



Inhibition of apoptosis caused by oxidative stress in motor neurons of cultured spinal cord of adult mice; Protective and antioxidant effects of quercetin

Momeni HR ^{a*}, Etemadi T^b, Noghli HR ^b, Darbandi N^a

^a PhD, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

^b M.Sc, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Momeni HR, Etemadi T, Noghli HR, Darbandi N. Inhibition of apoptosis caused by oxidative stress in motor neurons of cultured spinal cord of adult mice; Protective and antioxidant effects of quercetin. *Journal of Cell and Tissue* . 2024; 15(3):190.

<https://10.61186/JCT.15.3.215>.

KEY WORDS

Antioxidant
Apoptosis
Mice spinal cord
Oxidative stress
Quercetin

ABSTRACT

Aim: Organotypic cultures of spinal cord slices from mammalian neonatal and fetal animals are powerful tools for studies of spinal cord injury, neuronal degeneration, and cell death but also motor neuron regeneration. Models in which adult slices are used would be very useful. However, adult spinal cord slices are notoriously difficult to maintain in culture and rapidly deteriorate in vitro. Degeneration of motor neurons in the spinal cord is a critical phenomenon in spinal cord injuries and certain neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, a neurodegenerative disorder in which motor neurons in the spinal cord and motor cortex are lost. A variety of mechanisms have been proposed as having a role in neuronal apoptosis during spinal cord injury. Oxidative stress has been reported as one of the mechanisms involved in the apoptosis of motor neurons in spinal cord injuries and neurodegenerative diseases. This study was conducted to determine whether quercetin, as a potent antioxidant, can delay apoptosis in motor neurons of cultured spinal cords by reducing oxidative stress.

Material and methods: The thoracic regions of the spinal cord from adult NMRI mice were sliced using a tissue chopper and divided into three groups: 1) 0-hour, 2) control group, and 3) group treated with quercetin (100 μ M). Spinal cord slices in the 2 and 3 groups were incubated for 6 hours at 37°C in a CO₂ incubator. The viability of the spinal cord slices was measured using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The morphological features of apoptosis and the number of motor neurons were examined using Hoechst and propidium iodide staining. The

* Corresponding author. Tel.:08632627234, Fax: 0834173406

E-mail address: h-momeni@araku.ac.ir

DOI : <https://10.61186/JCT.15.3.215>

Received: 9 Jul. 2024; Received in revised form: 16 Sep. 2024; Accepted: 17 Sep. 2024

Original Article

© Author



malondialdehyde was measured to determine lipid peroxidation while the FRAP (ferric reducing antioxidant power) was assessed to evaluate total antioxidant capacity in fresh and cultured spinal cord slices. Results were expressed as mean \pm SD. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tucky's test was used to assess the statistical significances of the data. In all cases, a statistical probability of $p < 0.05$ was considered significant.

Results: After 6 hours (control group) in culture, the viability of the spinal cord slices, the neuron diameter, and the number of healthy motor neurons significantly decreased compared to the 0-hour group. Also, motor neurons showed the morphological features of apoptosis including cell shrinkage, nuclear and chromatin condensation in the control group. A significant increase in the amount of malondialdehyde and a significant decrease in the total antioxidant capacity was also observed compared with the 0-hour group. After 6 hours, quercetin not only increased the viability and the number of healthy motor neurons in the cultured slices but also reduced the morphological features of apoptosis in the motor neurons compared with the control group. In addition, quercetin significantly reduced the amount of malondialdehyde and increased the total antioxidant power in slices cultured for 6 hours.

Conclusion: Oxidative stress might be considered as one of the mechanisms involved in the apoptosis of motor neurons in cultured spinal cord slices and quercetin, as a potent antioxidant, was able to increase the viability of the cultured spinal cord slices and delay the morphological features of apoptosis in the motor neurons through reducing lipid peroxidation and increasing the total antioxidant capacity.



مهار آپوپتوزیس ناشی از استرس اکسیداتیو در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش بالغ؛ اثرات محافظتی و آنتی اکسیدانتی کوئرستین

حمیدرضا مومنی^{۱*}، طاهره اعتمادی^۲، حمیدرضا نقلی^۳ و نیلوفر دربندی^۴

^{۱*} استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران، (نویسنده اول) h-momeni@araku.ac.ir

^۲ کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران، ایمیل t-temadi@araku.ac.ir

^۳ کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران،

^۴ دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران، n-darbandi@araku.ac.ir

واژگان کلیدی	چکیده
استرس اکسیداتیو آپوپتوزیس آنتی اکسیدانت کوئرستین نخاع موش	<p>هدف: این پژوهش با این هدف انجام شد تا مشخص نماید که آیا کوئرستین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، قادر است با کاهش استرس اکسیداتیو، آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع به‌تأخیر بیاورد. مواد و روش‌ها: قطعات ناحیه سینه‌ای نخاع موش‌های بالغ به سه‌گروه تقسیم شد: ۱- لحظه صفر، ۲- کنترل و ۳- کوئرستین. برای بررسی قابلیت حیات قطعات نخاع از سنجش MTT و بررسی مشخصه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس و تعداد نورون‌های حرکتی از رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیدواید استفاده شد. در قطعات نخاع سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از روش مالون‌دی‌آلدهید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل، از روش FRAP استفاده گردید. نتایج: پس از ۶ ساعت (گروه کنترل)، قابلیت حیات قطعات نخاع، قطر و تعداد نورون‌های حرکتی سالم در مقایسه با گروه لحظه صفر به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین، نورون‌های حرکتی مشخصه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را نشان دادند. افزایش میزان مالون دی‌آلدهید و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل، به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه لحظه صفر نیز مشاهده شد. کوئرستین نه تنها توانست قابلیت حیات و تعداد نورون‌های حرکتی سالم قطعات نخاع را افزایش دهد، بلکه مشخصه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را کاهش داد. همچنین، این آنتی‌اکسیدانت نسبت به گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری میزان مالون دی‌آلدهید را کاهش و قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل را افزایش داد. نتیجه‌گیری: استرس اکسیداتیو می‌تواند یکی از مکانیسم‌های دخیل در آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع باشد و کوئرستین، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، توانست با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل، قابلیت حیات قطعات را افزایش و مشخصه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نخاع به‌تأخیر بیاورد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۹	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۲۶	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۷	

