

## مقاله پژوهشی

# بررسی اثرات ترمیمی رزمارینیک اسید بر نقیصه تجربی نخاع در مدل حیوانی موش صحرایی نژاد ویستار

سید احمد عمادی<sup>۱</sup>، هادی نداف<sup>۲</sup>، الهام حویزی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دوره دستیاری تخصصی جراحی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

<sup>۲</sup> استاد بخش جراحی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

<sup>۳\*</sup> دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات: e.hoveizi@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۳

## چکیده

**سابقه و اهداف:** آسیب طناب نخاعی وضعیتی است که در آن پارانشیم نخاع در اثر ضربه یا بیماری‌های مختلف آسیب می‌بیند. بخشی از آسیب‌های نخاعی عمدتاً توسط واکنش‌های التهابی ایجاد می‌شوند که عملکرد سلول را تغییر می‌دهد و باعث مرگ سلول‌های عصبی باقی مانده می‌شود. رزمارینیک اسید، یک پلی فنول فیتوشیمیایی محلول در آب، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوز است.

**روش بررسی:** در این پژوهش ۱۲ موش صحرایی از نژاد ویستار در دو گروه با جمعیت مساوی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. گروه کنترل هیچ درمانی پس از آسیب نخاعی تا روز ۵۶ مطالعه دریافت نکردند و گروه رزمارینیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره رزمارینیک اسید در آب آشامیدنی تا روز ۵۶ پس از آسیب نخاعی دریافت کردند. در طول این دوره موش‌ها از نظر حرکتی با آزمون باسو - بتی - برسناهان (Basso, Beattie and Bresnahan) مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.

**یافته‌ها:** بر اساس ارزیابی بازیابی حرکتی موش‌ها، گروه تحت درمان با رزمارینیک اسید نسبت به گروه کنترل نمره بالاتری را کسب کردند. همچنین نتایج حاصل از بررسی مقاطع بافتی نشان دهنده بهبودی و ترمیم بهتر، کاهش حجم عارضه و افزایش میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل آسیب نخاعی در گروه تحت درمان با رزمارینیک اسید به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شد ( $p < 0/005$ ).

**بحث:** نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده اثرات ترمیمی رزمارینیک اسید در آسیب‌های نخاعی در موش‌های صحرایی می‌باشد که ممکن است بعنوان یک عامل درمانی برای درمان صدمات نخاعی مورد استفاده قرار گیرد.

**کلیدواژه‌ها:** ضایعه نخاعی، رزمارینیک اسید، محافظت عصبی، التهاب، مدل حیوانی.

## مقدمه

به فلج شدن سیستم‌های عصبی حسی، حرکتی و خودکار در پایین‌تر از محل آسیب می‌شود. تقریباً ۲۵۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ نفر هر ساله در سراسر جهان دچار آسیب نخاعی می‌شوند و تخمین

آسیب طناب نخاعی (SCI) وضعیتی است که در آن پارانشیم نخاع در اثر ضربه یا بیماری‌های مختلف آسیب می‌بیند و منجر

ایمپلنت‌های عصبی و سلول‌های بنیادی باعث پیشرفت در کاهش التهاب عصبی، رشد آکسونی، افزایش میلین و کاهش اندازه نقیصه می‌شود [۱۱]. فیزیولوژی طبیعی طناب نخاعی شامل تعامل بین بسیاری از انواع سلول مانند آستروسیت‌ها، نورون‌ها، میکروگلیا و الیگودندروسیت‌ها می‌باشد. پس از آسیب ستون فقرات، این فعل و انفعالات چند سلولی قطع شده و به هم ریخته و منجر به اختلال در بهبود ستون فقرات می‌شود [۱۲].

درمان‌های موجود محدود است و تنها به بیماران دارای ناتوانی مادام‌العمر، کمک حمایتی می‌کنند [۱۳]. عوامل مختلفی مانند ویژگی‌های پیچیده، ناسازگاری‌های فراوان و پیامدهای پاتوفیزیولوژیک پیچیده پس از آسیب نخاعی دلایل اصلی درک ضعیف و شکست درمان آسیب نخاعی هستند [۱۴]. بنابراین، مداخله درمانی زودهنگام یک استراتژی مهم برای بازیابی عملکردی در درمان آسیب نخاعی است و تحقیقات پایه و بالینی به طور فعال بر روی مراحل حاد و تحت حاد آسیب نخاعی در حال انجام است [۱۵].

آسیب اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز نقش مهمی در گسترش آسیب ثانویه پس از آسیب نخاعی دارند [۱۶]. بر این اساس، از فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی به صورت درمانی در بیماران آسیب نخاعی استفاده می‌شود. علیرغم میزان بالای مرگ و میر حاصل از این آسیب و فقدان درمان موثر برای آسیب نخاعی وجود دارد. اما محصولات طبیعی منبع مهمی از داروهای جدید برای درمان آسیب‌های عصبی هستند [۱۷]. گیاهان دارویی برای مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولید شده در طول فتوسنتز، آنتی‌اکسیدان‌هایی تکامل یافته دارند [۱۸]. آنتی‌اکسیدان‌های حاصل از منابع گیاهی نقش مهمی در حفظ سلامت انسان دارند. در واقع، اجزای گیاهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مدل آسیب نخاعی نشان داده‌اند. بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی پتانسیل درمانی برای آسیب نخاعی محسوب می‌شوند [۱۷].

