مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره شانزدهم، شمارهٔ ۷، تیر ۱۳۹۳، صفحه ۴۰-۳۶

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بهار نارنج بر روند تکثیر سلولهای بنیادی عصبی در شرایط آزمایشگاهی(In vitro)

علیرضا عبدانی پور(PhD)[1*]، بهشته شادمان(MSc)[2]، فرشید سلیمی ننه کران(PhD)[1]، رضا بنابی(MSc)[1]، امیر نوریان(BSc)[2]

۱- آزمایشگاه سلول های بنیادی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل
۲- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل

دریافت: ۹۲/۹/۱۰، اصلاح: ۹۲/۱۰/۱۵، پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: یکی از مهم ترین مسائل در سلول درمانی استفاده از یک محرک مناسب برای افزایش سرعت تکثیر و رشد سلول های بنیادی در شرایط In vitro و In vivo می باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گل بهار نارنج (Citrus aurantium) بر روی روند تکثیر و رشد سلول های بنیادی عصبی نوزاد موش صحرایی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) است.

مواد و روشها: سلول های بنیادی عصبی به روش مستقیم و با استفاده از هضم آنزیمی از هیپوکمپ مغز نوزاد ۳ روزه موش صحرایی استخراج شد. به منظور تعیین بهترین غلظت عصاره گل بهار نارنج، سلول ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر محیط کشت تیمار شدند و میزان تکثیر سلولی با روش MTT بررسی گردید.

یافته ها: با توجه به نتایج بدست آمده، عصاره گل بهار نارنج تکثیر سلول های بنیادی عصبی را در مقایسه با گروه تیمار نشده افزایش می دهد. همچنین تاثیر عصاره گل بهار نارنج وابسته به غلظت آن دارد. نتایج این مطالعه نشان داد، سلول های تیمار شده با غلظت ۶۰۰ میکروگرم عصاره گل بهار نارنج به ازای هر میلی لیتر در محیط کشت بالاترین میانگین درصد تکثیر (۰/۰۶±۰/۸۱) را نسبت به گروه کنترل (۰/۰۲±۰/۵۹) دارد (P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: با توجه به تاثیر عصاره گل بهار نارنج بر روی روند تکثیر سلول های بنیادی عصبی در شرایط آزمایشگاهی، چنین به نظر می رسد که استفاده از این عصاره گیاهی جهت مقاصد سلول درمانی در بیماری های سیستم عصبی مانند ضایعات نخاعی در کلینیک سودمند است.

واژه های کلیدی: گل بهار نارنج، سلول های بنیادی عصبی، تکثیر سلولی، سلول درمانی.

مقدمه

سلول های بنیادی عصبی توانایی متمایز شدن به اکثر سلول های مغزی را دارند و در بیماری های سیستم عصبی قادرند به نقاط آسیب دیده مهاجرت و در عمل ترمیم شرکت کنند (۱). در اطراف بطن ها لایه ای از سلول ها به نام آپاندیم وجود دارد که در اطراف این لایه سلول هایی با قدرت تکثیر و میتوز قابل رویت است این قابلیت تکثیر در اطراف بطن طرفی در مغز قدامی مشهود تر است لذا این منطقه را ساب گرانولوزا نیز می گویند. این سلول ها توانایی مهاجرت و خود تکثیری دارند و به آن ها سلول های بنیادی عصبی می گویند (۲). همچنین سلولهای بنیادی عصبی را می توان از هیپوکمپ استخراج کرد (۳). تاکنون مطالعات زیادی بر روی سلول های بنیادی عصبی در گونه های مختلف انجام شده است در سال ۲۰۱۲ Liard و همکارانش توانستند سلول های بنیادی عصبی را که از اطراف بطن طرفی در مغز خوک استخراج شده را به صورت اتوگرفت پیوند نموده و نشان دادند که این سلول ها بیشتر به رده سلول عصبی تبدیل می شوند (۴). تحقیقات انجام شده به منظور کاربرد سلولهای بنیادی عصبی در درمان بیماریهای نورولوژیکی در طی چند سال اخیر پیشرفت چشم گیری داشته است. به دلیل پتانسیل بیولوژیکی سلول های بنیادی عصبی در ترمیم ضایعات عصبی، اخیرا توجه محققین در علوم زیستی و بالینی به این سلول ها معطوف گشته است (۶و۵). استفاده از این سلول ها در درمان آسیب طناب نخاعی در مدل های آزمایشگاهی تاییدی بر مناسب بودن این سلول ها در مقاصد کلینیکی می باشد (۷). همچنین سکته مغزی نیز یکی از عوامل منجر به مرگ و ناتوانی در انسانهاست که در حال حاضر هیچ درمان موثری نمی تواند عمل کرد نورولوژیکی از دست رفته را برگرداند (۸). مطالعات نشان داده که پیوند سلول های بنیادی می تواند منجر به ترمیم بافت مغزی در نواحی آسیب دیده و بهبود عملکرد مغزی شود (۱۰و۹). یکی از مهمترین مسائل در سلول درمانی استفاده از یک محرک مناسب برای افزایش سرعت تکثیر سلولهای بنیادی عصبی در شرایط In vitro می باشد. یکی از گونه های Citrus، نارنج با نام علمی Citrus Aurantium می باشد که از جمله گیاهان دارویی پر مصرف و بومی کشور ایران است و به عنوان پرتقال ترش شناخته می شود. در طب سنتی ایران گلهای این گیاه در درمان بیماریهای عصبی نظیر هیستری، تشنج و ضعف اعصاب استفاده

