بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه رساله ی دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

اثر الاجیک اسید در مهار سمیت سلولی و ژنی ناشی از آکریل آمید در لنفوسیت های ایزوله ی انسانی

اساتید راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

الهه بقال دهخوارقانی

شماره پایان نامه: د – ۷۵ /۱ ۱۴۰۰

فروردین ۱۴۰۰

پروردگارا

من به حسن ستایش تو افتتاح سخن میکنم و زبان به ثنای تو می گشایم، بزرگواری تو را مدح میگویم درصورتی که مدح تو را حد و نهایت نیست. تورا سپاس میگویم که مرا یاری نمودی تا بتوانم قدم کوچکی در راه علم بردارم.

ماحصل اندوخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانیشان آرامش بخش من است:

به پدر و مادر عزیزم. آموزگارانی که درس محبت و فداکاری و بردباری را نخستین بار در مکتب آن ها آموختم. به پاس تحمل چندین سال هجر و دوری

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

و به مشاور عزیزم که در طی این سال ها خالصانه دراین مسیر سخت با من هم گام شد تا در زیر سایه ی علم و تجربه اش از گزند حوادث در امان باشم. باشد که بتوانم الطاف و رحمت خدای را که در موقعیت های مهم سمت من روانه میشود شکر بگویم.

تقدیر و تشکر میکنم از :

استاد بزرگوارم، جناب آقای دکتر احمد سلیمی

که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی های کارساز و سازنده بارور ساختند و درکمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی از هیچ کمکی در این زمینه دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی و مشاوره ی این رساله را برعهده گرفتند.

باشد که این خردترین بخشی از زحمات ایشان را سپاس گوید.

چکیده فارسی پایان نامه

مقدمه: آکریل آمید، یک آلاینده مهم است که در طی فرآوری مواد غذایی در دمای بالا ایجاد می شود. به دلیل سمیت عصبی بالقوه، سمیت در دستگاه تولیدمثل، سمیت کبدی، سمیت ایمنی، سمیت ژنی و اثرات سرطان زایی، این آلاینده غذایی به عنوان یک نگرانی مهم در سلامتی انسان شناخته شده است. مطالعات قبلی نشان داد که سمیت ناشی از آکریل آمید با متابولیت فعال آکریل آمید توسط آنزیم سیتوکروم P450 ، استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندری و آسیب DNA ارتباط دارد. در مطالعه حاضر، ما نقش استرس اکسیداتیو در سمیت ژنی آکریل آمید و نقش بالقوه درمانی الاجیک اسید (EA) در لنفوسیت های انسانی را بررسی کردیم.

روش کار: لنفوسیت های انسانی به طور همزمان با غلظت های مختلف EA (۱۰ ، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) و آکریل آمید (۵۰ میکرومولار) به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تحت تیمار قرار گرفتند. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، پارامترهای سمیت مانند سمیت سلولی، تشکیل ROS، محتوای اکسید شده/ کاهش گلوتاتیون (GSH / GSSG) ، سطح مالون دی آلدئید (MDA) ، یکپارچگی غشاء لیزوزومی، آسیب غشای میتوکندری ($\Delta\Psi m$) و ۸-هیدروکسی ۲ " -دئوکسی گوانوزین (8-OHdG) با استفاده از ارزیابی بیوشیمیایی و فلوسیتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که آکریل آمید (۵۰ میکرومولار) به طور قابل توجهی سمیت سلولی، تشکیل ROS، اکسیداسیون GSH، پراکسیداسیون لیپید، آسیب غشای میتوکندری ، آسیب لیزوزومی و DNA را در لنفوسیت های انسانی افزایش داد. از طرف دیگر، درمان همزمان با الاجیک اسید (۲۵ و ۵۰ میکرومولار) استرس اکسیداتیو ناشی از آکریل آمید را مهار می کند که متعاقباً منجر به کاهش سمیت سلولی، اکسیداسیون GSH، پراکسیداسیون لیپید، آسیب غشاء میتوکندری، آسیب لیزوزومی و DNA می شود.

بحث و نتیجه گیری: روی هم رفته، این نتایج نشان می دهد که احتمالاً قرار گرفتن در معرض الاجیک اسید با غذاهای حاوی آکریل آمید می تواند باعث کاهش آسیب های میتوکندریایی، لیزوزومی و DNA و استرس اکسیداتیو ناشی از آکریل آمید در بدن انسان شود.

کلمات کلیدی: آکریل آمید، سمیت سلولی، سمیت ژنی، لنفوسیت های انسانی، استرس اکسیداتیو، الاجیک اسید

فهرست مطالب

فصل اول :مقدمه ۱

۱-۱-آکریل آمید ۲

۱-۱-۱-خصوصیات فیزیکوشیمیایی ۲

۱-۱-۲-تولید آکریل امید در غذا ۳

۱-۱-۳-مکانیزم تولید آکریل آمید در مواد غذایی ۴

۱-۱-۴-میزان مواجهه روزانه با آکریل آمید ۵

۱-۱-۵-کاربردهای آکریل آمید ۶

۱-۱-۶-توکسیکوکینتیک ۷

۱-۱-۷- سمیت آکریل آمید ۷

۱-۲- لنفوسیت ۱۰

۱-۲-۱ – تاثیر آکریل آمید بر لنفوسیت ها ۱۶

۱-۳-لیزوزوم ۱۹

۱-۳-۱-آندوسیتوز لیزوزومی ۲۱

۱-۳-۲-آندوسیتوز لیزوزومی ۲۴

۱-۳-۳- تاثیر آکریل آمید بر اتوفاژی لیزوزومی ۲۴

۱-۴-میتوکندری ۲۶

۱-۴-۱-سازمان و عملکرد میتوکندری ۲۶

۱-۴-۲- تاثیر آکریل آمید بر میتوکندری ۲۸

۱-۵-الاجیک اسید ۲۹

۱-۵-۱-فارماکوکینتیک ۳۰

۱-۵-۲-خواص آنتی اکسیدانی ۳۱

۱-۵-۳-خواص ضدالتهابی ۳۳

۱-۵-۴-الاجیک اسید و سندرم متابولیک ۳۵

۱-۵-۵-خواص ضد توموری و ضد سرطانی ۳۶

۱-۵-۶- الاجیک اسید و محافظت از پوست ۳۹

۱-۵-۷-سایر ویژگی های الاجیک اسید ۴۰

۱-۵-۸-خلاصه چشم انداز و نتیجه گیری ۴۱

۱-۶-بررسی متون ۴۴

۱-۷-اهداف ۴۷

۱-۷-۱-هدف کلی ۴۷

۱-۷-۲-اهداف اختصاصی ۴۷

۱-۸-فرضیات یا سئوالات پژوهش ۴۷

فصل دوم: روش کار ۴۹

۲-۱-نوع مطالعه ۵۰

۲-۲-مکان انجام مطالعه ۵۰

۲-۳-طراحی مطالعه ۵۰

۲-۴-مواد و دستگاه های مورد استفاده ۵۱

۲-۴-۱-مواد شیمیایی ۵۱

۲-۴-۲-وسایل آزمایشگاهی و دستگاه ها ۵۲

۲-۵-جمع آوری نمونه ۵۳

۲-۶- جداسازی لنفوسیتها ۵۳

۲-۷-تیمار لنفوسیت های جدا شده ۵۴

۲-۸- اندازه گیری زنده مانی سلول ها ۵۴

۲-۹- سنجش رادیکال های فعال اکسیژن ۵۵

۲-۹-۱- تهیه بافر PBS ۵۵

۲-۹-۲- تهیه بافر تنفسی(تعیین کنده میزان ROS) ۵۶

۲-۹-۳- اندازه گیری ROS ۵۶

۲-۱۰- غشاء میتو کندری ۵۷

۲-۱۰-۱- تهیه بافر تعیین کننده میزان سقوط پتانسیل(MMPc) ۵۷

۲-۱۰-۲- اندازه گیری میزان سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری ۵۷

۲-۱۱- میزان آسیب لیزوزومی ۵۸

۲-۱۱-۱- تهیه بافر تعیین کننده میزان آسیب لیزوزومی ۵۸

۲-۱۱-۲- اندازه گیری آسیب لیزوزومی ۵۹

۲-۱۲- لیپید پراکسیداسیون ۵۹

۲-۱۲-۱- اندازه گیری MDA ۶۰

۲-۱۳-محتوای GSH ۶۰

۲-۱۳-۱-بافر فسفات(۰.۱مولار) ۶۰

۲-۱۳-۲- بافر Tris HCL(۵۰۰mM) ۶۱

۲-۱۳-۳- اندازه گیری GSH ۶۱

۲-۱۴-تعیین میزان (8-OHdG) ۶۲

۲-۱۵-تحلیل آماری ۶۲

فصل سوم: نتایج ۶۳

۳-۱- بررسی سمیت سلولی Error! Bookmark not defined.

۳-۳- اندازه گیری MMPc ۶۸

۳-۴- ارزیابی آسیب لیزوزومی ۷۰

۳-۵- ارزیابی MDA ۷۲

۳-۶- ارزیابی مقدار GSH ۷۴

۳-۷- بررسی میزان 8-OHdG ۷۶

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۷۸

۴-۱- بحث ۷۹

۴-۲- نتیجه گیری ۸۶

۴-۳- پیشنهادات ۸۷

۴-۴- محدودیت ها ۸۷

صفحه اول مقاله ۸۸

منابع ۸۹

مصوبه کمیته اخلاق ۱۰۰

فهرست علائم، نشانه ها و اختصارات

ردیف	علامت اختصاری	معادل انگلیسی	معادل فارسی
۱	AA	Acrylamide	آکریل آمید
۲	EA	Elagic acid	الاجیک اسید
۳	8-OHdG	8-hydroxy-2' -deoxyguanosine	۸-هیدروکسی-۲ '-دئوکسی گوانوزین
۴	ROS	Reactive Oxygen Species	گونه های اکسیژن واکنش گر
۵	GSH	Glutathione	گلوتاتیون
۶	NO	Nitric oxide	نیتریک اکساید
۷	ATP	Adenosine triphosphate	آدنوزین تری فسفات
۸	IL	Interleukin	اینترلوکین
۹	COX-2	Cyclooxygenase 2	سیکلواکسیژناز ۲
۱۰	NF-kB	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells	فاکتور هسته ای کاپا تقویت کننده زنجیره سبک سلولهای B فعال شده
۱۱	HDL	High-density lipoprotein	لیپوپروتئین با چگالی بالا
۱۲	LDH	Lactate dehydrogenase	لاکتات دهیدروژناز
۱۳	MAPK	Mitogen-activated protein kinase	پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن
۱۴	ELISA	Enzyme-Linked Sorbent Assay	روش جذب مرتبط با آنزیم
۱۵	PBS	Phosphate Buffered Saline	بافر فسفات سالین
۱۶	TRIS-HCL	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1, 3-propanediol hydrochloride	۲-آمینو ۲- (هیدروکسی متیل) -۱ ، ۳-پروپاندیول هیدروکلرید
۱۷	MMPC	Mitochondrial Membrane Potential Collapse	سقوط احتمالی غشای

			میتوکندریایی
۱۸	TCA	Trichloroacetic acid	اسید تری کلرواستیک
۱۹	TBA	Thiobarbituric acid	اسید تیوباربیتوریک
۲۰	MDA	Malondialdehyde	مالون دی آلدئید
۲۱	MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization	نفوذ پذیری غشای خارجی میتوکندری
۲۲	GSSG	Glutathione Disulfide	گلوتاتیون دی سولفید
۲۳	LMP	Lysosomal membrane permeabilization	نفوذ پذیری غشای لیزوزومی
۲۴	ANOVA	Analysis Of Variance	تحلیل واریانس
۲۵	MPTP	Mitochondrial permeability transition pore	منافذ انتقال نفوذ پذیری میتوکندری

فهرست جداول

جدول ۲- ۱ مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه _____ ۵۱
جدول ۲- ۲ دستگاه های استفاده شده در این مطالعه _____ ۵۲
جدول ۲- ۳ اجزای تشکیل دهنده بافر PBS _____ ۵۵
جدول ۲- ۴ اجزای بافر تنفس _____ ۵۶
جدول ۲- ۵ اجزای بافر MMP _____ ۵۷
جدول ۲- ۶ لیزوزومی _____ ۵۸
جدول ۲- ۷ محلول های استفاده شده در تعیین MDA _____ ۵۹
جدول ۲- ۸ اجزای بافر فاسفات ۰/۱ مولار _____ ۶۰

فهرست نمودارها و عکس ها

شکل۱- ۱ ساختار دو بعدی (A)، سه بعدی (B)، و کریستالی (C) آکریل آمید (۶). ۳

شکل۱- ۲ تولید آکریل آمید از N-GLYCOSIDES ، A . ۵

شکل۱- ۳ اندامهای لنفاوی انسان (۴۷) ۱۱

شکل۱- ۴ آزمایشی که نشان داد لنفوسیت ها برای پاسخ های ایمنی سازگار به آنتی ژن های خارجی مورد نیاز هستند (۴۷) ۱۲

شکل۱- ۵ روشی که در آن سیستم ایمنی ذاتی به فعال سازی سیستم ایمنی تطبیقی کمک می کند (۴۷) ۱۳

شکل۱- ۶رشد و فعال سازی سلول های T و B (47) ۱۴

شکل۱- ۷میکروگراف الکترونی از لنفوسیت های غیر فعال و فعال شده (۴۷) ۱۵

شکل۱- ۸ پمپ کردن پروتونها به داخل لیزوزوم(۴۷) ۲۱

شکل۱- ۹ اندوسیتوز و تشکیل لیزوزوم (۴۷) ۲۳

شکل۱- ۱۰ لیزوزومها در فاگوسیتوز و اتوفاژی (۴۷) ۲۴

شکل۱- ۱۱ ساختار میتوکندری (۴۷) ۲۶

شکل۱- ۱۲ متابولیسم در ماتریس میتوکندری (۴۷) ۲۷

شکل۱- ۱۳ ساختار مولکولی الاجیک اسید (۶۶) ۲۹

شکل۱- ۱۴ مکانیسم پیشنهادی شلاته کنندگی اثر الاجیک اسید بر روی فلزات مختلف (۶۶) ____ ۳۲

شکل۱- ۱۵ الاجیک اسید و اثرات آنتی هایپرگلایسمی بر متابولیم گلوکز (سمت چپ) و اثرات الاجیک اسید بر متابولیسم لیپیدها و کلسترول و پیامدهای مثبت آنها در تشکیل آتروژنیک (سمت راست) (۶۶) _____ ۳۵

شکل ۲- ۱ شمایی از مراحل کلی این مطالعه _____ ۵۰

شکل۳- ۱ نتایج بدست آمده از تست MTT مربوط به زنده مانی سلول ها _____ ۶۵

شکل۳- ۲ نتایج مربوط به تولید ROS در لنفوسیت های تیمار شده با آکریل آمید و غلظت های مختلف الاجیک اسید _____ ۶۷

شکل۳- ۳ نتایج مربوط به ارزیابی عملکرد میتوکندری در لنفوسیت های تیمار شده با آکریل آمید و غلظت های مختلف الاجیک اسید _____ ۶۹

شکل۳- ۴ نتایج مربوط به ارزیابی ناپایداری غشاء لیزوزومی در لنفوسیت های تیمار شده با آکریل آمید و غلظت های مختلف الاجیک اسید _____ ۷۱

شکل۳- ۵ نتایج مربوط به ارزیابی MDA در لنفوسیت های تیمار شده با آکریل آمید و غلظت های مختلف الاجیک اسید _____ ۷۳

شکل۳- ۶ نتایج بدست آمده از ارزیابی گلوتاتیون احیاء (A): اثر غلظت های مختلف الاجیک اسید بر میزان GSH و (B): اثر غلظت های مختلف الاجیک اسید بر میزان GSSG _____ ۷۵

شکل۳- ۷ نتایج مربوط به ارزیابی 8-OHDG در لنفوسیت های تیمار شده با آکریل آمید و غلظت های مختلف الاجیک اسید _____ ۷۷