

مقاله پژوهشی

بررسی بیان گیرنده‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* در سلول‌های اندوتلیال در پاسخ به هایپرگلیسمی و داروی آتورواستاتین

زیبا فولادوند^۱، محمد علی برومند^۲، مهرداد بهمنش^{۱*}

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

پذیرش: ۱۹ آذر ۱۴۰۱

دریافت: ۱۶ آبان ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف: لایه اندوتلیوم در حفظ هموستاز عروقی نقش مهمی دارد. فعال شدن و اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال از اولین تغییرات قابل تشخیص در آتروسکلروز به عنوان یکی از عوارض ماکروواسکولار دیابت می‌باشد. در این بررسی با توجه عملکرد فیزیولوژیکی گیرنده‌های جفت‌شده با جی پروتئین در سیستم عروقی، تغییرات بیان ژن دو گیرنده *ADGRF5*, *ADGRL4* در شرایط هایپرگلیسمی و استفاده از داروی آتورواستاتین مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: سلول‌های اندوتلیال از شرایط نرمال به محیط هایپرگلیسمی منتقل شدند و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در این شرایط نگهداری شدند. در شرایط هایپرگلیسمی سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با داروی آتورواستاتین (۵ و ۱۰ میکرومولار) قرار گرفتند. بیان ژن‌های هدف در شرایط هایپرگلیسمی و تحت تیمار آتورواستاتین اندازه گیری شد. تست خراش سلولی در حضور داروی آتورواستاتین انجام شد.

یافته‌ها: بیان ژن گیرنده‌های *ADGRF5*, *ADGRL4* در محیط هایپرگلیسمی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به طور معنی‌دار $p \leq 0.01$ کاهش نشان داد. کاهش سطح حدود ۷ تا ۹/۵ برابری و حدود ۷ تا ۲۸ برابری به ترتیب برای ژن‌های مذکور مشاهده شد. تیمار با داروی آتورواستاتین در شرایط هایپرگلیسمی افزایش معنی‌دار بیان ژن‌ها را $p \leq 0.01$ به دنبال داشت. لیگاند‌های *VEGFA*, *DLL4* کاهش شدید بیان نسبت به شرایط هایپرگلیسمی نشان دادند. افزایش توان حرکت سلولی و تغییرات ظاهری سلول‌ها در زمان استفاده از آتورواستاتین مشاهده شد.

نتیجه گیری: تغییرات بیان گیرنده‌های *ADGRF5*, *ADGRL4* در شرایط هایپرگلیسمی می‌تواند نقش این گیرنده‌ها را در روند رگ‌زایی در اختلالات عروقی مورد توجه قرار دهد، که برای مطالعات آینده مرتبط با اختلالات عروقی مربوط به عوارض دیابت می‌تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: اختلال متابولیکی، دیابت، گیرنده‌های جفت‌شده با جی پروتئین

مقدمه

آتروسکلروز می‌باشد [۳، ۴]. فاکتورهای خطر از جمله دیابت، چاقی و پیری با اختلال عملکرد و متابولیسم سلول‌های اندوتلیال، پیشرفت آتروسکلروز را تسریع می‌کنند و بدین ترتیب اندوتلیوم را به عنوان یک عضو فعال متابولیکی موثر در هموستاز عروق و پیشرفت آتروسکلروز معرفی می‌کنند [۳، ۴]. مسیرهای مرتبط با متابولیسم سلولی در سلول‌های اندوتلیال، در روندهای رگ‌زایی، التهاب، و عملکرد سدخونی به عنوان تنظیم کننده عمل می‌کنند [۴].

دیابت نوع ۲ با افزایش کنترل نشده یا نقص در فرآیندهای

دیابت با افزایش مرگ و میر به دلیل عوارض آن از جمله بیماری‌های قلبی عروقی با سرعت نگران کننده‌ای در حال رشد است [۱]. هایپرگلیسمی، اختلال لیپیدی و سایر تغییرات متابولیک در بیماری دیابت منجر به ایجاد و پیشرفت عوارض ماکرو و میکروواسکولار می‌شوند. مشخص شده است که هایپرگلیسمی ناشی از ابتلای به دیابت منجر به رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی به عنوان عوارض میکروواسکولار می‌شود [۲]. فعال شدن و اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال در نواحی مستعد ضایعه عروقی از اولین تغییرات قابل تشخیص در

* نویسنده مسئول مکاتبات: behmanesh@modares.ac.ir (ORCID: 0000-0002-3901-304X)

رگ‌زایی و ایجاد تغییرات پاتولوژیک در عروق ریز و عروق کرونر عوارض دیابت را تشدید می‌کند [۵]. از طرفی مطالعات نشان داده است که کنترل مسیرهای مرتبط با متابولیسم سلولی (گلیکولیز و اکسیداسیون اسیدهای چرب) در اندوتلیال در حضور عوامل خطر آترواسکلروز مانند دیابت و چاقی می‌تواند استراتژی درمانی امیدوارکننده‌ای در برابر آترواسکلروز باشد [۶، ۷]. "گیرنده‌های جفت‌شده با G-پروتئین" (GPCR) ^۱، بزرگترین خانواده گیرنده‌های گذرنده از غشا در یوکاریوت‌ها هستند و سیگنال‌های مرتبط با محرک‌های فیزیکی، شیمیایی و محرک‌های متابولیک را انتقال می‌دهند. تنوع و ویژگی‌های منحصر بفرد در خانواده گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین آن‌ها را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اهداف دارویی تبدیل کرده است. GPCRs تقریباً در تمام اندام‌ها دارای عملکرد تنظیمی هستند و اختلال در تنظیم سیگنال‌دهی GPCRs در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها دخیل است. در سیستم عروقی، GPCRs پارامترهای حیاتی مختلفی از جمله انقباض عروق یا نفوذپذیری لایه اندوتلیال را تعدیل می‌کنند [۸، ۹].

سهم کم بازار داروهای هدف GPCR نشان می‌دهد پتانسیل این گیرنده‌ها به‌عنوان اهداف دارویی هنوز به‌طور کامل مورد بهره‌برداری قرار نگرفته است. جستجوی درمان‌های مبتنی بر هدف قرار دادن GPCRs استراتژی‌های مختلفی را در بر می‌گیرد، یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها شناسایی عملکردهای پاتوفیزیولوژیکی برای این گیرنده‌ها است. استراتژی مفید در شناسایی این عملکردها، تجزیه و تحلیل بیان آن‌ها در جمعیت‌های سلولی مرتبط با عملکردشان، از جمله سلول‌های سیستم عروقی با استفاده از تکنولوژی "تعیین توالی تک‌سلولی" است [۹].

