

## کاهش بیان ژن‌های Tie1 و VCAM-1 در شرایط بی‌وزنی: استراتژی جدید برای مطالعه و درمان بیماری تصلب‌شرائین

هما دادگر نیا<sup>۱</sup>، زهرا حاج ابراهیمی<sup>۲\*</sup>

### چکیده

**مقدمه:** VCAM-1 و Tie1 به ترتیب از مولکول‌ها و رسپتورهای سلول‌های اندوتلیالی هستند که می‌توانند در بیماری تصلب‌شرائین (آترواسکلروزیس) نقش داشته باشند. سلول‌های اندوتلیال به نیروهای مکانیکی و از جمله جاذبه حساس هستند، در این راستا مطالعات حاکی از تغییر شکل و عملکرد آن‌ها در شرایط بی‌وزنی است. به منظور بررسی تأثیر بی‌وزنی بر تصلب‌شرائین، بیان ژن‌های VCAM-1 و Tie1 در شرایط شبیه‌سازی شده بی‌وزنی بر روی سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان مورد مطالعه قرار گرفت. روش بررسی: روش مطالعه از نوع تجربی بود. در این مطالعه ابتدا سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان از بانک سلولی پاستور خریداری شد. سلول‌ها برای مدت ۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت در شرایط بی‌وزنی با استفاده از دستگاه شبیه‌ساز بی‌وزنی کلینواستت قرار گرفتند. از سلول‌های مذکور استخراج RNA صورت گرفت و تغییرات بیان ژن‌ها با تکنیک Real-time PCR بررسی گردید. نتایج: نتایج نشان داد که بی‌وزنی به طور قابل توجهی منجر به کاهش میزان بیان ژن VCAM-1 و Tie1 در نمونه‌های بی‌وزنی در مقایسه با نمونه‌های کنترل می‌شد ( $p < 0.05$ ) به طوری که پس از ۳ روز اعمال بی‌وزنی بیان این دو ژن بسیار کاهش می‌یافت. نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که بی‌وزنی دارای تأثیر مثبت در کاهش فاکتورهای ایجاد کننده تصلب‌شرائین است و می‌تواند به عنوان یک استراتژی جدید در درمان بیماری تصلب‌شرائین مورد استفاده قرار گیرد. همچنین از بی‌وزنی می‌توان برای مطالعه روند ایجاد و پیشرفت بیماری‌های عروقی نیز بهره برد.

واژه‌های کلیدی: بی‌وزنی، تصلب‌شرائین، سلول اندوتلیال ورید بند ناف انسان، VCAM-1، Tie1

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان

۲- استادیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم تحقیقات و فناوری، تهران

\* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۲۵۸۰۶۴۷۰، پست الکترونیکی: hajebrahimi@ari.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۵

