

بررسی اثر حفاظت نورونی عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع *Mentha pulegium* بر دژنراسیون نورون های حرکتی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت های نر نژاد ویستار

نگار مرتضی نیا M.Sc، مریم طهرانی پور Ph.D.*، جواد بهار آرا Ph.D.

- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۳

چکیده

هدف: این پژوهش به منظور بررسی اثرات محافظت نورونی عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع بر دژنراسیون نورون های حرکتی آلفای شاخ قدامی نخاع، پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل، کمپرسیون و گروه های تیمار با دوز های ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میلی گرم عصاره هیدروالکلی نعناع تقسیم شدند. به منظور ایجاد کمپرسیون، عصب سیاتیک با استفاده از قیچی قفل دار به مدت ۶۰ ثانیه در معرض کمپرسیون قرار گرفت. عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع به صورت تزریق درون صفاقی طی هفته های اول و دوم پس از کمپرسیون صورت گرفت، پس از ۲۸ روز از زمان کمپرسیون رت ها تحت متد پرفیوژن از نخاع کمری ناحیه L₄ تحت نمونه برداری قرار گرفتند و پس از نمونه برداری نخاع ناحیه کمری، دانسیته نورون ها با روش دایسکتور و متد استریولوژی محاسبه و نتایج گروه ها با هم مقایسه شدند.

نتایج: دانسیته نورونی در گروه کمپرسیون نسبت به کنترل کاهش معنی دار و در گروه های تیمار نسبت به کمپرسیون افزایش معنی دار نشان داد ($p < 0.001$). بیشترین افزایش دانسیته نورونی مربوط به دوز ۱۰۰ میلی گرم بود.

نتیجه گیری: نتایج بیان گر آن است که عصاره گیاه نعناع دارای اثرات حفاظت نورونی است که می تواند ناشی از خواص آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی در عصاره این گیاه باشد.

واژگان کلیدی: دژنراسیون، *Mentha pulegium*، محافظت نورونی

مقدمه

نورون‌ها تحت تاثیر عوامل فیزیکی، شیمیایی و پاتولوژیک دچار صدمه می‌شوند و تخریب (degeneration) آن‌ها یک صدمه دائمی محسوب می‌شود (۱). هر نورون یک واحد عملکردی و ساختمانی است و سلول‌هایی هستند که برای ارسال و دریافت علائم تخصص یافته‌اند. قسمتی از سلول که حاوی هسته می‌باشد، جسم سلول نامیده می‌شود و سیتوپلاسم این قسمت پریکاریون نام دارد (۲). هنگامی که یک عصب قطع می‌شود، ارتباط آکسون با جسم سلولی قطع شده و قطعه دیستال آن از محل ضایعه تا انتها شروع به دژنراسیون هم‌زمان می‌کند. به علاوه دژنراسیون تا اولین گره رانویه به سمت پروگزیمال نیز ادامه می‌یابد که این فرایند را دژنراسیون والرین می‌گویند (۳). چنانچه میزان تخریب بخش پروگزیمال شدید باشد اثرات ضایعه رو به عقب به سوی جسم سلولی توسعه یافته و سبب دژنراسیون مرکزی (تخریب جسم سلولی) می‌شود، اجسام نیسل شکسته شده و در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده می‌شود که این فرآیند را کروماتولیز گویند. همچنین هسته از موقعیت مرکزی خود به سمت محیط سلول تغییر مکان می‌دهد و جسم سلولی به دلیل تغییرات اسمزی متورم می‌شود (۴). اگرچه نورون‌ها عموماً پس از تولد فاقد قدرت تکثیر می‌باشند. اما می‌توانند در مقابل درجات معینی از ضایعات مقاومت کرده و بهبود یابند. اگر یک فیبر عصبی قطع شود هم در اعصاب محیطی و هم در اعصاب مرکزی تغییراتی ایجاد می‌شود که در صورت شدید بودن این تغییرات منجر به مرگ سلولی می‌شود (۵). استفاده از ماده ای که در این مرحله بتواند شدت ضایعات را کاهش دهد و یا به روندهای التیامی شدت ببخشد، می‌تواند راه‌گشای بسیاری از مشکلات عصبی باشد. در این زمینه بهره جویی از عصاره‌های گیاهی به‌علت طبیعی بودن و نداشتن اثرات جانبی بر عملکرد سایر دستگاه‌های بدن مورد توجه اکثر محققان می‌باشد. یکی از گیاهانی که در روند ترمیم سیستم عصبی نقش دارد، گیاه نعناع است. نعناع با نام علمی *pulegium Mentha* از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) گیاهی علفی چند ساله با فرم خوابیده و یا خیزان، با ساقه‌های متعدد، از قاعده منشعب، پوشیده از کرک‌های متراکم گسترده، برگ‌ها با دم‌برگ‌های کوتاه می‌باشد (۶). گیاه نعناع دارای خاصیت آنتی

