بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

اثر اسیدهای چرب (پالمیتات و اولئات) بر مقاومت به انسولین و بیان ژن، میزان پروتئین و فعالیت آنزیم پروتئین تیروزین فسفاتاز ۱ B در رده سلول‌های عضلانی C۲C۱۲

نگارش:

لیلا پروانه

اساتید راهنما

دکتر محمد تقی‌خانی

دکتر باقر لاریجانی

اساتید مشاور

دکترمهدی فروزنده‌مقدم

دکتر ابوالفضل گلستانی

تابستان ۱۳۸۹

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم لیلا پروانه رشته بیوشیمی بالینی رساله دکتری خود را با عنوان: اثر اسیدهای چرب (پالمیتات و اولئات) بر مقاومت به انسولین و بیان ژن، میزان پروتئین و فعالیت آنزیم پروتئین تیروزین فسفاتاز 1B در رده سلولهای عضلاتی C2C12 در تاریخ ۸۹/۶/۳۰ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر محمد تقی خانی	۸۹/۶/۳۰
استاد راهنمای دوم	دکتر باقر لاریجانی	
استاد مشاور	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استادمشاور	دکتر ابوالفضل گلستانی	
استاد ناظر	دکتر فاطمه صغری کرمی تهرانی	
استاد ناظر	دکتر پروین پا سالار	
استاد ناظر	دکتر شهره خاتمی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر عباس صاحبقدم لطفی	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **لیلا پروانه** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۳** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

لیلا پروانه

۸۹/۶/۳۰

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته بیوشیمی بالینی است که در سال ۱۳۸۹ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر محمد تقی‌خانی و دکتر باقر لاریجانی ، مشاوره دکتر مهدی فروزنده مقدم و دکتر ابوافضل گلستانی از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب لیلا پروانه دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

لیلا پروانه

۸۹/۶/۳۰

تقدیم به :

والدینم،

برادرانم،

و معلمانم

به انجام رساندن این رساله جز با راهنمایی اساتید بزرگوار و کمک‌های افراد آگاه و همدلی دوستان دلسوز ممکن نمی شد:

- از جناب آقای دکتر محمد تقی خانی استاد عالم و فرهیخته که در نهایت صبوری و تحمل و حسن خلق راهنمایی این کار را برعهده داشته‌اند نهایت سپاس و تشکر را دارم.

- از استاد ارجمند جناب آقای دکتر باقر لاریجانی که به عنوان استاد راهنمای دوم در هدایت این کار سهیم بوده‌اند تشکر می‌نمایم.

- از اساتید ارجمند جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم و جناب آقای دکتر ابوالفضل گلستانی که به عنوان اساتید مشاور در به انجام رسیدن این کار سهیم بوده‌اند تشکر می‌نمایم.

- از استاد ارجمند جناب آقای دکتر مشکانی استاد محترم مشاور که با اندوخته‌های علمی خود در کلیه مراحل انجام این رساله، از جمله طرح و ایده اولیه این تحقیق، پشتوانه علمی محکمی بوده‌اند کمال تشکر را دارم.

- از تمامی اساتید بزرگوارم در طول این مقطع و سایر مقاطع تحصیلی صمیمانه سپاسگزارم. بی شک آموخته های این بزرگواران همواره سرمایه زندگی و روشنایی راه خواهد بود.

- از کارشناسان محترم گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس و کارشناسان و اساتید محترم گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی تهران و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات غدد به خاطر همکاری و همراهی‌شان در مسیر این تحقیق سپاسگزارم.

- از تمامی دوستانم به خاطر همدلی صمیمانه و راهنمایی‌های دلسوزانه‌شان که طی این مسیر صعب را آسان نمود صمیمانه سپاسگزارم.