## مقدمه

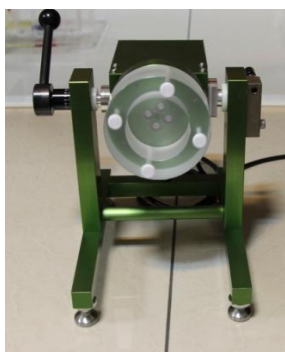
تحقیقات اخیر نشان داده است که التهاب نقش کلیدی در حالت‌های مختلف بیماری تصلب شرائین ایفا می‌کند. یکی از اولین پاسخ‌های سلولی قابل تشخیص در ایجاد ضایعات آترواسکلروز، چسبیدن لکوسیت‌ها به اندوتلیوم دیواره عروق در نقاط آناٹومیک خاص است. به مانند دیگر پاسخ‌های التهابی، لکوسیت‌ها از سد اندوتلیوم عبور کرده و در مناطقی در زیر اندوتلیوم، جایی که چربی‌ها منوسیت‌ها را مصرف کرده و سلول‌های فوم مانند ایجاد شده است؛ تجمع می‌یابند. با این وجود تصلب شرائین یک نوع خاص از پاسخ‌های التهابی است که در آن فراخوانده شدن لکوسیت‌ها در مناطق مستعد ضایعه، در شریان‌ها اتفاق می‌افتد که نتیجه آن تجمع لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها (به جزء گرانولوسیت‌ها) در زیر اندوتلیوم است. این فراخوانده شدن لکوسیت‌ها، به دلیل بیان مولکول‌های مخصوص چسبندگی لکوسیت‌ها توسط سلول‌های اندوتلیوم است (۶-۱). مطالعات اخیر حاکی از این است که مهاجرت لکوسیت‌ها حداقل به واسطه سه مسیر سیگنالی است. در مرحله اول endothelial P selectins (E-selectins) و VCAM-1 با مولکول‌های VCAM-1 که توسط سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود؛ واکنش می‌دهند (۸-۱۱). به دنبال آن وقایعی فعال می‌شوند که منجر به افزایش چسبندگی و متوقف شدن بیشتر سلول‌ها می‌شود. کموکین‌های ترشحی از بافت‌ها یا آن‌هایی که در سطح اندوتلیوم هستند؛ موجب انتقال سیگنال‌هایی می‌شوند که موجب فعال شدن چسبندگی اینترگرین‌ها می‌گردد. اعضای ابرخانواده ایمونوگلوبولین‌ها شامل مولکول‌های چسبندگی اندوتلیوم VCAM-1 و ICAM-1، میانجی‌گرهای چسبندگی هستند. در آخرین مرحله، کموتاکسی و مهاجرت از اندوتلیوم به بافت‌ها روی می‌دهد (۱۲،۱۳). مولکول VCAM-1 و ICAM-1 از نظر ساختار خیلی شبیه یکدیگر هستند. ولی بیان VCAM-1 بیشتر محدود به مناطق دارای ضایعه است در حالی که ICAM-1 در محل‌های خارج از ضایعه نیز بیان می‌شود (۱۴،۱۵). مولکول Tie1 رسپتور تیروزین کینازی است که در سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود و در بیماری‌های التهابی نقش دارد. مطالعات نشان داده است

که در بیماری‌هایی چون تصلب شرائین و آرتریت روماتوئید، بیان آن افزایش می‌یابد (۱۶). مطالعات اخیر نشان داده است که افزایش بیان Tie1 در سلول‌های اندوتلیال انسانی در محیط آزمایشگاه، منجر به فسفریلاسیون Tie1 و پاسخ‌های التهابی می‌شود (۱۷).

سلول‌های اندوتلیال عروق یک لایه نازک در سطح داخلی عروق را تشکیل می‌دهند و نقش مهمی در حفظ هموستازی عروق کوچک، تنظیم جریان خون و دیگر فرایندهای فیزیولوژیک سیستم قلبی عروقی ایفا می‌کنند. مطالعات نشان داده است که سلول‌های اندوتلیال به محرک‌های بیوشیمیایی پاسخ می‌دهند و بیان ژن‌ها در آن‌ها تغییر می‌کند (۱۸،۱۹) که این امر می‌تواند در فهم مکانیسم‌های هموستازی عروق به ما کمک کند. یکی از نیروهای فیزیکی که بر روی عملکرد سلول‌ها تأثیر می‌گذارد جاذبه است و تغییرات فیزیولوژیکی در فضانوردان در طول سفرهای فضایی گواهی بر این مطلب است (۲۰). سلول‌های اندوتلیال بسیار هتروژن هستند و رفتارهای متفاوتی از این سلول‌ها به هنگام کشت در شرایط بی‌وزنی مشاهده شده است (۲۱).

یکی از نیروهای محیطی که در طول حیات در تکامل موجودات زنده مؤثر بوده است؛ جاذبه است. تغییرات فیزیولوژیکی که فضانوردان در طول سفرهای فضایی تجربه می‌کنند؛ به خوبی بیانگر نقش نیروی جاذبه در تکامل موجودات زنده است. مطالعه سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی، هم می‌تواند به ما در فهم و حل مشکلات فضانوردان کمک کند و هم می‌تواند باعث افزایش علم زیست‌شناسی گردد (۲۲،۲۳). از آنجا که جاذبه متغیری است که در طول حیات بر ارگانیسم‌های زنده اعمال شده است؛ حذف آن می‌تواند منجر به روشن شدن بسیاری از سؤالات علم زیست‌شناسی و حتی بهبود کیفیت زندگی بشر بر روی زمین گردد. به طور مثال رشد سه‌بعدی سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی، در مهندسی بافت و ارگان بدون نیاز به داربست مهم است و یا مطالعه پوکی استخوان در فضانوردان در تولید داروهای جدید برای مشکلات پوکی استخوان در افراد میان‌سال مؤثر بوده است (۲۴،۲۵).

