Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.8, Nov 2016
Pages: 679-689

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۸، آبان ۱۳۹۵
صفحه: ۶۸۹-۶۷۹

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

اثر عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی(Cantharellus cibarius) بر تغییرات بیان ژن‌های NT3 و NGF پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت

علیرضا عجمی[۱]، مریم طهرانی پور[*۲]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۳]، محمود ذکایی[۴]

چکیده

مقدمه: بیان فاکتورهای نوروتروفیک که باعث افزایش بقاء و ترمیم نورون‌ها می‌شوند، بیانشان در پاسخ به آسیب عصب تغییر می‌یابد. قارچ قیفی(Cantharellus cibarius) دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است؛ لذا این پژوهش با هدف تعیین اثرات عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی و تأثیر آن بر روی میزان بیان ژن NT3 و NGF پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت انجام شده است.

روش بررسی: ابتدا عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی با روش سوکسله تهیه شد. در این مطالعه تعداد ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم به‌صورت تصادفی به سه گروه ۱۲ تایی شامل گروه‌های کنترل، کمپرسیون (روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۸) و تیمار (روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۸) تقسیم شدند. گروه‌های تیمار با دوز ۷۵mg/kg هیدروالکلی قارچ قیفی تیمار شدند و در گروه کنترل تزریق سرم فیزیولوژی جهت ایجاد استرس انجام شد. در گروه‌های کمپرسیون و گروه‌های تیمار عصب سیاتیک پای راست به مدت ۶۰ ثانیه تحت کمپرسیون قرار گرفت. اولین تزریق عصاره در گروه‌های تیمار به‌صورت داخل صفاقی بلافاصله بعد از کمپرسیون عصب و دومین تزریق ۷ روز بعد انجام شد، سپس از نخاع ناحیه کمری در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۸ در گروه‌های کمپرسیون و تیمار نمونه‌برداری گردید. از قطعات نخاعی نمونه‌برداری شده Total RNA استخراج و cDNA سنتز گردید و سپس بررسی تغییرات بیان ژن NT3 و NGF به وسیله روش RT-PCR در نمونه‌های مورد آزمایش انجام شد. داده‌ها توسط آزمون توکی و به کمک نرم‌افزار SPSS 16 تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن NT3 و NGF در گروه کمپرسیون نسبت به شاهد معنی‌دار بوده است ($p<0/05$). همچنین میزان بیان ژن NT3 و NGF گروه‌های تیمار با عصاره هیدروالکلی، در مقایسه با گروه کمپرسیون معنی‌دار بود($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد قارچ قیفی به علت داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی می‌تواند از پیشرفت ضایعه و تخریب عصب جلوگیری کرده به نحوی که بیان ژن NT3 و NGF در گروه تیمار در مقایسه با گروه کمپرسیون افزایش پیدا کرده است؛ بنابراین اثرات ترمیمی این قارچ از طریق مکانیسم افزایش بیان ژن NT3 و NGF عمل نموده است.

واژه‌های کلیدی: قارچ قیفی (Cantharellus cibarius)، تخریب، ترمیم عصب سیاتیک، ژن NT3، ژن NGF

۱ - کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد
۲ - دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد
۳ -استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد
۴ -استاد تمام، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰، پست الکترونیکی: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۴

