Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(107): 26-34

# The Effect of Microgravity Condition on Expression of VEGFR-2 Gene in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Homa Dadgarnia[1], Zahra Hajebrahimi[2]*

1- MSc Student of Genetics, Department of Biology, Azad University of Damghan, Damghan, Iran.
2- Assistant Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran.

Received:18 Dec 2015, Accepted: 12 Jan 2016

**Abstract**

***Background:*** Endothelial cells are very sensitive to mechanical force including microgravity and the morphological and functional changes in them are believed to be at the basis of weightlessness-induced cardiovascular deconditioning. It has been shown that the proliferation, migration, and morphological differentiation of endothelial cells play critical roles in angiogenesis. So far, the influence of microgravity on the ability of endothelial cells to foster angiogenesis remains to be explored in detail. The aim of this study was to investigate the effect of microgravity condition on VEGFR-2 and CD34 genes expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in angiogenesis.

***Materials and Methods:*** In this study, HUVEC cells were 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 for 72h leads to a significant increase (6 times compared with control group, $p<0.001$) in the VEGFR-2 gene expression. However, expression of CD34 did not change ($p>0.05$) with microgravity.

***Conclusion:*** Based on the results, microgravity has positive effect on angiogenesis and can be used to generate vascules for cell therapy of ischemic diseases and atherosclerosis.

***Keywords:*** Angiogenesis, Microgravity, Human Umbilical Vein Endothelial Cell

*Corresponding Author:
Address: P.O.Box:14665-834, 15th Alley (Havafaza), Mahestan St., Shahrake- Gharb, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran.
Email: hajebrahimi@ari.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۲ (شماره پیاپی ۱۰۷)، اردیبهشت ۱۳۹۵، ۳۴-۲۶

# تأثیر شرایط بی‌وزنی بر روی بیان ژن گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروق در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان

**همادادگر نیا[۱]، زهرا حاج ابراهیمی[۲*]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران.

۲- استادیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فن آوری، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۳

## چکیده

**زمینه و هدف:** سلول‌های اندوتلیال به نیروهای مکانیکی و ازجمله جاذبه حساس هستند و مطالعات حاکی از این است که تغییر در شکل و عملکرد این سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی عامل مشکلات قلبی است. مطالعات نشان داده است که شکل، تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال در رگ‌زایی موثر است. تاکنون تأثیر بی‌وزنی بر خصوصیات رگ‌زایی سلول‌های اندوتلیال به درستی مطالعه نشده است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر شرایط شبیه‌سازی شده بی‌وزنی بر روی سلول‌های اندوتلیال ورید بندناف انسان و بیان مارکر ژنی VEGFR-2 و CD34 در آنژیوژنز است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه ابتدا سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان از بانک سلولی پاستور خریداری شد. سلول‌ها با استفاده از دستگاه شبیه ساز بی وزنی کلینواستت برای مدت ۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت در شرایط بی‌وزنی قرار گرفتند. RNA سلول‌های مذکور استخراج شد و تغییرات بیان ژن ها با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که میزان بیان ژن VEGFR-2 در نمونه‌های بی‌وزنی نسبت به نمونه کنترل تا روز سوم به میزان ۶ برابر افزایش ($p<۰/۰۰۱$) می‌یابد، در حالی که بیان ژن CD34 بدون تغییر ($p>۰/۰۵$) باقی می‌ماند.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که بی‌وزنی تأثیر مثبتی در روند رگ‌زایی دارد و می‌تواند به عنوان محرکی در آزمایشگاه برای تولید عروق خونی جهت سلول درمانی بیماری‌های ایسکمیک و تصلب شرائین استفاده شود.

