



بررسی بیان ژن Bax در مخچه موش‌های صحرایی کلاستیک تجربی، متعاقب اثر داروی نورواید

افسانه کریمی انچه^۱، مهرداد هاشمی^{۱*}، محمد ناصحی^۲

^۱ گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* Email: drmehashmi@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۷

چکیده

کلستاز از جمله بیماری‌های کبدی است که از لحاظ عملکردی با کاهش یا قطع جریان صفرا همراه می‌باشد و باعث تجمع اسیدهای صفراوی در خون می‌شود، در صورت عدم درمان، کلستاز سبب آسیب به اندام‌های مختلف می‌گردد. در این تحقیق تأثیر کلستاز بر بیان ژن Bax که در روند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوز) مؤثر است، بررسی شد. تعداد ۱۶ سر رت نر به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل یا شاهد، گروه BDL. در این گروه مجرای صفراوی به شکل مصنوعی بسته شد، گروه BDL نوراید: در این گروه علاوه بر بستن مجرای صفراوی، رت‌ها با داروی نوراید نیز تیمار شدند، گروه شم نوراید: در این گروه علاوه بر اینکه رت‌ها تحت استرس جراحی قرار گرفتند داروی نوراید نیز دریافت نمودند. سپس مخچه‌ی رت‌ها خارج شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن‌ها با فن‌آوری Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. BDL باعث افزایش بیان ژن Bax و استفاده از داروی نوراید باعث کاهش بیان ژن Bax در ناحیه‌ی مخچه رت‌ها شد. تغییرات ایجاد شده توسط کلستاز در جهت افزایش آپوپتوز در ناحیه‌ی مخچه‌ی رت‌ها می‌باشد و استفاده از داروی نوراید می‌تواند باعث کاهش آپوپتوز در مخچه‌ی رت‌ها شود.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، رت (موش‌های صحرایی)، ژن Bax، کلستاز، مخچه، نوراید.

مقدمه

به‌ویژه اسیدهای صفراوی که در غلظت‌های بالا، سمی هستند منجر به بیماری مزمن کبدی و خارج کبدی می‌شود. با پیشرفت فیروز صفراوی، سیروز ایجاد شده و باعث نابودی کبد می‌شود و نیاز به پیوند کبدی ایجاد می‌گردد [۱۷، ۲۸، ۳۴، ۵۴]. کلستاز بر بسیاری از

کلستاز یک بیماری شدید کبدی در انسان و جوندگان است [۴۱، ۴۷] که از لحاظ عملکردی با کاهش جریان صفرا همراه است و باعث تجمع نمک‌های صفراوی در بدن می‌شود. [۵۰] انباشته شدن این مواد

است که اساساً در غشای خارجی میتوکندریایی قرار دارد نوزده عضو از خانواده Bcl-2 در پستانداران شناسایی شده است. این خانواده چهار موتیف حفاظت شده BH1-BH2-BH3-BH4 دارد. که با توجه به فعالیت و ساختار به سه دسته تقسیم شده‌اند:

(۱) اعضای آنتی آپوپتوز که شامل حداقل دو موتیف حفاظت شده هستند Bcl-XL, Bcl-2 و غیره

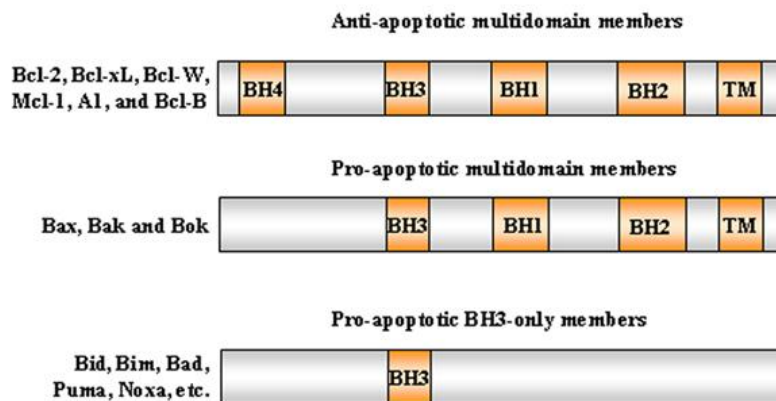
(۲) اعضای پرو آپوپتوز که شامل چهار دسته حفاظت شده هستند Bax, Bak و غیره.

(۳) شامل Bad, Bin, Bik و غیره هستند. این گروه تنها دارای موتیف حفاظت شده BH3 بوده و این ناحیه برای القای خاصیت کشندگی کافی و ضروری است [۳۹].

دستگاه‌های بدن مانند قلب و عروق [۲۹]، مغز [۱۲،۲۵،۲۶،۲۷،۳۸]، کلیه [۱۰]، سیستم ایمنی [۴۹] تأثیر می‌گذارد. انسفالوپاتی کلستاتیک در نتیجه تجمع بیلی روبین کونژوگه و اسیدهای صفراوی آب‌گریز در مغز به وجود می‌آید. [۴۸] همچنین اختلالات شناختی، یادگیری، حافظه، درک فضایی اشیا از عواقب کلستاز است [۱۵،۳۳،۴۰،۵۵]. مشخص شده است موش‌های کلستاتیک در آزمایش واترز ضعیف‌تر عمل می‌کنند [۲۳].

