Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Effect of aqueous and alcoholic extracts of *Ziziphora clinopodioides* on apoptosis and alteration of caspase-3 and caspase-9 gene expression in anterior horn neurons of the spinal cord after sciatic nerve compression in male rats

Iman Abdolamir Abdolsamad Halaf[1], Maryam Tehranipour[1]*, Homa Mahmodzadeh Akharat[1]

ABSTRACT

Background and Aim: Caspase family genes promote degeneration and are involved in apoptotic processes. The *Ziziphora clinopodioides* from the mint family (Lamiaceae) is one of the plants strong with anti-inflammatory effects and involved in the process of nervous system repair. The present study aimed to determine the effects of aqueous and alcoholic extracts of *Ziziphora clinopodioides* on apoptosis and alteration of caspase-3 and caspase-9 gene expression after sciatic nerve compression in male rats.

Materials and Methods: In the present study, 24 male Wistar rats weighing 200-250 g were randomly assigned to four groups (n=6 in each group): control, compression, treatment with aqueous, and treatment with alcoholic extracts at a dose of 75 mg/kg. The extract was injected intraperitoneally on compression day and seven days later. After 28 days, samples were taken from the lumbar spinal cord subsequent to performing the perfusion method, and the samples were studied in two ways. Thereafter, in each group, total RNA was extracted from the lumbar spinal cord, cDNA was synthesized; subsequently, the expression changes in caspases-3 and caspases-9 were compared.

Results: Based on the results, the number of neurons significantly decreased in the compression group, as compared to that in the control group, and demonstrated a significant increase in the aqueous extract group, in comparison with the compression group. Furthermore, the amount of caspases-3 and caspases-9 expression increased significantly in the compression group, compared to that in the control group. Moreover, caspase-3 and caspase-9 gene expression increased in the aqueous extract group, as compared to that in the compression group ($P<0.001$).

Conclusion: It seems that, the extract of *Ziziphora clinopodioides* has neuroprotective effects due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, as well as phenolic and flavonoid compounds, such as pulegone.

Keywords: Apoptosis, Degeneration, Neuron, *Ziziphora clinopodioides*

Citation: Abdolsamad Halaf IA, Tehranipour M, Mahmodzadeh Akharat H. [Effect of aqueous and alcoholic extracts of *Ziziphora clinopodioides* on apoptosis and alteration of caspase-3 and caspase-9 gene expression in anterior horn neurons of the spinal cord after sciatic nerve compression in male rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2021; 28(3): 222-235. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.101

Received: March 8, 2021 **Accepted:** August 9, 2021

[1] Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

***Corresponding author:** Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Tel: +989155110370 E-mail: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

مقاله اصیل پژوهشی

بررسی اثر عصاره‌های آبی و الکلی گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) بر روند آپوپتوز و تغییر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ نورون‌های شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت‌های نر

ایمان عبد الامیر عبد الصمد حلاف[۱]، مریم طهرانی پور[۱]*، هما محمودزاده آخرت[۱]

چکیده

زمینه و هدف: ژن‌های خانواده کاسپاز باعث پیشرفت دژنراسیون شده و در روندهای آپوپتوزی نقش دارند. گیاه کاکوتی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* از خانواده نعناعیان (Lamiacace) دارای اثرات ضد التهابی قوی می‌باشد. این پژوهش به منظور تعیین اثرات عصاره‌های آبی و الکلی گیاه کاکوتی بر روند آپوپتوز و تغییر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت‌های نر انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به صورت تصادفی به۴ گروه ۶ تایی (کنترل، کمپرسیون و تیمار با عصاره‌های آبی و الکلی با دوز ۷۵ mg/kg) تقسیم شدند. تزریق عصاره به صورت داخل صفاقی در روز کمپرسیون و۷ روز بعد انجام شد. بعد از ۲۸ روز و انجام پرفیوژن از نخاع ناحیه کمری نمونه‌برداری گردید و نمونه‌ها در دو مسیر مورد بررسی قرار گرفتند. سپس در هر گروه از قطعه کمری نخاع، Total RNA استخراج و cDNA سنتز گردید و سپس تغییرات بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تعداد نورون‌ها در گروه کمپرسیون نسبت به کنترل کاهش معنادار و در گروه عصاره آبی نسبت به کمپرسیون افزایش معنادار نشان داد. میزان بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ نیز در گروه کمپرسیون نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. در گروه تیمار با عصاره الکلی میزان بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ نسبت به گروه کمپرسیون افزایش معناداری نشان داد ($P<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که عصاره گیاه کاکوتی به‌علت داشتن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مانند پولگون دارای اثرات حفاظتی بر سیستم عصبی بوده که می‌تواند ناشی از خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی در عصاره این گیاه باشد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، دژنراسیون، نورون، کاکوتی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۰؛ ۲۸(۳): ۲۲۲-۲۳۵.

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۸

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

آدرس: مشهد- دانشگاه آزاد اسلامی (واحد مشهد)- دانشکده علوم- گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۵۵۱۱۰۳۷۰ پست الکترونیکی: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