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

مقدمه

آسیب‌های اعصاب محیطی ازجمله شایع‌ترین بیماری‌ها در جوامع مختلف است و باعث تحمیل هزینه‌های بالا، از دست رفتن کارآیی فرد و اختلال در فعالیت جامعه می‌شود. بنابراین مطالعه بر روی مکانیسم ایجاد این آسیب‌ها و عواملی که باعث کاهش عوارض آن‌ها که درنتیجه منجر به حفظ و بقای نورون‌ها می‌شوند ضروری به نظر می‌رسد. اکسوتومی یا قطع کامل عصب نخاعی یکی از معمولی‌ترین مدل‌ها برای بررسی مرگ نورونی القاء شده توسط آسیب است. 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، آزاد شدن نوروترانسمیترهای تحریکی مانند گلوتامات، ایجاد رادیکال‌های آزاد و فعال شدن فرآیندهای التهابی اشاره کرد و اگر کمپرسیون عصب شدید باشد منجر به دژنراسیون مرکزی در نخاع می‌گردد (۱). به دنبال قطع اعصاب محیطی و شروع دژنرسانس والرین، سلول‌های شوان و ماکروفاژها و منوسیت‌ها با همکاری یکدیگر میلین و اجزای قطعه انتهایی اکسون را در روزهای اول پس از آسیب بیگانه‌خواری می‌کنند (۲). بیان ژن‌های مرتبط با رشد آکسون، مکانیسم‌های انتقال آکسون، دسترسی به فاکتورهای رشد، تولید ماتریکس خارج سلولی، فعالیت سیتوکین‌ها و نفوذ گلیاها بر ترمیم آکسون تأثیر دارند (۳).NGF فاکتور اختصاصی برای زنده ماندن نورون‌ها می‌باشد. NGF ترمیم را تسریع کرده و سبب تکامل شاخه‌های جانبی آکسون‌های حسی آسیب دیده و افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار می‌شود. به دنبال قطع آکسون، سلول‌های شوان شروع به تولید NGF می‌کنند. NGF سبب تحریک مهاجرت سلول‌های شوان و کاهش دژنره شدن و افزایش ترمیم عملی پس از صدمه اعصاب محیطی و افزایش رگ‌زایی می‌شود. تجویز NGF سبب افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار، ضخامت میلین و بلوغ بیشتر لایه‌های آندوتلیال می‌گردد. تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که NGF ترمیم نورون‌های حرکتی را تسریع می‌نماید. تحت شرایط فیزیولوژیکی تأثیرات NGF به مرحله رشدی نورون‌ها وابسته است. در طی دوره وقوع طبیعی مرگ سلولی نورونی، NGF درجه بقای جمعیت خاصی از نورون‌ها را تنظیم می‌کند. برای مثال NGF فعالیت و سنتز آنزیم‌های درگیرشده در سنتز ناقل عصبی و سنتز نوروپپتیدها را تنظیم می‌نماید. NGF مانع از تجزیه و تخریب نورون‌های کولینرژیک مغز جلویی قاعده‌ای بعد از برداشتن آکسون می‌شود و عملکرد رفتاری حافظه آسیب دیده موش‌های پیر را بهبود می‌بخشد همچنین NGF می‌تواند مانع از تخریب نورونی بعد از برداشتن آکسون در سیستم عصبی محیطی شود (۳). همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که درمان تلفیقی ژن NT3 و سلول‌های بنیادی عصبی در بهبود عملکرد بیماری پارکینسون در موش نقش بسزایی دارد. درمان هم‌زمان ژن NT3 و سلول‌های بنیادی عصبی نشان می‌دهد که NT3 بیان شده به‌صورت اندوژنی القاء و اثرات تروفیک را بر سلول‌های بنیادی عصبی اعمال می‌کند (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. وجود قارچ‌ها در طبیعت یکی از نعمت‌های بزرگ الهی محسوب می‌شود. قارچ‌ها دارای فواید بی‌شماری هستند که دارا بودن انواع ویتامین‌ها، پروتئین‌ها (اسیدآمینه‌های ضروری) و املاح معدنی ازجمله آن‌ها است. داروهای استخراج شده از قارچ‌ها برخلاف داروهای شیمیایی اثرات جانبی ندارند و میزان تأثیر آن‌ها بر بدن انسان به مراتب بیشتر از داروهای شیمیایی است.

قارچ قیفی (Cantharellus cibarius) از تیره قیف قارچان است، این قارچ در استان مازندران رشد می‌کند و در گویش مازندرانی به آن زردکیجا می‌گویند؛ که به معنای «دختر زرد» است(تصویر ۱). این قارچ دارای مواد معدنی و ویتامین‌های بسیار ضروری و مورد نیاز بدن ازجمله نیاسین، پانتوتنیک اسید، ویتامین B، ویتامین D، کلسیم، آهن، منیزیم، منگنز، فسفر، پتاسیم، سدیم و روی می‌باشد، این قارچ دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی و ضدالتهابی است.

مصرف این قارچ از التهابات چشمی، شب کوری و از خشکی پوست و غشاهای مخاطی ناشی از کاهش ترشحات جلوگیری می‌کند و موجب مقاومت دستگاه تنفسی در مقابل بیماری‌های عفونی می‌شود، عصاره آن برای درمان ورم‌ها و زخم‌ها کاربرد دارد. اتانول استخراج شده از قارچ خاصیت مهارکنندگی بر روی تومورهای بدخیم در موش داشته است. اثرات فارماکولوژیکی متعدد قارچ‌ها ما را رهنمون ساخت که شاید بتوان از آن به‌عنوان یک فاکتور احتمالی و مؤثر در تحریک رژنراسیون ناشی از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت استفاده کرد(۵).

بر این اساس، این تحقیق با هدف بررسی تغییرات بیان ژن NT3 و NGF در زمان‌های مختلف پس از کمپرسیون عصب سیاتیک رت در حضور عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی (Cantharellus cibarius) در موش‌های صحرایی نر انجام شده است.

روش بررسی

به‌منظور رعایت اصول اخلاقی، کار بر روی حیوانات بر اساس پروتوکل هلسینکی سال ۱۹۷۵ و دستور کار انجمن علوم اعصاب آمریکا انجام شد. قارچ قیفی (Cantharellus cibarius)، از منطقه جنگل نکا واقع در جنوب شرقی دریای خزر در ارتفاع ۱۵۰ متری سطح دریا که دارای شیب متمایل به سمت شمال می‌باشد جمع‌آوری و شناسایی شده و در دستگاه انکوباتور خشک و پودر شد. از پودر قارچ به روش سوکسله عصاره هیدروالکلی تهیه گردید (۶).