۱- مقدمه

کشت قطعات نخاع می‌تواند به‌عنوان مدل آسیب‌های نخاعی که در آن، نورون‌ها قطع می‌شوند، در نظر گرفته شود. مطالعات نشان می‌دهند که مرگ نورون‌ها در دستگاه عصبی مرکزی، از نوع آپوپتوزیس (Apoptosis) است (۱). آپوپتوزیس (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی)، فرایندی است که به‌طور طبیعی در طی تکوین و رشد سلول، به‌عنوان مکانیسمی در جهت حفظ همئوستازی (Homeostasis)، به‌منظور عدم افزایش بی‌رویه‌ی تعداد سلول‌ها اتفاق می‌افتد. در طی روند آپوپتوزیس، سلول دچار تغییرات ریختی متعدد می‌شود. بدین صورت که، در ابتدا، سلول دچار چروکیدگی (Cell shrinkage) شده و هسته متراکم (Nuclear condensation) می‌گردد. به‌دنبال چروکیدگی سلول، اندازه آن کوچک‌تر، سیتوپلاسم غلیظ‌تر و همچنین اندامک‌ها نیز به‌یکدیگر فشرده می‌شوند. تراکم هسته به‌دنبال متراکم شدن کروماتین (Chromatin condensation) صورت می‌گیرد که بارزترین مشخصه‌ی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است (۲). آپوپتوزیس به‌عنوان عامل اصلی درگیر در تخریب نورون‌ها در بیماری‌های ناشی از مرگ نورورنی (Neurodegenerative diseases) و آسیب‌های نخاعی پیشنهاد شده است. در این زمینه، ما همچنین نشان داده‌ایم که نورون‌های حرکتی در قطعات کشت‌شده نخاع موش بالغ توسط آپوپتوزیس تخریب می‌شوند. مکانیسم‌های مختلفی از جمله سمیت گلوتامات (Glutamate excitotoxicity)، فعال‌سازی کاسپاز و کالپین (پروتئین‌های وابسته به کلسیم) در آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت‌شده نخاع پیشنهاد شده است. علاوه بر این، القای مسیره‌های آپوپتوزیس می‌تواند یکی از پیامدهای استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) در این نورون‌ها باشد (۳).

استرس اکسیداتیو، به‌دنبال برهم‌خوردن تعادل میان تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (Reactive Oxygen Species, ROS) و روند مقابله طبیعی با این گونه واکنش‌گرها به‌وجود می‌آید. این گونه مقابله‌ها به‌واسطه سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن که در رفع سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد (Free radicals) نقش دارند، انجام می‌شود (۴). ترکیبات مذکور عامل اصلی تخریب بسیاری از ساختارهای سلولی از جمله پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند. مشخص شده است که یکی از عوامل دخیل در مرگ نورون‌ها در بیماری‌های ناشی از مرگ نورون‌ها استرس اکسیداتیو می‌باشد (۵). بنابراین، حذف رادیکال‌های آزاد و/یا تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی ممکن است یک استراتژی احتمالی موثر برای محافظت از نورون‌ها در برابر انحطاط ناشی از استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شود. در این خصوص شواهدی وجود دارد که برخی از آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توانند از تخریب نورون‌ها در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کنند و همچنین می‌توانند به‌عنوان یک گزینه درمانی بالقوه برای اختلالات عصبی عمل نمایند (۶). بنابراین، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانت‌ها به‌ویژه آنتی‌اکسیدانت‌های استخراج شده از گیاهان دارویی می‌تواند اثرات بالقوه آن‌ها را بر بیماری‌های ناشی از مرگ نورون‌ها روشن نماید و حتی می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

کوئرستین از گروه آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی است و در دسته‌ی پلی‌فنول‌ها قرار دارد. کوئرستین، فلاونولی است که در بیشتر میوه‌ها (سیب و انواع توت)، سبزیجات (پیاز)، برگ‌ها (چای سبز)، دانه‌ها، مکمل‌های غذایی، و غذاها یافت می‌شود (۷). از جمله اثرات شناخته شده کوئرستین می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانتی آن، جلوگیری از تجمع پلاکتی، شل کردن عضله صاف عروق، جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی بالا (Low-density lipoprotein, LDL)، کاهش سطوح چربی سرمی، کاهش فشارخون سیستولی، کاهش انسولین پلاسمایی، کاهش سطح مارکرهای التهابی پلازما و اثرات ضد سرطانی اشاره نمود (۸،۹).

با توجه به این که، مرگ نورون‌ها در آسیب‌های نخاعی، بیماری‌های ناشی از مرگ نورون‌ها و قطعات کشت شده نخاع از نوع آپوپتوزیس گزارش شده است، شناسایی مکانیسم‌های دخیل در شروع روند آپوپتوزیس این نورون‌ها می‌تواند نقش شایانی در ارتباط با مهار آپوپتوزیس ایفا کند و از آن‌جا که استرس اکسیداتیو، به‌عنوان یک مکانیسم کلیدی دخیل در مرگ نورون محسوب می‌شود، بنابراین، هدف از مطالعه حاضر این بود که مشخص نماید که آیا کوئرستین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی با منشا گیاهی، قادر است با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل، آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی را در قطعات کشت شده نخاع موش بالغ به تاخیر بیاورد.

۲- مواد و روش‌ها

آماده‌سازی قطعات نخاع: در این تحقیق تجربی، از موش‌های ماده بالغ نژاد NMRI، با میانگین وزنی 22 ± 3 گرم (۵ تا ۶ هفته) استفاده شد. این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اراک مورد بررسی قرار گرفت و طی نامه شماره IR.ARAKMU.REC.1398.132 مورد تصویب و موافقت قرار گرفت. ابتدا حیوان به کمک ماده بی‌هوشی دی‌اتیل‌تر، بی‌هوش و سپس توسط شکافت قلبی کشته شد. سپس ناحیه پشتی حیوان و به‌دنبال آن، ستون مهره‌ها باز و نخاع حیوان برداشته شد و بلافاصله به پتری حاوی فسفات سالین سرد (PBS, Phosphate Buffered Saline) منتقل گردید. نمونه نخاع، به آزمایشگاه کشت منتقل و در نهایت برای انجام ادامه آزمایش‌ها، ناحیه‌ی سینه‌ای آن جدا و توسط دستگاه قطعه‌کننده بافت (Tissue chopper, Stolting, USA) به قطعاتی با ضخامت ۵۰۰ میکرومتر برش‌گیری شد. قطعاتی که از شرایط بهتری برخوردار بودند، توسط استریومیکروسکوپ (OPTICA مدل ZM2) جدا شده و به پلیت چهارخانه حاوی محیط کشت Minimum Essential Medium 50%، درصد سرم اسب ۲۵، درصد ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین ۲۵ میلی مولار، 25% HEPES)، با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (هر چهار قطعه در یک خانه). در نهایت این قطعات به سه گروه مجزا تقسیم بندی شدند.

۱. قطعات گروه لحظه صفر که بلافاصله فیکس شدند.
۲. قطعات گروه کنترل (که حلال ماده تیمار را دریافت کردند).
۳. قطعات گروه تیمار با کوئرستین (که غلظت ۱۰۰ میکرومولار کوئرستین را دریافت کردند).

