

مقاله های پژوهشی

- مقایسه‌ی تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) و سرم جنین گاوی (FBS) بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست فیبرین ۲۲۹۹
 مرضیه صادقیان، دکتر بتول هاشمی بنی، دکتر محمد مردانی، دکتر نوشین امیرپور، مریم علی اکبری
- ساخت و تعیین خصوصیت سلول نوترکیب HEK293T با بیان بالای Tim3 ۲۳۱۲
 مونا مبلغ ناصری، دکتر حسین خان احمد، ویدا همایونی، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی، دکتر منصور صالحی، ایلناز رحیم منش، راضیه تقی زاده، مهسا کلاهدوز
- بررسی بیان ژن ESR1 در نمونه‌های بلوک پارافینه‌ی زنان مبتلا به سرطان پستان ۲۳۲۴
 مریم قنبریان علویجه، دکتر الهام مسلمی، امیر ایزدی
- بیان ژن TERRA در درجات توموری مختلف آستروسایتوما ۲۳۳۳
 سپیده دشتی، سعیده عشوری، دکتر مجید خیرالهی

گزارش مورد

- میلیوم کلونید ۲۳۴۳
 دکتر امیر حسین سیادت، دکتر فاطمه مختاری، دکتر محمد علی نیلرورش زاده

Original Articles

- Comparing the Effect of Platelet Rich Plasma (PRP) and Fetal Bovine Serum (FBS) on Proliferation and Survival of Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Scaffolds 2311
 Marzieh Sadeghian, Batool Hashemibeni PhD, Mohammad Mardani PhD, Noushin Amirpoor PhD, Maryam Aliakbari
- Producing Recombinant HEK293 T-cells with High Expression of T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain-3 (Tim3) Protein 2323
 Mona Moballegheh-Naseri, Hosein Khanahmad PhD, Vida Homayouni MSc, Mazdak Ganjalikahni-Hakemi PhD, Mansour Salehi PhD, Inaz Rahim-Manesh, Razieh Taghizadeh, Mahsa Kolahdooz
- The Expression of ESR1 Gene in Paraffin Tissue Blocks of Women with Breast Cancer 2332
 Maryam Ghanbarian-Alavijeh MSc, Elham Moslemi PhD, Amir Izadi MSc
- Expression of TERRA in Different Grades of Astrocytoma 2342
 Sepideh Dashti MSc, Saeideh Ashouri MSc, Majid Kheirollahi PhD
- Case Report
- Colloid Milium 2348
 Amir Hossein Siadat MD, Fatemeh Mokhtari MD, Mohammad Ali Nilforoushzadeh MD



مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۳۱۷)، بهمن و دوم اسفند 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

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

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
مسؤول دفتر: گلناز رجبی
تلفن: ۰۳۱۱-۶۶۹۴۷۳۷
دورنگار: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۲۹۱
E-mail: jims@med.mui.ac.ir
وب سایت مجله: http://www.journals.mui.ac.ir/jims

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 زیست شناسی 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 نورو ایمنولوژی، 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 آسیب شناسی 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 مغيثی	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 دست‌نوشته‌ها 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 دست‌نوشته باید یک نامه تایپ شده (Covering letter) به سردبیر، شامل عنوان و اسامی نویسنده یا نویسندگان و اعلام این که این دست‌نوشته 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- دست‌نوشته 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؛ 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

مقایسه‌ی تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) و سرم جنین گاوی (FBS) بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست فیبرین.....۲۲۹۹
مرضیه صادقیان، دکتر بتول هاشمی بنی، دکتر محمد مردانی، دکتر نوشین امیرپور، مریم علی‌اکبری

ساخت و تعیین خصوصیت سلول نو ترکیب HEK۲۹۳ T با بیان بالای Tim^۳.....۲۳۱۲
مونا مبلغ ناصری، دکتر حسین خان‌احمد، ویدا همایونی، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی، دکتر منصور صالحی، ایلناز رحیم‌منش، راضیه تقی‌زاده، مهسا کلاهدوز

بررسی بیان ژن ESR۱ در نمونه‌های بلوک پارافینه‌ی زنان مبتلا به سرطان پستان.....۲۳۲۴
مریم قنبریان علویجه، دکتر الهام مسلمی، امیر ایزدی

بیان ژن TERRA در درجات توموری مختلف آستروسایتوما.....۲۳۳۳
سپیده دشتی، سعیده عشوری، دکتر مجید خیرالهی

گزارش مورد

میلیوم کلوئید.....۲۳۴۳
دکتر امیر حسین سیادت، دکتر فاطمه مختاری، دکتر محمد علی نیلفروش زاده

مقایسه‌ی تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) و سرم جنین گاوی (FBS) بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست فیبرین

مرضیه صادقیان^۱، دکتر بتول هاشمی بنی^۲، دکتر محمد مردانی^۳، دکتر نوشین امیرپور^۳، مریم علی‌اکبری^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه در سلول درمانی و مهندسی بافت، به سلول‌های بنیادی مزانشیمی توجه خاصی می‌شود و جهت رسیدن به تعداد سلول مورد نظر با ویژگی‌های مطلوب، دستیابی به شرایط مناسب کشت ضرورت دارد. از این رو، پژوهش حاضر با هدف مقایسه‌ی تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) یا Platelet rich plasma) و سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal bovine serum) بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs یا Adipose derived stem cells) در داربست طبیعی فیبرین انجام شد.

روش‌ها: نمونه‌های چربی از سه بیمار، طی جراحی لیپوساکشن به دست آمد. سلول‌های بنیادی از بافت چربی استخراج و کشت شد. سپس سلول‌های پاساژ سوم در داربست فیبرین و مدیوم حاوی PRP ۱۰ درصد (گروه مورد) یا FBS ۱۰ درصد (گروه شاهد) کشت داده شدند. میزان تکثیر و بقای سلول‌ها در روزهای چهارم و هشتم با روش MTT (۵,۲ diphenyl tetrazolium bromide assay) رنگ‌آمیزی با Trypan blue و درصد آپوتوز سلولی با روش Flow cytometry با استفاده از کیت Annexin-FITC ارزیابی گردید. اطلاعات جمع‌آوری شد و با استفاده از آزمون t مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در روزهای چهارم و هشتم میزان بقا و تکثیر و درصد سلول‌های زنده در گروه مورد نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر و میزان سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوتوز در گروه مورد نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/01$). میزان سلول‌ها در مرحله‌ی نهایی آپوتوز، در روز ۸ به طور معنی‌داری در گروه مورد کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: تأثیر مثبت PRP بر روند بقا و تکثیر سلول‌های ADSCs در مقایسه با FBS قابل توجه است.

واژگان کلیدی: فیبرین، پلاسمای غنی از پلاکت، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، تکثیر

ارجاع: صادقیان مرضیه، هاشمی بنی بتول، مردانی محمد، امیرپور نوشین، علی‌اکبری مریم. **مقایسه‌ی تأثیر PRP و FBS بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست فیبرین.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۷): ۲۲۹۹-۲۳۱۱

درمان‌های بافتی، چون گرافت‌ها و فلپ‌های اتولوگ و آلورژنیک (۱)، راهکار مؤثری در جهت آسیب‌های بافتی باشد.

مقدمه

مهندسی بافت و سلول درمانی، امروزه در حال پیشرفت است تا بتواند نسبت به روش‌های معمول

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

برداشت می‌گردد (۸) که یک روش سازگار با سیستم ایمنی برای بازگشت مواد بیومولکول به شخص، به خصوص در مورد بازگرداندن سلول‌ها به بدن را فراهم می‌کند (۹).

مشخص شده است که در طی کشت در *in vitro* عوامل رشد خاص می‌توانند بر تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌ها اثر بگذارند (۷). پلاکت موجود در پلاسما غنی از پلاکت (PRP یا Platelet rich plasma) که از سانتریفیوژ خون کامل تهیه می‌شود، حاوی مقدار فراوانی عامل رشد مانند Epidermal Transforming growth factor- β ، growth factor و Vascular endothelial growth factor می‌باشد و سبب افزایش میزان کلاژن، تسریع تولید اپی‌تلیال، ایجاد عروق و ترمیم زخم‌های بافتی می‌گردد و به عنوان یک منبع قابل دسترس و اتولوگ از عوامل رشد در ترمیم بافت استفاده می‌شود (۱۱-۱۰).

به طور معمول، در روش‌های مهندسی بافت از سرم‌های حیوانی مانند سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal Bovine Serum) در کشت سلول استفاده می‌شود. FBS در آزمایش‌های کلینیکی برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ انسانی استفاده می‌شود (۱۳-۱۲)؛ اما استفاده‌ی کلینیکال از محیط‌های کشت دارای FBS از نظر کلینیکی ایمن نمی‌باشد (۱۴)؛ چرا که FBS می‌تواند سیستم ایمنی میزبان را تحریک نماید (۱۳) و حتی شوک‌های آنافیلاکتیک ناشی از FBS گزارش شده است (۱۵). FBS وارد سلول‌ها می‌شود و با شستشوی ساده‌ی سلول‌ها از سلول‌ها حذف نمی‌گردد و واکنش ایمنی ایجاد می‌کند (۱۶).

ویژگی‌های سلول‌های بنیادی از جمله توانایی تکثیر فراوان و مجدد خود، ظرفیت تمایز به انواع سلول‌ها و حیات به مدت طولانی، آن‌ها را برای استفاده در سلول درمانی و مهندسی بافت، مناسب نموده است (۲). مطالعات نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی می‌تواند از بافت‌های بزرگسال مانند مغز استخوان و بافت چربی تهیه شود (۳). سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs یا Adipose derived stem cells)، به دلیل توانایی تکثیر فراوان، ظرفیت تمایز به انواع سلول‌ها مانند ادیپوسیت، استئوسیت، کندروسیت، میوسیت و نرون، در صورت فراهم کردن شرایط مناسب مانند سلول‌های بنیادی دیگر (۴) و سهل‌الوصول بودن در مقایسه با سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان، امروز در مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته است (۵).

بافت چربی زیر جلدی به عنوان منبع سلول‌های بنیادی می‌تواند به سادگی و بدون استفاده از روش تهاجمی تهیه شود و از مقدار بسیار کم آن، سلول‌های بنیادی زیادی به دست می‌آید. تعداد سلول‌های بنیادی در بافت چربی، صد برابر بیشتر از مغز استخوان است (۶). این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه کشت داده می‌شوند و به یک داربست مشابه ماتریکس خارج سلولی، منتقل می‌گردند (۷).

فیبیرین از داربست‌های طبیعی مهمی است که به دلیل توانایی ذاتی برای القای واکنش متقابل بین سلولی و به عنوان یک داربست در توانایی بازسازی در مقایسه با داربست‌های مصنوعی، می‌تواند کاربردی مناسب در تحقیقات بافتی داشته باشد. فیبیرین یک ماتریکس پروتئینی است که از فیبیرینوژن تولید می‌شود و فیبیرینوژن به صورت اتولوگ از بیمار

شد، میزان تشکیل استخوان بیشتر گردید (۲۳). هدف این تحقیق، بررسی و مقایسه‌ی تأثیر PRP به عنوان مجموعه‌ای از عامل رشد و FBS بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست فیبرین در شرایط In-vitro بود.

روش‌ها

سه نمونه از چربی سفید، از ناحیه‌ی زیر جلد شکم به صورت تصادفی از افرادی که جهت عمل لیپوساکشن به بیمارستان الزهرا (س) اصفهان مراجعه کردند، تهیه شد. این نمونه‌ها از افراد مؤنث ۲۷-۴۳ سال که به هیچ نوع بیماری مبتلا نبودند و بعد از کسب رضایت نامی کتبی از آن‌ها برداشته شد. نمونه‌های چربی تحت شرایط استریل در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد، به آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان منتقل گردید.

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت کشت اولیه: نمونه‌ها به قطعات کوچک بریده و چندین بار با فسفات بافر سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) شستشو گردید تا دبریدها و خون تا حد امکان از آن جدا شود. سپس نمونه‌ها با محلول کلاژناز نوع I (Sigma) جهت هضم آنزیمی مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. آنزیم کلاژناز با DMEM-LG (Dulbecco modified essential medium- low glucose) (Sigma) حاوی FBS ۱۰ درصد، خنثی شد. محلول سلولی در لوله‌ی فالكون به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی با DMEM-LG حاوی FBS ۱۰ درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد، سوسپانسیون و به فلاسک‌های T_{۲۵} منتقل شد و در

سرم‌های حیوانی ممکن است ناقل عوامل پاتوژنی چون مایکوپلاسما، پریون‌ها و ویروس‌ها باشند. به دلیل این مشکلات، بهتر است FBS با یک سرم اتولوگ جایگزین شود (۱۷). PRP نسبت به محصولاتی با منشأ حیوانی، به صورت اتولوگ، ترکیبی از عوامل رشد می‌باشد و ماهیت اتولوگ آن واکنش ایمنی کمتری را به همراه دارد. همچنین تهیه‌ی PRP نسبت به سرم‌های حیوانی مانند FBS آسان و ارزان‌تر می‌باشد (۱۸).

در مطالعه‌ی Bensaid و همکاران مشاهده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی زمانی که در داربست فیبرین قرار می‌گیرند؛ قادر به چسبیدن، تکثیر و گسترش در این داربست می‌باشند (۱۹). تحقیق Christman و همکاران نشان می‌دهد که فیبرین، بقای سلول‌های بنیادی منتقل شده به محل دچار ایسکمی عضله‌ی قلب را افزایش و در نتیجه، اندازه‌ی محل دچار ایسکمی میوکارد را کاهش می‌دهد (۲۰). Lucarelli و همکاران نشان دادند که استفاده از PRP ۱۰ درصد، در محیط کشت سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان، میزان تکثیر را افزایش می‌دهد (۲۱). Akeda و همکاران در تحقیق خود مشخص کردند که PRP، تکثیر و متابولیسم ماتریکس سلول‌های بین مهره‌ای را افزایش می‌دهد (۱۸). مردانی و همکاران از PRP ۱۰ درصد در مدیوم کندروژنیک، جهت تمایز ADSCs استفاده و مشاهده نمودند که میزان بیان نشانگرهای کندروسیت افزایش یافت (۲۲). Pieri و همکاران در پژوهش خود نشان دادند در ایمپلنت‌های دندان‌ی که از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همراه PRP در داخل اسکافولدهای فلورو هیدروکسی آپاتیت استفاده

ترومبین است، جمع‌آوری شد. سپس $10^5 \times 5$ ADSCs حاصل از پاساژ سوم با $500 \mu\text{l}$ از Cryocipitate (فرآورده‌ی خونی که حاوی مقدار فراوانی فیبرینوژن است) مخلوط گردید. این فرآورده‌ی خونی از بانک خون تهیه و در دمای 37°C در دستگاه بن ماری ذوب شده بود. در مرحله‌ی بعد، $500 \mu\text{l}$ ترومبین به آن اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، فیبرینوژن توسط ترومبین به فیبرین تبدیل و داربست تشکیل شد.

داربست فیبرین - سلول به ۲ گروه تقسیم گردید و به هر خانه‌ی پلیت‌های گروه شاهد، 1 cc محیط کشت حاوی DMEM-LG، FBS ۱۰ درصد و پنی‌سیلین ۱ درصد و به گروه مورد، محیط کشت حاوی DMEM-LG، PRP ۱۰ درصد و پنی‌سیلین ۱ درصد اضافه شد. سلول‌ها در داربست فیبرین در روزهای چهارم و هشتم بررسی شدند.

MTT [۵,۲] (۲-thiazolyl-۴,۵-dimethyl) برای بررسی بقای ADSCs در داربست فیبرین، از روش MTT در روزهای ۴ و ۸ استفاده شد و برای هر دو گروه فیبرین با PRP و فیبرین با FBS (گروه شاهد)، ۱۰ بار تکرار گردید. ابتدا، محیط کشت هر خانه‌ی پلیت‌ها تخلیه و با $400 \mu\text{l}$ مدیوم خالص و $40 \mu\text{l}$ محلول MTT (با غلظت 5 mg در 1 ml PBS) جایگزین و در دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 ، به مدت ۴ ساعت انکوبه شد تا کریستال‌های فورامازان آزاد و رنگ ارغوانی تشکیل گردید. سپس، محلول هر خانه تخلیه و $400 \mu\text{l}$ DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma) به هر خانه اضافه شد و به مدت ۲ ساعت انکوباسیون در تاریکی انجام گرفت. $100 \mu\text{l}$ از محلول

شرایط، 5 CO_2 درصد با رطوبت نسبی و دمای 37°C کشت داده شد.

کشت تک لایه‌ای سلول‌ها: بعد از اشغال ۸۰ درصد از سطح فلاسک‌ها توسط سلول‌ها، جداسازی از سطح فلاسک با استفاده از ۰/۰۵ درصد تریپسین/EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) انجام و سلول‌ها پاساژ داده شد و کشت تک لایه‌ی سلول‌ها تا پاساژ سوم ادامه یافت.

آماده‌سازی PRP: فرآورده‌های خونی از نوع Random platelets concentrate، هر کیسه حاوی $10^{10} \times 5/5$ پلاکت، از بانک خون بیمارستان الزهرا (س) اصفهان تهیه شد و به لوله‌های فالکون 50 cc منتقل گردید. لوله‌های فالکون به مدت ۱۰ دقیقه با دور 3600 rpm سانتریفیوژ و رسوب حاصل در لوله‌های فالکون جمع‌آوری شد و به ازای 10 cc از این محلول، از ترومبین با غلظت 1000μ در 1 ml کلرید کلسیم ۱۰ درصد، اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید تا ترومبین تحت تأثیر کلرید کلسیم باعث آزاد شدن گرانول‌های آلفای پلاکت شود. سپس با دور 1500 rpm سانتریفیوژ و مایع رویی به عنوان PRP جمع‌آوری و در دمای 8°C - نگهداری شد.

کشت سلول‌ها در داربست فیبرین: ۱ کیسه از فرآورده‌های خونی از نوع FFP (Fresh frozen plasma) از بانک خون بیمارستان الزهرا اصفهان تهیه و بعد از ذوب در دمای 37°C در دستگاه بن ماری، 16 cc آن با 10 cc کلسیم گلوکونات ۱۰ درصد، در دمای 37°C در داخل لوله‌ی فالکون 50 cc ، به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس با دور 2200 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و $1/5$ - 1 cc مایع شفاف رویی که حاوی

آزمایش Trypan blue: با این روش، تعداد سلول‌های زنده در روزهای ۴ و ۸ در هر دو گروه PRP و FBS، با ۱۰ بار تکرار مشخص شد. در این روش، بعد از تجزیه‌ی داربست توسط پلاسمین (با غلظت ۰/۰۱ واحد در ml آب دیونیزه) و تهیه‌ی سوسپانسیون سلولی، به ۱۰ μ l از سوسپانسیون سلولی روی یک لام معمولی، ۱۰ μ l از Trypan blue ۰/۴ درصد اضافه شد. از مخلوط حاصل، ۱۰ μ l بر روی لام نئوبار قرار داده شد و در زیر میکروسکوپ Invert شمارش گردید. تعداد سلول‌های شفاف به عنوان سلول‌های زنده و سلول‌های رنگ گرفته و تیره به عنوان سلول‌های مرده تلقی گردید. برای مقایسه‌ی نتایج در گروه‌های مختلف از آزمون آماری t مستقل استفاده گردید.

یافته‌ها

کشت ADSCs: در مرحله‌ی اول کشت تک لایه، ADSCs بعد از ۲ ساعت شروع به چسبیدن به کف ظرف نمودند و شکل این سلول‌ها در روزهای اولیه‌ی کشت بیشتر مدور بود و با گذشت زمان بیشتر سلول‌ها حالت دوکی یا مورفولوژی شبه فیبروبلاستی را به خود گرفتند (شکل ۱).

۵ روز به طول انجامید تا سلول‌ها تکثیر شدند و سطح فلاسک توسط سلول‌ها اشغال گردید. ۱۵ روز به طول انجامید تا کشت سلول‌ها تا پاساژ سوم در کشت تک لایه ادامه یافت (شکل ۲).

کشت سلول‌ها در داربست فیبرین: ADSCs حاصل از پاساژ سوم به داربست فیبرین منتقل شدند و در داربست فیبرین، شکل دوکی آن‌ها به حالت مدور تغییر شکل یافت (شکل ۳).

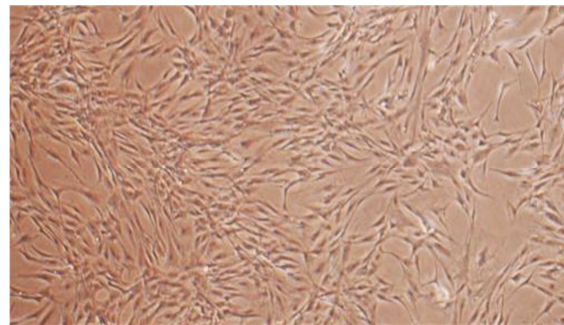
هر خانه به چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ nm، با دستگاه ELISA (Hiperion MPR) اندازه‌گیری گردید.

