



مقاله های پژوهشی

اثر جداگانه و همزمان یک دوره ی تمرین شنا و مصرف مکمل کورستین بر استئوآرتریت زانوی موش صحرایی ۸۰۵
 دکتر اکبر حاجی زاده مقدم، سید حسین میرکریم پور، دکتر محمد حسین علیزاده، دکتر محمدرضا کردی، محمد فلاح محمدی

بررسی اثر ترکیبی داروی دفروکسامین و دوز پایین آرسنیک تری اکساید بر میزان زندهمانی و مهار پرولیفراسیون رده ی سلولی NB4 ۸۱۸
 کاظم غفاری، دکتر احمد کاظمی، دکتر شعبان علیزاده، علی قاسمی، ندا مینایی، عباس قوطاسلو، بهنوش طیبی، دکتر محمدرضا رضوانی

القای تشکیل سلول های شبه عصبی از سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات با استفاده از روش تشکیل نوروسفر ۸۲۸
 دکتر شهناز رضوی، زهرا خسروی زاده، دکتر حمید بهرامیان، محمد کاظمی

تولید پروکاریوتی پروتئین ۲M ویروس آنفلوانزا در اتصال با پروتئین شوک حرارتی لیسمانیا ماژور به منظور دستیابی به یکت واکسن کارآمد ۸۴۱
 سیاوش چلبیانی، دکتر فاطمه فتوحی، دکتر امیر قائمی، مریم صالح، دکتر بهرخ فرمند، سید محمد علی علوی اصفهانی، منصوره طباطبائی، علی ترابی

مقاله مروری

بررسی نقش سیستم یوئیکوتئین- پروتئوزوم در فرایند اسپرماتوژنز ۸۵۴
 عرفانه شایگان نیا، مرضیه تولایی، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

Original Articles

Separate and Concomitant Effect of Swimming Exercise and Quercetin Supplementation on Rat's Knee Osteoarthritis 817
 Akbar Hajizadeh-Moghaddam PhD, Seyed Hossein Mirkarimpour MSc, Mohammad Hossein Alizadeh PhD, Mohammad Reza Kordi PhD, Mohammad Fallah-Mohammadi MSc

The Combination Effect of Low-Dose Arsenic Trioxide plus Deferoxamine on Viability and Inhibiting the Proliferation of NB4 Cell Line 827
 Kazem Ghaffari MSc, Ahmad Kazemi PhD, Shaban Alizadeh PhD, Ali Ghasemi MSc, Neda Minayi MSc, Abbas Ghotaslou MSc, Behnoush Tayebi MSc, Mohammad Reza Rezvani PhD

Induction of Neuron-Like Cells from Adipose Derived Stem Cells in Alginate Hydrogel, Using Neurospheres Formation 840
 Shahnaz Razavi PhD, Zahra Khosravizadeh MSc, Hamid Bahramian PhD, Mohammad Kazemi MSc

Prokaryotic Production of Influenza Virus M2 Protein Fused to Leishmania Major HSP70 in Order to Prepare an Effective Flu Vaccine 853
 Siavash Chalabiani MSc, Fatemeh Fotouhi PhD, Amir Ghaemi PhD, Maryam Saleh MSc, Behrokh Farahmand PhD, Mohammad Ali Alavi-Esfahani MSc, Mansoureh Tabatabaian, Ali Torabi

Review Article

Role of Ubiquitin-Proteasome in Spermatogenesis Process 870
 Erfaneh Shaygannia MSc, Marziyeh Tavalaei MSc, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD



مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۲۸۸)، بهمنه اول مرداد ۱۳۹۳

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

مدیر مسؤول: دکتر منصور شعله‌ور سردبیر افتخاری: دکتر رویا کلیشادی

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

ناشر:

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

E-mail: publications@mui.ac.ir

دفتر مجله: دانشکده پزشکی صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶

مسئول دفتر: گلناز رجبی

دورنگار: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۲۹۱

تلفن: ۰۳۱۱-۶۶۹۴۷۳۷

E-mail: jims@med.mui.ac.ir

<http://www.journals.mui.ac.ir/jims>

وب سایت مجله:

امور نشر:

(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)

شرکت فرزانتگان راداندیش

اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵

تلفن و دورنگار: ۰۳۱۱-۶۶۸۶۳۰۲

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

تیراژ: ۵۰۰ نسخه

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

- Scopus
- Chemical Abstracts
- Islamic World Science Citation Center (ISC)
- Academic Search Complete EBSCO Publishing databases
- WHO/EMRO/Index Medicus
- Google Scholar
- Index Copernicus
- Directory of Open Access Journal (DOAJ)
- Index Academicus
- Scientific Information Database (www.sid.ir)
- www.iranmedex.com

کپی‌رایت: چاپ مطالب مندرج در این مجله به شرط ذکر منبع مجله بلامانع است.

تصاویر رنگی مقالات و کلیپ‌های ویدئویی بر روی وب سایت مجله قابل دسترسی می‌باشند

اعضای شورای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان (به ترتیب حروف الفبا)

نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی
۱- دکتر مجتبی ابطحی	دانشیار، متخصص گوش و حلق و بینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دکتر ابراهیم اسفندیاری	استاد، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دکتر محمد اسماعیل اکبری	استاد، فوق تخصص جراحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دکتر فرامرز اسماعیل بیگی	استاد، متخصص داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، آمریکا
۵- دکتر افسون امامی	دانشیار، فوق تخصص نفرولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- شاهین امامی	گروه بیوشیمی و غدد داخلی، بیمارستان سن آنتونیو، فرانسه
۷- دکتر علیرضا امامی	دانشیار، متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۸- دکتر بابک امرا	استاد، فوق تخصص ریه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۹- دکتر رضا امین	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۱۰- دکتر کن باست	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۱۱- دکتر رضا باقریان سرارودی	استادیار، متخصص روانشناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۲- دکتر مجید برکتین	دانشیار، متخصص روانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۳- فرزین پور فرزاد	گروه زیست‌شناسی سلولی و ژنتیک، دانشگاه اراسموس، روتردام، هلند
۱۴- دکتر مسعود پورمقدس	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۵- دکتر احمد چیت‌ساز	دانشیار، متخصص داخلی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۶- دکتر مینا حسن رضایی	متخصص نوروایمونولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، آمریکا
۱۷- دکتر سید مرتضی حیدری	دانشیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۸- دکتر بهناز خانی	دانشیار، متخصص زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۹- دکتر مجید خزاعی	دانشیار، متخصص فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۰- دکتر حسن رزمجو	استاد، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۱- دکتر رضا روزبهانی	استادیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۲- دکتر مسعود سهیلیان	استاد، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲۳- دکتر منصور شعله‌ور	دانشیار، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۴- دکتر محمدرضا صفوی	استادیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۵- دکتر خسرو عادل‌لی	استاد، متخصص بیوشیمی بالینی، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا
۲۶- دکتر سعید عندلیب	استاد، متخصص پاتولوژی، دانشگاه لوئیس ویل، آمریکا
۲۷- دکتر غلامرضا عسکری	متخصص بیماری‌های پوستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۸- دکتر زیبا فرج‌زادگان	دانشیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۹- دکتر حمید فشارکی	دانشیار، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۰- دکتر مرجانه فولادی	دکترای پرستاری، دانشگاه فلوریدا، آمریکا
۳۱- دکتر علی قیصری	استاد، فوق تخصص جراحی قلب، کالیفرنیا، آمریکا
۳۲- دکتر منصور کارآموز	استاد، متخصص اورولوژی، کالیفرنیا، آمریکا
۳۳- دکتر رویا کلشادی	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۴- دکتر جعفر گلشاهی	دانشیار، فوق تخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۵- دکتر عزیز گه‌ری	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۳۶- دکتر پروین محزونی	دانشیار، فوق تخصص آسیب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۷- دکتر سید مهدی مدرس	استاد، متخصص چشم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳۸- دکتر محمد مردانی	دانشیار، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۹- دکتر هوشنگ معین	استاد، متخصص جراحی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴۰- دکتر آتیه مغیثی	استاد، متخصص غدد داخلی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، آمریکا
۴۱- دکتر مجید ملکی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴۲- دکتر محمدرضا نوربخش	دانشیار، متخصص فیزیوتراپی، آمریکا
۴۳- دکتر فریدون نوحی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴۴- دکتر علی محمد هنجنی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

راهنمای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

- ۱- **اهداف و چشم انداز:** مجله دانشکده پزشکی اصفهان به صورت هفته‌نامه و تحت حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتشر می‌گردد.
- ۲- این مجله مقالات اصلی و پژوهشی، مروری، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را منتشر می‌نماید و همچنین فیلم‌های آموزشی تهیه شده توسط محققین را بر روی وب سایت مجله قرار می‌دهد.
- ۳- **پذیرش دست‌نوشته:** پذیرش دست نوشته‌ها و پیگیری‌های بعدی در این مجله فقط از طریق وب سایت اختصاصی آن به آدرس <http://www.journals.mui.ac.ir/jims> و پس از ثبت نام (Registration) در آن ممکن می‌باشد. همراه دست نوشته باید یک نامه تایپ شده (Covering letter) به سردبیر، شامل عنوان و اسامی نویسنده یا نویسندگان و اعلام این که این دست نوشته در مجلات دیگر چاپ نشده است و یا همزمان در حال بررسی نمی‌باشد، ارسال گردد.
- ۴- دست‌نوشته باید توسط نرم‌افزار MS Word در سایز A4 و فاصله خطوط دو برابر (Double Spaced) با حاشیه‌های ۲/۵ سانتی‌متری تهیه شوند. جداول بدون حاشیه خارجی و تصاویر در فرمت GIF و JPEG و در تعداد محدود باشند. ارسال مدارک با فرمت PDF به هیچ عنوان پذیرفته نیست.
- ۵- دست نوشته باید شامل صفحه عنوان، چکیده، مقدمه، روش‌ها، یافته‌ها، بحث، تقدیر و تشکر و منابع باشد. **صفحه عنوان:** این صفحه باید شامل عنوان کامل، عنوان مکرری، اسامی نویسنده یا نویسندگان با بالاترین مدرک تحصیلی، گروه یا بخش یا مؤسسه محل فعالیت ایشان و همچنین آدرس، تلفن، فاکس و پست الکترونیکی نویسنده مسؤول باشد. ذکر منابع مالی و اعتباری طرح پژوهشی در این صفحه ضروری است.
- ۶- **چکیده:** تمام مقالات اصلی باید دارای چکیده مقاله به دو زبان فارسی و انگلیسی با حداکثر ۲۵۰ کلمه باشد. چکیده باید شامل بخش‌های سابقه علمی موضوع، روش‌ها، یافته‌ها و بحث باشد. در پایان چکیده مقاله ۳-۵ کلمه کلیدی قرار می‌گیرد که تنها با استفاده از راهنمای MESH در آدرس (<http://nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>) استخراج گردند.
- ۷- **مقدمه و معرفی:** در این بخش اهداف و علل انجام مطالعه آورده می‌شود؛ بنابراین نیازی به ارائه گسترده مطالب موجود در متون علمی نیست. در این بخش باید از ارائه اطلاعات، یافته‌های و نتایج مطالعه خودداری گردد.
- ۸- **روش‌ها:** این بخش شامل ارائه دقیق مشاهدات، مداخلات و روش‌های مورد استفاده در مطالعه است. اگر روش مورد استفاده شناخته شده است فقط منبع آن ذکر گردد اما اگر روشی نوین است، باید به صورتی توضیح داده شود که برای سایر محققان قابل درک و به طور عینی قابل انجام و تکرار باشد. در صورت استفاده از دستگاه و تجهیزات خاص باید نام، نام کارخانه سازنده و آدرس آن در پرانتز ذکر گردد. اگر از دارو در مطالعه استفاده شده است باید نام ژنریک، دوز و روش مصرف آن آورده شود. در مورد افراد و بیماران تحت مطالعه باید جنس و سن (همراه انحراف معیار) آورده شود. در مورد نرم‌افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پرانتز و پس از نام آن ذکر گردد. در صورتی که مطالعه دارای پرسش‌نامه یا چک لیست است، ضمیمه کردن آن لازم است؛ در مورد پرسش‌نامه‌های استاندارد ذکر نام و مرجع آن کافی است.
- ۹- **یافته‌ها:** این بخش به صورت متن همراه با جدول‌ها، شکل‌ها و نمودارها ارائه می‌گردد. محتوای جداول نباید به صورت کامل در متن ارائه شوند، بلکه کافی است با ذکر شماره جدول، شکل و یا نمودار به آنها اشاره شود. جدول‌ها، نمودارها و شکل‌ها هر کدام باید در یک صفحه جداگانه و پس از منابع، در پایان دست‌نوشته آورده شوند. در این بخش فقط یافته‌ها ارائه می‌شود و باید از ذکر دلایل و استدلال‌های مرتبط با آن خودداری گردد.
- ۱۰- **بحث:** در این بخش در ابتدا به یافته‌های مهم اساسی مطالعه و سپس تشابه و تفاوت‌های آن با یافته‌های سایر پژوهشگران در مطالعات مشابه اشاره می‌گردد. ذکر جزئیات کامل یافته‌ها در این بخش لازم نیست. تأکید بر یافته‌های جدید و با اهمیت مطالعه حاضر و دستاوردهای آن در این قسمت ضروری است. ذکر این که فرضیه ارائه شده در مطالعه صحیح یا نادرست بوده، یا این که دلایل کافی برای رد یا قبول آن به دست نیامده است، ضروری می‌باشد. هدف این بخش، ذکر دلیل اصلی انجام تحقیق، تحلیل و تفسیر یافته‌ها و همچنین نتیجه‌گیری کلی (Conclusion) است.

۱۱- **تقدیر و تشکر:** تمام افرادی که به نحوی در انجام مطالعه نقش داشته ولی جزء نویسندگان نبوده‌اند باید در این بخش مورد تقدیر قرار گیرند؛ از جمله کسانی که کمک‌های فنی، نوشتاری و مالی داده و همچنین سرپرستان و مدیران بخش‌های محل انجام مطالعه که در امر پشتیبانی‌های عمومی در اجرای تحقیق فعالیت داشته‌اند.

۱۲- **جدول‌ها:** تعداد محدود جدول با توجه به حجم مطالعه و مقاله، همراه با ذکر عنوان آن در بالای جدول مورد قبول خواهد بود. ارسال جداول فقط تحت نرم‌افزار MSWord مورد قبول است. توضیحات اضافی در خصوص محتوای جداول باید به صورت پی‌نوشته و در پایین جدول باشد. جدول‌ها باید در صفحات جداگانه و در پایان دست نوشته (پس از منابع) قرار داده شوند.

۱۳- **شکل‌ها:** تعداد محدود شکل همراه ذکر عنوان آن در زیر شکل یا نمودار و با فرمت GIF و JPEG قابل قبول است. اطلاعات موجود در شکل‌ها یا نمودارها نباید به طور کاملاً مشابه در جدول‌ها و یا متن مقاله ذکر شده باشند.

۱۴- **منابع:** نویسنده باید از صحت اشاره منابع ذکر شده به مطالب مورد استناد مطمئن باشد. ساختار منابع در این مجله بر اساس *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Bio Medical Journals (ICMJE)* و معاهده ونکوور (Vancouver) می‌باشد. تمامی منابع باید به زبان انگلیسی باشد، ترجمه متن منابع فارسی به عهده نویسنده است و در پایان آن عبارت [Persian] خواهد آمد. موارد ذیل برای نمونه ذکر می‌گردد:

اگر منبع مورد نظر مقاله است:

نام خانوادگی نویسنده، حرف اول نام کوچک نویسنده، عنوان مقاله، مخفف نام مجله (بر اساس Medline)، سال انتشار، شماره‌ی انتشار، شماره‌ی مجله، شماره‌ی صفحات. مثال:

(EN): Inzer N. Treatment of calcific aortic stenosis. Am J Cardiol 1987; 59(6): 314-7.

(FA): Zini F, Basiri Jahromi Sh. Study of fungal infections in patients with leukemia. Iranian journal of public health 1994; 1(4):89-103.[Persian].

(چنانچه تعداد نویسندگان ۶ نفر یا کمتر باشد، ذکر اسامی آن‌ها ضروری است. اگر تعداد آن‌ها ۷ نفر یا بیشتر باشد، پس از ۶ نفر، عبارت "et al." استفاده شود.)

اگر منبع مورد نظر کتاب است:

نام خانوادگی و حرف اول نام کوچک نویسنده (نویسندگان). عنوان کتاب. نوبت چاپ. محل نشر؛ نام ناشر؛ سال انتشار. p. شماره صفحات (نام نویسندگان با علامت کاما از هم جدا شود). مثال:

(EN): Romenes GJ. Cunningham's manual. 15th ed. New York: Oxford Univ Press; 1987.p.43-5.

(FA): Azizi F, Janghorbani M, Hatami H. Epidemiology and control of common disorders in Iran. 2nd ed. Tehran: Eshtiagh Publication; 2000.p.558.[Persian].

اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

نام خانوادگی و حرف اول نام کوچک نویسنده (نویسندگان) آن فصل. عنوان فصل مورد نظر. در: نام خانوادگی و حرف اول نام تدوین کننده‌ی کتاب. عنوان کتاب. نوبت چاپ. محل نشر؛ نام ناشر؛ سال انتشار. p. صفحات. مثال:

(EN): Bodly L, Bailey Jr. Urinary tract infection. In: Tailor R, editor. Family medicine. 6th ed. New York: Springer; 2003.p. 807-13.

۱۵- **نمونه‌خوانی (Proofreading):** یک نسخه از مقاله پیش از چاپ جهت انجام اصلاحات ضروری و بر طرف کردن اشکالات احتمالی برای نویسنده مسؤوّل ارسال می‌گردد که لازم است در کوتاه‌ترین زمان تغییرات مورد نظر مجله انجام داده، از طریق وبسایت مجله ارسال نماید.

۱۶- **اختصارات و نشانه‌ها:** تنها از اختصارات و نشانه‌های استاندارد استفاده شود و از ذکر عبارات‌های مخفف در عنوان و خلاصه مقاله خودداری گردد.

۱۷- توضیح کامل در مورد هر کدام از عبارتهای اختصاری برای اولین بار در متن آورده شود، مگر این که مربوط به مقیاس‌ها و مقادیر استاندارد شناخته شده باشد.

۱۸- پس از چاپ، یک نسخه از مجله برای نویسنده مسؤوّل ارسال خواهد شد.

- ۱۹- **ملاحظات اخلاقی:** این ملاحظات باید در بخش روش‌ها اشاره گردند. اخذ رضایت‌نامه از کلیه‌ی افراد بالغ شرکت‌کننده در مطالعه ضروری است و در مورد کودکان و افراد تحت تکفل باید از ولی قانونی آنها اخذ شود. ذکر منبع تأییدکننده‌ی ملاحظات اخلاقی مطالعه لازم است. هنگام استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ذکر رعایت و مقررات استاندارد مربوط لازم است.
- ۲۰- **تداخل منافع (Conflict of Interest):** نویسنده یا نویسندگان باید هر گونه ارتباط مالی مانند دریافت هزینه، حق‌الزحمه، مواد و تجهیزات از دانشگاه‌ها، سازمان‌ها، نهادها، شرکت‌ها و سایر منابع که انتشار یافته‌های مطالعه می‌تواند به آنها سود یا زیان برساند را اعلام نمایند.
- ۲۱- **هزینه چاپ:** هیچ‌گونه هزینه‌ای برای چاپ مقالات در این مجله دریافت نمی‌شود.
- ۲۲- **حق نسخه‌برداری (Copyright):** تمامی محتویات مجله دانشکده پزشکی اصفهان تحت قانون حق نسخه‌برداری بین‌المللی قرار دارد. این مجله برای استفاده غیر تجاری در اختیار افراد قرار می‌گیرد. اصلاح، انتشار، انتقال و نمایش هر گونه محتویات مجله بدون ذکر نام این مجله ممنوع است.
- ۲۳- **فرآیند مرور دقیق (Peer Review):** تمام دست‌نوشته‌ها توسط حداقل ۳ نفر از داوران منتخب شورای نویسندگان مجله مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. نویسنده‌ی مسؤؤل در کوتاه‌ترین زمان در جریان تصمیم‌سردبیر در مورد رد، قبول یا اصلاحات مورد نظر داوران و هیأت تحریریه قرار خواهد گرفت. در صورت پذیرش مقاله برای چاپ، نامه پذیرش به همراه ایمیل برای نویسنده‌ی مسؤؤل ارسال می‌شود و مقاله در نوبت چاپ قرار خواهد گرفت.
- ۲۴- هیأت تحریریه در رد، اصلاح، ویرایش و خلاصه کردن مقاله آزاد است.
- ۲۵- مسؤولیت صحت یا سقم مطالب ارائه شده در مقاله بر عهده‌ی نویسنده یا نویسندگان است.

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی

- ۸۰۵..... اثر جداگانه و همزمان یک دوره‌ی تمرین شنا و مصرف مکمل کورستین بر استئوآرتریت زانوی موش صحرايي.....
دکتر اکبر حاجی‌زاده مقدم، سید حسین میرکریم‌پور، دکتر محمد حسین علیزاده، دکتر محمدرضا کردی، محمد فلاح محمدی
- ۸۱۸..... بررسی اثر ترکیبی داروی دفروکسامین و دوز پایین آرسنیک تری اکساید بر میزان زنده‌مانی و مهار پروليفراسيون رده‌ی سلولی NB۴.....
کاظم غفاری، دکتر احمد کاظمی، دکتر شعبان علیزاده، علی قاسمی، ندا مینایی، عباس قوطاسلو، بهنوش طیبی، دکتر محمدرضا رضوانی
- ۸۲۸..... القای تشکیل سلول‌های شبه عصبی از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات با استفاده از روش تشکیل نوروسفر.....
دکتر شهناز رضوی، زهرا خسروی‌زاده، دکتر حمید بهرامیان، محمد کاظمی
- ۸۴۱..... تولید پروکاریوتی پروتئین M۲ و ویروس آنفلوآنزا در اتصال با پروتئین شوک حرارتی لیسمانیا ماژور به منظور دستیابی به یک واکسن کارآمد.....
سیاوش چلبیانی، دکتر فاطمه فتوحی، دکتر امیر قائمی، مریم صالح، دکتر بهرخ فرهمند، سید محمد علی علوی اصفهانی، منصوره طباطبائیان، علی ترابی

مقاله مروری

- ۸۵۴..... بررسی نقش سیستم یویکوئیتین - پروتئوزوم در فرایند اسپرماتوژنز.....
عرفانه شایگان نیا، مرضیه تولایی، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

اثر جداگانه و همزمان یک دوره‌ی تمرین شنا و مصرف مکمل کورستین بر استئوآرتروز زانوی موش صحرائی

دکتر اکبر حاجی‌زاده مقدم^۱، سید حسین میرکریم‌پور^۲، دکتر محمد حسین علیزاده^۳،
دکتر محمدرضا کردی^۴، محمد فلاح محمدی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استئوآرتروز (OA یا Osteoarthritis) یکی از شایع‌ترین اختلالات عضلانی-اسکلتی است که می‌تواند به درد مزمن و ناتوانی شدید بیمار منجر شود و پیش‌بینی شده است با افزایش سن جمعیت، شیوع آن در آینده به طور چشمگیری افزایش یابد.

روش‌ها: در تحقیق تجربی حاضر، ۳۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار (میانگین وزن 1 ± 173 گرم و سن ۸ هفته) به طور تصادفی به ۵ گروه ۶‌تایی شامل گروه‌های شاهد سالم، شاهد پایه، کورستین، شنا و نیز کورستین + شنا تقسیم شدند. برای ایجاد استئوآرتروز از تزریق درون مفصلی، مونو سدیم یدواستات (۵۰ μl) در زانوی راست نمونه‌ها استفاده شد. پروتکل تمرینی این پژوهش شامل شنا با شدت متوسط و به مدت ۲۸ روز بود. پس از اتمام دوره، حیوانات کشته شدند و مفاصل زانوی هر دو پای آن‌ها مورد بررسی هیستوپاتولوژیکی قرار گرفت. از آزمون آماری One-way ANOVA (One-way analysis of variance) ($P \leq 0/050$) و سپس آزمون تعقیبی Tukey به منظور تجزیه و تحلیل کمی یافته‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: در رابطه با شاخص نسبت عمق ضایعه تفاوت معنی‌داری بین گروه کورستین ($P = 0/002$)، شنا ($P = 0/001$) و کورستین + شنا ($P = 0/001$) با گروه شاهد پایه وجود داشت ($P = 0/001$). همچنین در رابطه با شاخص عرض کل ناحیه‌ی تخریب شده و عرض ناحیه‌ی تخریب شده به طور معنی‌دار، تفاوت معنی‌داری بین تمامی گروه‌ها با گروه شاهد پایه وجود داشت ($P = 0/001$).

نتیجه‌گیری: مصرف مکمل کورستین و تمرین شنا با شدت متوسط، هر یک به تنهایی و به صورت ترکیبی می‌توانند اثر مثبتی در بهبود علائم استئوآرتروز زانوی موش‌های صحرائی داشته باشند.

واژگان کلیدی: تمرین شنا، کورستین، استئوآرتروز زانوی موش صحرائی

ارجاع: حاجی‌زاده مقدم اکبر، میرکریم‌پور سید حسین، علیزاده محمد حسین، کردی محمدرضا، فلاح محمدی محمد. اثر جداگانه و همزمان یک دوره‌ی تمرین شنا و مصرف مکمل کورستین بر استئوآرتروز زانوی موش صحرائی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۸):

۸۰۵-۸۱۷

۱- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه بهداشت و طب ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه بهداشت و طب ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه آسیب‌شناسی ورزشی و حرکات اصلاحی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

Email: shmirkarimpour@ut.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: سید حسین میرکریم‌پور

مقدمه

استئوآرتروز (OA یا Osteoarthritis) یکی از شایع‌ترین اختلالات عضلانی-اسکلتی است (۱)؛ به طوری که تنها در آمریکا ۲۱ میلیون نفر از افراد میانسال و مسن به این بیماری مبتلا هستند (۲) و پیش‌بینی شده است که با افزایش سن جمعیت، شیوع آن در آینده به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۱). وقوع این بیماری بین مفاصل تحمل‌کننده‌ی وزن بدن مانند زانو و ران رایج‌تر است (۳)؛ به طوری که می‌توان گفت در بین افراد مسن، استئوآرتروز زانو مهم‌ترین علت ناتوانی مزمن در کشورهای پیشرفته می‌باشد (۲) و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۰ تعداد افراد ناتوان مبتلا به استئوآرتروز دو برابر خواهد شد (۴).

با وجود روش‌های درمانی متعددی که برای استئوآرتروز به کار رفته است، متأسفانه هیچ درمان قطعی برای آن یافت نشده است (۵). روش‌های درمانی حاضر برای استئوآرتروز موجب کاهش درد و التهاب می‌شوند، اما در جلوگیری از پیشرفت بیماری اثر چشمگیری ندارند (۶). در واقع مکانیزم از بین رفتن غضروف مفصلی، دارای دلایل مختلفی است و به طور کلی به عدم تعادل بین فرایندهای تخریبی و ترمیمی/ستزی غضروف مفصلی می‌انجامد (۷).

انجمن بین‌المللی تحقیقات استئوآرتروز (OARSI یا Osteoarthritis research society international) توصیه می‌کند درمان مطلوب علایم استئوآرتروز ران و زانو شامل ترکیبی از روش‌های درمانی دارویی و غیر دارویی باشد (۸). با توجه به این که درمان‌های دارویی در جلوگیری از پیشرفت این بیماری به مرحله‌ی فرسایش مفصلی غیر قابل برگشت و دفرمیتی ناکافی به نظر می‌رسند، امروزه توجه بیشتری

به خواص دارویی مواد طبیعی (Natural products) معطوف شده است (۹).

یکی از این مواد طبیعی کورستین (Quercetin)، رایج‌ترین فلاونول موجود در رژیم غذایی انسان است که در اشکال گلیکوسیدی گوناگونی یافت می‌شود و دارای خاصیت درمانی برای انسان است. در حقیقت، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد تکثیری مواد پلی‌فنولی طبیعی همچون کورستین که در میوه‌ها و سبزیجاتی مانند گینگگو بیلوبا (Kinkgo biloba)، چای، کاشن (Lovage)، پیاز و سیب وجود دارد و به طور معمول توسط انسان جذب می‌شود، نشان از بروز و ظهور راه جدیدی برای درمان استئوآرتروز می‌دهند (۶).

از سوی دیگر، مطالعات بسیاری به بررسی نقش روش‌های غیر دارویی، به ویژه ورزش، در درمان یا مدیریت علایم استئوآرتروز پرداخته‌اند (۲۱-۱۰)؛ به طوری که ورزش درمانی به عنوان اصل بنیادی در درمان غیر جراحی این بیماری مطرح شده است (۱۱). ورزش درمانی برای استئوآرتروز ممکن است روی زمین یا در یک محیط آبی اجرا شود (۱). با وجود محبوبیت زیاد ورزش‌های آبی، اثرات کمی این برنامه‌های تمرینی هنوز به طور کامل و دقیق بررسی نشده است (۲۲، ۱).

بنابراین پیش از توصیه‌ی این برنامه‌ها، سودمندی آن‌ها باید به طور کمی مشخص شود. تحقیقات متعددی، هم روی مدل حیوانی و هم روی مدل انسانی، وجود دارند که تأثیر مکمل‌های دارویی مختلف را، هم به صورت رژیم تک دارویی و هم به شکل ترکیبی از چند مکمل، روی درمان و پیشگیری از استئوآرتروز بررسی نموده‌اند (۳۱-۲۳، ۶-۵، ۳)،

صحرائی نر ویستار با تزریق داخل مفصلی مونسو سدیم یدواستات در زانوی آزمودنی‌ها - انجام شد.

روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع تجربی بود که برای این منظور ۳۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی شامل گروه‌های شاهد سالم، شاهد پایه، کورستین، شنا و نیز کورستین + شنا تقسیم شدند. حیوانات به صورت ۳ تایی در قفس‌های مخصوص، در محیطی با دمای $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و چرخه‌ی روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت هوای 50 ± 5 درصد نگهداری شدند و موارد مندرج در بیانیه‌ی Helsinki در خصوص کار با حیوانات آزمایشگاهی در مورد آنان رعایت شد.

غذای آزمودنی‌های این پژوهش، محصول شرکت خوراک دام به‌پرور بود که به طور آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت. همچنین آب مورد نیاز هر حیوان به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ ml ویژه‌ی حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آن‌ها قرار داده شد. قبل از اجرای پروتکل تمرینی، آزمودنی‌ها به مدت چند روز با نحوه‌ی انجام فعالیت در استخر مخصوص جوندگان آشنا شدند. پروتکل تمرینی این پژوهش شامل شنا در حوضچه‌ی مخصوص جوندگان با دمای 32°C ، با سرعت $3-4/5\text{ m/s}$ به مدت ۱۵ دقیقه در هر جلسه و برای ۲۸ روز بود (۳۲).

به منظور ایجاد استئوآرتریت در زانوی موش‌های صحرائی، از تزریق درون مفصلی مونسو سدیم یدواستات استفاده شد. بدین جهت، ابتدا حیوان با تزریق زیر صفاقی کتامین ($30-50\text{ mg/kg}$) و زایلازین ($3-5\text{ mg/kg}$) بی‌هوش می‌شد و سپس به

اما با توجه به مروری که بر تحقیقات گذشته انجام شد، مطالعات کمتری به بررسی تأثیر ترکیب هر دو روش دارویی و غیر دارویی پرداخته‌اند.

همچنین لازم به ذکر است که در این مطالعات محدود، تغییراتی که در بافت آسیب دیده رخ می‌دهد، به خوبی مشخص نشده است. به همین منظور و برای بررسی دقیق تغییراتی که پس از اجرای پروتکل درمانی روی بافت آسیب دیده روی می‌دهد، نیاز به بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی می‌باشد. بدیهی است چنین روش‌های مطالعاتی روی مدل‌های انسانی قابل انجام نیست و برای این منظور، نیاز به یک مدل حیوانی است که هم از نظر بافت مفصلی و هم از نظر پاتولوژی استئوآرتریت، به انسان شباهت بسیاری داشته باشد.

بر طبق مطالعات به عمل آمده، تزریق داخل مفصلی مونسو سدیم یدواستات (MIA یا Monosodium iodoacetate) در مدل‌های حیوانی (همچون موش صحرائی)، منجر به ایجاد تغییرات پاتولوژیکی مشابه استئوآرتریت در انسان می‌شود (۳).

مونسو سدیم یدواستات، مهارکننده‌ی گلیسرالدهید ۳-فسفات دهیدروژناز (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) است و با مهار گلیکولیز منجر به مرگ کندروسیت‌ها، متلاشی شدن تراپکول‌های استخوانی همراه با فیروز و افزایش استئوکلاست‌ها، تشکیل تراپکول‌های جدید و کیست‌های ساب کندرال می‌گردد (۳).

با توجه به آن چه مورد اشاره قرار گرفت، تحقیق حاضر با هدف مطالعه‌ی اثر جداگانه و تعاملی دو عامل مهم یعنی فعالیت بدنی شامل یک دوره‌ی ۴ هفته‌ای شنا با شدت متوسط و مصرف مکمل کورستین بر بهبود استئوآرتریت زانوی موش‌های

تخریب شده‌ی کندروسیت‌ها و پروتئوگلیکان‌ها) می‌باشد که از نقطه‌ی وسط هر دو برش ساجیتال و فرونتال از درشت نی به دست می‌آید. عرض کل ناحیه‌ی تخریب شده، همان عرض کل ناحیه‌ی از غضروف مفصلی است که دچار تغییرات دژنراتیو (تخریب/ فیبریلایسیون ماتریکس، تخریب پروتئوگلیکان، همراه با یا بدون مرگ کندروسیت) شده است.

همچنین، عرض ناحیه‌ی تخریب شده به طور معنی‌دار نیز اندازه‌ی عرض غضروف درشت نی است که ضخامت آن به میزان ۵۰ درصد یا بیشتر، به طور جدی تخریب گشته است (۳۵). بسته به میزان صدمات، به هر یک از شاخص‌های پیش‌گفته، نمراتی بر حسب میکرومتر تعلق می‌گرفت تا بتوان این اطلاعات را به صورت کمی (میانگین \pm انحراف استاندارد) بیان نمود و آنالیز آماری دقیقی را در مورد میزان کل صدمات پاتولوژیکی ارائه کرد (۳۴).

