

The Study of Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Portulaca oleracea* Leaves on NT3 Gene Expression in Degeneration of Alpha Neurons after Sciatic Nerve Compression in Rats

Shokoufe Hejazi¹, Maryam Tehranipour^{2*}

1. MSc Student in Animal Physiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2. Associate Professor, PhD of Animal Physiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 31 Oct 2016, Accepted: 20 Dec 2016

Abstract

Background: The injuries of peripheral nervous system cause the death of a number of motor cells of the spinal cord. Neurotrophins family genes such as NT3 involve in neuronal survive after nerve injury and their expression changes after it. With due attention to the expansion of portulaca pleracea in the world study was conducted to determine the effects of alcoholic and aqueous extracts of *Potulaca oleracea* on the NT3 gene expression after sciatic nerve compression in rat.

Materials and Methods: This study was performed on 88 male wistar rats that randomly were divided in 13 groups of 6 each. They consisted of control group, 4 compression groups (The sciatic nerve was compressed with locker pincer) and 8 treatment groups: compression + treatment with dose of 75 mg/kg of alcoholic and aqueous extract of *Portulaca oleracea* on days 1 and 7 (never compression was done on the first day). In all groups, Total RNA was extracted from the lumbar spinal cord segment in 1, 7, 14, 28 days and cDNA was synthesized, then NT3 expression changes were compared in groups.

Results: There was a significant increase in NT3 gene expression in the compression group compared to control ($p < 0.001$). The NT3 gene expression shows significant increase ($p < 0.05$) in the treatment groups with alcoholic extract (except 1 & 28 days). Also, there was no significant difference in gene expression between treatment group with acqueous extract and compression group in 1 and 7 days. A significant decrease was seen in the treatment groups with aqueous extract of purslane compared to compression ($p < 0.05$). The NT3 gene expression shows significant increase in the treatment groups with alcoholic extract compared to treatment groups with aqueous extract in all days ($p < 0.05$).

Conclusion: The results reveal the *Portulaca oleracea* leaves extracts increase the NT3 gene expression after sciatic nerve injury. This effect is more in alcoholic extract than aqueous extract.

Keywords: Neuroprotective, NT3, *Portulaca oleracea*

*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Email: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

بررسی اثر عصاره‌های آبی و الکلی برگ گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) بر بیان ژن NT3 در ترمیم نورون‌های آلفا پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت

شکوفه حجازی^۱، مریم طهرانی پور^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۲. دانشیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: آسیب به اعصاب محیطی موجب مرگ تعدادی از سلول‌های حرکتی نخاع می‌شود. ژن‌های خانواده نوروتروفین از جمله NT3 در بقای نورونی دخالت دارند و پس از آسیب عصب، میزان بیان آن‌ها تغییر می‌کند. با توجه به گستردگی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) در دنیا، این پژوهش به منظور تعیین اثرات عصاره الکلی و آبی خرفه بر میزان بیان ژن NT3 پس از آسیب عصب سیاتیک در رت انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۸۸ راس رت نر نژاد ویستار که به طور تصادفی در ۱۳ گروه ۶ تایی قرار گرفتند انجام شد و عبارت بودند از: یک گروه کنترل (بدون آسیب)، ۴ گروه کمپرسیون (عصب سیاتیک با پنس قفل دار فشرده شد) و ۸ گروه تیمار: کمپرسیون + تیمار با ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی و آبی برگ خرفه که در روز ۱ و ۷ به صورت داخل صفاقی تزریق شد (کمپرسیون عصب روز اول انجام شد). در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۸ از قطعه کمری نخاع هر نمونه، Total RNA استخراج و cdna سنتز گردید، سپس تغییرات بیان ژن NT3 در گروه‌ها مقایسه شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژن NT3 در گروه کمپرسیون نسبت به کنترل ($p < 0.001$) و در گروه تیمار الکلی در همه روزها به جز روزهای ۱ و ۲۸ نسبت به کمپرسیون افزایش معناداری را نشان داد ($p < 0.05$)، همچنین بیان ژن بین گروه تیمار آبی و کمپرسیون در روزهای ۱ و ۷ اختلاف معناداری نداشت و در روزهای ۱۴ و ۲۸ کاهش معناداری در گروه تیمار آبی نسبت به کمپرسیون دیده شد ($p < 0.05$) میزان بیان ژن در گروه تیمار با عصاره الکلی در همه روزها نسبت به گروه تیمار با عصاره آبی افزایش معناداری را نشان داد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که عصاره برگ خرفه، بیان ژن NT3 را پس از آسیب عصب سیاتیک افزایش می‌دهد و این تاثیرات در عصاره الکلی بیشتر از عصاره آبی است.

