دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشکده پردیس

پایان نامه برای در یافت درجه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی

عنوان :

تاثیر آندروگرافولید بر روی بیان آنزیم پاراکسوناز۲ و اپلین کبدی درموش های نر نژاد ویستار دچار اضافه باری ثانویه ی آهن

اساتید راهنما :

دکتر رضا علی پناه مقدم – دکتر محمد ماذنی

استاد مشاور :

آقای ودود ملک زاده

نگارش :

آرش مهری پیرایواتلو

تابستان ۱۳۹۵

شماره پایان نامه : ۰۱

بسم الله الرحمن الرحیم

این اثر را تقدیم می نمایم به:

روح پاک مادرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم

تقدیم با بوسه بر دستان پدرم:

به او که نمی دانم از بزرگی اش بگویم یا مردانگی، سخاوت، سکوت، مهربانی و .....

پدرم راه تمام زندگیست

پدرم دلخوشی همیشگیست

با سپاس فراوان از راهنمائی ها و زحمات استاد محترم و گرانقدر جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم که در ابتدای راه و در طی انجام این تحقیق، با راهنمائی های خود مرا در نگارش این اثر یاری نمودند.

از زحمات جناب آقای دکتر محمد مدادنی و آقای ودود ملک زاده اساتید محترم راهنما و مشاور کمال تشکر را می نمایم.

از اساتید عالیقدر آقای دکتر امیر شاهرخی، دکتر محمدی و دکتر نعمتی که زحمت داوری این رساله را بر عهده گرفتند سپاسگذاری می کنم.

همچنین از آقای دکتر شهرام مهری، خانم ها فریده منافی و مرضیه شریفی و آقای یاور محمودزاده و از تک تک اعضاء خانواده ام، مخصوصا پدر عزیزم که همواره در کنار من بودند نهایت سپاس و قدردانی را دارم.

تاثیر آندروگرافولید بر روی بیان آنزیم پاراکسوناز ۲ و اپلین کبدی در موش های نر نژاد ویستار دچار اضافه باری ثانویه ی آهن

چکیده :

سابقه و هدف : اضافه باری آهن با ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو باعث بیماری های مختلفی از جمله دیابت می شود. اپلین و پاراکسوناز ۲ دارای تاثیرات آنتی اکسیدانی بوده و در فرآیند پیشگیری از مقاومت انسولینی و دیابت نقش دارند و از آنجایی که آندروگرافولید دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد دیابتی می باشد مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر آندروگرافولید بر روی بیان پاراکسوناز ۲ و اپلین کبدی در موش های صحرایی نر دچار اضافه باری ثانویه ی آهن انجام شده است.

مواد و روش ها : در مطالعه تجربی حاضر ۳۶ سر موش صحرایی بالغ نر از نژاد ویستار به طور تصادفی در ٦ گروه شامل گروه کنترل دریافت کننده سرم فیزیولوژی ، گروه دریافت کننده آهن سوکروز با دوز ۷۵ mg/kg ، گروه درمان با آندروگرافولید با دوز ۳/۵ mg/kg پس از دریافت آهن، گروه درمان با آندروگرافولید با دوز ۷ mg/kg پس از دریافت آهن، گروه درمان با آندروگرافولید با دوز ۳/۵ mg/kg پس از دریافت سرم فیزیولوژی، گروه درمان با آندروگرافولید با دوز ۷ mg/kg پس از دریافت سرم فیزیولوژی قرار گرفتند. تزریق آهن به مدت ۲ هفته و سپس تزریق عصاره به مدت ۱ هفته انجام شد. سپس نمونه های خونی و بافت کبد از موش ها گرفته شد و بررسی بیان ژن های مورد هدف توسط Real time و اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی مورد نظر انجام گردید.