**واژگان کلیدی:** آنژیوژنز، بی‌وزنی، سلول اندوتلیال ورید بند ناف انسان

* **نویسنده مسئول:** ایران، تهران، وزارت علوم، تحقیقات و فن آوری، پژوهشگاه هوا فضا، شهرک غرب، خیابان مهستان، کوچه پانزدهم (هوافضا)، صندوق پستی ۸۳۴-۱۴۶۶۵

Email: hajebrahimi@ari.ac.ir

**مقدمه**

از آغاز عصر سفرهای فضایی تاکنون مشخص شده است که سفر به فضا با تغییرات فیزیولوژیک عمده‌ای در بدن انسان همراه است. عمده این تغییرات که ناشی از سازش فرد با شرایط محیط جدید است، در فضا مشکلی برای فضانوردان ایجاد نمی‌کند، اما پس از بازگشت به زمین فرد را با مشکلات عدیده‌ای مواجه می‌سازد. این تغییرات شامل کاهش توده استخوانی، آتروفی عضلات، کوچک شدن قلب و اختلال در عملکرد ریوی است(۱). یکی از مهم‌ترین مشکلاتی که فضانوردان در سفرهای فضایی با آن مواجه هستند مشکلات قلبی عروقی است. برخی از این مشکلات قلبی عروقی شامل اختلال در ریتم قلب، تغییر در اندازه قلب و عدم تحمل ارتوستاتیک می‌باشد(۲).

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 فرآیندهای فیزیولوژیک سیستم قلبی عروقی ایفا می‌کنند(۳). برخی از مطالعات حاکی از این است که تغییر در سلول‌های اندوتلیال عروق عامل اختلال در عملکرد قلب در شرایط بی‌وزنی است. این مطالعات بیان می‌کنند که مورفولوژی، عملکرد و بیان ژن‌های سلول‌های اندوتلیال در شرایط بی‌وزنی دچار تغییر می‌شود(۶-۴). سلول‌های اندوتلیال بسیار هتروژن هستند، به همین دلیل است که مطالعه تأثیر بی‌وزنی بر روی سلول‌های اندوتلیال و فرایند رگ‌زایی بسیار مشکل است. رفتارهای متفاوتی از این سلول‌ها به هنگام کشت در شرایط بی‌وزنی مشاهده شده است. کارلسون و همکاران متوجه شدند که تکثیر سلول‌های اندوتلیال به هنگام کشت در شرایط بی‌وزنی افزایش می‌یابد(۴). این درحالی است که موربیدلی و همکاران با کشت سلول‌های اندوتلیال آئورت خوک در شرایط بی‌وزنی به نتایج کاملا مغایری دست پیدا کردند(۶). از آن‌جا که سلول‌های اندوتلیال برای عملکرد عروق، التهاب و رگ‌زایی حیاتی هستند، بنابراین اختلال در این سلول‌ها یک عامل مهم تغییرات قلبی ناشی از بی‌وزنی می‌باشد(۷، ۸). به همین دلیل یک سری مطالعات به بررسی سلول‌های اندوتلیال در شرایط بی‌وزنی پرداخته‌اند.

مطالعه این سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی می‌تواند به درک بهتر مشکلات فضانوردان و یافتن راه حل‌هایی برای جلوگیری از این تغییرات و یا کند کردن روند تغییرات در فضانوردان کمک کند. هم‌چنین نتایج این‌گونه مطالعات می‌تواند مکانیسم‌های رگ‌زایی در بدن را نیز مشخص کند و برای تولید رگ در شرایط آزمایشگاه و پیوند رگ در بیماران قلبی عروقی و ایسکمیک استفاده شود. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که بیان مولکول‌های رگزا چون نیتریک اکساید (NO)، فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال عروق (VEGF) و اندوتلین-۱ در شرایط بی‌وزنی تغییر می‌کند، بنابراین شرایط بی‌وزنی بر روی رگ‌زایی تأثیرگذار است(۵، ۸، ۹).

شرایط بی‌وزنی را می‌توان با پروازهای فضایی و یا سقوط آزاد ایجاد کرد. طول بی وزنی ایجاد شده در اثر سقوط آزاد معمولا کوتاه‌تر از آن است که منجر به تغییر در رشد و تمایز سلول شود. به دلیل محدودیت در سفرهای فضایی، روش‌هایی برای شبیه‌سازی شرایط بی‌وزنی بر روی زمین توسعه یافته است که از بین آن‌ها دستگاه کلینواستت تک محوره وسیله مفیدی برای شبیه‌سازی بی‌وزنی بر روی سلول‌ها می‌باشد(۱۰).