چکیده:
چاقی و دریافت رژیم غذایی پرچربی از مهمترین فاکتورهای محیطی هستند که از طریق افزایش سطح اسیدهای چرب و فاکتورهای التهابی در بافت‌ها و پلاسما موجب مقاومت به انسولین عضلانی می‌شوند. اسیدهای چرب اشباع عموماً باعث مقاومت به انسولین و انواع غیراشباع موجب افزایش حساسیت به انسولین می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش PTP1B به عنوان واسطه در اعمال اثرات اسیدهای چرب بر عملکرد مسیر انسولین است. برای این منظور رده سلول‌های عضلانی موش، C۲C۱۲، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف دو اسید چرب اشباع و غیراشباع پالمیتات و اولئات برای زمان‌های مختلف قرار گرفتند. سپس میزان mRNA، پروتئین، و فعالیت آنزیمی این مولکول به ترتیب با استفاده از روش‌های Real-time PCR، لکه‌گذاری وسترن، و کیت تجاری اندازه‌گیری شدند. همچنین از کشت توام غیر-مستقیم میوتیوب‌ها و ماکروفاژها در حضور پالمیتات برای بررسی تاثیر التهاب ناشی از ماکروفاژها بر بیان پروتئین PTP1B استفاده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با پالمیتات ۰/۷۵ میلی‌مولار به مدت ۲۴ ساعت باعث القای بیان mRNA (۶۷٪)، پروتئین (۳۳٪)، و فعالیت آنزیمی PTP1B (۴۷٪) می-شود. همچنین این غلظت از پالمیتات باعث کاهش برداشت گلوکز و ایجاد مقاومت به انسولین در میوتیوب‌ها شد اما مهار فعالیت PTP1B در حضور پالمیتات مقاومت به انسولین ناشی از پالمیتات را کاهش داد. همچنین میزان افزایش سطح پروتئین PTP1B در میوتیوب‌ها در حضور ماکروفاژ و پالمیتات (۴۸٪) بیش از افزایش سطح این پروتئین در حضور پالمیتات تنها بود (۲۴٪). بررسی محیط کشت توام توسط الایزا نشان‌دهنده افزایش سینرژیستیک سطح دو سیتوکین التهابی TNF-α (۵۷ برابر) و اینترلوکین-۶ (۱۷ برابر) پس از تیمار با پالمیتات بود. همچنین نتایج نشان داد که اولئات تاثیری بر میزان mRNA مولکول PTP۱B نداشته اما میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی آن را کاهش داده و همزمان حساسیت به انسولین را بهبود می‌بخشد. تیمار همزمان میوتیوب‌ها با پالمیتات و اولئات به طور کامل مانع از القای mRNA مولکول PTP1B توسط پالمیتات شد. در مجموع نتایج مطالعه حاضر حاکی از نقش PTP1B به عنوان واسطه در بروز مقاومت به انسولین عضلانی ناشی از پالمیتات بوده و کاهش آن توسط اولئات می‌تواند موجب بهبود حساسیت به انسولین شود. مطالعات آتی به روشن شدن اثر اولئات و سایر اسیدهای چرب غیراشباع بر پیام‌رسانی انسولین و به خصوص، بر بیان PTP1B کمک خواهند نمود.

واژگان کلیدی: اسید چرب آزاد، اولئات، پالمیتات، پروتئین تیروزین فسفاتاز B۱، مقاومت به انسولین عضلانی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱ انتقال پیام انسولین و اثرات آن ۲

۱-۲ مقاومت به انسولین ۵

۱-۳ علت‌شناسی مقاومت به انسولین، نقش چاقی، محتوای چربی رژیم غذایی، و افزایش اسیدهای چرب ۷

