بسم الله الرحمن الرحيم

مدیریت تحصیلات تکمیلی پردیس خودگردان دانشگاه
دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی- ژنتیک

تاثیر عصاره ریشه گیاه جغجغه(*prosopis farcta*)بر بیان ژن فسفوفروکتوکیناز-۱در موش های صحرایی دیابتی (نوع۱)

اساتید راهنما:
دکتر حمیدرضا میری
دکتر صدیقه اسمعیل زاده بهابادی

اساتید مشاور:
دکتر شهلا نجفی
مهندس فاطمه دهمرده قلعه نو

تهیه و تدوین:
ریحانه محبی

مهر ۹۳

تقدیم به:

همسر عزیزم: که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، او که با صبرش در تمامی لحظات رفیق راه بود و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود. همدلی که با واژه ی نجیب و مغرور تلاش؛ آشنایی دارد و تلاش را تین را می شناسد و عطر رویایی آن را استشمام می کند و مرا در راه رسیدن به اهداف عالی یاری می رساند.

پدر زحمتکش و پر تلاشم که هر چه از او بگویم باز هم کم می آورم خورشیدی که از روشنایی اش جان گرفتم و در ناامیدی ها، چراغ راهم شده و لبریزم کرد از شوق، پدر مهربانم اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد به خودم تبریک می گویم که تو را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد.

مادر صبور و فداکارم: دریای بی کران عشق و فداکاری که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر. او که رنگ شادی هایم شد، غصه ها را با تمام وجود از من دور کرد و عمری خستگی ها را به جان خرید تا اکنون توانست طعم خوش پیروزی را به من بچشاند.

فرزندان عزیزم که با صبر و تحمل کاستی ها راه را بر من هموار نمودند.

و خانواده همسرم که پشتیبان و مشوق من در تمام مراحل بودند.

ریحانه محبی- مهرماه ۹۳

سپاس خداوندی را که سخنوران از ستودن او عاجز، حسابگران از شمارش نعمت‌های او ناتوان و تلاشگران از ادای حق او درمانده‌اند. خدایی که افکار ژرف‌اندیش ذات او را درک نمی‌کنند و دست غواصان دریای علوم به او نخواهد رسید.

از فرمایشات مولای متقیان حضرت علی (ع)

از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می‌کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده‌اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه:

از استاد ارجمندم:

جناب آقای دکتر حمیدرضا میری که در کمال سعه صدر با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننموده و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند کمال تشکر را دارم.

و صمیمانه‌ترین سپاس‌های خود را به محضر استاد راهنمای دوم سرکار خانم اسماعیل زاده بهابادی که مسئولیت راهنمایی اینجانب را بعهده داشته و در مراحل انجام کارهای پایان نامه از هیچ مساعدتی دریغ نفرموده‌اند، تقدیم می‌دارم.

از خانم دکتر شهلا نجفی و خانم مهندس فاطمه دهمرده قلعه نوکه مشاوره این پایان نامه را بعهده داشتند کمال تشکر را دارم.

سپاس فراوان از خانم دکتر فاطمه حدادی که علی رغم مشغله فراوان داوریم را قبول زحمت فرمودند.

در انتها از تمام دوستان و عزیزانی که مرا در انجام این مهم همراهی کردند، تشکر می‌کنم.