مقدمه

کاسپازها جزء خانواده سیستئین پروتئاز هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می‌نمایند. به دنبال فعال شدن این آنزیم‌ها روی سوبستراهای خاصی عمل و تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک ایجاد می‌نمایند. خانواده کاسپازها در پستانداران دارای ۱۴ عضو است (۱). تمام کاسپازها دو مشخصه مهم مشترک دارند، یکی این که سیستین پروتئاز هستند (حاوی جایگاه فعال سیستئین می‌باشند) و دارای توالی پنتاپپتیدی حفظ شده OACXG، دوم این که در سوبسترا، پیوند پپتیدی بین ریشه آسپارتات با اسید آمینه بعدی را می شکنند (۱). نورون‌ها تحت تأثیر عوامل فیزیکی، شیمیایی و پاتولوژیک دچار صدمه می‌شوند و تخریب (دژنراسیون) آن‌ها یک صدمه دائمی محسوب می‌شود (۲). هنگامی‌که یک عصب قطع می‌شود، ارتباط آکسون با جسم سلولی قطع شده و قطعه دیستال آن از محل ضایعه تا انتها شروع به دژنراسیون هم‌زمان می‌کند. به‌علاوه دژنراسیون تا Gاولین گره رانویه به‌سمت پروگزیمال نیز ادامه می‌یابد که این فرایند را دژنراسیون والرین می‌گویند (۲). چنانچه میزان تخریب بخش پروگزیمال شدید باشد، اثرات ضایعه رو به عقب به‌سوی جسم سلولی توسعه یافته و سبب دژنراسیون مرکزی (تخریب جسم سلولی) می‌شود، اجسام نیسل شکسته شده و در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده می‌شود که این فرآیند را کروماتولیز گویند. همچنین هسته از موقعیت مرکزی خود به‌سمت محیط سلول تغییر مکان می‌دهد و جسم سلولی به‌دلیل تغییرات اسمزی متورم می‌شود (۳). اگرچه نورون‌ها عموماً پس از تولّد فاقد قدرت تکثیر می‌باشند؛ امّا می‌توانند در مقابل درجات معینی از ضایعات مقاومت کرده و بهبود یابند. اگر یک فیبر عصبی قطع شود هم در اعصاب محیطی و هم در اعصاب مرکزی تغییراتی ایجاد می‌شود که در صورت شدید بودن این تغییرات گاهی منجر به مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌شود (۴). استفاده از ماده‌ای که در این مرحله بتواند شدت ضایعات را کاهش دهد و یا به روندهای التیامی شدت ببخشد، می‌تواند راه‌گشای بسیاری از مشکلات عصبی باشد. در این زمینه بهره جویی از عصاره‌های گیاهی به‌علت طبیعی بودن و نداشتن اثرات جانبی بر عملکرد سایر دستگاه‌های بدن مورد توجه اکثر محققان می‌باشد. یکی از گیاهانی که در روند ترمیم سیستم عصبی نقش دارد، گیاه کاکوتی است. کاکوتی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* از خانواده نعناعیان (*Lamiacace*) می باشد و گیاهی است علفی، یک ساله، دارای ساقه کوتاه به ارتفاع ۱۵-۵ سانتی‌متر و برگ‌های نوک تیز و باریک که در اغلب نواحی ایران پراکندگی دارد (۵). گیاه کاکوتی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی است که منتول موجود در گیاه کاکوتی به‌طور اختصاصی تولید ۳ مدیاتور اصلی التهاب توسط مونوسیت‌ها را مهار می‌کند (۶). وجود منتول دارای اثر ضد التهابی بوده که این ترکیب اثر خود را از طریق توقف تولید پیش التهاب‌های بیوشمیایی مثل لوکوترین و پروستاگلاندین اعمال کرده و نیز آزاد سازی هیستامین و دیگر میانجی‌های آلرژیک را مهار می‌کند. همچنین منتول موجود در عصاره هیدروالکلی گیاهان خانواده نعناع خاصیت آنتی اکسیدانتی اثبات شده‌ای دارد. مطالعات نشان داده‌اند که با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی ترکیب GSH و آنزیم GSH-Px و GR در گروه‌های حاوی منتول باعث کاهش میزان سیتوکین‌های التهابی مانند فاکتورهای نکروز کننده توموری آلفا (TNF-α)، اینترلوکین یک بتا (L-1β۱) و اینترلوکین ۶ (L-6۱) جلوگیری می‌نماید (۷). کاکوتی حاوی غلظت بالایی از آنتی اکسیدانت‌ها می‌باشد که این گیاه حاوی بالاترین ترکیبات فنولیک و فلاونوئید است که فلاونوئیدها از طریق چلاته کردن یون‌های فلزی فعالیت آنتی اکسیدانتی خود را اعمال می‌کنند. با توجه به اثرات ضد التهابی و آنتی‌آپوپتوزی عصاره این گیاه احتمال می‌رود که بتوان از آن جهت کاهش شدت ضایعات عصبی و یا بهبود روند ترمیم استفاده نمود (۸). بر این اساس این تحقیق با هدف بررسی اثر حفاظت نورونی عصاره هیدروالکلی کاکوتی بر روند آپوپتوز و تغییر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ نورون‌های شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی نر انجام شده است.

روش تحقیق

در این مطالعه به‌منظور رعایت اصول اخلاقی، کار بر روی حیوانات بر اساس پروتوکل هلسینکی و دستور کار انجمن علوم اعصاب آمریکا انجام شد (۹). گیاه کاکوتی به‌طور دستچین از استان خراسان رضوی و توابع شهرستان مشهد جمع‌آوری شد. این گیاه توسط مرکز هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه آزاد مشهد با کد ۱۰۳۱۳ مورد تأیید قرار گرفت. بعد از شستن با آب معمولی، اجزای گیاه در سایه خشک شدند. سپس به‌صورت پودر جمع آوری شدند. ۵۰ گرم از پودر خشک گیاه کاکوتی داخل کاغذ مخصوص کارتوش ریخته و در دستگاه سوکسله قرار داده شد. برای تهیه عصاره آبی ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در محفظه مخصوص دستگاه ریخته شد و برای تهیه عصاره الکلی ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد در محفظه مخصوص دستگاه ریخته شد. همچنان که کیسه حرارتی دستگاه، آرام آرام گرم می‌شود حلال (آب و الکل) نیز گرم شده و عصاره گیاه کاکوتی با حلال مخلوط گشته و به بالن بر می‌گردد. بدین ترتیب از حجم کل محلول کاسته نمی‌شود. عصاره‌گیری در ۱۰ ساعت صورت گرفت تا اطمینان حاصل شود که تمام عصاره قابل حل در حلال از پودر استخراج شده است. برای حذف حلال عصاره به‌دست آمده در پلیت‌های با وزن مشخص و استریل ریخته شد و در انکوباتور قرار داده شد تا کاملاً حلال حذف گردید (۱۰). موش‌های صحرایی نر از بخش حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد خریداری شدند. تا زمان انجام آزمایش حیوانات در شرایط نوری استاندارد (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) روزانه و درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد نگه‌داری شدند. آب مورد نیاز حیوانات از آب آشامیدنی شهر و غذای آن‌ها نیز دارای فرمول استاندارد و از شرکت جوانه خراسان تهیه شد. در این تحقیق ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم به چهار گروه ۶ تایی کنترل، کمپرسیون، کمپرسیون+تیمار با عصاره آبی دوز۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم و کمپرسیون+تیماربا عصاره الکلی با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. به‌صورت تجربی در مطالعات قبلی اثبات شده است که این دوزها می‌تواند مؤثر باشد (۱۱). عصاره در ۲ نوبت در روزهای اول هم‌زمان با کمپرسیون و در روز هفتم به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. رت‌های هر گروه با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی زایلازین ۶ میلی‌گرم و کتامین ۶۰ میلی‌گرم به نسبت وزن بدن بی‌هوش شدند، سپس عصب سیاتیک پای راست در ناحیه سر استخوان ران توسط پنس قفل‌دار (قفل دوم برای ۶۰ ثانیه) تحت کمپرسیون قرار گرفت (۱۲). پس از کمپرسیون محل ضایعه ضدعفونی و توسط گیره فلزی بخیه زده شد. بعد از این که موش‌ها هوشیاری اولیه خود را به‌دست آوردند، به قفس‌های جداگانه منتقل و در شرایط استاندارد اتاق حیوانات از نظر نور، دما و رطوبت نگه‌داری شدند. در گروه‌های تیمار اولین تزریق عصاره بلافاصله بعد از انجام عمل کمپرسیون انجام شد و دومین مرحله تزریق درون صفاقی عصاره در گروه‌های تیمار ۷ روز پس از اولین تزریق صورت گرفت. ۲۸ روز پس از کمپرسیون از قطعات نخاعی مربوط به عصب سیاتیک (L4-L6) پس از بیهوشی کامل نمونه برداری انجام شد (۱۳). سپس نمونه‌های نخاع در دو مسیر برای مطالعه بافتی و مطالعه بیان ژن قرار گرفتند. برای مطالعه بافتی از آنجا که بافت عصبی بافتی حساس است و به سرعت دچار فرآیندهای اتولیز می‌شود و علاوه بر این به‌علت وجود پرده‌های سخت اطراف نخاع تثبیت کننده نیز به‌خوبی در آن نفوذ نمی‌کند. برای تثبیت از روش پرفیوژن استفاده شد. در این روش در حیوان بی‌هوش، تثبیت کننده (فرمالین ۱۰ درصد نمکی) در بسترهای عروقی جریان می‌یابد (۱۳). پس از اتمام پرفیوژن، نمونه برداری از نخاع انجام شد. ابتدا با قیچی ناحیه قفسه سینه باز شده تمام محتویات قفسه سینه و شکم خارج می‌شود سپس در ناحیه مهره‌های قفسه سینه با اسکارپل ستون مهره‌ها به‌طور عرضی برش خورده و به‌آرامی با قیچی نوک باریک سطح شکمی مهره‌ها تا انتهای ستون مهره‌ها برش خورده و برداشته شده و نخاع به‌صورت کامل خارج می‌شود. برای یکسان بودن نمونه‌برداری در همه نمونه‌ها، نخاع به‌طور کامل تا انتهای دم اسب جدا شد و از انتهای دم اسب به اندازه ۱۸ میلی‌متر بالا رفته و نمونه‌هایی به‌طول ۸ میلی‌متر تهیه شد. نمونه‌های تهیه شده به‌مدت ۲ هفته درون فیکساتور قرار گرفته و پس از آن وارد مرحله پاساژ بافتی شدند. نمونه‌ها پس از طی مراحل پاساژ وارد مرحله برش‌گیری

شده، برش‌گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم انجام شد. برش‌گیری به‌صورت سریالی صورت گرفت به این صورت که از هر ۳۰ برش ۳ برش متوالی بر روی لام قرار گرفت و در نهایت از هر نمونه ۳۰ لام تهیه شد. و برش‌های سریال ۷ میکرونی تهیه شده با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند (۱۴). با استفاده از دستگاه فتومیکروسکوپ از منطقه شاخ قدامی نخاع در سمت راست در لام‌های تهیه شده، از ۲ برش متوالی عکس‌هایی تهیه شد. برای شمارش نورون‌های حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع در سمت راست، از روش دایسکتور [1] استفاده شد. در این روش در یک چهار چوب مرجع نورون‌ها شمارش می‌شوند. اگر ذره‌ای در چهار چوب مرجع باشد؛ ولی در چهار چوب بعدی (در برش متوالی بعدی) نباشد، در شمارش به‌حساب می‌آید، امّا اگر نورونی در هر دو چهار چوب باشد، در شمارش محسوب نمی‌شود (۱۵). برای بررسی داده‌ها به پارامتر دانسیته نورون‌ها (ND) نیاز بود که از طریق فرمول زیر محاسبه شد (۱۵):

$$ND=\text{å}Q/\text{å}Frame \times V\ dissector$$

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

$\sum frame$: مجموع دفعات نمونه برداری شده

V dissector: حجم چهارچوب نمونه‌برداری که برابر است با:

$$Vdissector = A\ Frame \times H$$

A Frame: مساحت چهارچوب نمونه برداری

H: فاصله بین دو برش یا ضخامت هر برش

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار Minitab14 و آزمون Anova و با سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ استفاده شد و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excell استفاده گردید.

برای بررسی بیان ژن در نمونه‌هایی که بدون پرفیوژن انجام شد به روش ذیل مراحل پیش رفت:

روش انجام آزمایش جهت بررسی بیان ژن

استخراج RNA از بافت نخاع به روش ستونی

مواد مورد نیاز:

کیت استخراج RNAColumn RNA isolation Kit III (DENAzist)، الکل ۷۰٪ تهیه شده با آب RNase free، سانتریفیوژ، دستگاه هموژنایزر، میکروتیوب ۱/۵ml و ۰/۵ RNase free، نوک سمپلر زرد و آبی RNase free، سمپلر، ازت مایع.

روش کار

ابتدا از بافت نخاع نمونه برداری شد. سپس مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری Column RNA isolation Kit III (DENAzist) انجام گرفت.

الف: مرحله آماده سازی

۱: گرم کردن DR2 تا دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد

۲: بافت نخاع در ۳ مرحله در مایع ازت کوبیده می‌شود تا کاملاً پودر شود.

۳: پودر را به میکروتیوب ۱/۵ ml منتقل کرده سپس µL DR1۱۷۵ به آن اضافه می شود.

۴: به مدت ۳۰ ثانیه بافت هموژنیزه می‌شود.

۵: ۵ دقیقه در محیط می‌ماند.

ب: شروع استخراج RNA

۱. ۳۵۰µl DR2 گرم شده در دمای ۷۰ درجه به میکروتیوب اضافه می‌شود. ۳-۲ بار معکوس سپس به مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شود.

۲. پس از پایان سانتریفیوژ یک فاز جامد در پایین و یک فاز مایع در بالا ایجاد می‌شود. سپس ۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی را با سمپلر به میکروتیوب ۱/۵ ml جدید منتقل کرده و بقیه دور ریخته می‌شود.

۳. ۲۳۵µl اتانول ۹۵٪ به مایع مرحله بالا اضافه و ۳-۲ بار معکوس می شود.

۴. مایع حاصل بلافاصله به ستون‌های استخراج منتقل می‌شود.

۵. میکروتیوب به مدت ۱ دقیقه با ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ

[1] Disector

می‌گردد و پس از هر سانتریفیوژ مایع جمع شده در لوله جمع کننده پایین ستون دور ریخته می‌شود.

۶. DR3۵۵۰µl به ستون اضافه می‌گردد و به مدت ۱ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شود.

۷. دوباره DR3 ۲۰۰µl به ستون اضافه می‌گردد و به مدت ۲ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شود.

۸. ستون‌ها به یک میکروتیوب ۱/۵ ml جدید منتقل می‌شود. و DR4 50µl به ستون اضافه می‌گردد و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق می‌ماند، سپس ۲ دقیقه با ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شود.

۹. دوباره DR4 ۵۰µl به ستون اضافه می‌گردد و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق می‌ماند سپس ۲ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شود.

۱۰. ستون‌ها دور انداخته می‌شود و ۱۰۰µl محلول حاصل حاوی RNA جهت نگهداری در فریزر به ۳ میکروتیوب ۰/۵ ml با نسبت ۲۰ : ۴۰ : ۴۰ منتقل می‌شود.

۱۱. Total RNAی حاصل توسط دستگاه نانودراپ تعیین کیفیت و کمیت می‌شود.

۱۲. RNA استخراج شده در فریزر ۷۰°C- نگهداری می‌شود.

کنترل کیفیت RNA استخراج شده

با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری و دستگاه نانودراپ از کیفیت RNA و استخراج صحیح آن اطمینان حاصل شد. این دستگاه به‌طور اتوماتیک غلظت RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر، محاسبه می‌کند. پس از آماده‌سازی نمونه و گذاردن آن در مکان قرارگیری نمونه، دستگاه غلظت نمونه مورد نظر را در طول موج مربوطه، بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر، محاسبه می‌نماید (۱۶).

سنتز cDNA

مواد مورد نیاز:

- Total RNA
- Oligo (dT) 16 500ng/µl
- Random hexamer 200ng/µl
- DEPC-treated wather
- RT-preMix (2x)

دستگاه مورد نیاز: دستگاه PCR

روش کار:

برای انجام واکنش RT-PCR از روی RNA، با استفاده از آنزیم Reverse Transcriptase، cDNA می‌سازیم. برای RT PCR سه جفت پرایمر وجود دارد.

الیگو دی تی Oligo (dT) 16: پرایمری است که ۱۶ باز دارد و همه T به انتهای دم پلی A متصل می‌شود، سپس آنزیم متصل شده و از روی RNA رونویسی می‌کند و cDNA را می‌سازد.

راندوم هگزامر Random Hexamer: ۶ باز دارد از ۴۰ نوع باز به صورت رندوم توالی های ۶ تایی می‌سازد؛ چون طول آن کوتاه است می‌توانند به صورت اتفاقی به RNA متصل شوند سپس آنزیم به انتهای پرایمر متصل می‌شود و رونویسی می‌کند.

Speciphic primer: پرایمر اختصاصی است. mRNA مربوط به ژن خاصی است. پرایمر اختصاصی طراحی می‌کنیم. به صورت اختصاصی پرایمر mRNA خود را پیدا می‌کند و رونویسی انجام می شود.

مراحل ساخت cDNA

بسته به غلظت RNA در هر نمونه بین ۲ تا ۳/۵ میکرولیتر از نمونه RNA نرمال و تیمار برداشته شد.

Ml ۱، Oligo (dT) 16 به هر نمونه اضافه گردید.

به هر میکروتیوب آنقدر Wather DEPC اضافه گردید که حجم به µl ۱۰ برسد.

۵ دقیقه در دستگاه PCR در دمای °C ۷۰ قرار داده شد تا ساختارهای ثانویه از بین برود.

نمونه ها چند دقیقه روی یخ قرار گرفت.

به هر میکروتیوب µl ۱۰RT premix(2x) اضافه شد سپس توسط سمپلر کاملا میکس گردید.

نمونه ها ۱۰ دقیقه در دمای °C ۲۵ و ۶۰ دقیقه در دمای °C ۵۰ انکوبه شدند.

برای توقف واکنش نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۷۰ قرار گرفتند.

پس از اتمام کار نمونه ها به فریزر ^{o}C ۲۰- منتقل شدند.

Real- Time PCR

در این روش از کاوشگرها یا پروب‌های هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسانس در انتهای'۵ یا '۳ استفاده می‌شود، که امکان بررسی میزان محصول PCR را بدون جداسازی آن‌ها در روش‌های الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی آکریل آمید می‌دهد.

پروتکل Real time PCR برای تعیین بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹

پروتکل پیشنهادی مطابق جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن کاسپاژ ۳ و GAPDH

ژن	توالی پرایمر	دما
کاسپاز۳	GCTGACTTCCTGTATGCTTAC	57.87
	GGAAGGTGGCAACGGAAT	55.97
GAPDH	ATTGCTGACAGGATGCAGAA	55.25

جدول ۲- توالی پرایمر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن کاسپاژ ۹ و GAPDH

ژن	توالی پرایمر	دما
کاسپاز۹	TCTCTTCATCTCCTGCTTAG	53.69
	GCAAAGGAGCAGAGAGTA	55.25
GAPDH	TAGAGCCACCAATCCACAC	56.67

مواد مورد نیاز برای RT PCR جهت مقدار بیان ژن کاسپاز ۳ و کاسپاز۹ مطابق جدول ۳ می‌باشد.

جدول ۳- مواد مورد نیاز RT PCR

ترکیبات	حجم	نهایی
SYBR Green PCR Master mix (2x)	10ul	1x
Forward primer	2ul	100um
Reverse primer	2ul	100um
Template Cdna	2ul	0.5-1um
Sterilized D.W	4ul	-
Total volume	20ul	-

برنامه دمایی Real Time PCR ۹ برای بیان ژن کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹

جدول ۴- برنامه دمایی Real Time PCR برای بیان ژن کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹

دما	زمان	سیکل
95	1min	1
95	15sec	40
59	30sec	
72	30sec	
95	10min	1

مراحل Real time PCR

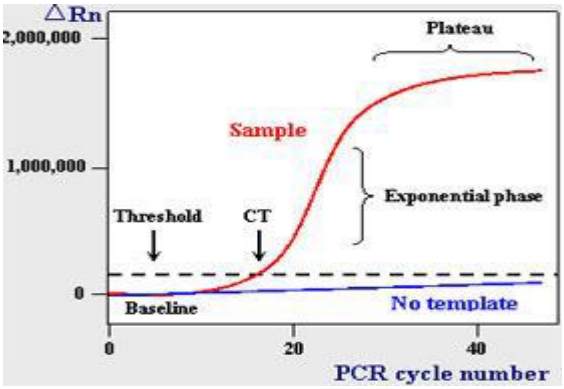
به طور کلی Real time PCR چند مرحله دارد (تصویر۱):

فاز اول The baseline region: با وجود اینکه محصول دو رشته‌ای وجود دارد ولی نور آن قابل ردیابی نیست.

فاز دوم The exponential phase: محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر می‌شود و رشد نمایی مربوط به واکنش شروع می‌شود.

فاز سوم The liner phase: ترکیبات واکنش و کارایی آن‌ها روبه اتمام است.

فاز چهارم The plateau phase: ترکیبات واکنش از بین می‌روند و افزایش در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود (۱۷).



تصویر ۱- مراحل Real time PCR

آنالیز آماری داده‌ها

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار MxPro و آزمون Anova با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ استفاده شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excell استفاده گردید.

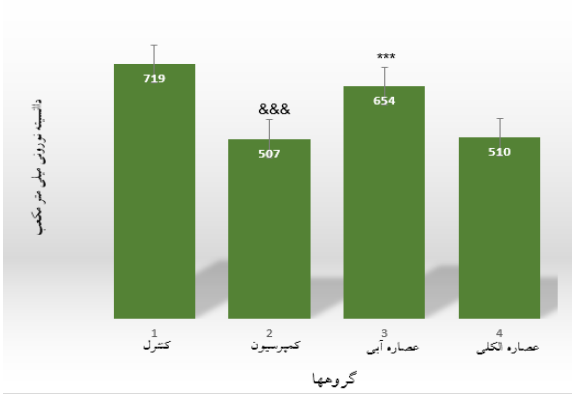
ملاحظات اخلاقی

پایان‌نامه با عنوان بررسی اثر عصاره‌های آبی و الکلی گیاه کاکوتی بر روند آپوپتوز و تغییر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در نورون‌های شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت نر در دانشگاه آزاد اسلامی- واحد مشهد بررسی و با شناسه اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1399.108 مصوب گردید.

یافته‌ها

شمارش نورون‌های حرکتی آلفا و دانسیته نورونی در شاخ قدامی نخاع در گروه‌های مختلف نشان داد که پدیده کمپرسیون باعث کاهش معنی‌دار دانسیته نورونی در نورون‌های شاخ قدامی نخاع پس از کمپرسیون نسبت به گروه کنترل شده (P<۰/۰۰۱) و در گروه‌های تیمار در مقایسه با کمپرسیون دانسیته نورونی افزایش یافته است (P<۰/۰۰۱). بیشترین اثرات حفاظت نورونی مربوط به عصاره آبی بود.

با توجه به مقدار P<۰/۰۰۱ تست آماری نشان می‌دهد که بین گروه کمپرسیون و گروه تیمار عصاره آبی (کمپرسیون+تیمار با دوز ۷۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم) تفاوت معنی‌داری در دانسیته تعداد نورون‌ها وجود دارد (نمودار۱) و این معناداری به صورت افزایش دانسیته تعداد نورون‌ها دیده می‌شود. ولی در گروه تیمار با عصاره الکلی دوز ۷۵ دانسیته نورونی نسبت به کمپرسیون افزایش معنی‌داری ندارد (P=۰/۰۹).



نمودار ۱- مقایسه دانسیته تعداد نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نیمه راست نخاع بین گروه کمپرسیون و سایر گروه‌ها (کنترل، کمپرسیون، عصاره آبی ۷۵، عصاره الکلی۷۵) (تعداد= ۶). در هر گروه اعداد بیانگر میانگین دانسیته نورونی±انحراف استاندارد می‌باشد.

***: اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار با گروه کمپرسیون (P<۰/۰۰۱).

&&&: اختلاف معنی‌داری بین گروه کمپرسیون با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱).

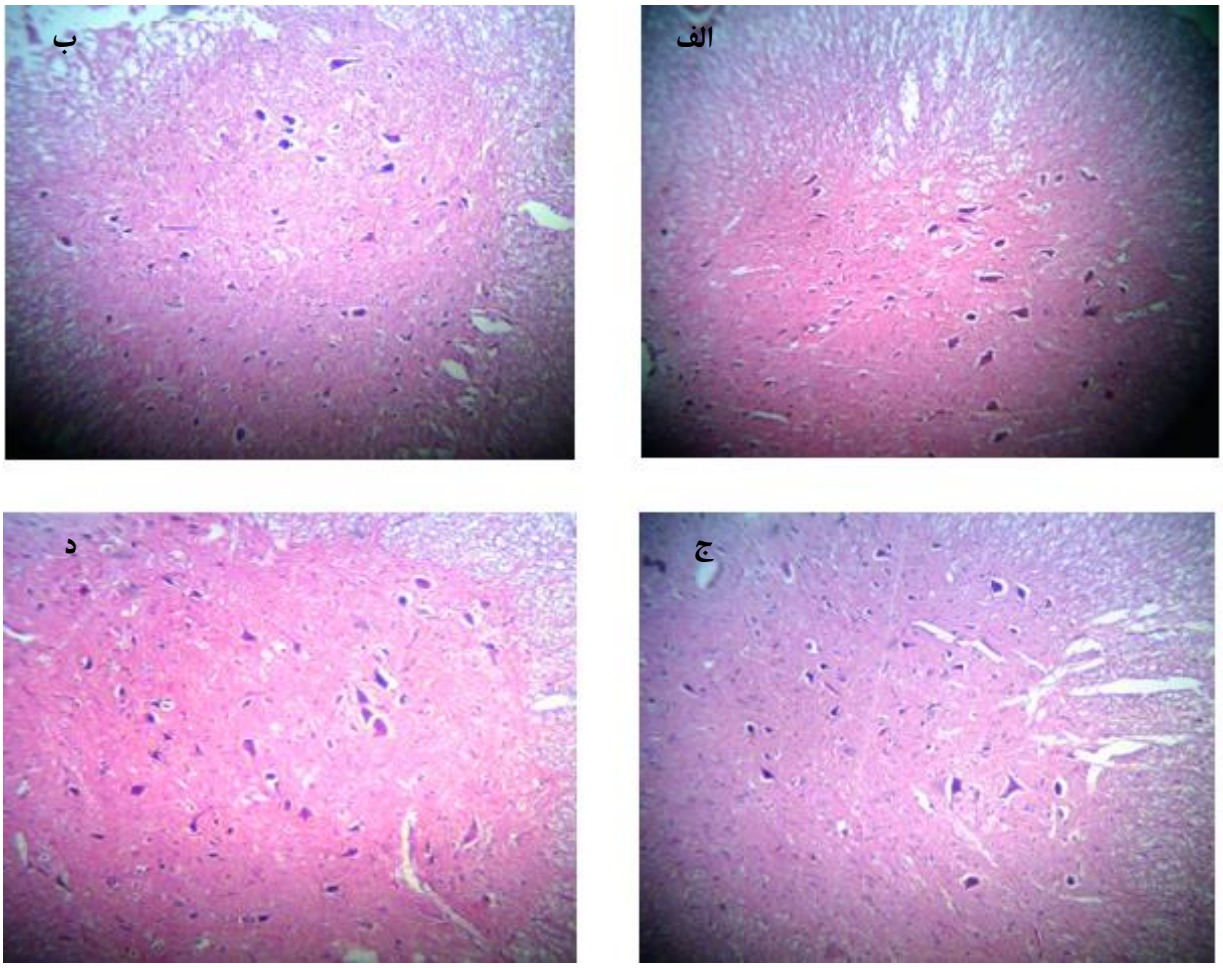
با توجه به مقدار تست آماری P=۰/۰۱ نشان می‌دهد که بین گروه تیمار عصاره الکلی (کمپرسیون+تیمار با دوز ۷۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم) و گروه تیمار عصاره آبی (کمپرسیون+تیمار با دوز ۷۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم) تفاوت معنی داری در دانسیته تعداد نورون‌ها وجود دارد (P<۰/۰۵). (نمودار۲) و این معناداری به صورت افزایش دانسیته تعداد نورون‌ها در گروه آبی دیده می‌شود.

برای بررسی نتایج حاصل از تحقیق انجام شده، تصاویر تهیه شده از برش‌های بافتی نخاع برای بررسی آلفا موتونورون‌های نخاع در نیمه راست شاخ قدامی مورد بررسی قرار گرفت (تصویر ۱).

نمودار۲- مقایسه دانسیته تعداد نورون‌های حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع در گروه‌های تیمار الکلی و آبی (تعداد= ۶)

در هر گروه اعداد نشان دهنده میانگین±انحراف معیار می‌باشد.

* نشان دهنده سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵).



تصویر۲- برش عرضی شاخ قدامی نخاع در گروه‌های مختلف (درشت نمایی 100x). رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین

الف: گروه کنترل، ب: گروه کمپرسیون، ج: گروه تیمار با عصاره آبی، د: گروه تیمار با عصاره الکلی (درشت نمایی x۱۰۰). رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین

در گروه کنترل جسم سلولی نورون‌های سالم می‌باشد. هسته در مرکز قرار گرفته و شکل نورون‌ها به‌حالت کروی است.

در گروه کمپرسیون هسته به کنار رانده شده است و به‌تدریج در حال ناپدید شدن است. نورون‌ها از حالت کروی خارج شده و ظاهر چندوجهی به‌خود گرفته است.

در گروه تیمار با عصاره آبی تزریق عصاره با (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از کمپرسیون عصب سیاتیک موجب تغییرات رژنراسیون در آکسون می‌شود. به دنبال تغییرات رژنراسیون در آکسون، در بعضی سلول‌ها جسم سلولی به حالت طبیعی در آمده، و تورم سلولی کم می‌شود. این تغییرات در عصاره آبی مشهودتر است. درگروه تیمار شده با عصاره الکلی تغییر محسوسی در شکل نورون‌ها مشاهده نمی‌شود. ظاهراً اجزای موثر گیاه در این عصاره نبوده است.

نتایج حاصل از نانودراپ

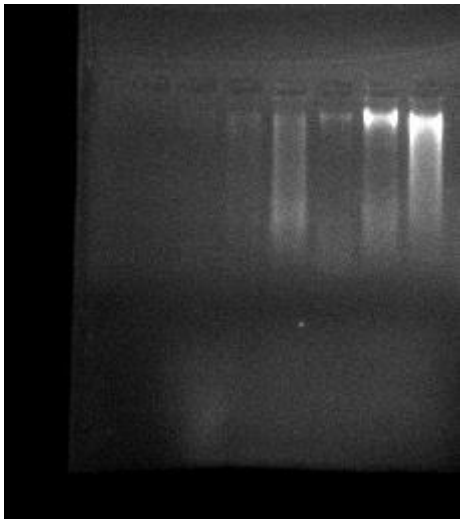
برای اندازه‌گیری و اطمینان از کمیت RNA استخراج شده، کمیت توتال RNA به روش نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت و نتایج حاصل در جدول ۵ درج شده است.

جدول ۵- غلظت RNA استخراج شده

گروه	غلظت RNA(µg/µL)
کنترل	۰/۰۵
کمپرسیون	۰/۰۱
کمپرسیون+عصاره آبی با دوز ۷۵ میلی گرم	۰/۱
کمپرسیون+عصاره الکلی با دوز ۷۵ میلی‌گرم	۰/۰۳

نتایج حاصل از Run کردن RNAها روی ژل الکتروفورز

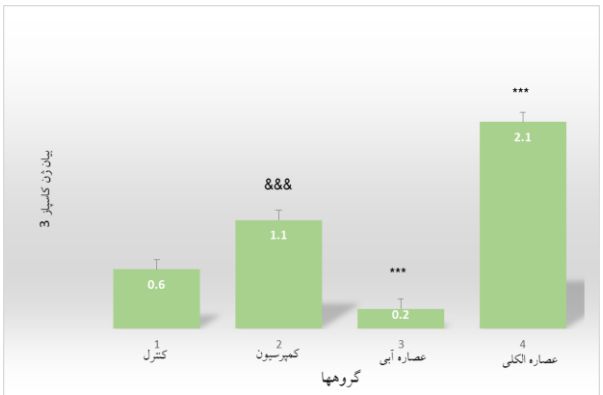
نمونه های RNA استخراج شده جهت بررسی کیفیت آن بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد ران گردید، ستون اول Ladder (100bp) را نشان می‌دهد و ستون های دیگر RNAهای موجود را به صوررت ۳ باند مجزا نشان می‌دهد. همانطور که در نتایج نانودراپ نیز مشاهده می شود گروه کنترل در ستون دوم و به ترتیب گروه های تیمار آبی و الکلی در ستون‌های آخر نشان داده شده‌اند تصویر (۲).



تصویر ۳- نتایج حاصل از ژل الکتروفورز

نتایج حاصل از بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه‌های مختلف

در مقایسه بیان ژن کاسپاز ۳ بین گروه‌های (کنترل و کمپرسیون) و گروه کمپرسیون با گروه‌های عصاره الکلی و عصاره آبی مقدار P اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۳- مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۳ بین گروه‌های مختلف

در هر گروه اعداد نشان دهنده میانگین±انحراف معیار می‌باشد.

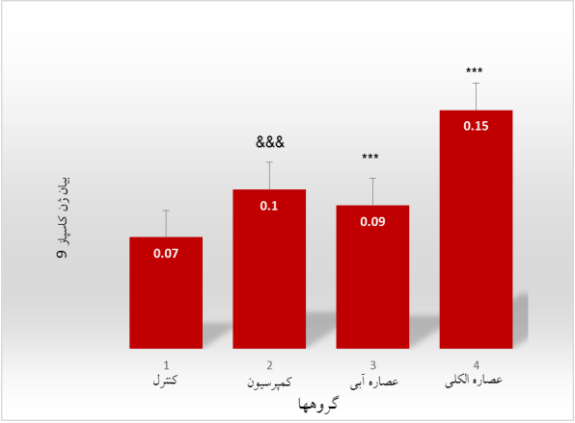
*** نشان دهنده سطح معنی‌داری (P<۰/۰۰۱).

&&& مقایسه گروه کنترل با کمپرسیون را نشان می‌دهد.

*** مقایسه گروه های تیمار با کمپرسیون را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از بیان ژن کاسپاز ۹ در گروه‌های مختلف

در مقایسه بیان ژن کاسپاز ۹ بین گروه‌های (کنترل و کمپرسیون) و گروه کمپرسیون با گروه‌های عصاره الکلی و عصاره آبی مقدار P اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱).



نمودار۴- مقایسه شدت بیان ژن کاسپاز ۹ بین گروه‌های مختلف

در هر گروه اعداد نشان دهنده میانگین±انحراف معیار می‌باشد.

*** نشان دهنده سطح معنی‌داری (P<۰/۰۰۱).

&&& مقایسه گروه کنترل با کمپرسیون را نشان می‌دهد.

*** مقایسه گروه‌های تیمار با کمپرسیون را نشان می‌دهد.

بحث

ضایعات سیستم عصبی گاهی غیر قابل برگشت و جبران ناپذیرند و باعث از کار افتادگی فرد و جامعه می‌شوند. در روند کمپرسیون عصب، فرایندهای التهابی فعال می‌شوند. چند ساعت پس از قطع مکانیکی اعصاب و رشته های عصبی، سلول‌های التهابی به منطقه آسیب دیده وارد شده و باعث پدید آمدن محیط شیمیایی زیـ ان آور و آسیب بیشتر می‌شوند (۱۸).

همان طور که در قسمت نتایج مشاهده می‌گردد تعداد آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی در گروه کمپرسیون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته است و این به این معناست که کمپرسیون عصب سیاتیک جانور سبب پدید آمدن اثرات دژنراسیون مرکزی به صورت رتروگراد به سمت جسم سلولی نورون‌های حرکتی در شاخ قدامی نخاع شده و در نهایت دانسیته نورونی در گروه کمپرسیون در مقایسه با کنترل کاهش معنا داری دارد (نمودار۱). کمپرسیون عصب یکی از عوامل به وجود آورنده ضایعه در اعصاب محیطی می‌باشد. به دنبال کمپرسیون عصب سیاتیک وقایع بیولوژیکی متعددی در سطح سلولی و مولکولی روی می‌دهد که از آن جمله می‌توان به بروز آپوپتوزیس، افزایش ورود کلسیم به درون نورون، آزادشدن نوروترانسمیترهای تحریکی مانند گلوتامات، فعال شدن پروتئاز کالپین، ایجاد رادیکال‌های آزاد و فعال شدن فرآیندهای التهابی اشاره نمود و اگر کمپرسیون عصب شدید باشد منجر به دژنراسیون مرکزی در نخاع می‌گردد (۱۹).

چنانچه در نتایج حاصل از این تحقیق مرگ نورونی در گروه کمپرسیون اتفاق افتاده که کاهش دانسیته نورونی در این گروه شاهد این اتفاق است، به نظر می‌رسد برای ترمیم ضایعه عصب محیطی باید از ماده‌ای استفاده نمود که توانایی مهار یا به تعویق انداختن روندهای تخریبی فوق را داشته باشد و احتمالاً استفاده از کاکوتی که دارای طیف وسیعی از خواص فارماکولوژیکی و ویژگی‌های بارز آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است، می‌تواند در حفاظت از عصب امید بخش باشد (۲۰).

از جمله ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان خانواده نعناعیان لیمونن، کارواکرول، گاما ترپینن، سینئول، بتاکاروتن، نیاسین و تیمول می باشد. در مطالعه‌ای که توسط گلشنی و همکارانبر روی گیاهی از خانواده نعناعیان kotschyi Dracocephalum صورت گرفت مشخص شد که این گیاه به دلیل وجود ترکیباتی نظیر لیمونن و آلفا ترپینئول دارای خاصیت ضد دردی می باشد (۲۱).

همچنین یکی از ترکیبات عمده و اصلی گیاه کاکوتی ماده‌ای به نام پولگون می باشد که اثرات ضد دردی و ضد التهابی آن به خوبی مشخص شده است (۲۲). گیاه کاکوتی احتمالاً به واسطه داشتن مواد مؤثری چون پولگون که اثرات التهابی آن طبق تجربیات قبلی اثبات شده است، اثرات ترمیمی خود را القا کرده است. چنان که نتایج دانسیته نورنی در گروه‌های تیمار عصاره آبی و عصاره الکلی افزایشی معنی‌داری را در هر دو گروه نسبت به گروه کمپرسیون نشان می‌دهد. آنالیز آماری داده‌ها اختلاف بین دانسیته نورونی گروه

تجربی با عصاره آبی با کمپرسیون را معنی‌دار توضیح می‌دهد. در حالی‌که این افزایش در گروه تجربی الکلی معنی‌دار نیست. از آنجایی که آنتی اکسیدان‌ها نقش ارزنده‌ای در حفاظت نورونی بر عهده دارند و کاکوتی دارای آثار بارز آنتی اکسیدانی است و در پژوهش‌های متعدد اثرات ضد اکسایشی عصاره و ترکیبات تشکیل دهنده آن گزارش شده است؛ بنابراین احتمال دارد اثرات ترمیمی عصاره‌های این گیاه به‌علت اثرات آنتی اکسیدانی گیاه باشد. در مقایسه دوتایی گروه‌های تیمار آبی با تیمار الکلی آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده می‌شود. به‌طوری‌که گروه تیمار با عصاره آبی افزایش معنی‌داری را در دانسیته نورونی نسبت به گروه تیمار با عصاره الکلی نشان می‌دهد. این اثر احتمالاً به دلیل فلاونوئیدهای موجود در عصاره آبی است. شواهد نشان می‌دهد که فلاونوئیدها بقای نورونی و رشد آکسون پس از آسیب عصبی را حمایت می‌کند که نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با بهبود سلول‌های عصبی در گروه تیمار احتمالاً نشان دهنده عملکرد فلاونوئیدهای موجود در عصاره گیاه کاکوتی در روی سلول‌های آسیب دیده بوده است (۲۳). فلاونوئیدها از طریق چلاته کردن یون‌های فلزی فعالیت آنتی اکسیدانی خود را اعمال می‌کنند. در این تحقیق خاصیت آنتی اکسیدانی بالا را به وجود این ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت می دهند (۲۴). در بررسی نتایج بیان ژن مربوط به کاسپاز ۳ و ۹ در گروه کمپرسیون افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد) که احتمالاً مرگ سلولی ایجاد شده از طریق القای کمپرسیون به‌علت افزایش بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ می‌تواند باشد. این کاسپازها مسیر داخلی آپوپتوز را راه اندازی می‌کنند. صرف نظر از محرک‌ها، این مسیر نتیجه افزایش نفوذپذیری میتوکندری و انتشار مولکول‌های پروآپوپتوتیک مانند سیتوکروم–c به سیتوپلاسمی ایجاد می‌شود. محرک‌های داخلی مانند آسیب‌های غیرقابل جبران ژنتیکی، هیپوکسیا، غلظت‌های بسیار بالایی از Ca^{2}+ سیتوکولار و استرس اکسیداتیو شدید، برخی از عوامل ایجاد آپوپتوز درون سلولی هستند (۲۵). معمولاً کمپرسیون عصب یک نوع استرس اکسیداتیو شدید در حیوان ایجاد می‌کند که پیامد آن ورود عظیمی از یون‌های کلسیم به سلول می‌باشد؛ بنابراین می‌تواند عاملی برای ایجاد فرایندهای آپوپتوز باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که مقایسه بیان ژن کاسپاز ۳ بین گروه‌های (کنترل و کمپرسیون) افزایش معنی‌داری را در گروه کمپرسیون نشان می‌دهد. مقایسه گروه کمپرسیون با گروه‌های تیمار با عصاره آبی و الکلی نشان داد که در عصاره آبی کاهش معنی‌دار و در عصاره الکلی افزایش معنی‌داری برای بیان ژن کاسپاز ۳ مشاهده می‌شود. کاهش بیان ژن کاسپاز ۳ که از عوامل پیش برنده اپوپتوز است می‌تواند گویای این باشد که روندهای ترمیمی ایجاد شده در گروه تیمار شده با عصاره آبی کاکوتی از طریق مهار یا کاهش مسیر آپوپتوز داخل سلولی بوده است (۳).

در این تحقیق در گروه تیمار با عصاره آبی کمترین میزان بیان ژن کاسپاز ۳ مشاهده شد که با نتایج تعداد نورون‌ها که بیشترین افزایش را در این گروه نشان می‌داد، همخوانی دارد. ظاهراً مواد موثر این گیاه بیشتر در عصاره آبی محلول بوده که ترمیم را افزایش داده است.

میزان بیان ژن کاسپاز ۹ در گروه کمپرسیون نسبت به کنترل افزایش قابل توجهی داشته که نشان دهنده القای آپوپتوز در این گروه است. بیشترین میزان بیان ژن کاسپاز ۹ در گروه تیمار با عصاره الکلی است که نشان دهنده القای آپوپتوز است و با نتایج دانسیته نورونی که به صورت کاهشی در این گروه است همخوانی دارد. در عصاره آبی بیان ژن کاسپاز ۹ نسبت به کمپرسیون کاهش پیدا کرده است که در این گروه القای آپوپتوز کاهش معناداری داشته است.

نتایج نشان می‌دهد که ظاهراً عصاره آبی این گیاه توانسته به‌طور مؤثری بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ را کاهش دهد؛ بنابراین احتمالاً اثرات رژنراسیونی مشهود این عصاره مربوط به مسیرهای سیگنالینگ کاسپازی می‌باشد.

با بررسی نتایج این پژوهش مشخص شد که در لام‌های میکروسکوپ نوری در گروه کنترل هسته در مرکز قرار دارد و شکل نورون کروی بوده است؛ ولی در گروه کمپرسیون هسته در کنار و چروکیده می‌باشد؛ در گروه‌های تیمار نورون‌ها مجدداً به سمت مرکز سلول برگشته است که در گروه تیمار با عصاره آبی هسته‌ها واضح‌تر

دیده می‌شوند و تشابه بیشتری به گروه کنترل نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کمپرسیون عصب سیاتیک سبب ضایعات سیستم عصبی مرکزی شده است؛ به گونه‌ای که باعث دژنره شدن جسم سلولی نورون‌ها در نخاع می‌شود. تیمار گروه‌ها با عصاره‌های آبی و الکلی گیاه کاکوتی باعث بهبود نسبی روندهای آپوپتوزی القا شده گردید؛ به‌طوری‌که در گروه تیمار شده با عصاره آبی تعداد نورون‌ها به گروه کنترل نزدیک شده و بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ نسبت به گروه کمپرسیون کاهش یافته که حاکی از مهار آپوپتوز و پیشرفت رژنراسیون سلول است. مشاهدات میکروسکوپ نوری وضعیت سلول‌ها را در این گروه مشابه سلول نرمال گزارش می‌کند. احتمالاً فراکسیون عصاره آبی گیاه کاکوتی دارای جز موثری است که باعث این بهبودی می‌شود.

تقدیر و تشکّر

این تحقیق حاصل پایان‌نامه با کد ۲۱۴۵۰ است که در گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صورت گرفت. از مدیریت محترم گروه زیست شناسی سرکار خانم دکتر بالانژاد کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Tehranipour M, Bahar ara J, Mostafaee M. The neuroprotective effect of CSF interaperitotoneal injection on alpha motor degeneration after sciatic nerve compression in rat. J Arak Uni Med Sci. 2009; 12(3): 101-8. [Persian]. Link

2- Tehranipour M, Javadmoosavi Z. The Neuroprotective Effect of Alcoholic Extract of Cannabis Sativa on Neuronal Density of Spinal Cord Alpha Motoneurons after Sciatic Nerve Injury in Rats. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci. 2011; 19(3): 339-49. [Persian]. Link

3- Coleman MP, Conforti L, Buckmaster EA, Tarlton A, Ewing RM, Brown MC, et al. An 85- kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(17): 9985-90. DOI: 10.1073/pnas.95.17.9985

4- Lebel-Hardenack S, Grant SR. Genetics of sex determination in flowering plants. Trends Plant Sci.1997; 2(4): 130-6. DOI: 10.1016/S1360-1385(97)01012-1

5- Zeinali H, Arzani A, Razmjoo R, Rezaee MB. Evaluation of Oil Compositions of Iranian Mints **(*Mentha* ssp.)**. 2005; 17: 156-59. DOI: 10.1080/10412905.2005.9698863

6- Salehi P, Sonboli A, Eftekhar F, NejadEbrahimi S, Yousefzadi M. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of Ziziphora clinopodioides subsp. rigida (BOISS.) RECH. f. from Iran. Biol Pharm Bull 2005; 28(10): 1892-6. DOI: 10.1248/bpb.28.1892.

7- Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappaB signaling system. Cytokine Growth Factor Rev. 2008; 19(3-4): 187–197. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2008.04.005

8- Aris A, Marrinhas E, Carvalho R, Dias C, Saavedra MJ. Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of ahaydroalcoholic Extract of Pterospartum tridentatum and Mentha Pulegium against Staphylococcus aureus Isolates. Biomed Res int. 2016; 2016:5201879.1-12. DOI: 10.1155/2016/5201879

9- Fadaei F, Zahedi L, Farahani Z, Ghasemzade N. Review of two version of declaration of Helsinki (2013 and 2008): challenges and changes. J Med Ethics Hist Med. 2016; 9 (3); 75-92. Link

10- Cicchetti E, Chaintreau A. Comparison of extraction techniques and modeling of accelerated solvent extraction for the authentication of natural vanilla flavors. J Sep Sci. 2009; 32(11): 1957-64. DOI: 10.1002/jssc.200800650

11- Tehranipour M, Attariyan F.The neuroprotective effect of stachys lavandulifolia Vahl leaves aqueous extract on the density of alpha neurons in anterior horn of spinal cord after sciatic nerve compression in rats. J shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(2): 119-126. [Persian]. Link

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

13- Razavi M, Tehranipour M, Khayatzade J .Effects of aqueous extract saliva chloroleuca leaves on degeneration alpha motoneurons in spinal cord after sciatic nerve compression in rat. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(2): 22-30. Link

14- Behnam-Rasouli M, Nikravesh M, Mahdavi-Shahri N, Tehranipour M. Post-Operative time effect after sciatic nerve crush on the number of alpha motonrurons using asterio gical counting metod (Dissector). Iran Biomed j. 2000; 4(1): 45-9. [Persian]. Link

15- Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J Microsc.1994; 134(Pt 2): 127-36. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1984.tb02501.x

16- Atawodi S.E, Atawodi J.C, Dzikwi A. Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. 2011; Sahel Med. 2010; 13(2): 54-63. DOI: 10.4314/smj2.v13i2.64834

17- Jeon S, Kumar Jha M, Ock J, Suk K. Role of Lipocalin-2-Chemokine Axis in the Development of Neuropathic Pain following Peripheral Nerve Injury. J Biol Chem. 2013; 288(33): 24116-27. DOI: 10.1074/jbc.M113.454140

18- Rowinsky E, Donehower R. The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. Pharmacol Ther. 1991; 52(1): 35-84. DOI: 10.1016/0163-7258(91)90086-2

19- Hanz Sh, Fainzilber M. Retrograde signaling in injured nerve - the axon reaction revisited. J Neurochem. 2006; 99(1): 13-9. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04089.x

20- Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F, Mare A, Alzrigh M, Benghuzzi Het al. Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone: an oxidative stress inhibitor. Biomed Sci Instrum. 2003; 39: 440-5. Link

21- Golshani S, Karamkhani F, Monsef Esfehani HR, Abdollahi M. Antinociceptive effects of the essential oil of Dracocephalum kotschyi in the mouse writhing test. J Pharma Pharmaceut Sci 2004; 7(1): 76-9. Link

22- De Sousa DP, Junior EV, Oliveira FS, De Almeida RN, Nunes XP, Barbosa-Filho JM. Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-activity relationship. Z Nature Forsch [C] 2007; 62 (1-2): 39-42. Link

23- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. J Biol Chem. 2005; 280: 38729–38733. DOI: 10.1074/jbc.M509497200

24- Kang MH, Reynolds CP, Bcl-2 inhibitors: Targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. Clin Cancer Res. 2009, 15(4): 1126-1132. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0144

25- Goldar S, Shekari Khaniani M, Mansoori Derakhshan S, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16(6): 2129-44. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129.