۱-٤ مکانیسم‌های مولکولی ایجاد مقاومت به انسولین توسط لیپیدها ۱۰

۱-۵ نقش پروتئین تیروزین فسفاتاز ۱ B در مقاومت به انسولین ناشی از اسید چرب ۱٤

۱-٦ علت شناسی مقاومت به انسولین و نقش التهاب القاشده توسط لیپید ۱۷

۱-۷ اهداف تحقیق حاضر ۲۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲٤

۲-۱ مواد و وسایل لازم ۲۵

۲-۲ طرز تهیه محلول‌ها ۲۹

۲-۳ کشت و تمایز سلول‌های C۲C۱۲ ..... ۳۲

۲-۳-۱ رده سلولی C۲C۱۲ ..... ۳۲

۲-۳-۲ کشت سلول‌های C۲C۱۲ ..... ۳۳

۲-۳-۳ تمایز سلول‌های C۲C۱۲ ..... ۳٤

۲-٤ تیمار سلول‌ها با اسیدهای چرب پالمیتات و اولئات ۳٤

۲-۵ سنجش MTT جهت بررسی تاثیر اسیدهای چرب بر قابلیت زیست میوتیوب‌ها ۳۵

۲-٦ سنجش میزان برداشت گلوکز برای بررسی اثر اسید چرب بر مقاومت به انسولین ۳٦

۲-۷ سنجش بیان ژن ۳۸

۲-۷-۱ استخراج RNA ۳۸

۲-۷-۲ بررسی کیفیت و کمیت RNA های استخراج‌شده ٤۰

۲-۷-۳ الکتروفورز ژل آگارز ٤٠
۲-۷-٤ ساخت cDNA ٤١
۲-۷-٥ تایید تمایز سلول‌های C2C12 با استفاده از RT-PCR نیمه‌کمی ٤٢
۲-۷-٦ بررسی میزان بیان mRNA ژن PTP1B با استفاده از Real-time PCR ٤٣
۲-۷-٦-۱ مفاهیم مورد استفاده در Real-time PCR ٤٥
۲-۷-٦-۲ رسم نمودار استاندارد و تعیین میزان کارایی واکنش PCR ٤٧
۲-۷-٦-۳ آنالیز نمودار ذوب محصولات real-time PCR جهت بررسی اختصاصی بودن واکنش ٤٧
۲-۷-٦-٤ روش تعیین کمی بیان ژن در Real-time PCR ٤٨
۲-۸ وسترن بلات یا لکه‌گذاری Western ٥٠
۲-۸-۱ لیز سلول‌های تیمارشده ٥٠
۲-۸-۲ اندازه‌گیری میزان پروتئین تام نمونه‌ها به روش برادفورد ٥٠
۲-۸-۳ الکتروفورز SDS-PAGE ٥١
۲-۸-٤ انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشای PVDF، لکه‌گذاری وسترن، و آشکارسازی لکه‌های پروتئینی با
استفاده از سوبسترای کمی‌لومینسانس ٥٣
۲-۹ اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی PTP۱B ٥٥
۲-۱۰ کشت توام غیرمستقیم سلول‌های C۲C۱۲ و ماکروفاژهای J۷۷٤A.۱ ..... ٥٦
۲-۱۱ اندازه‌گیری سیتوکین‌های التهابی در محیط کشت میوتیوب‌ها به روش الایزا ٥٧
۲-۱۲ آنالیزهای آماری ٥٨
فصل سوم: نتایج ٥٩
۳-۱ تأیید تمایز سلول‌های C۲C۱۲ با استفاده از RT- PCR نیمه کمی ٦٠
۳-۲ سنجش MTT جهت بررسی تاثیر پالمیتات و اولئات بر قابلیت زیست میوتیوب‌ها ٦٢
۳-۳ بررسی اثر اسیدهای چرب بر مقاومت به انسولین میوتیوب‌ها ٦٣

