بسم الله الرحمن الرحیم

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 **سالار بختیاری** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۴** 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 ».

امضا

تاریخ

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 آقای دکتر محمد تقی‌خانی ، مشاوره آقای دکتر رضا مشکانی 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 سالار بختیاری دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

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

عنوان

اثرات کاهش بیان ژن پروتئین تیروزین فسفاتاز-1B (**PTP-1B**) با استفاده از **shRNA** بر مقاومت به انسولین القاء شده توسط پالمیتات در رده سلولی عضلانی **C2C12**

نگارش

سالار بختیاری

استاد راهنما

دکتر محمد تقی‌خانی

استاد مشاور

دکتر رضا مشکانی

تابستان ۱۳۸۹

این پایان‌نامه را اگر لایق مقام والای

عزیزانم باشد، تقدیم می‌کنم به:

همسر مهربانم که مهرم قطره‌ای از مهر اوست.

پدر و مادر عزیزم که دستان مهربان و چشمان هستی‌بخش آنها سایبان وجودم بوده است.

برادر و خواهران عزیزم که همواره مهرشان بر من تابنده بوده است.

تشکر و قدردانی

با نهایت سپاس از درگاه پرودگاردی که هرچه دارم از اوست، پروردگار پاک و منزهی که داناست و نعمت آموختن را به بندگانش ارزانی داشته است. خدای بزرگ را سپاسگزارم که آرامشی به من عطا فرمود تا بتوانم در راه او گامی بردارم و توفیق اتمام مرحله علمی دیگری را داشته باشم. اکنون که این تحقیق در سایهٔ الطاف بیکران الهی پایان پذیرفت، وظیفه خود می‌دانم که از عزیزانی که مرا در این خصوص یاری نمودند، سپاسگزاری نمایم:

از استاد محترم جناب آقای دکتر محمد تقی‌خانی که مسئولیت راهنمایی این پایان نامه را عهده دار بودند و در این راه از هیچ کوششی دریغ نورزیدند، کمال سپاس و تشکر را دارم.

از استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر رضا مشکانی که در تمام مراحل این تحقیق از کمک-های بی‌پایان و راهنمایی‌های دلسوزانه و ارزشمندشان برخوردار بودم صمیمانه سپاسگزارم.

از استاتید ارجمندی که زحمت نظارت و داوری این پایان نامه را به عهده داشته‌اند، کمال تشکر و امتنان را دارم.

از تمامی اساتید و کارشناسان گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس که در طی این چند سال خوشه‌چین علم و معرفت‌شان بوده‌ام قدردانی می‌نمایم.

از تمام اساتید و کارشناسان گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی تهران بخاطر تمام مساعدت‌هایشان نهایت تشکر و امتنان را دارم.

از دوستان عزیز آقایان طاهری‌پاک و نسیمیان و خانم‌ها تقوایی، پروانه و صادقی بخاطر همهٔ کمک‌ها و همراهی‌هایشان صمیمانه تشکر می‌کنم.

در پایان از همهٔ بزرگوارانی که در مراحل مختلف این پژوهش، به هر نحو مرا یاری نموده‌اند و به علت پرهیز از اطالهٔ مطلب نام آنها ذکر نشده است، صمیمانه سپاسگزارم.

چکیده

پیش‌زمینه: مقاومت به انسولین، نقص اصلی در دیابت نوع ۲ و چاقی است که طی آن، تجمع لیپید همراه با افزایش بیان PTP-1B در عضله رخ می‌دهد. اهداف این مطالعه شامل بررسی اثرات کاهش بیان PTP-1B بر مقاومت به انسولین القاء شده با پالمیتات و همچنین متابولیسم درون سلولی پالمیتات در سلول‌های عضلانی C2C12 بود.

مواد و روش‌ها: یک سل‌لاین C2C12 کاهش بیان یافته PTP-1B ایجاد شد. بیان PTP-1B، همچنین فسفریلاسیون و بیان پروتئین‌های IRS-1 و Akt، DGAT1، SPT و PGC1α مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر کاهش PTP-1B بر برداشت گلوکز و متابولیت‌های پالمیتات از جمله دی‌آسیل گلیسرول (DAG)، سرامید و تری‌گلیسرید بررسی شد.

