١٣٩٨٣

٩٥٨٣٦

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

عنوان پایان نامه

تاثیر پودر پسته وحشی بر فعالیت آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (PAP) و چربیهای سرم موش صحرایی

پایان نامه :

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوشیمی

مولف

حسن امیدی

استاد راهنما

دکتر اسفندیار حیدریان

ماه و سال انتشار

دی ۱۳۸۶

۱۳۸۷ /۲/ ۱/۱۰

۹۵۸۳۶

دانشگاه پیام نور

تصویب نامه

پایان نامه تحت عنوان:

تاثیر پودر پسته وحشی بر فعالیت آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (PAP) و چربیهای سرم موش صحرایی

تاریخ دفاع: ۸۶/۱۰/۰۱ **نمره:** ۱۹/۳ **درجه:** عالی

اعضای هیات داوران :

نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
۱. آقای دکتر اسفندیار حیدریان	استاد راهنما		
۲. آقای دکتر رضا حاجی حسینی	استاد مشاور		
۳. آقای دکتر حبیب اله ناظم	استاد داور داخلی		
٤. آقای دکتر بهزاد لامع راد	استاد داور خارجی		
۵. خانم فرشته شاه محمدی	نماینده گروه		

۹۵۸۳۶

تقدیم به:

مادر مهربانم

به پاس تمامی محبتهای بی دریغش

تقدیم به:

خواهران و برادران عزیزم

آنان که با تحمل سختیها رنج تحصیل را بر من آسان نمودند

تقدیم به:

تمامی دوستان عزیزم

و تقدیم به:

همه آنان که به من آموختند

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس خداوند متعال را که نعمت وجود را در قالب انسانی مختار بر من ارزانی داشت. به مصداق حدیث "من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق" بر خود لازم می دانم از زحمات و الطاف بی دریغ جناب آقای دکتر اسفندیار حیدریان که همواره در طی مراحل مختلف پروژه از راهنماییهای ایشان بهره برده ام، صمیمانه تشکر و قدردانی کنم و همت والای ایشان را در جهت رفع موانع و پیشبرد اهداف عالیه بستایم. همچنین از همکاری و مساعدتهای جناب آقای دکتر رضا حاجی حسینی، مشاور محترم پروژه، نهایت تشکر و سپاسگزاری را می نمایم. از خداوند متعال آرزوی موفقیت و بهروزی برای آنها دارم. فرصت را مغتنم شمرده و از اساتید محترم دانشگاه و کلیه عزیزانی که بنحوی در طول مدت تحصیل و طی مراحل مختلف پروژه مرا یاری نمودند تشکر و سپاسگزاری می نمایم:

آقای دکتر بهزاد لامع راد	استاد محترم دانشگاه
آقای دکتر حشمت امیدی	استاد محترم دانشگاه
آقای مهندس صیدخانی	عضو هیئت علمی دانشگاه
سرکار خانم شاهی	کارشناس محترم آزمایشگاه بیوشیمی
آقای بیگ محمدی	کارمند بخش بیوشیمی

کلیه مسئولان و کارمندان محترم دانشگاه علوم پزشکی ایلام، که از هیچ مساعدتی به اینجانب دریغ ننمودند. موفقیت همگی را در طول زندگی از خداوند منان خواهانم.

چکیده :

مقدمه: آنزیم فسفاتیدات فسفوهیدرولاز (PAP) دفسفوریلاسیون فسفاتیدات را به دی آسیل گلیسرول و فسفات معدنی (Pi) کاتالیز می کند. این واکنش مرحله تنظیمی و محدود کننده سرعت متابولیسم گلیسرولیپیدها می باشد. دی آسیل گلیسرول تولیده شده پیش ساز سنتز فسفولیپیدها و تری گلیسریدها می باشد. در این مطالعه تاثیر پودر میوه Pistacia atlantica (از خانواده آناکاردیاسه) بر فعالیت آنزیم PAP ، تری گلیسرید کبدی و پروفیل چربیهای سرمی بررسی گردید.