واژگان کلیدی: گیاه خرفه، محافظت نورونی، NT3.

*نویسنده مسئول: ایران، مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی

Email: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

مقدمه

طناب نخاعی یک قسمت کامل از اختصاصی‌ترین دستگاه بدن یعنی سیستم عصبی می‌باشد، کار اصلی نخاع انتقال پیام‌های عصبی از مغز به تمامی قسمت‌های بدن و بالعکس می‌باشد (۱). بررسی‌ها نشان داده است که مرگ سلولی در بافت‌های آسیب دیده مغز و نخاع ترکیبی از الگوهای آپوپتوز و نکروز می‌باشد (۲). هم‌چنین مطالعات نشان داده است از جمله مکانیسم‌های مهم و کلیدی، آسیب ثانویه در ضایعات نخاعی است که به واسطه عوامل متعددی نظیر افزایش رادیکال‌های آزاد، سیتوکاین‌ها و واکنش‌های التهابی القا می‌شود. پس از ضایعات نخاعی، الیگودندروسیت‌ها بسیار مستعد آپوپتوز بوده و گیرنده‌هایی نظیر P75 و Fas را بیان می‌کنند که موجب تحریک فرآیند آپوپتوز می‌گردد. در نتیجه آکسون‌ها دمیلینه شده و اختلالات حرکتی نورولوژیک ایجاد می‌شود (۳). ضایعه نخاعی موجب القا و مهار ژن‌های مختلفی شده و تاثیر متقابل هر یک از اینها، مرگ عصب را موجب می‌شود. فاکتورهای مختلف نسخه برداری، پروتئین‌های شوک گرمایی و ژن‌های پیش التهابی پس از آسیب، افزایش بیان نشان می‌دهند. بازگشت اعمال حسی و حرکتی و رفلکسی از دست رفته به بازیابی نورونی و ترمیم آکسونی در محل آسیب بستگی دارد (۴). از جمله این ژن‌ها می‌توان به اعضای خانواده نوروتروفین‌ها اشاره کرد. نوروتروفین‌ها نقش‌های مهمی در مراحل مختلف تکامل و حفاظت سیستم عصبی از جمله مهاجرت نورونی، تمایز، میلینه شدن، ازدیاد طول آکسون و آپوپتوز بازی می‌کنند (۵). NT3 یکی از اعضای این گروه است که در چهارمین روز بعد از تولد ترشح آن افزایش می‌یابد (۶). نوروتروفین ۳ با عنوان عامل نوروتروفیک NTF3 یا با نام فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از هیپوکامپ HDNF نیز خوانده می‌شود. ژن NT3 در انسان بر روی کروموزوم 12P13 و در موش بر روی کروموزوم ۶ قرار دارد و در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی هم‌چنین در ماهیچه‌ها بیان می‌شود (۷). NT3 جوانه زدن مسیر قشری-نخاعی را در حین تکامل هم‌چنین بعد از ضایعات

