

مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان  
دوره‌ی ۲۵، شماره‌ی ۱۰۸، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۵۶ تا ۶۷

## بررسی کاهش نرخ آپوتوز توسط والپروئیک اسید به عنوان یک فعال کننده‌ی STAT5 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی

غلامرضا بهرامی منجمی<sup>۱</sup>، دکتر مهرداد نوروزی نیا<sup>۲</sup>، دکتر سید حسن تنکابنی<sup>۳</sup>

نویسنده‌ی مسوول: گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران noruzinia@modares.ac.ir

دریافت: ۹۴/۱۰/۱۵ پذیرش: ۹۵/۲/۶

### چکیده

**زمینه و هدف:** شدت فنوتیپ بیماری آتروفی عضلانی نخاعی دارای ارتباطی معکوس با سطح بیان ژن SMN2 است ولی این رابطه مطلق نیست، به همین دلیل در حال حاضر هیچ درمان موثری برای این بیماری وجود ندارد. بنابراین به جز بیان ژن SMN2 دخالت برخی عوامل تعدیل کننده اضافی در شدت این بیماری پیشنهاد شده است. در این تحقیق، اثر والپروئیک اسید به عنوان یک داروی فعال کننده STAT5 نه تنها بر روی وضعیت بیان SMN2 بلکه بر روی بیان ژن STAT5A و همچنین نرخ آپوتوز مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** سطح بیان ژن‌های SMN2 و STAT5A به روش Real-time PCR و همچنین نرخ آپوتوز به روش فلوسایتومتری طی پاسخ به والپروئیک اسید در سه رده سلول لنفوسیتی مبتلا و دو کنترل نرمال مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** پس از تیمار با والپروئیک اسید و القای بیان ژن STAT5A، افزایش سطح رونوشت SMN2 با طول کامل و کاهش نرخ آپوتوز در رده‌های لنفوسیتی مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** از آنجاکه القای بیان ژن STAT5A با افزایش سطح رونویسی SMN2 همراه می‌باشد، پس نتایج این تحقیق دخالت ژن STAT5A را هم به عنوان عضوی از مسیر STAT5 و هم به عنوان یک ژن هدف در درمان مطرح می‌سازد.

**واژگان کلیدی:** آتروفی عضلانی نخاعی، والپروئیک اسید، Real-time PCR آپوتوز

### مقدمه

در نورون‌های حرکتی موجود در شاخ قدامی نخاع همراه است که نهایتاً به ضعف پیشرونده‌ی عضلانی و هیپوتونی ختم می‌گردد (۴). بر اساس علایم حرکتی و سن آغاز، آتروفی عضلانی نخاعی عموماً به چهار تیپ بالینی طبقه بندی می‌گردد: تیپ یک و شدید آن که طی شش ماه اول حیات

آتروفی عضلانی نخاعی پروکسیمال (SMA) شایع‌ترین فرم آتروفی‌های عضلانی نخاعی با فراوانی ناقلین ۱:۳۵ می‌باشد (۱-۳). آتروفی عضلانی نخاعی دومین اختلال آتوزومی مغلوب شایع در جوامع انسانی است که علت ژنتیکی مرگ و میر در نوزادان می‌باشد. این بیماری با آپوتوز

۱- دانشجوی دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی، دانشیار دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

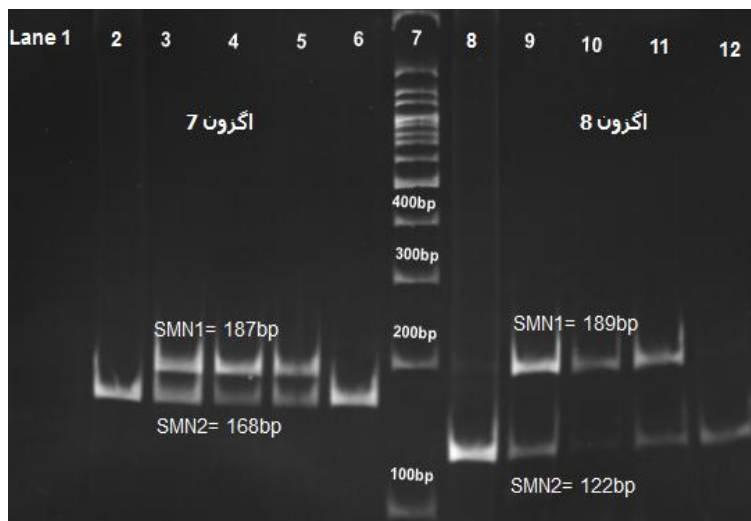
۳- فوق تخصص مغز و اعصاب کودکان، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

در ژنتیک نقش گسترده‌ی این تغییرات در بیماری‌زایی و اثر آنها بر روی شدت بیماری در بیماری‌های ژنتیکی و غیرژنتیکی می‌باشد (۹-۱۲). فعال کننده‌های متعددی برای ژن SMN2 شناسایی شده که یا توسط افزایش سطح رونویسی ناشی از تغییرات اپی‌ژنتیکی و یا تغییر در الگوی پیرایش، قادر به تولید مقادیری بالا از رونوشت SMN2 با طول کامل هستند. یکی از آنها داروی والپروئیک اسید (VPA) است که امروزه به عنوان یک داروی اپی‌ژنتیکی به صورت بالینی برای درمان صرع و اختلالات دو قطبی استفاده می‌گردد (۱۳). این دارو هم خاصیت مهارکنندگی هیستون داستیلازی دارد و هم می‌تواند مسیر STAT5 را القا نماید و به عنوان تنظیم کننده‌ی رونویسی ژن SMN2 عمل نماید (۱۶-۱۴). بر این اساس در این تحقیق علاوه بر وضعیت بیان ژن SMN2، بیان ژن STAT5A که جزئی از مسیر مولکولی STAT5 است به منظور شناسایی یک هدف درمانی مناسب دیگر برای بیماری آتروفی عضلانی نخاعی و همچنین نرخ آپوپتوز در رده‌های سلول لنفوسیتی نمونه‌های مبتلا و کنترل‌های نرمال طی پاسخ به والپروئیک اسید مورد بررسی قرار گرفت.

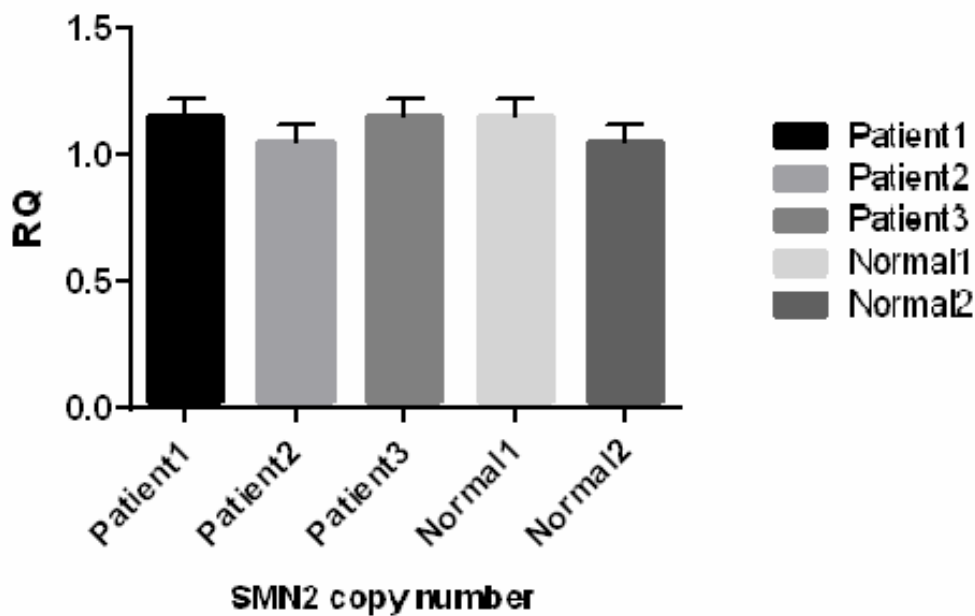
### روش بررسی

**بیماران و کشت سلولی:** پنج نمونه (سه بیمار مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی و دو کنترل نرمال) وارد این مطالعه‌ی تجربی (Experimental) شدند. بعد از جمع‌آوری نمونه‌های خون محیطی و استخراج DNA ژنومی به کمک دستورالعمل کیت Roche (High Pure PCR Templat Preparation Kit, Roche Applied Science, Germany)، تشخیص مولکولی بیماری آتروفی عضلانی نخاعی توسط بررسی حذف‌های هموزیگوت آگزون ۷ و آگزون ۸ ژن SMN1 با تکنیک PCR-RFLP انجام پذیرفت (۱۷) و از آغازگرهای مقاله‌ی استیگ و همکاران (۱۸) استفاده گردید (شکل ۱).

تشخیص داده می‌شود، و حدوداً ۵۰ درصد از مبتلایان به این بیماری را تشکیل می‌دهد، تیپ دو و حد واسط که علایم آن از شش تا هجده ماهگی ظاهر می‌گردد، تیپ سه خفیف و همچنین تیپ چهار بسیار خفیف که شروع آن مربوط به دوران بزرگسالی است (۵ و ۶). بیش از ۹۸ درصد مبتلایان به این بیماری در سطح مولکولی دارای حذف و یا جهش هموزیگوت در ژن بقای نورون حرکتی ۱ (SMN1) هستند. دو نسخه ژن SMN در ناحیه‌ی 5q13 ژنوم مستقر است: یکی SMN1 تلومری و دیگری SMN2 ساتنومری که دارای پنج اختلاف تک نوکلئوتیدی داخل آگزون‌هایشان می‌باشند که هر پنج تغییر در سطح پروتئین سازی خاموش است. اگرچه ژن‌های SMN1 و SMN2 پروتئین یکسانی را کدگذاری می‌کنند ولی SMN1 فقط رونوشت‌های با طول کامل (FL-SMN2) را تولید می‌کند. در حالی که به واسطه‌ی تبدیل سیتوزین به تیمین در موقعیت ششم آگزون هفت ژن SMN2، حدوداً ۹۰ درصد از رونوشت‌های حاصل از SMN2 توسط پیرایش متناوب، فاقد آگزون هفت (Δ7-SMN2) می‌باشند در صورتی که تنها ۱۰ درصد از رونوشت‌های این ژن دارای طول کامل هستند (۷ و ۸). علیرغم اینکه اثبات شده است شدت فنوتیپ آتروفی عضلانی نخاعی به طور معکوس با میزان بیان ژن SMN2 مرتبط است، ولی این ارتباط صددرصد نیست، از این رو تاکنون درمان موفقی برای این بیماری شناسایی نشده است. این وضعیت بیانگر دخالت یکسری عوامل ژنتیکی و یا اپی‌ژنتیکی در پاتوژنز و پاسخ به درمان بیماری آتروفی عضلانی نخاعی می‌باشد که شناسایی آنها می‌تواند قدمی موثر در کنار افزایش بیان ژن SMN2 جهت درمان بیماری محسوب گردد. امروزه ثابت شده است که تغییرات اپی‌ژنتیکی در درمان، پیش آگهی و تشخیص زودرس نقش داشته و به عنوان بیومارکر در پاسخ به درمان نیز کمک کننده است. علت کارایی زیاد این تغییرات



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵ درصد مختص PCR-RFLP برای ژن SMN1 به ترتیب از چپ به راست (ستون ۱ تا ۱۲)، کنترل منفی برای اگزون ۷، کنترل مثبت برای حذف اگزون ۷ ژن SMN1، نمونه‌ی نرمال حاوی اگزون ۷، نمونه‌ی نرمال حاوی اگزون ۷، نمونه‌ی نرمال حاوی اگزون ۸، نمونه‌ی بیمار با حذف هموزیگوت اگزون ۷، سایز مارکر 100bp، کنترل مثبت برای حذف اگزون ۸، نمونه‌ی نرمال حاوی اگزون ۸، نمونه‌ی نرمال حاوی اگزون ۸، نمونه‌ی نرمال حاوی اگزون ۸، نمونه‌ی بیمار با حذف هموزیگوت اگزون ۸ ژن SMN1.



شکل ۲: آنالیز تعداد نسخه‌های ژن SMN2 با متد  $2^{-\Delta\Delta CT}$

به کمک آغازگرهای مقاله‌ی اسمیت و همکاران تعیین گردید (۲۰ و ۱۹)، تا نهایتاً بعد از تیمار سلول‌ها با داروی والپروئیک

سپس تعداد نسخه‌های ژن SMN2 در هر پنج نمونه توسط Quantitative SYBR Real-time PCR و متد  $2^{-\Delta\Delta CT}$  و

انجام پذیرفت. در جدول ۱ اطلاعات پنج نمونه‌ی مورد مطالعه نشان داده شده است. هر سه نمونه‌ی مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی، درگیر حذف هموزیگوت در ژن SMN1 بوده‌اند که تعداد نسخه‌های ژن SMN2 نیز مطابق با شکل ۲ بین آنها برابر بوده است. هر دو کنترل نرمال هم دارای دو نسخه ژن SMN1 بوده‌اند (نتایج Real-time PCR آنها نشان داده نشده) است و هم تعداد نسخه‌هایی یکسان با نمونه‌های بیمار بوده‌اند.

اسید مشخص شود که اختلاف در بیان رونوشت SMN2 با طول کامل، مربوط به پاسخ‌های متفاوت به دارو است و نه مربوط به اختلاف در تعداد نسخه‌های ژن SMN2 بین نمونه‌های مختلف. چون همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است میزان کمیت سنجی نسبی (RQ) بین هر پنج نمونه تقریباً در یک سطح است که این وضعیت بیانگر تساوی تعداد نسخه‌های ژن SMN2 بین نمونه‌های مختلف می‌باشد. تمام واکنش‌های Real-time PCR در این تحقیق توسط سیستم (Applied Biosystems, Foster City, CA) ABI StepOne

جدول ۱: اطلاعات بالینی پنج نمونه‌ی مورد مطالعه

بیماران	نوع بیماری	سن بیمار	سن آغاز بیماری	تعداد نسخه SMN2	کنترل نرمال	سن	تعداد نسخه SMN2
۱	II	۲ سال	قبل از ۱ سالگی	۲	۱	۲ سال	۲
۲	II	۱/۵ سال	قبل از ۱ سالگی	۲	۲	۴ سال	۲
۳	I	۲/۵ سال	قبل از ۱ سالگی	۲			

(Paisley, Scotland, UK) کشت داده شدند و طی پاساژ سوم به اهداف مولکولی، مورد استفاده قرار گرفتند. آنالیز بیان ژن در سطح رونویسی به همراه نرخ آپتوز مطابق با مطالعه‌ی الر و همکاران بعد از ۴۸ ساعت تیمار رده‌ی سلول‌های لنفوسیتی با غلظت ۱ میلی‌مولار والپروئیک اسید انجام پذیرفت (۲۱).

واکنش رونویسی معکوس-واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (qRT-PCR): استخراج RNA از رده‌های سلولی تیمار شده و فاقد تیمار با والپروئیک اسید توسط کیت Roche (High Pure RNA Isolation Kit) انجام پذیرفت. غلظت RNA توسط اسپکتروفوتومتر (GeneQuant II) تعیین شد و سپس تک رشته cDNA از یک میکروگرم الگوی RNA توسط آغازگرهای هگزامر تصادفی سنتز شد (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis). آنالیز بیان رونوشت‌های SMN2 با طول کامل،

بعد از کسب رضایت نام‌هی کتبی از والدین افراد مبتلا و نرمال، مجدداً نمونه خون تازه از آنها جمع‌آوری گردید. رده‌های سلول لنفوسیتی طبق دستورالعمل استاندارد آماده شدند: لنفوسیت‌ها توسط فایکول از نمونه خون تام جدا شدند به طوری که بعد از جداسازی، باقی‌کوت طی دو مرحله توسط محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (PBS) مورد شستشو قرار گرفت. سپس رسوب موجود داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر ویروس ایشتاین بار (EBV)، ۵۰ میکرولیتر فیتوهم‌گلو‌تینین (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۵۰ میکرولیتر سیکلوسپورین (۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حل گردید. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با دی‌اکسیدکربن ۵ درصد انکوبه شدند تا به بقا برسند. رده‌های سلول لنفوسیتی نامیرا شده توسط ویروس ایشتاین بار به‌طور روتین داخل محیط کشت RPMI1640 به همراه سرم جنین گاوی ۱۰ درصد (Gibco BRL, Invitrogen Ltd, Foster City, CA)

STAT5A نیز برای اولین بار توسط پرایمرهایی جدید تکثیر یافتند، آغازگرها ابتدا توسط نرم افزار Primer3 طراحی شدند و سپس توسط برنامه Primer-Blast اختصاصی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

STAT5A و  $\Delta 7$ -SMN توسط ژن HPRT به‌عنوان ژن کنترل داخلی و به کمک آغازگرهای موجود در جدول ۲ صورت پذیرفت. رونوشت SMN2 با طول کامل توسط یک آغازگر رفت جدید طراحی شده با یک باز غیر مکمل در ناحیه ۲- پایانه 3 جهت افزایش اختصاصیت و رونوشت

جدول ۲: آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر رونوشت‌های SMN2 با طول کامل،  $\Delta 7$ -SMN، STAT5A و HPRT

FL-SMN2.F	CTATCATACTGGCTATTATATGGGTGTT
FL-SMN2.R	TCTATGCCAGCATTCTCCTTAATT
$\Delta 7$ -SMN.F	GTCCAGATTCTCTTGATGAT
$\Delta 7$ -SMN.R	GCCAGCATTTCATATAATAG
STAT5A.F	CCCTCTCATGAATGTTTGAATCC
STAT5A.R	CCTTACTAAACTCACACACGACC
HPRT.F	TGGACTAATTATGGACAGGACTGAAC
HPRT.R	GCACACAGAGGGCTACAATGTG

والپروئیک اسید به‌عنوان نمونه‌ی کنترل استفاده شد. فلوسایتومتری: بعد از تیمار رده‌های سلولی با والپروئیک اسید، غلظتی مشخص (میلی لیتر/ $10^6 \times 1$ ) از سلول‌ها جداسازی گردیدند و به منظور اندازه‌گیری نرخ آپوپتوز اولیه توسط Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) و Propidium iodide (PI) به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی رنگ آمیزی شدند. نرخ آپوپتوز توسط فلوسایتومتر Franklin Becton-Dickinson (Franklin Becton-Dickinson Lakes, NJ, USA) و نرم‌افزار ModFit LT بررسی گردید. آنالیز آماری: برای آنالیز نتایج Real-time PCR از روش paired t- test و همچنین unpaired t- test استفاده گردید تا هرگونه تغییری در میزان رونویسی و همچنین آپوپتوز مشخص گردد. نمودارهای میله‌ای نشان دهنده‌ی میانگین میزان بیان و یا آپوپتوز ( $\pm$ SEM) هستند (Graph Pad Prism program version 6.07). نتایج با P-value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شدند.

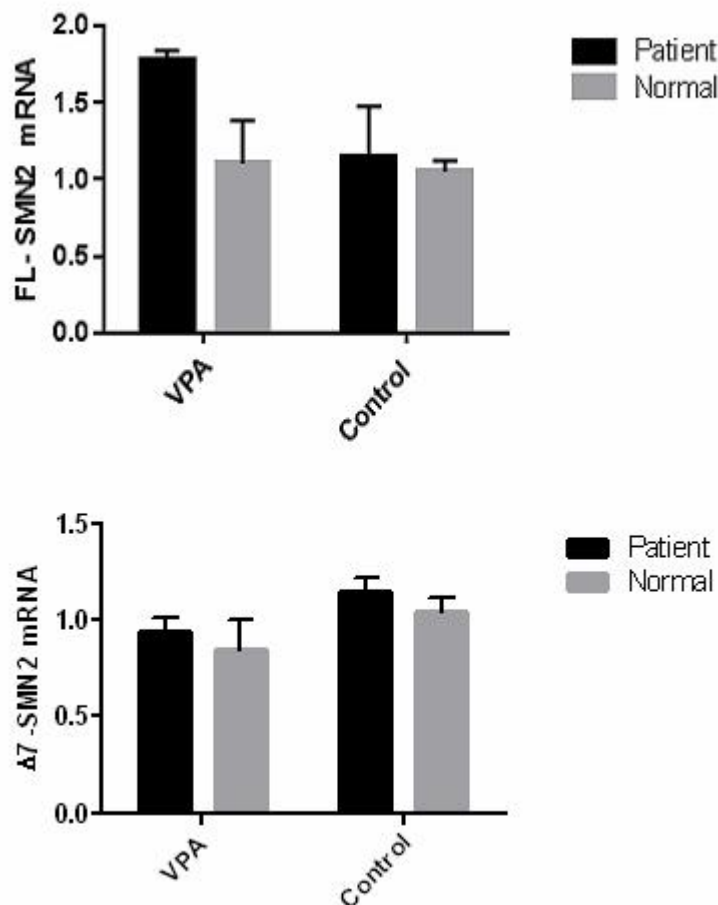
Real-time PCR مبتنی بر رنگ SYBR green در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر حاوی ۰/۱ میکرومولار از هر پرایمر، ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۵ میکرولیتر از ماستر میکس (Amliqon, RealQ Plus 2x Master Mix Green, High Rox) و ۲۰ نانوگرم الگوی cDNA به صورت سه بار تکرار انجام شد. شرایط دمایی انجام واکنش عبارت بود از یک دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه. راندمان تکثیر توسط ترسیم منحنی استاندارد از روی سریال رقت‌های مختلف cDNA و طبق فرمول  $E = 10 (1/- \text{slope}) - 1$  ارزیابی گردید که راندمان تکثیر تمام ژن‌ها باید در محدوده‌ی ۹۰-۱۰۰ درصد واقع می‌شد (شیب ۳/۳۲- معادل است با راندمان تکثیر ۱۰۰ درصد) (۲۲). جهت ارزیابی نسبی بیان رونوشت‌ها، از متد  $2^{-\Delta\Delta CT}$  استفاده گردید و جهت نرمالیزاسیون نتایج نیز، از رده‌ی سلولی فاقد تیمار با

## یافته ها

## سنجش نسبی رونوشت‌های SMN2 و STAT5A طی

پاسخ به والپروئیک اسید: سنجش بیان ژن روی رده‌ی سلول لنفوسیتی سه فرد مبتلا (با حذف هموزیگوت ژن SMN1) و دو کنترل نرمال (با دو نسخه SMN1) به منظور ارزیابی اثر والپروئیک اسید بر روی میزان رونویسی هر دو رونوشت SMN2 یعنی SMN2 با طول کامل و  $\Delta 7$ -SMN2 و

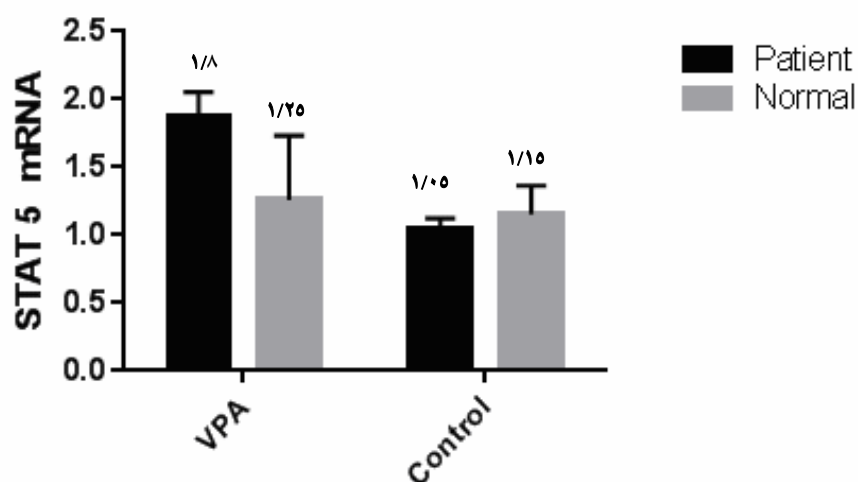
همچنین ژن STAT5A در شرایطی که، راندمان تکثیر هر سه رونوشت در محدوده ۹۰-۱۰۰ درصد است، صورت پذیرفت. به جز یک رده سلولی مبتلا در سایر نمونه‌ها حداکثر در حدود ۱/۷ برابر افزایش در سطح رونوشت SMN2 با طول کامل شناسایی گردید (شکل ۳a)، در حالی که این افزایش برای رونوشت  $\Delta 7$ -SMN2 وجود نداشت (شکل ۳b).



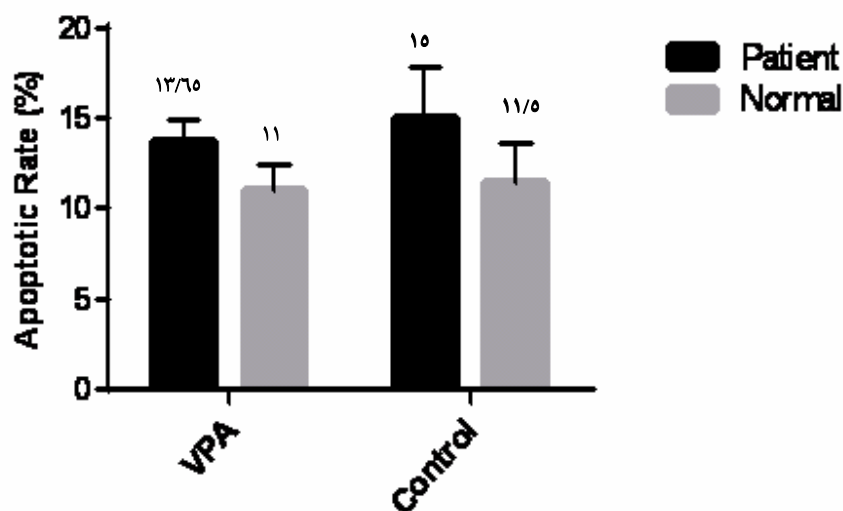
شکل ۳: القای رونویسی ژن SMN2 توسط والپروئیک اسید در رده‌های سلول لنفوسیتی بیمار. نمودارهای میله‌ای نشان دهنده رونوشت SMN2 با طول کامل (FL-SMN2) (3a) و رونوشت  $\Delta 7$ -SMN2 (3b) در نمونه‌ی تیمار شده با دارو (Valproic Acid) و فاقد تیمار (Control) می‌باشند. رونوشت SMN2 با طول کامل افزایش حدوداً ۱/۷ برابری را تنها در رده سلول‌های بیمار (و نه نرمال) نشان داد ( $t$ -test ( $P < 0/05$ )). در حالی که رونوشت  $\Delta 7$ -SMN2 چه در نمونه‌های بیمار و چه نرمال با هیچ گونه افزایشی همراه نبود.

نشده است. بر این اساس تیمار رده‌های سلولی با والپروئیک اسید نشان داد که این دارو در نمونه‌هایی که با افزایش سطح رونوشت SMN2 با طول کامل همراه بودند قادر به افزایش ۱/۸ برابری سطح رونویسی ژن STAT5A نیز می‌باشد (شکل ۴). این نتایج تایید کننده نقش تنظیمی مسیر STAT5 در فعال شدن ژن SMN می‌باشد.

مطابق با تحقیقات پیشین، نتایج این مطالعه نیز نشان دهنده‌ی آن است که داروی والپروئیک اسید نه تنها میزان پایه رونویسی از ژن SMN2 را افزایش می‌دهد بلکه الگوی پیرایش این ژن را نیز تغییر می‌دهد (۲۳). طبق اطلاعات ما، آنالیز رونویسی ژن STAT5A در نمونه‌های مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی طی تیمار با والپروئیک اسید تاکنون انجام



شکل ۴: القای رونویسی ژن STAT5A توسط والپروئیک اسید (Valproic Acid) در رده‌های سلول لنفوسیتی بیمار. رونوشت STAT5A افزایش حدوداً ۱/۸ برابری را در رده سلول‌های بیمار (و نه نرمال) نشان داد.



شکل ۵: کاهش نرخ آپوپتوز توسط تیمار با والپروئیک اسید در رده‌های لنفوسیتی بیمار و نه نرمال ( $P < 0.05$ ). *t-test*.

افزایش ۱/۹ برابری در سطح SMN در رده سلول لنفوسیتی بیماران بوده است. سدیم بوتیرات نیز در سطح رده‌ی سلول لنفوسیتی بیماران با مکانیسم افزایش رونویسی و اصلاح پیرایش قادر به افزایش حدوداً ۳ برابری سطح SMN2 می‌باشد (۳۰). همچنین مشخص شده که داروی مورد تایید سازمان مدیریت غذا و دارو (FDA) به نام ۴- فنیل بوتیرات به واسطه‌ی فعالسازی رونویسی ژن SMN2 قادر به افزایش ۱/۹ برابری سطح SMN2 می‌باشد (۳۱). والپروئیک اسید نیز با افزایش میزان رونویسی و اصلاح الگوی پیرایش، قادر به افزایش حدوداً ۴ برابری سطح SMN2 در نمونه فیبروبلاست به دست آمده از مبتلایان می‌باشد (۲۳). مکانیسم دیگر جهت افزایش SMN2، فعالسازی مسیر انتقال پیام STAT5 است (۱۴). یکی از فعال کنندگان مسیر STAT5 والپروئیک اسید می‌باشد. علیرغم تلاش‌های متعدد در زمینه افزایش سطح SMN2 تاکنون هیچ درمان موفقی برای این اختلال شناسایی نشده و این نشان دهنده‌ی آن است که یکسری عوامل تعدیل کننده‌ی دیگر علاوه بر افزایش بیان SMN2 در کنترل شدت بالینی و درمان پذیری بیماری SMA دخالت دارند. از این رو در این تحقیق تیمار رده‌های سلولی با والپروئیک اسید افزایش معنی‌دار رونوشت SMN2 با طول کامل را القا نمود، به طوری که حتی میزان این القا در نمونه‌های بیمار بیشتر از نرمال بود. در مقابل، میزان رونوشت  $\Delta 7$ -SMN2، هم در نمونه‌ی بیمار و هم در نمونه‌ی سلول نرمال با کاهش همراه بوده است، که این وضعیت نشان دهنده‌ی اصلاح الگوی پیرایش به نفع رونوشت SMN2 با طول کامل توسط والپروئیک اسید می‌باشد. ضمناً این میزان تغییر در الگوی پیرایش تقریباً بین نمونه‌های بیمار و نرمال مشابه بوده است. این نتایج با یافته‌های تحقیقات پیشین در زمینه‌ی درمان آتروفی عضلانی نخاعی توسط والپروئیک اسید کاملاً مطابق می‌باشد. همزمان توانایی والپروئیک اسید جهت فعالسازی ژن STAT5A به عنوان بخشی از مسیر انتقال پیام STAT5 نیز ردیابی گردید و

ارزیابی نرخ آپوپتوز طی پاسخ به والپروئیک اسید: نرخ آپوپتوز توسط رنگ آمیزی دو گانه با Annexin-V/Propidium iodide (PI) سنجش شد که در میزان آپوپتوز سلول‌های بیمار تیمار شده با دارو نسبت به سلول‌های بیمار فاقد تیمار (Control) کاهش معنی داری وجود داشت (شکل ۵).

## بحث

در ۹۶ درصد از تمام مبتلایان به آتروفی عضلانی نخاعی پروکسیمال، از دست رفتن هموزیگوت عملکرد ژن عامل بقای نورون حرکتی ۱ (SMN1)، ناشی از حذف و یا تبدیل ژنی SMN1 به نسخه‌ی ژنی تقریباً یکسان با آن به نام SMN2 می‌باشد (۲۴). فقدان ژن SMN1 منجر به تخریب نورون‌های حرکتی  $\alpha$  در شاخ قدامی نخاع و نهایتاً آتروفی پیش رونده‌ی عضلات اختیاری می‌گردد. تمام مبتلایان به آتروفی عضلانی نخاعی حداقل دارای یک نسخه ژن SMN2 هستند که ژن تعدیل کننده‌ی اصلی این بیماری محسوب می‌گردد. این اصل بازگو کننده‌ی آن است که شدت بیماری آتروفی عضلانی نخاعی دارای ارتباطی معکوس با میزان بیان ژن SMN2 می‌باشد (۲۶ و ۲۵). ژن SMN2 قادر به تولید مقادیر کافی از رونوشت با طول کامل نیست، به طوری که تنها حدود ۱۰ درصد تمام رونوشت‌های آن به طور صحیح پیرایش می‌گردند در نتیجه حاوی اگزون ۷ هستند (FL-SMN2) در حالی که حدود ۹۰ درصد رونوشت‌های آن فاقد اگزون ۷ می‌باشند ( $\Delta 7$ -SMN) (۲۹-۲۷). جهت درمان بیماری آتروفی عضلانی نخاعی، افزایش سطح رونوشت SMN2 با طول کامل، راهکار اصلی درمان محسوب می‌گردد. استراتژی‌های مختلفی جهت دستیابی به این هدف وجود دارد که سیاست اصلی افزایش سطح رونویسی از ژن SMN2، در سطح رده‌های سلولی می‌باشد. برای مثال ثابت شده که یک مهارکننده‌ی چرخه سلولی به نام هیدروکسی اوره قادر به



پیرایش SMN2 با طول کامل نرخ آپتوز را کاهش می‌دهد.

### نتیجه گیری

القای بیان ژن STAT5A و به همراه آن افزایش سطح رونوشت‌های SMN2 با طول کامل، دخالت ژن STAT5A به‌عنوان جزئی از مسیر انتقال پیام STAT5 را طی فرایند پاسخ به دارو در رده‌های سلولی مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی بیشتر روشن می‌سازد. به همین علت پیشنهاد می‌شود به جز والپروئیک اسید، سایر داروهایی که قادر به القای بیان ژن STAT5A و فعالسازی مسیر STAT5 هستند به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گیرند و همچنین تیمارهای ترکیبی با والپروئیک اسید با هدف دستیابی به سطوح بالاتری از رونوشت‌های SMN2 با طول کامل به همراه کاهش بیشتر نرخ آپتوز در رده‌های سلولی مبتلا نیز ارزیابی شوند.

### تقدیر و تشکر

مقاله‌ی حاضر حاصل رساله‌ی دکتری می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

مشخص شد که قادر به افزایش معنی‌دار سطح رونوشت STAT5A در نمونه‌های دارای افزایش SMN2 با طول کامل می‌باشد. از طرفی دیگر افزایش سطح STAT5A هم راستا و منطبق با افزایش SMN2 با طول کامل بوده، یعنی القای بیشتر ژن STAT5A نیز در سلول‌های بیمار بیشتر از نرمال رویت گردید. همچنین با مقایسه‌ی رده‌های سلولی بیمار فاقد تیمار با دارو نسبت به نرمال انتظار می‌رفت که میزان آپتوز در سلول‌های بیمار بالاتر باشد که نتایج فلوسایتومتری نیز این فرضیه را تایید نمود، در حالی که بعد از تیمار سلول‌های بیمار با والپروئیک اسید نرخ آپتوز همراه با افزایش بیان ژن STAT5A کاهشی معنی‌داری را نشان داد. نتایج مربوط به کاهش نرخ آپتوز از یک طرف می‌تواند نقش احتمالی ژن STAT5A قبل و بعد از تیمار با دارو در این پروسه را نشان دهد و از طرفی دیگر ویژگی ضد آپتوزی داروی والپروئیک اسید را ثابت می‌کند. بنابراین با مقایسه‌ی مطالعات پیشین در رابطه با درمان آتروفی عضلانی نخاعی توسط والپروئیک اسید و نتایج حاصل از این تحقیق باید اشاره کرد که والپروئیک اسید با افزایش بیان STAT5A و از مسیر اصلاح الگوی

### References

- 1- Farrar MA, Kiernan MC. The Genetics of spinal muscular atrophy: progress and challenges. *Neurotherapeutics*. 2015; 12: 290-302.
- 2- Mulcahy PJ, Iremonger K, Karyka E, et al. Gene therapy: a promising approach to treating spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther*. 2014; 25: 575-86.
- 3- Zanetta C, Riboldi G, Nizzardo M, et al. Molecular, genetic and stem cell-mediated

- therapeutic strategies for spinal muscular atrophy (SMA). *J Cell Mol Med*. 2014; 18: 187-96.
- 4- Liu WL, Li F, He ZX, Ai R, Ma HW. Molecular analysis of the SMN gene mutations in spinal muscular atrophy patients in China. *Genet Mol Res*. 2013; 12: 3598-604.
- 5- Mittal B. Rapid molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *Indian J Med Res*. 2012; 135: 6-8.
- 6- Ben-Shachar S, Orr-Urtreger A, Bardugo E, Shomrat R, Yaron Y. Large-scale population

- screening for spinal muscular atrophy: clinical implications. *Genet Med.* 2011; 13: 110-4.
- 7- Lorson CL, Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 259-65.
- 8- Chong JX, Oktay AA, Dai Z, Swoboda KJ, Prior TW. A common spinal muscular atrophy deletion mutation is present on a single founder haplotype in the US Hutterites. *Eur J Hum Genet.* 2011; 19: 1045-51.
- 9- Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, et al. Different Methylation Patterns of RUNX2, OSX, DLX5 and BSP in Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Cell J.* 2015; 17: 71-82.
- 10- Tarfiei G, Noruzinia M, Soleimani M, et al. ROR2 promoter methylation change in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell J.* 2011; 13: 11-5.
- 11- Izadi P, Noruzinia M, Karimipoor M, Karbassian MH, Akbari MT. Promoter hypermethylation of estrogen receptor alpha gene is correlated to estrogen receptor negativity in Iranian patients with sporadic breast cancer. *Cell J.* 2012; 14: 102-9.
- 12- Fard AD, Kaviani S, Noruzinia M, et al. Evaluation of H3 histone methylation and colony formation in erythroid progenitors treated with thalidomide and sodium butyrate. *Lab Hematol.* 2013; 19: 1-5.
- 13- Mattson RH, Cramer JA, Williamson PD, Novelly RA. Valproic acid in epilepsy: clinical and pharmacological effects. *Ann Neurol.* 1978; 3: 20-25.
- 14- Farooq F, Molina FA, Hadwen J, et al. Prolactin increases SMN expression and survival in a mouse model of severe spinal muscular atrophy via the STAT5 pathway. *J Clin Invest.* 2011; 121: 3042-50.
- 15- Ting CH, Lin CW, Wen SL, Hsieh-Li HM, Li H. Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 499-514.
- 16- Meerbeke JP, Sumner CJ. Progress and Promise: The Current Status of Spinal Muscular Atrophy Therapeutics. *Discov Med.* 2011; 12: 291-305.
- 17- Omrano O, Jabbarpour Bonyadi M, Barzgar M. Genotype- phenotype correlation in patients with spinal muscular atrophy in East Azerbaijan. *J Zanzan Univ Med Sci.* 2008; 16: 27-36.
- 18- Van der steege G, Grootsholten PM, Vander vliet P, et al. PCR based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet.* 1995; 345: 985-6.
- 19- Smith M, Calabro V, Chong B, Gardiner N, Cowie S. Population screening and cascade testing for carriers of SMA. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15: 759-66.
- 20- Akbari MT, Noruzinia M, Mozdarani H, Hamid M. Determination of exon 7 SMN1 deletion in Iranian patients and heterozygous carriers by quantitative real-time PCR. *J.Genet.* 2011; 90: 133-6.
- 21- Rallo EA, Ali'as L, Herna'ndez RM, et al. Treatment of spinal muscular atrophy cells with drugs that upregulate SMN expression reveals inter-

and intra-patient variability. *Eur J Hum Genet.* 2011; 19: 1059-65.

22- Hu N, Qian L, Hu Y, et al. Quantitative real-time RT-PCR validation of differential mRNA expression of SPARC, FADD, Fascin, COL7A1, CK4, TGM3, ECM1, PPL and EVPL in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2006; 6: 33.

23- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, et al. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 2481-9.

24- Wirth B, Herz M, Wetter A, et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 1340-56.

25- Brahe C. Copies of the survival motor neuron gene in spinal muscular atrophy: the more, the better. *Neuromuscul Disord.* 2000; 10: 274-5.

26- Burghes AH. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet.* 1997; 61: 9-15.

27- Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, et al. Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 213: 342-8.

28- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995; 80: 155-65.

29- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 6307-11.

30- Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 9808-13.

31- Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, et al. Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12: 59-65.

## Evaluation of Apoptotic Rate Reduction Using Valproic Acid as a STAT5 Inducer in Spinal Muscular Atrophy

Bahrami Monajemi GR<sup>1</sup>, Noruzinia M<sup>1</sup>, Tonekaboni SH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran Iran.

<sup>2</sup>Dept. of Neurology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Corresponding Author:** Noruzinia M, Dept. of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

**E-mail:** noruzinia@modares.ac.ir

**Received:** 5 Jan 2016    **Accepted:** 25 Apr 2016

**Background and Objective:** The severity of the spinal muscular atrophy phenotype is inversely associated with the expression levels of the SMN2 gene; this correlation is not absolute, for this reason there is currently no effective treatment. The interference of other severity modifying factors, apart from SMN2 gene expression has been suggested. Here we investigate the effects of valproic acid as a STAT5 inducer not only on SMN2 expression but on STAT5A gene expression as well as on the rate of apoptosis.

**Materials and Methods:** Expression levels of the SMN2 and STAT5A genes were determined using Real-time PCR while apoptotic rates were determined using flow cytometry in lymphocyte cell lines derived from three patients and two normal controls in response to valproic acid.

**Results:** STAT5A gene induction, enhanced FL-SMN2 expression and reduced apoptotic rate were seen in lymphocyte cell lines after valproic acid treatment ( $p < 0.05$ , t-test).

**Conclusion:** Since STAT5A gene induction was accompanied with SMN2 transcriptional upregulation, these findings propose the involvement of STAT5A gene both as a component of the STAT5 pathway and as a target gene in drug responsiveness.

**Keywords:** Spinal Muscular Atrophy, Valproic acid, Real-time PCR, Apoptotic rate