مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هفتم، شماره دهم، دی ۱۳۹۸
تاریخ دریافت:۱۳۹۶/۱۲/۰۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۶/۱۷

بررسی بیان تغییرات ژن *NT3* پس از کمپرسیون عصب سیاتیک رت در حضور عصاره هیدروالکلی چای کوهی

فریبا قاسم‌زاده[۱]، مریم طهرانی‌پور*[۲]، خدیجه نژاد شاهرخ‌آبادی[۳]

مقاله پژوهشی

مقدمه: فاکتورهای نوروتروفیک بیانشان در پاسخ به آسیب عصب تغییر می‌یابد. گیاه *Stachyslavandulifolia* از خانواده لامیناسه می‌باشد و از آنجا که چای کوهی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است لذا این پژوهش با هدف تعیین اثرات عصاره هیدروالکلی چای کوهی و تأثیر آن بر روی میزان بیان ژن NT_3 پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ابتدا عصاره هیدروالکلی از سرشاخه‌های گیاه چای کوهی با روش سوکسله تهیه شد. سپس تعداد ۳۶ رأس رت‌نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم به‌صورت تصادفی به ۹ گروه ۴تایی شامل گروه‌های کنترل، کمپرسیون (روزهای ۱، ۷، ۱۴و۲۱) و تیمار (روزهای ۱، ۷، ۱۴و ۲۸) تقسیم شدند. گروه‌های تیمار با دوز ۷۵mg/kg هیدروالکلی چای کوهی تیمار شدند در گروه کنترل تزریق سرم فیزیولوژی جهت ایجاد استرس انجام شد. در گروه‌های کمپرسیون و گروه‌های تیمار عصب سیاتیک پای راست به‌مدت 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، ۱۴و۲۸ در گروه‌های کمپرسیون و تیمار نمونه‌برداری گردید و از قطعات نخاعی نمونه‌برداری شده Total RNA استخراج و cDNA سنتز گردید و سپس بررسی تغییرات بیان ژن NT_3 در نمونه‌های بدون تیمار و تیمار با عصاره هیدروالکلی انجام شد. برای آنالیزآماری داده‌ها از نرم‌افزار MxPro و آزمون Anova با سطح معنی‌داری $p<0/05$ استفاده شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن NT_3 در گروه کمپرسیون و تیمار نسبت به‌شاهد افزایش معناداری داشته است ($p<0/001$). اما کاهش بیان ژن NT_3 در گروه تیمار نسبت به کمپرسیون مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که عصاره هیدروالکلی سرشاخه‌های گیاه *Stachyslavandulifolia*، بر بیان ژن NT_3 تاثیر نداشته است.

واژه‌های کلیدی: *Stachyslavandulifolia*، تخریب و ترمیم عصب سیاتیک، ژنNT_3

ارجاع: قاسم‌زاده فریبا، طهرانی‌پور مریم، نژاد شاهرخ‌آبادی خدیجه. **بررسی بیان تغییرات ژن *NT3* پس از کمپرسیون عصب سیاتیک رت در حضور عصاره هیدروالکلی چای کوهی**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۱۰): ۴۰-۱۹۲۴.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، 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، دکتری تخصصی ژنتیک ملکولی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۵۵۱۱۰۳۷۰، پست الکترونیکی: maryam_tehranipour@mshdiau.ac، صندوق پستی :۹۱۷۳۵۴۱۳

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

مقدمه

تاریخچه نوروتروفین‌ها در پستانداران، در سال ۱۹۵۰ با کشف فاکتور رشد عصب Nerve Growth Factor (NGF) به عنوان یک فاکتور ضروری برای رشد آکسونی آغاز شد و ۳۰ سال بعد انواع دیگر آن‌ها، شامل عامل عصبی تغذیه‌ای مشتق از مغز (BDNF)، NT-3 و NT-4/5 کشف شدند. با گذشت زمان و انجام تحقیقات بیشتر به دو فاکتور دیگر NT-6 و NT-7 پی بردند که در مغز پستانداران ترشح نمی‌شوند (۱). بیان نوروتروفین‌ها، در مغز پستانداران در طی رشد و به‌وسیله فعالیت‌های نورونی تنظیم می‌شود. در بین نوروتروفین‌ها بیشترین بیان NT-3 در دوره قبل از تولد و در هیپوکامپ، مخچه و نئوکورتکس می‌باشد. در حالی‌که بیان BDNF در آغاز تولد کم است و با افزایش سن تا بزرگسالی، افزایش می‌یابد. بیان NGF در هیپوکامپ، طی دوران رشد بعد از تولد نیز مشابه با BDNF است، در حالی‌که در نواحی دیگر مغز، بیان NGF، تغییرات اندکی را در دوران رشد بعد از تولد نشان می‌دهد. بیان NT-4/5 نیز در دوران بعد از تولد در هیپوکامپ، مخچه و نئوکورتکس صورت می‌پذیرد و تا بزرگسالی ادامه می‌یابد (۲). نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از فاکتورهای رشد عصبی هستند که در رشد و ترمیم و بازسازی و نهایتاً بقای بافت‌عصبی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. از آنجایی که نورتروفین‌ها ابتدا توسط متخصصین علوم اعصاب شناسایی شدند بیشترین عملکردشان بر روی دستگاه عصبی مطالعه شده است (۳). اثرات ناشی از نوروتروفی‌ها به‌واسطه پیوند آن‌ها با گیرنده‌های خاص با کشش بالا (گیرنده‌های کینازتیروزین) و با گیرنده‌های کشش پایین ایجاد می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها به‌صورت اورتودرومیک نیز منتقل می‌شود و پس از انتشار آن با پایانه‌های اکسون بر روی سلول‌های پس سیناپسی اثر می‌گذارند، به‌علاوه در تعدیل سریع فعالیت الکتریکی و سیناپسی نورونی نیز شرکت دارند (۴).

خانواده نوروتروفین‌ها از چهار عضو تشکیل شده که شامل (BDNF, NGF, NT_3, $NT_{4/5}$) می‌باشد. نوروتروفین‌های دیگری هم مانند NT_6 / NT_7 شناسایی شده‌اند که محدود به ماهی‌ها می‌باشند و در پستانداران ارتولوگی ندارند. این گونه فاکتورها می‌توانند از طریق حمایت و تحریک سلول‌های آسیب دیده منجر به رشد اکسونی در الیاف ضایعه دیده شوند (۵). در شرایط قطع عصب چنانچه بتوان از فاکتورهای تروفیک به‌صورت اگزوژن استفاده نمود نورون‌های ضایعه دیده با برخورداری از این حمایت تروفیکی زنده می‌مانند و پدیده‌ی ترمیم اکسونی خود را ادامه می‌دهند (۶). فاکتورهای تغذیه‌کننده عصبی، زنده ماندن، رشد، شکل نورون و تولید پروتئین‌ها را در نورون تنظیم می‌نمایند و از مرگ سلولی پیشگیری می‌کنند. نوروگلین اولین فاکتور تغذیه‌کننده عصبی است که حدود پنجاه سال پیش کشف گردیده است (۷). تعدادی از فاکتورهای تروفیک مفید عبارتند از: فاکتور رشد عصبی، فاکتور رشد شبه انسولینی، فاکتور رشد مشتق از پلاکت، اینترلوکین Interleukin و هورمون‌های جنسی همانند تستوسترون و پروژسترون. تعدادی از این فاکتورها جهت زنده ماندن نورون‌ها و تعدادی جهت تسریع در جوانه زدن و طویل شدن اکسون اهمیت دارند. اگرچه فاکتورهای رشد زیادی در دژنراسیون عصب مؤثر هستند ولی استفاده توأم از آن‌ها می‌تواند در تقویت دژنراسیون مفید باشد (۸).

