خوشه بندی بیانی پروتئین های هیپوکامپ موش صحرایی سالم و آلزایمر در حضور عصاره آبی اسطوخودوس

حکیمه زالی[۱]، مسعود سهیلی کاشانی[۱]، رضا وفایی[۲*]، لیلی رستم نیا [۳]

۱) دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۲) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۳) گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۹

چکیده

مقدمه: یکی از میان برهای کشف هدف های دارویی بهره گیری از دانش های جدیدی علوم پایه پزشکی نظیر ژنومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکس، آمار زیستی و بیوانفورماتیک می باشد که به صورت جامع نگر به مطالعه مباحث بیولوژیک و پزشکی می پردازد. در این مطالعه با کمک دانش پروتئومیکس و استفاده از بیوانفورماتیک و آمار زیستی به شناسایی هدف های پروتئینی دارویی برای درمان آلزایمر پرداخته می شود. پروتئوم هیپوکامپ موش های آلزایمری و سالمی که تحت تاثیر عصاره آبی گیاه اسطخودوس قرار گرفته اند مورد خوشه بندی از نظر میزان بیان قرار می گیرند.

مواد و روش ها: استخراج پروتئین از نمونه مغز موش سالم(C) : استخراج پروتئین از نمونه مغز موش سالم(C) و آلزایمری(A) که عصاره دریافت نکرده اند و سالم(CE) و آلزایمری(AE) که تحت انکوباسیون با عصاره بوده اند صورت گرفت و با استفاده از الکتروفورز دوبعدی جداسازی پروتئین ها انجام شد. سپس ژل ها جهت رویت لکه های پروتئینی به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد. پروتئین های چهار گروه با نرم افزار بیوانفورماتیکی مورد آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری قرار گرفت

یافته های پژوهش: آنالیز بیوانفورتیکی و آماری ژل های به دست آمده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی نشان داد که ۹۹۰ نقطه پروتئینی در چهار گروه مشاهده شد مقایسه پروتئوم A و AE، ۴۹ پروتئین در گروه A وجود داشت که در گروه AE بیانی نداشتند در حالی که ۲۶ نقطه در گروه AE وجود دارد که دارای بیان جدید هستند و ناشی از اثر عصاره است. مقایسه پروتئوم دو گروه C و CE نشان داد که حضور عصاره باعث بیان ۸۰ پروتئین جدید و خاموشی ۱۰۴ پروتئین شده است

بحث و نتیجه گیری: بعد از حذف پروتئین های مشترک بین دو گروهی که تحت تاثیر عصاره بودند پروتئین هایی که در واقع نقش کاندید دارویی برای درمان آلزایمر هستند مشخص شد. تغییرات در سطح ملکولی با آنالیزهای آماری چند متغیره ای نظیر کلاسترینگ یا آنالیز همبستگی و آنالیز مولفه اصلی به خوبی آشکار گردید و گروه های پروتئینی که دارای تغییر بیان بودند در ۳ خوشه اصلی معرفی گردید. 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 و حافظه در موش سالم و آلزایمری می گردد.

واژه های کلیدی: **بیماری** آلزایمر، اسطوخودوس، پروتئوم، هیپوکامپ، موش های صحرایی، خوشه بندی

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

Email: Vafaeereza@gmail.com

مقدمه

جمعیت جهان به سمت پیر شدن قدم بر می دارد و جامعه پزشکی با چالش ها و پیچیدگی های جدید تشخیص و درمان بیماری های مرتبط با پیری مواجه است. یکی از این بیماری ها آلزایمر است که یک بیماری تحلیل برنده و پیش رونده قوای عقلانی سیستم عصبی مرکزی انسان است،(۱). بر اساس آخرین گزارش انجمن جهانی آلزایمر بیش از ۳۵ میلیون نفر در جهان به آلزایمر مبتلا هستند و در جامعه ایرانی حدود ۶۰۰ هزار نفر با این بیماری مواجه هستند،(۲). با توجه به این که جامعه جوان ایرانی در آینده با رعایت شاخص های بهداشتی به یک جامعه پیر مبدل خواهد شد و میزان ابتلا به آلزایمر بستگی مستقیم با پیری دارد انجام مطالعات گسترده در درمان آلزایمر امری ضروری به نظر می رسد. نظر به این که داروهای ضد التهابی به عنوان داروهای تاخیر انداز آلزایمر پذیرفته شده اند اما بیشتر نتایج تحقیقات کلینیکی در مورد این تاثیر منفی بوده است بنا بر این با توجه به اثرات جانبی زیاد و محدودیت در مصرف این داروها، کشف داروهایی موثر جهت درمان و یا بهبود عوارض آلزایمر دشوار است،(۳). مکمل های درمانی(داروهای غیرشیمیائی) مورد توجه در بهبود آلزایمر شامل داروهای گیاهی، درمان با رایحه های مطبوع و ماساژ، درمان با موسیقی، طب سوزنی، مکمل های غذائی و ملاتوئین و درمان با نور شدید می باشند،(۴،۵). درمان گیاهی یعنی استفاده از گیاهان در بهبود استمرار وضعیت سلامت، در حال حاضر سعی می شود که با دید عملی بیشتر به این بخش پرداخته شود و تولیدات گیاهان داروئی دارای استاندارد شوند و هر قرص متشکل از مقدار مشخصی از ترکیبات موثر باشد. به همین جهت نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه می باشد.(۶)

اسطوخودوس گیاهی است دائمی با بوته ای به ارتفاع تا حدود یک متر و ساقه هایی چهارگوش که در قسمت های پایین، چوبی می شوند. برگ های این گیاه باریک و نوک تیز بوده و به طور متقابل بر روی ساقه قرار می گیرند. 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. موارد استعمال در پزشکی سنتی به عنوان آرام بخش و ضد دردهای عصبی، افسردگی و اضطراب مشخص شده است و عصاره آن به عنوان یک ضد التهاب که دارای اثر مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز است مورد توجه در درمان آلزایمر است.(۷-۹)

