● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیستم، شمارهٔ ۱، ص ۳۰-۲۰، ۱۳۹۱

مقالهٔ پژوهشی

بررسی قابلیت داروی گیاهی نپتامنتوئیدس (اسطوخودوس) در جلوگیری از آسیب نورون‌های حرکتی نخاعی

علیرضا عزیززاده دلشاد[1*]، عبدالرضا فرزان[2]

خلاصه

مقدمه: از آنجا که مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) در بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو دخیل می‌باشد، کنترل آن می‌تواند به‌عنوان یک روش محافظت عصبی بالقوه مطرح باشد. با توجه به تأیید اثر محافظت عصبی داروی گیاهی نپتا منتوئیدس (اسطوخودوس) بر مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از آکسوتومی در نورون‌های حرکتی نخاعی، بر آن شدیم تا قابلیت پیش‌درمانی (پروفیلاکسی) آن را نیز مورد بررسی قرار دهیم.

روش: در مطالعه حاضر عصب سیاتیک سمت راست ۲۰ نوزاد دو روزه موش صحرایی (۱ گروه شاهد و ۳ گروه آزمایشی) قطع گردید. گروه‌های آزمایشی از ۲۴ ساعت قبل از آکسوتومی دوزهای مختلف عصاره اسطوخودوس و گروه شاهد، حجم برابر از محلول سرم فیزیولوژی را به شکل داخل صفاقی و برای ۳ روز متوالی دریافت کردند. در پایان پس از قطع عصب سیاتیک راست، در شاخ قدامی، سگمان‌های نخاعی مربوطه نورون‌های حرکتی و نورون‌های آپوپتوتیک شمرده شد. در همه نمونه‌ها نیمه چپ نخاع به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: قطع عصب سیاتیک در همه گروه‌ها موجب مرگ برنامه‌ریزی شده و کاهش معنادار نورون‌های حرکتی شد. هرچند بر اساس مطالعه قبلی تجویز دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسطوخودوس از روز قطع عصب، به شکل معناداری از مرگ برنامه‌ریزی شده جلوگیری کرد، ولی تجویز دارو از ۲۴ ساعت قبل از آکسوتومی باعث افزایش اثر محافظت عصبی نشد.

نتیجه‌گیری: اثر محافظت عصبی اسطوخودوس بر نورون‌های حرکتی آکسوتومی شده فاقد قابلیت پیش‌درمانی است و تجویز آن قبل از آسیب عصبی موجب افزایش تأثیر محافظت عصبی نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: محافظت عصبی، نپتامنتوئیدس، اسطوخودوس، نورون حرکتی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، آکسوتومی

۱- دانشیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد ۲- استادیار جراحی مغز و اعصاب، گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: delshad@shahed.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۲۱ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۷/۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۷/۵

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوتیوز) یکی از انواع مرگ سلولی است که در روندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک دستگاه‌های مختلف بدن به ویژه دستگاه عصبی نقش مهمی دارد (۱)، به‌طوری که امروزه علت اصلی بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو را اختلال در وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده می‌دانند. هر چند در نخاع موش صحرایی بالغ مرگ سلولی طبیعی قبل از تولد پایان می‌یابد اما به دنبال قطع اعصاب محیطی در دوره نوزادی، نورون‌های حرکتی و حسی کماکان دستخوش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شوند (۲). در طول هفته اول پس از تولد نورون‌های حرکتی و نورون‌های رابط نخاع کمری موش صحرایی هنوز به پیام‌های تروفیک ورودی وابسته هستند و قطع این پیام‌ها به دنبال قطع عصب سیاتیک در هفته اول موجب مرگ برنامه‌ریزی شده نورون‌های حرکتی نخاع می‌شود (۳). همچنین شواهد بالینی نشان داده است که عوارض و پیامدهای ضایعه حاد سیستم عصبی وابسته به سن بوده و در نوزادان پاسخ‌های شدیدتری ایجاد می‌شود (۴). بنابراین آکسوتومی در دوره نوزادی، می‌تواند مدل مناسبی برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده و مطالعه مکانیسم‌های محافظت عصبی مرتبط با آن باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز ویژگی‌های مشترک زیادی دارند و شدت عامل آسیب‌رسان تعیین کننده نوع مرگ سلولی است (۵). از آنجا که مرگ برنامه‌ریزی شده با تأخیر بیشتری نسبت به نکروز اتفاق می‌افتد، مهار مرگ برنامه‌ریزی شده می‌تواند استراتژی محافظت عصبی مناسب‌تری باشد.

هر روش درمانی که بتواند از آسیب نورون‌ها و آکسون‌ها جلوگیری کند، محافظت عصبی (نوروپروتکشن) نامیده می‌شود و چنین درمانی می‌تواند برای همه اختلالات نورودژنراتیو مناسب باشد. محافظت عصبی دربرگیرنده مجموعه مکانیسم‌هایی است که علیه عوامل آسیب‌رسان عمل می‌کنند و باید قبل از وقوع مرگ سلولی و ظهور علایم بالینی آغاز شود (۶).