فاکتور رشد عصب NT_3 معمولاً در اعصاب سالم در سطح پایینی بیان می‌شوند ولی در پاسخ به آسیب عصبی بیان NT_3 در سلول‌های شوان افزایش می‌یابد. افزایش رشد و تکثیر سلول‌های شوان در بخش دیستال به‌منظور آماده‌سازی برای دریافت اکسونی که در حال زایش و ترمیم می‌باشد تحت تأثیر این فاکتور می‌باشد. NT_3 نه فقط نقش تغذیه‌ای بلکه نقش هدایت‌کننده نیز دارد. سلول‌های شوان دستجاتی از بونگنر را در مکان آسیب تشکیل می‌دهند و رسپتورهای NT_3 به‌عنوان یک فاکتور راهنما برای آکسون در حال ترمیم عمل می‌نماید. NT_3 متصل به‌رسپتورهایی که بر روی سلول‌های شوان قرار دارند نورون‌های در حال رشدی را ایجاد می‌نمایند که به یک فاکتور تغذیه‌ای برای افزایش بیشتر رشد و ترمیم متصل می‌شوند (۹). وجود NT_3 برای بقاء و حفظ نورون‌های سمپاتیکی مهم می‌باشد بدون آن نورون‌ها دچار مرگ

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

برنامه‌ریزی شده می‌شوند اما فاکتور رشد عصب باعث رشد اکسونی می‌شود (۱۰). مطالعات نشان می‌دهد که NT_3 باعث انشعاب و طویل شدن اکسون می‌شود (۱۱). NT_3 حداقل به دو گروه از رسپتورها متصل می‌شود: رسپتور نوروتروفین (P75 (NTR)) و Trkc. هر دو رسپتور مرتبط با اختلالات تخریب‌کننده نورونی و عصبی می باشند (۱۲). NT_3 به رسپتور تیروزین‌کیناز با میل ترکیبی زیاد متصل می‌شود. سپس بخش تیروزین‌کینازی را دایمری نموده و فسفریله می‌نماید که این امر منجر به فعال‌سازی PI3- Kinase و مسیرهای سیگنالی PLC می‌شود. هم‌چنین رسپتور P75 NTR می‌تواند با Trkc یک هترودایمر تشکیل دهد که میل ترکیبی بسیار بالایی با (NT_3) دارد. شواهد و مدارکی در این زمینه وجود دارند که نشان می‌دهد (NT_3) برای حفظ هموستازی ضرورت دارد (۱۲). گونه چای کوهی، گیاهی است از تیره نعناع به ارتفاع حدود ۲۵ سانتی‌متر با ساقه کرکدار و خزی که به گل آذین پشم گونه و الیافی دراز و خوشبو منتهی می‌شود (۱۳). جنس چای کوهی (خانواده نعنائیان) با بیش از ۲۷۰ گونه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری کشورهای جهان گسترش دارد. ۳۴ گونه از این خانواده در ایران یافت می‌شوند که ۱۳ گونه بومی ایران می‌باشند (۱۴). مطالعه‌های فیتوشیمیایی این جنس، حضور ترکیب‌های مختلف هیدروکسیل و ترکیب‌های فنولیک مثل پلی‌فنول‌ها Polyphenol، تانن‌ها Tanen، فلاونوئیدها Flavonoid، ایریدوئیدها Irydoied، اسیدلوگانیک Gollonic Acid، فنیل‌اتانوئید PhenilEtanoid، گلیکوزیدها Glicosid، ترپنوئیدها Terpinene، استروئیدها Estroid و دی ترپن‌ها-D Trepine را در این گیاه تأیید می‌کند (۱۲). هفتاد و نه ترکیب از اسانس چای کوهی شناسایی شده است که اجزای اصلی آن، ژرماکرین Germacrene D، بتافلاندرن β- Flandren، بتاپنین β- Pinene، میرسن Myrcene، آلفاپین α- Pinene و Z- بتا اوسیمن Z- βOcimene هستند (۱۲). فروزان الفتی و همکارانش در سال ۱۳۸۸ به بررسی اثرات پودر گل گیاه چای کوهی بر دیسمنوره پرداختند و دریافتند که استفاده از چای کوهی به شیوه سنتی می‌تواند باعث تسکین درد ناشی از دیسمنوره شود (۱۳). دکتر سیما نصری و همکارانش در سال ۱۳۸۹ طی تحقیقاتی به بررسی اثرات ضد دردی و ضد التهابی عصاره هیدروالکلی سرشاخه‌های چای کوهی در موش‌های سوری‌نر پرداختند و نتیجه گرفتند این عصاره می‌تواند در موش‌های نر دارای اثرات ضدالتهابی باشد (۱۴). خواص ضددردی و ضدالتهابی چای کوهی منجر به مشاهده خواص درمانی مشابه یا قوی‌تر از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی گردیده است و عصاره این گیاه بر هر دو فاز حاد و مزمن درد دارای اثرات مناسب می‌باشد. وجود ترکیبات فلاونوئیدی و ایریدوئیدی مسئول اثرات ضددردی و ضدالتهابی این گیاه می‌باشد (۱۵).

درد سیاتیکی باعث ایجاد یک نوع درد مزمن در قسمت انتهایی و میانی ران و پاها می‌شود و هم‌چنین موجب ناراحتی‌های زیاد و در برخی موارد باعث ناتوانی در راه رفتن افراد می‌شود، زیرا درد آن بسیار زیاد است و در نتیجه التهاب ایجاد می‌کند. درمان‌ها با داروهای شیمیایی اثرات جانبی فراوانی را به‌همراه دارند، از طرف دیگر، گیاهان دارویی با داشتن عناصر معدنی و فاکتورها و ریزمغذی‌ها می‌توانند التهاب را در عصب سیاتیک کاهش دهند که باعث کاهش درد و آرامش می‌شوند، و این رایج‌ترین دلایلی است که درمان‌های طبیعی را بهترین راه‌حل درمان درد عصب سیاتیک می‌کند، و اثرات آن به‌صورت طولانی‌مدت است و دارای اثرات جانبی کمی است اما برای استفاده از داروهای طبیعی نیز باید با پزشک متخصص مشورت شود (۱۶). وجود گیاهان در طبیعت یکی از نعمت‌های بزرگ الهی محسوب می‌شود. سابقه درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی به قدمت تاریخ زیست انسان بر روی کره 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 نهایتاً نقش پیشگیری را در برابر بیماری‌ها ایفا می‌کند. گیاهان دارویی برخلاف داروهای شیمیایی اثرات جانبی ندارند و میزان تأثیر آن‌ها بر بدن انسان به مراتب بیشتر از داروهای شیمیایی است. چای کوهی با نام علمی *Stachyslavandulifolia* گیاهی از تیره