چکیده

دیابت شیرین از جمله بیماریهای متابولیکی است که با کمبود نسبی و یا مطلق انسولین، افزایش گلوکز خون و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین همراه است و به تدریج عملکرد سایر سیستم‌های بدن را مختل می کند. شواهد زیادی حاکی از این است که بسیاری از گیاهان با خاصیت دارویی خود می توانند برای درمان و کنترل دیابت و پیشگیری از عوارض بعدی مفید باشند از جمله گیاهان دارویی می توان به گیاه جغجغه اشاره کرد. گیاه جغجغه (*prosopis farcta*) گیاهی با خواص ضد التهاب و ضد دیابتی است. در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه جغجغه بر میزان گلوکز خون و بیان ژن فسفو فروکتو کیناز-۱ در موش های دیابتی انجام شد. بدین منظور تعداد ۴۵ سر موش صحرایی نر با وزن۳۰۰-۱۵۰ گرم به طور تصادفی در سه گروه ۱۵ تایی (شاهد سالم، شاهد دیابتی و دیابتی تحت تیمار) تقسیم بندی شدند. القاء دیابت در موش های صحرایی با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۶۰mg/kg صورت پذیرفت. گروه دیابتی تحت تیمار مقدار ۳۰۰mg/kg وزن بدن عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه جغجغه به مدت ۳۰ روز از طریق گاواژ دریافت نمودند. در ادامه در سه مرحله (روز صفر قبل از شروع گاواژ، روز ۱۵ و ۳۰ پس از تجویز عصاره) میزان گلوکز خون اندازه گیری شد. سپس با استفاده از روش Real - time PCR میزان بیان ژن فسفو فروکتو کیناز۱ درکبد بررسی گردید. نتایج حاصل از آزمون های آماری توسط نرم افزار SPSS نشان داد که میزان گلوکز خون در گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره ریشه گیاه جغجغه نسبت به گروه شاهد دیابتی کاهش یافته است. اما میزان بیان ژن فسفو فروکتوکیناز۱ در گروه دیابتی تحت تیمار در سطح معنی داری مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: دیابت، جغجغه (*Prosopis farcta*)، موش صحرایی، فسفوفروکتوکیناز-۱، Real-time PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- کلیات تحقیق ۵
۱-۲-۱- دیابت ۵
۱-۲-۲- طبقه بندی دیابت ۶
۱-۲-۳- ملاحظات ژنتیکی دیابت نوع ۲ ..... ۶
۱-۲-۴- دیابت شیرین نوع ۱ ..... ۷
۱-۲-۵ ملاحظات ژنتیکی دیابت نوع ۱ ..... ۸
۱-۲-۶- عوارض دیابتی ۱۰
۱-۲-۷- دیابتی کردن تجربی ۱۱
۱-۲-۸- Streptozotocin ۱۱
۱-۲-۹- مکانیسم دیابت زائی STZ ۱۲
۱-۲-۱۰- تاریخچه شناسایی انسولین ۱۳
۱-۲-۱۱- انسولینInsulin ۱۴
۱-۲-۱۲- ساختمان و ساخت انسولین ۱۶
۱-۲-۱۵- سیستم تنظیم ترشح انسولین ۱۸
۱-۲-۱۷- اثرات متابولیسمی انسولین ۱۹
۱-۲-۱۸- مکانیسم سلولی تاثیر انسولین بر افزایش ورود گلوکز به داخل سلولها ۱۹
۱-۲-۱۹- انسولین از سه طریق بر روی مصرف گلوکز اثر می گذارد ۱۹
۱-۲-۲۰- اثر انسولین بر متابولیسم کربوهیدرات ۲۰
۱-۲-۲۱- اثر انسولین بر متابولیسم چربی ۲۱
۱-۲-۲۲- اثر انسولین بر متابولیسم پروتئین و رشد ۲۲
۱-۳- گیاهان موثر بر دیابت قندی ۲۳
۱-۳-۱- گیاه جغجغه یا *Prosopis Farcta* ۲۳
۱-۴- ژن فسفوفروکتوکیناز-۱(PFK_1) ۲۵
۱-۴-۱- فسفوریلاسیون فروکتوز ۶- فسفات به فروکتوز ۱و۶- بیس فسفات ۲۵
۱-۴-۲-تنظیم متقابل فسفو فروکتوکیناز-۱ و فروکتوز۱،۶-بیس فسفاتاز ۲۶
۱-۵ آشنایی باتکنیک Real time- PCR ۲۸
۱-۵-۱ آشکارسازی محصولات بدست آمده Real time PCR ۲۸
۱-۵-۲- روش های کمی سازی نمونه هاتوسط Real time PCR ۲۹

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۵-۱ مزایا و کاربردهای تکنیکReal time pcr ۳۰

فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام گرفته

۱-۲- مطالعات انجام گرفته بر روی تاثیر گیاهان دارویی بر دیابت ۳۲

۱-۲- بررسی بیان ژن ۳۴

فصل سوم: مواد و روشها

۱-۳ مواد و روشها ۳۸

۱-۱-۳ تهیه عصاره هیدرو الکلی ریشه گیاه جغجغه ۳۹

۲ -۱-۳ حیوانات آزمایشگاهی ۴۱

۱-۲-۱-۳ نحوه گروه بندی ۴۱

۳-۱-۳ روش القای دیابت تجربی ۴۱

۴-۱-۳ اندازه گیری قند و وزن موش ها ۴۲

۵-۱-۳ مراحل انجام تشریح ۴۲

۲-۳- بررسی بیان ژن ۴۴

۱-۲-۳- طراحی پرایمرها ۴۴

۲-۳- توالی ژن *pfk1* ۴۶

۱-۳-۳ آماده سازی پرایمر ۵۰

۳-۳-۳ استخراج RNA از نمونه های بافت کبد توسط کیت ۵۰

۱-۳-۳-۳ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده ۵۲

۲-۳-۳-۳ طرز تهیه EDTA یک میلی مولار جهت شست و شوی کووت ۵۳

۴-۳-۳ سنتز cDNA توسط کیتThermo SCIENTIFIC ۵۴

۵-۳-۳ واکنش های PCR ۵۶

۱-۵-۳-۳ PCR شیب دمایی ۵۶

۲-۵-۳-۳ PCR معمولی ۵۸

۶-۳-۳ الکترفورز ۵۹

۱-۶-۳-۳ لودینگ بافر ۵۹

۲-۶-۳-۳ شناساگرهای اندازهDNA ۶۰

۳-۶-۳- ۳ روش کار با ژل الکترفورز ۶۰

۷-۳-۳ واکنشReal-Time PCR ۶۱

۹ -۳-۳ تعیین توالی محصولاتPCR (Direct sequencing) ۶۳

۱۰-۳-۳ آنالیزبیان ژن ۶۴

۴- ۳تجزیه وتحلیل داده ها ۶۴

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- جمع آوری نمونه ۶۶
۴-۲ بررسی نتایج وزن موشهای مورد مطالعه ۶۶
۴-۲-۱- بررسی نتایج گلوکز ناشتای سرم موشهای مورد مطالعه ۶۷
۴-۲-۲- نتایج استخراج RNA توسط ژل الکتروفورز ۶۸
۴-۲-۱-۲-نتایج تعیین غلظت و کیفیت RNA توسط اسپکتروفتومتری ۶۹
۴-۲-۳- نتایج حاصل ازساخت cDNA بر روی ژل آگارز ۷۰
۴-۲-۴- نتایج مربوط به PCR شیب دمایی ۷۱
۴-۲-۵- نتایج منحنی استاندارد ۷۲
۴-۲-۵-۱- منحنی استاندارد ژن *TBP* ۷۲
۴-۲-۵-۲- منحنی استاندارد ژن *PFK1* ۷۳
۴-۲-۶- نتایج واکنش Real Time PCR ۷۳
۴-۲-۶-۱- تکثیر ژن *TBP* و *PFK1* ۷۴
۴-۲-۷- نتایج آنالیز منحنی ذوب ۷۴
۴-۲-۷-۱- آنالیز منحنی ذوب ژن *TBP* و *PFK1* ۷۵
۴-۲-۷-۲- منحنی تغییرات ذوب بر حسب دمای ژن *TBP* و *PFK1* ۷۵
۴-۲-۸- نتایج بررسی بیان ژن *PFK1* ۷۶
۴-۳- نتایج آماری بدست آمده ۷۷
۴-۴- بحث ۷۸
منابع ۸۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

۳-۱ تجهیزات و دستگاه ها..... ۳۹
۳-۳ پرایمرهای طراحی شده..... ۴۵
۳-۴ مواد مورد نیاز برای تهیه بافر TRIS-HCL..... ۵۴
۳-۵ محلول اولیه سنتز CDNA..... ۵۵
۳-۶ محلول دوم برای سنتز CDNA ۵۵
۳-۷ موادلازم برای PCR ۵۷
۳-۸ برنامه PCR شیب دمایی برای تکثیر قطعه حاصل از TBP ۵۷
۳-۹ برنامه PCR شیب دمایی برای تکثیر قطعه حاصل ازPFK1..... ۵۷
۳-۱۰ مواد و میزان مورد نیاز برای یک واکنش در REAL-TIME PCR ۶۲
۳-۱۱ مراحل، دما و زمان مربوطه در یک واکنش REAL- TIME PCR برای ژن *TBP* ۶۳
۳-۱۲ مراحل، دما و زمان مربوطه دریک واکنش REAL- TIME PCR برای ژن PFK_1 ..... ۶۳
۴-۱- نتایج آماری حاصل از آزمون F..... ۷۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

۱-۱- ساختمان پروانسولین انسان. نواحی پر رنگ مولکول انسولین آزاد شده پپتید ارتباطی است.۱۶
۲-۱- گیاه جغجغه ۲۵
۳-۱ مدل شماتیک از تترامر بودن PFK1 ..... ۲۷
۱-۳- نحوه گاواژ دادن عصاره ۴۰
۲-۳ اندازه گیری قند و وزن موش ها ۴۲
۳-۳- تشریح موش ها ۴۳
۳-۳- دستگاه اسپکتروفتومتری(ScanDrop – analytic jena) ۵۳
۴-۳ دستگاه PCR (Eppendorf –mastercyc gradient) ۵۸
۵-۳ دستگاه الکتروفورز وعکس ژل ۶۱
۶-۳ دستگاه Real-Time PCR ۶۲
۱-۴- نمودار وزن موش های مورد مطالعه ۶۷
۲-۴- بررسی گلوکز ناشتای موشهای صحرایی ۶۸
۳-۴- نتایج استخراج RNA کل ۶۹
۴-۴- تکثیر قطعه (۱۹۰bp)مربوط به ژن *PFK1*. ۷۰
۵-۴- تکثیر قطعه (۱۲۶bp) مربوط به ژن *TBP* ۷۰
۶-۴- نتایج شیب دمایی PCR برای ژن *PFK*1 ..... ۷۱
۷-۴- نتایج شیب دمایی PCR برای ژن *TBP* ۷۱
۸-۴- منحنی استاندارد ژن *TBP* ۷۲
۹-۴- منحنی استاندارد ژن *PFK1* ۷۳
۱۰-۴- منحنی تکثیر ژن *PFK1* (آبی) و *TB* (قرمز) در این منحنی شماره سیکل در محور افقی و شدت نور فلورسانت ساطع شده از دستگاه در محور عمودی قرار میگیرد. ۷۴
۱۱-۴- منحنی ذوب ژن*PFK1* (آبی) و *TB* (قرمز) ۷۵
۱۲-۴- رنگ قرمز نشان دهنده ی ژنTBP و رنگ آبی نشانگر ژن*PFK1* ۷۶
۱۳-۴- تغییرات بیان ژن*PFK* 1 ..... ۷۷