اکسیدانسی و ضدالتهابی است که منتول موجود در گیاه نعناع به‌طور اختصاصی تولید ۳ مدیاتور اصلی التهاب توسط مونوسیت‌ها را مهار می‌کند (۷). وجود منتول دارای اثر ضد التهابی بوده، که این ترکیب اثر خود را از طریق بلوکه کردن تولید پیش التهاب‌های بیوشیمیایی مثل کولترین و پروستاگلاندین اعمال کرده و نیز آزاد سازی هیستامین و دیگر میانجی‌های آلرژیک را مهار می‌کند. همچنین منتول موجود در عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع خاصیت آنتی اکسیدانسی اثبات شده‌ای دارد نشان داده شد با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانسی ترکیب GSH و آنزیم GSH-Px و GR در گروه‌های حاوی منتول باعث کاهش میزان سیتوکین‌های التهابی مانند فاکتورهای نکروز کننده توموری آلفا (TNF- α), اینترلوکین یک بتا (L-1 β) و اینترلوکین ۶ (L-6 β) جلوگیری می‌نماید (۸). گیاه نعناع به‌علت دارا بودن فلاونول‌های بالا و ساختار فیتوشیمیایی آن فعالیت ضد میکروبی دارد که در درمان بیماری‌های انسان و پرورده‌های التهابی کاربرد دارد (۹). نعناع حاوی غلظت بالایی از آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌باشد که این گیاه حاوی بالاترین ترکیبات فنولیک و فلاونوئید است که فلاونوئیدها از طریق چلاته کردن یون‌های فلزی فعالیت آنتی‌اکسیدانسی خود را اعمال می‌کنند. با توجه به اثرات ضد التهابی و آنتی‌آپوپتوزی عصاره این گیاه احتمال می‌رود که بتوان از آن جهت کاهش شدت ضایعات عصبی و یا بهبود روند ترمیم استفاده نمود (۱۰). بر این اساس این تحقیق با هدف بررسی اثر حفاظت نورونی عصاره هیدروالکلی نعناع بر دانسیته نورون‌های آلفای شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی نر انجام شده است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور رعایت اصول اخلاقی، کار بر روی حیوانات بر اساس پروتوکل هلسینکی و دستور کار انجمن علوم اعصاب آمریکا انجام شد (۱۱). گیاه نعناع به‌طور دستچین از استان خراسان رضوی و توابع شهرستان نیشابور جمع‌آوری شد. این گیاه توسط مرکز هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه آزاد مشهد با کد ۹۸۲۸ مورد تایید قرار گرفت. بعد از شستن با آب معمولی، اجزای گیاه در سایه خشک شدند. سپس به‌صورت پودر جمع‌آوری شدند. ۵۰ گرم از پودر خشک

از انجام عمل کمپرسیون انجام شد و دومین مرحله تزریق درون صفاقی عصاره در گروه‌های تیمار ۷ روز پس از اولین تزریق صورت گرفت. ۲۸ روز پس از کمپرسیون از قطعات نخاعی مربوط به عصب سیاتیک (L4-L6) نمونه برداری انجام شد (۱۳). از آنجا که بافت عصبی بافتی حساس است و سریعاً دچار فرآیندهای اتولیز می‌شود و علاوه بر این تثبیت کننده به علت وجود پرده‌های سخت اطراف نخاع نیز به خوبی در آن نفوذ نمی‌کند. برای تثبیت از روش پرفیوژن استفاده شد. در این روش در حیوان بی‌هوش، تثبیت کننده (فرمالین ۱۰ درصد نمکی) در بسترهای عروقی جریان می‌یابد (۱۴). پس از اتمام پرفیوژن، نمونه برداری از نخاع انجام شد. ابتدا با قیچی ناحیه قفسه سینه باز شده تمام محتویات قفسه سینه و شکم خارج می‌شود سپس در ناحیه مهره‌های قفسه سینه با اسکارپل ستون مهره‌ها به‌طور عرضی برش خورده و به آرامی با قیچی نوک باریک سطح شکمی مهره‌ها تا انتهای ستون مهره‌ها برش خورده و برداشته شده و نخاع به‌صورت کامل خارج می‌شود. برای یکسان بودن نمونه برداری در همه نمونه‌ها، نخاع به‌طور کامل تا انتهای دم اسب جدا شد و از انتهای دم اسب به اندازه ۱۸ میلی‌متر بالا رفته و نمونه‌هایی به طول ۸ میلی‌متر تهیه شد. نمونه‌های تهیه شده به مدت ۲ هفته درون فیکساتور قرار گرفته و پس از آن وارد مرحله پاساژ بافتی شدند. نمونه‌ها پس از طی مراحل پاساژ وارد مرحله برش‌گیری شده، برش‌گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم انجام شد. برش‌گیری به‌صورت سریالی صورت گرفت به این صورت که از هر ۳۰ برش ۳ برش متوالی بر روی لام قرار گرفت و در نهایت از هر نمونه ۳۰ لام تهیه شد. و برش‌های سریال ۷ میکرونی تهیه شده با آبی تولوئیدین و اتوزین رنگ آمیزی شدند (۱۴). با استفاده از دستگاه فتومیکروسکپ از منطقه شاخ قدامی نخاع در سمت راست در لام‌های تهیه شده، از ۲ برش متوالی عکس‌هایی تهیه شد برای شمارش نورون‌های حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع در سمت راست، از روش دایسکتور استفاده شد. در این روش در یک چهار چوب مرجع نورون‌ها شمارش می‌شوند. اگر ذره‌ای در چهار چوب مرجع باشد ولی در چهار چوب بعدی (در برش متوالی بعدی) نباشد، در شمارش به حساب

گیاه نعناع داخل کاغذ مخصوص کارتوش ریخته و در دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد در محفظه مخصوص دستگاه ریخته شد. همچنان که کیسه حرارتی دستگاه، آرام آرام گرم می‌شود حلال (آب و الکل) نیز گرم شده و عصاره گیاه نعناع با حلال مخلوط گشته و به بالن بر می‌گردد. بدین ترتیب از حجم کل محلول کاسته نمی‌شود. عصاره‌گیری در ۱۰ ساعت صورت گرفت تا اطمینان حاصل شود که تمام عصاره قابل حل در حلال از پودر استخراج شده است (۱۲). در نهایت ۶/۳۴ گرم عصاره خشک به‌دست آمد بازده روش ۱۲/۶۸ درصد بود. موش‌های صحرایی نر از بخش حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد خریداری شدند. تا زمان انجام آزمایش حیوانات در شرایط نوری استاندارد روزانه و درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد نگهداری شدند. آب مورد نیاز حیوانات از آب آشامیدنی شهر و غذای آن‌ها نیز دارای فرمول استاندارد و از شرکت جوانه خراسان تهیه شد. در این تحقیق ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم به شش گروه ۵ تایی کنترل، کمپرسیون، کمپرسیون + تیمار با دوز ۵۰ میلی گرم (A)، کمپرسیون + تیمار با دوز ۷۵ میلی گرم (B)، کمپرسیون + تیمار با دوز ۱۰۰ میلی گرم (C) تقسیم شدند. به‌صورت تجربی در مطالعات قبلی اثبات شده است که این دوزهای تواند موثر باشد (۱۳).

عصاره در ۲ نوبت در روزهای اول هم‌زمان با کمپرسیون و در روز هفتم به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. رت‌های هر گروه با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی زایلازین ۶ میلی‌گرم و کتامین ۶۰ میلی‌گرم به نسبت وزن بدن بی‌هوش شدند، سپس عصب سیاتیک پای راست در ناحیه سر استخوان ران توسط پنس قفل‌دار (قفل دوم برای ۶۰ ثانیه) تحت کمپرسیون قرار گرفت (۱۳). پس از کمپرسیون محل ضایعه ضد عفونی و توسط گیره فلزی بخیه زده شد. بعد از این که موش‌ها هوشیاری اولیه خود را به‌دست آوردند به قفس‌های جداگانه منتقل و در شرایط استاندارد اتاق حیوانات از نظر نور، دما و رطوبت نگهداری شدند. در گروه‌های تیمار اولین تزریق عصاره بلافاصله بعد

H: فاصله بین دو برش یا ضخامت هر برش می‌آید، اما اگر نورونی در هر دو چهار چوب باشد، در شمارش محسوب نمی‌شود (۱۵).

نتایج

شمارش نورون‌های حرکتی آلفا و دانسیته نورونی در شاخ قدامی نخاع در گروه‌های مختلف نشان داد که پدیده کمپرسیون باعث کاهش معنی‌دار دانسیته نورونی در نورون‌های شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون نسبت به گروه کنترل شده ($p < 0.001$) و در گروه‌های تیمار در مقایسه با کمپرسیون دانسیته نورونی افزایش یافته است ($p < 0.001$). بیشترین اثرات حفاظت نورونی مربوط به دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بود.

آنالیز آماری

برای بررسی داده‌ها به پارامتر دانسیته نورون‌ها (ND) نیاز بود که از طریق فرمول زیر محاسبه شد (۱۵).

$$ND = \frac{\sum Q}{\sum \text{Frame}} \times V \text{ dissector}$$

$\sum Q$: مجموع نورون‌های شمارش شده در یک نمونه

$\sum \text{frame}$: مجموع دفعات نمونه برداری شده

$V \text{ dissector}$: حجم چهارچوب نمونه‌برداری که برابر است

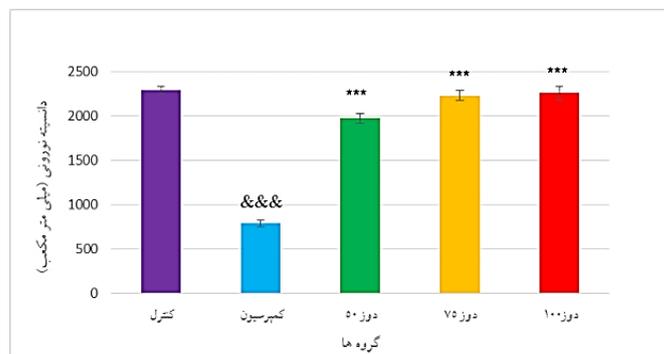
با:

$$V \text{ dissector} = A \text{ Frame} \times H$$

$A \text{ Frame}$: مساحت چهارچوب نمونه برداری

جدول ۱: بررسی معنی‌داری اختلاف دانسیته نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نیمه راست نخاع بین گروه کمپرسیون و سایر گروه‌ها (کنترل، هیدروالکلی ۵۰، هیدروالکلی ۷۵، هیدروالکلی ۱۰۰)

آزمون Paired t-test			نام گروه
P-value	Mean (N _v)	SE Mean	
۰/۰۰۰	۲۲۸۸/۰	۴۰/۰	کنترل
	۷۸۸/۰	۳۹/۰	کمپرسیون
۰/۰۰۰	۱۹۷۱/۰	۵۲/۰	عصاره دوز ۵۰
۰/۰۰۰	۲۲۲۹/۰	۵۱/۰	عصاره دوز ۷۵
۰/۰۰۰	۲۲۵۷/۰	۷۶/۰	عصاره دوز ۱۰۰



نمودار ۱: مقایسه دانسیته تعداد نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نیمه راست نخاع بین گروه کمپرسیون و سایر گروه‌ها (کنترل، هیدروالکلی ۵۰، هیدروالکلی ۷۵، هیدروالکلی ۱۰۰) ($n=6$). در هر گروه اعداد بیانگر میانگین دانسیته نورونی \pm انحراف استاندارد می‌باشد.

***: اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد $p < 0.001$. (مقایسه گروه‌های تیمار با گروه کمپرسیون)

&&&: اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد $p < 0.001$. (مقایسه گروه کمپرسیون با گروه کنترل)

میلی‌گرم برکیلوگرم) و (دوز ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) نسبت به گروه کمپرسیون می‌باشد.

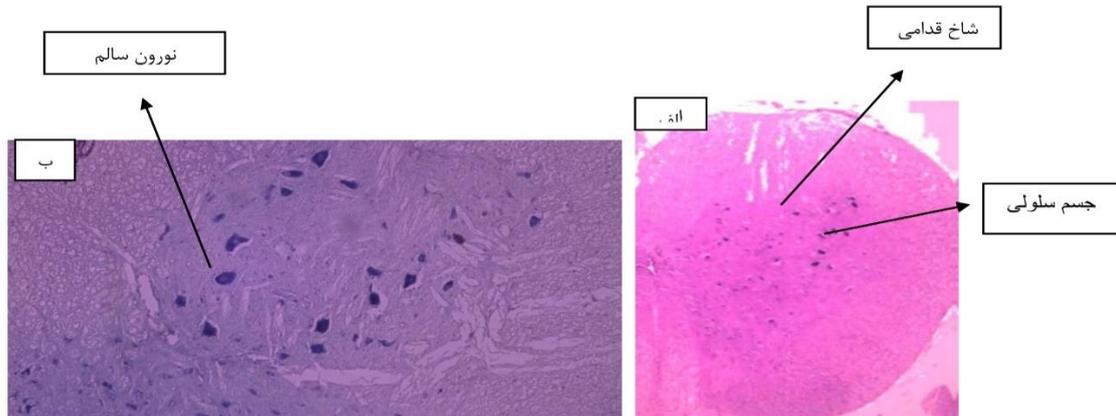
نتایج هیستولوژی

جهت بررسی میکروسکوپی تغییرات ایجاد شده، از شاخ قدامی نیمه راست نخاع تصاویری تهیه شده که در آن

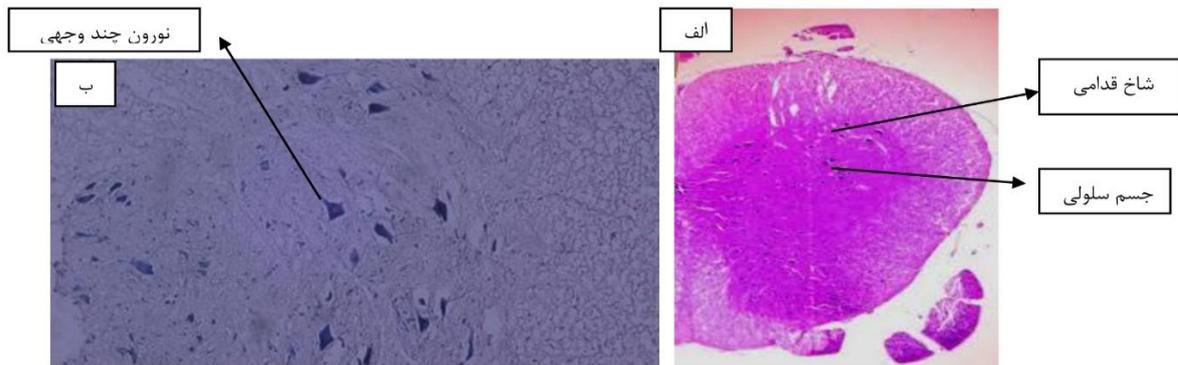
آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که بین گروه کمپرسیون با گروه‌های (کنترل، هیدروالکلی ۵۰، هیدروالکلی ۷۵، هیدروالکلی ۱۰۰) تفاوت معنی‌داری ($p < 0.001$) در دانسیته نورونی وجود دارد به طوری که این معنی‌داری به صورت افزایش دانسیته تعداد نورون‌ها در گروه‌های تیمار هیدروالکلی (دوز ۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) و (دوز ۷۵

سلولی نورون‌ها پس از آسیب عصب سیاتیک است. درحالی‌که در گروه کمپرسیون جسم سلولی چروکیده و غیر نرمال است.

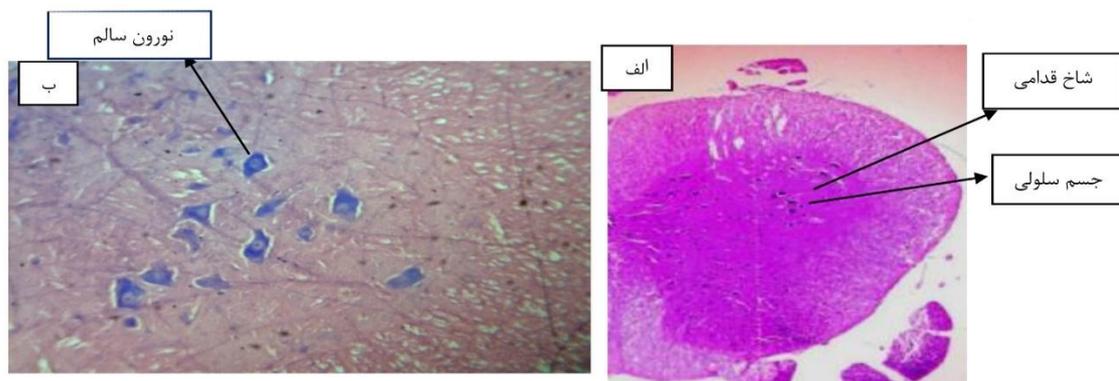
تغییرات جسم سلولی نورون‌ها در گروه‌های مختلف قابل مقایسه است. در گروه‌های تیمار و کنترل، جسم سلولی نورون‌های حرکتی نخاع وضعیت نرمال داشته و پدیده دژنراسیون در آن‌ها کمتر دیده می‌شود که بیانگر اثرات احتمالی حفاظتی عصاره هیدروالکلی این گیاه بر جسم



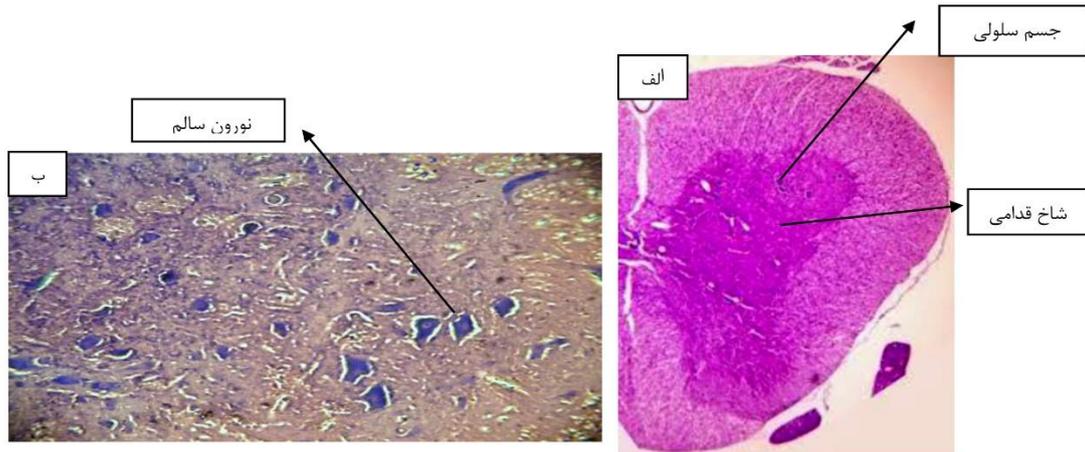
شکل ۱: در شکل الف برش عرضی نخاع را در گروه کنترل را نشان می‌دهد که جسم سلولی نورون‌های سالم می‌باشد (درشت‌نمایی X ۲۰۰). در شکل ب که هسته در مرکز قرار گرفته و شکل نورون‌ها به‌حالت کروی است (درشت‌نمایی X ۱۶۰۰). (رنگ آمیزی آبی تولوئیدین-اریتروزین).



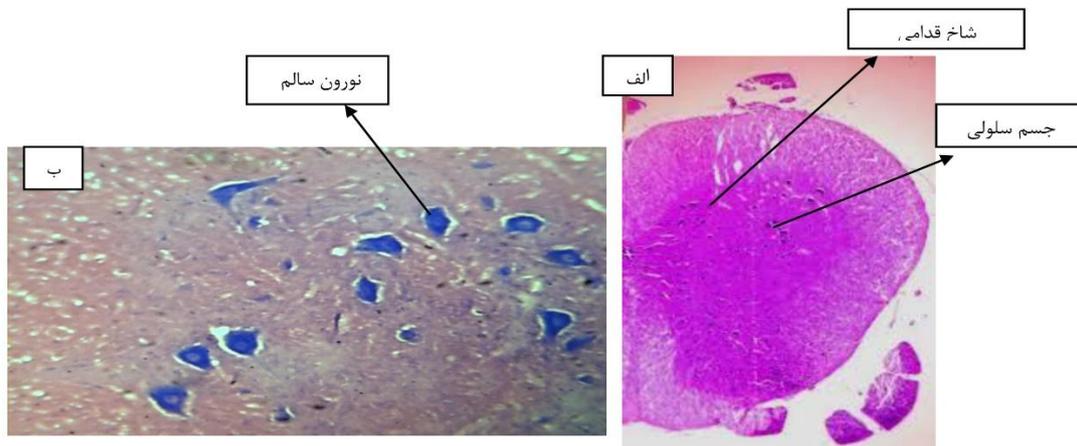
شکل ۲: در شکل الف برش عرضی نخاع در گروه کمپرسیون را نشان می‌دهد که هسته به کنار رانده شده است و به تدریج در حال ناپدید شدن است (درشت‌نمایی X ۲۰۰). در شکل ب نورون‌ها از حالت کروی خارج شده است و ظاهر چندوجهی به‌خود گرفته است (درشت‌نمایی X ۱۶۰۰). (رنگ آمیزی آبی تولوئیدین-اریتروزین).



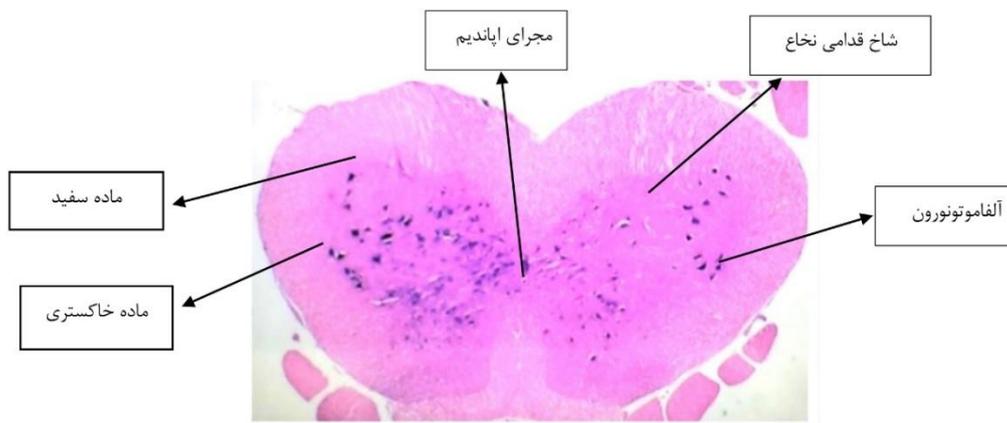
شکل ۳: در شکل الف برش عرضی نخاع در گروه تیمار ۵۰ (کمپرسیون + عصاره هیدروالکلی با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم) که جسم سلولی نورون‌ها و شاخ قدامی نخاع را نشان می‌دهد که تزریق عصاره هیدروالکلی دوز (۵۰ میلی گرم برکیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک موجب رژنراسیون در آکسون می‌شود. به‌دنبال تغییرات رژنراسیون در آکسون، جسم سلولی به‌حالت طبیعی در آمده، تورم سلولی کم می‌شود (درشت‌نمایی X ۲۰۰). در شکل ب نورون‌ها را نشان می‌دهد که تقریباً به‌حالت کروی نزدیک شده اند (درشت‌نمایی X ۱۶۰۰). (رنگ آمیزی آبی تولوئیدین-اریتروزین).



شکل ۴: در شکل الف برش عرضی نخاع در گروه تیمار ۷۵ (کمپرسیون + عصاره هیدروالکلی با دوز ۷۵ میلی گرم/کیلوگرم) که جسم سلولی نورون‌ها و شاخ قدامی نخاع را نشان می‌دهد که تزریق عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک موجب تغییرات رزئراسیون در آکسون می‌شود (درشت‌نمایی X ۲۰۰). در شکل ب به دنبال این تغییرات، جسم سلولی تقریباً به حالت طبیعی درآمده و هسته به مرکز برگشته است (درشت‌نمایی X ۱۶۰۰). (رنگ آمیزی آبی تولوئیدین-اریتروزین).



شکل ۵: در شکل الف برش عرضی نخاع در گروه تیمار ۱۰۰ (کمپرسیون + عصاره هیدروالکلی با دوز ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) که جسم سلولی نورون‌ها و شاخ قدامی نخاع را نشان می‌دهد تزریق عصاره هیدروالکلی (دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک موجب تغییرات رزئراسیون در آکسون می‌شود (درشت‌نمایی X ۲۰۰). در شکل ب به دنبال تغییرات در رزئراسیون آکسون، جسم سلولی به حالت طبیعی درآمده، تورم سلولی کم می‌شود، هسته به مرکز بر می‌گردد و این تغییرات به ویژگی‌های گروه کنترل نزدیک‌تر می‌شود (درشت‌نمایی X ۱۶۰۰). (رنگ آمیزی آبی تولوئیدین-اریتروزین).



شکل ۶: تصویر میکروسکوپی حاصل از برش عرضی قطعات نخاعی عصب سیاتیک (L1-L4)

سیتوپلاسم نورون‌ها تقریباً بازوفیلی شده است و هسته کمی متراکم و به کنار می‌رود و اجسام نیسل به‌ویژه در اطراف هسته از بین رفته‌اند و هسته و سیتوپلاسم قابل تشخیص نیست و سلول کاملاً چروکیده می‌شود. نورون‌های سالم و نورون‌های چند وجهی در گروه‌های کنترل و کمپرسیون و گروه‌های تحت تیمار نشان داده شد ولی اجسام نیسل فقط در درشت‌نمایی بیشتر مشاهده می‌شود که در آن حالت وضوح تصویر کاهش می‌یابد. در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به‌علت وجود مواد حفاظتی در عصاره تغییرات اندک بوده و شکل سلول‌ها به‌حالت نرمال نزدیک‌تر است.

بحث

بررسی میکروسکوپی تغییرات ایجاد شده، از شاخ قدامی نیمه راست نخاع که در آن تغییرات جسم سلولی نورون‌ها در گروه‌های مختلف قابل مقایسه است که در گروه کنترل جسم سلولی آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی نخاع به شکل منظم مشاهده می‌شود و هسته در مرکز قرار دارد ولی در گروه کمپرسیون نشان می‌دهد کمپرسیون عصب سیاتیک موجب دژنراسیون مرکزی و تخریب جسم سلولی آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی نخاع می‌شود (۱۶). همچنین مطابق جدول ۱: نشان می‌دهد که در گروه کمپرسیون دانسیته نورونی کاهش یافته که شکل نورون‌ها به‌حالت چند وجهی شده است درحالی‌که در گروه‌های تحت تیمار دانسیته نورونی افزایش یافته و در دوز ۱۰۰ نسبت به سایر دوزها دانسیته افزایش بیشتری داشته و شکل نورون‌ها به‌حالت کروی درآمده و به گروه کنترل نزدیک‌تر شده است که این نتایج هم‌راستا با سایر دانشمندان می‌باشد.

با کمپرسیون شدید اعصاب و تخریب شدید بخش پروگزیمال آکسون‌ها اثرات ضایعات رو به عقب (رتروگراد) به‌سمت جسم سلولی نورون‌ها توسعه یافته و سبب دژنراسیون مرکزی و تخریب جسم سلولی نورون‌ها شد (۱۷). همچنین مرگ ناشی از ضایعه در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی امری طبیعی است و قطع عصب سیاتیک یا کمپرسیون آن سبب القای مرگ نورونی در آلفا موتونورون‌های نخاع می‌شود (۱۸). این مطالعه نشان می‌دهد کمپرسیون عصب سیاتیک سبب کاهش معنی‌دار دانسیته تعداد نورون‌های آلفای شاخ قدامی نخاع در موش

در شکل ۱ جسم سلولی آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی به‌شکل منظم مشاهده می‌شود و هسته در مرکز قرار گرفته است. مطابق شکل ۲ دانسیته نورون‌ها در گروه کمپرسیون کاهش یافته و شکل نورون‌ها به‌حالت چندوجهی شده است در حالی که در گروه‌های تحت تیمار که در تصاویر ۳ الی ۵ دانسیته نورون‌ها افزایش یافته و شکل نورون‌ها به‌حالت کروی شده که به گروه کنترل نزدیک‌تر شده است.

گروه‌های کنترل و کمپرسیون و تیمار تغییری مشاهده نشده است. همچنین در این تصویر شاخ قدامی را نشان می‌دهد که دانسیته تعداد نورون‌ها در گروه کمپرسیون نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشته و تعداد آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی در گروه کمپرسیون کاهش قابل توجهی داشته است و این به این معناست که کمپرسیون عصب سیاتیک جانور سبب پدید آمدن اثرات دژنراسیون مرکزی به‌صورت رتروگراد به‌سمت جسم سلولی نورون‌های حرکتی در شاخ قدامی نخاع شده و در نهایت دانسیته نورونی در گروه کمپرسیون در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری دارد ولی در گروه‌های تیمار مخصوصاً در دوز ۱۰۰ نشان می‌دهد تزریق عصاره هیدروالکلی (دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک موجب تغییرات رژنراسیون در آکسون می‌شود. به‌دنبال تغییرات در رژنراسیون آکسون، جسم سلولی به‌حالت طبیعی درآمده، تورم سلولی کم می‌شود، هسته به مرکز بر می‌گردد و این تغییرات به ویژگی‌های گروه کنترل نزدیک می‌باشد که به‌علت وجود مواد موثره در گیاه نعناع است. همچنین آلفا موتونورون‌ها را نشان می‌دهد که به فیبرهای عضلات اسکلتی عصب می‌دهند. نورون‌های آلفا با توجه به نوع عضله واحدهای حرکتی کوچک یا بزرگ به‌وجود می‌آورند. به این ترتیب، نورون‌های حرکتی آلفا اعمال انقباضی فیبرهای عضلات اسکلتی را کنترل می‌کنند و در نتیجه تمام فعالیت‌های حرکتی بستگی به جریان عصبی دارد که نهایتاً به آلفا موتونورون‌ها برخورد می‌کند. نورون‌ها در حالت سالم و نرمال به اشکال و اندازه‌های مختلف هستند که این‌ها سیتوپلاسم وسیع و یکنواخت+اجسام نیسل، هسته بزرگ واحد و هستک دارند که این‌ها از ویژگی‌های نورون‌های گروه کنترل است ولی در گروه کمپرسیون که نورون‌ها اتولیز شده‌اند و

صحرائی شده و عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع با دوزهای ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میلی گرم در موش‌هایی با کمپرسیون عصب سیاتیک سبب افزایش معنی‌دار دانسیته تعداد نورون‌های آلفای شاخ قدامی نخاع می‌شود که احتمالاً از طریق ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانسی و ضد التهابی عناصر قابل حل در عصاره این گیاه می‌باشد. همان‌طور که می‌دانیم در روند کمپرسیون، فرآیندهای التهابی فعال می‌شوند و باعث پدید آمدن محیط شیمیایی زیان آور و آسیب بیشتر می‌شوند. احتمالاً عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع با داشتن اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانسی از پیشرفت آن‌ها جلوگیری می‌کند (۱۹). به طوری که در پژوهش حاضر در گروه‌های تیمار پیشرفت ضایعه کند شده بود. شواهد موجود نشان می‌دهد که گیاه نعناع دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانسی و ضد التهابی است. منتول موجود در گیاه نعناع به طور اختصاصی تولید ۳ مدیاتور اصلی التهاب توسط مونوسیت‌ها را مهار می‌کند. سنتز لکوترین b₄، پروستاگلندین و اینترلوکین ۱ توسط منتول مهار می‌شود (۲۰). یکی دیگر از عوامل موثر در مرگ سلولی، رادیکال‌های آزاد می‌باشد که به دنبال آسیب مکانیکی و یا کمپرسیون عصب سیاتیک تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد تولید بیش از حد این رادیکال‌ها باعث آسیب به عملکرد سلول می‌شود عصاره این گیاه باعث حذف رادیکال‌های آزاد در محل آسیب می‌شود (۲۱). خردمندی و همکاران طی آزمایشی پی بردند که گیاه نعناع با قابلیت آنتی‌اکسیدانسی نقش اساسی در کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد و آسیب‌های اکسیداتیو به بدن انسان را دارد و می‌توان آن‌را به عنوان روغن گیاهی استفاده کرد (۲۲). درمان و ترمیم آسیب‌های عصبی یکی از اهداف اساسی در پزشکی و نوروفارماکولوژی می‌باشد. تصادفات و جراحات وارده به بدن، بیماری‌هایی نظیر دیابت و عفونت‌ها می‌توانند آسیب دائمی به اعصاب وارد کنند و به دنبال آن درد مزمن شدید و از دست دادن حس و کنترل حرکتی یا فلجی اتفاق می‌افتد. بر خلاف ترمیم سلول‌ها در سایر نواحی بدن، پاسخ عصب محیطی به صورت روند میتوز و تکثیر سلولی نمی‌باشد، در واقع پاسخ این اعصاب به سادگی در ناحیه آسیب دیده و به صورت موضعی اتفاق نمی‌افتد بلکه جسم سلولی نورون که در طناب نخاعی یا عقده عصبی قرار دارد را درگیر می‌سازد. از آنجایی که جسم سلولی نورون مرکز متابولیکی آن است، در صورت

صدمه به نورون، جسم سلولی آن تخریب شده و باعث مرگ نورون می‌شود و تحت عنوان دژنراسیون والرین خوانده می‌شود. به دنبال قطع یا کمپرسیون عصب، دژنراسیون عصب در بخش خلفی آغاز می‌شود. بعد از آسیب نفوذ پذیری 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 (۲۳). به دنبال قطع اعصاب محیطی و شروع دژنراسیون والرین، سلول‌های شوان و ماکروفاژها و مونوسیت‌ها با همکاری یکدیگر میلین و اجزای قطعه انتهایی آکسون را در روزهای اول پس از آسیب بیگانه خواری می‌کنند. انشعابات آکسون در قسمت پروگسیمال، فاکتورهای رشد را جذب می‌کند (۲۳). وقایع بیولوژیکی متعددی به دنبال کمپرسیون عصب سیاتیک در سطح سلولی و مولکولی رخ می‌دهد که از آن جمله می‌توان به بروز آپوپتوزیس، افزایش ورود کلسیم به درون نورون، آزاد شدن نوروترانسمیترهای تحریکی مانند گلوتامات، ایجاد رادیکال‌های آزاد و فعال شدن فرآیندهای التهابی اشاره نمود و اگر کمپرسیون عصب شدید باشد منجر به دژنراسیون مرکزی در نخاع می‌شود. به دنبال له شدگی عصب تغییرات مورفولوژیکی و متابولیکی تحت عنوان کروماتولیز در جسم سلولی نورون‌ها به وجود می‌آید و شامل پاره پاره شدن اجسام نیسل و تبدیل آن‌ها به ذرات ریز و ناپدید شدن آن‌ها، حجیم و مدور شدن جسم سلولی نورون، قطعه قطعه شدن نوروفیبریل‌ها و جابه‌جایی هسته از مرکز به محیط می‌باشد. اگرچه نورون‌ها پس از تولد فاقد قدرت تکثیر می‌باشند، اما می‌توانند در مقابل درجات معینی از ضایعات مقاومت کرده و بهبود یابند که به این فرآیند رژنراسیون می‌گویند (۲۴).

مکانیسم آپوپتوزیس یکی از اصلی‌ترین راه‌های حذف سلول‌های ناخواسته است که در بدن موجودات پرسلولی و حتی تک سلولی انجام می‌شود، شکل‌گیری بافت‌ها و اندام‌های بدن انسان در دوره جنینی و کنترل میزان رشد و تکثیر سلول‌های بدن همگی از نتایج این پدیده زیستی است، شناسایی این فرآیند سلولی و راه‌های کنترل آن در دست‌یابی به داده‌های ضد سرطانی و ضد التهابی راه گشا است (۲۵).

nerve compression in rat. *Amuj*. 2009; 12(3): 101-108.

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

3. Tehranipour M, Javadmoosavi Z. The Neuroprotective Effect of Alcoholic Extract of Cannabis Sativa on Neuronal Density of Spinal Cord Alpha Motoneurons after Sciatic Nerve Injury in Rats. *J of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2011; 19(3): 339-349.

4. Coleman MP, Conforti L, Buckmaster EA, Tarlton A, et al. An 85- kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(17): 9985-90.

5. Lebel-Hardenack S, Grant SR. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends Plant Sci*. 1997; 2(4): 130-6.

6. Zeinali H, Arzani A, Razmjoo R, Rezaee MB. Evaluation of Oil Compositions of Iranian Mints. 2005; 17: 156-59.

7. Miraj S, Kiani S. Study of pharmacological effect of *Mentha pulegium*: A review. *Der Pharmacia Lettre*. 2016; 8(9): 242-245.

8. Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappaB signaling system Cytokine Growth Factor Rev. 2008; 19(3-4): 187-197.

9. Khosravi Zanjani M A , Mohammadi N, Zojaji M, Bakhoda H. Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. and its Antimicrobial Activity on *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Food Biosciences and Technology*. 2014; 5(2): 31-40.

10. Aris A, Marrinhas E, Carvalho R, Dias C, et al. Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of ahydroalcoholic Extract of *Pterospartum tridentatum* and *Mentha Pulegium* against *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res int*. 2016; 1-12 .

11. Fadaei F, Zahedi L, Farahani Z, Ghasemzade N. Review of two version of declaration of Helsinki (2013 and 2008): challenges and changes. 2008; 9(3): 75-92.

12. 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.

اغلب گیاهان خانواده نعناع تولید کننده ترینها و انواع ترکیبات دیگر هستند که این ترکیبات به طور عمده در غدد اپیدرمی برگها، ساقهها، و اندامهای زایشی خود ذخیره می کنند. این ترکیبات شامل: منتول، منتون، منتوفوران، پولگون، کاروتن، توکوفرول، بتاین، کولین، بتاوسمین، کارواکرول، ژرماکرن دی، لیمونن، سابین هیدرات، بتاکاریوفیلین است (۲۶). بنابراین علت کاهش دژنراسیون در گروه های تیمار شده با عصاره نعناع (نمودار ۱) احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فوق در عصاره بوده که با داشتن اثرات آنتی اکسیدانتی ضد التهابی از پیشرفت ضایعه جلوگیری کرده است. با توجه به نتایج حاصل در گروه کنترل هسته در مرکز قرار دارد و شکل نورون کروی بوده ولی در گروه کمپرسیون هسته در کنار و چروکیده می باشد ولی در گروه های تیمار با دوزهای ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی نعناع نورون ها مجدداً طبیعی نمایان شده است که در گروه تیمار با دوز ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم هسته ها واضح تر دیده می شوند و به گروه کنترل نزدیک تر شده است.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه نعناع یک عامل حفاظت نورونی بوده که احتمالاً می توان آن را جهت درمان بسیاری از بیماری های نورودژنراتیو استفاده نمود.

نتیجه گیری

افزایش دانسیته نورونی در گروه های تیمار نسبت به گروه کمپرسیون حاکی از آن است که مواد موجود در این گیاه دارای اثرات ترمیمی بر سیستم عصبی مرکزی بوده و علاوه بر کاهش شدت دژنراسیون روندهای ترمیمی را نیز سرعت می بخشد.

تشکر و قدردانی: این تحقیق در گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صورت گرفت از مدیریت محترم گروه زیست شناسی سرکار خانم دکتر مریم طهرانی پور و ریاست محترم دانشکده علوم جناب آقای دکتر سعیدی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

1. Tehranipour M, Bahar ara J, Mostafae M .The neuroprotective effect of CSF interaperitotoneal injection on alpha motor degeneration after sciatic

13. 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.
14. Alikhanzade M, Tehranipour M, Khayatizade 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.
15. Behnam rasouli M, Nikraves M, Mahdavi shahri N, Tehranipour M. post operative time effect after sciatic nerve crush on the number of alpha motonurons using asterio gical counting metod(dissector). *Iran Biomed j.* 2000; 4(1): 9-45.
16. Hejazi Sh, Tehranipour M. The Study of Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Portulaca oleracea* Leaves on NT3 Gene Expression in Degeneration of Alpha Neurons after Sciatic Nerve Compression in Rats. *AMUJ.* 2017; 19(117): 52-60.
17. Shahraki A, shahraki A. *Achillea mellifolium* ethanolic extract Protective effects on ventral horn of the spinal cord alpha motoneurons degeneration after sciatic nerve compression in rats Birjand University of Medical Sciences j. 2016; 22 (4): 340-348.
18. Groves MJ, Schanzer A, Simpson AJ, Kuol T, et al. Profile of adult rat sensory neuron loss, Apoptosis and replacement after sciatic nerve crush. *J Neurocytol.* 1997; 32(2): 113-22.
19. Alpsyoy L, Sahin H, Karaman S. Anti-oxidative and anti-genotoxic effects of methanolic extract of *Mentha pulegium* on human lymphocyte culture. *J Toxicol Ind Health.* 2011; 27(7): 647-54.
20. Hirata I, Naito Y, Handa O, Hayashi N, et al. Heat-shock protein 70-overexpressing gastric epithelial cells are resistant to indomethacin-induced apoptosis. *Digestion.* 2009; 79: 243-250.
21. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, et al. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 2005; 280(46): 38729-38733.
22. Kheradmandi M, Ataye salehi E, Esmaeilzadeh Kenari R, Tahereh nasiri Takami S. The Antioxidant Effect of *Mentha Pulegium* Extracts on the Stability of Canola Oil during Storage Conditions. *J. Appl. Environ.* 2014; 117-112.
23. Vargas ME, Barres BA, Why is wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 2007; 30: 79-153.
24. 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 of Med Sci.* 2014; 15(4): 29-34.
25. Salga MS, Ali HM, Abdulla MA, Abdelwahab SI. Gastroprotective activity and mechanism of novel dichloride - zinc (II) - 4 - (2 - (5 - methoxybenzylideneamino) ethyl) piperazin-1-iumphenolate complex on ethanol-induced gastric ulceration. *Chem Biol Interact.* 2012; 195:144-153.
26. Boukhebt H, Nadjib Chaker A, Belhadj H, Sahli F, et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre.* 2011; 3 (4) 267-275.

The neuroprotective effect of *Mentha pulegium* extract on degeneration of motor neurons in spinal cord after sciatic nerve compression in wistar rats

Mortezania N, M.Sc, Tehranipour M, Ph.D*, Baharara J, Ph.D

- Department Of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Iran -

* Email corresponding author: Maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

Received: 12 Jul. 2017

Accepted: 14 Nov. 2017

Abstract

Aim: This study was conducted to determine the neuroprotective effects of mint extract on alpha motor neuron degeneration at the anterior horn of the spinal cord after sciatic nerve compression in rats.

Material and Methods: In this study, 30 male Wistar rats weighing 200-250 g were randomly divided into 5 groups including control, compression and treatment groups of 50, 75 and 100 mg. In order to induce the compression, sciatic nerve was undergone to compress by using locking- scissors for 60 seconds. Hydroalcoholic extract of mint was injected intraperitoneally during the first and second weeks after the compression. After 28 days, rats were undergone by the perfusion method and after sampling the lumbar spinal cord, neuronal density was calculated by using dissector and stereological methods and the findings were compared together.

Results: a significant decrease was observed in compression group compared to the control for the neuronal density and also a significant increase was seen in treatment groups rather than the compression group ($p < 0.001$). The highest increase in neuronal density was related to the dose of 100 mg.

Conclusion: The results indicate that the mint extract has a neuroprotective effect that may be due to the antioxidant and anti-inflammatory properties of the extract of this plant.

Keywords: Degeneration, *Mentha pulegium*, Neuroprotective