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

نعناع است که دارای ویژگی‌های فارماکولوژیکی متعددی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب، ضددرد، ضداسپاسم گوارشی، ضدتومور، تقویت سیستم ایمنی و ... است اما اثر حفاظتی آن بر دژنراسیون مرکزی ناشی از کمپرسیون عصب سیاتیک کمتر مورد توجه قرار گرفته است. اثرات فارماکولوژیکی متعدد این گیاه 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 نمود. لذا این مطالعه به‌منظور بررسی بیان تغییرات ژن NT_3 پس از کمپرسیون عصب سیاتیک رت در حضور عصاره هیدروالکلی چای کوهی طراحی شد. با امید به اینکه نتایج به‌دست آمده با انجام تحقیقات بیشتر بتواند در کمک به‌زندگی بیماران با ضایعات سیستم عصبی محیطی و مرکزی سودمند باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی ابتدا چای کوهی به‌طور دست‌چین از ارتفاعات بینالود در جنوب شهر نیشابور جمع‌آوری شد. این گیاه توسط مرکز هرباریوم دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد (IAUM) به شمارهٔ هرباریوم ۹۴۲۰ تایید شد. برگ‌های گیاه چای کوهی توسط آسیاب کاملاً پودر و تا زمان عصاره‌گیری در جای خشک و خنک نگهداری شد. در ابتدا به روش سوکسله که یک روش علمی عصاره‌گیری است، از پودر برگ‌های چای کوهی عصاره هیدروالکلی تهیه شد (۱۶). ۳۰ گرم از پودرخشک چای کوهی داخل کاغذ مخصوص کارتوش ریخته ودر دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس ۱۵۰ سی‌سی آب مقطر و ۱۵۰ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد در محفظه مخصوص دستگاه ریخته شد. همچنانکه کیسه حرارتی دستگاه، آرام آرام گرم می‌شود حلال (آب و الکل) نیز گرم شده و عصاره چای کوهی با حلال مخلوط گشته و به بالن بر می‌گردد. بدین ترتیب از حجم کل محلول کاسته نمی‌شود. عصاره دردستگاه روتاری تقطیر در خلاء که روی دمای ۴۰ درجه و سرعت چرخش ۹۰ دور در دقیقه تنظیم شده بود، تایک سوم حجم اولیه تغلیظ گردید و پس از آن، برای خشک شدن کامل درون انکوباتور با دمای ۴۵ درجه به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد (۱۶). عصاره‌گیری در ۱۰ ساعت صورت گرفت تا اطمینان حاصل شود که تمام عصاره قابل حل در حلال از پودر استخراج شده است (۱۶) و در نهایت ۶/۸۵ گرم عصاره خشک به دست آمد. در این مطالعه تجربی از ۳۶ رأس رت نر نژاد ویستار با حدود وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم، با سن تقریبی۳ ماه تهیه شد. سپس به‌صورت تصادفی در۹ گروه تقسیم شدند (جدول۱). رت‌ها از بخش حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد خریداری شدند. تا زمان انجام آزمایش حیوانات در شرایط نوری استاندارد روزانه و درجه حرارت ۲۲تا 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 تمام طول آزمایش پروتکل اخلاقی کار با حیوانات رعایت شد تا کمترین درد یا زجری متحمل نشوند.

روش کمپرسیون عصب سیاتیک

رت‌های هر گروه با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی زایلازین ۶ میلی‌گرم و کتامین ۶۰ میلی‌گرم به نسبت وزن بدن بیهوش گردیدند (۱۶). پس از بیهوشی، حیوان را به پهلوی راست خوابانده و به کمک قیچی موهای پوست ناحیه سر استخوان ران را تراشیده و محل با بتادین ضدعفونی شد. آن‌گاه در زیر سر استخوان ران، در پوست برشی به طول یک سانتی‌متر به کمک اسکارپل ایجاد کرده و پس از کنار زدن عضلات در عمق این ناحیه، عصب سیاتیک آشکار شد. سپس با پنس قفل‌دار ساده عصب سیاتیک به‌مدت ۶۰ ثانیه تحت کمپرسیون قرارگرفت (۱). روش اعمال کمپرسیون در همه رت‌ها یکسان و از پنس قفل‌دار واحدی استفاده شد. پس از کمپرسیون، عصب در محل طبیعی خود قرار گرفت و لبه‌های زخم توسط گیره مخصوص به‌هم بخیه زده شده و محل ضایعه ضدعفونی گردید. در جریان عمل جراحی و پس از آن تا موقع به‌هوش آمدن، حیوان گرم نگه داشته شد. بعد از اینکه رت‌ها هوشیاری اولیه خود را به‌دست آوردند، به قفس‌های جداگانه منتقل و در شرایط استاندارد حیوان‌خانه از نظر نور، دما و رطوبت نگهداری شدند. برای هر جانور در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

طول ۲۸ روز، ۲ نوبت تزریق با دوزهای (۷۵mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی انجام گرفت. اولین مرحله تزریق بلافاصله بعد از انجام عمل کمپرسیون و تزریق دوم یک هفته بعد صورت پذیرفت (۱۶)

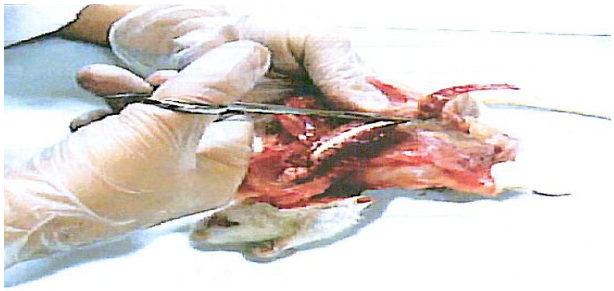
جدول ۱: گروه‌بندی حیوانات مورد آزمایش

	نام گروه	مشخصات	تعداد دفعات تزریق داخل صفاقی درمدت ۲۸ روز
n=4	کنترل	مشاهده عصب سیاتیک پای راست	تزریق سرم فیزیولوژیک جهت ایجاد استرس تزریق(روز اول وروز هفتم)
n=16	کمپرسیون	کمپرسیون عصب سیاتیک+ نمونه برداری در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۸	تزریق سرم فیزیولوژیک جهت ایجاد استرس تزریق(روز اول و روز هفتم)
n=16	تیمار	کمپرسیون+ عصاره هیدروالکلی با دوز ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم+ نمونه برداری در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۸	۲بار تزریق (روز اول و روز هفتم)

شکل ۲: نمایش مراحل مختلف کمپرسیون و تزریق عصاره (الف تا د)

نمونه‌برداری

بدین منظور حیوان از سطح شکمی تشریح شده و احشاء شکمی تخلیه گردید، ستون فقرات ناحیه کمر برای نمونه‌برداری آماده شد. ابتدا در ناحیه مهره‌های سینه برش به‌صورت عرضی در ستون مهره‌ها ایجاد شد به‌طوری‌که ارتباط آن با قسمت‌های بالا قطع گردید. سپس با استفاده از قیچی نوک تیز و ظریف از ناحیه برش در طرفین ستون مهره‌ها دو برش طولی ایجاد و قسمت شکمی مهره‌ها برداشته شد. برای یکسان بودن نمونه‌برداری در همه نمونه‌ها نخاع به‌طور کامل تا انتهای دم اسب از داخل ستون مهره‌ها خارج گردید سپس از دم اسب به اندازه ۱۸ میلی‌متر بالا رفته و نمونه‌هایی به‌طول ۸ میلی‌متر تهیه شد.



شکل ۳: نمایش نحوه نمونه برداری از نخاع

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]
[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

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 RNasefree، سانتریفیوژ، میکروتیوب ۱/۵ml و ۰/۵ RNase free، نوک سمپلر زرد و آبی RNase free، سمپلر، ازت مایع.

روش کار: ابتدا از بافت نخاع در زمان‌های تعیین شده نمونه‌برداری شد. سپس مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری Column RNA isolation Kit III(DENAzist) انجام شد.

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 کاملا پودر شد.

۳: پودر را به میکروتیوب 1.5 ml منتقل کرده سپس۱۷۵µL محلول DR1 به آن اضافه شد.

۴: به مدت ۳۰ ثانیه بافت هموژنیزه شد.

۵: ۵ دقیقه در محیط ماند.

ب: شروع استخراج RNA

۱: ۳۵۰µl DR2 گرم‌شده در دمای ۷۰ درجه به میکروتیوب اضافه شد. ۳-۲ بار معکوس سپس به‌مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد.

۲: پس از پایان سانتریفیوژ یک فاز جامد در پایین و یک فاز مایع در بالا ایجاد شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی را با سمپلر به میکروتیوب 1.5 ml جدید منتقل کرده و بقیه محلول دور ریخته شد.

۳: ۲۳۵µl اتانول ۹۵٪ به مایع سوپرناتانت اضافه و ۳-۲ بار معکوس شد.

۴: مایع حاصل سریعاً به ستون های استخراج منتقل گردید (۳).

۵: ستون به مدت ۱ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و پس از هر سانتریفیوژ مایع جمع شده در لوله جمع‌کننده پایین ستون دور ریخته شد.