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه:

دیابت شیرین (DM)[1] شامل گروهی از اختلالات متابولیک شایع است که وجه مشترک آنها در هیپرگلیسمی می باشد. چند نوع مشخص و مجزای دیابت شیرین وجود دارند که در اثر واکنش های پیچیده ای که بین عوامل ژنتیکی و فاکتورهای محیطی رخ می دهد بوجود می آیند (هاریسون، ۲۰۱۲)[2]. این بیماری با کاهش مطلق یا نسبی ترشح و یا کاهش اثر انسولین، افزایش قند خون و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، لیپید و پروتئین همراه است (Ness and Powles, 1997). هایپرگلیسمی منجر به تغییرات پاتولوژیکی بسیاری مانند نروپاتی، نفروپاتی، رتینوپاتی، اختلال معده ای-روده ای، نقص سیستم ایمنی، آسیبهای عروقی و اختلال در ترمیم بافت می شود (Morrison *et al.*, 1995). میزان شیوع جهانی دیابت شیرین طی دو دهه گذشته به نحو چشمگیری افزایش یافته است و از حدود ۳۰ میلیون مورد در سال ۱۹۸۵، به ۲۸۵ میلیون مورد در سال ۲۰۱۰ رسیده است. بر اساس پیش بینی فدراسیون بین المللی دیابت تا سال ۲۰۳۰ بیش از ۴۳۸ میلیون نفر به دیابت مبتلا خواهند شد (هاریسون، ۲۰۱۲). در ایران شیوع دیابت صرفنظر از نوع آن حدود ۶-۵٪ می باشد. در حال حاضر ۴ میلیون نفر در ایران دارای دیابت آشکار بوده و یا مستعد ابتلا به آن می باشند (Azizi *et al.*, 2000). دیابت قندی یکی از شایع ترین و پیچیده ترین مشکلات جوامع امروزی است که مشکلات اقتصادی-اجتماعی فراوانی ایجاد نموده است. دیابت نوع ۱ ناشی از نقص ترشح انسولین است در حالی که پاتوژنز دیابت نوع۲ با سیر پیش رونده مقاومت به انسولین در کبد و بافتهای محیطی، کاهش توده سلولهای بتا و نقص ترشح انسولین همراه می باشد (Srinivasan and Ramarao, 2007). افزایش دراز مدت (یا مزمن) گلوکز در بیماری دیابت، علت اصلی اختلالات ثانویه میکروآنژیوپاتی و ماکروآنژیوپاتی، ضعف سیستم دفاع

[1] Diyabet minutes
[2] Harrisons, 2012

آنتی اکسیدانی، ایجاد فشار اسمزی و همچنین اختلال متابولیسم لیپیدها می باشد. اختلالات فوق منجر به بروز عوارض کوتاه مدت و دراز مدت می شوند. عوارض مذکور سبب آسیب به عملکرد فیزیکی و فیزیولوژیکی ارگان های مختلف بدن شده و سلامتی انسان را تهدید می کند. از جمله مکانیزم های پاتولوژیک دخیل در بروز عوارض متعدد ناشی از ازدیاد قند خون، گلیکه شدن پروتئین های بدن می باشد. فرایند گلیکه شدن پروتئین ها، عامل القاء تغییر شکل فضایی پروتئین های متصل شده به گلوکز بوده و موجب تغییر ساختار و در نتیجه اختلال در عملکرد آنها می شود (Bathaie *et al.*, 2001; Jafanejad *et al.*, 2008). این فرایند، موجب تشکیل تجمعات پروتئینی ویژه (بتا-آمیلوئیدی) در سلولهای جزایر پانکراس شده، از این رو بیماری دیابت نوع۲ جزء گروه بیماری های ساختاری دسته بندی شده است. گلیکه شدن پروتئین ها اعم از پروتئین های ساختمانی، پروتئین های تنظیمی و پروتئین های در گردش خون، نتیجه اصلی بیوشیمیایی هیپرگلیسمی مزمن ناشی از بیماری دیابت قندی می باشد (Hayden *et al.*, 2005). به طور سنتی، در طول تاریخ از گیاهان متفاوتی برای کاهش قند خون و بهبود اثرات دیابت، استفاده شده و در طب سنتی ایران و سایر کشورهای جهان، اطلاعات کما بیش مفصلی در این رابطه به چشم می خورد. داروهای گیاهی به خاطر کم بودن اثرات جانبی، در دسترس بودن، هزینه نسبتا کم و مؤثر بودنشان، به طور وسیع در سر تا سر جهان تجویز شده و می شوند (Venkatesh *et al.*, 2003). چندین نوع داروهای کاهش دهنده گلوکز وجود دارد که از طریق مکانیزم های مختلف، اثرات ضد دیابتی خود را اعمال می کنند. از جمله این مکانیسم ها می توان به تحریک ترشح انسولین توسط داروهای خانواده سولفونیل اوره و مگلیتینیدها (*Meglitinides*)، افزایش جذب محیطی گلوکز توسط بای گوانیدها (*Biguanides*) و تیازولیدین دیون ها (*Thiazolidinediones*)، به تأخیر انداختن جذب کربوهیدراتها از روده توسط مهارکننده های آلفا-گلوکوزیداز، کاهش گلوکونئوژنز کبدی توسط بای گوانید ها و تیازولیدین دیون ها

