Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2017; 20(119): 100-112

Original Article

Investigation into Regeneration Mechanism of Hydroalcoholic Lavender (*Lavandula officianalis*) Extract through the Evaluation of NT3 Gene Expression after Sciatic Nerve Compression in Rats

Fereshteh Naderi Allaf[1], Maryam Tehranipour[2*], Khadijeh Nejad Shahrokh Abadi[3]

1. MSc in Cellular Developmental Biology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Associate Professor, PhD in Animal Physiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, PhD in Molecular Genetics, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 21 Jan 2017, Accepted: 15 Mar 2017

Abstract

Background: Retrograde transport to the alpha motoneurons causes spinal degeneration. The neurotrophic factor (NT3) increases the number of myelinated axons in the dorsal root, leads to differentiation and survival of sensory neurons, parasympathetic motoneurons and prevents cell death. Lavender is a plant in the family Lamiaceae which is reported to have antioxidant, antispasmodic, diuretic, anti-asthmatic, refrigerant, and antipyretic effects. This study examined NT3 gene expression changes after sciatic nerve compression in rats, in the presence of *Lavandula officinalis* extract.

Materials and Methods: Lavender Soxhlet hydroalcoholic extraction was prepared. 36 male Wistar rats were randomly divided into 3 groups including control, compression and treatment (compression group + hydroalcoholic extract of Lavender injections 75mg/kg) groups. In controls the muscle was opened without damage to gain access to the sciatic nerve. In compression and treatment groups, the sciatic nerve (right leg) was compressed. The extract was injected intraperitoneally in two occasions. A biopsy was taken from the spinal cord segments L4-L6 on day 28, total RNA was extracted and cDNA was synthesized and NT3 gene expression changes were analyzed by ANOVA test by using SPSS software.

Results: The results showed that NT3 gene expression had a significant reduction in compression group compared to the control group ($p<0.001$) and it had a significant increase in treatment group compared with the compression group ($p<0.001$).

Conclusion: A significant increase in gene expression shows that *Lavandula officinalis* hydroalcoholic extract improves nerve regeneration via NT3 gene expression.

Keywords: Compression, Lavandula officinalis, NT3 gene, Sciatic nerve regeneration.

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

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۲۰، شماره ۲ (شماره پیاپی ۱۱۹)، اردیبهشت ۱۳۹۶، ۱۱۲-۱۰۰

بررسی مکانیسم اثر ترمیمی عصاره هیدروالکلی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula officianalis*) از طریق ارزیابی بیان ژن NT-3 پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت

فرشته نادری علاف[۱]، مریم طهرانی پور[۲*]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۳]

۱.کارشناسی ارشد سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲.دانشیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۳.استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: ضایعات اعصاب به نورون‌های آلفا رسیده و سبب دژنراسیون مرکزی در نخاع می‌شوند. فاکتور نوروتروفیک (NT-3) موجب افزایش آکسون‌های میلین‌دار در ریشه خلفی، تمایز و بقای نورون‌های حسی، پاراسمپاتیک و موتونورون‌ها شده و از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند. گیاه اسطوخودوس از خانواده نعنائیان بوده و اثرات آنتی اکسیدانی، ضد اسپاسم، مدر، ضد آسم، تب بر و آنتی اسپاسمودیک آن گزارش شده است. در این پژوهش تغییرات بیان ژن NT-3 پس از کمپرسیون عصب سیاتیک رت در حضور عصاره هیدروالکلی گیاه *Lavandula officinalis* بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس به روش سوکسله تهیه شد. ۳۶ راس رت نژاد ویستار به طور تصادفی به ۳ گروه کنترل، کمپرسیون و تیمار (کمپرسیون + تزریق عصاره ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. در گروه کنترل، عضله در محل عصب سیاتیک بدون آسیب شکافته شد. در گروه‌های کمپرسیون و تیمار، عصب سیاتیک پای راست تحت کمپرسیون قرار گرفت. عصاره به صورت داخل صفاقی در دو نوبت تزریق شد. در روز ۲۸ از قطعات L4-L6 نخاع نمونه برداری شد، Total RNA استخراج و cDNA سنتز گردید و تغییرات بیان ژن NT-3 با نرم افزار SPSS و آزمون آنووا بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان ژن NT-3 در گروه کمپرسیون نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار($p<۰/۰۰۱$) و درگروه تیمار در مقایسه با کمپرسیون افزایش معنی داری داشته است($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: افزایش معنادار بیان ژن نشان می‌دهد که عصاره هیدرو الکلی گیاه *Lavandula officinalis* با افزایش بیان ژن NT-3 موجب پیشبرد رژنراسیون نورون‌های آسیب دیده می‌شود.

واژگان کلیدی: *Lavandula officinalis*، تخریب، ترمیم عصب سیاتیک، ژن NT-3.

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

Email: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

مقدمه

تحقیقات نشان داده که قطع عصب سیاتیک موجب کاهش تعداد نورون‌های موجود در گانگلیون ریشه پشتی یا DRG (Dorsal Root Ganglion) نخاع از طریق مرگ اپتوتیک می‌گردد. پس از ضایعه بیان ژن‌های نوروتروفین‌ها، نوروترانسمیترها وگیرنده‌های آن‌ها تغییر می‌کند که این به ضرر ترمیم نورون‌ها است.

خانواده نوروتروفین (Brain-Derived Neurotrophic Factor) BDNF, (Neurotrophin-3) NT3 (Nerve Growth Factor) NGF از مهم‌ترین فاکتورهای رشد در سیستم عصبی می‌باشند، که در رشد، ترمیم و بازسازی و نهایتا بقای بافت عصبی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها نقش خود را از طریق دو نوع گیرنده اختصاصی Tropomyosin-related Trks (kinase receptors) شامل (TrkA, TrkB, TrkC) و عمومی (p75NTR)(Neurotrophin p75 receptor) اعمال می‌نمایند. نوروتروفین‌ها از طریق پردازش درون سلولی با واسطه آنزیم‌های خانواده PC (Proprotein canverteses enzymes) (furin, PC1/PC3, PC2, PC4, PC5, PACE4, PC7/LPC) فعال می‌گردند. با توجه به وسعت معلولیت ناشی از آسیب‌های نخاعی و افزایش روز افزون مبتلایان به آن تلاش‌های زیادی برای ترمیم این ضایعه انجام شده است. از جمله راهکارهای ترمیم نخاع پیوند بافت جنینی، سلول‌های شوان، سلول‌های پیاز بویایی و سلول‌های بنیادی جنینی، مغز استخوان و سلول‌های بنیادی عصبی را می‌توان نام برد. در مواردی از ژن درمانی و وارد نمودن ژن‌های موثر در ترمیم از قبیل BDNF, NGF, NT-3 به درون سلول‌های تمایزیافته (مانند فیبروبلاست) یا سلول‌های بنیادی استفاده شده است. در پستانداران، سیستم عصبی دارای ظرفیت قابل ملاحظه‌ای برای تغییر در طول زندگی است. بیان ژن‌های مرتبط با رشد آکسون، مکانیسم‌های انتقال آکسون، دسترسی به فاکتورهای رشد، تولید ماتریکس خارج سلولی و مولکول‌های اتصال دهنده سلولی، فعالیت سیتوکین‌ها و نفوذ گلیاها همه در ترمیم آکسون تاثیر دارند(۱). ترمیم و بازسازی بافت عصبی مستقیما برکیفیت زندگی موجود اثر می‌گذارد. اگرچه تجربیات فراوانی در زمینه ترمیم عصب کسب شده است، اما به نظر می‌رسد که کافی یا مناسب نبوده و همواره دانشمندان به دنبال راهکارهای جدیدی هستند تا بتوانند اثر ضایعه را به حداقل رسانده و موجبات بازسازی عضو آسیب دیده را فراهم سازند. از آنجایی که NTs (Neurotrophins) توسط متخصصین علوم اعصاب شناسایی شدند، در ابتدا بیش‌تر بر روی عملکردشان در دستگاه عصبی مطالعه و تمرکز شد، با این وجود شواهد بسیاری از عملکردهای تنظیمی آن‌ها بر روی رشد یا بروز بیماری‌هایی در خارج از دستگاه عصبی مانند بافت قرنیه چشم(۲) نیز وجود دارد. NT-3 ژنی از خانواده نوروتروفین‌هاست که در رشد و نمو دستگاه عصبی، تکوین و تمایز نورون‌ها در دوران جنینی نقش دارند و باعث بقای نورون‌ها به دنبال بسیاری از آسیب‌های عصبی می‌شوند. در پستانداران خانواده نوروتروفین‌ها از چهار عضو تشکیل شده است: BDNF, NGF, NT-3, NT-4/5(۳، ۴). نوروتروفین‌های دیگری هم مانند NT-6 , NT-7 شناخته شده اند که محدود به ماهی‌ها بوده و در پستانداران ارتولوگی ندارند. از روی ژن نوروتروفین‌ها یک‌سری پروتئین‌های ساختاری به صورت پیش‌ساز کد می‌شوند که پس از پردازش به فرم دایمر به درون فضای خارج سلولی ترشح می‌گردند(۲، ۵). این شکست پروتئولیتیک در جایگاه‌های ویژه‌ای و توسط آنزیم‌های کانورتاز پروپروتئین(PCs) صورت می‌گیرد که برای عملکرد نوروتروفین‌ها ضروری است(۳). برخلاف سیستم عصبی مرکزی، فیبرهای عصبی محیطی قادر به بازسازی و عصب‌دهی هدف‌های دیستال می‌باشند. امروزه به نظر می‌رسد درمان‌های وابسته به سلول و نیز وابسته به مولکول‌های موثر در رشد عصب (نوروتروفین‌ها) نتایج بهتری را به دنبال خواهند داشت چرا که بر تقویت ترمیم طبیعی بافت عصبی استوار است. قطع