۶: DR3۵۵۰µl به‌ستون اضافه گردید و به‌مدت ۱ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد.

۷: دوباره DR3۲۰۰µl به‌ستون اضافه گردید و به‌مدت ۲دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. ستون‌ها به یک میکروتیوب 1.5 ml جدید منتقل شد و50µl DR4 به‌ستون اضافه گردید و به‌مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق ماند، سپس ۲ دقیقه با ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد.

۹: دوباره ۵۰µl DR4 به‌ستون اضافه گردید و به‌مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق ماند سپس ۲ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد.

۱۰: ستون‌ها دور انداخته شده و 100µl محلول حاصل حاوی RNA جهت نگهداری در فریزر به ۳ میکروتیوب 0.5 ml با نسبت ۳۰ : ۳۰ : ۴۰ منتقل شد.

۱۱: توتال RNA حاصل توسط دستگاه نانودراپ تعیین کیفیت و کمیت گردید.

۱۲: RNA استخراج شده در فریزر 70ºC- نگهداری گردید.

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 موردنظر را در طول موج مربوطه، بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر، محاسبه می‌نماید (۱۸).کنترل مقدار RNA استخراج شده توسط ژل آگاروز ۱/۵ ٪ جهت اطمینان از استخراج تمام نمونه‌ها، این روش انجام گردید.

۱- تهیه ژل آگارز ۱/۵ ٪: ۱/۵ گرم پودر آگار را در ۱۰۰ سی‌سی محلول TBE حل کرده و روی شعله قرار داده تا آرام به جوش بیاید. مقدار ۱ میکرولیتر اتیدیوم برماید به آن اضافه کرده، و سپس محلول در سینی ژل خالی شد.

۲- مقدار ۲ میکرولیتر از نمونه RNA را با محلول Loding buffer مخلوط کرده و سپس درون ول‌های ژل قرار گرفت. ژل درون دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰-۹۰ به مدت ۱ ساعت قرار داده شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

۳- عکس‌برداری ژل با دستگاه ژل داکت انجام و عکس‌ها ذخیره گردید.

سنتز cDNA:

جهت بررسی بیان ژن لازم است که از نمونه‌های RNA به‌روش ذیل cDNA سنتز شود:

مواد مورد نیاز:

1. Total RNA 0.5 – 1 ng
2. Oligo (dT) 16 500ng/µl
3. DEPC-treated wather
4. RT-preMix (2x)

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.

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

۲-راندوم هگزامر Random Hexamer: ۶ باز دارد از ۴۰ نوع باز به صورت رندوم توالی‌های ۶ تایی می‌سازد چون طول آن کوتاه است می‌توانند به‌صورت اتفاقی به RNA متصل شوند سپس آنزیم به انتهای پرایمر متصل شده و رونویسی می‌کند.

۳- Speciphic primer: پرایمر اختصاصی است. mRNA مربوط به ژن خاصی است. پرایمر اختصاصی طراحی می‌کنیم به‌صورت اختصاصی پرایمر mRNA خود را پیدا می‌کند و رونویسی انجام می‌شود (۱۷).

مراحل ساخت cDNA:

۱. بسته به غلظت RNAدر هر نمونه بین ۲ تا۳/۵ میکرولیتر از نمونه RNA نرمال و تیمار برداشته شد.

۲. یک میکرولیتر اولیگو dT به هر نمونه اضافه گردید.

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

۴. پنج دقیقه در دستگاه PCR در دمای 70ºC قرار داده شد تا ساختارهای ثانویه از بین برود.

۵. نمونه‌ها چند دقیقه روی یخ قرار گرفت.

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

۷. نمونه‌ها ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ ºC و ۶۰ دقیقه در دمای ۵۰ ºC انکوبه شدند.

۸. برای توقف واکنش نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ ºC قرار گرفتند.

۹. پس از اتمام کار نمونه‌ها به فریزر ۲۰ ºC- منتقل شدند.

Real- Time PCR

در این روش از کاوشگرها یا پروب‌های هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسانس در انتهای'۵ یا "۳استفاده می‌شود، که امکان بررسی میزان محصول PCR را بدون جداسازی آن‌ها در روش‌های الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی آکریل آمید می‌دهد (۱۷).

پروتکل Real time PCR برای تعیین بیان ژن NT3

پروتکل پیشنهادی مطابق جدول ۲ می‌باشد.

جدول۲: پروتکل Real time PCR برای ژن NT3

Component	Volume	Final conc
SYBR Green PCR Master Mix(2x)	10µl	1x
50x ROX dye	0.4µl	1x
Forward primer	1µl	100µM
Reverse primer	1µl	100µM
Template cDNA	3µl	0/5-1µg
Sterilized D.W	4.6µl	-
Total Volume	20µl	-

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

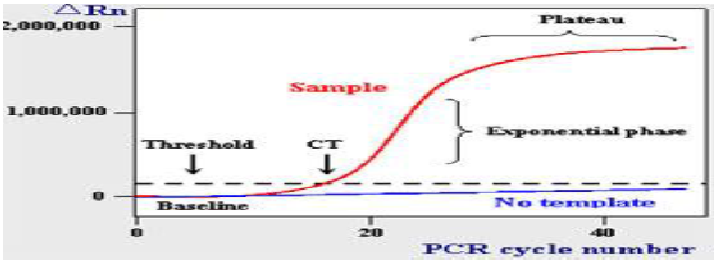
[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

جدول۳: توالی پرایمر مورد استفاده برای بررسی بیان ژنNT3

GENES	Primer Sequence	TM
NT3	Forward: 5´-CGTCCCTGGAAATAGTCATACGG - 3´	63 ºC
NT3	Reverse: 5´-GACAGATGCCAATTCATGTTCTT - 3´	63 ºC
β-Actin	Forward: 5´-ATTGCTGACAGGATGCAGAA - 3´	60 ºC
β-Actin	Reverse: 5´-TAGAGCCACCAATCCACAC - 3´	60 ºC

جدول۴: برنامه دمایی Real time PCR برای ژنNT3

Cycle	Time	Temp
1	15 Min	95 ºC
45	15 Sec	95 ºC
	30 Sec	63 ºC
	30 Sec	72 ºC
1	5Min	72 ºC



شکل۳: مراحل Real time PCR

مراحل Real time PCR

به‌طورکلی Real time PCRچند مرحله دارد: (۳) 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 مربوطبه واکنش شروع می‌شود.

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

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

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه روش‌های کمی quantitative real-time PCR وابسته به اندازه‌گیری میزان تکثیر قطعات ژنی در هر سیکل PCR با استفاده از ملکول‌های ساطع‌کننده نور فلورسنت هستند و داده‌های فلورسنت جمع‌آوری شده از real-time بایستی توسط روش‌های آنالیز داده‌ها بررسی شوند تا میزان تفاوت بیان mRNA در ژن هدف در مقایسه با ژن کنترل مشخص گردد (۱۸). تکنیک به‌کار رفته در این تحقیق Real-time PCR بوده که با این تکنیک میزان بیان mRNA ژن موردنظر با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ Syber Green ارزیابی گردیده و میزان تکثیر در چرخه‌ای که بیان ژن‌ها قابل ردیابی بود، تحت عنوان

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]
[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

CtThreshold Cycle نامیده و Ctهای حاصل نسبت به Ct مربوط به بیان ژن β-actin مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ برای بررسی تفاوت بیان mRNA استفاده گردید و از ژن β-Actin به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد (۱۸). در این بررسی یک ژن رفرنس و یک ژن هدف وجود دارد. یک گروه به‌عنوان کنترل شناخته می‌شود و بیان ژن‌ها نسبت به این کالیبراتور سنجیده می‌شود. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار MxPro و آزمون Anova با سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ استفاده شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد تایید شده است.