برای اولین بار، در سال ۱۹۵۸، اسکارپتی و اورینته، دو شیمیدان ایتالیایی، رزمارینیک اسید (RA) را به عنوان یک عامل اصلی جدا کردند و مطابق با گیاهی که از آن مشتق شده بود، *Rosmarinus officinalis* نامگذاری نمودند [۱۹، ۲۰]. اسید رزمارینیک به عنوان یک ترکیب پلی فنول طبیعی محلول در آب

زده می‌شود که ۲ تا ۳ میلیون نفر با ناتوانی‌های مربوط به آسیب نخاعی زندگی می‌کنند [۱]. آسیب طناب نخاعی یکی از چالش‌های جدی سلامت است و جنبه‌های مختلفی از زندگی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲]. نخاع آسیب دیده می‌تواند در اثر آسیب اولیه به دلیل تروما و به دنبال آن آسیب ثانویه به دلیل پاسخ‌های التهابی آسیب ببیند، که منجر به از دست دادن عملکرد به دلیل آسیب بیشتر می‌شود، اما نشان داده شده است که هنوز نوروپلاستیسته نسبتاً کمی در مراحل اولیه وجود دارد [۳].

پاتوژنز آسیب نخاعی شامل آسیب اولیه و ثانویه است. آسیب اولیه به آسیب مکانیکی ناشی از اعصاب نخاعی در هنگام تروما و آسیب ساختاری عروقی غیرقابل برگشت، پارگی آکسون و مرگ سلول‌های عصبی اشاره دارد. درحالی‌که آسیب ثانویه به آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد، سمیت گلوتامات، استرس اکسیداتیو، افزایش کلسیم داخل سلولی، آپوپتوز عصبی و تشکیل اسکار گلیال در مجاورت محل آسیب معطوف می‌شود [۴]. آسیب ثانویه عمدتاً توسط واکنش‌های التهابی ناشی از سلول‌های التهابی ایجاد می‌شود که عملکرد سلول را تغییر داده و باعث مرگ سلول‌های عصبی باقی مانده می‌شود. مرگ عصبی ناشی از آسیب اولیه قابل برگشت نیست [۵] و بنابراین، توجه زیادی بر درمان‌های بالقوه برای آسیب‌های ثانویه آسیب نخاعی متمرکز شده است. آسیب ثانویه باعث تشدید آسیب اولیه از طریق فعال کردن آبخاری از مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مخرب که منجر به وسعت ناحیه تروما می‌شود [۶]. شایان ذکر است که در آسیب نخاعی، واکنش التهابی از طریق سلول‌های میکروگلیا و لوکوسیت‌های گردش خون که بعد از مدت زمان کوتاهی پس از آسیب به محل ضایعه هجوم می‌آورند، شکل می‌گیرد [۷، ۸] از این رو التهاب را عامل اصلی در مرگ سلولی ثانویه بعد از آسیب نخاعی بیان داشته‌اند. از طرف دیگر در سیستم عصبی مرکزی؛ به علت محدودیت در ظرفیت ترمیم آکسون و جایگزینی نورون‌های آسیب دیده و سلول‌های گلیال، اثرات مضر التهاب در این سیستم نسبت به دیگر بافت‌ها بیشتر است و این امر موجب برگشت ناپذیری عملکرد سیستم عصبی مرکزی می‌گردد [۹] بنابراین، در آسیب و ترمیم عصبی آسیب دیده، التهاب نقش اساسی و مهمی دارد [۱۰]. مطالعات مختلف حیوانی نشان داده است که تجویز درمان‌های فعلی آسیب نخاعی مانند داروها،

گلوکوکورونیداسیون، سولفات‌ها شدن و متیلاسیون رزمارینیک اسید هستند که در ادامه از طریق ادرار دفع می‌شوند [۳۰، ۳۱]. در حال حاضر هیچ روش قطعی برای درمان آسیب‌های نخاعی مطرح نشده و درمان‌های انجام شده صرفاً باعث کاهش عوارض ناشی از آسیب‌های نخاعی می‌شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات ترمیمی رزمارینیک اسید بر نقیصه تجربی نخاع در مدل حیوانی موش صحرایی نژاد ویستار می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی حاصل از پروژه تحقیقاتی دانشجوی دکتری می‌باشد که در سال ۱۴۰۱-۱۴۰۲ در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسیده است. این پژوهش به وسیله کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز با شماره EE / 99.3.02.5284/scu.ac.ir تأیید شد.

۱۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار بالغ ماده با وزن حدود ۲۵۰ گرم از خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه گردید و به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن با محیط به مدت یک هفته با دسترسی آزاد به غذا و آب و با سیکل روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی در دمای محیط نگهداری ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد تا روز انجام جراحی‌ها نگهداری شدند. به منظور ایجاد نقیصه تجربی نخاع، ابتدا موش‌ها صحرایی با داروی بی‌هوشی کتامین ۱۰٪ با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۲٪ با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بی‌هوش شدند [۳۲]. به منظور ایجاد نقیصه تجربی نخاع یک برش خطی پوست در طول ناحیه پشتی موش صحرایی بر روی ستون مهره از محدوده مهره T9-T12 ایجاد شد. بعد از برش پوست و کند کاری عضلات، سقف مهره T10 توسط دیاموند سایز ۲ دندان‌پزشکی برداشته شد و نیمی از ضخامت نخاع به وسیله قیچی کاستروویجیو برش داده شد. سپس موضع جراحی توسط سرم نرمال سالین با دمای ۳۷ درجه شستشو شد در ادامه عضلات موضع برش با استفاده از نخ بخیه پلی‌گلیکولیک اسید شماره ۴-۰ و پوست با نخ نایلون شماره ۴-۰ بسته شد جهت جلوگیری از عفونت‌های احتمالی روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انروفلوکساسین (رویان دارو، ایران) به صورت زیرجلدی به مدت ۳ روز تزریق شد و ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن

در بسیاری از گیاهان یا عطرهای طبیعی سنتی مانند رزماری، نعناع، پریلا و مریم‌گلی وجود دارد [۲۱]. RA می‌تواند از سد خونی مغزی عبور کند و نفوذپذیری آن را تحت تاثیر قرار دهد [۲۲] شواهد نشان می‌دهد RA اثرات مفیدی در بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی دارد (۲۳).