قسمت‌های مختلف مفصل و نحوه‌ی محاسبه و ارزیابی شاخص‌های هیستوپاتولوژیک پیش‌گفته، در فوتومیکروگراف‌های گرفته شده به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری از مقاطع رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین-ئوزین، در شکل ۱ آمده است.

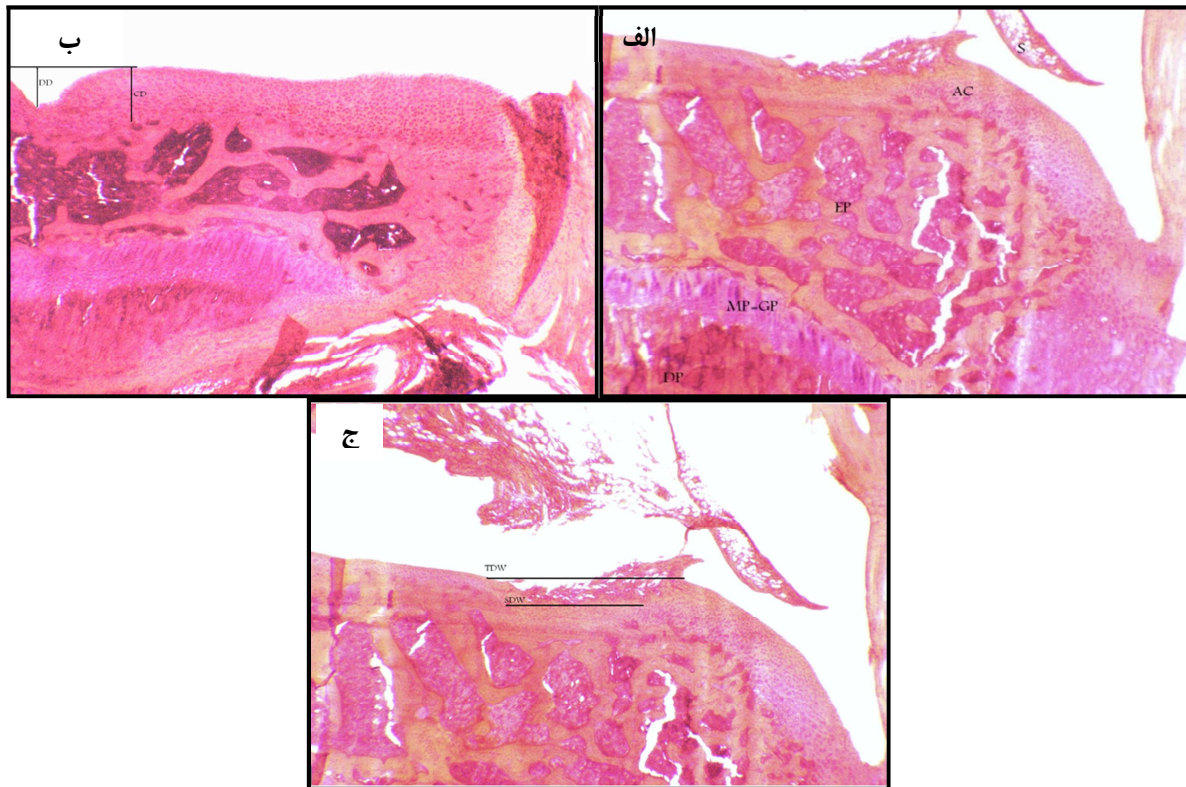
به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل، از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) در سطح معنی‌داری $P < 0/05$ و سپس جهت تعیین آن که میانگین کدام گروه‌ها با یکدیگر دارای تفاوت معنی‌دار هستند، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. کلیه‌ی مراحل تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد.

پشت قرار می‌گرفت و زانوی مورد نظر در زاویه‌ی 90° خم شدن قرار می‌گرفت. تاندون کشککی در زیر استخوان کشکک لمس شد و سپس اقدام به تزریق تک دوز مونو سدیم یدواستات (Sigma-Aldrich) با حجم $50 \mu\text{l}$ و غلظت 1 mg (با استفاده از سرنگ انسولین U-100) در این ناحیه صورت گرفت. به همین شکل در زانوی چپ آزمودنی، $50 \mu\text{l}$ سالین تزریق گردید (۳۳-۳۴).

یک روز پس از تزریق مونو سدیم یدواستات، برنامه‌ی تمرینی آغاز گردید و پس از اتمام دوره در روز ۲۸، تمام گروه‌ها با شرایط مشابه و در شرایط پایه با تزریق زیر صفاقی ماده‌ی بیهوشی ترکیبی از کتامین و زایلازین بیهوش و کشته شدند.

برای جمع‌آوری نمونه‌ها، مفاصل زانوی هر دو پای آزمودنی‌ها (شامل ناحیه‌ی دیستال ران و پروکسیمال درشت نی) توسط قیچی مخصوص جدا و بافت‌های نرم آن با دقت برداشته شد. آن گاه، هر زانو به صورت جداگانه در داخل ویال 50 CC با برچسب کددار حاوی محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت و به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شد.

مقاطع تهیه شده توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. شاخص‌های مهم هیستوپاتولوژیکی در این آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل انجمن بین‌المللی تحقیقات استئوآرتروز (OARSI)، شامل نسبت عمق ضایعه (Depth ratio of lesions)، عرض کل ناحیه‌ی تخریب شده (Total degeneration width) و عرض ناحیه‌ی تخریب شده به طور معنی‌دار (Significant degeneration width) بود. نسبت عمق ضایعه، میزان عمق دژنراسیون غضروف (شامل نواحی



شکل ۱. نحوه‌ی محاسبه‌ی شاخص‌های هیستوپاتولوژیک

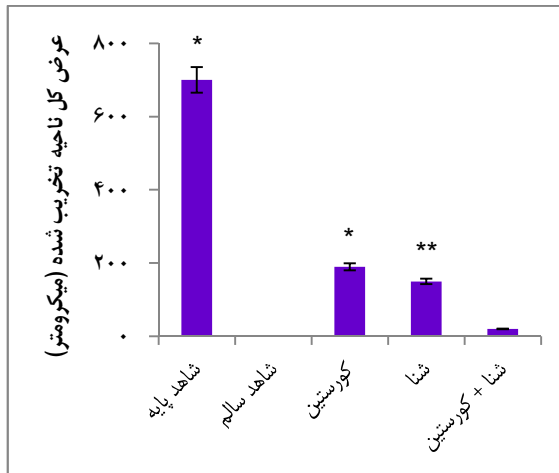
الف) قسمت‌های مختلف قابل مشاهده در فوتومیکروگراف: S (Synovial membrane) یا غشای سینویال، AC (Articular cartilage) یا غضروف مفصلی، EP (Epiphysis) یا اپی‌فیز استخوان، MP (Metaphysis) یا متافیز استخوان، DP (Diaphysis) یا دیافیز استخوان (ب) فوتومیکروگراف متعلق به آزمودنی گروه مکمل کورستین با درشت‌نمایی ۳/۲ برابر که نحوه‌ی ارزیابی نسبت یا کسر عمق ضایعه را نشان می‌دهد؛ نسبت عمق ضایعه از تقسیم عمق ناحیه‌ی تخریب بر ضخامت (عمق) غضروف بر حسب μm به دست می‌آید. عمق ضایعه (DD یا Degeneration depth)، عمق غضروف (CD یا Cartilage depth) و نسبت عمق ضایعه (DD/CD یا Degeneration depth ratio)؛ هر چه عدد به دست آمده به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد، شدت ضایعه بیشتر است. (ج) فوتومیکروگراف متعلق به آزمودنی گروه شاهد پایه که نشان دهنده‌ی تکنیک اندازه‌گیری پارامترهای استئوآرتريت در این مطالعه می‌باشد (بزرگ‌نمایی ۳/۲ برابر)؛ TDW (Total degeneration width) عرض کل ناحیه‌ی تخریب شده که از سطح اصلی غضروف اندازه‌گیری می‌شود و شامل کل ناحیه است که دچار هر گونه تخریب گشته است. (Significant degeneration width) عرض ناحیه‌ی تخریب شده به صورت معنی‌دار که نشانگر عرض غضروف مفصلی است که در آن ۵۰ درصد یا بیشتر ضخامت غضروف مفصلی از بین رفته است.

شنا و مکمل کورستین ($P = ۰/۰۴۰$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در رابطه با اثر شنا بر شاخص نسبت عمق ضایعه بین گروه شنا با گروه شاهد پایه ($P = ۰/۰۰۱$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت، اما بین گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین با گروه شنا تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P < ۰/۰۵۰$).

یافته‌ها

نسبت عمق ضایعه

تجزیه و تحلیل آماری در مورد اثر مصرف مکمل کورستین بر شاخص نسبت عمق ضایعه نشان داد که بین گروه مکمل کورستین با گروه شاهد پایه ($P = ۰/۰۰۲$)، گروه شنا ($P = ۰/۰۲۲$) و گروه ترکیب



شکل ۳. نمرات پاتولوژی (میانگین \pm انحراف استاندارد) شاخص عرض کل ناحیه‌ی تخریب شده بر حسب μm . نمرات بالاتر نشان دهنده‌ی صدمات بیشتر می‌باشد.

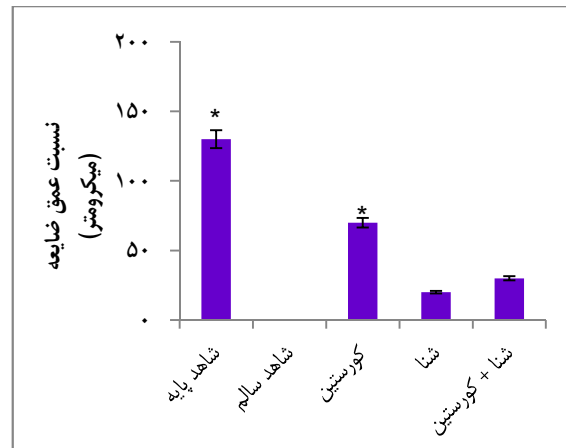
* نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کورستین + شنا و شنا می‌باشد.

** نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کورستین + شنا می‌باشد.

شاخص عرض ناحیه‌ی تخریب شده به طور معنی‌دار

تجزیه و تحلیل آماری در مورد اثر مصرف مکمل کورستین بر شاخص عرض ناحیه‌ی تخریب شده به طور معنی‌دار نشان داد که بین گروه مکمل کورستین با گروه شاهد پایه، گروه شنا و گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P = 0/001$). در رابطه با اثر شنا نتایج نشان داد که بین گروه شنا با گروه شاهد پایه تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P = 0/001$)، اما بین گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین با گروه شنا، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P < 0/050$). حال آن که گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین با گروه شاهد پایه، دارای اختلاف معنی‌دار نبود ($P = 0/001$). (شکل ۴).

بین گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین با گروه شاهد پایه تفاوت معنی‌داری ($P = 0/001$) مشاهده شد (شکل ۲).

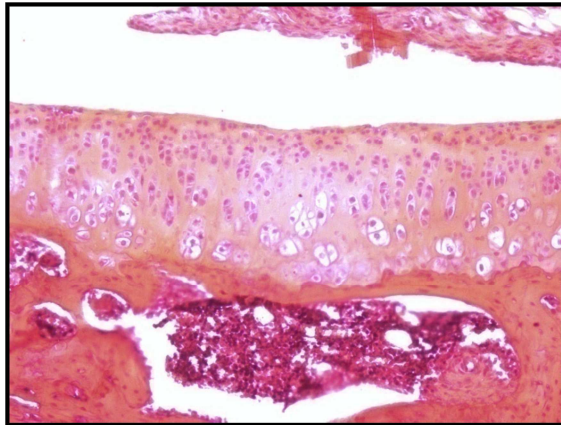


شکل ۲. نمرات پاتولوژی (میانگین \pm انحراف استاندارد) شاخص نسبت عمق ضایعه بر حسب μm . نمرات بالاتر نشان دهنده‌ی صدمات بیشتر می‌باشد.

* نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کورستین + شنا و گروه شنا و گروه کورستین است.

شاخص عرض کل ناحیه‌ی تخریب شده

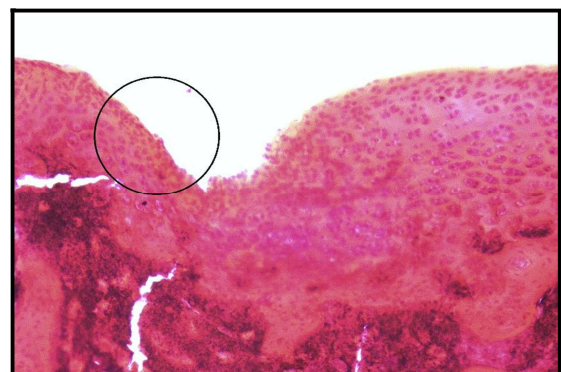
تجزیه و تحلیل آماری در مورد اثر مصرف مکمل کورستین بر شاخص عرض کل ناحیه‌ی تخریب شده، بیانگر این است که بین گروه مکمل کورستین با گروه شاهد پایه ($P = 0/001$)، گروه شنا ($P = 0/012$) و گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین ($P = 0/001$) تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در رابطه با اثر شنا نتایج نشان داد که بین گروه شنا با گروه شاهد پایه ($P = 0/001$) و گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین ($P = 0/001$)، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین تفاوت معنی‌داری ($P = 0/001$) با گروه شاهد پایه داشت (شکل ۳).



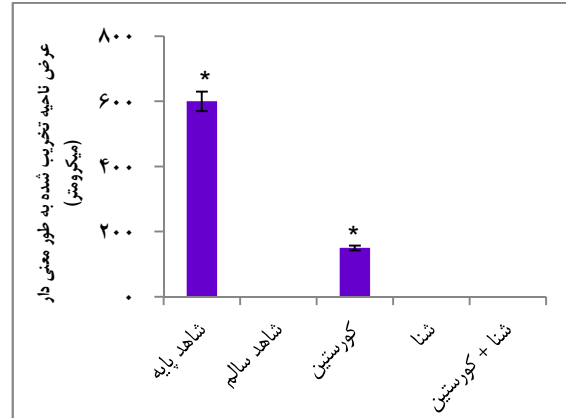
شکل ۶. فوتومیکروگراف مربوط به آزمودنی گروه شاهد سالم؛ غضروف تغییر خاصی را نشان نداده است (بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر).



شکل ۷. فوتومیکروگراف مربوط به گروه شنا؛ در این گروه تخریب بسیار سطحی بود؛ به طوری که تنها یک تغییر رنگ ماتریکس کم عمق مشاهده می‌شود و در مقابل آن، سلول‌های غضروفی در عمق سالم هستند (بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر).



شکل ۸. فوتومیکروگراف مربوط به گروه مکمل کورستین که حاکی از یک ضایعه‌ی به نسبت عمیق است (بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر).



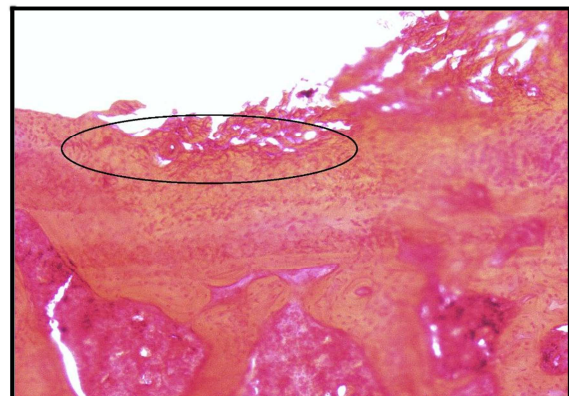
شکل ۴. نمرات پاتولوژی (میانگین \pm انحراف استاندارد) عرض ناحیه‌ی تخریب شده به طور معنی‌دار بر حسب mm^3 . نمرات بالاتر نشان دهنده‌ی صدمات بیشتر می‌باشد.

* نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کورستین + شنا و شنا می‌باشد.

تغییرات هیستومورفولوژیک مشاهده شده در

فوتومیکروگراف‌ها

فوتومیکروگراف‌های گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری از مقاطع رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین-ائوزین مربوط به همه‌ی گروه‌ها در شکل‌های ۵ تا ۹ ارایه شده است.



شکل ۵. فوتومیکروگراف مربوط به آزمودنی گروه شاهد پایه؛ ضایعات استئوآرتریت با از بین رفتن سلول‌های غضروفی و ایجاد یک فرورفتگی در سطح غضروف استخوان درشت نی دیده می‌شود. به رنگ قرمز- صورتی محل ضایعه دقت فرمایید (بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر).

راستای تحقیق حاضر می‌باشد (۶).

Huang و همکاران در مدل تجربی آرتریت ناشی از نقرس، اثر کورستین را بر التهاب ایجاد شده توسط تزریق درون مفصلی کریستال‌های اورات مونو سدیم در مفصل میچ پای موش‌های صحرایی بررسی کردند. در نهایت، محققان نتیجه گرفتند که کورستین دارای اثر ضد التهابی بسیار قوی است که می‌تواند در درمان آرتریت ناشی از نقرس مفید باشد. این نتایج نیز اثر مثبت ناشی از مصرف کورستین در تحقیق حاضر را توجیه می‌کند (۳۶). کورستین رایج‌ترین فلاونول موجود در گیاهان است (۳۷) که در مطالعات اخیر تأثیر آن در کنترل بیماری روماتوئید آرتریت اثبات شده است (۴۱-۳۸، ۹). احتمال می‌رود دلیل اثربخشی این ماده در بهبود شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی استئوآرتریت در تحقیق حاضر، خاصیت ضد التهابی، ضد اکسیدانی و ضد پرولیفراسیونی آن است. این ماده همچنین جنبه‌ی التهابی عملکرد سلول سینوویال، فعالیت نوتروفیل را مهار می‌کند (۳۸). همچنین به دلیل توانایی آنتی‌اکسیداتیو این مکمل در پاک‌سازی گونه‌های اکسیژن واکنشی و نیز توقف تولید نیتریک اکساید، کورستین می‌تواند موجب کاهش ظرفیت ماکروفاژها در تولید نیتریک اکساید (NO یا Nitric oxide) و TNF- α (Tumor necrosis factor- α) که نقش اصلی را در فرایند التهابی آرتریت بر عهده دارند، شود. نکته‌ی مهم‌تر این است که کورستین می‌تواند موجب بهبود ضایعات (Lesions) شود که این اثر درمانی در ضایعات شدیدتر (مرحله‌ای از ضایعه که با پرولیفراسیون شدید همراه است) بیشتر است. این یافته‌ها در مورد کورستین، از مطالعه بر روی ضایعات



شکل ۹. فوتومیکروگراف مربوط به آزمودنی گروه ترکیب شنا و مکمل کورستین که در آن تخریب بسیار سطحی بود؛ به طوری که تنها یک تغییر رنگ ماتریکس کم عمق و در مقابل آن سلول‌های غضروفی در عمق سالم هستند (بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر).

بحث

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر یک دوره ۴ هفته‌ای شنا با شدت متوسط و مصرف مکمل کورستین بر استئوآرتریت زانوی موش‌های صحرایی نر و بیستار بود. در زمینه‌ی اثر مصرف مکمل کورستین به مدت ۴ هفته بر شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی زانوی موش‌های صحرایی مبتلا به استئوآرتریت، نتایج نشان داد که بین گروه مکمل کورستین با گروه شاهد پایه در هر سه شاخص، تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

Lay و همکاران با استفاده از غضروف مفصلی گاو دریافتند که مکمل کورکومین و کورستین موجب مهار کاتابولیسم اگرکان موجود در غضروف گردید. همچنین محققان اثر محافظتی این دو مکمل را بلند مدت ذکر کرده‌اند؛ به طوری که پس از دوره‌ی درمانی نیز باقی می‌ماند. آنان دلیل این موضوع را ناشی از توانایی آنتی‌اکسیداتیو این دو مکمل در پاک‌سازی گونه‌های اکسیژن واکنشی و نیز توقف تولید نیتریک اکساید دانستند. این نتایج نیز در

استرس اکسایشی گردید که شاید ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اثر ورزش و کاهش صدمات اکسیداتیو و افزایش مقاومت بافت در برابر رادیکال‌های آزاد است (۱۹).

به طور کلی، استئوآرتریت یک بیماری پویا است که فعالیت‌های آنابولیک و کاتابولیک به طور همزمان در آن رخ می‌دهد و زمانی ایجاد می‌شود که عدم تعادل در توازن پویای بین تجزیه و ترمیم بافت‌های مفصل ایجاد شود (۴۳). بار متوسط و متناوب به نظر سودمند می‌رسد و برای عملکرد سالم مفصل ضروری است (۴۴). به طور کلی، ورزش یا به طور دقیق‌تر سیگنال‌های بیومکانیکی، در غضروف مفصلی مبتلا به استئوآرتریت به واکنش‌های بیوشیمیایی تبدیل می‌شوند و می‌توانند تغییرات آنابولیک را در این بافت‌ها ایجاد کنند (۱۹).

مطالعات نشان داده‌اند که نیروهای فشاری (۴۵)، حرکات برشی یا چرخشی شدید و طولانی مدت، به طور چشمگیری می‌توانند موجب تولید اینترلوکین- $\beta 1$ و فشار مکانیکی دایم می‌تواند موجب فعالیت P38MAPK شود (۴۶).

در مقابل حرکات چرخشی فشاری پویا به صورت متناوب کاتابولیسیم ناشی از اینترلوکین- $\beta 1$ را مهار می‌کند (۴۷). شنا یک نمونه‌ی چرخه‌ای از حرکت متناوب اندام است. به نظر می‌رسد چرخه‌ی متناوب فشار پویا دارای اثر محافظتی بر کندروسیت‌های غضروف است که این امر از طریق مهار فعالیت P38MAPK و مهار اینترلوکین- $\beta 1$ صورت می‌گیرد که موجب تحریک اثرات بیولوژیکی و سنتزی می‌شود (۳۲).

سلول‌های عضله‌ی صاف (Smooth muscle cells) (قلب) به دست آمده است (۴۲). مکانیزم پیشنهادی برای این خاصیت کورستین این است که این ماده بر روی ژن‌های مرتبط با پاسخ التهابی/دفاعی و کنترل چرخه‌ی سلول اثرگذار است و از این طریق، موجب التیام ضایعات می‌شود.

در زمینه‌ی اثر شنا بر شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی زانوی موش‌ها، نتایج نشان داد که بین گروه شنا با گروه شاهد پایه در هر سه شاخص تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج تحقیقات Galois و همکاران (۱۸)، Cifuentes و همکاران (۱۹) و نیز Haihong و Changjie (۳۲) همخوانی دارد.

Galois و همکاران در مطالعه‌ی خود به بررسی اثر یک برنامه‌ی تمرینی با سه شدت کم، متوسط و زیاد روی تردمیل بر پیش‌روی ضایعات زانوی رت‌های مبتلا به استئوآرتریت پرداختند. محققان به این نتیجه رسیدند که تمرین با شدت کم و متوسط اثر مثبتی بر شدت ضایعات غضروفی در مدل تجربی استئوآرتریت دارد که شاید به دلیل کاهش سطح مرگ سلولی کندروسیت‌ها از طریق ظرفیت‌های آنتی‌آپوپتوتیک (Anti-apoptotic) بوده است. در مقابل، تمرین شدید موجب از بین رفتن این اثر محافظتی می‌شود (۱۸).

Cifuentes و همکاران به ارزیابی اثر تمرین بر روی تردمیل بر غضروف مفصلی رت‌های مبتلا به استئوآرتریت پرداختند. محققان دریافتند که برنامه‌ی تمرینی موجب محافظت غضروف مفصلی در برابر استئوآرتریت و افزایش مکانیزم دفاعی در مقابل

موجب بهبود علائم استئوآرتروز شد؛ اما میزان اثربخشی آن نسبت به دو گروهی که از برنامه‌ی ورزشی شنا و ترکیب شنا و کورستین پیروی کردند، کمتر بود.

در پایان با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مصرف مکمل کورستین و تمرین شنا با شدت متوسط، هر یک به تنهایی و به صورت ترکیبی می‌توانند اثر مثبتی در بهبود علائم استئوآرتروز زانوی موش‌های صحرایی داشته باشند. این امر زمینه را برای تحقیقات آتی در رابطه با آثار درمانی این متغیرها در نمونه‌های انسانی فراهم می‌کند. همچنین محققان و متولیان سلامت جامعه را بر آن می‌دارد تا با اطمینان و قطعیت بیشتری مبتلایان به استئوآرتروز را به فعالیت بدنی و ورزش، به خصوص ورزش‌های آبی تشویق کنند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات دکتر آیدین دیلمقانیان در رابطه با بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی سپاسگزاری می‌گردد.

مهم‌ترین این که نیروهای فشاری در اندازه‌های کوچک خاصیت ضد التهابی دارند (۱۹). همچنین بیان شده است که ورزش در حفظ پروتئوگلیکان‌ها که به عنوان سیستم جذب ضربات مکانیکی به خصوص در غضروف مفصلی مطرح هستند، نقش دارد. علاوه بر این، فشار کششی چرخه‌ای از طریق تحریک mRNA ACAN (Aggrecan messenger RNA) و کاهش مهار سنتز پروتئوگلیکان موجب افزایش ترمیم غضروف می‌شود (۱۹).

نتایج به دست آمده از این تحقیق بیانگر این بود که تمرین شنا با شدت متوسط به تنهایی موجب بهبودی به طور تقریبی کامل در علائم استئوآرتروز زانوی موش‌های صحرایی در ۳ شاخص هیستوپاتولوژیکی (نسبت عمق ضایعه، عرض کل ناحیه‌ی تخریب شده و عرض ناحیه‌ی تخریب شده به طور معنی‌دار) گردید. ترکیب شنا و مصرف مکمل کورستین نیز دارای آثار مشابهی بر علائم استئوآرتروز زانوی آزمودنی‌ها بود. اما ترکیب شنا و مکمل کورستین در مقایسه با شنا به تنهایی دارای آثار بهتری نبود. مصرف مکمل کورستین نیز به تنهایی

References

- Hinman RS, Heywood SE, Day AR. Aquatic physical therapy for hip and knee osteoarthritis: results of a single-blind randomized controlled trial. *Phys Ther* 2007; 87(1): 32-43.
- Bayat N, Gharibdoost F, Nasiri Afshar F, Zamani B. Clinical and radiological analysis of OA patient referring to Baghiatallah hospital during 2003-2004. *Fez* 2006; 10(1): 42-5. [In Persian].
- Hadipour M, Mozaffari R. Protective effects of nutrients on articular cartilage of rats and its histological assessment. *Daneshvar Med* 2008; 15(75): 87-94. [In Persian].
- Gupta S, Hawker GA, Laporte A, Croxford R, Coyte PC. The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(12): 1531-7.
- Puett DW, Griffin MR. Published trials of nonmedicinal and noninvasive therapies for hip and knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* 1994; 121(2): 133-40.
- Lay E, Samiric T, Handley CJ, Ilic MZ. Short- and long-term exposure of articular cartilage to curcumin or quercetin inhibits aggrecan loss. *J*

- Nutr Biochem 2012; 23(2): 106-12.
7. Panico AM, Cardile V, Garufi F, Puglia C, Bonina F, Ronsisvalle G. Protective effect of *Capparis spinosa* on chondrocytes. *Life Sci* 2005; 77(20): 2479-88.
 8. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16(2): 137-62.
 9. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* 2001; 56(9): 683-7.
 10. Clyman B. Exercise in the treatment of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3(6): 520-3.
 11. Bennell KL, Hinman RS. A review of the clinical evidence for exercise in osteoarthritis of the hip and knee. *J Sci Med Sport* 2011; 14(1): 4-9.
 12. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18(1): 24-33.
 13. Andersson ML, Thorstensson CA, Roos EM, Petersson IF, Heinegard D, Saxne T. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2006; 7: 98.
 14. Roddy E, Zhang W, Doherty M, Arden NK, Barlow J, Birrell F, et al. Evidence-based recommendations for the role of exercise in the management of osteoarthritis of the hip or knee-the MOVE consensus. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(1): 67-73.
 15. Ng NT, Heesch KC, Brown WJ. Efficacy of a progressive walking program and glucosamine sulphate supplementation on osteoarthritic symptoms of the hip and knee: a feasibility trial. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(1): R25.
 16. Messier SP, Mihalko S, Loeser RF, Legault C, Jolla J, Pfruender J, et al. Glucosamine/chondroitin combined with exercise for the treatment of knee osteoarthritis: a preliminary study. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15(11): 1256-66.
 17. Galois L, Etienne S, Grossin L, Cournil C, Pinzano A, Netter P, et al. Moderate-impact exercise is associated with decreased severity of experimental osteoarthritis in rats. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(5): 692-3.
 18. Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Loeuille D, et al. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(10): 779-86.
 19. Cifuentes DJ, Rocha LG, Silva LA, Brito AC, Rueff-Barroso CR, Porto LC, et al. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18(8): 1088-95.
 20. Lee YJ, Park JA, Yang SH, Kim KY, Kim BK, Lee EY, et al. Evaluation of osteoarthritis induced by treadmill-running exercise using the modified Mankin and the new OARSI assessment system. *Rheumatol Int* 2011; 31(12): 1571-6.
 21. Vignon E, Valat JP, Rossignol M, Avouac B, Rozenberg S, Thoumie P, et al. Osteoarthritis of the knee and hip and activity: a systematic international review and synthesis (OASIS). *Joint Bone Spine* 2006; 73(4): 442-55.
 22. Fisher NM, Dolan DM, Brenner C, Pendergast DR. Quantitative effects of a water exercise program on functional and physiological capacity in subjects with knee osteoarthritis: a pilot study. *Sport Sci Health* 2004; 1(1): 17-24.
 23. Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* 2004; 50(10): 3145-52.
 24. Roe J, Pinczewski LA, Russell VJ, Salmon LJ, Kawamata T, Chew M. A 7-year follow-up of patellar tendon and hamstring tendon grafts for arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: differences and similarities. *Am J Sports Med* 2005; 33(9): 1337-45.
 25. Cohen M, Amaro JT, Ejnisman B, Carvalho RT, Nakano KK, Peccin MS, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction after 10 to 15 years: association between meniscectomy and osteoarthrosis. *Arthroscopy* 2007; 23(6): 629-34.
 26. Jarvela T, Paakkala T, Kannus P, Jarvinen M. The incidence of patellofemoral osteoarthritis and associated findings 7 years after anterior cruciate ligament reconstruction with a bone-patellar tendon-bone autograft. *Am J Sports Med* 2001; 29(1): 18-24.
 27. Neuman P, Englund M, Kostogiannis I, Friden T, Roos H, Dahlberg LE. Prevalence of tibiofemoral osteoarthritis 15 years after nonoperative treatment of anterior cruciate ligament injury: a prospective cohort study. *Am J Sports Med* 2008; 36(9): 1717-25.

28. Bitton R. The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care* 2009; 15(8 Suppl): S230-5.
29. National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. Handout on health: osteoarthritis [Online]. [cited 2003 Aug]; Available from: URL: http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Osteoarthritis/
30. Manek NJ, Lane NE. Osteoarthritis: current concepts in diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2000; 61(6): 1795-804.
31. Lee YC, Shmerling RH. The benefit of nonpharmacologic therapy to treat symptomatic osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2008; 10(1): 5-10.
32. Haihong SHEN, Changjie Z. The interaction of static magnetic field and swimming exercises on articular cartilage of rat's knee osteoarthritis. *Chinese J Rehabil Med* 2009; (24)8: 702-6.
33. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 2003; 31(6): 619-24.
34. Kobayashi K, Imaizumi R, Sumichika H, Tanaka H, Goda M, Fukunari A, et al. Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *J Vet Med Sci* 2003; 65(11): 1195-9.
35. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18(Suppl 3): S24-S34.
36. Huang J, Zhu M, Tao Y, Wang S, Chen J, Sun W, et al. Therapeutic properties of quercetin on monosodium urate crystal-induced inflammation in rat. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64(8): 1119-27.
37. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(1 Suppl): 230S-42S.
38. Jackson JK, Higo T, Hunter WL, Burt HM. The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflamm Res* 2006; 55(4): 168-75.
39. Kandere-Grzybowska K, Kempuraj D, Cao J, Cetrulo CL, Theoharides TC. Regulation of IL-1-induced selective IL-6 release from human mast cells and inhibition by quercetin. *Br J Pharmacol* 2006; 148(2): 208-15.
40. Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, et al. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res* 2007; 56(5): 210-5.
41. Tiku ML, Gupta S, Deshmukh DR. Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic Res* 1999; 30(5): 395-405.
42. Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, van Erk MJ, Wielinga PY, et al. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis* 2011; 218(1): 44-52.
43. Poole A, Howell D. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz RW, editor. *Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 27-49.
44. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 2000; 133(8): 635-46.
45. Villemure I, Chung MA, Seck CS, Kimm MH, Matyas JR, Duncan NA. Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth. *Connect Tissue Res* 2005; 46(4-5): 211-9.
46. Fanning PJ, Emkey G, Smith RJ, Grodzinsky AJ, Szasz N, Trippel SB. Mechanical regulation of mitogen-activated protein kinase signaling in articular cartilage. *J Biol Chem* 2003; 278(51): 50940-8.
47. Chowdhury TT, Akanji OO, Salter DM, Bader DL, Lee DA. Dynamic compression influences interleukin-1beta-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release by articular chondrocytes via alterations in iNOS and COX-2 expression. *Biorheology* 2008; 45(3-4): 257-74.

Separate and Concomitant Effect of Swimming Exercise and Quercetin Supplementation on Rat's Knee Osteoarthritis

Akbar Hajizadeh-Moghaddam PhD¹, Seyed Hossein Mirkarimpour MSc²,
Mohammad Hossein Alizadeh PhD³, Mohammad Reza Kordi PhD⁴,
Mohammad Fallah-Mohammadi MSc⁵

Original Article

Abstract

Background: Osteoarthritis is the most prevalent musculoskeletal disorder leading to chronic pain and severe disability and its prevalence is predicted to raise significantly in the future as the population ages.