* مسئول مقاله: دکتر علیرضا عبدانی پور
آدرس: اردبیل، میدان بسیج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۴۵۱-۷۷۲۸۰۲۰
e-mail: abdani.anatomy@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.6.2.4.6]

می شود. همچنین این گیاه به عنوان آرام بخش، خواب آور، اشتهاآور و بر طرف کننده تپش قلب شناخته شده است (۱۱). خواص آنتی باکتریال، آنتی فانگال و همچنین آنتی اکسیدانی این گیاه توسط محققین به اثبات رسیده است (۱۲).

تاکنون هیچ گونه مطالعه ای درباره اثر گیاه بهار نارنج بر روی سلول های بنیادی عصبی صورت نگرفته است. در این مطالعه برای اولین بار تاثیر عصاره هیدروالکلی گل این گیاه بر روی تکثیر سلولهای بنیادی عصبی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

جداسازی و کشت سلول های بنیادی عصبی: برای جداسازی سلول های بنیادی عصبی از نوزاد موش صحرایی نژاد Sprague استفاده گردید. مراقبت و نگهداری از موش ها مطابق با آیین نامه مصوب کار با حیوانات آزمایشگاهی تصویب شده در دانشگاه تربیت مدرس تهران انجام گردید. بعد از بیهوشی کامل، بخش ساب گرانولوزا در هیپوکامپ از دو نیمکره مغز جدا شده و پس از له کردن مکانیکی به میزان دو برابر بافت از آنزیم های Accutase و کلاژناز برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه به منظور هضم آنزیمی استفاده گردید. به این ترتیب که در ۱۵ دقیقه ابتدایی تنها کلاژناز و در ۱۵ دقیقه پایانی هر دو آنزیم به نمونه اضافه گردید. در مرحله بعدی به منظور خنثی کردن آنزیم ها از سرم FBS استفاده شد. سپس سوسپانسیون حاصله از فیلتر مش نایلونی ۷۰ میکرومتری عبور داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. رسوب سلولی بدست آمده با محیط کشت DMEM/F12 حاوی فاکتورهای رشد basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)، Epidermal Growth Factor (EGF)، B27، پنی سیلین-استرپتومایسین یک درصد به همراه ۳ درصد سرم FBS در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO2 کشت داده شد. محیط کشت سلول ها پس از ۲۴ ساعت تعویض شد و سلول های بنیادی عصبی که به کف فلاسک چسبیده بودند پس از رسیدن به تراکم ۸۰-۷۰ درصد با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا و با نسبت ۱ به ۲ پاساژ داده شدند. در این مطالعه از سلول های پاساژ سوم استفاده گردید. تمامی مواد مورد استفاده از شرکت سیگما و اینویتروژن خریداری گردید (۱۳).