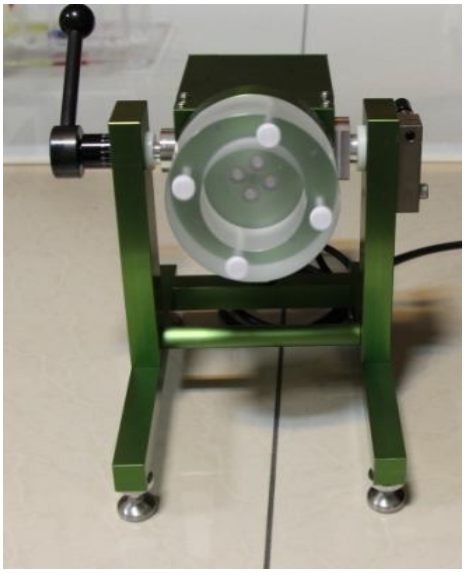
ژن VEGFR-2 (KDR) یکی از گیرنده‌های فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال عروقی است که از مارکرهای لایه مزودرم می‌باشد و اولین مارکری است که به هنگام تمایز سلول های اندوتلیال بیان می‌شود(۱۱). سلول‌های بنیادی جنینی که این مولکول را بیان کنند به سلول‌های اندوتلیال تمایز می‌یابند(۱۲، ۱۳). سلول‌های اندوتلیال، مولکول CD34 را در مراحل اولیه واسکولوژنزیز بیان می‌کنند. واسکولوژنزیز یکی از فرآیندهای تولید عروق خونی است که طی آن عروق خونی از سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال تولید می‌شوند. هم‌چنین مولکول‌های CD34 و CD31 از طریق سلول‌های اندوتلیال بالغ در بزرگ‌سالان بیان می‌شوند(۱۴).

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 VEGFR-2 و CD34 در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان (HUVEC) می‌باشد. نتایج این مطالعه هم در فهم بهتر مشکلات قلبی و عروقی فضانوردان در سفرهای فضایی موثر است و هم می‌تواند در توسعه روش‌های درمانی برای بیماری‌های ایسکمیک و پیوند رگ به کارگرفته شود.

## مواد و روش ها

### کشت سلول های اندوتلیال ورید بندناف انسان

در این مطالعه تجربی، سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در تعداد $۱-۲\times۱۰^{۶}$محیط کشت کیت EGM-2-MV Bullet (شرکت کلونتیکس، ایالات متحده امریکا) در فلاسک $۲۵cm^{2}$ (شرکت نانک، دانمارک) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز CO2 و در رطوبت مناسب تکثیر شدند. این کیت شامل محیط پایه اندوتلیال، ۵ درصد سرم جنین گوساله، فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (hEGF)، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه انسانی نوترکیب (hFGF-B)، فاکتور رشد اپیدرمال عروق (VEGF)، فاکتور رشد شبه انسولین ۱ (IGF-1)، اسید آسکوربیک، هپارین، هیدروکورتیزول و آنتی بیوتیک GA-1000 بود. محیط کشت روز بعد از چسبیدن سلول‌ها (یک روز بعد) و بعد از آن به صورت یک روز درمیان تعویض می‌شد. سلول‌ها بعد از پاساژ ۳ وارد مطالعه شدند. بافر HEPES در غلظت ۱/۲ درصد (حجمی/حجمی) به محیط کشت اضافه شد تا از تغییرات pH به علت کمبود گاز CO2 جلوگیری شود (به هنگام قرارگیری فلاسک بر روی دستگاه کلینواستت، درب فلاسک باید کاملا بسته باشد بنابراین امکان تبادل گاز با محیط انکوباتور وجود ندارد). نمونه‌ها به دو گروه کنترل و بی‌وزنی تقسیم شدند. نمونه‌های کنترل در شرایط ۱ جی (g) کشت شدند و نمونه‌های بی‌وزنی برای مدت زمان دو ساعت، ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت در شرایط بی وزنی بر روی دستگاه کلینواستت تک محوره که از دفتر سازمان ملل متحد در امور فضای خارج از جو گرفته شد قرارگرفتند. شکل ۱ دستگاه کلینواستت تک محوره را نشان می‌دهد. سرعت دستگاه در برابر با ۲۰ دور در دقیقه 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(شرکت گیبکو، آلمان) و جمع‌آوری شدند تا در مراحل بعد RNA از آن‌ها استخراج گردد.



**شکل ۱. کلینواستت تک محوره**

### استخراج RNA و ساخت cDNA

برای بررسی ژن‌های مورد نظر با استفاد از تکنیک Real-time-PCR، ابتدا RNA تام از سلول‌ها استخراج شد و پس از حصول اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده واکنش رونویسی معکوس انجام گرفت و cDNA تولید شده به عنوان نمونه DNA الگو برای انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. استخراج RNA تام از سلول‌ها از طریق محلول TRIZOL (اینویتروژن، ایالات متحده امریکا) مطابق با دستورکار شرکت سازنده صورت گرفت. خلوص و مقدار RNAی استخراج شده از طریق الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و جذب نوری در ۲۶۰ و

۲۸۰ نانومتر انجام شد. سپس ۲ میکروگرم از RNAی استخراج شده با آنزیم Rnase فاقد Dnas (شرکت تاکارا، ژاپن) به منظور حذف هرگونه آلودگی با DNAی ژنومی تیمار شد و جهت سنتز cDNA از کیت PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis استفاده شد (شرکت تاکارا، ژاپن). جهت ارزیابی سنتز cDNA از سنتز ژن GAPDH به عنوان ژن رفرانس (ژن خانه داری) 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)، (شرکت تاکارا، ژاپن) SYBR Premix Ex Taq II و دستگاه Rotor Gene 6000 Real Time PCR (شرکت کربت، استرالیا) انجام شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل به صورت ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون و ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای گسترش هم‌زمان بود. به منظور بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، از منحنی ذوب استفاده شد. میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و تعیین $\Delta\Delta CT$ و استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارزیابی گردید. جهت طراحی پرایمرهای ژن VEGFR-2 و CD34 و هم‌چنین ژن GAPDH به عنوان ژن رفرانس از نرم افزار Gene Runner نسخه ۳/۵ (Hastings Software ، نیویورک، ایالات متحده امریکا) استفاده شد که توسط کمپانی CopenhagenA/S)TAG، دانمارک) ساخته شد. برای اطمینان از اختصاصیت محصولات PCR، تمامی پرایمرهای طراحی شده با ژنوم انسان بلاست شده و محصولات PCR از طریق روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده تایید شدند.

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

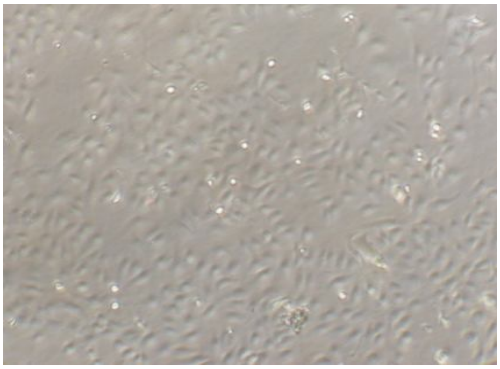
| نام ژن | شماره RefSeq | توالی پرایمر(۵ به۳) | طول محصول PCR (bp) |
|---|---|---|---|
| VEGFR-2 (KDR) | AF063658.1 | Forward: ATGACAACACAGCAGGAATCAGT<br>Reverse: TGTCCGTCTGGTTGTCATCTG | ۱۳۸ |
| GAPDH | BT006893.1 | Forward:AACAGCCTCAAGATCATCAGCA<br>Reverse: GATGGCATGGACTGTGGTCAT | ۱۲۰ |
| CD34 | AF523361.1 | Forward: CTTGCTGAGTTTGCTGCCTTC<br>Reverse: CATTGCCATGTTGAGACACAGG | ۱۷۹ |