۳-۳-۱ اثر پالمیتات بر مقاومت به انسولین میوتیوب‌ها در غیاب و حضور مهارکننده PTP۱B ٦٤
۳-۳-۲ اثر اولئات بر مقاومت به انسولین میوتیوب‌ها ٦٦
۳-٤ بررسی اثر اسیدهای چرب بر بیان mRNA ژن PTP۱B توسط روش Real-time PCR ٦٧
۳-٤-۱ رسم نمودار استاندارد و تعیین کارایی واکنش تکثیر ٦٨
۳-٤-۲ آنالیز منحنی ذوب محصولات real-time PCR برای تایید اختصاصی‌بودن واکنش تکثیر و عدم آلودگی ۷۰
۳-٤-۳ اثر پالمیتات بر بیان mRNA ژن PTP۱B ۷۱
۳-٤-٤ اثر اولئات بر بیان mRNA ژن PTP۱B ۷۳
۳-۵ بررسی اثر اسیدهای چرب بر میزان بیان پروتئین PTP۱B با استفاده از تکنیک وسترن بلات یا لکه-گذاری Western ۷۳
۳-۵-۱ اثر پالمیتات بر میزان بیان پروتئین PTP۱B ۷۳
۳-۵-۲ تاثیر اولئات بر میزان بیان پروتئین PTP۱B ۷٤
۳-٦ بررسی تاثیر اسیدهای چرب بر فعالیت آنزیمی PTP۱B ۷۵
۳-٦-۱ اثر پالمیتات بر فعالیت آنزیمی PTP۱B ۷٦
۳-٦-۲ اثر اولئات بر فعالیت آنزیمی PTP۱B ۷۸
۳-۷ اثر مهاری اولئات بر القای بیان PTP۱B توسط پالمیتات ۷۸
۳-۸ اثر التهاب ناشی از اسید چرب و ماکروفاژها بر بیان PTP۱B ۷۹
۳-۸-۱ اثر هم‌افزایی پالمیتات و ماکروفاژها بر بیان پروتئین PTP۱B در میوتیوب‌ها ۸۰
۳-۸-۲ اثر پالمیتات بر تولید سیتوکین‌های التهابی در محیط کشت میوتیوب‌ها ۸۱
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۸۳
فهرست منابع ۹۵
چکیده انگلیسی .....

فهرست جداول

جدول ۲-۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تایید تمایز ٤٣

جدول ۲-۲ آماده‌سازی نمونه‌های PCR نیمه‌کمی برای تایید تمایز ٤٣

جدول ۲-۳ شرایط انجام PCR نیمه‌کمی برای تایید تمایز ٤٣

جدول ۲-٤ آماده‌سازی نمونه‌های Real-time PCR ٤٩

جدول ۲-٥ شرایط انجام Real Time PCR ٤٩

جدول ۲-٦ حجم‌های مورد استفاده برای تهیه ژل جداکننده ۸ درصد ٥٢

جدول ۲-۷ حجم‌های مورد استفاده برای تهیه ژل متراکم‌کننده ٤ درصد ٥٢

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱ نتایج آنالیز نیمه‌کمی محصولات RT- PCR ژن‌های دسمین و بتا-اکتین در روزهای متوالی تمایز ٦١

نمودار ۳-۲ نتایج تست MTT پس از تیمار با غلظت‌های مختلف پالمیتات ٦٢

نمودار ۳-۳ نتایج تست MTT پس از تیمار با غلظت‌های مختلف اولئات ٦٣

نمودار ۳-٤ اثر پالمیتات بر برداشت گلوکز توسط میوتیوب‌ها و نقش PTP۱B ٦٥

نمودار ۳-٥ اثر اولئات بر برداشت گلوکز توسط میوتیوب‌ها ٦٦

نمودار ۳-٦ نمودار پیشرفت واکنش تکثیر نمونه‌های استاندارد با پرایمر بتا-اکتین ٦٨

نمودار ۳-۷ نمودار پیشرفت واکنش تکثیر نمونه‌های استاندارد با پرایمر PTP۱B ٦٩

نمودار ۳-۸ نمودار استاندارد دو پرایمر بتا-اکتین و PTP۱B ٦٩

نمودار ۳-۹ نمودار ذوب نمونه‌های استاندارد تکثیرشده با پرایمر بتا- اکتین ۷۰

نمودار ۳-۱۰ نمودار ذوب نمونه‌های استاندارد تکثیرشده با پرایمر PTP۱B ۷۱

نمودار ۳-۱۱ اثر پالمیتات بر بیان mRNA ژن PTP۱B در میوتیوب‌ها ۷۲

نمودار ۳-۱۲ اثر اولئات بر بیان mRNA ژن PTP۱B در میوتیوب‌ها ۷۲

نمودار۳-۱۳ اثر پالمیتات بر بیان پروتئین PTP۱B در میوتیوب‌ها ۷٤

نمودار۳-۱٤ اثر اولئات بر بیان پروتئین PTP۱B در میوتیوب‌ها ۷٥

نمودار ۳-۱٥ اثر پالمیتات بر فعالیت آنزیمی PTP۱B ۷۷

نمودار ۳-۱٦ اثر اولئات بر فعالیت آنزیم PTP۱B ۷۷

نمودار ۳-۱۷ اثر اولئات بر بیان mRNA ژن PTP۱B در میوتیوب‌های تیمارشده با پالمیتات ۷۹