کشت روز بعد از چسبیدن سلول‌ها و بعد از آن به صورت یک روز درمیان تعویض می‌شد. سلول‌ها بعد از پاساژ ۳ در مطالعه وارد شدند. بافر HEPES در غلظت ۱/۲٪ (حجمی/حجمی) به محیط کشت اضافه شد تا از تغییرات pH به علت کمبود گاز CO<sub>2</sub> جلوگیری شود. نمونه‌ها به دو گروه کنترل و بی‌وزنی تقسیم شدند. نمونه‌های کنترل در شرایط ۱ جی کشت شدند و نمونه‌های بی‌وزنی برای مدت زمان دو ساعت، ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت در شرایط بی‌وزنی بر روی دستگاه کلینواست تک محوره که از دفتر سازمان ملل متحد در امور فضای خارج از جو (United Nations Office at Vienna; The Office for Outer Space Affairs) گرفته شد؛ قرار گرفت. شکل ۱ دستگاه کلینواست تک محوره را نشان می‌دهد. سرعت دستگاه در ۲۰ rpm تنظیم شد و میزان بی‌وزنی ۰/۰۰۱ جی بود. دستگاه در انکوباتور قرار گرفت و نمونه‌های کنترل نیز هم‌زمان با نمونه‌های بی‌وزنی در انکوباتور قرار گرفتند. پس از مدت زمان مناسب، سلول‌ها تریپسینه و جمع‌آوری شدند تا در مراحل بعد از آن‌ها RNA استخراج گردد.



شکل ۱: کلینواست تک محوره

#### استخراج RNA و ساخت cDNA

برای بررسی ژن‌های مورد نظر با استفاده از تکنیک RT-PCR، ابتدا RNA تام (Total RNA) از سلول‌ها، استخراج شد و پس از حصول اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده واکنش رونویسی معکوس انجام و cDNA تولید شده به عنوان نمونه DNA الگو برای انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. استخراج RNA تام از سلول‌ها توسط محلول (TRIZOL (Invitrogen, USA) مطابق با دستورکار شرکت سازنده صورت گرفت. خلوص و مقدار RNA استخراج شده، توسط

شرایط بی‌وزنی را می‌توان با پروازهای فضایی و یا سقوط آزاد ایجاد کرد. به دلیل محدودیت در سفرهای فضایی و کوتاه بودن طول بی‌وزنی ایجاد شده در سقوط آزاد، روش‌هایی برای شبیه‌سازی شرایط بی‌وزنی بر روی زمین توسعه یافته است که از بین آن‌ها دستگاه کلینواست تک محوره، وسیله مفیدی برای شبیه‌سازی بی‌وزنی بر روی سلول‌ها است (۲۲،۲۳).

یکی از انواع سلول‌های اندوتلیالی، سلول اندوتلیالی ورید بند ناف انسان است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر بیان ژن‌های VCAM-1 و Tie1 در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان (HUVEC) است. از آنجا که سلول‌های اندوتلیال نقش مهم و کلیدی در نگهداری و یکپارچگی عروق و رگ‌زایی ایفا می‌کنند؛ مطالعه آن‌ها در شرایط بی‌وزنی، هم می‌تواند برخی از مشکلات قلبی-عروقی فضاانوردان را توضیح دهد و هم در مطالعه و روشن شدن مکانیسم‌های ایجاد مشکلات عروقی چون تصلب شرایین و یافتن روش‌های درمانی برای آن‌ها به ما کمک کند. همچنین می‌توان از بی‌وزنی برای تولید عروق خونی جهت سلول درمانی بیماری‌های ایسکمیک و تصلب شرایین استفاده نمود (۲۶،۲۷).

