



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس بر آسیب

کلیوی سیس پلاتین

نگارش:

ناصر خاطری

اساتید راهنما:

دکتر رضا علی پناه مقدم

دکتر فرهاد جدی

اساتید مشاور:

دکتر عباس ابراهیمی

دکتر علی نعمتی

فروردین سال ۱۴۰۰

شماره پایان نامه: ۰۷۰



تقدیم به :

روح پاک پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی،

ایستادگی را تجربه نمایم

و به مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج

بود و وجودش برایم همه مهر

و به : همسرم، اسطوره زندگیم، پناه خستگیم و امید بودنم.

تشکر :

از استاد گرامیم جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم بسیار سپاسگذارم
چرا که یاریها و راهنماییهای بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختیها
را برایم آسانتر نمودند.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	چکیده:.....
	فصل اول: مقدمه
۳	۱-۱ اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق.....
۴	۱-۲ اهداف و فرضیات طرح.....
۴	۱-۲-۱ هدف کلی طرح.....
۴	۱-۲-۲ اهداف اختصاصی طرح.....
۵	۱-۲-۳ فرضیات.....
۶	۱-۳ تعریف واژه‌های اختصاصی.....
	فصل دوم: بررسی متون
۷	۲-۱ نارسایی کلیوی.....
۸	۲-۲ نارسایی حاد کلیوی.....
	۲-۳ نارسایی مزمن کلیوی.....
	۱۰
۱۱	۲-۳-۱ عوامل موثر در ایجاد نارسایی حاد کلیوی.....
۱۱	۲-۳-۱-۱ عوامل پیش کلیوی.....
۱۲	۲-۳-۱-۲ عوامل پس کلیوی.....
۱۳	۲-۳-۱-۳ عوامل کلیوی.....
۱۴	۲-۴ اپیدمیولوژی و میزان بروز نارسایی حاد کلیوی.....
۱۶	۲-۵ نارسایی حاد کلیوی سیس پلاتین.....
۱۷	۲-۵-۱ عوامل عمده نارسایی حاد کلیه ناشی از سیس پلاتین.....
۱۷	۲-۵-۱-۱ التهاب.....

۱۷ ۲-۵-۱ استرس اکسیداتیو
۱۸ ۲-۶ استفاده از سیس پلاتین بعنوان مدل نارسایی حاد کلیوی
۲۰ ۲-۷ نقش ژن های cdk2 ، p21 و p53 در آسیب کلیوی ناشی از سیس پلاتین
۲۰ ۲-۷-۱ ژن cdk2
۲۱ ۲-۷-۲ ژن p21
۲۳ ۲-۷-۳ ژن p53
۲۴ ۲-۸ گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس
۲۵ ۲-۹ ترکیبات واکسینیوم آرکتوستافیلوس
۲۹ ۲-۱۰ بررسی متون

فصل سوم: مواد و روش کار

۳۳ ۳-۱ گروههای مورد مطالعه
۳۴ ۳-۲ فرایند کار جهت جمع آوری نمونه های آزمایشگاهی از رت ها
۳۶ ۳-۳ مواد، ترکیبات شیمیایی و کیت های آنزیمی مورد استفاده در تحقیق
۳۶ ۳-۴ تجهیزات الکتریکی مورد استفاده
۳۷ ۳-۵ ظروف و وسایل مورد استفاده
۳۸ ۳-۶ روش تهیه مواد استفاده شده در تحقیق
۳۸ ۳-۶-۱ روش تهیه عصاره هیدرو الکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس
۳۸ ۳-۷ روش کار
۳۸ ۳-۷-۱ بررسی شاخص های بیوشیمیایی
۳۸ ۳-۷-۱-۱ روش اندازه گیری ALT
۳۸ ۳-۷-۱-۲ روش اندازه گیری AST
۴۰ ۳-۷-۱-۳ روش اندازه گیری آلبومین
۴۰ ۳-۷-۱-۴ روش اندازه گیری پروتئین تام
۴۱ ۳-۷-۱-۵ روش اندازه گیری اوره
۴۱ ۳-۷-۱-۶ روش اندازه گیری کراتینین
۴۲ ۳-۷-۲ آنالیز بیان ژن

۴۲RNA استخراج ۳-۷-۲-۱
۴۳سنجش میزان RNA استخراج شده ۳-۷-۲-۲
۴۴سنتز cDNA ۳-۷-۲-۳
۴۵طراحی پرایمر ۳-۷-۲-۴
۴۶Real-time PCR ۳-۷-۲-۵
۴۷آنالیز نتایج بیان ژن ۳-۷-۲-۶
۴۷بررسی سطوح سرمی پروتئین KIM1 به روش الایزا ۳-۷-۳
۴۹روش انجام مطالعات بافت شناسی ۳-۷-۴
۵۰محاسبات آمار ۳-۸