نمودار ۳-۱۸ اثر پالمیتات و ماکروفاژها بر بیان پروتئین PTP۱B در میوتیوب‌ها ۸۰

نمودار ۳-۱۹ اثر افزایشی پالمیتات و ماکروفاژها بر تولید سیتوکین‌های التهابی در محیط کشت میوتیوب‌ها ۸۱

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱ تصویر شماتیک مسیر انتقال پیام انسولین ٤

شکل ۱-۲ مکانیسم پیشنهادی Randle برای مهار پیام‌رسانی انسولین توسط اسیدهای چرب ۱۱

شکل ۱-۳ گروه دیگری از مکانیسم‌ها برای نحوه اثر اسیدهای چرب بر مقاومت به انسولین عضلانی ۱۳

شکل ۱-٤ کاهش تیروزین‌فسفریلاسیون گیرنده انسولین و IRS-۱ توسط تیروزین‌فسفاتاز B۱ ..... ۱٦

شکل ۱-۵ میانکنش مستقیم بین مسیر انتقال پیام انسولین و مسیرهای التهابی ۲۰

شکل ۲-۱ مراحل سنتز cDNA از RNA تام ٤۲

شکل ۲-۲ اصول عملکرد سایبر گرین I ٤۵

شکل ۳-۱ تصویر سلول‌های C۲C۱۲ پیش از آغاز تمایز و در پایان روز چهارم تمایز ٦۰

شکل۳-۲ تصویر الکتروفورز محصولات RT- PCR ژن‌های دسمین و بتا-اکتین در روزهای متوالی تمایز ... ٦۱

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. انتقال پیام انسولین و اثرات آن

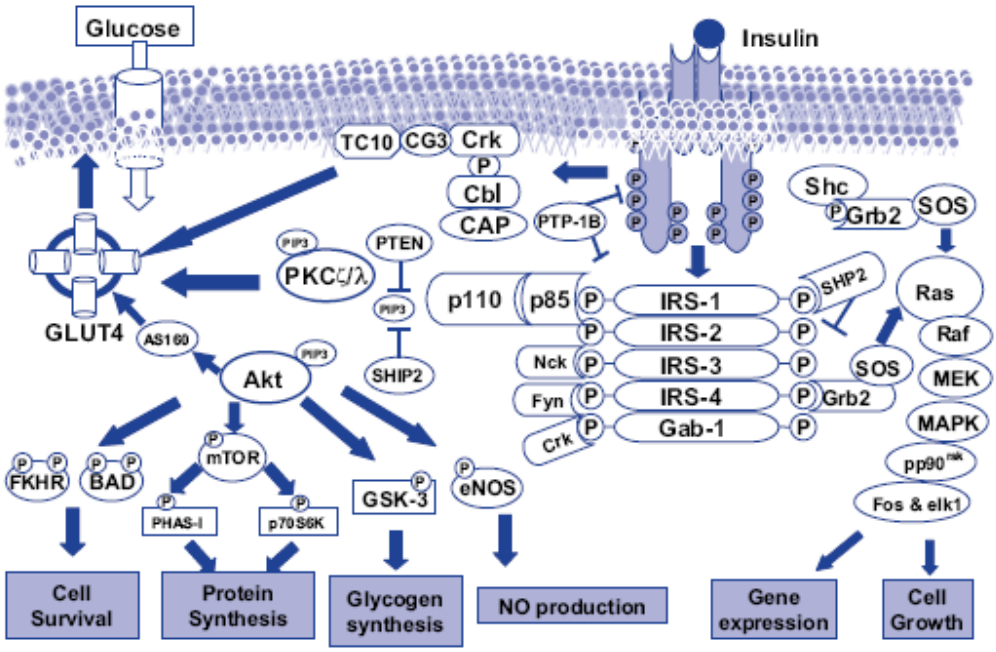
انسولین هورمون آنابولیکی است که عملکرد آن برای تکوین و رشد بافت‌ها و حفظ هومئوستاز گلوکز لازم است. انسولین توسط سلول‌های بتای پانکراس در پاسخ به افزایش میزان گلوکز و اسیدهای آمینه خون پس از صرف غذا ترشح می‌شود. تنظیم هومئوستاز گلوکز توسط این هورمون در جایگاه‌های متعددی انجام می‌گیرد. عمده‌ترین بافت‌های هدف انسولین عبارتند از عضلات اسکلتی و قلبی، بافت چربی، و کبد. در بافت عضله گلوکز پس از ورود به سلول و فسفریله‌شدن توسط هگزوکیناز ، به صورت گلیکوژن ذخیره شده و یا صرف تولید ATP می‌گردد. در آدیپوسیت‌ها و کبد گلوکز به ترتیب عمدتاً به صورت لیپید و گلیکوژن ذخیره می‌شود. انسولین با مهار گلوکونئوژنز و گلیکوژنولیز کبدی تولید گلوکز را در این بافت کاهش داده و از سوی دیگر موجب برداشت گلوکز توسط عضله و بافت چربی می‌گردد . انسولین همچنین متابولیسم لیپیدها را متاثر ساخته، سنتز لیپید را در کبد و سلول‌های چربی افزایش می‌دهد. در آدیپوسیت‌ها انسولین همچنین با مهار آنزیم لیپاز حساس به هورمون موجب مهار لیپولیز و کاهش رها شدن اسیدهای چرب می‌گردد. مجموع این اثرات موجب افزایش کلیرانس گلوکز از خون و افزایش مصرف آن توسط سلول‌ها و در نهایت، هومئوستاز گلوکز می‌شود [۱].

