious pain perception arises. Some changes in dorsal horn of spinal cord after nerve injury play a key role in the occurrence and maintenance of neuropathic pain. The abundance of inhibitory interneurons in the spinal cord highly suggests a key functional role of inhibition in processing information of pain. γ -Aminobutyric Acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the nervous system, including laminae II of spinal dorsal horn where nociceptive nerve fibers terminate. Levels of GABA are reduced following peripheral nerve injury. Glutamate level was elevated after

CCI of the sciatic nerve. Glutamate initiates neuroplastic changes, contributes not only to induction of excitation of postsynaptic neurons but also to excitotoxic neuronal death and responsible for many diseases including chronic pain. The clearance of excess glutamate is mediated by glutamate transporters (GTs). Glutamate Transporter-1 (GLT-1) is one of GTs type. Numerous animal studies have shown that rats with CCI is associated with histological changes in the DRG and the spinal cord. Previous study has shown that overexpression of spinal GLT-1 attenuated the induction of NP. Desensitization and/or functional downregulation of μ -opioid receptors in the dorsal horn of the spinal cord has been shown in nerve-injury neuropathy. Drugs, such as fluoxetine, can increase the expression of NR1 subunits in synaptic membranes while Electroacupuncture (EA) continuously improves behavioral deficits in rats with CCI significantly and effectively blocks the decreasing of pNR1 levels.

Generally the current treatments of NP is still disappointing due to the chronicity of the disease, fail (resistance or inadequate) to respond to conventional pharmaceutical drugs and unpleasant side effect of the drugs. Many patients with chronic pain, such as NP, seek alternative medicines. Cupping therapy, one of alternative and complementary medicines, have been applied in pain-related conditions for many years in various countries in the world. Cupping therapy may be have beneficial role for pain conditions. Cupping has also known as Al-Hijama or Al-hijamah, cupping therapy or cupping method, ventusynge or ventouza, βεντούζα, and 拔罐 療法 b agu an li ao fã is. Recently, the use of cupping has increased, widely used by sportsmen and general public. Although it has been widely used to reduce pain, but the mechanism for reducing pain is not clear yet.

The design of experimental study using Randomized Posttest-Only Control Group Design, animal model using Rattus norvegicus strain Wistar, aged \pm 4 months with weight of 220-250 grams. The animals was divided into 5 groups with the sample size of each groups 10 animals. The K0 group is a standard or negative control group that is not given any treatment. The P1 was a negative control group treated with wet cupping treatment. The P2 was a sham-CCI group. The P3 was a group with CCI procedure. The P4 was a CCI group and treated with wet cupping treatment. Assessment of thermal hyperalgesia is performed using a hot plate and the results are expressed as TWL. Determination of opioid- μ receptor expression, P2X3 receptor, GABA-A receptor, GLT-1 and pNR1 were carried out using immunohistochemical methods.

The results of the experiment on rats with CCI showed that application of wet cupping therapy significantly ($p < 0.05$) increased TWL as shown in P4 (CCI groups treated wet cupping treatment) compared to P3, P2, P1 and K0. The results of immunohistochemical analysis showed that application of wet cupping therapy could increase the expression of opioid- μ receptors in spinal cord, decrease the expression of P2X3 receptors in the DRG, increase several expressions in spinal cord such as opioid- μ receptor, GABA-A receptor, GLT-1 and pNR1.

ABSTRACT

The Relationship between Cupping Therapy Analgesia in Neuropathic Pain with Opioid- μ Receptors, P2X₃ Receptor, GABA-A Receptor, GLT-1, and pNRI of Rattus Norvegicus with Chronic Constriction Injury

Background: Neuropathic pain due to chronic constriction injury lead to pain behavioral changes and alteration of some substances in dorsal root ganglion and spinal cord. The result of thermal withdrawal latency and immunohistochemical analysis of substances in dorsal root ganglion and spinal cord shows that wet cupping therapy (WCT) has beneficial effects to reduce neuropathic pain in chronic constriction injury (CCI).

Obejctive: To evaluate the analgesic effects of WCT against neuropathic pain due to chronic constriction injury in rat dorsal root ganglion and spinal cord.

Methods: Four months male Rattus norvegicus rats were divided into five groups, i.e: K0 (negative-controlled), P1 (negative-controlled plus WCT), P2 (Sham-CCI), P3 (CCI) and P4 (CCI plus WCT). WCT two times every week for three weeks with 5 minutes of first cupping using -200 mmHg, ten punctures and 5 minutes of second cupping using -200 mmHg.

Results: WCT could reduce neuropathic pain significantly ($p < 0,05$) by increasing the thermal withdrawal latency, reducing P2X₃ receptor expression, but significantly increasing opioid- μ receptor, GABA-A receptor, GLT-1 expressions and pNRI expression ($p < 0,05$).

Conclusion: Chronic constriction injury could lead to neuropathic pain. The mechanism of wet cupping therapy to reduce neuropathic pain is through P2X₃ receptor, opioid- μ receptor, GABA-A receptor, GLT-1 and pNRI.

Keywords: Cupping therapy, neuropathic pain, CCI, P2X₃ receptor, opioid- μ receptor, GABA-A receptor, GLT-1, pNRI