براین‌اساس بسترهای عروقی مختلف، از جمله آئورت، عروق ماهیچه اسکلتی، ریه، مغز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند. سلول‌های اندوتلیال ناهمگنی بالایی در بیان GPCRs نشان داده‌اند، تنها پنج گیرنده (*ADGRE5*، *CALCRL*، *ADGRF5*، *S1PR1* ^۵ و *ADGRL4*) ^۶ به‌طور همگن در همه انواع سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شوند [۹].

مطالعه گیرنده‌های جفت‌شده با G-پروتئین در بستر عروقی مختلف در شرایط التهابی حاد و مزمن، ژن‌های GPCRs از جمله *ADGRF5* و *ADGRL4* کاهش بیان در سطح ژن و پروتئین نشان دادند. از طرف دیگر نشانگرهای فعال‌سازی التهابی مانند: مولکول چسبندگی بین سلولی-۱، مولکول چسبندگی سلول عروقی-۱ و اینترلوکین-۶ افزایش بیان نشان دادند، در حالی که بیان ژن‌های: گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی-۲ و اندوتلین-۱ که مرتبط با روند رگ‌زایی و تنظیم انقباض عروق هستند، کاهش یافت [۹].

بررسی‌ها نشان می‌دهد که توانایی استاتین‌ها در کاهش التهاب دیواره عروق، کاهش "گذار از اندوتلیال به مزانشیما" ناشی از فاکتور رشد تبدیل‌کننده بتا و القای نیتریک‌اکسیدستاز، اثرات مفیدی بر روند بازسازی عروق دارد. آترواستاتین به دلیل اثرات پلیوتروپیک قوی، باعث کاهش تشکیل عروق جدید و تسریع بلوغ عروق موجود می‌شود، که با مهار آزادسازی آنژیوپوئین-۲ و درونی‌سازی کاده‌رین-۵ روند بلوغ عروق را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۱۰]. با توجه به اطلاعات موجود در شبکه STARNET ^۷ که از نمونه‌های بافتی بیماران عروق کرونر تهیه شده است، تغییرات بیان در گیرنده‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* در بافت آئورت مشاهده شد [۱۱].

با توجه به اطلاعات موجود در پایگاه داده‌ای هارمونیزوم Harmonizome ^۸، گروه گیرنده‌های Adhesion GPCRs ^۹ در مطالعات GWAS ^{۱۰} در بیماری‌های "قلبی-عروقی" مورد توجه قرار گرفتند [۱۲]. در مطالعات "تعیین توالی تک‌سلولی" در آئورت موش‌های *APOE*^{-/-} تحت رژیم پرچرب دیابتی تغییرات بیان گیرنده‌های Adhesion GPCRs در سلول‌های اندوتلیال مورد توجه قرار گرفتند [۱۳].

بنابراین در این مطالعه ما بر آن شدیم تاثیر شرایط هایپرگلیسمی را در حضور داروی آترواستاتین بر بیان ژن‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* و برخی عملکردهای سلولی مرتبط با این ژن‌ها در سلول‌های اندوتلیال بررسی کنیم.

⁷ Stockholm-Tartu Atherosclerosis Reverse Networks Engineering Task

⁸ Collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins

⁹ Adhesion G protein-coupled receptors

¹⁰ Genome-Wide Association Studies

¹ G Protein-Coupled Receptor

² Adhesion G Protein-Coupled Receptor E5

³ Calcitonin Receptor Like Receptor

⁴ Adhesion G Protein-Coupled Receptor F5

⁵ Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1

⁶ Adhesion G Protein-Coupled Receptor L4

جدول ۱ -توالی پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن‌های مورد نظر

ژن	شماره دسترسی ژن	توالی پرایمر	طول محصول تکثیرشده
ADGRF5	ENSG00000069122	پیشرو: 3-CATTGGCGGGACCATCACTTAC- برگشتی: 3-CCTTCAGGTATGTAGGGAGCATC-5	۱۵۵ جفت باز
ADGRL4	ENSG00000162618	پیشرو: 3-GTAGTTGGATTTTCGGCAGCACTA- برگشتی: 3-GAAGGAACAGAAGAGCGAGGG-5	۲۵۰ جفت باز
VEGFA	ENSG00000112715	پیشرو: 3-GAGGGCAGAGTCATCACGAAGT- برگشتی: 3-GGTGAGGCCCGATCCGCATAATCT-5	۲۴۰ جفت باز
DLL4	ENSG00000128917	پیشرو: 3-GCACTCCCTGGCAATGTACT- برگشتی: 3-CTCCAGCTCACAGTCCACAC-5	۱۷۹ جفت باز
ACTB	ENSG00000075624	پیشرو: 3-ACCCAGCACAAATGAAGATCAAGA- برگشتی: 3-ACAGTCCGCCTAGAAGCATTTG-5	۱۷۵ جفت باز

مواد و روش‌ها

مطالعات بیوانفورماتیکی

تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه در شبکه STARNET از نمونه‌های بافت آنورت و بافت‌های چربی (زیرپوستی و شکمی) بیماران قلبی عروقی مورد بررسی قرار گرفت [۱۱]، نمودار تغییرات بیان با استفاده از CIMminer^{۱۱} برای تغییرات بیان ژن‌های هدف و ژن‌های مرتبط با عملکردشان ترسیم شد.

کشت سلول

سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان (HUVEC)^{۱۲} در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم، آنتی‌بیوتیک‌های استرپتوماسین/پنی‌سیلین در شرایط کنترل (غلظت ۵ میلی‌مولار گلوکز) و هایپرگلیسمی (غلظت ۲۵ میلی‌مولار گلوکز)، در انکوباتور با هوای مرطوب، دمای ۳۷ درجه و غلظت ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شدند [۱۴]. داروی آتورواستاتین در دو غلظت ۵ میکرومولار و ۱۰ میکرومولار در کشت سلول‌های HUVEC در پلیت کشت ۱۲ خانه و با میزان سلول $10^4 \times 5$ سلول بمدت ۲۴ ساعت در شرایط هایپرگلیسمی مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج RNA سلول و بررسی بیان ژن‌های هدف

طراحی پرایمر با استفاده از توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ای NCBI^{۱۳} (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی) با استفاده از نرم افزار "الیگو ۷" برای ژن‌های هدف (*ADGRF5*، *ADGRL4* و *VEGFA*)^{۱۴} در انسان انجام شد. پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ آمده است. برای بررسی بیان ژن‌های مدنظر، RNA کل سلول با استفاده از کیت (شرکت دنا زیست آسیا، ایران) استخراج شد و بعد از آن cDNA با غلظت ۳-۵ میکروگرم RNA با استفاده از کیت (شرکت پارس‌توس، ایران) سنتز شد. cDNA های سنتز شده در حضور پرایمرهای اختصاصی و مستر میکس اواگرین (شرکت Solis Biodyne) تحت انجام واکنش Real Time PCR قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و ژن ACTB^{۱۵} به‌عنوان ژن رفرنس در نرم افزار GenEx تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار میانگین نشان داده شدند.