بررسی آپوپتوز با کیت Annexin v-FITC: این روش میزان سلول‌های زنده، سلول‌های موجود در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوپتوز و در مرحله‌ی نهایی آپوپتوز و سلول‌های مرده را در روزهای ۴ و ۸ برای هر دو گروه PRP و FBS (گروه شاهد)، با ۱۰ بار تکرار مشخص نمود. ابتدا محیط کشت را از هر خانه‌ی پلیت‌ها تخلیه و یک بار با PBS شسته و سپس ۱ cc از پلاسمین انسانی (Sigma) (با غلظت ۰/۰۱ واحد در ml آب دیونیزه) به هر چاهک اضافه و ۳۰ دقیقه انکوبه گردید که پلاسمین سبب تجزیه‌ی داربست و آزاد شدن سلول‌ها گشت.

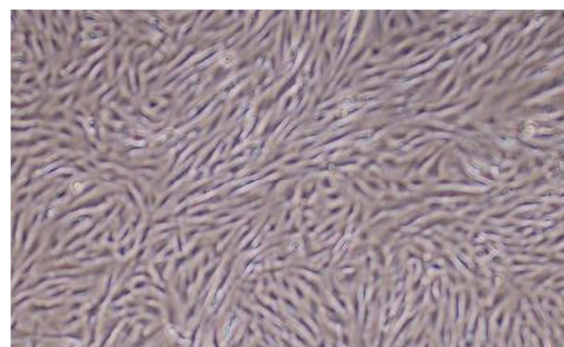
سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. به رسوب سلولی، ۵۰۰ μ l بافر کیت و ۵ μ l Annexin V-FITC و Propidium iodide اضافه شد و ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه و سپس با دستگاه فلوسایتمتری BD امواج Annexin V-FITC در طول موج ۴۸۸-۵۳۰ nm اندازه‌گیری شد که سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوپتوز به دلیل اتصال Annexin V-FITC به فسفاتیدیل سرین در لایه‌ی خارجی غشا، این امواج را از خود ساطع می‌کنند؛ اما سلول‌ها در مرحله‌ی نهایی به دلیل از دست رفتن قدرت نفوذ پذیری غشا و هسته‌ی سلول، هر دو امواج Annexin V-FITC و PI (Power integrity) و سلول‌های مرده به دلیل از دست دادن ساختار غشای سلول، موج PI را از خود ساطع می‌کنند. همچنین برای شاهد، از یک لوله‌ی سوسپانسیون سلولی با بافر کیت استفاده شد.

هر دو گروه PRP و FBS، تکرار گردید. بعد از انجام روش MTT، تشکیل کریستال‌های فورامازان در سلول‌های موجود در فیبرین، نمایانگر حفظ بقای سلول‌ها در هر دو گروه بود که رنگ بنفش تیره‌تری در گروه PRP نسبت به گروه FBS مشاهده شد (شکل ۴). میزان جذب نوری در داربست فیبرین با PRP در روز ۴، 0.270 ± 0.195 و در روز ۸، 0.410 ± 0.083 و در داربست فیبرین با FBS در روز ۴، 0.390 ± 0.087 و در روز ۸، 0.698 ± 0.180 بود. مقایسه‌ی این دو میانگین، نشان می‌دهد که میزان بقا و تکثیر سلول‌ها به طور معنی‌داری در گروه PRP نسبت به گروه FBS در روزهای ۴ و ۸ بیشتر بوده است ($P \leq 0.010$) (شکل ۵).

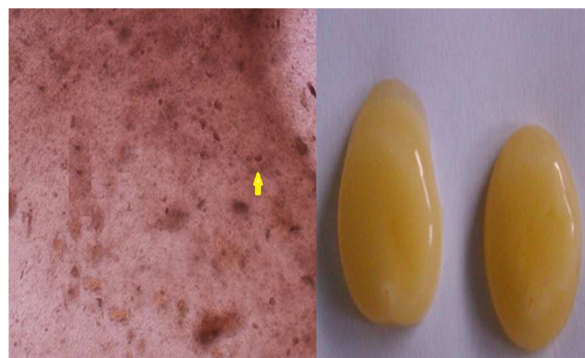
نتایج کیت Annexin v-FITC: میزان سلول‌های زنده، مرده و در مرحله‌ی اولیه و نهایی آپوپتوز با استفاده از کیت Annexin v-FITC برای هر گروه مشخص گردید. میانگین درصد سلول‌ها در گروه FBS در روز ۴ به ترتیب شامل زنده $5/550 \pm 76/730$ ، نکروز 0.270 ± 0.826 ، اولیه‌ی آپوپتوز $5/820 \pm 16/800$ ، نهایی آپوپتوز $0.570 \pm 5/750$ و در روز ۸ شامل زنده $2/900 \pm 80/370$ ، نکروز $1/490 \pm 1/261$ ، ۱۳ اولیه‌ی آپوپتوز $1/000 \pm 13/640$ ، نهایی آپوپتوز $4/220 \pm 4/880$ بود. همچنین در گروه PRP در روز ۴، به ترتیب برابر با $1/670 \pm 93/970$ ، 0.670 ± 0.406 ، $1/460 \pm 2/153$ ، $0.830 \pm 3/300$ و در روز ۸، $2/850 \pm 92/331$ ، 0.460 ± 0.546 ، $4/226 \pm 3/410$ ، $0.620 \pm 1/778$ بود. مقایسه‌ی میانگین سلول‌های زنده در هر دو گروه نشان



شکل ۱. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی با اشکال ستاره‌ای و دوکی در مرحله‌ی اولیه‌ی کشت، استفاده از میکروسکوپ Invert ($\times 40$).



شکل ۲. تکثیر و افزایش سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در پاساژ سوم که سطح فلاسک را اشغال کرده‌اند، استفاده از میکروسکوپ Invert ($\times 40$).



شکل ۳. تصویر ماکروسکوپی حاصل از داربست فیبرین (چپ). سلول‌های مشتق از چربی پس از پاساژ سوم بر روی داربست فیبرین ظاهری مدور دارند (راست) ($\times 400$).

نتایج MTT: روش MTT در روزهای ۴ و ۸ در



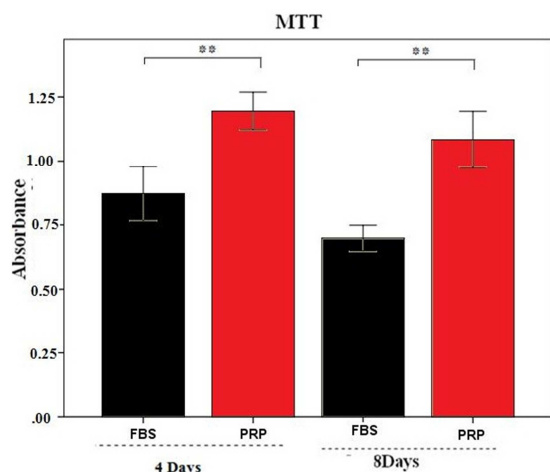
a

b

شکل ۴. نتایج حاصل از MTT (۵,۲ diphenyl tetrazolium bromide assay) (۲-yl)-۳-(۴,۵-dimethyl thiazol) و تولید رنگ

بنفش حاصل از فعالیت متابولیک سلول‌ها در گروه فیبرین با PRP (Platelet rich plasma) (a) و گروه فیبرین با FBS (Fetal bovine serum) (b). رنگ بنفش تیره‌تر در گروه فیبرین با PRP نسبت به گروه فیبرین با FBS نشان دهنده بقای بیشتر در گروه فیبرین با PRP است.

درصد سلول‌های زنده در گروه PRP نسبت به گروه شاهد در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری بیشتر بوده است ($P \leq 0/001$) (شکل ۸).



شکل ۵. نمودار مقایسه‌ی میزان جذب نوری در ۲ گروه PRP

FBS و (Platelet rich plasma)

(Fetal bovine serum) در روزهای ۴ و ۸ با روش MTT

(۵,۲ diphenyl tetrazolium bromide assay)

(۲-yl)-۳-(۴,۵-dimethyl thiazol) بیان می‌کند که میزان بقای

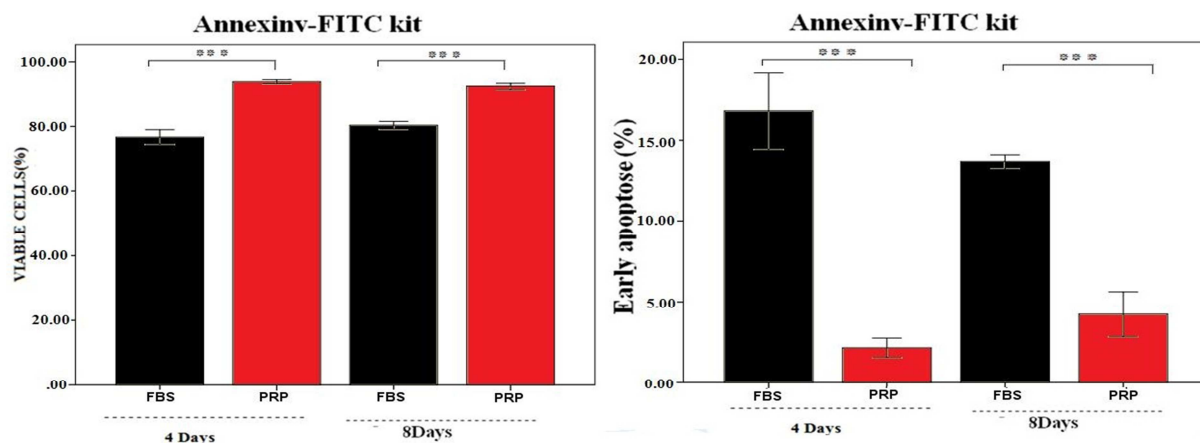
سلول‌ها در گروه PRP نسبت به FBS بیشتر است

($P \leq 0/001$)

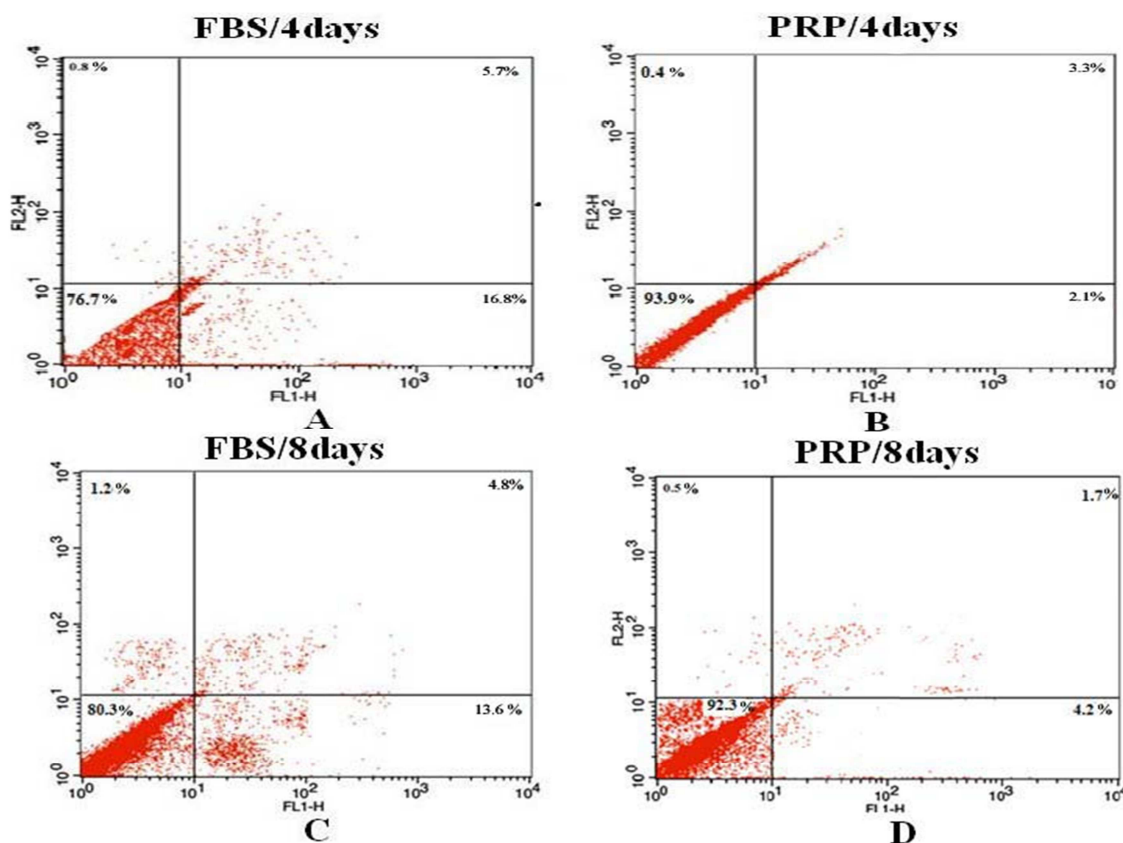
می‌دهد که میانگین سلول‌های زنده در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری در گروه PRP بیشتر از گروه FBS بوده است ($P \leq 0/001$).

میزان سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوتوز در گروه PRP در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری کمتر از گروه FBS بود ($P \leq 0/001$)، اما در میزان سلول‌های نهایی آپوتوز در روز ۴، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت. این میزان در روز ۸ به طور معنی‌داری در گروه PRP کمتر از گروه شاهد بود ($P \leq 0/001$). میزان سلول‌های نکروز در روزهای ۴ و ۸ در هر دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل‌های ۶ و ۷).

میانگین سلول‌های زنده‌ی حاصل از رنگ‌آمیزی با Trypan blue در روز ۴ در گروه PRP برابر با $3/430 \pm 94/030$ درصد و در روز ۸ برابر با $1/960 \pm 97/380$ درصد و در گروه FBS در روز ۴ برابر با $4/520 \pm 87/590$ درصد و در روز ۸ برابر با $1/830 \pm 89/900$ درصد بود که مشخص نمود



شکل ۶. نمودار حاصل از نتایج کیت Annexin v-FITC بیان می‌کند که میانگین سلول‌های زنده در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری در گروه PRP (Platelet rich plasma) بیشتر از گروه FBS (Fetal bovine serum) است ($P \leq 0/001$). میزان سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوپتوز در گروه PRP در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری کمتر از گروه FBS است ($P \leq 0/001$).

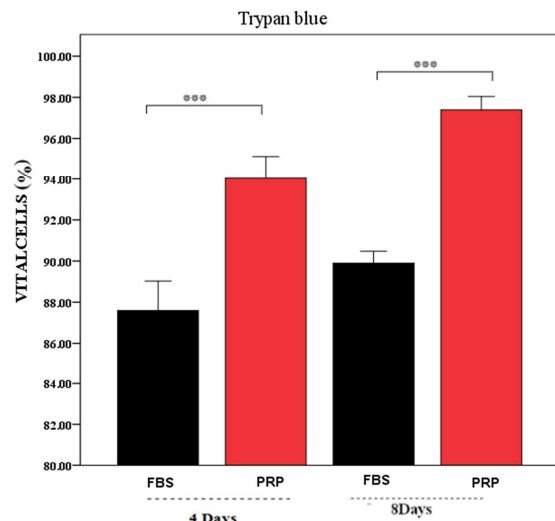


شکل ۷. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ADSCs (Adipose tissue-derived stem cells) با Annexin-FITC و PI را در هر دو گروه PRP (Platelet rich plasma) و FBS (Fetal bovine serum) در روزهای ۴ و ۸ که برای هر نمونه ۱۰ بار تکرار داشته است، مشخص می‌کند. مربع سمت چپ در پایین سلول‌های زنده را نشان می‌دهد (با هر دو رنگ Annexin-FITC و PI رنگ نگرفته‌اند). مربع سمت راست در پایین سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوپتوز را نشان می‌دهد (با Annexin-FITC رنگ گرفته‌اند). مربع سمت راست در بالا سلول‌ها در مرحله‌ی نهایی آپوپتوز را نشان می‌دهد (با هر دو رنگ Annexin-FITC و PI رنگ گرفته‌اند). گوشه‌ی سمت چپ در بالا سلول‌های مرده را نشان می‌دهد (با رنگ PI رنگ گرفته‌اند). اعداد درصد میانگین سلول‌ها را نشان می‌دهد.

با منشأ انسانی که به طور کامل دستی و با قیمت بسیار اندک تهیه گردید، استفاده شد. همچنین در این مطالعه علاوه بر محیط کشت متداول (حاوی FBS)، از محیط کشت حاوی PRP استفاده گردید. FBS، حاوی دامنه‌ی گسترده‌ای از عوامل رشد می‌باشد، اما برای تکثیر سلول‌های بنیادی در مدت زمان ایده‌ال کافی نیست (۲۹).

در مطالعات Zaragosi و همکاران Kabiri و همکاران برای اصلاح معایب FBS، به محیط کشت FGF۲ (Fibroblast growth factor۲) اضافه گردید (۲۹-۳۰). شفایی و همکاران در کشت تک لایه‌ای، در مقایسه‌ی FBS و سرم جفت انسانی، نشان دادند که میزان تکثیر و بقای ADSCs در مدیوم حاوی سرم جفت انسانی بیشتر از زمانی است که از FBS استفاده می‌شود (۳۱).

امروزه PRP بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در تحقیقات بیان می‌شود که PRP می‌تواند یک محرک در تکثیر سلول باشد؛ این اثر محرک قوی‌تر از FBS است (۱۸)؛ انواعی از عوامل رشدی که از پلاکت موجود در PRP آزاد می‌شوند، امکان تکثیر و تمایز انواع سلول‌ها و سنتز ماتریکس را به PRP می‌دهند که این امکان توسط یک یا مجموعه‌ای از عوامل رشد موجود در PRP با چسبیدن به گیرنده‌های سطح سلول امکان پذیر می‌شود (۳۲). گزارش‌هایی از تشکیل استخوان در *in vivo* با استفاده از PRP و BMSCs در مدل حیوانی بیان شده است (۳۲-۳۴) و PRP می‌تواند تکثیر Stromal stem cells را نسبت به زمانی که از FBS در محیط کشت استفاده می‌شود، افزایش دهد (۲۱). Akeda و همکاران از PRP به جای FBS در



شکل ۸. نمودار حاصل از Trypan blue، میانگین درصد سلول‌های زنده را در هر دو گروه نشان می‌دهد. میانگین سلول‌های زنده در روزهای ۴ و ۸ در گروه PRP (Platelet rich plasma) بیشتر از گروه FBS (Fetal bovine serum) است ($P \leq 0/001$).

بحث

استفاده از PRP ۱۰ درصد به جای FBS ۱۰ درصد که به طور معمول در محیط کشت می‌شود، میزان تکثیر و بقای ADSCs را افزایش می‌دهد. در مطالعات Bensaid و همکاران و Lin و همکاران مشخص گردید که بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) یا Bone marrow stromal cells در داربست فیبرین حفظ می‌گردد (۲۴، ۱۹) و Girandon و همکاران مشخص نمود که ADSCs قادر به تکثیر و بقا در داربست فیبرین هستند (۲۵). در تحقیق حاضر، مانند مطالعات قبلی مشخص گردید که بقا و تکثیر ADSCs در داربست فیبرین حفظ می‌شود. لازم به ذکر است که در مطالعات قبلی بیشتر از فیبرین تجاری و تهیه شده از خون حیوانات استفاده شده است (۲۸-۲۶، ۲۰)؛ اما در مطالعه‌ی حاضر از فیبرین

از FBS به عنوان یک سرم حیوانی استفاده می‌شود کمتر است و ممکن است بیانگر این امر باشد که فیبرین با PRP با ماهیت اتولوگ خود، شرایط مشابهی با *in vivo* در آزمایشگاه برای ADSCs فراهم می‌کنند؛ از این رو، این سلول‌ها استرس کمتری در مقایسه با زمان استفاده از FBS با ماهیت غیر اتولوگ را تجربه می‌کنند. همچنین بیان می‌شود که عامل رشد مشتق از پلاکت موجود در PRP میزان آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۳۴).

نتیجه‌گیری نهایی این که می‌توان PRP را به عنوان مجموعه‌ای از عوامل رشد به عنوان یک مکمل مناسب برای جایگزین کردن با سرم حیوانی مانند FBS در نظر گرفت و به کارگیری فیبرین به عنوان داربست و PRP به عنوان مکمل محیط کشت بر بقا و تکثیر (کاهش آپوپتوز) سلول‌های بنیادی مشتق از چربی ADSCs تأثیر چشمگیری داشته است. لازم به ذکر است که در زمینه‌ی روش تهیه‌ی PRP، اندازه‌گیری میزان هر یک از عوامل رشد موجود در آن و اثر آن‌ها بر روند تکثیر و تمایز Stem cells به انواع سلول‌ها، تحقیقات گسترده لازم است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مرضیه صادقیان در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

پژوهشگران مراتب سپاسگزاری خود را از معاونت محترم تحقیقات و فناوری، جناب آقای دکتر ادیبی و همچنین مدیر محترم گروه علوم تشریح، جناب آقای دکتر اسفندیاری اعلام می‌دارند.