یکی از میان برهای کشف هدف های دارویی بهره گیری از دانش های جدید علوم پایه پزشکی نظیر ژنومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکس، آمار زیستی و بیوانفورماتیک می باشد که به صورت جامع نگر به مطالعه مباحث بیولوژیک و پزشکی می پردازد. در این مطالعه با کمک دانش پروتئومیکس و استفاده از آمار زیستی و بیوانفورماتیک به شناسایی هدف های پروتئینی دارویی برای درمان آلزایمر پرداخته شده است. پروتئوم مغز موش های آلزایمری و سالمی که تحت تاثیر عصاره آبی گیاه اسطوخودوس قرار گرفته اند مورد خوشه بندی از نظر میزان بیان قرار گرفتند. خوشه بندی بر اساس بیان، نشان دهنده وجود پروتئین هایی است که می توانند وابستگی بیولوژیک نسبت به هم داشته باشند.(۱۰)

مواد و روش ها

موش های صحرایی نر بالغ ۲۸۰-۲۲۰ گرمی به صورت تصادفی انتخاب شده و در بین چهار گروه پخش شدند. چهار گروه آزمایشی شامل موش های سالمی که عصاره دریافت کرده اند(CE) و موش های سالمی که عصاره دریافت نکرده اند(C) و به عنوان کنترل سالم مورد مقایسه قرار می گیرند. از گروه موش های آلزایمری، موش هایی که عصاره دریافت کرده اند(AE) و موش های آلزایمری که عصاره دریافت نکرده اند(A) و به عنوان کنترل آلزایمری مورد مقایسه قرار می گیرند. در این تحقیق جهت استخراج عصاره گیاه اسطوخودوس 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.(۱۰)

جهت القاء آلزایمر در حیوانات، از تزریق ۱۰ میکروگرم آمیلوئید بتا به صورت محلول در ۲ میکرولیتر

آب مقطر درون بطن مغز استفاده شد. بدین صورت که پس از انجام جراحی و ایجاد سوراخ روی جمجمه توسط متـه مخصوص، به وسیله سرنگ همیلتون آمیلوئید بتا درون بطن مغز تزریق شده و پس از مسدود کردن سوراخ، به وسیله نخ بخیه جذبی بخیه شد. بعد از ۲۲ روز، جهت اطمینان از تشکیل پلاک، مغز حیوان را خارج شد، مراحل فیکس کردن، تهیه برش و رنگ آمیزی مخصوص پلاک انجام شد و زیر میکروسکوپ مشاهده شد که پلاک آمیلوئیدی تشکیل شده باشد.(تایید بافتی)(۱۱)

استخراج پروتئین از نمونه هیپوکامپ موش هایی که تحت انکوباسیون با عصاره بوده اند و آن هایی که تحت تاثیر نبوده اند صورت گرفت. آن ها را دوبار با PBS شستشو داده شد سپس به آن ها بافر سرد تریس ۲۰ میلی مولار با pH=7.5 اضافه شد. این بافر حاوی ۲ میلی مولار اتیلن دی آمین تترا استات ۱، ۱ میلی مولار فنیل متیل سول فونیل فلوراید ۲، ۰/۳۲ مولار سوکروز به همراه مخلوطی از آنتی پروتئازها شامل(۱۰ میلی مولار N – اتیل مالمید، ۲ میلی مولار ایدواستات، ۲۵ میلی مولار بنز آمیدین، ۱۲/۵ میلی مولار ۶– آمینوکاپروئیک اسید)است. سلول ها در درجه حرارت پائین به کمک دستگاه هموژنیزر همگون گردید. مخلوط هموژنیزه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد در g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع روئی حاصله جهت تعیین غلظت مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پروتئین های چهار گروه آزمایشی به روش براد فورد مورد سنجش قرار گرفت.(۱۱)

الکتروفورز دوبعدی

در بعد اول، IEF (Iso Electric Focusing)، از نوارهای ژلی IPG (Imobilized PH Gradiant) در رنج PH ۳ تا ۱۰ استفاده شد و پروتئین ها درون دستگاه IPG بسته به PH ایزوالکتریک خود روی استریپ تفکیک شدند.

بعد دوم شامل ژل پلی آکریل آمید با غلظت ۱۲ درصد حاوی ۱۵ میلی لیتر از محلول ذخیره ۳۰ درصد(اکریل آمید به علاوه بیس آکریل آمید با نسبت ۲۹/۲ درصد به ۰/۸ درصد)، ۱۸/۷۶ میلی لیتر آب دی یونیزه و ۱۱/۲۵ میلی لیتر بافر تریس و همراه ۳۰ میکرولیترTEMED و ۳۰ میکرولیتر آمونیم پرسولفات است. بافر الکتروفورز(Running buffer) به تانک های بالا و پائین افزوده می‌شود. این بافر شامل ۰/۰۲۵ مولار تریس– اسید کلرئیدریک(یا باز)، ۰/۱۹۲ مولار گلایسین و ۰/۱ درصد SDS می باشد. در نهایت پس از برقراری جریان، الکتروفورز در جریان ثابت ۳۰ الی ۴۰ میلی آمپر برای هر پلیت و با استفاده از سیستم خنک کننده در دمای ۹ 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 بیوانفورماتیکی و نرم افزار های آماری مورد آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری قرار گرفت.(۱۲)

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 چهار گروه با نرم افزار Non Progenesis Same Spot Linear مورد بررسی قرار گرفت.