فصل چهارم: نتایج

۵۴نتایج ۴-۱
۵۴۴-۱-۱ بررسی نرمال بودن توزیع متغیرها
۵۵۴-۱-۲ یافته‌های مربوط به متغیرهای بیوشیمیایی
۵۵۴-۱-۲-۱ تاثیر عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس روی سطوح اوره
۵۶۴-۱-۲-۲ تاثیر عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس روی سطوح آنزیم AST
۵۷۴-۱-۲-۳ تاثیر عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس روی سطوح سرمی آنزیم ALT
۵۸۴-۱-۲-۴ تاثیر عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس روی سطوح سرمی کراتینین
۵۹۴-۱-۲-۵ تاثیر عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس روی سطوح سرمی پروتئین توتال
۶۰۴-۱-۲-۶ تاثیر عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس روی سطوح سرمی آلومین
۶۱۴-۱-۲-۷ تاثیر عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس روی سطوح سرمی پروتئین KIM1
۶۲۴-۱-۳ نتایج بیان ژن ها در گروه های مورد مطالعه
۶۲۴-۱-۳-۱ نتایج بیان ژن p21 در گروه های مورد مطالعه
۶۳۴-۱-۳-۲ نتایج بیان ژن cdk2 در گروه های مورد مطالعه
۶۴۴-۱-۳-۳ نتایج بیان ژن p53 در گروه های مورد مطالعه
۶۵۴-۱-۴ بررسی های بافت شناسی
۶۶۴-۱-۴-۱ نتایج بافت شناسی در گروه های مورد مطالعه

فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

۷۳	۵-۱ بحث.....
۸۰	۵-۲ محدودیت های مطالعه.....
۸۱	۵-۳ نتیجه گیری.....
۸۲	۵-۴ پیشنهادات.....
۸۳	منابع.....
۹۱	ضمایم.....

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

۲۵	شکل ۱-۲ میوه قره قاط.....
۴۵	جدول ۱-۳ اطلاعات مربوط به توالی پرایمر های طراحی شده.....
۴۶	جدول ۲-۳ مقادیر و ترکیبات تشکیل دهنده محلول مورد استفاده در ریل تایم.....
۴۷	جدول ۳-۳ برنامه دمایی و زمانی تعریف شده برای بررسی بیان ژن ها.....
۵۴	جدول ۱-۴ بررسی نرمال بودن توزیع متغیرها در گروه های مورد مطالعه.....
۵۶	جدول ۲-۴ میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی اوره در گروه های مورد مطالعه.....
۵۷	جدول ۳-۴ میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی آنزیم AST در گروه های مورد مطالعه.....
۵۸	جدول ۴-۴ میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی آنزیم ALT در گروه های مورد مطالعه.....
۵۹	جدول ۵-۴ میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی کراتینین در گروه های مورد مطالعه.....
۶۰	جدول ۶-۴ میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی پروتئین توتال در گروه های مورد مطالعه.....
۶۱	جدول ۷-۴ میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی آلبومین در گروه های مورد مطالعه.....
۶۲	جدول ۸-۴ میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی KIM1 در گروه های مورد مطالعه.....
۴۴	شکل ۱-۳ نمودار آنالیز RNA استخراج شده توسط نانو دراپ.....
۶۳	نمودار ۱-۴ نمودار میزان بیان ژن p21 در گروه های مورد مطالعه.....
۶۴	نمودار ۲-۴ نمودار میزان بیان ژن cdk2 در گروه های مورد مطالعه.....

- نمودار ۳-۴ نمودار میزان بیان ژن P53 در گروه های مورد مطالعه..... ۶۵ .
- شکل ۱-۴ ساختمان میکروسکوپی بافت کلیه در گروه های مورد مطالعه با رنگ آمیزی H&E..... ۶۸ .
- شکل ۲-۴ ساختمان میکروسکوپی بافت کلیه در گروه های مورد مطالعه با رنگ آمیزی PAS..... ۶۹ .
- نمودار ۴-۴ مقایسه ایندکس آسیب بافتی و تغییرات غشای پایه در بین گروه های مورد مطالعه..... ۷۰ .
- نمودار ۵-۴ مقایسه قطر جسمک کلیوی و فضای ادراری در بین گروه های مورد مطالعه..... ۷۱ .

اختصارات:

ICU	Intensive Care Unit
ARF	Acute Renal Failure
CRF	Chronic Renal Failure
cdk2	Cyclin Dependent Kinase 2
G1 phase	G1 phase
IL-1 β	Interleukin 1 beta
S phase	DNA Synthesis phase
AST	Aspartate Transaminase
ALT	Alanine Transaminase
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase
QRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
KIM1	Kidney Injury Molecule-1
TNF- α	Tumor necrosis factor Alpha
GFR	Glomerular Filtration Rate
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
ROS	Reactive oxygen species
VA	Vaccinium Arctostaphylos
ACE	Angiotensin-converting enzyme
IL-10	Interleukin – 10
DNA	Deoxy Nucleic Acid
OCT	Organic Cation Transporter
MRP	Multidrug Resistance Pumps
Caspases	Cysteine-Aspartic Proteases
H&E	Hematoxylin and Eosin
PAS	Periodic Acid Schiff

بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس بر آسیب

کلیوی سیس پلاتین

چکیده

زمینه: نارسایی حاد کلیوی یکی از اختلالات بالینی بسیار جدی محسوب می گردد که عواقب بسیار بدی برای بیماران بدنبال داشته و با مرگ و میر زیادی همراه بوده و جزو اولویت های درمانی پزشکی محسوب می شود.

هدف: بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس بر آسیب کلیوی سیس پلاتین

مواد و روش ها: در این مطالعه از ۴۰ رت نر نژاد ویستار استفاده گردید. رتها به پنج گروه هشت تایی شامل کنترل منفی (دریافت کننده سرم فیزیولوژی)، کنترل مثبت (دریافت کننده سرم فیزیولوژی و تک دوز سیس پلاتین (۷/۵ mg/kg)، دریافت کننده ۱۰۰ mg/kg عصاره و تک دوز سیس پلاتین، دریافت کننده

۲۰۰ mg/kg عصاره به مدت ۱۴ روز و تک دوز سیس پلاتین، دریافت کننده ۴۰۰ mg/kg عصاره و تک دوز سیس پلاتین تقسیم گردیدند. مدت مطالعه ۱۴ روز بود و بعد از خون گیری سرم و بافت کلیه جدا شد. بافت کلیه با استفاده از رنگ آمیزی H&E و PAS مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی بیان ژنهای مورد مطالعه از روش Real-time PCR استفاده شد. پروتئین KIM1 با روش الیزا اندازه گیری شد. برای اندازه گیری سطوح سرمی اوره کراتینین، ALT، AST، آلبومین و پروتئین تام از روش نوری استاندارد استفاده گردید.

یافته‌ها: دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره باعث کاهش معنی‌دار میزان سطوح سرمی اوره نسبت به گروه سیس‌پلاتین شد ($p < 0/05$). سطوح سرمی AST در گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$). سطوح سرمی ALT در گروه سیس‌پلاتین نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری داشت ($p < 0/05$) ولی در گروه‌های تیمار شده با عصاره نسبت به گروه سیس‌پلاتین کاهش معنی‌داری یافته بود ($p < 0/01$). سطوح سرمی کراتینین در دوزهای ۲۰۰ mg/kg و ۴۰۰ mg/kg عصاره نسبت به گروه سیس‌پلاتین کاهش معنی‌داری یافته بود ($p < 0/01$). میزان بیان ژنهای p21 و cdk2 در دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($p < 0/01$). میزان بیان ژن p53 در دوزهای مختلف عصاره بیشتر از گروه سیس‌پلاتین بود ($p < 0/001$). یافته‌های پاتولوژیک نشان دادند آسیب بافتی در دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره بسیار کمتر از سایر گروه‌های دریافت‌کننده سیس‌پلاتین بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه ما برای اولین بار نشان داد عصاره هیدروالکلی واکسینیوم آرکتوستافیلوس باعث کاهش آسیب کلیوی سیس‌پلاتین می‌شود و این کاهش آسیب حاد کلیوی در دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره بسیار بیشتر از سایر گروه‌های تحت تیمار با سیس‌پلاتین و عصاره می‌باشد. همچنین بر اساس یافته‌های مطالعه ما دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره باعث افزایش بیان پروتئین‌های p21، p53 و cdk2 نسبت به گروه کنترل شد.

کلمات کلیدی: نارسایی حاد کلیوی، p21، p53، cdk2، سیس‌پلاتین