

دانشور

پزشکی

بررسی اثر کلستاز و داروی نورواید بر بیان ژن - Bcl-xl در ناحیه هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر

نویسندگان: پژمان مولایی^۱، محمد ناصحی^۲، مهرداد هاشمی^{۱*}

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران،
ایران

E-mail: mhashemi@iautmu.ac.ir

* نویسنده مسئول: مهرداد هاشمی

چکیده

مقدمه و هدف: کلستاز یعنی انسداد در مجرای صفراوی که در طی آن اسیدهای صفراوی سمی در کبد و سیستم‌های گردش بدن تجمع می‌یابد و خاصیت سمیت آن‌ها نیز در هپاتوسیت‌ها افزایش می‌یابد. یکی از پیامدهای کلستاز اثر آن بر روی حافظه است که باعث تخریب حافظه فضایی می‌شود و ناحیه هیپوکمپ نقش اصلی را در عملکرد حافظه ایفا می‌کند. هدف: در این پژوهش، اثرات بیماری کلستاز کبدی بر روی میزان بیان ژن‌های Bcl-xl در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) در ناحیه هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر و همچنین تأثیر داروی نورواید (MLC901) در جهت جلوگیری از ایجاد تغییرات در بیان ژن مذکور بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این کار بر روی ۱۶ سر موش صحرایی نر به وزن ۲۲۰ تا ۲۴۰ گرم انجام شد که به چهار گروه اصلی تقسیم شدند که شامل گروه کنترل (شاهد)، (استرس جراحی) Sham-NeuroAid و BDL (بستن مجرای صفراوی) و BDL-NeuroAid می‌باشند. سپس ناحیه هیپوکمپ استخراج شد و پس از طی مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA، سنجش بیان ژن توسط تکنیک Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS version 20 و آزمون ANOVA یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی با سطح معناداری ($P < 0.05$) آنالیز شدند.

نتایج: نتایج گروه‌های شم-نورواید و BDL-نورواید نشان می‌دهد که داروی نورواید به‌طور معناداری باعث افزایش بیان ژن Bcl-Xl در این گروه‌ها نسبت به گروه کنترل شده است؛ اما تغییر معناداری در بیان ژن Bcl-Xl متعاقب اثر کلستاز در گروه BDL مشاهده نشده است.

نتیجه‌گیری: در مجموع به نظر می‌رسد تیمار با داروی نورواید می‌تواند عوارض منفی کلستاز را به وسیله کاهش آپوپتوز اصلاح کند.

واژگان کلیدی: کلستاز، آپوپتوز، Bcl-Xl، نورواید، هیپوکمپ

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و پنجم-شماره ۱۳۲
دی ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۹/۱۲
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۹

مقدمه

کلستاز^۱ به معنای دقیق یعنی "ساکن ماندن صفرا" که در آن علائم زیادی از قبیل تجمع اسیدهای صفراوی سمی در کبد و سیستم‌های گردش بدن وجود دارد. کلستاز می‌تواند عامل بسیاری از مشکلات از قبیل التهاب^۲، عفونت‌های ویروسی، بیماری‌های خودایمنی، سنگ کیسه صفرا و یا تومورهای پانکراسی، کبدی یا عروق صفراوی شود. منشأ آسیب به سلول‌های کبدی به طور عمده می‌تواند سلول‌های کبدی یا مجراهای منتهی به کبد باشد (۱). صفرا دارای اجزای اصلی است که شامل اسیدهای صفراوی، بیلی روبین، فسفولیپیدها، کلسترول، مواد سنگین و همچنین تعدادی از متابولیت‌ها است (۲، ۳). شکل‌گیری صفرا و نقل و انتقال آن می‌تواند سیستم‌های انتقالی مختلفی را تنظیم کند که عملکرد آن‌ها وابسته به جریان صفراوی است (۴، ۵). جهش‌های ژنتیکی تحریک شونده بر ژن‌های انتقال‌دهنده یا پیدایش پیامدهای کلستاز اثر دارد که این موارد در نتیجه تخریب در متابولیسم و ترشح محتویات به وجود می‌آید (۶). در آسیب‌های کبدی انواع مختلفی از مرگ‌های سلولی شامل: آپوپتوز، نکروز، نکروپتوزیس و اتوفازی ممکن است رخ دهد که آپوپتوز و نکروز دو نوع مهم از مرگ سلولی می‌باشند. آپوپتوز یک مکانیسم کلی برای حذف سلول‌های ناخواسته، پیر یا آسیب‌دیده است. عملکرد آپوپتوز یک نقش بحرانی در موارد فیزیولوژیکی متعدد بر اساس فرآیندهای پاتوفیزیولوژیکی است (۷). آپوپتوز از دو مسیر کلی تشکیل شده است که شامل مسیر داخلی (میتوکندریایی) و یا مسیر خارجی است. در مسیر داخلی پروتئین‌های میتوکندریایی بعد از فعال شدن Bcl-3 که از اعضای خانواده Bcl-2(18q21.33) است آزاد می‌شوند، سپس به پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 متصل می‌شود، طی آن پروتئین‌های میتوکندریایی مانند سیتوکروم C که با APAF-1، پروکاسپاز ۹ و ATP میان‌کنش می‌دهد که به آن آپوپتوزوم می‌گویند. مسیر

دیگر آپوپتوز که مسیر خارجی نامیده می‌شود به وسیله فعالیت و اتصال لیگاند و گیرنده‌های مرگ است که بر اساس Fas، Tnf، Fas و یا گیرنده Trail استوار است (۸). Bcl-XI یک مولکول غشایی در میتوکندری است که یکی از اعضای خانواده Bcl-2 است و با جلوگیری از آزاد شدن محتویات میتوکندری از جمله سیتوکروم C و مهار فعالیت کاسپازها نقش ضد آپوپتوزی دارد (۹). این مکانیسم‌ها به وسیله سیگنال‌های داخلی که بر اساس سیگنال بقا یا مرگی که از محیط نشأت می‌گیرد کنترل می‌شود و در جهت سالم نگاه داشتن تمامیت بافت است. برهم خوردن تعادل آپوپتوز یک مشخصه مهم در اثرات پاتوژنی ناشی از طیف وسیعی از بیماری‌های کبدی است که شامل بیماری‌های اتوایمون، آلودگی‌های ویروسی، آسیب‌های بافتی و یا بدخیمی است (۱۰). نتیجه مشترک همه انواع کلستازها نگهداری اسیدهای صفراوی در کبد است. بالا رفتن سطح اسیدهای صفراوی می‌تواند سلول‌های کبدی را به سمت آپوپتوز و نکروز هدایت کند و سرانجام باعث ایجاد بیماری‌های مزمن کبدی شود. اسیدهای صفراوی از قبیل CDCA می‌تواند باعث القای آپوپتوز سلول‌های کبدی شوند. گیرنده CD95 با سایر کمپلکس‌های پیام‌رسان محرک مرگ سلولی (DISC) و فعالیت کاسپاز ۸ همراه است. (۱۱). بر اساس موضوعات بیان شده در بخش‌های قبل، کلستاز قادر است آسیب‌های جدی را به مغز تحمیل کند و انتظار می‌رود که بتواند سبب القای آپوپتوز در سلول‌های مغزی شود. از این رو در این پژوهش، به بررسی و معرفی داروی نورواید پرداخته می‌شود؛ زیرا این دارو خاصیت محافظت‌کنندگی نورونی دارد (۱۲، ۱۳).

هیپوکمپ یکی از چند منطقه در جمجمه بزرگسالان است، از جمله منطقه تحت بطنی (در جوندگان) و اخیراً نشان داده شده در انسان جسم مخطط که به طور دائم سلول‌های عصبی جدید تولید می‌کند (۱۴)، در یک سوم پایین DG^۳ از هیپوکمپ، لایه‌ی (زیرلایه) دانه

^۱. Cholestasis

^۲. Inflammation

^۳. Dentate gyrus

روش کار

این پژوهش در مرکز ملی مطالعات اعتیاد ایران (INCAS) انجام گرفت. در آزمایش‌ها از موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم که از دانشکده فارماکولوژی دانشگاه تهران تهیه شده؛ استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه تحقیقاتی منتقل شده و در هر قفس چهار سر موش قرار داده شد. در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار گرفت و هر سه روز یکبار قفس موش‌ها تمیز شدند. دما در حیوان‌خانه بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد متغیر بوده است. به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه قبل از جراحی وفق بدهند. در طول یک هفته هر روز حیوان‌ها نوازش^۴ شدند تا در موقع آزمایش استرس ناشی از گرفتن و کار با آن‌ها وجود نداشته باشد. هر حیوان فقط یک بار استفاده شد و در هر گروه چهار حیوان قرار داده شد. تمام آزمایش‌ها در طول روز انجام شدند (۱۷).

گروه‌بندی حیوان‌ها

موش‌های صحرایی به چهار گروه اصلی تقسیم شدند که شامل گروه‌های کنترل، شم-BDL، NeuroAid و BDL-NeuroAid می‌باشند.

مراحل جراحی جهت ایجاد انسداد مجرای صفراوی (BDL^۵)

حیوان‌ها توسط تزریق درون صفاقی^۶ (IP) کتامین^۷ حیوانی ۱۰٪ به میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم بی‌هوش شدند. برای جلوگیری از سفتی عضلات در هنگام بی‌هوشی زایلین^۸ ۲٪ با کتامین به ترتیب با نسبت یک‌به‌پنج قبل از تزریق مخلوط شدند. بعد از بی‌هوشی، حیوان به پشت خوابانیده شده و موهای سطح شکمی، حد فاصل جناغ تا دستگاه تناسلی چیده شد. سپس آن محل توسط الکل ۷۰٪ کاملاً ضد عفونی گشت. با استفاده از تیغ جراحی برشی در زیر جناغ به اندازه ۲ تا ۳ سانتی‌متر ایجاد و بدین ترتیب لایه بیرونی

فرعی (SGL) نوع یک سلول بنیادی عصبی (NSC^۱) منجر به تولید نوع IIb,II a و نوع III سلول پیش ساز عصبی می‌شود (NPC^۲) و نوروبلاست‌ها که به نورون‌های بالغ تبدیل می‌شوند و به لایه سلول‌های گرانول مهاجرت می‌کنند (GCL^۳). این نوع از سلول‌های مختلف را می‌توان با یک الگوی ساده از بیان پروتئین شناسایی کرد (۱۵).

نورواید دارویی است که در طب سنتی، در مناطقی نظیر چین، جنوب شرق آسیا و خاورمیانه مورد استفاده قرار می‌گرفته است. گزارش‌ها نشان داده‌اند این دارو اثرات مفیدی بر بیماری‌هایی که دچار سکنه مغزی شده بودند، گذاشته است. به خصوص اینکه عوارض پس از سکنه را کاهش می‌دهد. نورواید دارای دو نوع MLC901 و MLC601 است (۱۳). MLC601 مرکب از ۹ ترکیب گیاهی و ۵ ترکیب جانوری است؛ درحالی‌که MLC901 تنها از ترکیبات گیاهی تهیه شده است (۱۶).

Heurteaux و همکاران با بررسی‌های خود نشان دادند که داروی نورواید، عوارض ناشی از ایسکمی را در مغز مدل‌های جوندگان کم کرده و سبب زنده ماندن آن‌ها پس از سکنه مغزی می‌شود. همچنین آن‌ها ثابت کردند که این دارو باعث جلوگیری از مرگ و افزایش تکثیر سلول‌های عصبی در نمونه‌های سلولی انسان و جوندگان می‌شود (۱۳).

در تحقیق دیگری، Quintard و همکاران (۲۰۱۴) بر روی اثر داروی نورواید (MLC901) در موش‌های صحرایی که دچار آسیب مغزی شده بودند، به تحقیق پرداختند. آن‌ها مدل‌های موشی این آزمایش را دچار جراحی مغزی کردند و دو ساعت بعد از ایجاد جراحی، داروی MLC901 را به آن‌ها تزریق کردند. نتایج به دست آمده نشان داد که MLC901 دارای فعالیت‌های نوروپروتکتیو و ترمیم‌کننده نورونی است (۱۲).

4. Handling

5. Bile duct ligation

6. Intra peritoneal injection

7. Ketamine

8. Xylazine

1. Neural stem cells

2. Neuralprogenitor cells

3. Granule cell layer

وارد آوردن استرس جراحی به این موش‌ها تمام مراحل جراحی فوق تکرار شد؛ به استثنای انسداد مجرای صفراوی که این عمل انجام نگرفت.

طرز تهیه محلول‌های دارویی

پیش از تزریق‌ها، محتوای درون کپسول نورواید در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد استریل (سالین) حل شد (۱۲). از محلول به‌دست‌آمده جهت تزریق به زیرگروه‌های شم-نورواید و BDL-نورواید استفاده شد. دز دارو ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که به‌وسیله ترازوی دیجیتال توزین شد. به ازای هر ۱cc از حلال (سالین)، ۴mg از محتوای کپسول نورواید به آن اضافه گردید و سپس توسط دستگاه ورتکس^۳ تکان داده شد تا محلول نسبتاً یکنواختی به دست آید. لازم به ذکر است تهیه محلول برای هر نوبت تزریق یک ساعت قبل از آن انجام شد و محلول به‌دست‌آمده صرفاً در همان روز استفاده می‌شد و به دلیل جلوگیری از کاهش اثرات آن در روزهای دیگر مورد استفاده قرار نگرفت.

تزریق دارو و سالین

برای تزریق از سرنگ انسولین استفاده شد. برای زیرگروه‌های شم-نورواید و BDL-نورواید به ازای هر یک کیلوگرم وزن حیوان، میزان ۱cc دارو و برای زیرگروه‌های شم-سالین و BDL-سالین، ۱cc سالین به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۱۷). پیش از تزریق، حیوان‌ها ابتدا به مدت یک دقیقه مورد نوازش قرار گرفتند تا از میزان استرس واردشده به آن‌ها کاسته شود. همچنین برای در دست گرفتن موش در هنگام تزریق از یکپارچه یا حوله نرم استفاده شد.

* تمامی تزریق‌ها از روز بعد از جراحی آغاز و به صورت یک روز در میان تا ۲۸ روز پس از جراحی (۱۴ تزریق) ادامه یافت.

استخراج مغز و جداسازی ناحیه هیپوکمپ

یک روز پس از آخرین تزریق، ناحیه مورد نظر (هیپوکمپ) استخراج شد. تمام مراحل برش و جدا کردن ناحیه هیپوکمپ بر روی یخ صورت گرفت. پس از مشخص کردن هیپوکمپ‌های مربوط به هر گروه،

سطح شکمی حیوان شکافته شد. سپس لایه درونی نیز به همین روش و به کمک قیچی جراحی برش زده شد. در این مرحله کبد قابل مشاهده بود. با استفاده از برنیشر^۱ و انگشتان دست، کبد به آرامی بیرون آورده شده و در ناحیه فوقانی بر روی قفسه سینه حیوان قرار داده شد. در مرحله بعد با بهره‌گیری مجدد از برنیشر مجرای صفراوی مشترک بالا آورده شده و رگ خونی متصل به آن نیز جدا گشت. با استفاده از نخ بخیه استریل غیر جذبی، دو گره در دو نقطه از مجرا زده شده و حد فاصل بین این دو گره با استفاده از قیچی برش زده شد تا از صحت قطع جریان صفراوی اطمینان حاصل شود (۱۷). سپس به آرامی کبد و احشای حیوان بر سر جای خود بازگردانده شدند. در تمامی مراحل بالا تلاش شده بود که از برخورد وسایل جراحی به اندام‌های احشایی از جمله کبد اجتناب به عمل آید؛ زیرا در غیر این صورت باعث بروز خونریزی داخلی و مرگ حیوان می‌شد. پس از قرار گرفتن اندام‌ها در درون بدن، با استفاده از الکل ۷۰٪ و پنبه استریل تمام سطح برش خورده ضد عفونی گردید. در ادامه با بهره‌گیری از نخ بخیه استریل ۰/۲، بخیه‌ها به صورت ممتد^۲ (به اصطلاح بیس‌بالی) زده شدند. پس از اتمام بخیه زدن دو لایه سطح شکمی، محل زخم با الکل و سپس بتادین کاملاً ضد عفونی شده و جهت بازگرداندن حیوان به حالت همئوستاتیک و جبران خون ازدست‌رفته و استرس وارده، به مقدار ۱۰۰ واحد انسولین، سرم فیزیولوژی به صورت IP تزریق گردید. در ادامه هر کدام از حیوان‌ها به صورت جداگانه در قفس‌های پلاستیکی قرار داده شدند تا به سطح هوشیاری کامل برسند. پس از رسیدن موش‌ها به این سطح از هوشیاری، درون قفس‌های اصلی که هر کدام مخصوص نگهداری چهار سر حیوان بود، قرار داده شدند.

وارد آوردن استرس جراحی

این عمل در موش‌های گروه شم انجام گرفت. برای

^۱. Burnisher

^۲. Runing

^۳. Vortex

و UCSC به دست آمده و سپس با استفاده از این سکانس‌ها، یک جفت پرایمر جهت انجام واکنش‌های Real time PCR برای این دو ژن طراحی شد. برای جلوگیری از تکثیر ژنوم در طی واکنش، پرایمر Forward ژن Bcl-XI از محل اتصال اگزونی^۴ انتخاب شد. در آخر پرایمر طراحی شده و به دست آمده، توسط نرم افزار GENE RUNNER مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز انجام شده نشان دهنده عدم همولوژی پرایمر با مناطق ژنومی و رونوشت‌های دیگر و همچنین عدم ایجاد ساختار دوم در این پرایمر بود.

جدول ۱. سکانس پرایمرهای مربوط به ژن‌های

Bcl-XI و GAPDH

نام ژن	سکانس پرایمر 5'-3'	طول لفظه تکثیر کننده	طول پرایمر
GAPDH	F: AAGTTCACGGCACAGTCAAGG R: CATACTCAGCACCAGCATCACC	121	F: 22 R: 22
BCL-XL	F: GCTGGTGGTTGACTTCTCTCC R: GGCTTCAGTCTGTTCTCTCG	91	F: 22 R: 22

پلیت Real Time PCR را در ABI StepOnePlus Real Time PCR قرار داده و برنامه مورد نظر در دستگاه تنظیم و واکنش شروع شد. این دستگاه دارای یک پلیت ۹۶ خانه‌ای است. طراحی پلیت به گونه‌ای انجام گرفت که از هر نمونه به صورت دو تکراری، جهت افزایش دقت، استفاده شد. جداسازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه، تکثیر در ۴۰ سیکل که شامل جداسازی در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۴°C به مدت ۶۰ ثانیه صورت گرفت.

نمونه‌ها فوراً به تانک نیتروژن مایع انتقال داده شدند. نمونه‌ها بعد از گذشت ۲۴ ساعت و رسیدن به دمای انجماد و فیکس شدن، در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

* لاشه موش‌های کشته شده نیز درون کیسه‌های نایلونی قرار داده شده و به فریزر ۴۰- انتقال داده شدند تا بر طبق دستورالعمل مرکز تحقیقاتی دفع شوند.

Real-Time Pcr

جهت انجام بخش ژنتیکی (مولکولی) پروژه، از هر گروه موش صحرایی دو نمونه ناحیه چپ و دو نمونه ناحیه راست هیپوکمپ (چهار نمونه از هر گروه)، به صورت تصادفی انتخاب گردید تا نتایج به صورت کلی در هر دو ناحیه مورد بررسی قرار گرفته باشد.

استخراج RNA از بافت

ابتدا نمونه‌ها از فریزر ۸۰- خارج شده و جهت هموژنیزه شدن هر کدام از آن‌ها به صورت جداگانه روی پلیتی قرار گرفتند. پس از هموژنیزه شدن بافت‌ها توسط تیغ اسکالپل، هر نمونه داخل یک ویال فاقد RNase و Dnase به حجم ۱/۵ml با استفاده از تریزول (کیازول-شرکت کیاژن آلمان) قرار داده شد. در انتها ۳µl از RNA جهت بررسی کیفیت توسط دستگاه نانودراپ، برداشته شد. جهت بررسی خلوص و غلظت RNA های استخراج شده، OD^۱ آن‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر^۲ (NanodropBioTek Epoch آمریکا) در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ اندازه‌گیری شد.

سنتز cDNA از RNA های استخراج شده

RNA های استخراج شده از فریزر ۸۰- بیرون آورده شده و یکسان‌سازی غلظت برای آن‌ها صورت گرفت. حجم RNA ورودی به کیت cDNA معادل ۱۵۰۰ng/µl بود. به طور مثال از RNA با غلظت ۵۰۰ng/µl حجم ۳µl برای ورودی کیت سنتز cDNA استفاده شد. سپس به RNA، DDW اضافه می‌شود تا به حجم ۹µl برسد.

طراحی و BLAST^۳ پرایمرهای Real Time PCR

در این مطالعه، Bcl-XI به عنوان ژن هدف جهت بررسی بیان و GAPDH به عنوان ژن رفرنس انتخاب شدند. سکانس ژن Bcl-XI از پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI

^۱ Optical Density

^۲ Spectrophotometer

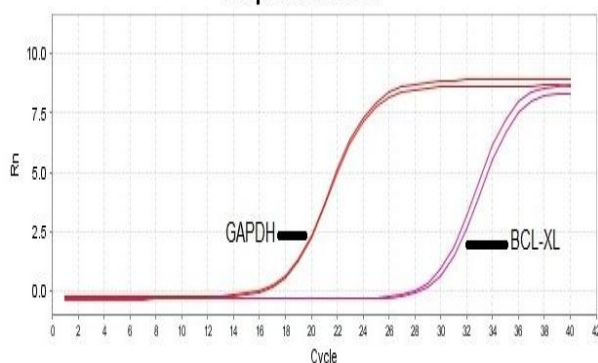
^۳ Basic Local Alignment Search Tool

^۴ Exon junction

استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 نمودار مربوط به بیان ژن رسم شد.

تفسیر داده‌ها نشان می‌دهد تیمار با داروی نورواید باعث افزایش بیان ژن Bcl-X1 می‌شود که نقش ضد آپوپتوزی دارد؛ و می‌توان با استناد به نتایج به دست آمده تا حدودی این استدلال را داشت که تیمار با داروی نورواید می‌تواند سبب افزایش بیان در ژن‌های ضد آپوپتوزی شود که در نتیجه منجر به مهار آپوپتوز ناشی از کلستاز در ناحیه هیپوکمپ گردد.

Amplification Plot

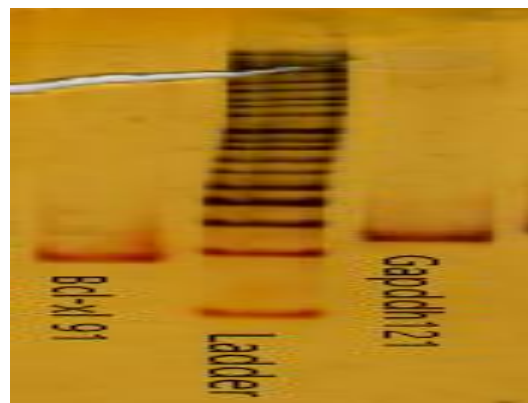


نمودار ۱. تکثیر ژن‌های BCL-XL و GAPDH به صورت دوبار تکرار

جدول ۲. مقایسه گروه‌های مختلف از لحاظ معنادار بودن ($P < 0.05$)

ارزش P	نسبت بیان ژن بین دو گروه	مقایسه گروه‌های مختلف نسبت به همدیگر
$P > 0.05$	۰/۸۴۱	BDL نسبت به کنترل
$P < 0.001$	۴/۰۰۰	BDL-نورواید نسبت به کنترل
$P < 0.001$	۴/۷۵۷	BDL-نورواید نسبت به BDL
$P < 0.05$	۱/۰۰۰	شم-نورواید نسبت به کنترل

در تجزیه و تفسیر داده‌های فوق نتایج گروه کنترل یک در نظر گرفته شده است.



شکل ۱. نتیجه PAGE^۱ برای تکثیر نمونه کنترل با پرایمرها.

اعداد نشان دهنده طول قطعات تکثیر شده بر حسب جفت باز است.

نتایج

دو روز پس از جراحی انسداد مجرای صفراوی، حیوانات علائم آشکار کلستاز شامل زردی گوش و پوست بدن و ادرار تیره را نشان دادند که این علائم در روزهای بعد تداوم داشت. برای انجام Quantitative Real-time PCR پس از استخراج RNA و غلظت سنجی، cDNA تولید، پرایمرهای مربوط طراحی، سنتز و برای هر نمونه دو بار تکرار PCR انجام گرفت. در پایان واکنش به منظور تأیید تکثیر محصول مورد نظر PCR، منحنی ذوب (Melting curve) محصول واکنش رسم شد. پس از اتمام واکنش، برای هر واکنش PCR یک نمودار تکثیر (Amplification curve) رسم شد. سپس بر اساس آن Cycle Threshold (Ct) تعیین شد (سیکلی که در آن منحنی PCR خط Threshold را قطع می‌کند) و در نهایت منحنی استاندارد واکنش به صورت خطی و بر اساس Ct و لگاریتم غلظت DNA رسم شد. با تعیین Ct و با استفاده از روش آنالیز $\Delta\Delta Ct$ ، نسبت کپی اولیه در نمونه‌های مورد مطالعه مشخص شد. به طوری که:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct, \text{ test gene} - Ct, \text{ reference gene}) - (Ct, \text{ test gene} - Ct, \text{ reference gene})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

نمونه نرمال و نمونه تیمار

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol20 و آزمون ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی توکی با سطح معناداری ($P < 0.05$) آنالیز شدند (محاسبه P value)؛ و با

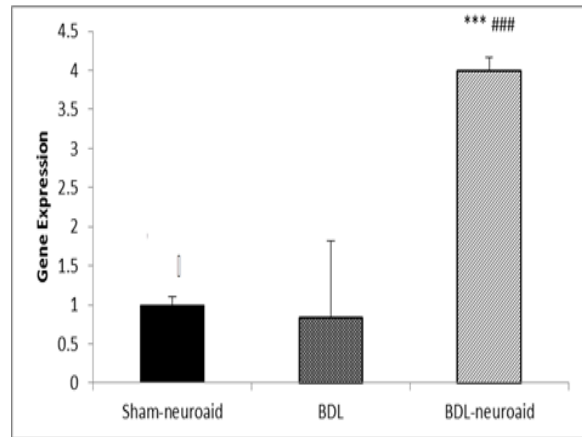
^۱. Polyacrylamide gel electrophoresis

صفراوی در کبد است که می‌تواند عامل التهاب و فیبروز شود که این عمل را با القاء سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها انجام می‌دهد (۱۸). جهش‌های ژنتیکی تحریک شونده بر ژن‌های انتقال‌دهنده یا پیدایش پیامدهای کلستاز اثر دارد که این موارد در نتیجه تخریب در متابولیسم و ترشح محتویات به وجود می‌آید (۶).

Chan و همکاران برای مطالعه اثر نورواید بر روی نوروژن سلول‌های عصبی انسان، تأثیر MLC901 را بر سلول‌های پیش ساز عصبی (NPC¹) انسانی که در حال تمایز عصبی بودند بررسی کردند. داده‌های به‌دست‌آمده نشان‌دهنده تنظیم بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای عملکردی به وسیله MLC901 بود. این پژوهش توانست برخی از ژن‌های هدف قابل توجه این دارو و مکانیسم احتمالی فعالیت آن را نشان دهد. ژن‌های هدف MLC901 که توسط Chan و همکاران تعیین شد شامل FGF19، GALR2، MMP10، FGF3 و TDO2 می‌باشند (۱۶).

مهار آپوپتوز به‌وسیله کاهش سطح اسیدهای صفراوی آب‌گریز صورت می‌پذیرد (۲۰، ۱۹). بر اساس مطالعه رودریگو و همکاران تیمار کردن موش صحرایی با دئوکسی کولیک اسید، آپوپتوز را در سلول‌های کبدی افزایش می‌دهد. درحالی‌که UDCA این عمل را مهار می‌کند. اسیدهای صفراوی سمی از قبیل CDCA آپوپتوز را در سلول‌های کبدی با تحریک گیرنده CD95 و کمپلکس پیام‌رسان افزایش مرگ (DISC) که با فعال‌سازی کاسپاز ۸ همراه است را تحریک می‌کند. سپس کاسپاز ۸، نفوذپذیری غشای میتوکندری (MMPT) را افزایش می‌دهد که آن را در جهت فعال‌سازی کاسپازهای اجرایی و القای آپوپتوز هدایت می‌کند. به علاوه UDCA غشای میتوکندری را تثبیت و MMPT را مهار می‌کند که در نتیجه مانع از القای آپوپتوز می‌شود (۲۲، ۲۱).

بنابراین گفته می‌توان اهداف دارویی را برای درمان کلستاز پیگیری نمود. تحریک متابولیسم اسیدهای



نمودار ۲. نسبت بیان ژن Bcl-xl در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل

نتایج نشان داده‌شده در نمودار ۲ بیان‌گر این موضوع است که داده‌های به‌دست‌آمده در دو گروه شم-نورواید و BDL اختلاف معناداری با گروه کنترل ندارد و بدان معنی است که عامل استرس جراحی توأم با داروی نورواید و همچنین کلستاز اثر چندانی بر بیان ژن BCL-XL در ناحیه مورد نظر ندارد اما هنگامی که گروه کلستاتیک با داروی نورواید تحت تیمار گرفتند بیان ژن BCL-XL نسبت به دو گروه کنترل و BDL به طرز کاملاً معناداری افزایش یافته است.

بحث

در این پژوهش، اثرات بیماری کلستاز کبدی بر بیان ژن Bcl-xl در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوز) در ناحیه هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر و همچنین تأثیر داروی نورواید (MLC901) در جهت جلوگیری از تغییرات در بیان ژن مذکور بررسی شد؛ و نتایج حاصله حاکی از آن است که تیمار با داروی نورواید روند قابل قبولی در افزایش بیان ژن BCL-XL در گروه کلستاتیک داشته است و در سایر گروه‌های مورد مطالعه تغییرات قابل توجهی صورت نگرفته است و همان‌طور که ذکر شد این ژن نقش مهمی در روند مرگ سلولی دارد.

با توجه به مطالعات انجام‌شده مراحل پیشرفته‌تر انسداد صفرا می‌تواند سلول‌های کبدی را به سمت آپوپتوز و نکروز و به‌طور کلی بیماری کلستاز مزمن هدایت کند. در حقیقت بیماری کلستاز، تجمع اسیدهای

¹. Neural progenitor cells

ایجادشده توسط افزایش سمیت در مراحل پیشرفته کلستاز و مهار فیروزه به وجود آمده ناشی از اسیدهای صفراوی می‌تواند از اهداف درمانی باشد (۱۱).

صفراوی هیدروفوبیک و سایر ترکیبات سمی به سمت آب دوست شدن که دارای خاصیت سمی کمتری هستند. همچنین محافظت از کلانژیوسیت‌ها که علیه اثرات سمی صفراوی عمل می‌کنند. مهار آپوپتوز

منابع

1. Shaffer EA. Cholestasis: the ABCs of Cellular mechanisms for impaired bile secretion-transporters and genes. *Canadian Journal of Gastroenterology* 2002;16(6):380-9.
2. Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Journal of Hepatology* 1991;14(3):551-66.
3. Keely SJ, Scharl MM, Bertelsen LS, Hagey LR, Barrett KE, Hofmann AF. Bile acid-induced secretion in polarized monolayers of T84 colonic epithelial cells: Structure-activity relationships. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007;292(1):G290-7.
4. Wagner M, Zollner G, Trauner M. New Molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *Journal of Hepatology* 2009;51(3):565-80.
5. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *The New England Journal of Medicine* 1998;339(17):1217-27.
6. Khalaf R, Phen C, Karjoo S, Wilsey M. Cholestasis beyond the neonatal and infancy periods. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition* 2016;19(1):1-11.
7. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267(5203):1456-62.
8. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling*. 2004;16(2):139-44.
9. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends in Genetics*:1995;11(3):101-5.
10. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Seminars in Liver Disease* 1998;18(2):105-14.
11. Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(28):4445-51.
12. Quintard H, Lorivel T, Gandin C, Lazdunski M, Heurteaux C. MLC901, a Traditional Chinese Medicine induces neuroprotective and neuroregenerative benefits after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 2014;277:72-86.
13. Heurteaux C, Gandin C, Borsotto M, Widmann C, Brau F, Lhuillier M, et al. Neuroprotective and neuroproliferative activities of NeuroAid (MLC601, MLC901), a Chinese Medicine, in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 2010;58(7):987-1001.
14. Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 2014;156(5):1072-83.
15. Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2015;7(9):a018812.
16. Quintard H, Borsotto M, Veysiere J, Gandin C, Labbal F, Widmann C, et al. MLC901, a Traditional Chinese Medicine protects the brain against global ischemia. *Neuropharmacology* 2011;61(4):622-31.
17. Reza Zarrindast M, Eslimi Esfahani D, Oryan S, Nasehi M, Torabi Nami M. Effects of dopamine receptor agonist and antagonists on cholestasis-induced anxiolytic-like behaviors in rats. *European Journal of Pharmacology* 2013;702.
18. Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *The American Journal of Gastroenterology* 2004;127(1):261-74.
19. Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *The American Journal of Gastroenterology* 2005;129:2009-2031.
20. Yoon JH, Gores GJ. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *Journal of Hepatology* 2002; 37: 400-410.
21. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A Novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101: 2790-2799.
22. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Molecular Medicine* 1998; 4: 165-178.

The effect of cholestasis and neuroAID treatment on Bcl-xl gene expression in hippocampus of male rats

Pezhman Molaee¹, Mohammad Nasehi², Mehrdad Hashemi^{1*}

1. Department of Genetics, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Cognitive and Neuroscience Research Center (CNRC), Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* Corresponding author e-mail: Drmehashemi@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Cholestasis is bile duct obstruction with accumulation of toxic bile acids in liver and circulatory systems and increased toxicity in hepatocytes. Some studies have shown that cholestasis induces spatial memory deficit. Hippocampus plays an important role in this process. In this research, the effect of cholestasis on expression of BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large as genes in apoptosis further) in hippocampus of male rat was assessed. Moreover, the preventive effect of neuroAID (MLC901) on above-mentioned changes regarding gene expression was also evaluated.

Materials and Methods: This project was done on 16 rats weighing 220-240 g, which were divided into three main groups including control, sham and BDL (Bile Duct Ligation). Thereafter, hippocampus region was extracted and the expression level of genes were assessment by Real-Time PCR. Results were analyzed using one-way ANOVA followed by a Tukey test. Significant level was 0.05.

Results: The results of sham-NeuroAID & BDL-NeuroAID groups indicate that NeuroAID significantly increases the expression level of Bcl-Xl gene in comparison with control group. In addition, there was no significant change for subsequent effect of cholestasis in the expression level of Bcl-Xl gene in BDL group.

Conclusion: Results of the current study indicates that NeuroAID can alter negative effect of cholestasis by decreasing apoptosis phenomenon.

Keywords: Cholestasis, Apoptosis, Bcl-Xl, NeuroAID, Hippocampus