اتصال انسولین به گیرنده‌اش که یک گلیکوپروتئین سطح سلولی است باعث فعال شدن دو مسیر اصلی انتقال پیام متابولیک و میتوژنیک می‌شود. این گیرنده سطح سلولی عضوی از خانواده گیرنده‌های دارای خاصیت تیروزین‌کینازی است که از دو زیرواحد α و دو زیرواحد β تشکیل شده که توسط پیوندهای

دی‌سولفید به هم متصل‌اند [۲، ۳]. مهمترین واقعه‌ای که پس از اتصال انسولین به گیرنده‌اش رخ می‌دهد فعال شدن عملکرد ذاتی تیروزین‌کینازی آن است که باعث اتوفسفریلاسیون تیروزین‌های خاصی در دمین درون‌سلولی این گیرنده می‌شود [۴]. این رخداد به نوبه خود این امکان را برای تعدادی از پروتئین‌های قلابی[۱] که سوبسترای گیرنده انسولین هستند فراهم می‌کند که از طریق میانکنش بین موتیف PTB [۲] شان با موتیف‌های فسفوتیروزین در گیرنده انسولین به آن متصل شده و تبدیل و انتقال پیام را به سایر اجزای مسیر ممکن سازند. تعدادی از این پروتئین‌های قلابی عبارتند از: سوبستراهای گیرنده انسولین (IRS ها[۳])، Shc[۴]، و پروتئین APS[۵]. مهم‌ترین مولکول سوبسترای گیرنده انسولین در عضله که به موتیف-های فسفوتیروزین در گیرنده انسولین متصل می‌شود IRS-۱ نام دارد. این مولکول یکی از مهمترین پروتئین‌های دخیل در تنظیم متابولیسم گلوکز در عضله محسوب می‌گردد [۵]. مسیر پیام‌رسانی انسولین از این مولکول به بعد به دو مسیر متابولیک و میتوژنیک مجزا شده (شکل ۱-۱) و مسیر متابولیک از طریق مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز[۶] (PI۳K) تنظیم می‌شود. فعال شدن PI۳K که از طریق اتصال زیرواحد تطبیقی‌اش به IRS-۱ رخ می‌دهد موجب افزایش سطوح فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۴،۳- بیس‌فسفات (PIP_2) و فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۵،۴،۳- تری‌فسفات (PIP_3) می‌گردد. این پیک‌های ثانویه با فعال کردن کیناز وابسته به فسفواینوزیتید-۱ (PDK-۱[۷]) موجب فسفریله و در نتیجه فعال شدن پروتئین کیناز B (PKB یا Akt) و ایزوزیم‌های غیرمعمول پروتئین کیناز C (PKC) به نام‌های PKCζ و PKCι/λ می‌شوند [۶-۸]. هم PKB و هم PKC های غیرمعمول موجب جابجایی وزیکول‌های حاوی انتقال‌دهنده گلوکز (GLUT [۸]) از سیتوپلاسم به غشای پلاسمایی و قرارگیری‌شان در عرض غشای پلاسمایی و در نتیجه

