

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

حکیمه زالی^{2,1}، مصطفی رضایی طاویرانی^{3*}، ایرج پاکراد⁴

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 میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ پذیرش: 91/11/9

تاریخ دریافت: 91/8/3

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 تحقیق 990 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 مـهار 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 احتمالاً 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

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 می شود و از بافت های مغز در برابر پیری حفاظت می کند، (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 همدیالیز قرار می گیرند، کم می کند، (3-6). 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 اسطوخودوس نیز در موش صحرایی از طریق انجام تست فرمالین گزارش شده است، (3-5). 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 مؤثره 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 اسطوخودوس از طریق آنالیزهای پروتئومیکسی بر روی هیپوکامپ موش های صحرایی جهت شناسایی هدف های ملکولی (در سطح پروتئین ها) ماده مؤثره 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 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. (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 تترا استات، 1 میلی مولار

آنالیز تصویر ژل های دوبعدی

الکتروفورز دوبعدی قادر است صدها پلی پپتید را از یک محلول پروتئینی 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.

فنیل متیل سول فونیل فلوراید، 2/32 مولار سوکروز به همراه مخلوطی از آنتی پروتازها شامل (10 میلی مولار N - اتیل مالامید، 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 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 Gradient) 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 می شود. این بافر شامل 0/025 مولار تریس-اسید کلریدریک (یا باز)، 0/192 مولار گلیسین و 0/1 درصد SDS می باشد. 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 نترات 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. (13)

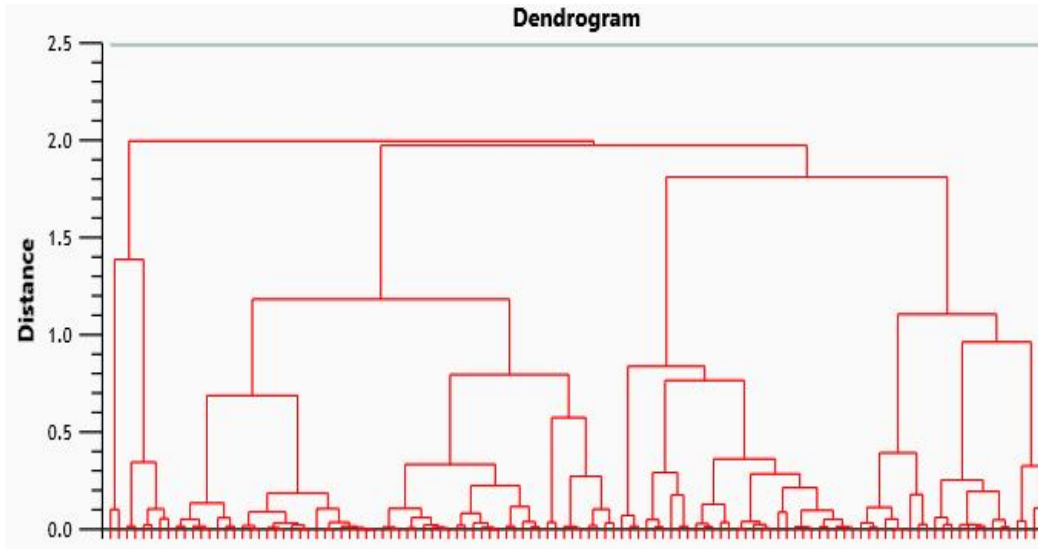
خوشه بندی پروتئین های گروهی که تحت تاثیر عصاره بوده اند (CE) را نشان می دهند هر دو گروه دارای 3 خوشه اصلی هستند.

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.

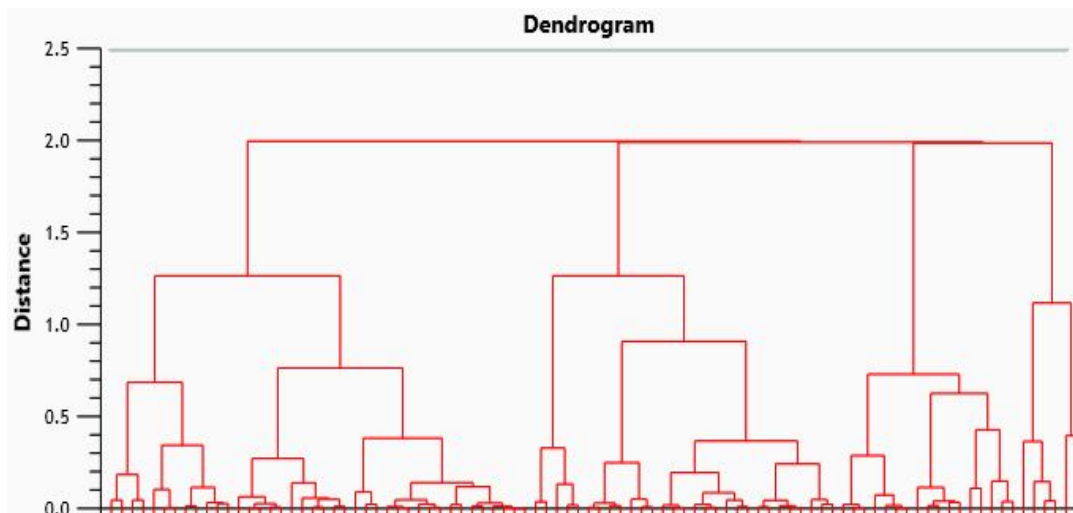
نرم افزار *progenesis same spot* خوشه بندی پروتئین ها بر اساس میزان بیان آن ها را مورد آنالیز قرار می دهد، به طوری که پروتئین هایی که در یک خوشه دسته بندی می شوند، دارای بیان مشابهی باشند؛ بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در سلول های مورد نظر دارند (یا هم افزایش و یا کاهش می یابند) که نتایج حاصل از 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

شماره نقطه	C	CE	شماره نقطه	C	CE
412			419		
905			530		
509			503		
577			481		
393			412		

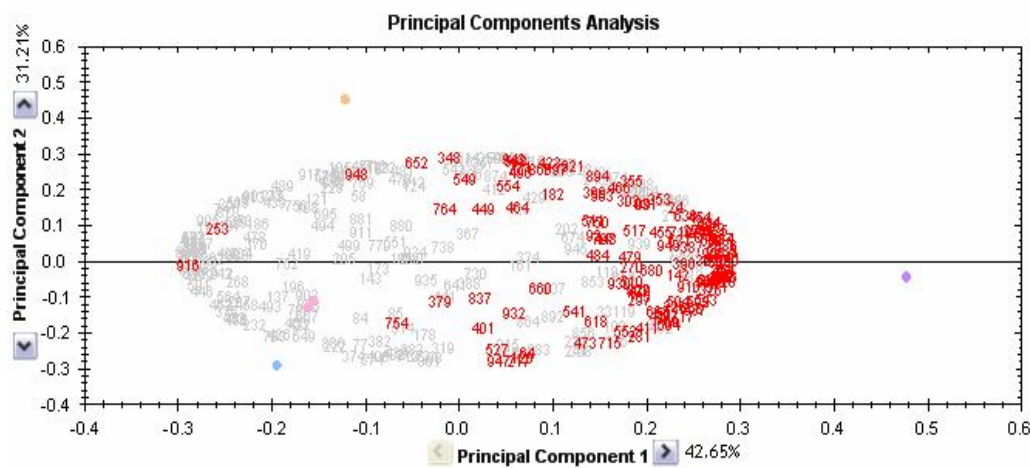
شکل شماره 1. جایگاه تعدادی از نقاط که دارای تفاوت معنی داری بیانی در بین دو گروه هستند



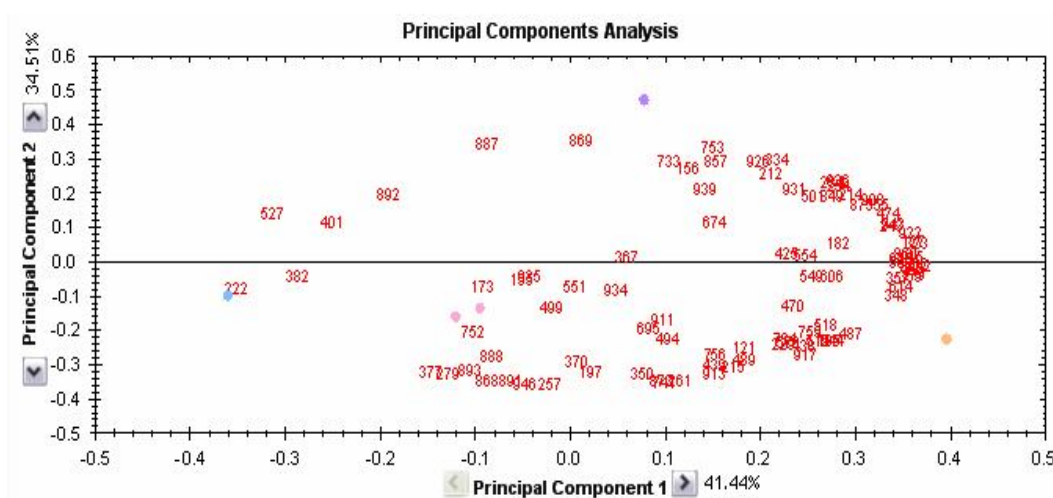
شکل شماره 2- الف. خوشه بندی پروتئین های گروه کنترل (C)



شکل شماره 2- ب. خوشه بندی پروتئین های گروه تحت تاثیر عصاره (CE)



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

گرفت. تغییرات بیان در سطح پروتئوم با کمک تکنیک ژل الکتروفورز دو بعدی مورد آنالیز پروتئومیک قرار گرفت. امروزه استفاده از نرم افزارهای آنالیز ژل کمک بیوانفورماتیک را در ساده نمودن آنالیز داده های پروتئومیک امری اجتناب ناپذیر نموده است. پیشرفت هایی که در سطح نرم افزاری صورت گرفته است آنالیزهای آماری چند متغیره را در داده های چندبعدی پروتئومیک 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

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 پروتئومیک مورد بررسی قرار

به تفاسیر مشترک آن‌ها خوشه بندی و نتایج را به صورت یک نمودار نمایش می‌دهد. هونگ بین شن و همکاران در سال 2005 از روش جدید خوشه بندی فازی با سرپرست، برای پیش بینی کلاس‌های ساختاری پروتئین‌ها استفاده نمودند. بر اساس این روش در مرحله آموزش، اطلاعات مربوط به کلاس‌های ساختاری پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفت، (14). پوپسکو و همکاران در سال 2004 به منظور یافتن عبارت‌هایی که بتوانند در خوشه بندی بر اساس تشابهات هستی‌شناسی ژنی نمایندگان خوبی برای خوشه‌ها باشند از روش خوشه بندی و BLAST سلسله مراتبی و اندازه مشابهت‌های حاصل از اندازه مشابهت فازی استفاده نمودند، (15). هوگو و همکاران در سال 2006 به منظور بررسی کارایی خوشه بندی پروتئین‌ها در تسریع مطالعه آن‌ها، پروتئین‌ها را به کمک اندازه مشابهت‌های حاصل از BLAST خوشه بندی نمودند. پس از بررسی خوشه‌ها از لحاظ هستی‌شناسی ژنی، نتیجه گیری شد که مرکز هر خوشه می‌تواند اطلاعات پروتئین‌های خوشه را در برگیرد، (16). کریستین اواسکا و همکاران در سال 2008 با اندازه گیری مشابهت‌های بین عبارات هستی‌شناسی ژنی و اجرای روش خوشه بندی سلسله مراتبی، توانستند روشی ارائه دهند که در شناسایی سریع ژن‌هایی 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 پروتئین‌هایی است که می‌توانند وابستگی بیولوژیک نسبت به هم داشته باشند، به طوری که افزایش بیان هم‌زمان چندین پروتئین باید در جبران کاهش بیان یا عدم بیان پروتئین‌های 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 پروتئین‌های جدیدی می‌کند که این پروتئین‌ها می‌توانند از نظر ساختاری یا عملکردی به هم وابسته باشند و دارای عملکردی باشند که حاصل اینترکشن آن‌ها است. مطالعات پیشین نیز که با کمک این نرم افزار به آنالیز ژل‌های

در سطح ژل‌ها 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 پروتئینی 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 ژن‌ها در هیپوکامپ می‌شود و از طرفی ژن‌هایی که دارای اثر مفیدی در فرآیند یادگیری و آموختن هستند بیان می‌شوند. بنا بر این می‌توان گفت همه اثرات مفید گیاه اسطوخودوس که در سطح رفتاری باعث بهبود فرایند یادگیری و آموختن در موش‌ها می‌گردد و یا اثرات درمانی گیاه روی افسردگی و اضطراب هم چنین اثر ضد التهابی، (3-5)، آن در سطح ملکولی، به حضور این پروتئین‌های 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 پروتئین‌ها بر اساس میزان بیان آن‌ها را مورد آنالیز قرار می‌دهد، به طوری که پروتئین‌هایی که در یک خوشه دسته بندی می‌شوند، دارای بیان مشابهی می‌باشند؛ بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در حالت سلولی مورد نظر دارند (با هم، افزایش و یا کاهش می‌یابند). در شکل شماره 2 الف و ب آنالیز خوشه بندی، پروتئین‌ها را از نظر بیان به 3 خوشه اصلی تقسیم نموده است. خوشه سمت چپ دسته پروتئینی را نشان می‌دهد 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 می‌رود تغییر می‌یابد 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 مجموعه‌های پروتئین‌ها وجود دارند، اما اغلب آن‌ها نتایج حاصله را در یک تصویر ساده و شفاف و قابل تفسیر ارائه نمی‌دهند. PANDORA ابزاری است که مجموعه‌ای از پروتئین‌ها را با توجه

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 پروتئومیکس دارد. نتایج آنالیز PCA پراکندگی 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 اعضا 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 پروتئومیکس 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 پروتئومیکس 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 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 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.

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-Adersen 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 angustifolia* 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-Umezumi 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 principle of protein-dye binding. *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.

Proteomic Study of Rat Hippocampus in Treatment of Lavandula Aqua Extract

Zali H^{1,2}, Rezaei Tavirani M^{3*}, Pakzad F⁴

(Received: 24 Oct. 2012

Accepted: 28 Jan. 2013)

Abstract

Introduction: For decreasing of stress and its sequelae, 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 electrophoresis 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 proteogenomics 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 lavandula 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)