Methods: Thirty male Wistar rats (weight of 173 ± 1 g, age of 8 weeks) were randomly divided into 5 equal experimental groups: 1. Intact control, 2. Osteoarthritis, 3. Quercetin, 4. Swimming, and 5. Quercetin + Swimming. Intra-articular injection of 50 μ l of monosodium iodoacetate (MIA) was applied on right knee of rats; similarly, saline was injected in left knees. The used training program was swimming in moderate intensity for 28 days. After the completion of the protocol, rats were killed and both knees of the animals were assessed histopathologically. One-way analysis of variances (ANOVA) and post-hoc Tukey tests were used for statistical analysis, at the significant level of $P < 0.05$.

Findings: Results indicated a significant difference between quercetin, swimming and quercetin + swimming groups with the osteoarthritis group ($P = 0.001$).

Conclusion: Regarding results of the study, it can be concluded that swimming exercise at moderate intensity and quercetin supplementation, either alone or in combination, have a positive effect on improvement of osteoarthritis symptoms of rat's knee. But, it seems that separate effect of quercetin supplementation and its combination with swimming exercise does not excel the effect of swimming exercise alone.

Keywords: Swimming exercise, Quercetin, Rat's knee osteoarthritis

Citation: Hajizadeh-Moghaddam A, Mirkarimpour SH, Alizadeh MH, Kordi MR, Fallah-Mohammadi M. **Separate and Concomitant Effect of Swimming Exercise and Quercetin Supplementation on Rat's Knee Osteoarthritis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(288): 805-17

1- Associate Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

2- PhD Student, Department of Sport Medicine, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Sport Medicine, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- Associate Professor, Department of Sport Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

5- PhD Student, Department of Sport Traumatology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Seyed Hossein Mirkarimpour MSc, Email: shmirkarimpour@ut.ac.ir

بررسی اثر ترکیبی داروی دفروکسامین و دوز پایین آرسنیک تری اکساید بر میزان زنده‌مانی و مهار پرولیفراسیون رده‌ی سلولی NB۴

کاظم غفاری^۱، دکتر احمد کاظمی^۲، دکتر شعبان علیزاده^۳، علی قاسمی^۱، ندا مینایی^۱، عباس قوطاسلو^۱، بهنوش طیبی^۴، دکتر محمدرضا رضوانی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد یکی از لوسمی‌های شایع رده‌ی میلوئیدی است. تدابیر درمانی مهم، استفاده از ترانس رتینوئیک اسید و در سال‌های اخیر آرسنیک تری اکساید می‌باشد. ترانس رتینوئیک اسید در برخی موارد باعث مقاومت به درمان و آرسنیک نیز در دوز بالا، سمی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر دفروکسامین، بر رده‌ی سلولی پرومیلوسیتیک حاد NB۴ جهت کاستن اثرات سمی دوز بالای آرسنیک می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه بعد از کشت و تکثیر رده‌ی سلولی NB۴، سلول‌ها با دوزهای مختلف دفروکسامین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) و دوز پایین آرسنیک (۰/۵ میکرومول) در ترکیب با دوزهای مختلف دفروکسامین (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) تیمار شدند. پس از شمارش سلول‌ها، فعالیت متابولیک با روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و درصد زنده‌مانی با روش تریپان بلو تعیین گردید. از آزمون t و نرم‌افزار Excel برای بررسی داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: سلول‌های تیمار شده با دوزهای مختلف دفروکسامین به تنهایی و در ترکیب با آرسنیک، کاهش درصد زنده‌مانی و کاهش فعالیت سلولی وابسته به دوز و زمان را نشان دادند. دوز ترکیبی آرسنیک ۰/۵ میکرومول و دفروکسامین ۲۰۰ میکرومول بیشترین اثر را در کاهش زنده‌مانی و فعالیت متابولیکی و دوز ۵۰ میکرومول دفروکسامین کمترین اثر را در زنده‌مانی و فعالیت متابولیکی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که دفروکسامین اثربخشی قابل توجهی بر زنده‌مانی رده‌ی سلولی NB۴ دارد و همچنین باعث کاهش فعالیت سلولی می‌شود.

واژگان کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آرسنیک تری اکساید، دفروکسامین

ارجاع: غفاری کاظم، کاظمی احمد، علیزاده شعبان، قاسمی علی، مینایی ندا، قوطاسلو عباس، طیبی بهنوش، رضوانی محمدرضا. بررسی اثر ترکیبی داروی دفروکسامین و دوز پایین آرسنیک تری اکساید بر میزان زنده‌مانی و مهار پرولیفراسیون رده‌ی سلولی NB۴. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۸): ۸۱۸-۸۲۷

۱- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- استاد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتی حاد (APL) یا Acute promyelocytic leukemia (AML-M۳) یا Acute myeloid leukaemia-M۳ یکی از انواع لوسمی‌های حاد میلوئیدی است که حدود ۱۰ درصد از مبتلایان به سرطان حاد میلوبلاستی را در بر می‌گیرد (۱). در این بیماری، تجمع سلول‌های غیر طبیعی خون‌ساز با ویژگی پرومیلوسیتی در مغز استخوان، غالب است. این بیماری به طور معمول با ناهنجاری کروموزومی (q۲۱;q۲۲) (۱۷؛۱۵) شناخته می‌شود، که در بیش از ۹۸ درصد بیماران مشاهده می‌گردد (۲).

این جابه‌جایی، ژن‌های گیرنده‌ی α اسید رتینوئیک (RAR α) و (Promyelocytic leukemia) PML را که به ترتیب روی کروموزم‌های ۱۷q و ۱۵q قرار گرفته‌اند، متصل می‌کند. پروتئین الحاقی ایجاد شده، نقش مهمی در لوکوموزنی APL ایفا می‌کند که پدیده‌ی تمایز در آن متوقف شده است (۳).

از طرف دیگر، این پروتئین الحاقی به عنوان گیرنده برای داروی ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) یا All trans retinoic acid (RAR α) پروتئین الحاقی و آزادسازی (Retinoic acid receptor alpha) می‌شود که نتیجه‌ی آن تمایز میلوئیدی است (۴). در بین لوسمی‌های میلوئیدی، APL به ATRA حساسیت بالایی نشان داده است که در ترکیب با شیمی درمانی موجب بهبودی بالینی موقت می‌شود، اما بیمار با دریافت ATRA بیشتر به آن مقاوم می‌شود و موجب عود (Relapse) بیماری می‌گردد (۵).

در مواردی که عود بیماری وجود دارد، داروی

آرسنیک تری اکساید (ATO یا Arsenic trioxide) داروی مناسبی می‌باشد. آرسنیک در دوزهای پایین به تنهایی نمی‌تواند باعث آپوپتوز شود و در دوزهای بالا نیز اثر سمی روی بافت‌های سالم دارد (۶).

زمانی که ATO به تنهایی به بیمار APL تجویز می‌شود، باعث بهبود در ۷۰ درصد بیماران می‌گردد؛ در حالی که در صورت ترکیب با ATRA، باعث بهبود در ۹۰ درصد بیماران می‌شود. اگر چه نتیجه‌ی درمان APL با ATRA و یا ATO در ترکیب با داروهای شیمی درمانی باعث بهبود بیماری می‌شود، اما عود و مقاومت دارویی به ATRA و یا ATO در برخی بیماران یکی از مشکلات حیاتی می‌باشد (۷).

دفروکسامین (DFO یا Deferoxamine) دارای وزن مولکولی ۶۵۶/۷۹، نیمه‌ی عمر ۶ ساعت، به صورت داخل جلدی، داخل وریدی، داخل ماهیچه‌ای و دهانی تجویز می‌شود. به صورت پودری سفید رنگ و دارای ساختار شیمیایی $C_{25}H_{48}N_6O_8CH_2O_3S$ می‌باشد (۸). DFO به عنوان یک داروی درمانی و شلاته‌کننده‌ی آهن در درمان گرانباری آهن استفاده می‌شود (۹). DFO به عنوان یک داروی ضد توموری نیز مطرح می‌باشد. آهن در شروع تومور (Tumor initiator) و تحریک ایجاد تومور (Tumor promotor) نقش دارد. خطر نسبی تومور در افراد با افزایش اشباع ترانسفرین و رژیم غذایی غنی از آهن افزایش می‌یابد (۱۰).

مطالعات نشان داده است که سلول‌های رده‌ی نوروبلاستوم حساس به DFO می‌باشند. DFO در ارتباط با دوز و زمان، سبب کاهش زنده‌مانی (Viability) سلول‌های رده‌ی نوروبلاستوم می‌شود. حدود ۹۰ درصد کاهش در زنده‌مانی این سلول‌ها

شود و همچنین در صورت دارا بودن اثر تقویتی معنی‌دار روی کاهش فعالیت متابولیکی سلول و زنده‌مانی آن، بتوان در آینده و پس از انجام مطالعات تکمیلی از ترکیب این دو دارو در درمان APL بهره‌مند شد.

روش‌ها

کشت سلول

در این مطالعه رده‌ی سلولی NB۴ (سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد، مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌ها در محیط RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute ۱۶۴۰) (Gibco)، که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco)، بیکربنات سدیم (Invitrogen) و $100 \mu\text{l}$ پنی سیلین- $100 \mu\text{g}$ استرپتومایسین (Bioidea) می‌باشد، کشت داده شدند.

محیط کشت بعد از تهیه در دمای 4°C نگهداری شد و قبل از استفاده به دمای محیط (24°C) رسانده شد. سلول‌های کشت داده شده در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و دمای 37°C نگهداری شدند.

تیمار کردن سلول‌ها با دارو

سلول‌ها در مرحله‌ی رشد لگاریتمی که در بهترین وضعیت خود به سر می‌برند و ممکن است بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها در حال تقسیم باشند، با دوزهای مختلف DFO (50 ، 100 و 200) به تنهایی و ترکیبی با ATO ($0/5 \mu\text{l}$) تیمار شدند. بنابراین در این مرحله می‌توان زمان دو برابر شدن (Doubligation time) سلول‌ها را نیز محاسبه کرد.

در مورد سلول‌های NB۴ زمان دو برابر شدن ۲۴ ساعت محاسبه شد. داروی دفروکسامین و آرسنیک

۹۶ ساعت بعد از تیمار با DFO دیده شده است (۱۱). یک کاهش ۸۰-۵۰ درصدی زنده‌مانی هپاتوماسل‌ها در تیمار با DFO نیز نشان داده شده است (۱۲).

مکانیسم‌های مهار رشد سلول‌های توموری توسط DFO پیچیده و اغلب ناشناخته می‌باشد. مشخص شده است که آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز، یک آنزیم وابسته به آهن که سبب تبدیل ریبونوکلئوتیدها به داکسی ریبونوکلئوتیدها می‌شود، یکی از اهداف DFO می‌باشد؛ از این رو از این طریق DFO یک اختلال در سنتز DNA ایجاد می‌کند (۱۳). DFO از طریق مکانیسم‌های دیگری نیز سبب القای آپوپتوز می‌شود. اگر چه این مکانیسم‌ها به طور دقیق مشخص نیست، اما بعضی مکانیسم‌های آن شناخته شده است که از جمله‌ی آن‌ها فعال کردن کاسپازها و آنزیم‌های پروتئولیتیک که واسطه‌ی القای آپوپتوز هستند، می‌باشد. DFO قادر است کاسپازهای ۸ و ۹ و کاسپاز ۳ را فعال کند (۱۴).

احتمال می‌رود DFO از طریق تخلیه‌ی آهن (Iron depletion) موجب آپوپتوز شود. از این رو، افزایش وابستگی سلول‌های توموری به آهن این مطلب را پیشنهاد می‌کند که تخلیه‌ی آهن به عنوان یک استراتژی درمانی در محدود کردن رشد تومور مطرح باشد، که این تخلیه‌ی آهن توسط شلاته‌کننده‌های آهن از جمله DFO امکان پذیر است.

با توجه به مطالبی که ذکر شد، در این مطالعه سعی گردید اثر دوز پایین آرسنیک در ترکیب با DFO روی رده‌ی سلولی NB۴ بررسی شود تا از اثرات مضر دوز بالای آرسنیک و سایر مشکلات آن مثل عدم خاصیت آپوپتوتیک در دوز پایین کاسته

بررسی فعالیت متابولیکی سلول‌ها با MTT assay

۱۰۰ μl از سوسپانسیون سلولی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و سپس داروی DFO (Sigma) و ATO به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، آزمون MTT (Sigma) مورد مطالعه قرار گرفت.

پودر MTT (Microculture tetrazolium test) با غلظت ۵ mg در ۱۰ ml محیط RPMI فاقد FBS یا توسط بافر PBS حل شد و معرف MTT تهیه گردید. سپس ۱۰۰ μl از معرف MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳-۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، پلیت با دور ۵۲۰ g به مدت ۷ دقیقه با سانتریفیوژ پللیت خور، سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ μl از محلول رویی خالی شد و به آن ۱۰۰ μl محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma) اضافه گردید و پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده شد و به مدت ۱۵ دقیقه داخل انکوباتور انکوبه گردید. سپس توسط دستگاه ELISA reader (Dynex technologies) جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد.

محاسبه‌ی مقدار P برای شمارش سلول‌ها، فعالیت متابولیکی و درصد زنده‌مانی با آزمون t و نرم‌افزار Excel انجام گردید.

یافته‌ها

کاهش شمارش سلول‌های NB۴ به دنبال مواجهه با داروی DFO و ترکیب DFO با ATO در سه فاصله‌ی زمانی

کاهش شمارش سلول‌ها وابسته به دوز و زمان بود و

در محیط RPMI ۱۶۴۰ بدون FBS (Fetal bovine serum) رقیق شدند. بدین منظور، استوک داروی دفروکسامین با غلظت ۱۰۰۰۰ μM در نظر گرفته شد. هر ۱ M دفروکسامین برابر ۶۵۶/۷۹ g/l می‌باشد. ۱۰۰ μM DFO برابر ۰/۰۶۵۶۷۹ در ۱ l می‌باشد و در ۵۰۰ CC برابر ۰/۰۳۲ می‌شود. ۱ M آرسنیک تری اکساید حدود ۲۰۰ g/l می‌باشد. ۱ M آرسنیک برابر ۲ g در ۱۰ ml می‌باشد. ۲ g آرسنیک معادل ۲۰۰۰ mg است. برای این کار از آمپول‌های ۱۰ mg در ۱۰ ml ATO (۱۰mg/۱۰ml) استفاده شد.

ATO در آمپول‌ها دارای غلظت ۵۰۰۰ μM است. برای دقت بیشتر در این مطالعه، ATO رقیق شد و از غلظت ۵۰ μM استفاده گردید. بنابراین، ۱۰ μl از دارو در ۹۹۰ μL محیط بدون FBS حل شد تا غلظت ۰/۵ μM آرسنیک تهیه شود.

برای تیمار اولیه از پللیت‌های ۱۲ خانه‌ای و حجم نهایی ۱۰۰۰ μl در هر چاهک استفاده شد. پس از تیمار درصد سلول‌های زنده با فاصله‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به وسیله‌ی تریپان بلو محاسبه شد.

بررسی زنده‌مانی سلول‌ها با تریپان بلو: برای

بررسی زنده‌مانی، ۵۰ μl از سوسپانسیون سلولی داخل میکروتیوب ریخته شد و به همان میزان تریپان بلو (Sigma) به آن اضافه گردید و به مدت ۲-۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۱۰ μl از سلول با لام نئوبار سلول‌های زنده و مرده شمارش گردید. سلول‌های زنده نسبت به رنگ تریپان بلو نفوذ ناپذیر و بی‌رنگ دیده می‌شوند. در سلول‌های مرده رنگ وارد سیتوپلاسم می‌شود و سلول‌ها به رنگ آبی مایل به بنفش دیده می‌شوند.

کمی روی زنده‌مانی داشت، اما دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ DFO در ترکیب با ATO باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان زنده‌مانی شد. کمترین زنده‌مانی سلول در دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO طی ۷۲ ساعت مجاورت با دارو مشاهده گردید (شکل ۱).

با استفاده از فرمول زیر درصد زنده بودن سلول‌ها محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{میانگین سلول‌های زنده}}{\text{میانگین مجموع سلول‌های زنده و مرده}} = \text{درصد زنده ماندن}$$

بر طبق شکل ۱ داروی دفروکسامین به تنهایی بر زنده‌مانی سلول اثر می‌گذارد؛ اما در ترکیب با آرسنیک، اثربخشی آن بسیار مشهود است که می‌توان نتیجه گرفت که این دو دارو اثر هم‌افزایی و سینرژیک در ترکیب با هم دارند.

مقدار P دوزهای مختلف DFO و ترکیب دوزهای DFO با دوز ۰/۵ آرسنیک تری اکساید برای زنده‌مانی سلول‌ها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به میزان $P < 0/050$ به دست آمد.

کمترین تعداد سلول در دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO طی ۷۲ ساعت مجاورت با دارو مشاهده گردید و بیشترین تعداد سلول در گروه شاهد و ۵۰ DFO طی ۲۴ ساعت مواجهه با دارو مشاهده شد (جدول ۱).

بررسی مقایسه‌ای تیمار دارویی در سه فاصله‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌ها در ۷۲ ساعت بعد از تیمار دارویی وجود داشت. بیشترین کاهش تعداد سلول مربوط به دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO در سه فاصله‌ی زمانی بود.

برای دوزهای مختلف DFO و ترکیب دوزهای DFO با دوز ۰/۵ آرسنیک تری اکساید با شمارش سلول‌ها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت $P < 0/050$ به دست آمد.

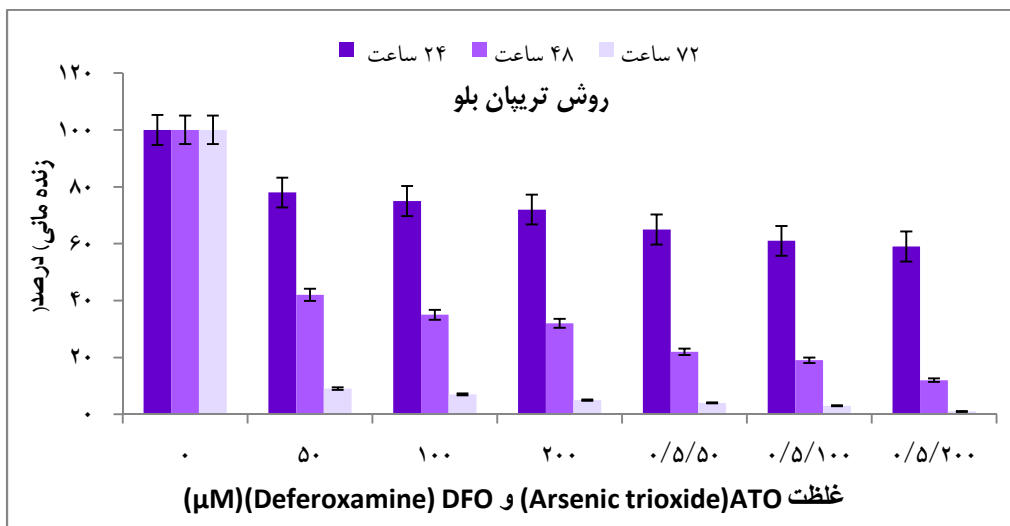
کاهش زنده‌مانی در مواجهه با DFO و ترکیب DFO با ATO در سه دوز درمانی

دوز ۵۰ μM DFO به تنهایی و در ترکیب با دوز ۰/۵ μM ATO در یک حالت وابسته به زمان اثر

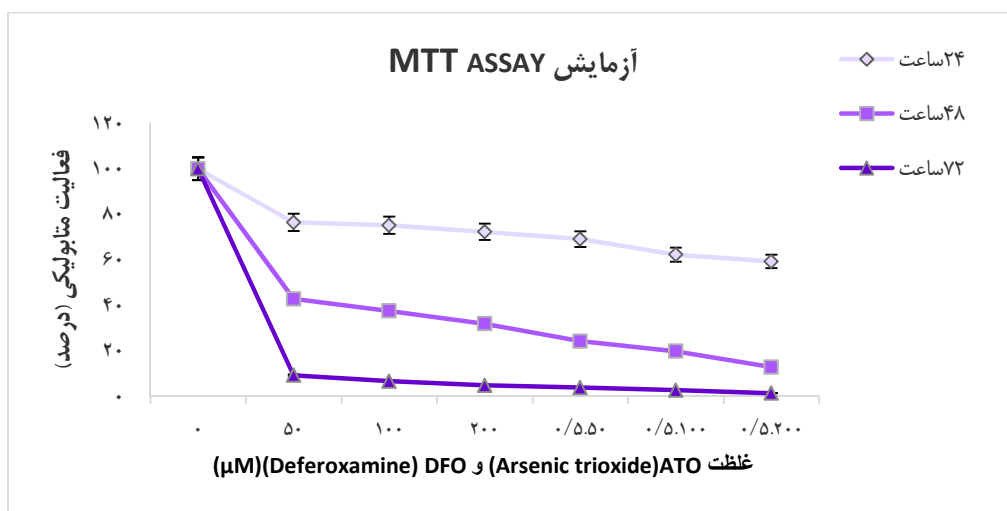
جدول ۱. شمارش سلولی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با دارو

ترکیب دارو	تعداد سلول		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۵۰ DFO	۳۴۵۰۰۰	۱۶۸۰۰۰	۱۰۳۰۰۰
۱۰۰ DFO	۳۲۹۰۰۰	۱۴۰۰۰۰	۹۱۰۰۰
۲۰۰ DFO	۲۸۳۰۰۰	۱۱۱۰۰۰	۷۹۰۰۰
۰/۵ ATO/۵۰ DFO	۲۶۷۰۰۰	۹۵۰۰۰	۶۶۰۰۰
۰/۵ ATO/۱۰۰ DFO	۲۵۶۰۰۰	۸۰۰۰۰	۵۴۰۰۰
۰/۵ ATO/۲۰۰ DFO	۲۴۸۰۰۰	۷۲۰۰۰	۳۸۰۰۰
شاهد	۴۶۴۰۰۰	۳۰۲۰۰۰	۲۰۰۰۰۰

DFO: Deferoxamine; ATO: Arsenic trioxide



شکل ۱. بررسی مقایسه‌ای زنده‌مانی سلول‌ها با تریپان بلو پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با دارو



شکل ۲. بررسی مقایسه‌ای فعالیت متابولیک سلول‌ها با MTT assay پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مجاورت با دارو

گردید. کمترین فعالیت متابولیکی در دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO طی ۷۲ ساعت مجاورت با دارو مشاهده گردید و بیشترین فعالیت متابولیکی در دوز ۵۰ DFO پس از ۲۴ ساعت مجاورت مشاهده شد (شکل ۲).

هر چه غلظت DFO بیشتر باشد، اثر مهار کنندگی بر فعالیت متابولیکی سلول بیشتر است. DFO در ترکیب با آرسنیک تری اکساید بیشترین اثر مهار

کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های NB4 به دنبال مواجهه با داروی DFO و ترکیب DFO با ATO در سه فاصله‌ی زمانی

برای بررسی فعالیت متابولیک سلولی، از آزمایش رنگ‌سنجی MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد. جذب نوری دوزهای مختلف با جذب نوری شاهد مقایسه شد و درصد فعالیت متابولیکی هر دوز طی سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه

درمان APL باعث کاهش سمیت و عوارض جانبی ATO گردد.

Zhang و همکاران، با مطالعه روی رده‌ی سلولی HL-۶۰ نشان دادند که آرسنیک در دوز کم، اثر قابل توجهی در القای آپوپتوز روی این سلول‌ها ندارد (۱۶). آرسنیک به طور مستقیم باعث ساموئیلینه (Sumoylation) و یوبیکیتویناسیون (Ubiquitination) موتیف (Motif) غنی از سیستئین پروتئین PML می‌شود و در نتیجه باعث تجزیه‌ی پروتئوزومال آن می‌شود (۶). همچنین آرسنیک در دوز کم به تنهایی اثری روی تکثیر و زنده‌مانی سلول‌ها ندارد. ترکیب ATRA و ATO باعث کاهش پروتئین الحاقی PML-RAR α و بقای بیشتر بیماران با APL می‌شود (۱۷).

در مطالعات Ex vivo نشان داده شد که DFO به عنوان یک داروی ضد توموری مفید مطرح می‌باشد. همچنین تیمار سلول‌های نوروبلاستوما با DFO سبب کاهش زنده‌مانی ۹۰ درصدی این سلول‌ها بعد از ۹۶ ساعت شد. در مطالعه‌ی حاضر بر روی سلول NB۴ نیز کاهش زنده‌مانی در دوز ترکیبی ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO پس از ۷۲ ساعت مجاورت با دارو مشاهده شد که یکدیگر را تأیید می‌کند.

Tanaka و همکاران نشان دادند که DFO سبب مهار رشد سلول‌های بدخیم F9 embryonal carcinoma cells از طریق القای تمایزشان می‌شود (۱۸). همچنین القای آپوپتوز در سلول‌های رده‌ی ML-۱ (Myeloblastic leukemia) و Raji (Burkitts lymphoma) در تیمار با DFO نشان داده شده است. توقف رشد سلول‌های لوکمیک به دنبال درمان با DFO در یک نوزاد

کنندگی بر فعالیت متابولیک را دارد که نشان از تقویت اثر آرسنیک توسط DFO می‌باشد.

مقدار P دوزهای مختلف DFO و ترکیب دوزهای DFO با دوز ۰/۵ μM آرسنیک تری اکساید برای فعالیت متابولیکی بعد از ۲۴ ساعت $P < ۰/۰۵۰$ ، بعد از ۴۸ ساعت معادل $P < ۰/۰۰۳$ و بعد از ۷۲ ساعت $P < ۰/۰۰۸$ محاسبه شد که معنی‌دار بودند.

بحث

مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که DFO می‌تواند باعث کاهش زنده‌مانی و فعالیت متابولیکی سلول NB۴ شود و همچنین در دوز ترکیبی با آرسنیک تری اکساید، اثربخشی آرسنیک را تقویت کند. بر اساس یافته‌های این مطالعه، بهترین دوز درمانی ترکیب ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO پس از ۷۲ ساعت مجاورت با دارو بود که بیشترین اثرگذاری را نشان داد. همچنین دوز درمانی ترکیب ۲۰۰ DFO با ۰/۵ ATO پس از ۲۴ ساعت مجاورت با دارو، بهترین اثرگذاری را در زمان کوتاه ۲۴ ساعت داشت.

در دوز ۲۰۰ DFO کاهش تعداد سلول، کاهش زنده‌مانی و کاهش فعالیت متابولیکی بسیار واضح بود. اختلاف نتایج مطالعه‌ی حاضر از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < ۰/۰۵۰$). احتمال می‌رود DFO به مانند ATO دارای مکانیسم‌های مولکولی مشابهی باشد که باعث کاهش فعالیت سلولی و زنده‌مانی سلول می‌شود. توصیه می‌گردد مطالعات تکمیلی و مولکولی در مورد مکانیسم اثر DFO انجام شود. بنابراین مطالعه‌ی حاضر نشان داد که DFO در ترکیب با ATO در مقایسه با ATO به تنهایی بسیار مؤثرتر است و می‌توان نتیجه گرفت که DFO می‌تواند در

بهبودی بیشتر بیماران مقاوم به درمان و بیماران عود یافته، علاوه بر بیماری اولیه APL شد. بدین صورت که داروی آرسنیک باعث القای آپوپتوز در سلول‌های NB۴ می‌شود (۱۵).

از آن جایی که مسیرهای آپوپتوتیک مشترکی بین DFO و ATO وجود دارد، ممکن است به کار بردن DFO در ترکیب با دوز پایین و غیر آپوپتوتیک آرسنیک باعث تقویت اثر دوز پایین آرسنیک در القای آپوپتوز و کاهش فعالیت متابولیکی شود. در این مطالعه، مشاهده شد که DFO باعث کاهش رشد و فعالیت متابولیکی سلول می‌گردد. از آن جا که تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با اثرات DFO بر روی بیان ژن‌ها، چرخه‌ی سلولی و مسیرهای انتقال پیام صورت نگرفته است؛ بنابراین توصیه می‌شود تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت پذیرد تا مکانیسم اثرات DFO به تنهایی و همچنین اثرات ترکیبی DFO با ATO به طور کامل مشخص شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل حمایت مالی این طرح به شماره‌ی ۲۲۳۳۱-۳۱-۰۲-۹۲ و همچنین از مسئولین و پرسنل آزمایشگاه هماتولوژی و آزمایشگاه تحقیقات مرکزی دانشکده‌ی پیرا پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام این مطالعه با ما همکاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Neonatal acute leukemia مشاهده گردید (۱۹).

Hann و همکاران، یک کاهش ۵۰-۸۰ درصدی زنده‌مانی هیپاتوماسل‌ها را در تیمار با DFO نشان دادند (۲۰).

در نهایت، در یک مطالعه DFO در ترکیب با داروهای دیگر (Combination therapy)، شامل Thiotepeا، Cyclophosphamide، Etoposide، Carboplatin و بر روی ۵۴ بیمار با نوروبلاستومای پیشرفته استفاده شد که سبب بهبودی کامل ۲۷ نفر و بهبود نسبی در ۲۶ نفر و بهبود خفیفی در ۳ نفر گردید (۲۱). نتایج ما با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد و یکدیگر را نقض نمی‌کنند.

مکانسیم‌های مولکولی اثر این دو دارو به طور کامل مشخص نیست. بسیاری از اثرات دفروکسامین و آرسنیک روی رده‌های سلولی و القای آپوپتوز مشابه است. علت اصلی انتخاب داروی دفروکسامین به این دلیل بود که این دارو مراحل کارآزمایی بالینی خود را در بسیاری از بیماری‌ها از جمله هموکروماتوز و تالاسمی ماژور سپری کرده است و یکی از اهداف درمانی این بیماری‌ها محسوب می‌گردد.

برداشت پایانی این که ATRA در سال ۱۹۸۵ به عنوان درمان جدید APL معرفی شد. اما بیمار با دریافت ATRA بیشتر به آن مقاومت نشان می‌دهد و موجب عود می‌گردد. اما ترکیب ATRA و شیمی درمانی باعث بهبودی کامل در ۹۵-۹۰ درصد بیماران می‌شود. به کار بردن آرسنیک تری اکساید باعث

References

1. Rego EM, De Santis GC. Differentiation syndrome in promyelocytic leukemia: clinical presentation, pathogenesis and treatment. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3(1): e2011048.
2. Jovanovic JV, Rennie K, Culligan D, Peniket A, Lennard A, Harrison J, et al. Development of real-time quantitative polymerase chain reaction assays to track treatment response in retinoid

- resistant acute promyelocytic leukemia. *Front Oncol* 2011; 1: 35.
3. Grimwade D, Mrozek K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25(6): 1135-61, vii.
 4. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369(2): 111-21.
 5. Park JH, Tallman MS. Treatment of acute promyelocytic leukemia without cytotoxic chemotherapy. *Oncology (Williston Park)* 2011; 25(8): 733-41.
 6. Lang E, Grudic A, Pankiv S, Bruserud O, Simonsen A, Bjerkvig R, et al. The arsenic-based cure of acute promyelocytic leukemia promotes cytoplasmic sequestration of PML and PML/RARA through inhibition of PML body recycling. *Blood* 2012; 120(4): 847-57.
 7. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol* 2013; 97(6): 717-25.
 8. Bergeron RJ, Wiegand J, Brittenham GM. HBED ligand: preclinical studies of a potential alternative to deferoxamine for treatment of chronic iron overload and acute iron poisoning. *Blood* 2002; 99(8): 3019-26.
 9. Liu ZD, Hider RC. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. *Med Res Rev* 2002; 22(1): 26-64.
 10. Stevens RG, Graubard BI, Micozzi MS, Neriishi K, Blumberg BS. Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. *Int J Cancer* 1994; 56(3): 364-9.
 11. Blatt J, Stitely S. Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines. *Cancer Res* 1987; 47(7): 1749-50.
 12. Deugnier Y, Turlin B. Iron and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(5): 491-4.
 13. Lederman HM, Cohen A, Lee JW, Freedman MH, Gelfand EW. Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. *Blood* 1984; 64(3): 748-53.
 14. Renton FJ, Jeitner TM. Cell cycle-dependent inhibition of the proliferation of human neural tumor cell lines by iron chelators. *Biochem Pharmacol* 1996; 51(11): 1553-61.
 15. Li J, Chen P, Sinogeeva N, Gorospe M, Wersto RP, Chrest FJ, et al. Arsenic trioxide promotes histone H3 phosphoacetylation at the chromatin of CASPASE-10 in acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49504-10.
 16. Zhang TC, Schmitt MT, Mumford JL. Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells in vitro. *Carcinogenesis* 2003; 24(11): 1811-7.
 17. Sanz MA, Fenaux P, Lo CF. Arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. A review of current evidence. *Haematologica* 2005; 90(9): 1231-5.
 18. Tanaka T, Muto N, Ido Y, Itoh N, Tanaka K. Induction of embryonal carcinoma cell differentiation by deferoxamine, a potent therapeutic iron chelator. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1357(1): 91-7.
 19. Fukuchi K, Tomoyasu S, Watanabe H, Tsuruoka N, Gomi K. G1 accumulation caused by iron deprivation with deferoxamine does not accompany change of pRB status in ML-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1357(3): 297-305.
 20. Hann HW, Stahlhut MW, Hann CL. Effect of iron and desferoxamine on cell growth and in vitro ferritin synthesis in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 1990; 11(4): 566-9.
 21. Donfrancesco A, Deb G, Angioni A, Maurizio C, Cozza R, Jenkner A, et al. D-CECaT: a breakthrough for patients with neuroblastoma. *Anticancer Drugs* 1993; 4(3): 317-21.

The Combination Effect of Low-Dose Arsenic Trioxide plus Deferoxamine on Viability and Inhibiting the Proliferation of NB4 Cell Line

Kazem Ghaffari MSc¹, Ahmad Kazemi PhD², Shaban Alizadeh PhD³, Ali Ghasemi MSc¹, Neda Minayi MSc¹, Abbas Ghotaslou MSc¹, Behnoush Tayebi MSc⁴, Mohammad Reza Rezvani PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: Acute promyelocytic leukemia (APL) is one of the most prevalent myeloid lineage leukemia. Currently-available treatment options for these patients are using all trans-retinoic acid (ATRA) and, recently, arsenic trioxide (ATO). All trans-retinoic acid may cause treatment resistance in some cases; and arsenic trioxide, in high doses, has cytotoxic effects. In our study, we determined the ability of deferoxamine (DFO) in reducing the cytotoxic effects of high doses of arsenic on NB4 cell line in the acute promyelocytic leukemia.

