عنوان:

ارزیابی بیان *miR-21* و *miR-103a* لاروتوکسوکارا کنیس *(Toxocara canis)* در تشخیص توکسوکاریازیس با روش Real-time PCR در انسان و رت

پایان نامه برای دریافت درجه دکتری تخصصی PhD

در رشته انگل شناسی پزشکی

نگارنده:

وحید رییسی

اساتید راهنما:

دکتر محمد باقر رکنی–دکتر محمد زیبایی

اساتید مشاور:

دکتر مهدی محبعلی–دکتر عشرت بیگم کیا–دکتر عباس رحیمی فروشانی

۱۳۹۹

شماره پایان نامه: ۹۴۲۱۳۵۳۰۰۳

چکیده فارسی

ارزیابی بیان *miR-21*و *miR-103a* لاروی*توکسوکارا کنیس*(*Toxocara canis*) درتشخیص توکسوکاریازیس به روش Real-time PCR درانسان و رت

مقدمه:

توکسوکاریازیس انسانی به دلیل مهاجرت لاروهای گونه های *توکسوکارا* (بخصوص گونه کنیس در انسان) ایجاد می‌گردد. انسان با خوردن تخم‌های جنین دار شده در خاک (ژئوفاژی، پیکا) و یا سبزیجات خام به انگل آلوده می‌شوند. معمولا کودکان بیشتر در معرض آلودگی قرار دارند. اگرچه به نظر می رسد بسیاری از عفونت ها بدون علامت هستند، اما رابطه ی بین توکسوکاریازیس، صرع و آسم نگرانی قابل توجهی را ایجاد کرده است. شیوع بیماری در انسان در جهان متفاوت بوده ولی معمولا بین ۱۰ تا ۳۰ درصد گزارش شده است. تشخیص این عفونت در انسان عمدتاً با روش های سرولوژیک و تشخیص قطعی از طریق بیوپسی از بافت آلوده می باشد. دارویآلبندازول به عنوان درمان انتخابی این بیماری، تایید شده است.

روش کار:

بخش عملی این مطالعه، شامل چهار بخش مجزا بود:
مرحله انگل شناسی،مرحله سرولوژی،استخراج RNAاز نمونه های پلاسما و مرحله مولکولی
در مرحله انگل شناسی،پس از جداسازی کرم های بالغ *توکسوکارا کنیس*از سگ و تشخیص مورفولوژی آنها و جدا سازی تخم ها از کرم بالغ ماده، رت های سفید نر نژاد ویستار با تخم های لارودار شده ی*توکسوکارا کنیس*آلوده شدند.
در مرحله سرولوژی، نمونه های پلاسمای رت و انسان که از قبل تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد، ذخیره شده بودند، توسط NovaTec *Toxocara canis* IgG-ELISA Kits، آزمایش شدند.
پس از این مرحله، به روش دستی و با استفاده از ترایزول از تمامی نمونه ها (مورد مطالعه و کنترل)total RNAاستخراج شد. صحت کمی و کیفی تمام RNA های اشتخراج شده به ترتیب توسط دستگاه نانودراپ و روش الکتروفورز مبتنی بر ژل آگارز، تایید گردید.
در آخرین مرحله از روش کار، پس از ساخت cDNAs از RNA ی نمونه های مورد مطالعه (۳۰ نمونه پلاسمای افراد دارای آنتی بادی IgG ضد گونه های توکسوکارا و ۷ نمونه پلاسمای رت های آلوده شده به تخم *توکسوکارا کنیس*) و نمونه های کنترل(۷ نمونه های پلاسماهای رت سالم و ۳۰

نمونهپلاسمای انسان فاقد آنتی بادی IgG ضد توکسوکارا)، ارزیابی *miR-103a* و *miR*-21 با روشReal-time PCRدر تشخیص توکسوکاریازیس در انسان و رت انجام گرفت. در تمامی مراحل آزمایش، نمونه های پلاسما و RNA استخراج شده در دمای ۸۰-درجه سانتی گراد و نمونه های cDNAs در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

یافته ها:

پس از انجام آزمایشات، نتایج توسط نرم افزار REST،فرمول Livak و آزمون آماری کمی T-test ارزیابی شد. بر اساس نتایج به دست آمده، نشان داده شد،درنمونه های رت،در دو گروه مورد مطالعه و کنترل، دو ژن *miR-21* و *miR-103a*، افزایش بیان قابل توجهی وجود نداشت. این افزایش بیان، از لحاظ آماری نیز فاقد ارتباط معنادار بود($P>0.05$).

همچنین آنالیزهای انجام شده بر روی نمونه های انسانی، نشان داد که در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل، تنها در ژن *miR-21* افزایش بیان ۰/۳ برابری با نرم افزار REST وجود داشت ، که این میزان تفاوت در بیان، بین این دو گروه، اگرچه با کمک روش آماری T-test معنادار بود($P<0.05$) ، لیکن با توجه به مطالعات پیشین، این میزان افزایش در بیان، در مقایسه بین دو گروه، کمتر از ۱/۵ برابر بود (Fold change ≤ 1.5, $P>0.05$).

نتیجه گیری:

این نتایج نشان داد که گرچه افزایش بیان*miR-21* در نمونه های انسانی مورد مطالعه،مشاهده شد، ولی به دلایلی همچون: ناکافی بودن و تفاوت در روش های آماری مختلف و نرم افزارهای مرتبط در تعیین بیومارکرها در نمونه های بیولوژیک افراد در مطالعات پیشین،تنوع در انتخاب نمونه، تنوع ساختاری بیومارکرها و تغییر بیان ژن کمتر از ۱/۵ برابر در نمونه های مورد مطالعه نسبت به نمونه های کنترل، *miR-21 و miR-103a* در تشخیص توکسوکاریازیس انسانی، نمی تواند ویژگی های کامل یک بیومارکر تشخیصی را داشته باشند.

کلمات کلیدی:

تشخیص، *توکسوکارا کنیس*، توکسوکاریازیس انسانی،miRNAs ،لارو،رت.