#### روش بررسی

##### کشت سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان

این مطالعه از نوع تجربی بود. سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت کیت EGM-2-MV Bullet (Clonetics, USA) در فلاسک مناسب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ گاز CO<sub>2</sub> و در رطوبت مناسب تکثیر شدند. این کیت شامل محیط پایه اندوتلیال (Endothelial basal medium)، ۵٪ سرم جنین گوساله، فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (hEGF؛ human epidermal growth factor)، فاکتور رشد پایه انسانی نوترکیب (human growth factor-basic recombinant)، hFGF-B (vascular epidermal)، فاکتور رشد اپیدرمال عروق (VEGF؛ growth factor)، فاکتور رشد شبه انسولین ۱ (IGF-1؛ insulin-like growth factor 1)، اسید آسکوربیک، هپارین، هیدروکورتیزول و آنتی‌بیوتیک GA-1000 بود. محیط

ورژن ۳/۵ (Hastings Software, New York, USA) استفاده شد و توسط کمپانی TAG (Copenhagen A/S, Denmark) با خلوص بالا ساخته شد. به منظور جلوگیری از تکثیر DNA، برای هر ژن حداقل یکی از دو پرایمر در محل اتصال اگزون-اگزون طراحی شد. برای اطمینان از اختصاصیت محصولات PCR، تمامی پرایمرهای طراحی شده با ژنوم انسان blast شده و محصولات PCR توسط روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده تایید شدند. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل به صورت ۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای annealing/extension هم‌زمان بود. به منظور بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مطالعه شد. میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و تعیین  $\Delta\Delta CT$  و استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ارزیابی گردید.

الکتروفورز ژل آگارز و جذب نوری در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر صورت گرفت. سپس ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده با آنزیم RNase-free DNase (TAKARA, Japan) به منظور حذف هرگونه آلودگی با DNA ژنومی، تیمار شد و جهت سنتز cDNA از کیت PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis (TAKARA, Japan) استفاده شد. جهت ارزیابی سنتز cDNA از سنتز ژن GAPDH استفاده شد.

بررسی بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان با استفاده از تکنیک Real-time PCR جهت تکثیر ژن‌ها، واکنش Real time PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر از محصول cDNA، پرایمرهای مخصوص هر ژن (جدول ۱)، SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA, Japan) و دستگاه Rotor Gene 6000 Real Time PCR (Corbett, Australia) انجام شد. جهت طراحی پرایمرهای ژن VCAM-1 و Tie1 و همچنین ژن GAPDH به عنوان کنترل درونی از نرم‌افزار Gene Runner

جدول ۱: ترادف و سایر مشخصات پرایمرهای به کار گرفته شده در این مطالعه

نام ژن	شماره RefSeq	توالی پرایمر (۵ به ۳)	طول محصول PCR (bp)
VCAM-1	M60335.1	Forward: TGTC AATGTTGCC CCCCAGAG Reverse: CACAGGATTTTCGGAGCAGGA	۱۲۰
Tie1	BC038239.1	Forward: GGAGACAAGCACCATCATCCG Reverse: CTACTGTGTTGCTCCAGTCCC	۱۰۱
GAPDH	BT006893.1	Forward: AACAGCCTCAAGATCATCAGCA Reverse: GATGGCATGGACTGTGGTCAT	۱۲۰

مقدار  $P < 0.05$  به عنوان معیار معنی‌داری در تمام تست‌ها در نظر گرفته شد.

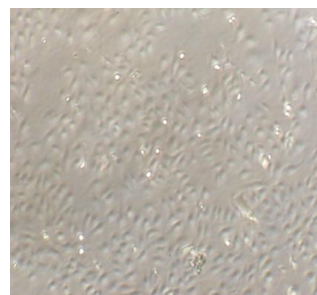
### نتایج

همان‌گونه که در بخش مواد و روش‌ها گفته شد؛ سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. در محیط EGM2 و در شرایط کاملاً استریل کشت و تکثیر شدند. شکل ۲ تصویر این سلول‌ها را بعد از پاساژ سوم نشان می‌دهد.

### تجزیه و تحلیل آماری

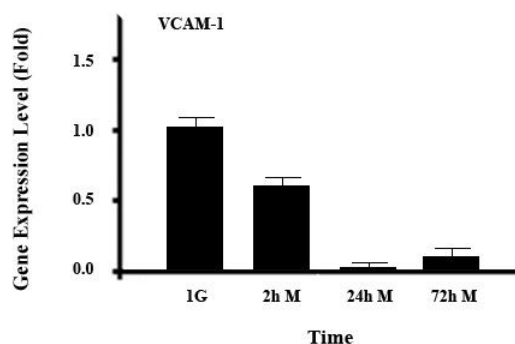
تمام آزمون‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۱۳ (SPSS Inc. Chicago, USA) انجام شد. تجزیه و تحلیل یافته‌های حاصل از سنجش‌های کمی (Real-time) میزان بیان ژن‌ها، در نمونه‌های بی‌وزنی و کنترل، با استفاده از نرم‌افزار REST 2008 (Representational State Transfer) (Corbett research Pty Ltd, Australia) انجام شد. اختلاف آماری بین گروه‌های کنترل و بی‌وزنی، با استفاده از تست Mann-Whitney بررسی شد. کلیه آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد و

سعی شد واکنش PCR تحت شرایط کاملاً یکسان برای تمام نمونه‌ها انجام گیرد. نمودار ۱ میزان بیان ژن VCAM-1 یا CD106 را در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های بی‌وزنی در زمان‌های ۲ ساعت، ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. همان‌گونه که در نمودار مشخص است؛ میزان بیان ژن VCAM-1 در شرایط بی‌وزنی بعد از ۲ ساعت به حدود نصف میزان بیان آن در نمونه‌های کنترل ۱ جی رسید. این روند کاهش ادامه داشته به طوری که بعد از ۱ روز قرار گرفتن سلول‌ها در بی‌وزنی، میزان بیان این ژن نزدیک به صفر شد و تا ۷۲ ساعت بیان آن نزدیک به صفر باقی ماند ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۲: سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان بعد از پاساژ سوم

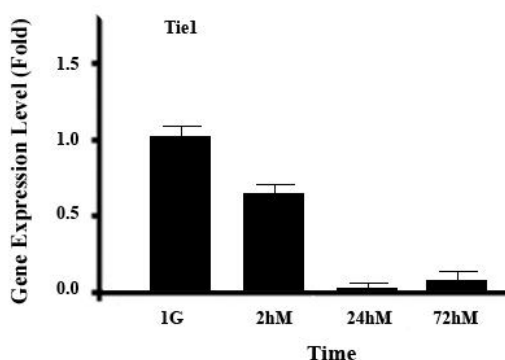
بیان ژن‌های مورد مطالعه توسط تکنیک Real-time PCR و به روش سایبرگرین انجام شد. برای تمامی نمونه‌ها ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت و



نمودار ۱: شدت بیان نسبی ژن VCAM-1 در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان، قبل از بی‌وزنی (ستون اول؛ 1G) و بعد از آن در زمان‌های ۲ ساعت (ستون دوم؛ 2hM)، ۲۴ ساعت (ستون سوم؛ 24hM) و ۷۲ ساعت (ستون چهارم؛ 72hM) بی‌وزنی

بی‌وزنی بعد از ۲ ساعت، به حدود نصف میزان بیان آن در نمونه‌های کنترل ۱ جی رسید. این روند کاهش ادامه داشته به طوری که بعد از ۱ روز قرار گرفتن سلول‌ها در بی‌وزنی، میزان بیان این ژن نزدیک به صفر شد و تا ۷۲ ساعت بیان آن نزدیک به صفر باقی ماند ( $P \leq 0.05$ ).

نمودار ۲ تغییرات بیان ژن Tie1 را در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان در شرایط کنترل ۱ جی و بی‌وزنی نشان می‌دهد. تغییرات بیانی این ژن نیز مشابه با بیان VCAM-1 بود و بی‌وزنی منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در بیان آن گردید. همان‌طور که مشاهده می‌شود؛ بی‌میزان بیان این ژن در شرایط



نمودار ۲: شدت بیان نسبی ژن Tie1 در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان و بعد از آن در زمان‌های ۲ ساعت (ستون دوم؛ 2hM)، ۲۴ ساعت (ستون سوم؛ 24hM) و ۷۲ ساعت (ستون چهارم؛ 72hM) بی‌وزنی

## بحث

یکی از انواع سلول‌های اندوتلیالی، سلول‌های اندوتلیالی ورید بند ناف انسان است. در مطالعه حاضر ما به تأثیر شرایط بی‌وزنی برای مدت ۲ ساعت، ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت بر روی بیان دو ژن VCAM-1 و Tie1 پرداختیم. برای ایجاد شرایط بی‌وزنی از دستگاه کلینواست تک محوره که از دفتر سازمان ملل متحد در امور فضای خارج از جو گرفته شده بود؛ استفاده کردیم. همان‌طور که گفته شد بیان ژن VCAM-1 در سلول‌های اندوتلیالی ورید بند ناف انسان پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی در دستگاه کلینواست، در حدود ۵۰٪ در مقایسه با نمونه‌های کنترل کاهش یافت. این کاهش بیان تا روز سوم ادامه داشت به گونه‌ای که در روز سوم بی‌وزنی، میزان بیان این ژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل نزدیک به صفر رسید.