۵۰ گرم از پودر خشک قارچ قیفی 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. همچنان که کیسه حرارتی دستگاه، آرام آرام گرم می‌شود حلال (آب و الکل) نیز گرم شده و عصاره قارچ قیفی 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. در نهایت ۴/۰۰ گرم عصاره خشک به دست آمد بازده روش ۸٪ بود که ۲/۵۰ گرم از عصاره هیدروالکلی، جهت تزریق به یک گروه از موش‌ها کنار گذاشته شد. موش‌های صحرایی نر از بخش حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه فردوسی 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.

در این تحقیق ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم به‌صورت تصادفی به ۳ گروه ۱۰ تایی شامل گروه‌های کنترل، کمپرسیون، تیمار A (کمپرسیون عصب سیاتیک + ۲ بار تزریق عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی با دوز ۷۵ mg/kg) تقسیم شدند (۷). عصاره در ۲ نوبت در روزهای اول هم‌زمان با کمپرسیون و در روز هشتم به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. رت‌های هر گروه با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی زایلازین ۶ mg/kg و کتامین ۶۰ mg/kg به نسبت وزن بدن بی‌هوش گردیدند؛ سپس عصب سیاتیک پای راست در ناحیه سر استخوان ران توسط پنس قفل‌دار (قفل دوم برای ۶۰ ثانیه) تحت کمپرسیون قرار گرفت (۸).

پس از کمپرسیون محل ضایعه ضدعفونی و توسط گیره فلزی بخیه زده شد. بعد از این که موش‌ها هوشیاری اولیه خود را به دست 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 (۱).

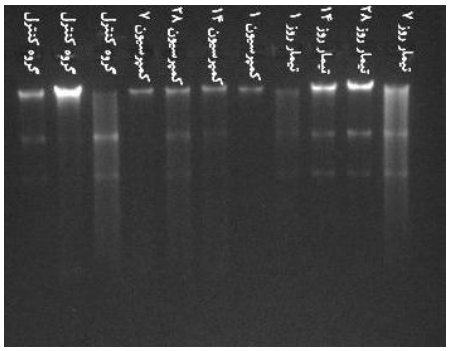
نمونه‌برداری از بافت نخاع در روزهای ۲۸،۱۴،۷،۱ انجام شد و توسط کیت استخراج RNA شرکت دنا زیست (مشهد) طبق پروتکل، استخراج RNA به روش ستونی صورت گرفت. برای سنجش کنترل کیفیت RNA استخراج شده از تکنیک اسپکتروفتومتری نانو دراپ استفاده شد. دستگاه به صورت اتوماتیک غلظت RNA را با استفاده از جذب نوری در طول‌موج

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

۲۶۰ نانومتر محاسبه و نتیجه را بر حسب نانوگرم بر میکرو لیتر ارائه می‌دهد.

سپس برای کنترل کیفیت مقدار RNA استخراج شده RNA را بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد قرار داده شد (شکل ۲). سپس به منظور سنتز cDNA از RNA استخراج شده ۲-۱ میکروگرم RNA هر نمونه، با استفاده از کیت رونویسی معکوس (شرکت پارس توس) با استفاده از آنزیم رونویس ساز معکوس و پرایمرهای الیگو dt طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد، در مرحله بعد ۳۰ نانوگرم از cDNA برای انجام RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲: ژل الکتروفورز و ترتیب نمونه‌ها، وجود ۳ باند جداگانه معرف کیفیت مناسب RNA استخراج شده برای هر نمونه است.

واکنش RT-PCR

پس از انجام مراحل استخراج RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ خلوص RNA استخراج شده تعیین شد. سپس از روی RNA استخراج شده، cDNA ساخته شد، سپس واکنش Real time PCR برای تکثیر ژن NGF طبق پروتوکل با ۱۰ میکرو لیتر سایبرگرین، ۱ میکرو لیتر Template DNA و ۴/۶ میکرو لیتر آب مقطر در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد در حضور پرایمر اختصاصی صورت گرفت، مرحله تکثیر شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، باز شدن رشته الگو در دمای ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۶۱ به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان یک مرحله انتهایی در دمای ۷۲ به مدت ۵ دقیقه بود.

سپس برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار LinReg PCR جهت بررسی و مقایسه سنجش کیفیت cDNA سنتز شده و استفاده از آن به عنوان استاندارد، پرایمرهای GAPDH مربوط به ژن‌های GAPDH رت نیز طراحی و استفاده شد، برای هر نمونه ژن اصلی یک نمونه حاوی پرایمر GAPDH و نیز پرایمر ژن اختصاصی NT3 و NGF موردبررسی قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمر Forward و توالی نوکلئوتیدی پرایمر Revers مکمل ژن‌های مورد نظر از طریق سایت NCBI موردبررسی قرار گرفت تا از اختصاصی بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل گردد.