قطعات گروه کنترل و گروه تیمار به پلیت‌های چهارخانه استریل منتقل شدند که در گروه کنترل هر خانه آن حاوی ۴۵۰ میکرولیتر محیط کشت بود، اما در گروه تیمار، هر خانه محتوی محیط کشت و کوئرستین بود. سرانجام هر پلیت شامل گروه‌های کنترل و تیمار، به مدت ۶ ساعت در انکوباتور CO_2 دار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کشت داده شدند (۱۰). جهت غلظت‌یابی و یافتن غلظت موثر کوئرستین بر روی آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی شاخ شکمی قطعات کشت شده نخاع، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد غلظت ۱۰۰ میکرومولار توانست بهترین اثر را در مهار آپوپتوزیس ایفا کند، بنابراین به‌عنوان غلظت موثر برای سایر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی قابلیت حیات (زنده مانی) قطعات نخاع: سنجش MTT در این روش، قطعات تازه تهیه شده نخاع (لحظه زمانی صفر) و قطعات کشت شده برای ۶ ساعت (کنترل و تیمار) به پلیت‌های چهارخانه حاوی ۴۵۰ میکرولیتر محیط کشت انتقال داده شدند (هر خانه حاوی چهار قطعه). سپس به هر کدام از خانه‌های پلیت، ۵۰ میکرولیتر از محلول غلیظ MTT (۵mg/ml) اضافه شد. سپس پلیت‌ها برای ۴۵ دقیقه در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند (۳). قطعات نخاع، با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و عکس تهیه شد.

بررسی نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس: قطعات نخاع لحظه زمانی صفر و کشت شده توسط تثبیت کننده استفانی (۲) درصد پارافرمالدهید، ۲ درصد اسید پیکریک و ۰/۱ مولار PBS، pH=7/2) به مدت ۲ ساعت تثبیت و سپس توسط PBS شستشو شدند (۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه). سپس این قطعات به مدت یک شب در محلول ساکارز ۲۰ درصد در PBS در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سرانجام از این قطعات توسط دستگاه کرایواسنات برش‌هایی به ضخامت ۱۰ میکرون تهیه شد. این برش بر روی لام‌های پوشیده شده توسط پلی-ال-لایزین (۹:۱ در آب مقطر) قرار گرفتند. در این تحقیق، از رنگ‌آمیزی فلئورسنت هوخست (Hoechst 33342) (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، سیگما، آمریکا) و پروپیدیوم آیوداید (Propidium iodide) (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، سیگما، آمریکا) استفاده شده است. به‌طور خلاصه، لام ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه به وسیله PBS شستشو شدند. سپس رنگ‌آمیزی به مدت ۱ دقیقه توسط پروپیدیوم آیوداید انجام شد و پس از شستشو به مدت ۵ دقیقه، لام‌ها به مدت ۳۰ ثانیه توسط هوخست رنگ آمیزی شدند. پس از شستشو به مدت ۵ دقیقه برش‌ها توسط محلول گلیسرول (1:1) PBS/پوشیده و سپس لامل بر روی آن‌ها قرار گرفت. لام‌ها توسط میکروسکوپ فلئورسانس (OLYMPUS, DP71, Japan) مجهز به دوربین با استفاده از فیلتر و عدسی مناسب مشاهده و از آن‌ها عکس برداری شد (۱۱). قطر هسته نورون‌های حرکتی در برش‌های قطعات نخاع، توسط نرم افزار موتیک اندازه‌گیری شد. مشخصه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس و تعداد نورون‌های حرکتی سالم نیز در شاخ شکمی، در هر گروه مورد بررسی قرار گرفته و شمارش شدند. در نهایت، داده‌های کمی به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی - روش مالون دی‌آلدهید (MDA): در این روش، نمونه بافتی (۰/۱ گرم) در محلول KCl به نسبت ۱ به ۹ هموزنیزه شد. یک حجم از نمونه هموزنیزه شده با دو حجم از محلول تیوباربیتوریک اسید (شامل تری کلرواستیک (TCA)، تیوباربیتوریک اسید (TBA) و هیدروکلریک اسید (HCl)) ترکیب شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. پس از خنک شدن (به‌منظور تثبیت رنگ)، با دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و در نهایت، لایه فوقانی به آرامی برداشته شده و جذب نوری آن در طول موج ۵۳۵ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (۱۲). غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی (Extinction coefficient) $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ بر حسب مولار محاسبه و میزان MDA قطعات نخاعی بر حسب nmol/gr گزارش شد.

سنجش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل (قدرت آنتی‌اکسیدانتی / احیا کنندگی آهن سه ظرفیتی: FRAP): در این روش ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره بافتی (۰/۱ گرم از قطعات نخاعی در محلول KCl به نسبت ۱ به ۹ هموزنیزه شد) در کووت‌های اسپکتروفتومتر ریخته، سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر از معرف آماده FRAP به کووت‌ها اضافه و پس از ۴ دقیقه، جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک، خوانده شد. سپس با استفاده از معادله رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد ($y = 1.2372x + 0.0114, r^2 = 0.9991$) که در آن y برابر جذب خوانده شده و x برابر با غلظت سولفات آهن است، میزان FRAP نمونه‌های بافتی بر حسب $\mu\text{mol/gr}$ به‌دست آمد (۱۲). محلول استاندارد سولفات آهن ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) با غلظت 1mm تهیه و از آن رقت‌های مختلف ساخته و سپس منحنی استاندارد سولفات آهن رسم شد.

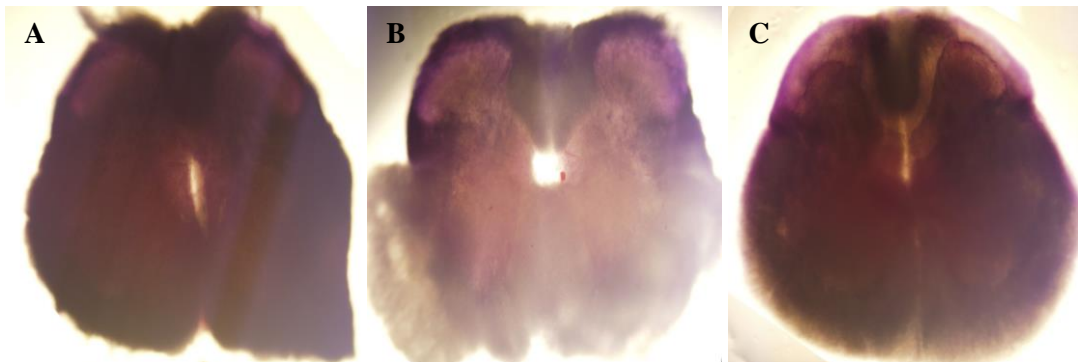
۳- آنالیز آماری

تمامی داده‌های حاصل، توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و Tukey's test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

۴- نتایج

بررسی قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع به‌وسیله سنجش MTT در حضور و عدم حضور کوئرستین

در سنجش MTT، رنگ بنفش نشان دهنده‌ی قابلیت حیات است و هرچه غلظت این رنگ بیشتر باشد، نمایانگر قابلیت حیات بیشتر است و برعکس. در قطعات کشت شده در لحظه زمانی صفر، میزان غلظت رنگ بنفش در بیشترین مقدار خود بود (شکل ۱، A). درحالی‌که در قطعات گروه کنترل ۶ ساعت (شکل B ۱) کاهش غلظت رنگ بنفش در بخش ماده خاکستری و سفید، نمایانگر کاهش قابلیت حیات بود. در گروه تیمار با کوئرستین، افزایش غلظت رنگ بنفش در بخش ماده خاکستری و سفید نیز، نمایانگر افزایش قابلیت حیات در قطعات کشت شده این گروه می‌باشد (شکل C ۱).

