Journal of Animal Biology, Summer 2024; 16(4):137-147

Research Article

The effect of Ethyl Acetate and N-butanol Fractions of Extract of *Arimonia eupatoria* on the Repair of Spinal Cord and the Expression of Caspase 3 and 9 genes after Sciatic Nerve Compression in Rats

Ghazale Nabavinia, Maryam Tehranipour*, Javad Baharara

Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
*Corresponding author: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

Received: 15 March 2024 Accepted: 29 April 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.1106937

Abstract

Caspase 3 gene plays a role in the progression of degeneration and caspase 9 in apoptotic, necrotic, and lysosomal deaths, and after the nerve damage, This study aimed to determine the neuroprotective effects of hydro alcoholic extract and fractions of *Agrimonia eupatoria* plant on neuron density and the change in the expression of caspase 3 and 9 genes 36 male Wister rats weighing were divided to 6 groups including control, compression, treatment A (compression + hydro alcoholic extract in dose of 75 mg/kg), treatment B (compression + ethyl acetate fraction in dose of 75 mg/kg dose), Treatment C (compression +N butanol fraction in dose of 75 mg/kg) and treatment D (compression + aqueous phase with dose of 75 mg/kg). In the control group, after anesthetizing of the rats, the muscle at the sciatic nerve site was split without nerve damage and in compression group and treatment groups; sciatic nerve of the right leg was subjected to compression for thirty seconds. The first intraperitoneal injection of the extract was performed immediately after compression of the nerve and the second injection was performed 7 days later. After twenty-eight days, the rats were subjected to the perfusion method and samples were taken from the lumbar spinal cord. Slides were stained with toluidine blue, the neuron density was measured using a dissector method and the stereology method and the results were compared by t-test and Anova analysis. Spinal cord samples were taken, Total RNA extracted, and cDNA was synthesized, and then, and the expression changes of caspase 3 and 9 genes in the samples were investigated. The results showed that neuronal density increased significantly in all treatment groups compared to the compression group ($p < 0.001$) and it is more in the n-butanol group than the other groups. The gene expression of Caspase 3 and 9 decreased in all treatment groups compared with compression group ($p < 0.01$). The extract of this plant can be effective in repairing the nervous system due to the presence of compounds such as tocopherol, which has anti-oxidant and anti-apoptotic effects.

Keywords: *Agrimonia eupatoria*, Sciatic nerve repair, Caspase 3 and 9.

زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۴۷-۱۳۷

مقاله پژوهشی

اثر فراکسیون‌های اتیل استات و ان بوتانول عصاره گیاه غافث (*Arimonia eupatoria*) بر ترمیم نخاع و بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت

غزاله نبوی نیا، مریم طهرانی پور*، جواد بهارآرا

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

*مسئول مکاتبات: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰

DOI: 10.60833/ascij.2024.1106937

چکیده

ژن کاسپاز ۳ در پیشرفت دژنراسیون و کاسپاز ۹ در روندهای آپوپتوزی، نکروزی و مرگ لیزوزومی نقش دارند و پس از آسیب عصب، میزان بیان آنها تغییر می‌کند. این پژوهش با هدف تعیین اثرات نوروپروتکتیوی عصاره هیدروالکلی و فراکسیون‌های گیاه غافث (*Agrimonia eupatoria*) بر دانسیته نورونی و تغییر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت انجام شد. ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار به شش گروه شش‌تایی شامل: کنترل، کمپرسیون، تیمار A (کمپرسیون+ عصاره هیدروالکلی با دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)، تیمار B (کمپرسیون+ فراکسیون اتیل استات با دوز۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)، تیمار C (کمپرسیون+ فراکسیون ان بوتانول با دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و تیمار D (کمپرسیون+ فاز آبی با دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) تقسیم شدند. در گروه کنترل پس از بیهوش کردن رت‌ها، عضله در محل عصب سیاتیک بدون آسیب عصب شکافته شد و در گروه کمپرسیون و گروه‌های تیمار عصب سیاتیک پای راست به مدت ۳۰ ثانیه تحت کمپرسیون قرار گرفت. اولین تزریق عصاره به صورت داخل صفاقی بلافاصله بعد از کمپرسیون عصب و دومین تزریق ۷ روز بعد انجام شد. بعد از ۲۸ روز، رت‌ها تحت روش پرفیوژن قرار گرفته و از نخاع قسمت کمری نمونه‌برداری گردید. لام‌ها با آبی تولوئیدین رنگ‌آمیزی شده، دانسیته نورونی به روش دایسکتور و متد استریولوژی محاسبه و نتایج توسط آنالیز T-test و Anova مقایسه شدند. از قطعات نخاعی نمونه-برداری شد، Total RNA استخراج و cDNA سنتز گردید و تغییرات بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در نمونه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که دانسیته نورونی در تمام گروه‌های تیمار افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کمپرسیون دارد ($p < ۰/۰۰۱$) و در گروه ان بوتانول بیشتر از سایر گروه‌ها است. بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در تمام گروه‌های تیمار نسبت به گروه کمپرسیون کاهش یافت ($p < ۰/۰۱$). عصاره این گیاه بدلیل داشتن ترکیباتی مانند توکوفرول که اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوزی دارد می‌تواند در ترمیم سیستم عصبی موثر باشد.

کلمات کلیدی: *Agrimonia eupatoria*، ترمیم عصب سیاتیک، کاسپاز ۳ و ۹.