یافته ها : نتایج نشان داد که تزریق آهن باعث افزایش بیان اپلین و پاراکسوناز ۲ می شود و تزریق آندروگرافولید باعث کاهش بیان اپلین و پاراکسوناز ۲ می شود. همچنین تزریق آهن باعث

افـزایش معنـی دار میـزان گلـوکز خـون شـده و تزریـق عصـاره باعـث کـاهش معنـی دار میـزان گلـوکز خون می شود. تزریـق آهـن همچنـین باعـث اخـتلالات در پروفایـل لیپیـدی شـده بـه طـوری کـه میـزان تری گلیسـرید و کلسـترول افـزایش معنـی داری مـی یابـد و تزریـق آندروگرافولیـد دارای اثـرات مثبـت روی پروفایل لیپیدی می باشد.

نتیجـه گیـری : آهـن باعـث افـزایش بیـان اپلـین و پاراکسـوناز ۲ و همچنـین افـزایش میـزان گلـوکز خـون و اخـتلالات پروفایـل لیپیـدی مـی شـود و آندروگرافولیـد دارای تـاثیرات مثبـت روی میـزان بیـان اپلـین و پاراکسـوناز ۲ مـی باشـد و بـه عنـوان یـک هـدف درمـانی در پـژوهش هـای بعـدی مـی توانـد مورد بررسی های بیشتر قرار گیرد.

کلمات کلیدی : اضافه باری آهن، آندروگرافولید، اپلین، پاراکسوناز ۲، موش صحرایی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: طرح تحقیق..... ۱