[1] Docking proteins
[2] Phospho-tyrosine binding domain
[3] Insulin receptor substrates
[4] Src homology collagen
[5] Adaptor protein with a PH and SH2 domain
[6] Phosphatidyl inositol 3 kinase
[7] Phosphoinositide-dependent kinase-1
[8] Glucose transporter

برداشت وابسته به انسولین مولکول گلوکز می‌گردند [۱۰،۹]. علاوه بر مسیر PI۳K، برداشت گلوکز از طریق مسیر مستقل از PI۳K به نام مسیر CAP/TC۱۰ نیز انجام می‌گیرد [۱۱].



شکل ۱-۱. تصویر شماتیک مسیر انتقال پیام انسولین [۱۲].

دیگر مسیر متابولیکی که توسط انسولین فعال می‌شود مسیر سنتز گلیکوژن است. PKB فعال موجب فسفریله و غیرفعال شدن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ (GSK-۳[1]) که مهارکننده اصلی گلیکوژن سنتاز عضلانی است شده و به این ترتیب موجب تبدیل گلوکز درون‌سلولی به گلیکوژن می‌گردد. انسولین همچنین با فسفریلاسیون زیرواحد تنظیمی مرتبط با گلیکوژن به نام PP۱ [2] باعث افزایش دفسفریلاسیون گلیکوژن سنتاز توسط این مولکول و در نهایت افزایش فعالیت گلیکوژن سنتاز می‌شود. نتیجه این وقایع افزایش برداشت و مصرف گلوکز توسط سلول است [۱۳، ۱۴].

[1] Glycogen-synthase kinase-3
[2] Type 1 protein phosphatase

در عضله اسکلتی مسیر PI۳K عمدتاً در کنترل متابولیسم گلوکز نقش دارد، در حالی که اثرات میتوژنیک انسولین بیشتر توسط Shc و فعال‌سازی مسیر Ras-MAPK[1] اعمال می‌شوند. در مسیر میتوژنیک تعدادی از مولکول‌های تطبیقی حاوی SH۲[2] از جمله p۸۵ و Grb-۲[3] به سوبستراهای گیرنده انسولین مثل اشکال فعال IRS-۱ و Shc متصل شده و با فعال کردن پروتئین تبادل‌گر نوکلئوتید به نام m-SOS[4] باعث تبادل GDP با GTP بر روی Ras و فعال شدن Raf می‌شوند. Raf گروهی از کینازها از جمله MEK۱ [5] و MEK۲ را فسفریله و فعال می‌کند. این MAP کینازها با فسفریله‌کردن انواع مختلفی از فاکتورهای رونویسی در هسته سلول موجب تغییر بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها و رشد و تمایز سلولی می‌شوند. گرچه چنین به نظر می‌رسد که فعال شدن MAP کینازها توسط انسولین اهمیت کمتری در کنترل متابولیسم گلوکز در مقایسه با مسیر PI۳K دارد، اما این دو مسیر تاثیرات متقابل مثبت و منفی بر یکدیگر بر جای می‌گذارند [۱۵، ۱۶]. انسولین همچنین می‌تواند سنتز پروتئین را در سطح ترجمه به وسیله فسفریله کردن P۷۰S۶ و ۴E-BP۱ افزایش دهد. فسفریله‌شدن مولکول اخیر باعث جدا شدن آن از ۴E-eIF و در نتیجه افزایش پروتئین‌سازی می‌شود [۱۰].