مطالعات قبلی حاکی از این است که افزایش بیان ژن VCAM-1 در شروع بیماری تصلب شرائین و فراخوانده شدن لکوسیت‌ها به محل ضایعه تأثیر مثبت دارد. در سال ۱۹۹۸، Nakashima و همکاران نشان دادند که بیان ژن VCAM-1 در محل‌های ضایعه در عروق موش افزایش می‌یابد و این افزایش بیان منجر به پیشرفت ضایعه می‌گردد. به گونه‌ای که افزایش بیان این پروتئین، منجر به فراخوانده شدن مونوسیت‌ها به محل ضایعه و پیشرفت بیماری می‌گردد (۲۸). نقش VCAM-1 در شروع بیماری تصلب شرائین توسط مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۲۹). استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این پروتئین منجر به کاهش مونوسیت‌ها در محل ضایعه و در نتیجه کاهش اثرات بیماری شده که این خود تأکیدی بر نقش این مولکول در بیماری تصلب شرائین دارد (۳۰، ۳۱).

مطالعه ما همچنین نشان داد که بی‌وزنی منجر به کاهش بیان ژن Tie1 می‌گردد. مشابه با VCAM-1، بیان این ژن پس از ۲۴ ساعت به حدود نصف کاهش می‌یافت که این کاهش تا روز سوم ادامه داشت و به نزدیک صفر در مقایسه با نمونه‌های کنترل می‌رسید. مولکول Tie1 رسپتور تایروزین کینازی مخصوص

سلول‌های اندوتلیالی است که در افزایش بیان مولکول‌های VCAM-1، E-selectin و ICAM-1 نقش کلیدی دارد. هر سه این مولکول‌ها از میانجی‌گرهای ایجاد تصلب شرائین هستند که در شروع بیماری و پیشرفت آن مؤثر هستند (۱۱-۷)؛ بنابراین کاهش بیان Tie1 می‌تواند مانع از ایجاد سختی عروق گردد. در مورد این مولکول نیز نشان داده شده است که بیان آن در بیماری تصلب شرائین افزایش می‌یابد (۱۶).

در سال ۲۰۰۹، Chan و Sukhatme نشان دادند که مهار بیان ژن Tie1 منجر به کاهش توانایی اندوتلیوم در تحریک و فراخوانی مونوسیت‌ها می‌گردد (۳۲). آن‌ها نشان دادند که Tie1 یک فاکتور پیش التهابی در سلول‌های اندوتلیالی است. از آنجا که بیماری تصلب شرائین یک بیماری مزمن التهابی است نقش Tie1 در این بیماری از طریق شروع التهاب در اندوتلیوم است که در نهایت منجر به افزایش بیان مولکول‌های VCAM-1، E-selectin و ICAM-1 و فراخوانده شدن مونوسیت‌ها به لایه زیراندوتلیوم و ایجاد ضایعات و پلاک‌های آترواسکلروز می‌شود. علاوه بر مولکول‌های چسبندگی سلولی چون VCAM-1، کاهش و یا مهار ژن Tie1 ممکن است منجر به تغییر بیان ژن‌های بسیاری شود که در تصلب شرائین اهمیت دارند. به طور مثال اینترلوکین ۱ بتا یک فاکتور التهابی مهم است که در پیشرفت ضایعه‌های آترواسکلروز نقش مهمی دارد (۳۶-۳۳)؛ بنابراین کاهش بیان Tie1 می‌تواند منجر به کاهش بیان سایر فاکتورهای التهابی و از جمله اینترلوکین ۱ بتا گردد.

در مجموع مطالعه ما نشان داد که بی‌وزنی منجر به کاهش بیان ژن‌های VCAM-1 و Tie1 می‌شود. از آنجا که هردوی این مولکول‌ها از فاکتورهای مهم در شروع و پیشرفت بیماری‌های التهابی عروق و از جمله بیماری تصلب شرائین و فراخوانده شدن فاکتورهای التهابی به محل ضایعه است، این احتمال وجود دارد که بی‌وزنی تأثیر مثبت در روند بهبود بیماری تصلب شرائین و یا حتی جلوگیری از ایجاد آن داشته باشد. مطالعه بیان این ژن‌ها در سطح پروتئین و همچنین سایر فاکتورهای که در بیماری تصلب شرائین وجود دارد در سلول‌های اندوتلیالی در شرایط

### سیاسگزاری

این مقاله بر اساس بخشی از نتایج حاصل از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک با عنوان بررسی تأثیر شرایط فضا بر روی بیان مارکرهای سلول اندوتلیال ورید بند ناف انسان نگارش شده است که در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه زیست فضایی پژوهشگاه هوا فضا انجام شده است. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از مسئولین محترم پژوهشی آن مرکز ابراز می‌دارند.

بی‌وزنی شبیه سازی شده و مقایسه آن با شرایط بی‌وزنی واقعی در فضا و همچنین در فضاوردان، می‌تواند اطلاعات سودمندتری را در این زمینه در اختیار ما قرار دهد. به طور کلی بی‌وزنی یک محیط جدید برای انجام مطالعات زیستی و پزشکی بوده و مطالعه سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در مورد نحوه ایجاد و پیشرفت بسیاری از بیماری‌ها، در اختیار محققین قرار دهد و پاسخ بسیاری از سوالاتی را که در علوم وجود دارد؛ مشخص سازد.

### References:

- 1- Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. *Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis*. J Cell Biol 2015; 209(1): 13-22.
- 2- Spinelli FR, Pecani A, Conti F, Mancini R, Alessandri C, Valesini G. *Post-translational modifications in rheumatoid arthritis and atherosclerosis: Focus on citrullination and carbamylation*. J Int Med Res 2016; 44(1 suppl): 81-4.
- 3- Lawson JS. *Multiple Infectious Agents and the Origins of Atherosclerotic Coronary Artery Disease*. Front Cardiovasc Med 2016; 3:30.
- 4- Gerrity RG. *The role of the monocyte in atherogenesis I: transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions*. Am J Pathol 1981; 103(2): 181-90.
- 5- Faggiotto A, Ross R, Harker L. *Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I: changes that lead to fatty streak formation*. Arteriosclerosis 1984; 4(4): 323-40.
- 6- Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. *Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries*. Br Heart J 1988; 60(6): 459-64.
- 7- Springer TA, Cybulsky MI. *Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis*. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Volume 1. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; 1996: 511-37.
- 8- Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. *The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1*. J Cell Biol 1995; 128(6): 1243-53.
- 9- Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, Von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC. *Integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow*. Cell 1995; 80(3): 413-22.

- 10- Gerszten RE, Lusinskas FW, Ding HT, Dichek DA, Stoolman LM, Gimbrone MA Jr, Rosenzweig A. *Adhesion of memory lymphocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human vascular endothelial cells under simulated physiological flow conditions in vitro*. *Circ Res* 1996; 79(6): 1205-15.
- 11- Konstantopoulos K, Kukreti S, Smith CW, McIntire LV. *Endothelial P-selectin and VCAM-1 each can function as primary adhesive mechanisms for T cells under conditions of flow*. *J Leukoc Biol* 1997; 61(2): 179-87.
- 12- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes*. *J Exp Med* 1993; 178(2): 449-60.
- 13- Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA. *Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo*. *J Exp Med* 1994; 179(3): 1059-64.
- 14- Springer TA. *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. *Cell* 1994; 76(2): 301-14.
- 15- Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, Di-Chiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. *Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation*. *Circ Res* 1999; 85(2): 199-207.
- 16- Porat RM, Grunewald M, Globerman A, Itin A, Barshtein G, Alhonen L, Alitalo K, Keshet E. *Specific induction of tie1 promoter by disturbed flow in atherosclerosis-prone vascular niches and flow-obstructing pathologies*. *Circ Res* 2004; 94(3): 394-401.
- 17- Chan B, Yuan HT, Ananth Karumanch S, Sukhatme VP. *Receptor tyrosine kinase Tie-1 overexpression in endothelial cells upregulates adhesion molecules*. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371(3): 475-9.
- 18- Garcia-Cardena G, Comander j, Anderson KR, Blackman BR, Gimbrone MA. *Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(8): 4478-85.
- 19- McCormick SM, Eskin SG, McIntire LV, Teng CL, Lu CM, Russell CG, Chittur KK. *DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(16): 8955-60.
- 20- Cogoli A. *Theories and models of biological response to gravity: an introduction*. *Adv Space Res* 1992; 1(1): 5-6.
- 21- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP. *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. *Blood* 1998; 91: 3527-3561.
- 22- Liu Q, Zhou RL, Zhao X, Chen XP, Chen SG. *Acclimation during space flight: effects on human emotion*. *Mil Med Res* 2016; 3(1): 15.



- 23- Rea G, Cristofaro F, Pani G, Pascucci B, Ghuge SA, Corsetto PA, Imbriani M, Visai L, Rizzo AM. *Microgravity-driven remodeling of the proteome reveals insights into molecular mechanisms and signal networks involved in response to the space flight environment*. J Proteomics 2016; 137: 3-18.
- 24- Crawford-Young SJ. *Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis*. Int J Dev Biol 2006; 50(2-3): 183-91.
- 25- Hughes-Fulford M, Lewis ML. *Effects of microgravity on osteoblasts growth activation*. Exp Cell Res 1996; 224(1): 103-9.
- 26- Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity. Nature medicine. 1998 Aug 1; 4(8): 901-7.
- 27- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP. *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood 1998; 91(10): 3527-61.
- 28- Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998;18(5): 842-51.
- 29- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis*. J Clin Invest 2001; 107(10): 1255-62.
- 30- Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K. *Direct demonstration of P-selectin- and VCAM- 1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice*. Circ Res 1999; 84(11): 1237-44.
- 31- Huo, Y, Hafezi-Moghadam, A, Ley K. *Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions*. Circ Res 2000; 87(2):153-59.
- 32- Chan B, Sukhatme VP. *Suppression of Tie-1 in endothelial cells in vitro induces a change in the genome-wide expression profile reflecting an inflammatory Function*. FEBS Lett 2009; 583(6): 1023-8.
- 33- Dinarello CA. Interleukin-1. Cytokine Growth Factor Rev 1997; 8: 253-65.
- 34- Von der Thusen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, Biessen EA. *Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential*. Pharmacol Rev 2003; 55(1): 133-66.
- 35- Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y. *Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(4): 656-60.
- 36- Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F. *Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation 1998; 97(3): 242-4.

## ***Decrease of Tie1 and VCAM-1 Genes Expression in Microgravity Condition: New Strategy for Study and Treatment of Atherosclerosis Disease***

***Homa Dadgarnia (MSc)<sup>1</sup>, Zahra Hajebrahimi (PhD)\*<sup>2</sup>***

<sup>1</sup> *Department of Biology, Faculty of Basic Science, Azad University of Damghan, Damghan, Iran.*

<sup>2</sup> *Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran.*

***Received:*** 25 Jan 2016

***Accepted:*** 10 Sep 2016

### ***Abstract***

***Introduction:*** VCAM-1 and Tie1 are endothelial molecule and receptor, respectively that may participate in atherosclerosis disease. Endothelial cells are very sensitive to mechanical forces, including microgravity and the morphological and functional changes in this condition. To examine the effect of gravity on atherosclerosis disease, we analyzed the expression of VCAM-1 and Tie1 genes in microgravity condition in HUVEC cells.

***Methods:*** The research method was experimental. HUVEC cells purchased from Pastor Institute. We used a clinostat to simulate microgravity condition for 2, 24 and 72 hours. Real time PCR technique was used for gene expression analysis after extraction of RNA from cells.

***Results:*** Our results showed that microgravity led to a significant decrease in gene expression of VCAM-1 and Tie1 ( $p < 0.05$ ). This response remained similar after 72 hours of exposure to microgravity.

***Conclusion:*** It seems that weightlessness has a positive impact on reducing the factors causing atherosclerosis and can be used as a new strategy in the treatment of the atherosclerosis disease. Microgravity also can be used to study development and progression of vascular disease.

***Keywords:*** Atherosclerosis; Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC); Microgravity; VCAM-1; Tie1

### ***This paper should be cited as:***

Homa Dadgarnia, Zahra Hajebrahimi. *Decrease of tie1 and vcam-1 genes expression in microgravity condition: new strategy for the study and treatment of atherosclerosis disease.* J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(7): 555-64.

***\*Corresponding author: Tel: 09125806470, email: hajebrahimi@ari.ac.ir***