در حال حاضر مطالعات فراوانی برای یافتن یک روش محافظت عصبی مناسب در حال انجام است و یافتن یک دارو یا ترکیب محافظت عصبی مؤثر هدف بسیاری از دانشمندان می‌باشد. با وجود گزارش‌های فراوانی که ظرفیت محافظت عصبی بسیاری از ترکیبات شیمیایی طبیعی و سنتتیک همچون هورمون‌ها و داروهای فارماکولوژیک را تأیید می‌کنند، اما به‌علت عوارض جانبی ناخواسته آنها، تلاش گسترده‌ای برای بررسی اثرات محافظت عصبی مواد جدیدی همچون داروهای گیاهی در حال انجام است. نپتا منتوئیدس که در منابع قدیمی طب سنتی ایران از آن با عنوان اسطوخودوس (۷) و یا گاهی با عنوان پونه‌سای‌سبلانی (۸) نام برده می‌شود قرن‌های متمادی به‌عنوان یک داروی گیاهی برای درمان اختلالات دستگاه عصبی همچون صرع و مالیخولیا مورد استفاده قرار می‌گرفته است (۹). جنس نپتا با نام فارسی پونه‌سا از تیره Lamiaceae و شامل ۴۰۰ گونه می‌باشد که بیشتر آن‌ها به شکل وحشی در اروپای مرکزی و جنوبی، شمال افریقا و مرکز و جنوب آسیا روییده و به‌طور گسترده ای به‌عنوان یک داروی سنتی ضداسپاسم، مدر، ضد آسم و تب بر استفاده می‌شود (۱۰). حدود نیمی از گونه‌های نپتا را می‌توان در ایران یافت (۱۱) که نپتامنتوئیدس یکی ار آنهاست. نپتامنتوئیدس گیاهی است علفی، چندساله، بالارونده و افراشته به ارتفاع ۱۵ تا ۴۰ سانتی‌متر با گل‌های بنفش رنگ (۸)، که در طب سنتی ایران از آن به‌عنوان دارویی مؤثر بر اختلالات سیستم عصبی نام برده شده است (۱۲،۱۳) و اخیراً نیز اثر محافظت عصبی آن در جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از آکسوتومی در نورون‌های حرکتی نخاعی گزارش گردیده است (۱۴)، اما تاکنون مطالعه‌ای بر قابلیت پیش‌درمانی آن

Archive of SID

www.SID.ir

در جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده انجام نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا قابلیت پیش‌درمانی آن را در جلوگیری از آسیب عصبی مورد بررسی قرار دهیم. برای این منظور با تجویز این داروی گیاهی از ۲۴ ساعت قبل از قطع عصب سیاتیک و القای مرگ برنامه‌ریزی شده در نوزاد موش صحرایی، اثر پیش‌درمانی آن را در پیشگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از آکسوتومی در نورون‌های نخاعی مورد بررسی قرار دادیم.

روش بررسی

تهیه عصاره الکلی اسطوخودوس

بخش‌های هوایی و سرشاخه‌های خشک شده گیاه اسطوخودوس در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد تأیید قرار گرفته و نمونه‌ای از آن با شماره مرجع PMP-352 برای مراجعات بعدی نگهداری گردید. برای تهیه عصاره مفدار ۲۰۰ گرم پودر بخش‌های هوایی گیاه به یک لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه گردید تا یک مخلوط معلق یکنواخت به دست آید. مخلوط حاصله به مدت ۴۸ ساعت در یک ظرف دربسته و در محیط تاریک نگهداری شد تا مواد مؤثره آن خارج شود و سپس در چند مرحله صاف گردید. محلول حاصله چند ساعت در بن ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا عصاره قهوه ای و غلیظی با ویسکوزیته بالا به دست آمد و با استفاده از سانتریفیوژ با ۲۰۰۰ دور در دقیقه، عصاره همگن گردید. ۵ گرم از عصاره در ۵۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی حل و با گذراندن محلول حاصله از میکروفیلتر ۰/۲ µm در ۳ مرحله استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با رقیق کردن استوک مذکور در سرم فیزیولوژی استریل دوزهای مورد نیاز تهیه گردید.

نمونه‌های حیوانی و گروه‌های آزمایشی

در نگهداری حیوانات و اجرای مراحل آزمایشگاهی، با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی مورد تأیید دانشگاه شاهد، نهایت تلاش به عمل آمد تا نمونه‌های حیوانی لازم به حداقل ممکن رسیده و حیوانات درد کمتری را تحمل نمایند. در مطالعه حاضر از ۲۰ سر نوزاد ۲ روزه موش صحرایی نژاد Sprague Dawley (انستیتو رازی کرج/ ایران) استفاده گردید که در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در کنار مادرشان نگهداری شدند. نوزادان به ۴ گروه ۵ تایی شامل۳ گروه آزمایشی و ۱ گروه شاهد تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی E3,E2,E1 از ۲۴ ساعت قبل از جراحی آکسوتومی به ترتیب ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰mg/kg از محلول اسطوخودوس را به شکل داخل صفاقی دریافت کردند، و به گروه شاهد (C) به شکل مشابه حجم برابر از سرم فیزیولوژی تزریق گردید، و تزریق‌ها تا ۳ روز تکرار گردید. در همه گروه‌ها پس از بی‌هوشی با روش سردسازی (هایپوترمی) و تحت شرایط استریل عصب سیاتیک راست در محل خروج از سوراخ سیاتیک بزرگ قطع گردید و برای اطمینان از جلوگیری از عصب‌گیری مجدد قطعه‌ای تقریباً ۲ میلی‌متری از آن برداشته شد. پس از به‌هوش آمدن کامل نوزادان و تزریق محلول اسطوخودوس در گروه‌های آزمایشی و یا سرم فیزیولوژی در گروه شاهد نوزادان به قفس مادرانشان برگردانده شدند.