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

عصب سیاتیک یعنی تخریب سلول‌های عصبی و تخریب آستروسیت‌ها منجر به کاهش شدید اکسیژن و مواد غذایی مورد نیاز سلول‌های عصبی محل آسیب می‌شود. در این زمان سلول‌های آستروسیت سالم اطراف محل آسیب دیده باید نقش نوروتروفیکی خود را تشدید کنند و علاوه بر این، باید رشته‌های قطع شده دیستال (دور از محور) را به کمک ماکروفاژها پاکسازی کنند تا فضا برای رشد رشته پروگزیمال (متصل به محور) فراهم گردد. آستروسیت‌ها اثر خود را با واسطه مولکول‌هایی که تولید می‌کنند بر محل آسیب دیده اعمال می‌کنند. این مولکول‌ها تحت نام کلی نوروتروفین‌ها خوانده می‌شوند و ما در این بررسی به NT-3 که متعلق به همین خانواده است می‌پردازیم. این که بعد از آسیب در چه زمان‌هایی این ژن بیش‌تر بیان شده و چه موقع بیان آن کاهش می‌یابد می‌تواند به درمان بیماری‌های قطع عصب و زمان استفاده از داروهای مشتق از نوروتروفین‌ها کمک بسیاری کند. نیز می‌توان با استفاده از تکنیک ژن درمانی و انتقال ژن‌های موثر در ترمیم عصب مانند BDNF , NGF , NT-3 به درون سلول‌هایی مانند فیبروبلاست‌ها یا سلول‌های تمایز نیافته بنیادی، اقدام به بازسازی عصب نمود(۶). باوجود گزارش‌های فراوانی که ظرفیت محافظت عصبی بسیاری از ترکیبات شیمیایی طبیعی و سنتتیک هم‌چون هورمون‌ها و داروهای فارماکولوژیک را تایید می‌کنند، اما به علت عوارض جانبی ناخواسته آن‌ها، تلاش گسترده‌ای برای بررسی اثرات محافظت عصبی مواد جدیدی هم‌چون داروهای گیاهی در حال انجام است. سابقه درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی به قدمت تاریخ زیست انسان بر روی کره‌ی زمین است و انسان به کمک گیاهان دارویی خود را درمان کرده و می‌کند. انسان تنها با داروهای شیمیایی درمان نمی‌شود بلکه همه عوامل طبیعی نقش درمان را دارند و دارو نهایتا نقش پیش‌گیری را در برابر بیماری‌ها ایفا می‌کند. وجود گیاهان در طبیعت یکی از نعمت‌های بزرگ الهی محسوب می‌شود. گیاهان دارویی برخلاف داروهای شیمیایی اثرات جانبی ندارند و میزان تاثیر آن‌ها بر بدن انسان به مراتب بیش‌تر از داروهای شیمیایی است. نپتامنتوئیدس که در منابع طب سنتی ایران از آن به عنوان اسطوخودوس یا گاهی به نام پونه سای سبلانی(۶) نام برده می‌شود، قرن‌های متمادی به عنوان یک داروی گیاهی برای درمان اختلالات دستگاه عصبی هم‌چون صرع و مالیخولیا مورد استفاده قرار می‌گرفته است. جنس نپتا با نام فارسی پونه سا از تیره lamiaceae (نعنائیان) و شامل ۴۰۰ گونه می‌باشد که بیش‌تر آن‌ها به شکل وحشی در اروپای مرکزی و جنوبی، شمال آفریقا و مرکز و جنوب آسیا روییده و به صورت گسترده‌ای به عنوان یک داروی سنتی ضد اسپاسم، مدر، ضد آسم و تب بر استفاده می‌شود(۷). حدود نیمی از گونه‌های نپتا را می‌توان در ایران یافت که نپتامنتوئیدس یکی از آن‌ها است. نپتامنتوئیدس گیاهی است علفی، چند ساله، بالارونده و افراشته به ارتفاع ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر با گل‌های بنفش رنگ(۶)، که در طب سنتی ایران از آن به عنوان دارویی موثر بر اختلالات سیستم عصبی نام برده شده است(۸، ۹). اخیرا نیز اثر محافظت عصبی آن در جلوگیری از مرگ برنامه ریزی شده ناشی از آکسوتومی در نورون‌های حرکتی نخاعی گزارش گردیده است(۱۰). با توجه به این که عصاره‌ی بعضی از گیاهان می‌تواند روندهای ترمیمی را سرعت بخشیده یا از شدت تخریب سیستم عصبی بکاهد و معمولا درمان‌های گیاهی اثرات جانبی کم‌تری دارند و با توجه به خواص فراوان گیاه اسطوخودوس، این تحقیق سعی دارد تاثیرات احتمالی آن را بر سیستم عصبی بررسی نماید. در این تحقیق تغییرات میزان بیان ژن NT-3 را در قطعه نخاعی مربوط به عصب سیاتیک، در موش‌های تیمار شده با عصاره اسطوخودوس و موش‌های شاهد تیمار نشده بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق تجربی در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی جانوری در گروه زیست شناسی انجام شد. در این تحقیق از ۳۶ راس رت نر نژاد ویستار با حدود

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

وزنی ۲۵۰ – ۲۰۰ گرم، با سن تقریبی ۳ ماه استفاده شد. رت‌ها از بخش حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد خریداری شدند. تا زمان انجام آزمایش حیوانات در شرایط نوری استاندارد روزانه و درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد نگهداری شدند. آب مورد نیاز حیوانات از آب آشامیدنی شهر و غذای آن‌ها نیز دارای فرمول استاندارد و از شرکت جوانه خراسان تهیه شد. گیاه اسطوخودوس از ناحیه کوه‌های هزار مسجد جمع آوری شد و توسط هرباریوم گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با کد ۹۷۲۸ شناسایی شد. بخش هوایی گیاه اسطوخودوس شامل گل و سرشاخه‌ها و ساقه توسط آسیاب کاملا پودر و تا زمان عصاره گیری در جای خشک و خنک نگهداری شد. از پودر گیاه اسطوخودوس به روش سوکسله که یک روش متداول عصاره‌گیری است، عصاره هیدروالکلی تهیه شد. ۵۰ گرم از پودر خشک گیاه اسطوخودوس داخل کاغذ مخصوص کارتوش ریخته و در دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس ۱۵۰ سی‌سی آب مقطر و ۱۵۰ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد در محفظه مخصوص دستگاه ریخته شد. عصاره‌گیری در ۱۰ ساعت صورت گرفت تا اطمینان حاصل شود که تمام عصاره قابل حل در حلال از پودر استخراج شده است(۱۱). حیوانات به صورت تصادفی به ۳ گروه، گروه کنترل، گروه کمپرسیون شامل کمپرسیون عصب سیاتیک با نمونه برداری روز ۲۸، گروه کمپرسیون + عصاره هیدروالکلی با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم + نمونه‌برداری روز ۲۸، تقسیم شدند. جهت انجام عمل کمپرسیون، موش‌های صحرایی هر گروه با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی زایلازین ۶ میلی‌گرم و کتامین ۶۰ میلی‌گرم به نسبت وزن بدن بیهوش گردیدند(۱۲). پس از بیهوشی، حیوان را به پهلوی راست خوابانده و به کمک تیغ موهای پوست ناحیه سر استخوان ران را تراشیده و محل با بتادین ضدعفونی شد. آن گاه در زیر سراستخوان ران، در پوست برشی به طول یک سانتی‌متر به کمک اسکارپل ایجاد کرده و پس از کنار زدن عضلات درعمق این ناحیه، عصب سیاتیک آشکار شد. سپس با پنس قفلدار ساده عصب سیاتیک به مدت ۶۰ ثانیه تحت فشار قرار گرفت. روش اعمال کمپرسیون در همه موش‌های صحرایی یکسان و از پنس قفل دار واحدی استفاده شد. پس ازکمپرسیون، عصب در محل طبیعی خود قرار گرفت و لبه‌های زخم توسط گیره مخصوص به هم بخیه زده شده و محل ضایعه ضدعفونی گردید. در جریان عمل جراحی و پس از آن تا موقع به هوش آمدن، حیوان گرم نگه داشته شد. بعد از این‌که موش‌های صحرایی هوشیاری اولیه خود را به دست آوردند، به قفس‌های جداگانه منتقل و در شرایط استاندارد حیوان‌خانه از نظر نور، دما و رطوبت نگهداری شدند(۱۲). برای هر جانور در طول ۲۸ روز، ۲ نوبت تزریق با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی انجام گرفت. اولین مرحله تزریق بلافاصله بعد از انجام عمل کمپرسیون و تزریق دوم یک هفته بعد صورت پذیرفت(۱۳). به منظور نمونه‌برداری بعد از بیهوش کردن، حیوان از سطح شکمی تشریح شده و احشاء شکمی تخلیه گردید تا ستون فقرات ناحیه کمر برای نمونه برداری آماده شود، سپس از نخاع مربوطه نمونه برداری انجام گرفت. برای یکسان بودن نمونه‌برداری در همه نمونه‌ها نخاع به طورکامل تا انتهای دم اسب، از داخل ستون مهره‌ها خارج گردید. سپس از انتهای دم اسب به اندازه ۱۸ میلی‌متر بالارفته ونمونه‌هایی به طول ۸ میلی‌متر تهیه شد. این منطقه محدوده حضور ریشه‌های عصب سیاتیک و شامل قطعات ۲۴ تا ۲۸ نخاعی می‌باشد(۱۴). از نمونه‌های مورد نظر استخراج RNA (Ribonucleic acid) صورت گرفت. استخراج RNA، با استفاده از کیت استخراج، تهیه شده از دنا زیست انجام گردید. به طور خلاصه، قطعات L4-L6 نمونه‌برداری شده از نخاع در ازت مایع کوبیده شده و در محلول DR1 به مدت چند دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سانتریفیوژ شده و محلول DR2 گرم شده به آن اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