## تحلیل آماری

تمام آزمون‌های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۳ (SPSS Inc، شیکاگو، ایالات متحده امریکا) انجام شد. تجزیه و تحلیل یافته‌های حاصل از سنجش‌های کمی (زمان واقعی) میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های بی‌وزنی و کنترل با استفاده از نرم‌افزار REST 2008 (نمایان گر حالت انتقال) ( Corbett research Pty Ltd، استرالیا) انجام شد. اختلاف آماری بین گروه‌های کنترل و بی وزنی با استفاده از آزمون من- ویتنی بررسی شد. کلیه آزمایشات ۳ بار تکرار شد و مقدار $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در تمام تست‌ها در نظر گرفته شد.

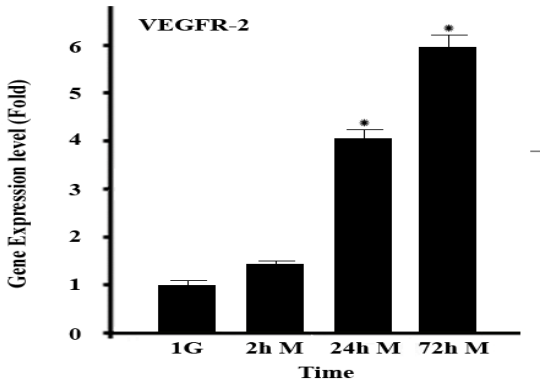
## یافته‌ها

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



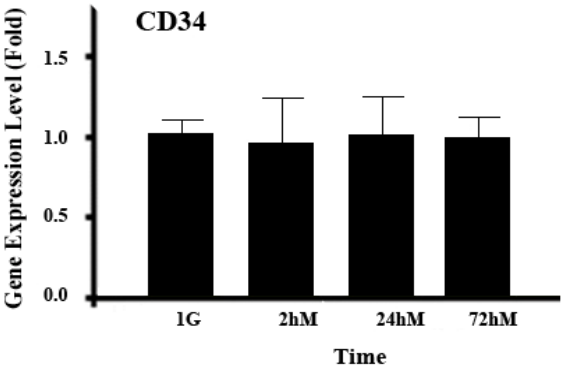
**شکل ۲. سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان بعد از پاساژ سوم، ۱۰۰x**

بیان ژن‌های مورد مطالعه از طریق تکنیک Real-time PCR و به روش سایبرگرین انجام شد. برای تمامی نمونه‌ها ژن GAPDH به عنوان ژن رفرانس مورد استفاده قرار گرفت و سعی شد واکنش PCR تحت شرایط کاملاً یکسان برای تمام نمونه‌ها انجام گیرد. نمودار ۱ میزان بیان ژن VEGFR-2 یا KDR را در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های بی‌وزنی در زمان‌های ۲ ساعت، ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. همان‌گونه که در این نمودار مشخص است، میزان بیان ژن VEGFR-2 در ۷۲ ساعت در مقایسه با ۲۴ ساعت ۱/۵ برابر و نسبت به ۲ ساعت ۳ برابر افزایش داشته است($p\leq ۰/۰۵$).




**نمودار۱. شدت بیان نسبی ژن VEGFR-2 در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان، قبل از بی‌وزنی (ستون اول، 1G) و بعد از آن در زمان‌های ۲ ساعت (ستون دوم، 2hM)، ۲۴ساعت (ستون سوم، 24hM) و ۷۲ ساعت (ستون چهارم، 72hM) بی وزنی؛ میزان بیان ژن VEGFR-2 در ۷۲ ساعت در مقایسه با ۲۴ ساعت ۱/۵ برابر و نسبت به ۲ ساعت ۳ برابر افزایش داشته است. h: ساعت و M: بی‌وزنی.**

نمودار ۲ تغییرات بیان ژن CD34 را درسلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان در شرایط کنترل ۱جی و بی وزنی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود بی‌وزنی تأثیری بر بیان ژن CD34 ($p\geq ۰/۰۵$) نداشته است. در این شکل، پس از ۲۴ ساعت بی‌وزنی، بیان ژن CD34 در مقایسه با نمونه کنترل هیچ تغییری نداشته و ثابت می‌باشد. این روند تا ۷۲ساعت (روز سوم) ادامه داشت.




**نمودار۲. شدت بیان نسبی ژن CD34 در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان و بعد از آن در زمان‌های ۲ ساعت (ستون دوم، 2hM)، ۲۴ساعت (ستون سوم، 24hM) و ۷۲ ساعت (ستون چهارم، 72hM) بی وزنی؛ بی وزنی تأثیری بر بیان ژن CD34 نداشته است. h: ساعت و M: بی وزنی.**

## بحث

حیات درطول تکامل در جاذبه ۱ جی گسترش پیدا کرده است. جاذبه یک فاکتور محیطی است که در طول تکامل ثابت بوده است و سازگاری با این نیرو به خوبی در سفرهای فضایی انسان مشهود است. از ابتدای مأموریت‌های فضایی تاکنون مشخص شده است که فضانوردان در مسافرت‌های فضایی در شرایط جاذبهٔ ناچیز با مشکلات زیادی چون تغییرات سیستم قلبی-عروقی، کاهش در حجم و تعداد سلول‌های خونی، آتروفی عضلات، پوکی استخوان و کاهش در واکنش پاسخ‌های سیستم ایمنی مواجه هستند. بسیاری از این تغییرات با بازگشت به زمین مجدداً تعدیل می‌گردد که این تعدیل برای برخی مشکلات به‌سرعت و برای برخی دیگر به صورت تدریجی و کند است. در سطح سلولی مشخص شده است که بی‌وزنی بر روی رشد و تکثیر

سلول، انتقال پیام و بیان ژن‌ها تأثیرگذار است(۱، ۱۵). مطالعه سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی هم می‌تواند در حل مشکلات فضانوردان به ما کمک کند و هم منجر به روشن شدن برخی از سوالات علم زیست شناسی و بهبود کیفیت زندگی بشر بر روی زمین گردد. در واقع بی‌وزنی چه به صورت واقعی در فضا و چه به صورت شبیه سازی شده بر روی زمین، محیط ایده آل برای رشد سه بعدی سلول و مهندسی بافت و ارگان است(۱۶).

از آن‌جا که سلول‌های اندوتلیال نقش مهم و کلیدی در نگهداری و یکپارچگی عروق و رگ‌زایی ایفا می‌کنند، مطالعه آن‌ها در شرایط بی وزنی هم می‌تواند برخی از مشکلات قلبی-عروقی فضانوردان را توضیح دهد و هم برای تولید رگ در شرایط بی‌وزنی جهت سلول درمانی بیماری‌های ایسکمیک و تصلب شرائین استفاده شود(۱۷).

یکی از انواع سلول‌های اندوتلیالی، سلول‌های اندوتلیالی ورید بند ناف انسان است. از این رو، در مطالعه حاضر به بررسی تأثیر شرایط بی‌وزنی برای مدت زمان ۲ ساعت، ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت بر روی بیان دو ژن VEGFR-2 و CD34 پرداختیم. برای ایجاد شرایط بی‌وزنی از دستگاه کلینواستت 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 VEGFR-2 در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی در دستگاه کلینواستت به میزان ۴ برابر در مقایسه با نمونه‌های کنترل افزایش یافت. این افزایش بیان تا روز سوم ادامه داشت، به گونه‌ای که در روز سوم بی‌وزنی، میزان بیان این ژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل به ۶ برابر رسید. از آن‌جا که مولکول VEGFR-2 یکی از گیرنده‌های فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF) است، این امر می‌تواند بیان‌گر این باشد که اثر VEGF که فاکتور تحریک کننده رگ‌زایی است در شرایط بی‌وزنی می‌تواند افزایش یابد. بنابراین این احتمال وجود دارد که بی‌وزنی محرک مناسبی برای رگ‌زایی در شرایط آزمایشگاهی باشد. این ژن اولین مارکری است که به هنگام تمایز سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود(۱۱) و سلول‌های بنیادی جنینی که این مولکول را بیان می‌کنند به سلول‌های اندوتلیال تمایز می‌یابند(۱۲).

نتایج مطالعه ما در رابطه با بیان ژن KDR با نتایج مطالعه چیو و همکاران در سال ۲۰۰۵ هم‌سو بود. آن‌ها بیان ژن VEGFR-2 را در شرایط بی‌وزنی و با استفاده از شبیه ساز بی وزنی RWV (لوله با دیواره چرخان) بررسی کرده، سلول‌های بنیادی خون ساز مشتق از بند ناف را در شرایط بی‌وزنی به سوی رگ تمایز دادند و مشاهده کردند که بی‌وزنی منجر به افزایش معنی‌دار($p<۰/۰۱$) در بیان این ژن می‌شود، به گونه‌ای که بیان این ژن در روز هفتم اعمال بی‌وزنی در مقایسه با نمونه کنترل به بیشترین میزان سطح خود می‌رسد(۱۸). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط سیاموالا و همکاران در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت نیز نشان داده شد که اعمال بی‌وزنی برای مدت زمان محدود ۲ ساعت محرک رگ‌زایی می‌باشد(۱۹، ۸).

هم‌چنین مطالعه ما نشان داد که بیان ژن CD34 در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف در شرایط بی‌وزنی هیچ تغییری نمی‌کند و پس از گذشت زمان ۲ ساعت، ۲۴ساعت و۷۲ ساعت مشابه با نمونه کنترل می‌باشد. مولکول CD34 از طریق سلول‌های اندوتلیال در مراحل اولیه واسکولوژنزیز بیان می‌شود. واسکولوژنزیز یکی از فرآیندهای تولید عروق خونی است که طی آن عروق خونی از سلول‌های پیش ساز اندوتلیال تولید می‌شوند. علاوه بر این، مولکول CD34 توسط سلول‌های اندوتلیال بالغ در بزرگ‌سالان نیز بیان می‌شود(۱۴). چیو و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که بیان ژن CD34 در شرایط بی وزنی در سلول‌های بنیادی ورید بند ناف انسان افزایش می‌یابد. علت اختلاف این مطالعه با مطالعه آن‌ها می‌تواند تفاوت در نوع سلول‌ها، نوع دستگاه شبیه ساز بی وزنی و مدت زمان مطالعه باشد. همان‌گونه که پیش‌تر گفته شد، آن‌ها از شبیه ساز بی وزنی RWV در مطالعه خود استفاده کردند و سلول‌ها را برای مدت زمان ۱۴ روز در شرایط بی‌وزنی کشت دادند و مشاهده کردند که بیان این ژن از روز ۷ افزایش می‌یابد.

بنابراین این احتمال وجود دارد که در مطالعه ما نیز درصورت افزایش مدت زمان بی‌وزنی، بیان آن افزایش یابد.

## نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت رگ‌زایی در رشد و تکامل عروق خونی جدید و هم‌چنین اهمیت تولید رگ جدید در پزشکی به منظور درمان بیماری‌هایی چون ایسکمی، تصلب شرائین و پیوند رگ، در این مطالعه به بررسی ژن‌های دخیل در این فرآیند در شرایط بی‌وزنی پرداختیم. رگ‌زایی در افراد سالم و بالغ پدیده نادری است که فقط به صورت موضعی و موقت و تحت شرایط فیزیولوژیک مشخص صورت می‌گیرد. سلول‌های اصلی دخیل در این فرایند سلول‌های اندوتلیالی هستند که عروق خونی را پوشانده و تقریباً تمام ساختمان مویرگ‌های خونی را تشکیل می‌دهند.

