

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و  
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایاننامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی تاثیر مقایسه‌ای اکسید روی با نانو ذرات اکسید روی،

روی بیان ژن هپسیدین در کبد موش صحرایی

اساتید راهنما:

دکتر رضا علی پناه مقدم

دکتر علی نعمتی

استاد مشاور:

ودود ملک زاده

نگارش:

پیروز پورمحمد

پاییز 1396

شماره پایاننامه: 037

تقدیم به

روح پاک پدر عزیزم

و به مادرم

دریای بی کران فداکاری و عشق

# بررسی تاثیر مقایسه‌ای اکسید روی با نانو ذرات اکسید روی ، روی بیان ژن

## هپسیدین در کبد موش صحرایی

### چکیده

**سابقه و هدف:** نانوذرات دارای یکسری ویژگی‌هایی از جمله افزایش جذب از روده، نفوذپذیری، پایداری، حلالیت و انتقال دارو به قسمت‌های آسیب دیده می‌باشند. در بین نانوذرات ، نانوذرات اکسید روی در پزشکی دارای کاربردهایی از جمله ضد عفونی کننده، تولید دارو می‌باشد. مطالعات انجام یافته در مورد نانوذرات اکسید روی نقش این ذرات را در کاهش یا افزایش بیان برخی ژن‌ها که نقش مهمی در پروسه‌ی تولید و تکثیر سلول‌ها دارد، را نشان داد. با توجه به نقش مهم هورمون هپسیدین در ایجاد آنمی و یا نقش آن در بیماری‌های اضافه باری آهن ما بر آن شدیم تا تاثیر اکسید روی را بر روی بیان کبدی ژن هپسیدین بررسی کنیم تا به یافتن راهی برای بهبود این دو بیماری کمکی کرده باشیم.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، 24 موش آزمایشگاهی نر نژاد ویستار به سه گروه هشت-تایی تقسیم شدند. 1-گروه کنترل، 2-گروه دریافت کننده‌ی اکسید روی و 3-گروه دریافت کننده‌ی نانوذرات اکسید روی. هر دو گروه دریافت کننده‌ی اکسید روی و نانو ذرات اکسید روی به مدت 14 روز 50 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به شکل داخل صفاقی ZnO و نانوذرات ZnO را دریافت نمودند. در پایان مطالعه نمونه‌های سرمی جمع‌آوری شده و میزان آهن، فریتین و IL-6 اندازه گیری شد. همچنین تکه‌ای از کبد نیز جهت جداسازی RNA برداشته شد.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که هم شکل متراکم و هم شکل نانو ذره اکسید روی به شکل معنی داری سبب افزایش بیان ژن هپسیدین نسبت به گروه کنترل شدند. افزایش بیان ژن هپسیدین در نانو

ذره نسبت به شکل متراکم قابل ملاحظه تر بود.

**نتیجه گیری :** نانوذرات اکسید روی نسبت به اکسید روی، تاثیر بیشتری بر روی افزایش بیان ژن

هپسیدین دارند.

**واژگان کلیدی :** هپسیدین، اکسید روی، نانوذرات اکسید روی، موش صحرائی

**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED...... فصل اول: طرح تحقیق**

- Error! Bookmark not defined......1-1-1-1** مقدمه و بیان مساله
- Error! Bookmark not defined......1-2-1-2** تعریف واژه
- Error! Bookmark not defined......1-3-1-3** اهداف و فرضیات
- Error! Bookmark not defined......1-3-1-1** اهداف کلی
- Error! Bookmark not defined......1-3-2-2** اهداف اختصاصی
- Error! Bookmark not defined......1-3-3-3** اهداف کاربردی
- Error! Bookmark not defined......1-4-1-4** فرضیات یا سؤالات تحقیق

**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED...... فصل دوم: پیشینه‌ی تحقیق**

- Error! Bookmark not defined......2-1-2-1** آهن
- Error! Bookmark not defined......2-1-1-1** منابع آهن در بدن
- Error! Bookmark not defined......2-1-2-2** ذخیره آهن
- Error! Bookmark not defined......2-1-3-3** تعادل تغذیه‌ای آهن
- Error! Bookmark not defined......2-2-2-2** مولکول‌های دخیل در متابولیسم آهن
- Error! Bookmark not defined......2-2-1-1** مولکول‌هایی که در جذب آهن از روده نقش دارند
- Error! Bookmark not defined.DMT-1 (Divalent metal-iron transporter)-2-2-1-1**
- Error! Bookmark not defined......2-2-1-2** فروپورتین (Fpn1)
- Error! Bookmark not defined......2-2-1-3** هفاستین
- Error! Bookmark not defined......2-2-2-2** مولکول‌هایی که در ذخیره‌ی کبدی آهن نقش دارند
- Error! Bookmark not defined......2-2-2-1** فریتین
- Error! Bookmark not defined......2-2-2-2** هموسیدرین
- Error! Bookmark not defined......2-2-2-3** ترانسفرین
- Error! Bookmark not defined......2-2-3-3** مولکول‌هایی که در تنظیم سیستماتیک آهن نقش دارند