روش های تجزیه و تحلیل داده ها

داده های حاصل از تکنیک ژل الکتروفورز دو بعدی با آمار چند متغیره مورد آنالیز قرار گرفت و از روش های آماری ANOVA ، کلاسترینگ و آنالیز مولفه اصلی استفاده شد. در این پژوهش آنالیز آماری مورد استفاده روش خوشه بندی است که پروتئین ها، بر اساس میزان بیان بین چهار گروه سالم و آلزایمری بدون حضور عصاره و تحت انکوباسیون با عصاره جهت تعیین هدف های درمانی مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته های پژوهش

خواص دارویی و درمانی عصاره آبی سرشاخه های گیاه اسطوخودوس بر روی هیپوکامپ موش صحرایی سالم و آلزایمری با کمک تکنیک پروتئومیکس مورد بررسی قرار گرفت. چهار گروه

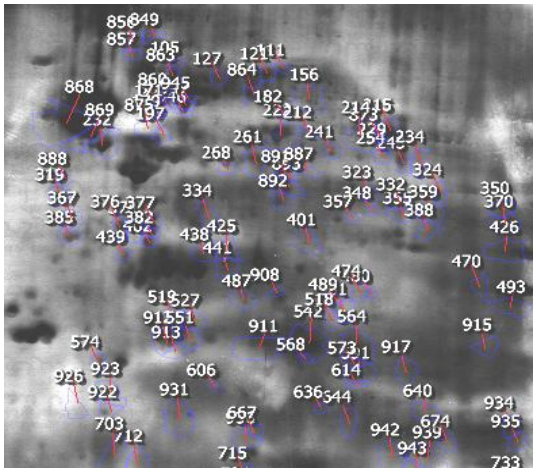
آزمایشی شامل موش هایی سالم(CE) و آلزایمری (AE) هستند که عصاره دریافت کرده اند و موش های سالم(C) و آلزایمری(A) که عصاره دریافت نکرده اند و به عنوان کنترل مورد مقایسه قرار می گیرند. استخراج پروتئین از هیپوکامپ موش ها در چهار گروه انجام شد و با کمک الکتروفورز دو بعدی پروتئین ها از یکدیگر جدا شدند. آنالیز ژل ها با کمک نرم افزار Progenesis۹۹۰ نقطه پروتئینی را مشخص کرد که تعدادی از آن ها دارای افزایش بیان معنی دار($P<0.05$) و تعدادی دارای کاهش بیان معنی دار($P<0.05$) بودند. در شکل شماره ۱، تصویر ژل الکتروفورز دو بعدی از هیپوکامپ موش صحرایی C و A نشان می دهد. ۱۱۱ پروتئین به طور اختصاصی متعلق به گروه کنترل است که در آلزایمری بیان نشده و ۶۷ پروتئین نیز دارای بیان جدید در حالت آلزایمری هستند. مقایسه پروتئوم دو گروه کنترل C و CE نشان داد که حضور عصاره باعث بیان ۸۰ پروتئین جدید و خاموشی ۱۰۴ پروتئین می شود.

مقایسه پروتئوم گروه A و AE نشان داد که ۲۱ نقطه در هر دو گروه بیان شد. ۴۹ نقطه در گروه A وجود داشت که در گروه AE بیانی نداشتند و بیان آن ها مهار شده بود در حالی که ۲۶ نقطه در گروه AE وجود دارد که دارای بیان جدید هستند و ناشی از اثر عصاره است. شکل شماره ۲ الف و ب به ترتیب بیان های جدید پروتئینی در گروه A وAE را نشان می دهند.

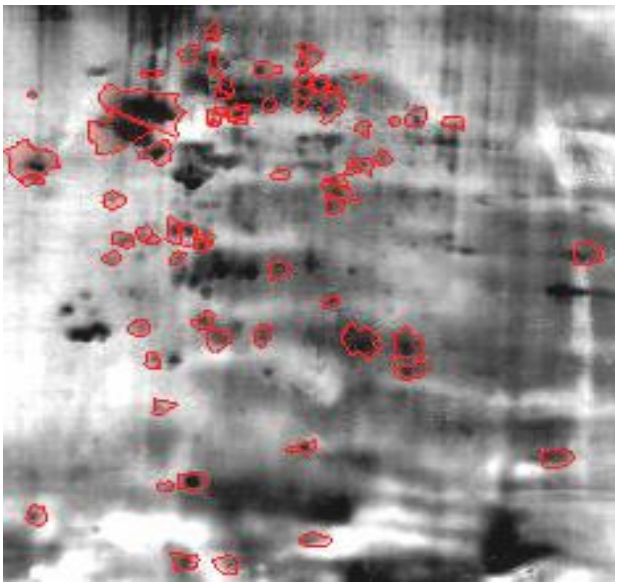
شکل شماره ۳ تصویر ژل الکتروفورز دو بعدی از آنالیز هیپوکامپ موش صحرایی CE و AE نشان می دهد. بعد از حذف پروتئین های مشترک بین دو گروهی که تحت تاثیر عصاره بودند پروتئین هایی که در واقع نقش کاندید دارویی برای درمان آلزایمر هستند مشخص شد که در جدول شماره ۱ معرفی شده اند.

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 مورد نظر دارند(با هم، افزایش و یا کاهش می یابند) که نتایج حاصل از این آنالیز خوشه بندی، در شکل شماره ۴ مشاهده می نماید. شکل شماره ۴ الف خوشه بندی پروتئوم چهار گروه آزمایشی را بیان می کند، شکل شماره ۴ ب خوشه بندی پروتئین های کنترل تحت تاثیر عصاره را نشان می دهد و شکل شماره ۴ ج بیانگر خوشه بندی پروتئین های گروه آلزایمری که تحت تاثیر عصاره بوده اند.

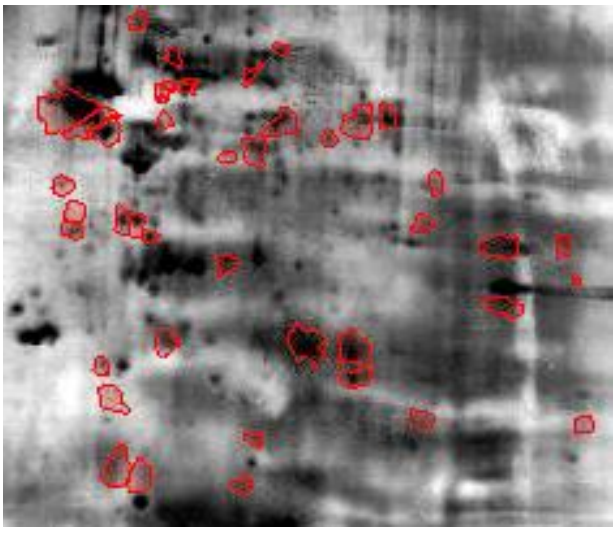
شکل شماره ۵ آنالیز آماری چند متغیره دیگری به نام آنالیز مولفه اصلی را نشان می دهد که برای تایید آنالیز خوشه بندی صورت می گیرد. شکل شماره ۵ الف آنالیز مولفه اصلی برای پروتئوم چهار گروه آزمایشی را بیان می کند. شکل شماره ۵ ب پروتئین های کنترل تحت تاثیر عصاره را نشان می دهد و شکل شماره ۵ ج آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های گروه آلزایمری تحت عصاره را نشان می دهد.



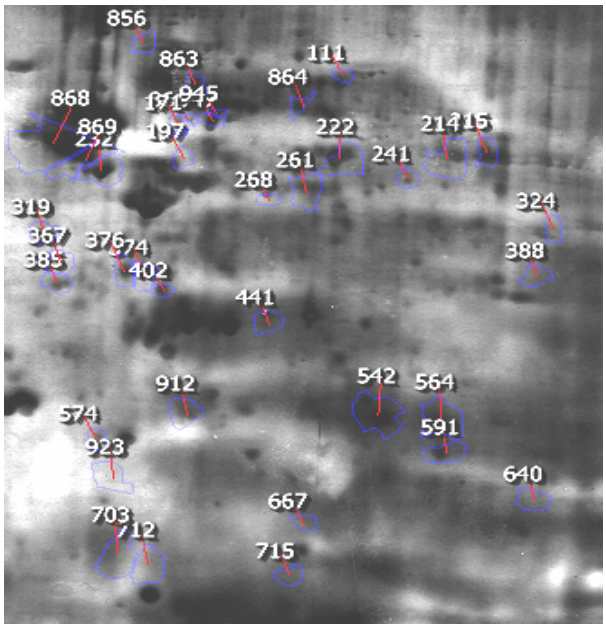
شکل شماره ۱. شکل ظاهری ژل دو بعدی هیپوکامپ موش صحرایی ***A*** و ***C*** که توسط نرم افزار ***Progenesis*** مورد آنالیز قرار گرفته است



شکل شماره ۲ الف. پروتیئن های بیان شده در گروه A



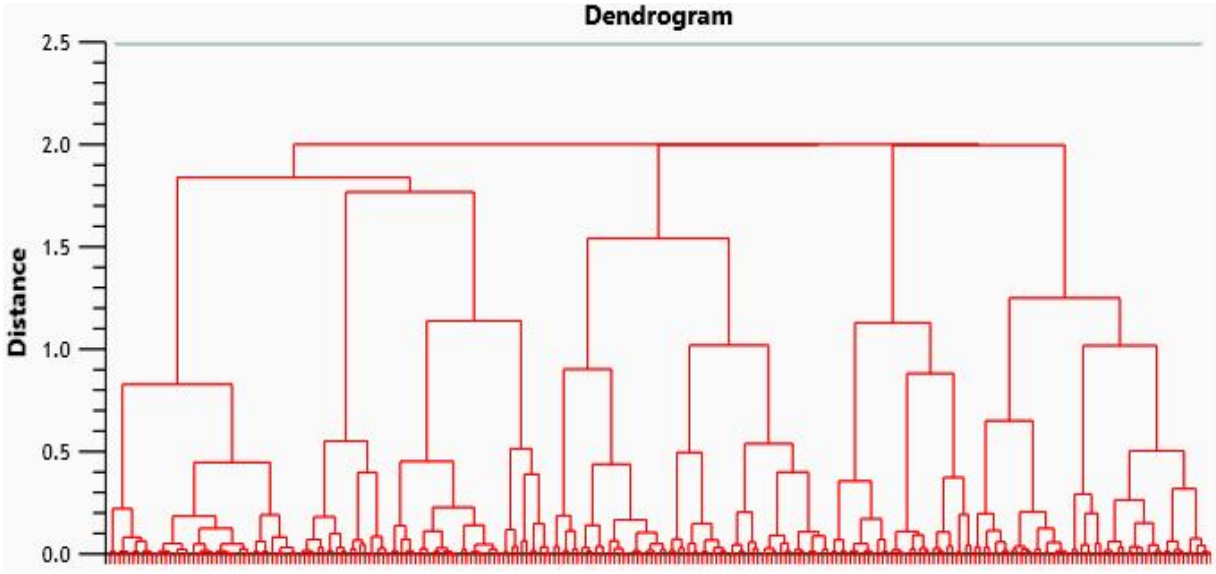
شکل شماره ۲ ب. پروتیئن های بیان شده در گروه AE



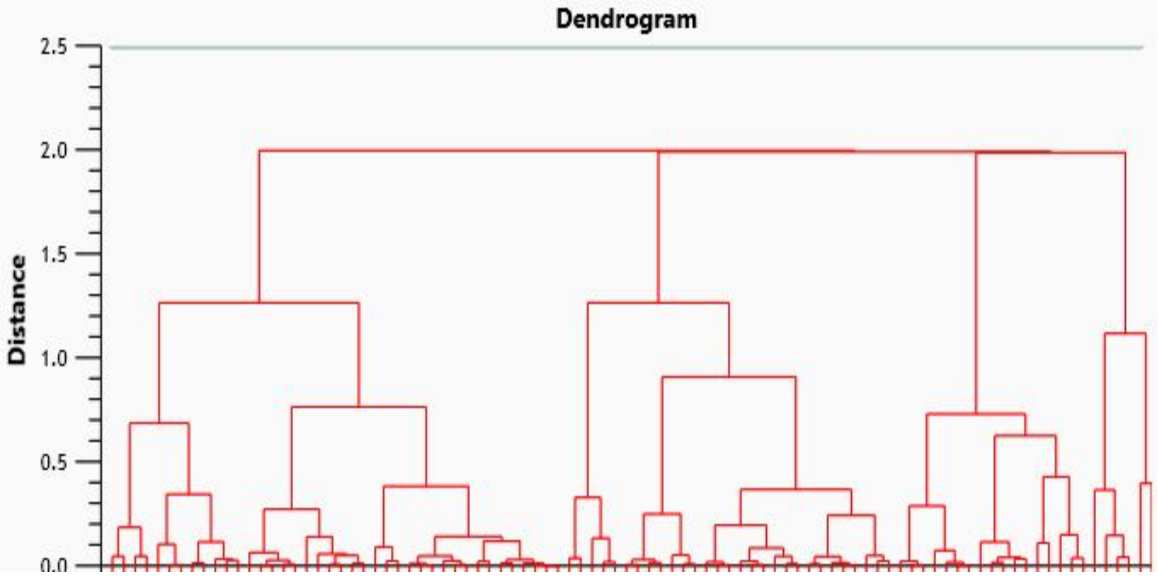
شکل شماره ۳. شکل ظاهری ژل دو بعدی هیپوکامپ موش صحرایی AE و CE که توسط نرم افزار Progenesis مورد آنالیز قرار گرفته است.

جدول شماره ۱. پروتئین های اختصاصی بیان شده در هیپوکامپ موش صحرایی در حضور عصاره. پروتئین های مشترک AE و CE در جدول حذف شدند

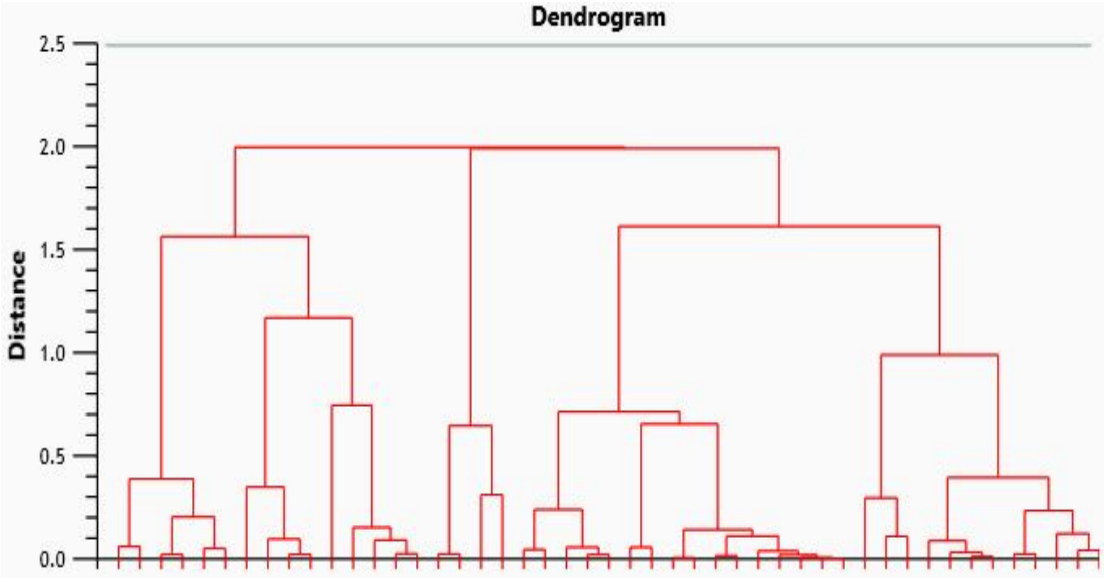
new expression	712	493	111	324	383	703	465	372	388	406	436	667	426	649	640	923		
suppression	812	514	836	58	108	84	867	862	137	529	128	730	422	161	883	686	853	
suppression	903	770	175	98	118	855	155	909	886	102	738	198	432	706	178	937	186	72



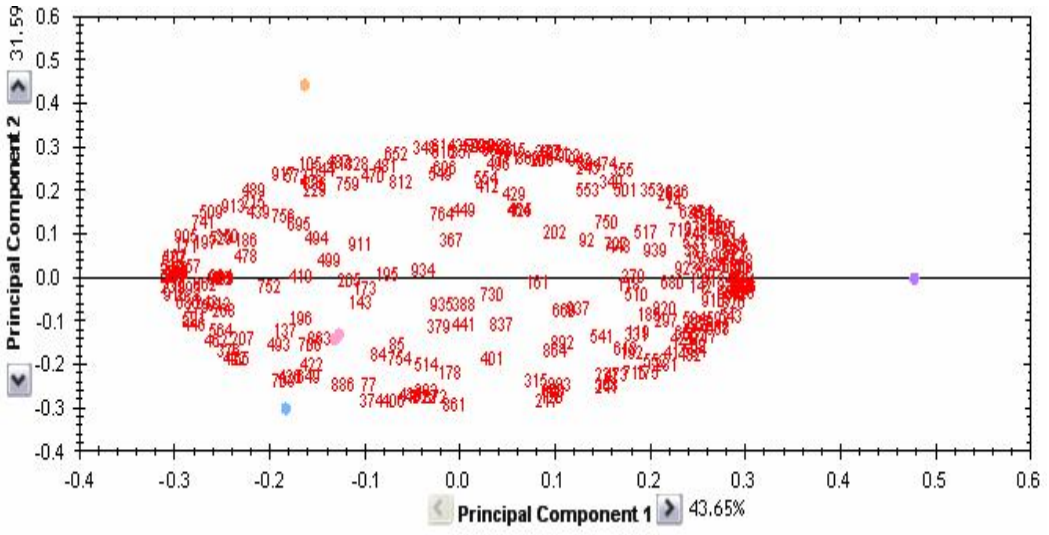
شکل شماره ٤ الف. خوشه بندی پروتئین های چهار گروه آزمایشی



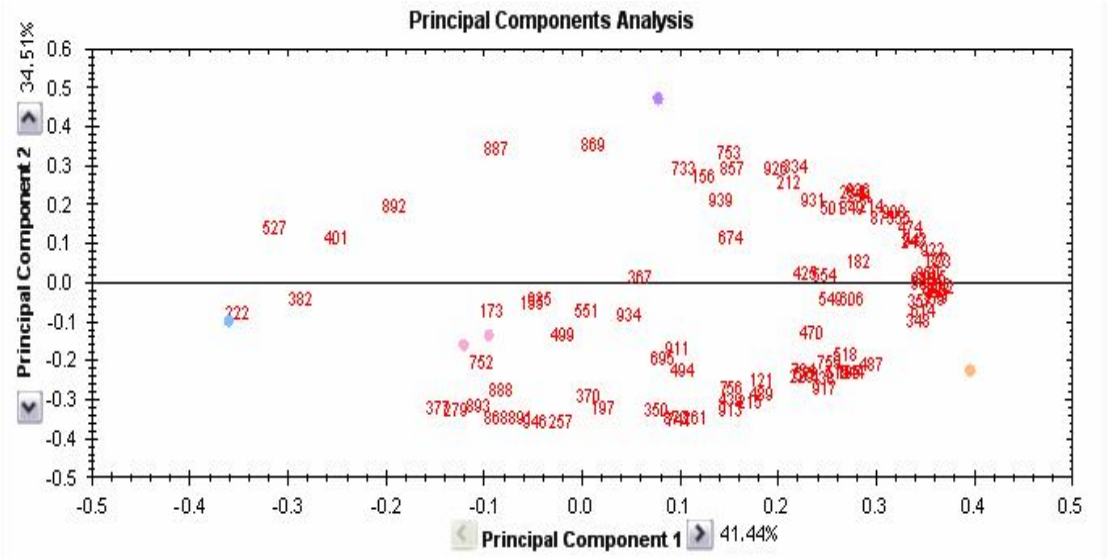
شکل شماره ٤ ب. خوشه بندی پروتئین های گروه کنترل تحت تاثیر عصاره



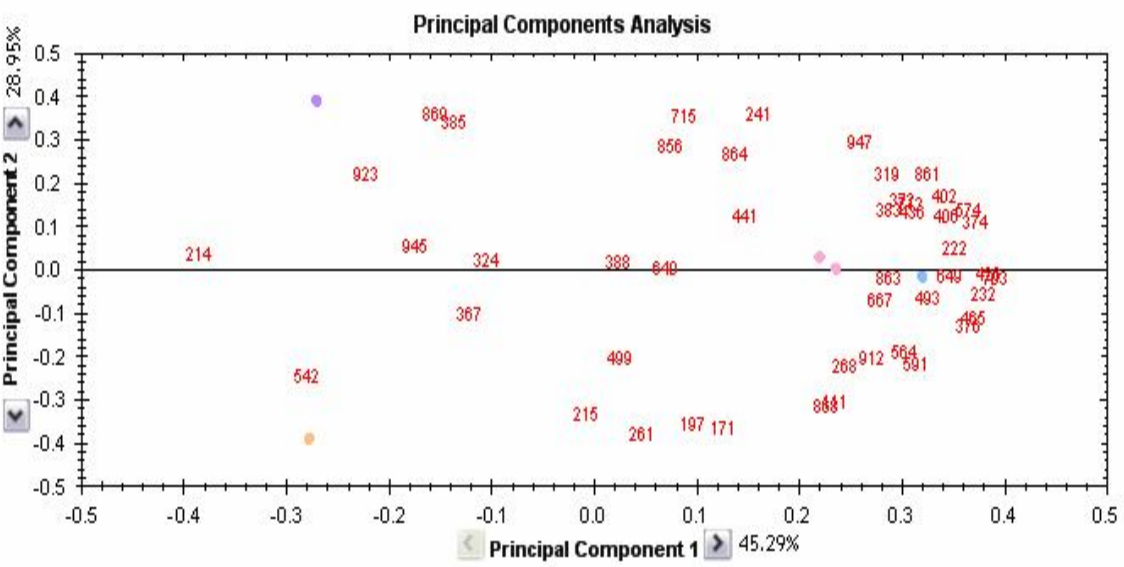
شکل شماره ٤ ج. خوشه بندی پروتئین های گروه آلزایمری تحت تاثیر عصاره



شکل شماره ۵ الف. آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های چهار گروه آزمایشی



شکل شماره ۵ ب. آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های گروه کنترل تحت عصاره



شکل شماره ۵ ج. آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های گروه آلزایمری تحت عصاره

بحث و نتیجه گیری

اگر چه بیماری آلزایمر درمان قطعی ندارد تاکنون داروهای شیمیایی زیادی جهت درمان و یا بهبود عوارض بیماری معرفی شده اند که با توجه به اثرات جانبی زیاد و محدودیت در مصرف این داروها، هنوز یک داروی موثر جهت درمان و یا بهبود عوارض آلزایمر معرفی نشده اند،(۵،۱۳)، از طرفی 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،(۳). در سال های اخیر گیاهانی با خواص درمانی بالا از جمله علف چای(Hypericum)و اسطوخودوس(Lavender) جهت درمان افسردگی، اضطراب و بی خوابی معرفی شده اند. اثر مهاری عصاره سرشاخه های اسطوخودوس روی آنزیم استیل کولین استراز نیز به اثبات رسیده است،(۸،۹). در این تحقیق اثر عصاره آبی سرشاخه های گیاه اسطوخودوس بر بهبود حافظه در مغز موش های صحرایی نر بالغ سالم و آلزایمری 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 آنالیز های آماری چند متغیره را در داده های چند بعدی پروتئومیکی تسهیل نموده است. در این مطالعه ژل های الکتروفورز دو بعدی با استفاده از نرم افزار progenesis same spot مورد آنالیز قرار گرفتند. آنالیز ژل ها با کمک نرم افزار Progenesis ۹۹۰ نقطه پروتئینی را مشخص کرد که تعدادی از آن ها دارای افزایش بیان معنی دار($P<0.05$) و تعدادی دارای کاهش بیان معنی دار($P<0.05$) بودند. همان طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می شود تصویر ژل الکتروفورز دو بعدی از هیپوکامپ موش صحرایی C و A که ۱۱۱ پروتئین به طور اختصاصی متعلق به گروه کنترل است که در آلزایمری بیان نشده و ۶۷ پروتئین نیز دارای بیان جدید در حالت آلزایمری هستند. تحقیقات نشان می دهند که چندین دسته از پروتئین در بروز بیماری در مراحل مختلف دخالت دارند. پروتئین های مسئول انتقال سیناپس(پروتئومیکس سیناپتوزوم)، دسته ای از پروتئین های شوک حرارتی (HSC71) و پروتئین های میتوکندریایی در پاسخ به استرس اکسیداتیو دارای تغییر بیان بودند،(۱۴). بیومارکرهایی که از راه های مختلف به دست آمده اند و به عنوان اهداف تشخیصی و درمانی مورد توجه هستند شامل پروتئین های پرسنیلین ۱ و ۲ و پیش ساز آمیلوئید بتا(APP)،(۱۵)، در مراحل

اولیه و آپولیپوپروتئین E الل e4،(۱۶)، در مراحل نهایی به عنوان ژن های مسئول ناهنجاری های رفتاری آلزایمر شناخته شده اند. آنزیم پرسنیلین-۱ جزئی از کمپلکس آنزیم گاماسکرتاز است در پروسه پردازشAPP نقش اصلی را ایفا می کند. موتاسیون در ژن های این پروتئین علت ۸۰ درصد ابتلا به این بیماری است.(۱۷)

مقایسه پروتئوم دو گروه کنترل C و CE نشان داد که حضور عصاره باعث بیان ۸۰ پروتئین جدید و خاموشی ۱۰۴ پروتئین می شود. مقایسه پروتئوم گروه A وAE نشان داد که ۲۱ نقطه در هر دو گروه بیان شد. ۴۹ نقطه در گروه A وجود داشت که در گروه AE بیانی نداشتند و بیان شان مهار شده بود در حالی که ۲۶ نقطه در گروه AE وجود دارد که دارای بیان جدید هستند و ناشی از اثر عصاره است. شکل شماره ۲ الف و ب به ترتیب بیان های جدید پروتئینی در گروه A و AE را نشان می دهند.

هدف برنامه های کشف دارویی کم کردن سطوح پلاک های نامحلول آمیلوئید β، مهار فسفریلاسیون پروتئین تاو، تغییر متابولیسم کلسترول و مهار التهاب ناشی از سلول های گلیای مغزی است. سلول های گلیای مغزی که در حالت فیزیولوژیک، مسئول هموستازی مغز هستند در حالت آلزایمری منبع تولید بسیاری از فاکتورهای التهابی نظیر IL-1β، IL-6، TNFα و iNOS می شوند و این در حالی است که نورون ها به میزان بسیار کمی آن ها را تولید می کنند. این فاکتورها در التهاب مزمن دارای خاصیت سمی هستند،(۱۰). نروترنسمیترها و فعالیت اکسیداتیو میتوکندری نیز باعث تغییر متابولیسم آمیلوئید β می شود. شکل شماره ۳ تصویر ژل الکتروفورز دو بعدی از هیپوکامپ موش صحرایی CE و AE نشان می دهد. بعد از حذف پروتئین های مشترک بین دو گروهی که تحت تاثیر عصاره بودند پروتئین هایی که در واقع نقش کاندید دارویی برای درمان آلزایمر هستند مشخص شد که در جدول شماره ۱ معرفی شده اند. با توجه به نتیجه رفتار شناسی موش های تحت عصاره که با افزایش کارای حافظه در هر دو گروه همراه بود بیانگر این است که عصاره باعث بیان ژن هایی که دارای اثر مفیدی در فرایند حافظه، یادگیری و آموختن هستند می شود. بنا بر این می توان گفت همه اثرات 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،(۴-۱)، آن در سطح ملکولی، به حضور این پروتئین های جدید است. مطالعات پیشین اثر ضد التهابی گیاه را به اثر مهارکنندگی آن بر روی آنزیم استیل کولین استراز نسبت داده اند.(۸)

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 ویا کاهش می یابند). در شکل شماره ۴ الف، ب و ج آنالیز خوشه بندی، پروتئین ها را از نظر بیان به ۳ 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 سمت راست می رود این نسبت 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. روش های خوشه بندی متفاوتی وجود دارد در گروهی از خوشه بندی ها، 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. در روش جدیدتری خوشه بندی فازی با سرپرست، برای پیش بینی کلاس های ساختاری پروتئین ها استفاده می شود،(۱۸). در خوشه بندی بر اساس تشابهات هستی شناسی ژنی نیز از روش خوشه بندی سلسله مراتبی و اندازه مشابهت های حاصل از اندازه مشابهت فازی استفاده می شود،(۱۹). 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 می شود و مرکز هر خوشه می تواند اطلاعات پروتئین های خوشه را در برگیرد،(۲۰). هدف از خوشه بندی در این مطالعه، 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. مطالعات پیشین نیز که با کمک این نرم افزار به آنالیز ژل های 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.(۲۱)

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 ۵ الف، ب و ج نشان داده شده است. آنالیز مولفه اصلی جهت تولید ساده‌ترین 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 های که توسط خوشه بندی به روش شبکه عصبی مصنوعی دسته 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.(۲۲)

ازPCA سه بعدی در تصاویر الگوهای پروتئومیکی جهت شناسایی کلاس نمونه های موجود در یک مجموعه داده استفاده می شود. روش پیشرفته تری جهت دو مجموعه داده مختلف به کار گرفته شد. مجموعه داده ای متشکل از ۵ نمونه از سرم موش سالم و ۵ نمونه سرم موش هایی که نیکوتین دریافت کرده بودند. مجموعه داده دوم شامل داده های ۴ نمونه غده لنفاوی سالم و ۴ نمونه غده لنفاوی مبتلا به لنفومای غیر هوجکینی بود. 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.(۲۳)

نتیجه این مطالعه نشان می دهد که تفاوت معنی داری 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 متغیره 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 بر درمان آلزایمر نیاز به مشخص شدن نوع پروتئین ها است که باید توسط دستگاه

اسپکتروفوتومتری جرمی تعیین هویت شوند و به عنوان کاندید دارویی معرفی گردند.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی با کد ۸۹۸۰-۱۵۹-۱-۱۳۹۱ که توسط کمیته پژوهشی دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب گردید و برگرفته از پایان نامه PhD حکیمه زالی می باشد. از مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در اجرای پروژه همکاری داشتند تشکر می گردد

References .

1-Minna A, Korolainen E. An update on clinical proteomics in Alzheimer s research. J Neurochem 2010;112:1386-414.

2-Saila V. A molecular genetic study and expression-based analysis of risk factors of Alzheimer's disease. Neurol Reports 2007; 4:90-6.

3-Robert V, Korolainen E, Jiero H. The secretase enzyme in health and alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential target. J Neurosci 2009:29:12787-94.

4-Toyoshi U, Sherri N, Gomes T, Roberto J. Anti conflict effect of lavender oil and identification of its active constituents. Pharmacol Biochem Behav 2006;85:713-21.

5-Hansen E, Richard A, Fiedel L, Lipino S. Functional outcomes of drug treatment in alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. Drug Age 2007;24:155-67.

6-Netzer WJ, Minna A, Korolainen E. Experimental alzheimer drug advaces to late-stage trials. Alzheimer Info 2008;7:87-90.

7-Wan-Ki P, Lin K, Toyoshi U, Sherri N, Gomes T, Roberto J. et al. Efficacy of armathotherapy (Lavandula angustifolia) as an intrventin for agitates behaviours in Chinese older person with dementia: a cross-over randomized trial. Int J Geriatr Psychiatry 2007;22:405-10.

8-Adsersen A, Minna A, Korolainen E, Lin K, Toyoshi U, Sherri N, et al. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholiesterase inhibitory activity. Joural of Ethnopharmacology 2006;104:418-22.

9-Valiollah H, Minna A, Korolainen E, Hansen E. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of Lavandula angustifolia Mill. J Ethnopharmacol 2003;89:67-71.

10-Blasko I, Valiollah H, Minna A, Korolainen E, Hansen E. Efficacy of donepezil treatment in Alzheimer patients with and without subcortical vascular lesions. Pharmacol 2004;75:78-81.

11-Brad ford MM, Robert V, Korolainen E. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizeing the princil of protein. Analyt Biochem 1976;72:248-54.

12-Zhou G, Hongmei L, Decamp D. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. Mol Cell Proteom 2002;1:117-23.

13-Feiqi Z, Caiyun Q. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. BMC Neurosci 2006;7:78-82.

14-Branislav K. New age of neuroproteomics in alzheimer's disease research. Cell Mol Neurobiol 2009;29:799-805.

15-Levy-Lahad J, Hongmei L, Decamp D. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science 1995;269:973-7.

16-Thinakaran G. Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease. Pharmacol Res 2004;50:411-8.

17-Rocchi A, Levy-Lahad J, Hongmei L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease and Parkinson disease. Hum Mol Genet 2003;12:3259-67.

18-Ovaska K, Laakso M, Hautaniemi S. Fast gene ontology based clustering for microarray experiments. Bio Data Min 2008;1:11-8.

19-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.

20-Hugo B, Daniel F, Catia P, Andreo F. Using GO terms to evaluate protein clustering. Meet Program 2007;8:107-10.

21-O'Gorman M, Beauvallet C. An Investigation into Crohn's disease using the pro-

genesis samespots analysis platform. Nonlinear Dynam 2010;5:54-9.
22-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 componentts analysis. Bioinformatics 2005;21: 2191-9.
23-Emilio M. Application of three-way principal component analysis to the evaluation of two-dimensional maps in proteomics. J Proteome Res 2003;2:351-60.

Expression Clustering of Proteins of Alzheimeric and Normal Rat Hippocampus Treated with Lavandula Angustifolia

Zali H[1], Soheili Kashani M[1], Vafaee R[2], Rostaminya L[3]*

(Received: 27 Aprl. 2013 Accepted: 31 July. 2013)

Abstract

Introduction: One of the shortcuts to discover drug targets is the utilizing of new knowledge of basic medical sciences such as genomics, proteomics, metabolomics, bioinformatics and biostatistics that are applying holistic approaches to study biological and medical subjects. In this study proteomics, bioinformatics and biostatistics techniques were applied to identify probable therapeutic proteins targets for the treatment of Alzheimer's disease. Hippocampus proteomes of normal and Alzheimeric rats treated with aqueous extract of lavender were evaluated with protein exprression clustering method.

Materials & Methods: Proteins of hippocampus samples from normal and Alzheimeric rats that treated with aqueous extract of lavender (CE and AE) and without the extract (C and A) were extracted. Proteins were separated by using of two-dimensional gel electrophoresis and the gels were stained by silver staining methods. Bioinformatics and biostatistics analysis of the separated were accomplished by bioinformatics software.

Findings: Bioinformatics and statistical analysis of the stained gels obtained 990 proteins in the four groups of rats. Proteomic comparison of A and AE groups revealed that the expression of 49 proteins was inhibited, while the expression of 26 new proteins in the AE group was observed that may be due to the present of lavender extract. Proteomic comparison between groups C and CE showed the expression of the 80 new proteins and inhibition of 104 proteins.

Discussion & Conclusion: After the removal of common proteins between the two groups, those proteins that were affected by the extract assigned as drug targets for the treatment of Alzheimer. Changes at the molecular level were revealed with multivariate statistical analyzes such as principal component analysis or correlation analysis and the clustering of proteins showed that the expression changes have been occurred in three main clusters. Finally, it could be concluded that lavender extract caused significant expression changes in the proteome and possibly activated specific biological processes in the rats' hippocampus that associated with enhancement of learning and memory in normal and Alzheimeric rats.

Keywords: alzheimer disease, lavender, proteome, hippocampus, rat, clustering

1. Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept of Nursing, Faculty of Nursing and Midwifery, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.
**(correspondence author)*