بررسی مهاجرت سلولی

برای مطالعه ظرفیت مهاجرت سلول‌های HUVEC پس از القای هایپرگلیسمی و تحت تیمار با داروی آتورواستاتین، تست

¹³ The National Center for Biotechnology Information

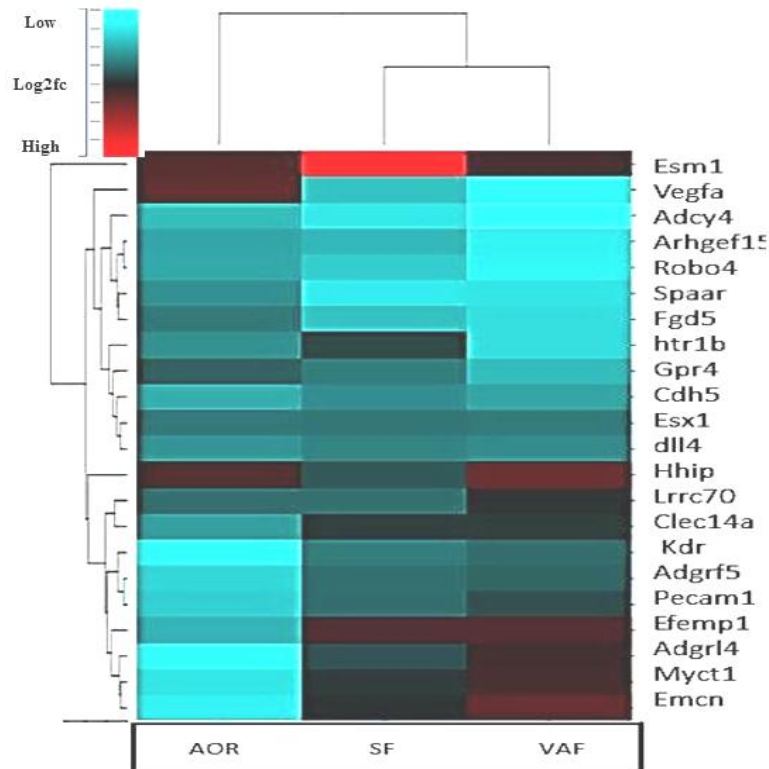
¹⁴ Delta Like Canonical Notch Ligand 4

¹⁵ Vascular Endothelial Growth Factor A

¹⁶ Actin Beta

¹¹ Color-coded Clustered Image Map miner

¹² Human umbilical vein endothelial cell



شکل ۱- تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با عملکرد گیرنده‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* در نمونه‌های بیماران قلبی-عروقی در شبکه Starnet. AOR: بافت ریشه آئورت، SF: بافت چربی زیر جلدی و VAF: بافت چربی شکمی.

مشخص شد [۱۵]. نتایج نشان داد که این دو گیرنده در بافت آئورت بیماران قلبی-عروقی در شبکه هم‌بیانی که مرتبط با فرآیندهای مهم سلولی از جمله توسعه و تنظیم رگ‌زایی، تعیین مورفوژن عروق، تنظیم تحرک و مهاجرت سلولی، سازماندهی ماتریکس خارج سلولی، تنظیم چسبندگی سلولی و روند بهبود زخم در لایه عروقی هستند، حضور دارند (جدول ۲).

تغییرات سطح بیان ژن‌ها در شرایط هایپرگلیسمی

با توجه به موارد بالا، تاثیر شرایط هایپرگلیسمی در سلول‌های HUVEC بر بیان گیرنده‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* مورد بررسی قرار گرفت، این بررسی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از قرار گرفتن در شرایط هایپرگلیسمی انجام شد، نتایج در نمودار ۱ آمده است. نتایج نشان داد که هر دو ژن در شرایط هایپرگلیسمی در هر سه سطح زمانی کاهش بیان معنی‌دار در $p \leq 0.01$ نسبت به شرایط کنترل داشتند، و در مورد ژن *ADGRL4* بین زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری در $p \leq 0.05$ مشاهده نشد ولی در سایر بازه‌های زمانی در هر دو ژن تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های مختلف

خراش سلولی^{۱۷} بر روی سلول‌ها در یک پلیت ۱۲ خانه در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار انجام شد. یک خراش در سراسر لایه سلول‌های اندوتلیال ایجاد شد. تصاویر از توان حرکت سلولی و تغییرات سلولی با بزرگنمایی ۱۰× و ۲۰× استفاده از میکروسکوپ اینورت در زمان‌های صفر، ۱۲ و ۲۴ تهیه شدند.

یافته‌ها

مطالعات بیوانفورماتیکی

با استفاده از اطلاعات موجود در شبکه STARNET تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با عملکرد بیولوژیکی این گیرنده‌ها در بافت آئورت و چربی (زیرجلدی، شکمی) به همراه دو گیرنده‌ی *ADGRF5* و *ADGRL4* در شکل ۱ آمده است. درگام بعدی با توجه به شبکه هم‌بیانی^{۱۸} ارائه شده اختصاصی بافت آئورت در شبکه STARNET، مسیر بیولوژیکی مهم مرتبط با این گیرنده‌ها با استفاده از "هستی‌شناسی ژن"^{۱۹}

¹⁷ Scratch test

¹⁸ Module

¹⁹ Gene ontology

جدول ۲- روندهای بیولوژیکی پیش بینی شده مرتبط با گیرنده های *ADGRF5*, *ADGRL4* با استفاده از شبکه هم‌بیانی ارائه شده در شبکه STARNET

TermID	روند بیولوژیکی	BonferoniP	EnrichmentP	TermID	روند بیولوژیکی	BonferoniP	EnrichmentP
GO:0001568	توسعه عروق	2.61E-29	2.35E-33	GO:0030155	تنظیم چسبندگی سلولی	1.44E-11	1.30E-15
GO:0048514	مورفوژن عروق	1.72E-26	1.54E-30	GO:0009611	پاسخ به زخمی شدن	1.53E-11	1.37E-15
GO:0051270	تنظیم حرکت اجزای سلولی	2.61E-24	2.35E-28	GO:0043542	مهاجرت سلول‌های اندوتلیال	5.27E-11	4.73E-15
GO:2000145	تنظیم حرکت سلولی	9.00E-24	8.09E-28	GO:0003158	رشد اندوتلیوم	1.00E-10	8.99E-15
GO:0045765	تنظیم رگ‌زایی	5.92E-16	5.32E-20	GO:0003007	مورفوژن قلب	1.23E-10	1.11E-14
GO:0001944	توسعه عروق	2.12E-30	1.90E-34	GO:0008015	گردش خون	5.77E-12	5.18E-16
GO:0030198	سازمان ماتریکس خارج سلولی	3.88E-13	3.49E-17	GO:0045766	تنظیم مثبت رگ‌زایی	2.48E-10	2.23E-14
GO:0043062	سازمان ساختار خارج سلولی	4.07E-13	3.66E-17	GO:0007186	مسیر سیگنالینگ گیرنده جفت‌شده با پروتئین G	2.53E-10	2.28E-14
GO:0030334	تنظیم مهاجرت سلولی	4.39E-23	3.95E-27	GO:0072358	توسعه سیستم قلبی عروقی	3.03E-30	2.73E-34