محیط کشت بر روی داربست آلژینات حاوی سلول‌های دیسک بین مهره‌ای خوکی استفاده نمود و نشان داد که PRP تکثیر و تولید ماتریکس خارج سلولی را نسبت به FBS افزایش می‌دهد (۱۸). در مطالعه‌ی حاضر، نوع سلول و داربست به کار رفته متفاوت است. در مطالعه‌ی Lucarelli و همکاران، تحت تأثیر محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های متفاوت FBS و PRP میزان تکثیر BMSCs در داربست ژل پلاکت مورد ارزیابی قرار گرفت. وی نشان داد که محیط کشت حاوی PRP ۱۰ درصد بدون وابستگی به حضور یا عدم حضور FBS می‌تواند منجر به افزایش تکثیر در BMSCs گردد (۲۱) که این نتیجه، مطابق با مطالعه‌ی حاضر است. اما در مطالعه‌ی حاضر، نوع سلول‌های بنیادی متفاوت است و این سلول‌ها به داربست فیبرین منتقل شده‌اند. در تحقیق Kakudo و همکاران، غلظت‌های متفاوت PRP (۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) با FBS در کشت تک لایه‌ای ADSCs و فیروبلاست‌های درم انسانی مقایسه شد. این مطالعه، درصد مناسب PRP به منظور کشت ADSCs را ۵ درصد و برای سلول‌های فیروبلاست ۱ درصد بیان می‌کند (۳۳). تحقیق حاضر مطابق با مطالعات قبلی نشان داد که PRP، میزان تکثیر و بقای سلولی را افزایش می‌دهد.

در نتایج تحقیق حاضر مشاهده شد زمانی که از داربست فیبرین و PRP که هر دو به صورت اتولوگ قابل تهیه می‌باشند و در این تحقیق، متفاوت با بیشتر مطالعات قبلی، به طور کامل دستی، با قیمت بسیار ارزان و از خون و فراورده‌های خون انسان تهیه شد و در کشت ADSCs استفاده گردید، میزان آپوپتوز اولیه‌ی سلول‌ها به طور معنی‌داری نسبت به زمانی که

References

- Galateanu B, Dimonie D, Vasile E, Nae S, Cimpean A, Costache M. Layer-shaped alginate hydrogels enhance the biological performance of human adipose-derived stem cells. *BMC Biotechnol* 2012; 12: 35.
- Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 1988; 106(6): 2139-51.
- Liang L, Bickenbach JR. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells* 2002; 20(1): 21-31.
- Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5(5): 362-9.
- Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004; 178(1): 2-12.
- Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 2008; 332(3): 415-26.
- Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B, Quarto R. Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol* 2000; 44(6): 707-14.
- Aper T, Schmidt A, Duchrow M, Bruch HP. Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33(1): 33-9.
- Neidert MR, Lee ES, Oegema TR, Tranquillo RT. Enhanced fibrin remodeling in vitro with TGF-beta1, insulin and plasmin for improved tissue-equivalents. *Biomaterials* 2002; 23(17): 3717-31.
- Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegard D, et al. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem* 2001; 276(9): 6083-92.
- Wu JJ, Woods PE, Eyre DR. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem* 1992; 267(32): 23007-14.
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18(2): 307-16.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309): 71-4.
- Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 203(2): 398-409.
- Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49(3): 152-6.
- Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* 2004; 9(5): 747-56.
- Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2007; 31(3): 293-8.
- Akeda K, An HS, Pichika R, Attawia M, Thonar EJ, Lenz ME, et al. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; 31(9): 959-66.
- Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003; 24(14): 2497-502.
- Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(3): 654-60.
- Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24(18): 3095-100.
- Mardani M, Kabiri A, Esfandiari E, Esmaeili A, Pourazar A, Ansar M, et al. The effect of platelet rich plasma on chondrogenic differentiation of human adipose derived stem

- cells in transwell culture. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16(11): 1163-9.
23. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, et al. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2008; 35(6): 539-46.
 24. Lin N, Lin J, Bo L, Weidong P, Chen S, Xu R. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif* 2010; 43(5): 427-34.
 25. Girandon L, Kregar-Velikonja N, Bozиков K, Barlic A. In vitro models for adipose tissue engineering with adipose-derived stem cells using different scaffolds of natural origin. *Folia Biol (Praha)* 2011; 57(2): 47-56.
 26. Humphrey RG, Smith SD, Pang L, Sadovsky Y, Nelson DM. Fibrin enhances differentiation, but not apoptosis, and limits hypoxic injury of cultured term human trophoblasts. *Placenta* 2005; 26(6): 491-7.
 27. Ho ST, Cool SM, Hui JH, Hutmacher DW. The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2010; 31(1): 38-47.
 28. Almqvist KF, Wang L, Wang J, Baeten D, Cornelissen M, Verdonk R, et al. Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(8): 781-90.
 29. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(11): 2412-9.
 30. Kabiri A, Esfandiari E, Hashemibeni B, Kazemi M, Mardani M, Esmaeili A. Effects of FGF-2 on human adipose tissue derived adult stem cells morphology and chondrogenesis enhancement in Transwell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424(2): 234-8.
 31. Shafaei H, Esmaeili A, Mardani M, Razavi S, Hashemibeni B, Nasr-Esfahani MH, et al. Effects of human placental serum on proliferation and morphology of human adipose tissue-derived stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46(11): 1464-71.
 32. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 1989; 84(2): 640-6.
 33. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122(5): 1352-60.
 34. Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN, Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)* 2000; 25(17): 2153-7.

Comparing the Effect of Platelet Rich Plasma (PRP) and Fetal Bovine Serum (FBS) on Proliferation and Survival of Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Scaffolds

Marzieh Sadeghian¹, Batool Hashemibeni PhD², Mohammad Mardani PhD²,
Noushin Amirpoor PhD³, Maryam Aliakbari⁴

Original Article

Abstract

Background: Today, stem cells are the best candidate for cell therapy and tissue engineering. To achieve intended number of cells with optimal characteristics, it is necessary to have appropriate condition of culture. Therefore, in this study, we compared the effects of platelet rich plasma (PRP) and fetal bovine serum (FBS) on proliferation and survival of adipose-derived stem cells (ADSCs) in a natural fibrin scaffold.

Methods: Adipose tissue specimens were obtained from 3 patients undergoing liposuction surgery. adipose-derived stem cells were isolated from adipose tissue and cultured and encapsulated in fibrin scaffolds in third passage with culture media containing PRP-10% (experimental group) or FBS-10% (control group). Then, the rate of viability and survival were evaluated using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay and Trypan blue staining. Percentage of apoptotic cells was evaluated via flow cytometry using AnnexinV-FITC kit on fourth and eighth days. Data were collected and statistical analyzed using t-test.

Findings: The rates of viability, survival and percentage of living cells in the experimental group were significantly higher than control group on fourth and eight days ($P < 0.010$ for all). Percentages of early apoptotic cells in the experimental group were significantly lower than control group on fourth and eight days ($P < 0.001$ for both). On the eighth day, percentage of late apoptotic cells in experimental group was significantly lower than control group.

Conclusion: This study showed that the positive effect of platelet rich plasma on the survival and proliferation of adipose-derived stem cells in compared with fetal bovine serum was significant.

Keywords: Fibrin, Platelet rich plasma, Adipose-derived stem cells, Proliferation

Citation: Sadeghian M, Hashemibeni B, Mardani M, Amirpoor N, Aliakbari M. **Comparing the Effect of Platelet Rich Plasma (PRP) and Fetal Bovine Serum (FBS) on Proliferation and Survival of Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Scaffolds.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(317): 2299-2311

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences Isfahan, Iran

4- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Batool Hashemibeni PhD, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

ساخت و تعیین خصوصیت سلول نوترکیب HEK۲۹۳ T با بیان بالای Tim۳

مونا مبلغ ناصری^۱، دکتر حسین خان احمد^۲، ویدا همایونی^۳، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی^۴،
دکتر منصور صالحی^۲، ایلناز رحیم منش^۱، راضیه تقی زاده^۱، مهسا کلاهدوز^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گلیکوپروتئین Tim³ (T-cell immunoglobulin and mucin domain³) یکی از نشانگرهای سطح سلولی سلولهای Th¹ (T helper¹) است که در بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی، تغییر بیان دارد. این مطالعه، با هدف بررسی و افزایش بیان پروتئین Tim³ در سطح سلول ۲۹۳T انجام شد.

روش‌ها: کاست بیانی Tim³ از روی پلاسمید EX-W۲۶۸۲-M۶۷ با استفاده از پرایمرهای دارای جایگاه آنزیمی NheI و MluI تکثیر و در جایگاه‌های مربوط در پلاسمید pHygro ساب کلون شد. پلاسمید نوترکیب محتوی ژن Tim³ (pH-Tim³) پس از استخراج و خالص‌سازی، با آنزیم NheI خطی شد و در سلول‌های ۲۹۳T با استفاده از روش کلسیم فسفات ترانسفکت شد. سپس سلول‌های نوترکیب ۲۹۳T بیان کننده Tim³ در محیط حاوی هیگرومایسین انتخاب مثبت شدند. پس از یک ماه بر روی DNA ژنومیک کلون‌های سلولی باقی‌مانده، واکنش PCR (Polymerase chain reaction) به منظور بررسی ادغام cDNATim³ (Complementary DNA) در ژنوم سلول ۲۹۳T انجام شد. همچنین میزان بیان پروتئین Tim³ در سطح سلول به روش فلوسایتومتری ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج هضم آنزیمی با آنزیم‌های NheI و MluI بر روی پلاسمید p-H-Tim³ باند ۲۳۱۲ و ۴۶۰۰ جفت بازی را نشان داد که تأیید کننده‌ی صحت کلونینگ است. در واکنش PCR بر روی DNA ژنومیک، باند ۱۱۰۰ جفت بازی تکثیر شد که نشانه‌ی ورود ژن Tim³ در ژنوم سلول ۲۹۳T می‌باشد. همچنین در فلوسایتومتری، ۸۸ درصد سلول‌ها از نظر بیان Tim³ مثبت بودند و شدت بیان در قسمت زیادی از سلول‌ها بالا بود.

نتیجه‌گیری: بیان پروتئین در سیستم‌های بیانی پروکاریوت‌ها از نظر زمان و هزینه بهتر از سیستم‌های یوکاریوتی است، اما در مورد پروتئین‌های دارای تغییرات پس از ترجمه، این سیستم بیانی جوابگو نیست. در برخی موارد ساختار فضایی طبیعی پروتئین در موقع لنگر انداختن بر سطح غشا، در تولید پروتئین‌های غشایی مانند Tim³ در سیستم‌های یوکاریوتی، حفظ نمی‌شود. در نتیجه، برای استفاده در تحقیقات تهیه‌ی آنتی‌بادی‌هایی که اپی‌توپ‌های فضایی را می‌شناسند و یا انتخاب آبتامر، مناسب نمی‌باشند. بیان پروتئین Tim³ در سطح سلول، می‌تواند ارایه دهنده‌ی پروتئین با ساختار فضایی طبیعی در پروژه‌های تولید آنتی‌بادی، نانوبادی و آبتامر باشد.

واژگان کلیدی: T-cell immunoglobulin and mucin domain³، ۲۹۳T، سلول نوترکیب

ارجاع: مونا مبلغ ناصری، خان احمد حسین، همایونی ویدا، گنجعلی خانی حاکمی مزدک، صالحی منصور، رحیم منش ایلناز، تقی‌زاده راضیه، کلاهدوز مهسا. ساخت و تعیین خصوصیت سلول نوترکیب HEK۲۹۳ T با بیان بالای Tim³. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۱۱۷): ۲۳۲۳-۲۳۱۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

در بیماری‌های مختلف الگوی پاسخ ایمنی سلولی می‌تواند به نفع Th¹ (T helper¹) یا Th² باشد. به عنوان مثال، فعال شدن بیش از حد Th¹ در بیماری‌های خودایمنی عضو خاص و ازدیاد حساسیت تأخیری رخ می‌دهد و پاسخ کنترل نشده‌ی Th² در بیماری‌هایی از قبیل آسم و آلرژی دیده می‌شود. به علاوه، سطح بالایی از Th¹⁷ در بیماری‌های خودایمنی و التهابی گزارش شده است (۱). با تنظیم بیان مولکول‌های نقاط واری ایمنی که شامل مولکول‌های کمک تحریکی و کمک مهارتی سلول‌های T می‌باشند و امواج مثبت یا منفی را القا می‌کنند، می‌توان یک روش درمانی نوین برای جلوگیری از عملکرد خودبه‌خودی فعال شدن یا مهار شدن سلول‌های T ارایه نمود. با کشف خانواده‌ی Tim (T-cell immunoglobulin and mucin domain) نمونه‌ای از مولکول‌های نقاط واری ایمنی شناخته شد (۲). گلیکوپروتئین‌های خانواده‌ی Tim از موج پپتید، منطقه‌ی گذر غشایی، دمین موسین، دمین ایمونوگلوبین و دمین سیتوپلاسمیک تشکیل شده‌اند. این خانواده، شامل هشت عضو روی کروموزوم موشی ۱۱ (ناحیه‌ی ۱۱p۱/۱) و ۳ عضو روی کروموزوم شماره‌ی ۵ انسان در ناحیه‌ی ۵q۳۳/۲۵ می‌باشند (۳).

Tim³، عضو جدید خانواده‌ی Tim، شامل ۷ اگزون است که پروتئین ۳۰۱ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند و در سطح سلول‌های تمایز یافته‌ی CD⁴⁺ Th¹، Th¹⁷ و CD⁸⁺ بیان می‌شود (۴). بیان Tim³ در سلول‌های ایمنی ذاتی شامل ماست سل‌های موشی، ماکروفاژها، سلول‌های NK (Natural killer)، (Natural killer T) NKT، مونوسیت و

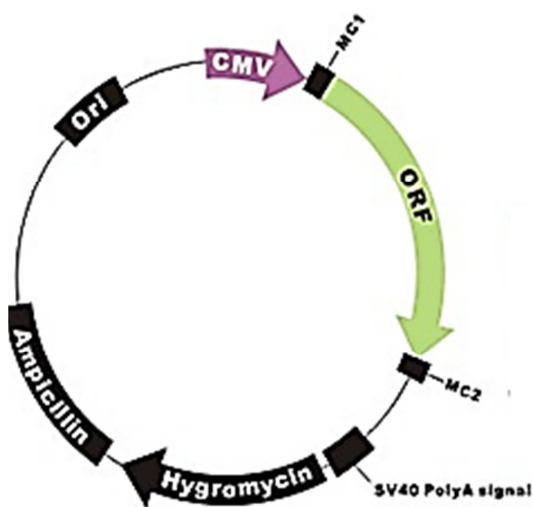
دندریتیک‌های انسانی که فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتیک و عرضه‌ی متقاطع به آنتی‌ژن‌ها را واسطه‌گری می‌کنند نیز مشاهده شده است (۵).

Tim³ به عنوان گیرنده‌ی ویژه در سطح سلول‌های Th¹ به لیگاند خود gal⁹ (galectin⁹) باند می‌شود. سلول‌های Th¹، IFN γ ، (Interferon gamma) تولید می‌کنند و باعث افزایش بیان galactin⁹ در سطح سلول‌های APC (Antigen presenting cell) می‌شوند که در پی آن، مرگ سلولی در سلول‌های Th¹ Tim³⁺ ایجاد می‌شود (۶، ۷). علاوه بر gal⁹، لیگاند دیگری که به تازگی در تعامل با Tim³ تعریف شده است، فسفاتیدیل سرین می‌باشد. Tim³ به عنوان گیرنده‌ی سلولی در سلول‌های APC بیان کننده‌ی Tim³ به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح بیرونی غشای پلاسمایی سلول‌های آپوپتوتیک باند می‌شود. سپس سلول‌های آپوپتوتیک به یک فاگوزوم اسیدی منتقل می‌شوند و آنتی‌ژن‌های آن‌ها پس از پردازش، به سلول‌های T ارایه می‌گردد؛ از این رو، تسهیل فاگوسیت شدن سلول‌های آپوپتوتیک را خواهیم داشت (۷، ۸). عدم تعادل در پاسخ ایمنی، علت بسیاری از بیماری‌ها با مرگ و میر بالا به خصوص بیماری‌های خودایمنی است. از طرفی، پاسخ ایمنی مانع عمده‌ای در برابر پیوند موفق اعضا می‌باشد (۸، ۹). در بیماری‌های خودایمنی، بیماری‌های اتوپیک، عفونت‌های مزمن و سرطان، پاسخ‌های ایمنی نادرست و نامتعادل مشاهده شده است (۹).

بسیاری از تحقیقات بر وجود ارتباط میان پلی‌مورفیسم‌های متعدد در ژن کد کننده‌ی Tim³ با ابتلا به بیماری‌های با واسطه‌ی ایمنی تأکید دارند (۲).

روش‌ها

پلاسمید PEZ-M⁶⁷ حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و هیگرومایسین، پروموتور CMV (Cytomegalovirus) ORF و (Open reading frame) ژن Tim³ و موج پلی A (Polyadenylation signal یا PAS) SV⁴⁰ (Simian vacuolating virus⁴⁰) ساخت شرکت Genecopoeia (USA) خریداری شد.



شکل ۱. نقشه‌ی ژنی پلاسمید PEZ-M⁶⁷ حاوی cDNA Tim³

ترانسفورماسیون و تمایز کلون‌های باکتری دارای

پلاسمید PEZ-M⁶⁷

باکتری‌های-Dam (GM²¹⁶³) در محیط LB (Lysogeny broth) حاوی ۱۰۰ μg/ml آمپی‌سیلین رشد داده شد. سپس با روش CaCl₂ و شوک حرارتی بر اساس پروتکل مندل و هیگا (Mandel and Higa) مستعد پذیرفتن پلاسمید نو ترکیب شد و پلاسمید PEZ-M⁶⁷ در آن ترانسفورم شد. کلون‌های رشد کرده، توسط واکنش PCR Colony PCR (Colony polymerase chain reaction) بررسی شد.

برای مثال، در مطالعات Kuchroo و همکاران در مدل‌های موشی EAE، Tim³ یک تنظیم کننده‌ی منفی پاسخ سلول‌های Th₁ محسوب می‌شود؛ به طوری که بلوک Tim³-Tim³L موجب تنظیم منفی IFN γ تولید شده توسط سلول‌های T و تشدید بیماری‌های خودایمنی می‌گردد (۱۵-۱۰، ۲-۱).

نقش تعامل Tim³-Tim³L در القای تحمل نیز به اثبات رسیده است؛ با توجه به داده‌های به دست آمده، با تجویز مهار کننده‌های Tim³، از عملکرد این پروتئین مهارتی جلوگیری می‌شود و پاسخ‌های ایمنی در پیوند عضو و به دنبال آن، خطر پس زدن عضو پیوندی افزایش می‌یابد (۸، ۵). همچنین حضور Tim³ در سلول‌های CD⁸⁺ خسته در بیماری‌های مزمن ایمنی مثل عفونت ویروسی و سرطان، نقش مهم این پروتئین را در سیستم ایمنی مشخص می‌سازد (۲۱-۱۶). به علاوه، در تحقیقات گوناگون این نتیجه حاصل شده است که در مدل‌های موشی آسم و بیماری‌های اتوپیک، اختلال عملکرد مولکول‌های Tim³ فنوتیپ بیماری را تغییر می‌دهد و موجب بهبودی علائم بیماری می‌گردد (۲۲، ۱۱).

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که این پروتئین می‌تواند یک هدف مهم برای درمان بالقوه‌ی پاسخ‌های ایمنی باشد. برای شناخت بیشتر این پروتئین و ساخت آنتی‌بادی برای استفاده در تحقیقات، مقادیر زیاد Tim³ لازم است. بنابراین در پژوهش حاضر، بیان Tim³ در سطح سلول ۲۹۳T افزایش یافت و از سلول نمایش دهنده‌ی این پروتئین می‌توان در فرایندهای ایمنی‌سازی استفاده نمود. هدف از این تحقیق، تهیه‌ی رده‌ی سلولی ۲۹۳T با بیان پایدار پروتئین Tim³ در سطح خود بود.

واکنش Colony PCR توسط پرایمرهای طراحی شده‌ی زیر و مطابق با برنامه‌ی زمانی ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

واکنش Colony PCR توسط پرایمرهای طراحی شده‌ی زیر و مطابق با برنامه‌ی زمانی ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

AAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCC

۶۷:Primer forward PEZ-M

ACTCGAGCTATGGCATTGCAAAGCG

۶۷:Primer reverse PEZ-M

استخراج پلاسمید با دستورالعمل کیت استخراج پلاسمید Sol Gent Co kit (Korea) انجام گرفت و میزان خلوص و غلظت پلاسمید با دستگاه Nanodrop بررسی شد.

کلونینگ cDNA Tim³ در پلاسمید pHygro

پلاسمید pHH، پلاسمیدی مشتق شده از PBGGT می‌باشد که کاست بیانی هیگرومایسین و ژن بتاگلوبین در آن کلون شده است. این پلاسمید به باکتری E. coli (Top10 F') ترانسفورم شد و استخراج پلاسمید انجام گرفت. هضم پلاسمید pHH توسط آنزیم‌های XhoI و SacI انجام شد. سپس محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز الکتروفورز شد و باند مربوط به Backbone به طول ۴۶۰۰ bp از روی ژل بریده و توسط کیت شرکت Bioneer تخلیص شد. سپس Backbone پلاسمید با آنزیم pfu (Plaque-forming unit) و dNTP (Deoxynucleotide triphosphates) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ °C انکوبه شد تا ۵'Overhang حاصل از هضم آنزیمی، Blunt گردد. حاصل واکنش تهدید شده با pfu با کیت Clean up تمیز گردید. به منظور Self-ligation پلاسمید پیش گفته، ۷ μl

آمده در این مرحله پلاسمید (pH) pHygro بود. به منظور تکثیر قطعه‌ی Tim³ موجود در پلاسمید PEZ-M۶۷، طراحی آغازگرهای Forward و Reverse با توجه به نکات استاندارد در طراحی پرایمر از جمله طول پرایمر، دمای اتصال، عدم تشکیل دایمر و لوپ یا حلقه و سایر موارد با استفاده از نرم‌افزار Gene runner نسخه‌ی ۳/۰۵ انجام گرفت. همچنین برای سهولت در مراحل کلونینگ دو جایگاه برش آنزیم محدود کننده‌ی MluI و NheI که در پلاسمید pH نیز موجود است، در دو پرایمر در نظر گرفته شد. توالی پرایمرهای طراحی شده به صورت زیر بود:

AAAGCTAGCTGCCACCTGACGTCTA

AGA^۳: Forward Tim

ATTACGCGTTAAGATAATTGATGA

GTTTGGAC^۳: Reverses Tim

قطعه‌ی مورد نظر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آنزیم pfu تکثیر شد. به منظور خروج ژن از پلاسمید نوترکیب و داخل نمودن آن به پلاسمید pH با جهت‌گیری صحیح، قطعه‌ی تکثیر شده و پلاسمید pH، توسط آنزیم‌های MluI و NheI در دو مرحله‌ی جداگانه با بافرهای مربوط، جهت هضم آنزیمی گذاشته شد. واکنش هضم در حجم ۲۰۰ μl و به قرار زیر بود:

میزان ۸۰ μl پلاسمید یا محصول PCR تمیز شده با کیت استخراج از ژل Bioneer (Korea)، ۲۰ μl بافر اختصاصی آنزیم، ۱۰۰ μl آب دو بار تقطیر و

انستیتو پاستور تهران خریداری شد و در فلاسک T25 در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) و ۱ درصد پنی سیلین - استرپتومایسین در ۳۷ °C و در انکوباتور با CO₂ ۵ درصد انکوبه شد. حدود ۱۰^۶ × ۵ سلول ۲۹۳T در پلیت ۶ خانه کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت با پلاسمید خطی ترانسفکت گشت. میزان ۲۱ μg پلاسمید خطی، ۳۰۴ μl ddH₂O و ۱۱ μl از بافر TE (Tris-EDTA)، ۳۵ μl از محلول کلسیم فسفات به محلول DNA اضافه شد و سپس ۳۵۰ μl HBS2X به آرامی و تحت ورتکس با حداکثر سرعت به محلول DNA افزوده گشت و روی کشت سلولی به صورت قطره قطره ریخته شد. بعد از ۴۸ ساعت، سلول‌ها به مدت ۴ هفته تحت تیمار با ۱۵۰ μg/ml هیگرومایسین قرار گرفتند.

بررسی بیان Tim³ توسط سلول‌های ۲۹۳T

ترانسفکت شده با پلاسمید نو ترکیب

DNA ژنومیک از یک میلیون سلول ۲۹۳T که تحت درمان با هیگرومایسین باقی مانده بودند، توسط کیت مربوط (Genet bio, USA) استخراج شد و به منظور ارزیابی الحاق Tim³ در DNA ژنومیک، توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر گشت. برنامه‌ی PCR شامل ۹۷ °C به مدت ۳ دقیقه، ۹۷ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C در ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C در ۷۲ ثانیه و در نهایت ۷۲ °C طی ۱۰ دقیقه در ۳۰ سیکل انجام گرفت. درصد سلول‌هایی که پس از انجام ترانسفکشن موفق به دریافت Tim³ cDNA شده بودند، توسط تکنیک فلوسایتومتری و با استفاده از آنتی‌بادی Anti Tim³ کونژوگه شده با PE

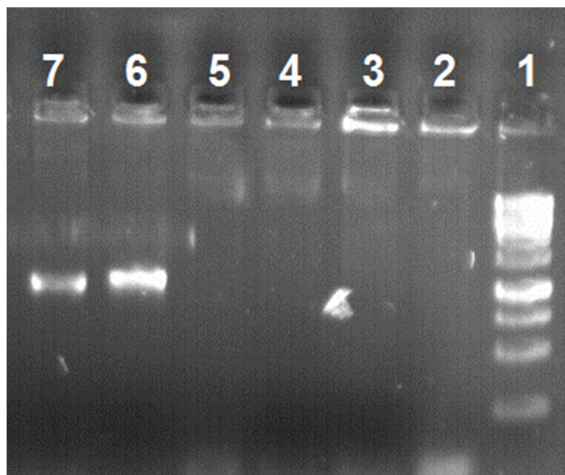
۵ μl آنزیم NheI و MluI مخلوط و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. سپس محصول هضم آنزیمی از روی ژل ۱ درصد آگارز بریده شد و قطعه‌ی مورد نظر از ژل استخراج گردید. واکنش Ligation بین پلاسمید خطی و محصول هضم PCR با استفاده از آنزیم T⁴ DNA ligase و با استفاده از ۱۵ μl قطعه‌ی Tim³ تکثیر و هضم شده و ۴ μl پلاسمید p-H خطی شده، ۳ μl بافر DNA (Polyethylene glycol) PEG ۳ μl و ۱۰x T⁴ ligase و ۴ μl آب استریل انجام شد و محصول Ligation با روش CaCl₂ به باکتری TOP10 Ecoli ترانسفورم شد.

صحت کلونینگ به روش PCR Colony، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن Tim³ بررسی شد. غلظت عوامل PCR شامل ۱ μl PR، ۱ μl PF، ۱ μl MgCl₂، ۰/۵ μl dNTP (Nucleoside triphosphate)، ۰/۲ μl taq و ۲/۵ μl Buffer بود که تحت برنامه‌ی PCR شامل ۹۵ °C به مدت ۴ دقیقه، ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۷۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه در ۳۰ سیکل انجام گرفت. بررسی محصول نهایی PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز، رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده‌ی آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV (Ultraviolet) و نشانگر ۱ kb انجام شد. در نهایت، پلاسمید با آنزیم NheI هضم گردید و پلاسمید pH-Tim³ Tim³ خطی از ژل آگارز استخراج گردید.

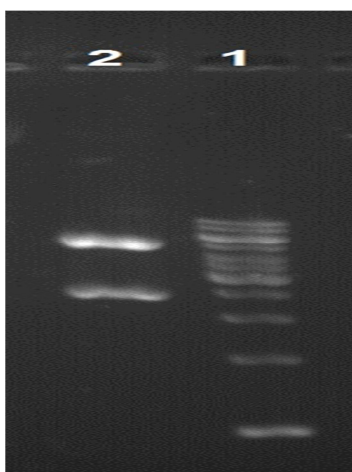
کشت و ترانسفکشن پلاسمید نو ترکیب pH-Tim³

به رده‌ی سلولی T293

سلول‌های ۲۹۳T (رده‌ی سلولی کلیه‌ی جنین انسان ترانسفورم شده با T آنتی‌ژن ویروس SV۴۰) از



شکل ۲. تأیید صحت مراحل کلون کردن cDNA Tim³ در پلاسمید pHH بر اساس نتایج واکنش Colony PCR
ستون ۱: نشانگر ۱ Kb. ستون‌های ۲، ۳، ۴ و ۵: کلونی‌هایی که منفی بودند. ستون‌های ۶ و ۷: کلونی‌های مثبت که باند ۱۱۰۰ مربوط به cDNA Tim³ را داشتند.



شکل ۳. الگوی الکتروفورزی هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب p-۳ H-Tim
ستون ۱: نشانگر ۱ Kb
ستون ۲: پلاسمید نوترکیب pH-Tim³ که با آنزیم‌های NheI و MluI هضم شده است و باند ۲۳۱۲ bp و ۴۶۰۰ bp دیده می‌شود.

انتخاب سلول‌ها در محیط حاوی هیگرومایسین

تصویر سلول‌های ترانسفکت شده در زمان شروع و بعد از دو هفته تیمار با هیگرومایسین در شکل ۴ آمده است.

(Phycoerythrin) (Biolegend ۳۴۰۰۵) و ایزوتایپ (Biolegend ۴۰۰۱۱۱) سنجش شد.

به طور خلاصه، حدود ۱۰^۶ سلول با مقدار ۵ μl از Anti Tim³ آنتی‌بادی کونژوگه شده و آنتی‌بادی ایزوتایپ مناسب به مدت ۲۰ دقیقه در ۲ تیوپ مجزا، در اتاق تاریک انکوبه شد. نمونه‌ها پس از شستشو با PBS، از طریق دستگاه فلوسایتومتری (Facs Calibur, USA) آنالیز شدند.

یافته‌ها

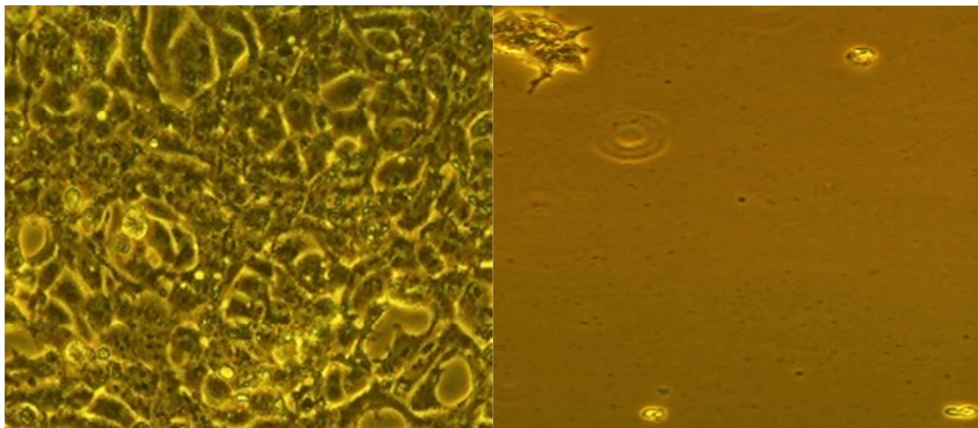
پلاسمید حاوی ژن Tim³ تهیه شده (PEZ-M۶۷)، تنها با آنزیم Eco³¹I خطی می‌شد و این آنزیم فعالیت مناسبی نداشت. بنابراین ژن Tim³ تکثیر شد و از پلاسمید PEZ-M۶۷ به پلاسمید دیگری به نام pH منتقل گردید که حاوی سایت‌های آنزیمی بیشتر و در دسترس‌تر بود.

ترانسفورمسیون محصول Ligation بین کاست

Tim³ و پلاسمید pH خطی شده

در این مرحله، ۱۰ کلونی از کلونی‌های رشد یافته برای تهیه ماتریکس انتخاب شدند که از بین آن‌ها، کلونی‌هایی گزینش شدند. استخراج پلاسمید و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در مورد این کلونی‌ها انجام گرفت. نمونه‌ای از محصول Colony PCR در شکل ۲ آمده است.

هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده از این کلونی‌ها توسط آنزیم‌های MluI و NheI انجام گرفت که ۲ باند حاصل از برش آنزیم در سایت‌های آنزیمی کلونی‌های دریافت کننده‌ی پلاسمید نوترکیب مشاهده شد و وجود پلاسمید نوترکیب در کلونی‌های باکتری تأیید گردید (شکل ۳).



شکل ۴. سلول‌های HEK ۲۹۳T

A: قبل از درمان با هیگرومایسین B: دو هفته پس از درمان با هیگرومایسین

نتایج فلوسایتمتری

نتایج فلوسایتمتری، میزان بیان ۸۸ درصدی Tim³ در سطح سلول‌های ترانسفکت شده در ۱۴ روز بعد از ترانسفکشن سلول‌ها را آشکار می‌کند.

نتایج حاصل افزایش محسوسی را در سطح بیانی در سلول‌های ۲۹۳T ترانسفکت شده با وکتور پلاسمیدی در مقایسه با سطح بیانی پایه‌ی Tim³ در گروه شاهد در سلول‌های ۲۹۳T نشان می‌دهد که مؤید بیان معنی‌دار Tim³ در گروه ترانسفکت شده است ($P \leq 0.05$).

موارد در جداول ۶ و ۷ قابل مشاهده است.

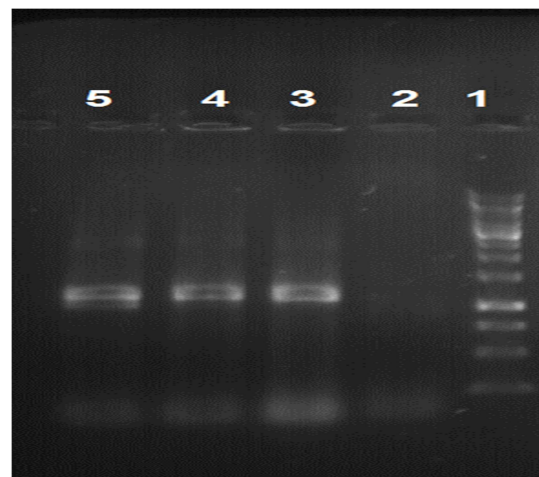
بحث

همزمان با کشف پروتئین‌های جدید، تحقیقات وسیعی در زمینه‌ی شناسایی عملکرد پروتئین شروع شد و در همه‌ی این تحقیقات، به پروتئین خالص به مقدار زیاد برای بررسی ساختار، فعالیت بیوشیمیایی و خصوصیات بیوفیزیکی آن نیاز است.

Tim³ گلیکوپروتئین سطح سلولی است و برای داشتن پروتئین با عملکرد و خصوصیات بیوشیمیایی

نتیجه‌ی PCR روی ژنوم سلول ترانسفکت شده

انجام واکنش PCR روی ژنوم سلول ترانسفکت شده، باند مربوط به قطعه‌ی cDNA Tim³ به طول ۱۱۰۰ جفت باز را نشان داد (شکل ۵) که حاکی از دریافت و ایتنگره شدن ژن درون سلول ۲۹۳T می‌باشد.



شکل ۵. الگوی الکتروفورزی محصول PCR

(Polymerase chain reaction) روی ژنوم سلول ترانسفکت

شده‌ی حاوی قطعه‌ی ژن Tim³ و نمونه‌ی شاهد

ستون ۱: نشانگر ۱ Kb

ستون ۲: شاهد منفی روی ژنوم ۲۹۳T ترانسفکت نشده

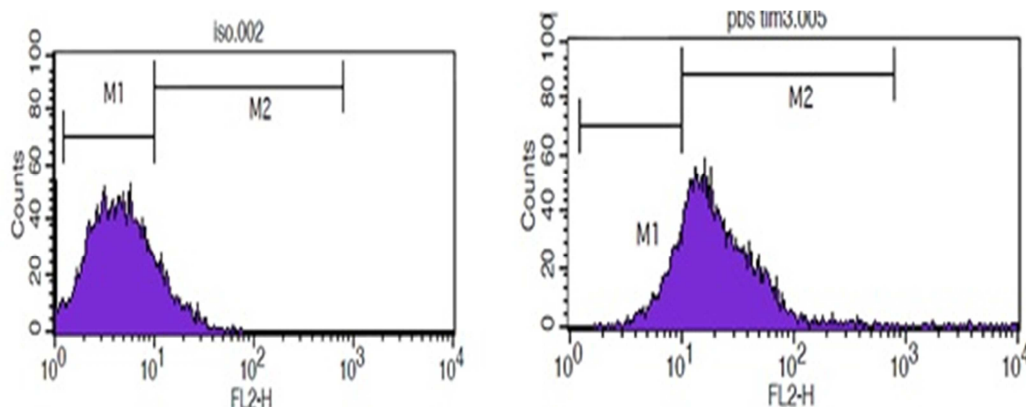
ستون‌های ۳ تا ۵: تکثیر cDNA Tim³ روی ژنوم سلول ۲۹۳T

ترانسفکت با cDNA Tim³

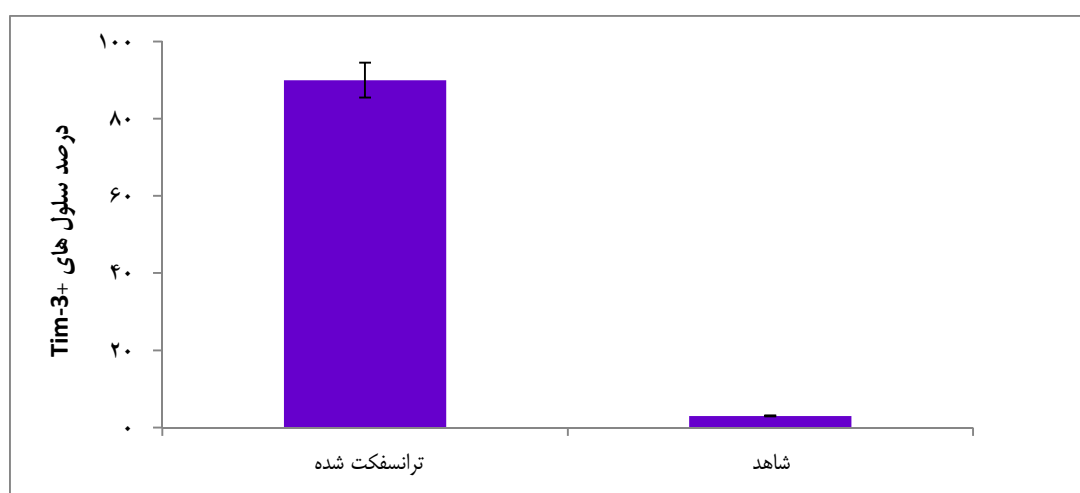
CHO امری اجتناب ناپذیر است.

در بعضی از تحقیقات، پروتئین با ساختار فضایی به طور کامل طبیعی نیاز است. برای مثال، در مورد پروتئین‌های غشایی مانند Tim³، پروتئین خالص شده از غشا یا پروتئین نوترکیب خالص نیز گاهی ساختار فضایی طبیعی را که پروتئین در موقع لنگر انداختن بر سطح غشا دارد، از دست می‌دهد و برای استفاده در برخی تحقیقات بررسی عملکرد یا حتی برای تهیه آنتی‌بادی‌هایی که اپی‌توپ‌های فضایی را می‌شناسند، مناسب نخواهد بود.

و ساختار فضایی مناسب، باید در سیستم‌های بیانی رده‌ی سلولی پستانداران بیان و تخلیص شود. با این که بیان در سیستم‌های بیانی پروکاریوت‌ها از نظر زمان و هزینه، اقتصادی‌تر از سیستم‌های سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد، اما متأسفانه در مورد پروتئین‌های دارای تغییرات پس از ترجمه مانند فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون، این سیستم بیانی جوابگو نیست؛ چرا که این تغییرات، در ساختار فضایی، عملکرد و خصوصیات آنتی‌ژنیک این پروتئین‌ها تأثیر دارد. از این رو، استفاده از سلول‌های رده‌ی پستانداران مانند



شکل ۶. نمودار فلوسایتمتری بیان پروتئین Tim³ در سلول‌های ترانسفکت شده و سلول‌های ۲۹۳T ترانسفکت نشده



شکل ۷. میزان نسبی بیان Tim³ برگرفته از آزمایش‌های متعدد فلوسایتمتری

در مطالعات انجام گرفته، محققان که در جستجوی کلونی‌های سلولی وابسته به Th¹ بودند، Tim³ در سطح سلول‌های Th¹ به عنوان نشانگر ویژه‌ی سطح سلولی شناخته شد (۲۴-۲۳).

در تحقیقی مشابه که توسط Chen و همکاران به منظور بررسی عملکرد پروتئین Tim³ نوترکیب در سلول‌های آپوتوتیک انجام گرفت، از وکتور بیانی پروکاریوتیک pET^{28a}-TIM³-EGFP استفاده شد. در این مطالعه، با جمع‌آوری RNA ژن Tim³ از نمونه‌ی خون محیطی انسان، کتابخانه‌ی cDNA ساخته شد و با ادغام قطعه‌ی TIM³-EGFP در پلاسمید، کلونینگ در سویه‌ی E. coli B²¹ انجام شد و به منظور بررسی عملکرد Tim³ در روند آپوتوز، از این فیوژن پروتئین استفاده شد (۲۵).

با توجه به نیاز پروتئین GFP (Green fluorescent protein) به عنوان یک سیستم نظارت، به استفاده از میکروسکوپ فلوروسنس و همچنین حساسیت پایین آن در تشخیص سلول‌های مجزا و محدودیت کاربرد در مطالعات *In vivo* و همچنین استفاده از برچسب His⁶ (Hexahistidine)، ممکن است در بیان پروتئین اختلال ایجاد کند.

در پژوهش حاضر، پروتئین غشایی تولید شد که بی‌نیاز از فرایندهای خالص‌سازی و پروتئین‌هایی نظیر GFP می‌باشد. در مطالعات قبلی، فرم ترشحی این پروتئین تولید شده بود. با وجود این پروتئین‌های غشایی درصد بالایی از پروتئین‌های سلول را شامل می‌شوند و تولید انبوه این پروتئین‌ها حایز اهمیت است. بنابراین تولید فرم غشایی به میزان انبوه، می‌تواند گام مهمی در تحقیقات مربوط باشد. استفاده از سلول ۲۹۳T به

از مزیت‌های استفاده از این سلول، داشتن ساختار فضایی طبیعی تر و وجود اپی‌توپ‌های فضایی است که ممکن است در پروتئین نوترکیب یا خالص شده از غشای سلول وجود نداشته باشد.

با توجه به عدم نیاز پروتئین‌های نمایش داده شده در سطح سلول به فرایندهای تخلیصی، بسیار مقرون به صرفه‌تر از پروتئین نوترکیب می‌باشند. آنتی‌بادی‌ها یا نانوبادی تولیدی حاصل از تزریق این پروتئین‌ها به حیوانات آزمایشگاهی، می‌تواند به منظور درمان و تشخیص بیماری‌ها به کار گرفته شود.

در مورد تحقیقات تهیه‌ی آپتامر بر ضد آنتی‌ژن‌های پروتئینی نیز اگر از روش ستون‌های کروماتوگرافی که آنتی‌ژن بر روی آن کونژوگه می‌شود، استفاده گردد، خرید ستون‌های گران قیمت و مقادیر بالای پروتئین نوترکیب لازم است. در روش Cell SELEX به جای استفاده از ستون کروماتوگرافی، از سلول‌هایی که آنتی‌ژن را بر سطح خود نمایش می‌دهند استفاده می‌گردد و با این کار، پروژه‌ی انتخاب آپتامر بسیار ارزان‌تر و در آزمایشگاه‌هایی که از نظر تجهيزات پیشرفته مانده HPLC (High-performance liquid chromatography) محروم هستند، قابل انجام می‌باشد.

این تحقیق، با هدف تهیه‌ی نانوبادی و انتخاب آپتامر علیه پروتئین Tim³ انجام شد. از این رو، سلول با بیان بالای Tim³ در سطح آن نیاز بود. ساخت آپتامر با استفاده از این پروتئین بیان شده، امکان عوارض ناخواسته‌ی دارویی ناشی از واکنش‌های ایمنی را کاهش می‌دهد.

لوکوس ژنی مولکول‌های Tim³ اولین بار در موش‌های Balb/c مستعد ابتلا به آسم آشکار گشت.

مورد نظر میسر گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مونا مبلغ ناصری به شماره‌ی ۳۹۲۵۳۲ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

دلیل سهولت انجام ترانسفکشن و رشد سریع، انتخاب مناسبی است. از این رو، در این مطالعه سازه‌ای طراحی شده است تا بتوان پروتئین Tim³ را در سلول یوکاریوتی کلون کرد و در نتیجه‌ی ادغام سازه‌ی بیانی انتقال یافته در DNA ژنومی سلول‌های هدف ۲۹۳T، بیان طولانی مدت از ژن

References

- Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med* 2005; 11(8): 362-9.
- Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(6): 665-9.
- Kuchroo VK, Dardalhon V, Xiao S, Anderson AC. New roles for TIM family members in immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(8): 577-80.
- Li S, Peng D, He Y, Zhang H, Sun H, Shan S, et al. Expression of TIM-3 on CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis. *APMIS* 2014; 122(10): 899-904.
- Yeung MY, McGrath M, Najafian N. The emerging role of the TIM molecules in transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11(10): 2012-9.
- Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S, Kontani K, Nobumoto A, Tateno H, et al. Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J Immunol* 2008; 181(11): 7660-9.
- Yan J, Zhang Y, Zhang JP, Liang J, Li L, Zheng L. Tim-3 expression defines regulatory T cells in human tumors. *PLoS One* 2013; 8(3): e58006.
- Rodriguez-Manzanet R, DeKruyff R, Kuchroo VK, Umetsu DT. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 259-70.
- Lee J, Phong B, Egloff AM, Kane LP. TIM polymorphisms--genetics and function. *Genes Immun* 2011; 12(8): 595-604.
- Su EW, Lin JY, Kane LP. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. *Cytokine* 2008; 44(1): 9-13.
- Vega-Carrascal I, Reeves EP, McElvaney NG. The role of TIM-containing molecules in airway disease and their potential as therapeutic targets. *J Inflamm Res* 2012; 5: 77-87.
- Chae SC, Park YR, Shim SC, Yoon KS, Chung HT. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 2004; 95(1): 91-5.
- Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(6): 454-62.
- Pan HF, Zhang N, Li WX, Tao JH, Ye DQ. TIM-3 as a new therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 2010; 37(1): 395-8.
- Li X, Zhao YQ, Li CW, Yuan FL. T cell immunoglobulin-3 as a new therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16(12): 1145-9.
- Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2010; 235(1): 172-89.
- McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahan BJ, Kemper M, Allen TM, et al. Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* 2010; 120(12): 4546-57.
- Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends Immunol* 2011; 32(8): 345-9.
- Ngiow SF, von SB, Akiba H, Yagita H, Teng MW, Smyth MJ. Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN-gamma-mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *Cancer Res* 2011; 71(10): 3540-51.
- Block MS, Markovic SN. The tumor/immune interface: clinical evidence of cancer immunosurveillance, immunoediting and immunosubversion. *Am J Immunol* 2009; 5(1): 29-49.
- Zhuang X, Zhang X, Xia X, Zhang C, Liang X,

- Gao L, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC. *Am J Clin Pathol* 2012; 137(6): 978-85.
22. Chae SC, Park YR, Lee YC, Lee JH, Chung HT. The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population. *Hum Immunol* 2004; 65(12): 1427-31.
23. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002; 415(6871): 536-41.
24. McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2001; 2(12): 1109-16.
25. Chen Z, Qing J, Qin G, Hu L. Construction and characterization of bifunctional TIM-3-EGFP fusion proteins. *Protein Expr Purif* 2012; 86(1): 1-6.

Producing Recombinant HEK293 T-cells with High Expression of T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain-3 (Tim3) Protein

Mona Moballeggh-Naseri¹, Hosein Khanahmad PhD², Vida Homayouni MSc³,
Mazdak Ganjalikahni-Hakemi PhD⁴, Mansour Salehi PhD², Inaz Rahim-Manesh¹,
Razieh Taghizadeh¹, Mahsa Kolahdooz¹

Original Article

Abstract

Background: T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 (Tim3) is known as a marker of cell surface of T-helper-1 (Th1) cell and has a key role in many diseases with cell-mediated immunity. Over expression of Tim3 has reported in autoimmune and atopic diseases. Though, many studies done about this inhibitory help protein molecules, but yet need more research. In research project on Tim3, native protein with proper post translation modification should be provided. In this study, Tim3 was expressed on the surface of HEK293 T-cell line.

Methods: Tim3 expression cassette was amplified from cDNA clone EX-W2682-M67 via polymerase chain reaction (PCR). The PCR product and pHygro plasmid were digested by NheI and MluI restriction enzymes. The linearized pHygro and digested PCR product were ligated together with T4 DNA ligase and transformed into Escherichia coli TOP 10 F'. The resulted pH-Tim3 plasmid was linearized with NheI and transfected into 293T cell line. The transfected cells were positive selected with hygromycin and their genomic DNA was extracted and PCR was done on them to amplify complementary DNA (cDNA) of Tim3. Also, protein expression levels were assessed via flow cytometry.

Findings: The result of PCR on selected cells confirmed integration of cDNA clone of Tim3 in genomic DNA. Based on flow cytometry, about 88% of cells were expressed Tim3 sharply.

Conclusion: In order to understand the role and mechanism of Tim3 protein, we need a large amount of purified native Tim3. Prokaryotic expression systems are simpler and cheaper than eukaryotic expression system, but they are not proper system for expression of proteins that modified after translation. Expression of membrane proteins like Tim3 on the surface of cell has even more native conformation in comparison with recombinant Tim3. The cells display Tim3 could be used in antibody, nanobody or aptamer production projects. In this project, we constructed a 293T cell which overexpressed Tim3 on its surface compared to untransfected ones.

Keywords: T-cell immunoglobulin and mucin domain (Tim3), 293T, Recombinant cell

Citation: Moballeggh-Naseri M, Khanahmad H, Homayouni V, Ganjalikahni-Hakemi M, Salehi M, Rahim-Manesh I, et al. **Producing Recombinant HEK293 T-cells with High Expression of T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain-3 (Tim3) Protein.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(317): 2312-23

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- PhD Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Hosein Khanahmad PhD, Email: hossein_khanahmad@yahoo.com

بررسی بیان ژن ESR1 در نمونه‌های بلوک پارافینه‌ی زنان مبتلا به سرطان پستان

مریم قنبریان علویجه^۱، دکتر الهام مسلمی^۲، امیر ایزدی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان پستان شایع‌ترین تومور بدخیم و سرطان منجر به مرگ در زنان می‌باشد. برخی نشانگرهای زیستی به عنوان عوامل تخمین پاسخ‌دهی به درمان کاربرد دارند. مثال واضح و رایج در این مورد، گیرنده‌ی استروژن است و ارتباط معنی‌داری بین حضور گیرنده (+ER یا Estrogen receptor) با احتمال ابتلا به سرطان پستان وجود دارد. هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری بیان گیرنده‌ی استروژن α در زنان مبتلا به سرطان پستان بود.

روش‌ها: در این مطالعه، تعداد ۲۰ نمونه‌ی بافت پارافینه از افراد مبتلا به سرطان و ۱۰ نمونه‌ی سالم جمع‌آوری شد. پس از پارافین‌زدایی، استخراج RNA با محلول RNX Plus انجام گردید. cDNA (complementary DNA) با روش رونویسی معکوس به وسیله‌ی آنزیم M-MuLV (Moloney murine leukemia virus) سنتز شد. بیان ژن با روش Real time PCR (Real-time polymerase chain reaction) نسبی سنجیده شد و ژن گلیسر آلدئید فسفات دهیدروژناز (GAPDH یا Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) نیز به عنوان شاهد داخلی استفاده گردید.

یافته‌ها: با مقایسه‌ی بیان ژن گیرنده‌ی استروژن α در بافت‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم، افزایش بیان در تمام نمونه‌های سرطانی بیشتر دیده شد. نتایج نشان داد که با افزایش مرحله‌ی بیماری، میزان بیان گیرنده‌ی استروژن α افزایش می‌یابد ($P < 0/0001$).

نتیجه‌گیری: میزان بیان ژن گیرنده‌ی استروژن α در نمونه‌های سرطانی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. بنابراین، اندازه‌گیری بیان این ژن، می‌تواند به عنوان عامل مؤثر در تشخیص و پی‌گیری پاسخ‌دهی به درمان به کار رود.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، گیرنده‌ی استروژن α ، Real-time polymerase chain reaction

ارجاع: قنبریان علویجه مریم، مسلمی الهام، ایزدی امیر. بررسی بیان ژن ESR1 در نمونه‌های بلوک پارافینه‌ی زنان مبتلا به سرطان

پستان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۷): ۲۳۳۲-۲۳۲۴

مقدمه

سرطان پستان پس از سرطان ریه، دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان و پس از سرطان غیر ملانومی پوست، شایع‌ترین سرطان در زنان است. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی، هر سال بیش از ۱/۲ میلیون بیمار مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده

می‌شوند و بیش از ۵۰۰ هزار نفر در اثر این بیماری فوت می‌کنند (۱).

در ایران نیز سرطان پستان عامل ۲۱/۴ درصد از کل بدخیمی‌ها و شایع‌ترین سرطان در زنان است (۲). زنان ایرانی در مقایسه با کشورهای توسعه یافته، حداقل یک دهه زودتر دچار این بیماری می‌شوند؛ که

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

این مسأله علاوه بر شیوع بالای این سرطان در ایران، بر اهمیت این بیماری می‌افزاید (۳).

سرطان پستان یک بیماری به شدت ناهمگن است که در اثر تأثیر متقابل عوامل خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و به تجمع پیش‌رونده‌ی تغییرات ژنتیک و اپی‌ژنتیک در سلول‌های سرطان پستان منجر می‌شود (۴).

ژن‌های دخیل در کنترل چرخه‌ی سلولی، مسیره‌های انتقال پیام سلولی و هورمون‌های استروئیدی با خطر ابتلا به سرطان پستان ارتباط دارند (۵-۶).

هورمون‌های تخمدانی به ویژه استروژن، نقش زیادی در ایجاد و پیشرفت سرطان پستان بازی می‌کنند. سن اولین قائدگی، سن یائسگی و سن در اولین حاملگی با دوره‌ی کامل، سه عامل خطر مرتبط با تغییرات میزان ترشح استروژن می‌باشند (۷).

طی هر دوره‌ی قائدگی، استروژن آزاد شده از تخمدان وارد گردش خون می‌شود و به بافت‌های دارای گیرنده‌ی استروژن، مانند پستان و رحم، متصل می‌شود. استروژن با اتصال به گیرنده‌ی خود وارد هسته‌ی سلول می‌شود و با تأثیر روی مرحله‌ی G1 چرخه‌ی سلولی، سلول را وادار به تقسیم می‌کند. آن جا که استروژن باعث تحریک تقسیم سلولی می‌شود، باعث افزایش شانس اشتباه حین تقسیمات متعدد DNA و افزایش امکان جهش می‌گردد (۸).

گیرنده‌ی استروژن به دو شکل α و β دیده می‌شود که نوع α (ESR1 یا Estrogen receptor1) برای رشد مجاری پستان طی دوره‌ی بلوغ ضروری است (۹-۱۰). میزان مواجهه با استروژن، عامل خطر پذیرفته شده‌ای برای ایجاد سرطان پستان ER مثبت می‌باشد. استروژن یک هورمون استروئیدی است که

از طریق فعال کردن ER- α ، اثر تکثیر کنندگی شدیدی بر روی اپیتلیوم پستان طبیعی انسان دارد. اپیتلیوم پستان طبیعی یک گیرنده‌ی هورمونی هسته‌ای معمول دارد. ER- α در ۷۰ درصد موارد سرطان پستان، بیش از حد بیان می‌شود. امروزه ER- α یکی از مؤثرترین اهداف برای درمان و پیشگیری سرطان پستان محسوب می‌شود و آنتی‌استروژن‌ها جزئی از رژیم‌های درمانی توصیه شده برای توده‌های بیان کننده‌ی ER- α هستند (۱۱-۱۲).

بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن گیرنده‌ی استروژن α (ESR1) با استفاده از روش (Real time polymerase chain reaction) Real time PCR در سرطان پستان و بررسی ارتباط آن با پیشرفت بیماری بود.

روش‌ها

برای انجام این مطالعه در سال ۱۳۹۱، ۲۰ بلوک پارافینه‌ی مربوط به افراد مبتلا به سرطان پستان و ۱۰ بلوک مربوط به افراد سالم جمع‌آوری گردید.

استخراج RNA: جهت استخراج RNA، ابتدا تعداد ۵-۶ برش ۱۰ μ از هر کدام از نمونه‌ها تهیه شد. به منظور پارافین‌زدایی پس از افزودن گزیلوز (Merck، آلمان) در 56°C انکوبه گردید. در مرحله‌ی بعد، حذف گزیلوز با افزودن اتانول مطلق سرد (Merck، آلمان) انجام شد. برای پارافین‌زدایی کامل، این مراحل دو بار تکرار گردید.

هضم بافت: برای انجام هضم بافت، ۱۰۰ μl پروتئاز بافر (سیناژن، ایران) و سپس ۲۰ μl پروتئیناز k (سیناژن، ایران) به لوله افزوده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در 56°C و ۱۵ دقیقه در 85°C انکوبه گردید.

۴/۵ μl آب بـه همـراه ۰/۵ μl M-MuLV (Moloney murine leukemia virus) (سیناژن، ایران) و ۲ μl M-MuLV buffer (سیناژن، ایران) با هم ترکیب و به مخلوط قبل اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در ۴۲ °C قرار گرفت.

طراحی پرایمر: برای انجام این مرحله، ابتدا توالی دو ژن ESR۱ و GAPDH (Glyceraldehyde ۳-phosphate dehydrogenase) (ژن شاهد داخلی) از سایت NCBI (National center for biotechnology information) به دست آمد. طراحی پرایمرها توسط نرم‌افزار Express primer انجام شد. برای اطمینان از صحت و اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده، توسط NCBI و نرم‌افزار gene Runner توالی BLAST (Basic local alignment search tool) گردید. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

انجام واکنش Real time PCR: جهت انجام واکنش ۱۰ μl از SYBR TM (۲ X) Master Mix، ۰/۵ μl پرایمر جلویی، ۰/۵ μl پرایمر عقبی، ۲ μl از cDNA سنتز شده و ۷ μl dH₂O ترکیب و در دستگاه ABI-۷۵۰۰ (آمریکا) قرار داده شد. برنامه‌ی حرارتی برای تکثیر هر دو ژن ESR۱ و GAPDH یکسان و طبق جدول ۲ بود.

استخراج RNA: برای استخراج RNA، ۵۰۰ μl RNX Plus (سیناژن، ایران) به لوله‌ی حاوی نمونه افزوده شد. در مرحله‌ی بعد، ۲۰۰ μl کلروفرم (Merck، آلمان) به لوله اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. بخش آبی به لوله‌ی جدید منتقل و برابر حجم آن، ایزوپروپانول سرد (Merck، آلمان) اضافه گردید. لوله به مدت ۱ ساعت در ۲۰ °C- انکوبه، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی تخلیه گردید. در مرحله‌ی بعد، ۱۰۰۰ μl اتانول سرد ۷۰ درصد به لوله افزوده شد و سپس به مدت ۸ دقیقه در ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی تخلیه شد و در دمای محیط قرار گرفت تا خشک شود. ۳۰ μl آب تیمار شده با (DEPC vivantis، مالزی) به لوله افزوده و در ۲۰ °C- نگهداری شد.

سنتز cDNA: برای انجام سنتز cDNA (complementary DNA) ابتدا ۱ μl Random hexamer primer (سیناژن، ایران) به همراه ۱ μl OligodT (سیناژن، ایران) و ۱ μl dNTP (Deoxynucleotide triphosphate) (سیناژن، ایران) با هم مخلوط، سپس ۱۰ μl از RNA نمونه اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ °C انکوبه گردید و سپس روی یخ قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد،

جدول ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای به کار رفته برای واکنش Real time polymerase chain reaction

نام پرایمر F (ESR۱)	توالی	طول قطعه	دمای اتصال
F (ESR۱)	CACCCAGGGAAGCTACTGTT	۸۰ bp	۶۰ °C
R (ESR۱)	ATCTCCACCATGCCCTCTAC		
F (GAPDH)	CCCACACACATGCACTTACC	۸۵ bp	۶۰ °C
R (GAPDH)	TGCCTGTCCTTCTAGCTCT		

ESR۱: Estrogen receptor

جدول ۲. برنامه‌ی حرارتی برای تکثیر دو ژن GAPDH (Glyceraldehyde ۳-phosphate dehydrogenase) و ESR1 (Estrogen receptor1)

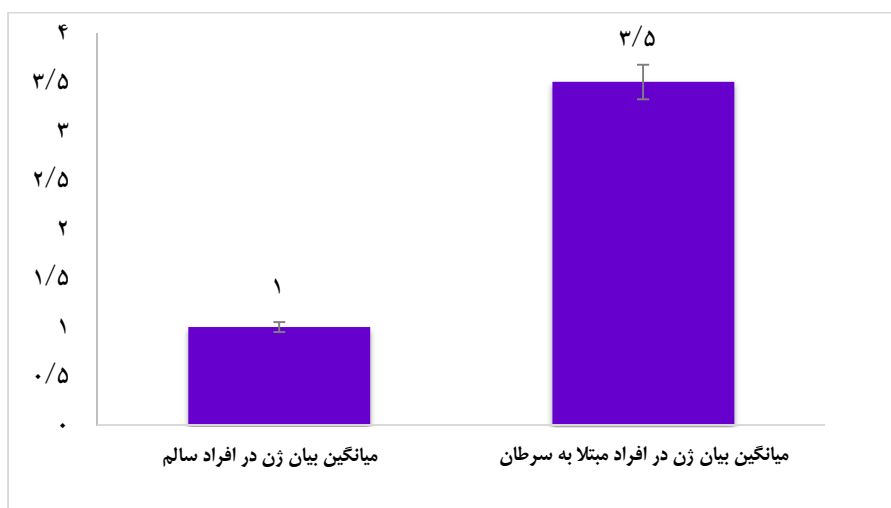
مرحله	چرخه	دما (°C)	زمان (s)
واسرشتگی اولیه	۱	۹۵	۱۰
واسرشتگی		۹۵	۵
اتصال و گسترش	۵۰	۶۰	۳۴

Grafpad prism استفاده گردید.

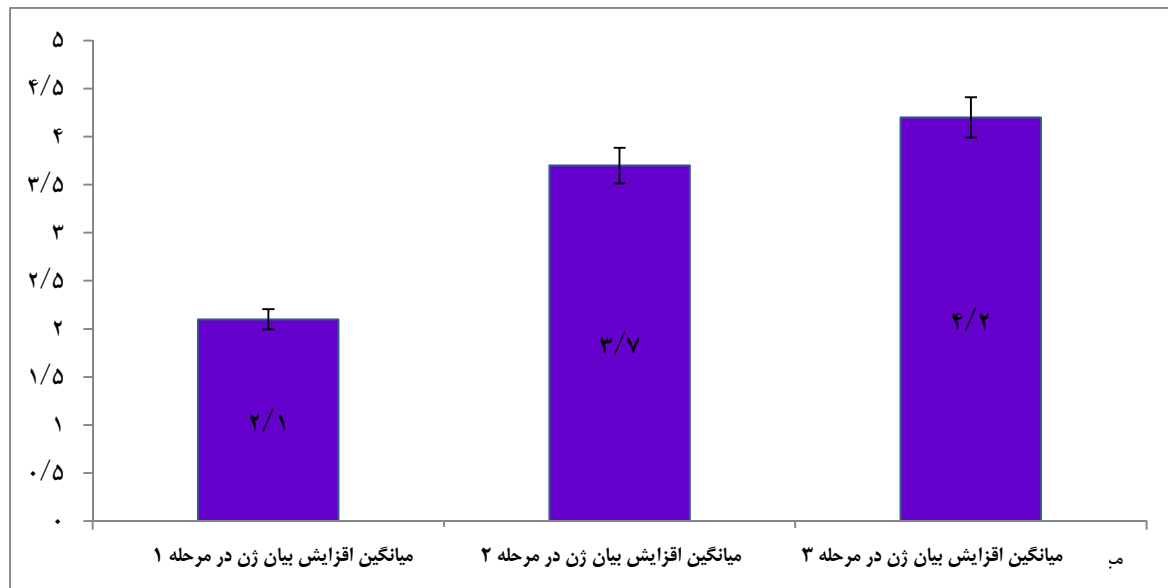
با بررسی نتایج مشخص شد که میزان بیان ژن ESR1 در افراد بیمار، به طور میانگین ۳/۵۴ برابر، نسبت به افراد طبیعی افزایش داشت ($P < ۰/۰۵۰۰$) (شکل ۱). در بررسی‌های دقیق‌تر و با تفکیک مرحله‌ی بیماری افراد، مشخص گردید که میانگین افزایش بیان ژن ESR1 در مرحله‌ی ۱ بیماری برابر با ۲/۱، در مرحله‌ی ۲ بیماری برابر با ۳/۷ و در مرحله‌ی ۳ برابر با ۴/۲ بود که این امر، نشان دهنده‌ی آن است که میزان بیان ژن ESR1 با افزایش مرحله‌ی بیماری افزایش می‌یابد (شکل ۲) و ارتباط معنی‌داری بین پیشرفت مراحل بیماری و افزایش بیان ژن مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۰۱$).

یافته‌ها

نتیجه‌ی آزمایش Real time PCR برای همه‌ی نمونه‌های شاهد داخلی و بیماران مثبت بود. به عبارت دیگر، همه‌ی نمونه‌ها بیان ژن GAPDH و افزایش بیان ژن ESR1 را نشان دادند. پس از انجام واکنش تکثیر، ct نمونه‌ها توسط دستگاه محاسبه و به RQ (Relative quantification) یا میزان بیان تبدیل شد و اندازه‌گیری میزان بیان ژن با روش $\Delta\Delta Ct$ انجام شد. میزان بیان نمونه‌های بیمار به صورت مقایسه‌ای با نمونه‌های طبیعی بیان گردید که در واقع، نتایج به دست آمده نسبت بیان ژن هدف به میزان بیان همان ژن در بافت طبیعی می‌باشد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده، از نرم‌افزار ۶



شکل ۱. نمودار مقایسه‌ی بیان ژن ESR1 (Estrogen receptor1) در افراد مبتلا به سرطان و سالم



شکل ۲. نمودار مقایسه‌ی بیان ژن ESR1 (Estrogen receptor) در افراد بیمار در مراحل مختلف بیماری در مقایسه با افراد سالم

عامل تعیین پیش‌آگهی، توانایی تخمین پاسخ‌دهی به درمان ضد سرطان را دارند. از این رو، با تغییر این عوامل، درمان‌های ضد سرطان نیز تغییر خواهند یافت (۱۶).

مثال واضح و رایج در این مورد، وضعیت گیرنده‌ی استروژن (ER) است و ارتباط معنی‌داری بین وضعیت مثبت این گیرنده (ER+) با افزایش سن بیماران مبتلا به سرطان پستان وجود دارد. به همین دلیل، پاسخ‌دهی به درمان‌های ضد استروژنی، از پایه‌های اصلی درمان ضد سرطان پستان در سنین بالا است (۱۷).

Bieche و همکاران بیان ژن‌های گیرنده‌ی استروژن α و β را در سرطان سینه‌ی تک‌گیر با کاربرد روش Real time PCR بررسی و بیان نمودند که تومورهای استروژن منفی (شامل درجات خیلی کم ژن گیرنده‌ی استروژن α)، تومورهایی با تمایز ضعیف هستند. همچنین بیان کردند که گیرنده‌ی استروژن α ، دارای فعالیت رونویسی بیشتری نسبت به گیرنده‌ی

همچنین اختلاف آماری معنی‌داری بین بیان ژن و افزایش سن بیماران مشاهده نگردید ($P > 0.0500$).

بحث

سرطان پستان شایع‌ترین تومور بدخیم و سرطان منجر به مرگ در زنان می‌باشد (۱۳). شناخت عواملی که بتوانند به طور مستقیم یا غیر مستقیم، سرنوشت نهایی بیماران را پیش‌بینی کنند، در تصمیم‌گیری بالینی و انتخاب درمان مفید است (۱۴).

سرطان پستان یک بیماری ناهمگن است. سال‌ها این اعتقاد وجود داشته است که تومورهایی که ویژگی‌های زیست‌شناختی متفاوتی دارند، نتایج بالینی و پاسخ‌های درمانی متفاوتی دارند (۱۵). در حال حاضر، پیش‌آگهی و انتخاب درمان در سرطان پستان بر اساس تعیین وضعیت گیرنده‌های هورمون رشد در تومور است (۱۱).

برخی نشانگرهای زیستی به عنوان عوامل تخمین پاسخ‌دهی به درمان کاربرد دارند؛ یعنی به عنوان یک

استروژن β در ژن‌هایی می‌باشد که در پروموتور خود عناصر پاسخ به استروژن دارند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که میزان بیان ژن گیرنده‌ی استروژن α با افزایش سن و یائسگی زیاد می‌شود. به علاوه، بیان نمودند که اندازه‌گیری میزان بیان ژن گیرنده‌ی استروژن، می‌تواند به عنوان یک روش قابل اطمینان برای کاربرد کلینیکی مطرح باشد (۱۸).

de و همکاران بیان گیرنده‌ی استروژن α و β را اندازه گرفتند. آن‌ها بیان نمودند که گیرنده‌ی استروژن β در مقابل α ، در سلول‌های سرطانی کمتر بیان می‌شود و روش Real time PCR برای کاربرد در آزمایش‌های کلینیکی، روش مناسبی است (۱۹).

Suzuki و همکاران بیان گیرنده‌ی استروژن α را در بافت‌های سرطانی انسان مورد سنجش قرار دادند. مطالعات آن‌ها پیشنهاد کرد که احتمال می‌رود گیرنده‌ی استروژن α بیان ERE را کنترل کند (۲۰).

با توجه به این که بافت پستان یکی از بافت‌های پاسخ دهنده به هورمون استروژن است و مواجهه با استروژن باعث افزایش رشد و تکثیر سلولی می‌شود، این هورمون و گیرنده‌ی آن نقش چشمگیری در سرطان پستان دارد (۲۱-۲۲). هورمون درمانی در بیماران مبتلا به تومورهای بدخیم ER+ سبب کاهش چشمگیری در مرگ و میر ناشی از سرطان پستان می‌شود (۲۳). در واقع، داروهای مثل تاموکسی‌فن (Tamoxifen) یکی از رویکردهای درمانی در تومورهای بدخیم دارای گیرنده‌ی استروژن است (۲۲، ۲۴).

در این مطالعه، میزان بیان ژن گیرنده‌ی استروژن α در زنان مبتلا به سرطان پستان با روش Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج

بیانگر افزایش بیان قابل توجه (۳/۵ برابر) ژن گیرنده‌ی استروژن α در بلوک‌های پارافینه‌ی سرطانی نسبت به غیر سرطانی بود. نتایج همچنین بیانگر افزایش بیان ژن گیرنده‌ی استروژن α همراه با پیشرفت مراحل بیماری بود ($P < 0/0001$)، که با توجه به پیش‌آگهی بهتر سرطان‌های پستان استروژن مثبت نسبت به سایر انواع سرطان‌های پستان، بیان کننده‌ی اهمیت تشخیص سریع نوع سرطان پستان از نظر بیان ژن گیرنده‌ی استروژن برای انتخاب روش درمانی مناسب جهت پیشگیری از پیشرفت بیماری است. در واقع، داروهای استفاده شده برای افراد مبتلا به سرطان پستان استروژن مثبت مانند تاموکسی‌فن با جلوگیری از اتصال استروژن به گیرنده‌اش، از رشد و تکثیر بیشتر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند و طول عمر بدون بیماری بیشتری را برای بیمار رقم می‌زنند.

اختلاف آماری معنی‌داری بین افزایش بیان ژن گیرنده‌ی استروژن α و افزایش سن بیماران مشاهده نگردید. این مسأله می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که عدم تعادل هورمونی به عوامل مختلفی وابسته است و در هر سنی احتمال به هم خوردن این تعادل و ایجاد تومور وجود دارد. در واقع، بررسی بیان ژن گیرنده‌ی استروژن در همه‌ی بیماران با هر رده‌ی سنی برای انتخاب روش درمانی مناسب اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد.

با توجه به این که افزایش بیان گیرنده‌های هورمونی به ویژه استروژن نقش چشمگیری در ایجاد سرطان پستان دارد، بنابراین سنجش میزان بیان این گیرنده‌ها با استفاده از یک روش کمی و دقیق مانند روش Real time PCR، می‌تواند نقش مؤثری در

داروهای استروژنی و ضد استروژن است. در نهایت، روش Real time PCR به علت حساس بودن و بازده بالا، می تواند به عنوان یک روش ارزشمند، جهت تشخیص کلینیکی مطرح باشد.

کاهش مرگ و میر افراد مبتلا به سرطان پستان داشته باشد.

این مطالعه برای اولین بار در ایران به بررسی میزان بیان ژن گیرنده ی استروژن α در بیماران مبتلا به سرطان پستان به روش Real Time PCR پرداخت و با توجه به نتیجه ی این مطالعه، به نظر می رسد که گیرنده ی استروژن α نقش های متفاوتی در تنظیم ژن ها و در نتیجه، سرطان پستان بازی می کند و بررسی بیان آن، کلید تشخیصی پاسخ های سلولی به

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم دکتر هما رئیسی دهکردی به خاطر همکاری صمیمانه ی ایشان قدردانی می گردد.

References

1. International Agency for Research on cancer. Cancer mondial [Online]. [cited 2006 Dec 7]; Available from: URL:http://www-dep.iarc.fr
2. Iranian Center for Prevention and Control of Disease, Center of Disease Management, Ministry of Health and Medical Education. Summary report on cancer incidence in Iran. Tehran, Iran: Ministry of Health and Medical Education: 2000.
3. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahan AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5(1): 24-7.
4. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. Oncogene 2006; 25(43): 5898-905.
5. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. Nature 2007; 447(7148): 1087-93.
6. Noori-Dalooi MR. Medical molecular genetics in the 3rd millennium. Tehran, Iran: Samer Publications; 2009.
7. Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. Breast Cancer Res 2004; 6(1): 39-52.
8. Foidart JM, Colin C, Denoo X, Desreux J, Beliard A, Fournier S, et al. Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells. Fertil Steril 1998; 69(5): 963-9.
9. Amend K, Hicks D, Ambrosone CB. Breast cancer in African-American women: differences in tumor biology from European-American women. Cancer Res 2006; 66(17): 8327-30.
10. Shyamala G, Chou YC, Cardiff RD, Vargis E. Effect of c-neu/ ErbB2 expression levels on estrogen receptor alpha-dependent proliferation in mammary epithelial cells: implications for breast cancer biology. Cancer Res 2006; 66(21): 10391-8.
11. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer: principles and practice of oncology-advances in oncology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2010.
12. Massarweh S, Schiff R. Unraveling the mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: new therapeutic opportunities. Clin Cancer Res 2007; 13(7): 1950-4.
13. Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology. New York, NY: Mosby; 2004.
14. Harris JR, Lippman ME, Osborne CK, Morrow M. Diseases of the breast. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2011.
15. Noori-Dalooi MR, Tabarestani S. Molecular genetics, diagnosis and treatment of breast cancer: review article. J Sabzevar Univ Med Sci 2000; 17(2): 74-87. [In Persian].
16. Balducci L. Management of cancer in the elderly. Oncology (Williston Park) 2006; 20(2): 135-43.
17. Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2008; 66(1): 65-74.
18. Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. Oncogene 2001; 20(56): 8109-15.
19. de Cremoux P, Tran-Perennou C, Elie C, Boudou E, Barbaroux C, Poupon MF, et al.

- Quantitation of estradiol receptors alpha and beta and progesterone receptors in human breast tumors by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Correlation with protein assays. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(3): 507-15.
20. Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, et al. Estrogen-related receptor alpha in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Res* 2004; 64(13): 4670-6.
21. Lopez-Tarruella S, Schiff R. The dynamics of estrogen receptor status in breast cancer: re-shaping the paradigm. *Clin Cancer Res* 2007; 13(23): 6921-5.
22. Ariazi EA, Ariazi JL, Cordera F, Jordan VC. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Curr Top Med Chem* 2006; 6(3): 181-202.
23. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365(9472): 1687-717.
24. Yamashita H. Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; 13(5): 380-3.

The Expression of ESR1 Gene in Paraffin Tissue Blocks of Women with Breast Cancer

Maryam Ghanbarian-Alavijeh MSc¹, Elham Moslemi PhD², Amir Izadi MSc³

Original Article

Abstract

Background: Breast cancer is the most common malignant tumor and cause of cancer death in women. Some biomarkers are used to estimate the response to therapy. One of the most common indicators is estrogen receptors (ER). It seems that there is a significant correlation between receptor existence (ER +) and risk of breast cancer. This study aimed to measurement the estrogen receptor alpha expression in women with breast cancer.

Methods: In this study, 20 cancerous paraffin-embedded tissue blocks from patients with breast cancer and 10 non-cancerous were collected. After deparaffinization, RNA was extracted with RNX Plus solution. Complementary DNA (cDNA) was synthesized via reverse transcription reaction using Moloney murine leukemia virus (MMULV) enzyme. Estrogen receptors gene expression was measured using relative real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) reaction. In this study, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) was used as internal control gene.

Findings: Estrogen receptor alpha expression in cancerous tissues had significant over-expression compared to normal tissues. Also, increasing the stage of disease, expression of estrogen receptor alpha was increased ($P < 0.0001$).

Conclusion: According to the results, it can be concluded that the estrogen receptor alpha gene expression strongly increases in tumor samples. So, determination of estrogen receptor alpha expression can be used as indicator agent for response to treatment and follow-up.

Keywords: Breast cancer, Estrogen receptor alpha, Real-time polymerase chain reaction

Citation: Ghanbarian-Alavijeh M, Moslemi E, Izadi A. **The Expression of ESR1 Gene in Paraffin Tissue Blocks of Women with Breast Cancer.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(317): 2324-32

1- Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran

3- Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran

Corresponding Author: Maryam Ghanbarian-Alavijeh MSc, Email: mghanbaryan@yahoo.com

بیان ژن TERRA در درجات توموری مختلف آستروسایتوما

سپیده دشتی^۱، سعیده عشوری^۱، دکتر مجید خیرالهی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تومورهای مغزی مرگ و میر بالایی را سبب می‌شوند. علاوه بر این، در درجه‌های توموری پیشرفته، قدرت تهاجم بالایی داشته، پیش‌آگهی بدتری دارند. تلوورها، توالی‌های تکراری و طویل DNA در دو انتهای کروموزوم‌های خطی هستند که از انتهای کروموزوم در مقابل نوترکیبی، اتصال و تخریب DNA محافظت نموده، از پیری سلولی جلوگیری می‌نمایند. در مهره‌داران، تلوورها از تکرارهای پشت سر هم شش نوکلوتیدی TTAGGG تشکیل شده‌اند. تلوورها با وجود ساختار هتروکروماتینی خود، به صورت نوعی RNA غیر کد کننده موسوم به TERRA (Telomeric repeat-containing RNA) رونویسی می‌شوند و این RNA، به عنوان مهارکننده‌ی طبیعی تلووراز عمل می‌نماید. با توجه به این امر که آستروسیتوما از شایع‌ترین تومورهای دستگاه عصبی مرکزی است و پیش‌آگهی بالینی بدی دارد، هدف از این مطالعه، سنجش میزان بیان TERRA در تومورهای مغزی آستروسیتوما و نمونه‌های شاهد غیر توموری بود. به علاوه، بیان رونوشت TERRA در درجات توموری مختلف آستروسیتوما سنجیده شد.

روش‌ها: mRNA از ۲۶ نمونه‌ی تومور آستروسیتوما و ۴ نمونه‌ی شاهد غیرتوموری استخراج شد. DNA مکمل (cdNA) سنتز شد و سطح بیان TERRA با روش Real-time reverse transcription polymerase chain reaction با استفاده از کیت SYBR Green در درجات مختلف توموری به همراه نمونه‌های طبیعی ارزیابی شد.

یافته‌ها: بر اساس مقایسه‌ی بیان نسبی TERRA بین درجات توموری مختلف در آستروسایتوما، میانگین ΔCt در درجات بالای توموری (III و IV) نسبت به درجه‌ی پایین (II) کاهش نشان داد و این امر حاکی از کاهش بیان TERRA در درجه‌های بالای آستروسایتوما به میزان ۴/۳۷۷ برابر نسبت به درجه‌ی پایین بود ($P = ۰/۰۳۶$). افزون بر این، اندازه‌گیری بیان TERRA در آستروسایتوما به میزان ۴/۹۶۹ برابر، کاهش بیان در مقایسه با نمونه‌های شاهد غیرتوموری نشان داد ($P = ۰/۰۲۹$).

نتیجه‌گیری: مطابق این بررسی و سایر مطالعات انجام شده در این مورد، احتمال می‌رود، TERRA بتواند به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی مطرح شود.

واژگان کلیدی: بیان ژن، ژن TERRA، تلوور، آستروسیتوما

ارجاع: دشتی سپیده، عشوری سعیده، خیرالهی مجید. بیان ژن TERRA در درجات توموری مختلف آستروسایتوما. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۷): ۲۳۴۲-۲۳۴۳

انتهای کروموزوم‌های خطی هستند، از انتهای کروموزوم در مقابل نوترکیبی، اتصال و تخریب

مقدمه

تلورها، توالی‌های تکراری و طویل DNA در دو

۱- کارشناس ارشد. مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده‌ی پیشگیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار. مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده‌ی پیشگیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خیرالهی

مشاهده می‌شود و در زیر مجموعه‌هایی از سارکوما و آستروسیتوما به نسبت معمول است (۱۳-۱۲). البته، باید توجه نمود که شیوع ALT، به‌طور کامل در همه‌ی انواع سرطان‌ها ارزیابی نشده است. به‌طور کلی، در اکثر موارد بررسی شده، مکانیسم نگهداری طول تلومر ALT در تومورهای خوش‌خیم و بافت‌های طبیعی مشاهده نشده است (۱۶-۱۴، ۱۱).

در طی مطالعات اخیر مشخص شده است که با وجود ساختار هتروکروماتینی تلومر، تلومرهای یوکاریوتی رونویسی می‌شود و به رونوشت آن‌ها، Telomeric repeat containing RNA (TERRA) می‌گویند (۲۰-۱۷). در واقع، TERRA یک Long noncoding RNA می‌باشد که در جانوران و قارچ‌ها شناسایی شده است و تمام اجزای هتروکروماتین تلومری را تشکیل می‌دهد (۲۰، ۱۸). رونویسی از روی TERRA در اغلب، و یا در تمام، انتهاهای کروموزومی انجام می‌شود و این فرایند، با فاکتورهای نظارت RNA (RNA surveillance factors) تنظیم می‌شود. این رونویسی در پاسخ به تغییر طول تلومر انجام می‌پذیرد (۲۰). TERRA از نواحی زیر تلومری تا انتهاهای کروموزوم رونویسی شده، جهت رونویسی در آن، از سمت سانترومر به سمت تلومر می‌باشد (۱۹-۱۷). سنتز TERRA در پستانداران و مخمر توسط RNA پلی‌مراز II انجام می‌گیرد (۲۱، ۱۹-۱۸). به نظر می‌رسد، کاهش بیان TERRA با فعالیت تلومراز مرتبط بوده، می‌تواند نشانگر عملکرد مهارتی TERRA بر روی تلومراز باشد (۲۲، ۲۰، ۱۸).

در تومورهایی که از تلومراز به‌عنوان مکانیسم نگاه‌دارنده‌ی طول تلومر استفاده می‌شود، نظیر مراحل

DNA محافظت نموده، از پیری سلولی جلوگیری می‌کنند. به‌طور کلی، وظیفه‌ی آن‌ها حفظ پایداری کروموزومی می‌باشد (۲-۱). در مهره‌داران، تلومرها از تکرارهای پشت سر هم شش نوکلوتیدی TTAGGG تشکیل شده‌اند (۳-۲).

در طی هر چرخه‌ی تقسیم سلولی، به‌علت ناپایداری DNA پلی‌مراز در همانندسازی انتهای 5' در DNA خطی، حدود ۵۰-۱۰۰ جفت باز از انتهای تلومرها از دست می‌رود (۵-۴). یکی از راه‌های ممکن جهت پیش‌گیری از دست رفتن تلومرها، فعال‌سازی مکانیسم‌های نگاه‌دارنده‌ی طول تلومر (TMM یا Telomere maintenance mechanism) می‌باشد که موجب نامیرایی سلولی می‌شود و به‌عنوان یکی از ویژگی‌های اصلی سلول‌های سرطانی توصیف شده است (۷-۶).

تا کنون، دو نوع مکانیسم نگاه‌داری طول تلومر شناسایی شده است که شامل تلومراز و Recombination-based alternative lengthening of telomeres (ALT) of telomeres می‌باشد. فعال‌سازی تلومراز (Tel-TMM)، مکانیسم اصلی نگاه‌دارنده‌ی طول تلومر در ۸۵ درصد از سرطان‌های انسانی است (۸). فعالیت تلومراز در ۱۰ تا ۱۵ درصد از سرطان‌های انسانی دیده نشده است و در زیرمجموعه‌ای از این تومورها، از مکانیسم‌های جایگزین برای نگهداری طول تلومر (Alternative lengthening of telomeres) یا ALT استفاده می‌شود، که مبتنی بر نوترکیبی همولوگ می‌باشد (۱۰-۹). برخی از سلول‌های توموری نیز از ترکیبی از این نوع مکانیسم‌های نگاه‌دارنده‌ی طول تلومر استفاده می‌کنند (۱۱).

فنوتیپ ALT به ندرت در بدخیمی‌های اپی‌تلیالی

مهمی که در چند دهه‌ی اخیر رخ داده است، بروز میزان بقای بیماران در این مدت تغییر نکرده است و تعداد کمی از بیماران با آستروسیتوما و گلیوبلاستوما بیش از ۲ سال پس از تشخیص، زنده می‌مانند (۲۸-۲۷). با توجه به نقش حیاتی تحقیقات مختلف در یافتن یک نشانگر تشخیصی مناسب در آستروسایتوما، سطح بیان TERRA در نمونه‌های بافت توموری آستروسایتوما با استفاده از تکنیک *Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)*، اندازه‌گیری شد. به علاوه، سطح بیان TERRA بین درجه‌های مختلف آستروسایتوما سنجش شد و با نمونه‌های شاهد غیرتوموری از بافت مغز مقایسه گردید.

روش‌ها

۲۶ بیمار مبتلا به تومور مغزی از نوع آستروسایتوما مورد جراحی قرار گرفتند. همچنین، اتوپسی از مغز ۴ جسد انسان، جهت جمع‌آوری نمونه‌های بافتی شاهد غیرتوموری انجام گرفت (۲۴). نمونه‌های بافتی از بیمارستان الزهرا (س) شهر اصفهان در فاصله‌ی زمانی بین سال‌های ۲۰۱۲-۲۰۱۴ جمع‌آوری شد. بافت توموری، بلافاصله پس از برش، در اتاق عمل در نیتروژن مایع فریز شد. این نمونه‌ها، بر اساس طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO یا World Health Organization)، درجه‌بندی شد (۲۹). این مطالعه، مطابق دستورالعمل‌های کمیته‌ی اخلاق محلی و با دریافت رضایت کتبی از بیماران، در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. استخراج RNA با استفاده از ماده‌ی Trizol مطابق دستورالعمل کارخانه‌ی سـازنده

پیشرفته‌ی سرطان حنجره، سرطان کولون و تومورهای گره‌های لنفاوی، بیان TERRA در مقایسه با بافت طبیعی کاهش می‌یابد (۲۳). غلظت‌های بالای رونوشت TERRA در تومورهایی با طول تلومر بلند، که فاقد فعالیت تلومرزی هستند، مشاهده شده است (۳). این نتایج، بیانگر این موضوع است که افزایش سطح TERRA می‌تواند به عنوان نشانگری برای ALT TMM محسوب شود (۲۴). بنابراین، جداسازی بیماران بر اساس نوع مکانیسم نگهداری طول تلومر، به منظور انتخاب بهترین روش درمانی مورد نیاز خواهد بود و می‌تواند به پزشکان در تشخیص نوع تومور کمک نماید (۲۵-۲۴). برای مثال، در آینده‌ی نزدیک، مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌های تلومراز و ALT-TMM می‌توانند، به عنوان یک عامل درمانی اختصاصی اهمیت پیدا نمایند (۲۶).

آستروسیتوما از تومورهای سیستم عصبی مرکزی است که به صورت اولیه از آن منشأ گرفته، نئوپلاسم سلول‌هایی می‌باشد که اغلب از آستروسیت نامیرا منشأ گرفته است. سازمان بهداشت جهانی، چهار درجه‌ی هیستولوژیک برای آستروسیتوما پایه‌گذاری نمود تا به همه، سردرگمی‌های مربوط به تشخیص این نوع از تومورهای مغزی خاتمه دهد. درجه‌های پایین آستروسیتوما (I و II) کمتر از درجه‌های بالا متداول بوده، کمتر از ۶ درصد موارد آن را شامل می‌شود. در حالی که بالاترین درجه، که گلیوبلاستوما (درجه‌ی IV) نامیده می‌شود، متداول‌ترین بدخیمی سیستم عصبی مرکزی اولیه می‌باشد. گلیوبلاستوما چند شکل، یکی از مهاجم‌ترین انواع نئوپلاسم با میانگین بقای یک سال پس از تشخیص است. با وجود پیشرفت‌های تحقیقی

برای تکثیر ژن 36B4 به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (۳، ۳۱).

واکنش Real-time PCR به صورت سه گانه (Triplicates) طراحی شد. مقادیر نسبی (Relative quantities یا RQ) با توجه به سطح بیان 36B4 تعیین شد. سطوح بیان با استفاده از روش Ct مقایسه‌ای ارزیابی شد. مخلوط تکثیر در حجم ۲۰ µl تهیه شد و در آن ۱۰ µl از مسترمیکس SYBR Green/nonROXqPCR (SA Biosciences, CN, PA)، از جفت پرایمر ۱۰ µM اختصاصی ژن (پرایمرهای Forward و Reverse)، از ۲ µl از cDNA الگو (۲۵۰ ng/µl) و ۷/۶ µl از آب مقطر دو بار تقطیر (ddH₂O) مخلوط گردید. مرحله‌ی آغازین چرخه‌ی دمایی، به منظور فعال‌سازی آنزیم شروع داغ Taq DNA polymerase در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه تنظیم شد و سپس، ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، به منظور ذوب، اتصال و فاز گسترش PCR تنظیم گردید.

تمام اندازه‌گیری‌ها به صورت سه گانه (Triplicates) انجام شد. به منظور محاسبه بیان نسبی از نرم‌افزار REST (Relative expression software tool) 2008 نسخه‌ی ۲.۰.۷ استفاده شد. سطح نسبی TERRA mRNA با سطح بیان ژن 36B4 نرمالایز شد و روش Ct مقایسه‌ای (ΔCt) به کار گرفته شد. آنالیزهای آماری، به منظور مقایسه‌ی بیان نسبی ژن‌ها در نمونه‌های توموری آستروسایتوما و نمونه‌های شاهد غیر توموری با استفاده از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹

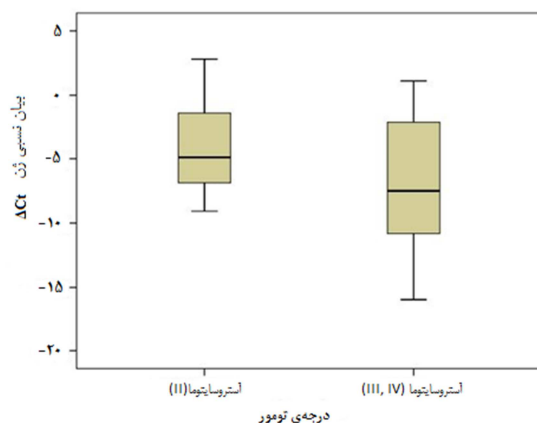
(Invitrogen, Carlsbad, CA)، از نمونه‌های بافتی انجام شد. خلوص RNA استخراج شده، به وسیله‌ی اندازه‌گیری‌های فوتومتریک با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. نسبت طول موج‌های خوانده شده در ۲۸۰-۲۶۰ نانومتر، بین ۱/۷-۲/۲ قرار گرفت. افزون بر این، کیفیت RNA به وسیله‌ی الکتروفورز در ژل آگارز بررسی شد. نسبت شدت سیگنال rRNA ۱۸S/۲۸S محاسبه شد و اعداد بین ۱/۵ و ۲/۵ مورد پذیرش قرار گرفت.

به منظور حذف DNA ژنومی از نمونه‌های RNA، تیمار با آنزیم DNase I انجام شد. DNA مکمل (cDNA) به وسیله‌ی کیت سنتز cDNA مارک RevertAid™ H Minus First Strand (Fermentas, Vilnius, Lithuania)، از دو میکروگرم RNA توسط پرایمرهای Random hexanucleotide سنتز شد. تمامی مراحل مطابق پروتکل کارخانه سازنده‌ی کیت انجام گرفت.

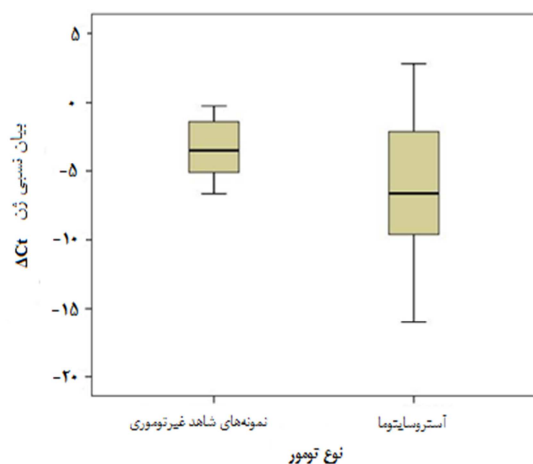
پس از سنتز cDNA، سطح بیان Total TERRA به وسیله‌ی Real-time PCR توسط دستگاه StepOnePlus™ system و با استفاده از مسترمیکس SYBR Green اندازه‌گیری شد. تکثیر Total TERRA به وسیله پرایمرهای اختصاصی تلومر انجام گرفت. پرایمرها از مطالعات گذشته به دست آمد (۳، ۳۰-۳۱).

پرایمرهای 5'-
CGGTTTGTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGG
Tel1b
GGTTTGGGGT-3' و 5'-
GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTA
Tel2b
CCCTTACCCT-3' برای تکثیر TERRA مورد استفاده قرار گرفت (۳، ۳۰). پرایمرهای 5'-
36B4u
CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3' و 5'-
36B4d
CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

می‌دهد ($P > 0/050$). در حالی که، مقایسه‌ی بیان TERRA در درجات بالای آستروسایتوما (III و IV) نسبت به نمونه‌های شاهد غیرتوموری، به میزان $8/271$ برابر کاهش بیان نشان داد ($P = 0/016$).



شکل ۱. مقایسه‌ی بیان نسبی ژن TERRA در درجه‌ی توموری پایین (II) و درجات توموری بالای (III و IV) آستروسایتوما



شکل ۲. مقایسه‌ی بیان نسبی ژن TERRA در آستروسایتوما و نمونه‌های شاهد غیرتوموری

بحث

ارزیابی بیان ژن TERRA سنجشی به نسبت نوین، جهت تعیین نوع مکانیسم نگه‌دارنده‌ی طول تلومر بوده، نوع تومور را بر اساس فعال‌سازی آنزیم تلومراز

(version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) صورت گرفت و از روش Independent two-tailed t-test جهت مقایسه‌ی بیان TERRA بین آستروسایتوما و نمونه‌های شاهد غیرتوموری استفاده شد.

یافته‌ها

۲۶ نمونه‌ی تومور مغزی آستروسایتوما مربوط به ۱۸ زن و ۸ مرد مورد بررسی قرار گرفت. میانگین سنی افراد، $46/00 \pm 19/14$ با محدوده‌ی ۵-۸۲ سال بود. ۴ نمونه‌ی شاهد غیرتوموری هم از اتوپسی مغز ۴ جسد انسان تهیه شد و به منظور مقایسه با نمونه‌های توموری مورد استفاده قرار گرفت. از نظر آسیب‌شناختی، ۶ نمونه در درجه‌ی II، ۲ نمونه در درجه‌ی III و ۱۸ نمونه در درجه‌ی IV توموری بودند.

مقایسه‌ی بیان نسبی ژن TERRA بین درجات توموری مختلف در آستروسایتوما انجام شد. میانگین ΔCt در درجات بالای توموری (III و IV) در آستروسایتوما نسبت به درجه‌ی پایین (II) کاهش نشان داد و این امر، حاکی از کاهش بیان TERRA در درجه‌های بالای آستروسایتوما به میزان $4/377$ برابر بود ($P = 0/036$) (شکل ۱).

افزون بر این، اندازه‌گیری بیان TERRA در آستروسایتوما به میزان $4/969$ برابر کاهش بیان در مقایسه با نمونه‌های شاهد غیرتوموری نشان داد ($P = 0/029$) (شکل ۲).

همچنین، بیان TERRA بین درجات مختلف آستروسایتوما با نمونه‌های شاهد غیرتوموری مقایسه گردید و مشخص شد که بیان این ژن در درجه‌ی پایین (II) از آستروسایتوما نسبت به نمونه‌های شاهد غیرتوموری به میزان $1/990$ برابر کاهش بیان نشان

است (۳۳، ۳) و افزایش سطوح TERRA می‌تواند نشانگری برای مکانیسم نگه‌دارنده‌ی طول تلومر بر اساس نوترکیبی همولوگ ALT TMM باشد (۲۴).

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، تاکنون دو نوع مکانیسم نگه‌داری طول تلومر شناسایی شده است که شامل تلومراز ALT می‌باشد. در نئوپلازی‌ها، نوع مکانیسم‌های نگه‌داری طول تلومر می‌تواند به پیش‌بینی بیماری کمک نماید و احتمال می‌رود که در آینده باعث یافتن درمان مستقیم شود. بر اساس این دو نوع مکانیسم نگه‌داری طول تلومر، ۴ گروه توموری در انسان تعریف می‌شود (۱۱). تومورهایی که فقط از تلومراز به عنوان نگه‌دارنده‌ی طول تلومر بهره می‌برند (Tel TMM)، تومورهایی که فقط از ALT استفاده می‌کنند (ALT TMM)، تومورهایی که از هیچ کدام از این سیستم‌های نگه‌دارنده‌ی طول تلومر استفاده نمی‌کنند (Non-determined یا NDTMM) و تومورهایی که از هر دو سیستم ALT و تلومراز استفاده می‌نمایند (Tel/ALT TMM). بر اساس این گروه‌بندی چهارگانه می‌توان نوع تومور را تشخیص داد (۲۴).

از آن جایی که هر روزه مهارکننده‌های TMM گسترش می‌یابند، انکولوژیست‌ها نیاز خواهند داشت تا نوع TMM توسط پاتولوژیست‌ها تعیین شود؛ نوع درمان انتخابی، بر اساس تشخیص نوع TMM متفاوت خواهد بود (۲۴). در آستروسایتوما، آنالیزهای بسیار جزئی در مورد TMM انجام شده و مشاهده شده است که در آن، هر ۴ گروه TMM حضور دارند (۲۴). درجه‌ی I آستروسایتوما، که در کودکان شایع است، به جز چند استثنا، از هیچ کدام از سیستم‌های Tel TMM و ALT TMM استفاده نمی‌کند

(Tel-TMM) یا به کارگیری مکانیسم نوترکیبی همولوگ (ALT TMM) مشخص می‌نماید (۲۴). سطح بیان TERRA به وسیله‌ی روش‌های مبتنی بر PCR اندازه‌گیری می‌شود. در این مطالعه، سطح بیان TERRA در درجات توموری مختلف آستروسایتوما به وسیله‌ی سنجش PCR تکرارهای اختصاصی تلومری انجام شد. تکثیر تکرارهای اختصاصی تلومری مبتنی بر PCR در مطالعات دیگر گذشته هم مورد استفاده قرار گرفته است (۳۱-۳۰).

در گذشته، مطالعات زیادی روی بیان ژن TERRA در تومورهای مغزی انجام نشده است. با این حال، توجه به این که بیان TERRA منعکس‌کننده‌ی نوع مکانیسم نگه‌دارنده‌ی تومور می‌باشد (۲۴) و تنظیم وضعیت تلومری نقشی به مراتب بزرگ‌تر از آن چه در گذشته تصور می‌شد، در سبب شناسی بیماری بازی می‌کند (۳۲)، ما را به پژوهش در این زمینه ترغیب نمود.

ما دریافتیم که کاهش بیان Total TERRA، به طور چشم‌گیری با افزایش درجه‌ی توموری در آستروسایتوما مرتبط می‌باشد. به عبارت دیگر، بیان TERRA با درجه‌ی توموری در آستروسایتوما رابطه‌ی معکوس دارد (۲۳، ۱۹). در واقع، چنین به نظر می‌رسد که بیان ژن TERRA با افزایش فعالیت آنزیم تلومراز رابطه‌ی معکوس نشان می‌دهد. اگر چه، کاهش بیان TERRA نسبت به بافت طبیعی در درجات پایین آستروسایتوما آغاز می‌گردد، اما درجات بالاتر آستروسایتوما، کاهش بیان به مراتب بیشتری را نشان می‌دهد. در ترکیب این نتایج با یافته‌های مطالعات گذشته، چنین به نظر می‌رسد که کاهش فعالیت تلومراز با افزایش بیان ژن TERRA همراه

انواع سنجش‌های مختلف، می‌تواند با میزان بقا ارتباط نشان دهد. مطابق مطالعه‌ی آنان، بیان TERRA همراه با سنجش فعالیت تلومراز در آستروسایتوما می‌تواند در تشخیص میزان بقا موثر واقع شود (۳). از این رو، ما میزان بیان TERRA در آستروسایتوما را در مطالعه‌ی خود بررسی و با بیان این ژن در نمونه‌های بافتی طبیعی مقایسه نمودیم. نتایج حاصل از این پژوهش، یافته‌های مطالعات گذشته را تأیید نمود. افزون بر این، این یافته‌ها می‌تواند در طی مطالعات آینده، جهت پیش‌بینی نوع TMM به کار گرفته شود. توانایی تعیین نوع TMM با استفاده از نمونه‌های خون، راهکاری جذاب در آنالیزهای بالینی است و به منظور تشخیص اولیه‌ی تومور، مفید می‌باشد (۲۴). ورود این یافته‌های تشخیصی به حوزه‌ی کارآزمایی بالینی بسیار ضروری می‌باشد. در ضمن، استفاده از ترکیبی از این روش‌ها برای پیش‌بینی وضعیت بالینی بیمار می‌تواند، باعث افزایش حساسیت و اختصاصیت نتایج شود (۲۴). به دنبال یافتن مکانیسم نگه‌داری طول تلومر در تومور می‌توان به یک راهکار درمانی مؤثر و مفید دست یافت (۱۱). تحقیقات بر روی TERRA، در ابتدای مسیر خود قرار دارد و دست‌کاری آن به منظور یافتن یک راهکار درمانی مناسب در بیماری‌های مرتبط با تلومر، مرکز توجه تحقیقات TERRA در آینده قرار گرفته است.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، که بودجه‌ی انجام این تحقیق را تأمین نمود.

(۳۵-۳۴، ۲۵). در درجات II و III از آستروسایتوما، به طور عمده از ALT TMM استفاده می‌شود (۱۲). در فرم شدید آستروسایتوما، یعنی درجه‌ی IV یا گلیوبلاستوما، TMM ALT نادر است (۲۵-۱۵ درصد)، Tel TMM بالای ۴۰ و NDTMM در حدود ۴۰ درصد قابل مشاهده می‌باشد (۱۲-۱۱، ۳۶). در برخی از موارد آستروسایتوما، TMM ALT/Tel وجود دارد؛ اما نادرتر از موارد دیگر است و در نزدیک به ۵ درصد موارد دیده می‌شود (۱۱). آستروسایتوماهای با درجه‌ی پایین واجد بعضی از نشانگرهای ALT TMM هستند ولی همه‌ی نشانگرهای آن را دارا نمی‌باشند که می‌تواند بیانگر این موضوع باشد، که آمادگی برای داشتن ALT TMM در تومورهای NDTMM، از قبل در رده‌ی سلولی مستعد به استفاده از ALT TMM وجود داشته است (۳۴).

روش‌هایی که Tel TMM و ALT TMM را تشخیص می‌دهند، به طور معمول در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، همیشه کاربردی نیستند (۳۸-۳۷، ۱۳). به تازگی اثبات شده است که استفاده از دو روش مورد نیاز است؛ یک روش، اطلاعات مربوط به Tel TMM و دیگری، اطلاعاتی مربوط به وضعیت ALT TMM را مشخص می‌نماید تا بتوان گروه‌های چهارگانه‌ی TMM را از هم متمایز نمود. در مطالعه‌ی Sampl و همکاران، یک گروه متشکل از ۲۸ نمونه‌ی گلیوبلاستوما مورد بررسی قرار گرفت و پژوهشگران دریافتند که حداقل استفاده از دو روش برای شناسایی نوع TMM ضروری است و ترکیبی از

References

- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350(6319): 569-73.
- Samassekou O, Gadji M, Drouin R, Yan J. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat* 2010; 192(5): 284-91.
- Sampl S, Pramhas S, Stern C, Preusser M, Marosi C, Holzmann K. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. *Transl Oncol* 2012; 5(1): 56-65.
- Chen HJ, Liang CL, Lu K, Lin JW, Cho CL. Implication of telomerase activity and alternations of telomere length in the histologic characteristics of intracranial meningiomas. *Cancer* 2000; 89(10): 2092-8.
- Cabuy E, de Ridder L. Telomerase activity and expression of telomerase reverse transcriptase correlated with cell proliferation in meningiomas and malignant brain tumors in vivo. *Virchows Arch* 2001; 439(2): 176-84.
- Colgin LM, Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9(1): 97-103.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(5): 787-91.
- Neumann AA, Reddel RR. Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(11): 879-84.
- Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 2002; 21(4): 598-610.
- Hakin-Smith V, Jellinek DA, Levy D, Carroll T, Teo M, Timperley WR, et al. Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet* 2003; 361(9360): 836-8.
- Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11(1): 217-25.
- Henson JD, Reddel RR. Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Lett* 2010; 584(17): 3800-11.
- Costa A, Daidone MG, Daprai L, Villa R, Cantu S, Pilotti S, et al. Telomere maintenance mechanisms in liposarcomas: association with histologic subtypes and disease progression. *Cancer Res* 2006; 66(17): 8918-24.
- Cairney CJ, Hoare SF, Daidone MG, Zaffaroni N, Keith WN. High level of telomerase RNA gene expression is associated with chromatin modification, the ALT phenotype and poor prognosis in liposarcoma. *Br J Cancer* 2008; 98(8): 1467-74.
- Ohali A, Avigad S, Ash S, Goshen Y, Luria D, Feinmesser M, et al. Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer* 2006; 107(6): 1391-9.
- Azzalin CM, Reichenbach P, Khoraiuli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 2007; 318(5851): 798-801.
- Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A, Porro A, Lingner J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Lett* 2010; 584(17): 3812-8.
- Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 2008; 32(4): 465-77.
- Luke B, Lingner J. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *EMBO J* 2009; 28(17): 2503-10.
- Schoeftner S, Blasco MA. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(2): 186-93.
- Ng LJ, Cropley JE, Pickett HA, Reddel RR, Suter CM. Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(4): 1152-9.

23. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2008; 10(2): 228-36.
24. Hung NA, Hsia H, Royds JA, Slatter TL. Telomere maintenance mechanisms: prognostic and therapeutic implications for the pathologist and oncologist. *Open Journal of Pathology* 2013; 3(1): 10-20.
25. Heaphy CM, Subhawong AP, Hong SM, Goggins MG, Montgomery EA, Gabrielson E, et al. Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am J Pathol* 2011; 179(4): 1608-15.
26. Basu N, Skinner HG, Litzelman K, Vanderboom R, Baichoo E, Boardman LA. Telomeres and telomere dynamics: relevance to cancers of the GI tract. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 7(8): 733-48.
27. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64(6): 479-89.
28. Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* 2007; 82(10): 1271-86.
29. Scheithauer BW, Fuller GN, Vandenberg SR. The 2007 WHO classification of tumors of the nervous system: controversies in surgical neuropathology. *Brain Pathol* 2008; 18(3): 307-16.
30. O'Callaghan N, Dhillon V, Thomas P, Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques* 2008; 44(6): 807-9.
31. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(10): e47.
32. Armanios M. Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009; 10: 45-61.
33. Kheirollahi M, Mehrazin M, Kamalian N, Mohammadi-asl J, Mehdipour P. Telomerase activity in human brain tumors: astrocytoma and meningioma. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33(4): 569-74.
34. Slatter T, Gifford-Garner J, Wiles A, Tan X, Chen YJ, MacFarlane M, et al. Pilocytic astrocytomas have telomere-associated promyelocytic leukemia bodies without alternatively lengthened telomeres. *Am J Pathol* 2010; 177(6): 2694-700.
35. Tabori U, Vukovic B, Zielenska M, Hawkins C, Braude I, Rutka J, et al. The role of telomere maintenance in the spontaneous growth arrest of pediatric low-grade gliomas. *Neoplasia* 2006; 8(2): 136-42.
36. Royds JA, Al NS, Wiles AK, Chen YJ, Ahn A, Shaw A, et al. The CDKN2A G500 allele is more frequent in GBM patients with no defined telomere maintenance mechanism tumors and is associated with poorer survival. *PLoS One* 2011; 6(10): e26737.
37. Durant ST. Telomerase-independent paths to immortality in predictable cancer subtypes. *J Cancer* 2012; 3: 67-82.
38. Fajkus J. Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin Chim Acta* 2006; 371(1-2): 25-31.

Expression of TERRA in Different Grades of Astrocytoma

Sepideh Dashti MSc¹, Saeideh Ashouri MSc¹, Majid Kheirollahi PhD²

Original Article

Abstract

Background: Brain tumors include burden of mortality from cancers. High grades of brain tumors are more aggressive and have poor prognosis. Introduction telomeres are the ends of linear chromosomes that serve as a protective cap to avoid permanent proliferation arrest, termed replicative senescence. In vertebrates, telomeres consist of tandem repeats of TTAGGG hexanucleotide sequences. In spite of heterochromatin structure of telomeres, they are transcribed into a non-coding RNA called telomeric repeat-containing RNA or TERRA which acts as a natural inhibitor of telomerase activity. Considering astrocytoma, as one of the most common tumors of the central nervous system (CNS), and a very poor prognosis tumor, the aim of this study was to evaluate the TERRA expression level in astrocytoma tumors and nontumoral controls. Furthermore, expression levels of TERRA were compared between different grades of astrocytoma.

Methods: The mRNA of 26 brain tumor samples and 4 samples as nontumoral controls were extracted and cDNA was synthesized. Then, real-time reverse transcription polymerase chain reaction (SYBR Green kit) for quantitation of total TERRA levels was developed.

Findings: We demonstrated the correlation between total TERRA levels of expression with different grades of astrocytoma. High grades (III and IV) of astrocytoma tumors had lower mean of ΔCt than low grades (II) and down-regulation for TERRA mRNA was 4.377-fold ($P = 0.036$). Additionally, measurement of TERRA expression in astrocytoma showed 4.969-fold less compared to levels of TERRA expression in nontumoral controls ($P = 0.029$).

Conclusion: According to our study, TERRA may be prognostic marker in astrocytoma tumors.

Keywords: Expression, TERRA, Telomere, Astrocytoma

Citation: Dashti S, Ashouri S, Kheirollahi M. **Expression of TERRA in Different Grades of Astrocytoma.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(317): 2333-42

1- Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Majid Kheirollahi PhD, Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

میلیوم کلوئید

دکتر امیر حسین سیادت^۱، دکتر فاطمه مختاری^۲، دکتر محمد علی نیلفروش زاده^۳

گزارش مورد

چکیده

مقدمه: میلیوم کلوئید یک وضعیت نادر پوستی با حداقل سه نوع متمایز است. از نظر بالینی، بیماری با ظهور پاپول‌های گسترده، نیمه شفاف و مایل به رنگ زرد و یا پلاک‌های تشکیل شده بر روی پوست آفتاب دیده، و از نظر بافت شناسی، با شناسایی کلوئید در ناحیه‌ی پایپیلای درم قابل تشخیص است.

معرفی بیمار: بیمار مردی بود با پاپول‌های کوچک و متعدد بر روی پشت دست‌ها که بیماری میلیوم کلوئید توسط پاتولوژیست برای وی تأیید شده بود. میلیوم کلوئید اغلب در بیماران با پوست روشن مشاهده می‌شود و بدون تغییر باقی می‌ماند. اما این بیمار، پوست به نسبت تیره از نوع Fitzpatrick skin type III داشت و ضایعات او در تابستان افزایش و در زمستان کاهش پیدا می‌کرد.

نتیجه‌گیری: این مورد، تأکیدی بر رابطه‌ی نزدیک بین قرار گرفتن طولانی مدت در معرض آفتاب و ابتلا به میلیوم کلوئید در بزرگسالان است.

واژگان کلیدی: بزرگسالان، بیوپسی، کلوئید، دست، میلیوم، بیماری پوستی، پاتولوژی

ارجاع: سیادت امیر حسین، مختاری فاطمه، نیلفروش زاده محمد علی. میلیوم کلوئید. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۷): ۲۳۴۸-۲۳۴۳

مقدمه

میلیوم کلوئید برای اولین بار در سال ۱۸۶۶ توسط Wagner با عنوان «Das Colloid-Milium der Haut» گزارش شد و در طول تاریخ با نام‌های Colloid infiltration, Colloid pseudomilium, Millitary collodoms، هیالوما و اختلاط الاستوزیس کلوئیدالیس شناخته شده است (۱-۲).

میلیوم کلوئید یک وضعیت دژنراتیو مرتبط با قرار گرفتن بیش از حد در معرض آفتاب است و احتمال می‌رود در اثر تماس با فرآورده‌های نفتی و

هیدروکینون‌ها هم بروز کند. منشأ ایجاد کلوئید در درمیس مشخص نیست؛ اما تصور می‌شود، علت بروز آن در نوع بالغین (Adults)، انحطاط رشته‌های الاستیک و در نوع کودکان (Juveniles)، انحطاط کراتینوسیت‌های تغییر شکل یافته در اثر اشعه‌ی فرابنفش (UV یا Ultraviolet) است (۳).

میلیوم کلوئید بالغین یک اختلال نادر پوستی است که توسط پاپول‌های شفاف و متعدد بر روی پوست و مناطقی که در معرض آفتاب بوده است، نظیر صورت، گردن، پشت دست‌ها و پشت، قابل تشخیص می‌باشد.

*۱ نسخه‌ی انگلیسی این مقاله در مجله‌ی Adv Biomed Res سال ۲۰۱۳ دوره‌ی ۲ به چاپ رسیده است.

۱- استادیار، مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران و مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک و گروه پوست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک و گروه پوست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Email: f_mokhtari@resident.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فاطمه مختاری

ارجاع داده شد. این ضایعات، در طول ۳ سال گسترش پیدا کرده بود و در فصل تابستان، افزایش و در زمستان، کاهش پیدا می‌کردند و هیچ کدام از آنها، در این مدت برطرف نشده بود.

در معاینه‌ی فیزیکی، پاپول‌های متعدد به رنگ قهوه‌ای متمایل به زرد، با قطر ۲-۳ میلی‌متر در پشت دست‌ها مشاهده شد (شکل ۱). وی هیچ گونه مشکل پزشکی فعلی و یا قبلی نداشت. سابقه‌ی پزشکی وی، مبنی بر مصرف داروهای ایجاد کننده‌ی حساسیت به نور و دیگر اختلالات، منفی بود. به علاوه، هیچ گونه زمینه‌ی خانوادگی در ابتلا به این بیماری وجود نداشت.

جهت تشخیص، نمونه‌برداری از تمام ضخامت پوست لازم است؛ اما پیشینه‌ی بیمار هم می‌تواند در تشخیص صحیح این بیماری مفید باشد (۴).

این گزارش، رابطه‌ی مستقیم بین قرار گرفتن در معرض آفتاب برای طولانی مدت و ابتلا به بیماری میلیوم کلونید را تأیید می‌کند.

معرفی بیمار

بیمار، مردی ۳۸ ساله، راننده از اهواز، دارای پوستی از نوع Fitzpatrick skin type III، با وضعیت سلامت خوب، به علت ظهور پاپول‌های بدون علامت در پشت دست‌هایش به مدت ۳ سال، به بیمارستان



ب

الف



ج

شکل ۱. ضایعات بیمار

شده در سطح پوست آفتاب دیده و از نظر بافت‌شناسی، توسط تعیین حضور کلونید در ناحیه‌ی پایبالی پوست، تشخیص داده می‌شود. سه نوع بالینی از میلیوم کلونید با نام‌های بالغین (Adults)، کودکان (Juveniles) و Nodular colloid degeneration وجود دارد.

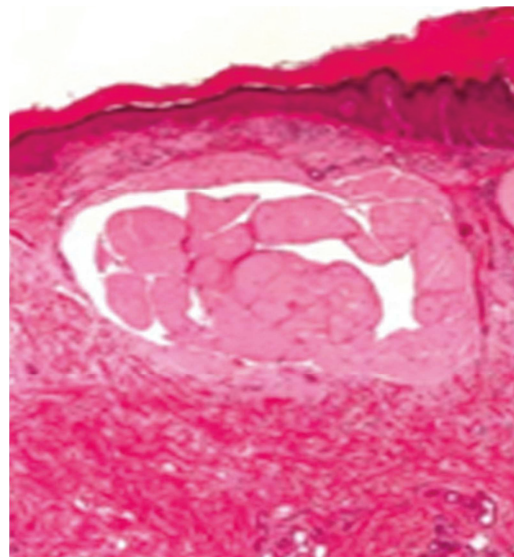
نوع بالغین را می‌توان نتیجه‌ی قرار گرفتن در معرض آفتاب، هیدروکینون‌ها، نفت خام و کودهای شیمیایی در نظر گرفت (۴، ۲). برخی پژوهشگران نوع بالغ بیماری را نوعی Actinic elastosis در نظر می‌گیرند (۶). در موارد دیگر، در میان کارگران پالایشگاه‌های مناطق گرمسیر، فنل‌های موجود در سوخت اکسید (نفت گاز) نقش مهمی در ایجاد زخم‌ها و تأثیرات فتودینامیکی دارند (۸، ۷).

نوع کودکان، اغلب زمینه‌ی خانوادگی دارد، قبل از سن بلوغ آغاز می‌شود و می‌تواند از فرم غیرخانوادگی، که در مراحل بعدی زندگی رخ می‌دهد، تمیز داده شود. هرچند نور نقش کمی در ایجاد نوع کودکان بازی می‌کند، اما به طور قطع، در بیماران مسن‌تر، که پوست شفاف‌تر دارند و در معرض نور خورشید کار می‌کنند، نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۱-۹، ۲).

Nodular colloid degeneration به عنوان نوعی Nodular amyloidosis هم رده‌بندی می‌شود. این اختلال، بیشتر به صورت یک ندول (گره) مجزا در صورت، تنه و پوست سر ظاهر می‌شود (۴).

بیشترین مناطق درگیر در میلیوم کلونید صورت، پشت دست‌ها، پشت، اطراف گردن و گوش‌ها می‌باشد. پاپول‌های کوچک پوستی با قطر ۲-۱ میلی‌متر، قهوه‌ای متمایل به زرد و گاهی تیره با

بیوپسی از یکی از ضایعات گرفته شد و تشخیص میلیوم کلونید تأیید گردید. تست بافت‌شناسی توسط رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، رسوب مواد هم‌گن کم‌رنگ ائوزینوفیلیک در شکاف‌های ایجاد شده را در پایبالی پوست مشخص کرد (شکل ۲).



شکل ۴. رسوب مواد هم‌گن کم‌رنگ ائوزینوفیلیک در شکاف‌های ایجاد شده در پایبالی پوست

بحث

میلیوم کلونید یک تغییر دژنراتیو است و از بین رفتن کلونیدی پوست یا هیالینوزیس پوستی نامیده می‌شود. شرایط این بیماری ممکن است به طور کامل، واضح و مشخص نباشد و باید به عنوان یکی از بیماری‌های پوستی در نظر گرفته شود (۵). علت ایجاد فرم کلونید در درم هنوز مشخص نیست اما تصور می‌شود، در نوع بالغین، از بین رفتن فیبرهای الاستیک و در نوع کودکان، از بین رفتن کراتینوسیت‌های تغییر شکل یافته به واسطه‌ی UV عامل ایجاد بیماری باشد (۳). از نظر بالینی، میلیوم کلونید با شناسایی پاپول‌های شفاف و زرد رنگ و یا پلاک‌های تشکیل

هایپرکراتوتیک یا پهن شده باشد (۱۴).
درمانی که برای Actinic elastosis در بیماران بزرگسال مورد استفاده است، شامل رتینوئید موضعی می باشد (۶). درمان با Derm abrasion (۱۵) و تخریب توسط لیزر Er: YAG هم برای بهبود این بیماری گزارش شده است (۱). تخریب زخم‌ها با حرارت و کرایوتراپی نیز قابل انجام است، اما نتایج جراحی زیبایی این درمان به ندرت رضایت‌بخش می باشد.

نتیجه گیری

این مورد، تأکید بر رابطه‌ی نزدیک بین قرار گرفتن طولانی مدت در معرض آفتاب و ابتلا به میلیوم کلویید بزرگسالان است.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر صانعی، پاتولوژیست بخش آسیب‌شناسی، جهت ارائه‌ی عکس هیستوپاتولوژی از نمونه تشکر می‌شود.

پیشرفت کند، کم و بیش متقارن، در گروه‌های نامنظم بر روی مناطق آفتاب دیده‌ی پوست ایجاد می‌شود. در صورت تماس، دارای جنس نرم می‌باشند و در اثر سوراخ شدن پاپول‌ها، حجم ژلاتینی داخل آن‌ها خارج می‌شود. هرچند امکان دارد، میلیوم کلویید تشدید و در طی سال‌ها گسترده‌تر شود اما در بیشتر موارد، بیماری در طول ۳ سال به حداکثر گسترش خود می‌رسد و بعد از آن، بدون تغییر باقی می‌ماند (۱۲). یافته‌های بافت‌شناسی و بالینی، هر دو عاری از خطا هستند؛ هرچند امکان دارد، اولی به تنهایی برای تفاوت قابل شدن از آمیلوئیدوزیس مشکل باشد (۱۳، ۵).

ضایعات معمولی مشابه، در Actinic elastosis شدید مشاهده می‌شود (۸). توسط میکروسکوپ نوری می‌توان در میان و بالای درمیس، میلیوم کلویید را مشاهده کرد که با تجمع کمی از مواد اتوزینوفیلیک بیشکل و هموزن، با ایجاد شکافی فضا مانند تشخیص داده می‌شود. اپی‌درم‌های روی هم قرار گرفته سالم و دست نخورده باقی می‌ماند، اما ممکن است،

References

1. Ammirati CT, Giancola JM, Hruza GJ. Adult-onset facial colloid milium successfully treated with the long-pulsed Er: YAG laser. *Dermatol Surg* 2002; 28(3): 215-9.
2. Innocenzi D, Barduagni F, Cerio R, Wolter M. UV-induced colloid milium. *Clin Exp Dermatol* 1993; 18(4): 347-50.
3. Kobayashi H, Hashimoto K. Colloid and elastic fibre: ultrastructural study on the histogenesis of colloid milium. *J Cutan Pathol* 1983; 10(2): 111-22.
4. Lim C, Li M. Colloid milium arising on a non-sun-exposed area in an adult. *Australas J Dermatol* 2006; 47(2): 137-8.
5. Hashimoto K, Miller F, Bereston ES. Colloid milium. Histochemical and electron microscopic studies. *Arch Dermatol* 1972; 105(5): 684-94.
6. Dummer R, Laetsch B, Stutz S, Scharer L. Elastosis colloidalis conglomerata (adult colloid milium, paracolloid of the skin): a maximal manifestation of actinic elastosis? *Eur J Dermatol* 2006; 16(2): 163-6.
7. Findlay GH, Morrison JG, Simson IW. Exogenous ochronosis and pigmented colloid milium from hydroquinone bleaching creams. *Br J Dermatol* 1975; 93(6): 613-22.
8. Muscardin LM, Bellocchi M, Balus L. Papuloverrucous colloid milium: an occupational variant. *Br J Dermatol* 2000; 143(4): 884-7.
9. Handfield-Jones SE, Atherton DJ, Black MM, Hashimoto K, McKee PH. Juvenile colloid milium: clinical, histological and ultrastructural features. *J Cutan Pathol* 1992; 19(5): 434-8.
10. Chowdhury MM, Blackford S, Williams S. Juvenile colloid milium associated with ligneous conjunctivitis: report of a case and review of the literature. *Clin Exp Dermatol*

- 2000; 25(2): 138-40.
11. Hashimoto K, Kumakiri M. Colloid-amyloid bodies in PUVA-treated human psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 1979; 72(2): 70-80.
 12. Muzaffar W, Dar NR, Malik AM. Colloid milium of the upper eyelid margins: a rare presentation. *Ophthalmology* 2002; 109(10): 1944-6.
 13. Hashimoto K, Black M. Colloid milium: a final degeneration product of actinic elastoid. *J Cutan Pathol* 1985; 12(2): 147-56.
 14. Lewis AT, Le EH, Quan LT, Krishnan B, Schulmeier J, Hsu S. Unilateral colloid milium of the arm. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46(2 Suppl Case Reports): S5-S7.
 15. Apfelberg DB, Druker D, Spence B, Maser MR, Lash H. Treatment of colloid milium of the hand by dermabrasion. *J Hand Surg Am* 1978; 3(1): 98-100.

Colloid Milium

Amir Hossein Siadat MD¹, Fatemeh Mokhtari MD², Mohammad Ali Nilforoushzadeh MD³

Case Report

Abstract

Background: Colloid milium is a rare cutaneous condition with at least, three distinct subtypes, characterized clinically by the development of yellowish translucent papules or plaques on sun-exposed skin, and histologically by the presence of colloid in the dermal papillae.

Case Report: We present a man with multiple small papules on dorsum of his hands pathologically confirmed to be colloid milium. Colloid milium is more commonly observed in fair-skin patients and remain unchanged; however, our patient had dark skin type (Fitzpatrick skin type III) and lesions were increasing in summer and decreasing in winter.

Conclusion: This case emphasizes the close relationship between long-term sun exposure and adult colloid milium.

Keywords: Adult, Biopsy, Colloid, Milium, Hand, Male, Skin disease, Pathology

Citation: Siadat AH, Mokhtari F, Nilforoushzadeh MA. **Colloid Milium.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(317): 2343-8

*The English version of this article has been previously published in Adv Biomed Res: 2013, Vol 2.

1- Assistant Professor, Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran AND Skin Diseases AND Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan Iran

2- Assistant Professor, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan Iran

3- Associate Professor, Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran

Corresponding Author: Fatemeh Mokhtari MD, Email: f_mokhtari@resident.mui.ac.ir

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

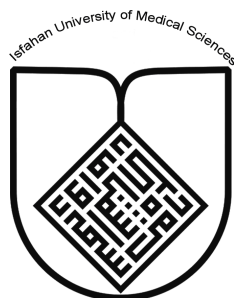
- a. **Article:** Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.
 - b. **Chapter in a book:** Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations 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. **Saied 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. 317, 2nd week, March 2015

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 indexes

- 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.