



دانشگاه علوم پزشکی  
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجهٔ دکترای حرفه ای رشته پزشکی

عنوان : بررسی اثر مهارکننده گیرنده P2X7 در بیان ژن های NOX1، MMP3 و

TGF- $\beta$  در سلولهای ماکروفاژ القا شده با LDL اکسیده

نگارش:

علیرضا تیموری

اساتید راهنما:

دکتر الهام صفرزاده

دکتر امیر احمد عرب زاده

دی ماه ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: ۱۱۴۰

## گواهی اصالت پایاننامه

بسمه تعالی

بدین وسیله اعلام مینماید که این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب بوده و به وسیله خودم انشاء گردیده است و قبلاً به عنوان پایان نامه در سایر مقاطع و دورههای تحصیلی ارایه نگردیده است.

بدین وسیله اصالت (ORIGINALITY) و صحت نتایج این پایان نامه مورد تایید اینجانب، استاد راهنما میشود.

پروردگار را سپاسگزارم که بار دیگر به من فرصت آموختن داد. خود واجب می‌دانم از مادر مهربان و عزیزم به خاطر زحماتی که در طول زندگی همواره برای پیروزی و شادکامی من به جان خرید، تشکر می‌کنم. همچنین بر از استاد فرزانه جناب **خانم دکتر الهام صفرزاده** که به عنوان استاد راهنما در مراحل مختلف این پایانامه همواره با سعه صدر و گشاده رویی در کنار من بودند و در طول مدت تحصیل از راهنمایی‌های اخلاقی و علمی ایشان بهره جست‌هام تشکر و قدردانی می‌نمایم. جناب آقای **دکتر امیر احمد عرب زاده** به عنوان استاد راهنما دوم مسئولیت سنگینی را قبول زحمت فرمودند و مطمئناً بدون حمایت‌ها، راهنمایی‌ها و روحیه بخشی ایشان، انجام بخش مهمی از این رساله میسر نمی‌شد. بدین وسیله از بزرگواری، حسن سلوک و حمایت بی دریغ اساتیدم تشکر کرده و برای ایشان طول عمر توام با سربلندی را آرزومندم.

در این میان و در امر داوری از اساتید گرانقدر آقای **دکتر محمد قاسم گل‌محمدی** و آقای **دکتر رضا علی پناه** و آقای **دکتر محمد مآذنی** که زحمت داوری رساله اینجانب را قبول فرمودند، قدردانی نموده و برای ایشان آرزوی طول عمر و سربلندی دارم.

## فهرست

### چکیده ..... 1

### فصل اول: مقدمه و بیان مسئله ..... 4

- ۱-۱ مقدمه و بیان مسئله: ..... 4
- ۲-۱ اهداف ..... 7
- ۲-۱-۱ هدف کلی ..... 7
- ۲-۱-۲ اهداف اختصاصی ..... 7
- ۲-۱-۳ هدف کاربردی ..... 8
- ۳-۱ فرضیات پژوهشی ..... 8
- ۴-۱ تعریف واژه ها ..... 9

### فصل دوم: بررسی متون ..... 11

- ۱-۲ کلیات ..... 11
- ۱-۱-۱-۱ اترواسکلروزیس ..... 11
- ۱-۱-۱-۲ پاتوفیزیولوژی اترواسکلروزیس ..... 11
- ۲-۱-۱-۲ پیشگیری و درمان اترواسکلروزیس ..... 12
- ۲-۱-۲ نقش سیستم ایمنی در ایجاد اترواسکلروزیس ..... 12
- ۳-۱-۲ رستپورهای پورینریک ..... 14
- ۴-۱-۲ گیرنده P2X7 ..... 15
- ۲-۲ پیشینه تحقیق ..... 16