بررسی در $p \leq 0.01$ داشت. در غلظت بالاتر داروی آتورواستاتین هر دو گیرنده هم‌چنان افزایش سطح بیان خود را حفظ کرده‌اند ولی برای ژن *ADGRF5* نسبت به غلظت پایین‌تر این افزایش محسوس‌تر هست.

مهاجرت سلولی

با توجه به کاهش نسبی بیان ژن‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* در شرایط هایپرگلیسمی و افزایش مجدد بیان ژن آن‌ها در شرایط استفاده از دارو، در غلظت‌های دارویی موثر در افزایش بیان هر دو ژن، ظرفیت مهاجرت سلولی با توجه به نقش آن در روند توسعه عروقی و بهبود آسیب‌های اندوتلیوم، تست خراش سلولی انجام شد، تصاویر در فاصله‌های زمانی ۱۲ ساعت با استفاده از میکروسکوپ اینورت تهیه شده‌است (شکل ۲-الف). نتایج نشان داد که آتورواستاتین در غلظت‌های مد نظر ما تأثیرات مثبتی در جهت مهاجرت سلولی و افزایش سرعت پرشدگی فاصله ایجادشده، دارد، بطوری که فاصله ایجادشده در شرایط استفاده از دارو در زمان ۲۴ ساعت از شروع تست پر شده‌است، از طرف دیگر در شرایط استفاده از داروی آتورواستاتین، سلول‌ها تغییرات مورفولوژیکی

اعمال شرایط هایپرگلیسمی در $p \leq 0.05$ مشاهده شد. از طرف دیگر برای بررسی ارتباط تغییرات بیان ژن‌های گیرنده‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* با بعضی از ژن‌های مرتبط با عملکردشان در شرایط هایپرگلیسمی، تغییرات بیان این دو گیرنده در کنار برخی ژن‌ها از جمله ژن‌های *VEGFA* و *DLL4* که به عنوان لیگاند‌های فعال‌کننده‌ی مسیرهای سیگنالینگ Notch^{۲۰} و Vegf^{۲۱} هستند، در شرایط هایپرگلیسمی مورد ارزیابی قرار گرفتند، نتایج در نمودار ۲ آمده است.

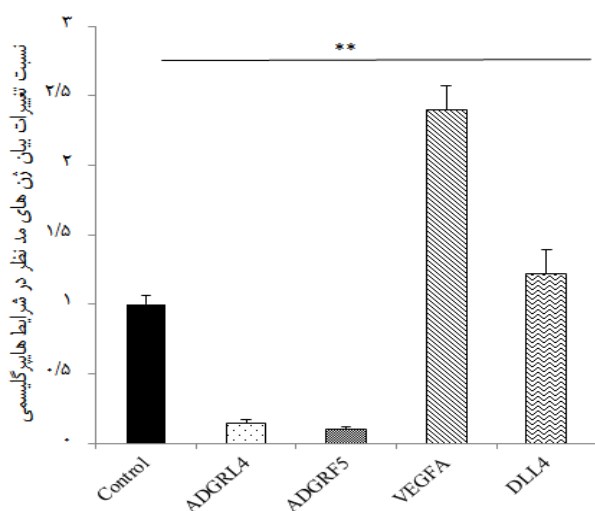
تغییرات سطح بیان ژن‌ها تحت تأثیر داروی آتورواستاتین

در مرحله بعدی تأثیر داروی آتورواستاتین در دو غلظت ۵، ۱۰ میکرومولار در شرایط هایپرگلیسمی، بر روی بیان *ADGRF5*، *ADGRL4*، *VEGFA* و *DLL4* بررسی شد. در نمودار ۳ مشاهده می‌شود این دارو در غلظت‌های بکارگرفته‌شده تأثیرات معنی‌داری بر روی کاهش و افزایش بیان ژن‌های مورد

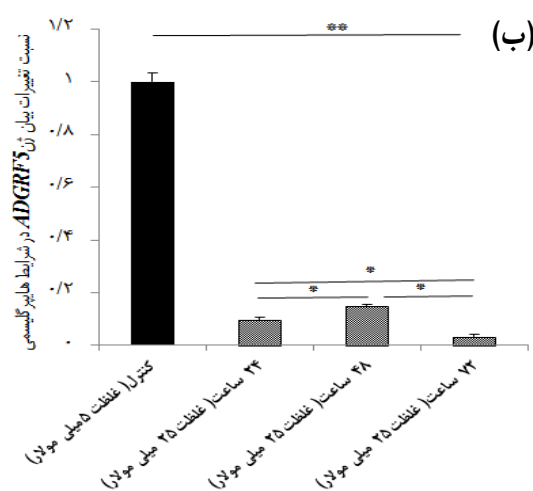
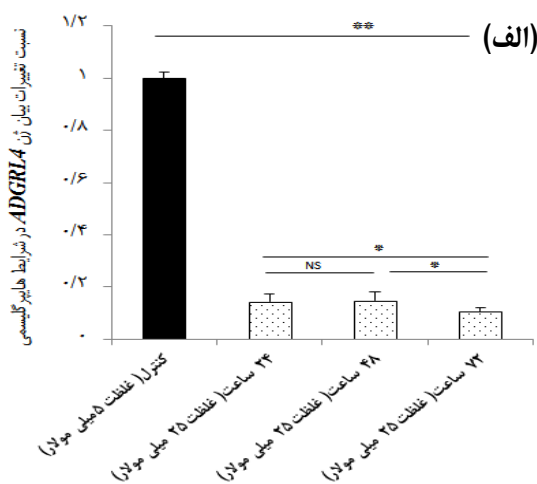
²⁰ Notch signaling pathway