نمونه‌برداری از نخاع

نوزادان ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق و تحت بی‌هوشی عمیق و با روش تزریق داخل قلبی کشته شده و با روش لامینکتومی سگمان‌های نخاعی L4-L6 به پارافرمالدئید ۴٪ منتقل گشتند. در همه نمونه‌ها نیمه چپ نخاع به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. از بلوک‌های

Archive of SID
www.SID.ir

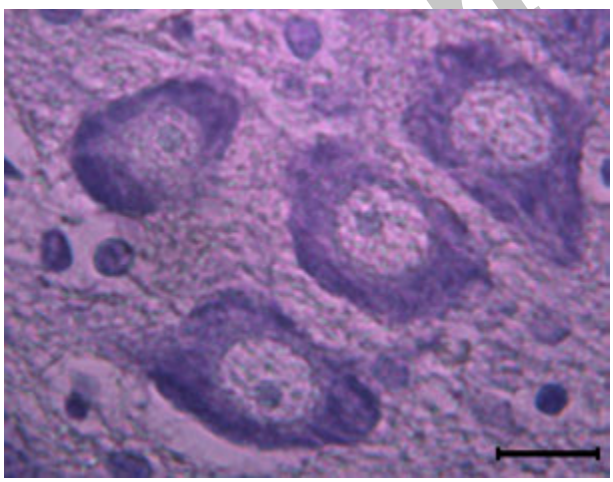
پارافینی نخاع برش‌های سریال به ضخامت ۸ µm تهیه گردید که برای شمارش نورون‌های حرکتی با رنگ کرزیل فست ویوله و برای تشخیص سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده با تکنیک TUNEL رنگ‌آمیزی شدند.

بررسی مورفومتری و شمارش سلولی

در نمونه‌های رنگ شده با کرزیل فست ویوله از هر ۵ برش متوالی یک برش انتخاب و برای مورفومتری و شمارش سلولی مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور در شاخ قدامی هر دو نیمه نخاع نورون‌های حرکتی دارای هسته بزرگ‌تر از ۱۰ µm و هستک مشخص، با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر و با میکروسکپ نوری مورد شمارش قرار گرفتند (شکل ۱). در هر گروه میانگین تعداد نورون‌های حرکتی شاخ قدامی هر دو نیمه نخاع و میانگین درصد کاهش تعداد نورون‌ها ی نیمه آکسوتومی شده نسبت به نیمه سالم محاسبه و نتایج حاصله با تست‌های آماری ANOVA و t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

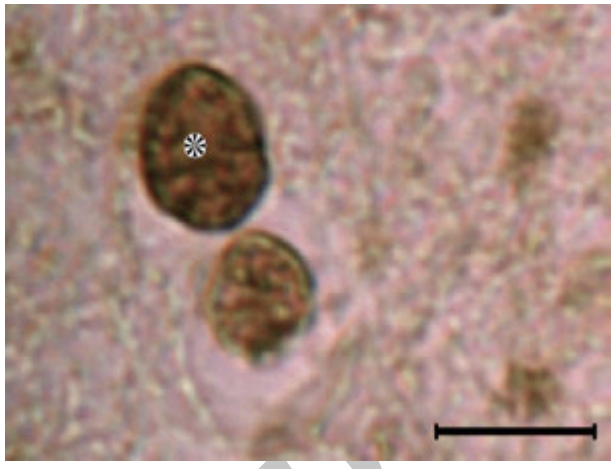
بررسی مرگ سلولی آپوپتوتیک با تکنیک TUNEL

در هر گروه ۵ برش از برش‌های مجاور مقاطع مورد استفاده برای مورفومتری، پس از پارافین زدایی و آبدهی به مدت ۸ دقیقه در معرض TritonX یک دهم درصد در بافر سیترات سدیم یک دهم درصد (سیگما / آلمان) قرار داده شد و پس از شستشو با PBS بر اساس دستورالعمل شرکت Roche آلمان به شکل زیر تحت رنگ‌آمیزی TUNEL قرار گرفت. برای این منظور با مخلوط کردن 5 µl محلول آنزیم حاوی TdT و 45 µl محلول حاوی نوکلئوتیدهای dUTP نشاندار شده با FITC، 50 µl مخلوط واکنش TUNEL به دست آمد و نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۳۷°C، در یک محفظه مرطوب و در محیط تاریک با این مخلوط انکوبه گردید. با حذف TdT از مخلوط فوق نمونه‌های کنترل منفی بررسی شد و در نمونه‌های کنترل مثبت نیز برای القای شکستن DNA ابتدا سلول‌ها برای ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق با محلول ۱۰ µg/ml DNase I در mM Tris-HCl ۵۰، ۱mM $MgCl_2$ و ۱ mg/ml BSA انکوبه شدند. سپس در مرحله دوم پس از شستشو با PBS نمونه‌ها برای ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C و در یک محفظه مرطوب با ۵۰ µl محلول convertor POD (حاوی آنتی‌بادی آنتی‌فلوئوروسین کنژوگه با horse-radish peroxidase) انکوبه گردید و پس از شستشو با PBS برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ °C و در تاریکی در معرض ۱۰۰ µl DAB (سیگما / آلمان) قرار داده شد. در پایان نمونه‌ها پس از شستشوی مجدد با PBS با لامل پوشانده شدند. در این مرحله سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده به شکل دانه‌های کاملاً متراکم قهوه‌ای تیره قابل تشخیص هستند (شکل ۲). در هر یک از ۵ برش مورد بررسی در هر گروه درصد سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده نسبت به تعداد کل نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع محاسبه گردید که از آن به‌عنوان اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده نام برده‌ایم.



شکل ۱. *فتومیکروگراف شاخ قدامی نیمه سالم نخاع با رنگ آمیزی کرزیل فست ویوله. چند نورون حرکتی سالم دارای هسته بزرگ و هستک مشخص در شکل دیده می‌شوند (بار= 10µm).*

www.SID.ir



شکل ۲. *فتومیکروگراف شاخ قدامی نیمه آکسوتومی با تکنیک TUNEL. یک نورون آپوپتوتیک (*) به شکل یک توده متراکم قهوه‌ای در مرکز شکل دیده می‌شود (بار= 10µm).*

نتایج

یافته‌های مطالعه مورفومتری و تکنیک TUNEL مربوط به نمونه‌هایی که از روز آکسوتومی دارو را دریافت کردند و قبلاً انتشار یافته است (۱۴)، مؤید وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از آکسوتومی در نورون‌های حرکتی مربوطه و اثر محافظت عصبی دوز بیش از ۵۰۰ mg/kg اسطوخودوس می‌باشد.

جدول ۱ نشان دهنده نتایج مربوط به مطالعه مورفومتری در گروه‌های E3,E2,E1 است. همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌گردد در نمونه شاهد قطع عصب سیاتیک موجب کاهش معنادار میانگین نورون‌های حرکتی در شاخ قدامی همان نیمه نخاع نسبت به نیمه سالم گردید، (میانگین نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نیمه سالم نخاع ۱۲/۰۸به ۸/۴۳ در نیمه آکسوتومی شده) که نمایانگر کاهش معناداری (P<۰/۰۵) به میزان ۳۰/۲۲ درصد می‌باشد (جدول ۱). هرچند تجویز اسطوخودوس در گروه‌های آزمایشی تا حدی از مرگ نورون‌ها به دنبال آکسوتومی جلوگیری کرد، اما در هر سه گروه آزمایشی E3, E2, E1 میانگین نورون‌های حرکتی در شاخ قدامی نیمه آکسوتومی شده کماکان با اختلافی معنادار کمتر از نیمه سالم نخاع می‌باشد (۱۷/۱۳، ۱۰/۵ و ۶/۲۱ درصد).

مقایسه نیمه آکسوتومی شده گروه‌های آزمایشی و کنترل نشان داد تأثیرتجویزاسطوخودوس از ۲۴ ساعت قبل از آکسوتومی در جلوگیری از مرگ نورون‌های آکسوتومی شده کم و بیش همانند تجویز دارو از همان روز آکسوتومی است، به این ترتیب بیشترین تأثیر در گروه دریافت کننده دوز ۵۰۰ mg/kg یعنی گروه E2 مشاهده گردید. مقایسه نورون‌های حرکتی نیمه آکسوتومی شده در گروه‌های آزمایشی و کنترل نشان دهنده اختلافی غیرمعنادار بین C-E1 ، E1-E2 و نیز E2-E3 بود در حالی که اختلاف بین C-E2 و نیز C-E3 کاملاً معنادار بود (P<۰/۰۵).

مقایسه میانگین‌ها و درصدهای مذکور بین گروه‌هایی که از ۲۴ ساعت قبل از آکسوتومی اسطوخودوس دریافت کردند و گروه‌هایی که از روز آکسوتومی تحت تجویز دارو قرار گرفتند (نتایج مربوط به رفرنس شماره ۱۴)، نشان دهنده تفاوتی معنادار در جلوگیری از مرگ نورون‌ها نبود؛ به عبارت دیگر تجویز اسطوخودوس از ۲۴ ساعت قبل از آکسوتومی فاقد اثر پیش‌درمانی بوده است.

برای تعیین اینکه آیا مرگ ناشی از آکسوتومی در نورون‌های حرکتی مربوطه از نوع مرگ برنامه‌ریزی شده بوده یا نه از روش TUNEL استفاده شد که در این روش نورون‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده به شکل یک توده متراکم قهوه‌ای تیره مشاهده می‌شوند (شکل ۲).

نتایج بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده با روش TUNEL (جدول ۲) نشان داد که در گروه کنترل اختلاف بین اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده نیمه سالم (۲/۹۷٪) و نیمه آکسوتومی شده نخاع (۶/۷۲٪) معنادار بود (P<۰/۰۱)، در حالی که در هیچ‌یک از گروه‌های آزمایشی E3,E2,E1 بین اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده نیمه سالم و نیمه آکسوتومی شده اختلاف معناداری مشاهده نگردید. همچنین مقایسه این اندکس بین نیمه سالم گروه‌های آزمایشی و کنترل اختلاف

Archive of SID

www.SID.ir

معناداری را نشان نداد، اما مقایسه نیمه آکسوتومی شده گروه‌ها با یکدیگر نشان‌دهنده اختلافی معنادار بین گروه کنترل و گروه E3 بود (P<۰/۰۵). مقایسه نتایج مربوط به اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده در گروه‌هایی که از روز آکسوتومی اسطوخودوس دریافت کردند (۱۴) با گروه‌هایی که از ۲۴ ساعت قبل از آکسوتومی تحت تجویز دارو قرار گرفتند تفاوت معناداری را بین این دو روش نشان نداد؛ به عبارت دیگر اسطوخودوس فاقد اثر پیش‌درمانی در تغییر اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد.

جدول ۱. *میانگین و خطای معیار نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در نیمه سالم و نیمه آکسوتومی در گروه‌های آزمایشی (E3,E2,E1) و شاهد (C)*

گروه‌ها / متغیر	کنترل C	آزمایشی E1	آزمایشی E2	آزمایشی E3
نیمه سالم	۱۲/۰۸ ± ۰/۹۰۹	۱۲/۹۶ ± ۰/۸۵۷	۱۳/۲۴ ± ۰/۹۶۳	۱۲/۸۸ ± ۰/۳۵۸
نیمه آکسوتومی	۸/۴۳ ± ۰/۶۸۴	۱۰/۷۴ ± ۰/۸۵۶ i	۱۱/۸۵ ± ۰/۸۲۶ s	۱۲/۰۸ ± ۰/۴۷۶ s
درصد کاهش نورونی	٪۳۰/۲۲	٪۱۷/۱۳	٪۱۰/۵	٪۶/۲۱

ردیف آخر نشان دهنده درصد کاهش نورون های حرکتی نیمه آکسوتومی نسبت به نیمه سالم در هر یک از گروه هاست. در هر گروه (ستون ها) اختلاف میان دو نیمه معنادار می باشد(P<۰/۰۵). مقایسه نیمه آکسوتومی گروه های آزمایشی با گروه شاهد نشان دهنده اختلاف غیرمعنادار گروه E1 (i) و اختلاف معنادار گروه های E2 و E3 (s) با گروه شاهد بود. اختلاف بین E2 و E3 نیز غیرمعنادار بود

جدول ۲. *درصد نورون‌های آپوپتوتیک نسبت به کل نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع (اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده) در نیمه سالم و نیمه آکسوتومی در گروه‌های آزمایشی (E3,E2,E1) و شاهد (C)*

گروه‌ها / متغیر	کنترل C	آزمایشی E1	آزمایشی E2	آزمایشی E3
نیمه سالم	٪۲/۹۷*	٪۲/۶۵	٪۳/۱۲	٪۲/۶۴
نیمه آکسوتومی	٪۶/۷۲*	٪۵/۵۱	٪۵/۱۷	٪۴/۹۲s

در گروه C اختلاف میان دو نیمه معنادار (*) و در هر یک از ۳ گروه آزمایشی این اختلاف غیر معنادار می باشد. با مقایسه نیمه سالم گروه های مختلف با یکدیگر و همینطور نیمه آکسوتومی گروه ها با یکدیگر تنها بین نیمه آکسوتومی گروه E3 با گروه C اختلاف معناداری مشاهده گردید (s).

بحث و نتیجه‌گیری

وجود اختلاف معنادار بین میانگین نورون‌های حرکتی در نیمه سالم و نیمه آکسوتومی شده نخاع در گروه شاهد مؤید کارآیی روش آکسوتومی در القای مرگ سلولی در نورون‌های حرکتی مربوطه می‌باشد (جدول ۱) و تکنیک TUNEL مورد استفاده در مطالعه حاضر نیز نشان داد که مکانیسم این مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌باشد (جدول ۲). در مطالعات متعدد دیگری نیز گزارش شده است که قطع اعصاب محیطی و آکسوتومی در دوره نوزادی موجب مرگ آپوپتوتیک نورون‌های مربوطه می‌شود (۲،۱۵). کاهش مرگ سلولی ناشی از آکسوتومی در نورون‌های حرکتی در همه گروه‌های آزمایشی دریافت کننده دارو نسبت به گروه شاهد نشان داد تجویز دوزهای مختلف اسطوخودوس به مدت سه روز می‌تواند نقش

Archive of SID

www.SID.ir

محافظت عصبی داشته باشد، که این اثر وابسته به دوز می‌باشد. همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده است در همه گروه‌ها اختلاف بین میانگین نورون‌های حرکتی در دو نیمه سالم و آکسوتومی شده از نظر آماری معنادار است. این امر نشان می‌دهد هر چند اسطوخودوس می‌تواند از مرگ آپوپتوتیک تعدادی از نورون‌های آکسوتومی شده جلوگیری نماید اما کماکان تعداد زیادی از آنها از بین خواهند رفت.

با مقایسه میانگین نورون‌های حرکتی نیمه آکسوتومی شده در گروه‌های آزمایشی و شاهد با یکدیگر، عدم وجود اختلاف معنادار بین دو گروه E1–C نشان داد که دوز ۲۵۰ mg/kg اسطوخودوس نمی‌تواند اثر محافظت عصبی مؤثری را ایجاد کند، در حالیکه وجود اختلاف معنادار بین دو گروه E2–C، نشان می‌دهد که دوز ۵۰۰ mg/kg را می‌توان به‌عنوان یک دوز مؤثر برای اثر محافظت نرونی در نظر گرفت. بررسی میانگین نورون‌های حرکتی در گروه E3 که دوز ۱۰۰۰ mg/kg را دریافت نمودند نیز نشان داد که علی‌رغم وجود اختلاف معنادار بین این گروه و گروه شاهد، به علت فقدان اختلاف معنادار بین گروه‌های E3–E2 عملاً دوز ۱۰۰۰ mg/kg را نمی‌توان دارای تأثیری بیشتر از دوز ۵۰۰ mg/kg دانست.

همان‌گونه که مشاهده می‌گردد بررسی نمونه‌هایی که از ۲۴ ساعت قبل از آکسوتومی و برای سه روز متوالی اسطوخودوس دریافت کردند نشان‌دهنده نتایج مشابه با گروه‌هایی است که از همان روز آکسوتومی دارو دریافت کردند (۱۴)؛ به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که تجویز داخل صفاقی اسطوخودوس برای محافظت عصبی فاقد نقش پیش‌درمانی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد. البته باید در نظر داشت که در مدل آزمایشی مطالعه حاضر برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده در نورون‌های نخاعی، عمل آکسوتومی ضرورتاً بر نوزاد ۲ روزه موش صحرایی انجام شد و بنابراین تجویز دارو بیش از یک روز قبل از آکسوتومی عملاً ممکن نبود؛ شاید در دیگر مدل‌های القای مرگ برنامه‌ریزی شده که امکان تجویز زودتر دارو وجود داشته باشد بتوان نتایج متفاوتی را به دست آورد.

یافته‌های رنگ‌آمیزی TUNEL در گروه شاهد، اختلاف معنادار بین درصد نورون‌های آپوپتوتیک نیمه آکسوتومی شده در مقایسه با نیمه سالم را نشان داد ولی در گروه‌های آزمایشی دریافت کننده اسطوخودوس این اختلاف غیرمعنادار بود، به عبارت دیگر در همه گروه‌های آزمایشی اسطوخودوس وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده را کاهش داد. از این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که اثرمحافظت عصبی اسطوخودوس از طریق جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده است.

از آنجا که مکانیسم مرگ نورون‌ها به دنبال آکسوتومی در دوره نوزادی عمدتاً مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد در وهله اول انتظار می‌رود در همه گروه‌های مورد مطالعه اختلاف بین میانگین نورون‌های حرکتی سالم در دو نیمه نخاع تقریباً برابر اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده (درصد نورون‌های آپوپتوتیک) باشد، اما مقایسه یافته‌های مورفومتری و تکنیک TUNEL مؤید این امر نبود به‌طوری که در هر یک از گروه‌های آزمایشی و شاهد اختلاف بین اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده در دو نیمه سالم و آکسوتومی شده به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از اختلاف میانگین نورون‌های حرکتی در دو نیمه نخاع بود. علت این تفاوت این می‌باشد که مرگ برنامه‌ریزی شده فرآیندی نسبتاً سریع بوده بسیاری از نورون‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سریعاً از طریق فاگوسیتوز از محیط حذف می‌شوند. بنابراین در هر مرحله زمانی تنها تعداد کمی از سلول‌های دارای مرگ برنامه‌ریزی شده را می‌توان مشاهده نمود.

در مطالعات قبلی نقش محافظت عصبی مواد و ترکیبات متفاوتی گزارش گردیده است. از جمله آندروژن‌ها (۱۶)، استروژن‌ها و پروژسترون‌ها (۱۸،۱۷)، اریتروپویتین (۱۹)،

Archive of SID

www.SID.ir

و مواد فارماکولوژیکی مانند آسپیرین (۲۰) و اسید ماسیلینیک (۲۱). در سال‌های اخیر اثر محافظت عصبی چندین ماده مطرح در طب سنتی و گیاهان دارویی همچون چای سبز (۲۲)، شاه‌پسند وحشی (۲۳)، زردچوبه (۲۴)، روغن ماهی (۲۵) و نپتا منتوئیدس (۱۴) گزارش شده است. ساترلند (Sutherland) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مقاله‌ای مروری درباره چای سبز و عنصر مؤثر آن یعنی کاته کین‌ها، گزارش نمودند که کاته‌کین‌هایی که دارای اثر آنتی‌اکسیدان هستند می‌توانند با کاستن استرس اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده را مهار کنند (۲۲). لای (Lai) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند که پیش درمان نورون‌های کورتیکال در حال رشد در محیط کشت با عصاره آبی گیاه شاه‌پسند وحشی باعث کاهش معنادار نوروتوکسیتی ناشی از آمیلوئید بتا می‌شود (۲۳). لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۰۹ با مطالعه اثرات چندین داروی مشتق از یک گیاه دارویی چینی بر روی بیماری آلزایمر نقش محافظت عصبی قابل توجهی را گزارش نمودند که از طریق مهار هم‌زمان استیل کولین استراز، گیرنده NMDA، نیتریک اکسید سینتاز و آبشار پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید / آمیلوئید بتا عمل می‌کند. مسیرهای نامبرده می‌توانند به‌عنوان یکی از مؤثرترین استراتژی‌های درمانی از نورودژنراسیون بیماری آلزایمر پیش‌گیری و یا آن را کند کنند (۲۶). ما نیز در مطالعات قبلی خود اثر محافظت عصبی اسطوخودوس را پس از قطع عصب سیاتیک در نوزاد موش صحرایی مشاهده نمودیم (۱۴). هر چند در این مطالعه مکانیسم تأثیر دارو مورد بررسی قرار نگرفت، اما با توجه به وجود فلاونوئیدهای متعددی در انواع گونه‌های نپتا، می‌توان اثر محافظت عصبی آن را ناشی از نقش آنتی‌اکسیدان و ضدالتهابی این فلاونوئیدها دانست که مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از آکسوتومی را در نورون‌های حرکتی مربوطه کاهش داده، سلول‌ها را در برابر عامل آسیب رسان محافظت می‌نماید. برای اثر محافظت عصبی ، فلاونوئیدها موجود در گیاه باید بتوانند در حد قابل قبولی از سد خونی- مغزی عبور کنند و مقدار آنها در نخاع به حد کافی برسد تا عملکرد نورون‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. در تأیید این مطلب گزارش شده است که متعاقب یک بار تزریق داخل صفاقی فلاونوئیدها در موش صحرایی، مقادیر قابل توجهی از این مواد در مغز حیوان یافت می‌شود. به این ترتیب می‌توان گفت که در موجودات زنده فلاونوئیدها می‌توانند به‌راحتی از سد خونی – مغزی عبور کنند (۲۷).

بعضی از مطالعات، به قابلیت پیش‌درمانی تعدادی از مواد محافظ عصبی نام برده شده از جمله بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها (۲۸)، روغن ماهی (۲۵) اسیدماسیلینیک (۲۱)، اشاره کرده‌اند. ما نیز در ادامه مطالعات قبلی خود و برای پاسخ به این سؤال که آیا اثر محافظت عصبی اسطوخودوس دارای قابلیت پیش‌درمانی نیز می‌باشد مطالعه حاضر را طراحی کردیم، اما همان‌گونه که ذکر گردید یافته‌های مطالعه حاضر قابلیت پیش‌درمانی این گیاه را تأیید نکرد و به این ترتیب تجویز آن پیش از آسیب عصبی نمی‌تواند تأثیر محافظت عصبی بیشتری داشته و موجب بقای بیشتر نورون‌های آسیب دیده شود.

سپاسگزاری

تحقیق حاصل بخشی از طرح پژوهشی دانشگاه شاهد با کد ٤/٢٦٣ می‌باشد. همچنین نویسندگان از آقای دکتر محسن ناصری مدیر گروه و آقای سید عباس هاشمی‌نژاد کارشناس گروه طب سنتی دانشکده پزشکی شاهد برای تأمین داروی گیاهی اسطوخودوس قدردانی می‌کنند.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Er E, Oliver L, Carton PF, Juin PH, Manon S, Vallette FM. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757(9-10): 1301-11.
2. Kinugasa T, Ozaki S, Hamanaka S, Kudo N. The effects of sciatic nerve axotomy on spinal motoneurons in neonatal Bax-deficient mice. *Neurosci Res* 2002; 44(4): 439- 46**.**
3. Oliveira AL, Risling M, Negro A, Langone F, Cullheim S. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J Comp Neural* 2002; 447(4): 381-93**.**
4. Adelson PD, Kochanek PM. Topical review: Head injury in children. *J Child Neural* 1998; 13(1): 2–15**.**
5. Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *Neuro Rx* 2004; 1(1): 5-16**.**
6. Palace J. Neuroprotection and repair. *J Neurol Sci* 2008; 265(1-2): 21-5.
7. Naghibi F, Mosaddegh M, Motamed SM, Ghorbani A. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian J Pharmacol Res* 2005; 4(2): 63-79**.**
8. Nazemieh H, Razavi SM, Asnaashari S, Talebpour AH, Ghahramani MA, Imani Y. Chemical composition of the essential oil of Nepeta menthoides Boiss & Buhse. *Pharmac Sci* 2009; 14(4): 283-9.
9. Aghili-Khorasani MH. Makhzan-ol-advieh. Qom, *Hablolmatin Press,* 2004; p 122 [In Persian].
10. Miceli N, Taviano MF, Giuffrida D, Trovato A, Tzakou O, Gatali EM. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from nepeta sibthorpii bentham. *J Ethnopharmacol* 2005; 97(2): 261-6.
11. Tepe B, Daferera D, Tepe AS, Polisseou M, Sokmen A. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of nepeta flavida hub.-mor. From turkey. *Food Chem* 2007; 103(4): 1358-64.
12. Mo'men Tonekaboni SM. Tohfat-ol-mo'menin. Tehran, Sepehr Publication Institute, 2007; p41 [In Persian].
13. Abu Ali Sina Sh. Alghanun fel-Teb. Beirut, Dar-ol-Kotob-ol-Elmie, 1999; p 357, [Arabic].
14. Delshad AA, Naseri M, Parvizi M, Fattah N, Sharayeli M. The Iranian traditional herbal medicine ostokhodus can prevent axotomy-induced apoptosis in spinal motoneurons in neonate rats. *J Medicinal Plants Res* 2011; 5(18): 4446-51.
15. Rogerio F, Jordao HJ, Vieira AS, Maria CC, Santos de Rezende AC, Pereira GA, et al. Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment. *Brain Res* 2006; 1112(1): 80-90.
16. Fargo KN, Foecking EM, Jones KJ, Sengelaub DR. Neuroprotective actions of androgens on motoneurons. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30(2): 130-41.
17. De Nicola AF, Labombarda F, Deniselle MC, Gonzalez SL, Garay L, Meyer M, et al. Progestrone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30(2): 173-87.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Simpkins JW, Dykens JA. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev* 2008; 57(2): 421-30.

19. McPherson RJ, Juul SE. Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *Int J Dev Neurosci* 2008; 26(1): 103-11.

20. Zheng Z, Schwab S, Grau A, Berger C. Neuroprotection by early and delayed treatment of acute stroke with high dose Aspirin. *Brain Res* 2007; 1186: 275-80.

21. Teng G, Yi-Song Q, Meng-Hao H, Long-Fei H, Xu-Zhen T, Yun-Man L, et al. Neuroprotection of Maslinic Acid, a novel glycogen phosphorylase inhibitor, in type 2 diabetic rats. *CJNM* 2010; 8(4): 293-7.

22. Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem* 2006; 17(5): 291-306.

23. Lai SW, Yu MS, Yuen WH, Chang RC. Novel neuroprotective effects of the aqueous extracts from verbena officinalis linn. *Neuropharmacol* 2006; 50(6): 641-50.

24. Noorafshan A, Omidi A, Karbalay-Doust S. Curcumin protects the dorsal root ganglion and sciatic nerve after crush in rat. *Pathol Res Pract* 2011; 207(9): 577– 82.

25. Denny Joseph KM, Muralidhara M. Fish oil prophylaxis attenuates rotenone-induced oxidative impairments and mitochondrial dysfunctions in rat brain. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(5): 1529-37.

26. Li W, Mak M, Jiang H, Wang Q, Pang Y, Chen K, et al. Novel anti-Alzheimer's dimer BIS (7)-cognitin: Cellular and molecular mechanisms of neuroprotection through multiple targets. *Neurotherapeutics* 2009; 6(1): 187-291.

27. Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(5): 592-604.

28. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113(3): 189–207.

Archive of SID

www.SID.ir

The Prophylactic Capacity of Nepeta Menthoides (Ostokhodus) in Prevention of Spinal Motoneuron Injury

Azizzadeh Delshad A.R., Ph.D.,[1*] Farzan A.R., M.D.[2]

1. Associate professor, Department of Anatomical Sciences and pathology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor of Neurosurgery, Department of Neurology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: delshad@shahed.ac.ir

(Received: 11 March 2012 Accepted: 26 Sep. 2012)

Abstract

Background & Aims: Since apoptotic cell death plays a crucial role in many neurodegenerative diseases, control of apoptosis can be taken into account as a putative neuroprotective strategy. Due to the reported neuroprotective effect of the herbal medicine Nepeta Menthoides (Ostokhodus) on the axotomy-induced apoptosis in the spinal motoneurons, in the present study we have investigated its prophylactic capacity.

Methods: In 20 two-day neonate rats (one control and three experimental groups) the right sciatic nerve was transected and in all samples the left ventral horn was considered as internal control. The experimental groups received different doses of alcoholic extract of Ostokhodus intraperitoneally for 3 days starting 24 hours before axotomy, and the control group was treated with equal volume of normal saline similarly. At the end, in the ventral horn of the related spinal cord segments the mean number of survived motoneurons, and by means of TUNEL assay the apoptotic motoneurons were counted.

Results: In all groups transection of sciatic nerve resulted in a significant reduction of motoneurons through apoptosis, which could be prevented significantly by administration of 500 and 1000mg/kg of Ostokhodus. The drug administration from 24 hours before axotomy did not result in any more prominent neuroprotection.

Conclusion: The neuroprotective effect of Ostokhodus on axotomized motoneurons, which acts through inhibition of apoptosis, has no prophylactic effect and its administration before neural injury causes no more neuroprotective effect.

Keywords: Neuroprotective agents, Nepeta Menthoides, Motor neurons, Apoptosis, Axotomy

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(1): 20-30

Archive of SID

www.SID.ir