RA یک آنتی‌اکسیدان طبیعی است که می‌تواند رادیکال‌های آزاد و اکسیدان‌ها را از بین ببرد. تجویز RA در یک مدل موش، دردهای نوروپاتی را بواسطه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی کاهش داد [۲۴]. علاوه بر این، RA اثرات محافظت‌کننده عصبی قدرتمندی در برابر بیماری پارکینسون، بیماری آلزایمر و بیماری‌های ایسکمیک مغزی اعمال می‌کند [۲۵، ۲۶]. یافته‌ها نشان می‌دهد که RA بهبود وضعیت حرکتی بعد از SCI را بهبود می‌بخشد و به طور قابل توجهی نقص عصبی را کاهش می‌دهد، حفظ نورون‌ها را افزایش داده و آپوپتوز را کاهش می‌دهد. همچنین، RA از فعال شدن میکروگلیا و آزادسازی  $IL-6$ ،  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و MDA جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، مسیریاری  $Nrf2$  و  $NF-\kappa B$  به عنوان اهداف RA بیان شده است. بنابراین، اثر محافظت‌کننده عصبی رزمارینیک اسید بر روی بیماران دارای آسیب‌های نخاعی، ممکن است به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن باشد که با تعدیل مسیرهای  $Nrf2/HO-1$  و  $TLR4/NF-\kappa B$  اعمال می‌شود (۲۷). کوی و همکاران گزارش نمودند که RA دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدآپوپتوز است که از سکنه مغزی ایسکمیک محافظت می‌کند [۲۸] و یک اثر محافظتی عصبی در برابر آسیب سلول‌های عصبی ناشی از هیدروژن پراکسید نشان می‌دهد [۲۹]. اگرچه در مطالعات شانگ و همکاران بیان شده است که RA می‌تواند از نخاع در برابر آسیب محافظت کند ولی هنوز نقش و مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ای RA در آسیب نخاعی نامشخص است [۱۷]. در مطالعات دیگر یافته‌ها نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید باعث کاهش درد و رفتارهای ناشی از آسیب‌های نوروپاتی شده است [۲۴].

مطالعات نشان داد که رزمارینیک اسید به راحتی در دستگاہ گوارش جذب می‌شود، با انتشار غیرفعال از اپیتلیوم روده عبور می‌کند و در نیم ساعت پس از تجویز به حداکثر غلظت پلاسمایی خود می‌رسد. متابولیت‌های تشکیل شده شامل

عصبی استفاده شد. مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکپ نوری مدل نیکون، (ECLIPSE E200, Japan) با بزرگنمایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت و تصاویر مقاطع بافتی توسط نرم افزار Image J مورد آنالیز قرار گرفت.

با توجه به نتایج آزمون همگونی واریانسها و آزمون توزیع نرمال داده‌ها (Kolmogorov-Smirnoff) داده‌های بدست آمده کمی، به صورت میانگین و انحراف استاندارد ارائه و اختلاف معنی دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) و  $\alpha=0.05$ ، در سطح معنی داری  $p>0.05$  توسط بسته نرم افزاری SPSS ویرایش ۱۸ برآورد گردید.

### یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون عملکردی - حرکتی باسو-بتی - برسنهان از روز دوم تا روز ۵۶ بعد از ایجاد نقیصه نخاعی در جدول شماره ۱ آمده است. بر اساس این نتایج در روزهای دوم و هفتم اختلاف معنی داری بین گروه‌های کنترل و رزمارینیک اسید یافت نشد ( $p>0.05$ ). اما در روز چهاردهم و بیست و یکم اختلاف بین دو گروه بصورت معنی دار بود ( $p<0.05$ ). در روز ۲۸ نیز اختلاف عملکردی حرکتی بین دو گروه دریافت کننده رزمارینیک اسید نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود ( $p>0.05$ ). بررسی نتایج به دست آمده در روزهای ۳۵، ۴۲، ۴۹ و ۵۶ بعد از ایجاد نقیصه تجربی نخاع نشان داد که گروه تحت درمان با رزمارینیک اسید نسبت به گروه کنترل از نظر توانایی حرکتی نتایج بهتری داشته و اختلاف معنی داری بین دو گروه دیده شد ( $p<0.05$ ).

کتوپروفن (رویان دارو، ایران) به صورت زیر جلدی به مدت ۳ روز تزریق شد [۳۳، ۳۴]. تعداد ۱۲ موش ویستار در ۲ گروه با جمعیت ۶ تایی تقسیم شده، گروه اول به عنوان گروه کنترل انتخاب شده و هیچ نوع درمانی در این گروه صورت نپذیرفت و در گروه دوم به عنوان گروه رزمارینیک اسید (سیگما، آمریکا)، با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم در روز به صورت خوراکی و محلول در آب آشامیدنی روزانه به موش‌ها داده شد.