²¹ Vegf signaling pathway

داده "اطلس پروتئینی انسان"^{۲۲} در شرایط فیزیولوژیک، "رگزایی" روند سلولی شاخص و مرتبط با این گیرنده‌ها در سلول‌های اندوتلیال و آدیپوسیت بود. در مرحله بعد برای بررسی ارتباط این دو گیرنده با بیماری آترواسکلروز، بررسی در بافت آئورت و چربی (شکمی و زیرپوستی) بیماران قلبی عروقی در شبکه STARNET انجام شد، نتایج نشان داد، *ADGRL4* در *ADGRF5* در بافت آئورت کاهش بیان و در بافت چربی افزایش بیان دارند. تغییرات در فنوتیپ سلول‌های اندوتلیال در طول رگزایی، شامل، تغییرات دینامیکی تحت کنترل فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)^{۲۳}، مسیر Notch و برنامه‌ریزی‌های متابولیکی است [۳]. گذار از "اندوتلیال به مزانشیمال" در شرایط پیش التهابی، با تسهیل روند مهاجرت به رشد پاتوفیزیولوژیکی عروق کمک می‌کند [۱۵]. نرخ گلیکولیتیک بالاتر سلول‌های اندوتلیال عروق می‌تواند رگزایی را تقویت کند [۴، ۷]. تغییرات در متابولیسم سلول‌های اندوتلیال ارتباط نزدیکی با آترواسکلروز و آنژیوپاتی دیابتی دارد [۳، ۴]. در آئورت موش‌های آترواسکلروتیک تحت رژیم دیابتی گیرنده‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* در کنار دو گیرنده *ADGRG1* و *ADGRL2* دارای تغییرات بیان معنی‌دار در جمعیت سلول‌های اندوتلیال بودند [۹، ۱۳].



نمودار ۲- تغییرات بیان ژن‌های *ADGRF5*، *ADGRL4* و *VEGFA* و *DLL4* بعد از تیمار با غلظت ۲۵ میلی‌مولار گلوکز در زمان ۲۴ ساعت در سلول‌های اندوتلیال. غلظت ۵ میلی‌مولار گلوکز به عنوان شرایط کنترل در نظر گرفته شده است. **: تفاوت معنی‌دار با $p \leq 0.01$



نمودار ۱- تغییرات بیان ژن بعد از تیمار با غلظت ۲۵ میلی‌مولار گلوکز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. الف: *ADGRL4* و ب: *ADGRF5* در سلول‌های اندوتلیال. غلظت ۵ میلی‌مولار گلوکز به عنوان شرایط کنترل در نظر گرفته شده است. *: تفاوت معنی‌دار با $p \leq 0.05$; **: تفاوت معنی‌دار با $p \leq 0.01$; ^{NS}: عدم وجود تفاوت معنی‌دار با $p \geq 0.05$.

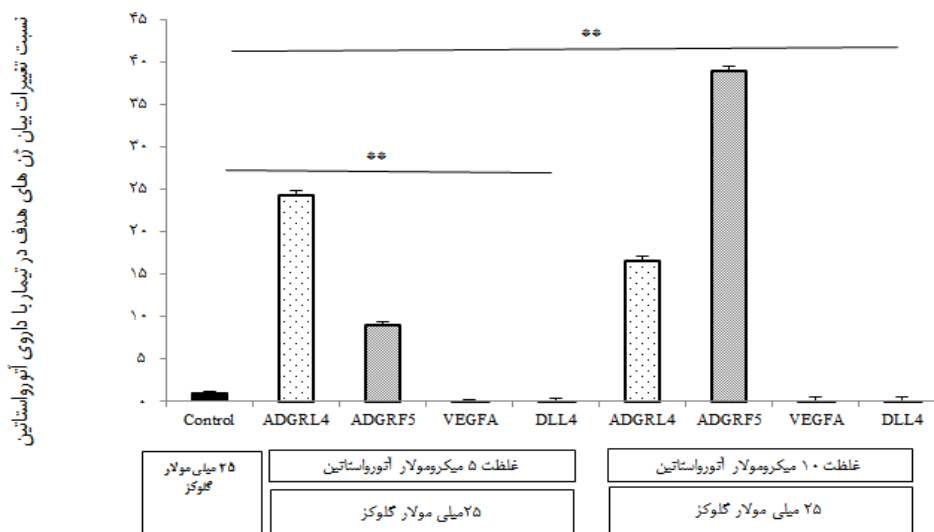
مشخصی را نشان دادند، پس از گذشت حدود ۶ ساعت سلول‌ها به تدریج تغییرات مورفولوژی آن‌ها شروع شد، و به شکل سلول‌های کشیده و دوکی‌شکل درآمدند، از طرف دیگر به نظر می‌رسد که سلول‌ها از حالت لایه سلولی پیوسته به شکل شبکه درهم تنیده‌ای درآمده است (شکل ۲ب).

بحث

در مطالعه انجام شده در پایگاه هارمونیزوم مشخص شد که گیرنده‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* با بیماری‌های قلبی عروقی مرتبط هستند [۱۲]. در ادامه این بررسی در پایگاه

²² <https://www.proteinatlas.org/>

²³ Vascular endothelial growth factor



نمودار ۳- تغییرات بیان ژن های *ADGRL4*، *ADGRF5*، *VEGFA* و *DLL4* بعد از تیمار با غلظت های ۵ و ۱۰ میکرومولار آتورواستاتین در زمان ۲۴ ساعت در سلول های اندوتلیال. غلظت ۲۵ میلی مولار گلوکز به عنوان شرایط کنترل در نظر گرفته شده است. **: تفاوت معنی دار با $p \leq 0.01$.