مولکول Bcl-2 (شکل ۱) ابتدا به‌عنوان پروتوانکوژن^۱ در لنفومای فولیکولار سلول‌های B شناسایی شد. سپس این مولکول به‌عنوان همولوگ پستانداری یکی از اعضای اصلی در آپوپتوز C. elegans معرفی شد. Bcl-2 یک پروتئین غشایی

شکل ۱. دمین‌های موجود در پروتئین‌های پروآپوپتوز و آنتی آپوپتوز



می‌کند. [۴۴] بسته به این‌که پیام مرگ از چه طریقی به سلول ابلاغ شود، مسیر فعال‌سازی مرگ سلولی متفاوت است. اگر پیام‌ها داخلی باشند، اولین اندامک فعال شده میتوکندری خواهد بود و اگر پیام از طریق رسپتورهای سطحی سلولی بیان شود، انتقال پیام از

اعضای آنتی آپوپتوز و پرو آپوپتوز به‌صورت هترو دایمر درمی‌آیند و اعمال یکدیگر را معین می‌کنند. غلظت‌های مشابه وابسته آن‌ها مانند یک تنظیم‌کننده قوی برای برنامه مرگ سلولی عمل

² BCL2-associated X

¹ Proto-oncogene

مخچه به دلیل اینکه تحریک الکتریکی در آن هیچ‌گونه احساسی تولید نکرده و بندرت موجب حرکت می‌شود، یک ناحیه ساکت مغز خوانده شده است. با این وجود، حذف مخچه موجب غیرطبیعی شدن شدید حرکات می‌گردد. مخچه همچنین برای کنترل فعالیت‌های عضلانی بسیار سریع از قبیل دیدن، ماشین‌نویسی، نواختن پیانو و حتی صحبت کردن اهمیت حیاتی دارد [۱].

مخچه به برنامه‌ریزی متوالی فعالیت‌های حرکتی کمک کرده و فعالیت‌های حرکتی بدن را مرتباً کنترل می‌کند و تنظیم‌های اصلاحی را در آن‌ها انجام می‌دهد به طوری که این حرکات با سیگنال‌های حرکتی که از طرف قشر حرکتی و سایر قسمت‌های مغز دیکته می‌شوند مطابقت پیدا کند [۸].

آسیب به مخچه موجب فلج هیچ عضله‌ای نمی‌شود، ولی موجب ناهمگام شدن کامل فعالیت‌ها بدنی می‌گردد [۸].

با توجه به تأثیرات کلستاز بر تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوز در سلول‌های قلبی و کبدی، این فرضیه ایجاد می‌شود که بیماران مبتلا به کلستاز در بافت‌های مغزی و مخچه نیز دچار تغییرات بیان ژن‌های آپوپتوز می‌شوند.

در این پژوهش با بررسی بیان یک ژن دخیل در مسیر آپوپتوز (Bax) بروز و افزایش میزان آپوپتوز و نیز تأثیر داروی نورواید (MLC901) در جلوگیری از بیان ژن Bax و در نتیجه کاهش عوارض احتمالی کلستاز بر بخش مخچه (ایجاد آپوپتوز) بررسی می‌شود.

در کشورهای مختلف جهان مطالعات بسیاری در خصوص کلستاز و اثرات آن بر کبد و دیگر بافت‌های بدن از جمله مغز و کلیه و قلب صورت گرفته است.

طریق مولکول‌های سازگار کننده (Adaptor) به آبشار کاسپازی خواهند رسید. میزان مرگ سلولی القاشده توسط رسپتورها شدیدتر از مسیر میتوکندریایی است پروتئین BAX از طریق شرکت در مرحله شکل‌دهی مجاری و نفوذپذیری میتوکندریایی از طریق آزادسازی سیتوکروم c (مسیر داخلی) در وقوع آپوپتوز نقش دارد [۵].

نوراید ترکیبی از محصولات طبیعی می‌باشد که در طب سنتی، در مناطقی نظیر چین، جنوب شرق آسیا و خاورمیانه مورد استفاده قرار می‌گرفته است و خاصیت بهبود بخشی آن پس از صدمات عصبی مانند آسیب‌های پس از سکنه مغزی به اثبات رسیده است [۲۲،۵۱]. همچنین این دارو دارای خاصیت محافظت، تکثیر و ترمیم نورونی است [۱۳،۳۷،۵۲]. نورواید دارای دو نوع MLC901 و MLC601 می‌باشد [۲۱] MLC601 مرکب از ۹ ترکیب گیاهی و ۵ ترکیب جانوری است؛ ترکیبات گیاهی آن عبارت از *radix astragali*, *radix salviaemitorrhizae*, *radix paeoniae rubrae*, *rhizoma chuanxiong*, *radix angelicae sinensis*, *Carthamus tinctorius*, *Prunus persica*, *radix polygalae* and *rhizoma acori tatarinowii* و ترکیبات جانوری آن عبارت است از *Hirudo*, *Eupolyphaga seu Steleophaga*, *calculus bovis artifactus*, *Buthus martensii* and *Cornu saigae tataricae* می‌باشد در حالی که MLC901 دارای فرمول ساده‌تر می‌باشد و تنها از ترکیبات گیاهی تهیه شده است [۲۲،۳۶].

آپوپتوز هپاتوسیت‌ها تقریباً به‌عنوان اساس همه بیماری‌های حاد و مزمن کبدی شناخته شده است؛ که البته مکانیسم آن پیچیده و وابسته به عوامل متعدد می‌باشد [۱۸]. استرس اکسیداتیو یکی از عوامل مؤثر در آپوپتوز هپاتوسیت‌ها و ایجاد آسیب کبدی در کلستاز است [۲].

(۲۰۱۳) روی مخچه‌ی رت‌هایی که تحت عمل BDL قرار گرفته بودند، مشخص شد که کلاستاز باعث ایجاد اختلالات پیش‌رونده شدید ساختمانی و متابولیک در سلول‌های پورکنژ مخچه می‌شود و طی ۱۰ الی ۲۰ روز به حداکثر خود می‌رسد و باعث مرگ در سلول‌های پورکنژ و در نتیجه کاهش تعداد آن‌ها می‌شود. در سیتوپلاسم این سلول‌ها کاهش فعالیت‌های دهیدروژناز سوکسینات، NADH-دیافوراز، گلوکز-۶-دهیدروژناز همراه با کاهش محتوای RNA و فعال شدن لاکتات دهیدروژناز و اسید فسفاتاز گزارش شده است [۱۱].

بر اساس تحقیقاتی از Chae و همکاران [۳۲]، Hayashi و همکاران [۲۰]، Ruiz-Gaspa و همکاران [۴۲] در زمینه‌ی ژن‌های Bax و Bcl-2 ثابت کرده‌اند که تغییرات بیوشیمیایی حاصل از کلاستاز باعث افزایش بیان BAX و کاهش Bcl-2 در سلول‌هایی نظیر ماهیچه صاف، نورون‌ها و استئوبلاست‌ها می‌شوند. تحقیق حاضر نیز تغییرات معنی‌داری (افزایش) را برای بیان ژن Bax در گروه کلاستاتیک [۷].

همچنین پژوهش‌های فراوانی در خصوص اثرات داروی نورواید بر سلول‌های عصبی انجام شده است [۶،۲۱،۲۲،۳۶] ولی در هیچ‌یک از این تحقیقات به تأثیر داروی نورواید بر بیان ژن Bax که تحت تأثیر کلاستاز قرار گرفته‌اند، پرداخته نشده بود. به این دلایل بر آن شدیم پژوهش پیش رو را شکل دهیم.

مواد و روش‌ها

در آزمایش‌ها از رت نر نژاد ویستار به وزن ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم که از دانشکده فارماکولوژی دانشگاه تهران تهیه شد؛ استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان خانه تحقیقاتی منتقل شده و در هر قفس چهار سر موش

مقاله‌های زیادی در مورد این اختلال و اثرات مخرب آن بر کبد و اندام‌های مورد مطالعه منتشر شده است [۱۷،۲۶،۲۸،۳۴،۵۴،۵۵]. اما تاکنون پژوهشی در مورد عملکرد کلاستاز بر آپوپتوز سلول‌های مخچه مغز انجام نگرفته است. - Serviddio و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعات خود مشاهده کردند در طول کلاستاز مزمن، تجمع اسیدهای صفراوی آب‌گریز سمی در سلول‌های کبدی، باعث ایجاد تغییرات قابل‌توجهی در وضعیت اکسیداتیو و عملکرد میتوکندریایی می‌شود [۴۶]. Le Sueur- و همکارانش (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای مشاهده نمودند که در موش‌های BDL شده ایجاد انسفالوپاتی کبدی می‌شود و ۲۱ روز پس از جراحی BDL، افزایش اضطراب و اختلالات روانی و کاهش حافظه در آن‌ها ایجاد شده است که احتمالاً به دلیل افزایش میزان آمونیاک خون می‌باشد [۳۰].

Paumgartner- و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند: در تمام انواع کلاستاز به دلیل انباشته شدن اسیدهای صفراوی در کبد و بالا رفتن سطح اسیدهای صفراوی سلول‌های کبدی دچار آپوپتوز و نکروز می‌شوند و سرانجام باعث ایجاد بیماری‌های مزمن کبدی از قبیل سیروز می‌شود. اسیدهای صفراوی از قبیل CDCA^۱ می‌توانند باعث آپوپتوز سلول‌های کبدی شوند. گیرنده CD95 با سایر کمپلکس‌های پیام‌رسان محرک مرگ سلولی (DISC) و فعالیت کاسپاز ۸ همراه است. کاسپاز ۸ باعث افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندریایی MMPT^۲ می‌شود که سایر کاسپازهای اثرگذار فعال می‌شوند و آپوپتوز رخ می‌دهد [۳۵].

- در تحقیقی که توسط Emel'ianchik و همکاران

^۱ Chenodeoxycholic Acid

^۲ Mitochondrial Membrane Permeability Transition

و با بخیه‌های ممتد^۱ شکم بسته شد. در گروه شم - نورايد پس از مشخص شدن مجرای مشترک صفراوی و دست‌کاری بدون بستن مجرای صفراوی، شکم بسته شد (به‌منظور وارد آوردن استرس جراحی). پس از طی مراحل جراحی به‌منظور جلوگیری از بازشدن محل عمل هر حیوان به مدت ۴ ساعت در قفس جداگانه نگهداری و سپس به قفس اصلی بازگردانده شد.

در این پژوهش از داروی نورايد MLC901 استفاده شد. داروی نورايد به‌صورت محلول ۴ml در ۱۰ cc نرمال سالین ۰.۹٪ تهیه گردید [۳۷]. از محلول به‌دست‌آمده جهت تزریق به گروه‌های شم-نورايد و BDL- نورايد استفاده شد. تزریق این محلول به میزان IP 1ml/1kg و با سرنگ انسولین انجام شد [۴۰].

تمامی تزریق‌ها از روز بعد از جراحی آغاز و به‌صورت یک روز در میان تا ۲۸ روز پس از جراحی (۱۴ تزریق) ادامه یافت. برای جداسازی ناحیه موردنظر، حیوان با استفاده از کلروفورم بی‌هوش شده و سر آن با دستگاه گیوتین جدا گردید.

پس از مشخص کردن مخچه مربوط به هر گروه، نمونه‌ها فوراً به تانک نیتروژن مایع انتقال داده‌شده. نمونه‌ها بعد از گذشت ۲۴ ساعت و رسیدن به دمای انجماد و فیکس شدن، در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. از هر گروه رت دو نمونه ناحیه چپ و دو نمونه ناحیه راست مخچه (چهار نمونه از هر گروه)، به‌صورت تصادفی انتخاب گردید. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، جهت، اندازه‌گیری بیان ژن؛ از فن‌آوری Real time PCR بهره‌گرفته شد [۴۰، ۹۱، ۴۳].

قرار داده می‌شد. در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت و هر سه روز یک‌بار قفس موش‌ها تمیز می‌شد. دما در حیوان‌خانه بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد متغیر بوده است. به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده می‌شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه قبل از جراحی وفق بدهند. هر حیوان فقط یک‌بار استفاده می‌شد. تمام آزمایش‌ها در طول روز انجام شدند [۴۰].

رت‌ها به چهار گروه اصلی تقسیم شدند هر گروه دارای ۴ سر رت بود [۱۶] گروه کنترل: رت‌های این گروه تنها دارای رژیم آب و غذا بوده‌اند. گروه شم^۱ - نورايد: آن‌ها علاوه بر این که در معرض استرس جراحی قرار گرفتند داروی نورايد هم دریافت کردند. گروه BDL^۲: در تمام رت‌های این گروه انسداد مجرای صفراوی ایجاد شد. هیچ‌کدام از حیوان‌ها در این گروه دارویی را دریافت نکردند. BDL - نورايد: رت‌های این گروه علاوه بر انسداد مجرای صفراوی، داروی نورايد نیز دریافت کردند.

لاپاراتومی با القای بیهوشی عمومی توسط تزریق درون صفاقی^۳ (IP) مخلوط کتامین^۴ حیوانی ۰.۱۰٪ (2ml/kg) و زایلین^۵ ۰.۲٪ (برای جلوگیری از سفتی عضلات در هنگام بی‌هوشی) که با نسبت یک‌به‌پنج مخلوط شدند، انجام گرفت با استفاده از نخ بخیه استریل غیر جذبی، دو گره در دو نقطه از مجرا زده‌شده و حفاصل بین این دو گره با استفاده از قیچی برش زده شد تا از صحت قطع جریان صفراوی اطمینان حاصل شود [۴۰]. سپس به‌وسیله نخ بخیه استریل ۰/۲

¹ Sham

² Bili duct ligation صفراوی انسداد

³ Intra peritoneal injection

⁴ Ketamine

⁵ Xylazine

⁶ Runing

مرحله اتصال در دمای 64°C به مدت ۶۰ ثانیه صورت گرفت. شیب افزایش دما از 60°C به 95°C برابر با 0.3°C انجام شد

CT هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار ABI StepOnePlus Real Time PCR آمریکا محاسبه و نرمالیزاسیون با استفاده از ژن GAPDH انجام گرفت و هر آزمایش دو بار تکرار شد.

در ادامه پس از اطمینان از موارد مذکور، هر کدام از نمونه‌ها به صورت جداگانه با پرایمرها جهت بررسی بیان ژن در چاهک‌ها در دستگاه قرار گرفتند.

برای سنجش پرایمرها هر کدام از آن‌ها با یک نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند و پس از اتمام Real Time، برای اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها و نمایش طول قطعات تکثیرشده، نمونه‌ها به روی ژل پلی اکریل امید 8% منتقل شدند.

الکتروفورز به مدت $3/5$ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت اجرا شد. در مراحل PCR^6 از NTC^6 (کنترل منفی) برای تأیید عدم آلودگی در حین انجام آزمایش استفاده شد. در کنترل منفی از محلول حاوی Master Mix و پرایمر، اما فاقد cDNA استفاده شد.

داده‌ها کنترل و آزمایش و به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین محاسبه شدند و جهت

برای استخراج RNA ابتدا سلول‌ها به وسیله‌ی ترایزول (کیازول- شرکت کیا ژن آلمان) لیز شدند. جهت بررسی خلوص و غلظت RNA های استخراج شده، OD^1 آن‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر^۲ (Nanodrop BioTek Epoch آمریکا) در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ اندازه‌گیری شد. در نهایت نمونه‌هایی که A_{280}/A_{260} آن‌ها برابر یا بیشتر از $1/1.8$ ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$) بود برای سنتز cDNA انتخاب شد.

سنتز cDNA از RNA های استخراج شده از نمونه‌های با استفاده از کیت سینا ژن Reverse Transcription بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

پرایمرهای ژن‌های BAX و GAPDH به دست آمدند. سنتز تمام پرایمرهای طراحی شده، توسط NCBI BLAST مورد آنالیز قرار گرفتند. آنالیزهای انجام شده نشان‌دهنده عدم همولوژی پرایمرها با مناطق ژنومی و رونوشت‌های دیگر و همچنین عدم ایجاد ساختار دوم در این پرایمرها بود. (جدول ۱)

Real-time PCR با شرایط: جداسازی اولیه در دمای 95°C به مدت ۱۵ دقیقه، تکثیر در 40°C که شامل جداسازی در دمای 95°C به مدت ۱۵ ثانیه،

جدول ۱: اندازه و سکانس پرایمرهای مذکور و طول قطعه تکثیر شونده

نام ژن	سکانس پرایمر 3'→5'	طول قطعه تکثیر شونده	طول پرایمر
GAPDH	F ³ : AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG R ⁴ : CATACTCAGCACCAGCATCACC	121	F: 22 R: 22
BAX	F: AGGGTGGCTGGGAAGGC R: TGAGCGAGGCGGTGAGG	93	F: 17 R: 17

¹ Optical Density

² Spectrophotometer

³ Forward

⁴ Reverse

⁵ Forward

⁶ Reverse

در نمودار شماره ۱ میزان بیان ژن BAX بین گروه‌ها مختلف نشان داده شده است.

در مقایسه نسبت بیان ژن BAX بین گروه BDL و کنترل: با میزان بیان ۱۹/۹۷۱ و $P < 0.05$ افزایش بیان ژن BAX در گروه BDL نسبت به گروه کنترل وجود دارد؛ که با یک ستاره نشان داده شده است و می‌تواند نشان‌دهنده‌ی افزایش آپوپتوز در سلول‌های مخچه‌ی موش‌های صحرایی در اثر کلستاز باشد.

در مقایسه نسبت بیان ژن BAX بین گروه BDL نوراید و کنترل: با میزان بیان ۰/۷۲۹ و $P > 0.05$ تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی‌شود.

در مقایسه نسبت بیان ژن BAX بین گروه شم نوراید و کنترل: با میزان بیان ۱/۰۸۱ و $P > 0.05$ تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی‌شود.

در مقایسه نسبت بیان ژن BAX بین گروه BDL نوراید- (نمودار ۲) با میزان بیان ۰/۰۳۷ و $P < 0.01$ کاهش بیان ژن BAX در گروه BDL نوراید وجود دارد که با دو ستاره نشان داده شده است؛ که نشان‌دهنده‌ی کاهش آپوپتوز و مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول و تأثیر مثبت داروی نوراید در کاهش آپوپتوز در سلول‌های مخچه‌ی موش‌های صحرایی می‌باشد.

در نمودار شماره ۲ میزان بیان ژن BAX بین گروه‌ها BDL نوراید- نشان داده شده است.

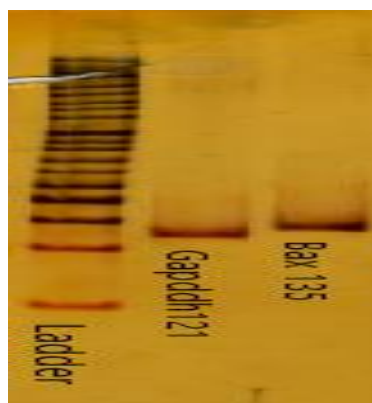
از آنجاکه در دمای ذوب، میزان فلورسانس به‌طور ناگهانی تغییر می‌کند؛ منحنی ذوب هر قله نمایانگر دمای ذوب یک محصول PCR می‌باشد. از این منحنی می‌توان به اختصاصی بودن PCR و ایجاد نشدن دایمر پرایمر پی برد. اگر منحنی ذوب برای هر ژن دارای یک قله باشد؛ اختصاصی بودن و تشکیل نشدن دایمر پرایمر تأیید می‌شود.

بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بیان ژن‌ها در بین گروه‌ها از نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج درستی پرایمر در ژل الکتروفورز در شکل شماره ۲ نشان داده شده است که نشان‌دهنده‌ی تک بانده بودن و طول صحیح قطعات تکثیرشده پرایمرها است عددها نشانگر طول قطعات تکثیرشده برحسب جفت باز است. نسبت بیان ژن در گروه BDL، BDL نوراید، شم نوراید، BDL نوراید- BDL به ترتیب ۱۹/۹۷۱، ۰/۷۲۹، ۱/۰۸۱، ۰/۰۳۷ می‌باشد.

شکل ۱: نتیجه PAGE^۱ برای تکثیر نمونه کنترل با پرایمر



در جدول شماره ۲ نسبت‌های بیان ژن BAX و ارزش P هر یک آورده شده است

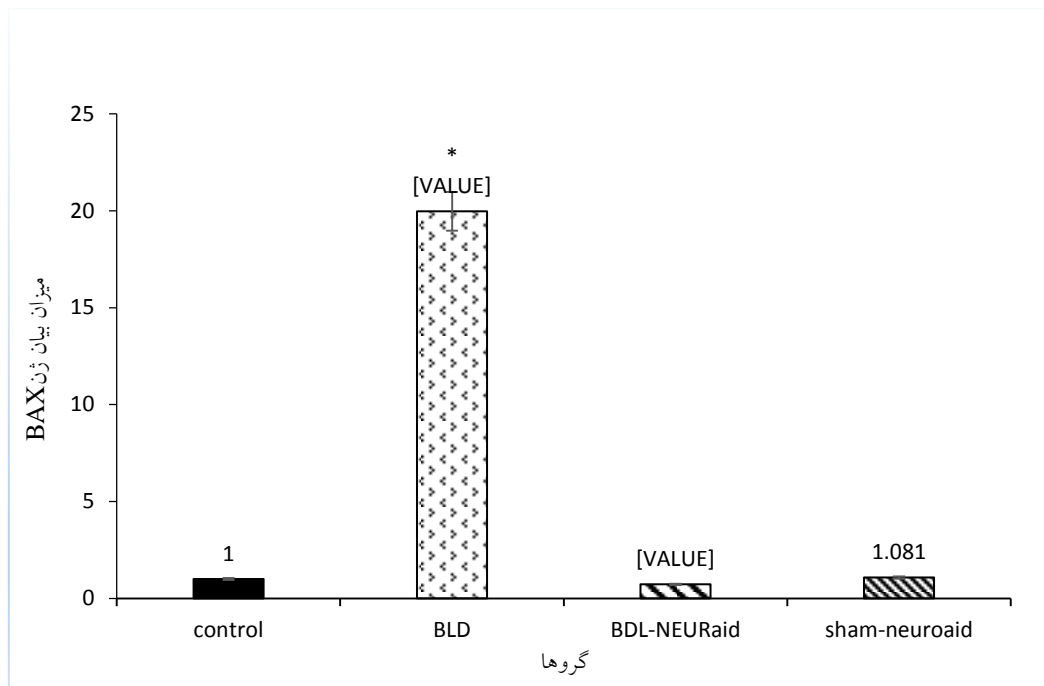
جدول شماره ۲ نسبت‌های بیان ژن BAX و ارزش P در گروه‌های مختلف

نام گروه	نسبت بیان ژن بین دو گروه	ارزش P
BDL - کنترل	19/971	$P < 0.05$
BDL نوراید - کنترل	0/729	$P > 0.05$
شم نوراید- کنترل	1/081	$P > 0.05$
BDL نوراید- BDL	0/037	$P < 0.01$

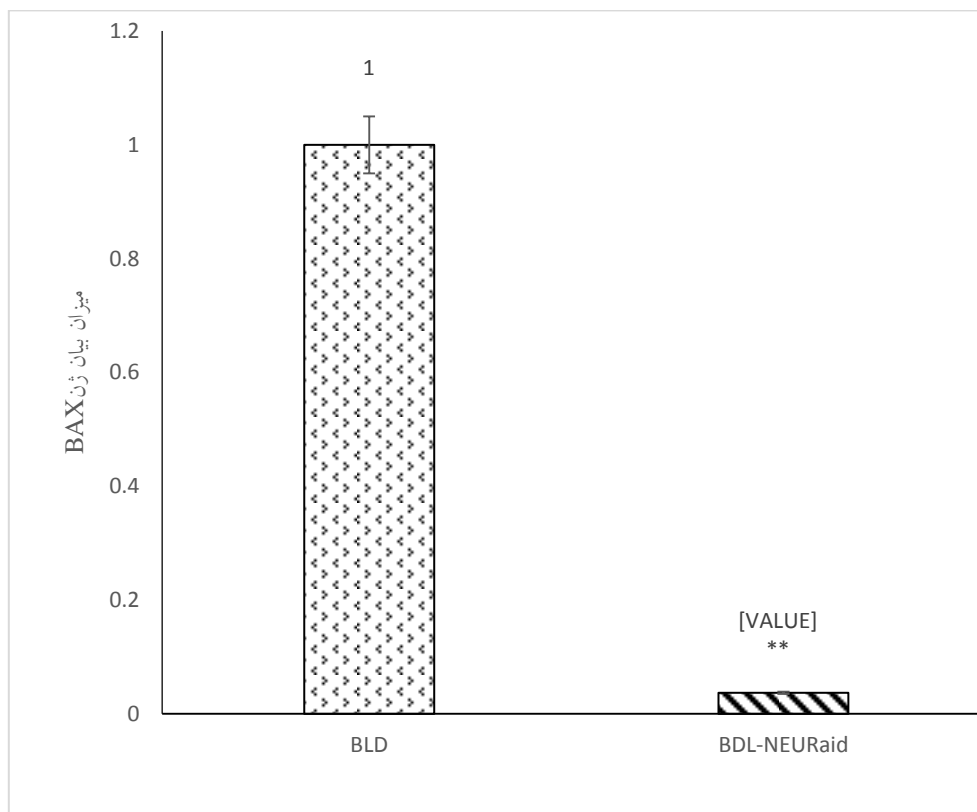
* P value <0.05 ** P value <0.01 *** P value <0.001

¹ Polyacrylamide gel electrophoresis

نمودار شماره ۱ میزان بیان ژن BAX بین گروه‌ها مختلف و گروه کنترل

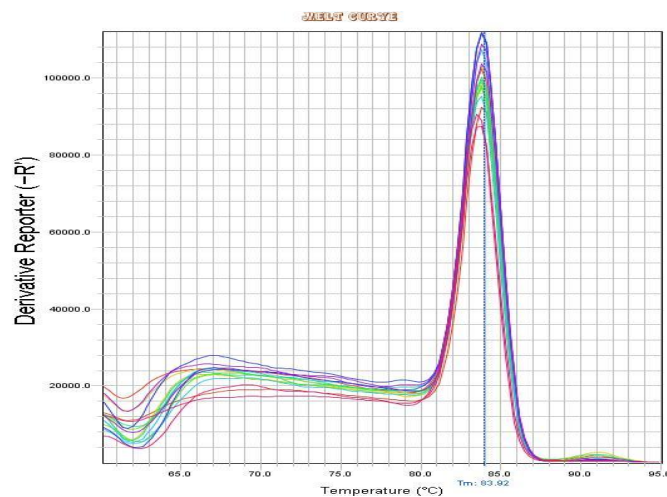


نمودار شماره ۲ میزان بیان ژن BAX بین گروه‌ها BDL نوراید- BDL

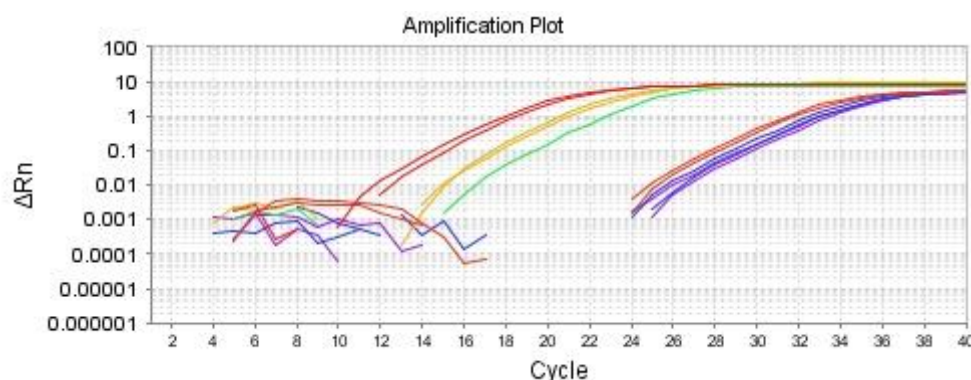


نمودار ۶ مربوط به منحنی ذوب تعدادی از ژن‌های BAX می‌باشد که اختصاصی بودن و تشکیل نشدن دایمر پرایمرها توجه به تک قله‌ای بودن این منحنی‌های ذوب تأیید می‌شود.

در نمودار ۷ منحنی تکثیر در تعدادی از ژن‌های BAX نشان داده شده است.



نمودار شماره ۶ منحنی ذوب تعدادی از ژن‌های BAX



نمودار شماره ۷ منحنی تکثیر تعدادی از ژن‌های BAX

شواهدی وجود دارد که آسیب کلستاز پیشرفته باعث کاهش بارز و حذف DNA میتوکندریایی می‌شود [۲]. تحقیقات نشان می‌دهد کلستاز بلندمدت باعث تجمع اسیدهای صفراوی آب‌گریز سمی در سلول‌های کبدی و در نتیجه ایجاد تغییرات قابل توجهی در وضعیت اکسیداتیو و کارکرد میتوکندریایی می‌شود [۴۶]. بیماری‌های کبدی می‌توانند در مغز اختلالات شناختی و غیر شناختی و همچنین نقص در حافظه ایجاد کنند [۴۰] تحقیقات آزمایشگاهی و تجربی نشان

بحث و نتیجه‌گیری

انسفالوپاتی کبدی یک بیماری نورولوژیک شدید می‌باشد که نتیجه‌ی نارسایی کبدی است. انسفالوپاتی کلستاتیک در نتیجه تجمع بیلی‌روبین کونژوگه و اسیدهای صفراوی آب‌گریز در مغز است [۴۸] بیلی‌روبین غیر کونژوگه بوده و در آب نامحلول می‌باشد لذا در ادرار و صفرا دفع نمی‌شود ولی محلول در چربی بوده لذا از سد خونی-مغزی و جفت عبور می‌کند (آسیب به مغز و جنین) [۴۵]. علاوه بر آن

داروی مؤثری در جلوگیری و یا به تأخیر انداختن مرگ سلول‌های صدمه‌دیده از مواد سمی حاصل از کلستاز در مخچه است و قابلیت جلوگیری از ضایعات جبران‌ناپذیر وارده به مخچه در اثر کلستاز را تا حدودی دارا است.

References

- [1] Apps, R., and S. Lee. 1999. Gating of transmission in climbing fibre paths to cerebellar cortical C1 and C3 zones in the rostral paramedian lobule during locomotion in the cat. *J Physiol* 516 (Pt 3): 875-83.
- [2] Arduini, A., et al. 2012. Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2233-52.
- [3] Baron, V., et al. 2000. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 127 (3): 243-9.
- [4] Behroozaghdam, M., et al. 2015. Expression of bax and bcl2 Genes in MDMA-induced Hepatotoxicity on Rat Liver Using Quantitative Real-Time PCR Method through Triggering Programmed Cell Death. *Iran Red Crescent Med J* 17 (11): e24609.
- [5] Boehm, I. 2006. Apoptosis in physiological and pathological skin: implications for therapy. *Curr Mol Med* 6(4):375-94.
- [6] Chan, H. Y., and L. W. Stanton. 2016. A pharmacogenomic profile of human neural progenitors undergoing differentiation in the presence of the traditional Chinese medicine NeuroAiD. *Pharmacogenomics J* 16(5):461-71.
- [7] Chen, C. L., et al. 2013. The NeuroAiD II (MLC901) in vascular cognitive impairment study (NEURITES). *Cerebrovasc Dis* 35 Suppl 1: 23-9.
- [8] Coco, M., and V. Perciavalle. 2015. Where did the motor function of the cerebellum come from? *Cerebellum Ataxias* 2: 10.
- [9] Collett, J. A., et al. 2015. Kidney-Specific Reduction of Oxidative Phosphorylation Genes Derived from Spontaneously Hypertensive Rat. *PLoS One* 10 (8): e0136441.

داده‌اند که اکسیژن رادیکال آزاد در ایجاد علائم کلستاز مؤثر است [۲۴، ۲۳، ۳]. در نمونه‌های کلستاتیک افزایش سطح اکسیژن فعال (ROS) oxygen species reactive دیده شده است [۳۱، ۳]. رادیکال‌های آزاد به خصوص ROS به عنوان واسطه‌ی مشترک آپوپتوز شناخته می‌شود. بسیاری از محرک‌ها و القاکننده‌های آپوپتوز، اکسیدانت‌ها یا متابولیسیم‌های اکسیداتیو می‌باشند. [۱۹] در این پروژه تمامی نتیجه‌گیری‌ها مربوط به ناحیه مخچه رت‌ها بوده و به معنای تعمیم آن به سایر نواحی مغزی و یا بافت‌های دیگر نمی‌باشد.

با توجه به مقایسه‌ی نتایج به دست آمده، بیان ژن BAX در گروه BDL نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است؛ و در نتیجه سلول‌های مخچه به سرعت به سمت آپوپتوز پیش خواهند رفت.

از آنجایی که در گروه BDL نوراید نسبت به گروه BDL کاهش بیان ژن BAX را داریم، می‌توان نتیجه گرفت که نوراید داروی مؤثری در کاهش آپوپتوز سلول‌های مخچه در رت‌های نرمی باشد

چنانچه می‌دانیم سلول‌های مغزی و مخچه بازسازی و ترمیم نمی‌شوند آسیب مخچه در حرکت، تعادل، استقرار و یادگیری حرکتی اختلال ایجاد می‌کند [۵۳]. لذا از بین رفتن هر یک از "مهم" و جلوگیری از مرگ هر یک از سلول‌های مخچه حائز اهمیت است، و هر عاملی که باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های مخچه شود بیماری خواهد بود که ایجاد صدمات جبران‌ناپذیری به اعصاب مرکزی می‌کند، با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق کلستاز، باعث افزایش مرگ سلول‌ها و ایجاد صدمه به مخچه در موش‌های صحرایی می‌شود و هر دارویی که بتواند از مرگ سلول‌ها جلوگیری کند داروی باارزشی است، با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش داروی نوراید،

- [10] Deroe, A. F., et al. 2010. Cholestasis induced nephrotoxicity: the role of endogenous opioids. *Life Sci* 86 (13-14): 488-92.
- [11] Emel'ianchik, S. V., and S. M. Zimatkin. 2013. [Structural and histochemical changes in the rat cerebellum Purkinje cells after cholestasis]. *Morfologiya* 143 (2): 19-23.
- [12] Esfandiary, E., et al. 2014. Novel effects of *Rosa damascena* extract on memory and neurogenesis in a rat model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 92(4): 517-30.
- [13] Feng, R., et al. 2001. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32(5):911-26.
- [14] Fonseca, L. F., et al. 2015. Expression of genes related to mitochondrial function in Nellore cattle divergently ranked on residual feed intake. *Mol Biol Rep* 42(2): 559-65.
- [15] Forton, D. M., S. D. Taylor-Robinson, and H. C. Thomas. 2002. Reduced quality of life in hepatitis C--is it all in the head? *J Hepatol* 36(3):435-8.
- [16] Garmabi, B., et al. 2016. Effect of circadian rhythm disturbance on morphine preference and addiction in male rats: Involvement of period genes and dopamine D1 receptor. *Neuroscience* 322: 104-14.
- [17] Ghonem, N. S., D. N. Assis, and J. L. Boyer. 2015. Fibrates and cholestasis. *Hepatology* 62 (2): 635-43.
- [18] Guicciardi, M. E., and G. J. Gores. 2002. Bile acid-mediated hepatocyte apoptosis and cholestatic liver disease. *Dig Liver Dis* 34 (6): 387-92.
- [19] Haddad, J. J. 2004. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int Immunopharmacol* 4 (4): 475-93.
- [20] Hayashi, H., et al. 2016. Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption. *Hepatol Res* 46 (2): 192-200.
- [21] Heurteaux, C., et al. 2010. Neuroprotective and neuroproliferative activities of NeuroAid (MLC601, MLC901), a Chinese medicine, in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 58 (7): 987-1001.
- [22] Heurteaux, C., et al. 2013. NeuroAiD: properties for neuroprotection and neurorepair. *Cerebrovasc Dis* 35 Suppl 1: 1-7.
- [23] Holt, S. H., et al. 2016. Activation of apoptosis in NAF-1-deficient human epithelial breast cancer cells. *J Cell Sci* 129 (1): 155-65.
- [24] Holt, S., et al. 1999. Acute cholestasis-induced renal failure: effects of antioxidants and ligands for the thromboxane A2 receptor. *Kidney Int* 55 (1): 271-7.
- [25] Hosseini, N., et al. 2014a. Effects of cholestasis on learning and locomotor activity in bile duct ligated rats. *Malays J Med Sci* 21 (1): 19-28.
- [26] Hosseini, N., et al. 2014b. Cholestasis progression effects on long-term memory in bile duct ligation rats. *Adv Biomed Res* 3: 215.
- [27] Hosseini, N., et al. 2013. Effects of CA \ glutamatergic systems upon memory impairments in cholestatic rats. *Behav Brain Res* 256: 636-45.
- [28] Jacquemin, E. 2012. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36 Suppl 1: S26-35.
- [29] Kikalishvili, L. A., et al. 2009. Morphological changes in brain and heart after the temporary liver exclusion from the bloodstream during the cholestasis. *Georgian Med News* (167):77-81.
- [30] Le Sueur-Maluf, L., et al. 2015. Behavioral alterations and Fos protein immunoreactivity in brain regions of bile duct-ligated cirrhotic rats. *An Acad Bras Cienc* 87 (1): 331-493.
- [31] Ljubuncic, P., I. Yousef, and A. Bomzon. 2004. Cholemic transgenic mice: a novel animal model to investigate the effects of bile acids. *J Pharmacol Toxicol Methods* 50 (3): 231-5.
- [32] Mani, A. R., et al. 2002. Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29 (10): 905-8.
- [33] Monfort, P., et al. 2002. Effects of hyperammonemia and liver failure on

- glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis* (17) 4: 50-237.
- [34] Nguyen, K. D., V. Sundaram, and W. S. Ayoub. 2014. Atypical causes of cholestasis. *World J Gastroenterol* 20 (28): 9418-26.
- [35] Paumgartner, G. 2006. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol* 12 (28): 4445-51.
- [36] Quintard, H., et al. 2011. MLC901, a traditional Chinese medicine protects the brain against global ischemia. *Neuropharmacology* 61 (4): 622-31.
- [37] Quintard, H., et al. 2014. MLC901, a Traditional Chinese Medicine induces neuroprotective and neuroregenerative benefits after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 277: 72-86.
- [38] Radahmadi, M., et al. 2015. Preventive and therapeutic effect of treadmill running on chronic stress-induced memory deficit in rats. *J Bodyw Mov Ther* 19 (2): 45-238.
- [39] Renault, T. T., et al. 2014. B cell lymphoma-2 (BCL-2) homology domain 3 (BH3) mimetics demonstrate differential activities dependent upon the functional repertoire of pro- and anti-apoptotic BCL-2 family proteins. *J Biol Chem* 289 (38): 26481-91.
- [40] Reza Zarrindast, M., et al. 2013. Effects of dopamine receptor agonist and antagonists on cholestasis-induced anxiolytic-like behaviors in rats. *Eur J Pharmacol* 702 (1-3): 25-31.
- [41] Roma, M. G., F. A. Crocenzi, and E. A. Sanchez Pozzi. 2008. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci (Lond)* 114 (9): 567-88.
- [42] Ruiz-Gaspa, S., et al. 2014. Ursodeoxycholic acid decreases bilirubin-induced osteoblast apoptosis. *Eur J Clin Invest* 44 (12): 14-1206.
- [43] Sari, S., et al. 2013. The Effect of Pentoxifylline on bcl-2 Gene Expression Changes in Hippocampus after Ischemia-Reperfusion in Wistar Rats by a Quantitative RT-PCR Method. *Iran J Pharm Res* 12 (3): 495-501.
- [44] Savitskaya, M. A., and G. E. Onishchenko. 2015. Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Mosc)* 80 (11): 1393-405.
- [45] Sedlak, T. W., and S. H. Snyder. 2004. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics* 113 (6): 1776-82.
- [46] Serviddio, G., et al. 2014. Silybin exerts antioxidant effects and induces mitochondrial biogenesis in liver of rat with secondary biliary cirrhosis. *Free Radic Biol Med* 73: 117-26.
- [47] Sheen, J. M., et al. 2010. Bile duct ligation in developing rats: temporal progression of liver, kidney, and brain damage. *J Pediatr Surg* 45 (8): 1650-8.
- [48] Sokolovic, D., et al. 2010. Effect of L-arginine on metabolism of polyamines in rat's brain with extrahepatic cholestasis. *Amino Acids* 38 (1): 339-45.
- [49] Swain, M. G. 2001. Cytokines and neuroendocrine dysregulation in obstructive cholestasis: pathophysiological implications. *J Hepatol* 35 (3): 416-8.
- [50] Trauner, M., and J. L. Boyer. 2003. Cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol* 19 (3): 216-31.
- [51] Venketasubramanian, N., et al. 2015a. The NeuroAiD Safe Treatment (NeST) Registry: a protocol. *BMJ Open* 5 (11): e009866.
- [52] Venketasubramanian, N., et al. 2015b. The value of patient selection in demonstrating treatment effect in stroke recovery trials: lessons from the CHIMES study of MLC601 (NeuroAiD). *J Evid Based Med* 8 (3): 149-53.
- [53] Wolf, U., M. J. Rapoport, and T. A. Schweizer. 2009. Evaluating the affective component of the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 21 (3): 245-53.
- [54] Woolbright, B. L., et al. 2013. Plasma biomarkers of liver injury and inflammation demonstrate a lack of apoptosis during obstructive cholestasis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 273 (3): 524-31.
- [55] Zarrindast, M. R., S. Hoseindoost, and M. Nasehi. 2012. Possible interaction between opioidergic and cholinergic systems of CA1 in cholestasis-induced amnesia in mice. *Behav Brain Res* 228 (1): 116-24.