راهنمای نویسندگان

نشریه یاخته به صورت فصلنامه و به زبان فارسی و انگلیسی منتشر می‌گردد و در کلیه مباحث سلولی و مولکولی مقاله می‌پذیرد.

شرایط پذیرش مقالات به شرح زیر است:

۱– نوع مقاله:

الف – مقالات اصیل (Original Articles): حاصل یافته‌های تحقیقی نویسندگان

ب – مقالات مروری (Review Articles): پذیرفته شده از نویسندگانی با تجربه کافی در موضوع مقاله و صاحب تالیفاتی در این زمینه

ج – گزارش موردی (Case Report): موارد استثنایی دارای جنبه‌های آموزشی و تحقیقی

د – مقالات کوتاه (Short Communications): حاصل یافته‌های تحقیقی نویسندگان

۲– تعهدات:

مقاله بایستی تاکنون در نشریات علمی دیگر به چاپ نرسیده باشد و نویسندگان مسئولیت محتوای علمی مقاله را پذیرفته و متعهد شوند که تا اخذ پاسخ از نشریه یاخته حداکثر ۵–۴ ماه) آن را برای سایر نشریات ارسال ننمایند.

۳– نحوه تنظیم مقاله:

۳–۱– صفحه اول

عنوان مقاله، نام کامل نویسندگان، درجه علمی، نشانی و محل اجرای تحقیق.

نویسندگان باید ترتیب درج اسامی خود را مشخص نمایند و نشانی و شماره تلفن نویسنده اول (رابط) ذکر شود.

۳–۲– صفحه دوم

چکیده فارسی مقاله حداکثر ۲۰۰ کلمه و در مقالات کوتاه حداکثر ۱۰۰ کلمه بوده و به تفکیک شامل موارد زیر باشد:

– هدف، مواد و روشها، یافته‌ها، نتیجه‌گیری، گل‌واژگان (حداقل ۳ و حداکثر ۵)

۳–۳– صفحه سوم

چکیده انگلیسی به تفکیک شامل: Key words، Conclusion، Results، Material & Methods، Introduction حداکثر در یک صفحه A_4

۳–۴– اصل مقاله شامل:

مقدمه: بیان مسئله و هدف از اجرا، با مروری بر بررسی‌های گذشته.

مواد و روشها: شرح دقیق موارد و روشهای بکار گرفته شده به طریقی که دیگران قادر به تکرار آن باشند.

یافته‌ها: شرح کامل یافته‌های کمی و کیفی تحقیق همراه با تصاویر لازم و جداول و نمودارها.

بحث: شامل نکات مهم یافته‌ها و مقایسه آن با یافته‌های دیگران و علت‌یابی موارد مشترک و اختلاف و بیان کاربرد احتمالی یافته‌ها و در انتها نتیجه‌گیری حداکثر در ۵ خط آورده شود.

تقدیر و تشکر: اگر مؤسسه‌ای بودجه تحقیقاتی برای تهیه مقاله در اختیار نویسندگان گذاشته است؛ نام مؤسسه و شماره مصوب بودجه تحقیقاتی نوشته شود. اگر کسانی بطور غیرمستقیم در انجام تحقیق دخالت داشته‌اند، در انتهای مقاله اسم آنان آورده شود.

منابع: منابع در متن شماره‌گذاری شود و به ترتیب ورود در فهرست منابع آورده شود.

– برای کتاب: نام نویسندگان، اسم کتاب، مؤلف کتاب، ناشر، محل نشر، سال انتشار، صفحه

مثال فارسی:

صالحی کرمانی محمدحسن: بیماریها و آندوسکوپی دستگاه فوقانی گوارش. چاپ دوم، سازمان انتشارات و آموزش انقلاب اسلامی تهران ۱۳۶۸، صفحات ۱۸۰–۱۷۳

مثال انگلیسی:

Sigman M, Lipshultz LI, Howards SS: Evaluation of subfertile male. In infertility in the Male, LI Lipshultz, SS Howards (eds) Philadelphia, Mosby Year Book, 1991, pp 179-210.

برای مقاله: نویسندگان، عنوان مقاله، نام نشریه، سال انتشار، شمارهٔ صفحه

مثال فارسی:

ابراهیمی ابوالفضل، حسینی احمد، سازگار قاسم: بررسی اثر روی تکمیلی بر التیام زخمهای برش در موش صحرایی، پژوهش در پزشکی ۱۳۷۶، سال ۲۱، شماره ۳، صفحه ۶۲–۵۵

مثال انگلیسی:

Valojerdi RM, Hosseini A, Nematollahi N, Mozdarani H: The effect of Vero cell on development of two cell mouse embryo. Middle East Fert Soc J, 1997; 2(1): 35-42

۳–۵– تصاویر و نمودارها

– عکسها حتی‌المقدور سیاه و سفید باشد و علامتهای لازم روی آنها چسبانده شده باشد. تصاویر بایستی عکس باشد نه فتوکپی یا زیراکس و نام مقاله و مؤلف با مداد نرم پشت آن نوشته شود.

– جداول و نمودارها سیاه و سفید باشد، بر روی کاغذ گلاسه رسم شده یا چاپگر لیزری چاپ گردد.

– از تصاویر و نمودارها دو نسخه اصلی ارسال گردد.

– موارد اخلاقی تحقیق رعایت شده باشد.

۴– از مقالاتی که از نرم افزار WORD استفاده نموده و به وسیله دیسکت به دفتر نشریه ارسال شود، استقبال می‌گردد.

۵– در مقاله از مخففها و علائم استاندارد بین‌المللی استفاده شده باشد.

۶– در مقالات کوتاه نویسندگان باید طی نامه‌ای اعلام نمایند که این مقاله یک (Short Communication) است.

۷– یک نسخه اصلی و سه نسخه زیراکس از مقاله برای نشریه ارسال گردد.

۸– ترتیب درج مقاله در نشریه به شخصیت علمی نویسندگان مربوط نمی‌شود.

۹– شورای نویسندگان در رد یا قبول مقالات آزاد هستند.

۱۰– مقاله‌های رسیده برای حداقل پنج نفر داور ارسال شده و با اخذ سه داور، به شورای نویسندگان ارائه می‌شوند (هویت داوران مکتوم خواهد ماند). مقالاتی که برای چاپ آماده شده‌اند برای تایید نهایی به نویسندگان ارجاع می‌شوند.

۱۱– نشریه پزشکی یاخته، حق رد، قبول و نیز ویراستاری مقالات را برای خود محفوظ داشته و هیئت تحریریه در انجام اصلاحات (با تائید مؤلف) آزاد است.

۱۲– چاپ و انتشار مطالب نشریه پس از کسب اجازه از سردبیر با ذکر مأخذ مجاز است.

توجه: هر کدام از شرایط ذکر شده رعایت نشود، مقاله بررسی نشده و عودت داده می‌شود.

نشانی: تهران، خیابان ولیعصر، خیابان زعفرانیه، چهار راه آصف، خیابان شهید اعجازی،کوچه حامد، پلاک ۶

صندوق پستی: ۴۶۴۴–۱۹۳۹۵، تلفن: ۲۴۱۳۷۹۰، ۲۴۰۲۴۸۶، ۲۴۱۹۰۹۹، دورنگار: ۲۴۱۴۵۳۲

Email: yakhteh@royaninstitute.org

www.royaninstitute.org

به نام خدا

فهرست مقالات

● **مطالعه اثر تجویز خوراکی طولانی مدت وراپامیل بر روی کمیت‌های خونی در موشهای صحرایی نر**
محمد شعبانی، صالح زاهدی اصل، هما مناهجی ۶۵

● **بررسی روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای بر بقاء و تکوین جنینهای دو سلولی موش**
مینا رمضانی، مجتبی رضازاده ولوجردی، کاظم پریور ۶۹

● **اثر هورمون‌های استروئیدی جنسی (۱۷ بتا استرادیول و ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون) بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی رت تحریک شده با TGF-β**
کاظم احمدی، قاسم سلگی ۷۵

● **اثر ضد میکروبی عصاره کلروفرمی سیر (آلیسین) بر بروسلا ملی تنسیس (Rev 1) و بروسلا آبورتوس (S 19) درون ماکروفاژی**
رضا شاپوری، مرتضی ستاری، زهیر محمدحسن ۸۱

● **بیان متمایز دو واریانت مختلف Survivin در طی تکوین مغز موش**
مجتبی عمادی بایگی، سیدجواد مولی، پروانه نیک‌پور، تقی طریحی ۸۵

● **غنی سازی سلولهای دندریتیک دست نخورده خون محیطی به روش بید مغناطیسی متصل به آنتی بادی**
نادره نادری، علی اکبر پورفتح الله، کامران علی مقدم، اردشیر قوام زاده، محمد مؤذنی ۹۱

● **اثر هم‌افزائی سیکلوسپورین A به همراه فاکتورهای رشد خونساز بر روی تکثیر سلولهای مغز استخوان انسان در کشت طولانی مدت مغز استخوان و کشت کلونال در محیط نیمه جامد آگار**
مینو سیاری، علی‌اکبر پور فتح الله، کامران علی مقدم، مسعود سلیمانی ۹۷

● **تاثیر رتینوئیک اسید بر تمایز سلولهای عصبی از بن یاخته‌های جنینی انسان با و بدون مورفولوژی Rosette**
حسین بهاروند، مریم حاتمی، نرگس زارع ۱۰۳

● چکیده انگلیسی مقالات ۱۱۰

توضیح طرح روی جلد: شکل ۲، قسمت B، صفحهٔ ۱۰۶

چکیده مقالات در
1. *Index Medicus for the WHO Estern Mediterranea Region (IMEMR)*
2. *Index Compernicus Division*
3. *Cambridge Scientific Abstract (CAS)*

فهرست می‌شود.

صاحب امتیاز:
پژوهشکده رویان جهاددانشگاهی

مدیر مسئول:
دکتر سعید کاظمی آشتیانی

سردبیر:
دکتر احمد حسینی

شورای نویسندگان:
دکتر محمد کاظم آقایی مظاهری
دکتر ژیلا بهزادی
دکتر تقی الطریحی
دکتر مجتبی رضازاده
دکتر منصور جمالی زواره‌ای
دکتر سعید سمنانیان
دکتر علیرضا عسگری
دکتر بهرام کاظمی
دکتر حمید گورابی
دکتر حسین مزدارانی
دکتر حسینعلی مهرانی
دکتر محمدحسین نصر اصفهانی

شورای اجرایی:
فریده ملک‌زاده
عبدالحسین شاهوردی
دکتر احمد وثوق
دکتر رضا عمانی سامانی

ویراستار ادبی فارسی:
دکتر سعید کاظمی آشتیانی
ویراستار انگلیسی:
دکتر لیدا فدائی زاده
حروف نگاری و طراحی صفحات داخلی:
شهره روحبانی

یاخته

مطالعه اثر تجویز خوراکی طولانی مدت وراپامیل بر روی کمیت های خونی در موشهای صحرایی نر

محمد شعبانی M.Sc. ☆، صالح زاهدی اصل Ph.D. ❀❖، هما مناهجی Ph.D. ❀

☆دانشگاه علوم پزشکی کرمان، بیمارستان افضلی‌پور

❀ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات غدد

❀ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

❖آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۴۷۶۳-۱۹۳۹۵، مرکز تحقیقات غدد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

پست الکترونیک: Email: zahedis@hotmail.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۱۰/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۱۲

* **هدف:** بررسی اثر مصرف طولانی مدت وراپامیل با دوزهای مختلف روی عناصر خونی در موش صحرایی نر

* **مواد و روشها:** این تحقیق بر روی موش های صحرایی نر که مدت دو ماه دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، وراپامیل را به صورت خوراکی دریافت کردند، انجام شد. شمارش گلبولهای خونی توسط لام نئوبار و میکروسکوپ نوری انجام شد و برای رنگ آمیزی جهت تعین درصد انواع گلبولهای سفید از محلول گیمسا استفاده شد.

* **یافته ها:** در شمارش گلبولهای سفید و قرمز تغییرات معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. درصد لنفوسیتهای در گردش در گروه ۲۰ و ۵۰ نسبت به گروه شم و کنترل کاهش معنی دار و درصد منوسیتهای در گردش در گروه ۱۰، ۲۰ و ۵۰ نسبت به گروه شم و کنترل افزایش معنی داری($P<0/05$) نشان داد. درصد نوتروفیلها، ائوزینوفیلها و بازوفیلهای در گردش بین گروههای مختلف تفاوت معنی داری نشان نداد.

* **نتیجه گیری:** نتایج حاصل به خصوص کاهش درصد لنفوسیتها در دوزهای متوسط و بالای وراپامیل اثر احتمالی وراپامیل در تضعیف سیستم ایمنی را تایید می کند که توجه به این مسأله را در بیمارانی که از وراپامیل به مدت طولانی استفاده می کنند مطرح می نماید.

گل واژگان: وراپامیل، گلبولهای سفید، گلبولهای قرمز، لنفوسیت

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۶۸-۶۵

مقدمه

مسدود کننده های کانالهای کلسیمی دارای طیف وسیعی از عملکرد هستند. استفاده ازداروهای بلوک کننده کانالهای کلسیمی به عنوان ترکیبات پایین آورنده فشار خون و متسع کننده عروق کرونر در درمان آنژین وبه عنوان ضد آریتمی در درمان بیماریهای قلب وعروق مصرف روز افزون دارد. در بین داروهای مورد استفاده از این دسته وراپامیل ، نیفدیپین و دیلتیازم اولین داروهایی هستند که شناخته و سنتز شدند و استفاده کلینیکی وسیع تری نسبت به بقیه داروهای این گروه دارند (۱). این داروها به صورت خوراکی فعال هستند و به راحتی با پروتئینهای پلاسما باند می شوند. با اولین عبور حدود ۹۰-۸۰ درصد متابولیسم کبدی برای وراپامیل ودیلتیازم صورت می گیرد. وراپامیل پس از تجویز خوراکی حدود ۹۰ درصد آن جذب می‌شود و شروع اثر آن تقریبا" ۳۰ دقیقه پس از تجویز است (۲). اغلب داروهای مورداستفاده در کلینیک در کنار اثرات شفا بخشی، دارای یک سری عوارض جانبی نیز هستند، مخصوصا" اگر به صورت دراز مدت مصرف شوند.

وراپامیل نیز از این قاعده مستثنی نیست. بیمارانی که به مدت طولانی از وراپامیل خوراکی استفاده می کنندممکن است دچار عوارضی چون بلوک دهلیزی- بطنی، نارسائی قلبی، تهوع، یبوست، افت فشار خون، گیجی، گرگرفتگی، سردرد و خستگی، عوارض پوستی، اختلالات کبدی و سمیت کبدی شوند (۱، ۲، ۳، ۴). همچنین گزارشات متناقضی مبنی براثر وراپامیل بر روی سلولهای خونی وجود دارد و در چند دهه اخیر وراپامیل به عنوان یک داروی سرکوب کننده سیستم ایمنی مطرح شده که در درمان سرطان به همراه سیکلوسپورین A می‌تواند موثر باشد (۵). این نقش احتمالا از طریق بلوک یون کلسیم -که جهت حیات سلولهای T در تیموس ضروری است -(۶) و یا از طریق مهار P-gp ۱۷۰ ایفاء می‌شود (۵، ۷). وراپامیل باعث کاهش تکثیر لنفوسیتها می‌شود که این اثر را می تواند از طریق کاهش PKC و یا کاهش بیان ژنی که در کدگذاری mRNA برای IL-2 و سرین استراز اختصاصی جهت تکثیر لنفوسیتهای T لازم است اعمال کند (۱۰-۶). با توجه به مصرف روز افزون این دارو و عدم آگاهی کافی از اثرات آن در بعضی پدیده‌های فیزیولوژیک از جمله در روند خونسازی و با در نظر گرفتن نقش قابل توجه یون کلسیم در پدیده تکثیر سلولی

(۳) تا کنون عمدتا" اثر وراپامیل را به صورت حاد و در کوتاه مدت بررسی کرده‌اند در این مطالعه اثرمصرف طولانی مدت وراپامیل با دوزهای مختلف بر تعداد سلولهای خونی بررسی شده است.

مواد و روشها

در این مطالعه از تعداد ۵۰ سر موش صحرایی (Rat از نژاد Wistarبالغ از جنس نر با وزن ۲۰۰-۱۰۰ گرم تهیه شده از مؤسسه تحقیقاتی پاستور ایران) استفاده شد. حیوانها در شرایط ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با حرارت ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند. وزن اولیه هر یک از حیوانات تعیین و نمونه‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه ده تایی تقسیم شد.

گروه اول (شم) به مدت دو ماه در شرایط یکسان آب وهوایی وتغذیه با گروه های دیگر نگهداری شدند بدون اینکه هیچ دارویی دریافت کنند.

گروه دوم (کنترل) به مدت دو ماه آب مقطر به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه سوم تا پنجم به مدت دو ماه وراپامیل را با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به صورت خوراکی دریافت کردند.

وراپامیل (اهدائی شرکت روز دارو- ایران) با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به صورت خوراکی(داخل معدی) و در حجم ۱تا ۱/۵ میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفت. محلول وراپامیل هر بار قبل از تجویز در آب مقطر حل ودر روز آزمایش تجویز می‌شد. آب مقطر و وراپامیل با استفاده از لوله مخصوص (oral tube) روزانه ساعت ۱۰-۸ صبح از راه دهان تجویز می‌گردید و در طول دو ماه حیوانات به صورت هفتگی توزین می‌شدند.

برای تهیه خون ابتدا حیوانات وزن شده وسپس با استفاده از کتامین با دوز ۱۱۰ mg/kg بیهوش شدند. خون گیری پس از باز کردن شکم و از راه آئورت شکمی حیوان صورت گرفت که در شیشه های حاوی EDTA جهت انجام آزمایشات خون شناسی جمع آوری شد. جهت شمارش گلبولهای قرمزو سفید از لام هماسیتومتر ولامل سنگی و برای تهیه رقت لازم از محلول ایزوتونیک نرمال سالین ۰/۹ درصد ومحلول رقیق کننده مارگانو (Margano Solution) استفاده شد. از نمونه‌های خون لام تهیه و با استفاده از متانول فیکس و با رنگ گیمسا تازه رقیق شده (۱ حجم گیمسا با ۱۵ الی ۲۰ حجم از بافر آبی) رنگ‌آمیزی شدند (۱۱). اطلاعات به وسیله نرم افزار SPSS 10 و Excell آنالیز شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شدند و جهت مقایسه بین گروهها از آزمون t، آنالیز واریانس و Post testهای مربوطه استفاده گردید. نتایج با P<۰/۰۵ به عنوان نتایج معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

در شروع آزمایشات، بین وزن موشهای گروه کنترل (۱۲۹±./۵) با گروه ۱۰(۳/۴± ۱۳۴/۱)، گروه ۲۰ (۱۳۱/۲±۵/۱) وگروه ۵۰ (۱۲۵/۸±۴) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت . پس از اتمام دوره آزمایش نیز مقایسه وزن بین گروههای مختلف، اختلاف معنی داری را نشان نداد. نتایج به دست آمده از شمارش گلبولهای قرمز موجود در یک میلی متر مکعب خون نشان می دهد که بین تعداد گلبولهای قرمز گروه شم و کنترل با گروههای تحت درمان با وراپامیل اختلاف معنی داری وجود ندارد. نتایج حاصل از شمارش گلبولهای سفید افزایش معنی داری (P<۰/۰۵) در گروه کنترل و دریافت کننده وراپامیل ۱۰ نسبت به گروه شم نشان داد اما بین گروه شم وگروه وراپامیل ۲۰ و ۵۰ اختلاف معنی داری وجود نداشت. در شمارش گلبولهای سفید بین گروه کنترل و گروههای دریافت کننده وراپامیل اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۱). نتایج حاصل از تعیین درصد لنفوسیت در بین گروههای مختلف حاکی از آن است که بین گروه شم و گروه کنترل با گروه وراپامیل ۱۰ اختلاف معنی داری وجود ندارد اما درصد لنفوسیتها در گروههای ۲۰ و ۵۰ کاهش معنی داری نسبت به گروه شم و گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۵). در نتایج حاصل از تعیین درصد نوتروفیلها، ائوزینوفیلها و بازوفیلهای در گردش بین گروههای مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد. درصد مونوسیتها در گروههای ۱۰، ۲۰ و ۵۰ با P کمتر از ۰/۰۵ نسبت به گروه شم افزایش یافت (جدول ۲).

جدول شماره۱: مقایسه عناصر خونی بین گروه های شم ،کنترل و دریافت کننده دوزهای۱۰،۲۰ و ۵۰ میلی گرم وراپامیل به ازای کیلو گرم وزن بدن

متغیرها	گروه شم	گروه کنترل	گروه ۱۰ وراپامیل	گروه ۲۰ وراپامیل	گروه ۵۰ وراپامیل
گلبول قرمز (10^{12}/L)	۷/۹±۰/۱۴	۸/۲۵±۰/۳۴	۸/۱۴±۰/۴۳	۸/۸۹±۰/۴۲	۸/۹۶±۰/۴۸
گلبول سفید (10^{6}/L)	۵۷۵۳±۶۲۳	۸۴۴۵±۷۸۲✠	۹۲۸۵±۱۲۲۹✠	۷۵۶۰±۶۵۲	۷۹۶۹±۱۱۸۰
لنفوسیت (10^{6}/L)	۵۲۵۲±۷۳۰	۶۱۰۷±۶۱۵	۵۹۸۰±۱۰۰۲	۵۳۷۷±۲۱۸*	۴۵۸۹±۶۷۳ *
نوتروفیل (10^{6}/L)	۱۰۱۲±۵۱۱	۱۲۹۹±۴۷۴	۱۱۸۰±۵۴۳	۱۴۵۶±۱۳۸۲	۱۳۸۸±۲۸۵
مونوسیت (10^{6}/L)	۲۴۸±۱۱۴	۳۵۸±۱۲۷	۶۵۱±۲۰۲*✠	۵۸۲±۱۲۹*✠	۶۰۶±۱۸۰*✠

✠ نشان معنی دار بودن اختلاف با گروه شم و* نشان معنی دار بودن اختلاف با گروه کنترل می باشد

جدول شماره ۲: مقایسه عناصر خونی بین گروه های شم، کنترل و دریافت کننده دوزهای۱۰،۲۰ و ۵۰ میلی گرم وراپامیل به ازای کیلو گرم وزن بدن

متغیرها	گروه شم	گروه کنترل	گروه ۱۰ وراپامیل	گروه ۲۰ وراپامیل	گروه ۵۰ وراپامیل
لنفوسیت (درصد)	۸۲/۴±۱/۹	۷۹/۵۵±۱/۱۵	۷۸/۴±۱/۲	۲۷/۱±۲/۶✠*	۷۲/۶±۱/۹✠*
نوتروفیل (درصد)	۱۳/۶±۱/۶	۱۵/۹±۱	۱۴±۱/۲	۱۸/۷±۲/۲	۱۹±۲
مونوسیت (درصد)	۳/۶±۰/۴	۴/۴۴±۰/۶	۷±۰/۸۶✠*	۸/۸±۱✠*	۸/۱۲±۱/۱✠*
ائوزینوفیل (درصد)	۰/۴۴±۰/۱	۰/۱۱±۰/۱۱	۰/۳۷±۰/۱۸	۰/۳±۰/۱۳	۰/۲۵±۰/۱۶
بازوفیل (درصد)	۰/۱۱±۰/۱	۰	۰	۰/۱±۰/۱	۰

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده‌اند.

✠ نشان معنی‌دار بودن اختلاف با گروه شم و* نشان معنی دار بودن اختلاف با گروه کنترل است.

بحث

نتایج حاصل از شمارش گلبولهای سفید، در گروه کنترل و ۱۰ وراپامیل افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شم نشان داد در حالی که بین گروه کنترل وگروههای دریافت کننده وراپامیل اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

دلیل آن ممکن است استرس حاصل از نحوه تجویز دارو باشد. به این صورت که گروه کنترل وگروه های تحت درمان با وراپامیل هر روز با استفاده از لوله مخصوص گاواژ دارو یا آب مقطر دریافت می‌کردند که باعث افزایش گلبولهای سفید در گروه کنترل شده است اما به دلیل اثر ضد التهابی و نقشی که وراپامیل در جلوگیری از مهاجرت لوکوسیتها و در تضعیف سیستم ایمنی می تواند ایفا کند (۵، ۶، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵) و یا به علت اثر وراپامیل در مواجه با استرس (۱۶) در دوزهای متوسط و بالا از افزایش گلبولهای سفید جلوگیری کرده است، در حالی که دوز ۱۰ وراپامیل نتوانسته این اثر را اعمال کند. عدم معنی‌داری اختلاف بین گروههای دریافت کننده وراپامیل با گروه کنترل که به یک روش وراپامیل و آب مقطر را دریافت کرده اند، این نکته را تایید می کند. در شمارش لنفوسیتها، گروههای ۲۰و۵۰ نسبت به گروههای شم و کنترل ($P<0/05$) حدود ۱۰-۸ درصد کاهش نشان داد. چون کلسیم جهت حیات لنفوسیتها در تیموس ضروری است (۶). وراپامیل به عنوان یک مسدود کننده کانالهای کلسیمی و به دلیل اثر مهار کنندگی آن بر روی P-gpو کاهش IL-2 می‌تواند از تکثیر لنفوسیتهای Tجلوگیری کند (۶، ۷، ۸، ۹). Bonhomme-Faivre و همکاران مشاهده کردند که مصرف طولانی مدت خوراکی وراپامیل با دوز ۰/۶ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم ۱۸-۱۰درصد لنفوسیتهای موش سوری را کاهش می‌دهد.

Martinez و همکارانش گزارش کردند که تجویزداخل صفاقی وراپامیل ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم در موش صحرایی به تنهایی یا همراه دیکلوفناک تاثیری روی تعداد لنفوسیتها ندارد، اما نقش ضد التهابی آن از طریق کاهش در مهاجرت سلولی ایفا می‌شود (۵، ۶، ۷، ۱۴).

این یافته‌ها شبیه یافته‌های این تحقیق در دوز ۱۰ وراپامیل است. با توجه به یافته های ما و Martinez دوز ۱۰میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وراپامیل از راه خوراکی و داخل صفاقی احتمالاً تاثیری بر روی لنفوسیتها ندارد. درتحقیقی دیگر Balakumaran و همکارانش مشاهده کردند که تجویزداخل صفاقی وراپامیل با دوز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو گرم باعث مرگ سلولی در تیموس می‌شود(۶).

با توجه به یافته های این پژوهش و دیگران شاید بتوان بیان کرد که مصرف طولانی مدت وراپامیل باعث کاهش درصد لنفوسیتهای در گردش می شود. در شمارش نوتروفیل ، بازوفیل و ائوزینوفیل بین گروه شم وکنترل با گروههای دریافت کننده وراپامیل اختلاف معنی داری مشاهده نشد. این یافته ها با یافته های Martinezو Balakumaran در یک سو است، و نشان می‌دهد که وراپامیل در دوزهای پایین، متوسط و بالا اثری روی تعداد نوتروفیلها، بازوفیلها وائوزینوفیلها ندارد. درصد مونوسیتهای در گردش در گروه های تحت درمان با دوزهای ۱۰و۲۰و۵۰ وراپامیل نسبت به گروه شم وکنترل افزایش یافت.

Martinez و همکارانش با تجویز داخل صفاقی وراپامیل در موش صحرایی هیچ تاثیری را بر روی تعداد مونوسیتها مشاهده نکردند. دلیل این موضوع به احتمال زیاد تجویز دوز پایین و کوتاه مدت وراپامیل بوده است. در تحقیقی دیگر که Bonhomme-Faivre و همکارانش بر روی موش سوری انجام دادند مشاهده کردند که مصرف کوتاه مدت وراپامیل با دوز ۰/۱۲ میلی گرم در هر موش سوری تاثیری بر روی مونوسیتها نداشت، اما مصرف طولانی مدت خوراکی وراپامیل با دوز ۰/۶میلی گرم باعث کاهش تعداد مونوسیتها شد.

با توجه به اینکه تعداد کل گلبولهای سفید در گروههای ۱۰، ۲۰ و ۵۰ وراپامیل و کنترل - که به یک روش دارو یا آب مقطر را دریافت می‌کردند - افزایش پیدا کرده است، اما تنها در گروه های دریافت کننده وراپامیل کاهش لنفوسیتها دیده می شود ،بنابراین افزایش مهاجرت سلولی در پاسخ به استرس وارد شده به علت نحوه تجویز دارو به مقدار بیشتری به افزایش مونوسیتهای در گردش مربوط می شود نتایج توزین حیوانات نشان می دهد که اختلاف معنی داری در وزن اولیه و ثانویه حیوانات گروه کنترل وگروه های دریافت کننده وراپامیل وجود ندارد. لذا می توان نتیجه گرفت که گروه ها یکسان تغذیه شده و مصرف خوراکی وراپامیل تاثیری بر روی وزن حیوانات نداشته است وحیوانات در طول بررسی از وضع جسمی نسبتاً خوبی برخوردار بوده‌اند. نتایج حاصل از شمارش گلبولهای قرمز در هر میلی متر مکعب خون اختلاف معنی داری را بین گروه های مختلف نشان نداد.

مشابه یافته هایی که ما در توزین وزن و شمارش گلبولهای قرمز داشتیم، Bonhomme-Faivre و همکارانش پس از ۱۱ هفته تجویز خوراکی وراپامیل در موش سوری گزارش کردند (۷).

در مجموع می توان گفت که داروی وراپامیل

مـــی تـــوانـــد فـــاکتورهای ایـــمونولوژیکال وهـــماتولوژیکال را تـــحت تـــاثیر قـــرار دهـــد بـــنابرایـــن در بـــیمارانـــی که به صـــورت مـــزمن از ایـــن دارو اســـتفاده مـــی کـــنند از اهـــمیت خـــاصی بـــرخوردار است و پـــیشنهاد مـــی شـــود که در چـــنین اشـــخاصی پـــارامـــترهای ایـــمنی تـــحت کـــنترل باشد.

تقدیر و تشکر

در اجـرای ایـن تـحقیق از حـمایت مـالی مـرکز تـحقیقات غـدد و بـخش فـیزیولوژی دانـشگاه عـلوم پـزشکی شـهید بـهشتی و مساعدتهای کارکنان آزمایشگاه فیزیولوژی مرکز تحقیقات غدد، خانم فرزانه فرجی و آقای حسین صفاخواه بهره مند شدیم که بدین وسیله تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Lee KS, Tsien RW: Mechanism of calcium – channel blockade by verapamil, D 600, diltiazem and nitrendipine in single dialyzed heart cells. Nature. 1983; 302: 790-794

2. Katzung BG: Basic and clinical pharmacology, Appleton & Lange medical book Stamford Connecticut 1995; 301-305

3. Stryer L: Biochemistry, 14ed. W H freeman and company New york. 1995; 325- 374

4. Semple CG: Calcium channel antagonist and endocrin statue: Lack of effect of oral verapamil on pituitry and testicular function. Br J Clin Pharmacol. 1984; 17: 179-182

5. Larsson R, Nygren P: Verapamil and cyclosporine A potentiate the effects of chemotherapeutic drugs in the human medullary thyroid carcinoma TT cell line not expressing the 17o kDa p – glygoprotein. Cancer Letters. 1990; 54: 125-131

6. Balakumaran A, Campbell GA, Moslen MT: Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 1996; 139(1): 122-127

7. Bonhomme-Faivre L, Forestier F, Auchere D, Soursac M, Orbach-Arbouys S, Farinotti R. Chronic administration of verapamil, ketoconazole and carbamazepine: impact on immunological parameters. Int J Pharm. 2002; 238(1-2): 133-137

8. DePetrillo PB, Abernethy DR, Wainer IW, Andrawis NS: Verapamil decreases lymphocyte protein kinase C activity in humans. Clin Pharmacol Ther. 1994; 55(1): 44-49

9. Zanker B, Marx S, Strom TB, Kohler H: The immunosuppressive effects of verapamil upon mitogen upon mitogen activated and alloantigen inducible human cytotoxic T-lymphocytes. Int J Immunopharmacol. 1994; 16(7): 507-517

10. Zanker B, Walz G, Wieder KJ, Moscovitch-Lopatin M, Smith BR, Strom TB, Verapaml selectively inhibitis expression of interleukin-2 messenger RNA in mitogen activated mononuclear blood cells. Transplant Proc. 1989; 21(1 Pt 1): 85-87

11. Bernard Henry J: Hematology Coagulation Transfusion Medicine.19th Edition, Syracuse, New York 1996; 20-60

12. Martinez LL: Aparecida De Oliveira M, Fortes ZB. Influence of verapamil and diclofenac on leukocyte migration in rats. Hypertension. 1999; 34(4 Pt 2): 997-1001

13. Mix E, Correale J, Olsson T, Solders G, Link H: Calcium antagonists suppress experimental allergic neuritis (EAN). J Autoimmun. 1992; 5(1): 69-82

14. Rosales C, Brown EJ: Calcium channel blockers nifedipine and diltiazem inhibit Ca2+ release from intracellular stores in neutrophils. J Biol Chem. 1992; 267(3): 1443-1448

15. Mix E, Olsson T, Solders G, Link H: Effect of ion channel blockers on immune response and course of experimental allergic neuritis. Brain. 1989; 112 (Pt 6): 1405-1418

16. Bergey JL, Much DR: Direct effects of diltiazem, nifedipine and verapamil on peripheral sympathetic nerve function, cardiac impulse conduction and cardiovascular function in anesthetized dogs subjected to ganglionic blockade. Eur J Pharmacol. 1986; 22: 128(1-2): 109-118

بررسی روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای بر بقاء و تکوین جنینهای دوسلولی موش

مینا رمضانی M.Sc.[☆♦]، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.[☆☆]، کاظم پریور Ph.D.[☆]

☆دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی

☆ پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی

پست الکترونیک: info@royaninstitute.org

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۱۲/۱۸، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۱۴

* **هدف:** مقایسه اثرات سه روش مختلف انجماد شیشه‌ای [closed pulled straw (CPS), Open pulled straw (OPS), Conventional (C)] بر بقاء مورفولوژیکی جنینهای دو سلولی موش و تکوین آنها به بلاستوسیستهای Hatched

* **مواد و روشها:** جنینهای دو سلولی موش به چهار گروه کنترل (C,(۱۹۴ (۱۶۰) OPS, (۱۵۰) و CPS (۱۵۵) تقسیم شدند. جنینهای گروه کنترل در محیط HTF به مدت ۱۲۰-۹۶ ساعت کشت داده شدند. در گروههای انجمادی جنینها با اتیلن گلیکول ۵/۵ مولار و یک مول سوکروز با سه روش مختلف منجمد و پس از ذوب سریع در دمای اطاق، جنینها درمحلولهای سوکروز (۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ مولار) به صورت مرحله به مرحله آبدهی شدند و پس از سه بار شستشو در محیط HTF کشت داده شدند. پس از ذوب، جنینهای زنده در هر روش تعیین شد. توانایی جنینهای زنده برای ادامه تکوین براساس کشت In vitro آنها مشخص و با گروه کنترل مقایسه شد. در تمامی موارد از آزمون آماری χ^2 استفاده شد.

* **یافته‌ها:** میزان بقاء جنینها پس از ذوب به طور معنی‌داری در CPS ۷۶درصد بیشتر از OPS (P<۰/۰۱، ۶۲درصد) و C (P<۰/۰۵، ۶۶درصد) است.

میزان بلاستوسیستهای hatched در C (۵۸درصد)، OPS (۵۵درصد) و CPS (۶۴درصد) اختلاف معنی‌داری نداشت. اما به طور معنی‌دار کمتر از کنترل (۷۲درصد) در گروههای C (P<۰/۰۵) و OPS (P<۰/۰۱) بود.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه حاکی از آن است که روش CPS احتمالا راه مفیدتری برای انجماد جنینهای دو سلولی موش است.

گل واژگان: انجماد شیشه‌ای، نی کشیده شده باز (OPS)، نی کشیده شده بسته (CPS)

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۷۴-۶۹

مقدمه

از زمان ابداع روش انجماد شیشه‌ای (vitrification) در زمینه تولید مثل توسط Rall و Fahy حدود دو دهه می‌گذرد (۱). اساس انجماد شیشه‌ای بر عدم تشکیل کریستال یخ به علت استفاده از غلظتهای بالای محافظین انجمادی و سرعت بالای سرد و گرم شدن، استوار است. در این روش مایعات داخل جنین به هنگام سرد شدن بدون تشکیل کریستال یخ ، به جامد شیشه‌ای تبدیل می‌شوند.

از زمان ارائه روش فوق محققین سعی نموده‌اند با به‌کارگیری ضد یخهای با سمیت کمتر، تغییر غلظت ضد یخها و استفاده از ماکروملکول ها برای افزایش سرعت آبگیری، کارآیی انجماد شیشه‌ای را افزایش دهند (۲، ۳، ۴، ۵). در این رابطه Ali و Shelton پس از بررسی ترکیبات مختلف، ترکیب VS_{14} (اتیلن گلیکول ۵/۵ مولار و سوکروز ۱ مولار) را به عنوان مناسبترین ترکیب برای انجماد شیشه ای تمام مراحل جنینی موش به جز یک سلولی ارائه کردند VS_{14}. حتی پس از ۳۰ دقیقه در معرض قرار گیری برای جنینهای موش سمی نبود (۵). همچنین عده ای از محققین در پی نظریه اثرات مفید افزایش سرعت تغییرحرارت ، انجماد شیشه ای با روشهای فوق سریع (ultrarapid) را مطرح کردند.

اولین گزارش از روش انجماد شیشه ای فوق سریع، توسط Leibo و همکارانش ارائه شد (۶). آنها سیستم انجماد شیشه ای با استفاده از گرید های میکروسکوپ الکترونی را توصیف کردند .این سیستم باعث افزایش انتقال گرما به هنگام انجماد در نیتروژن مایع می‌شود. Martino روش اخیر را در تخمکهای گاو به کار برد و با قرار دادن مستقیم تخمکها بر روی گرید های میکروسکوپ الکترونی، سرعت تغییر حرارت را افزایش داد. وی نشان داد که میزان آسیب سرمایی (chilling damage) در تخمکهای گاو کاهش یافته و درصد بالاتری بلاستوسیست زنده نسبت به نی معمولی به دست

مـــی‌آید (۷). دو ســـال بـــعد Vajta و هـــمکارانش روش OPS(Open pulled straw) را مطرح کردند و گزارش نمودند که پتانسیل باروری تخمکهای منجمد شده با این روش در مقایسه با نـی مـعمولی افـزایش مـی‌یابد (۸). Vajta نـی‌های مـعمولی فریز (نـی فـرانـسوی) را بـر روی شعله گرفت تـا گرم شـود، سپس آنـها را کشید به طوری که طول آنها دو برابر و قطر آنها نصف شد. در نی ops به دلیل قطر کاهش یافته و همچنین طریقه پر کردن نی، حجم کـمی از مـحلول انـجمادی نـسبت به نـی مـعمولی اسـتفاده می‌شود. بـنابرایـن، به دلیـل حـجم کـم مـحیط انـجمادی و ارتـباط مـستقیم مـحیط دارای جـنین بـا نیتروژن مـایع، سـرعت تغییر حرارت افزایش می‌یابد. البته از معایب آن ارتباط مستقیم جنین با نـیتروژن مـایع و احـتمال آلودگی است. اخـیراً روشـی به نـام CPS(Closed Pulled Straw) تـوسط Chen ارائه شـده است که عـلاوه بر اینکه مزایای OPS را در سرعت گرم و سرد شدن‌دارد، مزایای نی معمولی را نیز به عنوان یک روش غیرتماسی دارد (۹). وی از نـی‌های OPS استفاده نـمود و طـوری آن را پر کـرد که دو طـرف مـحلول انـجمادی حـاوی جـنین تـوسط حـباب هـوا و سـپس مـحلول انجمادی بسته شود. بدین طریق یک سیستم بسته ایجاد کرد. Chen روش CPS را برای انجماد شیشه‌ای تخمکهای موش، با روشهای نی معمولی OPS و گرید مقایسه و گزارش نمود که میزان بقاء در روش CPS و نی معمولی به طور معنی‌داری بیشتر از روش OPS و گرید است (۱۰). یـافتن منافع ومعایب نی هـای مـعمولی OPS و CPSو ارائه بـهترین روش انـجماد شـیشه‌ای که درآن جنینها پس از انجماد قـدرت تکوین و حیات خـود را به میزان زیادی حفظ کنند، هـنوز به مـطالعه بـیشتری نیاز دارد. بـنابرایـن در پـژوهش حـاضر سـعی شده است که برای اولین بار اثر سه روش مختلف انجماد شیشـه‌ای (C, OPS و CPS) بر میزان بقاء جنینهای دو سلولی موش و سپس تکوین آنها به بلاستوسیست بررسی شود.

مواد و روشها

تحریک تخمک گذاری و تهیه جنین

در ایـن تـحقیق از مـوشهای سوری ۱۰-۵ هـفته‌ای نـژادNMRI (مؤسسه پاستور) استفاده شد. موشها در دمای ۳±۲۴ ، رطوبت ۵۰-۴۰ درصـد و روشنایی از ساعت ۱۶ الی ۲۰ نـگهـداری شـدند. به مـوشها به مـیـزان ۷/۵ واحـد PMSG (Intervet)[1] به صـورت درون صـفاقی تـــزریق کـــرده و پس از ۴۶ تـــا ۴۸ ســـاعت به هـــمان مـــیزان HCG(Organon)[2] تزریق شد. پس از انجام جفت‌گیری با موش نر از همان نژاد، صبح روز بعد موشهای دارای پلاک واژنی جدا شده و ۴۶ تا ۴۸ ساعت پس از دومین تزریق، موشها به طریق قطع نخاع کشته شده و جنینهای دو سلولی توسط flushing از اویداکت آنها خارج، و به مـــحیط کـــشت HTF حـــاوی ۴mg/ml ســـرم آلبـــومین گاوی (Sigma) مـــنتقل شـــدند. جـــنینهای دو ســـلولی به طـــور تـــصادفی به ۴ گروه کـــنترل و انـــجماد شـــیشه‌ای به طـــریقه CPS، C و OPS تـــقسیم شـــدند. تـــمامی آزمـــایشات ۱۲ بار تکرار شد.

آماده سازی محلولهای انجماد و ذوب

بـــرای تـــهیه مـــحلولهای مـــورد نـــیاز انـــجماد و ذوب از Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) حاوی ۲۰درصد Human Serum Albumin (HSA, Biotest) استفاده شد. در همه روشهای انجمادی، جنینها ابتدا با دو غلظت ۱/۵ مولار (۵ دقیقه) و۵/۵ مولار اتیلن گلیکول (یک دقیقه) (Sigma) به تعادل رسیدند. محلولهای انجمادی از اتیلن‌گلیکول ۵/۵ مولار و ۱ مول سوکروز تهیه شد. محلولهای ذوب نیز به ترتیب شامل سوکروز ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۰/۱۲۵ مـولار بـود که جـنینها به مـدت ۲/۵ دقـیقه در هـر کـدام قرار گرفتند. مدت زمان انجماد حداقل ۲۴ ساعت و حداکثر ۵ روز بود.

انجماد وذوب به طریقه معمولی

برای انجماد، از نی‌های انجماد فرانسوی ۰/۲۵ میلی‌لیتری متصل به یک سـرنگ ۱ مـیلی‌لیتری اسـتفاده شـد. بـا اسـتفاده از سـرنگ ابـتدا ۱ سـانتی‌متر مـحیط انـجمادی وارد کـرده، سپس ۰/۵ سـانتی‌متر هـوا، ۲ سانتیمتر محیط انجمادی حاوی ۱۲-۱۰ جنین، ۰/۵ سانتیمتر هوا و ۳/۵ سـانتیمتر مـحیط انـجمادی کـشیده و انـتهای نـی را تـوسط خمیر هـماتوکریت بـسته (شـکل 1a) و وارد تـانک نـیتروژن مـایع شـد. به مـنظـــور ذوب، ابـــتدا نـــی از تـــانک خـــارج شـــد و به مـــدت ۵ ثـــانیه در هـــوای اطـــاق و ســـپس در آب ۳۷ درجه ســـانتی‌گراد به مـــدت ۱۰ ثـــانیه قـــرار گـــرفت. پس از آن جـــنینها در غـــلظتهای مـختلف سـوکروز به مـنظور ذوب قـرار گرفـته و در مـحیط کشت انـکوبه شـدند. جـنینهای انـکوبه شـده به مـدت ۱۲۰ سـاعت مـطالعه شدند (۱۰).

انجماد و ذوب به طریقهٔ OPS

نـــی‌های انـــجمادی بـــا حـــرارت نـــرم و ســـپس کـــشیده مـــی‌شدند تـــا طول آنـــها دو بـــرابـــر و قـــطر آنـــها نـــصف شود. پس از آبـــگـــیـــری جـــنینها، حدود ۵ تـــا ۶ جـــنین را داخـــل یک قـــطره ۲ مـــیکرولیتری از مـــحیط انـــجمادی گذارده و بـــا اســـتفاده از خـــاصیت موئینگی به داخـــل نـــی کشیده شـــده (شـــکل 1b) و به سرعت وارد تـانک نـیتروژن شـد. بـرای ذوب، نـوک نـی داخـل ۴۰۰ میکرو لیتر مـحلول سوکروز ۰/۵ مـولار قـرار گرفت تـا جنینها خـارج شـوند. جـنینها پس از ذوب و انـکوباسیون به مـدت ۱۲۰ سـاعت مـطالعه شدند (۱۰).

1. Pregnant Mares Serum Gonadotropin
2. Human Chorionic Gonadotropin