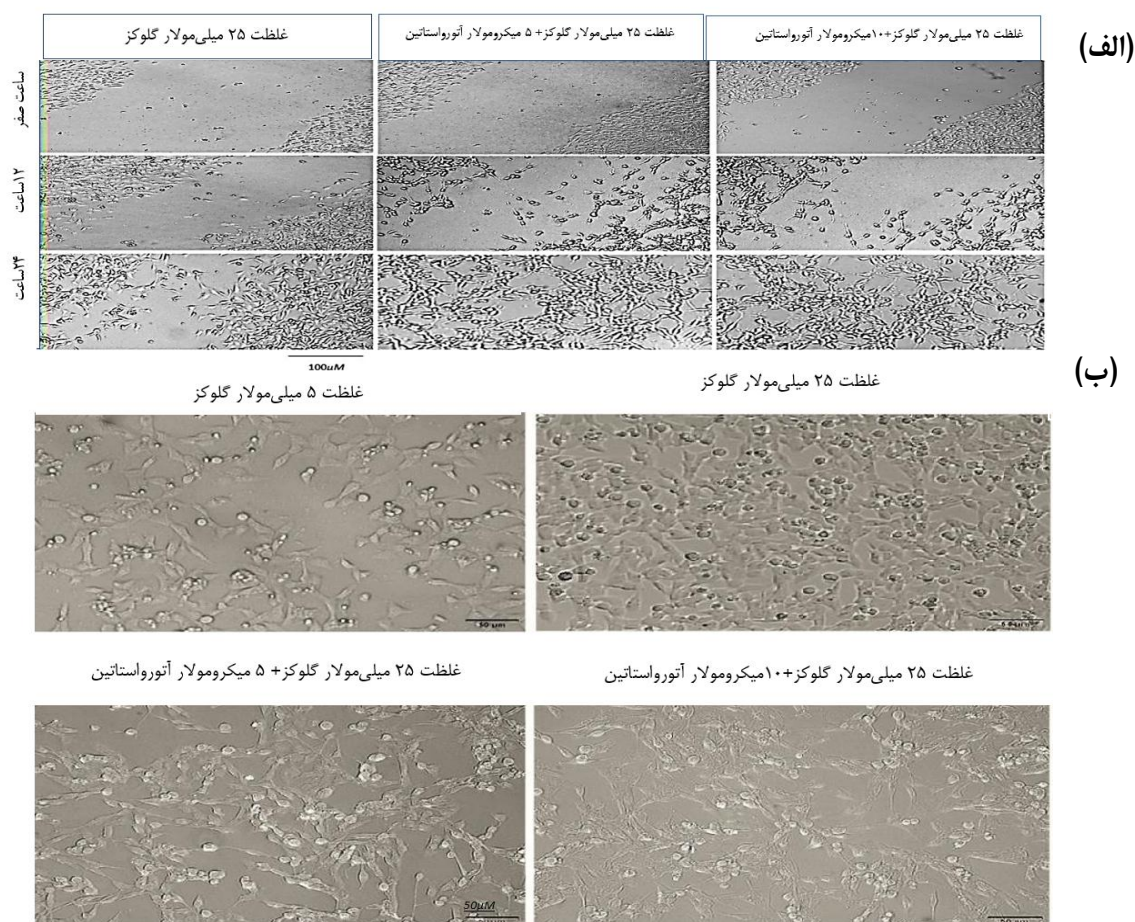
استاتین ها به دلیل بهبود عملکرد اندوتلیال، فعالیت های ضدالتهابی، نئوواسکولایزاسیون به طور گسترده در هیپرلیپیدمی و بیماران قلبی عروقی تجویز می شوند [۱۸]. در این مطالعه ما اثرات دزهای ۵ و ۱۰ میکرومولار داروی آتورواستاتین در شرایط هایپرگلیسمی را بر بیان گیرنده های *ADGRL4* و *ADGRF5* بررسی کردیم، نتایج نشان داد که بیان گیرنده *ADGRF5* در غلظت های مورد استفاده ارتباط مثبت با افزایش غلظت آتورواستاتین دارد، که می تواند ارتباط این ژن را در متابولیسم سلول و بخصوص لیپیدها شاخص تر نشان دهد [۱۹]. در مطالعات عملکرد گیرنده های GPCR در بافت چربی *ADGRF5* به وفور در سلول های چربی اولیه و تمایز یافته موش بیان می شود، علاوه بر این، حذف *ADGRF5* برای بافت چربی منجر به مقاومت به انسولین و عدم تحمل گلوکز می شود و اندازه سلول های چربی و ترشح آدیپونکتین را کاهش می دهد [۲۰].

در مطالعه ما گیرنده *ADGRL4* تاثیر دوزهای (۵ و ۱۰ میکرومولار) آتورواستاتین بر روی بیان این گیرنده وابسته به غلظت هست و در غلظت ۵ میکرومولار استاتین افزایش بیان بیشتری را نشان داد. در مرحله بعد ما برای تعیین امکان وجود ارتباط این افزایش بیان با برخی عملکردهای سلولی، بیان برخی ژن های موثر در روند رگ زایی بررسی کردیم. با توجه به تاثیر وابسته به غلظت داروی آتورواستاتین بر بیان ژن های

حذف کامل ژن های *ADGRL4* و *ADGRF5* به صورت جداگانه در موش ها نشان داد هیچ اثر آشکاری بر عملکرد قلبی عروقی یا کلیوی نداشت، اما موش های فاقد هر دو ژن، با ناهنجاری هایی در جریان های قوس آئورت و مجرای خروجی قلب منجر به مرگ پری ناتال در حدود ۵۰ درصد از موش ها شد. در موش های زنده مانده میکروآنژیوپاتی ترومبوتیک کلیوی مشاهده شد [۱۶]. نتایج ما نیز نشان داد که بیان گیرنده های *ADGRF5* و *ADGRL4* در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش معنی داری در شرایط هایپرگلیسمی (تغییر متابولیکی) دارند.

علاوه بر این نتایج ما نشان داد که ژن های مرتبط با توسعه ی عروق و مهاجرت سلولی (*VEGF* و *DLL4*) تحت تاثیر شرایط هایپرگلیسمی قرار می گیرند، به طوری که در نتایج ما در مدت زمان ۲۴ ساعت بعد از اعمال شرایط هایپرگلیسمی این ژن ها افزایش بیان به ترتیب ۱/۵ و ۲/۴ برابری را نشان دادند. در سلول های اندوتلیال شبکه، لیگاندهای *JAG1*^{۲۴} و *DLL4* در شرایط هایپرگلیسمی مسیرهای معمولی و غیرمعمول NOTCH را فعال می کنند، سیگنال دهی نابجای NOTCH در کنار سیگنال دهی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در اختلال عملکرد سلول های اندوتلیال عروق شبکه دخیل هستند و باعث نفوذپذیری عروقی در دیابت می شود [۱۷].

²⁴ Jagged Canonical Notch Ligand 1



شکل ۱-الف- تست خراش سلولی تحت شرایط هایپرگلیسمی و غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار داروی آتورواستاتین در سلول‌های HUVEC در مدت زمان ۲۴ ساعت با بزرگنمایی $\times 10$. ب- تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های HUVEC در مقایسه با سلول‌های کشت شده در شرایط نرمال (غلظت ۵ میلی‌مولار گلوکز) با بزرگنمایی $\times 20$.

داشتیم، که می‌تواند ناشی از ارتباط گیرنده *ADGRL4* از طریق لیگاند *DLL4* در مسیر Notch باشد.

در طی رگ‌زایی سلول‌های اندوتلیال برای تولید آدنوزین تری‌فسفات به گلیکولیز وابسته هستند، که بعضی از تنظیم‌کننده‌های مهم متابولیسم گلوکز، اکسیداسیون اسیدهای چرب و متابولیسم گلوتامین برای تعدیل سوئیچ رگ‌زایی فیزیولوژیک و رگ‌زایی پاتولوژیک شناسایی شده‌اند، ویژگی منحصر به فرد گلیکولیتیک سلول‌های اندوتلیال برای تکثیر سلولی، مهاجرت و پاسخ به تغییرات محیطی مهم می‌باشد و خاموشی ژن *ADGRL4* در سلول‌های HUVEC رابطه خود را با متابولیسم اصلی (متابولیسم پیریمیدین، اسید آمینه و قند) سلول از طریق مسیر Notch به انجام رسانده است [۱۵]. مطالعات بیشتر برای ارتباط این دو مسیر از جنبه

DLL4 و *VEGFA*، در غلظت ۵ میکرومولار بیان این ژن‌ها به شدت کاهش یافت اما در غلظت بعدی و با افزایش بیان *VEGFA* و افزایش مجدد بیان ژن *DLL4* روند کاهش بیان را در ژن *ADGRL4* داشتیم.