### فصل سوم: مواد و روش کار ..... 23

- ۱-۳ نوع مطالعه ..... 23

جامعه آماری و روش نمونه گیری:.....	۲۳	۲-۳
متغیرها:.....	۲۴	۳-۳
روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری:.....	۲۴	۴-۳
ملاحظات اخلاقی:.....	۲۵	۵-۳
متدولوژی مطالعه:.....	۲۵	۶-۳
.....	۲۷	۱-۶-۳
.....	۲۷	۱-۱-۶-۳
.....	۲۸	۲-۱-۶-۳
.....	۲۹	۳-۶-۱-۳
.....	۲۹	۳-۶-۱-۴
.....	۳۰	۳-۶-۱-۵
.....	۳۱	۳-۶-۱-۶
.....	۳۱	۷-۳
.....	۳۲	۸-۳
.....	۳۳	۹-۳
.....	۳۳	۱-۹-۳
.....	۳۵	۲-۹-۳
.....	۳۷	۳-۹-۳
.....	۳۷	۱-۳-۹-۳
.....	۳۸	۲-۳-۹-۳
.....	۳۹	۳-۳-۹-۳
.....	۴۰	۴-۳-۹-۳
.....	۴۱	۵-۳-۹-۳
.....	۴۳	۶-۳-۹-۳

۱۰-۳ ..... روش جمع آوری اطلاعات و ابزار های مورد استفاده: ..... ۴۴

#### ۴۶ ..... فصل چهارم: نتایج

۱-۴ ..... تمایز سلول های THP-1 به ماکروفاژ ..... ۴۶

۲-۴ ..... میزان مهار تشکیل سلول های کف آلود بعد از تیمار با مهار کننده P2X7 ..... ۴۷

۳-۴ ..... میزان بیان ژن هدف در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه

کنترل ..... ۵۱

۱-۳-۴ ..... میزان بیان ژن P2X7 در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه

کنترل ..... ۵۱

۲-۳-۴ ..... میزان بیان ژن NOX-1 در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه

کنترل ..... ۵۲

۳-۳-۴ ..... میزان بیان ژن MMP3 در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه

کنترل ..... ۵۳

۴-۳-۴ ..... میزان بیان ژن TGF- $\beta$  در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه

کنترل ..... ۵۴

#### ۵۷ ..... فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۱-۵ ..... تفسیر نتایج و مقایسه با سایر مطالعات: ..... ۵۷

۲-۵ ..... نتیجه گیری ..... ۶۱

۳-۵ ..... پیشنهادات: ..... ۶۲

۴-۵ ..... ترجمان دانش ..... ۶۳

#### ۶۵ ..... منابع

## فهرست تصاویر

- شکل 1-2 شکل شماتیک گیرنده های پورینرژیک ..... ۱۵
- شکل 2-2 مکانیسم عمل گیرنده P2X7 ..... ۱۶
- شکل 1-4: سلول های THP-1 قبل از تیمار با PMA ..... ۴۶
- شکل 2-4: سلول های THP-1 بعد از اضافه نمودن PMA ..... ۴۷
- شکل 3-4: رنگ آمیزی RED OIL O در سلولهای ماکروفاژ ..... ۴۸

## فهرست جداول

- جدول 3-1: متغیر ها ..... ۲۴
- جدول 3-2: توالی پرایمرها ..... ۴۱
- جدول 3-3: نحوه تهیه MASTER MIX برای انجام QRT-PCR ..... ۴۲
- جدول 3-4: پروتکل سیکل های به کار برده شده برای انجام QRT-PCR ..... ۴۲
- جدول 1-4: میانگین میزان رنگ پذیری RED OIL O در سلول های ماکروفاژ ..... ۴۸
- جدول 4-2: جدول آنالیز داده ها ..... ۴۹



## فهرست نمودار ها

- نمودار 4-1: درصد میزان رنگ پذیری RED OILO در گروه های مورد مطالعه ..... ۵۰
- نمودار 4-2: میزان بیان ژن P2X7 در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۲
- نمودار 4-3: میزان بیان ژن NOX-1 در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۳
- نمودار 4-4: میزان بیان ژن MMP3 در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۴
- نمودار 4-5: میزان بیان ژن TGF-B در ماکروفاژهای تیمار شده با مهار کننده P2X7 در مقایسه با گروه کنترل ..... ۵۵

## فهرست اختصارات

AMP: Adenosine monophosphate

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATP: Adenosine triphosphate

CDNA: Copy DNA

EMMPRIN: Extracellular matrix metalloproteinase inducer

FBS: Fetal bovine serum

FGF2: fibroblast growth factor

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

IFN: Interferon

IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 beta

LDL: low-density lipoproteins

OX-LDL: Oxidized Low-Density Lipoprotein

M1: macrophage type 1

M2: macrophage type 2

MMP3: matrix metalloproteinase-3

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NLRP3: NLR family pyrin domain containing

NOX: NADPH oxidase

P2X7: purinergic receptor 2 X 7

PCR: Polymerase chain reaction

PMA: Phorbol 12-myristate-13-acetate

ROS: reactive oxygen species

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor beta

TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor

بررسی اثر مهارکننده گیرنده P2X7 در بیان ژن های NOX1، MMP3 و TGF- $\beta$  در سلولهای ماکروفاژ القا شده با LDL اکسیده

چکیده

زمینه: سلول های کف آلود (Foam cell)، ماکروفاژ های مملو از چربی هستند که نقش مهمی در ایجاد آترواسکلروزیس دارند. سلول های کف آلود با افزایش بیان فاکتور های التهابی و نیز با افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش فعالیت NADPH اکسیداز باعث پیشرفت آترواسکلروز می شود. همچنین با افزایش فعالیت آنزیم های متالوپروتئیناز باعث ناپایداری پلاک و ایجاد آسیب عروقی میشود. P2X7 جزئی از گیرنده پورینرژیک، کانال کاتیونی غیرانتخابی، در سلول های ایمنی بخصوص ماکروفاژ التهابی بیان میشود.

هدف: در مطالعه حاضر اثر مهار کننده P2X7 بر بیان ژن های درگیر در فرایند ایجاد و توسعه آترواسکلروزیس در ماکروفاژ های القا شده با LDL اکسیده (فاکتور اصلی در ایجاد سلول کف آلود) را بررسی کرده ایم.

مواد و روش ها: گروه های مورد مطالعه شامل گروه ۱ (کنترل): سلول های THP-1 (سلولهای مونوسیت) تیمار شده با PMA (ماده موثر در تمایز مونوسیت به ماکروفاژ)، گروه ۲: سلول های THP-1 تیمار شده با PMA و OX-LDL، گروه ۳: سلول های THP-1 تیمار شده با PMA<sup>1</sup> و OX-LDL و مهار کننده P2X7 میباشد. در این مطالعه سلول های THP1 (سلول های پیش ساز مونوسیتی) به وسیله PMA به سلول های ماکروفاژ تبدیل شدند. سپس سلول های ماکروفاژ با

<sup>1</sup> Phorbol 12-myristate-13-acetate

LDL اکسیده جهت تشکیل سلول های کف آلود و نیز جهت بررسی اثر P2X7 ، ماکروفاژها با LDL اکسیده همراه مهار کننده P2X7 تیمار شدند. از رنگ آمیزی Oil Red O (ORO) جهت تایید ایجاد سلول های کف آلود استفاده شد. سپس بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA بیان ژن های NOX1، MMP3 و TGF  $\beta$  با تکنیک qPCR بررسی شدند.

**یافته ها:** نتایج حاصل از ORO نشان دهنده ی مهار P2X7 باعث کاهش تشکیل سلول های کف آلود حاصل از OX-LDL میشود. نتایج RT-PCR نشان دهنده مهار P2X7 باعث کاهش بیان ژن NOX1 نسبت گروه تیمار شده با OX-LDL ( $P < 0.001$ ) و نیز کاهش بیان ژن MMP3 نسبت گروه تیمار شده با OX-LDL ( $P < 0.001$ ) و کاهش بیان ژن TGF  $\beta$  نسبت گروه تیمار شده با OX-LDL بود ( $P < 0.0001$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان دهنده تاثیرات مثبت مهار گیرنده P2X7 جهت سرکوب روند تشکیل فوم سل و تاثیرات چشمگیر بر مهار بیان ژنهای آتروژنیک بود. به طور کلی پیشنهاد می شود که از این ترکیب بعنوان یک گزینه کاربردی جهت بررسی های بیشتر در راستای درمان و یا کنترل بیماری آترواسکلروزیز استفاده شود.

**کلمات کلیدی:** ماکروفاژ، سلول کف آلود، NOX1، P2X7، OX-LDL، TGF-B، MMP3