٩٨٤٢٩

دانشگاه شهید بهشتی
دانشکده زیست شناسی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی (فیزیولوژی جانوری)

عنوان:

# تعیین اثر گرلین بر غلظت پلاسمایی هورمون های تیروئیدی از طریق Substance-P در موش‌های صحرایی

دانشجو:
فریبا محمودی

استاد راهنما:
دکتر همایون خزعلی

استاد مشاور:
مهندس خسرو ملا جعفری

۱۳۸۶

۱۳۸۶/۱۲/۲۵

۹۸۳۲۹

تقدیم به
پدر ارجمند و مادر عزیزم

عبور باید کرد .....

هم نورد افق های دور باید شد.

و گاه در رگ یک حرف خیمه باید زد.

با سپاس از الطاف یگانه معبود هستی و ضمن تشکر و قدردانی از زحمات پدر و مادر عزیزم، جا دارد از زحمات و راهنمایی های استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر خزعلی، استاد مشاور ارجمندم جناب آقای مهندس ملا جعفری، و همچنین، از همکاری صمیمانه دوستان عزیزم خانم کلثوم قربان تبار، مژده منصوری، معصومه زمانی، زهرا رضائی اصل، مریم بهزادفر، خانم رقیه چشمه نوشی و سایر عزیزانی که مرا در انجام این پروژه یاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

## چکیده:

اثر مهاری گرلین بر فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- تیروئید به طور کامل مشخص شده است. از آنجا که نورون های Substance P (SP) و نورون های گرلین هر دو علاوه بر نواحی مختلف بدن، در هسته ARC و PVN هیپوتالاموس نیز واقع شده اند و مشخص شده است که آنالوگ S-P به نام [D-Arg-1, D-phe-5, D-Trp-7,9, Leu-11]SP به عنوان Inverse agonist و یا مهارکننده گیرنده GHSR-Ia گرلین عمل کرده و سبب کاهش تخلیه معده، کاهش اشتها و وزن بدن القا شده توسط گرلین می شود. بنابراین، احتمال دارد آنالوگ S-P همانند مسیر اشتها، با عمل گرلین در مسیر تیروئیدی نیز برهم کنش داشته باشند.

هدف از این تحقیق بررسی اثر بر هم کنش گرلین وآنالوگ S-P بر روی میانگین غلظت هورمون های تیروئیدی در Rat های نر می‌باشد تا مشخص شود آیا آنالوگ S-P در مسیر تیروئیدی نیز همانند مسیر اشتها قادر است به عنوان مهارکننده گیرنده گرلین عمل کرده و اثر مهاری گرلین بر هورمون های تیروئیدی را بلوکه کند.

برای انجام این تحقیق، ۳۰ عدد Rat نر از نژاد Wistar به وزن g ۲۵۰- ۲۳۰ به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند: گروه ها یا ۵nmol گرلین ، nmol ۱۰ از آنالوگ S-P و یا nmol ۵ گرلین به همراه nmol ۱۰ آنالوگ S-P را در حجم µl۵ به مدت ۳ روز از طریق بطن جانبی مغز دریافت نمودند. نمونه های خونی روزانه قبل و بعد تزریق از یک روز قبل تزریق تا یک روز بعد از آخرین تزریق به مدت ۵ روز جمع آوری گردید. عمل برش گیری از مغز نیز جهت اطمینان از محل صحیح کانول گذاری صورت گرفت. پلاسمای خون جهت اندازه گیری غلظت T3 و T4 به وسیله روش RIA مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج نشان داد، که گرلین موجب کاهش میانگین غلظت پلاسمایی هورمون های تیروئیدی شد و بر هم کنش بین گرلین و آنالوگ Substance-P نشان داد که آنالوگ S-P سبب کاهش اثر مهاری گرلین بر میانگین غلظت هورمون های تیروئیدی شد ولی این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود.