مقدمه

ضایعات اعصاب محیطی یکی از بزرگترین و شایع ترین صدمات انسان کنونی در جوامع مختلف است که باعث از دست رفتن کارایی فرد و تحمیل هزینه‌های بالا می‌شوند. اگر یک فیبر عصبی قطع یا دچار ضایعه گردد، هم در اعصاب محیطی و هم در اعصاب مرکزی تغییراتی ایجاد شده و نهایتا منجر به مرگ

سلولی می‌گردد (۹). بدین معنا که در قطع شدگی و کمپرسیون شدید اعصاب چنانچه میزان تخریب بخش پروگزیمال آکسون‌ها شدید باشد، اثرات ضایعه رو به عقب به سمت جسم سلولی نورون‌ها توسعه یافته و سبب دژنراسیون مرکزی و تخریب جسم سلولی نورون‌ها می‌گردد (۱۲). بنابراین مطالعه بر روی مکانیسم ایجاد این آسیب‌ها و عواملی که باعث کاهش عوارض آن‌ها و در نتیجه منجر به حفظ و بقای نورون-ها می‌شوند، ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی آکسوتومی و له شدگی عصب آپوپتوز را در نورون‌ها القا می کند (۱۱). مطالعات نشان داده‌اند که کاسپازها با تقویت آبشار سیگنالینگ باعث ایجاد آپوپتوز می-گردند. کاسپازها انواعی از پروتئین‌های سیستئین-آسپارتات مربوط به مسیر آپوپتوز می‌باشند که نقش مهمی در تنظیم و اجرای آپوپتوزیس ایفا می‌کنند (۱۶)، کاسپازها براساس عملکردشان به ۲ نوع آغازگر شامل کاسپازهای ۸، ۹ و ۱۰ و اجرایی شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ دسته‌بندی می‌شوند (۵). مسیر بیرونی شامل کاسپازهای ۸ و ۱۰ و مسیر داخلی شامل کاسپاز ۹ می‌باشد که هر ۲ مسیر همگرا بوده و از کاسپازهای اجرایی استفاده می‌نمایند که به طور آبشاری فعال شده و منجر به انهدام سلول‌ها می‌شود (۶). تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که عوامل مختلفی مانند انواع فاکتورهای نوروتروفیک، سایتوکین‌های نورواکتیو، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و مواد آنتی‌اکسیدان بر ترمیم ضایعات سیستم عصبی اثر می-گذارند (۷). در این رابطه شناسایی محرکی که بدون عوارض جانبی سبب کاهش و یا توقف اثرات حاصل از ضایعات ایجاد شده بر سیستم عصبی گردد، ضروری می‌باشد. امروزه گرایش عمومی جامعه به استفاده از گیاهان دارویی و اثرات مفید آنها در درمان به طور چشمگیری گسترش یافته است. گیاه غافث (*Agrimonia eupatoria*) از خانواده گل سرخیان دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است همچنین دارای چندین نوع فلاونوئید شامل: کوئرستین و کامفرول است (۲۰). مطالعات انجام شده بر روی ترکیبات گیاه غافث مشخص کرده است که بعضی از این ترکیبات همانند: آگریمونین، کوئرستین، کاتچین، لوتئولین و کامفرول و آگریمونین دارای خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی هستند (۱). بنابراین با توجه به اثرات یادشده این گیاه در مطالعات گذشته احتمال می‌رود که بتواند باعث ترمیم یا کاهش شدت دژنراسیون سیستم عصبی شود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق تجربی در آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی جانوری در گروه زیست شناسی واحد مشهد با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات انجام شد. حیوانات از سرم‌سازی رازی تهیه و در شرایط نوری استاندارد روزانه و درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات در حالی که به راحتی دسترسی به آب و غذا داشتند نگهداری شدند. گیاه غافث از اطراف بجنوورد تهیه و توسط هرباریوم دانشگاه فردوسی شناسایی و با کد هرباریوم ۳۶۸۳۰ مورد تایید قرارگرفت. پس از خشک و پودر کردن گیاه عصاره هیدروالکلی آن با روش سوکسله تهیه شد (۱۴) در مرحله بعد پس از حل کردن عصار هیدروالکلی در آب با اضافه کردن مرحله‌ای ان بوتانول و اتیل استات از آن فراکسیون‌های مختلف آماده گردید. در این مطالعه ۳۶ راس رت نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم بصورت تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی شامل: گروه‌های کنترل، کمپرسیون، تیمار A (کمپرسیون + عصاره هیدروالکلی با دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)، تیمار B (کمپرسیون+ فراکسیون اتیل استات با دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)، تیمار C (کمپرسیون+ فراکسیون ان بوتانول با دوز ۷۵