بیان بیش از حد *ADGRL4* باعث بیان *ELMOD1* می‌شود که به عنوان تنظیم‌کننده رگ‌زایی با تعدیل ترافیک و بازیافت *KDR* از سطح سلول این وظیفه را به انجام می‌رساند و بیان کافی *KDR* را در مسیر سیگنالینگ VEGF تضمین می‌کند [۲۱]. با افزایش بیان ژن *ADGRL4* کاهش بیان ژن *DLL4* و افزایش تولید جوا نه رگ‌زایی اتفاق می‌افتد [۲۱]. در مطالعه ما در غلظت ۵ میکرومولار بیشترین کاهش بیان *DLL4* را

²⁵ ELMO Domain Containing 1

[۲۳]. از طرف دیگر بنظر می‌رسد نقش این ژن در روندهای مرتبط باید در سطح پروتئین نیز مورد بررسی قرار گیرد، که جز محدودیت‌های مطالعه بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به تاثیر شرایط هایپرگلیسمی بر بیان ژن‌های مرتبط با گیرنده‌های *ADGRF5* و *ADGRL4* تحت تاثیر داروی آتورواستاتین بنظر می‌رسد لازم است بیان این ژن‌ها در شرایط پاتوفیزیولوژیکی مرتبط با بیماری دیابت از جمله مقاومت به انسولین و اثرات متقابل سلول‌های چربی و سلول‌های اندوتلیال بررسی‌های لازم انجام شود.

سپاسگزاری

از همکاری دانشگاه تربیت مدرس تهران قدردانی می‌شود.

ملاحظات مالی

برای اجرای پژوهش حمایت مالی پایان نامه دکترای تخصصی زیبا فولادوند (به شماره ثبت ۱۵۹۹/۱۲۲۵) دریافت شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ز.ف. انجام پروژه، تجزیه و تحلیل آماری م.ب و م.ع.ب. ایده پژوه و نظارت بر اجرا و نگارش مقاله.

فهرست منابع

- [1] Beverly JK, Budoff MJ, Atherosclerosis: Pathophysiology of insulin resistance, hyperglycemia, hyperlipidemia, and inflammation. *J Diabetes* 12 (2020) 102-104.
- [2] Hasheminasabgorji E, Jha JC, Dyslipidemia, diabetes and atherosclerosis: role of inflammation and ROS-redox-sensitive factors. *Biomedicines* 9 (2021) 1602.
- [3] Theodorou K, Boon RA, Endothelial cell metabolism in atherosclerosis. *Front Cell Dev Biol* 6 (2018) 82.
- [4] Peng H, Wang X, Du J, Cui Q, Huang Y, Jin H,

متابولیسمی و روند مهاجرت سلولی در طی روند رگ‌زایی باید انجام شود.

فعال‌سازی *ADGRL4* در سلول‌های اندوتلیال منجر به ایجاد "گذار اندوتلیال به مزانشیمال نوع ۲" می‌شود که توانایی رگ‌زایی را افزایش می‌دهند و کموکاین‌ها و سیتوکین‌هایی ترشح می‌کنند که قادر به تنظیم پاسخ ایمنی هستند [۱۵]. در مطالعه حاضر نیز سلول‌های اندوتلیال در هر دو غلظت مورد استفاده داروی آتورواستاتین تغییرات مورفولوژیکی را نشان دادند که ظاهری دوکی شکل را به سلول‌ها می‌دهد، از طرف دیگر در مطالعه مربوط به خاموشی ژن *ADGRL4* در سلول اندوتلیال با افزایش بیان ژن آنژیوپویتین-۲ در عدم حضور *ADGRL4* مواجهه شدند که می‌تواند تاییدی بر نقش افزایش بیان ژن *ADGRL4* در فرآیند کاهش تعداد عروق همراه با بلوغ عروق باشد که یکی از اثرات پلی‌تروپیک استفاده از آتورواستاتین می‌باشد [۱۵، ۱۰].

سیتوکین‌های پیش‌التهابی تولید شده در بافت چربی می‌توانند به طور قابل توجهی بر عملکرد قلبی-عروقی و مورفولوژی عروق تأثیر بگذارند [۲۲]، با توجه به تأثیرات شرایط هایپرگلیسمی بر بیان گیرنده‌های *ADGRF5*، *ADGRL4* در کشت سلولی و اثرات داروی آتورواستاتین بر روی بیان این ژن‌ها بنظر می‌رسد، لازم است ارتباط سلول‌های چربی و سلول‌های اندوتلیال در شرایط هایپرگلیسمی بر روی بیان این دو گیرنده بررسی شود.

علاوه بر این در مطالعات مرتبط با بیماری پره‌اکلامپسی وزیکول‌های حاوی دمنین خارج سلولی *ADGRL4* به عنوان یک عامل تنظیمی در روند رگ‌زایی در نظر گرفته شده است و دلایلی مبنی بر نقش این گیرنده در اختلال عملکرد اندوتلیال در این بیماری ارائه شده است، که نباید نادیده گرفته شود

Metabolic reprogramming of vascular endothelial cells: basic research and clinical applications. *Front Cell Dev Biol* 9 (2021) 626047.

- [5] Fadini GP, Albiero M, Bonora BM, Avogaro A, Angiogenic abnormalities in diabetes mellitus: mechanistic and clinical aspects. *J Clin Endocrinol Metab* 104 (2019) 5431-5444.
- [6] Li J, Fu X, Yang R, Zhang W, Atherosclerosis vascular endothelial secretion dysfunction and smooth muscle cell proliferation. *J Healthc Eng* (2022) 9271879.
- [7] Yetkin-Arik B, Vogels IMC, Neyazi N, van Duinen V, Houtkooper RH, van Noorden CJF, Klaassen I, Schlingemann RO, Endothelial tip cells in vitro are less glycolytic and have a more flexible response to