مواد و روشها: چهار گروه موش صحرایی (۶ سر موش صحرایی در هر گروه) برای مدت ۱۵ و۶۰ روز با غذای عادی یا غذای عادی همراه با ۱۰درصد پودر پسته وحشی تغذیه شدند. سپس وزن بدن، فعالیت آنزیم PAP، تری گلیسرید سرم، کلسترول تام، HDL-C، LDL-C، VLDL-C و مقدار تری گلیسرید کبدی اندازه گیری گردید.

نتایج: نتایج نشان می دهد که موشهای تغذیه شده با پودر پسته وحشی در مدت ۱۵ روز دارای افزایش معنی دار کلسترول در همه فراکسیونهای لیپوپروتئینی و کاهش مقدار تری گلیسرید کبدی می باشند ($P<0.05$). فعالیت آنزیم PAP ۱۱درصد کاهش یافت که نسبت به گروه شاهد معنی دار نبود ($P>0.05$). همچنین تغییرات وزن بدن در هر دو دوره معنی دار نبود ($P>0.05$). از طرف دیگر، موشهای که به مدت ۶۰ روز با پسته وحشی تغذیه شده بودند تفاوت معنی داری در همه فراکسیونهای لیپوپروتئینی نسبت به گروه شاهد نشان ندادند ($P>0.05$). در حالیکه مقدار تری گلیسرید کبدی بطور معنی داری کاهش یافته بود ($P<0.05$). علاوه بر این، فعالیت آنزیم PAP نسبت به گروه شاهد تقریبا ۱۶درصد کاهش یافت.

یافته های پژوهش: این یافته ها نشان می دهد که در پسته وحشی برخی از ترکیبات در دوره کوتاه مدت بطور معنی داری متابولیسم کلسترول را در همه فراکسیونهای لیپوپروتئینی افزایش می دهند. از طرف دیگر، در دوره بلند مدت نتایج معنی داری از متابولیسم کلسترول بدست نیآمد و این احتمالا ناشی از اثر اسیدهای چرب لینولنیک و لینولئیک پسته وحشی است که می تواند سطح افزایش یافته کلسترول را در دوره بلند مدت کاهش دهد. با توجه به دخالت آنزیم PAP در تولید چربی کبدی، میوه پسته باعث کاهش مقدار تری گلیسرید کبدی از طریق کاهش فعالیت آنزیم PAP در دوره کوتاه مدت و بلند مدت می شود.

کلید واژه ها : فسفاتیدات فسفوهیدرولاز، آجیل پسته، لیپوپروتئین، اسیدهای چرب لینولنیک و لینولئیک

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

فصل اول

کلیات

۱-۱-مقدمه ۲

۱-۲- گیاه شناسی و ترکیب شیمیایی ۳

۱-۳- مصارف ٤

۱-۴- تعریف مساله و بیان سوالهای تحقیق ٤

۱-۵- اهداف ٥

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- آنزیم فسفاتیدات فسفو هیدرولاز یا PAP (EC 3.1.3.4) ۷

۲-۲- خصوصیات آنزیمPAP ۷

۲-۲-۱- pH اپتیمم آنزیم ۷

۲-۲-۲- آنزیمPAP و یون منیزیم ۸

۲-۲-۳- سوبسترای اختصاصی ۸

۲-۲-۴- اثر غلظت فسفاتیدات ۹

۲-۳- آنزیمPAP و جایگاه آن در سلول ۹

۲-۴- نقش آنزیمPAP در بافتهای مختلف ۱۰

۲-۴-۱- نقش آنزیمPAP در مغز ۱۰

۲-۴-۲- نقش آنزیمPAP درکبد ۱۱

۲-۴-۳- نقش آنزیمPAP در بافت قلب ۱۲

۲-۴-۴- نقش آنزیمPAP در بافت چربی ۱۲

۲-۴-۵- نقش آنزیمPAP در بافت ریه ۱۳

۲-۵- آنزیمPAP بعنوان پیام آور ثانویه ۱٤

۲-۶- کنترل فعالیت آنزیمPAP ۱۵

۲-۶-۱- کنترل هورمونی و متابولیکی ۱۵

۲-۷- نقشCAMP در توزیع درون سلولی آنزیم PAP و نقش احتمالا تنظیمی فسفوریلاسیون آنزیم... ۱۸