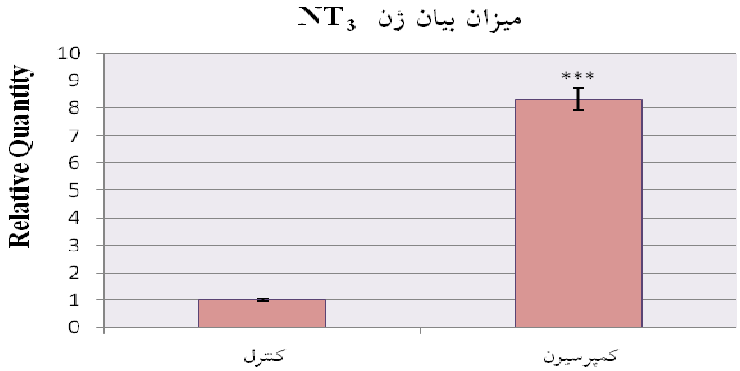
نتایج

این پژوهش به‌منظور اثرات عصاره هیدروالکلی چای کوهی بر بیان ژن NT_3 در عصب سیاتیک آسیب‌دیده رت انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش در نمودارهای ۱ تا۷ ارائه گردیده است. در تحقیق حاضر ابتدا با به‌کارگیری نرم‌افزارآماری Minitab17 و MX pro به تجزیه و تحلیل داده‌ها پرداخته شد و سپس خروجی‌های حاصل جهت معرفی بیشتر به‌صورت نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel طراحی و ترسیم شد. برای تأیید کیفیت RNA استخراج شده از تکنیک نانودراپ استفاده شد که نتایج آن در جدول (۵) مشاهده می‌شود.

جدول۵: نتایج غلظت RNA استخراج شده به روش نانودراپ برحسب نانوگرم بر میکرولیتر

غلظت RNA	گروه‌ها
۰/۰۷	کنترل
۰/۰۳۱	کمپرسیون روز ۱
۰/۰۴۴	کمپرسیون روز ۷
۰/۰۴۹	کمپرسیون روز ۱۴
۰/۱۱	کمپرسیون روز۲۸
۰/۰۶	تیمار روز ۱
۰/۰۶۲۴	تیمار روز۷
۰/۰۶	تیمار روز ۱۴
۰/۰۱۴۶	تیمار روز ۲۸

براساس نمودار ۱بیان ژن NT_3 در گروه کمپرسیون افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهد.

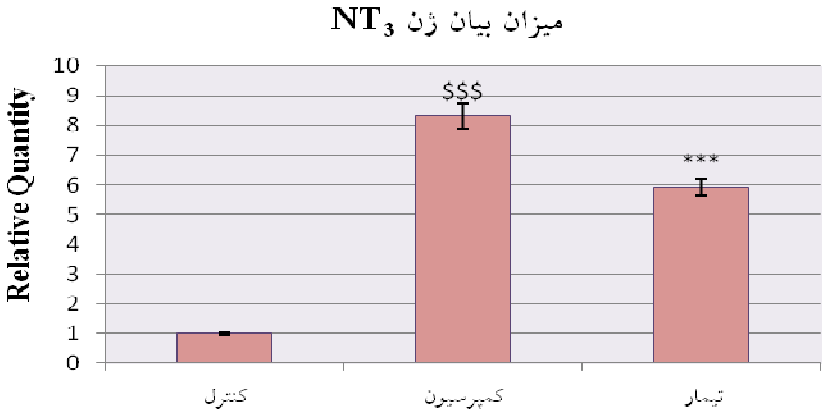


نمودار۱: مقایسه شدت بیان ژن NT_3 در قطعه نخاعی بین دو گروه کنترل و کمپرسیون در روز اول.

*** اختلاف معناداری را نشان می دهد p<0.001. (مقایسه گروه کنترل با گروه های کمپرسیون)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]
[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

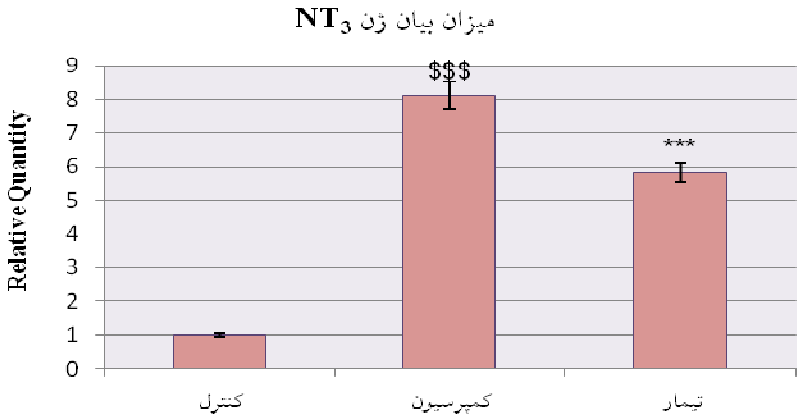
براساس نمودار ۲ بیان ژن NT_3 پس از یک روز در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) کاهش معنا داری را در مقایسه با گروه کمپرسیون در همان روز نشان می دهد.



نمودار۲: مقایسه شدت بیان ژن NT3 در قطعه نخاعی بین گروه تیمار عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) با گروه کمپرسیون در روز اول

$$$: اختلاف معناداری را نشان می دهد $p<0.001$ (مقایسه گروه کنترل با گروه های کمپرسیون)

براساس نمودار۳ بیان ژن NT_3 پس از ۷ روز در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) کاهش معنا داری را در مقایسه با گروه کمپرسیون نشان می دهد.



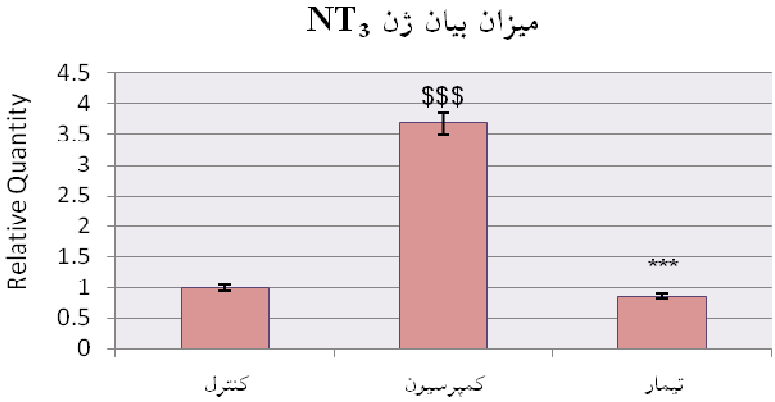
نمودار۳: مقایسه شدت بیان ژن NT_3 در قطعه نخاعی بین گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) با گروه کمپرسیون در روز هفتم

$$$: اختلاف معناداری را نشان می دهد $p<0.001$ (مقایسه گروه کنترل با گروه های کمپرسیون)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

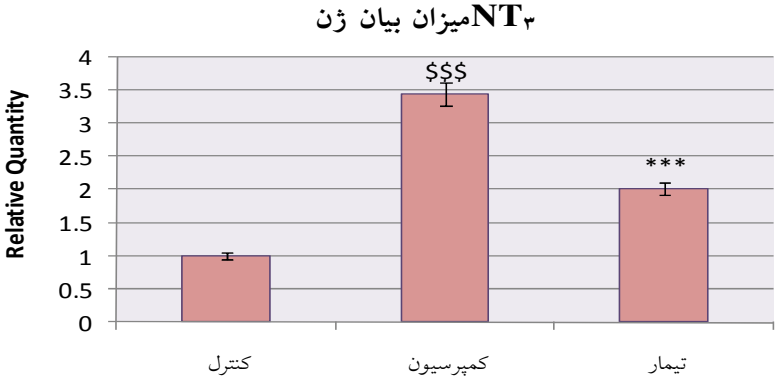
براساس نمودار۴بیان ژن NT_3 پس از ۱۴ روز در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) کاهش معناداری را در مقایسه با گروه کمپرسیون نشان می‌دهد.