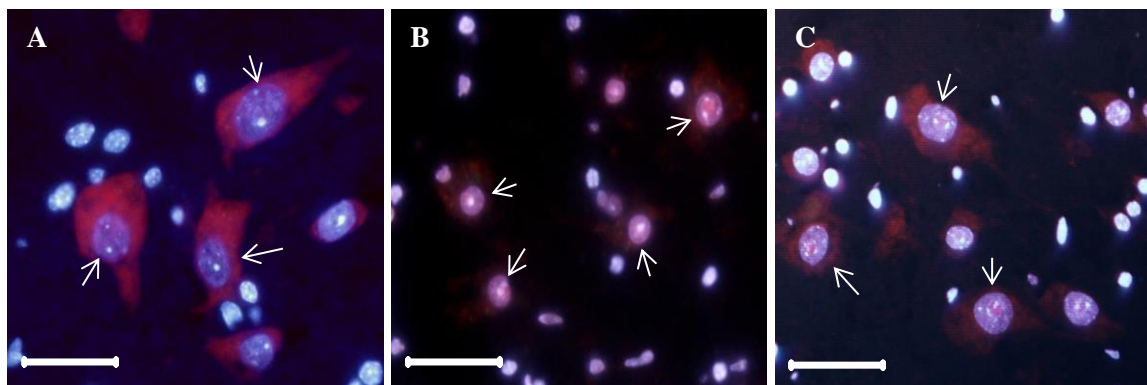


شکل ۱: بررسی زنده‌مانی قطعات نخاع با استفاده از سنجش MTT. توزیع رنگ بنفش به‌معنی فعالیت آنزیم‌های متابولیک سلول و زنده بودن سلول‌ها است. (A) توزیع رنگ بنفش (MTT فورمازان) در قطعات کشت شده در لحظه زمانی صفر. (B) توزیع رنگ بنفش فورمازان در قطعات کشت شده در گروه کنترل ۶ ساعت. کاهش رنگ بنفش، نمایانگر کاهش فعالیت آنزیم‌های متابولیک و مرگ سلولی است. (C) توزیع رنگ بنفش فورمازان در قطعات کشت شده در گروه تیمار با کوئرستین. کاربرد کوئرستین در این قطعات و افزایش رنگ بنفش، نمایانگر جلوگیری از مرگ سلولی سلول‌های این قطعات می‌باشد (بزرگنمایی 400x).

مطالعه شاخص‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع در حضور و عدم حضور کوئرستین

با استفاده از رنگ آمیزی فلئورسنت هوخست و پروپیدیوم آیوداید مورفولوژی نورون‌های حرکتی مربوط به قطعات نخاع در لحظه زمانی صفر و قطعات کشت شده نخاع پس از ۶ ساعت (گروه کنترل و گروه تیمار با کوئرستین) به‌منظور تعیین نوع مرگ سلولی

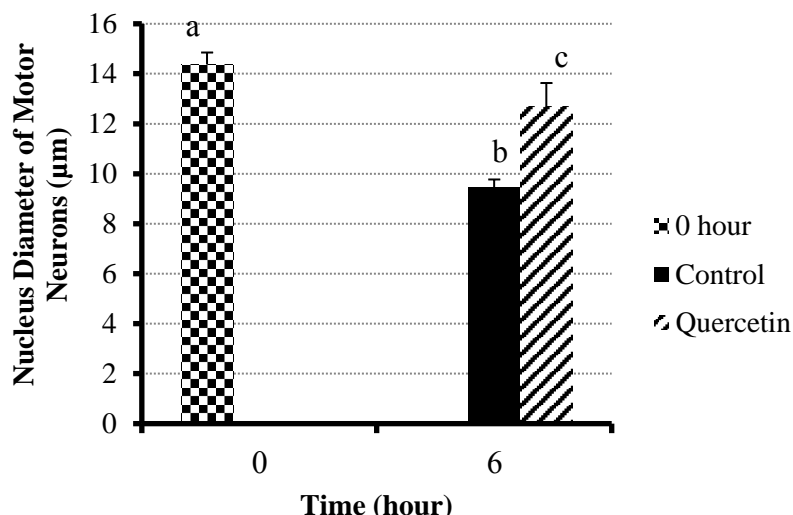
و همچنین تاثیر کوئرستین مورد بررسی قرار گرفت. در قطعات نخاعی لحظه زمانی صفر، نورون‌های حرکتی، واجد اجسام سلولی بزرگ، توزیع طبیعی مواد هسته‌ای و بدون هیچ گونه نشانه آپوپتوزیس بودند (شکل A ۲). در حالی که نورون‌های حرکتی در برش‌های قطعات کشت شده گروه کنترل، پس از گذشتن مدت زمان ۶ ساعت، نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس از قبیل چروکیدگی سیتوپلاسم و غشای سلول (کوچک شدن سلول)، متراکم شدن هسته (کوچک شدن هسته) و تراکم و تجمع کروماتین هسته را نشان می‌دادند (شکل B ۲). کاربرد کوئرستین با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار به مدت ۶ ساعت در محیط کشت، توانست نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد (شکل C ۲).



شکل ۲: اثر کوئرستین بر شاخص‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی نخاع. رنگ آمیزی فلئورسنت شامل پروپیدیوم آیوداید (قرمز) و هوخست (آبی)، تغییرات مورفولوژی را در نورون‌های حرکتی نشان می‌دهند. (A) نورون‌های حرکتی طبیعی با جسم سلولی و هسته بزرگ از قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر). (B) نورون‌های حرکتی بعد از گذشت مدت زمان ۶ ساعت در محیط کشت، علائم آپوپتوزیس شامل متراکم شدن کروماتین، چروکیدگی هسته و سیتوپلاسم را نشان می‌دهند. (C) کاربرد کوئرستین با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار توانست، نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی، به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل مهار کند. فلش‌ها نمایانگر نورون‌های حرکتی می‌باشند (Scale bar = 20 μm)

اندازه‌گیری قطر هسته نورون‌های حرکتی در حضور و عدم حضور کوئرستین

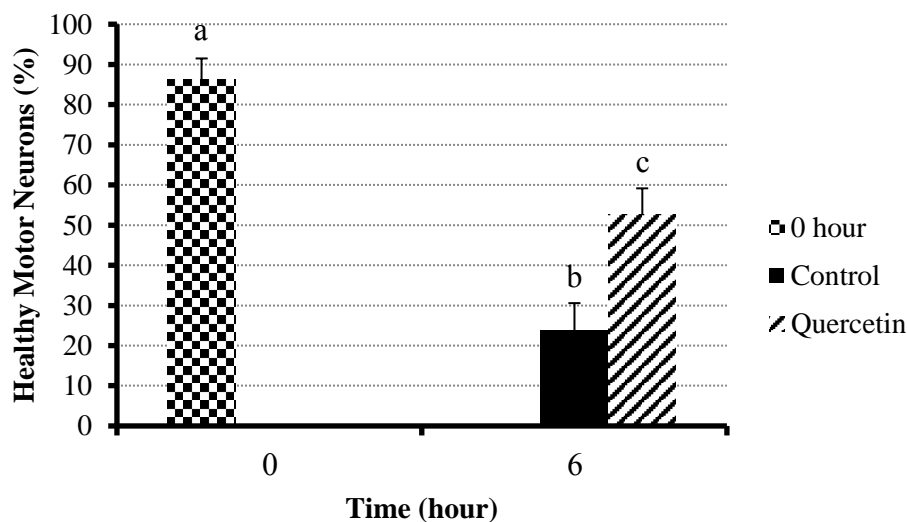
میانگین قطر هسته نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع، پس از ۶ ساعت نسبت به میانگین قطر هسته این نورون‌ها در لحظه زمانی صفر، کاهش معنی‌داری ($p < 0.001$) را نشان داد. کاربرد کوئرستین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در محیط کشت پس از گذشت ۶ ساعت، توانست کاهش قطر نورون‌های حرکتی را به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل جبران نماید (نمودار ۱).



نمودار ۱: اثر کوئرستین بر قطر هسته نورون‌های حرکتی کشت شده نخاع. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (Mean \pm SD) ارائه شده است. میانگین با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (ANOVA, Tukey's test, n=6).

بررسی تعداد نورون‌های حرکتی سالم در شاخ شکمی قطعات کشت شده نخاع در حضور و عدم حضور کوئرستین

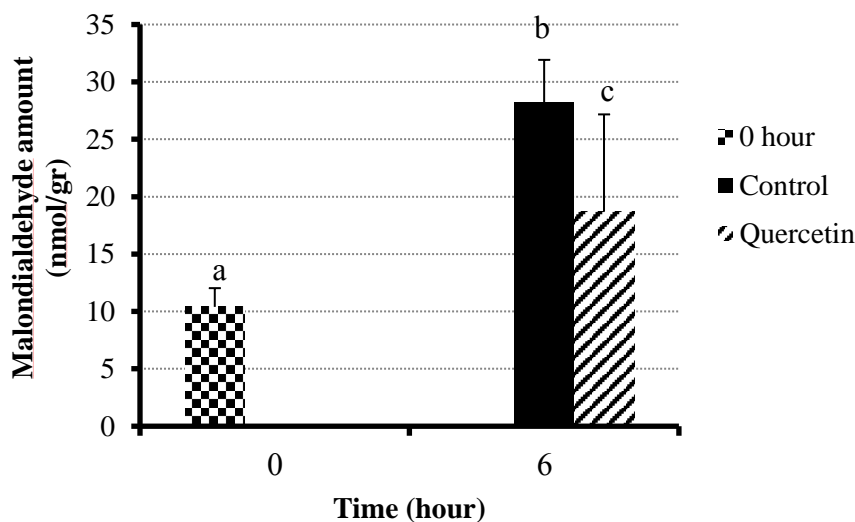
میانگین درصد تعداد نورون‌های حرکتی سالم در قطعات کشت شده نخاع، پس از ۶ ساعت نسبت به میانگین درصد این نورون‌ها در لحظه زمانی صفر، کاهش معنی‌داری ($p < 0.001$) را نشان داد. کاربرد کوئرستین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در محیط کشت پس از گذشت ۶ ساعت، توانست کاهش درصد نورون‌های حرکتی سالم را به‌طور معنی‌داری ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل، جبران نماید (نمودار ۲).



نمودار ۲: اثر کوئرستین بر تعداد نورون‌های حرکتی سالم در قطعات کشت شده نخاع. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (Mean \pm SD) ارائه شده است. میانگین با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (ANOVA, Tukey's test, n=6).

ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی سنجش شده به وسیله MDA در حضور و عدم حضور کوئرستین در قطعات کشت شده نخاع

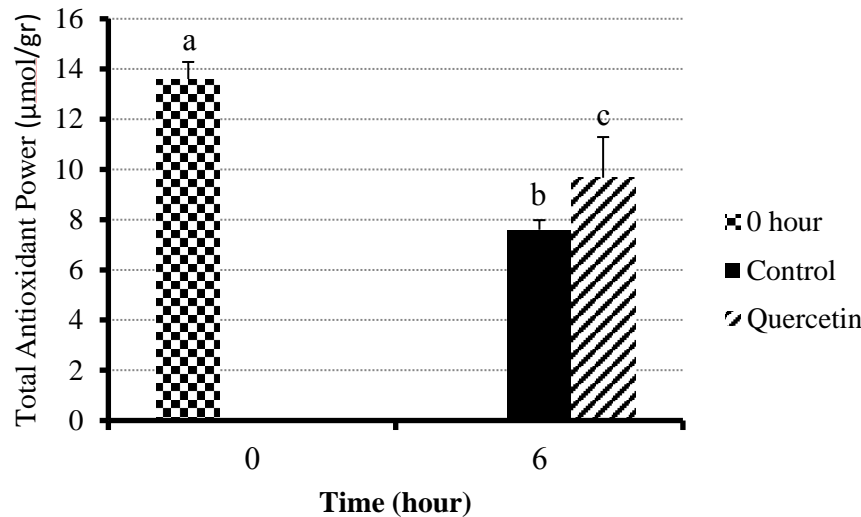
میزان MDA در قطعات کشت شده نخاع در گروه کنترل ۶ ساعت نسبت به قطعات لحظه زمانی صفر افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) را نشان داد. پس از گذشت ۶ ساعت، کاربرد کوئرستین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، توانست میزان MDA قطعات را به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد (نمودار ۳).



نمودار ۳: اثر کوئرستین بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی (سنجش میزان مالون دی‌آلدهید) قطعات کشت شده نخاع. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (Mean \pm SD) ارائه شده است. میانگین با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (ANOVA, Tukey's test, $n=6$).

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل سنجش شده به وسیله FRAP در حضور و عدم حضور کوئرستین در قطعات کشت شده نخاع

ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در قطعات کشت شده نخاع، پس از ۶ ساعت نسبت به ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی این قطعات در لحظه زمانی صفر، کاهش معنی‌داری ($p < 0.001$) را نشان داد. کاربرد کوئرستین (۱۰۰ میکرومولار) توانست به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل را در این گروه نسبت به گروه کنترل افزایش دهد (نمودار ۴).



نمودار ۴: اثر کوئرستین بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در قطعات کشت شده نخاع. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (Mean \pm SD) ارائه شده است. میانگین با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (ANOVA, Tukey's test, n=20).

۵- بحث

در این مطالعه، کشت قطعات نخاع موش‌های بالغ به منظور بررسی مکانیسم‌های دخیل در مرگ سلولی نورون‌های حرکتی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج نشان داد که استرس اکسیداتیو می‌تواند علت احتمالی آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی باشد.

کشت قطعات نخاع گرفته شده از جانور بالغ می‌تواند به عنوان مدل مناسبی برای آسیب‌های نخاعی و بیماری‌های ناشی از تخریب نورون‌ها مانند اسکروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) در نظر گرفته شود. این مدل‌ها امکان بررسی برخی از رویدادهای سلولی و مولکولی در نورون‌ها را فراهم می‌آورند. از این رو، این روش‌ها می‌تواند در رابطه با تغییرات بیوشیمیایی مربوط به نورون‌ها، مکانیسم‌های القاکننده مرگ سلولی و ترمیم نورون‌ها اطلاعات مفیدی را فراهم کند (۱۳).

در پژوهش حاضر بررسی قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع که با استفاده از تست MTT انجام شد، نشان داد که بعد از ۶ ساعت در این قطعات و به ویژه در شاخ‌های شکمی نخاع، قابلیت حیات سلول‌ها از جمله نورون‌های حرکتی موجود در شاخ‌های شکمی نسبت به لحظه زمانی صفر به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. مکانیسم‌های متعددی می‌توانند در کاهش قابلیت حیات سلول‌ها دخالت داشته باشند. طی مطالعات گذشته، استرس اکسیداتیو به عنوان محتمل‌ترین عامل که منجر به کاهش قابلیت حیات سلول‌ها می‌شود، در نظر گرفته شده است. یکی از راه‌هایی که استرس اکسیداتیو از طریق آن باعث کاهش قابلیت حیات سلول‌ها می‌شود، اختلال در تمامیت میتوکندری به صورت مستقیم یا غیر مستقیم است. میتوکندری محل تولید انرژی مورد نیاز سلولی بوده و مولکول ATP که توسط فسفوریلاسیون اکسیداتیو در غشای میتوکندری تولید می‌شود جهت فعالیت سلول به مصرف می‌رسد. بنابراین، اختلال در فعالیت میتوکندری و به دنبال آن کاهش ATP ممکن است با اختلال در قابلیت حیات سلول همراه باشد. یکی از راه‌های به هم خوردن تمامیت میتوکندری، کاهش پتانسیل و تغییر در سیالیت غشای آن به دلیل استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا آن می‌باشد که ممکن است منجر به تغییر در پتانسیل غشای میتوکندری و آزاد شدن

ROS شود (۱۴). علاوه بر آن، این احتمال هم وجود دارد که استرس اکسیداتیو باعث افزایش جریان ورودی کلسیم به داخل سلول‌ها شده و از طریق افزایش سطح کلسیم سیتوزولی با فعال کردن پروتئازهای وابسته به کلسیم (کلپین‌ها)، باعث مرگ این سلول‌ها پس از ۶ ساعت گردد (۱۵).

یکی از روش‌های مرگ نورون‌ها آپوپتوزیس می‌باشد که در بیماری‌های ناشی از مرگ نورون‌ها مثل پارکینسون و آلزایمر نیز گزارش شده است (۱۶). از این رو، به دنبال بررسی قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع توسط سنجش MTT و مشاهده افت کلی قابلیت حیات سلول‌های نخاع به ویژه سلول‌های شاخ شکمی به بررسی مشخصات مورفولوژیکی نورون‌های حرکتی در شاخ-های شکمی قطعات نخاع پرداخته شد. نتایج بررسی مطالعه حاضر نشان داد که بعد از ۶ ساعت نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده مشخصات مورفولوژیکی آپوپتوزیس مانند چروکیدگی سیتوپلاسم و متراکم شدن هسته و کروماتین را نشان دادند که با گزارش قبلی ما مطابقت داشت (۳). به علاوه تعداد نورون‌های حرکتی در این قطعات نسبت به لحظه زمانی صفر به طور معنی‌دار کاهش یافته بود.

آپوپتوزیس به عنوان یک فرآیند پیچیده در نورون‌ها توسط سیگنال‌های درونی و بیرونی متعددی مانند فعال شدن کاسپازها و کالپین‌ها، اختلال عملکرد میتوکندری، اختلال در تنظیم کلسیم و استرس اکسیداتیو القا می‌شود (۱۷). در مطالعات متعدد، آپوپتوزیس ناشی از استرس اکسیداتیو در بیماری‌های ناشی از تخریب نورون‌ها گزارش شده است. استرس اکسیداتیو از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و/یا اختلال در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی به پروتئین‌ها، DNA، لیپیدهای غشا و اندامک‌هایی مانند میتوکندری آسیب می‌رساند و باعث آپوپتوزیس سلول‌های عصبی می‌شود. مشخص شده است که ROS نقش مهمی در القای سیگنال‌های آپوپتوزیس در مسیر میتوکندری ایفا می‌کند. استرس اکسیداتیو اعمال شده توسط سطوح بالای ROS ممکن است باعث باز شدن منافذ در غشای داخلی میتوکندری شده و سیتوکروم c و سایر پروتئین‌های آپوپتوژنیک مانند فاکتور القاکننده آپوپتوزیس (AIF: Apoptosis-inducing factor) را آزاد کند (۱۸، ۱۹). انتشار سیتوکروم c یک رویداد کلیدی در فعال شدن آبشاری کاسپازها می‌باشد. اهداف بالقوه کاسپازها پروتئین‌های ساختاری در هسته سلول هستند. لامین‌ها که در سمت داخلی غشای هسته قرار دارند و مسئول یکپارچگی هسته می‌باشند، در طی آپوپتوزیس تحت پروتئولیز قرار می‌گیرند. از دست دادن یکپارچگی هسته به دلیل انحطاط لامین‌ها منجر به متراکم شدن هسته و کروماتین می‌شود (۲۰). از سوی دیگر، AIF آزاد شده از میتوکندری به هسته منتقل شده و تراکم کروماتین و قطعه‌قطعه شدن DNA با وزن مولکولی بالا را القا می‌کند که در نهایت منجر به آپوپتوزیس به روشی مستقل از کاسپاز می‌شود (۲۱). علاوه بر این، به دلیل مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع، غشای میتوکندری مستعد آسیب توسط رادیکال‌های آزاد است که می‌تواند پتانسیل غشای میتوکندری را تغییر دهد و با مختل نمودن تولید ATP منجر به سیگنال‌های مرگ ذاتی ناشی از استرس اکسیداتیو شود (۲۲). ارتباط منطقی بین استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوزیس در سلول‌های عصبی گزارش شده است. رادیکال‌های آزاد می‌توانند با لیپیدها، پروتئین‌ها و دیگر اجزای سلولی برهم کنش داشته باشند و بدین ترتیب منجر به مرگ سلولی شوند. شواهدی وجود دارد که رادیکال‌های اکسیژن تولید شده تحت شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک مختلف، می‌تواند با تغییر دادن گزینشی ساختار و عملکرد غشای پلاسمایی، مرگ سلولی را القا کنند (۲۳). برای مثال، در بیماری‌هایی از جمله ALS، آلزایمر، و پارکینسون که در آن‌ها سطح افزایش یافته‌ای از استرس اکسیداتیو سلولی وجود دارد، مرگ سلول‌های عصبی از طریق آپوپتوزیس گزارش شده است (۲۴-۲۶).

با توجه به این که استرس اکسیداتیو می‌تواند عاملی برای مرگ نورون‌ها باشد، این احتمال وجود دارد که در این پژوهش القای استرس اکسیداتیو نیز عاملی برای آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع باشد. بنابراین، جهت بررسی این

احتمال در این پژوهش شاخص‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو مانند سطح مالون دی آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل قطعات نخاع کشت داده شده مورد مطالعه قرار گرفت. افزایش سطح MDA می‌تواند به دلیل افزایش سطح رادیکال‌های آزاد به دنبال استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی غشای نورون‌ها در قطعات کشت شده نخاع، به خصوص نورون‌های حرکتی شاخ‌های شکمی باشد. نتایج ما نشان داد میزان مالون دی آلدئید در قطعات نخاع کشت شده برای ۶ ساعت افزایش معنی‌داری نسبت به گروه لحظه صفر داشت. علاوه بر این، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل که می‌تواند ناشی از فعالیت آنزیم‌های متعدد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی از جمله سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز باشد، در قطعات نخاع کشت شده برای ۶ ساعت کاهش معنی‌داری نسبت به گروه لحظه صفر داشت. با توجه به این نتایج می‌توان فرض کرد که استرس اکسیداتیو از طریق مسیرهای مستقیم و / یا غیر مستقیم باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی شده باشد. اگر این فرضیه درست باشد، استفاده از یک آنتی‌اکسیدانت می‌تواند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی از اثرات نامطلوب استرس اکسیداتیو بر این نورون‌ها جلوگیری کند. نتایج ما نشان داد، که کوئرستین توانست نه تنها قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع را افزایش دهد بلکه قادر بود بسیاری از جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را مهار و یا به تعویق بیاورد. علاوه بر این، کوئرستین توانست در گروه تیمار پس از ۶ ساعت تعداد نورون‌های حرکتی را به شکل معنی‌داری نسبت به گروه کنترل حفظ نماید. همچنین با در نظر گرفتن میزان مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل (به عنوان شاخص‌های استرس اکسیداتیو) در قطعات کشت شده نخاع، کوئرستین توانست میزان مالون دی آلدئید را کاهش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل را افزایش دهد که این اختلاف در مقایسه با قطعات گروه کنترل، معنی‌دار بود.

کوئرستین از گروه آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی است و در دسته‌ی پلی‌فنول‌ها قرار دارد. پلی‌فنول‌ها از متابولیت‌های ثانویه گیاهی و محافظت کننده از گیاه در برابر پرتو ماوراءبنفش، اکسیدانت‌ها و پاتوژن‌ها هستند. کوئرستین، فلاونولی است که در بیشتر میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها و دانه‌ها و مکمل‌های غذایی یافت می‌شود (۲۷). از جمله توانایی آن در کاهش التهاب، از بین بردن درد، محافظت بدن در برابر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، کاهش فشارخون، کنترل دیابت، جلوگیری از ابتلا به برخی سرطان‌ها، و تقویت سیستم ایمنی است (۲۸). در مطالعه‌ای کوئرستین توانسته با افزایش فعالیت سلول‌های گلیال و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، از استرس اکسیداتیو جلوگیری و یا آن را به تعویق بیاورد (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر، نقش کوئرستین استخراج شده از پیاز در جلوگیری از آپوپتوزیس نورون‌های هیپوکامپ گزارش شده است (۳۰). به علاوه نقش کوئرستین در جلوگیری از ایسکمی سلول‌های قشر مغز نیز نشان داده شده است. همچنین تحقیقاتی در زمینه نقش کوئرستین بر روی شاخص‌های مورفولوژیکی نورون‌های قشر مخ رت صورت گرفته است. در این تحقیق، با بررسی پراکندگی نورون‌ها و قابلیت حیات این نورون‌ها، کوئرستین توانست از کاهش این توزیع جلوگیری و قابلیت حیات این نورون‌ها را افزایش دهد (۳۱). در مطالعه‌ای دیگر، اثرات آنتی‌اکسیدانت‌های مختلف از جمله کوئرستین را بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل بررسی نموده‌اند که کاربرد کوئرستین و تاثیر بسزای آن در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل گزارش شده است. همچنین، نقش کوئرستین در جلوگیری از فعالیت رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر از دیگر دست‌آوردهایی است که به اثبات رسیده است (۳۲). بنابراین کوئرستین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی و گیاهی می‌تواند باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو شود. از سویی دیگر، این امکان وجود دارد که با افزایش میزان پتانسیل غشای میتوکندری از تخریب غشای میتوکندری سلول‌های قطعات کشت شده نخاع جلوگیری کرده و مرگ سلولی را کاهش دهد (۳۳). در این خصوص، اثر محافظتی کوئرستین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی گیاهی، می‌تواند ناشی از قابلیت آن در توقف وقایع مهم آپوپتوزیس به واسطه کلپین‌ها و اندونوکلتازها که آغازگر مسیر آپوپتوزیس هستند، باشد (۳۴). همچنین، کوئرستین قابلیت جلوگیری از آسیب‌های ناشی از آب اکسیژنه (H_2O_2) به DNA و

همچنین کاهش آسیب‌های سلولی در نقش پیش‌آزمیم در سیستم آنتی اکسیدانتی گلوتاتیون را دارد که در تحقیقات گذشته گزارش شده است (۳۵). طبق مطالعات گذشته، کوئرستین به واسطه پاکسازی ROS توانست پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش دهد و از عوارض جانبی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش سطح MDA جلوگیری کند (۳۶).

مطالعات نشان داده‌اند که کوئرستین می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی (کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) از طریق مسیر Nrf2 (عناصر پاسخ دهنده به آنتی اکسیدانت) گردد (۳۷). کوئرستین همچنین می‌تواند مهار تشکیل ROSها را از طریق فعالیت‌های آنزیمی، مانند NADPH oxidase و اکسیدوردوکتاز وابسته به نیکوتین‌آمیدآدنین دی‌نوکلئوتید (NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide) به ترتیب در غشای پلاسمایی نورون‌های حرکتی و میتوکندری به انجام برساند (۳۸).

با توجه به بررسی نتایج مربوط به شاخص‌های استرس اکسیداتیو (MDA و ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل) و همچنین نقش کوئرستین در مهار این شاخص‌ها و به‌تاخیر انداختن آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی، این‌طور می‌توان نتیجه گرفت، که استرس اکسیداتیو می‌تواند عاملی برای آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع باشد و استفاده از کوئرستین در قطعات گروه تیمار، می‌تواند به مدت ۶ ساعت مرگ این سلول‌ها را به‌تعویق بیندازد. با این حال، تحقیقات نشان داده است مهار استرس اکسیداتیو، همچنان نتوانسته است آپوپتوزیس را در نورون‌ها به‌طور کامل و به‌مدت طولانی مهار کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به پیچیدگی فرآیند آپوپتوزیس، احتمالاً مکانیسم(های) دیگری به‌طور همزمان آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی موجود در شاخ‌های شکمی قطعات کشت شده نخاع القا می‌نمایند که آزمایش‌های بیشتری برای شناخت این عوامل مورد نیاز است.

