Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.45; No.1

Effect of hydroalcoholic extract and ethyl acetate and N-butanol fractions of Agrimonia eupatoria plant on the overgrowth of anterior spinal cord alpha neurons after sciatic nerve compression in male rats

Ghazaleh Nabavinia, Maryam Tehranipour*, Javad Baharara

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

(Received: 2019/06/1 Accept:2020/07/11)

Abstract

Backgrond*: Denervation or compression result in the destruction of the cell body of neurons in the anterior horn of the spinal cord. Environmental nerve damage in the form of retrograde affects the cell body of alpha neurons and causes central degeneration of neurons in the spinal cord. Agrimonia eupatoria from the Golsorkhian family has antioxidant and anti-inflammatory effects and is effective in the survival and division of neurons. Therefore, the present study was conducted with the aim of determining the neuroprotective effects of hydroalcoholic extract of the plant unaffected by neural density after compression of the sciatic nerve in rats.*

Materials and Methods: *In the present experimental study, a total of 36 male Wistar rats weighing -250 300 g were randomly divided into 6 groups of 6: control, compression, treatment A (compression + extract at 75 mg / kg dose), treatment B (Compression + ethyl acetate fraction at 75 mg / kg dose), C treatment (compression + N-butanol fraction at 75 mg / kg dose), and D treatment (compression + blue phase with 75 mg / kg dose). Ghafath plant hydroalcoholic extract was prepared using Souxelle method. In the control group, after anesthetizing the rats, the muscle in the sciatic nerve was split without nerve damage and in the compression group and the sciatic nerve treatment group, the right leg was compressed for 30 seconds. The first intravenous infusion was performed immediately after nerve compression and the second infusion was performed seven days later. After 28 days, the rats were subjected to perfusion and then the lumbar spinal cords were sampled, and the samples were serialized after the tissue passage and blockage steps and stained with blue toluidin and erythrosine. Neurotic densities were calculated using directory method and the results were compared running t-test and ANOVA.*

Results: *The results of comparing neuronal densities between compression and treatment groups showed that all the treatment groups had a significant difference in neuronal density with compression group ($P < 0.001$). Maximum neuronal density was related to n-butanol with a mean of (34 ± 1864), then the group alcoholic (mean: 29 ± 1614) and the aqueous phase (24 ± 1597) and the Department of ethyl acetate with a mean of 33± 1292.*

Conclusion: *It seems that the hydroalcoholic extract of Ghafas plant increases the density of the anterior alpha branch of the spinal cord after compression of the sciatic nerve in male rats, which may be due to compounds such as tocopherol, and with its antioxidant and anti-apoptotic effects can be effective in repairing the nervous system.*

Keywords: *Agrimonia eupatoria; sciatic nerve; alpha moto neuron*

* *Corosponding author: Maryam Tehranipour*

Email:maryam_tehranipour@mshdiau.ac

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-01-15]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۵، شماره ۱، ۱۴۰۰، صفحات ۳۴ تا ۴۰

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی و فراکسیون‌های اتیل استات و ان بوتانول گیاه غافث Agrimonia eupatoria برترمیم نورون‌های آلفا شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی نر

غزاله نبوی‌نیا ، دکتر مریم طهرانی‌پور*، دکتر جواد بهارآرا

گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۳/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۴/۲۱

چکیده:

سابقه و هدف: قطع عصب یا کمپرسیون، سبب تخریب جسم سلولی نورون‌های شاخ قدامی نخاع می‌شوند. ضایعه عصب محیطی به صورت رتروگراد بر جسم سلولی نورون‌های آلفا تاثیر و سبب دژنراسیون مرکزی نورون‌ها در نخاع می شود. گیاه غافث (Agrimonia eupatoria)از خانواده گل‌سرخیان دارای آثار آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است و در بقا و تقسیم نورون‌ها موثر است. بنابراین این پژوهش با هدف تعیین آثار نوروپروتکتیوی عصاره هیدروالکلی گیاه غافث بر دانسیته نورونی پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ابتدا ۳۶ راس رت نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم به صورت تصادفی به شش گروه شش تایی شامل گروه‌های کنترل، کمپرسیون، تیمار A (کمپرسیون+ عصاره هیدروالکلی با دوز ۷۵ mg/kg)، تیمار B (کمپرسیون+ فراکسیون اتیل استات با دوز ۷۵ mg/kg)، تیمار C (کمپرسیون+ فراکسیون ان بوتانول با دوز ۷۵ mg/kg)و تیمار D (کمپرسیون+ فاز آبی با دوز ۷۵ mg/kg) تقسیم شدند. عصاره هیدروالکلی گیاه غافث با روش سوکسله تهیه شد. درگروه کنترل پس از بیهوش کردن رت‌ها، عضله در محل عصب سیاتیک بدون آسیب عصب شکافته شد و در گروه کمپرسیون و گروه تیمار عصب سیاتیک پای راست به مدت ۳۰ ثانیه تحت کمپرسیون قرار گرفت. نخستین تزریق عصاره به صورت داخل صفاقی بلافاصله بعد از کمپرسیون عصب و دومین تزریق هفت روز بعد انجام شد. بعد از ۲۸ روز، رت‌ها تحت روش پرفیوژن قرار گرفته و سپس از نخاع قسمت کمری نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها پس از طی مراحل پاساژ بافتی و بلوکه کردن به طور سریالی برش‌هایی تهیه و با آبی تولوئیدین و اریتروزین رنگ‌آمیزی شد. دانسیته نورونی به روش دایسکتور و متد استریولوژی محاسبه و نتایج گروه‌ها توسط آنالیز (Post Hoc) و Anova با هم مقایسه شدند.

یافته‌ها: نتایج مقایسه دانسیته نورونی بین گروه کمپرسیون و گروه‌های تیمار نشان داد که تمام گروه‌های تیمار اختلاف معناداری در دانسیته نورونی با گروه کمپرسیون داشته اند(P۰/۱۰۰>). به طوری که بیشترین دانسیته نورونی به ترتیب مربوط به گروه ان بوتانول با میانگین (۴۳ ± ۴۶۸۱) سپس گروه هیدروالکلی با میانگین (۹۲ ± ۴۱۶۱) و فاز آبی (۴۲ ± ۷۹۵۱) و در نهایت گروه اتیل‌استات با میانگین (۳۳ ± ۲۹۲۱) است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که عصاره هیدروالکلی گیاه غافث سبب افزایش دانسیته نورون آلفا شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در در موش‌های صحرایی نر می‌شود که شاید به دلیل داشتن ترکیب‌هایی مانند توکوفرول که آثار آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوزی دارد می‌توانند در ترمیم سیستم عصبی موثر باشند.

واژگان کلیدی: گیاه غافث (Agrimonia eupatoria) ، عصب سیاتیک، آلفا موتونورون

مقدمه

قبل از بازسازی رشته عصبی مجموعه‌ای از فرآیندهای دژنراتیو رخ می‌دهد که بسیاری از آن‌ها مقدمات مستقیم بازسازی را فراهم می‌کنند(۱). از آنجا که جسم سلولی نورون مرکز متابولیکی آن است، در صورت صدمه به نورون، جسم سلولی آن تخریب شده و سبب مرگ نورون می‌شود و با عنوان دژنراسیون والرین خوانده می‌شود(۲). به دنبال قطع یا کمپرسیون عصب، دژنراسیون عصب در بخش خلفی آغاز می‌شود. بعد از آسیب نفوذپذیری سد خونی- عصبی افزایش یافته تا اجازه دهد فاکتورها و سلول‌های خونی که ترمیم عصب را تسهیل می‌کنند، وارد عصب شوند. از مهم‌ترین سلول‌های وارد شده به ناحیه آسیب دیده، ماکروفاژها هستند(۱و۲). به دنبال قطع اعصاب محیطی و شروع دژنراسیون والرین، سلول‌های شوان و

نویسنده مسئول: دکتر مریم طهرانی‌پور
پست الکترونیک: maryam_tehranipour@mshdiau.ac

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-01-15]

ماکروفاژها و مونوسیت‌ها با همکاری یکدیگر میلین و اجزای قطعه انتهایی آکسون را در روزهای اول پس از آسیب بیگانه‌خواری می‌کنند(۳). بعضی فاکتورهای رشد در فرآیند التهاب دخالت دارند. به عنوان مثال کمبود فاکتورهای محرک کلونی ماکروفاژی (MCSF) سبب کاهش تکثیر سلول‌های میکروگلیال و کاهش تعداد لنفوسیت‌ها در محل التهاب می‌شوند اما اثر ظاهری در سرعت ترمیم آکسون‌ها ندارند(۴). اگر چه نورون‌ها پس از تولید فاقد قدرت تولید دوباره هستند اما می‌توانند در مقابل درجه‌های معینی از ضایعه‌ها مقاومت کرده و بهبود یابند. اگر یک فیبر عصبی قطع شود هم در اعصاب محیطی و هم در اعصاب مرکزی تغییرهایی ایجاد می‌شود که در صورت شدید بودن این تغییرها منجر به مرگ سلولی می‌شود(۵).

گیاه غافث (Agrimonia eupatoria) گیاهی است علفی چند ساله از خانواده گل‌سرخیان دارای ساقه و برگ‌های کرک‌دار. گل‌های غافث در انتهای ساقه‌ها به رنگ زرد به صورت سنبله ظاهر می‌شوند(۶).این گیاه در کوهستان‌های سردسیر رشد می‌کند. عصاره تمام بخش‌های هوایی گیاه غافث دارای اثر تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی هستند. سرشاخه، ساقه و بذر با بیشترین اثر تحریک‌کنندگی سبب افزایش تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تا میزان هشت برابر شد. عصاره متانولی گیاه غافث دارای اثر ضدباکتری بر برخی باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا بوده و بیشترین اثر ضدباکتری بر باکتری باسیلوس سوبتیلیس در غلظت mg/ml ۴ و باکتری استافیلوکوک اورئوس در غلظت mg/ml ۷ بود(۶). این گیاه دارای ترکیب‌های ارزشمندی مانند آگریمونین، کاتچین، پروسیانیدین، کوئرستین، لوتئولین، کامفرول و یوگنول است(۷). در طب سنتی، قسمت‌های هوایی این گیاه خاصیت مدر و قابض دارد و برای درمان اسهال، کولیت، مشکلات آپاندیس، التهاب مثانه، مار گزیدگی و زگیل کاربرد دارد(۸). علاوه بر این، این گیاه برای مشکلات کبدی، کلیوی، سنگ‌های صفراوی، ادم، روماتیسم، هموروئید، جلوگیری از خونریزی، زخم‌های واریسی، التهاب گلو، سل ریوی و سل پوستی استفاده می‌شود(۹). مطالعه‌های محققان نشان داده که این گیاه دارای خواص آنتی اکسیدان، ضدالتهاب، ضدویروس، ضدباکتری، ضدچاقی، ضددیابت، ضدسرطان و ضدآلزایمر است. همچنین در طب سنتی، این گیاه برای ترمیم زخم‌ها و در درمان بیماری‌های مرتبط با کبد، صفرا و سیستم ایمنی مانند روماتیسم کاربرد دارد. آثار حفاظتی رادیکال‌های آزاد و فعالیت‌های حفاظت از آسیب اسیدها نیز شناخته شده است(۱۰).

با توجه به آثار فارماکولوژیکی متعدد این گیاه و استفاده فراوان از این گیاه به صورت بومی و سنتی، هدف از این مطالعه بررسی عصاره هیدروالکلی از آن به عنوان یک فاکتور احتمالی و مؤثر در تحریک رژنراسیون ناشی از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت است.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی روی ۳۶ راس موش صحرایی بالغ در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد. موش رت نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم بالغ از بخش حیوان‌های دانشکده پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد خریداری شدند. تا زمان انجام آزمایش حیوان‌ها در شرایط نوری استاندارد روزانه و درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوان‌های دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد نگهداری شدند. در طول آزمایش، حیوان‌ها به آب و غذای کافی دسترسی داشتند و غذای آنها از شرکت جوانه خراسان تهیه شد. گیاه غافث به طور بوته ای از استان خراسان شمالی و توابع شهرستان بجنورد جمع‌آوری شد. مرکز هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه آزاد مشهد این گیاه را با کد هرباریوم ۳۶۸۳۰ تایید کرد. اجزای گیاه در سایه خشک شدند و سپس به صورت پودر استفاده شد. در این مطالعه، در هر عصاره بسته به نوع حلال، مواد موثره‌ای متفاوت از گیاه جدا می‌شود. برای مثال، در فراکسیون آبی اجزای محلول در آب و در فراکسیون ان بوتانول اجزا محلول در الکل در نتیجه برای بررسی هر یک از اجزای گیاه از فراکسیون‌های متفاوت استفاده شده است. ابتدا مقدار ۵۰ گرم پودر گیاه غافث در داخل کاغذ کارتوش ریخته و در دستگاه سوکسله قرار داده شد(۱۱). به عنوان حلال ۱۵۰ cc اتانول ۹۶درصد و ۱۵۰ cc آب مقطر باهم مخلوط و در محفظه دستگاه ریخته شد. عصاره‌گیری به مدت ۱۰ ساعت انجام شد تا اطمینان حاصل شود تمام عصاره از پودر استخراج شده است. در انتها عمل حذف حلال از عصاره گیاه غافث انجام شدو عصاره به دست آمده در انکوباتور با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شده و به این وسیله عصاره گیاه خشک شد. ۲۵/۱۴گرم عصاره خشک به دست آمد که بازده آن معادل ۵/۲۸درصد بود(۱۱). برای تهیه فراکسیون یک چهارم از عصاره گیاه معادل ۵۶/۳ گرم ، برای تزریق به یک گروه از موش‌ها کنار گذاشته شد و از بقیه آن برای تهیه فراکسیون‌های ان بوتانول ، اتیل استات و فاز آبی استفاده شد. در تهیه فراکسیون ان بوتانول ۱۰،۶۸ گرم از عصاره گیاه در ۱۸۰ cc آب مقطر حل و محلول حاصل داخل قیف دکانتور ریخته شد. سپس ۵۰ cc ان بوتانول به مایع داخل قیف دکانتور اضافه و خوب تکان داده شد تا مواد با همدیگر مخلوط شوند. قیف دکانتور ثابت گذاشته شده تا زمانی که دوفاز از یکدیگر جدا شد. بعد از جدا کردن دو فاز از یکدیگر ، چندین مرتبه با ۵۰ cc ان بوتانول ،عملیات فوق برای فاز پایینی تکرار شد تا اجزای غیر قطبی جدا شوند. سپس محلول حاصل تغلیظ و داخل انکوباتورقرار داده شد تا عصاره خشک به دست آید. برای تهیه فراکسیون اتیل استات، فازپایینی حاصل از مرحله قبل را که شامل اجزای قطبی و بینابینی است، داخل قیف دکانتور ریخته و به آن ۵۰ cc اتیل استات اضافه می شود، بعد از تکان دادن قیف و سپس ثابت نگه داشتن آن ، دوفاز تشکیل می شود. فاز رویی شامل اجزای بینابینی مثل فسفولیپیدهاست که در اتیل استات حل می‌شوند. چندین بار با ۵۰ cc اتیل استات عملیات فوق برای فاز پایینی تکرار می‌شود تا اجزای بینابینی جدا شوند. سپس محلول حاصل تغلیظ شده و برای به دست آوردن عصاره خشک داخل انکوباتور قرار گرفت. بعد از استخراج فراکسیون‌های ان بوتانول و اتیل‌استات از مخلوط عصاره هیدروالکلی وآب مقطر موجود در قیف دکانتور، آنچه باقی می‌ماند، فاز آبی است. عصاره فاز آبی بعد از تغلیظ، برای خشک شدن در انکوباتور قرار داده شد(۱۲).

۳۶ سر رت نژاد ویستار به طور تصادفی به شش گروه زیر تقسیم‌بندی شدند:

گروه‌بندی حیوان‌ها

نام گروه	میزان دوز تزریقی و نوع عصاره
کنترل	تزریق سرم فیزیولوژی برای ایجاد استرس و مشاهده عصب سیاتیک
کمپرسیون	تزریق سرم فیزیولوژی برای ایجاد استرس و ایجاد کمپرسیون
تیمارA	کمپرسیون +تیمار با عصاره هیدروالکلی ۷۵mg/kg
تیمارB	کمپرسیون +تیمار با فاز آبی۷۵mg/kg
تیمارC	کمپرسیون+تیمار با ان بوتانول ۷۵mg/kg
تیمار D	کمپرسیون +تیمار با اتیل استات ۷۵mg/kg

روش انجام عمل کمپرسیون

رت‌های هر گروه با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی زایلازین شش میلی‌گرم و کتامین ۶۰ میلی‌گرم به نسبت وزن بدن بیهوش شدند(۱۳). ۳۶ سر رت نژاد ویستار به طور تصادفی به شش گروه شامل گروه‌های کنترل، کمپرسیون وکمپرسیون+تیمارهای فراکسیون‌های مختلف با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. ایجاد کمپرسیون پس از ایجاد برشی به طول یک سانتی‌متر در زیر سر استخوان ران، عصب سیاتیک آشکار شد و با استفاده از قیچی قفل‌دار به مدت ۳۰ ثانیه در معرض کمپرسیون قرار گرفت و لبه‌های زخم توسط گیره مخصوص به هم بخیه زده شده و محل ضایعه ضدعفونی شد. برای هر رت در طول ۲۸ روز دو نوبت تزریق با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی انجام می‌گیرد. نخستین تزریق پس از انجام عمل کمپرسیون و تزریق دوم یک هفته بعد انجام می‌شود. پس از ۲۸ روز از تازیخ کمپرسیون، ابتدا بافت‌های بدن حیوان با استفاده از روش پرفیوژن فیکس شد و سپس نمونه‌برداری از قطعه‌های نخاعی مربوط به عصب سیاتیک انجام شد. به این منظور نخاع به طور کامل تا انتهای دم اسب، از داخل ستون مهره‌ها خارج شده و سپس از انتهای دم اسب به اندازه ۱۸ میلی‌متر بالا رفته و نمونه‌های به طول ۸ میلی‌متر تهیه شد با توجه به اینکه عصب سیاتیک از پنج ریشه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-01-15]

عصب شامل اعصاب چهارم و پنجم کمری (L۴-L۵) و اول تا سوم خاجی (S۱-S۳) در نخاع منشأ می‌گیرد ، بنابراین نمونه‌های ۸ میلی‌متری تهیه شده، محدوده جسم سلولی نورون‌های تشکیل‌دهنده عصب سیاتیک هستند(۱۳)

روش نمونه‌برداری

پس از ۲۸ روز از تاریخ کمپرسیون، برای فیکس کردن بافت‌های بدن حیوان، از روش پرفیوژن استفاده شد. دلیل استفاده از این روش، حساس بودن بافت عصبی و اتولیز سریع آن است. از طرفی به دلیل وجود بافت‌های پشتیبان فیکساتور به راحتی درآن نفوذ نمی‌کند. برای این کار ابتدا حیوان با تزریق داخل صفاقی زایلازین و کتامین (شش و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شد. سپس در تشتک تشریح به پشت قرار داده شده ناحیه سینه جانور را به شکل مثلث برش داده، به صورتی که قلب در دسترس باشد، ابتدا جناغ سینه را لمس کرده، از انتهای جناغ سینه به سمت پایین دیافراگم، برشی را ایجاد کرده با زدن اولین برش با قیچی نوک غضروف جناغ سینه دیده شد. در نهایت برش مثلثی را ایجاد کرده. در این مرحله باید مواظب رگ‌های خونی نزدیک به قلب برای جلوگیری از خونریزی بود. نوک بطن را با پنس نوک گرد گرفته و سوند متصل به دستگاه پرفیوژن را از انتهای بطن چپ وارد آئورت کرده و دستگاه به کار انداخته شد. به این ترتیب ابتدا سرم فیزیولوژیک و سپس فیکساتور وارد گردش عمومی خون می‌شد. به دنبال آن برای خروج خون برشی در ناحیه دهلیز راست ایجاد شد. بعد از مدتی در تمام بدن فیکساتور به جای خون جریان یافته و خون از بدن خارج شد. با این روش فیکساتور از طریق بسترهای خونی به تمام قسمت‌های بدن رفته و سبب فیکسه شدن سریع و کامل حیوان می‌شود. در این هنگام هر اندامی از حیوان که فیکس می‌شود به لرزش در می‌آید. در یک متد خوب باید تعداد لرزش‌ها سریع‌تر و بیشتر باشد(۱۴). بافت عصبی پس از گذراندن مراحل پاساژ، برای قالب‌گیری آماده است. با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت هفت میکرون تهیه شد. برش‌گیری به صورت سریال انجام شده و از هر ۳۰ برش سه برش متوالی انتخاب و به لام منتقل شدند. برای رنگ‌آمیزی مقاطع پارافینی باید پارافین زدایی و آب‌دهی شوند. برای حذف پارافین از زایلین و برای آب‌دهی از الکل ۹۶ درصد با درجات نزولی استفاده می‌شود بعد از رنگ‌آمیزی عمل آب‌گیری با استفاده از الکل مطلق انجام می‌شود. یکی از رنگ‌های استفاده شده، آبی تولوئیدین است که در آن هسته‌ها به رنگ بنفش در آمده و زمینه بافت به رنگ صورتی می‌شود. پس از اتمام رنگ‌آمیزی و خشک شدن چسب تصاویر با استفاده از دستگاه فتومیکروسکوپ مدل Zeiss و با عدسی ۴۰× تهیه شدند.

مرحله شمارش نورونی

در این مرحله، شمارش نورون‌ها با روش دایسکتور انجام شد. دایسکتور متدی است که نمونه‌ها در یک فضای سه بعدی بدون در نظر گرفتن اندازه و یا شکل آن‌ها بررسی می‌شوند. در متد دایسکتور دو برش باید وضعیت یکسانی داشته باشند و چارچوب نمونه‌برداری باید یک وضعیت رندوم داشته باشد. در این حالت تمام اجزا شانس برابر برای شمارش دارند. دایسکتور شامل دو برش متوالی است که در چارچوب مرجع ذرات شمارش می‌شوند. اگر ذره‌ای در چارچوب باشد، ولی در چارچوب بالایی نباشد در شمارش به حساب می‌آید، ولی اگر ذره‌ای در هر دو چارچوب باشد، در شمارش محسوب نمی‌شود.

برای آنالیز داده‌های خام نیاز به پارامترهایی نظیر، Q ∑، frame ∑، V disector، Mean±SE و ... است که این گونه معرفی می‌شوند :

∑Q: مجموع نورون‌های شمارش شده در یک نمونه

∑frame: مجموع دفعه‌های نمونه برداری شده

V dissector: حجم چارچوب نمونه‌برداری شده

Vdissector =A Frame × H

A Frame: مساحت چارچوب نمونه‌برداری

H: فاصله بین دو برش یا ضخامت هر برش

برای بررسی داده‌ها با کمک برنامه آماری t-test نیاز به پارامتر دیگری به نام NV یا دانسیته تعداد نورون‌هاست که از طریق فرمول زیر قابل محاسبه است(۱۴).

$$N_V = \frac{\sum Q}{\sum \text{Vdisector} \times \text{frame}}$$

مساحت چارچوب نمونه‌برداری روی صفحه مانیتور ۱٫۵×۱٫۵ سانتی‌متر بود که برای به دست آوردن اندازه واقعی این مساحت روی نمونه از لام میکرومتری استفاده شد و با توجه به این که لام میکرومتری تصویری به اندازه ۱۱ میلی‌متر داشت، بنابراین بزرگنمایی ۱۱ مرتبه بود.

V dissector =A Frame × H

$$V\ \text{dissector} = \frac{15}{11} \times \frac{15}{11} \times (7 \times 10^{-3}\text{mm}) = 0/84394290 \times 10^{-3}\text{mm}^3$$

آنالیز آماری داده‌ها

در گروه‌های مورد آزمایش، از هر گروه سه نمونه برای بررسی‌های بافتی و سه نمونه برای بررسی بیان ژن در مسیر آزمایش قرار گرفت که برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار Minitab ۱۶ و آزمون Anova و (Post Hoc) با سطح معناداری p<۰٫۰۵ استفاده شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excell استفاده شد.

یافته ها

نتایج حاصل از دژنراسیون مرکزی در طول ۲۸ روز پس از کمپرسیون و همچنین بررسی اثر گروه‌های تیمار با عصاره هیدروالکلی برگ گیاه غافث به صورت دانسیته نورونی، نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نخاع در جدول‌های زیر ارائه شده است.

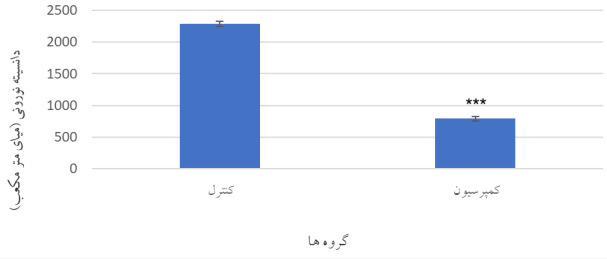
تعداد نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نیمه راست نخاع در گروه کنترل روز ۲۸ برابر با ۳۱ ± ۱۴۸۰ =SE Mean ± است.

تعداد نورون‌های حرکتی آلفا شمارش شده، در شاخ قدامی نیمه راست نخاع، در گروه کمپرسیون در روز ۲۸ برابر ۲۷ ± ۶۸۶ =SE Mean ± است.

تعداد نورون‌های حرکتی آلفا شمارش شده، در شاخ قدامی نیمه راست نخاع، در گروه تیمار با گروه ان‌بوتانول با دوز(۷۵ کیلوگرم/ میلی‌گرم) برابر ۳۴ ± ۱۸۶۴ =SE Mean ± است.

تعداد نورون‌های حرکتی آلفا شمارش شده، در شاخ قدامی نیمه راست نخاع، در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی با دوز(۷۵ کیلوگرم/ میلی‌گرم) برابر ۲۹ ± ۱۶۱۴ =SE Mean ± است.

در نمودار، میزان دانسیته نورون‌های حرکتی آلفا شاخ نخاع در گروه کنترل و کمپرسیون (=۶n) آورده شده است. در هر گروه اعداد نشان‌دهنده میانگین دانسیته نورونی ± خطای استاندارد است. با توجه به این که مقدار P= ۰٫۰۰۰ است. تفاوت معناداری بین دانسیته نورونی گروه کنترل و گروه کمپرسیون وجود دارد، به طوری که دانسیته گروه کمپرسیون کاهش پیدا کرده است.



نمودار ۱– میزان دانسیته نورون های حرکتی آلفا شاخ نخاع در گروه کنترل و کمپرسیون

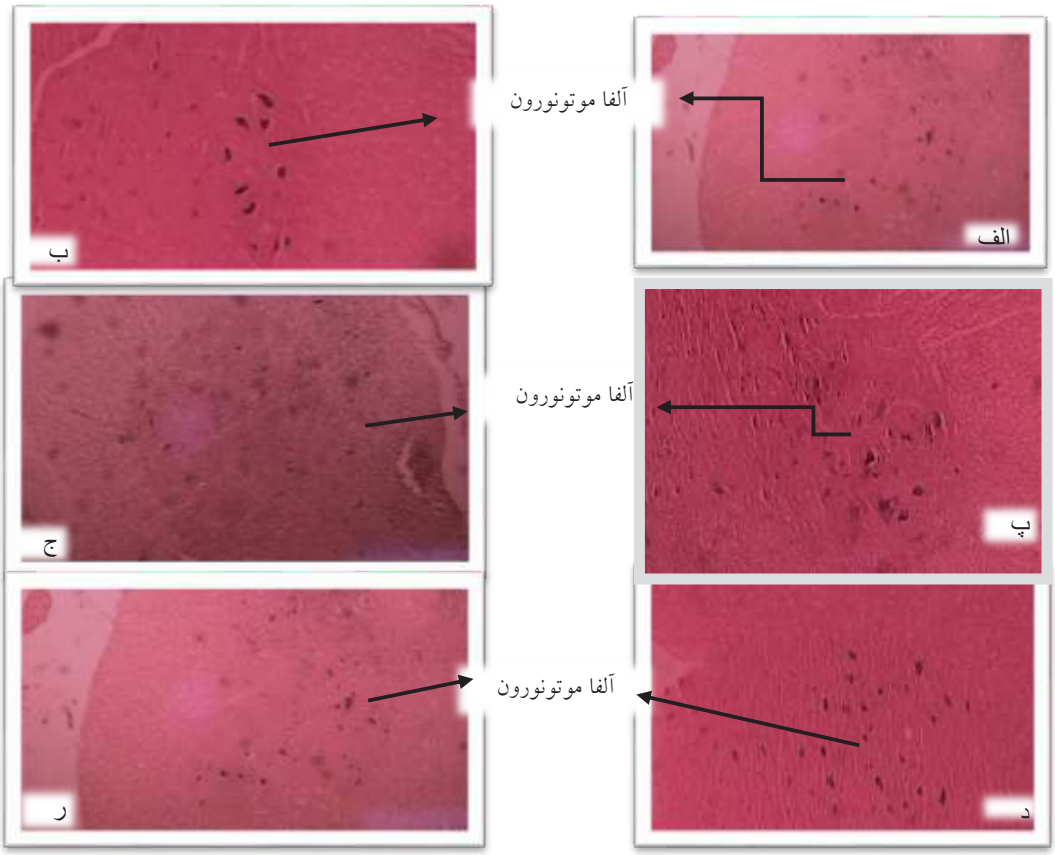
در نمودار ۲، نتایج میزان دانسیته نورون های حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع در گروه کمپرسیون با گروه های تیمار اتیل استات و فاز آبی و ان بوتانول و هیدروالکلی با دوز۷۵ میلی گرم/کیلوگرم آورده شده است. آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد مقایسه گروه‌های اتیل استات، فاز آبی ، ان بوتانول و هیدروالکلی با گروه کمپرسیون افزایش معناداری را نشان می‌دهد به طوری که بیشترین افزایش در دانسیته نورونی گروه ان بوتانول است (p/۰۰۱>)

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-01-15]

نمودار ۲- میزان دانسیته نورون‌های حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع بر حسب گروه‌ها

نتایج هیستولوژیک

نتایج حاصل از برش‌های بافتی نخاع برای بررسی آلفا موتونورون‌های نخاع در نیمه راست شاخ قدامی در تصویرهای زیر خلاصه شده است. تصویر میکروسکپی حاصل از برش عرضی قطعه‌های نخاعی عصب سیاتیک در گروه‌های مختلف و با رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین انجام گرفته است. الف: در گروه کنترل جسم سلولی آلفا موتونورون های شاخ قدامی نخاع به شکل منظم مشاهده می‌شود و هسته در مرکز قرار دارد. ب: کمپرسیون عصب سیاتیک سبب دژنراسیون مرکزی و تخریب جسم سلولی آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی نخاع می‌شود. جسم سلولی به شکل بیضی و یا مثلثی در می‌آید. اجسام نیسل شکسته شده و در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده می‌شوند. همچنین هسته از موقعیت مرکزی خود به سمت محیط سلول



شکل ۱- نورون حرکتی آلفا در برش عرضی نخاع بر حسب گروه ها. رنگ آمیزی: آبی تولوئیدین – اریتروزین. (درشت نمایی × ۴۰۰)،الف: گروه کنترل، ب: کمپرسیون، پ: تیمار A ،ج : تیمار B ،تیمار C، تیمار D

تغییر مکان می‌دهد. در تصویر (پ)تزریق عصاره اتیل استات دوز ۷۵ (میلی‌گرم برکیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک سبب رژنراسیون در آکسون می‌شود. به دنبال تغییرهای رژنراسیون در آکسون، جسم سلولی به حالت طبیعی در آمده، تورم سلولی کم می‌شود. در تصویر (ج) تزریق فاز آبی (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک سبب تغییر رژنراسیون در آکسون می‌شود. به دنبال این تغییرها، جسم سلولی به حالت طبیعی درآمده و هسته به مرکز برگشته است. در تصویر (د) تزریق عصاره ان بوتانول (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک سبب تغییرهای رژنراسیون در آکسون می‌شود. به دنبال تغییر در رژنراسیون آکسون، جسم سلولی به حالت طبیعی در آمده، تورم سلولی کم می‌شود، هسته به مرکز بر می‌گردد و این تغییرها به ویژگی‌های گروه کنترل نزدیک است. در تصویر (ر)تزریق عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک سبب تغییر رژنراسیون در آکسون می‌شود. به دنبال تغییر در رژنراسیون آکسون، جسم سلولی به حالت طبیعی در آمده، تورم سلولی کم می‌شود، هسته به مرکز بر می‌گردد و این تغییرها به ویژگی‌های گروه کنترل نزدیک است.

بحث

تحقیق نشان داد که تمام گروه‌های تیمار اختلاف معناداری در دانسیته نورونی با گروه کمپرسیون داشته‌اند(P/۰۰۱>). بررسی نتایج عکس‌های بافتی این پژوهش نشان داد که در گروه کنترل هسته در مرکز قرار دارد و شکل نورون کروی بوده است، ولی در گروه کمپرسیون هسته در کنار و چروکیده است، ولی در گروه‌های تیمار با حالت طبیعی نورون‌ها دوباره نمایان شده است که در گروه تیمار با فراکسیون ان بوتانول، هسته‌ها واضح‌تر دیده می‌شوند و تشابه بیشتری به گروه کنترل نشان می‌دهد.

اگر یک فیبر عصبی قطع شود هم در اعصاب محیطی و هم در اعصاب مرکزی تغییرهایی ایجاد شده و درنهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود(۱۵). به این معنا که در قطع شدگی و کمپرسیون شدید اعصاب چنانچه میزان تخریب بخش پروگزیمال آکسون‌ها شدید باشد، آثار ضایعه رو به عقب به سمت جسم سلولی نورون ها توسعه یافته و سبب دژنراسیون مرکزی و تخریب جسم سلولی نورون‌ها می‌شود(۱۶). تحقیق‌هایی که در سال ۲۰۰۲ توسط

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-01-15]

Kinugasa و همکارانش انجام شد نشان داد که آکسوتومی و له شدگی عصب آپوپتوز را در نورون‌ها القا می‌کند(۱۷). تحقیقی که ما انجام دادیم نیز مویّد آن مطلب است. همان‌طور که در قسمت نتایج مشاهده می‌شود، دانسیته تعداد نورون‌ها در گروه کمپرسیون نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری داشته و تعداد آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی در گروه کمپرسیون کاهش قابل توجهی داشته است (P/۰۰۱>) و این بدان معناست که کمپرسیون عصب سیاتیک جانور سبب پدید آمدن آثار دژنراسیون مرکزی به صورت رتروگراد به سمت جسم سلولی نورون‌های حرکتی در شاخ قدامی نخاع شده و در نهایت دانسیته نورونی در گروه کمپرسیون در مقایسه با کنترل کاهش معناداری دارد(نمودار۱).این نتیجه هم راستا با مطالعه‌های پیشین سایر دانشمندان است(۱۸).

مطالعه‌های فیتوشیمی گیاه نشان داد که این گیاه دارای ترکیب‌های ارزشمندی مانند: آگریمونین، کاتچین، پروسیانیدین، کوئرستین، لوتئولین، کامفرول، یوگنول و فلاونوئیدهاست که در طب سنتی کاربرد فراوان دارد. این ترکیب‌ها سبب آثار ضد التهابی و آنتی اکسیدانتی گیاه غافث می‌شوند(۱۹). فلاونوئیدها طی فتوسنتز در گیاهان ساخته شده و گیاه را در مقابل گروه‌های اکسیژن فعال حفاظت می‌کنند. فلاونوئیدها در شش زیرگروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند: فلاونون‌ها، فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها، فلاوانون‌ها، فلاوانول و آنتوسیانیدین‌ها. از بین این گروه‌ها گیاه غافث دارای چندین نوع فلاونوئید است شامل: کوئرستین، کامفرول(۲۰). در زمان آسیب سیستم عصبی واکنش‌های اکسیداتیو فعال شده و سبب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند. این رادیکال‌ها واکنش‌های دژنراسیون را پیش برده و سبب نفوذ بیش از حد یون کلسیم به داخل سلول و آغاز روندهای مرگ سلولی می‌شوند. وجود فلاونوئیدها و مواد آنتی‌اکسیدانی سبب جلوگیری از پیشرفت ضایعه شده و روندهای ترمیمی را بهبود و سرعت می‌بخشند. همان‌طور که در نمودار ۲ مشخص است، تمام گروه‌های دریافت کننده، عصاره‌های مختلف دانسیته نورونی بیشتری نسبت به گروه کمپرسیون داشته‌اند که می‌تواند نشان‌دهنده روندهای ترمیمی در این گروه‌ها به دلیل حضور ترکیب‌های موثر در عصاره‌ها باشد. این نتایج هم راستا با نتایج پژوهشگران است که نشان دادند عصاره آبی گیاه غافث سبب کاهش پاسخ التهابی می‌شود(۲۱). همچنین Nimse و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثرعصاره Agromonia را بر تسریع بازسازی پوست با فعال شدن پتانسیل گیرنده وانیلیوئیدی اثبات کردند(۲۲) که خود گواه بر داشتن آثار ترمیمی این گیاه است که نتایج ما هم راستا با این تحقیق است.

مطالعه‌های انجام شده روی ترکیب‌های گیاه غافث مشخص کرده است که بعضی از این ترکیب‌ها همانند آگریمونین، کوئرستین، کاتچین، لوتئولین و کامفرول دارای خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی هستند.

همچنین نتایج حاصل از محققان قبل با استفاده از طیف سنجی (HPLC) کروماتوگرافی فاز مایع با فشار بالا نشان داده است که قسمت‌های هوایی گیاه غافث حاوی ۲/۸ فلاونوئید و - ۹/۱۰ mg/g ، ۶/۰ فنولیک اسید ۳/۶ - ۹/۱۰ تانن است. آگریمونین موجود در گیاه غافث گونه Agrimonia pilosa سبب القای تولید اینترلوکین ۱ سیتوکین تحریک‌کننده سیستم ایمنی می‌شود(۲۳).

در شرایط تخریب سیستم عصبی و ضایعه آن، سیستم ایمنی بدن در مقابل شرایط نامساعد ایجاد شده که سبب مرگ نورون‌ها می‌شوند شروع به دفاع و فعالیت می‌کنند. شاید آثار ترمیمی موجود در عصاره‌های گیاه غافث مربوط به خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی موجود در این ترکیب‌هاست.

همچنین فلاونوئیدهای کوئرستین، کاتچین و لوتئولین سبب افزایش ترشح اینترلوکین ۲ و سیتوکین تحریک‌کننده سیستم ایمنی در ماکروفاژها می‌شوند. علاوه بر آن تحقیق‌ها مشخص کرد که کامفرول موجود در عصاره متانولی گیاه سبب افزایش تولید لنفوسیت و همچنین افزایش تولید سیتوکین‌های تحریک‌کننده سیستم ایمنی مانند اینترلوکین ۲ می‌شود(۲۴).