- metabolic stress than non-tip cells. *Sci Rep* 9 (2019) 10414.
- [8] Tischner D, Grimm M, Kaur H, Staudenraus D, Carvalho J, Looso M, Günther S, Wanke F, Moos S, Siller N, Breuer J, Single-cell profiling reveals GPCR heterogeneity and functional patterning during neuroinflammation. *JCI Insight* 2 (2017) e95063.
- [9] Kaur H, Carvalho J, Looso M, Singh P, Chennupati R, Preussner J, Günther S, Albarrán-Juárez J, Tischner D, Classen S, Offermanns S, Single-cell profiling reveals heterogeneity and functional patterning of GPCR expression in the vascular system. *Nat Commun* 8 (2017) 15700.
- [10] Baganha F, de Jong R, Peters EA, Voorham W, Jukema JW, Delibegovic M, de Vries MR, Quax PH, Atorvastatin pleiotropically decreases intraplaque angiogenesis and intraplaque haemorrhage by inhibiting ANGPT2 release and VE-Cadherin internalization. *Angiogenesis* 24 (2021) 567-581.
- [11] Koplev S, Seldin M, Sukhavasi K, Ermel R, Pang S, Zeng L, et al., A mechanistic framework for cardiometabolic and coronary artery diseases. *Nat Cardiovasc Res* 1 (2022) 85-100.
- [12] Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MD, Ma'ayan A, The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)* (2016) baw100.
- [13] Kichi ZA, Natarelli L, Sadeghian S, Boroumand MA, Behmanesh M, Weber C, Orphan GPR26 counteracts early phases of hyperglycemia-mediated monocyte activation and is suppressed in diabetic patients. *Biomedicine* 10 (2022) 1736.
- [14] Zhao G, Lu H, Liu Y, Zhao Y, Zhu T, Garcia-Barrio MT, Chen YE, Zhang J, Single-cell transcriptomics reveals endothelial plasticity during diabetic atherogenesis. *Front Cell Dev Biol* 9 (2021) 689469.
- [15] Sheldon H, Alexander J, Bridges E, Moreira L, Reilly S, Ang KH, Wang D, Lin S, Haider S, Banham AH, Harris AL, ELTD1 activation induces an endothelial-EMT transition to a myofibroblast phenotype. *Int J Mol Sci* 22 (2021) 11293.
- [16] Lu S, Liu S, Wietelmann A, Kojonazarov B, Atzberger A, Tang C, Schermuly RT, Gröne HJ, Offermanns S, Developmental vascular remodeling defects and postnatal kidney failure in mice lacking Gpr116 (*Adgrf5*) and Eltd1 (*Adgrl4*). *PLoS One* 12 (2017) e0183166.
- [17] Zheng X, Narayanan S, Sunkari VG, Eliasson S, Botusan IR, Grünler J, Catrina AI, Radtke F, Xu C, Zhao A, Ekberg NR, Triggering of a Dll4–Notch1 loop impairs wound healing in diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 116 (2019) 6985-6994.
- [18] Kim JY, Choi J, Kim SG, Kim NH, Relative contributions of statin intensity, achieved low-density lipoprotein cholesterol level, and statin therapy duration to cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes: population based cohort study. *Cardiovasc Diabetol* 21 (2022) 1-9.
- [19] Kaczmarek I, Suchý T, Prömel S, Schöneberg T, Liebscher I, Thor D, The relevance of adhesion G protein-coupled receptors in metabolic functions. *Biol Chem* 403 (2021) 195-209.
- [20] Nie T, Hui X, Gao X, Li K, Lin W, Xiang X, Ding M, Kuang Y, Xu A, Fei J, Wang Z, Adipose tissue deletion of Gpr116 impairs insulin sensitivity through modulation of adipose function. *FEBS Lett* 586 (2012) 3618-3625.
- [21] Favara DM, Liebscher I, Jazayeri A, Nambiar M, Sheldon H, Banham AH, Harris AL, Elevated expression of the adhesion GPCR ADGRL4/ELTD1 promotes endothelial sprouting angiogenesis without activating canonical GPCR signalling. *Sci Rep* 11 (2021) 1-13.
- [22] Hu H, Garcia-Barrio M, Jiang ZS, Chen YE, Chang L, Roles of perivascular adipose tissue in hypertension and atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 34 (2021) 736-749.
- [23] Sheldon H, Zhang W, Bridges E, Ang KH, Lin S, Masiero M, Li D, Handford PA, Whiteman P, Fischer R, Buffa F, ELTD1 is present in extracellular vesicles derived from endothelial cells as a cleaved extracellular domain which induces in vivo angiogenesis. *J Extracell Biol* 1 (2022) e52.

Research paper

Studying the expression of ADGRL4 and ADGRF5 receptors in endothelial cells in hyperglycemic conditions under the influence of Atorvastatin

Ziba Fooladvand¹, Mohammad Ali Boroumand², Mehrdad Behmanesh^{1,*}

1. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences,
Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Department of Pathology and Clinical Laboratory, Tehran Heart Center,
Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 7 November 2022

Accepted: 10 December 2022

Abstract

Background and Aim: The endothelium layer plays an important role in maintaining vascular homeostasis. The activation and dysfunction of endothelial cells is one of the first detectable changes in atherosclerosis as one of the macro-vascular complications of diabetes. In this study, according to the physiological function of G-protein coupled receptors in the vascular system, the changes in gene expression of two receptors, *ADGRF5* and *ADGRL4* were investigated in hyperglycemic conditions and the use of atorvastatin.

Methods: Endothelial cells were transferred from normal conditions to hyperglycemic environment and kept in these conditions for 48, 24 and 72 hours. In hyperglycemic conditions, the cells were treated with atorvastatin (5 and 10 μ M) for 24 hours. The expression of target genes was measured in hyperglycemic conditions and under atorvastatin treatment, scratch test cell culture was performed in the presence of atorvastatin drug.

Results: *ADGRF5* and *ADGRL4* gene expression decreased significantly $p \leq 0.01$ in hyperglycemic environment at 24, 48 and 72 hours, the level decreased by about 7 to 9.5 times and about 7 to 28 times respectively for genes. Treatment with atorvastatin in hyperglycemic conditions resulted in a significant increase in the expression of receptors $p \leq 0.01$. *VEGFA* and *DLL4* showed a significant decrease in expression compared to hyperglycemic conditions. An increase in the power of cell movement and changes in the morphology of cells were observed when using atorvastatin.

Conclusion: Changes in the expression of *ADGRF5* and *ADGRL4* receptors in hyperglycemic conditions can focus on the role of these receptors in the process of angiogenesis in vascular disorders, which is useful for future studies related to vascular disorders related to diabetes complications.

Keywords: Metabolic Disorder, Diabetes, G-protein Coupled Receptors

Please cite this article as follows:

Fooladvand Z, Boroumand MA, Behmanesh M, Studying the expression of ADGRL4 and ADGRF5 receptors in endothelial cells in hyperglycemic conditions under the influence of Atorvastatin. *Iran J Physiol Pharmacol* 6 (2022) 240-250.

*Corresponding authors: behmanesh@modares.ac.ir (ORCID: 0000-0002-3901-304X)