تهیه عصاره هیدروالکلی گل بهار نارنج: عصاره Cirsium Aurantium به روش سوکسله تهیه و اثر غلظت های مختلف آن بر روی رشد و تکثیر دو رده سلولی بنیادی عصبی(NSCs) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور گیاه مورد نظر در فروردین ماه در شهر شیراز جمع آوری و در سایه و جریان هوا خشک و توسط آسیاب پودر شدند. از پودر تهیه شده برای عصاره گیری به روش سوکسله استفاده شد. بدین صورت که ۱۰۰ گرم از پودر آماده در کارتوشهایی که از کاغذ صافی معمولی با اندازه مناسب تهیه شده بود، ریخته شد. سپس کارتوشها را درون دستگاه سوکسله قرار داده و تقریباً به میزان ۳۰۰ میلی لیتر مخلوط متانول و آب مقطر به عنوان حلال به آن اضافه گردید. عصاره گیری به مدت ۱۲ ساعت ادامه یافت. عصاره بدست آمده به ظرف های شیشه ای منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت بدون درپوش در آون ۵۰ درجه نگهداری شد تا حلال باقی مانده تا حد امکان تبخیر شود. سپس عصاره تهیه شده برای آزمایشهای بعدی در یخچال نگهداری شد.

تیمار سلول های بنیادی عصبی با عصاره Citrus Aurantium: سلول های بنیادی عصبی ایزوله شده از هیپوکمپ نوزاد موش صحرایی در یک گروه کنترل و پنج گروه تیمار شده با عصاره مورد نظر در پلیتهای ۹۶ خانه با غلظتهای µg/ml ۱۰۰۰،۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ بمدت ۴۸ ساعت تیمار و مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور بررسی های آماری دقیق ۴ تکرار و یک کنترل در نظر گرفته شد.

آزمون MTT: برای ارزیابی میزان تکثیر در سلول های بنیادی عصبی از روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده گردید. پس از ۴۸ ساعت تیمار با عصاره هیدروالکلی گل بهار نارنج محیط کشت سلول ها با ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (سیگما) با غلظت ۵ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر که به صورت تازه تهیه شده بود، تعویض شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجهٔ سانتیگراد محلول روی سلول ها به آهستگی حذف شد و کریستال های فورمازون ایجاد شده در اثر واکنش با MTT در ۱۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) حل شد. پس از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستالها، جذب در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (BioTek) محاسبه شد.

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 15.0 انجام گردید و تمامی داده ها به صورت SEM ± ارائه شد. مقایسه آماری بین گروه ها با استفاده از آزمون Anova و آزمون تعقیبی Tukeys post hok test تجزیه و تحلیل و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

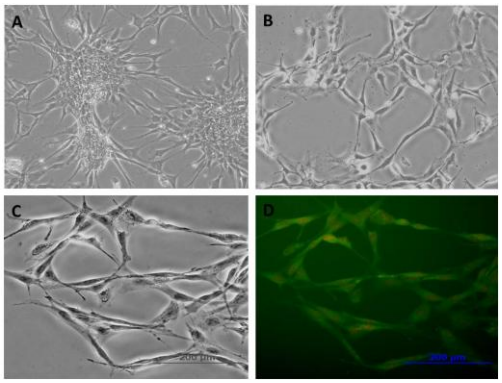
یافته ها

نتایج حاصل از کشت سلول های بنیادی عصبی: سلول ها وقتی در محیط مناسب کشت سلول بنیادی عصبی قرار گرفتند زوائد و استطاله هایی در سلول ایجاد گردید که گاهی چند برابر جسم سلولی مشاهده شد و با سلول های جانبی ارتباط برقرار نمود. هسته ها کشیده تر بنظر می رسید و سلول ها دوکی تر شده و در حالی که مرز بین سلول ها منظم تر و مشخص تر دیده شد. در روز اول ابتدا این سلول ها به صورت کلونی بودند که به کف پلیت چسبیده اند در روز دوم و سوم به مرور از حجم کلونی کاسته شد و سلولها کم کم پخش شدند و این در حالی بود که همچنان سلول ها قدرت تقسیم داشتند به این ترتیب تا حدودی ظاهر سلولها ویژگی های یک سلول شبه عصبی را بدست آوردند که قدرت تقسیم داشتند. سلول های بنیادی عصبی بعد از ۷ روز کاملا فلاسک را پر کردند و نمایی کشیده و دوکی شکل با زوائد سیتوپلاسمی به خود گرفتند (شکل ۱ A و B). این سلول ها قدرت تکثیر داشتند که برای اثبات عصبی بودن سلولهای NSCs و تعیین خلوص آنها در پاساژ سوم از آنتی بادی Nestin استفاده گردید. در سلول هایی که پروتئین مربوطه وجود داشت به دلیل استفاده از آنتی بادی ثانویه کنژوگه به FITC سیتوپلاسمشان سبز رنگ دیده شد. برای تعیین درصد سلولهای مثبت، هسته سلول ها توسط اتیدیوم بروماید قرمز رنگ شدند (شکل ۱ C و D). میانگین درصد سلولهای مثبت برای پروتئین نستین ۰/۳۶±۹۷/۳۵ ارزیابی شد.

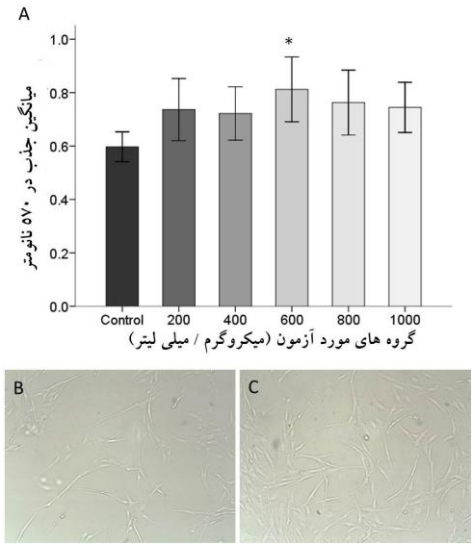
نتایج MTT: مورفولوژی سلول های بنیادی عصبی پس از تیمار با عصاره گیاهی تغییری نداشت. نتایج تست MTT نشان دهنده افزایش تکثیر سلول های بنیادی عصبی در گروه تیمار شده با عصاره گل بهار نارنج نسبت به گروه کنترل

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.6.2.4.6]

بود (شکل ۲). افزایش تکثیر وابسته به غلظت عصاره مـی باشـد. افـزایش غلظـت عصاره بیش از ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث کاهش تعداد سلول می شود که می تواند به دلیل افزایش توکسیسیتی در محیط باشد. سلول هـای تیمـار شـده بـا غلظـت ۶۰۰ میکروگـرم (۰/۰۶±۰/۸۱) بـالاترین میـانگین رشـد (جـذب در ۵۷۰ نانومتر) را نشان داد که نسبت به گروه کنترل (۰/۰۲±۰/۵۹) اختلاف معنـی داری را نشان می دهد (p<۰/۰۵) (شکل ۲). نتایج آزمون MTT بـرای غلظـت هـای ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگـــرم بـــه ترتیـــب ۰/۰۵±۰/۷۳، ۰/۰۴±۰/۷۲، ۰/۰۶±۰/۷۶ و ۰/۰۴±۰/۷۴ بدست آمد.



شکل ۱: تصاویر مربوط به سلول های بنیادی عصبی. تصویرA سلول های بنیادی عصبی را پس از یک روز نشان می دهد که به صورت کلونی های چسبیده به کف پلیت دیده می شود. تصویرB سلول های بنیادی عصبی را پس از یک هفته نشان می دهد. این سلول ها کف فلاسک را پر کرده و حالت کشیده و دوکی شکل می باشند. تصاویر C و D ایمونوسیتوشیمی از سلول های بنیادی عصبی به ترتیب فاز کنتراست و فلورسنت. رنگ سبز نشان دهنده آنتی بادی نستین و رنگ قرمز اتیدیوم برماید می باشد. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر می باشد.



شکل ۲ :A) مقایسه سلولهای بنیادی عصبی در غلظت های مختلف با روش MTT: A) نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار میان گروه کنترل و سلولهای بنیادی عصبی تیمار شده با غلظتµg/ml ۶۰۰ می باشد. BوC) میکروگرافهای سلولهای بنیادی عصبی قبل و بعد از تیمار با غلظت µg/ml۶۰۰ عصاره گل قاصدک. خطای معیار(SEM)، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P<0.05). بزرگنمایی تصاویر ۲۰۰ برابر می باشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که تیمار سلول های بنیادی عصبی با عصاره هیدروالکلی گل بهار نارنج برای مدت ۴۸ ساعت منجر به افزایش تکثیر سلول های بنیادی عصبی می شود. از آن جایی که هیچ گونه کار مشابهی تاکنون در ارتباط با تاثیر این عصاره بر روی سلول های بنیادی انجام نشده است بحث در این مورد تنها به نتایج این مطالعه محدود می شود. نستین که زیر مجموعه ای از اینترمدیت فیلامنت هاست به طورکلی در حین تکامل سلول های عصبی ظاهر می شود در نتیجه در سلول های بنیادی عصبی نیز پروتئین نستین دیده می شود. این در حالی است که کاهش قابل توجهی در ظهور این پروتئین پس از تمایز سلولی به سمت انواع رده های سلولی بالغ وجود دارد (۱۴). بیان نستین در سلول های بنیادی عصبی ایزوله شده از هیپوکمپ در این مطالعه نیز تاییدی بر نتایج بدست آمده در مطالعات مشابه می باشد. ترکیبات تشکیل دهنده موجود در گل بهار نارنج حاکی از وجود آلکالوئید، لینانول، لینانیل استات، مسیرین، لیمونن و لیمونوئید و درصد قابل توجهی از فلاونوئیدها می باشد (۱۵و۱۱). لینالول در حفاظت حیوان از حمله های صرعی القا شده در موش های سوری نقش موثری دارد (۱۸-۱۶). همچنین اسانس این گیاه باعث اثرات ضد اضطرابی و شبه ضد افسردگی در موش های سوری می شود. عامل موثر این فعالیت ها عمدتا لیمونن موجود در گیاه شناخته شده است که از طریق گیرنده $5\text{-}HT_{1A}$ اثر آرام بخشی خود را اعمال می کند (۱۷).

مطالعات دیگر نیز حاکی از اثر آرامش بخشی و ضد تشنجی لیمونین در مدل های حیوانی می باشد (۱۶). اثرات ضد اضطرابی و آرام بخشی آن در مطالعات انسانی نیز تایید شده است (۱۹). میسرین یا بتا- میسرین موجود در گیاه یک ترکیب منو ترپنی است که دارای اثرات ضد دردی، بلوکه کنندگی کانال سدیمی ولتاژی (۲۱و ۲۰) و شل کننده عضلات (۲۲) می باشد. فلاونوئیدهای موجود در گیاهان تاثیرات فارماکولوژیک وسیعی از جمله ممانعت از اکسیداسیون لیپوپروتئین های با وزن مولکولی پایین، جلوگیری از تجمع پلاکت ها و همچنین پایداری سلول های ایمنی را دارا هستند. لذا در درمان ناراحتی های روانی، عفونت های ویروسی، تورم و آلرژی استفاده می شوند (۲۲). از آن جایی که تاکنون هیچ بررسی مشابهی انجام نشده، در رابطه با نتیجه حاصل در این بررسی مقایسه بین نتایج این تحقیق و نمی توان بحث زیادی انجام داد و ارائه نظرات قطعی تر در مورد چگونگی حصول این نتیجه مستلزم انجام آزمایشات بیش تر از جمله بررسی اثر ترکیبات موجود در عصاره به صورت مجزا بر روی تکثیر سلول های بنیادی عصبی است. نتیجه گیری کلی از این تحقیق این است که عصاره هیدروالکلی گل بهار نارنج دارای خاصیت میتوژنیک بوده و باعث افزایش روند تکثیر سلول های بنیادی عصبی در محیط In vitro می شود. تاثیر این عصاره بر روی تکثیر سلولی بستگی به غلظت آن در محیط کشت دارد. همچنین با انجام بررسی های بیشتر به کاربرد این گیاه در سلول درمانی بیماری های مخرب سیستم عصبی می توان امیدوار بود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت های بی دریغ آقای دکتر سید سعید هاشـمین (معاونـت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل) تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.6.2.4.6]

In Vitro Evaluation of Hydroethanolic Extracts of Citrus Aurantium on Proliferative Rate of NSCs

A.R. Abdanipour (PhD) [1*], B. Shadman (MSc) [2], F. Salimi Nanehkaran (PhD) [1], R. Bonabi (MSc) [1], A. Norian (BSc) [2]

1. Stem Cells Research Laboratory, Faculty of Medicine, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
2.Young Researchers and Elite Club, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

J Babol Univ Med Sci; 16(7); Jul 2014; pp: 36-40

Received: Dec 1st 2013, Revised: Jan 5th 2014, Accepted: Mar 6th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The use of an appropriate stimulus to speed up in vitro and in vivo stem cell proliferation and growth is the one of the most important issues in cell therapy. The aim of this study was in vitro evaluation of hydroethanolic extraction of citrus aurantium on proliferation and growth rates of neonate rat neural stem cells.

METHODS: Neural stem cells were isolated using enzymatic digestion from hippocampus region of 3 day old neonatal rat brain. To determine optimal concentration of citrus aurantium extraction, isolated neural stem cells were treated at 200, 400, 600, 800 and 1000 µg/ml for 48 h. Then cells proliferation rate were evaluated using MTT assay method.

FINDINGS: Citrus aurantium promoted neural stem cells proliferation compared to untreated cells. As well as the effect of aurantium extract is dose dependent. The result of this study showed that proliferative rate in treated cells with 600 µg/ml of Citrus aurantium extraction (0.81±0.06) significantly is higher than control (untreated neural stem cells) group (0.59±0.02). ($p<0.05$)

CONCLUSION: Regarding the effect of Citrus aurantium extract on the proliferation rate of neural stem cells, the use of hydroethanolic extraction of Citrus aurantium can be useful for clinical purposes to cell replacement therapy of various neurodegenerative disorders such as spinal cord injury.

KEY WORDS: *Citrus aurantium, Neural stem cells, Cell proliferation, Cell therapy.*

Please cite this article as follows:

Abdanipour AR, Shadman B, Salimi Nanehkaran F, Bonabi R, Norian A. In Vitro evaluation of hydroethanolic extracts of citrus aurantium on proliferative rate of NSCs. J Babol Univ Med Sci 2014;16(7): 36-40.

* **Corresponding Author; A.R. Abdanipour (PhD)**

Address: Stem Cells Research Laboratory, Faculty of Medicine, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Basij Sq., Ardabil, Iran

Tel: + 98 451 7728020

E-mail: abdani.anatomy@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.6.2.4.6]

References

1.Hermann A, Gastl R, Liebau S, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci 2004; 117(19):4411-22.

2.Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. J Physiol Paris 2002;96(1-2):81-90.

3.Seaberg R. M, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. J Neurosci 2002;22(5):1784-93.

4.Liard O, Segura S, Sagui E, et al. Adult-brain-derived neural stem cells grafting into a vein bridge increases postlesional recovery and regeneration in a peripheral nerve of adult pig. Stem Cells 2012;2012:128732.

5.Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. BMC Med 2011;9:52.

6.Yanagisawa M, Yu RK. The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. Glycobiology 2007;17(7):57-74.

7.Sharma HS. New perspectives for the treatment options in spinal cord injury. Expert Opin Pharmacother 2008;9(16):2773-800.

8.Zhu Y, Wan S, Zhan RY. Inducible pluripotent stem cells for the treatment of ischemic stroke: current status and problems. Rev Neurosci 2012;23(4):393-402.

9.Bhasin A, Padma Srivastava MV, Mohanty S, Bhatia R, Kumaran SS, Bose S. Stem cell therapy: a clinical trial of stroke. Clin Neurol Neurosurg 2012;115(7):1003-8.

10.Banerjee S, Williamson DA, Habib N, Chataway J: The potential benefit of stem cell therapy after stroke: an update. Vasc Health Risk Manag 2012;8:569-80.

11.LM Lopes C, Gonçalves e Sá C, de Almeida AA, et al. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of itrus limon (Burn) essential oil in mice. Pharmazie 2011;66(8):623-7.

12.Ammar AH, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M, Zagrouba F. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of Citrus aurantium l. flowers essential oil (Neroli oil). Pak J Biol Sci 2012:15(21):1034-40.

13.Waldron J, Lecanu L. Age and sex differences in neural stem cell transplantation: a descriptive study in rats. Stem Cells Cloning 2011;2011:25-37.

14.Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, et al. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene, expression to neural stem cells or muscle precursors. Neuron 1994;12(1):11-24.

15.Faturi CB, Leite RJ, Alves PB, Canton AC, Teixeira-Silva F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry 2010; 34(4):605-9.

16.Elisabetsky E, Brum LF, Souza DO. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-elated seizure models. Phytomedicine 1999;6(2):107-13.

17.Komiya M, Takeuchi T, Harada E. Lemon oil vapor causes an anti- stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. Behav Brain Res 2006;172(2):240-9.

18.Fukumoto S, Morishita A, Furutachi K, Terashima T, Nakayama T, Yokogoshi H. Effect of flavour components in lemon essential oil on physical or psychological stress. Stress Health 2008;24(1):3-12.

19.Sugawara Y, Hara C, Tamura K, et al. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool. Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalool. Anal Chim Acta 1998;365(1-3): 293-9.

20.Haeseler G, Maue, D, Grosskreutz, J, et al. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. Eur J Anaesthesiol 2002;19(8):571-9.

21.Do Vale TG, Furtado EC, Santos JG Jr, Viana GS. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotype from Lippia Alba (Mill) n.e. Brown. Phytomedicine 2002;9(8):709-14.

22. Da Silva VA, de Freitas JC, Mattos AP, et al. Neurobehavioral study of the effect of beta-myrcene on rodents. Braz J Med Biol Res 1991;24(8):827-31.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.6.2.4.6]