۶- نتیجه‌گیری

نتایج ما نشان داد آپوپتوزیس القا شده توسط استرس اکسیداتیو می‌تواند یکی از عوامل احتمالی مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع موش باشد و کوئرستین به‌عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی گیاهی می‌تواند با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و همچنین افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل از القای استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی جلوگیری نماید.

۷- تشکر و قدردانی

این پژوهش تحت حمایت مالی دانشگاه اراک به انجام رسید.

۸- منابع

1. Bredesen DE, Rao R V, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature*. 2006;443(7113):796–802.
2. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
3. Momeni HR, Nasimi P. Caspase-dependent apoptosis in motor neurons of adult mouse spinal cord slices. *Iran J Sci Technol*. 2014;38(1):55–60.
4. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:715–48.

5. Poh Loh K, Hong Huang S, De Silva R, H Tan BK, Zhun Zhu Y. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res.* 2006;3(4):327–37.
6. Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2009;34:630–8.
7. Kelly GS. Quercetin. *Altern Med Rev.* 2011;16(2):172–95.
8. Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS, Agrawal P, Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World J Pharm Pharm Sci.* 2012;1(1):146–60.
9. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2–3):325–37.
10. Momeni HR, Jarahzadeh M, Farjad E. Glutamate excitotoxicity; a possible mechanism for apoptosis of motoneurons in adult mouse spinal cord slices. *Neurophysiology.* 2020;52(6):408–14.
11. Momeni HR, Kanje M. Calpain inhibitors delay injury-induced apoptosis in adult mouse spinal cord motor neurons. *Neuroreport* [Internet]. 2006;17(8). Available from: https://journals.lww.com/neuroreport/fulltext/2006/05290/calpain_inhibitors_delay_injury_induced_apoptosis.1.aspx
12. Moshaveri F, Momeni HR, Noori M. Protective effect of silymarin and Artichoke (*Cynara scolymus*) flavonoids against apoptosis of cultured spinal cord the motor neurons of adult mice. *Iran J Physiol Pharmacol.* 2018;2(1):34–42.
13. Pandamooz S, Nabiuni M, Miyan J, Ahmadiani A, Dargahi L. Organotypic spinal cord culture: a proper platform for the functional screening. *Mol Neurobiol.* 2016;53:4659–74.
14. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):913–22.
15. Dargelos E, Brulé C, Stuelsatz P, Mouly V, Veschambre P, Cottin P, et al. Up-regulation of calcium-dependent proteolysis in human myoblasts under acute oxidative stress. *Exp Cell Res.* 2010;316(1):115–25.
16. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol cell Biol.* 2000;1(2):120–30.
17. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian J Biol.* 2020;81:1133–43.
18. Wang C, He C, Lu S, Wang X, Wang L, Liang S, et al. Autophagy activated by silibinin contributes to glioma cell death via induction of oxidative stress-mediated BNIP3-dependent nuclear translocation of AIF. *Cell Death Dis.* 2020;11(8):630.
19. Matilla AJ. Cellular oxidative stress in programmed cell death: focusing on chloroplastic $1O_2$ and mitochondrial cytochrome-c release. *J Plant Res.* 2021;134(2):179–94.
20. Kristiani L, Kim Y. The interplay between oxidative stress and the nuclear lamina contributes to laminopathies and age-related diseases. *Cells.* 2023;12(9):1234.
21. Novo N, Ferreira P, Medina M. The apoptosis-inducing factor family: Moonlighting proteins in the crosstalk between mitochondria and nuclei. *IUBMB Life.* 2021;73(3):568–81.
22. Zhang J, Cao H-Y, Wang J-Q, Wu G-D, Wang L. Graphene oxide and reduced graphene oxide exhibit cardiotoxicity through the regulation of lipid peroxidation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. *Front cell Dev Biol.* 2021;9:616888.
23. Behl T, Makkar R, Sehgal A, Singh S, Sharma N, Zengin G, et al. Current trends in neurodegeneration: Cross talks between oxidative stress, cell death, and inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7432.
24. Dionísio PA, Amaral JD, Rodrigues CMP. Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. *Ageing Res Rev.* 2021;67:101263.

25. Petrozziello T, Bordt EA, Mills AN, Kim SE, Sapp E, Devlin BA, et al. Targeting tau mitigates mitochondrial fragmentation and oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol.* 2022;59(1):683–702.
26. Bhatia V, Sharma S. Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2021;421:117253.
27. Yang D, Wang T, Long M, Li P. Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020.
28. Aghababaei F, Hadidi M. Recent advances in potential health benefits of quercetin. *Pharmaceuticals.* 2023;16(7):1020.
29. Borghi SM, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Bussmann AJC, Vignoli JA, Camilios-Neto D, et al. Quercetin inhibits peripheral and spinal cord nociceptive mechanisms to reduce intense acute swimming-induced muscle pain in mice. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162267.
30. Yang E-J, Kim G-S, Kim JA, Song K-S. Protective effects of onion-derived quercetin on glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death. *Pharmacogn Mag.* 2013;9(36):302.
31. Cho J-Y, Kim I-S, Jang Y-H, Kim A-R, Lee S-R. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2006;404(3):330–5.
32. Zhang M, Swarts SG, Yin L, Liu C, Tian Y, Cao Y, et al. Antioxidant properties of quercetin. In: *Oxygen transport to tissue XXXII.* Springer; 2011. p. 283–9.
33. Ho C-L, Kao N-J, Lin C-I, Cross T-WL, Lin S-H. Quercetin increases mitochondrial biogenesis and reduces free radicals in neuronal SH-SY5Y cells. *Nutrients.* 2022;14(16):3310.
34. Pandey AK, Shukla SC, Bhattacharya P, Patnaik R. A possible therapeutic potential of quercetin through inhibition of μ -calpain in hypoxia induced neuronal injury: a molecular dynamics simulation study. *Neural Regen Res.* 2016;11(8):1247–53.
35. Nacaia H, Takekoshi S, Takagi T, Honma T, Watanabe K. Antioxidative action of flavonoids quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J Exp Clin Med.* 1999;24:1–12.
36. Rezaei-Sadabady R, Eidi A, Zarghami N, Barzegar A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of quercetin and quercetin-encapsulated liposomes. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol.* 2016;44(1):128–34.
37. Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. *Chem Biol Interact.* 2012;195(2):154–64.
38. Grewal AK, Singh TG, Sharma D, Sharma V, Singh M, Rahman MH, et al. Mechanistic insights and perspectives involved in neuroprotective action of quercetin. *Biomed Pharmacother.* 2021;140:111729.