Hampson و همکارانش در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که کانابینوئیدها آثار پروتکتیوی خود را در مقابل سمیّت گلوتامات از طریق مسیرهای وابسته به رسپتور انجام نمی‌دهند، بلکه آن‌ها به وسیله خصوصیات آنتی اکسیدانی آثار خود را القا می‌کنند. آثار آنتی‌اکسیدانی این ترکیب‌ها از طریق اسکوربات یا آلفا توکوفرول اعمال می‌شود که به کانابینوئیدها توان مقابله با سمیّت گلوتامات و آسیب‌های اکسیداتیو نورون مثل ایسکمی مغزی را می‌دهد(۲۵). بنابراین شاید آثار آنتی اکسیدانتی موجود در این گیاه نیز به دلیل وجود توکوفرول بوده و از مکانیسم بالا باعث آن آثار می‌شود.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد تزریق عصاره هیدروالکلی گیاه غافث و فراکسیون‌های اتیل استات و ان بوتانول و فاز آبی آن در دفعات دوبار در ۲۸ روز پس از کمپرسیون (روز اول و هشتم) سبب افزایش معناداری در دانسیته نورونی گروه‌ها شد. به طوری که بیشترین دانسیته در گروه ان بوتانول مشاهد شد. بنابراین عصاره‌های ذکر شده گیاه غافث شاید به دلیل داشتن آثار آنتی اکسیدانتی و ضدالتهابی و آنتی آپوپتوزی می‌توانند سبب ترمیم سیستم عصبی شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد بود. از همه همکاران گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مدیریت گروه سرکار خانم دکتر نخعی مقدم و ریاست محترم دانشکده علوم آقای دکتر جاوید برای همکاری‌های بی دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

1- Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. Neurological Research 2004; 26(2): 1-11.

2- Balabanov R, Popko B. Myelin repair: developmental myelination redux?. Nature Neuroscience 2005; 8(3): 262-64.

3- Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. Am J Orthop 2000; 29(3): 167-73.

4- Tehranipour M, Bahar ara J, Mostafaee M. The neuroprotective effect of CSF interaperitotoneal injection on alpha motor degeneration after sciatic nerve compression in rat.amuj. 2009; 12(3): 101-108.

5- Wood MD, Kemp SW, Weber C, Borschel GH, et al. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. Ann Anat 2011; 193: 321-333.

6- Granica S, Krupa K, Klebowska A and k. Kiss K. Development and validation of HPLC _DAD_CAD_MS method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in Agrimonia eupatoria herba. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013; 86: 112 - 22.

7- Feng XL, He YB, Liang YZ, Wang YL, Huang LF and Xie JW. Comparative Analysis of the volatile components of Agrimonia eupatoria from leaves and roots by gas chromatography-mass spectrometry and multivariate curve resolution. J. Analytical Methods in Chemistry 2013; 1-9

8- Copland A, Nahar N, Tomlinson CTM, Hamilton V, Middleton M, Kumarasamy Y and Sarker SD. Antibacterial and free radical scavenging activity of the seeds of Agrimonia eupatoria. J. Fitoterapia 2003; 74: 133 - 5.

9- Ivanova D, Tasinove O, Vancova D and Kiselova-Kaneva Y. Antioxidative potential of Agrimonia eupatoria L. J. Medicine 2011; 1: 20- 24.

10- Adhiah A, Al-Bederi ONH, AL-Sammarrae KW. Citotoxic

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-01-15]

effects of Agrimonia eupatoria L. against cancer cell lines in vitro. J Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences 2013; 14: 87 - 92.

11- Razavi M, Tehranipour m, khayatzade j.Effects of aqueous extract saliva chloroleuca leaves on degeneration alpha motoneurons in spinal cord after sciatic nerve compression in rat. 2013; 10(2): 22-30.

12- Tehranipour M, Attariyan F.The neuroprotective effect of stachys lavandulifolia Vahl leaves aqueous extract on the density of alpha neurons in anterior horn of spinal cord after sciatic nerve compression in rats. J shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(2): 119-126.

13- Alikhanzade M, Tehranipour M , Khayatzade J. The study of effect of aquatic extracts of Achillea biebersteinii leave on repair alpha motoneurons after sciatic nerve injury in rat. J Shahrekord. 2013; 15(4): 16-25.

14- Behnam rasouli M. Nikravesh M. Mahdavi shahri N. Tehranipour M. post operative time effect after sciatic nerve crush on the number of alpha motonrurons using asterio gical counting metod(dissector). Iran Biomed j. 2000; 4(1): 9-45.

15- Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). Int J Mol Med 2010; 7(5): 455-78.

16- Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA, Kim HA. Microanatomy of axon/glial signaling during Wallerian degeneration. J Neuroscience 2005; 25: 3478-87.

17- 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.

18- van der Stelt M, Di Marzo V. Cannabinoid reseptors and theire role in neuroprotection. Neuro Molecular Med 2005; 7(1-2): 37-50.

19- Sagredo O, Arencibia G, Lago E, Finetti S, Decio A. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorder. Mol Neurobiol 2007; 36(1): 82-91.

20- Chen J, Lee CT, Errico S, Deng X, Cadet JL, Freed WJ. Protective effects of Δ9-tetrahydrocannabinol against N-methyl-D-aspartate-induced AF5 cell death. Brain Res Mol Brain Res 2005; 134(2): 215-25.

21- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and(-)-D9- tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Nati Acad Sci USA 1998; 95(14): 8268-73.

22- Unno K, Takabayashi F, Yoshida H, Choba D, Fukutomi R, et al, delays catechin tea green of consumption Daily memory regression in aged mice.biologernotology,2007;8(2):89-95.

23- Nimse, S. B & Pal, D.(2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, RsC Advances, 5(35),27986-28006.

24- Mechoulam R, Shohami E. Endocannabinoids and traumatic brain injury. Mol Neurobiol 2007; 36(1): 68-74.

25- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and(-)-D9- tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Nati Acad Sci USA 1998; 95(14): 8268-73.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-01-15]