۱-۲. مقاومت به انسولین

مقاومت به انسولین یک وضعیت پاتولوژیک است که در آن پاسخ‌دهی بافت‌های هدف به سطوح نرمال انسولین خون کاهش می‌یابد. پیامد مقاومت به انسولین افزایش تولید گلوکز کبدی و کاهش برداشت گلوکز توسط بافت‌های عضله و چربی است. به علاوه سنتز لیپید در بافت چربی کاهش یافته و در عوض، لیپولیز کنترل‌نشده که ناشی از عدم تاثیر انسولین بر لیپاز حساس به هورمون است موجب افزایش رها شدن اسیدهای چرب از این بافت می‌گردد. کل این وقایع منجر به عدم توانایی انسولین در حفظ سطوح

[1] Ras-mitogen activated protein kinase
[2] Src homology-2
[3] Growth receptor binding protein-2
[4] Mammalian Son of Sevenless
[5] MAPK/ERK kinase

نرمال گلوکز و هومئوستاز لیپید می‌شوند، در نتیجه مقادیر بیشتری از انسولین برای حفظ سطح نرمال گلوکز خون ترشح می‌شود. هایپرانسولینمی جبرانی که ناشی از افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتای پانکراس است یکی از خصوصیات انفکاک‌ناپذیر مقاومت به انسولین به شمار می‌رود [۱]. تظاهرات بالینی مقاومت به انسولین عبارتند از چاقی احشایی[1] [۱۷]، اکانتوزیس نیگریکانس [2] [۱۸]، آکنه، هیرسوتیسم [۱۹]، و استئاتوز کبدی [۲۰]. مقاومت به انسولین با تعدادی از بیماری‌ها مانند عفونت مزمن [۲۱]، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک [۲۲]، و انواع لیپودیستروفی همراه بوده و در پاتوژنز دیابت، افزایش فشار خون، بیماری‌های قلبی-عروقی، و روی هم رفته سندرم متابولیک نقش کلیدی ایفا می‌کند [۱ و ۲۳-۲۶]. شیوع کلی مقاومت به انسولین در جمعیت‌های گوناگون ۱۰ الی ۲۵ درصد است [۲۷].

قسمت عمده شناخت فعلی ما از پاتوفیزیولوژی مقاومت به انسولین طی مطالعات *in vivo* در مدل-های حیوانی و انسان با استفاده از تکنیک euglycaemic hyperinsulinaemic clamp به دست آمده است. در این تکنیک میزان مصرف گلوکز انفیوزشده در حضور انسولین اندازه‌گیری می‌شود. این مطالعات نشان دادند که این میزان در حالات مقاومت به انسولین کاهش می‌یابد، لذا اختلال در مصرف گلوکز در حضور انسولین به عنوان مقیاسی از مقاومت به انسولین در نظر گرفته می‌شود [۲۸]. مقیاس‌های دیگر مقاومت به انسولین عبارتند از سطح انسولین ناشتای پلاسما [۲۹]، اندکس HOMA[3] [۳۰]، QUICKI [4] [۳۱]، و اندکس McAuley [۳۲].

مطالعات *in vivo* نشان داده‌اند که از میان بافت‌های هدف انسولین عضله اسکلتی جایگاه اصلی برداشت گلوکز در حضور انسولین است به طوری که حدود ۷۵ درصد از مصرف وابسته به انسولین گلوکز کل بدن پس از صرف غذا توسط این بافت انجام می‌پذیرد. در نتیجه اختلال در برداشت گلوکز توسط این بافت بیشترین سهم را در ایجاد مقاومت به انسولین کل بدن ایفا می‌کند [۳۳]. لذا بخش عظیمی از

[1] Visceral obesity
[2] Acanthosis Nigricans
[3] Homeostasis model assessment
[4] Quantitative insulin sensitivity check index