<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	<b><u>defined.</u></b>
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-2-3-1-هپسیدین
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-3-هپسیدین
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-3-1- ساختار و ایزو فرم های هپسیدین
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-3-2- هپسیدین و تاثیر آن روی هموستاز آهن
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-3-3- عوامل موثر در تولید هپسیدین توسط کبد
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-3-3-1- مسیر تنظیمی وابسته به فعالیت خون سازی
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-3-3-2- مسیر تنظیمی وابسته به ذخایر آهن
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-3-3-3- مسیر تنظیمی وابسته به التهاب
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-3-3-4- مسیر تنظیمی وابسته به هیپوکسی
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4- متابولیسم آهن
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-1- سندروم اضافه بار آهن
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-2- انواع هموکروماتوز
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-2-1- هموکروماتوز ارثی تیپ I: HH-I
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-2-2- هموکروماتوز ارثی تیپ II: HH-II
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-2-3- هموکروماتوزیس ارثی تیپ III: HH-III
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-2-4- هموکروماتوزیس ارثی تیپ IV: HH-IV
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-3- هموکروماتوز ثانویه
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-4- پاتوفیزیولوژی اضافه باری آهن
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-4-5- نقش آهن در ایجاد آسیب کبدی
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	2-5- نانوذرات
25.....	2-6- بررسی متون

**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.** ..... **فصل سوم: شیوه اجرای طرح**

<b><u>Error! Bookmark not</u></b> .....	3-1- مواد، ترکیبات شیمیایی و کیت های آنزیمی مورد استفاده در تحقیق
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	<b><u>defined.</u></b>
<b><u>Error! Bookmark not defined.</u></b> .....	3-2- نام ظروف و وسایل مورد استفاده

- Error! Bookmark not defined.**.....3-3- تجهیزات الکتریکی مورد استفاده
- Error! Bookmark not defined.**.....3-4- حیوان آزمایشگاهی مورد مطالعه
- Error! Bookmark not defined.**.....3-5- دلایل انتخاب این حیوان به طور خلاصه عبارتند از
- Error! Bookmark not defined.**.....3-6- شرایط نگهداری حیوانات
- Error! Bookmark not defined.**.....3-7- نحوه‌ی گروه بندی
- Error! Bookmark not defined.**.....3-8- آماده کردن حیوانات برای خونگیری
- Error! Bookmark not defined.**.....3-9- جداسازی کبد و خونگیری از قلب موش صحرایی
- Error! Bookmark not defined.**.....3-10- جداسازی سرم از خون موشها
- Error! Bookmark not defined.**.....3-11- اندازه گیری آهن
- Error! Bookmark not defined.**.....3-12- اندازه گیری فریتین
- Error! Bookmark not defined.**.....3-13- اندازه گیری IL-6
- Error! Bookmark not defined.**.....3-14- استخراج RNA
- Error! Bookmark not defined.**.....3-14-1- اندازه گیری مقدار RNA استخراج شده
- Error! Bookmark not defined.**.....3-14-2- بررسی کیفی RNA استخراج شده
- Error! Bookmark not defined.**.....3-14-3- تیمار RNA استخراج شده
- Error! Bookmark not defined.**.....3-14-4- سنتز cDNA از RNA استخراج شده
- Error! Bookmark not defined.**3-15- نحوه‌ی انجام واکنش RT-PCR با ژن GAPDH
- Error! Bookmark not defined.**3-15-1- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز
- Error! Bookmark not defined.**.....3-15-2- تهیه ژل آگارز 1/2 درصد
- Error! Bookmark not defined.**.....3-15-3- نحوه‌ی انجام الکتروفورز
- Error! Bookmark not defined.**.....3-15-4- آشکار سازی ژل
- Error! Bookmark not defined.**.....3-16- آماده سازی پرایمرها
- Error! Bookmark not defined.**.....3-17- روش SYBR green qRT-PCR
- Error! Bookmark not defined.**3-18- تجزیه و تحلیل داده های SYBR green qRT-PCR
- Error! Bookmark not defined.**.....3-19- آنالیز آماری

**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**..... **فصل چهارم: نتایج**



- Error! Bookmark not defined.**.....4-1- ارزیابی کیفی سه باند RNA استخراج شده
- Error! Bookmark not defined.**.....4-2- کنترل واکنش سنتز cDNA توسط RT-PCR
- Error! Bookmark not defined.**.....4-3- نتایج بررسی های مولکولی
- Error!** 4-3-1- بررسی اختصاصی بودن و پرایمردایمر ژن خانگی GAPDH و ژن Hepcidin **Bookmark not defined.**
- Error! Bookmark not** 4-3-2- نتایج حاصل از Real Time PCR برای ژن GAPDH **defined.**
- Error! Bookmark not** 4-3-3- بررسی محصول Real time PCR بر روی ژل آگارز **defined.**
- Error! Bookmark not** 4-3-4- نتایج حاصل از Real Time PCR برای ژن Hepcidin **defined.**
- Error! Bookmark not** 4-3-5- بررسی محصول Real time PCR بر روی ژل آگارز **defined.**
- Error! Bookmark not** 4-3-6- بررسی کمی بیان ژن هپسیدین به روش Real time PCR **defined.**
- Error! Bookmark not defined.**.....4-4- نتایج بررسی های بیوشیمیایی
- Error! Bookmark not defined.**.....4-4-1- تاثیر نانوذرات روی و اکسید روی بر سطح آهن سرم
- Error! Bookmark not** 4-4-2- تاثیر نانوذرات روی و اکسید روی بر سطح فریتین سرم **defined.**
- Error! Bookmark not** 4-4-3- تاثیر نانوذرات روی و اکسید روی بر سطوح سرمی IL-6 **defined.**

## **فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری**.....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

- 55.....5-1- بحث
- 58.....5-2- نتیجه گیری
- 58.....5-2- محدودیت ها
- 59.....5-3- پیشنهادات
- 60.....5-4- منابع

## فهرست اشکال

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	شکل 2-1: مربوط به جذب، انتقال و متابولیسم آهن.
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	شکل 1-1: مربوط به واکنش فنتون .....
شکل 1-4	الکتروفورز حاصل از RNA تام استخراج شده از بافت کبدی با روش TRIZOL بر روی ژل
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	آگارز 1/2 درصد .....
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	شکل 3-4- منحنی ذوب مربوط به ژن GAPDH به عنوان ژن خانگی، در گروه های مورد مطالعه
BOOKMARK NOT DEFINED.	
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	شکل 4-4- منحنی تکثیر برای ژن GAPDH به عنوان ژن خانگی، در گروه های مورد مطالعه
BOOKMARK NOT DEFINED.	
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	شکل 5-4- بارگذاری محصول REAL TIME PCR مربوط به ژن GAPDH .....
BOOKMARK NOT DEFINED.	
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	شکل 6-4- منحنی ذوب مربوط به ژن هپسیدین در گروه های مورد مطالعه
NOT DEFINED.	
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	شکل 7-4- منحنی تکثیر برای ژن هپسیدین در گروه های مورد مطالعه
DEFINED.	

ERROR! .....[شکل 8-4- بارگذاری محصول REAL TIME PCR مربوط به ژن HEPICIDIN](#)

BOOKMARK NOT DEFINED.

## فهرست نمودارها

صفحه

عنوان

نمودار 4-1- مقایسه میزان بیان ژن هپسیدین در گروه های مورد

**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**.....مطالعه

نمودار 4-2- میانگین غلظت سرمی آهن در گروه های مورد

**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**.....مطالعه

نمودار 4-3- میانگین غلظت سرمی فریتین در گروه های مورد

**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**.....مطالعه

نمودار 4-4- میانگین غلظت سرمی IL-6 در گروه های مورد مطالعه.....53

## اختصارات

<b>DMT-1</b>	Divalent Metal-iron Transporter-1
<b>ERK2</b>	Extracellular signal-Regulated Kinase 2
<b>Fpn</b>	Ferroportin
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>HAMP</b>	Hepcidin Antimicrobial Peptide
<b>HFE</b>	Human hemochromatosis protein
<b>HH-1</b>	Hereditary hemochromatosis
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>Nrf2</b>	Nuclear factor E2-related factor 2
<b>NTBI</b>	Non-transferrin bound iron
<b>NTC</b>	No Template Control
<b>OD</b>	Optical density
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RT</b>	Reverse Transcriptase
<b>TFR1</b>	Transferrin Receptor Protein 1
<b>TMB</b>	Tetramethyl benzidine