

بیان ژن FSH انسانی در سلول تخمدان همستر چینی و بررسی فعالیت آن در مدل حیوانی رت

نویسندگان: اعظم موسیوند^۱، شهرام تیموریان^۲، مریم رضایی^۲، امیرحسین شهابی یونسی^۳، ایرج رسولی^{۱*}

۱- گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- گروه ژنتیک پزشکی و زیست‌شناسی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- گروه داروسازی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

E-mail: rasooli@shahed.ac.ir

*نویسنده مسئول: ایرج رسولی

چکیده

مقدمه و هدف: FSH هورمون کلیکوپروتئین هترودايمری است که در رشد و بلوغ اندام‌های جنسی و صفات ثانویه مؤثر است. گنادوتروپین‌های قابل تزریق نقش پیشرو در درمان ناباروری داشته‌اند. تولید FSH در داخل کشور یکی از اهداف مهم پیرامون این دارو است. هدف از این مطالعه امکان تولید آزمایشگاهی FSH نو ترکیب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: وکتور حاوی زیر واحد آلفا و بتای ژن FSH انسانی در باکتری *DH5a* انتقال و پلاسمید جداسازی و توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به سلول تخمدان همستر چینی ترانسفکت شد. سلول‌ها بوسیله نئومایسین به مدت ۱۰ روز تیمار و سلول‌های ترانسفکت شده انتخاب شدند. بیان پروتئین بوسیله الایزا مورد بررسی قرار گرفت. محصول با روش کروماتوگرافی افینیتی خالص شد. جهت محاسبه راندمان تخلیص، غلظت پروتئین قبل و بعد از کروماتوگرافی به وسیله الایزا مورد سنجش قرار گرفت. جهت تائید خلوص پروتئین از روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ استفاده شد. سپس به رت ماده تزریق و عملکرد پروتئین بررسی شد.

نتایج: بیان پروتئین با استفاده از تست الایزا در ۴۵۰ نانومتر $43/538$ mIU/ml تائید شد. در مرحله تخلیص با روش کروماتوگرافی افینیتی، پیک مربوط به FSH در بازه زمانی حدود ۷/۹ دقیقه مشاهده و راندمان تخلیص ۷۰٪ محاسبه شد. وجود باندها ۴۵ کیلو دالتونی بر روی ژل و غشای PVDF پس از تخلیص، حضور FSH را تائید نمود. افزایش وزن تخمدان بعد از تزریق، عملکردی بودن پروتئین را تائید نمود.

نتیجه‌گیری: در حال حاضر تولید هورمون‌های نو ترکیب از نیازهای کشور محسوب می‌شود. بنابراین دستیابی به این هدف ارزشمند نیاز به برنامه‌ریزی بلندمدت دارد و ما در این پژوهش سعی نمودیم این مسیر را به منظور تولید هورمون FSH انسانی به عنوان یک داروی نو ترکیب مؤثر در درمان ناباروری هموار نماییم.

واژگان کلیدی: انتقال، بیان، *E. coli*، FSH، سلول تخمدان همستر چینی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وششم- شماره ۱۳۹
اسفند ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۲

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۱۱/۲۵

پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۱

مقدمه

آنچه امروزه به وضوح مشاهده می‌شود این است که میزان باروری در کشورهای صنعتی کاهش یافته است. از جمله دلایل آن می‌توان به تغییر نقش زنان در فعالیت‌های اجتماعی، افزایش سن ازدواج، افزایش استفاده از روش‌های پیشگیری از باروری اشاره نمود (۱). ناتوانی تخمدان در رهاسازی تخمک از عوامل اصلی ناباروری در زنان است (۲). حدود ۸۰ درصد از زنانی که در دسته‌بندی نورموگنادوتروپیک نورمواستروژنیک سازمان بهداشت جهانی قرار می‌گیرند، از سندرم تخمدان پلی‌کیستیک رنج می‌برند (۳). درمان گنادوتروپین از عناصر کلیدی در درمان ناباروری است که منجر به تحریک تخمدان و القاء تخمک‌گذاری می‌شود و درصد بالایی از موفقیت را برای درمان ناباروری در جهان به ارمغان می‌آورد (۲).

گنادوتروپین‌ها هورمون‌های گلیکوپروتئینی هستند که شامل هورمون محرک فولیکول (FSH)، هورمون لوتئینی (LH) که از بخش پیشین هیپوفیز ترشح و گنادوتروپین کوریون انسانی (hCG) که به طور عمده در جفت در طول دوره بارداری تولید می‌شود، است (۳).

FSH یک گلیکوپروتئین هترودایمر ۴۵ کیلودالتونی است که متشکل از دو زیر واحد پلی‌پپتیدی آلفا که حاوی ۹۶ اسید آمینه و بتا که حاوی ۱۱۱ اسید آمینه (FSH β) و یک سیگنال پپتید ۱۸ اسید آمینه‌ای است که فعالیت اختصاصی هورمون FSH مربوط به زیر واحد بتا است که فعالیت‌های بیولوژیک تنها توسط هترودایمر فراهم می‌شود (۴). ۱۵ تا ۳۰ درصد ساختار آن از کربوهیدرات‌ها تشکیل شده و شباهت‌های ساختاری بالایی با اعضای خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی دارد (۶-۴).

هورمون FSH نوترکیب به وسیله کشت سلول‌های تخمدان همستر چینی تولید می‌شود (۷). علت انتخاب سلول پستانداران در تولید پروتئین نوترکیب، سیستم‌های بیان سلول پستانداران نسبت به سیستم‌های پروکاریوتی در توانایی سیستم پستانداران در انجام تغییرات پس از

ترجمه از جمله گلیکوزیلاسیون و پردازش سیگنال پپتید و ترشح پروتئین است (۸،۹).

از دهه ۱۹۹۰ ورود محصولات FSH نوترکیب به بازار آغاز شد. دو نوع محصول FSH نوترکیب با ساختارهای مشابه اما با اصلاحات پس از ترجمه متفاوت، با نام‌های فولیتروپین آلفا (Gonal-f; EMD Serono) و فولیتروپین بتا (Follistim; Organon/Merck & Co, Whitehouse Station, USA, NJ) به بازار معرفی شدند (۱۰-۱۲). در حال حاضر Ovaleap (XM17) (فلوتروپین آلفا) هورمون نوترکیب FSH است که برای درمان ناباروری با تحریک تخمک‌گذاری به همراه تکنیک‌های باروری کمکی (ART) مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱).

مواد و روش‌ها

پس از کشت باکتری *E.coli* سویه *DH5 α* در شرایط استریل، کلنی‌های ایجاد شده به محیط کشت مایع منتقل و با روش شیمیایی کلرید کلسیم سلول‌های مستعد باکتریایی تهیه گردید. سپس ترانسفورماسیون ناقل پلاسمیدی Pvitro2-neo-mcs (شکل شماره ۱) حاوی زیر واحدهای آلفا و بتای ژن FSH (جدول شماره ۱) که به صورت هدیه از دانشگاه علوم پزشکی ایران دریافت شده بود، به سلول‌های *DH5 α* مستعد شده صورت گرفت و جهت غربالگری، باکتری در محیط Luria-Bertani حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند و از تک کلنی‌های ایجاد شده به محیط کشت LB (Luria-Bertani) broth) تلقیح شد و تخلیص پلاسمید از این باکتری‌ها طبق پروتکل ارائه شده توسط شرکت سازنده کیت (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) انجام و در فریزر ۲۰- جهت انتقال به سلول همستر چینی نگهداری شد.

رده سلولی CHO-K₁ (ATCC CCL 61) از انیستیتوپاستور تهران تهیه گردید و مراحل کشت سلول در محیط کشت DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific Dulbecco's Modified Eagle), Inc., Waltham, MA, USA) و (Medium) و (Ham's F12 nutrient mixture) همراه با ۱۰

رت ماده تزریق شد. بدین منظور از تعداد ۳۵ رت ماده نابالغ نژاد ویستار استفاده شد. همگی این حیوانات دارای سن ۲۸-۱۹ روز و وزن آن‌ها ۸۰-۱۰۰ گرم بود. رت‌ها از لانه حیوانات انستیتو پاستور تهران طبق استانداردها خریداری شد. برای اطمینان، رت‌های تهیه‌شده وزن‌کشی شدند تا وزن ۸۰-۱۰۰ گرم برای همه آن‌ها تأیید گردد سپس در ۷ گروه ۵ تایی به صورت کاملاً تصادفی قرار گرفتند.

گروه کنترل: به رت‌های موجود در گروه کنترل ۰/۵ میلی‌لیتر سرم نمکی ۹ درصد تزریق شد.

گروه تیمار ۱: به رت‌های این گروه مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر FSH تجاری سینال - اف (فولیتروپین آلفا) تهیه‌شده از شرکت سیناژن cinagen با دوز ۱/۵ IU تزریق شد.

گروه تیمار ۲: به رت‌های این گروه مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر FSH تجاری سینال - اف (فولیتروپین آلفا) تهیه‌شده از شرکت سیناژن cinagen با دوز ۳ IU تزریق شد.

گروه تیمار ۳: به رت‌های این گروه مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر FSH تجاری سینال - اف (فولیتروپین آلفا) تهیه‌شده از شرکت سیناژن cinagen با دوز ۶ IU تزریق شد.

گروه تیمار ۴: به رت‌های این گروه مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر هورمون FSH خالص‌شده در مطالعه‌ی حاضر با دوز ۱/۵ IU تزریق شد.

گروه تیمار ۵: به رت‌های این گروه مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر هورمون FSH خالص‌شده در مطالعه‌ی حاضر با دوز ۳ IU تزریق شد.

گروه تیمار ۶: به رت‌های این گروه مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر هورمون FSH خالص‌شده در مطالعه‌ی حاضر با دوز ۶ IU تزریق شد.

دوزهای اختصاص‌یافته به گروه‌ها به صورت زیر جلدی تزریق و هر دوز ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق اول تکرار شد. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، رت‌ها کشته و تخمدان‌ها از هر رت خارج شدند. هر مایع و

FBS% طبق پروتکل تأیید شده انجام گرفت. پس از آماده شدن سلول‌ها با تراکم سلولی ۹۰-۷۰٪ ترانسفکت پلاسمید به داخل سلول CHO طبق پروتکل لیپوفکتامین (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, USA) ۲۰۰۰ براساس دستور کار شرکت سازنده انجام گردید. بعد از ترانسفکت و ۷۲ ساعت پس از اولین تعویض محیط، ۸۰۰ μg/ml آنتی‌بیوتیک نئومایسین اضافه شد. هر دو روز محیط کشت قدیمی تعویض و به آن آنتی‌بیوتیک نئومایسین اضافه گردید. این کار سه تا چهار بار طی ۱۰ روز انجام گرفت تا فقط سلول‌های ترانسفکت شده زنده باقی بمانند. سپس دو پاساژ سلولی در محیط کشت تکثیر DMEM/F12 همراه با سرم ۱۰٪ طبق دستورالعمل‌های مربوطه داده شد و پس از تکثیر سلول‌ها، سلول‌ها به محیط کشت بیانی حاوی محیط DMEM/F12 فاقد سرم و حاوی ۱٪ انسولین انتقال داده شد. سپس تست الایزا بر اساس پروتکل شرکت سازنده کیت الایزا انجام و غلظت نمونه پس از تعیین Optical density (OD) آن‌ها در ۴۵۰nm با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

پس از تأیید بیان بوسیله تست الایزا، کشت سلولی ادامه پیدا کرد و سوپ سلولی جمع‌آوری و جهت انجام مراحل بعدی در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس با روش آنتی‌بادی منوکلونال با ستون کروماتوگرافی افینیتی عمل خالص‌سازی پروتئین بوسیله دستگاه HPLC انجام شد. برای تهیه این ستون یک میلی‌لیتر از رزین (Glyoxal Agarose Beads) با ۹ میلی‌لیتر بی‌کربنات سدیم با PH=10 و ۵۰۰ میکرو لیتر آنتی‌بادی FSH به عنوان لیگاند تهیه شد. سپس مراحل تخلیص طبق دستور کار تخلیص پروتئین FSH انجام گرفت. به منظور بررسی میزان راندمان مرحله خالص‌سازی، نمونه‌های حاصل از کشت سلول، قبل و بعد از کروماتوگرافی با استفاده از کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت و راندمان تخلیص محاسبه شد سپس پروتئین مربوط به پیک جمع‌آوری‌شده در مرحله HPLC با روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تأیید گردید. در نهایت پس از تأیید خلوص، پروتئین به

به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام و نمودار توسط نرم افزار Excel رسم شد.

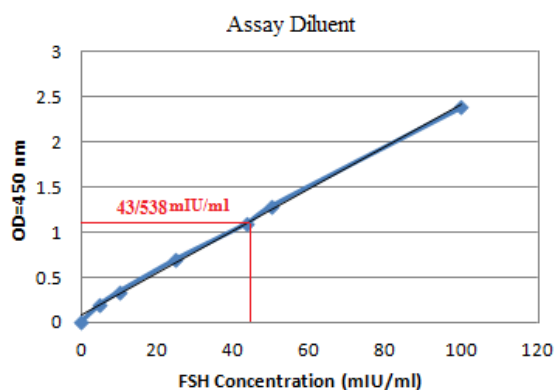
توالی نوکلئوتیدی زیر واحد آلفا و بتای هورمون FSH در جدول ۱ آورده شده است.

بافت خارجی از تخمدان‌ها بیرون آورده شد و بلافاصله وزن دو تخمدان هر رت با ترازوی دیجیتالی و با دقت ۰/۰۰۰۱ اندازه‌گیری و ثبت گردید. سپس آنالیز واریانس داده‌های جمع‌آوری شده بر اساس طرح کاملاً تصادفی و

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی زیر واحدهای هورمون FSH

Chain	Sequence
Human Fsh alpha	atggattac tacagaaat atgcagctat ctttctgtc acattgtcgg tgtttctgca tgttctccat tccgctcctg atgtgcagga ttgccagaa tgcacgctac aggaaaacc attctctcc cagccgggtg cccaataact tcagtgcatg ggctgctgct tctctagac atatccact ccaactaagg tcaaaagaacg tcaactcaga gtccactgc tgtgtagcta aatcatataa cagggtcaca gtaatggggg gttcaaagt ggagaaccac acggcgtgcc actgcagtac ttgtattat cacaatctt aa
Human Fsh Beta	atgaagacact ccagttttc ttcttttct gttgctggaa agcaactgc tgcaatgct gtgagctgac caacatcacc attgcaatag agaaaagaaga atgctgttc tgcataagca tcaacaccac ttggtgtgct ggctactgct acaccaggga tctgtgtat aaggaccagc ccaggcccaa aatccagaaa acatgtacct tcaaggaact ggtatagaa acagtgtgag tgccggctg tgcaccact gcagattcct tgtatcataa cccagtgcc acccagtgct actgtggcaa gttgtgacgc gacagcactg attgtactgt gcgaggcctg gggccagct actgctcctt tgggaaatg aaagaataa

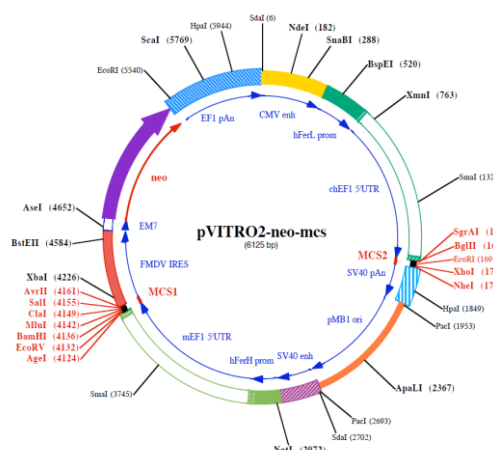
توجه به منحنی استاندارد غلظت نمونه ۴۳/۵۳۸ mIU/ml تعیین شد (شکل شماره ۲).



شکل ۲. غلظت نمونه پروتئینی قبل از کروماتوگرافی در طول موج ۴۵۰nm بر اساس منحنی استاندارد Miu/ml ۴۳/۵۳۸ محاسبه گردید.

سپس مراحل تخلیص طی دستور کار تخلیص FSH انجام گرفت. پس از مرحله شستشو با استفاده از بافر شستشو با سرعت، ۵ ml/min تمامی موارد اضافی و غیر اتصالی به ستون، خارج شد (پیک اول). پس از مرحله شستشو، بافر خارج‌سازی اضافه و پس از گذشت زمان مشخص، پیک مربوط به FSH در فاصله زمانی ۷/۹ دقیقه مشاهده (شکل ۳) و پروتئین مورد نظر جمع‌آوری گردید.

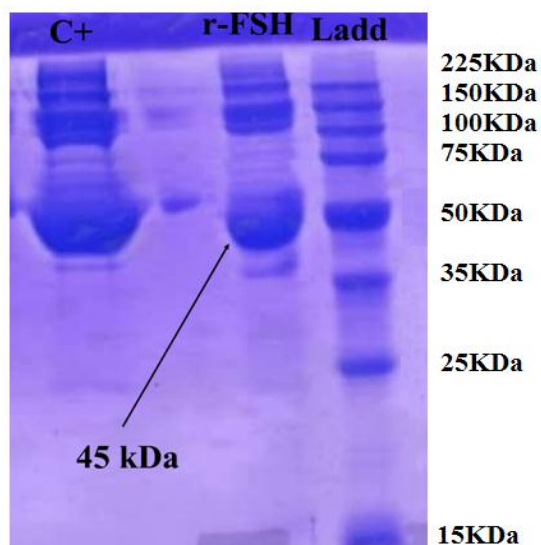
ناقل مورد استفاده در این طرح pVITRO2-neo-mcs است که از جمله ناقل‌های رایج برای سلول‌های یوکاریوتی است. مشخصات ناقل مورد استفاده همراه با جزئیات دقیق آن در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. نقشه ژنتیکی پلاسمید دابل اکسپرنشن pVITRO2-neo-mcs مورد استفاده در بررسی حاضر

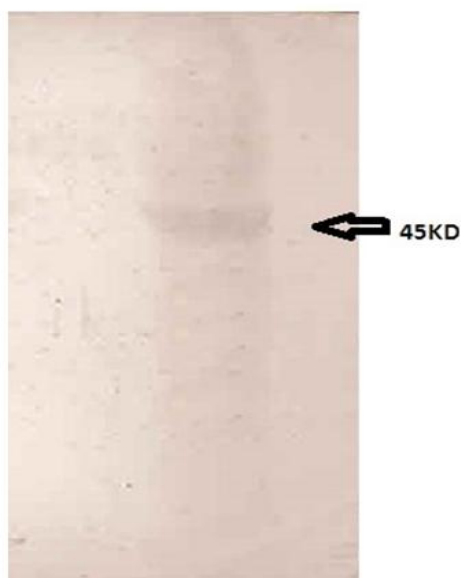
یافته‌ها

بعد از ترانسفکت پلاسمید به داخل سلول همستر چینی طبق دستور کار لیپوفکتامین ۲۰۰۰ انجام گردید. پس از دو پاساژ سلولی در محیط کشت تکثیری DMEM/F12 همراه با ۱۰٪ سرم، سلول‌ها به محیط کشت بیانی حاوی محیط DMEM/F12 فاقد سرم و حاوی ۱٪ انسولین انتقال داده شدند. سپس سوپرناتانت پس از ۷۲ ساعت جمع‌آوری و با تست الیزا تأیید بیان گردید. با

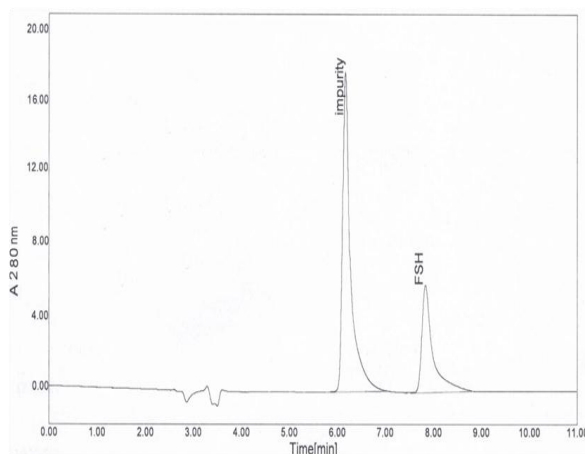


شکل ۵. الگوی SDS-PAGE پروتئین FSH تخلیص شده

ستون اول از راست: نشانگر وزن مولکولی پروتئین،
ستون دوم از راست: پروتئین استخراج شده نو ترکیب (r-FSH)،
چهارمین چاهک: کنترل مثبت (سینال اف تجاری (45kDa)



شکل ۶. تست لکه گذاری وسترن پروتئین FSH نو ترکیب

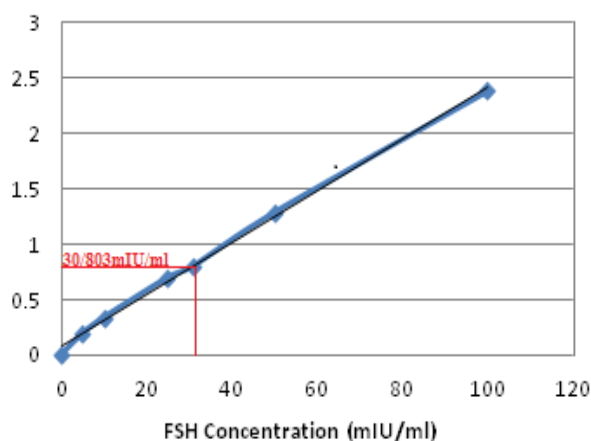


شکل ۳. تخلیص پروتئین FSH بر روی ستون کروماتوگرافی افینیتی

پیک اول مربوط به مرحله Washing (ناخالصی‌های موجود در ستون) و پیک دوم مربوط به مرحله Elution نمونه اصلی که در زمان حدود ۷/۹ دقیقه مشاهده گردید.

پس از تخلیص پروتئین، جهت محاسبه راندمان تخلیص تست الایزا انجام شد (شکل ۴) و با توجه به نتایج الایزا قبل و پس از ستون HPLC، راندمان تخلیص حدود ۷۰٪ تخمین زده شد.

Assay Diluent



شکل ۴. غلظت نمونه پروتئینی بعد از کروماتوگرافی در طول موج ۴۵۰nm بر اساس منحنی استاندارد ۳۰/۸۰۳ mIU/ml محاسبه گردید

جهت تأیید پروتئین FSH از SDS-PAGE (شکل ۵) و وسترن بلات (شکل ۶) استفاده گردید.

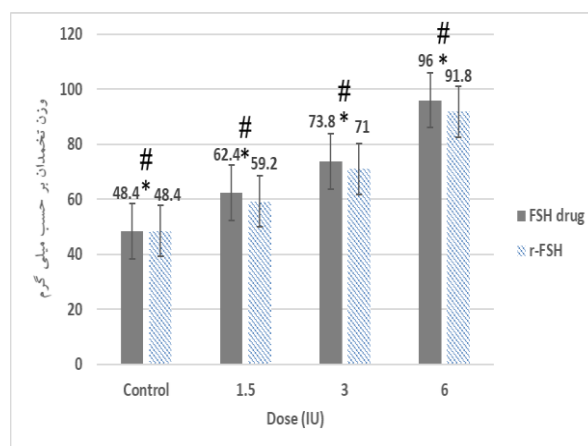
Kelton و همکاران (۱۹۹۲) است که کلونینگ گیرنده هورمون محرک فولیکولی انسان و بیان آن در رده سلول‌های COS-7، CHO و Y-1 را بررسی نمودند. در پایان گزارش کردند که رده‌های سلولی CHO و Y-1 می‌توانند به عنوان ناقل‌های مناسب جهت کلونینگ مورد استفاده قرار گیرند (۱۶). اولین FSH انسانی نوترکیب (follitropin alfa؛ r-hFSH) برای استفاده بالینی توسط آزمایشگاه Serono در سال ۱۹۸۸ تولید شد و برای بازاریابی در اتحادیه اروپا به عنوان Gonol-Fw در سال ۱۹۹۵ مجوز گرفت (۱۷). در آزمایشگاه سازنده Gonol F (Serono) دو وکتور جداگانه برای ساخت رده سلولی تولیدکننده FSH ساخته شد که هر وکتور برای یک زیر واحد مدنظر قرار گرفت (۱۷). وکتور مورد استفاده در مطالعه حاضر حاوی دو جایگاه برای ورود ژن است، چراکه FSH یک ژن دوزیرواحدی است. همچنین این وکتور توانایی تکثیر و غربالگری در میزبان‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی را دارد و می‌تواند در سلول‌های پستانداران به طور پایدار در سطح بالایی بیان داشته باشد و علاوه بر این، حمل و بیان دو ژن را به صورت همزمان میسر می‌سازد. همچنین ناقل فوق با داشتن دو پروموتور قوی^۱ EF1 باعث بالا رفتن میزان بیان پروتئین موردنظر می‌گردد (۱۸).

در مطالعه حاضر تزریق r-FSH تخلیص شده منجر به افزایش معنی‌دار وزن تخمدان نسبت به گروه کنترل شده است؛ که با نتایج Wang و همکارش در سال ۱۹۹۳، مبنی بر افزایش وزن تخمدان در موش‌های فاقد هیپوفیز تیمار شده با FSH+LH سازگار است (۱۹). در حالی که با گزارش Allan و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مورد بیان FSH ترانس ژنیک که باعث افزایش وزن تخمدان در موش‌های بالغ هیپوگنادال که کمبود گنادوتروپین دارند تناقض دارد (۲۰). احتمالاً این تفاوت‌ها به علت تغییر برخی عوامل مهم مانند نژاد حیوان، میزان هورمون و مدت زمان تیمار باشد. گرچه در مطالعه حاضر میزان لقاح، کیفیت جنین و میزان حاملگی و تخمک‌ها بررسی نشد،

پس از تأیید خلوص، پروتئین به رت ماده تزریق و اندازه‌گیری وزن تخمدان انجام شد که میانگین آن‌ها در جدول ۲ و در نمودار ۷ آورده شده است.

جدول ۲. داده‌های حاصل از تزریق FSH به موش‌ها

گروه‌ها	وزن تخمدان در دوز IU ۱/۵ (mg)	وزن تخمدان در دوز IU ۳ (mg)	وزن تخمدان در دوز IU ۶ (mg)
کنترل	۴۸/۴ ± ۳/۹۱۲	۴۸/۴ ± ۳/۹۱۲	۴۸/۴ ± ۳/۹۱۲
Cinnal. f	۶۲/۴ ± ۲/۳۰۲	۷۳/۸ ± ۳/۷۰۱	۹۶ ± ۳/۱۶۲
r-FSH	۵۹/۲ ± ۱/۴۸۳	۷۱ ± ۲/۷۳۹	۹۱/۸ ± ۵/۶۳



نمودار ۱. وزن تخمدان به تفکیک گروه‌ها

بحث

این پژوهش به دلیل دستیابی به فناوری تولید یک داروی نوترکیب مؤثر در درمان ناباروری یک نوآوری برای کشور محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده که ۱۰-۱۵ درصد زوج‌ها در سنین باروری مبتلا به ناباروری هستند (۱۳). در بروز این مشکل، عوامل مردانه (۴۰-۲۵ درصد)، عوامل زنانه (۴۹/۵۵ درصد)، ترکیبی از دو عامل مردانه و زنانه (۱۰ درصد) و ناباروری با علت ناشناخته (۱۰ درصد) دخیل است (۱۴). از حدود نیم‌قرن پیش گنادوتروپین، جهت القاء تخمک‌گذاری در درمان اختلالات ناشی از آن و انجام روش‌های فن‌آوری‌های کمک باروری استفاده می‌شوند (۱۵). با تولید FSH در کشور می‌توان تا حدودی از واردات دارو و خروج ارز از کشور جلوگیری کرد.

مطالعات مختلفی کارایی بالای سلول‌های CHO را در تولید FSH نشان داده‌اند که یکی از این مطالعات، مطالعه

^۱. Elongation factor 1

همچنین عنوان نمودند که داروهای مورد استفاده برای تحریک تخمک‌گذاری در انسان، از نظر تعداد کلی تخمک‌های به دست آمده و بلوغ تخمک‌ها در موش آزمایشگاهی اثر یکسانی ندارند. استفاده از hMG1 بهترین نتیجه را در مورد تعداد کلی تخمک‌ها و نیز درصد تخمک‌های MII داشت. هیچ‌گونه برتری بین داروی نوترکیب rFSH و دیگر داروها دیده نشد (۲۰). شباهت در دو مطالعه مربوط به این نتیجه است که در دو مطالعه هیچ‌گونه برتری بین داروی نوترکیب r-FSH و داروهای تجاری آن دیده نشده است (۲۲).

نتیجه‌گیری

برای تولید یک داروی نوترکیب فعال از نظر بیولوژیکی لازم است مناسب‌ترین روش، مواد و تجهیزات مورد استفاده قرار بگیرد. با بهینه‌سازی بیان FSH در سلول‌های پستانداران نسبت به پروکاریوت‌ها می‌توان در هزینه تولید این دارو نیز صرفه‌جویی کرد. با توجه به اینکه تفاوت در الگوی گلیکوزیلاسیون و فعالیت بیولوژی FSH نوترکیب نسبت به FSH ادراری و خلوص بالاتر این دارو، برنامه‌ریزی برای تولید می‌تواند کمک مؤثری در درمان ناباروری و برطرف کردن نیازهای کشور در این زمینه داشته باشد. (۳، ۲۳-۲۴).

در این پژوهش برای بهینه‌سازی تولید FSH نوترکیب بیان FSH در سلول CHO-K1 با ناقل pVITRO2_neo-msc انجام شد. نتیجه این مطالعه مشخص کرد که FSH نوترکیب (r-FSH) همانند همتای تجاری خود (FSH دارویی) عملکرد بالینی در مدل حیوانی دارد؛ بنابراین می‌توان امید داشت که یک داروی کارآمد در سطح داروهای FSH تجاری در داخل ایران تولید شود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی تحت عنوان بیان ژن FSH انسانی در سلول تخمدان همستر چینی و بررسی فعالیت آن در مدل حیوانی رت» در مقطع کارشناسی ارشد از خرداد ۱۳۹۶ تا آبان ۱۳۹۷ است که در شرکت دانش‌بنیان فاربیوسان انجام گردید. از حمایت‌های مادی و معنوی این مرکز قدردانی می‌گردد.

اما مشاهده گردید که r-FSH و FSH دارویی در وزن تخمدان‌ها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. تنها تفاوت آن‌ها در این بود که r-FSH در مطالعه ما از دودمان سلولی در محیط *in vitro* به دست آمده و FSH دارویی بصورت تجاری ساخته شده است. در مطالعه ما نشان داده شد که تولید FSH نوترکیب در سلول‌های CHO در داخل کشور می‌تواند کارایی لازم و همسان با کارایی FSH دارویی موجود در بازار را داشته باشد؛ بنابراین وقتی مصرف دو دارو نتیجه یکسانی دارد، منطقی است که از داروی ارزان‌تر استفاده شود تا هزینه درمان ناباروری با سیکل‌های ART کاهش یابد. در مطالعه‌ای، نظری و همکاران (۱۳۸۶) تحریک تخمک‌گذاری با FSH نوترکیب و HP-hMG در سیکل‌های کمک باروری را بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بوده است که تعداد اووسیت به دست آمده در گروه HP-hMG (۱۱/۱) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه FSH نوترکیب (۷/۷۹) است. آن‌ها نتیجه گرفتند که HP-hMG و FSH نوترکیب در سیکل‌های کمک باروری عوارض و اثربخشی یکسانی دارند؛ بنابراین نوع درمان را می‌توان بر اساس هزینه و روش تجویز انتخاب نمود (۲۱). در مطالعه ما بر خلاف مطالعه نظری دو ترکیب مقایسه شده یعنی FSH نوترکیب (r-FSH) و FSH دارویی در اثر بر روی وزن تخمدان‌ها تفاوت معنی‌داری نداشتند. هرچند ترکیب مورد استفاده در دو مطالعه متفاوت بود؛ اما هر دو مطالعه نتیجه گرفته‌اند که FSH نوترکیب کارایی مناسبی در سیکل‌های کمک باروری دارند. کارایی گنادوتروپین‌های انسانی نوع ادراری و نوترکیب با استفاده از مدل حیوانی توسط خلیلی و همکاران (۱۳۸۹) بررسی گردید. در این مطالعه تجربی از ۳۰ موش سوری نژاد NMARI با سن یکسان (۸ هفته) استفاده شد. موش‌های گروه آزمایش با ۱۰ واحد از داروهای hMG1، hMG2، uFSH و rFSH و موش‌های گروه کنترل با PMSG به وسیله تزریق داخل صفاقی برای تخمک‌گذاری تحریک شدند. تعداد کلی تخمک‌ها در گروه‌های مختلف با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت.

منابع

1. Direkvand-Moghaddam A, Delpisheh A, Direkvand-Moghaddam A. Effect of infertility on the quality of life, a cross-sectional study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014;8(10): 5-13.
2. Smitz J, Wolfenson C, Chappel S, Ruman J. Follicle-Stimulating Hormone: A Review of Form and Function in the Treatment of Infertility. *Reproductive Sciences* 2016; 23: 706–716.
3. Strauss JF, Barbieri RL 2013 *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*. Elsevier - Health Sciences Division
4. McKerns KW 2012 *Structure and Function of the Gonadotropins*. Springer US.
5. Fox, KM, Dias, JA and Van Roey, P. three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Molecular Endocrinology* 2001; 15(3): 378–389.
6. Grigorova M. Worldwide variation of follicle-stimulating hormone beta-subunit gene and its potential association with reproductive success. master thesis. Tartu University 2006; 3-62.
7. Ng EH, Lau EY, Yeung WS, Ho PC. HMG is as good as recombinant human FSH in terms of oocyte and embryo quality. *Human Reproduction* 2001; 16: 319-325.
8. Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012; 93: 917–930.
9. Omasa T, Onitsuka M, Kim W. Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2010; 11: 233-240.
10. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010; 20(1):5-14.
11. Winstel R, Wieland J, Gertz B, Mueller A, Allgaier H. Manufacturing of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone Ovalep (XM17), Comparability with Gonal-f, and Performance/Consistency. *Original Research Article* 2017; 17(2): 305-312.
12. Rose TH, shammar DR, Erichsen L, Grundemar L, Ottesen JT. Characterisation of Population Pharmacokinetics and Endogenous Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Levels After Multiple Dosing of a Recombinant Human FSH (FE 999049) in Healthy Women 2016; 16:165–172.
13. Speroff, L. & Fritz, M. A. (2005) *Clinical gynaecologic endocrinology and infertility*, lippincott Williams & wilkins.
14. Novak E, Berek JS. *Berek and Novak's gynecology*, Lippincott Williams and Wilkins 2007; 297(14): 1601-1604.
15. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 2002; 296(5576): 2178-2180.
16. Christie A, Kelton, Shirley V.Y. Cheng, Noreen P. Nugent, Rene L. Schweickhardt, Judy L. Rosenthal, Susan A. Overton, Gregory D. Wands, Jennifer B. Kuzeja, Carol A. Luchette and Scott C. Chappel. The cloning of the human follicle stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO, and Y-1 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1992; 89: 141- 151.
17. C.M.Howles. Genetic engineering of human FSH. *Human Reproduction Update* 1996; 2 (2): 172-191.
18. Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012; 93: 917–930.
19. Wang XN, Greenwald GS. Hypophysectomy of the cyclic mouse. II. Effects of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone on folliculogenesis, FSH and human chorionic gonadotropin receptors, and steroidogenesis. *Biology of Reproduction* 1993; 48(3): 595-605.
20. Allan CM, Wang Y, Jimenez M, Marshan B, Spaliviero J, Illingworth P. et al. Follicle stimulating hormone increases primordial follicle reserve in mature female hypogonadal mice. *Endocrinology*. 2006; 188: 549-557.
21. Nazari T, Zinolzadeh M, Radman R, Isma'il Zadeh S, Basirat Z, Haji Ahmadi M, Farsi M. Comparison of ovulation induction with recombinant FSH and hMG-HP in fertility cycles 1368; 9(3): 27-32
22. Khalili Mohammad Ali, Agha Rahimi Azam, Mir Esmaili seyed Mohsen, Comparison of efficiency of human gonadotropins of urine and recombinant type using animal model. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 1389; 9(1): 15-26
23. Lehert P, Kolibianakis E, Venetis C, Schertz J, Saunders H, Arriagada P, Copt S, Tarlatzis B. Recombinant human follicle-stimulating hormone (r-hFSH) plus recombinant luteinizing hormone versus r-hFSH alone for ovarian stimulation during assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014; 12: 17
24. Keel B, May J, Delonge C. *Textbook of assisted reproductive technique*. CRC Co. 2000; 3-180.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
26th Year, No.139
February-March 2019*

Received: 24/10/2018

Last revised: 14/02/2019

Accepted: 20/02/2019

Expression of human FSH in Chinese hamster ovarian cells and its activity in a rat model

Aezam Mousivans¹, Shahram Timurian², Maryam Rezaei², Amirhassan Shahabi³, Iraj Rasooli^{1*}

1. Department of Microbiology, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Department of Genetics and Molecular Biology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Pharmacy, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

* Corresponding author e-mail: rasooli@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: FSH is a heterodimeric glycoprotein that performs an important role in the regulation of reproductive processes. Over the past decades, injectable gonadotrophins have played a leading role in the treatment of infertility. The production of FSH in the country is one of the main goals around this drug. The aim of this study was to produce a semi- industrial recombinant FSH.

Materials and Methods: In this research study, the FSH gene contained within the pVITRO2-neo-mcs vector was transfected into the cell line of CHO after transformation in DH5 α and plasmid purification. The amount of FSH in cell supernatant was measured by ELISA. The FSH protein was purified by HPLC. The presence of FSH protein after purification was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting methods. Finally, the clinical effects of purified FSH on the ovary in the rat model were investigated.

Results: The expression of the protein was determined by ELISA test at 450 nm that was 43.538 mIU/ml. In the HPLC purification step, the FSH peak was observed at a time interval of about 7.9 minutes, and the purification efficiency was 70%. The existence of a 45 KDa band on the pvdf membrane was confirmed after western blotting of FSH. Increasing the weight of the ovary after the injection has confirmed the functionality of the protein.

Conclusion: At present, the production of recombinant hormone is one of the basic needs of every country. In order to arrive at this aim, a long-term planning is required. We are trying to pave the way for producing human FSH hormone as an effective recombinant drug in the treatment of infertility.

Keywords: E. coli, Follicle stimulating hormone (FSH), Expression, Chinese hamster ovary cell line (CHO)