نمودار۴: مقایسه شدت بیان ژن NT_3 در قطعه نخاعی بین گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) با گروه کمپرسیون در روز چهاردهم

$$$: اختلاف معناداری را نشان می دهد $p<0.001$. (مقایسه گروه کنترل با گروه های کمپرسیون)

براساس نمودار۵ بیان ژن NT_3 پس از ۲۸ روز در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) کاهش معناداری را در مقایسه با گروه کمپرسیون نشان می‌دهد.



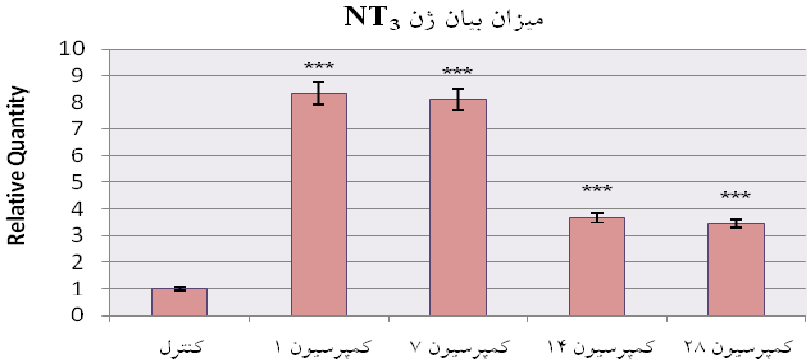
نمودار۵: مقایسه شدت بیان ژن NT_3 در قطعه نخاعی بین گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی (دوز ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) با گروه کمپرسیون در روز بیست و هشتم.

$$$: اختلاف معناداری را نشان می دهد $p<0.001$. (مقایسه گروه کنترل با گروه های کمپرسیون)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

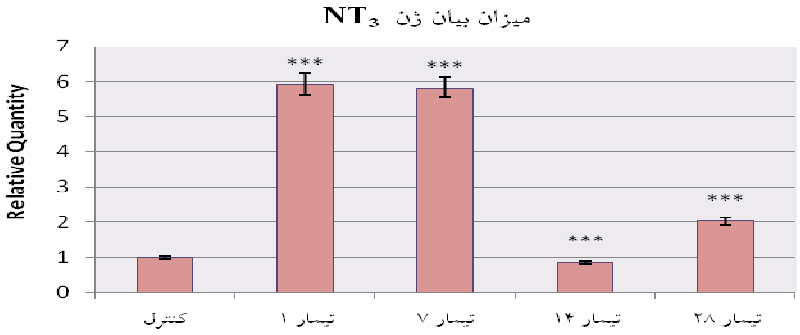
بر اساس نمودار ۶ بیان ژن NT_3 پس از گذشت ۱،۷،۱۴و۲۸ روز در گروه کمپرسیون در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنا داری نشان می دهد($p<0.001$).



نمودار۶: مقایسه شدت بیان ژن NT_3 در قطعه نخاعی بین گروه های کنترل و کمپرسیون دربازه زمانی (۱،۷،۱۴و۲۸) روز.

***: اختلاف معناداری را نشان می دهد $p<0.001$. (مقایسه گروه کنترل با گروه های کمپرسیون)

براساس نمودار ۷ بیان ژن NT_3 پس از گذشت ۱،۷،۱۴و۲۸ روز در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنا داری نشان می دهد($p<0.001$).



نمودار ۷: مقایسه شدت بیان ژن NT_3 در عصب سیاتیک بین گروه های کنترل و تیمار با عصاره هیدروالکلی دوز (۷۵میلی گرم بر گیلوگرم) دربازه زمانی (۱،۷،۱۴و۲۸)روز.

***: اختلاف معناداری را نشان می دهد$p<0.001$. (مقایسه گروه کنترل با گروه های تیمار)

بحث

در پژوهش حاضر جهت بررسی تغییرات بیان ژن NT_3 در مسیر ترمیم عصب اقدام به کمپرسیون عصب سیاتیک رت کردیم سپس حیوانات را با دوز ۷۵ میلیگرم بر کیلوگرم عصاره چای‌کوهی تیمار نمودیم تا تغییرات بیان ژن NT_3 را در آن‌ها مشاهده کنیم و کاهش یا افزایش آنرا بررسی نماییم و نتیجه گرفتیم بیان ژن NT_3 در گروه‌های کمپرسیون و تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری پیدا کرد. (نمودار۶و۷) اما در مقایسه با گروه‌های تیمار با گروه کمپرسیون مشاهده شد که افزایش بیان ژن در گروه کمپرسیون بیشتر از گروه تیمار بود.

(نمودار۲،۳،۴،۵) باتوجه به اینکه مکانیزم‌های مؤثر در ترمیم شامل اثرات ضدالتهابی، اثرات فاکتورهای حیاتی، اثرات NGF، اثرات NT_3، آنتی اکسیدانی و آنتی آپوپتوزی می‌باشد (۱۸). لذا چنین تصور می‌شود که گیاه چای‌کوهی روند ترمیم را از مسیرهای دیگر به غیر از ژن NT_3دنبال می‌کند. اکسوتومی یا قطع کامل عصب نخاعی یکی از معمولی‌ترین مدل‌ها برای بررسی مرگ نورونی القاء شده توسط آسیب می‌باشد. به‌دنبال کمپرسیون عصب سیاتیک وقایع بیولوژیکی متعددی در سطح سلولی و مولکولی روی می‌دهد که از آن جمله می‌توان به بروز آپوپتوزیس، افزایش ورود کلسیم به‌درون نورون، آزاد شدن

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

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 (۱۹،۲۰). در این پژوهش نیز ما پس از کمپرسیون عصب سیاتیک طبق نمودار ۱ مشاهده می‌کنیم که به‌علت وقایع بیولوژیکی و فعال شدن فرآیندهای التهابی افزایش معنادار فاکتورهای نوروتروفین مشاهده می‌شود. یکی دیگر از وقایعی که به‌دنبال آسیب آکسون بوجود می‌آید افزایش ورود کلسیم به درون نورون می‌باشد که از چندین جهت باعث ایجاد اختلالات نورودژنراتیو می‌شود. به‌دنبال آسیب عصب نوروترانسمیترهای تحریکی در فضای سیناپسی رها می‌شوند که موجب تحریک بیش از حد نورون‌های پس‌سیناپسی و بروز سمیت تحریکی می‌شوند. یکی از این نوروترانسمیترها گلوتامات می‌باشد که به‌روش اگزوسیتوز و به‌صورت وابسته به کلسیم آزاد می‌شود و با اتصال به گیرنده‌های NMDA در نورون پس سیناپسی ورود کلسیم به داخل سلولی عصبی را افزایش می‌دهد. کلسیم فرآیندهای آنزیمی زیادی را از جمله فعال کردن آنزیم پروتئازکالپین را موجب می‌شود که با فعال شدن این آنزیم پروتئین‌های اساسی در سلول تجزیه شده و ضایعات جبران‌ناپذیری به سلول وارد می‌کند و همچنین کلسیم می‌تواند با اثر بر روی میتوکندری‌ها موجب افزایش تولید رادیکالهای آزاد شود (۲۰،۲۱). به‌دنبال 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 (۲۱). همان‌طور که در این آزمایش مشاهده شد بیان ژن NT_3در روزهای اول و هفتم پس از آسیب افزایش معناداری داشت و سپس این روند در روزهای ۱۴ و ۲۸ رو به کاهش گذاشت (نمودار ۶).