۲-۸- اثر عوامل مختلف بر فعالیت آنزیم PAP ۱۹

۲-۸- ۱- اثرتغذیه بر فعالیت آنزیم PAP ۱۹

۲-۸-۲-اثرکاتیونهای آمفیفیلیک بر فعالیت آنزیم PAP ۱۹

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۲-۸-۳- اثر اسیدهای چرب طویل بر فعالیت و توزیع درون سلولی آنزیم PAP ۲۰
۲-۸-۴- اثر الکل بر فعالیت آنزیم PAP ۲۲
۲-۸-۵- اثر کاتیونها بر فعالیت آنزیمPAP ۲۳
۲-۸-۶- اثر فسفولیپیدها بر فعالیت آنزیمPAP ۲۴
۲-۹- لیپوپروتئین ها ۲۴
۲-۱۰- هدف ۲۶

فصل سوم

مواد و روشها

۳-۱- وسایل ۲۹
۳-۲- مواد شیمیایی ۲۹
۳-۳- محلولهای لازم جهت سنجش فعالیت آنزیم ۲۹
۳-۴- حیوانات آزمایشگاهی، شرایط نگهداری و رژیم غذایی ۳۰
۳-۵- پرفیوژن کبد ۳۱
۳-۶- هموژنیزاسیون کبد ۳۱
۳-۷- اندازه گیری فعالیت آنزیمPAP ۳۲
۳-۸- اندازه گیری فسفات معدنی حاصل از فعالیت آنزیمPAP ۳۳
۳-۹- اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد ۳۳
۳-۱۰- اندازه گیری لیپیدهای سرم ۳۵
۳-۱۰-۱- اندازه گیری کلسترول سرم ۳۶
۳-۱۰-۲- اندازه گیری تری گلیسرید سرم ۳۷
۳-۱۰-۳- اندازه گیری HDL-کلسترول سرم ۳۸
۳-۱۰-۴- اندازه گیری LDL و VLDL کلسترول سرم ۳۹
۳-۱۱- جداسازی و تخلیص لیپیدهای تام از کبد ۴۰
۳-۱۱-۱- اصول ۴۰
۳-۱۲- استخراج فسفولیپیدها از سایر چربیها ۴۱
۳-۱۳- اندازه گیری تری گلیسرید کبد ۴۳
۳-۱۴- روش آماری تجزیه و تحلیل اطلاعات ۴۳

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل چهارم

نتایج

۴-۱-۱-نتایج تاثیر پسته وحشی بر وزن موش صحرایی ٤٥
۴-۱-۲- نتایج تاثیر پسته وحشی بر فعالیت آنزیم فسفاتیدات فسفو هیدرولاز (PAP) ٤٧
۴-۱-۳- نتایج تاثیر پسته وحشی بر کلسترول تام سرم (TC) ٤٩
۴-۱-۴- نتایج تاثیر پسته وحشی بر تری گلیسرید سرم (TG-S) ٥١
۴-۱-۵- نتایج تاثیر پسته وحشی بر لیپو پروتئین با چگالی بالا (HDL-C) ٥٣
۴-۱-۶- نتایج تاثیر پسته وحشی بر لیپو پروتئین با چگالی پائین (LDL-C) ٥٥
۴-۱-۷- نتایج تاثیر پسته وحشی بر لیپو پروتئین با چگالی خیلی پائین (VLDL-C) ٥٧
۴-۱-۸- نتایج تاثیر پسته وحشی بر تری گلیسرید کبدی (TG-L)..... ٥٩

فصل پنجم

بحث

۵- بحث ٦٢

۶- نتیجه گیری کلی ٦٩
۷- پیشنهادات ٧٠
۸- منابع و ماخذ ٧١
۹- ضمائم ٨٣

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱ برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیپوپروتئینها ۲۵

جدول ۳-۱. تعیین منحنی استاندارد پروتئین به روش برادفورد..... ۳۵

جدول ۳-۲: نحوه تهیه نمونه های بلانک، استاندارد و تست برای اندازه گیری کلسترول سرم..... ۳۶

جدول ۳-۳: نحوه تهیه نمونه های بلانک، استاندارد و تست برای اندازه گیری تری گلیسرید سرم ۳۸