*کلمات کلیدی:*

*گرلین، Substance P، تری یدوتیرونین(T3)، تیروکسین(T4).*

فهرست

**عنوان** **صفحه**


**فصل اول: مقدمه**

۱- ۱- مقدمه ..... ۲

**فصل دوم: مروری بر منابع**

۲- ۱- گرلین ..... ۶

۲ - ۱- ۱- تاریخچه کشف گرلین ..... ۶

۲- ۱- ۲- ساختار گرلین و جایگاه ژنی آن ..... ۸

۲ - ۱- ۳- سلول‌های تولید کننده گرلین ..... ۱۰

۲ - ۱- ۴- گیرنده گرلین و ساختار ژنی آن ..... ۱۱

۲- ۱- ۵- مکانیسم عمل گیرنده گرلین ..... ۱۲

۲- ۱- ۶- توزیع گیرنده گرلین ..... ۱۳

۲- ۱- ۷- غلظت گرلین ..... ۱۳

۲- ۱- ۸- عوامل موثر بر تنظیم ترشح گرلین ..... ۱۴

۲- ۱- ۸- ۱- غذا خوردن و روزه داری ..... ۱۴

۲- ۱- ۸- ۲- گلوکز و انسولین ..... ۱۴

۲- ۱- ۸- ۳- هورمون رشد ..... ۱۴

۲- ۱- ۸- ۴- لپتین ..... ۱۵

۲- ۱- ۸- ۵- فعالیت تیروئید ..... ۱۵

۲- ۱- ۸- ۶- چاقی ..... ۱۵

۲- ۱- ۹- اعمال فیزیولوژیکی گرلین ..... ۱۵
۲- ۱- ۹- ۱- افزایش هورمون رشد ..... ۱۵
۲- ۱- ۹- ۲- افزایش اشتها ..... ۱۶
۲- ۱- ۹- ۳- اثر بر تولید مثل ..... ۱۷
۲- ۲- Substance P ..... ۱۸
۲- ۲- ۱- تاریخچه کشف Substance P ..... ۱۸
۲- ۲- ۲- ساختار Substance P و سنتز آن ..... ۱۹
۲- ۲- ۳- گیرنده Substance P و مکانیسم عمل آن ..... ۲۰
۲- ۲- ۴- توزیع Substance P و گیرنده آن ..... ۲۲
۲- ۲- ۵- اعمال فیزیولوژیکی Substance P ..... ۲۳
۲- ۲- ۵- ۱- ایجاد افسردگی، نگرانی و استرس ..... ۲۳
۲- ۲- ۵- ۲- تحریک رفلکس استفراغ ..... ۲۳
۲- ۲- ۵- ۳- اثر بر ترشح بزاق ..... ۲۳
۲- ۲- ۵- ۴- اثر بر وزن و اشتها ..... ۲۴
۲- ۲- ۵- ۵- اثر بر ترشح هورمون های هیپوفیزی ..... ۲۴
۲- ۳- غده تیروئید و هورمون های تیروئیدی ..... ۲۶
۲- ۳- ۱- آناتومی غده تیروئید ..... ۲۶
۲- ۳- ۲- اعمال غده تیروئید ..... ۲۶
۲- ۳- ۳- سنتز هورمون های تیروئیدی ..... ۲۷
۲- ۳- ۴- میزان ترشح روزانه T3 و T4 ..... ۲۸
۲- ۳- ۵- انتقال هورمون های تیروئیدی ..... ۲۹

۲- ۳- ۶- متابولیسم هورمون های تیروئیدی ..... ۲۹
۲- ۳- ۷- مکانیسم عمل هورمون های تیروئیدی ..... ۳۱
۲- ۳- ۸- تنظیم غعالیت غده تیروئید ..... ۳۱
۲- ۳- ۸- ۱- TSH ..... ۳۱
۲- ۳- ۸- ۲- سایر تنظیم کننده های سنتز هورمون های تیروئیدی ..... ۳۲
۲- ۳- ۹- اعمال فیزیولوژیکی هورمون های تیروئیدی ..... ۳۲
۲- ۳- ۱۰ مطالعات انجام شده گرلین روی هورمون های تیروئیدی ..... ۳۴

## فصل سوم: مواد و روش ها

۳- ۱- وسایل مورد نیاز برای آزمایش ..... ۳۹
۳- ۲- مواد مورد نیاز برای آزمایش ..... ۴۰
۳- ۳- دستگاه های استفاده شده ..... ۴۱
۳- ۴- محل انجام آزمایش ..... ۴۲
۳- ۵- واحدهای آزمایشی ..... ۴۲
۳- ۶- تغذیه و شرایط آزمایشگاهی نگهداری حیوان ..... ۴۲
۳- ۷- تیمارهای آزمایشی ..... ۴۲
۳- ۸- دزهای استفاده شده گرلین و **SP** ..... ۴۳
۳- ۹- مراحل انجام آزمایش ..... ۴۳
۳- ۹- ۱- مرحله بیهوش کردن حیوان ..... ۴۳
۳- ۹- ۲- مرحله تثبیت حیوان در دستگاه استرئوتاکسیک ..... ۴۳
۳- ۹- ۳- مرحله جراحی ..... ۴۴
۳- ۹- ۴- مرحله کانول گذاری ..... ۴۵

۳- ۹- ۵- مرحله تزریق ..... ۴۶
۳- ۹- ۶- مرحله خونگیری ..... ۴۶
۳- ۹- ۷- مرحله Perfussion ..... ۴۷
۳- ۹- ۸- مرحله خارج کردن مغز از داخل جمجمه ..... ۴۸
۳- ۹- ۹- مرحله تهیه برش از نمونه ها ..... ۴۸
۳- ۹- ۱۰- مرحله سنجش نمونه های پلاسمایی ..... ۴۹
۳- ۱۰- اجزاء کیت T3 ..... ۵۰
۳-۱۱- اجزاء کیت T4 ..... ۵۰
۳-۱۲- طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده ها ..... ۵۰

## فصل چهارم: نتایج

۴- ۲- هورمون T3 ..... ۵۲
۴- ۳- هورمون T4 ..... ۵۸

## فصل پنجم: بحث و پیشنهادات

۵- ۱- بحث ..... ۶۵
۵- ۱- ۱- نتایج اثر گرلین بر غلظت پلاسمایی هورمون های تیروئیدی ..... ۶۶
۵- ۱- ۲- احتمال کاهش بیشتر T4 نسبت به T3 ..... ۶۷
۵- ۱- ۳- مکانیسم های اثر کاهشی گرلین بر هورمون های تیروئیدی ..... ۶۸
۵- ۱- ۳-۱- مکانیسم احتمالی اول ..... ۶۹
۵- ۱- ۳- ۲- مکانیسم احتمالی دوم ..... ۶۹
۵- ۱- ۳- ۳- مکانیسم احتمالی سوم ..... ۷۰
۵- ۱- ۳- ۴- مکانیسم احتمالی چهارم ..... ۷۱

۵- ۱- ۳- ۵- مکانیسم احتمالی پنجم ..... ۷۲
۵- ۱- ۳- ۶- مکانیسم احتمالی ششم ..... ۷۰
۵- ۱- ۳- ۷- مکانیسم احتمالی هفتم ..... ۷۲
۵- ۱- ۴- نتایج اثر آنالوگ P-S بر غلظت پلاسمایی هورمون های تیروئیدی ..... ۷۳
۵-۱-۵- نتایج برهم‌کنش گرلین و آنالوگ SP بر غلظت پلاسمایی هورمون های تیروئیدی..... ۷۳
۵- ۱- ۵- دلایل احتمالی عدم مهار اثر کاهش گرلین در محور تیروئیدی با SP ..... ۷۳
۵- ۱- ۵- ۱- دلیل احتمالی اول ..... ۷۴
۵- ۱- ۵- ۲- دلیل احتمالی دوم ..... ۷۴
۵- ۱- ۶- نتیجه گیری کلی..... ۷۵
۵- ۳- پیشنهادات ..... ۷۵
منابع ..... ۷۸

# فهرست اشکال و نمودارها


شکل ۲- ۱ ..... ۸

شکل ۲- ۲ ..... ۹

شکل ۲- ۳ ..... ۱۱

شکل ۲- ۴ ..... ۱۲

شکل ۲- ۵ ..... ۱۳

شکل ۲- ۶ ..... ۱۶

شکل ۲- ۷ ..... ۱۷

شکل ۲- ۸ ..... ۲۰

شکل ۲- ۹ ..... ۲۱

شکل ۲- ۱۰ ..... ۲۲

شکل ۲- ۱۱ ..... ۲۹

شکل ۲- ۱۲ ..... ۳۰

شکل ۲- ۱۳ ..... ۳۲

شکل ۲- ۱۴ ..... ۳۴

شکل ۳- ۱۵ ..... ۴۳

شکل ۳- ۱۶ ..... ۴۴

شکل ۳- ۱۷ ..... ۴۵

شکل ۳- ۱۸ ..... ۴۵

شکل ۳- ۱۹ ..... ۴۶

شکل ۳- ۲۰ ..... ۴۷

شکل ۳- ۲۱ ..... ۴۸
شکل ۳- ۲۲ ..... ۴۸
شکل ۳- ۲۳ ..... ۴۹
شکل ۳- ۲۴ ..... ۴۹
شکل ۵- ۲۵ ..... ۷۰
شکل ۵- ۲۶ ..... ۷۱
نمودار ۴- ۱ ..... ۵۴
نمودار ۴- ۲ ..... ۵۴
نمودار ۴- ۳ ..... ۵۵
نمودار ۴- ۴ ..... ۵۵
نمودار ۴- ۵ ..... ۵۶
نمودار ۴- ۶ ..... ۵۶
نمودار ۴- ۷ ..... ۵۷
نمودار ۴- ۸ ..... ۶۰
نمودار ۴- ۹ ..... ۶۰
نمودار ۴- ۱۰ ..... ۶۱
نمودار ۴- ۱۱ ..... ۶۱
نمودار ۴- ۱۲ ..... ۶۲
نمودار ۴- ۱۳ ..... ۶۲
نمودار ۴- ۱۴ ..... ۶۳

# فصل اول

# مقدمه

## ۱-۱- مقدمه

متابولیسم و فرایند جذب و مصرف انرژی در پستانداران از اهمیت بسزایی برخوردار است و از طریق فاکتورهای متعدد عصبی، هورمونی و محیطی، به طور دقیقی تنظیم می شود. از مجموع غدد درون ریز بسیاری که برای تنظیم متابولیسم پایه بدن عمل می‌کنند هورمون های تیروئیدی مهمترین و بیشترین نقش را دارند و متابولیسم را در اکثر سلول های بدن افزایش می دهند (۳، ۵۰). بنابراین هر گونه تغییر در عملکرد غده تیروئید و میزان هورمون های T3 و T4 باعث تغییرات وسیعی در بدن می‌شود که تغییرات متابولیسم و وزن بدن از آن جمله می باشند. لازم به ذکر است، فاکتورهای متعددی بر میزان هورمون های تیروئیدی تاثیر دارند که از بین آنها می توان به گرلین[1] اشاره کرد.

گرلین پپتید ۲۸ اسیدآمینه ای است که در سرین شماره ۳ خود اسیله[2] شده است. این هورمون برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ توسط Kojima و همکارانش از معده Rat جداسازی شد و به عنوان لیگاند درونی برای گیرنده GHS-Ra[1] مطرح گردید (۵۶). گرلین به هنگام گرسنگی به مقدار زیادی از معده و به مقدار اندکی از مغز و سایر اندام های مختلف بدن سنتز می شود. مطالعات نشان داده گرلین علاوه بر افزایش هورمون

---

[1]. Ghrelin
[2]. Acylation

رشد (۴۷، ۸۵) سبب افزایش تخلیه معده، افزایش اشتها، افزایش وزن بدن (۲۳، ۵۶) و کاهش غلظت هورمون های تیروئیدی می شود (۲، ۴، ۱۳، ۳۱، ۵۴، ۱۰۱، ۱۰۲) پیشنهاد شده است نوروترانسمیترهای مختلف ممکن است در عمل فیزیولوژیکی گرلین دخالت داشته باشند که Substance P (SP) یکی از این نوروروترانسمیترها است.