نخاعی در بزرگسالی افزایش می‌دهد (۸). با توجه به وسعت معلولیت ناشی از آسیب نخاعی و افزایش روز افزون مبتلایان به آن تلاش‌های بسیاری برای ترمیم این ضایعه انجام شده است. محققین در تلاشند که محیط اطراف ضایعه را طوری تغییر دهند که باعث رشد سلول‌های عصبی و ترمیم آن‌ها شوند. چون نورون‌های موجود در نخاع تکثیر نمی‌یابند، جلوگیری از شدت تخریب یا مرگ آن‌ها می‌تواند برای بهبود وضعیت بیمار مفید باشد. از آن جایی که داروهای گیاهی عوارض جانبی نداشته و به راحتی در دسترس می‌باشند، از دیرباز این گیاهان در درمان بیماری‌ها مورد توجه بوده‌اند. خرفه *Portulaca oleracea* یک ساله و گرما دوست و چهار کرپنه از خانواده *Portulacaceae*، یک گیاه گرمسیری است (۹)، که ترکیبات متنوعی از آن جدا شده است مانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، پلی ساکارید، اسیدهای چرب، ترپنوئید، استرول، پروتئین، ویتامین‌ها و مواد معدنی (۱۰) و دارای اثرات محافظت نورونی (۱۱)، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد درد است (۱۲). خرفه در بیشتر نقاط جهان یافت می‌شود، از قرون باستان به عنوان غنی‌ترین منبع آلفا-لینولینیک اسید، اسیدهای چرب امگا ۳ و ۶ ضروری، اسیداسکورویک، گلوکوتایون، آلفاتوکرول و بتاکاروتن شناخته شده است. اسیدهای چرب امگا-۳ نقش مهمی در افزایش عملکرد سیستم ایمنی بدن و پیشگیری و درمان فشار خون بالا، بیماری قلب و عروق کرونر، سرطان و سایر اختلالات التهابی و خودایمنی بازی می‌کند (۱۰). مصرف خرفه می‌تواند سرعت اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با دانسیته پایینتر LDL را به عنوان یک عامل مهم در تصلب شرایین را کاهش دهد (۱۳). با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی و آنتی آپوپتوزی خرفه و برخورداری این گیاه از موادی که نام برده شد، هدف از این تحقیق بررسی اثرات عصاره آبی و الکلی برگ گیاه خرفه بر ترمیم نورون‌های آلفای نخاع از طریق بررسی بیان ژن NT3 پس از آسیب عصب سیاتیک در آن محدوده زمانی است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش تجربی، برگ گیاه خرفه از باغات منطقه کوهسرخ شهرستان کاشمر واقع در جنوب استان خراسان رضوی در خرداد ماه جمع‌آوری شد و با کد هرباریومی ۹۷۳۴ در هرباریوم دانشگاه آزاد واحد مشهد تایید شد. ۳۰ گرم از پودر خشک برگ خرفه را داخل کاغذ مخصوص کارتوش ریخته و در دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس ۳۰۰ سی‌سی اتانول در محفظه مخصوص دستگاه ریخته شد. هم‌چنان که کیسه حرارتی دستگاه، آرام گرم می‌شود حلال (الکل) نیز گرم شده و عصاره برگ خرفه با حلال مخلوط گشته و به بالن بر می‌گردد به این ترتیب از حجم کل محلول کاسته نمی‌شود. عصاره در دستگاه روتاری تقطیر در خلاء که روی دمای ۴۰ درجه و سرعت چرخش ۹۰ دور در دقیقه تنظیم شده بود، تا یک سوم حجم اولیه تغلیظ گردید و پس از آن، برای خشک شدن کامل درون انکوباتور با دمای ۴۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد (۱۴). عصاره گیری در ۱۰ ساعت صورت گرفت تا اطمینان حاصل شود که تمام عصاره قابل حل در حلال از استخراج شده است و در نهایت ۴/۵ گرم (بازده=۱۵ درصد) عصاره الکلی خشک به دست آمد. بار دیگر همان مقدار پودر خشک با استفاده از ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر به عنوان حلال در دستگاه سوکسله قرار داده شد. مدت زمان لازم حدود ۱۸ ساعت طول کشید و زمان لازم برای خشک شدن در انکوباتور ۴۸ ساعت بود و در نهایت ۳ گرم (بازده=۱۰ درصد) عصاره آبی خشک به دست آمد. در این تحقیق از رت‌های نر نژاد ویستار استفاده شد. ۸۸ راس رت حدوداً ۳ ماهه با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در ۱۳ گروه ۶ تایی (کنترل، کمپرسیون، تیمار با عصاره الکلی، تیمار با عصاره آبی دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم بندی شدند. رت‌ها از بخش حیوانات دانشکده علوم پزشکی مشهد خریداری شد و تحت شرایط یکسان و استاندارد، از چند روز قبل از آزمایش در اتاق حیوانات دانشکده علوم دانشگاه آزاد نگهداری شدند و