(Modi, 2007)، افزایش غلظت سرمی GLP-1[1] و کاهش خالی شدن معده توسط آنالوگ های پپتیدی جدید مانند اگزناتیدها (*Exenatide*) و لیرا گلوتیدها (*Liraglutide*) و مهارکننده های DPP-4[2] (Hui *et al.*, 2005) اشاره کرد. این درمان ها دارای معایبی نظیر توسعه مقاومت دارویی، اثرات جانبی و حتی سمی بودن تا کمبود پاسخ دهی می باشند. به عنوان مثال سولفونیل اوره ها به مدت ۶ سال کارایی خود را در ۴۴ درصد از بیماران از دست می دهند. ۲/۳ از داروهای تجویز شده برای کودکان مؤثر نیستند (Michael *et al.*, 2005; Defronzo, 1999). به علاوه هیچ کدام از این داروهای کاهش دهنده گلوکز به طور مؤثر افزایش لیپیدهای خون را کنترل نمی کنند (Derek, 2001). با شیوع در حال افزایش دیابت در جمعیت روستایی و به علت اثرات نامساعد داروهای صناعی، یک نیاز آشکار برای توسعه منابع گیاهی طبیعی، داروهای ضد دیابت وجود دارد (Venkatesh *et al.*, 2003). همچنین اثرات جانبی داروها و تداخلات آنها با یکدیگر که در بدن انسان یا در هنگام آزمایش های مختلف آشکار می شود (Bathaie *et al.*, 2001)، نیز مسئله مهمی است که باید مد نظر باشد. تاکنون بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاهی در ۷۲۵ جنس و ۱۸۳ خانواده شناخته شده اند که دارای فعالیت ضد دیابتی هستند که بیش از نیمی از آنها به طور مرسوم به عنوان ضد دیابت مصرف شده اند و در حدود ۵۰ درصد نیز به طریق آزمایشگاهی مطالعه شده اند (Marles and Farnsworth., 1996). گیاه جغجغه (*Prosopis Farcta*) یکی از گیاهانی است که در ایران جهت التیام زخم در میان عوام به خصوص در منطقه سیستان وبلوچستان کاربرد داروئی و خاصیت ضد دیابتی دارد (Saad, 2005; Kramer, 1954).

این تحقیق به منظور بررسی اثر عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه جغجغه بر میزان گلوکز خون موش های دیابتی نوع۱ صورت گرفت و تاکنون تاثیر گیاه جغجغه به عنوان گیاهی بومی بر بیان این ژن

[1] Dipeptidyl Peptidas-1
[2] Dipeptidyl Peptidas-4

مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا بررسی تاثیر آن بر بیان ژن فسفوفروکتوکیناز۱ و بیماری دیابت ضروری به نظر می رسد.

فرضیاتی که در این تحقیق مورد بررسی قرار میگیرند عبارتند از:

- عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه جغجغه، بیان ژن فسفوفروکتوکیناز-۱ را در موش‌های دیابتی نوع۱ افزایش می دهد.

- عصاره هیدرو الکلی ریشه گیاه جغجغه گلوکز خون موش‌های دیابتی را کاهش می دهد.