SP نوروپپتید ۱۱ اسید آمینه ای است که در سیستم عصبی محیطی و مرکزی به عنوان نوروترانسمیتر ، نورومدیولاتور[۲] و یا نوروهورمون[۳] عمل می کند. این پپتید برای اولین بار در سال ۱۹۳۱ توسط Von Euler و Gaddum از عصاره بافتی مغز و روده که سبب تحریک انقباض ماهیچه صاف روده در شرایط in vitro می‌شد جداسازی گردید و به عنوان لیگاند درونی برای گیرنده NK1 مطرح شد (۹۴). مطالعات نشان داده است نورون های SP و گرلین علاوه بر نواحی مختلف بدن،در هسته ARC[۴] و PVN[۵] هیپوتالاموس واقع شده اند (۴۹، ۸۱) و آنالوگ S-P به نام **[D-Arg-1, D-phe-5, D-Trp-7,9, Leu-11] SP**، به عنوان Inverse agonist کامل و یا مهارکننده[۶] ضعیف گیرنده GHSR-Ia عمل کرده و با مهار این گیرنده سبب کاهش تخلیه معده، کاهش اشتها و کاهش وزن بدن القا شده توسط گرلین می شود (۱۱، ۴۲، ۴۳، ۱۰۴).

با توجه به این یافته ها، هدف این تحقیق بررسی اثر بر هم کنش[۷] گرلین و آنالوگ S-P از طریق تزریق داخل بطنی[۸] و تاثیر مدت زمان تزریق این هورمون ها بر غلظت پلاسمایی هورمون های تیروئیدی (T3 و T4) می باشد تا مشخص شود آیا آنالوگ S-P در مسیر تیروئیدی نیز همانند مسیر اشتها قادر است به عنوان مهارکننده ویا inverse agonist گیرنده GHSR-Ia گرلین عمل نموده و اثر مهاری گرلین بر غلظت هورمون های تیروئیدی را بلوکه کند.

---

1. **Growth Hormone Secretagogue Receptor**
2. **Neuromediator**
3. **Neurohormone**
4. **Arcuate Nucleus**
5. **Paraventricular Nucleus**
6. **Antagonist**
7. **Interaction**
8. **Intracerebral Ventricle (ICV)**

# فصل دوم

# مروری بر منابع علمی

# گرلین

# Substance P

## هورمون های تیروئیدی

## ۲-۱- گرلین:

### ۲-۱-۱- تاریخچه کشف گرلین:

Bowers و همکارانش در سال ۱۹۷۶ پپتیدی را که مشابه اپیوئیدها[1] بود ولی فعالیت اپیوئیدی نداشت و سبب رها شدن هورمون رشد می شد سنتز کردند این پپتید GHS[2] نامیده شد (۱۵). GHS ها گروهی از ترکیبات مصنوعی هستند که محرک قوی برای ترشح هورمون رشد از هیپوفیز قدامی می باشند. این ترکیبات از طریق مسیری متفاوت از مسیر GHRH کار تحریک ترشح هورمون رشد را انجام می دهند. GHRH روی گیرنده GHRH عمل کرده و با افزایش CAMP سبب ترشح GH می گردد در حالی که GHSها بر روی گیرنده اختصاصی خود GHS-R[3] عمل کرده، سبب تحریک فسفولیپاز C[4] شده و با استفاده از اینوزیتول‌تری فسفات(IP3)[5] سبب افزایش کلسیم درون سلولی و به این ترتیب سبب تحریک ترشح هورمون رشد می شوند (۸۸،۵۹). فعالیت آزادکنندگی هورمون رشد GHS های اولیه بسیار ضعیف بوده و تنها به صورت in vitro مشاهده می شد. در سال ۱۹۸۴ یک GHS موثر یعنی GHRP-6[6] سنتز شد. این هگزاپپتید هم به صورت in vivo و هم به صورت in vitro فعالیت نشان می داد و امکان به کارگیری آن را برای مصارف

