

## بررسی تکثیر ژن‌های VH و VL از منبع RNA تک پلاسماسل انسانی

لعیا عصمتی، جلیل فلاح مهرآبادی، حمیده روحانی‌نژاد، معصومه بزاز

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، [jalil.fallah@gmail.com](mailto:jalil.fallah@gmail.com)

تاریخ دریافت: 93/6/25 تاریخ پذیرش: 93/8/10

### چکیده

مقدمه و هدف: نخستین نسل آنتی‌بادی‌های درمانی مونوکلونال با متشا موشی موجب برانگیختن پاسخ ایمونولوژیکی در بدن انسان می‌شود. استفاده از آنتی‌بادی درمانی کاملاً انسانی علاوه بر کاهش ایمونوژنیسیته، بیشترین کارایی را به دنبال خواهد داشت. امروزه جهت تهیه آنتی‌بادی انسانی تکنیک‌های نمایش فاژی و روش‌های مبتنی بر تک سلول B، مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش تکثیر ژن‌های VH و VL از منبع RNA پلاسماسل انسانی می‌باشد.

روش کار: از واکنش RT-PCR به منظور جداسازی و تکثیر قطعات ژن VH و VL از تک پلاسماسل غربالگری شده علیه آنتی‌ژن مورد نظر استفاده شد. در ابتدا با استفاده از بافر لیزکننده سلول، پلاسماسل‌ها لیز و جهت ساخت cDNA استفاده گردیدند. ژن‌های آنتی‌بادی انسانی با استفاده از cDNA حاصل از یک پلاسماسل و مجموعه پرایمرهای آنتی‌بادی تکثیر و شش جفت پرایمر جهت تکثیر نواحی متغیر زنجیره سنگین (VH) و سبک (VL) مورد استفاده قرار گرفتند. در این پرایمرها جایگاه برش آنزیم‌های محدودالانتر جهت کلون نمودن در وکتور مربوطه و توالی لیتکر جهت اتصال نواحی VH و VL قرار داده شد.

یافته‌ها: الکتروفورز طی واکنش PCR مشخص نموده که قطعات VH و VL به طول حدود 400bp به طور جداگانه تکثیر یافته‌اند. توالی‌های به‌دست آمده از ژن‌های آنتی‌بادی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI مشابهت 97 درصدی نشان داد. نتیجه‌گیری: پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش به گونه‌ای طراحی شدند که دارای توالی لیتکر جهت تهیه ScFv و جایگاه برش آنزیم‌های NcoI و NotI جهت کلونینگ قطعات VH و VL هستند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی، ScFv، پلاسماسل.

### مقدمه

آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی، روش نمایش فاژی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است (13). در این روش ابتدا همه تنوع ژن‌های آنتی‌بادی انسانی توسط واکنش RT-PCR، تکثیر و به صورت یک کتابخانه آنتی‌بادی ذخیره می‌شود، سپس با استفاده از واکنش الایزا، آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن مورد نظر غربالگری می‌شود. با روش نمایش فاژی این امکان فراهم می‌گردد که قطعات آنتی‌بادی نو ترکیب به منظور تهیه یک کتابخانه آنتی‌بادی انسانی با پرایمرهای متنوع ایجاد شود (7). این امر به دلیل تنوع موجود در ژن‌های آنتی‌بادی می‌باشد به همین سبب بهینه‌سازی شرایط PCR آن، بسیار مهم است (1). بنابراین پرایمرها باید به گونه‌ای طراحی و

ضرورت استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در مباحث درمانی و تشخیصی بسیار مهم می‌باشد. به همین دلیل، تاکنون در سرتاسر جهان تلاش‌های زیادی برای دستیابی به تکنولوژی‌های تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال صورت گرفته است (15). امروزه انواع آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از جمله موشی، کایمیریک و انسانی‌شده، بر علیه آنتی‌ژن‌های مختلف تهیه و تجاری سازی شده است. در موارد درمانی، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انواع موشی، کایمیریک و به میزان کمتر نوع انسانی شده دارای معایبی است که از میان آن‌ها می‌توان به برانگیختن پاسخ ایمنی در انسان و کارایی پایین آن‌ها در بدن اشاره کرد. از میان روش‌های تهیه

تک پلاسماسل ترشح کننده آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژن مورد نظر بوده است به گونه‌ای که این قطعات قابلیت تبدیل شدن به ScFv را طی یک واکنش PCR Overlap Extension داشته باشند.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه ابتدا پلاسماسل‌ها به روش فلوسایتومتری و به صورت تک سلول از خون محیطی فرد واکسینه شده جدا شدند. سپس از تک پلاسماسل‌هایی که آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن مورد نظر را ترشح می‌کردند، RNA استخراج گردید. برای این منظور ابتدا با استفاده از بافر لیزکننده سلول (شرکت Signosis)، پلاسماسل‌ها در شرایطی که RNA حفظ شود، لیز شدند، به این صورت که ابتدا پلیت 96 خانه‌ای حاوی پلاسماسل سانتیفریوژ شده و مایع رویی محیط کشت دور ریخته شد. سپس بافر لیزکننده سلول به هر چاهک حاوی پلاسماسل اضافه و پلیت به مدت 10 دقیقه روی یخ قرار گرفت. محتوی پلیت به میکروتیوپ 0/5 میکرولیتری منتقل و به مدت 10 دقیقه با سرعت 12000 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتیفریوژ و پس از انتقال مایع رویی به میکروتیوپ دیگر، RNA تولید شده به مدت 10 دقیقه در دمای 75 درجه سانتی‌گراد قرار داده و بلافاصله روی یخ خنک و از آن جهت ساخت cDNA استفاده شد. جهت سنتز cDNA، ابتدا 6 میکرولیتر RNA با پرایمرهای oligo dT و Random Hexamer مخلوط شده و به مدت 5 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد، سپس بلافاصله روی یخ قرار داده شد. سپس dNTP، و آنزیم RT به همراه RNasin به میکروتیوپ اضافه شده و به مدت یک ساعت در 42 درجه سانتی‌گراد و سپس 5 دقیقه در 70 درجه سانتی‌گراد (جهت غیرفعال سازی آنزیم) نگه داشته شد. به منظور تایید کیفیت cDNA سنتز شده، با استفاده از پرایمرهای Housekeeping واکنش PCR

انتخاب شوند که همه تنوع‌های ممکن ژن آنتی‌بادی را در برگیرند. برای دستیابی به این امر، دو مجموعه پرایمر مورد استفاده قرار می‌گیرد: مجموعه نخست شامل پرایمرهای اختصاصی ناحیه متغیر زنجیره سنگین (VH (Variable Heavy) و مجموعه دوم پرایمر-های اختصاصی ناحیه متغیر زنجیره سبک آنتی‌بادی (VL (Variable Light) می‌باشد (2). پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی آمینواسیدی ایمونوگلوبولین‌ها است که به سبب آن‌ها طیف وسیعی از ژن‌های ایمونوگلوبولین بازآراسته تکثیر شدند (20). امروزه تکنولوژی‌هایی بر پایه تک سلول B، این امکان را فراهم آورده است که توالی آنتی بادی از تک سلول ترشح کننده آنتی بادی اختصاصی، آنتی ژن مورد نظر به صورت طبیعی به دست آید (9). البته در این روش نیز تنوع پرایمرهای آنتی‌بادی بسیار مهم است (19). از میان آنتی‌بادی‌های نو ترکیب، ScFv به دلایلی که در ادامه اشاره می‌شود انتخاب مناسب‌تری می‌باشد. قطعات تک‌زنجیره‌ای ناحیه متغیر (ScFv)، یک قالب رایج در میان قطعات آنتی‌بادی نو ترکیب که با یک اتصال دهنده‌ی پپتیدی انعطاف‌پذیر از گسستگی اتصال نواحی VH و VL جلوگیری می‌نماید و آن‌ها به یک‌دیگر متصل می‌شوند (8). یکی از ویژگی‌های این اتصال-دهنده عدم تمایل به تشکیل ساختار ثانویه می‌باشد (14). اندازه‌ی ScFv ها نصف Fab ها می‌باشد و در نتیجه زمان پایداری کمتری در بافت‌های غیر هدف داشته و از خون پاک‌سازی و سریع تر عبور داده و نفوذ بهتری به بافت‌های توموری خواهند داشت و به دلیل نداشتن قطعه FC ایمنی‌زایی کمتری دارد (10). ScFv از نظر ژنتیکی پایدارتر بوده و برای تولید آن نیاز به کشت سلول در سطح گسترده و یا حیوانات آزمایشگاهی نمی‌باشد (6). هدف از این پژوهش بهینه سازی شرایط PCR جهت تکثیر ژن‌های VH و VL از منبع RNA

VH و VL توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) انجام و نتایج حاصل در پایگاه داده NCBI، BLAST شد. به منظور اتصال و همسانسازی قطعات VH و VL، توالی لینکر و جایگاه برش آنزیمی در پرایمرها قرار داده شده بود. جهت سنتز ScFv، لازم است که قطعات VH و VL را با استفاده از لینکر مذکور و واکنش Overlap Extension PCR به یکدیگر متصل نمود.

### نتایج

در این مطالعه ابتدا مطابق برنامه دمایی ذکر شده در بخش قبل، واکنش Housekeeping PCR جهت تایید کیفیت ساخت cDNA انجام شد (شکل 1). پس از تعیین کیفیت cDNA سنتز شده، با استفاده از پرایمر-های اختصاصی ژن آنتیبادی واکنش PCR انجام شد. پس از چندین مرحله تغییر در غلظت مواد مختلف و بهینه‌سازی شرایط واکنش، تک باند بودن هر یک از نمونه‌ها نشان‌دهنده حضور تک پلاسماسل می-باشد (شکل 2). پس از تعیین توالی قطعات ژنی VH و VL آنتیبادی، توالی‌های مذکور در پایگاه BLASTn بررسی شد. مشاهده 97٪ هم‌پوشانی میان توالی به-دست آمده از این پروژه و توالی‌های موجود در پایگاه NCBI تاییدی بر صحت انجام مراحل کار می-باشد (شکل 3).

انجام گرفت (جدول 1). مواد مطابق جدول شماره 2 به یک میکروتیوب اضافه شده و نمونه مطابق شرایط دمایی جدول 3 در ترموسایکلر قرار داده شد. در مرحله بعد با استفاده از مجموعه پرایمرهای اختصاصی ژن آنتیبادی، واکنش PCR بر روی cDNA انجام شد. در این پژوهش پرایمرها به گونه ای در نظر گرفته شدند که پرایمر Forward برای آمینواسید 1-9 دومین متغیر ایمونوگلوبولین (FR1) و پرایمر Reverse برای آمینواسید 115-121 CH1 (زنجیره سنگین) و برای آمینواسید 109-116 CLK طراحی شود (20، 16). هم-چنین توالی لینکر و جایگاه برش آنزیم در این مجموعه پرایمرها با توجه به وکتور مورد نظر افزوده شد. پرایمر-های پیشرو و پسرو که جهت تکثیر نواحی VH و VL مورد استفاده قرار گرفتند در جدول 4 مشخص شده‌اند. به منظور شناسایی تک پلاسماسل ترشح‌کننده آنتی-بادی، بر روی هر یک از نمونه‌ها 6 واکنش PCR انجام شد. بهینه غلظت مواد واکنش به صورت نمایان شده در جدول 5 می‌باشد. در ادامه، شرایط دمایی واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر در 30 سیکل به صورت جدول 6 تنظیم شد. پس از تکثیر نواحی VH و VL و خالص‌سازی محصولات واکنش PCR به‌وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز، تعیین توالی قطعات ژنی

جدول 1- توالی پرایمرهای Housekeeping

Name	Sequence(5' to 3')
hHPRT F	CTTCCTCCTCCTGAGCAGTC
hHPRT R	AACACTTCGTGGGGTCCTTT

جدول 2- غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام Housekeeping PCR

شاخص	Taq 2x master mix کلرید متبزیم	پرایمرها		Templet(cDNA)	آب	Total
		HPRT F	HPRT R			
حجم (μl)	12/5	1	1	3	7/5	25
غلظت (mM)	2	0/4	0/4	-	-	-

جدول 3- چرخه های حرارتی PCR

مرحله	چرخه	دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
denature	1	94	30
Annealing	1	58	30
Extension	1	72	60
Final extension	1	72	600

جدول 4- پرایمرهای اختصاصی تکثیر نواحی متغیر زنجیره سبک و سنگین آنتی بادی انسانی

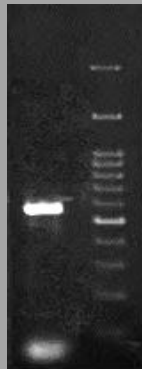
نام	توالی
F:VH1	GAATAGGCCATGGCG5AGGTGCAGCTGGTGCAGTCT
F:VH2	GAATAGGCCATGGCGCAGGT(AG)CAGCTGCAG(GC)AGTC
F:VH3	GAATAGGCCATGGCGGAGGTGCAGCTG5TGGAGTCT
F:IgG	CAGTCAAGCTTTGGGCCCTTGGTGGA
F: Kappa1-4	TACAGGATCCACGCGTAGACATC(GC)(AT)GATGACCCAGTCTCC
F: Kappa2	TACAGGATCCACGCGTAGATATTGTGATGAC(CT)CAG5CTCCA
F: Kappa3	TACAGGATCCACGCGTAGAAAATTGT56TGAC7CAGTCTCCA
R:Kc	CAGTCAAGCTTTGGGCCCTTGGTGGA

جدول 5- غلظت مواد مورد استفاده جهت تکثیر قطعات VH و VL با مجموعه پرایمرهای اختصاصی ژن آنتی بادی

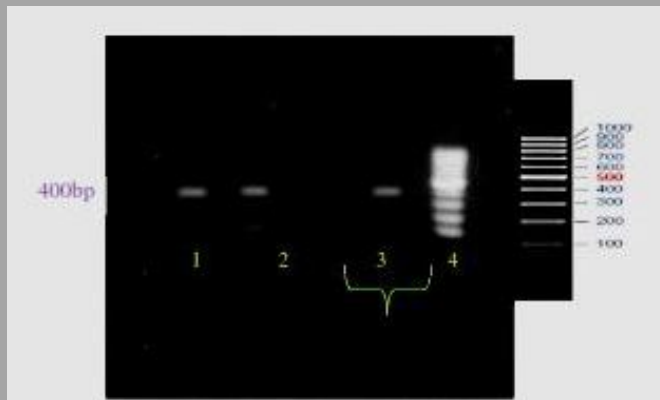
نام ماده	Taq 2x master mix کلرید متیزیم	پرایمر		Template(cDNA)	آب	Total
		VH/VL	IgG/ Kc			
حجم (µl)	12/5	1	1	2	8/5	25
غلظت (mM)	1/5	0/4	0/4	-	-	-

جدول 6- چرخه های حرارتی PCR

مرحله	چرخه	دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
denature	1	94	30
Annealing	1	66	30
Extension	1	72	30
Final extension	1	72	600



شکل 1- الکتروفورز نتیجه Housekeeping RT-PCR. ردیف 1: محصول PCR، ردیف 2: مارکر 100 bp plus



شکل 2- تصویر الکتروفورز نتیجه RT-PCR قطعات ژن آنتی‌بادی. ردیف 1 و 3، محصولات PCR ناحیه VH، ردیف 2 محصول PCR ناحیه VL، ردیف 4: مارکر 100bp. وجود 2 چاهک فاقد باند در هر یک از نمونه‌ها حاکی از وجود تک پلاسماسل در آنها می‌باشد.

شکل 3- نتایج BLASTn توالی VLk در پایگاه داده NCBI. 97٪ همپوشانی میان توالی حاصل از پژوهش انجام شده با توالی زنجیره سبک ژن آنتی‌بادی انسانی مشاهده شد.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Homo sapiens isolate NM15-CD19-L9-2 immunoglobulin kappa light chain variable region gene, partial cds	538	538	97%	2e-149	95%	<a href="#">DQ172499.1</a>
Homo sapiens IGK mRNA for immunoglobulin kappa light chain VLJ region, partial cds, clone:K37	532	532	97%	9e-148	95%	<a href="#">AB064078.1</a>
Homo sapiens IGK mRNA for immunoglobulin kappa light chain VLJ region, partial cds, clone:K8	529	529	99%	1e-146	94%	<a href="#">AB064049.1</a>
Homo sapiens mRNA for IgM kappa chain, partial cds, clone:HO702-001L	520	520	98%	7e-144	94%	<a href="#">AB084082.1</a>
Homo sapiens isolate P5_nB31_kLC immunoglobulin variable region-like mRNA, partial sequence	505	505	97%	2e-139	94%	<a href="#">HM996229.1</a>
Homo sapiens isolate NM15-CD19-012-6 immunoglobulin kappa light chain variable region gene, partial cds	505	505	97%	2e-139	94%	<a href="#">DQ172503.1</a>
Homo sapiens monospecific anti-ssDNA antibody light chain variable region mRNA, complementarily determining regions 1-3 and framework regions 1-4	505	505	92%	2e-139	95%	<a href="#">L39957.1</a>

### بحث و نتیجه گیری

تشخیصی و درمانی مناسب نبوده و سبب نفوذ ناکارآمد آنها و عدم نفوذ به سد خونی مغزی می‌گردد. هم‌چنین امکان دست‌ورزی ژنتیکی این آنتی‌بادی‌ها نیز بسیار محدود است. کلیه موارد فوق منجر به توسعه راهبرد-هایی جهت تولید قطعات آنتی‌بادی جایگزین و آنتی-بادی‌های نو ترکیب با اندازه کوچک‌تر شده است که بتوانند به آسانی انتخاب، تولید و با استفاده از تکنیک-

با وجود این که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی-کلونال هم‌چنان یکی از عوامل مهم در زمینه‌های تشخیصی و تحقیقاتی هستند، اما از لحاظ هزینه‌های گزاف تولید و زمان طولانی لازم برای تولید، فاکتورهای گران قیمتی به‌شمار می‌روند. به‌علاوه اندازه بزرگ این آنتی‌بادی‌ها برای برخی کاربردهای

تصادفی قطعات آنتی‌بادی احتمال جفت شدن غیر طبیعی قطعات VH و VL را افزایش می‌دهد. در صورتی که با استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر تک سلول B، ژن‌های آنتی‌بادی تنها از یک سلول جدا می‌شوند، در نتیجه احتمال ایجاد VH و VL‌های غیر هم‌جنس وجود نخواهد داشت و آنتی‌بادی حاصله دارای کیفیت بالاتری خواهد بود. نیز حجم کاری در این روش بسیار کمتر از تکنیک نمایش فازی می‌باشد (17)، Wang (4, 5) و همکارانش در سال 2000 با استفاده از واکنش Single cell RT-PCR، قطعات VH و VL به طول حدود 400bp را تکثیر نمودند (12). هم‌چنین روش Thomas Tiller و همکارانش در سال 2008 به روش Nested RT-PCR، قطعه VH به طول 450 bp و قطعات VL و VL به طول 510 و 405 جفت بازی تکثیر کردند. در این پژوهش پس از انجام PCR، قطعات VH و VL به صورت جداگانه تکثیر شدند. پرایمرهای مورد استفاده در این واکنش به گونه‌ای در نظر گرفته شده بودند که دو قطعه یکسان VH و VL با طول حدود 400-420 نوکلئوتید طی واکنش PCR تکثیر گردند (18). به منظور تولید قطعه ScFv لازم است که قطعات VH و VL به وسیله توالی لینکر، به یک دیگر متصل گشته و پس از هضم آنزیمی به درون وکتور بیانی مورد نظر وارد شوند.

های زیست‌شناسی مولکولی دست‌ورزی شوند. تاکنون ساختارهای آنتی‌بادی‌های نو ترکیب گوناگونی پیشنهاد شده‌است که از میان آن‌ها قطعات VHH، ScFv و VH بیشترین گسترش را در زمینه‌های تحقیقاتی و برنامه‌های کاربردی داشته‌اند (3). آنتی‌بادی‌های نو ترکیب مزایای بسیاری نسبت به آنتی‌بادی مونوکلونال دارند. اساس این مزایا بر پایه‌ی دو ویژگی می‌باشد: توانایی وارد کردن DNA آنتی‌بادی به ارگانیسمی مانند *E. coli* و استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و قطعات آنتی‌بادی به جای مولکول IgG کامل، به دلیل اندازه‌ی کوچک‌تر و عدم وجود ناحیه FC که اتصال غیر اختصاصی به گیرنده‌های FC سلولی را حذف کرده و از تاثیرات ناخواسته که به وسیله‌ی ناحیه FC آنتی‌بادی کامل ایجاد می‌شود، جلوگیری می‌کند (16). آنتی‌بادی‌های کاملاً انسانی به دلیل عدم برانگیختن پاسخ ایمنی در انسان، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (11). تکنولوژی نمایش فازی، روشی مناسب جهت تهیه آنتی‌بادی انسانی است که امروزه بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله مشکلاتی که استفاده از این روش را محدود می‌سازد حجم بالای نمونه‌های مورد غربالگری است. به گونه‌ای که در این کتابخانه‌ها اغلب، تعداد زیادی کلون ایجاد می‌گردد که غربالگری آن‌ها حجم کاری بالایی نیاز دارد و هم‌چنین ترکیب

## منابع

1. Abbas, A. K., Andrew, H. H., Shiv, Pillai. (2012). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Elsevier Health Sciences.
2. Andersen, P. S., Margit H. H., Lars, S. N., Martin, B. O. (2010). Method for linking sequences of interest. U.S. Patent, 7; 697-749.
3. Ario, de M. (2011). Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microb Cell Fact*, 10(1); 44-57.
4. Babcock, J. S., Leslie, K. B., Olsen, O. A., Salmon, R. A., Schrader, J. W. (1996). A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15); 7843-7848.
5. Coronella, J. A., Telleman, P., Truong, T. D., Ylera, F., Junghans, R. P. (2000). Amplification of IgG VH and VL (Fab) from

- single human plasma cells and B cells. *Nucleic Acids Research*, 28(20); e85-e85.
6. Deonarain, M. P. (2008). Recombinant antibodies for cancer therapy. 1123-1141.
7. de Kruijff, J., Arjen K. (2009). Human immunoglobulin repertoires against tetanus toxoid contain a large and diverse fraction of high-affinity promiscuous. *Journal of Molecular Biology*, 387(3); 548-558.
8. Holliger, P., Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9); 1126-1136.
9. Liao, H. X., Levesque, M. C., Nagel, A., Dixon, A., Zhang, R., Walter, E. (2009). High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods*, 158(1); 171-179.
10. Little, M., Kipriyanov, S. M. F., Le G., Moldenhauer, G. (2008). The mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology today*, 21(8); 364-370.
11. Lonberg, Nil. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology*, 23(9); 1117-1125.
12. Kantor, A. B., Merrill, C. E., MacKenzie, J.D., Herzenberg, L. A., Hillson, J. L. (1995). Development of the antibody repertoire as revealed by single-cell pcr of facs-sorted B-cell subsets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 764(1); 224-227.
13. Nimmagadda, Sridevi V., Shukra M. (2012). Aavula, neelakantam biradhar, samuel sula, rajendra lingala, dev chandran, and srinivasan alwar villuppanoor. "development of recombinant single-chain variable fragment against hepatitis a virus and its use in quantification of hepatitis a antigen. *Biologicals*, 40(4); 299-308.
14. Paul, J., Conroy, S. H., Paul, L., Richard, J. O. (2009). Antibody production, design and use for biosensor-based applications. In *Seminars in cell & Developmental Biology*, 20(1); 10-26. Academic Press.
15. Reichert, Janice M. (2012). Marketed therapeutic antibodies compendium. In *MAbs*, 4(3); 413.
16. Schatz, D. G. (2004). Recombination. *Immunological Reviews*, 200(1); 5-11.
17. Tiller, T. (2011). Single B cell antibody technologies. *New Biotechnology*, 28(5); 453-457.
18. Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M. C., Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *Journal of Immunological Methods*, 329(1); 112-124.
19. Tiller, T., Christian, E., Busse, H. W. (2009). Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells. *Journal of Immunological Methods*, 350(1); 183-193.
20. Welschhof, M., Terness, P., Kolbinger, F., Zewe, M., Dübel, S., Dörsam, H., Hain, C. (1995). Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes. *Journal of Immunological Methods*, 179(2); 203-214.
-





## تاثیر عصاره هیدرو الکلی برگ زیتون (*Olea europaea*) بر روی میزان گنادوتروپین ها، هورمون های جنسی و مراحل اسپرماتوژنز در موش صحرایی نر دیابتی

فاطمه معینی<sup>1</sup>، مختار مختاری<sup>2</sup>، اسفندیار شریفی<sup>1</sup>

1- کارشناس ارشد علوم جانوری، گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

2- دانشیار فیزیولوژی گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران. Mokhtar\_Mokhtary@Yahoo.Com

تاریخ پذیرش: 93/8/10

تاریخ دریافت: 93/6/27

### چکیده

مقدمه و هدف: افزایش قند خون منجر به بروز تغییرات ساختاری و عملکردی در فعالیت های تولید مثلی می گردد. در این تحقیق تاثیر عصاره هیدرو الکلی برگ زیتون (*Olea europaea*) بر میزان گنادوتروپین ها، هورمون های جنسی و نیز تغییرات بافت شناسی بیضه در مراحل اسپرماتوژنز موش صحرایی نر دیابتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی 48 سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 220-250 گرم به طور تصادفی به 6 گروه 8 تایی تقسیم و به مدت 21 روز مورد تیمارهای مختلف قرار گرفت. پس از تهیه نمونه های خونی میزان هورمون های LH و FSH، تستوسترون و دی هیدروتستوسترون با استفاده از روش رادیو ایمنوآسی (RIA) و تغییرات بافتی بیضه در مراحل اسپرماتوژنز بررسی گردید.

یافته ها: میزان هورمون های LH، FSH، تستوسترون و دی هیدروتستوسترون در گروه کنترل دیابتی کاهش معنی داری نسبت به گروه های کنترل و گروه شاهد داشت. هورمون های LH و تستوسترون در گروه تجربی 3 و 4 نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی داری نشان داد. افزایش هورمون های FSH و دی هیدروتستوسترون تنها در گروه تجربی 4 نسبت به گروه کنترل دیابتی معنی دار بود. بررسی بافت شناسی بیضه نشان داد که تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و لایدیگ در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه های کنترل و شاهد کاهش معنی داری دارد، در حالی که در گروه تجربی 4 که علاوه بر دیابتی شدن، عصاره 500 mg/kg در یافت کردند نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی داری داشت.

نتیجه گیری: عصاره برگ زیتون اثرات جانبی دیابت را بر میزان گنادوتروپین ها، هورمون های جنسی و فرآیند اسپرماتوژنز کاهش می دهد و باعث بهبود عملکرد محور هورمونی هیپوفیز - بیضه به دنبال القای دیابت می شود.

واژه های کلیدی: برگ زیتون، دیابت، گنادوتروپین، هورمون جنسی، اسپرماتوژنز، رت

### مقدمه

ادراز زیاد، کاهش وزن (34)، تاری دید و تغییر در متابولیسم لیپیدها، کربوهیدرات ها و پروتئین ها مشخص می شود که در دراز مدت مشکلات متعددی برای بیمار ایجاد می کند (20). اختلالات آندوکرینی علت اصلی ناباروری در مردان مبتلا به دیابت است (27). مطالعات نشان می دهد ناباروری در مردان، امروزه یک تهدید است و به دلیل هیپرگلیسمی به سرعت افزایش می یابد (3). هم چنین منجر به تولید اشکال اکسیژن

دیابت ملیتوس (DM) یکی از شایع ترین اختلالات آندوکراین است و تقریباً 6 درصد از جمعیت جهان را تحت تاثیر قرار می دهد (1). شواهد نشان می دهد هر دو نوع دیابت اثرات مضر بر عملکرد تولید مثلی مردان دارند (2) و علل شناخته شده اختلال در عملکرد جنسی و باروری مردان (هم در مردان و هم مدل های حیوانی) هستند (29). این بیماری با علائم متعددی از قبیل افزایش غلظت گلوکز پلاسما، احساس تشنگی،