Methods: The NB4 cell line cultured, expanded and then treated with different doses of deferoxamine (50, 100, and 200 μ M) alone, and low dose of arsenic trioxide (0.5 μ M) in combination with different doses of deferoxamine (50, 100, 200 μ M). Proceeding cells were counted, metabolic activity was measured using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] reduction assay and cell viability was determined via trypan blue exclusion assay. The data were analyzed using the Student's t-test method and the Excel software.

Findings: Cells treated with different doses of deferoxamine, alone and in combination with arsenic trioxide, showed decrease in viability and cell activity in a dose- and time-dependent manner. Treatments with combination of 0.5 μ M arsenic trioxide and 200 μ M deferoxamine showed the maximum effect in decreasing viability and metabolic activity of NB4 cells; and treatments with deferoxamine alone showed the minimum effect in declining viability and metabolic activity.

Conclusion: This study shows that deferoxamine has a significant effect on viability of NB4 cell line and also causes decrease in cell activity. It seems that deferoxamine is an appropriate agent for inhibition of tumor cells.

Keywords: Acute promyelocytic leukemia, Arsenic trioxide, Deferoxamine

Citation: Ghaffari K, Kazemi A, Alizadeh Sh, Ghasemi A, Minayi N, Ghotaslou A, et al. **he Combination Effect of Low-Dose Arsenic Trioxide plus Deferoxamine on Viability and Inhibiting the Proliferation of NB4 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(288): 818-27

1- Department of Hematology, Allied Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Hematology, Allied Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Hematology, Allied Medical School, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

5- Associate Professor, Department of Hematology, Allied Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Ahmad Kazemi PhD, Email: a.kazemi@iums.ac.ir

القای تشکیل سلول‌های شبه عصبی از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات با استفاده از روش تشکیل نوروسفر

دکتر شهناز رضوی^۱، زهرا خسروی زاده^۲، دکتر حمید بهرامیان^۳، محمد کاظمی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هیدروژل‌ها محیط سه بعدی مناسبی را برای کشت انواع مختلف سلول‌ها فراهم می‌کنند و انکپسوله کردن سلول در هیدروژل‌ها روش مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت است. آلژینات، هیدروژل زیست سازگاری است که سیستم مناسبی برای انکپسوله کردن سلول‌ها فراهم می‌کند. به علاوه، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند که ممکن است منبع مناسبی از سلول‌ها جهت استفاده در سلول درمانی به صورت اتولوگ باشند.

روش‌ها: در این مطالعه سرنوشت سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلژینات را که به مدت یک هفته در محیط کشت القای عصبی کشت شدند، بررسی شد. با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و تکنیک ایمنوسیتوشیمی به ترتیب میزان تکثیر و تمایز عصبی این سلول‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری در میانگین درصد سلول‌های GFAP (Glial fibrillary acidic protein)، Nestin و MAP2 (Microtubule-associated protein2) مثبت و کاهش معنی‌داری در میزان تکثیر و بقای سلول‌های انکپسوله در مقایسه با سلول‌های کشت تک لایه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: هیدروژل آلژینات می‌تواند محیط مناسبی برای تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی فراهم کند.

واژگان کلیدی: هیدروژل آلژینات، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، تمایز عصبی، تکثیر

ارجاع: رضوی شهناز، خسروی زاده زهرا، بهرامیان حمید، کاظمی محمد. القای تشکیل سلول‌های شبه عصبی از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات با استفاده از روش تشکیل نوروسفر. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۸): ۸۴۰-۸۲۸

مقدمه

در موقعیت‌های فیزیولوژیک سلول‌ها در یک محیط سه بعدی رشد می‌کنند (۱)، در حالی که متابولیسم، بیان ژن، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و مورفولوژی سلول‌های کشت شده در محیط دو بعدی

با آن چه در شرایط فیزیولوژیک اتفاق می‌افتد، متفاوت است (۲). در مهندسی بافت، سلول‌ها به طور معمول بر روی داربستی شبیه به ماتریکس خارج سلولی بافت‌های نرم کشت داده می‌شوند (۳). داربست به عنوان یک ماتریکس خارج سلولی

۱- استاد، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

برای رهایش دارو، انکپسوله کردن سلول و تولید مجدد بافت استفاده می‌شود (۲۳-۱۸).

انواعی از سلول‌ها شامل استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها، سلول‌های جزایر پانکراس، سلول‌های مزانشیمی و سلول‌های بنیادی عصبی در هیدروژل آلژینات به صورت *In vivo* و *In vitro* انکپسوله و کشت داده شده‌اند (۲۶-۲۴، ۱۶، ۸، ۶). سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات ممکن است به خوبی توسط سیستم عصبی مرکزی تحمل شوند؛ زیرا سیستم عصبی مرکزی مکانی با مصنوعیت ایمنی است (۲۷).

در سال‌های اخیر سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز از بافت‌های فرد بالغ مانند مغز استخوان، پوست، عضله و چربی جدا شده‌اند (۲۸). از میان این بافت‌ها، مغز استخوان بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است، در حالی که بافت چربی ممکن است مزایای بیشتری در مقایسه با مغز استخوان داشته باشد (۲۹). سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی (ADSCs یا Adipose derived stem cells) توانایی خود نوسازی و تمایز به دودمان‌های مختلف بافت مزانشیمی را دارند (۳۰-۳۱). این سلول‌ها می‌توانند در تعداد بیشتر استخراج شوند و توانایی رشد و تکثیر بالایی دارند (۳۲)، به علاوه کارایی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی با افزایش سن، جنس، چاقی و بعضی بیماری‌ها مانند نارسایی کلیوی و بیماری عروقی تغییر نمی‌کند (۳۳).

آزمایش‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، عوامل نوروتروفیک BDNF (Brain derived neurotrophic factor)، NGF (Nerve growth factor)، GDNF

سنتتیک جهت ایجاد سیگنال‌های هدایت کننده سلول‌ها و تکامل بافت جدید استفاده می‌شود. از آن جا که داربست‌ها شبکه‌های سه بعدی بسیار هیدراته هستند، ساختاری شبیه به ماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌کنند. هیدروژل‌ها شبکه‌های سه بعدی از پلیمرهای هیدروفیلیک با اتصالات عرضی هستند که در محیط آبی بسیار متورم می‌شوند (۴).

فضا و پایداری مکانیکی ایجاد شده به وسیله این اتصالات عرضی، می‌تواند جهت پر کردن نقص‌های نامنظم ایجاد شده در حین آسیب و تشکیل بافت جدید مفید باشد (۵-۷).

داربست سه بعدی هیدروژل آلژینات به علت تهیه آسان و توانایی آن برای انکپسوله کردن سلول‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۸-۱۲). آلژینات یک پلی ساکارید خطی مشتق از جلبک قهوه‌ای و محلول در آب است که از مونومرهای L-guluronicacid (G) و D-mannuronicacid (M) تشکیل شده است. به علت توانایی ژل شدن و ویسکوزیته‌ی بالای آن در محلول‌های آبی، آلژینات به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی استفاده می‌شود (۱۳-۱۴).

هیدروژل آلژینات در تداخل عمل یون‌های دو ظرفیتی از قبیل کلسیم با توالی‌های G محلول آلژینات سدیم ساخته می‌شود (۱۵-۱۶، ۱۰). آلژینات ویژگی‌های مفیدی از قبیل زیست سازگاری و عدم تحریک سیستم ایمنی دارد که احتمال می‌رود مربوط به خاصیت هیدروفیلیک آن باشد (۱۷). همچنین این هیدروژل فراوان، ارزان و غیر سمی است (۱۱). چون سلول‌ها در طی فرایند ژل شدن و تشکیل اتصالات عرضی یونی آسیب نمی‌بینند، این ماده به طور وسیعی

از تمایز عصبی بررسی و با گروه شاهد مقایسه شود. نظر به این که در سیستم عصبی ماتریکس خارج سلولی بسیار کمی وجود دارد، آلژینات می‌تواند به عنوان ماتریکس خارج سلولی عمل کند و در صورتی که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در آلژینات تمایز عصبی مطلوبی داشته باشند، می‌توان از این داربست جهت پیوند در بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده نمود.

روش‌ها

روش جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی

نمونه‌های چربی انسانی استفاده شده در این تحقیق از بافت چربی سه خانم، پس از تکمیل فرم رضایت و عمل سزارین تهیه شد. بافت چربی بلافاصله پس از عمل جراحی در ظرف حاوی PBS (Phosphate buffered saline) به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل شد. بافت چربی به همراه ظرف آن وزن شد. زیر هود، نمونه چند بار با PBS شسته شد تا دبری و خون از بافت چربی جدا شود. به وسیله تیغ اسکالپل و پنس استریل پوست، بافت فیروز و عروق خونی جدا شد و پس از قطعه قطعه کردن، بافت چربی به فالكون ۵۰ ml منتقل شد.

سلول‌های جدا شده از بافت چربی به ظرف منتقل و دوباره وزن شد و با کم کردن آن از وزن اولیه، وزن چربی استفاده شده تعیین شد. به ازای هر گرم چربی، ۰/۵ ml آنزیم کلاژناز A ۰/۰۱ درصد به فالكون اضافه شد. پس از مخلوط کردن آنزیم با چربی، فالكون به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. برابر با حجم آنزیم، محیط کشت حاوی FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد به فالكون حاوی چربی جهت خنثی کردن آنزیم اضافه و سپس به

(Glial derived neurotrophic factor) و عوامل رشد عصبی بهبود دهنده‌ی بازسازی میلین را در اعصاب آسیب دیده تولید می‌کنند و نسبت به آپوپتوز مقاوم‌تر هستند (۳۷-۳۴). مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی از قبیل لامینین در تولید دوباره‌ی عصب نقش دارند و مطالعات جدید نشان داده‌اند که این سلول‌ها لامینین را بیان می‌کنند که می‌تواند در موش‌های دارای نقص لامینین حاصل از سلول شوان، موجب تسریع آرایش آکسون، میلینه شدن و بهبود عملکرد شود (۳۸). مولکول‌های آنژیوژنیک مانند عامل رشد اندوتلیال عروق (VEGF یا Vascular endothelial growth factor) که باعث افزایش رشد زواید نوریت می‌شوند، به میزان بالا توسط سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی بیان می‌شود (۳۹-۴۰).

آزمایش‌های اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی می‌توانند ویژگی‌های خاص سلول‌های عصبی و گلیال را بیان کنند (۴۱-۴۲، ۳۰). با توجه به مزایای ذکر شده، می‌توان به تعداد کافی سلول بنیادی از بافت چربی استخراج و در موارد کلینیکی استفاده نمود.

با توجه به مزایای سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و ویژگی‌های منحصر به فرد کپسول هیدروژل آلژینات در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی و از آن جا که تاکنون تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات در زمان‌های مختلف بررسی نشده است، تصمیم گرفته شد این سلول‌ها در هیدروژل آلژینات کشت شوند و بیان نشانگرهای GFAP (Glial fibrillary acidic protein)، Nestin و MAP۲ (Microtubule-associated protein۲) پس

و پس از چند بار پیپت کردن، ۵ دقیقه با دور rpm ۱۶۰۰ سانتریفوژ شد. محیط روی سلول‌ها تخلیه و ۱ ml محیط کشت نوروبازال به نروسفرهای منفرد شده اضافه گردید. جهت انجام هر آزمایش تعداد مناسب سلول در نظر گرفته شد و جهت انکپسوله کردن سلول‌ها در هیدروژل آلژینات، $10^6 \times 1$ سلول به ۱ ml آلژینات منتقل شد.

سلول‌های کشت تک لایه‌ای به عنوان گروه شاهد و سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات به عنوان گروه آلژینات در نظر گرفته شد. جهت تهیه‌ی ۲۰ ml مـدیوم القـای عـصبـی، از Neurobasal medium ۱۸ ml، FBS ۱ ml، $200 \mu\text{l}$ NEAA، پنی سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد، $200 \mu\text{l}$ NEAA، (Non-essential amino acid) $200 \mu\text{l}$ L-Glu، $400 \mu\text{l}$ B_{۲۷} (۱x)، Nystatin $200 \mu\text{l}$ و $200 \mu\text{l}$ N_۲ استفاده شد.

نحوه‌ی انکپسوله کردن سلول‌ها در هیدروژل

آلژینات

شمارش سلولی انجام شد و برای هر ۱ ml محلول هیدروژل آلژینات $10^6 \times 1$ سلول در نظر گرفته شد. سلول‌ها به سرنگ ۵ ml حاوی ۱ ml محلول آلژینات منتقل شدند. محلول آلژینات حاوی سلول‌های بنیادی به وسیله‌ی سرنگ با Gage ۲۲ در چاهک‌های پلیت ۲۴ well محتوی محلول CaCl_2 ، 10.2 mM قطره‌گذاری شد. پلیت محتوی بیدهای آلژینات به مدت نیم ساعت در انکوباتور قرار داده شد. محلول CaCl_2 از روی بیدها حذف شد و بیدها دو بار با بافر 20 mM Tris و یک بار با محیط کشت شسته شد. محیط کشت القای عصبی به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور قرار گرفت.

مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۶۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی تخلیه و بار دیگر محیط کشت به رسوب سلولی اضافه و پیپت شد و نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۶۰۰ سانتریفوژ شد. پس از تخلیه‌ی مایع رویی، سوسپانسیون سلولی جهت کشت به فلاسک‌های محتوی محیط کشت DMEM/F۱۲ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی FBS ۱۰ درصد و پنی سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد منتقل شد.

القای تمایز عصبی از طریق تهیه‌ی نروسفر

پس از انجام شمارش سلولی جهت تشکیل نروسفر، $10^6 \times 1$ سلول به پتری دیش ۵ ml حاوی $2 \mu\text{l}$ Heparin، 5 ml DMEM/F۱۲، پنی سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد، $100 \mu\text{l}$ B_{۲۷} (۱x)، $10 \mu\text{l}$ hEGF (Human epidermal growth factor) و $10 \mu\text{l}$ bFGF (Basic fibroblast growth factor) منتقل شد.

عوامل Heparin، B_{۲۷}، hEGF، bFGF هر سه روز یکبار به محیط اولیه اضافه شد.

القای تمایز نوروزنیک

با تشکیل نروسفرها در روز هفتم پس از القا، محیط حاوی نروسفر به فالكون ۱۵ ml منتقل شد و جهت رسوب نروسفرها در انکوباتور قرار داده شد. شستشوی سلول‌های چسبیده به کف پتری دیش با $1/5 \text{ ml}$ PBS انجام شد. ۱ ml آنزیم تریپسین-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) به پتری دیش اضافه شد و جهت جدا شدن سلول‌ها از کف دیش، سه دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. با استفاده از محیط کشت محتوی سرم، آنزیم خنثی شد. محتوی پتری دیش به فالكون حاوی نروسفر منتقل

بررسی مورفولوژی سلول‌های انکپسوله توسط

(Scanning electron microscopy) SEM

مورفولوژی سلول‌های انکپسوله شده در آلژینات به وسیله میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. بیدهای آلژینات در پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شد و برش‌های انجمادی (Cryocut ۱۸۰۰ reichert, JUNG, Germany) تهیه شد. برش‌های ۹ μm پوشش طلا داده شد و سپس با میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید (Seron Technology AIS ۲۵۰۰, India).

آزمایش MTT جهت تعیین میزان تکثیر و بقای سلولی

برای بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلژینات و سلول‌های گروه شاهد از این آزمایش استفاده شد. بیدهای آلژینات و سلول‌های گروه شاهد در روز چهاردهم پس از تمایز با PBS شسته شدند. PBS حذف شد و ۲۰۰ μl محیط کشت DMEM/F۱۲ فاقد سرم و ۲۰ μl محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت چهار ساعت در انکوباتور قرار گرفت. محیط کشت حاوی محلول MTT حذف و ۲۰۰ μl DMSO (Dimethyl sulfoxide) در تاریکی به هر چاهک اضافه شد. چند بار سلول‌ها در این محلول پیست شدند و سپس محلول به چاهک‌های پلیت ۹۶ well منتقل شدند. جذب نوری محلول با دستگاه Microplate reader در طول موج ۵۴۰ nm ارزیابی شد. برای هر نمونه سه بار آزمایش تکرار شد.

تکنیک ایمنوسیتوشیمی

برای ارزیابی میزان تمایز عصبی سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات و سلول‌های گروه شاهد،

از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد.

رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته‌ی گروه شاهد و بیدهای آلژینات علیه آنتی بادی‌های Nestin (پروتئین فیلامنت بینابینی که توسط سلول‌های پیش‌ساز عصبی بیان می‌شود)، GFAP (پروتئین فیلامنت بینابینی که سلول‌های گلیال آن را بیان می‌کنند) و MAP۲ (پروتئینی که همراه با میکروتوبول‌ها می‌باشد و نشانگر سلول‌های عصبی بالغ است) انجام شد. محیط روی نمونه‌ها حذف و سلول‌های گروه شاهد دو بار با PBS و بیدهای آلژینات دو بار با بافر Tris شسته شد. برای ثابت کردن نمونه‌ها از ۳۵۰ μl میکرولیتر پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی استفاده شد. پارافرمالدهید ۴ درصد از روی نمونه‌ها حذف و با بافر مربوطه شسته شد. برای نفوذ پذیر کردن غشای سلولی، از Triton X-۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق استفاده شد.

Triton X-۱۰۰ از روی نمونه‌ها حذف و شستشو با بافر انجام شد. آنتی بادی‌های اولیه (۱:۳۰۰) Nestin، GFAP (۱:۶۰۰) و MAP۲ (۱:۳۰۰) به نمونه‌ها اضافه شد. ابتدا ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C و سپس به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد. آنتی بادی‌های اولیه حذف و شستشو با بافر انجام شد. آنتی بادی ثانویه کونژوگه شد و با FITC (Fluorescein isothiocyanate) با غلظت ۱:۵۰۰ به نمونه‌ها اضافه شد و ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد.

پس از حذف آنتی بادی ثانویه، شستشو با بافر انجام شد. DAPI (۲-phenylindole-۶-diamidino) با غلظت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق جهت

نیز خواهند داشت (شکل ۱b). پس از یک هفته نوروسفرهای منفرد شده در محیط القای عصبی دارای زواید شبه آکسونی و شبه دندریتی داشتند (شکل ۱c). بیدهای آلژینات زیر میکروسکوپ مرحله‌ی کنتراست به صورت توده‌های کروی بودند و به دلیل ماهیت شفاف هیدروژل آلژینات سلول‌های گرد و بدون زائده‌ی موجود در آن قابل رؤیت بودند (شکل ۱d). در تصاویر میکروسکوپ الکترونی هیدروژل آلژینات به صورت شبکه‌ای خزه مانند حاوی سلول‌های کروی شکل و بدون زائده بود (شکل‌های ۲a, b). تصاویر میکروسکوپ فلورسنت نیز مؤید این مطلب است (شکل‌های ۲c, d, e).

بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌ها

جهت تعیین میزان تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، پس از القای عصبی و انتقال به هیدروژل آلژینات، MTT assay در روز ۱۴ پس از تمایز انجام شد. این آزمایش، میزان بقا برای سلول‌های القا شده‌ی گروه شاهد و گروه آلژینات را به ترتیب (0.72 ± 0.13) و (0.28 ± 0.02) نشان داد. آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری را بین میزان بقای گروه شاهد و گروه آلژینات نشان داد ($P < 0.001$).

بررسی ایمنوسیتوشیمی

برای ارزیابی تمایز عصبی و تعیین میانگین درصد سلول‌های Nestin (نشانگر پیش‌ساز عصبی)، GFAP (نشانگر آستروسیت‌ها) و MAP2 (نشانگر نورون بالغ) مثبت، این آزمایش برای گروه شاهد و گروه آلژینات در روز ۱۴ پس از تمایز انجام شد. کنترل منفی با حذف آنتی بادی اولیه انجام شد (شکل ۳).

رنگ‌آمیزی هسته‌ی سلول‌ها اضافه شد. شستشو با بافر مربوط انجام گردید. لامل حاوی نمونه، روی لام منتقل شد و با میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردید. تصاویر سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ شمارش شد و درصد سلول‌های مثبت برای هر نمونه در سه زمینه‌ی غیر همپوشان محاسبه شد.

تحلیل آماری

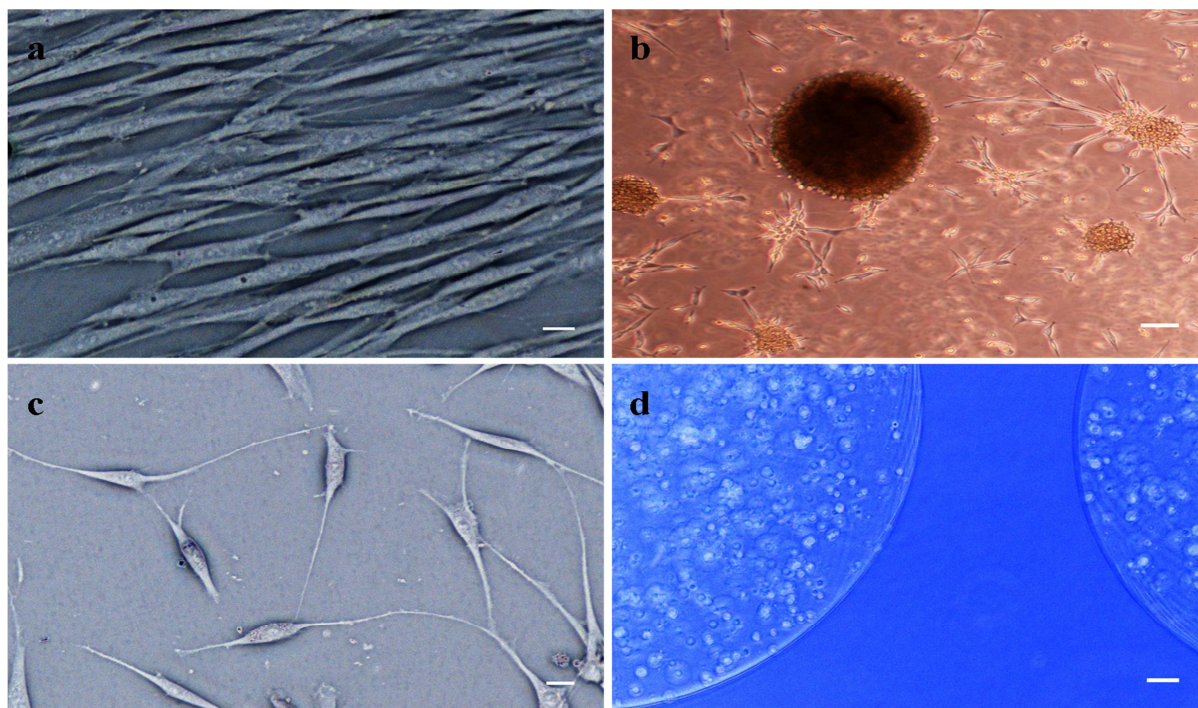
از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون one-way ANOVA (One-way analysis of variance) جهت بررسی اختلافات معنی‌دار بین گروه‌ها استفاده شد. اختلاف میانگین داده‌ها در صورت $P < 0.05$ معنی‌دار محسوب شدند.

یافته‌ها

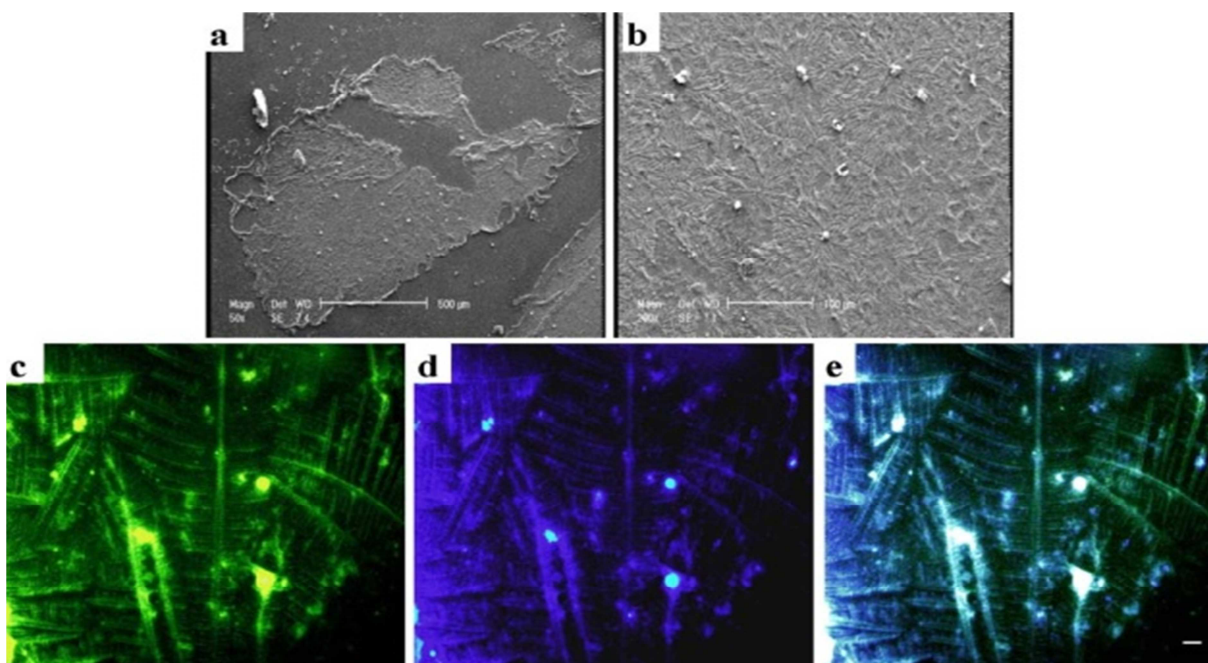
بررسی مورفولوژی سلول‌ها

۴۸ ساعت پس از کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، این سلول‌ها در تصاویر میکروسکوپ مرحله‌ی کنتراست به صورت جمعیتی هتروژن از سلول‌های دوکی شکل دیده شدند. در پاساژ ۲-۳ و تراکم سلولی ۹۰-۸۰ درصد، سلول‌ها آرایش تک لایه‌ای و فیروبلاست شکل داشتند (شکل ۱a).

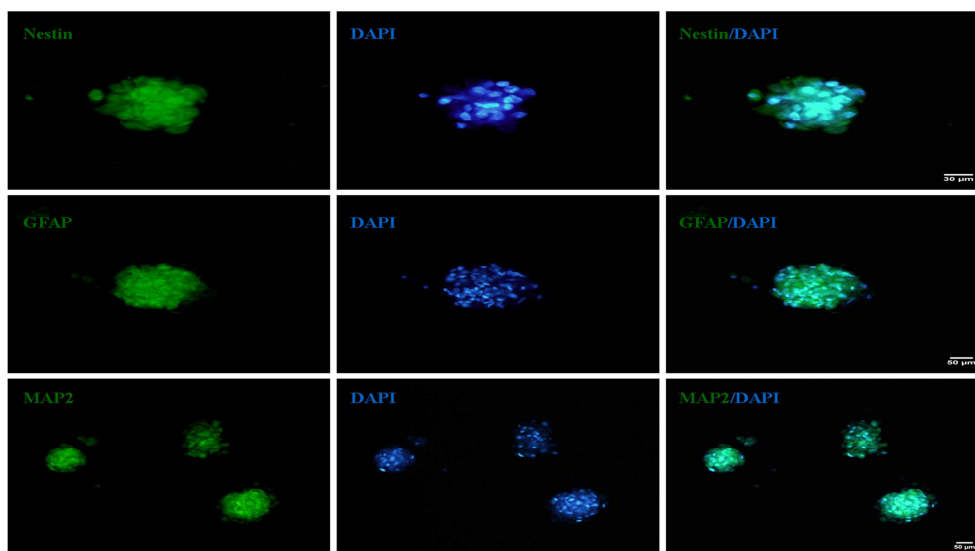
در محیط پیش‌القای عصبی، تغییر در مورفولوژی سلول‌ها شامل جمع‌شدگی سیتوپلاسم و تشکیل زواید بود. ۲۴-۴۸ ساعت بعد توده‌های کروی به نام نوروسفر تشکیل شد و این توده‌های کروی با گذشت زمان به علت وجود عوامل پیش‌برنده‌ی تکثیر سلولی مانند bFGF و hEGF در محیط کشت افزایش اندازه



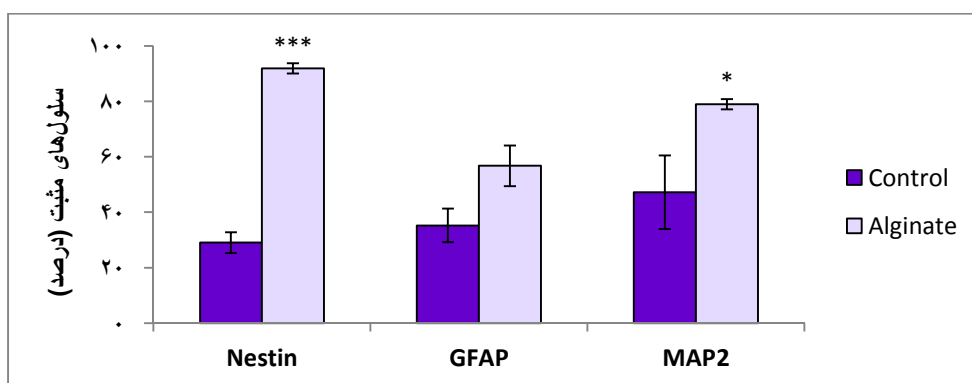
شکل ۱. بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی پس از القای عصبی و انکپسوله کردن در هیدروژل آلژینات. **a** سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در محیط کشت **DMEM-F12**. **b** سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در مدیوم القای عصبی به مدت ۷ روز و تشکیل نوروسفر. **c** کشت تک لایه‌ای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی القا شده. **d** سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات. بررسی‌های مورفولوژیک با میکروسکوپ مرحله‌ای کنتراست انجام گرفت (بزرگ‌نمایی در **a**، **b** و **d** $200 \mu\text{m}$ و در **c** $50 \mu\text{m}$).



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از برش انجمادی پیدهای آلژینات حاوی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی القا شده (**a** و **b**) و تصاویر میکروسکوپ فلورسنت شبکه‌ای خزهای شکل حاوی سلول‌های کروی را نشان داد (**c**، **d** و **e**) (بزرگ‌نمایی **c**، **d** و **e** $200 \mu\text{m}$).



شکل ۳. رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنت برای نشانگرهای عصبی (Glial fibrillary acidic protein) GFAP، Nestin و (Microtubule-associated protein γ) MAP γ در سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلژینات. (بزرگ‌نمایی ۵۰ μ m).



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین درصد سلول‌های Nestin، GFAP (Glial fibrillary acidic protein) و MAP γ (Microtubule-associated protein γ) مثبت انکپسوله در هیدروژل آلژینات با گروه شاهد در روز ۱۴ پس از تمایز. میانگین درصد سلول‌های انکپسوله‌ی Nestin مثبت تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < 0.001$), همچنین میانگین درصد سلول‌های MAP γ مثبت انکپسوله در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) (Mean \pm SE).

درصد) افزایش یافت. همچنین میانگین درصد سلول‌های MAP γ مثبت در سلول‌های انکپسوله به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (۷۸/۹۶ \pm ۱/۸۱ درصد در مقابل ۴۷/۲۰ \pm ۱۳/۳۰ درصد) ($P < 0.05$) (شکل ۴).

میانگین درصد سلول‌های انکپسوله‌ی Nestin مثبت (۹۱/۹۰ \pm ۱/۸۴ درصد) به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد (۲۹/۰۳ \pm ۳/۷۳ درصد) افزایش یافت ($P < 0.001$). به علاوه، میانگین درصد سلول‌های انکپسوله‌ی GFAP مثبت (۵۶/۷۵ \pm ۷/۳۰ درصد) در مقایسه با گروه شاهد (۳۵/۲۳ \pm ۶/۰۹ درصد)

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هیدروژل آلژینات محیط سه بعدی مناسبی را برای کشت و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی فراهم می‌کند. اگر چه میزان تکثیر و بقای سلولی در هیدروژل آلژینات کاهش پیدا کرد، میانگین درصد سلول‌های Nestin، GFAP و MAP2 مثبت در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت.

رفتار انواع مختلفی از سلول‌ها در هیدروژل آلژینات بررسی شده و نتایج متفاوتی به دست آمده است (۴۳). این نتایج می‌تواند مربوط به نوع خاص سلول و یا روش به کار گرفته شده جهت انکپسوله کردن سلول‌ها باشد (۴۴). چون آلژینات تداخل عمل سلولی ندارد، سلول‌ها قادر به چسبیدن به شبکه‌ی آلژینات نیستند. چسبندگی سلول برای بقا، تکثیر، تمایز و بیان ژن اغلب سلول‌ها ضروری است (۴۵).

طبیعت غیر چسبنده‌ی هیدروژل آلژینات تداخل عمل سلول-سلول را حمایت می‌کند که جهت حفظ بقای سلول و تقویت ویژگی‌های عملکردی سلول‌ها دارای اهمیت است (۴۶).

سلول‌های کشت شده در آلژینات، مورفولوژی کروی دارند و اگر چه میزان تکثیر این سلول‌ها کاهش می‌یابد، اما سلول‌ها در این هیدروژل زنده می‌مانند (۴۳). در تحقیقات متعددی، کاهش تکثیر انواع سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات گزارش شده است (۲۵، ۴۶-۴۷). کاهش تکثیر سلولی در هیدروژل آلژینات ممکن است وابسته به درصد وزنی پایین آلژینات (۱ درصد) مورد استفاده باشد (۴۸).

Banerjee و همکاران سلول‌های بنیادی عصبی را

در هیدروژل آلژینات قرار دادند و در محیط کشت DMEM/F12 محتوی FGF2 (۲ Fibroblast growth factor) کشت دادند و پس از ۷ روز بیان نشانگرهای عصبی بتا توبولین III و Nestin را بررسی کردند و افزایش بیان بتا توبولین III را مشاهده کردند (۴۹). Ashton و همکاران نشان دادند که BDNF نقش‌های مهمی در تکامل و نوروپلاستیستی مغز دارد؛ همچنین بقای عصبی، نورون‌ها و رشد عصبی را تنظیم می‌کند (۵۰) و نقش‌های مکملی در تنظیم تمایز دو رده‌ی سلولی نورون‌ها و سلول‌های گلیال دارد (۵۱).

مطالعه‌ای نشان داده است که سلول‌های بنیادی عصبی انکپسوله در هیدروژل آلژینات قادر به ترشح BDNF و همچنین بیان GFAP و Nestin هستند (۴۸). به علاوه، طبق نتایج آزمایش‌های اخیر، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی توانایی تولید نوروتروفین‌های BDNF، NGF و GDNF را دارند (۳۶-۳۷). از آن جایی که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی در محیط کشت دو بعدی BDNF ترشح می‌کنند، ممکن است با انکپسوله کردن این سلول‌ها در هیدروژل آلژینات، مقادیر بیشتری از این عامل ترشح شده باشد که افزایش میزان تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی را نسبت به گروه شاهد توجیه می‌کند.

Ashton و همکاران سلول‌های پیش‌ساز عصبی رت را در هیدروژل آلژینات ۱ درصد همراه با PLGA-Al (Poly(lactid-co-glycolide) alginate lyase) به مدت ۷ روز کشت دادند و افزایش معنی‌داری را در سرعت تکثیر این سلول‌ها مشاهده کردند (۵۰). در مطالعه‌ی حاضر سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی

می‌مانند و به نظر می‌رسد که بافت مغز هیدروژل آلژینات را به خوبی تحمل می‌کنند (۹). در حالی که در آزمایش‌های اخیر، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلژینات ۱/۲ درصد کشت شده به صورت *In vitro* تکثیر کمی داشتند.

تفاوت در نوع سلول‌ها و غلظت آلژینات مورد استفاده، همچنین شرایط *In vivo* در مطالعه‌ی Read و همکاران (۹) ممکن است در نتایج متفاوت به دست آمده در دو تحقیق مؤثر باشد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هیدروژل آلژینات تکثیر و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. میزان تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلژینات به طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی که تمایز عصبی این سلول‌ها افزایش یافت. احتمال می‌رود هیدروژل آلژینات با ایجاد شرایطی مشابه با ماتریکس خارج سلولی و تنظیم ترشح عوامل نوروتروفیک، می‌تواند منجر به افزایش تمایز عصبی شده باشد. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی تمایز عصبی و اندازه‌گیری عوامل نوروتروفیک ترشح شده از این سلول‌ها، می‌تواند اطلاعات باارزشی را جهت استفاده در مهندسی بافت و مطالعات *In vivo* فراهم کند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسؤولین محترم معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و نیز از زحمات سرکار خانم علی‌اکبری مسؤول آزمایشگاه کشت سلولی که در زمینه‌ی انجام پژوهش حاضر همکاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر خود را ابراز می‌نمایم.

انسانی کشت شده در محیط پیش‌القای عصبی، به هیدروژل آلژینات ۱/۲ درصد منتقل شد و ۷ روز در محیط عصبی کشت شد. سرعت تکثیر این سلول‌ها در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت.

در مطالعه‌ی Ashton و همکاران ممکن است حضور PLGA-Al در کنار هیدروژل آلژینات با کنترل تجزیه‌ی این هیدروژل باعث افزایش سرعت تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی رت شده باشد. همچنین نوع سلول‌ها و غلظت آلژینات استفاده شده در دو مطالعه متفاوت است (۵۰).

Xie و همکاران سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی رت را در هیدروژل پپتیدی و در محیط القای عصبی کشت دادند. ۱۰ روز پس از تمایز عصبی، آنالیز ایمنوسیتوشیمی نشان داد که این سلول‌ها Nestin (نشانگر پیش‌ساز عصبی) و Brdu (نشانگر تکثیر سلولی) را در مرکز توده‌های سلولی تشکیل شده بیان کردند (۵۲). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر هم افزایش معنی‌داری را در بیان Nestin در سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلژینات ۱۴ روز پس از تمایز عصبی نشان داد. در هر دو تحقیق، به علت استفاده سلول‌های مشابه افزایش بیان Nestin مشاهده شد. اگر چه نوع داربست استفاده شده در دو مطالعه متفاوت است، ممکن است وضعیت هیدروفیلیکی که هر دو داربست ایجاد می‌کنند، در ایجاد نتایج مشابه مؤثر باشد.

Read و همکاران نشان دادند که رده‌ی سلولی BT4C از رت با بیماری گلیوما انکپسوله در هیدروژل آلژینات ۱/۵ درصد کشت شده به صورت *In vivo* تکثیر می‌یابد و سلول‌های آن مورفولوژی کروی دارند. همچنین ۴ ماه پس از کشت زنده

References

- Moroni L, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials* 2006; 27(7): 974-85.
- Dutta RC, Dutta AK. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv* 2009; 27(4): 334-9.
- Hunt NC, Smith AM, Gbureck U, Shelton RM, Grover LM. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomater* 2010; 6(9): 3649-56.
- Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 2001; 101(7): 1869-79.
- Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14(2): 149-65.
- Lee KY, Alsberg E, Mooney DJ. Degradable and injectable poly (aldehyde guluronate) hydrogels for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001; 56(2): 228-33.
- Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 1998; 43(4): 422-7.
- Li X, Liu T, Song K, Yao L, Ge D, Bao C, et al. Culture of neural stem cells in calcium alginate beads. *Biotechnol Prog* 2006; 22(6): 1683-9.
- Read TA, Stensvaag V, Vindenes H, Ulvestad E, Bjerkvig R, Thorsen F. Cells encapsulated in alginate: a potential system for delivery of recombinant proteins to malignant brain tumours. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17(5-6): 653-63.
- Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999; 20(1): 45-53.
- Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 2006; 6(8): 623-33.
- Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24(24): 4337-51.
- Li T, Shi XW, Du YM, Tang YF. Quaternized chitosan/alginate nanoparticles for protein delivery. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83(2): 383-90.
- Kemp MR, Fryer PJ. Enhancement of diffusion through foods using alternating electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2007; 8(1): 143-53.
- Prang P, Muller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, et al. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials* 2006; 27(19): 3560-9.
- Petruzzo P, Cappai A, Ruiu G, Dessy E, Rescigno A, Brotzu G. Development of biocompatible barium alginate microcapsules. *Transplant Proc* 1997; 29(4): 2129-30.
- Shapiro L, Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 1997; 18(8): 583-90.
- Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, Alhague F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release* 2007; 119(1): 5-24.
- Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004; 35(2): 562-9.
- Kong HJ, Mooney DJ. The effects of poly (ethyleneimine) (PEI) molecular weight on reinforcement of alginate hydrogels. *Cell Transplant* 2003; 12(7): 779-85.
- Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J Dent Res* 2003; 82(11): 903-8.
- Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001; 80(11): 2025-9.
- Hsiong SX, Huebsch N, Fischbach C, Kong HJ, Mooney DJ. Integrin-adhesion ligand bond formation of preosteoblasts and stem cells in three-dimensional RGD presenting matrices. *Biomacromolecules* 2008; 9(7): 1843-51.
- Schagemann JC, Mrosek EH, Landers R, Kurz H, Erggelet C. Morphology and function of ovine articular cartilage chondrocytes in 3-d hydrogel culture. *Cells Tissues Organs* 2006; 182(2): 89-97.
- Markusen JF, Mason C, Hull DA, Town MA, Tabor AB, Clements M, et al. Behavior of adult human mesenchymal stem cells entrapped in alginate-GRGDY beads. *Tissue Eng* 2006; 12(4): 821-30.
- Saha K, Keung AJ, Irwin EF, Li Y, Little L, Schaffer DV, et al. Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophys J* 2008; 95(9): 4426-38.
- Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977; 25: 1-54.
- Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12(11): 3007-19.
- Strem BM, Hedrick MH. The growing

- importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol* 2005; 23(2): 64-6.
30. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
 31. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100(9): 1249-60.
 32. de GM, Schuurs TA, van SR. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J Surg Res* 2004; 121(1): 141-50.
 33. DiMuzio P, Tulenko T. Tissue engineering applications to vascular bypass graft development: the use of adipose-derived stem cells. *J Vasc Surg* 2007; 45(Suppl A): A99-103.
 34. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 2008; 60(5): 538-44.
 35. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One* 2011; 6(3): e17899.
 36. Razavi S, Razavi MR, Kheirollahi-Kouhestani M, Mardani M, Mostafavi FS. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: promotes neurogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440(3): 381-7.
 37. Kalbermatten DF, Schaakxs D, Kingham PJ, Wiberg M. Neurotrophic activity of human adipose stem cells isolated from deep and superficial layers of abdominal fat. *Cell Tissue Res* 2011; 344(2): 251-60.
 38. Carlson KB, Singh P, Feaster MM, Ramnarain A, Pavlides C, Chen ZL, et al. Mesenchymal stem cells facilitate axon sorting, myelination, and functional recovery in paralyzed mice deficient in Schwann cell-derived laminin. *Glia* 2011; 59(2): 267-77.
 39. Sondell M, Sundler F, Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 2000; 12(12): 4243-54.
 40. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109(10): 1292-8.
 41. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294(2): 371-9.
 42. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(6): 1922-31.
 43. Mulder L. Cell adhesion on alginate scaffolds for tissue engineering of aortic valve-a review. Eindhoven, Netherlands: Faculty of Biomedical Engineering, Eindhoven University Technology; 2002. p. 22-34.
 44. Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth JO, Novikov LN. Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77(2): 242-52.
 45. Retta SF, Ternullo M, Tarone G. Adhesion to matrix proteins. *Methods Mol Biol* 1999; 96: 125-30.
 46. Dar A, Shachar M, Leor J, Cohen S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80(3): 305-12.
 47. Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 2003; 64(2): 273-81.
 48. Purcell EK, Singh A, Kipke DR. Alginate composition effects on a neural stem cell-seeded scaffold. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15(4): 541-50.
 49. Banerjee A, Arha M, Choudhary S, Ashton RS, Bhatia SR, Schaffer DV, et al. The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials* 2009; 30(27): 4695-9.
 50. Ashton RS, Banerjee A, Punyani S, Schaffer DV, Kane RS. Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture. *Biomaterials* 2007; 28(36): 5518-25.
 51. Cheng A, Coksaygan T, Tang H, Khatri R, Balice-Gordon RJ, Rao MS, et al. Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism. *J Neurochem* 2007; 100(6): 1515-30.
 52. Xie X, Tang Z, Chen J, Yang J, Zeng W, Liu N, et al. Neurogenesis of adipose-derived stem cells in hydrogel. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2011; 31(2): 174-7.

Induction of Neuron-Like Cells from Adipose Derived Stem Cells in Alginate Hydrogel, Using Neurospheres Formation

Shahnaz Razavi PhD¹, Zahra Khosravizadeh MSc², Hamid Bahramian PhD³,
Mohammad Kazemi MSc⁴

Original Article

Abstract

Background: Hydrogels provide appropriate three-dimensional environment for culture of a variety of cells and cell encapsulation in hydrogels is a promise plan for tissue engineering applications. Alginate is an attractive biocompatible hydrogel that provides a supportive system for the encapsulated cells. Moreover, human adipose derived stem cells are mesenchymal stem cells that might be a suitable source of cells for use in autologous cell therapy.

Methods: In this study, we examined the fate of human adipose derived stem cells encapsulated in alginate hydrogel that cultured in neural induction medium for 1 week. Using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay and immunocytochemical analysis, the proliferation rate, and viability and neural differentiation of human adipose derived stem cells were evaluated.

Findings: We observed a significant increase in the mean percent of Nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and microtubule-associated protein-2 (MAP2) positive cells and significant reduction of proliferation rate and viability in encapsulated cells versus monolayer induced cells.

Conclusion: These findings showed that alginate hydrogel can provide a suitable environment for neural differentiation of human adipose derived stem cells.

Keywords: Hydrogel alginate, Human adipose-derived stem cells, Neural differentiation, Proliferation

Citation: Razavi Sh, Khosravizadeh Z, Bahramian H, Kazemi M. **Induction of Neuron-Like Cells from Adipose Derived Stem Cells in Alginate Hydrogel, Using Neurospheres Formation.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(288): 828-40

1- Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- PhD Student, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- PhD Student, Department of Genetics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir

تولید پروکاریوتی پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا در اتصال با پروتئین شوک حرارتی لیشمانیا ماژور به منظور دستیابی به یک واکسن کارآمد

سیاوش چلبیانی^۱، دکتر فاطمه فتوحی^۲، دکتر امیر قائمی^۳، مریم صالح^۴، دکتر بهرخ فرهمند^۵، سید محمد علی علوی اصفهانی^۱، منصوره طباطبائیان^۵، علی ترابی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویروس‌های آنفلوانزا عامل عمده‌ی بیماری و مرگ و میر ناشی از بیماری‌های تنفسی در جهان به شمار می‌روند و واکسیناسیون، بهترین راه پیشگیری می‌باشد. به علت تغییرات آنتی ژنیک ویروس آنفلوانزا، بازآرایی هر ساله‌ی واکسن اجتناب ناپذیر است. یکی از روش‌های مقابله با این مشکل، طراحی واکسن با استفاده از آنتی ژن‌های حفاظت شده‌ی ویروس آنفلوانزا است. پروتئین M2 که در پوشش ویروس، کانال یونی را تشکیل می‌دهد و با تغییرات pH باعث ورود ویروس و ایجاد عفونت در سلول‌های میزبان می‌شود، در بین همه‌ی ویروس‌های آنفلوانزای A حفاظت شده است و هدف مناسبی برای تولید واکسن با ایمنی وسیع‌الطیف می‌باشد. در این مطالعه، به منظور تولید یک واکسن کارآمد، بخشی از ژن HSP70 (Heat shock proteins) لیشمانیا ماژور به ژن M2 ویروس آنفلوانزای A/H1N1 متصل شد و پروتئین نوترکیب کایمر در سیستم پروکاریوتی بیان گردید.

روش‌ها: برای ساخت سازه‌ی بیانی، ابتدا ژن کد کننده‌ی HSP در پلاسمید pET28a در بین محل اثر آنزیم‌های BamHI و HindIII جای‌سازی گردید. سپس ژن M2 به روش PCR (Polymerase chain reaction) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، تکثیر یافت و در محل اثر سایت آنزیمی BamHI در وکتور خطی و دفسفریله شده‌ی pET28a و در بالادست ژن HSP70 کلون گردید. پس از تعیین ترادف و تأیید صحت کلونینگ، بیان پروتئین نوترکیب در سلول‌های BL21 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج کلنی PCR و هضم آنزیمی، صحت سازه‌های نوترکیب را تأیید کردند. نتایج تعیین توالی نشان داد که ژن M2 در وکتور pET28a و در بالادست ژن HSP70 به طور صحیح و در قاب خواندنی دنباله‌ی هیستیدینی کلون شده است. تولید پروتئین‌های نوترکیب به روش وسترن بلات (Western blot) تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های شوک حرارتی توانایی تحریک و ایجاد هر دو نوع ایمنی ذاتی و اکتسابی را دارند و اتصال آن به آنتی ژن هدف باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی می‌شود. پروتئین کایمر تهیه شده در این مطالعه، پس از تخلیص می‌تواند به عنوان یک کاندیدای واکسن زیر واحدی مناسب برای پیشگیری از عفونت آنفلوانزا در نظر گرفته شود. برای بررسی اثرات ادجوانتی HSP70 لیشمانیا ماژور بر روی پروتئین M2، ارزیابی ایمونوژنیسیته‌ی آن در مدل‌های حیوانی در مطالعات آتی انجام خواهد شد.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا، پروتئین کایمر، M2، HSP70، واکسن زیر واحدی

ارجاع: چلبیانی سیاوش، فتوحی فاطمه، قائمی امیر، صالح مریم، فرهمند بهرخ، علوی اصفهانی سید محمد علی، طباطبائیان منصوره، ترابی علی. **تولید پروکاریوتی پروتئین M2 ویروس آنفلوانزا در اتصال با پروتئین شوک حرارتی لیشمانیا ماژور به منظور دستیابی به یک واکسن کارآمد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۸): ۸۵۳-۸۴۱

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروپزشکی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه ویروس‌شناسی پزشکی و ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۴- کارشناس ارشد، گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۵- کارشناس آزمایشگاه، گروه ویروس‌شناسی، آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزای نوع A موجب بروز بیماری تنفسی در پرندگان و پستانداران می‌شوند و همچنین می‌توانند باعث مرگ و میر مبتلایان در تمام سنین شوند. بیماری آنفلوانزا سالانه حدود ۱۰ درصد یا به عبارت دیگر ۵۰۰ میلیون نفر از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد که باعث مرگ ۲۵۰ تا ۵۰۰ هزار نفر از مبتلایان می‌گردد (۱). بیشترین شیوع این بیماری در طی ماه‌های سرد سال اتفاق می‌افتد و به عنوان آنفلوانزای فصلی شناخته می‌شود. ویروس آنفلوانزا متعلق به خانواده‌ی ارتومیکسو ویریده می‌باشد. ویروس‌های این خانواده دارای پوشش هستند و واجد ژنوم RNA (Ribonucleic acid) تک رشته‌ای قطعه قطعه با پولاریته‌ی منفی می‌باشند. ژنوم این ویروس شامل ۸ قطعه می‌باشد که این قطعات به ترتیب اندازه، شماره‌گذاری می‌شوند و هر کدام یک یا دو پروتئین را رمزدهی می‌کنند.

آنتی بادی‌های خنثی کننده علیه دو گلیکوپروتئین سطحی هماگلوتینین و نورومینیداز تولید می‌شوند و همه‌گیری‌های ویروس آنفلوانزا مرتبط با تغییرات در ساختمان آنتی ژنیک آن‌ها می‌باشد (۲-۳). توسعه و تولید واکسنی که بتواند ایمنی وسیع‌الطیف علیه ویروس آنفلوانزای A ایجاد کند، از دیرباز مورد توجه محققان بوده است. واکسن‌های آنفلوانزایی که امروزه تولید و مصرف می‌شوند، حاوی ویروس کشته شده می‌باشند که برای جلوگیری از بیماری آنفلوانزا در جمعیت‌های انسانی، اسب و خوک مورد استفاده قرار می‌گیرند. ایمنی القا شده توسط این واکسن به واسطه‌ی القای آنتی بادی علیه دو گلیکوپروتئین سطحی ویروس در بدن میزبان صورت می‌گیرد.

واکسن‌های آنفلوانزا اغلب به صورت واکسن‌های دوتایی یا سه‌تایی ساخته می‌شوند که شامل انواع ویروس‌های در حال گردش در جامعه می‌باشند. نامتناسب بودن سویه‌ی واکسن و ویروس در حال گردش، عامل اصلی برای عدم موفقیت واکسن می‌باشد. به دلیل تغییرات آنتی ژنتیک ویروس‌های آنفلوانزای A، نیاز به بازآرایی هر ساله‌ی واکسن‌های آنفلوانزای انسانی می‌باشد. آنالیز سویه‌های در حال گردش و انتخاب سویه‌ی مناسب واکسن آنفلوانزای انسانی، توسط کمیته‌ی علمی بر اساس گزارش‌های کسب شده از شبکه‌ی آزمایشگاه‌های سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) صورت می‌گیرد. با وقوع پاندمی آنفلوانزای خوکی A/H1N1 در سال ۲۰۰۹ معلوم گردید که این روش برای پیشگیری از خطر بروز پاندمی چندان موفقیت‌آمیز نمی‌باشد (۴-۵).

بهترین راه حل برای مقابله با این مشکل، ساخت واکسن با استفاده از آنتی ژن‌های حفاظت شده‌ی ویروس می‌باشد. برای تهیه‌ی این واکسن‌ها نیازی به پیش‌بینی سویه‌ی در حال گردش نیست و استفاده از آن‌ها در هنگام وقوع پاندمی تا زمانی که واکسن متناسب با سویه ساخته شود، بیماری را محدود می‌کند (۶).

پروتئین M2 که در سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا بسیار حفاظت شده است، یک پروتئین تراغشایی غیر گلیکوزیله‌ی نوع ۳ می‌باشد که می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن جامع آنفلوانزا باشد. این پروتئین که به میزان فراوانی در غشای پلاسمایی سلول‌های آلوده به ویروس بیان می‌شود، اما فقط مقدار کمی از آن (به طور متوسط

برای عرضه به همراه پپتیدهای آنتی ژنی پیشنهاد شده است. پروتئین‌های شوک حرارتی یکی از اعضای خانواده‌ی چاپرون‌های مولکولی است و ساختار ژنی آن در طی تکامل بسیار حفاظت شده است. این پروتئین‌ها که در همه‌ی ارگانسیم‌های زنده از باکتری تا انسان یافت می‌شوند و اغلب بر اساس وزن مولکولی نام‌گذاری می‌شوند، یک سیستم اولیه‌ی دفاع سلولی هستند و سلول‌ها را در برابر استرس‌های مختلف محیطی مثل گرما و غیره محافظت می‌کنند و از طریق اتصال محکم به سکانس‌های پپتیدی تازه سنتز شده (پروتئین ناقص)، مانع از تجمع و غیر عملکردی شدن آن‌ها می‌شود (۱۱-۱۰).

پروتئین HSP70 از دو ناحیه‌ی اصلی شامل ناحیه‌ی آمینی (دارای فعالیت ATPase) و ناحیه‌ی کربوکسیل (ناحیه‌ی اتصال به پپتید) تشکیل می‌شود (۱۲).

در این مطالعه، بخشی از ژن HSP70 لیشمانیا ماژور (کد کننده‌ی اسید آمینه‌های ۲۲۱ تا ۶۰۴) به ژن M2 ویروس آنفلوانزای A/H1N1 متصل شد و پروتئین‌های نوترکیب HSP70 و کایمر M2-HSP70 در سیستم پروکاریوتی بیان گردید. پروتئین کایمر تولید شده، می‌تواند پس از تخلیص به عنوان یک کاندید واکسن در نظر گرفته شود و در مطالعات آینده در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش‌ها

در این مطالعه از ژن M2 سویه (H1N1) A/NewCaledonia/20/99 که از قبل در آزمایشگاه تحقیقات آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران در وکتور pcDNA کلون شده بود، استفاده شد (۱۳). ژن M2 توسط PCR (Polymerase chain reaction) با

۲۰-۶ مولکول) به ذرات ویروسی ملحق می‌شود، یک کانال یونی را شکل می‌دهد که نقش مهمی در پوشش برداری ویروس در مراحل اولیه‌ی عفونت‌زایی آن ایفا می‌کند.

پروتئین دست نخورده‌ی M2 به صورت یک هموترامر می‌باشد که شامل یک جفت دایمر متصل به هم است که از طریق پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. هر مونومر آن از ۳ بخش تشکیل شده است: بخش خارج سلولی که شامل ۲۴ اسید آمینه‌ی انتهایی آمینی است و M2e نامیده می‌شود. بخش تراغشایی با ۱۹ اسید آمینه که برای فعالیت کانال یونی ضروری می‌باشد و بخش C ترمینال که ۵۴ اسید آمینه را شامل می‌شود و نقش مهمی در همانندسازی و چیدمان ویروس آنفلوانزا بر عهده دارد. داروهای ضد ویروسی آمانتادین و ریمانتادین بر علیه این پروتئین وارد عمل می‌شوند. با وجود این که پاسخ‌های ایمنی اختصاصی ضد M2 در عفونت طبیعی کم است، مطالعات متعددی نشان داده است که آنتی بادی اختصاصی که ناحیه‌ی خارج سلولی پروتئین را شناسایی می‌کند، به طور نسبی موش‌ها را در برابر چالش مرگ‌بار ویروسی محافظت می‌نماید. این پدیده، شاید به واسطه‌ی خاصیت سلول‌کشی وابسته به آنتی بادی صورت می‌گیرد (۹-۷).

یکی از نگرانی‌ها درباره‌ی واکسن‌های آنفلوانزای A بر پایه‌ی پروتئین M2، میزان ایمنی‌زایی محدود آن‌ها می‌باشد. چندین استراتژی برای افزایش پتانسیل ایمنی‌زایی واکسن‌هایی که بر پایه‌ی پپتیدهای کوچک و ضعیف از نظر ایمنی‌زایی طراحی شده‌اند، وجود دارد. در سال‌های اخیر، پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP یا Heat shock proteins) به عنوان ادجوانت

کلونینگ در ناقل pGEM-T Easy

برای این منظور، پلی نوکلئوتیدهای تکثیر شده با استفاده از کیت (شرکت کیازن) از ژل آگارز استخراج و سپس در ناقل pGEM-T Easy (شرکت Promega) مطابق روش گفته شده کلون گردید و در باکتری E.coli سویه ی 'Top10f' ترانسفورم شد. با استفاده از روش غربالگری کلنی های آبی - سفید در محیط کشت حاوی IPTG/Xgal (Sopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)، کلنی های سفید که احتمال می رود واجد پلاسمید مورد نظر بودند، انتخاب گردیدند. جهت تأیید کلونینگ، از سه روش کلنی PCR با پرایمرهای اختصاصی، هضم آنزیمی با BamHI و تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب استفاده شد.

آماده سازی پلاسمید pET28a

یک کلنی تک از باکتری واجد پلاسمید pET28a در 5 ml محیط مایع LB (Luria-Bertani) تلقیح شد و به مدت یک شب در دمای 37 °C در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. پلاسمید pET28a با استفاده از کیت (شرکت ایترون) استخراج شد و پس از تعیین غلظت، در حضور آنزیم های محدودالانتر BamHI و HindIII هضم آنزیمی صورت گرفت و به صورت خطی شده مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت پلاسمید نو ترکیب pET28a-M2-HSP70

برای ساخت سازه ی بیانی واجد M2 و HSP70، ابتدا ژن کد کننده ی HSP در پلاسمید pET28a جای سازی گردید. بدین منظور، از سازه ی pGEM-HSP70 برای دستیابی به ژن HSP70 استفاده گردید (۱۲). این سازه با آنزیم های BamHI و HindIII هضم گردید و قطعه ی

استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر یافت تا سایت آنزیمی مناسب در دو انتهای ژن هدف ایجاد و کدون خاتمه از انتهای این ژن حذف گردد. بدین منظور، پرایمرهایی که شامل ابتدا و انتهای ژن M2 به همراه ترادف اختصاصی ناحیه ی برش آنزیم BamHI بودند، طراحی گردید.

۳' TCGGATCCATGAGTCTTCTAAC ۵'

Forward

GGATCCCTTCAACTCTATGCTGAC ۳'

Reverse ۵'

با استفاده از پرایمرهای پیش گفته و مواد مورد نیاز، تکثیر ژن M2 به روش PCR صورت گرفت. غلظت پرایمرها و مواد مورد نیاز PCR شامل 10 pM از هر یک از پرایمرها، 50 ng DNA الگو، 1/5 mM dNTP mix، 2/5 mM MgCl₂ و یک واحد (Deoxyribonucleotide triphosphates) آنزیم Taq DNA پلیمرز بود. حجم نهایی واکنش با آب دیونیزه به 25 μ l رسانده شد. برنامه ی دمایی مورد نیاز شامل 5 دقیقه در دمای 95 °C، 35 چرخه (1 دقیقه در دمای 95 °C، 1 دقیقه در دمای 55 °C و 30 ثانیه در دمای 72 °C) و در نهایت، 10 دقیقه در دمای 72 °C بود. محصول PCR بر روی ژل 2 درصد آگارز در بافر تریس - اسید بوریک - EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) با ولتاژ 80 و به مدت 30-40 دقیقه الکتروفورز شد.

جهت بررسی نتیجه ی الکتروفورز، ژل آگارز با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و با استفاده از دستگاه آشکارساز (شرکت Viber Lourmat) در طول موج 260 nm مشاهده گردید. همچنین برای تشخیص اندازه ی مولکولی محصول PCR از نشانگر 100 bp DNA شرکت Fermentas (SM1153) استفاده شد.

بیان پروتئین‌های نو ترکیب

پلاسمیدهای نو ترکیب pET28a-HSP70 و pET28a-M2-HSP70 به داخل باکتری مستعد شده‌ی E.coli سویه‌ی BL21 ترانسفورم شد. باکتری‌ها در محیط کشت LB مایع حاوی 50 µg/ml کانامایسین کشت داده شد و در دمای 37 °C گرماگذاری شد تا زمانی که میزان جذب نمونه در طول موج 600 nm به 0/5 برسد. سپس برای القای بیان ژن، ایزوپروپیل تیو گالاتوزید (IPTG) با غلظت‌های مختلف 1 mM، 0/5 و 0/2 اضافه شد و سلول‌ها به مدت 3 ساعت دیگر در دمای 37 °C در انکوباتور قرار گرفتند. رسوب سلول‌های باکتریایی در زمان‌های 1، 2 و 3 ساعت پس از القا، جمع‌آوری و دانسیته‌ی آن‌ها با اسپکتروفوتومتر معلوم گردید.

بررسی بیان پروتئین‌های نو ترکیب با روش

SDS-PAGE

جهت بررسی بیان پروتئین، نمونه‌ها بر روی ژل آکریل امید 12 درصد الکتروفورز شدند. ابتدا رسوب باکتری‌های جمع‌آوری شده در ساعات مختلف با بافر نمونه (Sample buffer) مخلوط و 10 دقیقه جوشانده شدند. باندهای پروتئینی با رنگ‌آمیزی با محلول کوماسی بلو R-250، آشکار گردید. برای برآورد اندازه‌ی پروتئین از نشانگر پروتئینی شرکت فرمنتاز استفاده شد.

تأیید پروتئین بیان شده با روش وسترن بلات

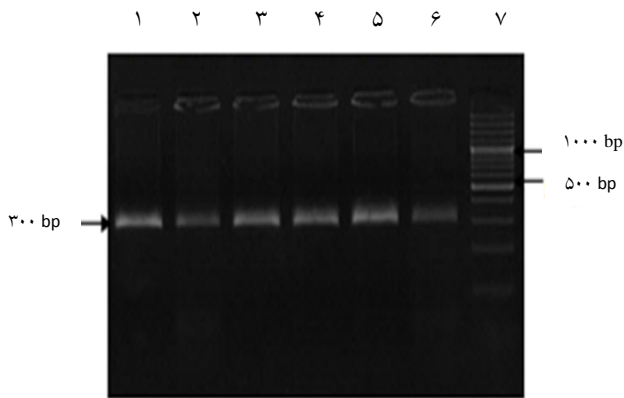
(Western blot)

پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل پلی آکریل امید، با استفاده از دستگاه الکتروترانسفر به روی غشای نیتروسلولز منتقل شد. بیان پروتئین‌های M2-HSP70 و HSP70 در باکتری BL21 با استفاده از

L.major HSP70 کد کننده‌ی (nt 661-1812) پس از استخراج از ژل در حضور آنزیم لیگاز به پلاسمید خطی شده‌ی pET28a متصل و به داخل باکتری مستعد سویه‌ی Top10f ترانسفورم شد و در محیط کشت واجد کانامایسین کشت داده شد. کلنی‌های به دست آمده در محیط مایع کشت داده شدند و پلاسمیدهای جدا شده از نظر وجود یا عدم وجود ژن با هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

در مرحله‌ی بعدی پلاسمید نو ترکیب pET28a-HSP جهت جای‌سازی ژن M2 در بالادست ژن HSP، با استفاده از آنزیم BamHI خطی شد. پلاسمید pGEM-M2 نیز با همین آنزیم هضم و ژن M2 تخلیص شده در حضور آنزیم لیگاز به پلاسمید خطی شده‌ی pET28a-HSP متصل گردید. از آن جایی که در این مرحله فقط از یک آنزیم برای جای‌سازی ژن هدف استفاده شد، به منظور کاهش اتصال غیر اختصاصی، پلاسمید pET28a-HSP قبل از مجاور شدن با ژن هدف دفسفریله شد. برای دفسفریله کردن پلاسمید از آنزیم‌های SAP (Shrimp alkaline phosphatase) و همچنین CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد تا با برداشتن فسفات 5' انتهایی DNA از باز اتصالی پلاسمید خطی شده جلوگیری گردد. جهت تأیید کلونینگ، از روش کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و هضم آنزیمی در حضور آنزیم‌های BamHI و HindIII استفاده شد. در نهایت پلاسمید نو ترکیب pET28a-M2-HSP70 با تعیین توالی نوکلئوتیدی تأیید گردید.

محصول آن به باکتری E.coli سویه ی Top10f، برای انتخاب کلنی مورد نظر، از روش کلنی PCR استفاده شد که نتایج آن در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲. نتایج کلنی Polymerase chain reaction (PCR) جهت تأیید جای سازی ژن M2 در pGEMT vector (ستون ۱-۶: محصولات PCR کلنی های سفید غربال شده (قطعه ی M2)، ستون ۷: نشانگر DNA 100 bp)

پس از مشاهده ی قطعه ی تکثیر یافته ی مورد نظر، کلنی مربوط در محیط مایع کشت داده شد، پلاسمید آن استخراج گردید و با آنزیم BamHI هضم گردید که منجر به جداسازی یک قطعه ی 300 جفت بازی از پلاسمید گردید.

به منظور کلونینگ ژن HSP در پلاسمید بیانی، پلاسمید pGEM II-HSPV0 واجد ژن لیسمانیا مازور با آنزیم های BamHI و HindIII هضم گردید و قطعه ی 152 جفت بازی کد کننده ی HSPV0 از آن جدا گردید که نتیجه ی الکتروفورز آن در شکل ۳ آمده است.

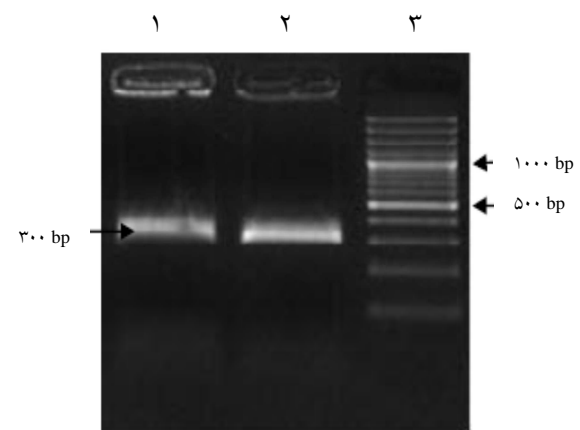
ژن کد کننده ی HSP پس از استخراج از ژل در پلاسمید pET28a جای سازی گردید و به داخل باکتری مستعد سویه ی Top10f ترانسفورم و در محیط کشت واجد کانامایسین کشت داده شد. حضور ژن HSP در پلاسمید های جدا شده با هضم آنزیمی

آنتی بادی مونوکلونال علیه دنباله ی هیستیدینی صورت گرفت. این آنتی بادی که با آنزیم پراکسیداز نشاندار شده بود، با رقت 1/3000 در PBS تهیه شد و باندهای پروتئینی با استفاده از سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB یا 3,3'-Diaminobenzidine) آشکار شد.