---

[1]. Opioids
[2]. Growth Hormone Secretagogues
[3]. Growth Hormone Secretagogues- Receptor
[4]. Phospholipase C
[5]. Inositol Triphosphate
[6]. Growth Hormone Releasing Peptide 6

کلینیکی فراهم می کرد (۱۵). پس از سنتز نخستین GHRP و سایر پپتیدهای GHS محققان تلاش برای پیدا کردن ترکیبات غیر پپتیدی را که عملکرد GHRP- 6 را تقلید می کنند آغاز کردند (۱۲). در سال ۱۹۸۸ گیرنده GHSR-Ia توسط Smith و همکارانش کشف شد و به دنبال آن در سال ۱۹۹۳ نخستین GHS غیر پپتیدی موثر یعنی L692429 توسط Smith و همکارانش سنتز شد (۵۶). از آنجایی که GHSها به طور طبیعی در بدن وجود ندارند بنابراین باید یک لیگاند درونی که به گیرنده GHS-R متصل می شود در بدن وجود داشته باشد و اعمال مشابه GHSها را انجام دهد (۸۵). با وجود تحقیقات گسترده توسط گروه های مختلف، جداسازی لیگاند درونی گیرنده GHSR تا سال ۱۹۹۹ مبهم باقی ماند. سرانجام در سال ۱۹۹۹ گروهی به رهبری Kojima و همکارانش که ترشحات بافت های مختلف نظیر مغز، شش ها، قلب، کلیه ها و معده را آزمایش می کردند بر خلاف آنچه تصور می شد که بایستی بیشترین غلظت گرلین مربوط به هیپوتالاموس باشد به طور شگفت انگیزی دریافتند که بیشترین فعالیت GHSR در ترشحات معدی یافت می‌شود. آنها همچنین بیان کردند این مولکول به آسانی تجزیه زیستی می شود و سرانجام گرلین[1] به عنوان یک پپتید ۲۸ اسیدآمینه ای که در سرین شماره ۳ خود اسیله شده است توسط Kojima و همکارانش در سال ۱۹۹۹ از معده Rat جداسازی شد و به عنوان لیگاند درونی برای گیرنده GHS-R1a در نظر گرفته شد. گفتنی است، گرلین از کلمه ghre از ریشه کلمه growth در زبان اروپای قدیم گرفته شده و هیچ گونه همولوژی ساختاری بین گرلین و GHS ها وجود ندارد (۵۶، ۶۱).