جدول ۳-۴: نحوه تهیه نمونه های بلانک، استاندارد و تست برای اندازه گیری HDL-کلسترول سرم ۳۹

جدول ۴-۱: میانگین وزن اولیه و نهایی رتها (بر حسب گرم) با تغییرات نسبت به شاهد در دوره ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۴۵

جدول ۴-۲: میانگین فعالیت مخصوص آنزیم PAP در دوره ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۴۷

جدول ۴-۳: میانگین غلظت کلسترول تام رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۴۹

جدول ۴-۴: میانگین غلظت تری گلیسرید سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه ۵۱

جدول ۴-۵: میانگین غلظت HDL-کلسترول سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۵۳

جدول ۴-۶: میانگین غلظت LDL-کلسترول سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۵۵

جدول ۴-۷: میانگین غلظت VLDL-کلسترول سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۵۷

جدول ۴-۸: میانگین غلظت تری گلیسرید کبد رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه ۵۹

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۴-۱: نمودار وزن اولیه و نهایی رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه تحت تاثیر تیمار ۱۰ درصد پسته وحشی ۴۶

شکل۴-۲: نمودار تاثیر پسته وحشی بر میزان فعالیت آنزیم PAP در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه ۴۸

شکل۴-۳: نمودار تاثیر پسته وحشی بر غلظت کلسترول تام سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۵۰

شکل۴-۴: نمودار تاثیر پسته وحشی بر غلظت تری گلیسرید سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۵۲

شکل۴-۵: نمودار تاثیر پسته وحشی بر غلظت HDL-کلسترول سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۵۴

شکل۴-۶: نمودار تاثیر پسته وحشی بر غلظت LDL-کلسترول سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه ۵۶

شکل۴-۷: نمودار تاثیر پسته وحشی بر غلظت VLDL-کلسترول سرم رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه..... ۵۸

شکل۴-۸: نمودار تاثیر پسته وحشی بر غلظت تری گلیسرید کبدی رتها در دوره زمانی ۱۵ و ۶۰ روزه ۶۰

فصل اول

کلیات

۱-۱-مقدمه

پسته وحشی یا بنه، ***Pistacia atlantica*** گونه ای از جنس پسته، از خانواده آناکاردیاسه[1] است، پسته وحشی در مناطق مختلف جنگلی ایران در مساحتی در حدود ۲۴۰۰۰۰۰ هکتار مـی رویـد. پـسته وحـشی در ارتفاعات و کوهستانهای خشک و نیمه خشک همراه با گونه های مهم افرا، بادام، بلوط و دیگر بوته ها، جوامع جنگلی وسیعی را تشکیل می دهد. در شرایط مساعد، ارتفاع درختان پسته وحشی تا ۱۰متر و قطر تنه شان تا بیش از یک متر می رسد [۱].

پسته با اسامی مختلف در میان مردم این سرزمین شهرت دارد. اسناد و مدارک تاریخی، مبـدا پـسته را قلمرو فرهنگی ایران و پسته وحشی را سرزمین مادها در دامنه های سلسله جبـال زاگـرس نـام بـرده انـد. از طرفی به استناد مدارک و تحقیقات علمـی ناشـی از دلایـل زمـین شناسـی، ژئومورفولـوژی، گـرده شناسـی، تجزیه شیمیایی رسوبها، اقلیم شناسی نیز موید این نظر است که از حدود ۵۵۰۰ سال پـیش پوشـش گیـاهی زاگرس به جنگلهای بلوط و پسته وحشی تبدیل شده است. جنگلهای پسته وحشی نه تنها در ایران، بلکـه در سایر کشورها مانند: ترکیه، کـشورهای مـشترک المنـافع، اسـپانیا، و نـواحی مدیترانـه گـسترده شـده اسـت. زیرگونه های مختلف پسته وحشی در کشورمان در شهرهای کرمانشاه، ایلام، یزد، خراسان، کرمـان، فـارس، سیستان بلوچستان، کردستان و لرستان انتشار دارند [۱].

پسته وحشی دارای اهمیت اقتصادی_اجتماعی و زیست محیطی می باشد و همچنین در تامین نیازهای محلی، اقتصاد منطقه ای، ملی، اشتغال زایی و گسترش صنایع نقش دارد. صمغ درختان پسته وحشی یکـی از محصولات باارزش جنگلهای خشک و نیمه خشک کشور بشمار می رود که از آن صدها محـصول دارویـی و صنعتی تهیه می شود. علاوه بر اینها دانه و میوه آن نیز مصرف خوراکی دارد [۱].

همچنین پسته وحشی بعنوان پایه مقاوم به عوامل بیماریزا، در تکثیر درختان پـسته تجـاری از اهمیـت بالایی برخوردار است. بنابر اهمیت اقتصادی پسته وحشی، مطالعاتی در زمینه های مختلف مرتبط با آن انجام شده است. ولی مطالعات گسترده تری جهت حفاظت جنگلها و کیفیت و کمیت آن لازم است [۱].

[1] Anacardiacea

۱-۲- گیاه شناسی و ترکیب شیمیایی

پسته وحشی (بنه) به گیاهانی از جنس ***Pistacia*** ، از خانواده آناکاردیاسه تعلق دارد. پسته وحشی درختی با ارتفاع ۲ الی ۷ متر، خزان کننده، تاج گرد، تنه قطور با پوست ناصاف و تیره می باشد. این گیاه دارای ریشه های عمیق و در خاکهای آهکی قادر به رویش است. برگها تک شانه ای، تخم مرغی شکل و نوک تیز بوده و سطح روئی برگها اغلب شفاف است. از دیگر خصوصیات مهم آن می توان مقاومت به خشکی، باد، گرما، شوری و سرمای زیر صفر اشاره کرد. متوسط عمر مفید درخت پسته وحشی۳۰۰ سال است [۲].

میوه پسته وحشی شفت خوشه ای است که شکل کروی یا بیضی دارد. مغزه خوراکی میوه داخل یک پوسته سخت قرار دارد. میوه پسته وحشی از زمان شکل گیری تا رسیدگی کامل بترتیب به رنگهای کرم، زرد تیره، نارنجی، قرمز، قهوه ای متمایل به قرمز و زیتونی تیره تغییر می یابد. میوه آن حاوی ۵۲ تا ۶۰ درصد چربی، ۱۸ تا ۲۲ درصد پروتئین، ۱۶ تا ۱۷ درصد قند، فیبر، روغنهای فرار، ترکیبات ترپنوئیدی و مقادیر زیادی اسیدهای آمینه لیزین و آرژنین می باشد [۴-۲]. علاوه بر این عناصر معدنی نظیر کلسیم، فسفر، منیزیم، پتاسیم، سدیم، منگنز، مس، روی، آهن، سلنیم و مقادیر قابل ملاحظه ای ویتامین A و C در این میوه دیده می شود [۴،۵].

روغن بنه شباهت زیادی به روغن زیتون داشته و از جنبه خوراکی روغن مرغوبی می باشد [۲]. بیشتر اسیدهای چرب موجود در میوه پسته وحشی اسیدپالمیتیک (۹/۶ درصد)، اسیدپالمیتولئیک (۱/۳ درصد)، اسیداستئاریک (۳/۱ درصد)، اسیداولئیک (۶۹ درصد) و اسیدلینولئیک (۱۷ درصد) است. از سوی دیگر عدد یدی این چربیها ۹۴ درصد است که نشان دهنده میزان بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در روغن این میوه است که نسبت به روغن ذرت، بادام زمینی، آفتاب گردان و کنجد بیشتر است. با توجه به وجود میزان زیاد اسید چرب غیر اشباع در این میوه می توان به آثار کاهش دهنده چربی خون آن توجه بیشتری نمود [۲،۶].

۱-۳- مصارف

درگذشته از بخشهای مختلف گیاه استفاده زیادی شده است از جمله:

ـ جهت تهیه ترشی و معطر ساختن ماست و دوغ از میوه پسته وحشی استفاده می گردد [۲].

ـ برگ بنه بواسطه وجود مواد شیمیایی و داروئی از مدتها قبل بصورت سنتی برای درمان بعضی از امراض و تهیه مواد شیمیایی مورد نیاز ساکنین مناطق مختلف استفاده می گردد [۲].

ـ صمغ (سقز) که درحقیقت شیرابه درخت است، از طریق شیارهای که در تنه درخت ایجاد می شود بدست می آید و در تهیه آدامس و درمان زخمهای پوستی، ضدعفونی مجاری ادراری، دهان، دستگاه گوارش، سنگ کلیه و صفرا، امراض کبدی، نفخ شکم، تقویت اعصاب و جزام کاربرد دارد [۲].

امروزه در صنایع بهداشتی داروئی، تهیه رنگ، علف کش، چسب و کاغذ سازی... استفاده از صمغ این درخت افزایش یافته است [۲].

۱-۴- تعریف مساله و بیان سوالهای تحقیق

امروزه مصرف انواع داروهای ضد چربی سنتتیک و شیمیایی نظیر لواستاتین، کلوفیبرات، ژمفیبروزیل، اسید نیکوتینیک و.... بطور گسترده ای در جوامع صنعتی و شهرنشین متداول شده است. مصرف این داروها علاوه بر اینکه هزینه بالایی را به بیمار تحمیل می کند، برخی از آنها دارای اثرات و عوارض جانبی منفی زیادی نیز می باشند. استفاده از گیاهان و فراورده های دارویی آنها در ایران و سایر کشورها سابقه تاریخی و اثرات شناخته شده ای داشته است و این گونه فراورده های دارویی گیاهی نسبت به ترکیبات شیمیایی دارویی دارای اثر بخشی نسبی و حداقل عوارض جانبی می باشند. در تحقیقات قبلی مشخص شده مصرف محصول درختان خانواده آناکاردیاسه دارای اثرات کاهنده چربی خون هستند [۶]، اما مکانیسم دقیق اثرات کاهنده آنها بر چربیهای خون هنوز بخوبی مشخص نشده است. با توجه به اینکه درخت پسته وحشی از خانواده آناکاردیاسه بطور گسترده ای در کشور یافت و رشد می کند، بر آن شدیم تا تاثیر پسته وحشی را بر فعالیت آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز چربیها یعنی فسفاتیدات فسفوهیدرولاز، چربیها و لیپوپروتئینهای سرم موش صحرایی (رت) بررسی نماییم

با توجه به موارد مطرح شده مهمترین سوالات مورد نظر عبارتند از:

۱- آیا مصرف پسته وحشی بر فعالیت آنزیم فسفاتیدات فسفو هیدرولاز کبدی موثر است؟

۲- آیا مصرف پسته وحشی بر مقدار تری گلیسرید سرم موثر است؟

۳- آیا مصرف پسته وحشی بر مقدار کلسترول تام سرم موثر است؟

۴- آیا مصرف پسته وحشی بر مقدار تری گلیسرید تام کبدی موثر است؟

۵- آیا مصرف پسته وحشی بر مقدار HDL-کلسترول سرم موثر است؟

۶- آیا مصرف پسته وحشی بر مقدار VLDL-کلسترول سرم موثر است؟

۷- آیا مصرف پسته وحشی بر مقدار LDL-کلسترول سرم موثر است؟

۸- آیا مصرف پسته وحشی بر مقدار وزن موثر است؟

۱-۵- اهداف

مهمترین اهداف اصلی و فرعی این طرح عبارتند از:

۱- تعیین اثر پودر پسته وحشی بر فعالیت آنزیم کبدی فسفاتیدات فسفو هیدرولاز موش صحرایی

۲- تعیین اثر پودر پسته وحشی بر مقدار تری گلیسرید سرم موش صحرایی

۳- تعیین اثر پودر پسته وحشی بر مقدار کلسترول تام سرم موش صحرایی

۴- تعیین اثر پودر پسته وحشی بر مقدار تری گلیسرید تام کبد موش صحرایی

۵- تعیین اثر پودر پسته وحشی بر مقدار HDL-کلسترول سرم موش صحرایی

۶- تعیین اثر پودر پسته وحشی بر مقدار VLDL-کلسترول سرم موش صحرایی

۷- تعیین اثر پودر پسته وحشی بر مقدار LDL-کلسترول سرم موش صحرایی

۸- تعیین اثر پودر پسته وحشی بر مقدار وزن موش صحرایی

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- آنزیم فسفاتیدات فسفو هیدرولاز یا PAP (EC 3.1.3.4)

این آنزیم اولین بار توسط اسمیت[1] در بافتهای جانوری شناسایی شد [۷]. سپس وجود آن در بعضی از بافتهای حیوانی نظیر کبد اثبات شد. امروزه این آنزیم از منابع مختلف از جمله میکروزومهای کلیه خوکچه هندی، مغز خوکچه هندی، میتوکندریهای کبد رت [۸-۷] و شش جداسازی شده است [۹،۱۰].

آنزیم PAP موجب هیدرولیز اسید فسفاتیدیک (PA) به دی آسیل گلیسرول (DG) و ارتو فسفات (Pi) می شود [۱۱]. این واکنش در نقطه شروع متابولیسم گلیسرو فسفولیپیدها می باشد [۱۰] و DG حاصل از این واکنش به عنوان یک پیش ساز، در سنتز فسفاتیدیل کولین (PC) و فسفاتیدیل اتانول آمین سلولهای یوکاریوت [۷] و همچنین تری آسیل گلیسرول عمل می کند. بدین ترتیب این آنزیم یک نقش تنظیمی مهم را در سنتز تری گلیسریدها [۱۳- ۱۲]، تشکیل VLDL در کبد [۱۴] و متابولیسم گلیسرو فسفولیپیدها ایفا می کند [۱۵]. لذا فاکتورهای که فعالیت آنزیم PAP را تحت تاثیر قرار می دهند، ممکن است اثرات مهمی را بر مسیر سنتز TG اعمال کنند [۸]، مانند هورمونهای گلوکوکورتیکوئیدی [۱۶] و انسولین [۱۷]. این مسئله از آنجا اهمیت پیدا می کند که بدانیم PA و TG در تنظیم اثر هورمونها نقش دارند [۸]. مکانیسم تنظیمی این آنزیم ممکن است فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون باشد [۱۸-۱۲].

۲-۲- خصوصیات آنزیم PAP

۲-۲-۱- pH اپتیمم آنزیم

آنزیم PAP در میتوکندری دارای pH اپتیمم بین ۶ تا ۷ می باشد [۱۹] و آنزیم موجود در کلروپلاست اسفناج دارای یک pH اپتیمم قلیایی یعنی ۹ می باشد [۲۰]. آنزیم PAP خالص شده از کبد در بافر تریس هیدروکلراید دارای یک pH اپتیمم بین ۷/۴ تا ۷/۶ می باشد [۷].

[1] Smith

۲-۲-۲- آنزیم PAP و یون منیزیم

تعدادی از فسفولیپازها برای فعالیت نیاز به یونهای دو ظرفیتی دارند. فعالیت آنزیم PAP خالص شده بوسیله Mg^{2+} تحریک می شود [۲۱]. به نظر می رسد که یون منیزیوم بر روی سوبسترا اثر می گذارد تا نیاز قطعی برای آنزیم باشد. یون منیزیوم احتمالا با تغییر شکل فیزیکی سوبسترا از طریق خنثی کردن بار منفی آن و ایجاد یک کنفورماسیون مناسب، اندرکنش آنزیم و سوبسترا را تسهیل می کند [۲۱]. آنزیم PAP موجود در کمپارتمانهای سلولی از لحاظ نیازمندی به یون منیزیم به دو دسته تقسیم می شود:

۱- Mg^{2+}–dependent (PAP-1) ۲- Mg^{2+}–independent (PAP-2) [۱۱]

بخش میتوکندریایی حاوی فرم آنزیمی غیر وابسته به منیزیوم می باشد و بخش سیتوزولی اساسا حاوی فرم آنزیمی وابسته به منیزیوم می باشد، در حالی که بخش میکروزومی حاوی هر دو فرم می باشد [۱۱]. این دو فرم آنزیمی در بافت چربی، کبد، قلب و ششها یافت می شوند [۲۲]، و در خواصی نظیر حساسیت در برابر آنزیمهای پروتئولیتیک و اثر عوامل گروه تیولی و ناپایداری در مقابل حرارت[1] با یکدیگر متفاوت هستند [۱۱]. از سوی دیگر فرم وابسته به منیزیوم توسط N- اتیل مالیمید (NEM)[2] ، گرما و فلوراید مهار می شود ولی فرم غیروابسته به منیزیوم توسط NEM، گرما و فلوراید مهار نمی شود [۲۴-۲۲]. لذا از اثر مهاری NEM در جداسازی و تشخیص این دو فرم آنزیمی استفاده می شود [۸،۲۲]. تحقیقات انجام شده نشان داده است که آنزیم PAP وابسته به منیزیوم نقش مهمی در سنتز TG دارد [۲۱،۲۵]. جمدر[3] و همکارانش [۲۳] نشان دادند که تفاوت در نیازمندی به یون منیزیوم، مربوط به اختلاف در خواص این دو فرم آنزیمی می باشد.

۲-۲-۳- سوبسترای اختصاصی

مطالعات صورت گرفته با ترکیبات فسفوریله مختلف نشان داده است که آنزیم برای فسفاتیدات بسیار اختصاصی می باشد [۷،۱۳]. سرعت دفسفوریلاسیون ۱- آسیل Sn- گلیسرول فسفات کمتر از ۱۵ درصد مقدار فسفاتیدات می باشد. وقتی که فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ دی فسفات و فسفاتیدیل اینوزیتول ۴- فسفات بعنوان سوبسترا استفاده شود، Pi آزاد نمی شود. وقتی که از ترکیباتی نظیر گلیسرول ۱- فسفات،

[1] Thermolability
[2] N-ethylmaleimide (NEM)
[3] Jamdar

گلیسرول ۲- فسفات، 5′-AMP، 3′-AMP، فسفوسرین، گلوکز ۶- فسفات و پارا نیتروفنیل فسفات در غلظتهای ۰/۲ تا ۱ میلی مولار استفاده می گردد، دفسفوریلاسیون انجام نمی شود [۱۳].

فسفاتیدات در هر دو بخش غشاء خارجی میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی سلولهای کبدی رت تشکیل می شود [۲۶]. این مسئله زمانی اهمیت پیدا می کند که بدانیم آنزیم سازنده فسفاتیدات یعنی گلیسرو فسفات آسیل ترانسفراز در هر دو بخش میتوکندری و میکروزومی بطور جداگانه وجود دارد [۲۷].

۲-۲-۴- اثر غلظت فسفاتیدات

بر اساس مطالعات انجام گرفته توسط هوزاکا[1] و همکارانش [۷]، K_m ظاهری آنزیمی که نسبتا خالص شده است، تقریبا ۰/۰۵ میلی مولار است.

۲-۳- آنزیم PAP و جایگاه آن در سلول

آنزیم PAP توزیع چندگانه دارد یعنی هم در فراکسیون میکروزومی و هم در فراکسیون سیتوزولی یافت می شود [۲۸]. الگوی توزیع درون سلولی[2] این آنزیم نسبت به سایر آنزیمهای درگیر در سنتز آسیل گلیسرولها غیر معمول است. این آنزیم در بخشهای مختلف سلول مانند سیتوزول، غشاء پلاسمایی، میتوکندری، لیزوزوم و میکروزوم وجود دارد در حالی که اغلب آنزیمهای سنتز کننده آسیل گلیسرول اساسا در بخشهای میکروزومال و برسطح سیتوپلاسمی ویزیکولهای میکروزومی قرار گرفته اند [۱۱]. قسمت لیزوزومی رت بالاترین فعالیت مخصوص را دارد ولی حداکثر مقدار آن در بخش میکروزومی قرار دارد [۲۹]. اما آنچه که کمتر روشن شده است ارتباط این فراکسیونها با هم است. هر تحقیق در این زمینه وابسته به توانایی در سنجش قابل اعتماد این فراکسیونها می باشد. ابتدا تصور می رفت آنزیم در سیتوزول وجود ندارد زیرا آنزیم در محلول امولسیونی فسفاتیدات شامل Ca^{2+} قابل آشکار شدن نبود [۲۵،۳۰] و تنها با استفاده از فراکسیون میکروزومی یا میتوکندریایی غنی از فسفاتیدات، قابل استخراج بود که در این زمان آنزیم PAP سیتوزولی

[1] Hosaka
[2] Subcellular