۱-۱- مقدمه..... ۲

۲-۱- بیان مسئله..... ۳

۳-۱- تعریف واژه های کلیدی..... ۷

٤-۱- اهداف..... ۸

۱-٤-۱- هدف کلی..... ۸

۲-٤-۱- اهداف اختصاصی..... ۸

۳-٤-۱- اهداف کاربردی..... ۸

۵-۱- فرضیات..... ۹

فصل دوم: بررسی متون..... ۱۰

۱-۲- دیابت..... ۱۱

۲-۲- آهن..... ۱۱

۱-۲-۲- کلیات در مورد آهن..... ۱۱

۲-۲-۲- متابولیسم آهن..... ۱۲

۳-۲-۲-اضافه باری آهن..... ۱۳

٤-۲-۲- آهن و ارتباط آن با دیابت..... ۱٤

۵-۲-۲- مکانیسم های مولکولی تنظیم متبولیسم گلوکز توسط آهن..... ۱۷

۳-۲- آندروگرافولید.....۱۸

۱-۳-۲- آندروگرافیس پانیکولاتا.....۱۸

۲-۳-۲- استفاده از آندروگرافیس پانیکولاتا در سیستم پزشکی سنتی.....۱۹

۳-۳-۲- استفاده از آندروگرافیس پانیکولاتا در سیستم پزشکی مدرن.....۱۹

٤-۳-۲- خواص آنتی اکسیدانی آندروگرافیس پانیکولاتا.....۲۰

۵-۳-۲- اثرات ضد هایپر گلایسمیک و هیپوگلایسمیک آندروگرافولید.....۲۰

٤-۲- اپلین.....۲۱

۱-٤-۲- رسپتور اپلین.....۲۱

۲-٤-۲- هورمون اپلین.....۲۲

۳-٤-۲- ایزوفرم های اپلین.....۲۲

٤-٤-۲- توزیع بافتی اپلین.....۲۳

۵-٤-۲- اپلین و متابولیسم انرژی.....۲۳

٦-٤-۲- عملکردهای اپلین در بافت های پاسخگو به انسولین.....۲٤

۷-٤-۲- خواص آنتی اکسیدانی اپلین.....۲٦

۵-۲- آنزیم پاراکسوناز ۲.....۲٦

۱-۵-۲- کلیات.....۲٦

۲-۵-۲- ساختار و عملکرد پاراکسوناز ۱.....۲۷

۳-۵-۲- پاراکسوناز ۳.....۲۷

٤-۵-۲- پاراکسوناز ۲.....۲۷

۵-۵-۲- نقش پاراکسوناز ۲ در حذف رادیکال آزاد.....۲۸

٦-۵-۲- تنظیم بیان پاراکسوناز ۲.....۲۹

۷-۵-۲- ارتباط پاراکسوناز ۲ و دیابت.....۳۰

٦-۲- مروری بر مطالعات انجام شده.....۳۰

فصل سوم: شیوی اجرای تحقیق.....۳٤

۱-۳- نوع مطالعه.....۳۵

۲-۳- ملاحظات اخلاقی.....۳۵

۳-۳- مکان و زمان انجام مطالعه.....۳۵

٤-۳- جمعیت مورد مطالعه.....۳۵

۵-۳- مواد لازم.....۳۵

٦-۳- وسائل لازم.....۳۷

۷-۳- دستگاه های لازم.....۳۸

۸-۳- موش های صحرایی به عنوان مدلی برای بیماری انسان.....۳۹

۹-۳- تهیه حیوانات آزمایشگاهی.....٤۰

۱۰-۳- نحوه ی ایجاد مدل اضافه بار ثانویه آهن.....٤۰

۱۱-۳- نحوه ی گروه بندی.....٤١

۱۲-۳- آماده کردن حیوانات برای خونگیری.....٤٣

۱۳-۳- بررسی بیان ژن اپلین و پاراکسوناز ۲ با استفاده از تکنیک real time pcr.....٤٣

۱-۱۳-۳- استخراج RNA.....٤٣

۲-۱۳-۳- تعیین غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ.....٤٥

۳-۱۳-۳- الکتروفورز RNA بر روی ژل آگارز.....٤٦

٤-۱۳-۳- تیمار RNA با آنزیم DNase1.....٤٦

۱٤-۳- سنتز cDNA از RNA استخراج شده.....٤٧

۱٥-۳- واکنش RT-PCR برای GAPDH.....٤٨

۱٦-۳- الکتروفورز محصول RT-PCR بر روی ژل آگارز.....٤٩

۱۷-۳- ژن های مورد استفاده در این مطالعه.....٥٠

۱-۱۷-۳- توالی ژن های مورد استفاده در این مطالعه.....٥٠

۲-۱۷-۳- آماده سازی پرایمرها.....٥٠

۱۸-۳- پروتکل واکنش Real time.....٥٢

۱-۱۸-۳- آماده سازی نمونه ها.....٥٢

۲-۱۸-۳- وضعیت برنامه دستگاه Light cycler.....٥٣

۱۹-۳- آزمون های بیوشیمیایی سرم.....٥٤

۱-۱۹-۳- اندازه گیری گلوکز.....٥٤

۲-۱۹-۳-اندازه گیری کلسترول.....٥٥

۳-۱۹-۳- اندازه گیری تری گلیسرید.....٥٦

٤-۱۹-۳- اندازه گیری HDL.....٥٧

۲۰-۳- تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات.....٥٨

فصل چهارم: نتایج.....٥٩

۱-٤- نتایج بررسی های هیستوپاتولوژی.....٦٠

۲-٤- نتایج حاصل از بررسی RNA استخراج شده.....٦٠

۳-٤- نتایج بررسی های مولکولی.....٦٢

۱-۳-٤- نتایج بررسی بیان ژن اپلین.....٦٢

۲-۳-٤- نتایج بررسی بیان ژن پاراکسوناز ۲.....٦٤

٤-٤- نتایج بررسی های بیوشیمیایی.....٦٧

۱-۲-٤- بررسی تاثیر عصاره آندروگرافولید روی میزان گلوکز خون ناشتایی.....٦٧

۲-٤-٤- بررسی تاثیر عصاره آندروگرافولید روی پروفایل لیپیدی.....٦٨

۱-۲-٤-٤- نتایج اندازه گیری میزان کلسترول.....٦٨

۲-۲-٤-٤- نتایج اندازه گیری میزان تری گلیسرید.....٦٩

۳-۲-٤-٤- نتایج اندازه گیری میزان کلسترول-HDL.....٧٠

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری.....۷۲

۱-۵- مقدمه.....۷۳

۲-۵- اضافه باری آهن بیان کبدی اپلین را افزایش می دهد.....۷۳

۳-۵- اضافه باری آهن بیان کبدی آنزیم پاراکسوناز ۲ را افزایش می دهد.....۷٦

٤-۵- آندروگرافولید بیان کبدی اپلین را افزایش می دهد.....۷۹

۵-۵- آندروگرافولید بیان کبدی آنزیم پاراکسوناز ۲ را افزایش می دهد.....۸۱

٦-۵- آندروگرافولید سطوح سرمی گلوکز خون ناشتایی را کاهش می دهد.....۸۵

۷-۵- آندروگرافولید سطوح سرمی پروفایل لیپیدی را کاهش می دهد.....۸۷

۸-۵- نتیجه گیری.....۸۹

۹-۵- پیشنهادات.....۸۹

۱۰-۵- محدودیت ها.....۸۹

۱۱-۵- منابع.....۹۰

چکیده انگلیسی.....۱۰۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۳- گروه بندی و تزریق.....۴۲

جدول ۲-۳- آماده سازی نمونه ها جهت تیمار با آنزیم DNase1 .....۴۶

جدول ۳-۳- مرحله اول سنتز cDNA.....۴۷

جدول ٤-۳- مرحله دوم سنتز cDNA.....۴۸

جدول ۵-۳- واکنش RT-PCR برای GAPDH ۴۸

جدول ٦-۳- مراحل دمایی واکنش PCR برای GAPDH.....۴۹

جدول ۷-۳- توالی ژن های مورد استفاده و دمای اتصال آن ها.....۵۰

جدول ۸-۳- تهییه MASTER MIX واکنش برای ژن GAPDH.....۵۲

جدول ۹-۳- تهییه MASTER MIX برای ژن های Apelin و Paraoxonase 2.....۵۲

جدول ۱۰-۳- پروتکل دمایی سه مرحله ای Real time برای ژن GAPDH و Paraoxonase 2.....۵۳

جدول ۱۱-۳- پروتک دمایی سه مرحله ای کیت Real time برای ژن Apelin.....۵٤

جدول ۱۲-۳- آماده سازی نمونه ها جهت اندازه گیری گلوکز.....۵۵

جدول ۱۳-۳- آماده سازی نمونه ها جهت اندازه گیری کلسترول.....۵٦

جدول ١٤-۳- آماده سازی نمونه ها جهت اندازه گیری تری گلیسرید.....۵۷

جدول ۱۵-۳- مرحله دوم اندازه گیری HDL.....۵۸

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-٤- مقایسه میزان رسوب آهن در کبد با رنگ آمیزی اختصاصی آهن..... ٦٠

شکل ۲-٤- مثالی از الکتروفورز حاصل از RNA تام استخراج شده از بافت کبد..... ٦١

شکل ۳-٤- بارگذاری محصول PCR مربوط به GAPDH روی ژل آگارز ۲ درصد..... ٦٢

شکل ٤-٤- منحنی تکثیر برای ژن اپلین..... ٦٣

شکل ٥-٤ منحنی ذوب برای ژن اپلین..... ٦٣

شکل ٦-٤- منحنی تکثیر برای ژن پاراکسوناز ۲ ..... ٦٥

شکل ۷-٤- منحنی ذوب برای ژن پاراکسوناز ۲..... ٦٥

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۱-٤- مقایسه میزان بیان ژن اپلین در گروه های مورد مطالعه.....٦٥

نمودار ۲-٤- مقایسه میزان بیان ژن پاراکسوناز ۲ در گروه ها مورد مطالعه.....٦٧

نمودار ۳-٤- مقایسه گلوکز خون ناشتایی در گروه های مورد مطالعه.....٦٨

نمودار ٤-٤- مقایسه کلسترول در گروه های مورد مطالعه.....۷۰

نمودار ٥-٤- مقایسه تری گلیسرید در گروه های مورد مطالعه.....۷۱

نمودار ٦- ٤- مقایسه کلسترول-HDL در گروه های مورد مطالعه.....۷۲

اختصارات

PON_1 Paraoxonase1

PON_2	Paraoxonase2
PON_3	Paraoxonase3
APJ	apelin receptor
HDL	high density lipoprotein
LDL	low density lipoprotein
DMT-1	divalent metal-iron transporter
NTBI	non-transferrin-bound iron
AMPK	APM-activated protein kinase
ATP	Adenosine triphosphate
GLUT4	glucose transporter
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline
RNA	Ribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase