دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه‌ی دکتری حرفه‌ای داروسازی

عنوان:

اثرات پیشگیرانه شیمیایی هسپریدین بر لوکمی ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره (ENU) در یک مدل موش سوری

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

بهاره عسگری

بهار ۱۴۰۲ شماره پایان نامه: د-۱۶۶

تقدیم

این پایان نامه تقدیم می‌شود به :

پدر مهربانم

و

روح پاک مادرم

تشکر و قدردانی

تشکر قلبی و لسانی خود را از استاد بزرگوار و دانشمند گرانقدر جناب آقای دکتر احمد سلیمی که زحمت راهنمایی این پایان نامه را عهده‌دار گردیدند ابراز می‌دارم و توفیقات روز افزون ایشان را توأم با صحت و سعادت از خداوند متعال مسئلت دارم.

همچنین از خواهر عزیزم، دوستان، همکلاسی‌ها و تمام کسانی که مرا در انجام این تحقیق یاری کردند کمال تشکر را دارم.

چکیده:

مقدمه: لوکمی به تکثیر نئوپلاستیک سلول‌های لنفوئیدی و میلوئیدی در نتیجه جهش در سلول‌های بنیادی سازنده خون اشاره دارد. لوکمی با تجمع غیرطبیعی گلبول‌های سفید نابالغ (بلاست) در خون و اندام‌ها مشخص می‌شود. با این‌حال، این سلول‌های سرطانی با تعداد زیاد، قادر به انجام عملکردهای طبیعی سلول‌های خونی نیستند، در نتیجه باعث افزایش حساسیت به عفونت می‌شوند. ENU [1]یک عامل آلکیله کننده با فرمول شیمیایی $C_3H_7N_3O_2$ است که یک جهش‌زای بسیار قوی است. در میان فلاونوئیدهای گیاهی، هسپریدین یک ترکیب فعال زیستی است که در اپی‌کارپ، اندوکارپ و مزوکارپ گونه‌های مختلف مرکبات وجود دارد. مطالعات اخیر اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد ویروسی و محافظت در برابر اختلالات قلبی-عروقی این ترکیب را نشان داده‌اند.

مواد و روش‌ها: موش‌های ماده به سه گروه هفت تایی: گروه کنترل، گروه ENU و گروه هسپریدین+ENU تقسیم شدند. هسپریدین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) یک بار در روز به مدت ۳۰ روز به موش-های گروه هسپریدین+ENU تزریق شد. نرمال سالین یک بار در روز به روش داخل صفاقی به موش‌های گروه کنترل و ENU به مدت ۳۰ روز تزریق شد. در روز ۳۱ ام، ENU (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تک دوز، داخل صفاقی) به موش‌های گروه ENU و گروه هسپریدین+ENU تزریق شد. موش‌ها بمدت ۹۰ روز از نظر تغییرات وزن و حال عمومی‌کنترل شدند. در پایان ۱۵۰ روز بعد از تزریق ENU، از طریق تزریق کتامین/زایلازین (۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین+۱۳میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین، داخل صفاقی) یوتانزی شدند. نمونه خون تازه از قلب موش‌ها جمع‌آوری و بررسی شد.

نتایج : نتایج ما نشان داد که هسپریدین به طور معناداری تا ۸۶ درصد زنده‌مانی موش‌ها را بعد از مواجهه با ENU افزایش می‌دهد و مانع تغییرات وزن محسوس بعد از مواجهه با ENU می‌شود. همچنین هسپریدین پارامترهای سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری(MMP)، گونه‌های فعال اکسیژن(ROS)، پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب غشای لیزوزم را بهبود بخشید. اما در سطح گلوتاتیون احیاء و اکسیده تغییر معناداری ایجاد نشد.

بحث و نتیجه گیر: در نهایت نتایج ما نشان داد که هسپریدین به طور معناداری توانست مانع بروز اثرات سمی ان-اتیل-ان نیتروزاوره شود.

کلمات کلیدی: لوکمی، ان-اتیل-ان نیتروزاوره، هسپریدین

[1] N-ethyl-n-nitrosourea

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و نتیجه‌گیری

۱-۱- مقدمه و بیان مسئله ۲

۱-۲- محیط و سرطان ۲

۱-۳- پیشگیری از سرطان ۴

۱-۴- عوامل آلکیله کننده ۵

۱-۵- استرس اکسیداتیو ۶

۱-۶- تشکیل بیولوژیک و عملکرد ROS ۷

۱-۶-۱- سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدانی در مدیریت ROS ۱۰

۱-۷- معرفی ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۱۱

۱-۷-۱- رژیم‌های تزریق و سرعت جهش زایی ENU ۱۳

۱-۷-۲- کینتیک ENU ۱۳

۱-۸- لوکمی ۱۴

۱-۸-۱- عوامل خطر ژنتیکی و محیطی در ایجاد لوکمی ۱۵

۱-۸-۲- اپیدمیولوژی لوکمی ۱۶

۱-۸-۳- انواع لوکمی ۱۶

۱-۸-۳-۱- لوکمی لنفوبلاستیک حاد ۱۶

۱-۸-۳-۲- لوکمی حاد میلوژن ۱۶

۳-۳-۸-۱- لوکمی لنفوسیتی مزمن..... ۱۷
۴-۳-۸-۱- لوکمی مزمن میلوژن..... ۱۷
۴-۸-۱- پاتوفیزیولوژی..... ۱۷
۱-۴-۸-۱- پاتوفیزیولوژی لوکمی‌حاد..... ۱۷
۲-۴-۸-۱- پاتوفیزیولوژی لوکمی مزمن..... ۱۸
۵-۸-۱- تظاهرات بالینی..... ۱۸
۱-۵-۸-۱- تظاهرات بالینی لوکمی حاد..... ۱۸
۲-۵-۸-۱- تظاهرات بالینی لوکمی مزمن..... ۱۹
۶-۸-۱- ارزیابی لوکمی..... ۱۹
۹-۱- ترکیبات گیاهی و کاربرد آن‌ها در درمان بیماری‌ها..... ۲۰
۱۰-۱- هسپریدین..... ۲۰
۱-۱۰-۱- بیوسنتز هسپریدین..... ۲۱
۲-۱۰-۱- کینتیک هسپریدین..... ۲۳
۱-۲-۱۰-۱- جذب هسپریدین..... ۲۳
۲-۲-۱۰-۱- متابولیسم هسپریدین..... ۲۴
۳-۲-۱۰-۱- دفع هسپریدین..... ۲۵
۳-۱۰-۱- اثرات آنتی‌اکسیدان هسپریدین..... ۲۶
۴-۱۰-۱- رابطه ساختار شیمیایی هسپریدین با اثرات آنتی‌اکسیدانی..... ۲۷
۵-۱۰-۱- اثرات ضدالتهابی هسپریدین..... ۳۲

۶-۱۰-۱- مکانیسم‌های مولکولی اثر هسپریدین..... ۳۳

۷-۱۰-۱- فعالیت ضد رگ‌زایی و ضد متاستاز هسپریدین..... ۳۵

۱۱-۱- بررسی متون..... ۴۷

۱۲-۱- اهداف و فرضیات..... ۴۸

۱-۱۲-۱- هدف کلی..... ۴۸

۲-۱۲-۱- اهداف اختصاصی..... ۴۸

۳-۱۲-۱- هدف کاربردی..... ۴۹

۴-۱۲-۱- فرضیات تحقیق..... ۴۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۱-۲- نوع مطالعه..... ۵۱

۲-۲- مکان انجام مطالعه..... ۵۱

۳-۲- حیوانات مورد مطالعه، مواد شیمیایی و تجهیزات آزمایشگاهی..... ۵۱

۱-۳-۲- مواد شیمیایی..... ۵۱

۲-۳-۲- تجهیزات و وسایل مورد مطالعه..... ۵۳

۴-۲- محتویات و طرز تهیه بافرها و محلول‌ها..... ۶۲

۱-۴-۲- بافر فسفات (۰.۱ مولار)..... ۶۲

۲-۴-۲- بافر مورد استفاده در سنجش پراکسیداسیون لیپیدی..... ۶۲

۱-۲-۴-۲- تهیه محلول٪۲۰ وزنی/ حجمی تری‌کلرواستیک اسید..... ۶۳

۲-۲-۴-۲- تهیه محلول ٪۰/۵ وزنی/ حجمی تیوباربیتوریک اسید..... ۶۳

۵-۴-۲- بافرهای مورد استفاده در سنجش گلوتاتیون اکسیده(**GSSG**)..... ۶۳

۱-۵-۴-۲- بافر Tris-Hcl..... ۶۳

۲-۵-۴-۲- محلول واکنش گلوتاتیون اکسیده..... ۶۳

۵-۲- آماده سازی مواد جهت تزریق..... ۶۴

۱-۵-۲- آماده سازی هسپریدین..... ۶۴

۲-۵-۲- آماده سازی ان اتیل ان نیتروز اوره..... ۶۵

۶-۲- گروه بندی حیوانات و دوره درمانی..... ۶۶

۷-۲- روش انجام آزمایشات..... ۶۸

۱-۷-۲- جداسازی لنفوسیت‌ها از نمونه خون جمع آوری شده از قلب موش..... ۶۸

۲-۷-۲- اندازه گیری تولید ROS در لنفوسیت..... ۶۹

۳-۷-۲- سنجش میزان آسیب لیزوزومی..... ۷۰

۴-۷-۲- سنجش میزان افت پتانسیل غشاء میتوکندری..... ۷۱

۵-۷-۲- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی..... ۷۲

۶-۷-۲- سنجش میزان گلوتاتیون..... ۷۳

فصل سوم: نتایج

۳- ۱- اثر پیش درمانی با هسپریدین بر تغییرات وزن موش‌ها..... ۷۶

۲-۳- اثر پیش درمانی با هسپریدین بر زنده مانی موش‌ها بعد از تزریق ENU..... ۷۷

۳-۳- اثرات پیش درمانی با هسپریدین بر آسیب لیزوزمی در لنفوسیت‌های استخراج شده از خون قلب موش..... ۷۸

۴-۳- اثرات پیش درمانی با هسپریدین بر تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) سلول لنفوسیت ناشی از ENU..... ۷۹

۵-۳- اثر پیش درمانی با هسپریدین بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) ناشی از ENU..... ۸۰

۴-۳- اثر پیش درمانی با هسپریدین بر استرس اکسیداتیو (GSH، GSSG، MDA ایجاد شده توسط ENU در لنفوسیت‌ها)..... ۸۱

۱-۴-۳- اثر پیش درمانی با هسپریدین بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ENU در لنفوسیت‌ها.. ۸۱

۲-۴-۳- اثرپیش درمانی با هسپریدین بر تغییرات گلوتاتیون احیاء (GSH) ناشی از ENU..... ۸۲

۳-۴-۳- اثر پیش درمانی با هسپریدین برتغییرات گلوتاتیون دی سولفید اکسیده (GSSG) ناشی ازENU..... ۸۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۱-۴- بحث..... ۸۵

۲-۴- نتیجه گیری..... ۹۹

۳-۴- محدودیت‌ها..... ۹۹

۴-۴- پیشنهادات..... ۹۹

فهرست منابع و مآخذ..... ۱۰۰

فهرست اختصارات و اصطلاحات

AGEs: Advanced Glycation End-products

AHH: Aryl Hydrocarbon Hydroxylase

ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia

ALP: Alkaline Phosphatase

ALT: Alanine Transaminase

AML: Acute Myelogenous Leukemia

APL: Acute Promyelocytic Leukemia

AST: Aspartate Transaminase

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor

CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia

CML: Chronic Myeloid Leukaemia

COX-2: Cyclooxygenase-2

DNA: Deoxyribo Nucleic Acid

ENU: N-ethyl N-nitrosourea

GGT: Gamma-Glutamyl Transferase

GPx: Glutathione Peroxidase

GR: Glutathione Reductase

GS: Glutathione S-transferase

GSH: Glutathione

GSSG: Glutathione Disulfide

Hesp: Hesperidine

Hst: Hesperetin

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase

LDH: Lactate Dehydrogenase

LPO: Lipid Hydroperoxide

MAPKs: Mitogen-Activated Protein Kinases

MMP: Mitochondrial Membrane Protentional

MMP: Matrix Metalloproteinases

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NFATC3: Nuclear Factor Of Activated T Cells 3

NF-jB: Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells

NO: Nitric Oxide

PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

PGE2: Prostaglandin E2

RH123: Rhodamine123

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

SOD: Superoxide Dismutase

TBA: Thiobarbituric Acid

TCA: Trichloroacetic Acid

TNF-a: Tumor Necrosis Factor Alpha

Trx: Thioredoxin

VCAM-1: Vascular Adhesion Molecule-1

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول۲-۱. مواد شیمیایی به کار رفته در اجرای پایان نامه ۵۱

جدول۲-۲. تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده در اجرای پایان نامه ۵۳

جدول۲-۳. اجزای بافر فسفات ۶۲

جدول۲-۴. اجزای محلول مورد نیاز جهت سنجش پراکسیداسیون لیپید ۶۲

جدول۲-۵. اجزای بافر Tris-Hcl ۶۳

جدول۲-۶. اجزای محلول واکنش گلوتاتیون اکسیده(**GSSG**) ۶۴

فهرست شکل‌ها و نمودارها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱. ارتباط سرطان‌های مختلف با عوامل محیطی ۳
شکل ۱-۲. ارتباط استرس وارد شده به سلول با مسیرهای انتقال سیگنال و فعال شدن مسیر دفاعی در پاسخ به ROS ۸
شکل ۱-۳. ساختار شیمیایی ترکیب هسپریدین ۱۹
شکل ۱-۴. بخش‌های مختلف میوه مرکبات ۲۰
شکل ۱-۵. مسیر بیوسنتز هسپریدین ۲۱
شکل ۱-۶. سرنوشت متابولیکی فلاونوئید در مدل موش ۲۳
شکل ۱-۷. مکانیسم‌های سلولی برای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هسپریدین (Hesp) و هسپرتین (Hst) ۲۸
شکل ۱- ۸. تاثیر هسپریدین بر چرخه سلولی و آپوپتوز ۳۱
شکل ۱-۹. اهداف سلولی هسپریدین در فعالیت ضد رگ‌زایی ۳۴
شکل۲- ۱. دستگاه یخ ساز ۴۴
شکل۲-۲. سانتریفیوژ یخچال دار ۴۴
شکل۲-۳. دستگاه مولد آب مقطر ۴۵
شکل۲-۴. هموژنایزر اولتراسونیک ۴۵
شکل۲-۵. هود آزمایشگاهی ۴۶
شکل۲-۶. ترازوی دیجیتال با دقت ۴ رقم اعشار ۴۶
شکل۲-۷. Lab dancer ۴۷

شکل۲-۸. دستگاه هیتر-استیرر ۴۷

شکل۲-۹. PH متر ۴۸

شکل۲-۱۰. دستگاه ELISA reader ۴۸

شکل۲-۱۱. دستگاه ترموبلاک ۴۹

شکل۲-۱۲. دستگاه فلوسایتومتری ۴۹

شکل۲-۱۳. دستگاه انکوباتور ۵۰

شکل۲-۱۴. ست سمپلر ۵۰

شکل ۲- ۱۵. هسپریدین و محلول تهیه شده در حلالDMSO.....۵۳

شکل ۲- ۱۶. توزین موش‌ها.....۵۶

شکل ۲- ۱۷.موش‌های گروه هسپریدین بعد از تزریق تک دوز ENU.....۵۶

شکل ۲- ۱۸. خون‌گیری از قلب موش.....۵۷

شکل ۲- ۱۹. رقیق سازی خون گرفته شده از قلب موش با نرمال سالین.....۵۸

شکل ۲- ۲۰. جداسازی لنفوسیت از نمونه خون تهیه شده.....۵۸

نمودار ۳- ۱. تغییرات وزن موش‌ها بعد از تزریق ان-اتیل-نیتروز اوره.....۶۵

نمودار ۳-۲. درصد زنده مانی موش‌ها بعد از تزریق تک دوز ان-اتیل-نیتروز اوره ۶۶

نمودار ۳-۳. نتایج ارزیابی میزان آسیب غشای لیزوزمی در لنفوسیت‌های موش ۶۷

نمودار ۳-۴. اثر هسپریدین بر تشکیل ROS در لنفوسیت‌های جدا شده از خون موش ۶۸

نمودار ۳-۵. اثر هسپریدین بر پتانسیل غشای میتوکندری در لنفوسیت‌های جدا شده از خون موش...۶۹

نمودار ۳-۶. اثر هسپریدین بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ENU در لنفوسیت‌های موش ۷۰

نمودار ۳-۷. اثر هسپریدین بر تغییرات گلوتاتیون احیاء (GSH) ناشی از ENU ۷۱

نمودار ۳-۸. اثر هسپریدین برتغییرات گلوتاتیون دی سولفید اکسیده (GSSG) ناشی ازENU.....۷۲