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 (۲۲). در پژوهش حاضر نیز مشاهده می‌شود که پس از ایجاد کمپرسیون بیان ژن NT_3 افزایش چشمگیری را در گروه‌های کمپرسیون نشان می‌دهد (نمودار ۱). NT_3 فاکتور اختصاصی برای زنده ماندن نورون‌ها می‌باشد.NT_3 ترمیم را تسریع کرده و سبب تکامل شاخه جانبی اکسون‌های حسی آسیب‌دیده و افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار می‌شود. به‌دنبال قطع آکسون، سلول‌های شوان شروع به ترشح NT_3می‌کنند. هم‌چنین NT_3 سبب تحریک مهاجرت سلول‌های شوان و کاهش دژنره شدن و افزایش قدرت ترمیم پس از صدمه اعصاب محیطی و افزایش رگ‌زایی می‌شود، NT_3 هم‌چنین سبب افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار، ضخیم‌شدن غلاف میلین و بلوغ بیشتر لایه‌های آندوتلیال می‌گردد (۲۳،۲۴). در این آزمایش نیز طبق نمودارهای ۱تا۷ مشاهده می‌شود که بیان ژن NT_3در گروه‌های کمپرسیون نسبت به کنترل افزایش داشته است. گیاه چای کوهی دارای آثار بارز ضدالتهابی می‌باشد. نصری و همکاران در سال ۱۳۸۹ نشان دادند که عصاره هیدروالکلی سرشاخه‌های چای کوهی دارای اثر ضدالتهابی می‌باشد (۲۴). تحقیقات نشان می‌دهد که از فلاونوئیدهای موجود در چای کوهی از جمله آلفا بیسابولول و اکسیدهای A و B از آلفابیسابولول و ماتریسین می‌توان به عنوان ضدالتهاب استفاده کرده (۲۴). در بررسی فیتوشیمیایی عصاره گیاه چای کوهی دو گلیکوزید ایریدوئیدی و یک گلیکوزید فلانوئیدی و یک گلیکوزید اتانوئیدی شناسایی شده است. وجود ترکیبات فلاونوئیدی و ایریدوئیدی در عصاره این گیاه مسئول اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد دردی بوده و باعث استفاده‌های سنتی از این گیاه می‌شود. هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه عصاره این گیاه مؤید وجود ترکیبات گلیکوزیله فنولی در آن‌ها می‌باشد (۲۵). براساس نتایج تحقیقات فوق احتمال می‌رود یکی از مکانیسم‌هایی که عصاره گیاه به لحاظ اعمال حفاظت نورونی از آن بهره می‌برد ویژگی آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد. احتمالاً فلانوئید محلول در عصاره گیاه چای کوهی و ترکیب آن با عناصری مانند مس با ورود به سیستم اعصاب مرکزی و مهار کانال‌های کلسیمی موجود در پایانه‌های عصبی از ورود کلسیم به داخل نورون‌ها

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

جلوگیری کرده و با افزایش آستانه تحریک‌پذیری سلول‌های عصبی و تعدیل آزاد شدن نوروترانسمیترها، به نوعی نقش حفاظتی بر سلول‌های عصبی اعمال می‌کند. احتمالاً عصاره چای کوهی می‌تواند از طریق بلوکه کردن کانال‌های کلسیمی و به‌دنبال آن کاهش کلسیم درون سلولی و کاهش سطح گلوتامات در حفاظت نورونی نقش داشته باشد. ضمن اینکه از طریق مهار کلسیم می‌تواند در کاهش تولید رادیکال‌های آزاد نیز مؤثر باشد (۲۶).

به‌طورکلی افزایش بیان ژن NT_3 در گروه‌های کمپرسیون به علت افزایش ناگهانی در فرآیند تخریب نورونی و دمیلینه شدن آکسون‌ها، افزایش واکنش‌های التهابی و هجوم ماکروفاژها به محل آسیب و در نهایت ایجاد شرایط مطلوب جهت افزایش بیان ژن‌های تحریک‌کننده رشد آکسونی و دخیل در بقاء نورونی می‌باشد. این افزایش ناگهانی پس از اینکه عوامل تحریک‌کننده کاهش می‌یابد و تخریب نورونی متوقف می‌گردد سیر نزولی پیدا می‌کند (۲۷). در این پژوهش بیشترین بیان ژن NT_3 در گروه‌های کمپرسیون روزهای ۱و۷ مشاهده شد و در روزهای ۱۴و۲۸ این روند روبه کاهش می‌گذارد. به‌طوریکه بیان ژن NT_3در گروه‌های کمپرسیون ۱و۷ افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل دارد ($p<۰/۰۰۱$). در مورد گروه‌های تیمارشده با عصاره هیدروالکلی چای کوهی‌نیز این روند افزایش بیان ژن در روزهای اول و هفتم به‌نحوی قابل مشاهده است و در روزهای چهاردهم و بیست و هشتم این روند سیر نزولی پیدا می‌کند. به‌طوریکه بیان ژن NT_3در گروه‌های تیمار با عصاره هیدروالکلی چای‌کوهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشته است ($p<۰/۰۱$). اما با مقایسه گروه‌های تیمار و گروه کمپرسیون مشاهده می‌شود که علیرغم اینکه در گروه‌های تیمار افزایش بیان ژن NT_3 مشاهده شد ولی در مقایسه با گروه کمپرسیون دیده شد که افزایش بیان ژن در گروه‌های کمپرسیون بیشتر بوده که نشان‌دهنده‌ی این مطلب است که احتمالاً عصاره هیدروالکلی چای کوهی تأثیر چندانی در افزایش بیان ژن NT_3 ندارد و باتوجه به اینکه عصاره هیدروالکلی چای کوهی بر دانسیته‌ی جسم سلولی نورون‌های آلفا اثر مثبت داشته (۲۸،۲۹) و هم‌چنین این عصاره بیان ژن NGF را نیز در عصب سیاتیک موش‌های آسیب دیده افزایش می‌دهد (۳۰). لذا تصور براین است که عصاره هیدروالکلی چای‌کوهی احتمالاً از روش‌های ترمیم دیگری به غیر از بیان NT_3 می‌تواند باعث ترمیم بافت عصبی ضایعه دیده شود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش آنالیز داده‌های مربوط به آزمون بررسی بیان تغییرات ژن NT_3 پس از کمپرسیون عصب سیاتیک رت در حضور عصاره‌های هیدروالکلی چای کوهی بررسی شد و مشاهده شد که بیان ژن NT_3در گروه‌های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی چای کوهی افزایش معناداری ($P<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل داشته است که در نمودارهای (۱تا۵) آورده شده. اما در مقایسه گروه تیمار شده با گروه کمپرسیون، افزایش بیان ژن را مشاهده نمی‌شود که می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که احتمالاً عصاره هیدروالکلی چای کوهی ترمیم را از طریق روش‌های دیگری انجام می‌دهد.

سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد بود و تمام هزینه انجام تحقیق بر عهده دانشگاه آزاد بود و از هیچ‌گونه حمایت مالی دیگر برخوردار نبود. بدین‌وسیله از همه همکاران گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد واحد مشهد به خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع: وجود ندارد

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

References:

1- Geier DA, Kern JK, Garver CR, Adams JB, Audhya T, Geier MR. ***A Prospective Study of Transsulfuration Biomarkers in Autistic Disorders***. Neurochem Res 2009; 34: 386–93.

2- Lu JM, Lin pH, Yao Q, Chen C. ***Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Apporoaches and Model System.*** J Cell Mol Med 2010; 14 (4): 840-60.

3- Caporali A, Emanueli C. ***Cardiovascular Actions of Neurotrophins.*** Physiol Rev 2009, 89(1): 279-308.

4- Gu X, Ding F, Williams DF. ***Neural Tissue Engineering Options for Peripheral Nerve Regeneration***. Biomaterial 2014; 35(24): 6143-56.

5- Nazemiyeh H, Razavi SM, Asnaashari S, Talebpour AH, Ghahramani MA, Imani Y. ***Composition of the Essential Oil of Nepeta menthoides boiss & Buhse.*** Pharmaceutical Sciences 2008; 14(4): 283-9.

6- Wood MD, Mackinnon SE. ***Pathways Regulating Modality-Specific Axonal Regeneration in Peripheral Nerve***. Exp Neurol 2015; 265: 177-5.

7- Kucera J, Ernfors P. ***Reduction in the Number of Spinal Motor Neurons in Neurotrophin-3 Deficient Mice.*** Neuroscience 1995; 69(1): 321-30.

8- Britz GW, McCall T, Grant G, Kliot M. ***Peripheral and Cranial Nerve Injury***. Neurosurgery 2005; 557-570. Springer, London.

9- Senoglu M, Nacitarhan V, Kurutas EB, Senoglu N, Altun I, Atli Y, et al. ***Intraperitioneal Alpha-Lipoie Acid to Prevent Neural Damage after Crush Injury to the Sciatic Nerve.*** J Brachial Plexus Peripher Nerve Inj 2009; 4: 22-28.

10- Madduri S, Papaloïzos M, Gander B. ***Synergistic Effect of CODNF and NGF on Axonal Branching and Elongation in Vitro.*** Neurosci Res 2009; 65(1): 88-97.

11- DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. ***Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy***. Fundam Clin Pharmacol 2003; 17: 405–17.

12- Liu R, Zhang L, Lan X, Li L, Zhang TT, Sun JH, et al. ***Protection by Borneol on Cortical Neorons against Oxygen-Glucose Deprivation/ Reperfusion: Involvement of Anti-Oxydation and any Antiinflammation through Nuclear Transcription Factor –Appa-B Signaling Pathway.*** Neuroscience 2011; 176: 408-19.

13- Olfati F, Azarbaijani S, Hadizadeh M, Sadeghi T, Hajseiedjavadi E. ***Effect of Powder of Stachys Lvandulifolia Flowers on Primary Dysmenorrhea.*** J Med Plants 2010; 2 (34): 84-89. [Persian]

14- Nasri S, Ramezanghorbani A, Kamalinejad M. ***Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Stachys Lavandulifolia Vahl S, Aerial Parts in Male Mice.*** Armaghane danesh 2011; 16(2): 161-71. [Persian]

15- Coleman MP, Perry VH. ***Axon Pathology in Neurological Diseases: A Neglected Therapeutic Target.*** Trends Neurosis 2002; 25(10): 532-537.

16- 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 Stereological Counting Method (Disector).*** IBJ 2000; 4(1): 45-9.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

17- Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA, Kim HA. ***Microanatomy of Axon/Glial Signaling during Wallerian Degeneration***. J Neurosci 2005; 25(13): 3478-87.

18- Dahlin LB, Brandl J. ***Basic Science of Peripheral Nerve Repair: Wallerian Degeneration/ Growt Cones.*** Operative Techniques in Orthopaedics 2004; 14(3): 138-45.

19- Mueller M, Wacker K, Hickey WF, Ringelstein EB, Kiefer R***. Co-Localization of Multiple Antigens and Specific DNA: A Novel Method Using Methyl Methacrylate-Embedded Semithin Serial Sections and Catalyzed Reporter Deposition.*** Am J Pathol 2000, 157(6):1829- 38.

20- Tehranipour M, Khayetzadeh J, JavaheriFard R. ***Protective Effects of Turmeric Whole Extract on Degeneration of Anterior Spinal Neuroglial Cells after Compression of Sciatic Nerve in Rats.*** Arak Medical University J 2010; 13(1): 83-9. [Persian]

21- Di Giovanni S, Rathore K***. P53- Dependent Pathway in Neurite Outgrowth and Axonal Regeneration***. Cell Tissue Res 2012; 349(1): 87-95.

22- Hsieh SH, Ferraro GB, Fournier AE. ***Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase***. J Neurosci 2006; 26(3):1006–15.

23- Jancalek R, Dubovy P, Svizenska I. ***Bilateral Changes of TNF-A and IL-10 Protein in the Lumber and Cervical Dorsal Root Ganglia Following a Unilateral Chornic Constriction Injury of the Sciatic Nerve.*** J Neureinflammation 2010; 7:11.

24- Kershensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Misgeld T. ***In Vivo Imaging of Axonal Degeneration and Regeneration in the Injured Spinal Cord.*** Nat Med 2005; 11(5): 572-7.

25- Levi- Montalcini R. ***The Nerve Growt Factor and the Neuro Science Chess Board.*** Prog Brain Res 2004; 146: 525-7.

26- Li H, Deng J, Chen H, Chen T, Cao X, Hou H, Huan W, Zhang G, Yu B, Wang Y. ***Dynamic Changes of PIRH2 and P27kip1 Expression in Injured Rat Sciatic Nerve***. Neurol Sci 2012; 33(4): 749-57.

27- Marandi M, Mowla SJ, Tavallaei M, Yaghoobi MM, Jafarnejad SM. ***Propertein Convertases 1 and 2 (PC 1 and PC 2) are expressed in Neutrally Differentiated Rat Bone Marrow Stromal Stem Cessl (BMSCs).*** Neuroscience Letters 2007; 420(3): 198-203.

28- Dahmane N, Ruiz-i-Altaba A. ***Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum.*** Development 1999; 126: 3089–100.

29- Rabinson PP, Yates JM, Smith KG. ***An Electrophysiological Study in to the Effect of Neurotrophin-3 on Functional Recovery after Lingual Nerve Repair.*** Arch Oral Biol 2004; 49(10): 763-75.

30- Rodinskii AG, Serdyuchenko IY, Demchenko TV. ***Effects of Systemic Injections of Gamma-Hydroxy Butyrate on the Recovery of Functions of the Distal Hindlimb Muscles in Rats after Compression of the Sciatic Nerve.*** Neurophysiology 2011; 43(2): 113.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 27| NO 10 | Jan 2020
Received: 20 Feb 2018
Accepted: 8 Sep 2018

Expression of Changes in NT3 Gene after Rat's Sciatica Nerve Compression in the Presence of Hydroalcoholic Extract of Mountain Tea (*Stachyslavandulifolia*)

Fariba Ghasemzadeh[1], Maryam Tehranipour[†2], Khadijeh Nezhad Shahrokhabadi[3]

Abstract

Introduction: Neurotrophic factors change in response to nerve damage. Stachyslavandulifolia belongs to the Laminaceae family and since tea has antioxidant and anti-inflammatory effects, therefore, this study aimed to determine the effects of hydroalcoholic extract of mountain tea and its effect on NT3 gene expression after compression.

Methods: In this experimental study, at first the hydro-alcoholic extract of stachys was prepared by the Soxhlet method. In this study, 36 Wistar male rats , 250-300 gr, were randomly divided into 9 groups, 4 rats in each group, and included control, compression (1, 7, 14 and 21 days) and experimental (1, 7, 14 and 28 days) groups. Experimental groups were treated by 75 mg / kg of hydro-alcoholic extract of stachys and to induce the stress in the 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 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 samples was studied in both samples, without treatment and treated with hydro-alcoholic extract.Data were analyzed using MxPro software and Anova test with a significant level of $p < 0.05$ and Excel software was used for drawing graphs.

Results: The results showed that NT3 gene expression was significantly increased in the compression and treatment groups ($p < 0.001$). Although, the NT3 gene expression was decreased in the treatment group compared to the compression group.

Conclusion: It seems that hydroalcoholic extract of Stachyslavandulifolia shoots did not affect NT3 gene expression.

Keywords: Stachyslavandulifolia, NT3 gene destruction and repair of sciatic nerve

Citation: Ghasemzadeh F, Tehranipour M, Shahrokhabadi KH. **Expression of changes in NT3 gene after rat's sciatica nerve compression in the presence of hydroalcoholic extract of mountain tea (*Stachyslavandulifolia*).** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2020; 27(10): 1924-40

[1]Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Iran.
[2]Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Iran.
[3]Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09155110370**, email:** maryam_tehranipour@mshdiau.ac

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-05-15]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i10.2401]