مهم‌ترین فاکتوری که نقش به سزایی در فرآیند رگ‌زایی ایفا می‌کند فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF) وگیرنده‌های آن است. در این تحقیق مشخص شد که VEGF-2 یا KDR که یکی از سه گیرنده VEGF می‌باشد، افزایش بیان قابل ملاحظه‌ای در رده سلولی HUVEC در شرایط بی‌وزنی دارد. ازطرف دیگر، بیان ژن CD34 در این شرایط در مقایسه با نمونه‌های کنترل تغییری را نشان نداد که علت این امر می‌تواند طول مدت زمان آزمایش بوده باشد. مطالعه این سلول‌ها در آینده در شرایط بی‌وزنی برای مدت زمان طولانی‌تر و هم‌چنین تمایز آن‌ها به عروق خونی و مطالعه بیان ژن‌ها در سطح پروتئین می‌تواند اطلاعات سودمندتری را در اختیار محققان قرار دهد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله براساس 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 هوافضا انجام شده است. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از مسئولان محترم پژوهشی آن مرکز ابراز می‌دارند.

## منابع

1. Crawford-Young SJ. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. International journal of developmental biology. 2006; 50(2/3):183-91.
2. Convertino VA. Status of cardiovascular issues related to space flight: implications for future research directions. Respiratory physiology & neurobiology. 2009; 169:S34-S7.
3. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood. 1998; 91(10):3527-61.
4. Carlsson SI, Bertilaccio MT, Ballabio E, Maier JA. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2003; 1642(3):173-9.
5. Infanger M, Ulbrich C, Baatout S, Wehland M, Kreutz R, Bauer J, et al. Modeled gravitational unloading induced downregulation of endothelin-1 in human endothelial cells. Journal of cellular biochemistry. 2007; 101(6): 1439-55.
6. Morbidelli L, Monici M, Marziliano N, Cogoli A, Fusi F, Waltenberger J, et al. Simulated hypogravity impairs the angiogenic response of endothelium by up-regulating apoptotic signals. Biochemical and biophysical research communications. 2005; 334(2):491-9.
7. Coupe M, Fortrat J, Larina I, Gauquelin-Koch G, Gharib C, Custaud M. Cardiovascular deconditioning: from autonomic nervous system to microvascular dysfunctions. Respiratory physiology & neurobiology. 2009; 169: S10-S2.
8. Griffoni C, Di Molfetta S, Fantozzi L, Zanetti C, Pippia P, Tomasi V, et al. Modification of proteins secreted by endothelial cells during modeled low gravity exposure. Journal of cellular biochemistry. 2011; 112(1):265-72.
9. Mariotti M, Maier JA. Gravitational unloading induces an anti-angiogenic phenotype in human microvascular endothelial cells.

Journal of cellular biochemistry. 2008; 104(1): 129-35.
10. Sutherland R, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. Cancer research. 1986; 46(10):5320-9.
11. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Bréant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997; 94(10):5141-6.
12. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature. 2000; 408(6808): 92-6.
13. Kordi MR, Nekouei A, Shafiee A, Hadidi V. The Effect of Eight Weeks High Intensity Aerobic Continuous and Interval Training on Gene Expression of Vascular Endothelial Growth Factor In Soleus Muscle of Healthy Male Rats. AMUJ. 2015; 18(101): 53-62.[Persian]
14. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K-i, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood–derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. The Journal of clinical investigation. 2000; 105(11): 1527-36.
15. Hughes-Fulford M, Lewis ML. Effects of microgravity on osteoblast growth activation. Experimental cell research. 1996; 224(1):103-9.
16. Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity. Nature medicine. 1998; 4(8):901-7.
17. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood. 1998; 91(10): 3527-61.
18. Chiu B, Wan JZ, Abley D, Akabutu J. Induction of vascular endothelial phenotype and cellular proliferation from human cord blood stem cells cultured in simulated microgravity. Acta astronautica. 2005; 56(9):918-22.
19. Siamwala JH, Majumder S, Tamilarasan K, Muley A, Reddy SH, Kolluru GK, et al. Simulated microgravity promotes nitric oxide-supported angiogenesis via the iNOS–cGMP–PKG pathway in macrovascular endothelial cells. FEBS letters. 2010; 584(15):3415-23.