۲-۱- کلیات تحقیق

۱-۲-۱- دیابت

دیابت بیماری مزمنی است که جنبه های مختلف زندگی فردی و اجتماعی بیماران را تحت تأثیر خود قرار می دهد. تحقیقات سازمان جهانی سلامت (WHO) نشان می دهد که تعداد افراد دیابتی بالغ از ۱۳۵میلیون نفر در سال ۱۹۹۵ به ۳۰۰ میلیون نفر در سال ۲۰۲۵ میلادی افزایش خواهد یافت که سهم کشورهای در حال توسعه و از جمله ایران در این افزایش شیوع، بیشتر از کشورهای توسعه یافته خواهد بود (امینی و همکاران، ۱۳۸۰). دیابت شیرین یا دیابت ملیتوس، یک اختلال اندوکرینی است و یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته محسوب می شود و با تغییر کربوهیدرات ها، چربی ها و پروتئین ها (Ravi *et al*., 2006)، افزایش قند خون و پیدایش قند در ادرار (Scoppola *et al*., 2001) و افزایش میزان چربی پلاسما و لیپو پروتئین و رسوب آنها در جدار عروق و ایجاد آتروسکلـروز همراه است (Ravi *et al*., 2006). دیابت در صورت عدم درمان، منجر به عوارض شدیدی شامل آتروسکلـروز، بیماری شبـکیه چشم، نارسایی کلیه، آسیب اعصاب و همچنین زخم شدن و گانـگرن دست و پا می گردد. عوارض بیماری، عامل اصلی بیماری ها و مرگ و میـر نـاشی از دیـابـت است (Shane and Whorter, 2005; Zareba *et al*., 2005). در بیـماری دیابـت، به دلیل اختـلال در عمـلکرد انسـولین توانـایی متابولیـسم گلـوکز کاهـش

می یابد و موجب اختلالات بالینی متعددی در بیماران می شود. افزایش میزان استرس اکسیداتیو و تشکیل رادیکالهای آزاد در بافت های افراد دیابتی همراه با کاهش میزان گلوتاتیون خون و بافت ها از جمله این اختلالات است. تصور می شود که افزایش استرس اکسیداتیو، گلوتاتیون بافتی را تخلیه می کند و چون گلوتاتیون فاکتور اصلی خنثی کردن رادیکالهای آزاد است، تخلیه آن منجر به افزایش رادیکالهای آزاد می گردد (Curcio *et al*., 1995; Dominguz *et al*., 1998; Donnini *et al*., 1996).

۲-۲-۱- طبقه بندی دیابت

دیابت به دو دسته‌ی اصلی وابسته به انسولین (دیابت نوع ۱) و دیابت غیر وابسته به انسولین (دیابت نوع ۲) تقسیم می شود. همچنین گونه دیگر با نام دیابت بارداری (Gestational) که در دوران بارداری بروز کرده و پس از آن بهبود می یابد. دیابت نوع ۱ ناشی از نقص ترشح انسولین است در حالی که پاتوژنز دیابت نوع ۲ با سیر پیش‌رونده مقاومت به انسولین در کبد و بافت‌های محیطی، کاهش توده سلول‌های β و نقص ترشح انسولین همراه می‌باشد (Srinivasan and Ramaro, 2007).

۳-۲-۱- ملاحظات ژنتیکی دیابت نوع ۲

عوامل ژنتیکی نقش مهمی در بروز دیابت نوع ۲ دارند. میزان هماهنگی دیابت شیرین نوع۲ در دوقلوهای یکسان بین۷۰ تا ۹۰٪ است. افرادی که یکی از والدین آنها به دیابت شیرین نوع ۲ مبتلا است در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به دیابت قرار دارند؛ و اگر والدین هر دو به دیابت شیرین نوع۲ مبتلا باشند، خطر بروز این بیماری در فرزندان آنها به ۴۰٪ می رسد. مقاومت به انسولین، که به صورت کاهش مصرف گلوکز در عضلات اسکلتی نمایان می شود، در بسیاری از خویشاوندان درجه اول غیر دیابتی افراد مبتلا به دیابت شیرین نوع ۲ وجود دارد. این بیماری، چند ژنی و چند عاملی است، چون علاوه بر استعداد ژنتیکی، عوامل محیطی (نظیر چاقی، تغذیه و فعالیت فیزیکی)

نیز بر فنوتیپ این بیماری مؤثرند. ژنهایی که استعداد ابتلا به دیابت شیرین نوع ۲ را افزایش می دهند بطور کامل شناخته نشده اند، ولی مطالعات جدید در مورد روابط در کل ژنوم، چند ژن را شناسایی کرده است که حامل خطر نسبتا اندکی برای ابتلا به دیابت شیرین نوع۲ هستند (بیشتر از ۲۰ ژن، هر یک با خطر نسبی۱/۰۶ تا ۱/۵). بارزترین آنها، گونه ای از ژن ۲ شبیه به فاکتور ۷ نسخه برداری است که در تعدادی از جمعیت ها، ارتباط آن با دیابت نوع ۲ مشخص شده است، و در یکی از جمعیتهایی که با خطر بالای ابتلا به دیابت مواجه بودند، ارتباط آن با اختلال تحمل گلوکز مشخص شد (هاریسون، ۲۰۱۲).

۴-۲-۱- دیابت شیرین نوع ۱

دیابت شیرین نوع ۱در نتیجه تعامل میان عوامل ژنتیکی، محیطی و ایمنولوژیکی بوجود می آید که در نهایت سبب تخریب سلولهای بتای پانکراس و کمبود انسولین می شوند (Donath *et al.*, 2003). دیابت شیرین نوع۱ در نتیجه تخریب خود ایمنی سلولهای بتا رخ می دهد، و در اکثر (ولی نه در همه) مبتلایان شواهد خود ایمنی بر ضد سلولهای جزیره ای مشاهده می شود. برخی از افرادی که فنوتیپ بالینی دیابت شیرین نوع۱ را دارند، فاقد نشانگرهای ایمونولوژیک حاکی از فرایند خود ایمنی بر ضد سلولهای بتا و شاخص های ژنتیکی دیابت نوع ۱ هستند. در افرادی که استعداد ژنتیکی برای ابتلا به این بیماری دارند، حجم سلولهای بتا در بدو تولد طبیعی است؛ ولی به دلیل تخریب خود ایمنی که ماهها تا سالها رخ می دهد، این سلولها به تدریج از بین می روند. تصور می شود که این روند خود ایمنی به وسیله یک عامل تحریکی عفونی یا محیطی شروع شده و به واسطه یک مولکول اختصاصی سلول بتا تداوم پیدا می کند (هاریسون ۲۰۱۲). در اکثر افراد، نشانگرهای ایمونولوژیک پس از تحریک شروع کننده و قبل از اینکه دیابت از نظر بالینی آشکار شود ظاهر می گردند. سپس حجم سلولهای بتا به تدریج کاهش یافته و ترشح انسولین به شکل پیش رونده ای مختل می شود، ولی تحمل طبیعی گلوکز حفظ می شود. سرعت کاهش حجم

سلولهای بتا در میان افراد مختلف تفاوتهای زیادی نشان می دهد، به شکلی که بعضی از بیماران به سرعت به طرف دیابت بالینی پیش می روند و سایرین بسیار آهسته به این سمت سیر می کنند. تا زمانی که قسمت اعظم سلولهای بتا تخریب نشده باشند (۷۰ تا ۸۰٪) ویژگیهای دیابت آشکار نمی شوند. در این مرحله هنوز بقایای سلولهای بتا دارای عملکرد وجود دارند ولی تعداد آنها برای حفظ تحمل گلوکز کافی نیست. وقایعی که سبب تبدیل حالت عدم تحمل گلوکز به دیابت آشکار می شوند غالبا با افزایش نیاز به انسولین همراه هستند، چنانچه این حالت در زمان بلوغ یا هنگام بروز عفونتها رخ می دهد (Sima *et al.*, 2000). به دنبال اولین تظاهر بالینی دیابت شیرین نوع ۱، ممکن است یک دوره "ماه عسل" وجود داشته باشد که در طی آن می توان با حداقل دوز انسولین، و یا بندرت بدون نیاز به انسولین، قند خون را کنترل نمود. با این حال این دوره زود گذر تولید انسولین داخلی به وسیله بقایای سلولهای بتا به سرعت سپری می شود، چون روند خود ایمنی بقیه سلولهای بتا را نیز تخریب کرده و فرد کاملا دچار کمبود انسولین می شود. برخی بیماران مبتلا به دیابت نوع۱ دراز مدت، مقدار کمی انسولین تولید می کنند (با تولید پپتید C مشخص می شود) و در نمونه لوزالمعده اتوپسی برخی افراد نیز سلولهای انسولین مثبت یافت می شود (هاریسون، ۲۰۱۲).

۵-۲-۱ ملاحظات ژنتیکی دیابت نوع ۱

ژنهای متعددی در ایجاد زمینه ژنتیکی ابتلا به دیابت شیرین نوع۱ نقش دارند. میزان هماهنگی دیابت شیرین نوع۱ در دوقلوهای یکسان بین ۴۰ تا ۶۰ درصد متغییر است؛ عوامل تعیین کننده دیگری نیز در ابتلا به دیابت نقش دارند (King H, 1998). عمده ترین le تعیین کننده استعداد ابتلا به دیابت شیرین نوع۱، در ناحیه HLA[1] کروموزوم ۶ واقع شده است. گوناگونی کمپلکس HLA، مسئول ۴۰ تا ۵۰٪ خطر ژنتیکی ابتلا به دیابت شیرین نوع۱ است. این ناحیه حاوی ژنهایی

[1]Human leukocyte antigen

است که مولکولهای MHC[1] کلاس II را کدگذاری می کنند؛ مولکولهای مذکور آنتی ژنها را به سلولهای T کمک معرفی کرده و به این ترتیب در شروع پاسخ ایمنی نقش دارند. توانایی مولکولهای MHC کلاس II برای معرفی آنتی ژنها، به ترکیب اسید های آمینه مکانهای متصل شونده به آنتی ژن در آنها بستگی دارد. جایگزینی اسیدهای آمینه می تواند بر خصوصیات پاسخ ایمنی مؤثر باشد؛ این مسأله با تغییر میزان تمایل آنتی ژنهای مختلف به مولکولهای کلاسII انجام می شود. در اکثر افراد مبتلا به دیابت شیرین نوع۱، هاپلوتیپ HLADR3 و/ یا DR4 وجود دارد. بررسی ژنوتیپی پیشرفته لوکوس های HLA نشان داده است که هاپلوتیپهای DQA1*0301، DQB1*0302 DQB1*0201 قوی ترین همراهی را با دیابت شیرین نوع۱ دارند. این هاپلوتیپ ها در ۴۰٪ کودکان مبتلا به دیابت شیرین نوع۱ دیده می شوند، در حالی که شیوع آنها در میان جمعیت عادی ایالات متحده ۲٪ است. با این وجود، اکثر افرادی که هاپلوتیپ های مستعد کننده ابتلا به دیابت را دارند، به این بیماری دچار نمی شوند. علاوه بر همراهی با مولکول های MHC کلاس II، حداقل ۲۰ لوکوس ژنتیکی دیگر نیز در استعداد ابتلا به دیابت شیرین نوع۱ نقش دارند، شامل گوناگونی توالی ناحیه پروموتور ژن انسولین، ژنCTLA4، گیرنده اینترلوکین۲، CTLA4 و PTPN22. ژنهایی نیز وجود دارند که سبب ایجاد حفاظت در مقابل بروز این بیماری می شوند. هاپلوتیپ DQB1*0602، DQA1*0102 در میان افراد مبتلا به دیابت شیرین نوع۱ بسیار به ندرت دیده می شود (کمتر از ۱٪ موارد) و به نظر می رسد که سبب محافظت در برابر ابتلا به دیابت شیرین نوع۱ می گردد. اگر چه خطر بروز دیابت شیرین نوع۱ در بستگان افراد مبتلا به این بیماری ۱۰ برابر افزایش پیدا می کند، ولی این خطر به طور نسبی کم است: اگر یکی از والدین به دیابت نوع۱مبتلا باشد، این خطر ۴-۳٪ و اگر یکی از خواهر و برادرها مبتلا باشد، این خطر ۱۵-

[1] Major Histocompatibility Complex

۵٪ خواهد بود به همین دلیل، اکثر افراد مبتلا به دیابت شیرین نوع۱، هیچ خویشاوند درجه اولی که مبتلا به این اختلال باشد ندارند (هاریسون، ۲۰۱۲).

۶-۲-۱- عوارض دیابتی

یکی از خصوصیات ویژه دیابت های مزمن، پراکسیداسیون لیپیدها می باشد. افزایش ایجاد رادیکالهای آزادی که احتمالا با اسیدهای چرب اشباع نشده مرکب واکنش نشان می دهند، منجر به پراکسیداسیون می شود. پراکسیداسیون لیپیدها در جای خود باعث افزایش تولید رادیکالهای آزاد می شود (Levy *et al*., 1999). در پیشرفت دیابت نوع۱ و۲ آسیب حاصل از لیپید پراکسید، مشاهده می شود. ترشح انسولین نیز به طور نزدیکی با پراکسیدهای مشتق شده از لیپوکسی ژناز در ارتباط می باشد (Walsh and Pek, 1984). سطوح پایین پراکسیدهای لیپوکسی ژنازی ترشح انسولین را تحریک می کند. اما زمانی که غلظت پراکسیدهای آندوژن افزایش می یابد پراکسیداسیون کنترل نشده لیپید آغاز شده و منجر به نفوذ سلولی و آسیب سلول های جزایر در دیابت نوع۱ می باشد (Metz, 1984). سیستم های دفاعی مشترک که بدن را در برابر آسیب حاصل از رادیکال آزاد حفظ می نماید شامل عناصر غذایی با خاصیت آنتی اکسیدانی و آنزیم ها می باشند. افزایش اکسیدان ها در افراد دیابتی با کاهش در ظرفیت آنتی اکسیدانی همراه است. و این مسئله می تواند اثرات مخرب رادیکال های آزاد را افزایش دهد (LU, 1999). مطالعات کلینیکی وتجربی فراوانی نشان داده اند که مشکلات ایجاد شده در بیماران دیابتی ناشی از یک فرایند اکسیداتیو می باشد که با واسطه رادیکالهای آزاد انجام می شود و تغییراتی از افزایش قند، افزایش چربی، افزایش اوره، کاهش گلوتاتیون و کاهش ذخیره گلیکوژن کبدی در موش های دیابتی دیده شده است (Damasceno and Volpato, 2002).