یافته ها

در این مطالعه، از طول کامل ژن M2 ویروس آنفلوانزا سویه ی H1N1 که شامل 300 جفت باز می باشد و ژن HSPV0 لیسمانیا مازور که 1152 جفت باز دارد، جهت ساخت پلاسمید نو ترکیب استفاده شد.

به منظور تولید پلاسمید نو ترکیب pET28a-M2-HSP، در ابتدا ژن M2 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR تکثیر داده شد. نتیجه ی الکتروفورز قطعه ی 300 جفت بازی ژن M2 که بر روی ژل آگارز 2 درصد انجام شد، در شکل ۱ آمده است.



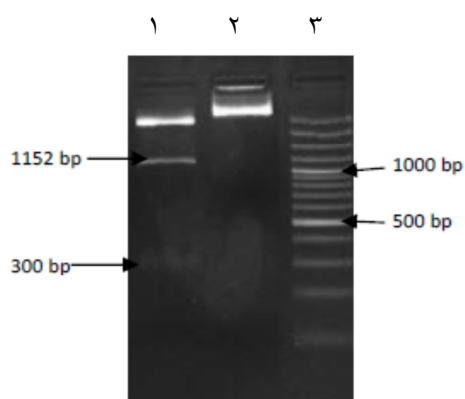
شکل ۱. نتیجه ی الکتروفورز تکثیر ژن M2، ستون ۱ و ۲: قطعه ی M2 300 جفت بازی، ستون ۳: نشانگر DNA 100 bp

ژن M2 پس از جداسازی از ژل آگارز در پلاسمید pGEMTeasy جای سازی شد و پس از انتقال

مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۴ تعدادی از این پلاسمیدها را که با هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفتند، نشان می‌دهد. برای ساختن پلاسمید کایمر، ژن M2 از هضم پلاسمید pGEM-M2 با آنزیم BamHI تهیه شد. همچنین پلاسمید نو ترکیب pGEM II-HSPV0 نیز با آنزیم پیش‌گفته برش خورد و پس از دفسفوریل شدن در حضور آنزیم لیگاز، با ژن هدف مجاور گشت تا در بالا دست ژن HSPV0 ساب کلون گردد. ساختار پلاسمیدی جدید به داخل باکتری E.coli سویه‌ی

Top10f ترانسفورم شد و بعد از تأیید وجود ژن توسط کلنی PCR، پلاسمید نو ترکیب از کلنی‌های مثبت استخراج و درستی جای‌سازی ژن‌ها توسط آنالیزهای هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های BamHI و HindIII تأیید گردید (شکل ۵).

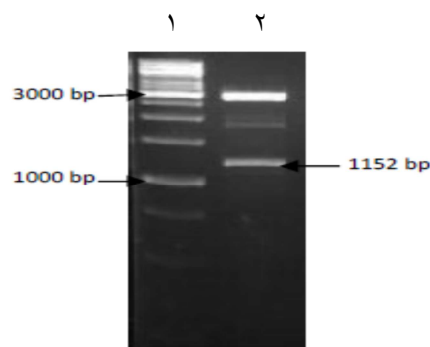
همان‌طور که در تصویر دیده می‌شود، آنالیز آنزیمی این پلاسمیدها دو باند مورد انتظار را نشان دادند (۳۰۰ و ۱۱۵۲ جفت باز). در نهایت تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب معلوم گردانید که ژن HSPV0 به صورت صحیح در دنباله‌ی ژن M2 و در یک قاب خواندنی با دنباله‌ی هیستیدینی در پلاسمید pET28a جای‌سازی شده است.



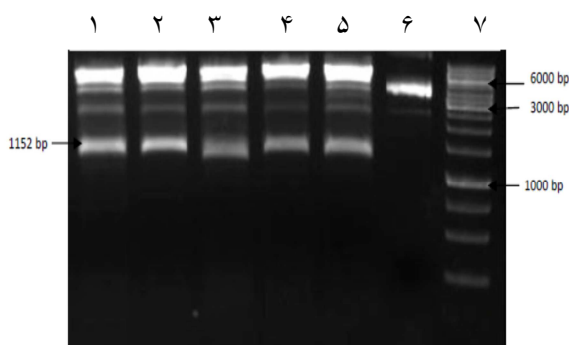
شکل ۵. نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب با دو آنزیم BamHI و HindIII، ستون ۱: محصول هضم آنزیمی (قطعات ۳۰۰ bp و ۱۱۵۲ bp)، ستون ۲: سازی هضم نشده، ستون ۳: نشانگر ۱۰۰ bp

برای بررسی بیان پروتئین، پلاسمیدهای نو ترکیب واجد ژن هدف (pET28a-HSPV0 و M2-HSPV0) در باکتری E.coli سویه‌ی BL21 ترانسفورم گردید. برای القای بیان پروتئین از غلظت‌های مختلف IPTG استفاده شد و در ساعات مختلف نمونه برداشت شد و بر روی ژل ۱۲ درصد آکریل آمید در

شکل ۳. هضم پلاسمید pGEM II-HSPV0 با آنزیم‌های BamHI و HindIII و جداسازی قطعه‌ی ۱۱۵۲ جفت بازی HSPV0 (Heat shock proteins) از پلاسمید در کنار نشانگر ۱ Kbp



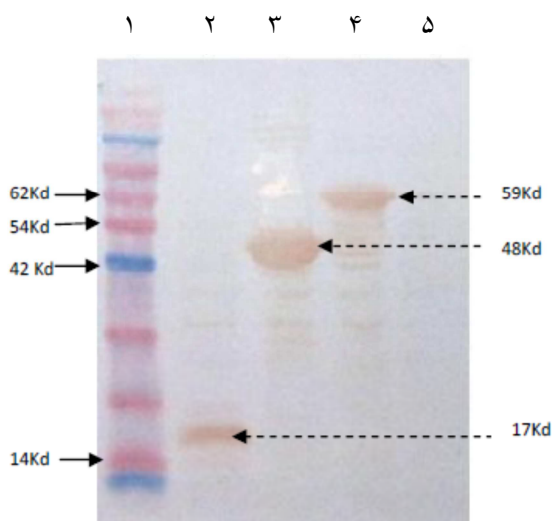
شکل ۴. هضم پلاسمیدهای pET28a نو ترکیب با آنزیم‌های BamHI و HindIII، قطعه‌ی ۱۱۵۲ جفت بازی HSPV0 (Heat shock proteins) در کنار نشانگر ۱ Kbp دیده می‌شود.



شکل ۵. نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب با دو آنزیم BamHI و HindIII، ستون ۱: محصول هضم آنزیمی (قطعات ۳۰۰ bp و ۱۱۵۲ bp)، ستون ۲: سازی هضم نشده، ستون ۳: نشانگر ۱۰۰ bp

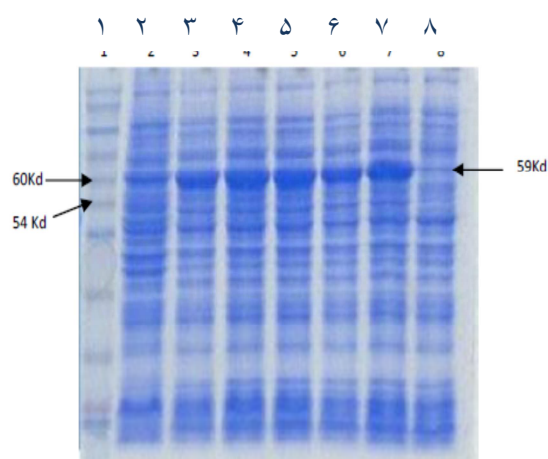
بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های نوترکیب HSP و M2-HSP با استفاده از نرم‌افزار Expasy (<http://expasy.org>) انجام گردید. با توجه به محل جای‌سازی ژن در پلاسمید pET28a و افزوده شدن دنباله‌ی هیستیدینی در هر دو طرف پروتئین‌های نوترکیب، اندازه‌ی مولکولی مورد انتظار (59 kDa برای پروتئین کایمر و 48 kDa برای HSP) در روی ژل آگارز مشاهده گردید.

نمونه‌های پروتئینی که با الکتروفورز روی ژل ۱۲ درصد پلی‌اکریل آمید از همدیگر تفکیک شده بودند، به غشای نیتروسولوز منتقل شدند و با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ویژه‌ی دنباله‌ی هیستیدینی آزمایش وسترن بلائینگ انجام شد (شکل ۸). پروتئین نوترکیب M2 که در مطالعات قبل توسط علوی و همکاران در این آزمایشگاه ساخته و تأیید شده بود نیز در شکل دیده می‌شود (۱۴).

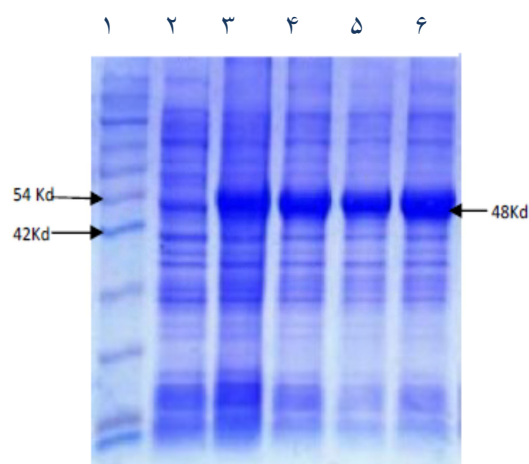


شکل ۸. نتیجه‌ی وسترن بلائینگ پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین. ستون ۱: نشانگر پروتئینی، ستون ۲: پروتئین M2، ستون ۳: پروتئین HSP، ستون ۴: پروتئین کایمر M2-HSP و ستون ۵: شاهد منفی

حضور سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز شد. نتیجه‌ی الکتروفورز عمودی در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که بالاترین میزان تولید پروتئین دو ساعت پس از القا با ۰/۵ mM IPTG حاصل می‌گردد.



شکل ۶. نتیجه‌ی بررسی بیان پروتئین M2-HSP70 در سلول‌های BL21 قبل و بعد از القا با IPTG (غلظت ۰/۵ mM) روی ژل آکریل آمید. ستون ۱: نشانگر پروتئینی، ستون ۲-۷: نمونه ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت بعد از القا، ستون ۸: نمونه‌ی قبل از القا



شکل ۷. نتیجه‌ی بررسی بیان پروتئین HSP70 در سلول‌های BL21 قبل و بعد از القا با IPTG (غلظت ۰/۵ mM) روی ژل آکریل آمید. ستون ۱: نشانگر پروتئینی، ستون ۲: نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۳-۶: نمونه ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از القا

بحث

در مطالعه‌ی حاضر پروتئین کایمر واجد پروتئین M2 و پروتئین (۶۰۴-۲۲۱) HSP70 در سیستم پروکاریوتی بیان گردید. پروتئین M2 که در بین تحت تیپ‌های مختلف ویروس بسیار حفاظت شده است، در عفونت طبیعی پاسخ‌های ایمنی ضعیفی ایجاد می‌کند (۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی بر علیه این پروتئین ویروسی، می‌تواند به حفاظت نسبی میزبان در برابر انواع ویروس‌های آنفلوانزا منجر شود. Slepishkin و همکاران نشان دادند که پروتئین M2 بیان شده در سلول‌های حشرات، می‌تواند موش‌ها را در برابر چالش با تحت تیپ‌های مختلف ویروس محافظت نماید (۱۶).

همچنین Okuda و همکاران با تجویز طول کامل ژن M1 و M2 در قالب واکسن DNA توانستند آنتی بادی‌های اختصاصی و همچنین پاسخ‌های سلولی را در موش‌های واکسینه شده نشان دهند (۱۷). به منظور بهینه‌سازی پاسخ‌های ایمنی اختصاصی، پروتئین M2 و یا ناحیه‌ی خارج سلولی آن (M2e) در کنار ترکیبات مختلفی به عنوان ادجوانت مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله اتصال چند سکانس پیوسته‌ی M2e به پروتئین نوترکیب *Onchocerca volvulus* (OV-) ۱ (Asp, ۱۸۲۶ CPG-ODN و یا STF2 باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال اختصاصی ضد M2e در مدل موشی گردید (۱۸).

یکی از ادجوانت‌های مناسب که باعث افزایش ایمنی‌زایی پروتئین هدف می‌شود، پروتئین شوک حرارتی (HSP) می‌باشد. پروتئین شوک حرارتی با عملکرد چارونی خود به پپتیدهای آنتی ژنی متصل می‌شود و آن‌ها را برای عرضه به لنفوسیت‌ها در اختیار

MHCI (Major histocompatibility complex) قرار می‌دهد و در تحریک و تولید هر دو ایمنی ذاتی و اکتسابی نقش دارد. این پروتئین بخش مهمی از دستگاه سلولی برای فولدینگ صحیح پروتئین‌ها می‌باشد و قادر به تحریک تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی عامل نکروز دهنده‌ی تومور (Tumor necrosis factor)، اینترلوکین‌های (Interleukin) ۱، ۶ و ۱۲ و رهاسازی کموکاین‌های NO و C-C توسط مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک می‌باشد.

اثرات پروتئین شوک حرارتی به عنوان ادجوانت در واکسن‌های زیر واحدی پروتئینی و ژنی در پژوهش‌های مختلف مورد تأیید قرار گرفته است. مطالعات نشان داده است که تجویز همزمان پلاسمیدهای کد کننده‌ی HSP و پلاسمیدهای کد کننده‌ی آنتی ژن و یا تجویز پلاسمیدهای کایمر که شامل ژن HSP و ژن هدف می‌باشد، می‌تواند باعث تقویت ایمنی سلولی بشود (۱۹).

در مطالعه‌ی پیرامون تولید واکسن ژنی بر ضد ویروس هانتان، Li و همکاران نشان دادند که واکسن کایمر شامل ژن‌های کد کننده‌ی قطعه‌ی S ویروس و ژن HSP می‌تواند به طور مؤثری باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال گردد (۲۰).

پروتئین شوک حرارتی در بهینه‌سازی واکسن‌های آنفلوانزا نیز به کار گرفته شده است. ابراهیمی و همکاران، پپتید M2e ویروس آنفلوانزا H۹N۲ را به ناحیه‌ی کربوکسیل پروتئین شوک حرارتی (HSP70^{۳۵۹-۶۱۰}) باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس متصل کردند و آن را در وکتور بیانی pPICZαA

ویژگی‌های خاصی باشد تا بتواند امکانات مورد نیاز جهت رونویسی، ترجمه و بیان ژن هدف را فراهم کند. یکی از مرسوم‌ترین وکتورهای مورد استفاده، پلاسمیدهای گروه pET می‌باشند. این پلاسمیدها دارای منشأ همانندسازی مناسب در سیستم پروکاریوت هستند و باکتری پذیرنده آن‌ها، قادر است که مقادیر زیادی پلاسمید نوترکیب را تولید نماید. همچنین به واسطه‌ی دارا بودن پروموتور باکتریوفاژ TV، قادر است ژن هدفی را که در پایین دست این پروموتور قرار گرفته است، با کارایی بسیار بالا بیان نماید.

در این سیستم، بیان پروتئین با افزودن IPTG القا می‌شود. در پژوهش حاضر از وکتور pET28a جهت تولید واکسن‌های زیر واحدی استفاده شد. در ابتدا ژن کد کننده‌ی اسید آمینه‌های ۲۲۱ تا ۶۰۴ HSPV0 لیشمانیا ماژور در پلاسمید pET28a جای‌سازی گردید. در مرحله‌ی بعدی، ژن M2 در بالا دست ژن HSP و در یک قاب خواندنی با دنباله‌ی هیستیدینی جای‌سازی گردید. در تمام مراحل کلونینگ، پلاسمیدهای نوترکیب با تعیین توالی نوکلئوتیدی تأیید گردیدند. برای بیان پروتئین‌های نوترکیب HSP و کایمر M2-HSP از باکتری E.coli سویه‌ی BL21 استفاده شد. سویه‌های باکتریایی BL21 دارای ژن کد کننده‌ی لیزوزیم TV می‌باشند. این لیزوزیم مهار کننده‌ی RNA پلیمراز TV می‌باشد و کمک می‌کند تا هیچ بیانی از پروموتور TV صورت نگیرد تا زمانی که IPTG اضافه شود. بنابراین پس از انتقال پلاسمید، این باکتری‌ها می‌توانند رونویسی و بیان ژن هدف را که در پایین دست پروموتور TV جای‌سازی شده است، افزایش دهند (۲۴).

کلون و پروتئین مربوط را در سلول‌های مخمر *Pichia Pastoris KMV1H* بیان کردند (۲۱). آن‌ها همچنین این پروتئین را در سیستم پروکاریوت نیز بیان کردند و برای این کار از وکتور PQE60 استفاده نمودند (۲۲).

در این پژوهش پروتئین کایمر واجد پروتئین M2 و پروتئین (۲۲۱-۶۰۴) HSPV0 لیشمانیا ماژور در سیستم پروکاریوتی بیان گردید. رأفتی و همکاران قطعات متفاوت پروتئین Lm.HSPV0 را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که ناحیه‌ی کد کننده‌ی اسید آمینه‌های ۲۲۱ تا ۶۰۴ این پروتئین در مقایسه با قطعات C و N ترمینال آن باعث القای بهتر پاسخ‌های ایمنی همورال می‌شود که در مورد لیشمانیا مطلوب نبود (۱۲)؛ در حالی که در مورد آنفلوانزا، پاسخ‌های آنتی بادی ویژه‌ی M2 از اهمیت خاصی برخوردار است. از این رو در این مطالعه، این ناحیه از Lm.HSPV0 به انتهای کربوکسیل پروتئین M2 متصل شد. در این حالت، در پروتئین کایمر نوترکیب، مشابه حالت طبیعی انتهای آمین پروتئین M2 آزاد است و می‌تواند به صورت یک ایمونوژن قوی و به عنوان واکسن زیر واحدی عمل کند (۲۳).

واکسن‌های زیر واحدی، حاوی یک یا چند آنتی ژن خالص و فاقد بیماری‌زایی هستند و به عنوان واکسن‌های بی‌خطر، مؤثر و پایدار از نظر آنتی ژنیک به شمار می‌آیند که باعث به وجود آمدن پاسخ ایمنی سلولی و همورال مؤثر، مناسب و طولانی مدت می‌شوند؛ در عین حال که فرایند تولید آن‌ها نیز مقرون به صرفه می‌باشد.

ناقل بیانی مناسب که به منظور بیان پروتئین در سلول‌های پروکاریوت به کار می‌رود، باید دارای

آنفلوانزای A و بررسی اثرات ادجوانتی HSPV⁰ لیشمانیا ماژور بر روی پروتئین M₂، ارزیابی ایمونوژنیسیته آن در مدل‌های حیوانی ضروری می‌باشد و در مطالعات آتی انجام خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی و مساعدت معاونت پژوهشی و بر اساس طرح مصوب انستیتو پاستور ایران به شماره‌ی ۶۱۱ انجام پذیرفته است. نویسندگان از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی آنفلوانزا کمال تشکر را دارند.

در نهایت، با توجه به توانایی جهش‌زایی و فراوانی نوترینی ژنتیکی در ویروس‌های آنفلوانزا، طراحی واکسنی که فرمولاسیون ثابتی داشته باشد و ایمنی متقاطع قابل قبولی در برابر تحت تیپ‌های مختلف ویروس ایجاد کند و بتوان جهت پیشگیری از اپیدمی‌های آنفلوانزا و حتی پاندمی‌های احتمالی از آن بهره جست، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه، ما به طور موفقیت‌آمیزی پروتئین کایمر HSPV⁰-M₂ را در سیستم بیانی پروکاریوتی بیان کردیم. آنالیزهای SDS-PAGE و وسترن بلات بیان پروتئین نوترکیب را تأیید کردند؛ اما برای حضور آن به عنوان یک کاندیدای واکسن جامع بر علیه ویروس

References

- Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. *Am J Med* 2008; 121(4): 258-64.
- Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 2007; 8(3): 196-205.
- Zimmer G. RNA replicons - a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. *Viruses* 2010; 2(2): 413-34.
- Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol* 2004; 59(1): 1-15.
- Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 2003; 21(16): 1776-9.
- Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(7): 4170-4.
- Wu F, Huang JH, Yuan XY, Huang WS, Chen YH. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine* 2007; 25(52): 8868-73.
- Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* 1988; 62(8): 2762-72.
- Treanor JJ, Tierney EL, Zebede SL, Lamb RA, Murphy BR. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol* 1990; 64(3): 1375-7.
- Torok Z, Tsvetkova NM, Balogh G, Horvath I, Nagy E, Penzes Z, et al. Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(6): 3131-6.
- Tamura Y, Saito K, Sato N. Heat shock protein inhibitor for molecular targeting therapy. *Nihon Rinsho* 2012; 70(Suppl 8): 135-9. (In Japanese).
- Rafati S, Gholami E, Hassani N, Ghaemimanesh F, Taslimi Y, Taheri T, et al. Leishmania major heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine* 2007; 25(21): 4159-69.
- Esghaei M, Monavari SH, Tavassoti-Kheiri M, Shamsi-Shahrabadi M, Heydarchi B, Farahmand B, et al. Expression of the influenza M2 protein in three different eukaryotic cell lines. *J Virol Methods* 2012; 179(1): 161-5.
- Alavi-Esfahani MA, Fotouhi-Chahooki F, Saleh M, Tavakoli R, Farahmand B, Ghaemi A, et al. Over expression of influenza virus M2 protein in prokaryotic system. *Iran J Virol* 2012; 6(4):

- 13-9
15. Fu TM, Freed DC, Horton MS, Fan J, Citron MP, Joyce JG, et al. Characterizations of four monoclonal antibodies against M2 protein ectodomain of influenza A virus. *Virology* 2009; 385(1): 218-26.
 16. Slepishkin VA, Katz JM, Black RA, Gamble WC, Rota PA, Cox NJ. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine* 1995; 13(15): 1399-402.
 17. Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamajima K, et al. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine* 2001; 19(27): 3681-91.
 18. Zhao G, Du L, Xiao W, Sun S, Lin Y, Chen M, et al. Induction of protection against divergent H5N1 influenza viruses using a recombinant fusion protein linking influenza M2e to *Onchocerca volvulus* activation associated protein-1 (ASP-1) adjuvant. *Vaccine* 2010; 28(44): 7233-40.
 19. Chen W, Lin Y, Liao C, Hsieh S. Modulatory effects of the human heat shock protein 70 on DNA vaccination. *J Biomed Sci* 2000; 7(5): 412-9.
 20. Li J, Li KN, Gao J, Cui JH, Liu YF, Yang SJ. Heat shock protein 70 fused to or complexed with hantavirus nucleocapsid protein significantly enhances specific humoral and cellular immune responses in C57BL/6 mice. *Vaccine* 2008; 26(25): 3175-87.
 21. Ebrahimi SM, Tebianian M, Toghyani H, Memarnejadian A, Attaran HR. Cloning, expression and purification of the influenza A (H9N2) virus M2e antigen and truncated *Mycobacterium tuberculosis* HSP70 as a fusion protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2010; 70(1): 7-12.
 22. Ebrahimi SM, Tebianian M. Heterologous expression, purification and characterization of the influenza A virus M2e gene fused to *Mycobacterium tuberculosis* HSP70(359-610) in prokaryotic system as a fusion protein. *Mol Biol Rep* 2010; 37(6): 2877-83.
 23. Shaw A. Conserved proteins as potential universal vaccines. In: Rappuoli R, Giudice GD, editors. *Influenza vaccines for the future*. New York, NY: Springer; 2011. p. 313-25.
 24. Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci* 2010; Chapter 5: Unit 5.24.1-29.

Prokaryotic Production of Influenza Virus M2 Protein Fused to Leishmania Major HSP70 in Order to Prepare an Effective Flu Vaccine

Siavash Chalabiani MSc¹, Fatemeh Fotouhi PhD², Amir Ghaemi PhD³, Maryam Saleh MSc⁴, Behrokh Farahmand PhD², Mohammad Ali Alavi-Esfahani MSc¹, Mansoureh Tabatabaian⁵, Ali Torabi⁵

Original Article

Abstract

Background: Influenza is a major cause of morbidity and mortality in the world. Permanent antigenic variation of influenza virus A causes a major concern to develop influenza vaccine. Now, some researchers are focusing on conserved antigens. The M2 protein is a proton-selective ion channel, integral in the viral envelope of the influenza virus A and allows the virus to enter and cause an infection in the host cells. This protein is conserved among all types of influenza virus A and an appropriate target for the development of influenza vaccine with broad-spectrum protection. In this study, Leishmania major heat shock protein-70 fused to M2 protein to prepare an effective vaccine against influenza virus A.

Methods: Lm. HSP70 gene was cloned into BamHI and HindIII sites of pET28a vector. Influenza virus M2 gene was amplified via polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and cloned into dephosphorylated linear pET28a vector upstream of Leishmania major HSP70 gene. The confirmed construct was transformed into Escherichia coli BL21 and protein expression was induced using isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

Findings: The recombinant plasmids were confirmed via colony PCR, restriction enzyme analysis and sequencing. The result of sequencing revealed that the M2 gene was properly cloned into pET28a-HSP70 in the right frame to 6xhis tag. The protein expression was determined using Western blot analysis.

Conclusion: Binding of HSP to the desired antigen induces increased level of immune responses. Hence, the chimer protein prepared in this study, could be an appropriate vaccine candidate to prevent influenza infection. The immunogenicity of this chimer protein with different formulation is going to evaluate in animal models. To investigate the effect of HSP on M2 immunogenicity, this chimer protein will be evaluated in future projects.

Keywords: Influenza virus A, Chimer protein, M2, HSP70

Citation: Chalabiani S, Fotouhi F, Ghaemi A, Saleh M, Farahmand B, Alavi-Esfahani MA, et al. **Prokaryotic Production of Influenza Virus M2 Protein Fused to Leishmania Major HSP70 in Order to Prepare an Effective Flu Vaccine.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(288): 841-53

1- Department of Microbiology, School of Biological Science, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

2- Assistant Professor, Department of Virology, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Medical Virology and Immunology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

4- Department of Virology, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

5- Lab Instructor, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Fatemeh Fotouhi PhD, Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

بررسی نقش سیستم یوبیکوئیتین - پروتئوزوم در فرایند اسپرماتوز

عرفانه شایگان نیا^۱، مرضیه تولایی^۲، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی^۳

مقاله مروری

چکیده

مقدمه: یوبیکوئیتین اولین بار در سال ۱۹۷۵ به عنوان یک پروتئین ۸/۵-kDa موجود در سلول شناسایی شد. یوبیکوئیتین، یک پروتئین بسیار حفاظت شده است؛ به طوری که یوبیکوئیتین انسان و مخمر در ۹۶ درصد توالی ژنتیکی مشترک هستند. این پپتید، به طور معمول به عنوان شاخص نشان گذاری سلول جهت حذف توسط پروتئوزوم شناخته شده است، اما نقش های دیگری همانند دخالت در آپوپتوز، تمایز و غیره برای آن در نظر گرفته شده است. آن چه که بیشتر در این مطالعه مد نظر می باشد، بررسی نقش سیستم یوبیکوئیتین - پروتئوزوم در فرایند اسپرماتوز است.

روش ها: مقالات جستجو شده در پایگاه های اطلاعاتی Entrez Pubmed و پایگاه های مرتبط با مقالات ISI مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: یوبیکوئیتین در طی بلوغ اسپرم، از سلول های اپیتلیال اپیدیدیم آزاد می شود و بر روی سطح اسپرم های غیر طبیعی که باید حذف شوند، قرار می گیرد. امکان دارد تعدادی از این اسپرم ها بدون حذف شدن در اپیدیدیم، در مایع انزال مشاهده شود.

نتیجه گیری: در برخی از تحقیقات دیده شده است که یوبیکوئیتیناسیون ممکن است به عنوان یک روند فیزیولوژیک در طی ظرفیت یابی افزایش پیدا کند و این افزایش، نشانه ی کیفیت خوب اسپرم است. بنابراین، یوبیکوئیتیناسیون علاوه بر حذف اسپرم های آسیب دیده، می تواند در فرایند ظرفیت یابی اسپرم نیز نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: یوبیکوئیتیناسیون، مسیر یوبیکوئیتیناسیون - پروتئوزوم، اسپرماتوز، ناباروری مردان

ارجاع: شایگان نیا عرفانه، تولایی مرضیه، نصر اصفهانی محمد حسین. بررسی نقش سیستم یوبیکوئیتین - پروتئوزوم در فرایند

اسپرماتوز. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۸): ۸۷۰-۸۵۴

مقدمه

یوبیکوئیتین، به عنوان یک پپتید نشان گذار پروتئولیتیک سلولی است که برای کنترل عملکردهای پیچیده سلول های انسانی و حیوانی ایفای نقش می کند (۱). اصلی ترین عملکرد یوبیکوئیتین، نشان دار کردن پروتئین ها به منظور تجزیه توسط سیستم

پروتئوزومی (Proteosomal) است و مشخصه ی کلیدی آن، ۷ ریشه ی اسید آمینه ی لیزین در انتهای C می باشد. در کنار این نقش، پایداری، عملکرد و محل قرارگیری پروتئین های داخل سلولی را نیز کنترل می کند (۱). در پی اضافه شدن یک یوبیکوئیتین به سوبسترا، مولکول های یوبیکوئیتین بیشتری می توانند

۱- کارشناس ارشد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده ی زیست فناوری جهاد دانشگاهی، گروه زیست فناوری تولید مثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی تکوین و عضو هیأت علمی، پژوهشکده ی زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان و گروه زیست فناوری تولید مثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، اصفهان، ایران

۳- استاد، پژوهشکده ی زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان و گروه زیست فناوری تولید مثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل و مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

نویسنده ی مسؤول: دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

انتهای C یوبیکوئیتین توسط یک آبشار آنزیمی به وجود می‌آید. در کل، این مرحله نیازمند فعالیت یکی از صد پروتئین یوبیکوئیتین لیگاز E₃ - که اغلب به عنوان یوبیکوئیتین لیگاز نام برده می‌شود - می‌باشد. آنزیم‌های E₃ به عنوان شناسایی باقی مانده‌ی سوستر در سیستم عمل می‌کنند و توانایی برقراری ارتباط با هر دو E₂ و سوستر را دارند.

در آبشار یوبیکوئیتیناسیون، E₁ می‌تواند با دومین‌های E₂، که خود می‌توانند با صدها E₃ پیوند برقرار کنند، به صورت شبکه‌ای ارتباط برقرار کند. دیگر پروتئین‌های شبیه یوبیکوئیتین نیز از طریق آبشار E₃-E₂-E₁ عمل می‌کنند (۱) (شکل ۱). آنزیم E₃:

- این آنزیم یکی از دو ناحیه‌ی زیر را دارا می‌باشد:
- 1- ناحیه‌ی HECT (Homologous to the E₆) (-AP carboxyl terminus Really interesting new) RING
 - 2- ناحیه‌ی U-box (Really interesting new) (gene or the closely-related U-box domain)
 - 3- جدول ۱ مشخصات اصلی پروتئین یوبیکوئیتین را نشان می‌دهد.

وظیفه و تنوع اصلاحات یوبیکوئیتین

یوبیکوئیتیناسیون بر روی توالی ۷ ریشه‌ی اسید آمینه‌ی لیزین مولکول سوستر صورت می‌گیرد. اضافه شدن یوبیکوئیتین در طی تکامل بر روی لیزین ۴۶ و ۴۸ صورت گرفته است. ممکن است تنها یک مولکول یوبیکوئیتین به سوستر اضافه گردد که به آن مونویوبیکوئیتیناسیون اطلاق می‌شود (۱). مونویوبیکوئیتیناسیون پروتئین را برای انتقال به سمت لیزوزوم نشانه‌گذاری می‌کند (۲) (شکل ۱).

به اولی اضافه شوند و یک زنجیره‌ی پلی یوبیکوئیتین را تشکیل دهند. به طور معمول، حدود ۴ مولکول یوبیکوئیتین به سوستر اضافه می‌شود. در این حالت، پروتئین برای تجزیه شدن به سمت کمپلکس پروتئوزوم پیش برده می‌شود (۲). پروتئوزوم، یک کمپلکس چند زیر واحدی است که وظیفه‌ی تجزیه‌ی پروتئین‌های نشان‌دار شده به وسیله‌ی یوبیکوئیتین را دارد (۳)؛ ساختار و وظایف آن در ادامه خواهد آمد.

یوبیکوئیتیناسیون:

نشان‌گذاری یک پروتئین به وسیله‌ی یوبیکوئیتین، یوبیکوئیتیناسیون یا یوبیکوئیتیناسیون (Ubiquitylation or ubiquitination) نام دارد که از مراحل زیر تشکیل شده است:

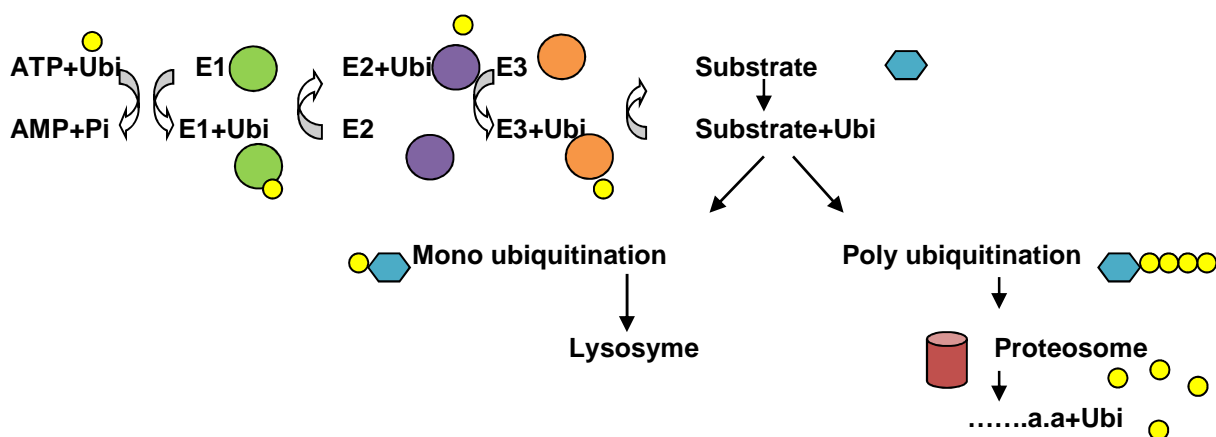
- فعال‌سازی یوبیکوئیتین: یوبیکوئیتین در یک فرایند دو مرحله‌ای و با استفاده از آنزیم فعال‌سازی یوبیکوئیتین (E₁) که از Adenosine triphosphate (ATP) به عنوان یک منبع انرژی استفاده می‌کند، فعال می‌شود. مرحله‌ی اول شامل تولید یوبیکوئیتین-آدنیلات است. مرحله‌ی دوم، یوبیکوئیتین را به باقی مانده‌ی سیستمین جایگاه فعال E₁، با رهاسازی AMP (Adenosine monophosphate)، منتقل می‌کند. این مرحله منجر به ایجاد یک پیوند تیواستر بین گروه کربوکسیل انتهایی C یوبیکوئیتین و گروه سولفیدریل سیستمین آنزیم E₁ می‌شود (شکل ۱).
- 1- انتقال یوبیکوئیتین از E₁ به سیستمین سایت فعال آنزیم متصل کننده‌ی یوبیکوئیتین E₂، از طریق واکنش ترانس استریفیکاسیون (Esterification) صورت می‌گیرد.
 - 2- آخرین مرحله‌ی یوبیکوئیتیناسیون، یک پیوند ایزوپپتیدی بین لیزین پروتئین هدف و گلیسین

حلقه‌ی β که شامل ۷ زیر واحد است، وجود دارد (PSMB ۱-۷) β ۱-۷ (۳). درون این حلقه‌ها آنزیم‌های پروتئولیتیک وجود دارد. زیر واحدهای PSMB ۷-۵، دارای پپتیدهایی با فعالیت‌های هیدرولیزی شبه تریپسین و شبه کیموتریپسین هستند، که مسؤل تجزیه‌ی پروتئین‌های وارد شده به این حلقه‌ها می‌باشند. هر ناحیه از این حلقه‌های β ، از تک حلقه‌های α که هر حلقه‌ی α شامل هفت زیر واحد است (PSMA ۱-۷) α ۱-۷ تشکیل شده است. نقش حلقه‌های α ، تنظیم ورود پروتئین‌های هدف به درون حلقه‌های β جهت تجزیه‌ی آن‌ها است (۴). کمپلکس (کلاهک یا Cap) تنظیم کننده‌ی ۱۹s دارای فعالیت‌های پپتیداز، اکسیدوردوکتاز و بی‌شکل کردن پروتئین‌ها است. این کمپلکس مسؤل شناسایی، اتصال و از بین بردن رشته‌های پلی‌یوبیکوئیتینه‌ی موجود بر روی سوبستراهای پروتئینی هستند که برای تخریب هدف‌گذاری شده‌اند (۵).

یوبیکوئیتین همچنین می‌تواند پروتئین‌های تراغشایی (گذرنده از غشا یا Transmembrane) را برای حذف کردن از غشاها و انجام تعدادی نقش‌های سیگنالی درون سلولی علامت‌گذاری کند. مولکول‌های تراغشایی سطحی سلول که با یوبیکوئیتین علامت‌گذاری شده‌اند، اغلب مونویوبیکوئیتینه هستند. این علامت‌گذاری منجر به تغییر مکان پروتئین بر سطح سلول می‌شود و اغلب پروتئین را برای تخریب توسط لیزوزوم مورد هدف قرار می‌دهد (۲).

پروتئوزوم

پروتئوزوم ۲۶s شامل یک کمپلکس چند زیر واحدی است که دارای یک مرکز استوانه‌ای شکل ۲۰s که از یک یا دو سمت به وسیله کمپلکس تنظیم کننده‌ی ۱۹s پوشیده شده است، تشکیل گردیده است (شکل ۲). درون حلقه‌ی تو خالی پروتئوزوم ۲۰s دو

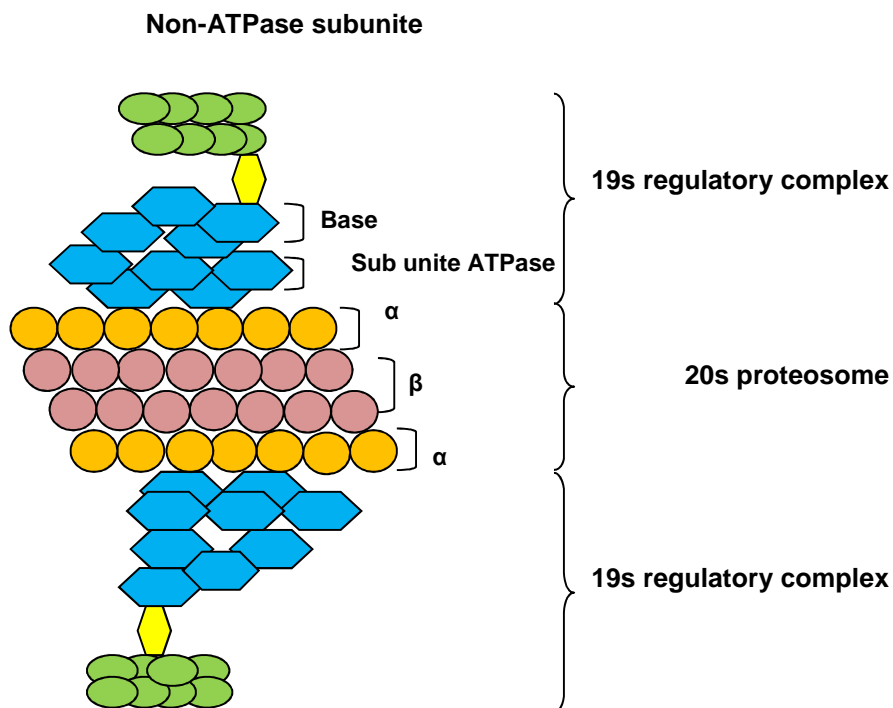


ATP: Adenosine triphosphate; AMP: Adenosine monophosphate; Ubi: Ubiquitin

شکل ۱. مراحل یوبیکوئیتیناسیون: فعال‌سازی یوبیکوئیتین (تولید یوبیکوئیتین آدنیلات)، اتصال یوبیکوئیتین به آنزیم E1، انتقال یوبیکوئیتین از E1 به آنزیم E2، انتقال یوبیکوئیتین به آنزیم E3 و سپس انتقال آن به سوبسترا. در این مرحله، منویوبیکوئیتیناسیون صورت می‌گیرد و برخی از سوبستراها با اتصال تنها یک یوبیکوئیتین (منویوبیکوئیتیناسیون) به منظور تجزیه به سمت لیزوزوم هدایت می‌شوند؛ اما ممکن است به یوبیکوئیتین اولیه متصل شده به یک سوبسترا، چندین یوبیکوئیتین دیگر نیز متصل گردد که در اصطلاح گفته می‌شود پلی‌یوبیکوئیتیناسیون صورت گرفته است. در این صورت، سوبسترای مورد نظر به سمت پروتئوزوم پیش برده می‌شود و تجزیه می‌گردد.

جدول ۱. مشخصات پروتئین یوبیکوئیتین

مشخصات پروتئینی یوبیکوئیتین	
تعداد باقی مانده های اسید آمینه ای (Number of residues)	۷۶
وزن مولکولی	۸۵۶۴/۴۷ Da
نقطه ی ایزوالکتریک (Isoelectric point یا IP)	۶/۷۹ (pH)
ژن های کد کننده	UBC و UBB، UBA۵۲ (UBCEP۲)، RPS۲۷A (UBA۸۰، UBCEP۱)



واحدهای غیر ATPase (PMSD۴) Rpn۱۰ رخ می دهد. در سال های اخیر پیشنهاد شده است که زیر واحد Rpn۱۳/ARM۱ در شناسایی رشته ی پلی یوبیکوئیتینه شده شرکت دارد. مشخص شده است که ATPase های PSMC۱-۶ یا Rpt۱-۶ می چرخند و به پروتئین اجازه می دهند که وارد هسته ی ۲۰s شوند (۶).

انتهای زیر واحدهای غیر ATPase (PMSD۱۱-۱۲ یا Rpn۳-۹)، ناحیه ی سرپوش کمپلکس ۱۹s را می سازد (۶). برخی از این زیر

کلاهی ۱۹s دارای دو نوع زیر واحد متفاوت است که در آن به هم آمیخته اند. یک دسته از آنها وابسته به ATP هستند (PSMC۱-۶ یا Rpt۱-۶) و نوع دوم، غیر وابسته به ATP هستند (PMSD۱-۱۴) یا Rpn۱-۱۲ (۵). کلاهی ۱۹s، به دو ناحیه ی چند زیر واحدی تقسیم می شود: قسمت پایه و قسمت سرپوش. ناحیه ی پایه شامل ATPase ها (PSMC۱-۶ یا Rpt۱-۶) و غیر ATPase ها (PMSD۲) Rpn۱، (PMSD۱) Rpn۲ و (PMSD۴) Rpn۱۰ است. شناسایی پروتئین های یوبیکوئیتینه شده در زیر

یوبیکوئیتین که هر روز تعداد بیشتری از آن‌ها شناخته می‌شود، نیز وجود دارد که هدف‌های سلولی را نشان‌دار می‌کند که باید حذف شوند اما یوبیکوئیتین نیستند. این پروتئین‌ها از لحاظ ساختار سه بعدی مشابه یوبیکوئیتین هستند. برای مثال، SUMO (Small ubiquitin-like modifier) تنها در ۱۸ درصد از سری مشخصات با یوبیکوئیتین مشترک است، اما ساختار سه بعدی مشابه یوبیکوئیتین دارد. این حالت پیچیدگی در ساختار سه بعدی، تاخوردگی یوبیکوئیتین (Ubiquitin fold) نام دارد. این پیچیدگی (تاخوردگی یوبیکوئیتین) در خود پروتئین یوبیکوئیتین، UBLها (Ubiquitin-like proteins) و پروتئین‌های دارای تاخوردگی فضایی مشابه تاخوردگی یوبیکوئیتین دیده شده است (۱۱-۱۰).

پروتئین‌های شبیه یوبیکوئیتین عبارت از اصلاح‌کننده‌های کوچک شبیه یوبیکوئیتین (SUMO)، پروتئین کراس واکنشی (UCRP یا Ubiquitin cross-reactive protein)، اصلاح‌کننده‌ی ۱ مربوط به یوبیکوئیتین (URM1 Ubiquitin related modifier) و ... می‌باشند.

این مولکول‌ها، عملکردهای منحصر به فرد دارند و بر مراحل مختلف بیولوژیکی تأثیر می‌گذارند. همچنین تنظیمات متفاوت بین مسیرهای مختلف را ایجاد می‌کنند. این به دلیل آن است که برخی از پروتئین‌ها با بیش از یک UBL می‌توانند اصلاح شوند. پروتئین‌های متصل شده به UBLها اغلب مورد هدف تجزیه توسط پروتئوزوم نیستند، اما در فعالیت‌های مختلف تنظیمی عمل می‌کنند. اتصال UBL ممکن است باعث تغییر ساختار سوبسترا و تأثیر روی کشش لیگاندها یا مولکول‌های فعال دیگر

واحدهای غیر ATPase ممکن است، مسؤول به کارگیری آنزیم‌های دیوبیکوئیتین‌کننده که مولکول‌های یوبیکوئیتین را از سوبسترای پروتئینی خود جدا می‌کنند، باشند. در ادامه‌ی این مرحله از دیوبیکوئیتیناسیون، سوبسترای پروتئینی می‌تواند به تنهایی جهت تخریب وارد ناحیه‌ی مرکزی شود و مولکول‌های یوبیکوئیتین آزاد هم می‌توانند توسط سلول برای نشان‌دار کردن دیگر پروتئین‌ها مورد استفاده قرار بگیرند (۷). مهار کردن فعالیت دیوبیکوئیتیناسیون توسط کمپلکس ۱۹s در نهایت موجب تحریک و افزایش تجزیه‌ی پروتئین توسط پروتئوزوم می‌شود (۸).

در حضور مهارکننده‌های آنزیم‌های دیوبیکوئیتین‌کننده، زنجیره‌ی یوبیکوئیتین‌کننده از سوبسترای پروتئینی متصل شده به کمپلکس ۱۹s جدا نمی‌شود. در عوض، این رشته‌های یوبیکوئیتین همراه سوبسترای که به آن متصل هستند، تجزیه می‌گردند. مهار کنندگان دیوبیکوئیتیناسیون نه تنها برای متوقف کردن دیوبیکوئیتیناسیون، بلکه برای تحریک تجزیه‌ی پروتئین توسط پروتئوزوم پدیدار می‌شوند (۸).

پروتئوزوم‌ها در سیتوپلاسم، غشای خارجی شبکه‌ی آندوپلاسمی، اسکلت سیتوپلاسمی و سانتروزوم (۹) و هسته‌ی تمام سلول‌های یوکاریوتی یافت شده‌اند و زیر واحدهای پروتئوزومی حدود بیش از ۱ درصد از تمامی پروتئین‌های سلولی را شامل می‌شوند (۵).

اصلاح‌کننده‌های شبه یوبیکوئیتین (Ubiquitin-like modifiers)

در حالی که یوبیکوئیتین بهترین اصلاح‌کننده‌ی بعد از ترجمه‌ای است، یک خانواده‌ی پروتئینی مشابه

اسپرماتوگونی‌ها تقسیم می‌شوند و نسل‌های پیاپی سلولی ایجاد می‌شود که در نهایت اسپرماتوسیت به وجود می‌آید.

۲. میوز: که در طی آن اسپرماتوسیت‌ها دستخوش دو تغییر پیاپی می‌شوند و تعداد کروموزوم‌ها و مقدار DNA هر سلول به نصف کاهش می‌یابد و اسپرماتید ایجاد می‌شود.

۳. اسپرمیوزن: سلسله تغییراتی که بر اثر تغییر شکل اسپرماتید به اسپرماتوزوئید به وجود می‌آید، تحت عنوان اسپرمیوزن نامیده می‌شود (۱۴).

از آن جایی که در طی فرایند اسپرمیوزن، بلوغ اسپرم رخ می‌دهد؛ در ادامه به تغییراتی که در اسپرم رخ می‌دهد، اشاره می‌گردد:

اسپرمیوزن

اسپرمیوزن به ۴ مرحله‌ی گلژی، کلاهک، آکروزوم و بلوغ تقسیم می‌شود (۱۵).

۱. مرحله‌ی گلژی و کلاهک: اسپرماتید یک سلول کم و بیش کروی است که شامل یک هسته، دستگاه گلژی، سانتریول و میتوکندری می‌باشد. گرانول‌های کوچک پیش آکروزومی (PAS (Postacrosomal sheath) مثبت که سرانجام آکروزوم را تشکیل می‌دهند، در دستگاه گلژی انباشته می‌شوند، در هم می‌آمیزند و گرانول آکروزومی واحدی را ایجاد می‌کنند که در یک غشای محصور کننده‌ی موسوم به کیسه‌ی آکروزومی محصور است. سانتریول‌ها به محلی در نزدیکی سطح سلول و در مقابل ناحیه‌ی تشکیل آکروزوم مهاجرت می‌نمایند، سپس آکسونم تاژک تشکیل می‌شود.

۲. مرحله‌ی آکروزومی: کیسه و گرانول آکروزومی

شود و مکان سوسترا را تغییر دهد و بر پایداری پروتئین تأثیر بگذارد (۱۱-۱۰).

ساختار UBLها مشابه یوبیکوئیتین است و با استفاده از مراحل آنزیماتیک که مشابه مکانیسم‌های مربوط به یوبیکوئیتین است، فعال می‌شود، متصل می‌شود و یا جدا می‌گردد. این اصلاح‌کننده‌ها، آنزیم‌های خاص خود نظیر E1 (فعال‌کننده)، E2 (متصل‌کننده) و E3 (لیگاز‌کننده) را دارا هستند که UBLها را به اهداف درون سلولی متصل می‌کنند (۱۲).

اعمال مختلف یوبیکوئیتین

سیستم یوبیکوئیتیناسیون در مراحل سلولی بسیار متنوعی نقش دارد که شامل مرحله‌ی آنتی ژن، آپوپتوز، بیوزن ارگانل‌ها، چرخه‌ی سلولی، نسخه‌برداری و ترمیم DNA، تمایز (Differentiation) و تکامل، پاسخ ایمنی و التهاب، تولید پیام‌های عصبی و عضلانی، مورفوژن شبکه‌ی عصبی، نسخه‌برداری سطح گیرنده‌های سلول، کانال‌های یونی، پاسخ به استرس و تعدیل‌کننده‌های برون سلولی، بیوزن ریوزوم‌ها و عفونت ویروسی و همچنین دیگر فعالیت‌ها می‌باشد (۱۳).

از جمله نقش‌هایی که برای یوبیکوئیتین در نظر گرفته می‌شود، نقش آن در اسپرماتوزن و مراحل پس از آن می‌باشد که در این مبحث، بر روی این مراحل تمرکز و بحث می‌شود.

نقش یوبیکوئیتین در اسپرماتوزن (Spermatogenesis)

اسپرماتوزن شامل مراحل زیر است:

۱. اسپرماتوسیتوزن: که در طی آن

اسپرم در طی اسپرماتوزونز در لوله‌های منی‌ساز (Seminiferous) حذف می‌شوند. در اسپرماتید کشیده، میزان یوبیکوئیتین شده بعد از جایگزینی توسط پروتامین کاهش پیدا می‌کند (۲۳). کمپلکس منفذهای هسته‌ای (Nuclear pore) نیز از کمپلکس غشای هسته (Envelope) اسپرماتید کشیده، حذف می‌شوند و در لوب سیتوپلاسمی قرار می‌گیرند؛ جایی که می‌توانند یوبیکوئیتین شوند و مورد پروتئولیز قرار بگیرند (۲۴).

کاهش تدریجی حجم سیتوپلاسم در طول مرحله‌ی هاپلوئید اتفاق می‌افتد. در این زمان، نیمی از میتوکندری‌های اسپرماتید به همراه قسمت اعظمی از سیتوزول، به عنوان اجسام باقی مانده توسط سلول‌های سرتولی بیضه حذف می‌شوند.

در سطح ژنوم، اگر آنزیم‌های ترمیم کننده‌ی DNA متصل به یوبیکوئیتین (HR۲۳B و USP۹Y) غیر فعال بشوند، اسپرماتوزونز طبیعی اتفاق نمی‌افتد (۲۵).

یوبیکوئیتیناسیون در بلوغ و ذخیره‌سازی اسپرم در اپیدیدیم

پس از آن که اسپرماتوزوآها بیضه را ترک کردند، در اپیدیدیم تجمع پیدا می‌کنند. در آن جا به بلوغ نهایی می‌رسند و ذخیره می‌شوند. اپیدیدیم در پستانداران از سه قسمت مجزا تشکیل شده است: سر، تنه و ناحیه‌ی دم، که هر کدام از آن‌ها نقش مشخصی در بلوغ، نگهداری، انتقال و ذخیره‌سازی اسپرم به عهده دارند. پروتئین‌های زیادی به صورت آپوکرین توسط اپیتلیوم اپیدیدیم ترشح می‌شوند که در ایجاد باندهای دی سولفیدی در تثبیت ساختار پیش هسته و کسب قدرت باروری نقش دارند (۲۶-۲۸).

گسترش می‌یابد، نیمه‌ی قدامی هسته‌ی متراکم شده را می‌پوشاند و از این پس به عنوان آکروزوم شناخته می‌شوند. در این مرحله قطب قدامی سلول که آکروزوم را در بر دارد، به سمت قاعده‌ی لوله‌ی منی‌ساز متوجه می‌شود. در ضمن، هسته هم باریک‌تر و متراکم‌تر می‌گردد. عامل اصلی در تراکم DNA هسته‌ی اسپرم، پروتامین می‌باشد که به جای هیستون قرار می‌گیرد. یکی از سانتیول‌ها به طور دائم رشد می‌کند و تاژک را تشکیل می‌دهد. میتوکندری‌ها به دور بخش ابتدایی تاژک جمع می‌شوند و ناحیه‌ی ضخیمی به نام بخش میانی را می‌سازند که منشأ حرکات اسپرماتوزوئید است.

۳. مرحله‌ی بلوغ: سیتوپلاسم اضافی از سلول جدا می‌شود و سلول‌های سرتولی آن را می‌بلعند. اسپرماتوزوئیدها به داخل لوله‌ی منی‌ساز رها می‌گردند (۱۵).

یوبیکوئیتین و آنزیم‌های متصل کننده‌ی یوبیکوئیتین (E۱ و E۲) (۱۷-۱۶)، ۴UBC (Ubiquitin conjugating) (۱۸) به میزان زیادی در طول اسپرمیوزونز و اسپرماتوزونز در غدد و سلول‌های بنیادی، سلول‌های سرتولی، اسپرماتوشیزوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدهای اولیه بیان می‌شوند. E۲ و ۴UBC در طول اسپرماتوزونز فعال هستند، اما PGP۹/۵ (نوع خاصی از UCHL-۱ یا Ubiquitin C-terminal hydrolase-۱) هم در بیضه (۱۹) و هم در اپیدیدیم (۲۰) بیان می‌شود.

یوبیکوئیتین E۱ به عنوان آنزیمی برای جایگزینی هیستون‌ها توسط پروتامین‌ها در حین طویل شدن اسپرماتید می‌باشد. هیستون‌های H۲A، H۳ یوبیکوئیتین می‌شوند (۲۲-۲۱) و در ضمن آزاد شدن

ترشح پروتئین‌های اپیدیدیمی توسط اتصال آن‌ها به اجزای شبه پروتئوزومی و وزیکول‌های مجرای اپیتلیال اپیدیدیم به درون لومن اپیدیدیم صورت می‌گیرد. این مراحل بلوغ و پایداری، اسپرم را در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو در طول مدت زمان ذخیره‌سازی و پس از آزادسازی آن درون دستگاه تناسلی ماده محافظت می‌کند (۲۸). در حین حرکت اسپرم به سمت انتهای اپیدیدیم، زواید سیتوپلاسمی تحلیل می‌روند و یا توسط سلول‌های اپیتلیال اپیدیدیم فاگوسیت می‌شوند (۲۹-۳۰).

یوبیکوئیتین، در پلاسمای مایع منی انسان و همچنین در اسپرماتوزوآهای آسیب دیده وجود دارد که این یوبیکوئیتین در طی گذر اپیدیدیمی توسط سلول‌های اپیتلیال اپیدیدیم ترشح می‌شود (۳۱). هر چند غدد ضمیمه‌ی جنسی (Accessory glands) می‌توانند منبع یوبیکوئیتین در پلاسمای مایع منی باشند، اما به نظر می‌آید که منبع بیشتر آن‌ها از اپیدیدیم باشد. این پیشنهاد توسط میزان پایین واکنش آنتی یوبیکوئیتین در پروستات انسان و حیوان، غدد بولبوپورترال (غده‌ی پیازی پیشابراهی یا Bulbulatheral)، سمینال کولیکولوسوس (Seminal colliculus) و سمینال وزیکول (Seminal vesicle) تقویت می‌شود (۲۴).

مشخص نیست که چگونه اسپرماتوزوآهای آسیب دیده توسط مکانیسم یوبیکوئیتیناسیون شناسایی می‌شوند و از بین می‌روند (۳۲). دیگر پروتئین‌های اصلی اپیدیدیم مانند پروتئین متصل به لنگر پروتئینی یا گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) یا اسپرم CD۵۲/HE۵ (۳۳) و CD۵۵ و CD۵۹ (۳۴)،

که در طول بلوغ اپیدیدیمی وارد غشای پلاسمایی اسپرم می‌گردند، می‌توانند هدف یوبیکوئیتیناسیون در اسپرم‌های آسیب دیده باشند و یا برعکس، ممکن است یوبیکوئیتیناسیون که در اپیدیدیم اتفاق می‌افتد، مانع از جابه‌جایی این پروتئین‌ها و ورود آن‌ها به غشای اسپرم گردد. حال اگر اسپرم افراد با تعداد و یا حرکت پایین را در معرض آنتی بادی بر علیه CD۵۲ قرار دهند، درصد اسپرم‌های CD۵۲ مثبت بسیار پایین است. بنابراین CD۵۲ یا به سطح اسپرم مهاجرت نکرده است و یا توسط یوبیکوئیتین پوشانده شده است که نمی‌توان با آنتی بادی اختصاصی ضد CD۵۲ آن را شناسایی نمود (۳۵).

آسیب در ساختار DNA و یا ساختارهای دیگر در بیضه، ممکن است منجر به راه افتادن مسیرهای آپوپتوز گردد و اسپرم‌هایی که در مسیر آپوپتوز قرار می‌گیرند، ممکن است یوبیکوئیتینه شوند. علاوه بر مسیر آپوپتوز، موارد دیگری نیز شاید می‌تواند منجر به یوبیکوئیتیناسیون اسپرم‌های آسیب دیده شوند، که از جمله‌ی این موارد می‌توان به پیچش نامناسب آنتی ژن‌های سطحی اسپرم و یا از بین رفتن ساختار (Denaturation) آن‌ها اشاره نمود (۳۶).

لازم به ذکر است که آسیب و یا حذف کامل غشای پلاسمایی اسپرم در ناحیه‌ی اپیدیدیم و یا در اسپرم انزال شده نیز می‌تواند موجب مستعد شدن چنین اسپرم‌هایی جهت یوبیکوئیتیناسیون در این ناحیه گردد. همچنین، نفوذ پذیر کردن و یا نوآرایی غشای پلاسمایی اسپرم می‌تواند موجب در معرض قرار گرفتن آنزیم E۲ (آنزیم متصل شونده‌ی یوبیکوئیتین که به صورت لنگری در غشای اسپرم قرار دارد) شود و آن را برای اتصال به یوبیکوئیتین در

دسترس قرار دهد (۳۷).

اسپرماتوزوآهای آسیب دیده‌ای که در اپیدیدیم و مایع منی انزال شده تجمع پیدا می‌کنند، در محیط آزمایشگاه قابلیت اتصال به سطح یوبیکوئیتینه شده‌ی سلول‌های اپیدیدیم را در محیط کشت گاو، به علت بار مثبتی که دارند، به دست می‌آورند (۳۷). پروتئین‌های دیگری مانند کلاسترین و HEP۶۴ در انباشتگی سلول‌های آسیب دیده نقش دارند و ممکن است در حذف آن‌ها توسط سلول‌های اپیدیدیم نقش داشته باشند. جالب است که بدانیم، HEP۶۴، تنها در ناحیه‌ی انتهایی اپیدیدیم در هامستر ترشح می‌شود؛ در صورتی که یوبیکوئیتین در ناحیه‌ی سر (Caput) نیز ترشح می‌شود (۳۸-۳۹).

یوبیکوئیتیناسیون میتوکندری اسپرم در اسپرماتوزن

یوبیکوئیتیناسیون میتوکندری‌های اسپرم در اسپرماتوزن بر تخریب هدفمند میتوکندری پدری پس از لقاح دلالت می‌کند. این مکانیسم به ارث رسیدن میتوکندری مادری را توجیه می‌کند. مشخصات سوبستراهای یوبیکوئیتینه شده در میتوکندری‌های اسپرم ناشناخته است. پروهیبین (Prohibitin) یک پروتئین حفاظت شده با وزن مولکول ۳۲-۳۰ kDa است و در غشای میتوکندری جای دارد و یکی از سوبستراهای یوبیکوئیتین است که ایزوفرم‌های زیادی دارد (۲۸۵-۶۴ kDa). یوبیکوئیتیناسیون پروهیبین در اسپرماتیدهای درون بیضه و اسپرماتوزوآها به وجود می‌آید. یوبیکوئیتیناسیون پروهیبین در اسپرماتوزوآهایی که از نظر کارایی ناقص هستند، در مایع انزال زیاد وجود دارد؛ که به نظر می‌آید در اثر یوبیکوئیتیناسیون سطحی در اپیدیدیم رخ داده است.

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پروهیبین یکی از سوبستراهای یوبیکوئیتین است و باعث شناخت میتوکندری‌های اسپرم توسط پروتئوزوم- یوبیکوئیتین وابسته به مکانیسم پروتئولیتیک تخم پس از لقاح می‌شود که بسیار شبیه به نشان‌دار کردن اسپرم‌ها در اپیدیدیم برای تخریب است (۴۰).

بسیاری از گزارش‌های منتشر شده ارتباط نزدیکی میان پروتئین پروهیبین و میتوکندری را نشان می‌دهد. از نقش‌های احتمالی برای پروهیبین به عنوان چاپرون برای دیگر پروتئین‌های غشای میتوکندری در طول پروتئولیز کنترل شده، ذکر شده است (۴۱). mRNA و پروتئین پروهیبین در سلول‌های سرتولی و لایدیگ وجود دارند. به علاوه ثابت شده است که پروتئین پروهیبین ترجمه می‌شود و به شکل متفاوتی در طول پیشرفت سلول‌های جنسی (Germ cell) بیان می‌شود. تصور می‌شود که پروهیبین (جزء حفاظت شده‌ی ۳۰-kDa غشای داخلی میتوکندری) به عنوان یک ایزوفرم غیر طبیعی با وزن مولکولی بالا در پستانداران بیان می‌شود. پروهیبین از نظر عملکردی در تنظیم سیکل سلولی، تمایز و نامیرایی سلول‌ها نقش دارد (۳۲).

یوبیکوئیتین، پروتئوزوم و ظرفیت یابی اسپرم

در خلال ظرفیت‌یابی اسپرم، تغییراتی در غشای پلاسمایی اسپرم رخ می‌دهد. در غشای خارجی آکروزوم و پوشش آکروزومی در آماده‌سازی برای آگروسیتوز آکروزومی تغییراتی صورت می‌گیرد (۴۲). pH اولیه‌ی آکروزوم موش، اسیدی است. اعتقاد بر این است که علت آن غیر فعال نگه داشتن پروتئازهای پروآکروزین است (۴۲). به محض آن که اسپرماتوزوآ تحت ظرفیت‌یابی قرار گیرد، pH از

مشخص شده است که پروتئوزوم‌ها در طول فرایندهای ظرفیت‌یابی اسپرم، فعال می‌شوند و مهار شدن آن‌ها موجب نقص در پدیده‌ی ظرفیت‌یابی اسپرم می‌گردد. در کل، پروتئوزوم‌ها به منظور شرکت در جابه‌جا کردن پروتئین‌های متصل به غشا در حین فرایند ظرفیت‌یابی ظهور می‌یابند. اما تمامی فعالیت‌های پروتئوزوم در طول ظرفیت‌یابی اسپرم نیست. فعالیت‌های پروتئوزومی در دیگر فرایندهای لقاح مانند اگزوسیتوز آکروزومی نیز نقش دارد (۴۷).

بر اساس تعریف گرتون، اگزوسیتوز آکروزومی به خارج‌سازی محتویات آکروزومی در اندازه‌های متفاوت، بسته به ماتریکس آکروزوم و ساختار غشا گفته می‌شود (۴۷). به نظر می‌آید که اگزوسیتوز آکروزومی در مرحله‌ی ظرفیت‌یابی اسپرم آغاز می‌شود و اتمام آن حاصل اتصال زونا پلوسیدا و وزیکوله شدن غشای خارجی آکروزوم و غشای پلاسمایی است. به محض آن که اسپرماتوزوآ به زونا پلوسیدا (Zona pellucida) متصل می‌شود (۴۳، ۴۷)، واکنش آکروزومی صورت می‌گیرد و پروتئوزوم قادر است برخی از پروتئین‌های زونا پلوسیدا را تخریب کند. پروتئوزوم‌های موجود در آکروزوم در دو ساختار به شکل عمده وجود دارد:

اولین جمعیت پروتئوزوم‌ها در اگزوسیتوز آکروزومی، همانند آن چه که در طی ظرفیت‌یابی اسپرم انسانی القا شده توسط پروتئین‌های ZP۳/ZP۴ نوترکیب رخ می‌دهد، وجود دارد و به نظر می‌رسد که پروتئوزوم‌ها در غشای خارجی آکروزوم قابل ردیابی هستند و ممکن است موجب واکنش آکروزومی شوند (۴۸).

دومین جمعیت پروتئوزوم‌ها پس از اگزوسیتوز

سطح پایه‌ی آن افزایش پیدا می‌کند. این تغییر موجب می‌شود که پروآکروزین از لحاظ پروتئولایتنیکی به صورت آکروزین فعال درآید که آن نیز فرایندهای پروتئولایتنیکی را در ماتریکس میتوکندری آغاز می‌کند (۴۳). به غیر از تغییرات pH که موجب فعال‌سازی پروتئازهای موجود در اسپرم می‌شود، فسفریلاسیون نیز موجب آن می‌گردد. در سال‌های اخیر نشان داده شده است که پروتئین متصل به آکروزین (sp۳۲) که در ماتریکس میتوکندی وجود دارد، در طول ظرفیت‌یابی (Capacitation) اسپرماتوزوآی گراز، تیروزین فسفریله می‌شود (۴۴). زیر واحد پروتئوزومی - $\alpha 6$ (PSMA۱) و پروتئین دارای والوزین (Valosine) (کوفاکتور ارایه‌ی سوبسترا به کمپلکس تنظیم کننده‌ی ۱۹s پروتئوزومی) نیز فسفریله می‌شوند.

لکه‌های پروتئینی مشخص شده به وسیله‌ی آنتی بادی علیه زیر واحد اصلی $\alpha 3$ (PSMA۴) و $\beta 6$ (PSMB۱) در ژل الکتروفورز دو بعدی قبل و بعد از ظرفیت‌یابی اسپرم گراز افزایش اندازه نشان می‌دهد. احتمال می‌رود که در طول ظرفیت‌یابی اسپرم، تغییراتی در ساختار پروتئوزومی اسپرم رخ می‌دهد (۴۵). افزایش اندازه‌ی زیر واحد هسته‌ی ۲۰s ممکن است به علت فعال شدن هسته‌ی ۲۰s باشد، در حالی که همچنین احتمال دارد که تغییرات فسفریلاسیون زیر واحد هسته‌ی ۲۰s موجب این افزایش بشود، مانند آن چه که در sp۳۲ دیده می‌شود که تغییری در الگوی تیروزین فسفریلاسیون کل پروتئین‌ها در اسپرم ظرفیت‌یابی شده‌ی طبیعی (در انسان) در حضور اپوکسی مایسین (مهار کننده‌ی پروتئوزوم) رخ می‌دهد (۴۵-۴۶).

بایستی به مرحله‌ی ظرفیت‌یابی اسپرم توجه شود (۵۵)؛ زیرا به طور معمول یوبیکوئیتیناسیون به عنوان شاخص منفی برای ارزیابی کیفیت اسپرم استفاده می‌شود و اکثر اسپرم‌هایی که در مایع منی تازه انزال شده با میزان بالای یوبیکوئیتیناسیون دیده می‌شوند، دارای کیفیت پایینی هستند و برای لقاح مناسب نمی‌باشند (۵۶).

یوبیکوئیتیناسیون در مراحل ابتدایی جنینی

یوبیکوئیتیناسیون میتوکندری پدری، در مراحل ابتدایی جنینی صورت می‌گیرد که بحث آن مطرح شد. اتفاقات دیگری در طول لقاح صورت می‌گیرد که وابسته به پروتئولیز است. پروتئولیز ممکن است برای آزادسازی عامل فعال کننده‌ی اووسیت با منشأ اسپرمی (SOAF یا Sperm-born, oocyte-activity factor) در طول حذف پوشش پیش هسته‌ی سر اسپرم در لقاح لازم باشد (۵۷). تجزیه‌ی پوشش پیش هسته در سیتوپلاسم اووسیت می‌تواند توسط مهار کنندگان سرین پروتئاز، مهار شود. گرچه این موضوع مستلزم حضور سیستم یوبیکوئیتیناسیون است. سانتربول اسپرم در طول لقاح از ناحیه‌ی فشرده‌ی دم اسپرم که در تشکیل ساختار دم اسپرم وجود دارد، آزاد می‌شود (۵۸). یوبیکوئیتین و زیر واحدهای پروتئوزومی ۲۶S در ناحیه‌ی سانتربولی دم اسپرم و دیگر نواحی قسمت میانی دم اسپرم وجود دارند و ممکن است در این روند دخالت داشته باشند (۶۰-۵۹).

اولین تقسیم میتوزی جنینی توسط تخریب سایکلین B که وابسته به یوبیکوئیتین است، صورت می‌گیرد. تجمع یوبیکوئیتین همچنین در ناحیه‌ی میانی دومین دوک میتوزی در تخمک‌های لقاح یافته و در

آکروزومی، در غشای داخلی آکروزوم، دیده می‌شوند و فعالیت پروتئولیتیک را در زمان عبور سر اسپرم از ZP، ایجاد می‌کنند. بنابراین، اکنون مشخص شده است که فعالیت پروتئوزومی برای اسپرماتوزوآ در ظرفیت‌یابی اسپرم و آگروسیتوز آکروزومی اساسی است (۴۹).

بررسی بر روی مدل‌های عروس دریایی نشان داده است که گیرنده‌ی اسپرم بر روی سطح تخمک یوبیکوئیتینه شده، توسط پروتئوزوم اسپرم شناسایی می‌شود و آن‌ها را تخریب می‌کند (۴۹).

یوبیکوئیتیناسیون و تخریب آکروزومی گیرنده‌ی اسپرم بر روی سطح غلاف ویتلین تخمک در عروس دریایی، رخ می‌دهد. در واقع یوبیکوئیتین، آنزیم‌های وابسته به آن و اجزای پروتئوزوم درون آکروزوم وجود دارند و پس از واکنش آکروزومی آزاد می‌شوند و گیرنده‌ی اسپرم را یوبیکوئیتینه می‌کنند و توسط پروتئوزوم تخریب می‌شوند (۵۰). اما در پستانداران و انسان، پروتئوزوم آزاد شده از آکروزوم اسپرم، گیرنده‌ی یوبیکوئیتینه شده (با یوبیکوئیتینی که منشأ اسپرمی ندارد) را تخریب می‌کند. این‌ها نقش مؤثر و لازم حضور یوبیکوئیتین و سیستم پروتئولیز را در انجام عمل لقاح نشان می‌دهد (۵۳-۵۱). در آزمایش‌ها نشان داده شده است که حذف ژن هر کدام از این اجزا، مانع از لقاح می‌شود (۵۴).

همچنین در برخی از تحقیقات دیده شده است که یوبیکوئیتیناسیون ممکن است به عنوان یک روند فیزیولوژیک پس از ظرفیت‌یابی افزایش پیدا کند و این افزایش، نشانه‌ی کیفیت خوب اسپرم است. بنابراین زمانی که بررسی میزان یوبیکوئیتیناسیون به عنوان ارزیابی کیفیت مایع منی استفاده می‌گردد،

تشکیل می‌دهند و تشخیص این که «کدام یک از آنتی ژن‌های سطح اسپرم مسؤول این پاسخ ایمنی است؟» را مشکل می‌سازد. برای رفع این مشکل، محققان ایزوفرم‌های متفاوت سوبستراهای پلی‌یوبیکوئیتیناسیون را و سترن بلات نمودند و با نمونه‌ی شاهد (سرمی که توسط آنتی‌بادی‌های ضد یوبیکوئیتین به خوبی شناسایی شده‌اند)، پس از آن که آنتی‌بادی‌های اضافی آن شسته شده و تنها آن‌هایی باقی مانده‌اند که به سوبسترا متصل می‌مانند، مقایسه کردند.

جالب است اشاره شود هم در افراد دارای انسداد مجرای و ابران و هم در عدم حضور مادرزادی مجرای و ابران و در مردان وازکتومی شده، میزان بالای ایمونوگلوبین‌های ضد اسپرم در اپیدیدیم تجمع پیدا کرده است و افزایش یوبیکوئیتیناسیون در اسپرماتوزوای آسیب دیده‌ی چنین مردانی، می‌تواند به علت اشباع ظرفیت پروتئولیتیک اپیدیدیمی اپی‌تلیال، صورت بگیرد. حتی در افراد بارور نیز تمامی اسپرم‌های یوبیکوئیتینه حذف نمی‌شوند و در انزال دیده می‌شود (۶۸).

یوبیکوئیتیناسیون در کنار دسته‌بندی و حذف اسپرم‌های آسیب دیده، می‌تواند آن اسپرم را توسط دستگاه ایمنی حذف کند و از شرکت در رقابت برای رسیدن به تخمک جلوگیری کند (۶۶). برای بار اول، در دستگاه تناسلی ماده، این اسپرم می‌تواند توسط لوکوسیت‌های موجود مورد هدف واقع شود و تحت واکنش ایمنی قرار گیرد و مانع از لقاح آن شود. اگر این موضوع صحیح باشد، یوبیکوئیتین می‌تواند یک هدف خوب چه در زن و چه در مرد برای موارد پیشگیری از بارداری باشد (۶۶).

در حالی که یوبیکوئیتیناسیون اسپرم اغلب در

دوک‌های متافاز جنینی دیده می‌شود (۶۱). نقش یوبیکوئیتیناسیون در لقاح و پیشرفت جنینی توسط این یافته که پروتئین شبه یوبیکوئیتین، یوبیکوئیتین لیگاز و یوبیکوئیتین هیدرولاز در سلول تخم پستانداران به شدت بیان می‌شوند، تأیید می‌گردد (۶۲).

یوبیکوئیتیناسیون و ناباروری

آنالیز مورفولوژی اسپرم توسط میکروسکوپ نوری، اطلاعات مفید (و نه کامل) را نسبت به کیفیت اسپرم به ما می‌دهد (۶۳). نشانگرهای مولکولی کیفیت مایع منی، نیز برای ارزیابی ناباروری در مردان به کار می‌رود، مانند آنکسین V (Annexin V)، p۶۴ و Fas-لیگاند به عنوان نشانگر منفی و p۳۴H و sp۲۲ به عنوان نشانگر مثبت برای شناسایی علل بیماری در ناباروری به کار می‌رود (۶۴). یوبیکوئیتین، به عنوان یک نشانگر عمومی برای ناهنجاری‌های اسپرم و مایع منی شناخته می‌شود که ناهنجاری‌های اسپرمی شامل انواع ناهنجاری‌ها در سر و دم اسپرم می‌شود. میزان بالای یوبیکوئیتین در افرادی که از نقص اسپرماتوژنز رنج می‌برند مشاهده می‌شود، مانند دیسپلازی غشای فیبروز (Dysplasia of the Fibrous Sheath یا DFS) و یا سندرم دم له شده (Stomp tail) و یا اسپرم‌های با سر کروی (Globozoospermia) وجود دارند. در مورد اخیر، نقص در ژن سنتز کننده‌ی آلفا کیناز II دارد (۶۵-۶۶).

آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم، هم در بدن مرد و هم در بدن زن تولید می‌شود و یوبیکوئیتین به عنوان اصلی‌ترین نشانگر اسپرم‌های آسیب دیده می‌تواند در این پاسخ ایمنی نقش داشته باشد (۶۷). اکثر آنتی‌بادی‌های ضد اسپرمی، باندهای چند گانه‌ای را در و سترن بلات

آپوپتوز گردد و اسپرم‌هایی که در مسیر آپوپتوز قرار می‌گیرند، ممکن است یوبیکوئیتینه شوند. علاوه بر مسیر آپوپتوز، موارد دیگری نیز می‌تواند منجر به یوبیکوئیتیناسیون اسپرم‌های آسیب دیده شوند که از جمله‌ی این موارد می‌توان به پیچش نامناسب آنتی ژن‌های سطحی اسپرم و یا از بین رفتن ساختار آن‌ها اشاره نمود. در حالی که، در برخی از تحقیقات دیده شده است که یوبیکوئیتیناسیون ممکن است به عنوان یک روند فیزیولوژیک پس از ظرفیت‌یابی افزایش یابد و این افزایش، نشانه‌ی کیفیت خوب اسپرم است. بنابراین زمانی که بررسی میزان یوبیکوئیتیناسیون به عنوان ارزیابی کیفیت مایع منی استفاده می‌گردد، بایستی به مرحله‌ی ظرفیت‌یابی اسپرم توجه شود. نقش یوبیکوئیتیناسیون در لقاح و پیشرفت جنینی توسط این یافته که پروتئین شبه یوبیکوئیتین، یوبیکوئیتین لیگاز و یوبیکوئیتین هیدرولاز در سلول تخم پستانداران به شدت بیان می‌شوند، تأیید می‌گردد. بنابراین امکان دارد سیستم یوبیکوئیتین- پروتئوزوم نقش‌های دیگری در مسیر تولید مثلی مذکر و مؤنث داشته باشد که هنوز ناشناخته است و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولان پژوهشکده‌ی رویان اصفهان ابراز می‌دارند.

اپیدیدیم اتفاق می‌افتد، تجمع یوبیکوئیتین در سلول‌های بیضه ممکن است نشان دهنده‌ی یک مسیر پاتولوژیکی باشد. این مورد به طور معمول در بیمارانی که تحت درمان سرطان با مواد شیمیایی هستند و یا در نکرور بافت بیضه مرتبط با سن، دیده می‌شود (۶۷).

نتیجه این که اصلی‌ترین عملکرد یوبیکوئیتین، نشان‌دار کردن پروتئین‌ها به منظور تجزیه توسط سیستم پروتئوزومی است. پروتئوزوم، یک کمپلکس چند زیر واحدی است که وظیفه‌ی تجزیه‌ی پروتئین‌های نشان‌دار شده به وسیله‌ی یوبیکوئیتین را دارد. سیستم یوبیکوئیتیناسیون در مراحل سلولی بسیار متنوعی نقش دارد، مانند دخالت در مراحل نسخه‌برداری و ترمیم DNA، تمایز و تکامل، پاسخ ایمنی و التهاب، تولید پیام‌های عصبی و عضلانی و غیره. از جمله نقش‌هایی که برای یوبیکوئیتین در نظر گرفته می‌شود، نقش آن در اسپرماتوزن و مراحل پس از آن می‌باشد.

یوبیکوئیتین، آنزیم‌های متصل‌کننده‌ی یوبیکوئیتین (E1 و E2) و UBC4 به میزان زیادی در طول اسپرمیوزن و اسپرماتوزن در غدد و سلول‌های بنیادی، سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها بیان می‌شوند. در مرحله‌ی بلوغ و ذخیره‌سازی اسپرم در اپیدیدیم، آسیب در ساختار DNA و یا ساختارهای دیگر در بیضه، ممکن است منجر به راه افتادن مسیرهای

References

1. Xu P, Peng J. Characterization of polyubiquitin chain structure by middle-down mass spectrometry. *Anal Chem* 2008; 80(9): 3438-44.
2. Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(2): 112-21.
3. Wojcik C, Benchaib M, Lornage J, Czyba JC, Guerin JF. Proteasomes in human spermatozoa.

- Int J Androl 2000; 23(3): 169-77.
4. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin--proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82(2): 373-428.
 5. Hendil KB. The 19 S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells. *Biochem Int* 1988; 17(3): 471-7.
 6. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, et al. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 2008; 453(7194): 481-8.
 7. Yao T, Cohen RE. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 2002; 419(6905): 403-7.
 8. Guterman A, Glickman MH. Deubiquitinating enzymes are IN/(trinsic to proteasome function). *Curr Protein Pept Sci* 2004; 5(3): 201-11.
 9. Tulsiani DR, Abou-Haila A. Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments. *Zygote* 2001; 9(1): 51-69.
 10. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(8): 599-609.
 11. Grabbe C, Dikic I. Functional roles of ubiquitin-like domain (ULD) and ubiquitin-binding domain (UBD) containing proteins. *Chem Rev* 2009; 109(4): 1481-94.
 12. Ubiquitin proteasome pathway [Online]. [cited 2014]; Available from: URL: <http://www.bostonbiochem.com/about/ubiquitin-proteasome-pathway-upp>
 13. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; 19(1): 94-102.
 14. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, et al. *Gray's anatomy*. 38th ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 1995. p. 125-7.
 15. Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Dev Biol* 1971; 26(2): 220-51.
 16. Kay GF, Ashworth A, Penny GD, Dunlop M, Swift S, Brockdorff N, et al. A candidate spermatogenesis gene on the mouse Y chromosome is homologous to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 1991; 354(6353): 486-9.
 17. Wing SS, Jain P. Molecular cloning, expression and characterization of a ubiquitin conjugation enzyme (E2(17)kB) highly expressed in rat testis. *Biochem J* 1995; 305 (Pt 1): 125-32.
 18. Rajapurohitam V, Morales CR, El-Alfy M, Lefrancois S, Bedard N, Wing SS. Activation of a UBC4-dependent pathway of ubiquitin conjugation during postnatal development of the rat testis. *Dev Biol* 1999; 212(1): 217-28.
 19. Kon Y, Endoh D, Iwanaga T. Expression of protein gene product 9.5, a neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase, and its developing change in sertoli cells of mouse testis. *Mol Reprod Dev* 1999; 54(4): 333-41.
 20. Fraile B, Martin R, De Miguel MP, Arenas MI, Bethencourt FR, Peinado F, et al. Light and electron microscopic immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in the human epididymis and vas deferens. *Biol Reprod* 1996; 55(2): 291-7.
 21. Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Roest HP, Ooms M, Vreeburg J, Hoeijmakers JH, et al. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol* 1999; 207(2): 322-33.
 22. Chen HY, Sun JM, Zhang Y, Davie JR, Meistrich ML. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* 1998; 273(21): 13165-9.
 23. Loir M, Dupressoir T, Lanneau M, Le GF, Sautiere P. High mobility group proteins in ram spermatids. *Exp Cell Res* 1986; 165(2): 441-9.
 24. Sutovsky P, Ramalho-Santos J, Moreno RD, Oko R, Hewitson L, Schatten G. On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe MitoTracker(TM) and high resolution differential interference contrast microscopy. *Hum Reprod* 1999; 14(9): 2301-12.
 25. Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed JA. Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *J Endocrinol Invest* 2000; 23(9): 597-604.
 26. Bedford JM. Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. In: Fawcett DW, Bedford JM, editors. *The spermatozoon*. Munich, Germany: Urban and Schwarzenberg; 1979. p. 7-21.
 27. Cooper TG. Epididymis. In: Knobil E, Neil JD, editors. *Encyclopedia of reproduction*. San Diego, CA: Academic Press; 1998. P. 602-9.
 28. Hermo L, Dworkin J, Oko R. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am J Anat* 1988; 183(2): 107-24.
 29. Rao AR, Bane A, Gustafsson BK. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology* 1980; 14(1): 1-12.
 30. Roussel JD, Stallcup OT, Austin CR. Selective phagocytosis of spermatozoa in the epididymis

- of bulls, rabbits, and monkeys. *Fertil Steril* 1967; 18(4): 509-16.
31. Lippert TH, Seeger H, Schieferstein G, Voelter W. Immunoreactive ubiquitin in human seminal plasma. *J Androl* 1993; 14(2): 130-1.
 32. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 2000; 63(2): 582-90.
 33. Yeung CH, Schroter S, Wagenfeld A, Kirchhoff C, Kliesch S, Poser D, et al. Interaction of the human epididymal protein CD52 (HE5) with epididymal spermatozoa from men and cynomolgus monkeys. *Mol Reprod Dev* 1997; 48(2): 267-75.
 34. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998; 3(2): 86-95.
 35. Yeung CH, Cooper TG, Nieschlag E. Human epididymal secreted protein CD52 on ejaculated spermatozoa: correlations with semen characteristics and the effect of its antibody. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(12): 1045-51.
 36. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; 4(1): 38-47.
 37. Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 9): 1665-75.
 38. Ibrahim NM, Gilbert GR, Loseth KJ, Crabo BG. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *J Androl* 2000; 21(6): 887-94.
 39. NagDas SK, Winfrey VP, Olson GE. Identification of a hamster epididymal region-specific secretory glycoprotein that binds nonviable spermatozoa. *Biol Reprod* 2000; 63(5): 1428-36.
 40. Thompson WE, Ramalho-Santos J, Sutovsky P. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* 2003; 69(1): 254-60.
 41. Arnold I, Langer T. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592(1): 89-96.
 42. Honda A, Siruntawineti J, Baba T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update* 2002; 8(5): 405-12.
 43. Buffone MG, Foster JA, Gerton GL. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5-6): 511-22.
 44. Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5-6): 463-72.
 45. Choi YJ, Uhm SJ, Song SJ, Song H, Park JK, Kim T, et al. Cytochrome c upregulation during capacitation and spontaneous acrosome reaction determines the fate of pig sperm cells: linking proteome analysis. *J Reprod Dev* 2008; 54(1): 68-83.
 46. Kong M, Diaz ES, Morales P. Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biol Reprod* 2009; 80(5): 1026-35.
 47. Kim KS, Gerton GL. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev Biol* 2003; 264(1): 141-52.
 48. Morales P, Pizarro E, Kong M, Jara M. Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Mol Reprod Dev* 2004; 68(1): 115-24.
 49. Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamano JN, Sutovsky M, Thompson WE, et al. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2004; 71(5): 1625-37.
 50. Sawada H, Sakai N, Abe Y, Tanaka E, Takahashi Y, Fujino J, et al. Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(3): 1223-8.
 51. Sakai N, Sawada H, Yokosawa H. Extracellular ubiquitin system implicated in fertilization of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation and characterization. *Dev Biol* 2003; 264(1): 299-307.
 52. Sun QY, Fuchimoto D, Nagai T. Regulatory roles of ubiquitin-proteasome pathway in pig oocyte meiotic maturation and fertilization. *Theriogenology* 2004; 62(1-2): 245-55.
 53. Morales P, Kong M, Pizarro E, Pasten C. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Hum Reprod* 2003; 18(5): 1010-7.
 54. Cardullo RA, Thaler CD. Function of the egg's extracellular matrix. In: Hardy DM, editor. *Fertilization*. San Diego, CA: Academic Press; 2002. p. 119-52.
 55. Zarei-Kheirabadi M, Shayegan NE, Tavalaee M, Deemeh MR, Arabi M, Forouzanfar M, et al. Evaluation of ubiquitin and annexin V in sperm

- population selected based on density gradient centrifugation and zeta potential (DGC-Zeta). *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(4): 365-71.
56. Eskandari-Shahraki M, Tavalaei M, Deemeh MR, Jelodar GA, Nasr-Esfahani MH. Proper ubiquitination effect on the fertilisation outcome post-ICSI. *Andrologia* 2013; 45(3): 204-10.
 57. Sutovsky P, Schatten G. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod* 1997; 56(6): 1503-12.
 58. Perry AC, Wakayama T, Cooke IM, Yanagimachi R. Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients and involvement of proteolysis. *Dev Biol* 2000; 217(2): 386-93.
 59. Bose R, Manku G, Culty M, Wing SS. Ubiquitin-proteasome system in spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2014; 759: 181-213.
 60. Mochida K, Tres LL, Kierszenbaum AL. Structural features of the 26S proteasome complex isolated from rat testis and sperm tail. *Mol Reprod Dev* 2000; 57(2): 176-84.
 61. Josefsberg LB, Kaufman O, Galiani D, Kovo M, Dekel N. Inactivation of M-phase promoting factor at exit from first embryonic mitosis in the rat is independent of cyclin B1 degradation. *Biol Reprod* 2001; 64(3): 871-8.
 62. Hwang SY, Oh B, Knowles BB, Solter D, Lee JS. Expression of genes involved in mammalian meiosis during the transition from egg to embryo. *Mol Reprod Dev* 2001; 59(2): 144-58.
 63. Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 1989; 10(2): 89-98.
 64. Boue F, Sullivan R. Cases of human infertility are associated with the absence of P34H an epididymal sperm antigen. *Biol Reprod* 1996; 54(5): 1018-24.
 65. Rawe VY, Olmedo SB, Benmusa A, Shiigi SM, Chemes HE, Sutovsky P. Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath. *Hum Reprod* 2002; 17(8): 2119-27.
 66. Bronson RA. Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. *J Reprod Immunol* 1999; 45(2): 159-83.
 67. Primakoff P, Lathrop W, Bronson R. Identification of human sperm surface glycoproteins recognized by autoantisera from immune infertile men, women, and vasectomized men. *Biol Reprod* 1990; 42(5-6): 929-42.
 68. Sutovsky P, Terada Y, Schatten G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum Reprod* 2001; 16(2): 250-8.

Role of Ubiquitin-Proteasome in Spermatogenesis Process

Erfaneh Shaygannia MSc¹, Marziyeh Tavalaei MSc²,
Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD³

Review Article

Abstract

Background: Ubiquitin first time was known at 1975, as an 8.5 KDa protein, existing in the cell. Ubiquitin protein has been highly preserved and it has 96% homology gene sequencing between human and yeast. This peptide has been identified as an index of cell mark for removing it via “proteasome”. But, other functions such as participating in the apoptosis, differentiation and etc. have been considered for ubiquitination. In the present study, we tried to concentrate on role of ubiquitin-proteasome system in spermatogenesis process.

Methods: Literature search in Entrez PubMed database, as well as other data sources related to ISI Web of Knowledge.

Findings: Ubiquitin is secreted through epithelial cells of epididymis during sperm maturation, and placed on surface of abnormal sperm that is deleted. It is possible that some of this sperms escape from deletion in epididymis and appear in ejaculate.

Conclusion: Some researches indicated that ubiquitination may increase as a physiological phenomenon during the sperm capacitation which is a positive marker to confirm sperm quality. Therefore, addition to role of ubiquitination in removing abnormal sperm, it can be involved in sperm capacitation process.

Keywords: Ubiquitination, Ubiquitin-proteasome pathway, Spermatogenesis, Male infertility

Citation: Shaygannia E, Tavalaei M, Nasr-Esfahani MH. **Role of Ubiquitin-Proteasome in Spermatogenesis Process.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(288): 854-70

1- Department of Reproductive Biotechnology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Isfahan, Iran

2- PhD Student, Faculty Member, Department of Reproductive Biotechnology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR) AND Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD, Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

errors author should verify references against the original documents. The Reference should provide the following information as stated in the presented models as follows:

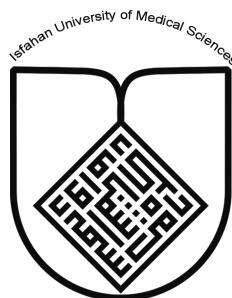
- a. **Article:** Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.
 - b. **Chapter in a book:** Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
 - c. **Book:** Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
14. **Proof Reading:** A computer printout is sent to the corresponding author for proof reading before publication in order to avoid any mistakes. Corrections should be marked clearly and sent immediately to the Journal office.
 15. **Abbreviations and symbols:** Use only standard abbreviations. **Avoid using them in the title and abstract.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
 16. The **corresponding author:** Will be supplied with 1 free issue.
 17. **Ethical guidelines:** Ethical considerations must be addressed in the Materials and Methods. Please state that **informed consent** was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project. Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your Institute or agency.
 18. **Conflicts of interest:** Authors must acknowledge and declare any sources of funding and potential conflicting interest, such as receiving funds or fees by, or holding stocks and shares in, an organization that may profit or lose through publication of your paper. Declaring a competing interest will not lead to automatic rejection of the paper, but we would like to be made aware of it.
 19. **Page charges:** There are no charges for publication in this Journal.
 20. **Copyright:** The entire contents of the Journal of Isfahan Medical School are protected under international copyrights. This Journal is for your personal noncommercial use. You may not modify copy, distribute, transmit, display, or publish any materials contained on the Journal without the prior written permission of it or the appropriate copyright owner.
 21. **Peer review process:** All manuscripts are considered to be confidential. They are peer-reviewed by at least 3 anonymous reviewers selected by the Editorial Board. The corresponding author is notified as soon as possible of the editor decision to accept, reject, or require modifications. If the manuscript is completely acceptable according to the criteria set forth in these instructions, it is scheduled for the next available issue.
 22. Journal has entire right for accept or reject any of received manuscripts.
 23. The editors, editorial board, sponsoring organization, and publisher do not accept responsibility for the statements expressed by authors in their contributions.
 24. **Communicating with the Editorial Office:** We encourage you to communicate with the JIMS Editorial Office and to check on the status of a manuscript via journal site: (<http://journals.mui.ac.ir/jims>) only. For more information you can contact with JIMS office via E-mail address (jims@med.mui.ac.ir).

INSTRUCTION TO AUTHORS

1. **Aims and Scope:** The Journal of Isfahan Medical School is the official scientific **weekly** publication of the Faculty of Medicine in Isfahan Medical Sciences University.
This Journal accepts Original Papers, Review Articles, Case Reports, Short Communications, Educational Medical Video Clips and Letters to the Editor on all aspects of medicine.
2. Manuscript **Submission is acceptable only via Journal URL: <http://journals.mui.ac.ir/jims>**
Manuscript must be accompanied by a covering letter to the Editor-in-Chief, including title and author(s) name and undertaking that it has not been published or submitted elsewhere. In case the manuscript was earlier submitted to some other Journal and was rejected, the authors must provide full information for proper analysis. Manuscript should be typed in double space of the A-4 size paper with clear margins on both sides. The text should be submitted in Microsoft Word format only. Tables as well as illustrations should be typed and drawn on a separate pages. Do not submit tables as photographs.
The figures should be sent in a format of JPEG or GIF which will produce high quality images in the online edition of the journal. Authors must declare that it is being exclusively contributed to the Journal of Isfahan Medical School.
3. The manuscript should include: **Title page**, the **Abstract** (in both Farsi and English), **Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion, Acknowledgement and References**.
4. **The title page:** The complete title of the manuscript, the name of all the authors with their highest qualifications, the department or institution to which they are attached, address for correspondence with telephone numbers, e-mail, and Fax number.
5. The **Abstract:** All original articles must accompany a structured abstract up to 250 words. It should be structured as **Background, Methods, Results and Conclusion** followed by **3 to 5 Keywords**. Keywords will assist indexers in cross indexing the article as they are published with abstract. Use terms from the Medical Subject Headings (MeSH) list of index medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). Authors need to be careful that the abstract reflects the content of the article accurately.
6. **Introduction:** This should summarize the purpose and the rationale for the study. It should neither review the subject extensively nor should it have data or conclusions of the study.
7. **Materials & Methods:** This should include exact method or observation or experiment. If an apparatus is used, its manufacturer's name and address should be given in parenthesis. If the method is established, give reference but if the method is new, give enough information so that another author is able to perform it. If a drug is used, its generic name, dose and route of administration must be given. For patients, age, sex with mean age \pm standard deviation must be given. Statistical method must be mentioned and specify any general computer program used.
8. **Results:** It must be presented in the form of text, tables and illustrations. The contents of the tables should not be all repeated in the text. Instead, a reference to the table number may be given. Long articles may need sub-headings within some sections (especially the Results and Discussion parts) to clarify their contents.
9. **Discussion:** This should emphasize the present findings and the variations or similarities with other work done in the field by other workers. The detailed data should not be repeated in the discussion again. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. It must be mentioned whether the hypothesis mentioned in the article is true, false or no conclusions can be derived.
10. **Acknowledgement:** All contributors who do not meet the criteria for authorship should be covered in the acknowledgement section. It should include persons who provided technical help, writing assistance and departmental head who only provided general support. Financial and material support should also be acknowledged.
11. **Tables:** In limited numbers should be submitted with the **captions placed above**. Do not submit tables as photograph. Place explanatory matters in footnotes, not in the heading.
12. **Figures:** Should be in limited numbers, with high quality art work and mounted on separate pages. The captions **should be placed below**. The same data should not be presented in tables, figures and text, simultaneously.
13. **References:** Should be as **Vancouver style**. All manuscripts should be accompanied by relevant references. The author should ensure reference to locally published studies by doing proper literature search. It may not be possible for the editor and reviewers to check the accuracy of all reference citations. To minimize such

Editorial Board (In alphabetical order)

1. **Mojtaba Abtahi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. **Khosrow Adeli** PhD, Professor of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada
3. **Mohammad Esmail Akbari** MD, Professor of Thoracic Surgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. **Reza Amin** MD, Professor of Pediatrics, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5. **Babak Amra** MD, Professor of Pulmonology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6. **Saeid Andalib Jortani** MD, Professor of Pathology, Lewis Weil University, USA
7. **Gholam Reza Askari** MD, PhD of Nutrition, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
8. **Reza Bagherian-Sararoudi** PhD, Assistant Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
9. **Majid Berekatain** MD, Associate Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
10. **Ken Bassett** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
11. **Ahmad Chitsaz** MD, Associate Professor of Neurology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
12. **Afsoon Emami** MD, Associate Professor of Nephrology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
13. **Ali Reza Emami** MD, Associate Professor of Infectious Diseases, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
14. **Shahin Emami** Biochemistry and Endocrinology, Saint Antoine Hospital, France
15. **Ebrahim Esfandiary** MD, PhD, Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
16. **Faramarz Esmail beigi** MD, Professor of Internal Medicine, School of Medicine, USA
17. **Ziba Farajzadegan** MD, Associate Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
18. **Hamid Fesharaki** Associate Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
19. **Marjane Foladi** PhD of Nursing, University of Florida, USA
20. **Aziz Gahari** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
21. **Ali Gheisari** MD, Professor of Cardiovascular Surgery, California, USA
22. **Jafar Golshahi** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
23. **Ali Mohammad Hanjani** MD, Professor of Cardiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
24. **Mina Hasanrezaei** MD, NeuroImmunology, School of Pharmacy, USA
25. **Saeid Morteza Heidari** MD, Associate Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
26. **Mansour karamooz** MD, Professor of Urology, California, USA
27. **Roya Kelishadi** MD, Professor of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
28. **Behnaz Khani** MD, Associate Professor of Obstetrics & Gynecology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
29. **Majid Khazaei** MD, PhD, Associate Professor of Medical Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
30. **Parvin Mahzooni** MD, Associate Professor of Pathology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
31. **Majid Maleki** MD, Professor of Cardiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
32. **Mohammad Mardani** MD, Associate Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
33. **Atiye Moghisi** MD, Professor of Endocrinology, Endocrine and Metabolism Research Center, USA
34. **Mehdi Modares** MD, Professor of Ophthalmology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
35. **Hoshang Moein** MD, Professor of Neurosurgery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
36. **Fereydoun Nouhi** MD, Professor of Cardiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
37. **Mohammadreza Nourbakhsh** Associate Professor of Physiotherapy, USA
38. **Farzin Pourfarzad** Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University MC Rotterdam, The Netherlands
39. **Masoud Pourmoghaddas** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
40. **Hassan Razmju** MD, Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
41. **Mohammad Reza Safavi** MD, Assistant Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
42. **Reza Rouzbahani** MD, MPH, Assistant Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
43. **Mansour Sholevar** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
44. **Masoud Soheilian**. MD, Professor of Ophthalmology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran



JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 32, No. 288, 1st week, August 2014

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

Emerita Editor-in-Chief: **Roya Kelishadi MD**

Editor-in-Chief: **Majid Barekatin MD**

Associate Editor: **Reza Rouzbahani MD, MPH**

Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

E-mail: publications@mui.ac.ir

Office:

P.O. Box 81744-176, Isfahan, I.R. IRAN

Telefax: +98 311 7922291

E-mail: jims@med.mui.ac.ir

Website: <http://www.journals.mui.ac.ir/jims>

Office Secretary: Golnaz Rajabi

Copy edit, Layout edit, Design and Print:

Farzanegan Radandish Co.

P.O. Box 81465-1798, Isfahan, I.R. IRAN

Telefax: +98 311 6686302

E-mail: esfahanfarzanegan@yahoo.com

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

Circulation: 500

This journal is indexed in the following international indexers

- Scopus
- Chemical Abstracts
- Islamic World Science Citation Center (ISC)
- Academic Search Complete EBSCO Publishing databases
- WHO/EMRO/Index Medicus
- Google Scholar
- Index Copernicus
- Directory of Open Access Journal (DOAJ)
- Index Academicus
- Scientific Information Database (www.sid.ir)
- www.iranmedex.com

The online version is available in; IUMS website (www.journals.mui.ac.ir/jims), Iran Publications database (www.magiran.com), Scientific Information Database website (www.sid.ir) and in Health Researchers website (www.iranmedex.com).

Copyright: All rights reserved, no part may be reproduced without the prior permission of the publisher.