آب مورد نیاز حیوانات از آب آشامیدنی شهر و غذای آن‌ها نیز دارای فرمول استاندارد و از شرکت جوانه خراسان تهیه شد. رت‌های هر گروه با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ۶۰ میلی‌گرم کتامین و ۶ میلی‌گرم زایلازین، بیهوش گردیدند (۱۵). سپس عصب سیاتیک پای راست در ناحیه استخوان ران توسط پنس قفل دار (فقل دوم) ۶۰ ثانیه تحت کمپرسیون قرار گرفت، محل ضایعه ضد عفونی و توسط گیره فلزی بخیه زده شد. برای هر جانور در گروه تیمار در طول ۲۸ روز، ۲ نوبت تزریق عصاره با دوز ۷۵mg/kg با استفاده از سرنگ انجام شد. اولین مرحله تزریق بلافاصله بعد از انجام عمل کمپرسیون و تزریق دوم یک هفته بعد صورت پذیرفت (۱۶). در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۸ پس از کمپرسیون از قطعات نخاعی مربوط به عصب سیاتیک (L4, L5) نمونه برداری انجام شد. برای یکسان کردن نمونه برداری، در همه نمونه‌ها، نخاع به طور کامل تا انتهای دم اسب جدا شده، از انتها به اندازه ۱۸ میلی‌متر بالا رفته و نمونه‌هایی به طول ۸ میلی‌متر تهیه شد (۱۶). از بافت نخاع به روش ستونی با استفاده از کیت استخراج RNA محصول شرکت دنازیست، RNA استخراج و طبق پروتکل موجود در کیت انجام شد. با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز و اسپکتروفتومتری از استخراج RNA اطمینان حاصل گردید (ژل آگارز ۱/۵ درصد به کار رفت و جهت دیدن باندها از اتیدیوم برماید استفاده شد) و با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت RNA بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه شد. جهت بررسی ژن با استفاده از کیت سنتز cDNA محصول شرکت پارس توس از نمونه‌های cDNA، RNA سنتز شد. مرحله Real Time PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن NT3 و ژن بتا-اکتین که به عنوان House keeping استفاده شد طبق پروتکل (جدول ۲، ۳) انجام شد. پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌ها در (جدول ۱) ارائه شده است.

جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن NT3

GENES	Primer Sequence	TM
NT3	Forward: 5'-CGTCCCTGGAAATAGTCATACGG -3' Reverse: 5'-ACAGATGCCAATTCATGTTCTT -3"	63 °C
β-Actin	Forward: 5'-ATTGCTGACAGGATGCAGAA - 3' Reverse: 5'-TAGAGCCACCAATCCACAC -3'	60 °C

جدول ۲. پروتکل Real time PCR برای ژن NT3

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

جدول ۳. برنامه دمایی Real time PCR برای ژن NT3

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

یافته‌ها

آبی اختلاف معناداری وجود ندارد ولی در گروه تیمار الکلی نسبت به این دو گروه کاهش معناداری دیده می‌شود ($p < 0/05$) (نمودار ۲). در روز هفتم میزان بیان ژن بین گروه تیمار آبی و کمپرسیون اختلاف معناداری ندارد ولی در گروه تیمار الکلی نسبت به این دو گروه افزایش معناداری دیده می‌شود ($p < 0/01$) (نمودار ۲). در روز چهاردهم بیان ژن در گروه کمپرسیون نسبت به گروه تیمار آبی و در گروه تیمار الکلی نسبت به دو گروه دیگر افزایش معناداری نشان می‌دهد ($p < 0/001$). در روز بیست و هشتم

برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار Minitab 16 و آزمون ANOVA و T-test استفاده شد. بیان ژن پس از کمپرسیون در همه گروه‌ها و در همه روزها (به جز تیمار الکلی روز ۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان می‌دهد ($p < 0/01$). بیش‌ترین میزان بیان ژن در گروه کمپرسیون، در روز ۲۸ و در گروه تیمار الکلی در روز ۱۴ و در گروه تیمار آبی در روز اول مشاهده می‌شود. در روز اول پس از کمپرسیون، بین بیان ژن در گروه کمپرسیون و تیمار

بیان ژن در گروه کمپرسیون نسبت به دو گروه تیمار الکلی و تیمار آبی افزایش معناداری دارد ($p < 0/001$) و در گروه تیمار آبی افزایش معنادار نسبت به تیمار الکلی دیده می شود ($p < 0/05$) (نمودار ۲).

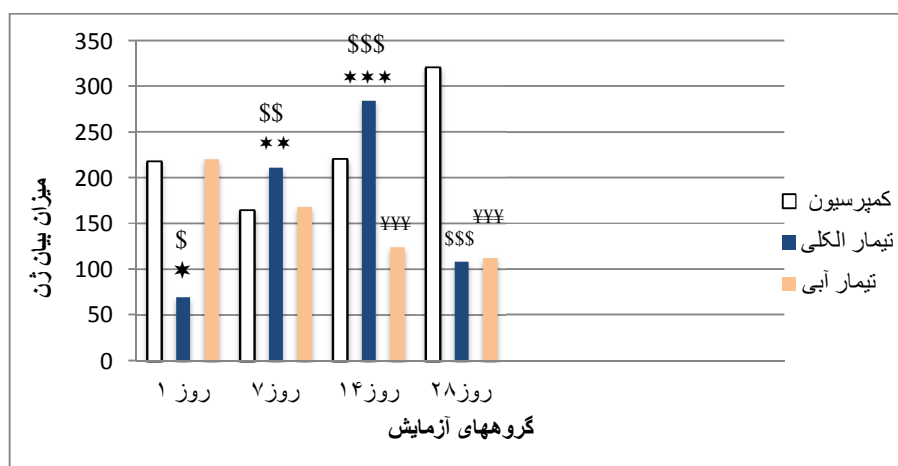


نمودار ۱. مقایسه شدت بیان ژن NT3 در عصب سیاتیک بین گروه‌های کنترل و کمپرسیون در بازه زمانی روزهای (۱، ۷، ۱۴ و ۲۸)، بیان ژن در همه روزها در گروه کمپرسیون نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. بیشترین مقدار بیان ژن ۲۸ روز و کمترین مقدار ۷ روز پس از کمپرسیون مشاهده می‌شود

* اختلاف معناداری $p < 0/05$

** اختلاف معناداری $p < 0/01$

*** اختلاف معناداری $p < 0/001$ را نشان می‌دهد. (n = 6)



نمودار ۲. مقایسه بیان ژن NT3 در گروه‌های کمپرسیون، تیمار با عصاره الکلی و آبی گیاه خرفه در ۱، ۷، ۱۴ و ۲۸ روز پس از کمپرسیون عصب سیاتیک، بیان ژن در گروه تیمار با عصاره الکلی در همه روزها (به جز روز ۱) نسبت به گروه تیمار با عصاره آبی افزایش معناداری داشته است (مقدار بیان ژن در گروه کنترل در همه روزها ۱۰۰ در نظر گرفته شده است). اختلاف معنادار گروه‌های تیمار آبی و الکلی نسبت به هم با علامت *، گروه‌های تیمار الکلی و کمپرسیون با علامت \$ و گروه‌های تیمار آبی و کمپرسیون با علامت \$\$\$ نشان داده شده است.

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که بیان ژن NT3 پس از گذشت ۱، ۷، ۱۴ و ۲۸ روز در گروه کمپرسیون در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری نشان می‌دهد. در تحقیق مشابهی که حیدرزاده انجام داده است میزان بیان ژن NT3 در ۶ ساعت ابتدایی پس از آسیب عصب افزایش یافته و در ۷۲ ساعت به اوج خود رسیده و سپس کاهش نشان می‌دهد (۴). افزایش بیان ژن پس از آسیب می‌تواند به علت افزایش ناگهانی در فرآیند تخریب نورونی و دمیلینه شدن آکسون‌ها، افزایش فعالیت میکروگلیاها، کاهش مولکول‌های مهارکننده ناشی از آن، افزایش واکنش‌های التهابی و هجوم ماکروفاژها به محل آسیب و در نهایت ایجاد شرایط مطلوب جهت افزایش بیان ژن‌های تحریک کننده رشد آکسونی و دخیل در بقای نورونی باشد (۴). پژوهشی که توسط سانگ و همکارانش انجام شد نشان داد که ضایعه نخاعی موجب القا و مهار ژن‌های مختلف می‌شود که تاثیر متقابل آن‌ها مرگ سلول را باعث می‌شود. پروتئین‌های شوک حرارتی و ژن‌های پیش التهابی، پس از آسیب نخاعی افزایش بیان نشان می‌دهند. از طرفی دیگر بعضی گیرنده‌های نوروترانسمیتر و ترانسپورترها، کانال‌های یونی، کینازها و پروتئین‌های ساختاری ۳ ساعت پس از آسیب نخاعی کاهش بیان نشان داده‌اند. بسیاری از ژن‌هایی که در رشد و تمایز، بقا و حفاظت عصبی نقش دارند، ۲۴ ساعت پس از آسیب، افزایش بیان داشته‌اند (۱۷). در گروه کمپرسیون نتایج حاکی از افزایش بیان ژن در روز اول پس از کمپرسیون است که این مقدار در روز هفتم کاهش نشان می‌دهد سپس در روز چهاردهم مجدداً افزایش داشته و در روز بیست و هشتم به اوج خود می‌رسد (نمودار ۱). کاهش بیان ژن در روز هفتم هم راستا با نتایج تحقیق حیدرزاده است. بر اساس نظریه نوروتروفیک، بقا و تمایز تعداد خاصی از نورون‌ها از طریق فاکتورهای نوروتروفیک مشتق از هدف تامین می‌شود، انتقال برگشتی نوروتروفین‌ها در بافت‌هایی انجام می‌گیرد که هدف تقویت هستند نه در نورون‌هایی که آن‌ها را تقویت

می‌کنند و گیرنده‌های آن‌ها بر روی نورون‌های تقویت شونده هستند و در بافت‌های هدف نیستند (۱۸). طبق این نظریه فاکتورهای رشد به صورت برگشتی از اندام‌های هدف به سلول‌های عصبی مناسب منتقل می‌شوند هم چنین توسط سلول‌های شوان در اعصاب محیطی سنتز می‌شوند. بخشی از گزارشات دیگر هم معطوف به انتقال پس نورد عوامل نوروتروفیک از بافت‌های هدف یا سلول‌های اطراف ضایعه است و از آنجایی که این عوامل نقش موثری در حفظ نورون‌ها دارند با اعمال فشار، تاثیر عوامل نوروتروفیک بافت هدف یا بافت اطراف به روی سلول‌های موتونورون قطع یا مختل می‌شود. بنابراین سطوح نوروتروفین در دسترس قرار گرفته در محل آسیب به منظور جبران فقدان فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از هدف برای حفظ بقای سلولی کافی نیست (۱۹). احتمالاً به همین دلیل در روز هفتم کاهش بیان در همه گروه‌ها مشهود است. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده افزایش معنادار بیان ژن در گروه تیمار با عصاره الکلی (به جز روز اول) نسبت به گروه کمپرسیون و تیمار با عصاره آبی است (نمودار ۱). کاهش بیان ژن در روز اول احتمالاً به دلیل شوک ناشی از اثر عصاره الکلی است که به طور موقت بیان ژن را در ساعات‌های اولیه کاهش داده است، پژوهش گران دیگری هم گزارش کرده‌اند که عصاره الکلی در ساعات اولیه تاثیری بر حیات سلول ندارد (۲۰). آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد بیش‌ترین میزان بیان ژن در گروه تیمار الکلی مربوط به روز چهاردهم می‌باشد و افزایش معنادار نسبت به دو گروه دیگر نشان می‌دهد (نمودار ۲). به دنبال آسیب آکسونی سلول‌های شوان بخش دیستال سنتز NGF, BDNF, P75 اما نه NT3 را تنظیم مثبت می‌کند. افزایش گیرنده‌های با تمایل کم قبل از فساد آکسون قابل تشخیص است و تصور بر این است که افزایش NGF و P75 به صورت هم‌زمان، تکثیر و مهاجرت سلول‌های شوان را زیاد می‌کند (۱۹). با زیاد شدن سلول‌های شوان و پیشرفت روند ترمیم عصب، افزایش بیان ژن دیده می‌شود که به نوبه خود روند ترمیم را افزون نموده و به نظر می‌رسد در گروه تیمار الکلی، ترمیم در روز ۱۴ کامل شده

موثر بر بیان ژن در عصاره الکلی بیشتر است (نمودار ۲). به طور کلی نتایج تحقیق نشان می‌دهد که اثر مثبت عصاره الکلی برگ خرفه از عصاره آبی آن بر بیان ژن بیش تر بوده است. احتمالاً در روش سوکسله، اتانول حلال بهتری برای استخراج عصاره این گیاه است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره‌های آبی و الکلی برگ گیاه خرفه، پس از آسیب عصب سیاتیک، بیان ژن نوروتروفین ۳ (NT3) را افزایش داده و در گروه‌های تیمار با عصاره الکلی، افزایش بیان ژن از گروه تیمار با عصاره آبی بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد و حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری با عنوان "بررسی اثر عصاره آبی و الکلی برگ گیاه خرفه *portulaca oleracea* بر تغییرات بیان ژن NT3 و دانسیته نورونی نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت" می‌باشد. از ریاست دانشکده و مدیریت محترم و پرسنل گروه زیست‌شناسی به خاطر همراهی بی دریغشان قدردانی می‌شود.

منابع

- 1- Becker C.G, Diez del Corral R. Neural development and regeneration: it's all in your spinal cord. *Development* 2015; 142: 811-816.
- 2- Rabuffetti M, Sciorati C, Tarozzo G, Clementi E, Manfredi AA, Beltramo M. Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2000; 20(12):4398-404.
- 3-Khalatbary A.R. Apoptosis in neurodegenerative diseases. *J Gorgan Uni Med Sci* 2014; 16(2): 1-11.

و بیان ژن سیر نزولی یافته تا در روز ۲۸ به حد نرمال می‌رسد. این کاهش معنادار بیان ژن در گروه تیمار الکلی نسبت به گروه کمپرسیون در روز بیست و هشتم احتمالاً به دلیل وجود فاکتورهای ترمیمی و ضد التهابی از جمله فلاونوئیدها در عصاره الکلی خرفه است (نمودار ۲). یکی از ترکیبات موجود در خرفه آلفا-لینولینیک اسید (ALA) می‌باشد (۱۰)، یک اسید چرب امگا ۳ که بر اساس تحقیقات انجام شده، میزان بیان ژن BDNF را در نورون‌های قشر و هیپوکامپ افزایش می‌دهد و گیرنده TrkB را که میل ترکیبی بالا به BDNF دارد را فعال می‌کند (۲۱). نیاسین از گروه ویتامین B شبیه به اسید نیکوتینیک و مشتقات آمیدیش (نیکوتین آمید) است. نیاسین در خرفه وجود دارد (۱۰). بر اساس شواهد، نیاسین بیان BDNF-TrkB را افزایش داده و بقای نورونی و رشد آکسون پس از آسیب عصبی را حمایت می‌کند (۲۲). از آنجایی که مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن NT3 شباهت آن را با BDNF نشان می‌دهد (۲۳). نشان می‌دهد B و A تمایل به ترکیب با تیروزین کینازهای نوع C علاوه بر تیروزین کیناز نوع NT3 سوی دیگر. NT3 (۵)، این احتمال را می‌توان در نظر گرفت که آلفا-لینولینیک اسید و نیاسین تأثیرات مشابهی بر بیان ژن داشته باشند. پژوهش‌های پیش‌تری نیاز است تا مشخص شود کدام ترکیبات موجود در خرفه بر میزان بیان ژن NT3 موثر است. در تحقیقی که حیدرزاده انجام داده است نیز مشاهده شد که تکثیر سلول‌های شوان در قطعه انتهایی سبب می‌شود ترشح فاکتورهای رشد توسط این سلول‌ها تا روز چهاردهم بعد از ضایعه به حداکثر خود رسیده و سپس کاهش یابد بنابراین نتایج تحقیقات قبلی همسو با پژوهش فعلی است. نتایج نشان می‌دهد بیان در گروه‌های تیمار با عصاره آبی در روز اول و هفتم اختلاف معناداری نسبت به گروه کمپرسیون NT3 ژن نشان نمی‌دهد و در روزهای چهاردهم و بیست و هشتم کاهش معناداری مشاهده می‌شود (نمودار ۲). بر طبق نتایج، بیان ژن در گروه تیمار الکلی نسبت به تیمار آبی افزایش معناداری نشان می‌دهد و بیان‌گر این است که فاکتورهای

- 4- Heidarzade S. The study of NT3 gene expression in axotomized rats. [MSc thesis]. Esfahan university, 2010
- 5- Bucci C, AliFona P, Cogli L. The Role of Rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin Receptors. *Membranes* 2014; 4(4):642-77.
- 6- Malamitsi-Puchner A, Economou E, Boutsikou T, Nikolaou K, Vrachnis N. Neurotrophin-3 and FLT3 Tyrosine Kinase Receptor in Perinatal Life. *Mediators Inflamm* 2005; (1): 53-56.
- 7- Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends neurosci* 1991; 14(5):165-70.
- 8- Barde YA. The nervr growth factor family. *Prog Growth factor Res* 1990; 2(4):237-48.
- 9- Jin R, Wang Y, Liu R, Gou J, Chan Z. Physiological and Metabolic Changes of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) in Response to Drought, Heat, and Combined Stresses. *Front Plant Sci* 2015; 6: 1123.
- 10 -Zhou YX, Xin HL, Rahman K, Wang SJ, Peng C, Zhang H. *Potulaca oleracea* L: A review of Phytochemistry and Pharmacological Effects. *Biomed Res Int* 2015; Review. 11 pages.
- 11- Abdel moneim AE. The neuroprotective effect of purslane(*portulaca oleracea*) on rotenon-induced biochemical changes and apoptosis in brain of rat. *CNS Neuro Disord Drug Targets* 2013; 12(6):830-41.
- 12- Chan k, Islam MW, Kami M, Radhakrishnan R, Zakaria MN, Habibullah M, et al. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. *Sativa* (Haw.) Celac. *J Ethnopharmacol* 2000; 73 (3):44-51.
- 13- Ahmadi kamazani N, Amiri m. Physicochemical Evaluation of Purslane Seed Oil. *Journal of Food Technology & Nutrition* 2013; 4 (40):81-90.
- 14- Javad Moosavi B. Z, Tehranipour M, Mollashahi M, Mahmoodzadeh H. Neuroprotective effects of Cannabis sativa leaves extracts on α -Motoneurons density after sciatic nerve injury in rats. *Life Science Journal* 2013; 10.
- 15- Razavi M, Tehranipour M, Khayatzaheh J. Neuroprotective Effect of Alcoholic Extract of *Salvia chloroleuca* Against Neuronal Degeneration of Alpha Motoneurons of Anterior Horn Spinal Cord after Sciatic Nerve Injury in Rats. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences* 2014; 20: 151-156.
- 16- Tehranipour M, Kehtarpour M. Evaluation of CNS neuronal density in rats with exogenous cannabis sativa leaves aqueous and alcoholic extracts. *Pharmacology online* 2011; 3: 899-906
- 17- Song G1, Cechvala C, Resnick DK, Dempsey RJ, Rao VL. GeneChip analysis after acute spinal cord injury in rat. *J Neurochem* 2001; 79(4):804-15.
- 18- Pakravan g. The study of NT4 gene expression in axotomized rats. [MSc thesis]. Esfahan university, 2011.
- 19- Terenghi G, McIndoe B. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat* 1999; 194:1-14.
- 20- gholami m. The study of effects of aqueous and alcoholic extracts of *Ziziphus zizyphus* on P53 gene expression in ovarian cancer cells. [MSc thesis]. Zabol university, 2014.
- 21- Blondeau N, Lipsky R.H, Bourourou M, Duncan M.W, Gorelick P.B, Marini A. Alpha-Linolenic Acid: An Omega-3 Fatty Acid with Neuroprotective Properties—Ready for Use in the Stroke Clinic? *Biomed Res Int* 2015; 19.
- 22- Fu L, Doreswamy V. The biochemical pathways of central nervous system neural degeneration in niacin deficiency. *Neural Regen Res* 2014; 9: 1509-1513.
- 23- Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends neurosci* 1991; 14(5):165-70.