نتایج: در سل‌لاین C2C12 کاهش بین یافته، میزان بیان پروتئین PTP-1B، ٦٢٪ کاهش یافت. در شرایط تیمار با پالمیتات و در حضور انسولین، فسفریلاسیون‌های مفید IRS-1 و Akt در سلول‌های کاهش بیان یافته نسبت به کنترل، به ترتیب ۱/۵۵ و ۱/٦٨ برابر افزایش نشان داد. غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات، از طریق کاهش برداشت گلوکز در سلول‌های کنترل (به ترتیب ٢٦٪ و ٤٢٪) و کاهش بیان یافته (به ترتیب ١٦/۵٪ و ٣٢/٧٪) در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، بطور قابل توجهی سبب القاء مقاومت به انسولین گردید. در حضور غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات، برداشت گلوکز وابسته به انسولین در سلول‌های کاهش بیان یافته در مقایسه با کنترل، به ترتیب حدود ۳ و ۲/۵ برابر بود. برخلاف سلول‌های کنترل تیمار شده با پالمیتات که محتوای DAG و سرامید آنها افزایش نشان می‌دهد، سلول‌های کاهش بیان یافتهٔ حاوی سطوح پایین‌تری از این متابولیت‌ها ($p< ۰/۰۰۱$) بود. محتوای تری‌گلیسرید در سلول‌های کاهش بیان یافته تحت پالمیتات افزایش یافت، ولی در سلول‌های کنترل تقریبا بدون تغییر باقی ماند. تیمار با پالمیتات ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار تغییر معنی‌داری در میزان بیان پروتئین‌های SPT و PGC-1α در سلول‌های کاهش بیان یافتهٔ ایجاد نکرد، در حالیکه میزان بیان SPT و PGC-1α در سلول‌های کنترل به ترتیب افزایش و کاهش یافت. در سلول‌های کاهش بیان یافتهٔ و کنترل، در شرایط تیمار با پالمیتات میزان بیان پروتئین DGAT1 بدون تغییر بود.

بحث: کاهش بیان پروتئین PTP-1B می‌تواند منجر به بهبود برداشت گلوکز در میوتیوب‌ها گردد. بعلاوه، کاهش بیان PTP-1B در سلول-های C2C12، متابولیسم پالمیتات را در جهت بیوسنتز تری‌گلیسرید و β- اکسیداسیون پیش برده و بدینوسیله متابولیت‌های DAG و سرامید را در سلول‌های عضلانی کاهش می‌دهد. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند PTP-1B می‌تواند بعنوان یک هدف درمانی بالقوه در درمان مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین تیروزین فسفاتاز-1B، RNA سنجاق سری کوچک (shRNA)، مقاومت به انسولین، کاهش بیان، برداشت گلوکز، پالمیتات، دی‌آسیل گلیسرول (DAG)، سرامید.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. اپیدمی دیابت ملیتوس ۲

۱-۲. دیابت ملیتوس وابسته به انسولین (IDDM) ۳

۱-۳. دیابت ملیتوس غیر وابسته به انسولین (NIDDM)..... ٤

۱-٤. سیگنالینگ انسولین در ترانسپورت گلوکز..... ٥

۱-٥. ارتباط بین چاقی و دیابت..... ۱۱

۱-٦. مقاومت به انسولین القاء شده با لیپید..... ۱۱

۱-٦-۱. مقاومت به انسولین در چاقی و دیابت نوع ۲ ..... ۱۱

۱-٦-۲. اسیدهای چرب آزاد (FFAs) و مقاومت به انسولین ۱۲

۱-٦-۳. محتوی لیپید درون سلول عضله و مقاومت به انسولین ۱٥

۱-٦-٤. اختلال در سیگنالینگ انسولین توسط حدواسط‌های لیپیدی ۱٦

۱-٦-٤-۱. آسیل CoA با زنجیره بلند (LCFACoA) ۱٦

۱-٦-٤-۲. دی‌آسیل گلیسرول (DAG) ۱۸

۱-٦-٤-۳. سرامید ۲۲

۱-۷. PGC-1α و مقاومت به انسولین..... ۲٦

۱-۸. پروتئین تیروزین فسفاتازها (PTPs) ۲۸

۱-۸-۱. پروتئین تیروزین فسفاتاز- 1B (PTP-1B)..... ۳۰

۱-۸-۲. PTP-1B، مقاومت به انسولین و دیابت نوع ۲ ..... ۳۲

فصل دوم: مواد و روشها ۳۷

۲-۱. کشت سلول ۳۸

۲-۱-۱. سل‌لاین میوبلاستی C2C12 ..... ٤۰

۲-۱-۲. مواد و محلول‌های مورد نیاز برای کشت سلول ٤٠
۲-۱-۳. کشت سلول C2C12 ..... ٤٣
۲-۱-۳-۱. آماده سازی سلولها ٤٣
۲-۱-۳-۲. تریپسینه کردن سلولها ٤٣
۲-۱-۳-۳. تمایز میوبلاست‌های C2C12 به میوتیوب ٤٤
۲-۲. کشت باکتری ٤٤
۲-۲-۱. آماده سازی محیط کشت LB Broth و LB Agar ٤٤
۲-۲-۲. آنتی‌بیوتیک‌ها ٤٥
۲-۲-۳. تهیه سلول Competent ٤٦
۲-۲-٤. ترانسفورماسیون ٤٨
۲-۲-٥. تخلیص پلاسمید با استفاده از کیت QIAprep Spin Miniprep ٤٩
۲-۳. کاهش بیان ژن از طریق RNAi ٥٠
۲-۳-۱. کاهش بیان PTP-1B با استفاده از shRNA ٥١
۲-۳-۱-۱. هضم آنزیمی پلاسمیدهای pRS برای تأیید قطعه shRNA کلون شده..... ٥٣
۲-۳-۱-۲. ترانسفکشن موقت پلاسمیدهای pRS به درون سل‌لاین C2C12 با استفاده از روش کلسیم فسفات..... ٥٤
۲-۳-۱-۳. ترانسفکشن دایمی ٥٦
۲-٤. وسترن بلات ٥٧
۲-٥. سنجش فعالیت PTP-1B در سلول‌های کاهش بیان یافته و طبیعی ٦٤
۲-٦. تیمار با پالمیتات ٦٥
۲-۷. مقایسه عناصر کلیدی در مسیر سیگنالینگ انسولین در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و طبیعی ٦٦
۲-۸ آزمایش برداشت گلوکز ٦٧
۲-۹. بررسی میزان پروتئین DGAT1، SPT و PGC-1α در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته

PTP-1B و طبیعی..... ٦٩
۲-۱۰. مقایسه محتوای لیپیدی در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های طبیعی C2C12..... ٦٩
۲-۱۰-۱. استخراج لیپید ٦٩
۲-۱۰-۲. کرماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC) برای آنالیز نیمه کمی سرامید و دی‌آسیل‌گلیسرول..... ٧١
۲-۱۰-۳. سنجش محتوای تری‌گلیسرید ٧١
۲-۱۱. تحلیل آماری نتایج ٧٢
فصل سوم: نتایج ٧٣
۳-۱. هضم پلاسمیدهای pRS ٧٤
۳-۲. ترانسفکشن به روش کلسیم فسفات ٧٥
۳-۲-۱. ترانسفکشن میوبلاست‌های C2C12 با پلاسمید GFP ٧٥
۳-۲-۲. ترانسفکشن موقت ٧٦
۳-۲-۳. ترانسفکشن دایمی و تأیید کاهش بیان PTP-1B در سلول‌های C2C12 ..... ٧٧
۳-۳. افزایش سیگنالینگ انسولین در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B در حضور پالمیتات ٨٠
۳-٤. افزایش برداشت گلوکز در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B در حضور پالمیتات ٨٤
۳-۵. مقایسه تأثیر پالمیتات بر میزان بیان پروتئین‌های DGAT1، SPT و PGC-1α در میوتیوب‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و میوتیوب‌های طبیعی کنترل ٨٥
۳-٦. بررسی محتوای لیپیدی در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و کنترل طبیعی C2C12 ..... ٨٩
۳-٦-۱. نتایج حاصل از HPTLC برای سرامید و دی‌آسیل گلیسرول ٨٩
۳-٦-۲. نتایج حاصل از سنجش تری‌گلیسرید ٩٢

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۹٤
٤-۱. بحث ۹۵
٤-۲. نتیجه‌گیری ۱۰٤
٤-۳. پیشنهادها ۱۰۷
فهرست منابع ۱۰۸
چکیده انگلیسی ۱۲۸

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. منحنی استاندارد بر مبنای غلظت فسفات و میزان جذب در ٦٢٠ نانومتر ۷۹

نمودار ۳-۲. میزان فعالیت PTP-1B در سلول‌های C2C12 کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های C2C12 کنترل..... ۸۰

نمودار ۳-۳. اثر پالمیتات ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار بر میزان برداشت گلوکز در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های C2C12 طبیعی..... .... ۸۵

نمودار ۳-٤. اثر غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات بر محتوای تری‌گلیسرید در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های C2C12 طبیعی ۹۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. مکانیسم شماتیک مسیرهای سیگنالینگ انسولین ۸

شکل ۱-۲. مکانیسم‌هایی که از طریق آنها گونه‌های لیپیدی درون سلول عضلانی عملکرد انسولین در عضلات را مهار می‌نمایند ۱۷

شکل ۱-۳. تولید دی‌آسیل گلیسرول (DAG) از فسفاتیدیل اینوزیتول ٤ و ٥- بیس‌فسفات (PIP2) توسط آنزیم فسفولیپاز C (PLC) ۱۹

شکل ۱-٤. مسیر بیوسنتز سرامید ۲۳

شکل ۱-٥. نمودار شماتیک برای نشان دادن مکانیسم‌های چندگانه‌ای که سرامید از طریق آنها سیگنالینگ انسولین را مختل می‌کند ۲٥

شکل ۱-٦. نمای شماتیک بیوژنز میتوکندری ۲۷

شکل ۲-۱. توالی‌های shRNA علیه ژن PTP-1B موجود در پلاسمیدهای pRS ٥۱

شکل ۲-۲. نقشه پلاسمید pRS ٥۲

شکل ۳-۱. هضم پلاسمیدهای pRS با دو آنزیم محدود کننده EcoRI و HindIII ۷٤

شکل ۳-۲. ترانسفکشن سلولهای C2C12 با پلاسمید GFP با استفاده از روش کلسیم فسفات ۷٥

شکل ۳-۳. کاهش بیان PTP-1B در سلول‌های C2C12 متعاقب ترانسفکشن پلاسمیدهای pRS با استفاده از روش کلسیم فسفات ۷٦

شکل ۳-٤. کلنی‌های ایجاد شده متعاقب ترانسفکشن دایمی ۷۷

شکل ۳-٥. کاهش بیان PTP-1B در سلول‌های C2C12 متعاقب ترانسفکشن دایمی با پلاسمید بیانی pRS-1 ..... ۷۸

شکل ۳-٦. اثر پالمیتات بر روی میزان فسفریلاسیون تیروزین ٦۳۲ مولکول IRS-1 در سلول‌های C2C12 کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های طبیعی ۸۲

شکل ۳-۷. اثر پالمیتات بر روی میزان فسفریلاسیون سرین ٤۷۳ مولکول Akt در سلول‌های C2C12 کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های طبیعی ۸۳

شکل ۳-۸. اثر غلظت‌های ۰، ۰/۲٥، ۰/٥ و ۰/۷٥ میلی‌مولار پالمیتات بر میزان بیان پروتئین DGAT1 در

سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های C2C12 طبیعی ۸۶

شکل ۳-۹. اثر غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات بر میزان بیان پروتئین SPT در سلول-های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های C2C12 طبیعی..... ۸۷

شکل ۳-۱۰. اثر غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات بر میزان بیان پروتئین PGC-1α در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های C2C12 طبیعی ۸۸

شکل ۳-۱۱. اثر غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات بر محتوای DAG در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های C2C12 طبیعی ۹۰

شکل ۳-۱۲. اثر غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار پالمیتات بر محتوای سرامید در سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B و سلول‌های C2C12 طبیعی ۹۱

شکل ٤-۱. مکانیسم پیشنهادی برای مجموعه فرایندهای متابولیسمی که در شرایط تیمار با پالمیتات در (A) سلول‌های کنترل C2C12 و (B) سلول‌های کاهش بیان یافته PTP-1B رخ می‌دهد ۱۰۶

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. اپیدمی دیابت ملیتوس

جهانی شدن و ایجاد بازارهای جهانی منجر به تغییرات سریع در الگوهای غذایی و رفتاری انسان شده است. در نتیجه این تغییرات، تمایل به مصرف رژیم‌های پرکالری با درصد بالاتری از اسیدهای چرب اشباع افزایش یافته است [۱]. به سبب تغییر تدریجی سبک زندگی در جهت الگوهای کم تحرک، فعالیت بدنی کاهش یافته که منجر به تهدید سلامتی گردیده است. این تغییرات در الگوهای رژیمی و سبک زندگی باعث بیماری‌های مرتبط با رژیم غذایی[1] از جمله چاقی، دیابت ملیتوس و بیمارهای قلبی-عروقی شده که این بیماری‌ها علت اصلی ناتوانی و مرگ زودرس در کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته می‌باشند [۲].

دیابت ملیتوس اختلالی است که در ایالات متحده و در تمام دنیا به سرعت در حال گسترش می‌باشد [۳]. مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری گزارش داده‌اند که تقریباً ۱۷ میلیون نفر در ایالات متحده مبتلا به دیابت ملیتوس بوده و سالانه بیش از ۲۰۰۰۰۰ هزار نفر به علت عوارض ناشی از این بیماری می‌میرند. به عقیده برخی از متخصصان، ممکن است که از هر چهار نفر یک نفر پس از ۲۵ سالگی مبتلا به دیابت گردد، مگر اینکه این بیماری در مراحل اولیه با موفقیت درمان شود [٤]. دیابت ملیتوس یک اختلال مزمن است که سبب بروز برخی عوارض از قبیل بیماری قلبی، سکته، نارسایی کلیه، کوری و آسیب عصبی می‌شود [۵]. این بیماری همچنین در گروه ناهمگونی دسته‌بندی می‌شود که

[1]- Diet-related diseases

مشخصه بارز این گروه افزایش سطح گلوکز خون است [٦]. سلولهای β- پانکراس و انسولین مترشحه از آنها در پاتوفیزیولوژی دیابت دارای نقش اساسی می‌باشند. بر اساس تعریف Tisch و McDevitt [٧] دو نوع از دیابت ملیتوس وجود دارد: نوع ١ و نوع ٢. نوع ١ یا دیابت ملیتوس وابسته به انسولین ناشی از فقدان کامل انسولین به علت تخریب اتوایمیون سلولهای β- پانکراس ترشح‌کننده انسولین می‌باشد. نوع ٢ یا دیابت ملیتوس غیروابسته به انسولین (NIDDM) اساساً بصورت مقاومت به انسولین سلول‌های هدف از قبیل سلول‌های عضله و چربی متعاقب تحریک با انسولین، تعریف می‌شود [٨]. مکانیسم‌های جبرانی که در سلولهای β- پانکراس به منظور تولید انسولین بیشتر آغاز می‌گردند، برای حفظ غلظت‌های گلوکز در محدوده‌های فیزیولوژیک کافی نمی‌باشند [٩ و ١٠].

١-٢. دیابت ملیتوس وابسته به انسولین (IDDM)

IDDM در اثر آسیب اختصاصی به سلولهای β- پانکراس ترشح‌کننده انسولین در جزایر لانگرهانس رخ می‌دهد و به نظر می‌رسد که یک بیماری اتوایمیون با واسطه لنفوسیت‌های B باشد [٨]. این بیماری دارای دو مرحله است. نخست، انسولیت[1] هنگامی رخ می‌دهد که جمعیت متنوعی از لکوسیت‌ها به جزایر لانگرهانس حمله می‌کنند. دوم، دیابت هنگامی ایجاد می‌شود که اکثر سلولهای β- پانکراس تخریب شده و ترشح کافی انسولین برای تنظیم سطوح گلوکز خون وجود ندارد که این امر منجر به هیپرگلیسمی می‌گردد. در برخی از افراد قبل از بروز دیابت، برای سالها انسولیت در آنها مخفی باقی می‌ماند. این عارضه یکی از شایعترین بیماری‌ها است و امروزه حدود ٠/٥ درصد از جمعیت کشورهای پیشرفته به آن مبتلا می‌باشند و میزان شیوع آن در حال افزایش است [١١]. بعلاوه، شواهد فراوانی مبنی بر این وجود دارد که بخشی از افرادی که در ابتدا مبتلا به NIDDM تشخیص داده می‌شوند، بیماری‌شان پیشرفت نموده و در دسته IDDM قرار می‌گیرند [١٢]. در حالی که هنوز علت

[1]- Insulitis

این پیشرفت بیماری معلوم نیست، اما شواهدی دال بر دخالت فاکتورهای ژنتیکی و محیطی در این فرایند وجود دارد. در نتیجه، هنوز مشخص نشده است که با کدام روش بی‌خطر (که به لحاظ درمانی نیز قابل انجام باشد)، می‌توان IDDM را مهار و یا درمان نمود. بسیاری از محققان به دلیل عدم امکان استفاده از بافت‌های انسانی از مدل‌های حیوانی دیابتی، بویژه موش دیابتی غیرچاق و انواع ترانس‌ژنیک آن استفاده می‌کنند [۱۳]. با وجود اینکه نتایج حاصل از تخریب اتوایمیون سلول‌های β پانکراس مشخص می‌باشد، اما دلایل بروز این اختلال و همچنین فاکتورهای محیطی که باعث بروز این نوع تخریب در کودکان، نوجوانان و بزرگسالانِ مستعد به لحاظ ژنتیکی می‌شوند، هنوز ناشناخته باقی مانده است [۱۱].

۱-۳. دیابت ملیتوس غیر وابسته به انسولین (NIDDM)

NIDDM متشکل از چند سطح از عوارض می‌باشد که هر یک بوسیله میزان مقاومت به انسولین و تخریب سلول‌های β مشخص شده و باعث بروز هیپرگلیسمی می‌شوند. بروز هر یک از سطوح این بیماری ناشی از اختلال در عملکرد یک ژن واحد است که بر روی ظرفیت سلول‌های β در تولید انسولین [۱٤ و ۱۵] یا توانایی سلول‌های ماهیچه‌ای، چربی و کبدی در پاسخ به انسولین [۷ و ۱٦] اثر می‌گذارد. در مجموع ۹۵-۹۰ درصد از بیماران دیابتی از نوع NIDDM گزارش شده‌اند. حدود ٦ درصد از افراد جوامع غربی به این بیماری هتروژن مبتلا می‌باشند. عامل اولیه دخیل در این شیوع بالا، شدت فزاینده چاقی در افراد است که یکی از مهمترین علل پاتوژنز دیابت می‌باشد [۱۷ و ۱۸]. اغلب بیماران مبتلا به NIDDM افزایش وزن دارند [۱۹ و ۲۰]. بنابراین، امروزه NIDDM یک بیماری اندوکرین پیشرونده در کشورهای غربی است که ۸-۵ درصد این افراد به آن مبتلا بوده و سالانه نیز ۵ درصد به این تعداد افزوده می‌شود [۲۱].

طی چند سال گذشته دانش ما از مکانیسم‌های بیوشیمیایی مرتبط با پیشرفت دیابت بطور قابل توجهی افزایش یافته است. طیف وسیعی از اهداف مولکولی دارویی در این مسیرها وجود دارند که این اهداف بر اساس نقش‌های مورد انتظاری که در تنظیم یک یا چند فرایند حیاتی در پاتوژنز دیابت ایفا می‌کنند، شناسایی شده‌اند. چندین مکانیسم وجود دارند که می‌توانند به عنوان روش‌های درمانی جدید در نظر گرفته شوند: ۱) روش‌هایی با هدف کاهش شدید تولید گلوکز توسط کبد، ۲) مکانیسم‌هایی به منظور افزایش تولید گلوکز تحریک شده با انسولین، ۳) اهداف خاص مولکولی در مسیر سیگنالینگ انسولین و ٤) رویکردهای جدید برای تغییر متابولیسم چاقی و لیپیدها. هدف نهایی در تمامی این روش‌ها افزایش خالص در عملکرد انسولین می‌باشد [۲۲]. در طول چند دهه گذشته، محققان متعددی به بررسی جنبه‌های ناشناخته دیابت پرداخته‌اند و در نتیجه آن اطلاعات شگفت‌آوری راجع به این بیماری کسب گردیده است. با این حال، هنوز دیابت ملیتوس و بسیاری از مکانیسم‌های سلولی مربوط به عملکرد انسولین ناشناخته باقی مانده است [٤].