میلی‌گرم/کیلوگرم) و تیمار D (کمپرسیون+ فاز آبی با دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) تقسیم شدند. در گروه کنترل، عضله در محل عصب سیاتیک بدون آسیب شکافته شد. در گروه‌های کمپرسیون و تیمار، برای اعمال کمپرسیون عصب سیاتیک، ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی رامپون و کتامین به نسبت ٦ و ٦٠ میلی‌گرم/کیلوگرم بیهوش شدند. سپس در پوست در محل سر استخوان ران برشی به طول یک سانتی-متر به کمک اسکارپل ایجاد کرده و پس از کنار زدن عضلات در عمق این ناحیه با پنس قفل‌دار ساده (قفل دوم) عصب سیاتیک به مدت ۳۰ ثانیه تحت کمپرسیون قرارگرفت. پس از کمپرسیون، عصب در محل طبیعی خود قرارگرفت و لبه‌های زخم توسط گیره مخصوص به هم بخیه زده شده و محل ضایعه ضدعفونی گردید (۱۸). در روزهای اول و هشتم عصاره و فراکسیون‌ها به هر گروه به صورت داخل صفاقی در دو نوبت تزریق شد. اولین مرحله تزریق بلافاصله بعد از انجام عمل کمپرسیون و تزریق دوم یک هفته بعد صورت پذیرفت. به منظور ارزیابی فاکتورهای مورد مطالعه در روز ۲۸ رت‌ها بیهوش گشته و از قطعات L4-L6 نخاع نمونه برداری شد. برخی از نمونه‌ها جهت مطالعات بافتی در فیکساتور ۱۰ درصد شده به مدت دو هفته قرار داده شدند و پس از آن وارد مراحل پاساژ بافتی شدند (۱۹). سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم (Cut6062) برش‌هایی با ضخامت ۷ میکرون، تهیه شد. برش‌گیری به صورت سریال صورت گرفته و از هر ۳۰ برش ۳ برش متوالی انتخاب و پس از قرارگرفتن در حمام آب گرم، به لام منتقل گردیدند. پس از آن نمونه‌ها با استفاده از رنگ آبی تلوئیدین- اریتروزین رنگ آمیزی شدند.در مرحله بعدی با استفاده از دستگاه فتومیکروسکوپ (Zeiss)، از منطقه شاخ قدامی نخاع در نیمه راست، از دو برش متوالی عکس‌هایی تهیه گردید. برای شمارش ذرات یعنی نورون‌های حرکتی آلفا از روش دایسکتور استفاده گردید (٤). از برخی نمونه‌ها توسط پروتکل کیت استخراج RNA شرکت پارس توس RNA استخراج شد. پس از ارزیابی کمیت RNA استخراج شده توسط نانودراپ از بهترین‌ها cDNA سنتز و توسط ریل تایم به کمک پرایمر اختصاصی بیان ژن-های کاسپاز ۳ و ۹ ارزیابی شدند.از GAPDH به عنوان ژن خانه‌داری استفاده شد، (جدول ۱). برای آنالیز آماری داده‌ها در گروه‌های مورد آزمایش، از نرم‌افزار Minitab١٦ و آزمون Anova و t-test با سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ استفاده شد و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excell استفاده گردید.

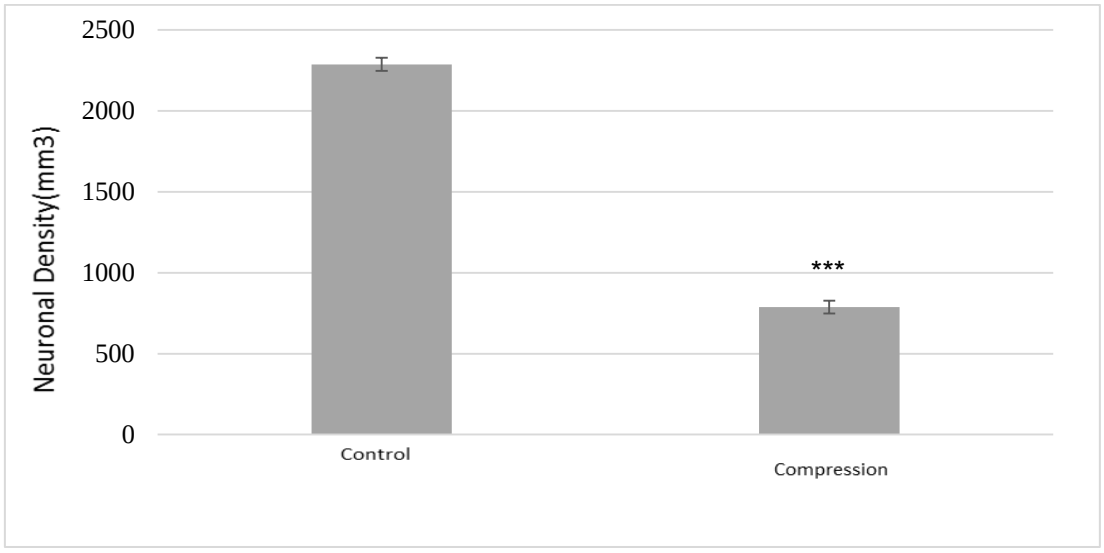
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹

Table 1. Sequence of primers used for caspase 3 and 9 genes

GENES	Primer Sequence	TM
Caspase 3	Forward: 5´-GCTGACTTCCTGTATGCTTAC -3´	57 ºC
	Reverse: 5´-GGAAGGTGGCAACGGAAT - 3´	55 ºC
Caspase 9	Forward: 5´-TCTCTTCATCTCCTGCTTAG -3	55 ºC
	Reverse: 5´-GCAAAGGAGCAGAGAGTA - 3´	53 ºC
GAPDH	Forward:5´-TGCTGGTGCTGAGTATGTCG -3	59 ºC
	Reverse: 5´-GCATGTCAGATCCACAACGG - 3´	

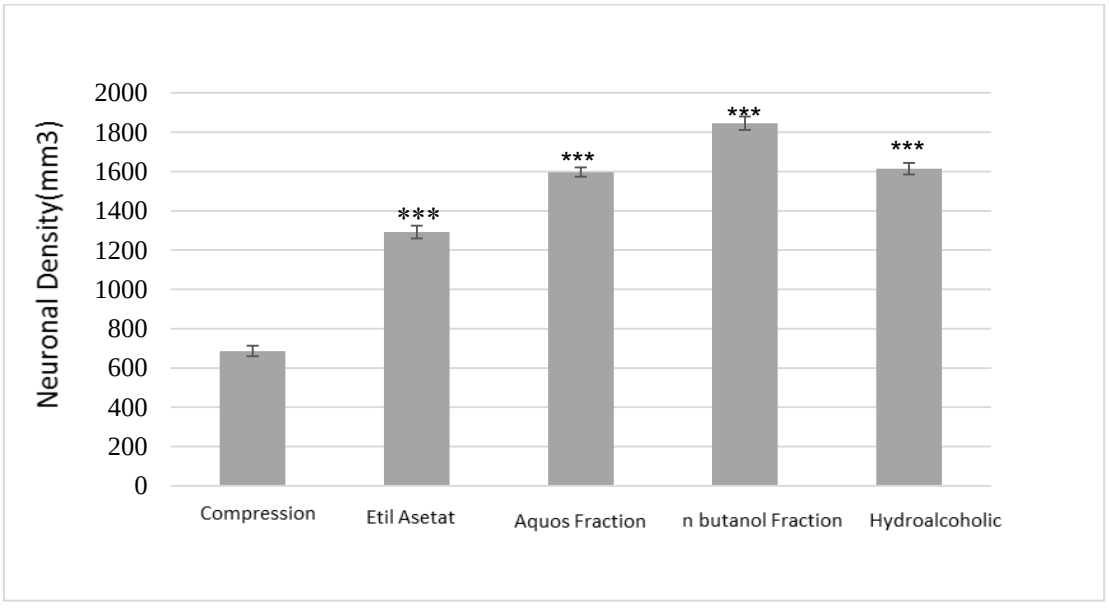
نتایج

نتایج حاصل از بررسی پدیده دژنراسیون مرکزی در طول ۲۸ روز پس از کمپرسیون عصب سیاتیک و بررسی اثرات نوروپروتکتیوی گروه‌های تیمار شده با فراکسیون ان بوتانول و فراکسیون اتیل استات گیاه غافث به صورت شمارش نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نیمه راست نخاع در نمودارهای ۱ و ۲ ارائه گردیده است. با توجه به این که مقدار p ۰/۰۰۰ = می‌باشد. تفاوت معنی‌داری بین دانسیته نورونی گروه کنترل و گروه کمپرسیون وجود دارد، به طوریکه دانسیته گروه کمپرسیون کاهش پیدا کرده است. با مقایسه مقدار p در آنالیز آماری بین تک تک گروه‌های تیمار با گروه کمپرسیون مشخص شده است. با توجه به (p <۰/۰۰۱) در تمام آنالیزها اختلاف (افزایش) معنی‌داری بین تک تک گروه‌های تیمار با گروه کمپرسیون وجود دارد، به طوری که بیشترین افزایش در دانسیته نورونی گروه ان بوتانول است. نتایج حاصل از برش‌های بافتی نخاع برای بررسی آلفا موتونورون‌های نخاع در نیمه راست شاخ قدامی در شکل۱ خلاصه شده است. در گروه کنترل جسم سلولی آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی نخاع به شکل منظم مشاهده می‌شود و هسته در مرکز قرار دارد. در گروه کمپرسیون ضایعه موجب دژنراسیون مرکزی و تخریب جسم سلولی آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی نخاع می‌شود. جسم سلولی به شکل بیضی و یا مثلثی در می‌آید. در گروه ان بوتانول به دنبال تغییرات در رژنراسیون آکسون، جسم سلولی به حالت طبیعی در آمده، تورم سلولی کم می‌شود، هسته به مرکز بر می-گردد و این تغییرات به ویژگی‌های گروه کنترل نزدیک می‌باشد. نتایج تغییرات بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در نمودارهای ۳ و ٤ خلاصه شده است. در نمودار ۳، مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۳ بین دو گروه کنترل و کمپرسیون اختلاف معناداری را نشان می‌دهد (۰/۰۰۱ > p). بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه کمپرسیون افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد و داده‌ها حکایت از این داشت که میزان فعالیت کاسپاز افزایش یافته است که حاکی از القای آپوپتوز است. مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۳ بین گروه تیمار عصاره هیدروالکلی گیاه غافث (دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با گروه کمپرسیون اختلاف معنی داری را نشان نمی‌دهد (مقایسه گروه تیمار با گروه کمپرسیون). مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۳ بین گروه تیمار عصاره ان بوتانول گیاه غافث (دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با گروه کمپرسیون اختلاف معناداری را نشان می‌دهد (p < ۰/۰۰۱). مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۳ در عصب سیاتیک بین گروه تیمار با فاز آبی گیاه غافث (دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با گروه کمپرسیون اختلاف معناداری را نشان می‌دهد (p < ۰/۰۵). مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۳ در عصب سیاتیک بین گروه تیمار با عصاره اتیل استات گیاه غافث (دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با گروه کمپرسیون اختلاف معناداری را نشان می‌دهد (۰/۰۰۱ > p). بیان ژن کاسپاز ۹ در گروه کمپرسیون افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۹ بین گروه تیمارعصاره هیدروالکلی ان بوتانول گیاه غافث (دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با گروه کمپرسیون کاهش معناداری را نشان می‌دهد (p <۰/۰۱) مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۹ بین گروه تیمار با فاز آبی و اتیل استات گیاه غافث (دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با گروه کمپرسیون کاهش معناداری را نشان می‌دهد.



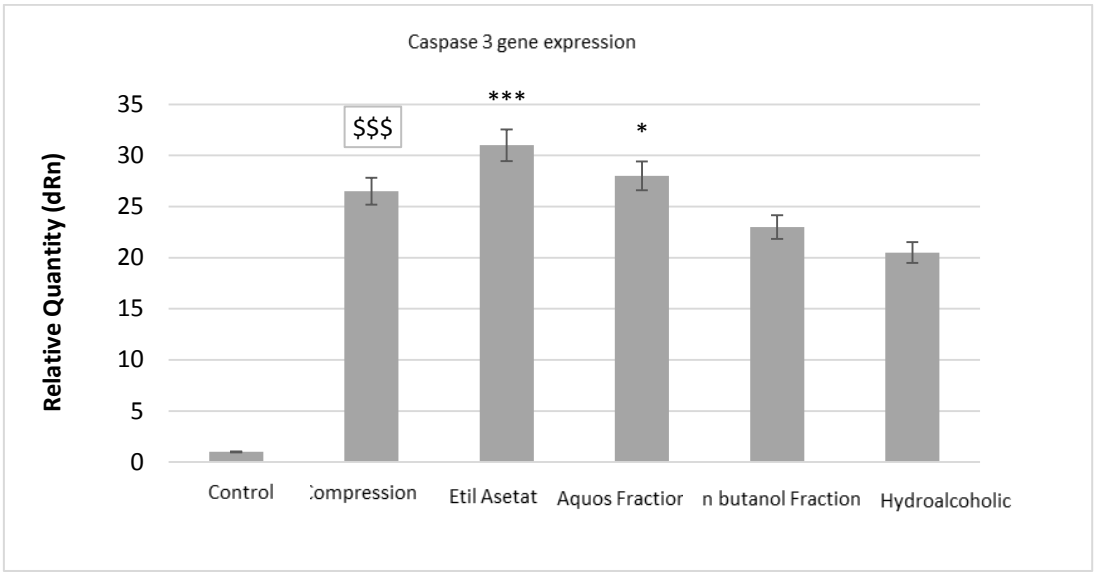
نمودار ۱- مقایسه دانسیته نورون‌های حرکتی آلفا شاخ نخاع در گروه کنترل و کمپرسیون (n = ٦) در هر گروه اعداد نشان دهنده: میانگین دانسیته نورونی ± خطای استاندارد می‌باشد. *** مقایسه گروه کنترل با کمپرسیون (p < ۰/۰۰۱)

Fig 1. Comparison of alpha motoneurons density of spinal cord in the control and compression groups (n=6) in each group, the numbers indicate: the average neuron density ± standard error. ***Comparison of the control group with compression (p < 0.001)



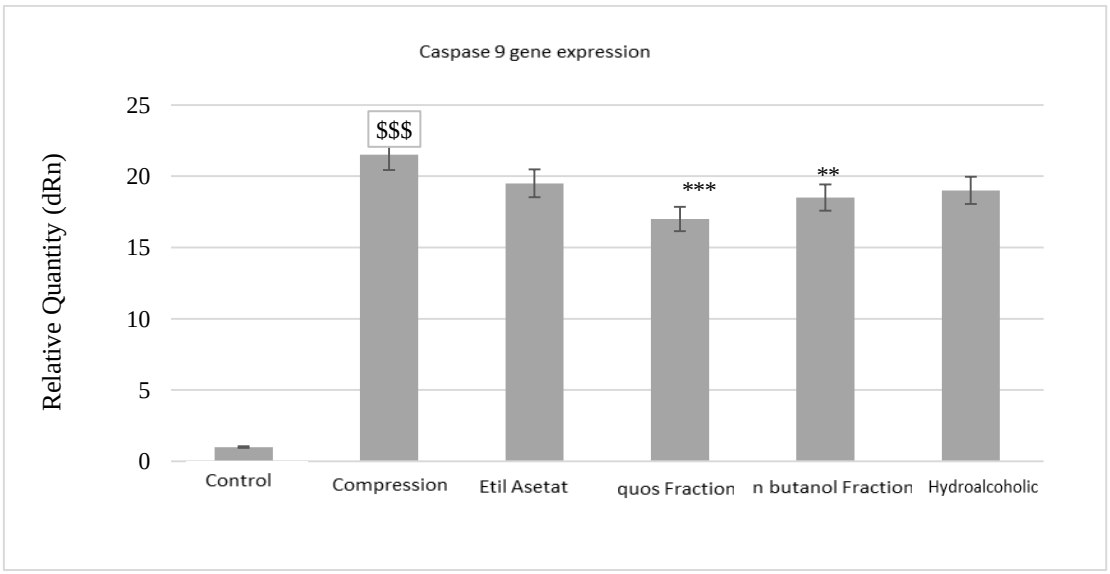
نمودار ۲- مقایسه دانسیته نورون‌های حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع در گروه کمپرسیون با گروه‌های تیمار اتیل استات و فاز آبی و ان بوتانول و هیدرو الکلی با دوز ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم. در هر گروه اعداد نشان دهنده: میانگین دانسیته نورونی ± خطای استاندارد می‌باشد. *** اختلاف معناداری را نشان می‌دهد (p < ۰/۰۰۱) (مقایسه گروه‌های تیمار با کمپرسیون).

Fig 2. Comparison of alpha motoneurons density of the anterior horn of the spinal cord in the compression group with the ethyl acetate and aqueous phase, n-butanol and hydroalcoholic treatment groups with a dose of 75 mg/kg. In each group numbers indicate: average neuron density ± standard error. *** indicates a significant difference (p < 0.001) (comparison of treatment groups with compression).



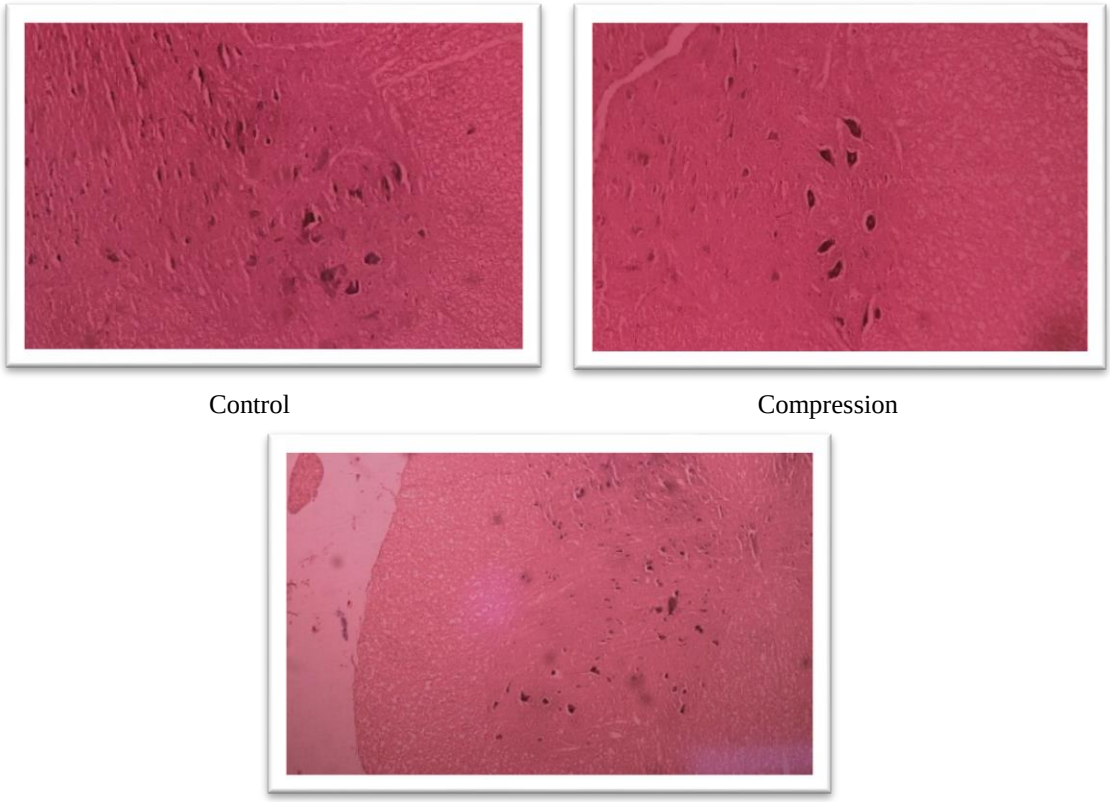
نمودار ۳- مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه‌های مختلف. $$$ اختلاف معناداری را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۰۱$) (مقایسه گروه کنترل با کمپرسیون)، *** اختلاف معناداری را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۰۱$) (مقایسه گروه‌های تیمار با کمپرسیون)، * اختلاف معناداری را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۵$) (مقایسه گروه‌های تیمار با کمپرسیون)

Fig 3. Comparison of caspase 3 gene expression intensity in different groups. $$$ indicates a significant difference ($p < 0.001$) (comparing the control group with compression),*** indicates a significant difference ($p < 0.001$) (comparing the treatment groups with compression), * indicates a significant difference gives ($p < 0.05$) (comparison of treatment groups with compression)



نمودار ٤- مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۹ در عصب سیاتیک در گروه‌های مختلف. $$$ اختلاف معناداری را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۰۱$) (مقایسه گروه کنترل با کمپرسیون)، ** ($p < ۰/۰۱$) و *** ($p < ۰/۰۰۱$) اختلاف معناداری را نشان می دهد (مقایسه گروه‌های تیمار با کمپرسیون)

Fig 4. Comparison of caspase 9 gene expression intensity in sciatic nerve in different groups. $$$ indicates a significant difference ($p < 0.001$) (comparing the control group with compression), ** and *** indicate a significant difference ($p < 0.001$ and $p < 0.01$) (comparing the treatment groups with compression)



شکل ۱- برش عرضی نخاع در گروه‌های مختلف. رنگ آمیزی: آبی تولوئیدین – اریتروزین. (درشت نمایی × ۴۰)

Fig 5. Transverse section of the spinal cord in different groups. Staining: toluidine blue - erythrosine. (Magnification × 40)

بحث

نتایج مقایسه دانسیته نورونی بین گروه کمپرسیون و گروه‌های تیمار نشان داد که تمام گروه‌های تیمار اختلاف معنی‌داری در دانسیته نورونی با گروه کمپرسیون داشته‌اند ($p < ۰/۰۰۱$). بطوریکه بیشترین دانسیته نورونی به ترتیب مربوط به گروه ان بوتانول با میانگین ۱۸٦٤ سپس گروه هیدروالکلی با میانگین ۱٦۱٤ و فاز آبی ۱۵۹۷ و در نهایت گروه اتیل استات با میانگین ۱۲۹۲ می باشد. مطالعات فیتوشیمی گیاه غافث نشان داد که این گیاه دارای ترکیبات ارزشمندی مانند: آگریمونین، کاتچین، پروسیانیدین، کوئرستین، لوتئولین، کامفرول، یوگنول و فلاونوئیدها است که در طب سنتی کاربرد فراوان دارد. این ترکیبات باعث اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانتی گیاه غافث می‌گردند (۲) به دنبال کمپرسیون عصب، در محل ضایعه سوپر اکسیدها (مولکول‌های اکسیژن با یک الکترون اضافه) و نیتریک اکساید تولید شده و آسیب‌های اکسیداتیو را موجب می‌شوند. سوپر اکسیدها به پراکسید هیدروژن متصل شده و رادیکال‌های هیدروکسیل را به وجود می‌آورند. تجمع این رادیکال‌ها سبب آسیب‌های ثانویه بافت آسیب دیده شده و در نهایت می‌توانند منجر به مرگ نورون‌ها شوند. از طرفی این رادیکال ها، واکنش های دژنراسیون را پیش برده و باعث نفوذ بیش از حد یون کلسیم به داخل سلول و آغاز روندهای مرگ سلولی می‌گردند (۱۳). وجود فلاونوئیدها و مواد آنتی-اکسیدانی باعث جلوگیری از پیشرفت ضایعه گشته و

روندهای ترمیمی را بهبود و سرعت می‌بخشند. همانطور که در نمودار ۲ مشخص است تمام گروه‌های دریافت کننده عصاره‌های مختلف دانسیته نورونی بیشتری نسبت به گروه کمپرسیون داشته اند که می تواند نشان دهنده بهبود روندهای ترمیمی در این گروه‌ها به علت حضور ترکیبات موثر در عصاره‌ها باشد. این نتایج هم راستا با نتایج بی و همکاران در سال ۲۰۱۰ است که نشان دادند عصاره آبی گیاه غافث باعث کاهش پاسخ التهابی می‌گردد (۳). چرا که در روند کمپرسیون عصب بعد از مدتی فرآیندهای التهابی فعال می‌شوند. ورود سلول‌های التهابی به منطقه آسیب و مواد حاصل از فعالیت آن‌ها باعث ایجاد محیط شیمیایی زیان‌آور و آسیب بیشتر به بافت‌های عصبی می‌گردد. بنابراین سرکوب واکنش-های التهابی می‌تواند در ترمیم عصب مؤثر باشد. از طرفی کره یا و همکاران در سال ۲۰۰۷، در یک بررسی تجربی اثر حفاظتی از عصارهٔ گیاه غافث را بر رادیکال‌های آزاد مورد بررسی قرار دادند (۸). که باز هم راستا با اثرات حفاظتی عصاره این گیاه در تحقیقات انجام شده در این پژوهش است. تحقیقات نشان می دهد که آسیب‌های نخاعی منجر به بروز آپوپتوز و راه اندازی مسیرهای مرگ داخل سلولی می‌شود در حقیقت برخی از پروتئازهای فعال کننده آپوپتوز کاسپازهای ۳ و ۹ می‌باشند که با قطعه قطعه کردن DNA سلول ها را از درون تجزیه می‌کنند و باعث مرگ سلولی و در نهایت کاهش دانسیته نورونی می‌گردند (۱۷). نتایج حاصل از بررسی بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در این پژوهش نشان داد که در گروه کمپرسیون بیان کاسپاز ۳ و ۹ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته که با ایجاد مرگ نورونی، خود می‌تواند علت کاهش دانسیته نورونی در نمونه-های این گروه باشد. در حقیقت کاسپاز مانند یک آنزیم عمل می‌کند که به تدریج سلول و مواد ژنتیکی را هضم می‌کند و باعث تغییرات مورفولوژیک در طی آپوپتوز می‌شود، قطعه قطعه شدن DNA، فعال شدن کاسپاز ۳ و بیان پروتئین های BCL، BAX وP53 از جمله شواهد آپوپتوز است (۱۵). نتایج این تحقیق کاهش معنی‌داری در بیان کاسپاز ۳ در گروه ان بوتانول و هیدروالکلی نسبت به گروه کمپرسیون را نشان داد که هم راستا با نتایج دانسیته نورونی است. از طرفی در بررسی بیان ژن کاسپاز ۹ در تمام گروه‌های تیماری نسبت به گروه کمپرسیون کاهش مشاهده گردید. از آنجایی که که کاسپاز ۹ از کاسپازهای آغازگر و کاسپاز ۳ اجرایی است (۱۰). ظاهرا اجزای موثره موجود در فراکسیون ان بوتانول هر دو مسیر داخلی و بیرونی آپوپتوز را تا حدی مهار کرده است و از این طریق توانسته روندهای ترمیمی را بهبود بخشد. بنابراین مکانیسم مولکولی احتمالی پیشبرد روند ترمیم در ضایعه سیستم عصبی مهار نسبی فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ بوده است که نیازمند مطالعات بیشتر است.

نتیجه‌گیری

تزریق عصاره هیدروالکلی گیاه غافث و فراکسیون-های اتیل استات و ان بوتانول و فاز آبی آن در دفعات ۲ بار در طی ۲۸ روز پس از کمپرسیون (روز اول و هشتم) باعث افزایش معنی داری در دانسیته نورونی گروه‌ها گردید. بطوریکه بیشترین دانسیته در گروه ان بوتانول مشاهد شد بررسی بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ مشخص کرد مکانیسم مولکولی مهار یا کاهش مرگ سلولی کاسپاز بوده است. بنابراین عصاره‌های ذکر شده گیاه غافث احتمالا بدلیل داشتن اثرات انتی اکسیدانتی و ضدالتهابی و آنتی آپوپتوزی می توانند باعث ترمیم سیستم عصبی شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه با عنوان بررسی اثر فراکسیون‌های اتیل استات و ان بوتانول عصاره هیدروالکلی غافث (*Arimonia eupatoria*) بر ترمیم نورون های شاخ قدامی نخاع و بیان ژن های کاسپاز ۳ و۹ پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت های نر نژاد ویستار مصوب دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد واحد مشهد می‌باشد و نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی واحد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Adhiah A.H., Al-bederi O., Al-sammarrae K.W. 2013. Cytotoxic effects of Agrimonia eupatoria L. against.cancer cell lines in vitro. *J Assoc Arab Univ Basic Appl Sci*, 14: 87-92, 2013.

2.Al-snafi A. 2015. AE: The pharmacological and therapeutic importance of Agrimonia eupatoria - a review. Asian J Pharm Sci. *Technol*, 5: 112–117.

3. Bae H., Kim H-J., Shin M., Lee H., Yin C.S., Ra J., Kim J. 2010. Inhibitory effect of Agrimoniae Herba on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and proinflammatory cytokine production in BV2 microglial cells. *Neurol Res*, 32: 53–57.

4. Behnam-Rasouli M., Nikravesh MR., Mahdavi-Shahri N. and Tehranipour M. 2000. Post-Operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alpha motoneurons ,using a stereological (Disector). *Iran. Biomed. J*, 4(1): 45-9.

5. Benchoua A., Couriaud C., Guegan C. 2002.Active caspase-8 trans-locates to the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. *J Biol Chem*, 277:34217–22.

6. Cain K., Bratton SB., Cohen GM. 2002. The Apaf-1 apoptosome: A large caspase-activating complex. *Biochemie*, 84:203–14.

7. Cande C., Cohen I., Daugas E. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): A novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 84:215–22.

8. Correia H.S., Batista M.T., Dinis T.C.P. 2007. The activity of an extract and fraction of Agrimonia eupatoria L. against reactive species. *BioFactors*, 29: 91–104

9. Ferrer I., Planas A.M. 2003. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(4): 329-39.

10.Gyrd-Hansen M., Farkas T., Fehrenbacher N., Bastholm L., Høyer-Hansen M., Elling F., Wallach D., Flavell R., Kroemer G., Nylandsted J., Jäättelä M. 2006. Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Mol Cell Biol*, 26(21):7880-91.

11. Hernando R. 2010. Neurological improvement of injured sciatic nerve following omental transplantation. *J Neurol Sci* , 27(2): 254-6.

12. Leker R.R., Shohami E. 2002.Cerebral ischemia and trauma—Different etiologies yet similar mechanisms: Neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev*, 39:55–73.

13. Nesic O., Xu GY., McAdoo D., High K.W., Hulsebosch C. and Perez-Pol R. 2001. IL-1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 18(9): 947-56.

14.Rakhshandah H., Shakeri MT. and Ghasemzadeh MR. 2007. Comparative Hypnotic Effect of Rosa damascena Fractions and Diazepam in Mice. *Iranian J Pharmaceuti Res*, 6(3): 193-197.

15.Sommer C., Schomacher M., Berger C., Kuhnert K., Muller H.D., Schwab S., Schabitz W.R. 2006. Neuroprotective cannabinoid receptor antagonist SR141716A prevents downregulation of excitotoxic NMDA receptors in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol*, 112(3):277-86.

16. Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. Apopotosis signaling. 2000. 69:217–45.

17. Sun X.M., Bratton S.B., Butterworth M., MacFarlane M., Cohen G.M. 2002. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactiva-tion of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem*, 277:1345–51.

18. Tehranipour M. Javadmoosavi Z. 2011. The neuroprotective effect of alcoholic extract of cannabis sativa on neuronal density of spinal cord alpha motoneurons after sciatic nerve injury in rat .*j shaheed sadoughi uni med sci*, 19(3). 49-339.

19. Tehranipour M. and Ghadamyari T. 2010. The effects of root aquatic extract of Salvia staminea on neuronal density of alpha motoneurons in spinal cord anterior horn after sciatic nerve compression in rat. *J Biol Sci*, 10(1): 48-52.

20. Zoltan P. , Biriczova L. , Pallag G., Carvalheiro Marqes E., Vargova N., Kmonickova E.2020. The Therapeutic Effects of Agrimonia eupatoria L. *Physiol. Res*, 69(4):S555-S571