بررسی پروتئوم هیپوکامپ موش های صحرایی تحت تاثیر عصاره آبی گیاه اسطوخودوس

حکیمه زالی[2,1]، مصطفی رضایی طاویرانی[*3]، ایرج پاکزاد[4]

1) کمیته پژوهشی دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
2) دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
3) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
4) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/8/3 **تاریخ پذیرش:91/11/9**

چکیده

مقدمه: برای کاهش استرس و پیامدهای متعاقب آن، محققین روش های متفاوتی را پیشنهاد می کنند که یکی از آن ها استفاده از گیاهان دارویی است. به نظر می رسد که گیاه اسطوخودوس در افزایش حافظه و کاهش استرس مفید باشد. در این مطالعه به بررسی ملکولی اثر عصاره آبی گیاه اسطوخودوس در مدل حیوانی موش صحرایی با کمک تکنیک پروتئومیکس پرداخته می شود.

مواد و روش ها: استخراج پروتئین از هیپوکامپ در دو گروه آزمایشی که شامل موش های کنترل و موش هایی که عصاره آبی گیاه اسطوخودوس دریافت کرده بودند صورت گرفت. سپس پروتئین ها در مرحله اول(IEF) بسته به pH ایزوالکتریک خود روی نوار استریپ تفکیک شدند و مرحله دوم الکتروفورز دوبعدی SDS page است که مرحله جداسازی پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی می باشد. ژل های هر دو گروه مورد آزمایش، جهت رویت لکه های پروتئینی با روش نقره رنگ آمیزی شدند. در نهایت پروتئین های دو گروه جهت آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری(آنالیز خوشه بندی و آنالیز مولفه اصلی) با نرم افزار progenesis same spot مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: در این تحقیق990 نقطه پروتئینی از هر دو گروه به دست آمد. مقایسه بین گروه ها حکایت از بیان 80 نقطه پروتئینی جدید در گروه تحت تاثیر عصاره بود در حالی که هیپوکامپ در حضور عصاره مهار بیان 140 پروتئین را نشان داد. بنا بر این حضور عصاره باعث تغییر بیان ژن در هیپوکامپ می شود که نتیجه آن منجر به تقویت فرایند یادگیری و آموختن می گردد. آنالیز خوشه بندی، پروتئین ها را از نظر بیان به 3 خوشه اصلی تقسیم نمود که بیانگر وجود پروتئین هایی با بیان مشابه در هر خوشه است که این پروتئین ها می توانند عملکرد مشابهی را در شرایط آزمایش ارائه نمایند یا بیانگر حضور همه آن ها در مسیر بیولوژیکی مشترک است. آنالیز مولفه اصلی(PCA) نتایج حاصل از خوشه بندی را تایید نمود و نشان داد که داده های پروتئینی بر طبق شرایط آزمایش خوشه بندی شده اند.

بحث و نتیجه گیری: در نهایت می توان نتیجه گرفت که عصاره اسطوخودوس باعث تغییر بیان معنی داری در سطح پروتئوم می شود و احتمالا فرایند های بیولوژیک ویژه ای را در هیپوکامپ موش صحرایی فعال می نماید که در همراهی با تقویت یادگیری در موش است.

واژه های کلیدی: اسطوخودوس، پروتئوم، هیپوکامپ، موش صحرایی، خوشه بندی، آنالیز مولفه اصلی

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Email: rezaei.tavirani@ibb.ut.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

ماشینی شدن زندگی و سست شدن کانون های خانوادگی سنتی، تحریکات روانی ناشی از محیط اجتماعی و فشارهای اقتصادی، افراد جامعه را در مقابل استرس، اضطراب و نگرانی آسیب پذیر کرده و منجر به بروز انواع بیماری ها مانند بالا رفتن فشارخون، اختلالات گوارشی ، عوارض پوستی و سردرد شده است. پیشینه دیرینه طب سنتی در استفاده از گیاهان جهت کاهش استرس و اضطراب و کسب آرامش و افزایش کارایی سیستم های مختلف دفاعی جهت حفاظت بدن مورد توجه بوده است. گیاهان دارویی آرام بخش، ضد افسردگی، مقوی اعصاب و محافظ اعصاب را در گنجینه گیاهان دارویی می توان شامل گیاهان اسطوخودوس، بابونه، بادرنجبویه، بهارنارنج، جوی دوسر، جینسینگ، جینکو، چای، رازک، ریحان، زردچوبه، زعفران، سنبل الطیب، علف چای، کرفس، گل رنگ، گل ساعتی، گل گاوزبان، نعنا فلفلی و نعنا قمی دانست. مصرف این گیاهان دارویی علاوه بر این که باعث کاهش استرس و اضطراب می شوند در تقویت اعصاب از طریق ساخت بافت های عصبی و افزایش گردش خون در ناحیه مغز باعث تحریک تمرکز و تقویت حافظه نیز می‌شود و از بافت های مغز در برابر پیری حفاظت می‌کند،(۱،۲). گفته می شود برای مقابله با استرس نیز هیچ گیاهی به اندازه اسطوخودوس موثر نیست. اسطوخودوس دستگاه عصبی و تحریک پذیری آن را کنترل می نماید بنا بر این آرام بخش است و باعث شل شدن عضلات می شود. بر اساس مطالعات متعددی که روی اسطوخودوس انجام گرفته، روغن این گیاه، استرس بعد از عمل را در بیمارانی که عمل جراحی قلب انجام داده اند، کاهش می دهد و اضطراب زنانی را که تحت همودیالیز قرار می گیرند، کم می کند،(6-3). اسطوخودوس گیاه شگفت انگیزی است که در درمان اختلالات جزئی خواب، موثر عمل می کند. آزمایش های بالینی که در سال 2005 در بریتانیا انجام شد نشان داد اسطوخودوس در درمان بی خوابی موثر است،(7). اثر مهاری عصاره سرشاخه های اسطوخودوس روی آنزیم استیل کولین استراز نیز به اثبات رسیده که مورد توجه در درمان آلزایمر است. اثر ضد التهابی سرشاخه های اسطوخدوس نیز در موش صحرایی از طریق انجام تست فرمالین گزارش شده است،(5-3). مهم ترین مواد مؤثر دارویی آن روغن فرار، فلاونوئیدها، تانن، کومارین، پتاسیم و کلسیم است به علت خواص درمانی در فرآورده های داروسازی نیز کاربرد دارد،(۴،۸،۹). تا کنون مطالعه ملکولی پیرامون هدف های ملکولی ماده موثره این گیاه صورت نگرفته است و نتجه تحقیقی که با استفاده از عصاره کامل سرشاخه های گیاه اسطوخودوس در مدل های حیوانی موش صحرایی انجام شده بهبود فرایند آموختن را در موش هایی که عصاره دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترلی که عصاره دریافت نکرده بود نشان می داد،(10)، لذا در این مطالعه تغییرات ملکولی ناشی از اثر عصاره آبی سرشاخه های گیاه اسطوخدوس از طریق آنالیزهای پروتئومیکی بر روی هیپوکامپ موش های صحرایی جهت شناسایی هدف های ملکولی(در سطح پروتئین ها) ماده موثره عصاره در بهبود فرایند یادگیری مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش ها

نمونه گیری

موش های صحرایی نر بالغ 280-220 گرمی به صورت تصادفی انتخاب شده و در بین دو گروه پخش شدند. دو گروه آزمایشی شامل موش هایی هستند که عصاره دریافت کرده اند(CE) و موش هایی که عصاره دریافت نکرده اند(C) و به عنوان کنترل مورد مقایسه قرار می گیرند. در این تحقیق جهت استخراج عصاره گیاه اسطوخدوس روش دستی عصاره گیری آبی به کار گرفته شد و از روش تزریق درون صفاقی گیاه جهت بررسی اثر آن استفاده شد. حیوانات گروه کنترل نیز آب مقطر را از طریق جراحی دریافت نمودند.(11)

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین از نمونه هیپوکامپ موش های کنترل و موش هایی که عصاره دریافت کرده بودند صورت گرفت. ابتدا بافت هیپوکامپ دوبار با PBS شستشو داده شد سپس به آن ها بافر سرد تریس 20 میلی مولار با pH=7/5 اضافه شد. این بافر حاوی 2 میلی مولار اتیلن دی آمین ترا استات، 1میلی مولار

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

فنیل متیل سول فونیل فلوراید، 2/32 مولار سوکروز به همراه مخلوطی از آنتی پروتئازها شامل(10 میلی مولار N - اتیل مالمید، 2 میلی مولار ایدواستات، 25 میلی مولار بنز آمیدین، 12/5 میلی مولار 6-آمینوکاپروئیک اسید) است. سلول ها در درجه حرارت پائین به کمک دستگاه هموژنیزر همگن گردیدند. مخلوط هموژنیزه شده به مدت 10 دقیقه در دمای 10 درجه سانتیگراد در g 12000 سانتریفیوژ شد. مایع روئی حاصله جهت تعیین غلظت مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پروتئین های دو گروه آزمایشی به روش برادفورد،(12)، مورد سنجش قرار گرفت.

الکتروفورز دوبعدی

در بعد اول، در دستگاه IEF (Iso Electric Focusing)، از نوارهای ژلی IPG (Imobilized PH Gradiant) در محدوده pH 3 تا 10 استفاده شد و پروتئین ها درون دستگاه IPG بسته به pH ایزوالکتریک خود روی نوار استریپ تفکیک شدند.

بعد دوم شامل ژل پلی آکریل آمید با غلظت 12 درصد حاوی 15 میلی لیتر از محلول ذخیره 30 درصد (اکریل آمید به علاوه بیس آکریل آمید با نسبت 29/2 درصد به 0/8 درصد)، 18/76 میلی لیتر آب دیونیزه و 11/25 میلی لیتر بافر تریس به همراه 30 میکرولیتر TEMED و 30 میکرولیتر آمونیم پرسولفات است. بافر الکتروفورز(Running buffer) به تانک های بالا و پائین افزوده می‌شود. این بافر شامل 0/025 مولار تریس-اسید کلریدریک(یا باز)، 0/192 مولار گلایسین و 0/1 درصد SDS می‌باشد. در نهایت پس از برقراری جریان، الکتروفورز در جریان ثابت 30 الی 40 میلی آمپر برای هر پلیت و با استفاده از سیستم خنک کننده در دمای 9 درجه سانتیگراد انجام گردید. رنگ آمیزی پروتئین ها به روش رنگ آمیزی نیترات نقره انجام شد و ژل ها اسکن و تصاویر پردازش شد و در نهایت با روش های بیو انفورماتیکی و نرم افزار های آماری مورد آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری قرار گرفت.(13)

آنالیز تصویر ژل های دوبعدی

الکتروفورز دوبعدی قادر است صدها پلی پپتید را از یک محلول پروتیئنی بر اساس بار الکتریکی و وزن مولکولی آن ها جدا کند. پس از طی مراحل رنگ آمیزی، پروتئین ها به صورت لکه هایی با صفات و ویژگی های ظاهری متفاوت مانند شکل، اندازه و شدت رنگ نمایان می گردند. پس از اسکن ژل، استخراج داده های مربوط به نمونه بافت هیپوکامپ موش های دو گروه با نرم افزار Progenesis Same Non Linear Spot مورد بررسی قرار گرفت. تعداد نقاط پروتئینی و تفاوت آن ها(افزایش و یا کاهش بیان) توسط این نرم افزار آنالیز شد و با آمار چند متغیره(خوشه بندی و آنالیز مولفه اصلی) پروتئین ها از نظر بیان خوشه بندی شدند.

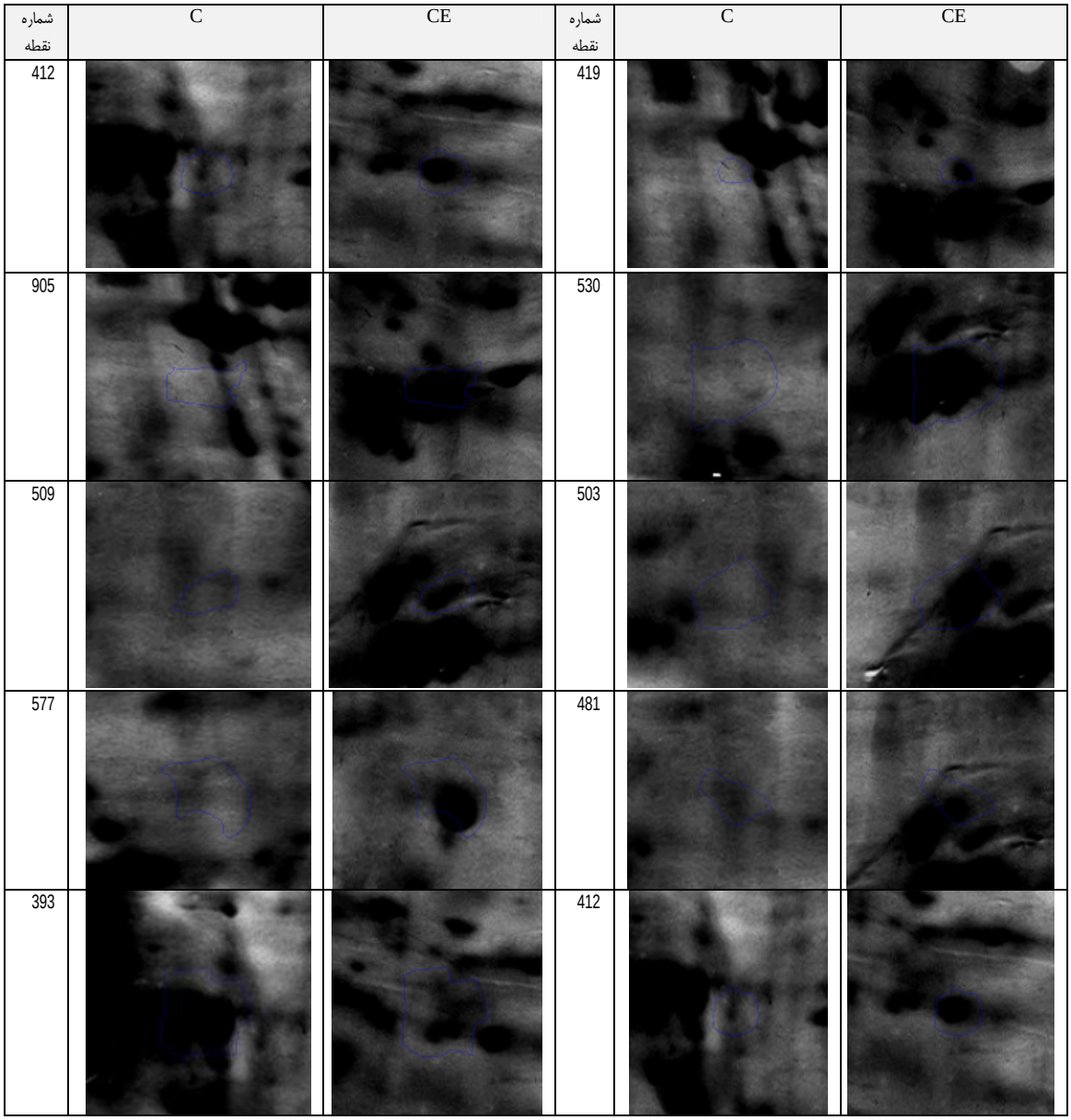
یافته های پژوهش

خواص دارویی و درمانی عصاره آبی سرشاخه های گیاه اسطوخودوس بر روی هیپوکامپ موش صحرایی با کمک تکنیک پروتئومیکس مورد بررسی قرار گرفت. دو گروه آزمایشی شامل موش هایی که عصاره دریافت کرده اند(CE) و موش هایی که عصاره دریافت نکرده اند(C) و گروه کنترل هستند مورد آنالیز پروتئومیکی قرار گرفتند. آنالیز ژل ها با کمک نرم افزار Progenesis 990 نقطه پروتئینی را مشخص کرد که تعدادی از آن ها دارای افزایش بیان و تعدادی دارای کاهش بیان بودند. در گروهی که تحت تاثیر عصاره بودند 80 بیان جدید از پروتئین تعیین شد در حالی که عصاره باعث خاموشی یا عدم بیان 140 پروتئینی شده است که در گروه کنترل بیان شده بودند. در شکل شماره 1، تصویر بخش هایی از ژل الکتروفورز دو بعدی از هیپوکامپ موش صحرایی در دو گروه را نشان می دهد. مقایسه بین دو گروه در بسیاری از جایگاه، تفاوت بیان در نقاط مشاهده شد که در شکل شماره 1 تعدادی از آن ها انتخاب شده و به نمایش گذاشته شده است. تفاوت معنی داری($P<0.05$) بیان در بین دو گروه با آنالیز آماری ANOVA تعیین گردید و میزان تغییر بیان برای هر نقطه در شکل، Fold>2 در نظر گرفته شده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

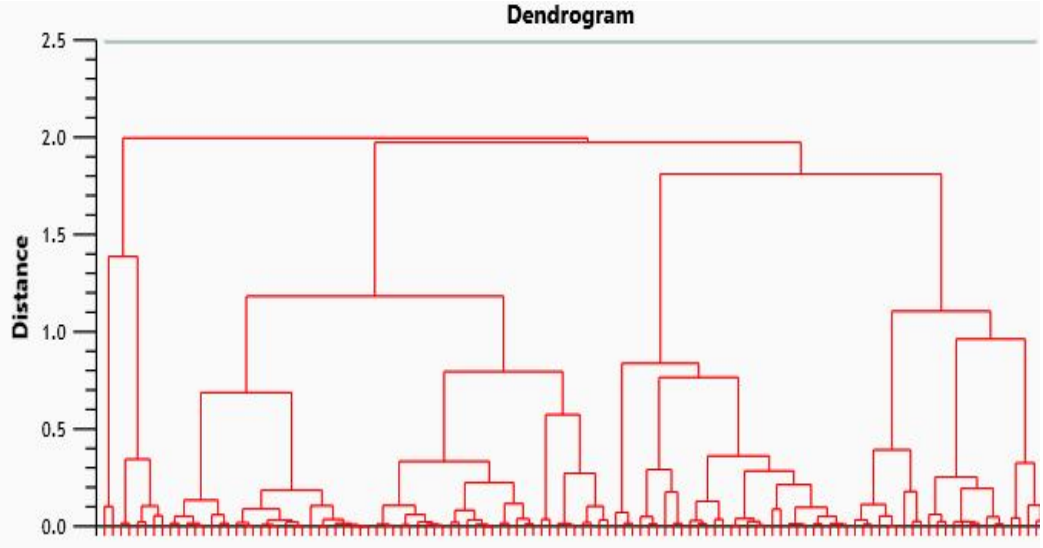
نرم افزار progenesis same spot خوشه بندی پروتئین ها بر اساس میزان بیان آن ها را مورد آنالیز قرار می دهد، به طوری که پروتئین هایی که در یک خوشه دسته بندی می شوند، دارای بیان مشابهی باشند؛ بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در سلول های مورد نظر دارند(با هم افزایش و یا کاهش می یابند) که نتایج حاصل از این آنالیز خوشه بندی، در شکل شماره 2 مشاهده می شود. شکل شماره 2 الف خوشه بندی پروتئین های کنترل(C) و شکل شماره 2 ب خوشه بندی پروتئین های گروهی که تحت تاثیر عصاره بوده اند(CE) را نشان می دهند هر دو گروه دارای 3 خوشه اصلی هستند.

شکل شماره 3 آنالیز آماری چند متغیره دیگری به نام آنالیز مولفه اصلی را نشان می دهد که برای تایید آنالیز خوشه بندی صورت می گیرد. شکل شماره 3 الف آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های گروه کنترل(C) و شکل شماره 3 ب آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های گروه تحت عصاره(CE) را نشان می دهند.

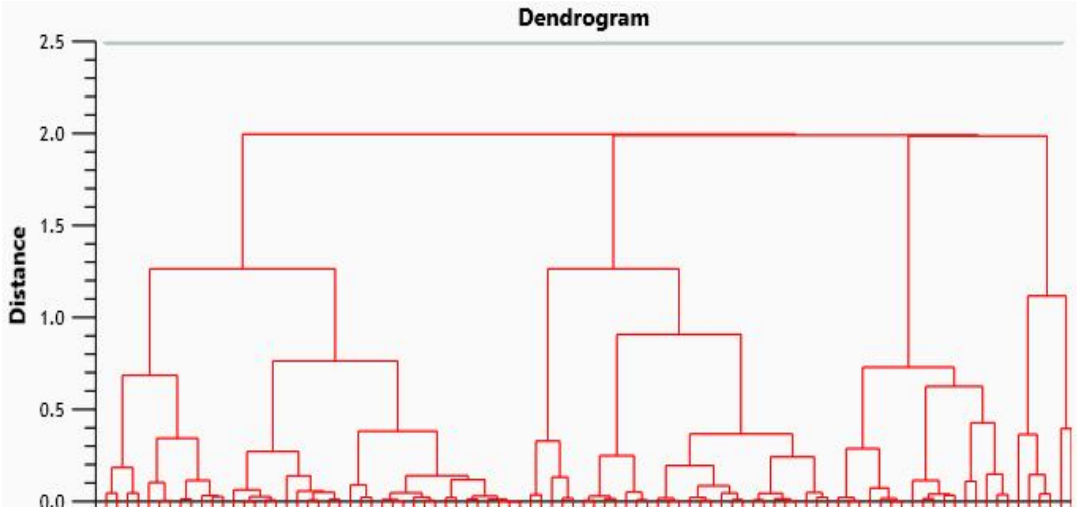


شکل شماره 1. جایگاه تعدادی از نقاط که دارای تفاوت معنی داری بیانی در بین دو گروه هستند

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

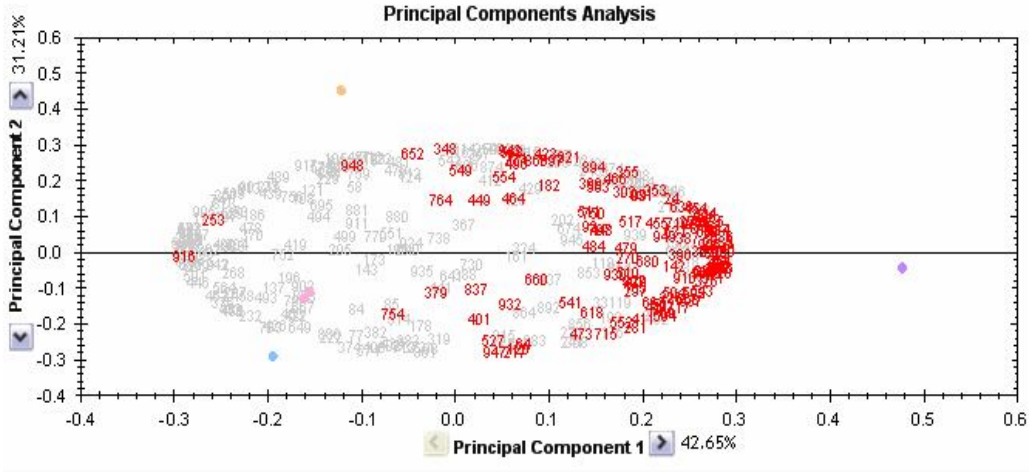


شکل شماره 2- الف. خوشه بندی پروتئین های گروه کنترل(C)

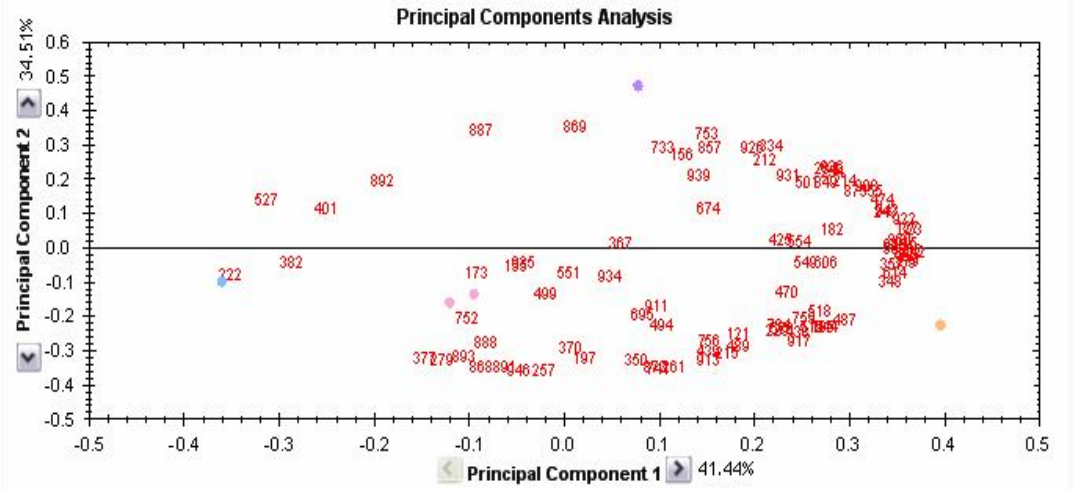


شکل شماره2- ب. خوشه بندی پروتئین های گروه تحت تاثیر عصاره(CE)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]



شکل شماره 3 –الف. آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های کنترل(C).
اعداد قرمز رنگ بیانگر نقاط پروتئینی هستند که در گروه C بیان شده اند.



شکل شماره 3 –ب. آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های گروهی که عصاره دریافت کرده اند(CE).
اعداد قرمز رنگ بیانگر نقاط پروتئینی هستند که در گروه CE بیان شده اند.

بحث و نتیجه گیری

امروزه گرایش به یافتن داروهای گیاهی برای بسیاری از بیماری ها توجه جهانیان را به خود جلب نموده است زیرا بسیاری از آن ها اثربخشی بیشتر و عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند،(4). در سال های اخیر گیاهانی با خواص درمانی بالا از جمله علف چای(Hypericum) و اسطوخدوس (Lavender) جهت درمان افسردگی، اضطراب و بی خوابی معرفی شده اند،(۴،۸). در این تحقیق اثر عصاره آبی سرشاخه های گیاه اسطوخدوس بر فرایند یادگیری و آموختن در مغز موش های صحرایی نر بالغ از طریق آنالیزهای پروتئومیکی مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات بیان در سطح پروتئوم با کمک تکنیک ژل الکتروفورز دو بعدی مورد آنالیز پروتئومیکی قرار گرفت. امروزه استفاده از نرم افزارهای آنالیز ژل کمک بیوانفورماتیک را در ساده نمودن آنالیز داده های پروتئومیکی امری اجتناب ناپذیر نموده است. پیشرفت هایی که در سطح نرم افزاری صورت گرفته است آنالیزهای آماری چند متغیره را در داده های چندبعدی پروتئومیکی تسهیل نموده است. در این مطالعه ژل های الکتروفورز دو بعدی با استفاده از نرم افزار progenesis same spot مورد آنالیز قرار گرفتند که نتایج تعدادی از تفاوت های بیانی بین نقاط

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

در سطح ژل ها در بررسی و مقایسه دو گروه، در شکل شماره 1 نشان داده شده است. نتایج آنالیز پروتئوم نشان داد که 990 نقطه پروتئینی در دو گروه آشکار شده است که مقایسه بین کنترل و گروه تحت عصاره در سطح بیان پروتینی حکایت از بیان 80 نقطه پروتئینی جدید است در حالی که حضور عصاره در هیپوکامپ باعث مهار بیان پروتئینی نیز شده است و 140 پروتئین بیانشان خاموش شده است. این نتیجه بیانگر این است که عصاره باعث مهار بسیاری از ژن ها در هیپوکامپ می شود و از طرفی ژن هایی که دارای اثر مفیدی در فرآیند یادگیری و آموختن هستند بیان می شوند. بنا بر این می توان گفت همه اثرات مفید گیاه اسطوخودوس که در سطح رفتاری باعث بهبود فرایند یادگیری و آموختن در موش ها می گردد و یا اثرات درمانی گیاه روی افسردگی و اضطراب هم چنین اثر ضد التهابی،(5-3)، آن در سطح ملکولی، به حضور این پروتئین های جدید است. مطالعات پیشین اثر ضدالتهابی گیاه را به اثر مهارکنندگی آن بر روی آنزیم استیل کولین استراز نسبت داده اند.(5)

نرم افزار progenesis same spot با استفاده از روش آنالیز همبستگی، خوشه بندی پروتئین ها بر اساس میزان بیان آن ها را مورد آنالیز قرار می دهد، به طوری که پروتئین هایی که در یک خوشه دسته بندی می شوند، دارای بیان مشابهی می باشند؛ بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در حالت سلولی مورد نظر دارند(با هم، افزایش و یا کاهش می یابند). در شکل شماره 2 الف و ب آنالیز خوشه بندی، پروتئین ها را از نظر بیان به 3 خوشه اصلی تقسیم نموده است. خوشه سمت چپ دسته پروتئینی را نشان می دهد که دارای بیان بیشتری در گروه کنترل نسبت به گروه تحت اثر عصاره بوده اند و خوشه میانی به همان نسبت که به سمت راست می رود تغییر می یابد به طوری که در خوشه آخر در سمت راست تغییر بیان در گروه تحت اثر عصاره بیشتر از گروه کنترل است. ابزارهای بسیاری برای تحلیل مجموعه های پروتئین ها وجود دارند، اما اغلب آن ها نتایج حاصله را در یک تصویر ساده و شفاف و قابل تفسیر ارائه نمی دهند. PANDORA ابزاری است که مجموعه ای از پروتئین ها را با توجه به تفاسیر مشترک آن ها خوشه بندی و نتایج را به صورت یک نمودار نمایش می دهد. هونگ بین شن و همکاران در سال 2005 از روش جدید خوشه بندی فازی با سرپرست، برای پیش بینی کلاس های ساختاری پروتئین ها استفاده نمودند. بر اساس این روش در مرحله آموزش، اطلاعات مربوط به کلاس های ساختاری پروتئین ها مورد استفاده قرار گرفت،(14). پوپسکو و همکاران در سال 2004 به منظور یافتن عبارت هایی که بتوانند در خوشه بندی بر اساس تشابهات هستی شناسی ژنی نمایندگان خوبی برای خوشه ها باشند از روش خوشه بندی و BLAST سلسله مراتبی و اندازه مشابهت های حاصل از اندازه مشابهت فازی استفاده نمودند،(15). هوگو و همکاران در سال 2006 به منظور بررسی کارایی خوشه بندی پروتئین ها در تسریع مطالعه آن ها، پروتئین ها را به کمک اندازه مشابهت های حاصل از BLAST خوشه بندی نمودند. پس از بررسی خوشه ها از لحاظ هستی شناسی ژنی، نتیجه گیری شد که مرکز هر خوشه می تواند اطلاعات پروتئین های خوشه را در برگیرد،(16). کریستین اواسکا و همکاران در سال 2008 با اندازه گیری مشابهت های بین عبارات هستی شناسی ژنی و اجرای روش خوشه بندی سلسله مراتبی، توانستند روشی ارائه دهند که در شناسایی سریع ژن هایی که دارای عبارات GO مشترک هستند کمک نماید،(17). هدف از خوشه بندی در این تحقیق بررسی خوشه بندی بر اساس میزان بیان بود. خوشه بندی بر اساس بیان، نشان دهنده وجود پروتئین هایی است که می توانند وابستگی بیولوژیک نسبت به هم داشته باشند، به طوری که افزایش بیان هم زمان چندین پروتئین باید در جبران کاهش بیان یا عدم بیان پروتئین های دیگر باشد. در واقع، این عمل یک مکانیسم برقراری هموستازی سلولی است که با خاموشی یک فرایند، فرایند جدیدی جایگزین آن شده و شروع به بیان یا افزایش بیان پروتئین های جدیدی می کند که این پروتئین ها می توانند از نظر ساختاری یا عملکردی به هم وابسته باشند و دارای عملکردی باشند که حاصل اینترکشن آن ها است. مطالعات پیشین نیز که با کمک این نرم افزار به آنالیز ژل های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

دو بعدی پرداخته اند نیز نتایج مشابهی را نشان می دهند و بیان می کنند که پروفایل بیانی مشابه اعضای یک خوشه دارای تفسیر بیولوژیکی منطقی است.(18)

آنالیز آماری چند متغیره دیگری به نام آنالیز مولفه اصلی(PCA) برای تایید آنالیز خوشه بندی توسط نرم افزار انجام می شود که در شکل شماره 3 الف و ب نشان داده شده است. آنالیز ترکیبی اصلی جهت تولید ساده ترین نمایش گرافیکی از داده های چند بعدی است. هر دو شکل جایگاه پروتئین های هر دو گروه را نشان می دهد و بیانگر این است اکثر پروتئین ها متمایل به یک سمت هستند و خوشه های مشترک زیادی با هم دارند. از طرفی PCA بیانگر این است که هیچ outlier در داده وجود ندارد و داده بر طبق شرایط آزمایش خوشه بندی شده است. PCA کاربردهای زیادی در داده های چند بعدی پروتئومیکی دارد. نتایج آنالیز PCA پراکندکی اعضا هر خوشه در اطراف یک بردار را نشان می دهد و بیانگر این است که نقاط نزدیک به یکدیگر متعلق به یک کلاس هستند که در پروتئومیکس تنوع را در بین مجموعه داده می تواند دسته بندی کند و اعضاء هر دسته را نیز مشخص نماید. از طرفی اگر گونه های متفاوتی از داده مورد استفاده قرار گیرد می تواند خوشه های هر گونه را نیز مشخص نماید و نشان دهد که همه نمونه های یک گونه در اطراف یک بردار واضح قرار می گیرند و همه خوشه ها به هم نزدیک هستند. در مطالعه پروتئومیکی دیگری نیز از PCA جهت ارزیابی مجموعه داده استفاده شده بود، همه نمونه های N.meningitidis به طور واضحی در اطراف یک بردار قرار گرفتند و نمونه هایی که توسط خوشه بندی به روش شبکه عصبی مصنوعی خوشه بندی نشده بودند و در کلاس ها قرار نگرفته بودند در فاصله ای از آن ها که خوشه بندی شده بودند قرار گرفتند و نشان می داد که با توجه به ماهیت داده ها که از دو گونه متفاوت بوده است PCA می تواند خوشه های تشکیل شده از روش های مختلف خوشه بندی را مورد ارزیابی قرار دهد و outliers موجود در مجموعه داده را تعیین نماید.(19)

از PCA سه بعدی در تصاویر الگوهای پروتئومیکی جهت شناسایی کلاس نمونه های موجود در یک مجموعه داده استفاده می شود. در یک گروه تحقیقاتی روش پیشرفته تری جهت دو مجموعه داده مختلف به کار گرفته شد. مجموعه داده ای متشکل از 5 نمونه از سرم موش سالم و 5 نمونه سرم موش هایی که نیکوتین دریافت کرده بودند. مجموعه داده دوم شامل داده های 4 نمونه غده لنفاوی سالم و 4 نمونه غده لنفاوی مبتلا به لنفومای غیر هوجکینی بودند. با کمک این روش موفق به شناسایی کلاس های نمونه های موجود در هر دو گروه ژل دو بعدی شدند و اجازه داد تا نواحی از نقشه های دو بعدی مسئول تفاوت های موجود در بین کلاس ها برای هر دو مجموعه داده سرم موشی و لنفومای انسانی مورد شناسایی قرار گیرد.(20)

به طور کلی با انجام این مطالعه می توان این نتیجه را گرفت که تفاوت معنی داری در بیان ژن بین دو گروه کنترل و گروهی که تحت تاثیر عصاره آبی اسطوخودوس بوده اند وجود دارد و این تغییرات در سطح ملکولی با کاهش و افزایش بیان پروتئین ها و حضور یا ناپدید شدن پروتئین ها خود را نشان می دهد. این تغییرات را در سطح ملکولی با آنالیزهای آماری چند متغییره ای نظیر کلاسترینگ یا آنالیز همبستگی و آنالیز مولفه اصلی به خوبی آشکار گردید و گروه های پروتئینی که دارای تغییر بیان بودند خود را نشان دادند که برای شناسایی مکانیسم ملکولی اثر عصاره نیاز به مشخص شدن نوع پروتئین ها است که باید توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری جرمی تعیین هویت شوند.

سپاسگزاری

این مطالعه برگرفته از پایان نامه PhD حکیمه زالی است و حاصل طرح تحقیقاتی با کد 1391-1-159-8981 است که توسط کمیته پژوهشی دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب گردیده است. از مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در اجرای پروژه همکاری داشتند تشکر می گردد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

References

1-Masoumi M, editor. Principles and application of phytotherapy. First ed. Taymourzadeh Press; 2010.
2-Amin G. The most common of Iranian traditional medicinal plants. Tehran University of Medical Science and Ethics and History of Medicine Research Center, 2008.
3-Ballard CG, Gauthier S, Cummings JL, Brodaty H, Grossberg GT, Robert P, et al. Management of agitation and aggression associated with Alzheimer disease. Nat Rev Neurol 2009;5:245-55.
4-Adsersen A, Gauguin B, Gudiksen L, Jäger AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. J Ethnopharmacol 2006;104: 418-22.
5-Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of Lavandula angustifolia Mill. J Ethnopharmacol 2003;89:67-71.
6-Cavanagh HM, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. Phytother Res 2002;16:301-8.
7-Lewith GT, Godfrey AD, Prescott P. A single-blinded, randomized pilot study evaluating the aroma of Lavandula augustifolia as a treatment for mild insomnia. J Altern Complement Med 2005;11:631-7.
8-Basch E, Foppa I, Liebowitz R, Nelson J, Smith M, Sollars D, et al. Lavender (Lavandula angustifolia Miller). J Herb Pharmacother 2004;4:63-78.
9-Umezu T, Nagano K, Ito H, Kosakai K, Sakaniwa M, Morita M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. Pharmacol Biochem Behav 2006;85:713-21.
10-Kashani MS, Tavirani MR, Talaei SA, Salami M. Aqueous extract of lavender (Lavandula angustifolia) improves the spatial performance of a rat model of Alzheimer's disease. Neurosci Bull 2011;27:99-106.
11-Leussis MP, Andersen SL. Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model. Synapse 2008;62:22-30.
12-Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the princil of protein. Anal Biochem 1976;72:248-54.
13-Moravej FH, Zali H, Rezaei-Tavirani M, Toossi P. Proteomic Analysis of Gene Expression in Basal Cell Carcinoma. Iranian J Dermatol 2010;13:1-2.
14-Shen HB, Yang J, Liu XJ, Chou KC. Using supervised fuzzy clustering to predict protein structural classes. Biochem Biophys Res Commun 2005;334:577-81.
15-Popescu M, Keller JM, Mitchell JA, Bezdek JC. Functional summarization of gene product clusters using Gene Ontology similarity measures. Intellig Sen, Sen Net Info Proc Confer 2004;553-8.
16-Bastos H, Faria D, Pesquita C, Falcão AO. Using GO terms to evaluate protein clustering. In ISMB/ECCB 2007 SIG Meeting Program Materials, 107-110.24, 35,37,39.
17-Ovaska K, Laakso M, Hautaniemi S. Fast gene ontology based clustering for microarray experiments. BioData Min 2008;1:11.
18-Brioschi M, Polvani G, Fratto P, Parolari A, Agostoni P, Tremoli E, et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified myocardial proteins in human heart failure: implications for protein function. PLoS One 2012;7:e35841.
19-Lancashire L, Schmid O, Shah H, Ball G. Classification of bacterial species from proteomic data using combinatorial approaches incorporating artificial neural networks, cluster analysis and principal components analysis. Bioinformatics 2005;21: 2191-9.
20-Marengo E, Leardi R, Robotti E, Righetti PG, Antonucci F, Cecconi D. Application of three-way principal component analysis to the evaluation of two-dimensional maps in proteomics. J Proteome Res 2003;2:351-60.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

Proteomic Study of Rat Hippocampus in Treatment of Lavandula Aqua Extract

Zali H[1,2], Rezaei Tavirani M[3], Pakzad I[4]*

(Received: 24 Oct. 2012 Accepted: 28 Jan. 2013)

Abstract

Introduction: For decreasing of stress and its sequlae, researchers suggest different ways that one of them is using of medicinal plants. The medicinal plant, lavandula, has been shown to enhance learning and to decrease stress. In this study the molecular effects of lavandula aqueous extracts was explored in rat by using of proteomics techniques.

Materials & Methods: Proteins extracted from the hippocampus of two groups of rats; the control group and the group treated with lavandula aqueous extracts. At first dimension, the proteins were separated on electrophpresis strip according to their isoelectric pH (IEF). At second dimension, the proteins were separated on SDS page electrophoresis based on their molecular weight. For detecting protein spots, both gels were silver stained. Finally for bioinformatics and statistical analysis (cluster analysis and principal component analysis) of proteins was studied with the progenesis same spot software.

Findings: In the research, 990 protein spots were obtained from both experimental groups. Comparisons between groups suggested a new expression of 80 protein spots were affected in the rats treated with extracts whereas presence of extract cause protein expression inhibition of 140 proteins in the hippocampus. Clustering analysis divided proteins into three main clusters demonstrating the pattern of expressions of the proteins is the same in the clusters that may have similar performance and signaling pathway. Principle component analysis (PCA) analysis confirmed the results of clustering and showed the proteins have been classified in accordance with the test conditions.

Discussion & Conclusion: It can be concluded that lavendula extract caused significantly expression changes in the proteome and possibly activated a biological process in rat hippocampus that is associated with enhanced learning.

Keywords: Lavender, Proteome, Hippocampus, Rat, Clustering, Principal component analysis

1. Students' Research Committee, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(correspondence author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]