جدول ۱: اطلاعات مربوط به پرایمرها، (F پرایمر بالادست، R پرایمر پایین‌دست)

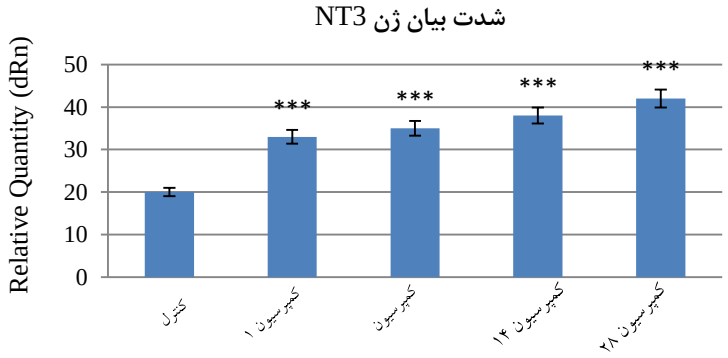
کد بانک ژن	GENES	Primer Sequence	TM
NM-031073	NT3	Forward: 5´-AGGTCAGAATTCCAGCCGAT 3´	63 ºC
	NT3	Reverse:: 5´-GTTTCCTCCGTGGTGATGTT - 3´	
XM_006233053.2	NGF	Forward: 5´- CCT CTT CGG ACA CTG TGG A-3'	63 ºC
	NGF	Reverse:: 5´- CGT GGC TGT GGT CTT ATC T-3'	
NM_017008.4	GAPDH	Forward: 5´-TGCTGGTGCTGAGTATGTCG - 3´	60 ºC
	GAPDH	Reverse:: 5´-GCATGTCAGATCCACAACGG - 3´	

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

نتایج

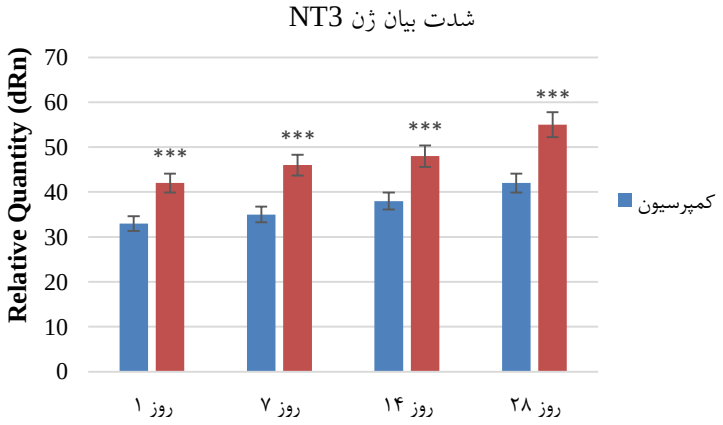
در این پژوهش آنالیز داده‌های مربوط به آزمون بررسی اثرات نوروپروتکتیوی عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی دوز ۷۵ mg/kg ناشی از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت نشان داد که بیان ژن NT3 و NGF در گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی افزایش معنی‌داری (P< ۰/۰۵)نسبت به گروه کمپرسیون داشته است.

بر اساس نمودار ۱، در گروه کمپرسیون بیان ژن NT3 پس از گذشت ۱،۷،۱۴ و ۲۸ روز در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۱). بیشترین میزان بیان ژن NT3 در گروه کمپرسیون مربوط به روز ۲۸ و کمترین میزان بیان ژن NT3 در گروه کمپرسیون مربوط به روز اول می‌باشد.



نمودار ۱: مقایسه شدت بیان ژن NT3 در عصب سیاتیک بین گروه‌های کنترل و کمپرسیون در بازه زمانی (۱۴،۷،۱ و ۲۸) روز.
***: اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد p<۰/۰۰۱. (مقایسه گروه کنترل با گروه کمپرسیون)

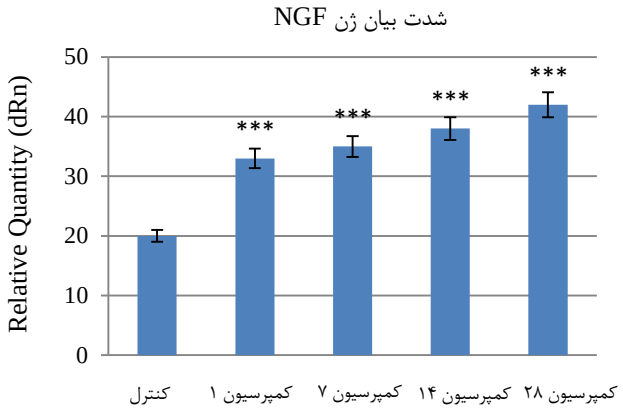
بر اساس نمودار ۲ بیان ژن NT3 در گروه‌های تیمار با عصاره هیدروالکلی در بازه زمانی (۱،۷،۱۴ و ۲۸) روز افزایش معنی‌داری (p< ۰/۰۰۱) نسبت به گروه کمپرسیون نشان می‌دهد و بیان ژن NT3 در روز ۲۸ بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است.



نمودار ۲: مقایسه شدت بیان ژن NT3 در عصب سیاتیک بین گروه کمپرسیون و تیمار با عصاره هیدروالکلی دوز (۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در بازه زمانی (۱۴،۷،۱ و ۲۸) روز.
***: اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد p<۰/۰۵. (مقایسه گروه کمپرسیون با گروه تیمار).

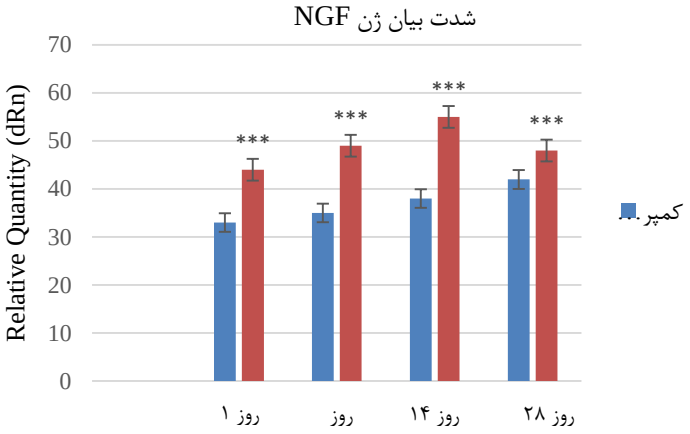
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

بر اساس نمودار ۳: در گروه کمپرسیون بیان ژن NGF پس از گذشت ۱،۷،۱۴ و ۲۸ روز در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (p<۰/۰۵). بیشترین میزان بیان ژن NGF در گروه کمپرسیون مربوط به روز ۲۸ و کمترین میزان بیان ژن NGF در گروه کمپرسیون مربوط به روز اول می‌باشد.



نمودار ۳: مقایسه شدت بیان ژن NGF در عصب سیاتیک بین گروه کنترل و کمپرسیون در بازه زمانی (۱۴،۷،۱ و ۲۸) روز.
***: اختلاف معناداری را نشان می‌دهد p<0.001. (مقایسه گروه کنترل با گروه کمپرسیون)

بر اساس نمودار ۴، بیان ژن NGF در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی در بازه زمانی (۱،۷،۱۴ و ۲۸) روز افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کمپرسیون نشان می‌دهد و بیان ژن NGF در روز چهاردهم بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است.



نمودار ۴: مقایسه شدت بیان ژن NGF در عصب سیاتیک بین گروه کمپرسیون و تیمار با عصاره هیدروالکلی دوز (۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در بازه زمانی (۱۴،۷،۱ و ۲۸) روز.
***: اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد p<۰/۰۵. (مقایسه گروه کمپرسیون با گروه‌های تیمار).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در اثر آسیب عصب سیاتیک بیان ژن‌های NT3 و NGF به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است p<۰/۰۵. در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی بیان ژن‌های NT3 و NGF افزایش معنی‌داری نسبت به کمپرسیون داشته p<۰/۰۵ و بیشترین تأثیر مربوط به گروه روز ۲۸ در ژن NT3 و روز ۱۴

برای ژن NGF بوده است (نمودار ۲،۴). این داده‌ها بیانگر اثرات تحریکی شدید عصاره قارچ قیفی در بیان خانواده ژن‌های نروتروفین ازجمله NT3 و NGF است. اغلب بعد از آسیب عصب سیاتیک فرآیند ترمیم شروع می‌شود و گانگلیون ریشه، آکسون‌ها و اتصالات عملکردی بازسازی می‌شوند، در این میان مکانیسم‌های مولکولی فرآیند ترمیم نورونی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. انواع زیادی از موکول‌های اتصال‌دهنده سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارجی، ازجمله ایمونوگلوبولین، اینتگرین و کادهرین در طی ترمیم و تکامل اعصاب نقش دارند. این مولکول‌های اتصال‌دهنده، نقش مهمی در تنظیم طویل شدن آکسون‌ها ایفا می‌کنند (۹). سیتوکین‌ها سبب پشتیبانی ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، ماست سل‌ها و سلول‌های شوان می‌شوند(۱۰). سیتوکین اینترلوکین ۱ (IL-1) ترمیم اعصاب محیطی را توسط تنظیم بیان فاکتورهای رشد تسریع می‌نماید. این افزایش NGF با هجوم ماکروفاژها همراه است (۱۰).

تحقیقات نشان می‌دهد در موش‌های بالغ نرمال تقریباً نیمی از نورون‌های حسی کمری دارای رسپتورهایی با میل ترکیبی بالا برای NGF می‌باشند. یک ماه پس از بریده شدن عصب سیاتیک میانگین تعداد مکان‌های با میل ترکیبی بالا روی نورون‌های نشان‌دار شده در گانگلیون ریشه پنجم پشتی کمری به کمتر از ۲۰٪ نرمال می‌رسد که به علت دانسیته رسپتوری کاهش‌یافته و حجم سلولی کاهش‌یافته می‌باشد (۱۱)؛ بنابراین احتمالاً استفاده از موادی که بتواند باعث افزایش بیان ژن NGF شود مانند عصاره قارچ قیفی، می‌تواند در پدیده تسریع ترمیم مؤثر باشد. NGF فاکتور اختصاصی برای زنده ماندن نورون‌ها می‌باشدNGF . ترمیم را تسریع کرده و سبب تکامل شاخه‌های جانبی آکسون‌های حسی آسیب دیده و افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار می‌شود. به دنبال قطع آکسون، سلول‌های شوان شروع به تولید NGF می‌کنند. NGF سبب تحریک مهاجرت سلول‌های شوان و کاهش دژنره شدن و افزایش ترمیم عملی پس از صدمه اعصاب محیطی و افزایش رگ‌زایی می‌شود. تجویز NGF سبب افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار، ضخامت میلین و بلوغ بیشتر لایه‌های آندوتلیال می‌گردد (۱۲).

نتایج مطالعات ما نیز نشان داد که در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره بیان ژن NGF افزایش یافته و تسریع در ترمیم در اعمال حرکتی آن‌ها نمایان بود. تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که NGF ترمیم نورون‌های حرکتی را تسریع می‌نماید. تحت شرایط فیزیولوژیکی تأثیرات NGF به مرحله رشدی نورون‌ها وابسته است. در طی دوره وقوع طبیعی مرگ سلولی نورونی، NGF درجه بقای جمعیت خاصی از نورون‌ها را تنظیم می‌کند. برای مثال NGF فعالیت و سنتز آنزیم‌های درگیرشده در سنتز ناقل عصبی و سنتز نوروپپتیدها را تنظیم می‌نماید. NGF مانع از تجزیه و تخریب نورون‌های کولینرژیک مغز جلویی قاعده‌ای بعد از برداشتن آکسون می‌شود و عملکرد رفتاری حافظه آسیب دیده موش‌های پیر را بهبود می‌بخشد همچنین NGF می‌تواند مانع از تخریب نورونی بعد از برداشتن آکسون در سیستم عصبی محیطی شود (۱۳).

حضور مولکول‌های پیام‌آور سلولی و فاکتورهای نوروتروفیک مشابه با آن‌هایی که در پاسخ‌های ضدالتهابی موثرند در پدیده آسیب و ترمیم نقش دارند. فاکتورهای نوروتروفیک نظیر فاکتور رشد نورونی (NT3) و (NGF) از عوامل دیگر دخیل در این پدیده می‌باشند (۱۴). با توجه به گزارش‌های فوق نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تجویز عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی به موش‌های دارای له‌شدگی عصب موجب تولید و افزایش فاکتورهای نوروتروفیک ازجمله فاکتورهای رشد عصب (NT3) و (NGF) می‌شود.

بر پایه نتایج به دست آمده از این تحقیق و آنالیز داده‌ها و مقایسه‌ای که بین گروه‌های کنترل، کمپرسیون و تیمار با عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی در روزهای ۱۴،۷،۱ و ۲۸ صورت گرفت نتایج زیر حاصل شد است. در گروه کمپرسیون بیان ژن (NT3) و (NGF) در شاخ قدامی نخاع افزایش معناداری داشته است($p<۰/۰۰۱$).

بیشترین میزان بیان ژن (NT3) و (NGF) در گروه کمپرسیون مربوط به روز ۲۸ می‌باشد. بیان ژن (NT3) و (NGF) در گروه‌های تیمار با عصاره هیدروالکلی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد و بیان ژن NT3

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

در روز ۲۸ و ژن NGF در روز ۱۴ دارای بیشترین تغییر است (p<۰/۰۰۱).

درروند کمپرسیون عصب، فرآیندهای التهابی فعال می‌شوند و باعث پدید آمدن محیط شیمیایی زیان‌آور و آسیب بیشتر می‌شوند (۱۵). احتمالاً عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی با داشتن اثرات ضدالتهابی از پیشرفت آن‌ها جلوگیری می‌کند. به طوری که در پژوهش حاضر گروه‌های تیمار پیشرفت ضایعه را کند کرده بودند طبق پژوهش Nathan و همکاران دناتوره شدن پروتئین‌ها از دلایل عمده التهاب است، عصاره این قارچ بر روی غشا سلول‌ها ازجمله گلبول‌های قرمز و لیزوزوم اثر می‌گذارد و باعث پایداری در غشا شده و در فرآیند ضدالتهابی سهم بسزایی دارد (۱۶). سیرنیگول یا Pyrogallol موجود در عصاره قارچ قیفی سبب کاهش التهاب در ناحیه آسیب دیده می‌گردد به‌طوری که این ماده در مراحل اولیه پس از آسیب از ترشح سیتوکاین‌های اصلی و التهابی مانند فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا (TNF-α)، اینترلوکین یک بتا (L-1β۱) و اینترلوکین ۶ (L-۱ 6) جلوگیری می‌نماید (۹)؛ بنابراین مکانیسم مؤثر دیگری که به وسیله آن عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی می‌تواند پس از کمپرسیون عصب سیاتیک از مرگ سلولی جلوگیری کند کاهش التهاب در محل آسیب می‌باشد و احتمالاً به همین دلیل در گروه تیمار بیان ژن به مقدار قابل‌توجهی افزایش یافته است و هرچه زمان بیشتر سپری شده مقدار ترمیم و اثرگذاری عصاره بیشتر شده تا آنجایی که مقدار بیان ژن NT3 گروه تیمار در روز ۲۸ نزدیک به گروه کنترل شده است (نمودار ۲). یکی دیگر از عوامل مؤثر در مرگ سلولی، رادیکال‌های آزاد می‌باشد که به دنبال آسیب مکانیکی و یا کمپرسیون عصب سیاتیک تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد تولید بیش از حد این رادیکال‌ها باعث آسیب به عملکرد سلول می‌شود عصاره این قارچ باعث حذف رادیکال‌های آزاد در محل آسیب می‌شود به عنوان مثال حذف رادیکال (DPPH) به اثبات رسیده است (۱۷). ترکیبات موجود در عصاره قارچ قیفی مانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، ساپونین و فنول هرکدام دارای عملکرد خاصی است. فنول‌ها، گالیک اسید، فلاونوئیدها و پلی ساکاریدهای موجود در عصاره این قارچ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی می‌باشد. Ania و همکاران نشان دادند که قارچ قیفی حاوی بالاترین ترکیبات ترپنوئید، فنول و فلاونوئید بوده که این فلاونوئیدها از طریق چلاته کردن یون‌های فلزی فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کنند (۱۸). در این تحقیق خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا را به وجود این ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت می‌دهد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی یک عامل حفاظت نورونی بوده که احتمالاً می‌توان آن را جهت درمان بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش آنالیز داده‌های مربوط به آزمون بررسی اثرات نوروپروتکتیوی عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی دوز ۷۵ mg/kg ناشی از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت نشان داد که بیان ژن NT3 و NGF در گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی قارچ قیفی افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کمپرسیون داشته است؛ بنابراین در ارتباط با مکانیسم‌های احتمالی حفاظت نورونی توسط قارچ قیفی چنین به نظر می‌رسد که قارچ قیفی دارای ماده یا مواد موثره‌ای ازجمله مواد ضدالتهابی و پروتئین‌هایی است که پس از آسیب آکسونی با افزایش بیان ژن NT3 و NGF روندهای ترمیمی را سرعت بخشیده و از شدت ضایعه می‌کاهد همچنین احتمالاً از افزایش نفوذ کلسیم به درون آکسون جلوگیری نموده و با کاهش التهاب، جمع‌آوری و حذف اکسیدانت‌های مضر و همچنین ممانعت از آزادسازی بیش از حد گلوتامات، از مرگ نورون‌ها جلوگیری می‌کند.

سپاسگزاری

این تحقیق در گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صورت گرفت از مدیریت محترم گروه زیست‌شناسی سرکار خانم دکتر مریم طهرانی پور و ریاست محترم دانشکده علوم جناب آقای دکتر سعیدی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

References:

1- Behnam-Rasouli M, Nikravesh MR, Mhadavi-Shahri N, Tehranipour M. ***Post-operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alpha motoneurons, using a sterological counting method (disector).*** Iran Biomed J 2000; 4(1): 45-9.

2- DeVivo M. ***Epidemiology of Spinal Cord Injury. In: Lin V, editor. Spinal cord medicine: principles and practice.*** New York: Demos Medical Publishing; 2003. p. 79-86.

3- Nathan C. ***"Points of control in inflammation."*** Nature 2002; 420(6917): 846-52.

4- Cook-Mills JM, Deem TL. ***"Active participation of endothelial cells in inflammation."*** J Leukocyte Biology 2005; 77(4): 487-95.

5- Abdel moneim AE. ***The neuroprotective effectc of purslane(portulaca oleracea) on rotenon-induced biochemical changes and apoptosis in brain of rat.*** CNS Neuro Disord Drug Targets 2013; 12(6): 830-41.

6- Gu JF, Zheng ZY, Yuan JR, Zhao BJ, Wang CF, Zhang L, et al. ***Comparison on hypoglycemic and antioxidant activites of the fresh and drive Portulaca olearacea L. in insulin resistant HepG2 cells and streptozotocin-induced c57BL/6J diabetic mice.*** J Ethnnopharmacol 2015; 161: 214-23.

7- 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.

8- 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 Biol Sci 2010; 10(1): 48-52.

9- Moro C, Palacios I, Lozano M, D'Arrigo M, Guillamón E, Villares A, et al. ***"Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages."*** Food Chemistry 2012; 130(2): 350-55.

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

11- Barros L, Venturini BA, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR. ***Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushroom: A comprehensive study.*** J Agric Food Chem 2008; 56(10): 3856-862.

12- Pan H, Hu XZ, Jacobowitz DM, Chen C, McDonough J, Van Shura K, Lyman M, Marini AM. ***Alpha-linolenic acid is a potent neuroprotective agent against soman-induced neuropathology.*** Neurotoxicology 2012; 33(5): 1219-29.

13- Jamalpoor Z, Asgari AR, Nourani MR. ***Skeletal muscle tissue engineering: Present and future.*** J Milit Med. 2012; 14(2): 77-84.

14- Linshan Fu, Doreswamy V, Prakash R. ***The biochemical pathways of central nervous system neural degeneration in niacin deficiency.*** Neural Regen Res 2014; 9(16): 1509-513.

15- Sumathi T, Christinal J. ***Neuroprotective effect of Portulaca oleracea Ethanolic Extract Ameliorates Methylmercury Induced congnitive Dysfunction and Oxidative stress in cerebellum and cortex of Rat Brain.*** Bio Elem Res 2015; 172(1): 155-65.

16- Kasthuri BM, Ammu KR, Nagaraja H. ***Protective Mechanisms of Flavonoids in Parkinson's Disease.*** Oxid Med Cell Longev 2015.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

Effects of Cantharellus Cibarius Hydro-Alcoholic Extract on NT3, NGF Gene Expression after Sciatic Nerve Compression in Rats

Alireza Ajami (MSc)[1], Maryam Tehranipour (PhD)[*2]
Khadije Nezhad Shahrokh Abadi (PhD)[3], Mahmoud Zokaee (PhD)[4]

[1-4] *Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.*

Received: 5 Jul 2016 ***Accepted:*** 24 Nov 2016

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 9:52 IRDT on Sunday June 24th 2018

Abstract

Introduction: The expression of neurotrophic factors, which cause increasing of the survival and regeneration of neurons, is changed in response to nerve injury. Cantharellus cibarius has antioxidant and anti-inflammatory effects. So, the aim of present study was to determine the effects of hydro-alcoholic extract of Cantharellus cibarius on expression level of NT3 gene after sciatic nerve compression in rats.

Methods: First the hydro-alcoholic extract of Cantharellus cibarius was prepared by the Soxhlet method. In this study, 36 Wistar male rats , 250-300 gr, were randomly divided into 3 groups consisted of 12 rats in each group. They were control, compression (1, 7, 14 and 28 days) and experimental (1, 7, 14 and 28 days) groups. Experimental groups were treated by 75 mg / kg of hydro-alcoholic extract of Cantharellus cibarius and to induce the stress in control group, saline serum was injected. In compression and experimental groups, the sciatic nerve of right leg was compressed for 60 seconds. The first injection of extract in the experimental group was performed intraperitoneally and immediately after the compression and the second one was injected 7 days later. Then, the sampling was performed of lumbar spinal cord on 1, 7, 14 and 28 days in compression and experimental groups and the total RNA was extracted from the spinal cord segments, cDNA was synthesized and after that the alteration of gene expression of NT3 and NGF samples was studied real time PCR method and Data were analyzed by Tukey test and SPSS 16 softwere.

Results: The expression of NT3 and NGF showed significant increase in compression group compared to the control group, ($p<0.05$). Also, it is shown significant increase of expression of NT3 and NGF in the experimental group compared to the compression group, ($p<0.05$).

Conclusion: According to these findings, hydro alcoholic extract of Cantharellus cibarius has an anti oxidant and anti-inflammatory effects that increase the regeneration process expression of NT3 and NGF in the experimental group was increase compared with the compression group.

Keywords: Cantharellus Cibarius; Regeneration; Degeneration; NT3 Gene; NGF Gene

This paper should be cited as:
Alireza Ajami, Maryam Tehranipour, Khadije Nezhad Shahrokh Abadi, Mahmoud Zokaee. ***Effects of cantharellus cibarius hydro-alcoholic extract on nt3, ngf gene expression after sciatic nerve compression in rats. .*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(8): 679-89.

****Corresponding author: Tel: 05138435050, email: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir***