

## بررسی قابلیت داروی گیاهی نیتامنتوئیدس (اسطوخودوس) در جلوگیری از آسیب نوروپاتی های

### حرکتی نخاعی

علیرضا عزیززاده دلشاد<sup>۱\*</sup>، عبدالرضا فرزنان<sup>۲</sup>

#### خلاصه

مقدمه: از آنجا که مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) در بسیاری از بیماری های نورودژنراتیو دخیل می باشد، کنترل آن می تواند به عنوان یک روش محافظت عصبی بالقوه مطرح باشد. با توجه به تأیید اثر محافظت عصبی داروی گیاهی نیتامنتوئیدس (اسطوخودوس) بر مرگ برنامه ریزی شده ناشی از آکسوتومی در نوروپاتی های حرکتی نخاعی، بر آن شدیم تا قابلیت پیش درمانی (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. گروه های 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، سگمان های نخاعی مربوطه نوروپاتی های حرکتی و نوروپاتی های آپوپتوتیک شمرده شد. در همه نمونه ها نیمه چپ نخاع به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

یافته ها: قطع عصب سیاتیک در همه گروه ها موجب مرگ برنامه ریزی شده و کاهش معنادار نوروپاتی های حرکتی شد. هرچند بر اساس مطالعه قبلی تجویز دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اسطوخودوس از روز قطع عصب، به شکل معناداری از مرگ برنامه ریزی شده جلوگیری کرد، ولی تجویز دارو از ۲۴ ساعت قبل از آکسوتومی باعث افزایش اثر محافظت عصبی نشد.

نتیجه گیری: اثر محافظت عصبی اسطوخودوس بر نوروپاتی های حرکتی آکسوتومی شده فاقد قابلیت پیش درمانی است و تجویز آن قبل از آسیب عصبی موجب افزایش تأثیر محافظت عصبی نمی شود. واژه های کلیدی: محافظت عصبی، نیتامنتوئیدس، اسطوخودوس، نوروپاتی های حرکتی، مرگ برنامه ریزی شده سلولی، آکسوتومی

۱- دانشیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و آسیب شناسی، 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

## مقدمه

مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپتوز) یکی از انواع مرگ سلولی است که در روندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک دستگاه‌های مختلف بدن به ویژه دستگاه عصبی نقش مهمی دارد (۱)، به طوری 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 علائم 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 به علت عوارض جانبی ناخواسته آنها، تلاش گسترده‌ای برای بررسی اثرات محافظت عصبی مواد جدیدی همچون داروهای گیاهی در حال انجام است. نپتا متئوئیدس که در منابع قدیمی طب سنتی ایران از آن با عنوان اسطوخودوس (۷) و یا گاهی با عنوان پونه‌سای سبلانی (۸) نام برده می‌شود قرن‌های متمادی به عنوان 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 Lamiales و شامل ۴۰۰ گونه می‌باشد که بیشتر آن‌ها به شکل وحشی در اروپای مرکزی و جنوبی، شمال آفریقا و مرکز و جنوب آسیا روئیده و به طور گسترده‌ای به عنوان یک داروی سنتی ضد اسپاسم، مدر، ضد آسم و تب بر استفاده می‌شود (۱۰). حدود نیمی از گونه‌های نپتا را می‌توان در ایران یافت (۱۱) که نپتامتئوئیدس یکی از آنهاست. نپتامتئوئیدس 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 به عنوان 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

### 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 شامل ۳ گروه آزمایشی و ۱ گروه شاهد تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی E1, E2, E3 از ۲۴ ساعت قبل از جراحی آکسوتومی به ترتیب ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/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

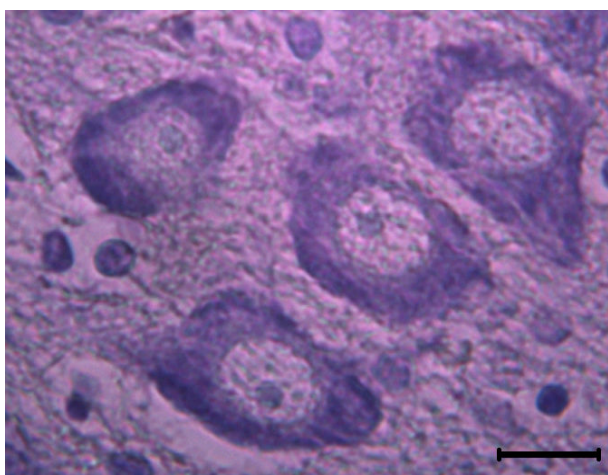
در جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده انجام نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا قابلیت پیش‌درمانی آن را در جلوگیری از آسیب عصبی مورد بررسی قرار دهیم. برای این منظور با تجویز این داروی گیاهی از ۲۴ ساعت قبل از قطع عصب سیاتیک و القای مرگ برنامه‌ریزی شده در نوزاد موش صحرایی، اثر پیش‌درمانی آن را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

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 DNase I  $10 \mu\text{g/ml}$  در mM Tris-HCl  $50$ ،  $1 \text{ mg/ml}$  BSA و  $1 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  انکوبه شدند. سپس در مرحله دوم پس از شستشو با PBS نمونه‌ها برای ۳۰ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  و در یک محفظه مرطوب با  $50 \mu\text{l}$  محلول POD convertor (حاوی آنتی‌بادی آنتی‌فلوئوروسین کنژوگه با horse-radish peroxidase) انکوبه گردید و پس از شستشو با PBS برای ۱۰ دقیقه در دمای  $20^\circ\text{C}$  و در تاریکی در معرض  $100 \mu\text{l}$  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 =  $10 \mu\text{m}$ ).

پارافینی نخاع برش‌های سریال به ضخامت  $8 \mu\text{m}$  تهیه گردید که برای شمارش نورون‌های حرکتی با رنگ کرزیل فست ویوله و برای تشخیص سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده با تکنیک TUNEL رنگ آمیزی 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  $10 \mu\text{m}$  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 نورون‌های 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 رنگ آمیزی TUNEL قرار گرفت. برای این منظور با مخلوط کردن  $5 \mu\text{l}$  محلول آنزیم حاوی TdT و  $45 \mu\text{l}$  محلول حاوی نوکلئوتیدهای dUTP نشاندار شده با FITC،  $50 \mu\text{l}$  مخلوط واکنش TUNEL به دست آمد و نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای  $37^\circ\text{C}$  در یک محفظه مرطوب و در محیط تاریک با این مخلوط انکوبه گردید. با حذف TdT از مخلوط فوق نمونه‌های

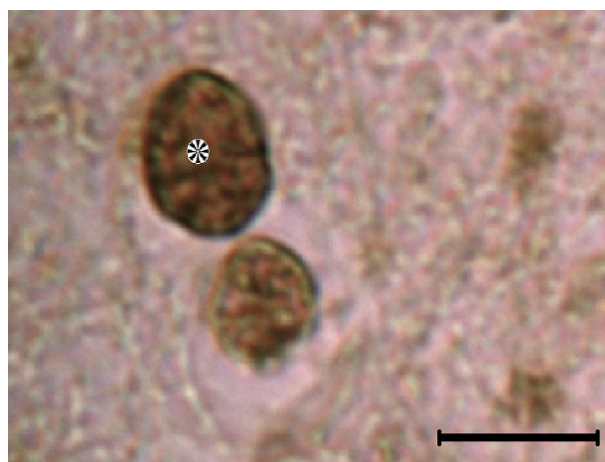
کماکان با اختلافی معنادار کمتر از نیمه سالم نخاع می‌باشد (۱۷/۱۳، ۱۰/۵ و ۶/۲۱ درصد).

مقایسه نیمه آکسوتومی شده گروه‌های آزمایشی و کنترل نشان داد تأثیر تجویز اسطوخودوس 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 E1-E2، C-E1 و نیز E2-E3 بود در حالی که اختلاف بین C-E2 و نیز C-E3 کاملاً معنادار بود ( $P < 0.05$ ).

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 ( $P < 0.01$ ), 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



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 ۱۲/۰۸ به ۸/۴۳ در نیمه آکسوتومی شده) که نمایانگر کاهش معناداری ( $P < 0.05$ ) 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

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.

معناداری را نشان نداد، اما مقایسه نیمه آکسوتومی شده گروه‌ها با یکدیگر نشان‌دهنده اختلافی معنادار بین گروه کنترل و گروه E3 بود ( $P < 0/05$ ). مقایسه نتایج مربوط به اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده در گروه‌هایی که از روز آکسوتومی اسطوخودوس دریافت کردند (۱۴) با

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)

متغیر	گروه‌ها	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 <sup>i</sup>	۱۱/۸۵ ± ۰/۸۲۶ <sup>s</sup>	۱۲/۰۸ ± ۰/۴۷۶ <sup>s</sup>
درصد کاهش نورونی		۳۰/۲۲%	۱۷/۱۳%	۱۰/۵%	۶/۲۱%

ردیف آخر نشان دهنده درصد کاهش نورون‌های حرکتی نیمه آکسوتومی نسبت به نیمه سالم در هر یک از گروه‌هاست. در هر گروه (ستون‌ها) اختلاف میان دو نیمه معنادار می‌باشد ( $P < 0/05$ ). مقایسه نیمه آکسوتومی گروه‌های آزمایشی با گروه شاهد نشان دهنده اختلاف غیر معنادار گروه E1 (i) و اختلاف معنادار گروه‌های E2 و E3 (s) با گروه شاهد بود. اختلاف بین E2 و E3 نیز غیر معنادار 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)

متغیر	گروه‌ها	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	۴/۹۲ <sup>s</sup>

در گروه C اختلاف میان دو نیمه معنادار (\*) و در هر یک از ۳ گروه آزمایشی این اختلاف غیر معنادار می‌باشد. با مقایسه نیمه سالم گروه‌های مختلف با یکدیگر و هم‌بطور نیمه آکسوتومی گروه‌ها با یکدیگر تنها بین نیمه آکسوتومی گروه E3 با گروه C اختلاف معناداری مشاهده گردید (s).

## بحث و نتیجه‌گیری

(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 دریافت‌کننده دارو نسبت به گروه شاهد نشان داد تجویز دوزهای مختلف اسطوخودوس به مدت سه روز می‌تواند نقش

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 مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد

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 اثر محافظت 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 به طوری که در هر یک از گروه‌های آزمایشی و شاهد اختلاف بین اندکس مرگ برنامه‌ریزی شده در دو نیمه سالم و آکسوتومی شده به طور 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 (۱۷، ۱۸)، اریتروپویتین (۱۹)،

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 به عنوان 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 صحرائی انجام شد و بنابراین تجویز دارو بیش از یک روز قبل از آکسوتومی عملاً

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 صحرائی، مقادیر قابل توجهی از این مواد در مغز حیوان یافت می‌شود. به این ترتیب می‌توان گفت که در موجودات زنده فلاونوئیدها می‌توانند به راحتی 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 ۴/۲۶۳ 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.

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 پیش‌درمان نورون‌های کورتیکال در حال رشد در محیط کشت با عصاره آبی گیاه شاه‌پسند وحشی باعث کاهش معنادار نورو توكسیتی 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 استیل‌کولین استراز، گیرنده NMDA، نیتریک اکسید سیتاز 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 صحرائی 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



## 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. Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30(2): 173-87.

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.

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

Azizzadeh Delshad A.R., Ph.D.,<sup>1\*</sup> Farzan A.R., M.D.<sup>2</sup>

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