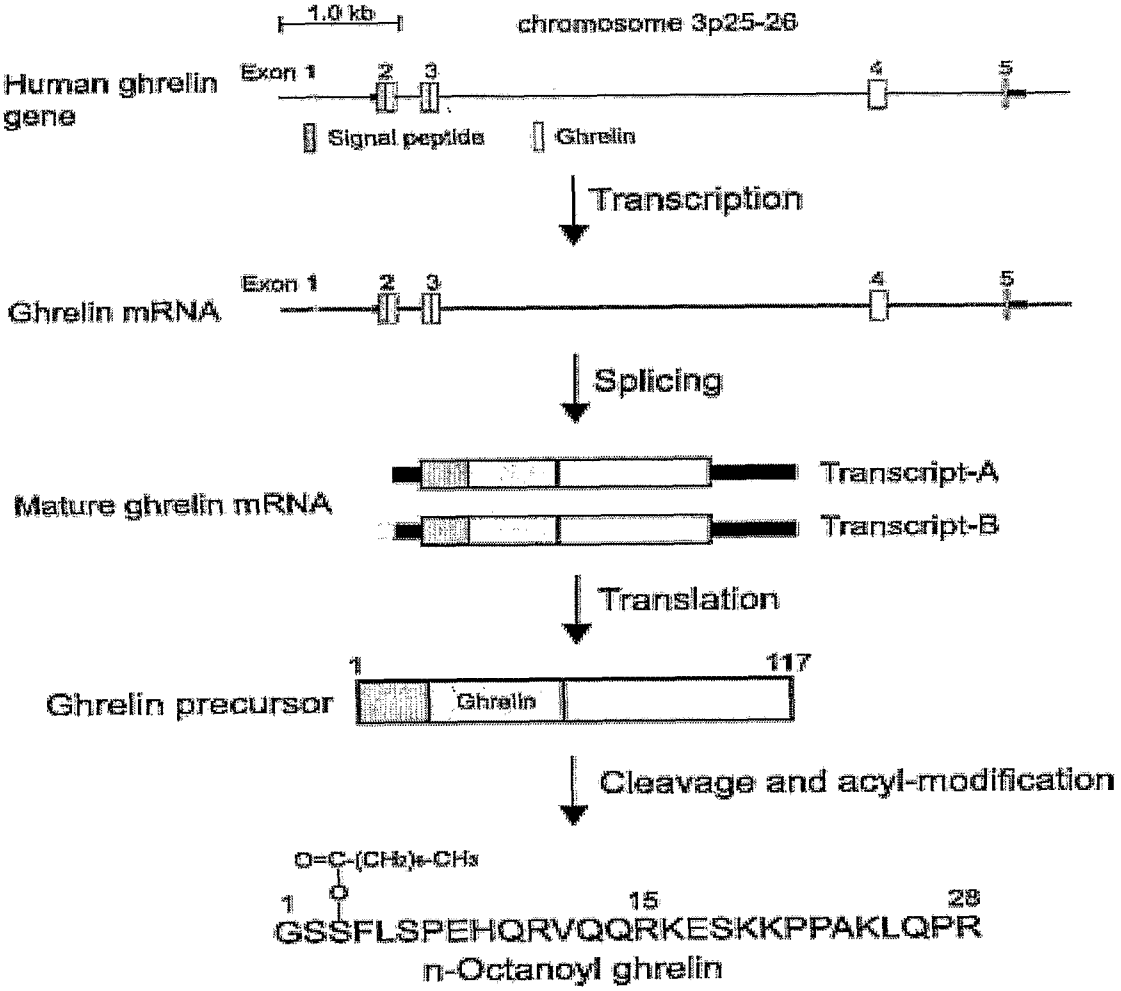
**۲-۱-۲- ساختار گرلین و جایگاه ژنی آن:**

ژن گرلین انسانی بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۳ در جایگاه 3p25- 26 قرار گرفته است. ناحیه ۵' ژن گرلین انسانی دارای توالی شبیه TATA می باشد. با وجود این، نه موتاسیون[2] و نه حذف جایگاه شبیه TATA فعالیت پروموتور را کاهش نمی دهد. این امر نشان می دهد وجود این جایگاه ضروری نیست. در

---

[1]. **Ghrelin**
[2]. **Mutation**

این ژن توالی جعبه CAAT و GC وجود ندارد. ژن گرلین انسانی مانند ژن گرلین موش شامل ۵ اگزون می‌باشد. اگزون اول کوتاه و دارای ۲۰ جفت باز است. ۲۸ اسیدآمینه عملکردی پپتید گرلین در اگزون ۱ و ۲ کد می شود(۸۸). (شکل ۲- ۱).




**شکل۲- ۱ ساختار ژن گرلین و مراحل پردازش‌آن**

اصطلاح گرلین از ریشه "Ghre" گرفته شده است و دلیل آن توانایی گرلین در تحریک ترشح هورمون رشد می‌باشد. گرلین پپتید ۲۸ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۳۳۷۰ دالتون در انسان (۳۳۱۴ دالتون در موش) می‌باشد و از مولکول پیش ساز Pre- proghrelin که دارای ۱۱۷ اسیدآمینه می باشد سنتز می شود.