۱-٤. سیگنالینگ انسولین در ترانسپورت گلوکز

انسولین تنظیم کننده اصلی سطح گلوکز خون است. انسولین انسانی از لحاظ زیستی فعال از دو زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده است: زنجیره A (۲۱ اسید آمینه) و زنجیره B (۳۰ اسید آمینه). این دو زنجیره توسط دو پیوند دی‌سولفیدی در موقعیت‌های $A\text{-}Cys^{7}/B\text{-}Cys^{7}$ و $A\text{-}Cys^{20}/B\text{-}Cys^{19}$ بهم متصل شده‌اند. همچنین یک پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای بین $A\text{-}Cys^{6}/A\text{-}Cys^{11}$ وجود دارد [۲۳]. انسولین از طریق فعال کردن مجموعه‌ای از آبشارهای سیگنالینگ درون سلولی، طیف وسیعی از فرآیندهای متابولیک و میتوژنیک را آغاز می‌کند [۲٤ و ۲۵]. اثر انسولین با اتصال آن به گیرنده هتروتترامری (IR) سطح سلول آغاز می‌گردد. این گیرنده متشکل از دو زیرواحد α و دو زیرواحد β می‌باشد که از طریق پیوندهای دی‌سولفید به یکدیگر متصل شده‌اند [۲٦]. انسولین به زیرواحدهای α

خارج سلولی گیرنده خود اتصال می‌یابد که این امر منجر به فعال‌سازی زیرواحدهای β و اتوفسفریلاسیون بخش سیتوزولی گیرنده در باقیمانده تیروزین می‌گردد [۲۷]. باقیمانده تیروزین فسفریله در زیرواحد آلفای IR جایگاه‌هایی را برای اتصال سوبسترای گیرنده انسولین[1] (IRS)، خانواده‌ای که حاوی دمین‌های Src همولوژی ۲ (SH2) می‌باشد، فراهم می‌کند. IRSها حاوی چندین جایگاه بالقوه فسفریلاسیون تیروزین در موتیف‌های توافقی[2] می‌باشد که توسط تیروزین کینازها شناسایی می‌گردد [۲۸]. تاکنون شش ایزوفرم از IRS شناسایی شده است [۲۹]. IRS-1 و IRS-2 به طور گسترده در بافت‌هایی که تصور می‌شود در هموستازی گلوکز و لیپید حائز اهمیتند، بیان می‌گردند [۳۰ و ۳۱] و بنابراین در ماهیچه، کبد، بافت چربی و جزایر پانکراس یافت می‌شوند. هرچند که به نظر می‌رسد IRS-1 نسبت به IRS-2 اهمیت بیشتری در متابولیسم ماهیچه دارد، تصور می‌شود که IRS-2 در کبد و جزایر سلول‌های β نقش مهمتری را ایفا نماید [۳۱]. IRS-1 به محض فسفریله شدن توسط IR، به زیرواحد تنظیمی p85 فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳- کیناز (PI3K) متصل شده که این امر منجر به فعال شدن زیرواحد کاتالیتیکی p110 آن می‌گردد [۳۲]. فعال‌سازی PI3K شامل انتقال آن به غشای پلاسمایی در نتیجه تحریک توسط انسولین خارج سلولی است. تاکنون، پنج ایزوفرم از زیرواحدهای تنظیمی PI3K در عضله اسکلتی شناسایی شده است، از جمله دو ایزوفرم کلاسیک (p85α و p85β) و سه ایزوفرم (p55α، p55γ و p50α) [۳۳]. PI3K فعال انتقال گروه γ- فسفات ATP را بطور اختصاصی به موقعیت D3 فسفواینوزیتیدهای سلولی کاتالیز می‌کند. این واکنش منجر به تولید فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳و٤و٥- تری‌فسفات (PIP3) از فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳ و٤- بیس‌فسفات (PIP2) می‌گردد [٣٤ و ٣٥]. این فسفولیپیدهای منحصربفرد به عنوان جایگاه‌های اتصالی برای پروتئین‌های سیتوپلاسمی دارای دمین‌های همولوژی پلکسترین[3] (PH) عمل می‌کنند که این پروتئین‌ها عبارتند از: سرین/ترئونین کینازها،

[1]- Insulin receptor substrate
[2]- Consensus motifs
[3]- Pleckstrin homology