جهت ارزیابی حسی - حرکتی به دنبال ایجاد نقیصه تجربی نخاع در موش‌های مورد آزمایش توسط روش Basso, Beattie and Bresnahan یا BBB در روزهای ۴۲، ۴۹، ۵۶، ۳۵، ۲۸، ۲۱، ۱۴، ۷، ۲، ۰ ارزیابی صورت گرفت. امتیاز دهی در این روش به این گونه می‌باشد که حرکت مفاصل به همراه حرکت جزئی اندام حرکتی خلفی و یا عدم حرکت اندام خلفی امتیاز ۰ تا ۷، قدم زدن نا هماهنگ امتیاز ۸ تا ۱۳ و راه رفتن هماهنگ و منظم بر روی اندام حرکتی خلفی و قدامی امتیاز ۱۴ تا ۲۱ را دریافت خواهد کرد. امتیازدهی توسط ۲ ناظر ثبت شد و در صورت عدم تفاهم نظر دو ناظر کمترین امتیاز ثبت گردید.

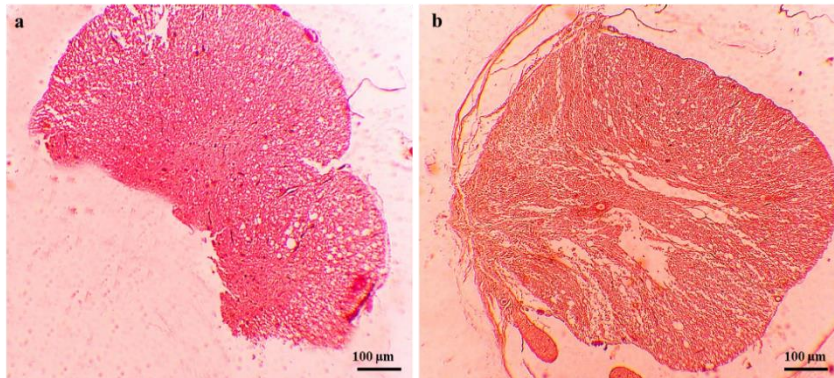
جهت ارزیابی هیستومورفومتری (حجم ضایعه و میلینه شدن رشته‌های عصبی) در انتهای دوره نگهداری ۵۶ روزه، موش‌ها با استفاده از دوز بالای بیپوشی آسان کشی شده و قطعات مورد نظر نخاع نمونه برداری شد. نمونه‌ها در محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شده و پس از تثبیت نمونه بافتی، و تهیه مقطع به منظور بررسی کمی و کیفی بافت‌شناسی از دو روش رنگ‌آمیزی هماآتوکسیلین اتوزین جهت تعیین حجم ضایعه و رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو به منظور تعیین در صد میلینه شدن رشته‌های

جدول ۱ - نتایج آزمون عملکردی حرکتی BBB در دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل از روز دوم تا روز پنجاه و شش بعد از ایجاد نقیصه تجربی نخاع

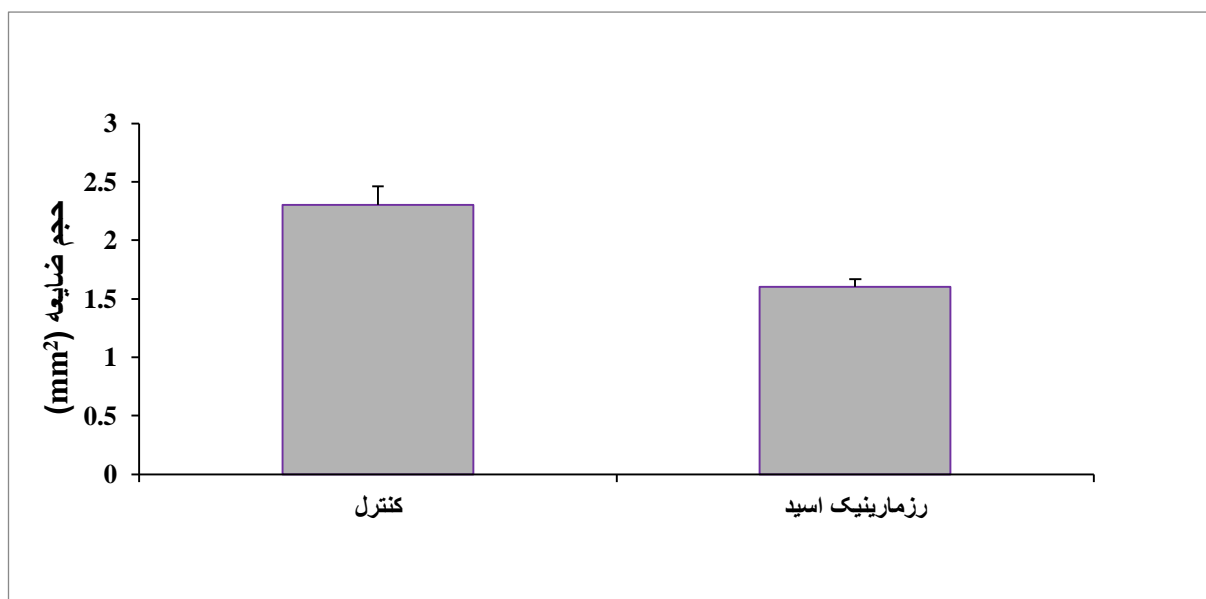
p-value	Z	میانگین	مقایسه‌ها
0.54	-1.4228482	0.50	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز دوم
0.219	-0.9978987	3.40	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز هفتم
.002	-0.5436423	6.50	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز چهاردهم
.002	0.1597224	11.30	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز بیست یکم
.062	0.4234842	13.10	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز بیست هشتم
.000	0.8044734	15.70	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز سی و پنج
.000	0.9363543	16.60	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز چهل دو
.000	0.9949680	17.00	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز چهل نه
.000	1.1415023	18.00	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز پنجاه و شش

نخاع و کمترین میزان ترمیم در گروه کنترل با بیشترین حجم ضایعه (به صورت میانگین  $2/3$  میلیمتر مکعب) مشاهده گردید (تصویر شماره ۱ و ۲) ( $P < 0.0001$ ). همچنین نتایج به دست آمده از بررسی تصاویر مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با رنگ آمیزی لوکسال فست بلو در دو گروه کنترل و رزمارینیک اسید نشان دهنده تفاوت معنی دار در میزان میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل تقیصه تجربی نخاع در ۵۶ روز بعد از عمل در دو گروه می باشد ( $P < 0.0001$ ). میزان میلینه شدن رشته‌های عصبی بر اساس درصد در محل عارضه نخاعی در گروه رزمارینیک اسید به صورت میانگین ۱۱ درصد و در گروه کنترل  $1/4$  درصد مشاهده شد (تصویر شماره ۲ و ۳).

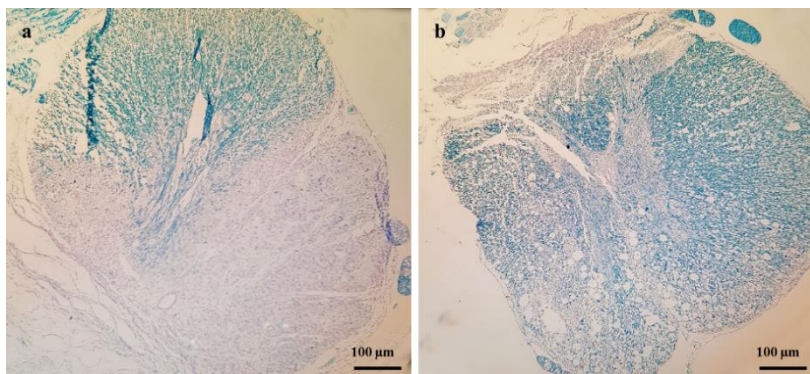
نتایج بدست آمده از مشاهده میکروسکوپی از مقاطع بافتی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین نشان داد که در گروه کنترل، در محل عارضه سلول‌های دژنره و واکوئله شده بافتی، سلول‌های التهابی و بافت فیروز شده تشکیل شده است که گواه بر عدم رخداد ترمیم مناسب در این گروه می باشد و در گروه رزمارینیک اسید به دلیل حضور تعداد پایین سلول‌های التهابی ترمیم بافتی بهتر بوده است. همچنین نتایج به دست آمده از بررسی تصاویر در دو گروه کنترل و رزمارینیک اسید نشان دهنده تفاوت معنی دار در حجم ضایعه نخاع در دو گروه می باشد. به این صورت که روند ترمیم بهتری در گروه رزمارینیک اسید با کمترین حجم ضایعه (صورت میانگین  $1/6$  میلیمتر مکعب) در



تصویر ۱: تصاویر میکروسکوپی از محل ترمیم آسیب نخاعی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین (H&E) در روز ۵۶ پس از آسیب. a گروه کنترل، b گروه رزمارینیک اسید. بزرگنمایی ۴X

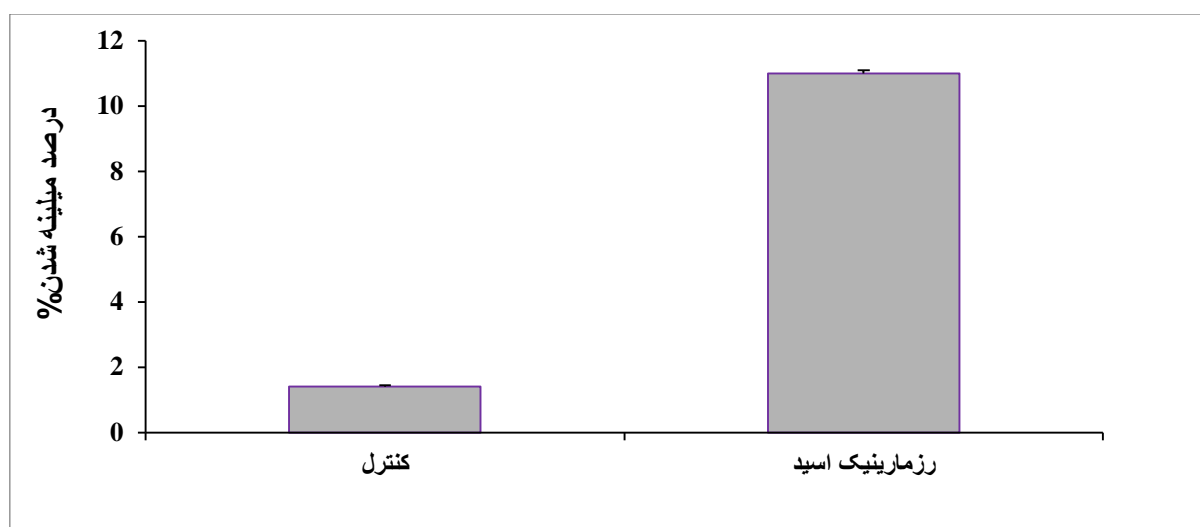


تصویر ۲: نمودار میزان حجم ضایعه نخاعی در محل آسیب در روز ۵۶ بعد از ایجاد عارضه نخاعی.



تصویر ۳: تصاویر میکروسکوپی از محل ترمیم آسیب نخاعی با استفاده از لوکسال فست بلو در روز ۵۶ پس از آسیب. a گروه کنترل، b گروه رزمارینیک اسید. بزرگمایی

۴X



تصویر ۴: نمودار درصد میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل نقیصه تجربی در روز ۵۶ بعد از ایجاد عارضه نخاعی.

## بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش به بررسی اثر ترمیمی رزمارینیک اسید بر ضایعه تجربی نخاع پرداخته شد. نتایج حاصله در تایید یافته‌های قبلی مبنی بر اثر ترمیمی رزمارینیک اسید در ضایعات نخاعی می‌باشد. بر اساس یافته‌های ما رزمارینیک اسید باعث بهبود عملکردی - حرکتی در موش‌های صحرایی دارای ضایعات نخاعی می‌شود. همچنین بر اساس یافته‌های بافت‌شناسی، رزمارینیک اسید باعث کاهش التهاب و ترمیم سریعتر در محل آسیب نخاعی می‌شود.

آسیب نخاعی یک مشکل سلامت عمومی بوده که با از دست دادن ناگهانی عملکردهای حسی و حرکتی همراه می‌باشد. این اتفاق فاجعه باری است که عمیقاً می‌تواند مسیر زندگی بیمار را با تاثیر بر جنبه‌های اقتصادی، فرهنگی و اجتماعی تحت تاثیر قرار دهد. در حال حاضر روش‌های اصلی برای درمان آسیب

نخاعی شامل درمان جراحی، درمان دارویی، اکسیژن درمانی هایپرباریک و فیزیوتراپی است. با این حال، اثرات درمانی و نتیجه در بیماران مبتلا به آسیب نخاعی رضایت بخش نیست. این امر مستلزم مطالعه روش‌های جدید و موثر برای درمان آسیب نخاعی است. بعلاوه استفاده از روش‌های طب سنتی در کنار طب نوین می‌تواند اثرات موثری در روند بهبود بیماری‌های عصبی داشته باشد. در این راستا ژانگ و همکارانش بیان داشتند که استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند جایگزین مناسبی به منظور درمان عارضه‌های نخاعی باشد [۱۷]. رزمارینیک اسید یک ترکیب گیاهی با خاصیت ضدالتهابی است که در درمان بیماری‌های عصبی همچون پارکینسون، آلزایمر و ایسکمی مغزی مورد استفاده قرار گرفته است [۳۵].

فعالیت ضد التهابی RA عمدتاً به مهار فعالیت‌های سیکلوآکسیژناز و لیپوآکسیژناز و فعال‌سازی مسیر کمپلمان نسبت

را مهار کرده و به طور قابل توجهی نقیصه عصبی را ۷ روز پس از آسیب نخاعی بهبود بخشید که با یافته‌های ما در مورد رزمارینیک اسید مطابقت دارد [۴۰]. ژان و همکارانش بیان داشتند که استفاده از عصاره پورپورین در ضایعات نخاعی موشهای صحرایی، معنی‌داری امتیاز BBB را در موش‌های نخاعی افزایش می‌دهد، آسیب بافت‌شناسی نخاع و از دست دادن نورون را کاهش داده، فعال‌سازی سلول‌های گلیال را مهار کرده، التهاب و آپوپتوز سلولی را در نخاع آسیب‌دیده مهار می‌کند که مشابه مطالعات بر روی رزمارینیک اسید و کورکومین است [۴۱].

در مطالعه رزمیان و همکاران در سال ۲۰۲۳ بیان شده است که عصاره بوسیلیک اسید باعث افزایش میلینه شدن و کاهش حجم ضایعه در محل آسیب نخاعی در موش‌های صحرایی مبتلا به آسیب نخاعی شده است که با مطالعات ما بر روی رزمارینیک اسید مطابقت دارد [۴۲].

به طور کلی نتایج این مطالعه و مطالعات پیشین نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید با داشتن خواص ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوزی پتانسیل خوبی برای درمان ضایعات نخاعی دارد. رزمارینیک اسید با کاهش چشم‌گیر حجم عارضه نخاعی، افزایش معنی‌دار میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل آسیب نخاعی و بهبود عملکرد حرکتی تاثیر مثبتی در روند بهبود ضایعه نخاعی در مدل موش آزمایشگاهی نشان داد. با این حال، تحقیقات بیش‌تری برای درک بهتر مکانیسم‌های زیربنایی اثرات مشاهده شده و تعیین دوز و مدت زمان بهینه درمان موردنیاز است. علاوه بر این، آزمایش‌های بالینی در انسان برای تعیین ایمنی و اثربخشی رزمارینیک اسید برای درمان آسیب‌های نخاعی موردنیاز است.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجوی دکتری تخصصی بوده و هزینه تحقیقات از محل اعتبارات پژوهانه سال ۱۴۰۲ معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تامین گردیده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

داده می‌شود [۳۶]. در مطالعات یون و همکاران، در سال ۲۰۰۳ بیان شده است که اسید رزمارینیک به دلیل ظرفیت حذف رادیکال‌های آزاد، اثر ترمیمی در درمان بیماری‌های التهابی مانند آرتریت روماتوئید را دارا می‌باشد [۳۷]. در تحقیقات ژان ژون و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثر درمانی و مکانیسم مولکولی رزمارینیک اسید در آسیب‌های حاد نخاعی بررسی گردید. آن‌ها نشان دادند که رزمارینیک اسید بهبود حرکتی را پس از ضایعه نخاعی بهبود می‌بخشد و به طور قابل توجهی نقص عصبی را کاهش می‌دهد، حفظ نورون‌ها را افزایش داده و آپوپتوز را کاهش می‌دهد. همچنین، رزمارینیک اسید از فعال شدن میکروگلیا و آزادسازی TNF- $\alpha$ ، IL-6، و IL-1 $\beta$  و MDA جلوگیری نموده و همچنین باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ Nrf2 و NF- $\kappa$ B می‌شود [۲۷]. رهبردار و همکاران در مطالعه‌ای بر روی موش‌های صحرایی با آسیب مزمن عصب سیاتیک، به بررسی اثر ضددردی عصاره اتانولی رزمارینیک اسید پی بردند [۳۸].

بر اساس یافته‌های ما رزمارینیک اسید باعث بهبود میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل ضایعه نخاعی شده است. در همین راستا در مطالعات لی و همکارانش، تزریق صفاقی رزمارینیک اسید به موش‌های صحرایی مبتلا به هایپوکسی و ایسکمی مغزی باعث بهبود اختلالات حرکتی، اضطراب، یادگیری و حافظه فضایی در روز ۲۲ بعد از آسیب شده است. همچنین رزمارینیک اسید باعث افزایش تعداد سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت در ناحیه زیر بطنی گردیده و باعث کاهش از دست رفتن پروتئین پایه میلین و از دست رفتن غشای میلین در جسم پینه‌ای مغز شده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید اختلال عملکرد شناختی را پس از آسیب هیپوکسی / ایسکمی با بهبود میلیناسیون مجدد در جسم پینه‌ای بهبود بخشیده است [۳۹].

در مطالعه‌ای که توسط لین و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی اثر عصاره کورکومین، به عنوان عامل تاثیرگذار در مهار التهاب، بر روی آسیب‌های نخاعی موش‌های صحرایی انجام شد نشان داده شده است که نمرات BBB برای اندام عقبی آسیب‌دیده پس از آسیب نخاعی در گروه تحت درمان با کورکومین در مقایسه با گروه کنترل، روزهای ۳ و ۷ به طور قابل توجهی بهبود یافت. کورکومین آپوپتوز و از دست دادن نورون و فعال شدن آستروسیت

- منابع
- [13] Khorasanizadeh M, Yousefifard M, Eskian M, Lu Y, Chalangari M, Harrop JS, et al. Neurological recovery following traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2019; 30(5): 683-99.
- [14] Htwe O, Hussain RI, Naicker AS. Challenges in Managing Severe Lower Limb Spasticity Associated with Bilateral Hip Joints Subluxation. *Eur J Gen Med*. 2016; 13(2): 165-7.
- [15] Honmou O, Yamashita T, Morita T, Oshigiri T, Hirota R, Iyama S, et al. Intravenous infusion of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in spinal cord injury patients: 13 case series. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2021; 203: 106565.
- [16] Chen X, Chen X, Huang X, Qin C, Fang Y, Liu Y, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition provides multi-target therapeutic effects in rats after spinal cord injury. *Molecular neurobiology*. 2016; 53: 1565-78.
- [17] Zhang Q, Yang H, An J, Zhang R, Chen B, Hao D-J. Therapeutic effects of traditional Chinese medicine on spinal cord injury: a promising supplementary treatment in future. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 2016.
- [18] Kuźniak E, Kornas A, Kaźmierczak A, Rozpądek P, Nosek M, Kocurek M, et al. Photosynthesis-related characteristics of the midrib and the interveinal lamina in leaves of the C3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Annals of Botany*. 2016; 117(7): 1141-51.
- [19] Scarpati ML. Oriente, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ric Sci*. 1958; 28: 2329-33.
- [20] Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2020; 393: 1779-95.
- [21] Wang Y-S, Shen C-Y, Jiang J-G. Antidepressant active ingredients from herbs and nutraceuticals used in TCM: pharmacological mechanisms and prospects for drug discovery. *Pharmacological research*. 2019; 150: 104520.
- [22] Sánchez-Martínez JD, Valdés A, Gallego R, Suárez-Montenegro ZJ, Alarcón M, Ibañez E, et al. Blood-Brain Barrier Permeability Study of Potential Neuroprotective Compounds Recovered From Plants and Agri-Food by-Products. *Frontiers in Nutrition*. 2022; 9: 924596.
- [1] Quadri SA, Farooqui M, Ikram A, Zafar A, Khan MA, Suriya SS, et al. Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury. *Neurosurgical Review*. 2020; 43: 425-41.
- [2] Brunner LS. *Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing: Lippincott Williams & Wilkins*; 2010.
- [3] Hashimoto S, Nagoshi N, Shinozaki M, Nakanishi K, Suematsu Y, Shibata T, et al. Microenvironmental modulation in tandem with human stem cell transplantation enhances functional recovery after chronic complete spinal cord injury. *Biomaterials*. 2023; 295: 122002.
- [4] Özdemir ÜS, Nazıroğlu M, Şenol N, Ghazizadeh V. Hypericum perforatum attenuates spinal cord injury-induced oxidative stress and apoptosis in the dorsal root ganglion of rats: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Molecular neurobiology*. 2016; 53: 3540-51.
- [5] Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in neurobiology*. 2014; 114: 25-57.
- [6] Dalbayrak S, Yaman O, Yılmaz T. Current and future surgery strategies for spinal cord injuries. *World journal of orthopedics*. 2015; 6(1): 34.
- [7] Popovich PG, Jones TB. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends in pharmacological sciences*. 2003; 24(1): 13-7.
- [8] David S, Greenhalgh AD, López-Vales R. Role of phospholipase A2s and lipid mediators in secondary damage after spinal cord injury. *Cell and tissue research*. 2012; 349(1): 249-67.
- [9] Silver J, Schwab ME, Popovich PG. Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015; 7(3): a020602.
- [10] Bastien D, Landete VB, Lessard M, Vallieres N, Champagne M, Takashima A, et al. IL-1 $\alpha$  gene deletion protects oligodendrocytes after spinal cord injury through upregulation of the survival factor Tox3. *Journal of Neuroscience*. 2015; 35(30): 10715-30.
- [11] Katoh H, Yokota K, Fehlings MG. Regeneration of spinal cord connectivity through stem cell transplantation and biomaterial scaffolds. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019; 13: 248.
- [12] O'Shea TM, Burda JE, Sofroniew MV. Cell biology of spinal cord injury and repair. *The Journal of clinical investigation*. 2017; 127(9): 3259-70.



- [23] Ravaria P, Saxena P, Lakshmi BS S, Ranjan V, Abidi SWF, Saha P, et al. Molecular mechanisms of neuroprotective offerings by rosmarinic acid against neurodegenerative and other CNS pathologies. *Phytotherapy Research*. 2023.
- [24] Rahbardar MG, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: An evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Phytomedicine*. 2018; 40: 59-67.
- [25] Zhang M, Yan H, Li S, Yang J. Rosmarinic acid protects rat hippocampal neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury via the Akt/JNK3/caspase-3 signaling pathway. *Brain research*. 2016; 1657: 9-15.
- [26] Bigford GE, Del Rossi G. Supplemental substances derived from foods as adjunctive therapeutic agents for treatment of neurodegenerative diseases and disorders. *Advances in Nutrition*. 2014; 5(4): 394-403.
- [27] Ma Z, Lu Y, Yang F, Li S, He X, Gao Y, et al. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF- $\kappa$ B pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2020; 397: 115014.
- [28] Cui H-Y, Zhang X-J, Yang Y, Zhang C, Zhu C-H, Miao J-Y, et al. Rosmarinic acid elicits neuroprotection in ischemic stroke via Nrf2 and heme oxygenase 1 signaling. *Neural regeneration research*. 2018; 13(12): 2119.
- [29] Ghaffari H, Venkataramana M, Ghassam BJ, Nayaka SC, Nataraju A, Geetha N, et al. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sciences*. 2014; 113(1-2): 7-13.
- [30] Konishi Y, Kobayashi S. Transepithelial transport of rosmarinic acid in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2005; 69(3): 583-91.
- [31] Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life sciences*. 2004; 75(2): 165-78.
- [32] Davis JA. Mouse and rat anesthesia and analgesia. *Current protocols in neuroscience*. 2008; 42(1): A. 4B. 1-A. 4B. 21.
- [33] Santos DRd, Teixeira RKC, Araújo NPd, Calvo FC, Duarte TB, Ataíde LAPd, et al. A new anesthetic protocol to medullary nerve roots access in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2021; 36.
- [34] Ye Y, Feng T-t, Peng Y-r, Hu S-q, Xu T. The treatment of spinal cord injury in rats using bone marrow-derived neural-like cells induced by cerebrospinal fluid. *Neuroscience letters*. 2018; 666: 85-91.
- [35] Iswandana R, Pham B, Van Haaften W, Luangmonkong T, Oosterhuis D, Mutsaers H, et al. Organ-and species-specific biological activity of rosmarinic acid. *Toxicology in Vitro*. 2016; 32: 261-8.
- [36] Sahu A, Rawal N, Pangburn MK. Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochemical pharmacology*. 1999; 57(12): 1439-46.
- [37] Youn J, Lee K-H, Won J, Huh S-J, Yun H-S, Cho W-G, et al. Beneficial effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2003; 30(6): 1203-7.
- [38] Rahbardar MG, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 86: 441-9.
- [39] Li M, Cui M-M, Kenechukwu NA, Gu Y-W, Chen Y-L, Zhong S-J, et al. Rosmarinic acid ameliorates hypoxia/ischemia induced cognitive deficits and promotes remyelination. *Neural Regeneration Research*. 2020; 15(5): 894.
- [40] Lin M-S, Lee Y-H, Chiu W-T, Hung K-S. Curcumin provides neuroprotection after spinal cord injury. *Journal of Surgical Research*. 2011; 166(2): 280-9.
- [41] Zhang D, Ma G, Hou M, Zhang T, Chen L, Zhao C. The neuroprotective effect of puerarin in acute spinal cord injury rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016; 39(3): 1152-64.
- [42] Razmian N, Hoveizi E, Naddaf H. An investigation on the reparative effects of boswellic acid on experimental spinal cord injury in a Wistar rat model. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*. 2023; 17(67): 199-209.

[43]

## Investigation of the reparative effects of rosmarinic acid on experimental spinal cord injury in the Wistar rat animal model

Emadi S. A.<sup>1</sup>, Naddaf H.<sup>2</sup>, Hoveizi E.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>3\*</sup> Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

\* (Corresponding author): e.hoveizi@scu.ac.ir

Received: March 2024

Accepted: August 2024

### Abstract

Spinal cord injury is a condition in which the spinal cord's parenchyma is damaged due to trauma or different diseases. Inflammatory reactions can indeed play a significant role in causing spinal cord injuries by altering the function of cells and leading to the death of nerve cells. Rosmarinic acid, a water-soluble polyphenolic phytochemical, possesses antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. In this study, 12 Wistar rats were divided in two groups with equal populations. The control group did not receive any treatment after spinal cord injury until day 56, while the rosmarinic acid group received 100 mg/kg of rosmarinic acid extract in their drinking water daily until day 56 after the spinal cord injury. During the 56-day period, the mice were assessed for movement using the Basso, Beattie, and Bresnahan test. The group treated with rosmarinic acid showed higher scores in terms of movement recovery compared to the control group. The examination of tissue sections revealed that the group treated with rosmarinic acid exhibited significantly better recovery and repair, a reduction in the size of complications, and an increase in the myelination of nerve fibers at the spinal cord injury site compared to the control group ( $p < 0.005$ ). The research findings suggest that rosmarinic acid could potentially be a valuable therapeutic option for treating spinal injuries in the future. It's exciting to see the potential restorative effects of this compound in experimental studies on rats. This could pave the way for further exploration and development of new treatment options for spinal injuries.

**Keywords:** spinal cord injury, rosmarinic acid, neuroprotection, inflammation, animal model.