سوپرناتانت به ستون استخراج منتقل و چندین بار با محلول DR3 شستشو شد. در مرحله آخر با اضافه کردن محلول DR4، RNA جمع‌آوری گردید. RNA ابتدا الکواته و سپس برای تعیین کمیت و کیفیت، نانودراپ و الکتروفورز گردید.

پس از انجام مراحل استخراج RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ خلوص RNA استخراج شده تعیین شد. سپس از روی RNA استخراج شده (complementary cDNA) Deoxyribonucleic acid ساخته شد. جهت سنتز cDNA، با استفاده از کیت سنتز پارس توس و با توجه به غلظت RNA حاصل از نانودراپ به مقدار۰/۵ تا ۱ میکروگرم RNA با دستورالعمل کیت و در دو مرحله cDNA سنتز گردید.

سپس واکنش ریل تایم(Real-Time Polymerase Chain Reaction) با استفاده از دستگاه ریل تایم مدل QIAGEN و با مقدار ۳ میکرولیتر از cDNA سنتز شده و با استفاده از کیت Real-Time PCR صورت گرفت. نمونه‌ها به صورت سه تایی برای پرایمر اختصاصی و نیز برای پرایمر هوس کیپینگ (House keeping) انجام شد. هوس کیپینگ ژن برای مقایسه بیان ژن به عنوان کنترل است.

سپس برای آنالیز آماری داده ها از نرم افزار Minitab (SPSS 16) استفاده شد. جهت بررسی و مقایسه و سنجش کیفیت cDNA سنتز شده و استفاده از آن به عنوان استاندارد، پرایمرهای GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase) مربوط به هوس کیپینگ ژن GAPDH رت نیز طراحی و خریداری شد. پرایمرها با استفاده از نرم افزار Prim3 طراحی و سپس در سایت NCBI برای اطمینان از اتصال صحیح BLAST گردید.

برای هر نمونه اصلی یک نمونه حاوی پرایمر GAPDHو نیز پرایمر ژن اختصاصی NT-3 مورد بررسی قرار گرفت .ترادف پرایمرهای به کار گرفته شده و نیز بهترین دمای اتصال(annealing) برای هر جفت پرایمر که از طریق دمای ذوب پرایمر بر اساس نوع نوکلئوتیدها تعیین شده به شرح جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژنNT-3

ژن ها	توالی پرایمر	دمای ذوب پرایمر
NT-3	Forward: 5´-CAAACCTCCAAAGTGCTGTGT- 3	۵۶/۳ ° C
NT-3	Reverse: 5´-GGGGTGAATTGTAGCGTCTCT- 3	۵۶/ ۳ ° C
GAPDH	Forward: 5´- TGCTGGTGCTGAGTATGTCG – 3	۵۳/۸ ° C
GAPDH	Reverse: 5´-GCATGTCAGATC CACAACGG – 3	۵۳/۸ ° C

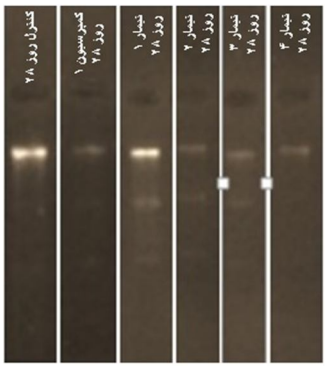
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

یافته‌ها

با استفاده از اسپکتروفتومتری و دستگاه نانودراپ از کیفیت RNA و استخراج صحیح آن اطمینان حاصل شد. سپس با مقایسه کیفیت نمونه‌های برتر جهت سنتز cDNA انتخاب گردید. جدول ۲ نتایج حاصل ازنانودراپ را نشان می‌دهد. این دستگاه به طوراتوماتیک 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(۱۵).

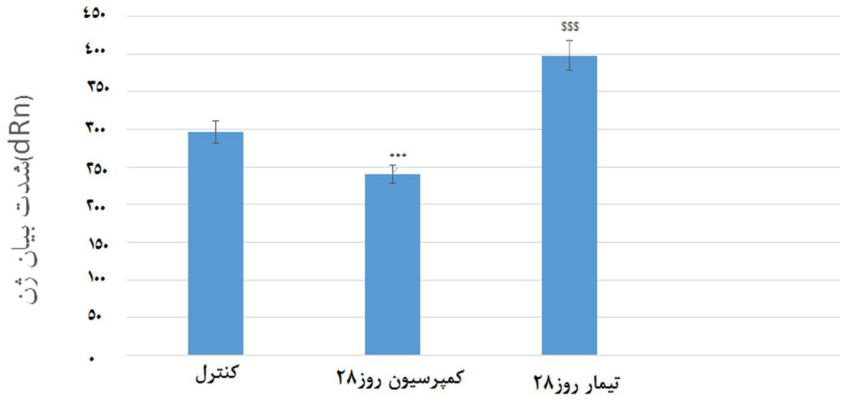
نمونه‌های RNA استخراج شده جهت بررسی کیفیت آن بر روی ژل الکتروفورز آماده گردید، برای انجام عمل الکتروفورز ابتدا ژل ۱/۵ درصد آگارز (همراه با اتیدیوم بروماید) تهیه گردید. سپس به مقدار ۲ میکرولیتر از انواع RNA استخراج شده همراه با لودینگ بافر (Loading buffer) در چاهک‌های ژل ریخته شد. ژل به مدت ۴۰ دقیقه در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۹۰-۱۰۰ ران گردید. سپس با دستگاه UV Tec از ژل عکس‌برداری شد.

ستون‌های RNA موجود را به صوررت ۳ باند مجزا نشان می‌دهند. شکل ۱، نمونه‌های RNAی استخراج شده را بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان می‌دهد. همان طور که در شکل دیده می‌شود بعضی از ستونرها کیفیت بهتری را نشان می‌دهند که دارای سه باند مشخص هستند. در تکرارهای مورد استفاده از نمونه‌های مناسب برای سنتز c DNA استفاده گردید. در ادامه پس از انجام واکنش RT- PCR (Reverse Transcription Polymerase chain Reaction)که به صورت سه تایی و توسط دستگاه Real Time مدل QIAGEN انجام گردید، نمودار بیان ژن رسم شد.



شکل ۱. شکل نمونه‌های RNAی استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد را نشان می‌دهد. نمونه‌ها به ترتیب عبارتند از کنترل روز ۲۸، کمپرسیون ۱ روز ۲۸، تیمار ۱ روز ۲۸، تیمار ۲ روز ۲۸، تیمار ۳ روز ۲۸، تیمار ٤ روز ۲۸

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018



نمودار ۱. نمودار مقایسه شدت بیان ژن در عصب سیاتیک بین گروه‌های کنترل، کمپرسیون و عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در روز ۲۸

*** مقایسه شدت بیان ژن بین گروه کنترل و گروه کمپرسیون را نشان می دهد ($p<0/001$).

$$$ مقایسه شدت بیان ژن بین گروه کمپرسیون و گروه تیمار روز ۲۸ را نشان می‌دهد ($p<0/001$).

بر اساس نمودار۱، محور افقی نوع نمونه و محور عمودی درصد میزان بیان ژن مربوط به نمونه‌های کنترل، کمپرسیون و تیمار را در طی ۲۸ روز نشان می‌دهد. بر طبق این نمودار، بیان ژن NT-3 پس از گذشت ۲۸ روز در گروه کمپرسیون در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری نشان می‌دهد ($p<0/001$)، هم‌چنین بیان ژنNT-3 در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی در روز ۲۸افزایش معناداری ($p<0/001$) نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد شدت بیان ژن NT-3 در گروه تیمار نسبت به گروه کمپرسیون افزایش معناداری داشته است. ($p<0/001$) بیش‌ترین و قابل توجه‌ترین میزان بیان ژن مربوط به گروه تیماردر روز ۲۸ می‌باشد.

بحث

بر پایه نتایج به دست آمده از این تحقیق و آنالیز داده‌ها، رت‌های تیمار با عصاره در روز بیست وهشتم نسبت به رت‌های کمپرسیون در زیرگروه خود افزایش معناداری در بیان ژن NT-3 داشته است ($p<0/05$).

نتایج حاصل از پژوهش انجام شده توسط حجازی و همکاران نشان می‌دهد که بیان ژن NT3 پس از گذشت ۱، ۷، ۱۴، ۲۸ روز در گروه کمپرسیون در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری نشان می‌دهد(۱۶). در تحقیق دیگری که حیدرزاده انجام داده است میزان بیان ژن NT3 در ۶ ساعت ابتدایی پس از آسیب عصب افزایش یافته و در ۷۲ ساعت به اوج خود رسیده و سپس کاهش نشان می‌دهد(۱۷). هم‌چنین پژوهشی که توسط سانگ و همکارانش انجام شد نشان داد که ضایعه نخاعی موجب القا و مهار ژن‌های مختلف می‌شود که تاثیر متقابل آن‌ها مرگ سلول را باعث می‌شود. بسیاری از ژن‌هایی که در رشد و تمایز، بقا و حفاظت عصبی نقش دارند، ۲۴ ساعت پس از آسیب، افزایش بیان داشته اند(۱۸).

دیگر داده‌های آماری حکایت از این داشت که تزریق داخل صفاقی عصاره‌ی هیدروالکلی اسطوخودوس، میزان بیان ژن NT-3 را در رت‌هایی که عصب سیاتیک آن‌ها له شده بود،

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

بالا می‌برد. بیش‌ترین میزان بیان ژن NT-3 در گروه مربوط به تیمار روز بیست و هشت می‌باشد که احتمالا علت آن وجود مولکول‌های موثر بر بیان ژن NT-3 در گیاه اسطوخودوس می‌باشد(نمودار ۱). بر اساس نتایج دیده شده و هم‌چنین بر اساس اطلاعات به دست آمده از نرم افزار Minitab میزان بیان ژن در رت‌های تیمار روز بیست و هشتم افزایش معناداری داشته است ($p<0/05$) ، که می‌تواند دلالت بر اثرات مثبت عصاره اسطوخودوس باشد، همان‌طور که در طب سنتی ایران از آن به عنوان دارویی موثر بر اختلالات سیستم عصبی نام برده شده است(۸، ۹)،که این می‌تواند به علت مواد موثره موجود در گیاه اسطوخودوس مانند فلاونوئیدها با خاصیت ضد التهابی باشد(۱۹، ۲۰) که احتمالا در ترمیم عصب سیاتیک موثرند. در سال‌های اخیر پژوهش‌گران به وجود فلاونوئیدهای متعدد در انواع گونه‌های نپتا اشاره کردند و اثر محافظت عصبی گیاه اسطوخودوس را در جلوگیری از مرگ برنامه ریزی شده ناشی از آکسوتومی در نورون های حرکتی نخاع را گزارش دادند و قابلیت داروی گیاهی نپتامنتوئیدس را در پیش‌گیری از آسیب نورون‌های حرکتی نخاع بررسی کردند و دریافتند این گیاه فاقد قابلیت پیش درمانی است، هم‌چنین محققان در پژوهشی بیان نمودند فلاونوئیدهای اسطوخودوس از سد خونی- مغزی عبور کرده و وقتی مقدار آن‌ها در نخاع به حد نصاب رسید، عملکرد نورون‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند(۲۱)، هم‌چنین محققان اثر مهارکنندگی عصاره اسطوخودوس روی آنزیم استیل کولین استراز را به اثبات رساندند(۲۲). هم‌چنین با توجه به مقدار لینالول موجود در گیاه اسطوخودوس (۳۵-۲۰ درصد)(۲۳) و خواص آنتی اکسیدانی و آرام بخشی که دارد(۱۹، ۲۰) می‌تواند در ترمیم نورون‌ها اهمیت داشته باشد.هم‌چنین لینالول و لینالیل استات موجود در این گیاه قادر به تحریک سیستم پاراسمپاتیک بوده و لینالیل استات نیز دارای خواص نارکوتیک بوده و لینالول موجود در ان به صورت یک آرام‌بخش عمل می‌کند(۲۴). پژوهش‌گران مکانیسم احتمالی اثر ضد افسردگی اسطوخودوس را موثر بودن لینالول موجود در گیاه اسطوخودوس بر افزایش سطح نورآدرنالین و دوپامین اعلام نمودند(۲۵). در مطالعه‌ای اثر بخشی مصرف توام تنتور اسطوخودوس و ایمی پرامین در بیماران افسرده اثبات شده است. ظاهرا اسطوخودوس از طریق اثر بر سیستم آمیگدال و هیپوکامپ اثرات سایکولوژیک خود را اعمال می‌کند(۲۶). پژوهشگران با انجام آزمون‌های مختلف، اثر عصاره‌های آبی الکلی و پلی فنلی و نیز اسانس این گیاه را به عنوان یک ماده ضد التهاب بررسی و اثبات نمودند. هم‌چنین محققان اثر مهارکنندگی عصاره اسطوخودوس روی آنزیم استیل کولین استراز را به اثبات رساندند(۲۲). وجود ترکیباتی مانند مونوترپن‌ها و سزکوترپن‌ها مثل لینالول و لینالیل استات (۵۵-۳۰ درصد)(۲۳). وفلاونوئیدهایی مثل Luteolin که در تقویت سیستم عصبی مرکزی به اثبات رسیده است در ترمیم عصب سیاتیک موثر می‌باشد. در پژوهشی دیگر نشان داده شد که عصاره اسطوخودوس باعث تغییر بیان معنی‌داری در سطح پروتئوم می‌شود و احتمالا فرایندهای بیولوژیک ویژه‌ای را در هیپوکامپ موش صحرایی فعال می‌نماید که باعث تقویت یادگیری و حافظه در موش سالم و آلزایمری می‌گردد(۲۷). عصاره آبی گیاه اسطوخودوس بر بقای سلول‌های سرطانی اثر مهاری قابل توجهی نشان داده است(۲۸). اسطوخودوس دارای عملکرد مشابه با بنزودیازپین‌ها بوده و موجب افزایش GABA (Gamma-Amino Butyric acid) در آمیگدال می‌شود و با توجه به اثر مثبت آن می‌توان در داروسازی از آن بهره برد(۲۶). در سال‌های اخیر روش‌های آزمایشگاهی توسعه یافته و اجازه تشکیل و نیز ترمیم نورون را در محیط آزمایشگاه (in vitro) داده است. مطالعات نشان داده که سیستم عصبی مرکزی و محیطی در پستانداران به صورت یکسان به آسیب‌ها پاسخ نمی‌دهند. به دنبال قطع اعصاب محیطی و شروع دژنراسیون والرین، سلول‌های شوان و مونوسیت‌ها با همکاری همدیگر میلین و اجزای قطعه انتهایی آکسون را در روزهای اول پس از آسیب بیگانه خواری می‌نمایند(۲۹). نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

فاکتورهای مشتق از هدف هستند که در رشد، تمایز، ترمیم و بازسازی و نهایتا بقا و حفظ عملکرد نورون‌های مختلف هم در دستگاه عصبی مرکزی و هم محیطی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. این فاکتورها در نورون، عضله و غدد تولید می‌شوند و از یک نورون به سایر نورون‌ها، سلول‌های گلیا یا اندام‌های هدف (عضله و غدد) فرستاده می‌شوند(۱). خانواده‌ی نوروتروفین‌ها در بسیاری از عملکردهای دستگاه عصبی، شامل رشد اکسون‌ها، انعطاف پذیری سیناپسی، تمایز و میلینه شدن، بقای نورون‌ها در طول تکوین، بقا و عملکرد نورون‌های بالغ و هم‌چنین پیش روی و باز تولید اکسون‌های آسیب دیده پس از آسیب‌های مختلف دستگاه عصبی مرکزی و محیطی دخیل می باشند(۱). تولید نوروتروفین‌ها در نورون‌های حسی اولیه برای رشد، بلوغ و حفظ سیستم عصبی لازم و ضروری می‌باشد. پس از ضایعه بیان ژن‌هایی مانند نوروتروفین‌ها، نوروترانسمیترها و گیرنده‌های آن‌ها کاهش می‌یابد که این به ضرر ترمیم نورون‌ها است. این یافته هم راستا با یافته‌های حاصل از این پژوهش است به طوری که در گروه کمپرسیون بیان ژن NT-3 نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است (نمودار ۱). بیان ژن‌های مرتبط با رشد آکسون، دسترسی به فاکتورهای رشد، تولید ماتریکس خارج سلولی(۱)، ملکول‌های اتصال دهنده سلولی، فعالیت سیتوکین‌ها و نفوذ گلیاها بر ترمیم آکسون تاثیر دارند. مطالعات زیادی نشان می‌دهد که پس از آسیب در سیستم عصبی مرکزی، تماس نوروتروفین‌ها می‌تواند مرگ نورون‌هایی که اکسون‌هایشان قطع شده است را محدود نماید. براساس این یافته‌ها و اثر مثبت عصاره اسطوخودوس در افزایش بیان ژن NT-3 که خود موجب افزایش تعداد آکسون‌های میلین دار در روند ترمیم در ریشه خلفی می‌شود که جهت برقراری ارتباطات کورتیکوتالامیک ضروری می‌باشد. هم‌چنین موجب تمایز و بقای نورون‌های حسی، پاراسمپاتیک و موتونورون‌ها شده و از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند، می‌توان به اهمیت مولکول‌های موثره این گیاه در ترمیم عصب پی برد. اگر مداخلات جراحی به تأخیر بیفتد، سلول‌های شوان به طور خودجوش دچار مرگ سلولی شده و ترمیم و بازسازی کمتری انجام می‌گیرد. مطابق با نتایج حاصل از این تحقیق در گروه تیمار شده با عصاره، بیان ژن NT-3 پس از آسیب به طور معنی‌داری نسبت به گروه کمپرسیون و حتی کنترل افزایش یافته است که حاکی از اثرات مواد موثره موجود در عصاره این گیاه در تغییر بیان ژن می‌باشد. به تازگی، Gordon و همکارانش نشان دادند که در تخریب ساختار عصبی، ماهیچه‌های در حال تخریب در بافت عصبی، به صورت منفی بر روی نتایج عملکردی تأثیر می‌گذارند. در نتیجه تلاش می‌شود تا احیاء عصب تا حد ممکن سریع آغاز شود(۳۰). استفاده از گیاه اسطوخودوس می‌تواند سبب تسریع ترمیم عصب آسیب دیده شود و از اثر ماهیچه‌های در حال تخریب در بافت عصبی ممانعت به عمل آورد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره اسطوخودوس بیان ژن NT-3 را در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل نیز افزایش داده است، لذا اثر مواد موثره این عصاره بر بیان این ژن بیش از حد نیاز به ترمیم بافت بوده و دارای اثرات تحریک کنندگی شدید است که می‌توان در سرعت ترمیم آن را مشاهده نمود. راهکار دیگر استفاده از داروها و موادی است که بتوان افزایش سطح فاکتورهای نوروتروفیک را به آن نسبت داد. از این میان ما گیاه اسطوخودوس با پیشینه‌ی چند هزار ساله را انتخاب کردیم. این انتخاب بر اساس تاریخچه درمانی گیاه صورت گرفت. از عصاره هیدروالکلی این گیاه جهت ارزیابی تغییرات میزان بیان ژن استفاده گردید تا مواد موثره موجود در اسطوخودوس، هم در آب و هم در محیط الکلی به راحتی محلول و از آن خارج گردد. شاید اثر اسطوخودوس از طریق تحریک افزایش تولید سلول‌های شوان به هنگام آسیب عصب اعمال می‌گردد. سلول‌های شوان خود بیان ژن NT-3 را افزایش می‌دهد. احتمالا این گیاه حاوی مولکول‌های موثره‌ای است که سبب راه افتادن واکنش‌های آبشاری می‌شود که منجر به بیان بیش‌تر ژن می‌گردد و از مرگ بیش‌تر نورون‌ها جلوگیری کرده و

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

روند رژنراسیون را تسریع می‌کند. شاید وجود مشتقات کومارینی سبب هجوم بیش‌تر خون به سمت اعصاب آسیب دیده شود و سبب رساندن سلول‌های ایمنی و رفع التهاب بافتی شود. هم‌چنین مولکول‌های پیش ساز جهت ترمیم بافت را از راه رگ‌ها به آنجا برساند. این گیاه ضد اکساینده‌ی طبیعی است و از تخریب بیش‌تر بافت جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری

بر اساس این پژوهش و آنالیز داده‌های آماری مربوط به میزان بیان ژن NT-3 در گروه‌های کنترل، کمپرسیون و تیمار با عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه اسطوخودوس، استفاده دارویی از این گیاه می‌تواند منجر به بهبود عملکردی عصب آسیب دیده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه دوستان و همکاران در آزمایشگاه تکوین جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد هم‌چنین از سرکار خانم دکتر آذرنوش جعفری مسئول مرکز هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی (IAUM) که در تشخیص و کدگزاری گیاه کمک شایانی نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد با عنوان "بررسی تغییرات میزان بیان ژن NT-3 پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در زمان های مختلف در رت نر نژاد ویستار در حضور عصاره هیدروالکلی گیاه اسطوخودوس" می‌باشد.

منابع

1. Thanos PK, Okajima S, Terzis J K. Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. J of Reconstructive Microsurg 1998; 14(6): 423-437.
2. Montazeri F, Esmaeili A, Miroliaei M, Moshtaghian S J. Dual Role. [Interactions and Signaling Pathways of p75 NTR in the Nervous System]. G3M 2011; 9 (2) :2401-2409 [Farsi].
3. Marandi M, Mowla SJ, Tavallaei M, Yaghoobi MM, Jafarnejad SM. Proprotein convertases 1 and 2 (PC1 and PC2) are expressed in neutrally differentiated rat bone marrow stromal stem cells (BMSCs). Neu. Let 2007; 420: 198–203.
4. Sieck GC, Mantilla CB. Role of neurotrophins in recovery of phrenic motor function following spinal cord injury. Respiratory Physiology & Neurobiology 2009; 169: 218–25. spinal cord contusion. Neu. Let 2008; 441: 261–6.
5. Unsain N, Nunez N, Anastasia A, Masco DH. Status Epilepticus induces A TrkB to p75 Neurotrophin receptor switch and increases brain-derived Neurotrophic factor interaction with p75 Neurotrophin receptor: An initial event in neuronal injury induction. Neuroscience 2008; 154: 978–93.
6. Nazemieh H, Razavi SM, Asnaashari S, Talebpour AH, Ghahramani MA, Imani Y, et al. Chemical composition of the essential oil of Nepeta menthoides Boiss & Buhse. Pharmac Sci 2009; 14(4): 283-9.
7. Miceli N, Taviano MF, Giuffrida D, Trovato A, Tzakou O, Gatali EM, et al. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from nepeta sibthorpii bentham. J Ethnopharmacol 2005; 97(2): 261-6.
8. Abu Ali Sina Sh. Alghanun fel-Teb. Beirut, Dar-ol-Kotob-ol-Elmie, 1999; 357.
9. Mo'men Tonekaboni SM. Tohfat-ol-mo'menin. Tehran, Sepehr Publication Institute , 2007; 41.
10. Delshad AA, Naseri M, Parvizi M, Fattah N, Sharayeli M. The Iranian traditional herbal medicine ostokhodus can prevent axotomy- induced apoptosis in spinal motoneurons in neonate rats. J Medicinal Plants Res 2011; 5(18): 4446-51.
11. Tehranipour M, Khayatzade J, Behnam Rasooli M, Ferdosi Makan M. [The Neuroprotective Effects of Hydroalcoholic Extract of Nigella Sativa on Alpha

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018

Motoneurons Degeneration After Sciatic Nerve Injury in Rats]. Arak University of Medical Sciences Journal 2013; 16 (1) :79-86 [Farsi]
12. Behnam-Rasoli M, Nikravesh MR, Mahdavi-Shahri N, Tehranipour M. Post-operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alfa motoneurons, using a stereological counting method. Iran Biomad 2000; 4(1): 45-9.
13. Tehranipour M, Ghamyari T. 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 rats. J Biolog Sci 2010; 10(1):48-52.
14. Kirsch M, Campos Friz M, Vougioukas VI, Hofmann HD. Wallerian degeneration and axonal regeneration after sciatic nerve crush are altered in ICAM-1-deficient mice. Cell Tissue Res 2009; 338(1): 19-28.
15. MrNasir F, Aghayi H, Nurani MR. The role of lipocalin 2 molecule in processing damage and restoration sciatica nerve . Scientific magazine of medical university of the Islamic republic of Iran 1391; 10 (3): 198-206.
16. Shokoufe Hejazi, Maryam Tehranipour. [The study of effects of Aqueous and alcoholic Extracts of *Portulaca oleracea* Leaves on NT3 Gene Expression in Degeneration of Alpha Neurons after Sciatic Nerve Compression in Rats]. Arak Medical University Journal (AMUJ) 2017; 19 (117): 52-60 [Farsi]
17. Heidarzade S. The study of NT3 gene expression in axotomized rats. Esfahan University 2010.
18. Song G1, Cechvala C, Resnick DK, Dempsey RJ, Rao Vl. Genechip analysis after acute spinal cord injury in rat. J Neurochem 2001; 79 (4): 804-15.
19. Dorman DS. Noble RC. Evaluation in vitro of plant essential oils natural antioxidants. J Essent Oil Res 1995; 7: 645-51.
20. Adam SA, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of Origarnum vulgare subsp. Hirtum, Mentah spicata, Lavandula angustifolia and Salvia fruticose essential oils against human pathogenic fungi. J Agric Food Chem 1998; 46: 1739-45.
21. Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. 2006.
22. Adsersen BG, Gudiksen L, Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. J Ethnopharmacol 2006; 104: 418-22.
23. Denner SS. Lavandula angustifolia Miller. Holist Nurs Pract. Jan-Feb 2009; 23(1): 57-64.
24. Skold M, Hagvall L. Auto oxidation of linalyl acetate, the main component of lavender oil, creates potent contact allergens 2008; 58(1):9-14.
25. Yamada K, Mimaki Y, Sashida Y. Effects of inhaling the vapor of Lavandula burnatii super-derived essential oil and linalool on plasma adreno cortico tropic hormone (ACTH), catecholamine and gonadotropin levels in experimental menopausal female Rats. Biol Pharm Bull 2005; 28(2): 378-9.
26. Nikfarjam M, Parvin N, Asarzadegan N. [The effect of Lavandula angustifolia in the treatment of mild to moderate depression]. J Shahrekord Univ Med Sci 2010; 11 (4) :66-73 [Farsi].
27. zali H, sohaili kashani M, vafaee R, rostamnia L. [Expression Clustering of Proteins of Alzheimeric and Normal Rat Hippocampus Treated with Lavandula Angustifolia]. sjimu. 2013; 21 (4) :123-135 [Farsi]
28. dalirian S, haidari kashl S, zamanian azodi M, omidi R, Roeintan R, Hoseini R, et al. [The Evaluation of Lavender Aqueous

Extract on Human Fibroblast Cells]. sjimu 2013; 21 (1) :143-149 [Farsi]
29. Hung YC, Hung YY. Tissue engineering for nerve repair.Biomedical Engineering 2006; 18(3): 100-110.
30. Gordon T, Tyreman N, Raji M. A. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. Journal of Neuroscience 2011; 31(14): 5325–5334.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 6:30 +0430 on Saturday May 26th 2018