تحقیقی

اثر عصاره اتانولی *Achillea wilhelmsii* بر تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک موش‌های صحرایی

دکتر علی شهرکی*[1]، رسول دیانی فر[2]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

۲- کارشناس ارشد زیست شناسی- بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *قطع اعصاب محیطی یا له‌شدگی و کمپرسیون آنها در اثر تصادفات و حوادث مختلف باعث دژنراسیون والرین در بخش خلفی نورون‌ها می‌گردد و به‌صورت واکنش عقب گرد به جسم سلولی آنها نیز کشیده می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره اتانولی Achillea wilhelmsii بر تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک موش‌های صحرایی نر انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم انجام شد. حیوانات به‌طور تصادفی در ۵ گروه شش تایی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل کنترل، کمپرسیون، کمپرسیون + تزریق عصاره اتانولی گیاه با دوز ۵۰ mg/kg، کمپرسیون + تزریق عصاره اتانولی گیاه با دوز ۷۵ mg/kg و کمپرسیون + تزریق عصاره اتانولی گیاه با دوز ۱۰۰ mg/kg بودند. موش‌های صحرایی تحت بیهوشی قرار گرفتند و در سمت راست بدن پوست ناحیه ران و عضلات زیر آن برش زده شد تا عصب سیاتیک ظاهر شود. سپس به‌وسیله پنس خون بند عصب سیاتیک تحت کمپرسیون شدید قرار گرفت و سر انجام عضلات و پوست بخیه گردید. عصاره اتانولی گیاه به‌صورت داخل صفاقی به‌مدت سه هفته بعد از کمپرسیون و هفته‌ای یک تزریق تجویز شد. ۲۸ روز بعد از عمل جراحی بخش کمری طناب نخاعی با عمل پرفیوژن جدا گردید. نمونه‌های طناب نخاعی برای تهیه مقاطع بافتی به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل شد و با استفاده از رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین و عکسبرداری، تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها : *تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در گروه کمپرسیون (۳۸/۵۶±۷۰۷) نسبت به گروه شاهد (۴۹/۸۱±۱۷۴۰) کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). میانگین تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در گروه‌های مداخله دوز ۵۰ mg/kg ، دوز ۷۵ mg/kg و دوز ۱۰۰ mg/kg به ترتیب با مقادیر ۵۷/۵۸±۱۲۰۸ ، ۳۳/۹۱±۱۳۷۰ و ۶۴/۴۶±۱۴۳۷ در مقایسه با گروه کمپرسیون (۳۸/۵۶±۷۰۷) افزایش معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *تزریق عصاره اتانولی Achillea wilhelmsii به صورت وابسته به دوز باعث افزایش تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در مقایسه با کمپرسیون عصب سیاتیک می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *دژنراسیون والرین ، عصب سیاتیک ، نورون حرکتی ، Achillea wilhelmsii*

* نویسنده مسؤول : دکتر علی شهرکی ، پست الکترونیکی ashahraki@science.usb.ac.ir

نشانی : زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن ۳۱۱۳۶۳۳۸-۰۵۴ ، نمابر ۳۴۴۶۵۶۵

وصول مقاله : ۱۳۹۴/۱/۱۶ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۴/۳/۲۶ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۴/۴/۶

مقدمه

محیط داخلی نورون‌ها نیز مانند تمام سلول‌های بدن به‌وسیله همؤستاز الکترولیت‌ها به دقت تحت کنترل هستند. انتقال اکسونی رو به جلو به سمت پایانه عصبی و انتقال رو به عقب به سمت جسم سلولی نوروترانسمیترها و اجزای ساختمانی سلول را بین این دو بخش جابجا می‌کند. هرگونه نقص یا گسستگی در اکسون یا غشای لیپیدی آن باعث وقایع آبشاری غیرقابل برگشت مربوط به مرگ برنامه‌ریزی شده سلول عصبی می‌گردد. تنها زمانی چنین وقایعی رخ نمی‌دهد که این نقص و بریدگی به سرعت ترمیم یابد (۱). دژنراسیون موضعی نورون شبیه همان دژنراسیونی است که در دیگر بافت‌های آسیب‌دیده نظیر پوست و عضله اتفاق می‌افتد (۲). با این حال تفاوت عمده با دیگر بافت‌ها آن است که دژنراسیون والرین بخش خلفی آکسون به فواصل دورتر و به خود جسم سلولی کشیده می‌شود. نوتروفیل‌ها اولین لکوسیت‌های التهابی هستند که از گردش خون به ناحیه آسیب دیده عصب وارد می‌شوند و بقایای بافتی را فاگوسیت می‌کنند و سایر لکوسیت‌ها (عمدتاً منوسیت‌ها) را فعال

می‌کنند (۳). ماکروفاژها سلول‌های عمده دیگری هستند که به آسیب اعصاب محیطی پاسخ می‌دهند. ماکروفاژهای اندونورال حدود ۲۹ درصد سلول‌های هسته‌داری را تشکیل می‌دهند که در اندونورال عصب محیطی سالم وجود دارند. این ماکروفاژهای مقیم مولکول‌های MHC و گیرنده کمپلمان ۳ را بیان می‌کنند که در فعالیت ماکروفاژها نقش مهمی دارند. تکثیر، فعال‌سازی و عملکرد فاگوسیتی این ماکروفاژها در مراحل اولیه دژنراسیون والرین شروع می‌شود و بقایای بافت‌های آسیب‌دیده را فاگوسیت می‌کنند. در مراحل بعدی تعداد زیادی از منوسیت‌های گردش خون به ناحیه آسیب دیده وارد می‌شوند. منوسیت‌ها که در بافت‌ها به ماکروفاژها تمایز پیدا می‌کنند؛ برای فاگوسیته کردن موثر پوشش میلین آسیب‌دیده و تولید سیتوکین‌هایی که سلول‌های شوان را فعال می‌کنند؛ نظیر اینترلوکین – ۱ و عوامل رشد نظیر NGF به ترمیم اکسون آسیب‌دیده کمک می‌کنند (۴). آخرین سلول‌های ایمنی که به ناحیه آسیب دیده وارد می‌شوند؛ لنفوسیت‌های Tهستند که با تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی به پاسخ ایمنی در ناحیه آسیب‌دیده کمک می‌کنند (۵). بنابراین بعد از آسیب اعصاب محیطی، ابتدا سلول‌های شوان بقایای اکسون و میلین را پاکسازی می‌کنند تا لوله خالی اندونورال باقی بماند. آنگاه ماکروفاژهای اندونورال و ماکروفاژهای نفوذکننده از گردش خون نقش اساسی در پاکسازی بقایای آسیب‌دیده بافتی دارند. این ماکروفاژها سلول‌های شوان را تحریک کرده و باعث تکثیر فیبروبلاست‌ها می‌شوند. آنگاه سلول‌های شوان لوله‌های خالی اندونورال را به صورت ستون‌های طولی منظمی که تحت عنوان نوارهای بونگر خوانده می‌شوند؛ پر می‌کنند. این محیط حمایتی برای ترمیم موفق اکسون دارای اهمیت زیادی است (۱و۶). اعتقاد بر این است که پاسخ سریع و موثر ماکروفاژها در ترمیم اکسون محیطی آسیب‌دیده نقش زیادی دارد.

جنس آکیلیا (بومادران) شامل ۱۴۰ گیاه دارویی دایمی است که در نیم‌کره شمالی وجود دارد و به صورت تیپیک دارای برگ‌های پرزدار و معطر هستند. این گیاه دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی است. به‌عنوان مثال باعث آرامش عضلات صاف در دستگاه گوارش و در دیواره رحم می‌شود و به همین دلیل دردهای معده، دستگاه گوارش و دردهای قاعدگی را بهبودی می‌بخشد. استفاده از گونه‌های مختلف آکیلیا به‌خصوص *Achillea wilhelmsii*، اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی موثری نشان داده است (۹-۷). آکیلیا برای درمان سرماخوردگی و آنفلوآنزا موثر است. به‌دلیل شرکت در انعقاد خون برای درمان خون دماغ نیز موثر است. به‌عنوان ترکیبات کاهش‌دهنده پاسخ‌های ایمنی و ضدسرطان به‌کار رفته است و برای جلوگیری از کچلی نیز توصیه شده است (۱۰و۱۱). مطالعه قبلی ما روی اثرات محافظت کننده نورونی عصاره آبی *Achillea wilhelmsii* نتایج نویدبخش و رضایت‌بخشی به همراه داشت (۱۲). فلاونوئیدها یکی از مهم‌ترین گروه‌های موجود در گیاه هستند که اثرات فارماکولوژیکی نظیر اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی به‌عهده دارند (۱۳و۱۴). این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره اتانولی *Achillea wilhelmsii* بر تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک موش‌های صحرایی نر انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار دارای وزن تقریبی ۳۰۰- ۲۵۰ گرم و سن حدود ۳ ماهگی در دانشگاه سیستان و بلوچستان طی سال ۱۳۹۳ انجام گردید.

گیاه *Achillea wilhelmsii* در خرداد ماه ۱۳۹۱ از حاشیه زمین‌های کشاورزی و مراتع دامنه کوه تفتان در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری و در سایه خشک گردید. شناسایی دقیق گونه گیاه به‌وسیله متخصص گیاه‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی انجام شد. نمونه هرباریومی گیاه با کد ۱۲۳۵ در هرباریوم گروه زیست‌شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان نگهداری گردید. برای تهیه عصاره اتانولی گیاه مقدار ۲۰ گرم از ساقه، برگ و گل را آسیاب نموده و درون بشر با ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه ریختیم و به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با مگنت قرار داده شد. آنگاه محلول حاصل را با استفاده از کاغذ صافی، صاف نموده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک نمودیم و عصاره اتانولی به دست آمد (۱۵).

موش‌های صحرایی از بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان خریداری و به اتاق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه سیستان و بلوچستان منتقل گردید. حیوانات در شرایط یکسان و استاندارد از لحاظ نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) دما، تغذیه و رطوبت نگهداری شدند. برای سازگاری با محیط به مدت ۷ روز در شرایط مذکور نگهداری شدند. سپس به‌صورت تصادفی به ۵ گروه ۶تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه A : کنترل؛ گروه B : کمپرسیون؛ گروه C : کمپرسیون + تیمار با دوز ۵۰ mg/kg عصاره اتانولی گیاه؛ گروه D : کمپرسیون + تیمار با دوز ۷۵ mg/kg عصاره اتانولی گیاه و گروه E : کمپرسیون + تیمار با دوز ۱۰۰ mg/kgعصاره اتانولی گیاه (۱۶).

پروتکل بین‌المللی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. ابتدا موش‌ها را با استفاده از اتر و کتامین (۰/۱۶ میلی لیتر به ازای ۳۰۰ گرم وزن بدن) بیهوش نمودیم. سپس پوست ناحیه ران سمت راست حیوان تراشیده شد و پس از ضدعفونی با بتادین ۲ درصد، ابتدا پوست برش زده شد و پس از آن عضلات ناحیه

برش زده شد تا عصب سیاتیک نمایان گردید. سپس با استفاده از پنس قفل‌دار خون‌بند، عصب سیاتیک به مدت ۶۰ ثانیه تحت کمپرسیون شدید قرار گرفت. پس از کمپرسیون عصب سیاتیک، عضلات و پوست را بخیه نمودیم و با استفاده از بتادین موضع عمل به خوبی ضدعفونی گردید. بعد از عمل به گروه‌های آزمایشی C ، D و C E به ترتیب دوزهای ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره اتانولی گیاه *Achillea wilhelmsii* به صورت داخل صفاقی تزریق شد. تزریق داخل صفاقی عصاره الکلی سه مرتبه انجام شد. به‌طوری که اولین تزریق بلافاصله بعد از عمل جراحی و تزریق دوم در ابتدای هفته دوم بعد از عمل و تزریق سوم در ابتدای هفته سوم بعد از عمل انجام شد. در گروه‌های کنترل و کمپرسیون فقط تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژی انجام گردید.

پس از گذشت ۲۸ روز از کمپرسیون و تجویز عصاره الکلی گیاه، به منظور جداسازی طناب نخاعی، حیوانات گروه‌های مختلف مورد آزمایش تحت عمل پرفیوژن قرار گرفتند. آنگاه طناب نخاعی را تا انتهای ناحیه دم اسب از ستون مهره‌ها خارج نمودیم و ۱۸ میلی‌متر انتهایی آن جدا گردید. پس از این جداسازی، ۸ میلی‌متر انتهایی طناب نخاعی به‌عنوان نمونه‌برداری برداشته شد. با توجه به این که عصب سیاتیک از ۵ ریشه عصبی یعنی اعصاب L4 و L5 و اعصاب اول تا سوم خاجی منشعب می‌شود؛ نمونه استخراج شده از طناب نخاعی، جسم سلولی نورون‌های تشکیل‌دهنده عصب سیاتیک را دربرمی‌گرفت (۲۰-۱۷).

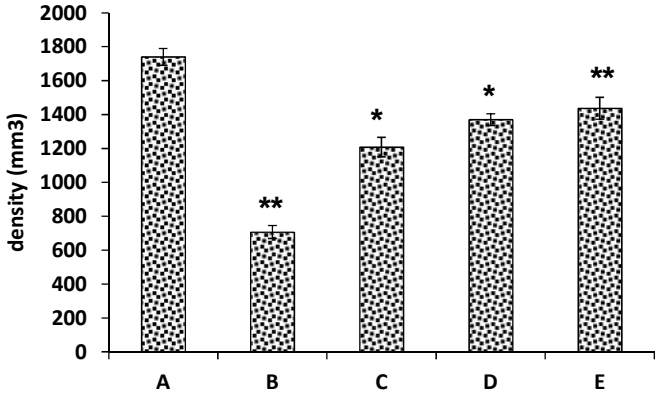
برای تهیه مقاطع میکروسکوپی ابتدا پاساژ بافتی شامل آبگیری با الکل ۷۰، ۸۰، ۹۰، الکل مطلق I و الکل مطلق II شفاف‌سازی با بوتانل ۱ و۲ و آغشتگی با پارافین ۱ و ۲ صورت گرفت. آنگاه از بافت نخاعی، قالب‌های پارافینی تهیه نموده و به‌وسیله دستگاه میکروتوم، برش‌های متوالی ۷ میکرونی تهیه شد. از هر کدام از نمونه‌های طناب نخاعی ۳۰ برش تهیه شد و با رنگ تولوئیدین آبی رنگ‌آمیزی شدند. در این رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های عصبی به رنگ بنفش و زمینه به رنگ نارنجی در می‌آید. سپس عکس‌برداری از نمونه‌ها انجام شد و مطالعه مورفومتریک تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع به روش دایسکتور انجام شد. تراکم نورون‌ها با فرمول مجموع نورون‌های شمارش شده تقسیم بر حجم چهارچوب نمونه‌برداری (میلی‌متر مکعب) در تعداد دفعات نمونه‌برداری شده ضرب و تعیین شد (۱۷و۱۸).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-19 و آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و Student T-test در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

میانگین و انحراف استاندارد تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در گروه‌های کنترل ۴۹/۸۱±۱۷۴۰، کمپرسیون ۳۸/۵۶±۷۰۷، کمپرسیون با عصاره اتانولی گیاه با دوز ۵۰ mg/kg میزان ۵۷/۵۸±۱۲۰۸، کمپرسیون با عصاره اتانولی گیاه با دوز ۷۵ mg/kg میزان ۳۳/۹۱±۱۳۷۰ و کمپرسیون با عصاره اتانولی گیاه با دوز ۱۰۰ mg/kg میزان ۶۴/۴۶±۱۴۳۷ تعیین شد (نمودار یک).

تراکم نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع بین گروه‌های کمپرسیون و کنترل اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱)؛ اما در گروه‌های درمان شده با عصاره اتانولی گیاه *Achillea wilhelmsii* نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع افزایش یافتند. به همین دلیل دانسیته نورونی در گروه‌های دریافت کننده عصاره اتانولی گیاه نسبت به گروه کمپرسیون افزایش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین اثر مربوط به دوز ۱۰۰ mg/kg بود (نمودار یک و شکل‌های ۴-۱).



نمودار ۱ : میانگین دانسیته موتور نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در گروه‌های مورد مطالعه

گروه A: کنترل؛ گروه B: کمپرسیون؛ گروه C: کمپرسیون + تیمار با دوز ۵۰ mg/kg عصاره اتانولی گیاه؛ گروه D: کمپرسیون + تیمار با دوز ۷۵ mg/kg عصاره اتانولی گیاه و گروه E: کمپرسیون + تیمار با دوز ۱۰۰ mg/kgعصاره اتانولی گیاه.

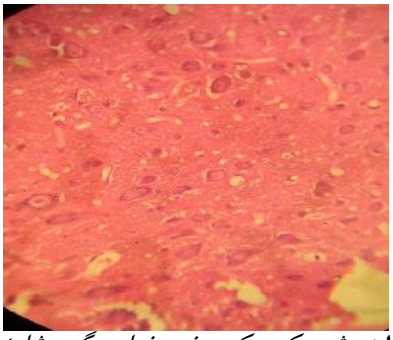
**** مقایسه گروه کمپرسیون با گروه‌های تیمار با دوز ۵۰ g/kg و ۷۵mg/kg عصاره الکلی گیاه (P<۰/۰۱).***

***** مقایسه گروه کنترل و کمپرسیون، مقایسه گروه کمپرسیون و تیمار با دوز ۱۰۰ mg/kg عصاره الکلی گیاه (P<۰/۰۰۱).***

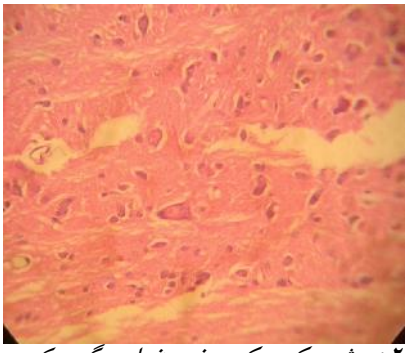
بحث

در این مطالعه دانسیته نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در گروه کمپرسیون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. تزریق عصاره الکلی گیاه *Achillea wilhelmsii* با دوزهای ۱۰۰و ۷۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌طور معنی‌داری دانسیته نورون‌های مذکور را نسبت به گروه کمپرسیون افزایش داد. بیشترین اثر محافظت نورونی در گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن مشاهده شد.

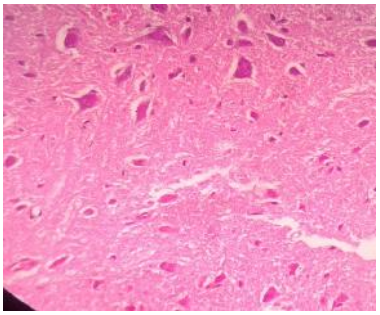
بعد از آسیب عصبی، اختلال در فعالیت میتوکندری‌ها باعث تولید گونه‌های واکنش‌زای اکسیژن و فعال شدن واکنش‌های متوالی



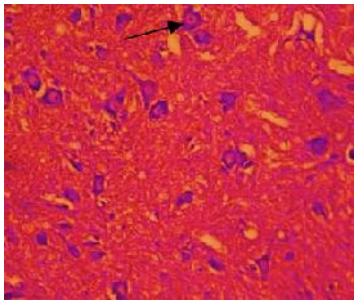
شکل ۱ : برش میکروسکوپی نورون‌ها در گروه شاهد
هسته نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در مرکز سلول قرار دارد.
بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر؛ رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدن و اریتروزین



شکل ۲ : برش میکروسکوپی نورون‌ها در گروه کمپرسیون
نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع به حالت چندوجهی تغییر یافته و هسته حالت کناری دارد. تراکم نورون‌ها به میزان زیادی کاهش یافته است. بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر؛ رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدن و اریتروزین



شکل ۳ : برش میکروسکوپی نورون‌ها در گروه تیمار با عصاره الکلی گیاه با دوز ۵۰ mg/kg
هسته نورون‌ها مجدداً در حال ظاهر شدن است.
بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر؛ رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدن و اریتروزین



شکل ٤ : برش میکروسکوپی نورون‌ها در گروه تیمار با عصاره الکلی با دوز ۱۰۰ mg/kg
شکل سلول به حالت کروی برگشته؛ ولی هسته هنوز حالت کناری دارد. تراکم نورون‌ها مشابه گروه کنترل است.
بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر؛ رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدن و اریتروزین

اپوپتوتیک می‌گردد که باعث دژنراسیون سلول‌های عصبی می‌گردد (۲۱). ترکیباتی که بتواند با استرس اکسیداتیو مقابله کند یا محافظت میتوکندریایی را در برابر گونه‌های واکنش‌زای اکسیژن شامل سوپراکسید و پراکسید هیدروژن بالا ببرد؛ دارای اثر محافظت کننده نورونی خواهد بود. گیاه *Achillea wilhelmsii* غنی از ترکیبات فلاونوئیدی است (۲۲) که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و اثر آنها به‌عنوان جارو کننده رادیکال‌های آزاد گزارش شده است. از طرفی آکیلیا حاوی ترکیبات ضدالتهابی مهمی نظیر کامفور، برونئول و ۱،۸ سینئول است که از طریق کاهش فعالیت و کاهش بیان آنزیم‌های سیکلو اکسیژناز-۲ ، هم اکسیژناز-۱ و نیتریک اکسید سنتاز اثرات ضدالتهابی خود را اعمال می‌کنند (۲۳).

مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت‌کننده نورونی ترکیبات آکیلیا به خوبی مشخص نشده است و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. با این حال مکانیسم اثر بعضی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان مثل ان –استیل – سیستئین (NAC) تا حدودی شناسایی شده است که احتمالا ترکیبات آکیلیا هم از طریق مکانیسم‌های مشابهی اثر محافظت نورونی خود را اعمال می‌کنند. NAC دارای اثرات مختلفی نظیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، افزایش مقادیر گلوتاتیون داخل سلولی و تحریک نسخه‌برداری است (۲۴).

برای سال‌های زیادی NAC به‌عنوان یک ترکیب لیز کننده موکوس برای درمان احتقان و انسداد بیماری‌های ریوی استفاده شده است و به‌عنوان داروی انتخابی در مسمومیت با پاراستامول است. در سال‌های ۲۰۰۴ به بعد نشان داده شد که NAC می‌تواند نورون‌های حسی و حرکتی را از دژنراسیون عقب‌گرد نجات دهد (۲۵). مکانیسم اثر آن به مقدار زیادی شناخته نشده است. این ترکیب القا کننده مستقیم و جارو کننده رادیکال‌های آزاد است که با گونه‌های واکنش‌زای اکسیژن واکنش می‌دهد و در مدل‌های عصبی متعددی در محیط آزمایشگاه دارای اثر محافظت کننده نورونی بوده است (۲۶). همچنین بیوسنتز گلوتاتیون در نورون‌ها را افزایش می‌دهد که خود آن جارو کننده اصلی رایکال‌های آزاد در سلول‌های عصبی است. گلوتاتیون می‌تواند دارای اثر محافظت کننده نورونی باشد. به‌هرحال این ترکیب نمی‌تواند از سد مغزی خونی عبور کند و ترکیب پیش‌ساز اصلی آن یعنی سیستئین در CSF ناپایدار است (۲۷). برخلاف آن ترکیب ان- استیل- سیستئین می‌تواند از سد مغزی خونی عبور کند؛ در مغز تجمع یابد و مقادیر داخل سلولی گلوتاتیون را افزایش دهد. تخلیه گلوتاتیون داخل سلولی و به‌خصوص گلوتاتیون میتوکندریایی باعث مرگ سلولی در آزمایشات in-vitro می‌شود. افزایش مقادیر گلوتاتیون به‌وسیله

NAC مانع آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری می‌شود و در نتیجه از واکنش‌های متوالی اپوپتیک جلوگیری می‌کند (۲۸). با این حال مشخص شده اثر نوروپروتکتیو NAC از طریق مسیر Ras-ERK فعال شده با عامل نوروتروفیک و مسیر فعال شده JNK به‌وسیله استرس می‌شود (۲۹). NAC می‌تواند به صورت سینرژی با سیتوکین cNTF عمل کند تا از کشتن الیگودندروسیت‌ها با TNF-α جلوگیری کند. گروه‌های تحقیقاتی مختلفی گزارش کرده‌اند NAC نه تنها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند؛ بلکه باعث فعال‌ساختن سریع مسیر Ras – ERK می‌شود (۳۰).

NAC می‌تواند فعال‌سازی P38 کیناز، شکست و تجزیه کاسپاز-۹ و کاسپاز-۳ را کاهش دهد و اپوپتوز را در محیط آزمایشگاه مهار کند. فعال شدن مسیر ERK و کاهش تجزیه کاسپاز با NAC شبیه اثرات عوامل نوروتروفیک مختلف روی موتورنورون‌های طناب نخاعی در محیط آزمایشگاه و بعد از آسیب عصبی در in-vivo است. این مشاهدات نشان می‌دهد NAC می‌تواند به اثرات عوامل نوروتروفیک اضافه شود تا بقای نورونی را از طریق مسیر سیگنالینگ Ras-ERK حفظ کند (۲۹).

ترکیبات مهم دیگری که در این گیاه گزارش شده شامل کارواکرول، لوتئولین، اپیگنین است. مطالعه نیازمند و همکاران (۳۱) نشان داد *Achillea wilhelmsii* باعث آرامش عضلات صاف عروق خونی و اتساع آنها می‌گردد. مکانیسم ایجاد این آرامش مربوط به اندوتلیوم عروق نیست؛ بلکه در اثر مهار کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ و کانال‌های کلسیمی فعال شده به‌واسطه گیرنده در عضلات صاف عروق خونی است. لوتئولین اثر خود را با مهار کانال‌های کلسیمی سارکولما و مهار ورود کلسیم از ذخایر کلسیمی داخل سلولی و فعال شدن کانال‌های پتاسیمی اعمال می‌کند. به‌خوبی مشخص شده cGMP از طریق سیگنال‌های پروتئین کیناز وابسته به cGMP باعث آرامش عروق خونی می‌شود. در واقع فعال شدن گوانیلات سیکلاز محلول در سیتوپلاسم سلول‌های اندوتلیال باعث افزایش مقادیر داخل سلولی cGMP می‌شود که به نوبه خود پروتئین کیناز وابسته به cGMP را فعال می‌کند. در مورد اثر *Achillea wilhelmsii* بر آرامش عروق خونی مطالعه نیازمند و همکاران (۳۱) نشان داد که این اثر به واسطه مسیر cGMP نیست و به صورت مستقل از اندوتلیوم عروق خونی است. بنابراین یکی از مکانیسم‌های دیگر اثر این گیاه در زمینه محافظت نورونی ممکن است اتساع عروق خونی در بخش‌های مختلف بدن موش صحرایی، به‌خصوص ناحیه کمپرسیون باشد که باعث افزایش خونرسانی و افزایش مواد مغذی به این ناحیه می‌گردد و ترمیم ناحیه آسیب‌دیده را تسریع می‌کند (۳۱و۳۲). مطالعه حاضر با مطالعه علی‌خانزاده و همکاران (۱۸) هم‌خوانی داشت. ایشان از عصاره آبی گونه *Achillea biebersteinii* استفاده کردند. مقایسه نتایج دو مطالعه نشان می‌دهد که در مطالعه حاضر محافظت نورونی بیشتری اتفاق افتاده است. به‌طوری که دانسیته نورونی در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مطالعه علی خانزاده و همکاران ۱۰۵۲ بود (۱۸). در حالی که در دوز مذکور در مطالعه حاضر ۱۲۰۸تعیین شد. در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مطالعه علی خانزاده و همکاران (۱۸) ۱۱۵۳ بود و در مطالعه حاضر ۱۴۳۷ تعیین شد. نتایج محافظتی بهتر مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل استفاده از عصاره الکلی بوده است که توانسته است ترکیبات فنلی و محتوی فلاونوئیدی بیشتری را وارد عصاره نماید و یا این که ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گونه *Achillea wilhelmsii* بیشتر است (۱۳و۱۴).

پیشنهاد می‌گردد به همراه بررسی‌های پاتولوژیکی نورون‌های حرکتی عصب سیاتیک، آزمون‌های رفتاری هم مورد مطالعه قرار گیرند. به‌دلیل ترکیبات مختلف گیاه در شرایط اقلیمی مختلف آنالیز فیتوشیمیایی عصاره الکلی گیاه مورد مطالعه نیز صورت گیرد تا ترکیبات موثر و درصد آنها به خوبی مشخص گردد. با توجه به این که ترمیم نورون‌های دستگاه عصبی مرکزی بسیار مشکل است؛ همچنین اثر عصاره اتانولی گیاه روی تخریب نورون‌ها دستگاه عصبی مرکزی مثل هیپوکامپ و عقده‌های قاعده‌ای توصیه می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی گیاه *Achillea wilhelmsii* می‌تواند به‌عنوان ترکیب محافظت کننده نورونی برای نجات نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع بعد از آسیب عصبی محیطی مورد استفاده قرار گیرد و دوز ۱۰۰ mg/kg آن دارای بیشترین اثر است. به‌نظر می‌رسد ترکیبات فلاونوئیدی که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و ترکیبات ضدالتهابی گیاه نظیر کامفور، برونئول و ۱،۸ سینئول و ترکیبات موجود در گیاه که در اتساع عروق خونی نقش دارند؛ در این زمینه موثر باشند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه آقای رسول دیانی‌فر برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی - بیوشیمی از دانشکده علوم دانشگاه سیستان و بلوچستان بود. بدین‌وسیله از خانم دکتر فاطمه حیدری و کارکنان آزمایشگاه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان به خاطر همکاری صمیمانه در اجرای این مطالعه قدردانی می‌گردد.

References

1. Grinsell D, and Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. BioMed Research International. 2014; 2014: Article ID 698256. http://dx.doi.org/10.1155/2014/698256

2. Schwartz LM. Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle. Cell Death Differ. 2008 Jul; 15(7):1163-9. doi: 10.1038/cdd.2008.68

3. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol. 2006 Mar; 6(3):173-82.

4. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. J Neuroinflammation. 2011; 8:110. doi: 10.1186/1742-2094-8-110

5. Moalem G, Xu K, Yu L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. Neuroscience. 2004; 129(3): 767-77.

6. Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. J Bone Joint Surg Am. 2013 Dec; 95(23):2144-51. doi: 10.2106/JBJS.L.00704

7. Saeidnia S, Gohari A, Mokhber-Dezfuli N, Kiuchi F. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus Achillea. DARU. 2011; 19(3):173-86.

8. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, Akpulat HA. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). J Ethnopharmacol. 2003 Aug; 87(2-3):215-20.

9. Shahraki A, Ravandeh M. Comparative survey on the essential oil composition and antioxidant activity of aqueous extracts from flower and stem of Achillea wilhelmsii from Taftan (Southeast of Iran). Health Scope. 2013; 1(4): 173-78. doi: 10.17795/jhealthscope-8873

10. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Zupkó I, Réthy B, Falkay G, Forgo P, Hohmann J. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from Achillea millefolium s.l. on cultured human tumour cell lines. Phytother Res. 2009 May; 23(5):672-6. doi: 10.1002/ptr.2697

11. Lakshmi T, Geetha RV, Roy A and Kumar A. Yarrow (Achillea millefolium linn.) a herbal medicinal plant with broad therapeutic use- a review. Inter J Pharmace Sci Rev Res. 2011; 9(2): 136-41.

12. Shahraki A, Ghasemi M, Rezazehi A, Mollashahi M. [Neuroprotective effects of aqueous extract of Achillea willhelmsii on motor neuron destruction of spinal cord ventral horn after siatic nerve compression in male adult rats]. J Kerman Uni Med Sci. 2015; 22(1): 1-11. [Article in Persian]

13. Keser S, Celik S, Turkoglu S, Yilmaz O, Turkoglu I. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of water and ethanol extracts from Achillea millefolium L. Turk J Pharm Sci. 2013; 10(3): 385-91.

14. Mplani AL, Farj AM, Saleh Mahdy A. Antioxidant activity and phenolic content of some medicinal plants traditionally used in Northern Iraq. Phytopharmacol. 2012; 2(2): 224-33.

15. Nagappan R. Evaluation of aqueous and ethanol extract of bioactive medicinal plant, Cassia didymobotrya (Fresenius) Irwin & Barneby against immature stages of filarial vector, Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae). Asian Pac J Trop Biomed. 2012 Sep; 2(9):707-11. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60214-7

16. Niazmand S, Esparham M, Rezaee SA, Harandizadeh F. Hypotensive effect of Achillea wilhelmsii aqueous-ethanolic extract in rabbit. Avicenna J Phytomed. 2011; 1(1): 51-56.

17. Behnam-Rasouli M, Nikravesh MR, Mahdavi-Shahri N, Tehranipour M. Post-operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alpha motoneurons, using a stereological counting method (dissector). Iran Biomed J. 2000; 4(1): 45-49.

18. Alikhanzade M, Tehranipour M, Khayatzade J. [The study of eefect of aquatic extracts of Achillea biebersteinii leave on repair alpha motoneurons after sciatic nerve injury in rat]. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013; 15(4): 16-25. [Article in Persian]

19. Tehranipour M, Mollashahi M, Javadmoosavi BZ. [Effect of ethanolic extract of pod Prosopis farcta plant on neuronal density of anterior horn following sciatic nerve compression in Rats]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 14(4):39-43. [Article in Persian]

20. Jalali M, Tehranipour M, Mahdavi Shahri N. [Effect of alcoholic extract of Nigella sativa seed on alpha motor neurons density of spinal cord following sciatic nerve compression in rats]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 15(4): 29-34. [Article in Persian]

21. Merenda A, Bullock R. Clinical treatments for mitochondrial dysfunctions after brain injury. Curr Opin Crit Care. 2006 Apr; 12(2):90-6.

22. Fathi H, Lashtoo Aghaee B, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity and phenolic contents of Achillea willhelmsii. Phamacologyonline. 2011; 2: 942-49.

23. Chou ST, Peng HY, Hsu JC, Lin CC, Shih Y. Achillea millefolium L. essential oil inhibits LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production in RAW 264.7 Macrophages. Int J Mol Sci. 2013 Jun; 14(7):12978-93. doi: 10.3390/ijms140712978

24. Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. Cerebellum. 2007; 6(4):308-14. doi: 10.1080/14734220601142878

25. Hart AM, Terenghi G, Kellerth JO, Wiberg M. Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. Neuroscience. 2004; 125(1):91-101.

26. Ferrari G, Yan CY, Greene LA. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. J Neurosci. 1995 Apr; 15(4):2857-66.

27. Wang XF, Cynader MS. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. J Neurochem. 2000 Apr; 74(4):1434-42.

28. Kirkland RA, Franklin JL. Evidence for redox regulation of cytochrome C release during programmed neuronal death: antioxidant effects of protein synthesis and caspase inhibition. J Neurosci. 2001 Mar; 21(6):1949-63.

29. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. Mol Neurobiol. 2003 Jun; 27(3):277-324.

30. Kuperstein F, Yavin E. ERK activation and nuclear translocation in amyloid-beta peptide- and iron-stressed neuronal cell cultures. Eur J Neurosci. 2002 Jul; 16(1):44-54.

31. Niazmand S, Harandizadeh F, Mahmoudabady M, Hosseini M, Hasanzadeh M, Feredouni E. Mechanism of vasorelaxation induced by Achillea willhelmsii in rat islated thoracic aorta. Advan Biomed Res. 2014; 3: 91-98. doi: 10.4103/2277-9175.128470

32. Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MD, Lima FC, Lahlou S, Magalhães PJ, et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. Fundam Clin Pharmacol. 2010 Jun; 24(3):341-50. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00768.x

Original Paper

Effect of alchohlic extract of *Achillea wilhelmsii* on density of motor neurons of spinal cord after sciatic nerve compression in male rats

Shahraki A (Ph.D)*[1], Dianifar R (M.Sc)[2]

[1]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.
[2]M.Sc in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Transaction or laceration and compression of peripheral nerves in accidents and different circumstances resulting Wallerian degeneration which go back to perikaryon through retrograde reaction. This study was done to determine the effect of alchohlic extract of *Achillea wilhelmsii* on density of motor neurons of spinal cord after sciatic nerve compression in male Wistar rats.

Methods: In this experimental study, 30 male wistar rats were randomly allocated into 5 groups: group A: control, group B: compression, group C: compression and treatment with 50 mg/kg/bw of ethanolic extract, group D: compression and treatment with 75 mg/kg/bw of ethanolic extract and group E: compression and treatment with 100 mg/kg/bw of ethanolic extract of *Achillea wilhelmsii*. After anesthetizing rats, skin and sub cutaneous muscles of right thigh were cut to sciatic nerve appears. Then, compression of sciatic nerve was done by a surgical forceps for 60 seconds, followed by suturing muscle and skin. Extract injection was done intraperitoneally for three weeks after compression. Group A and B were received normal saline. 28 days after compression, samples were prepared from lumbar spinal cord under perfusion method and histological sections were provided serially. After staining, density of motor neurons was calculated by dissector method.

Results: Neuronal density in the compression group (707±38.56) significantly reduced in compare to control group (1740±49.81), ($P<0.05$). Neuronal density in group C (1208±57.58), group D (1370±33.91), and group E (1437±64.46) significantly increased in compare to compression group ($P<0.05$), respectively.

Conclusion: Ethanolic extract of *Achillea wilhelmsii* increased neuronal density of rat's spinal cord after compression of sciatic nerve.

Keywords: Wallerian degeneration, Sciatic nerve, Motor neuron, *Achillea wilhelmsii*

*** Corresponding Author: Shahraki A (Ph.D), E-mail: ashahraki@science.usb.ac.ir**

Received 5 Apr 2015 **Revised** 16 Jun 2016 **Accepted** 27 Jun 2016

Cite this article as: Shahraki A, Dianifar R. [Effect of alchohlic extract of *Achillea wilhelmsii* on density of motor neurons of spinal cord after sciatic nerve compression in male rats]. J Gorgan Uni Med Sci. Autumn 2016; 18(3): 21-27. [Article in Persian]