بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه‌ی دکتری حرفه‌ای داروسازی

عنوان:

اثرات پیشگیرانه شیمیایی سیناپیک اسید بر لوکمی ناشی از ان- اتیل- ان- نیتروز اوره در یک مدل موش سوری

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

مهشاد پورقلی

بهار ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: د-۱۶۹

تقدیم

این پایان نامه تقدیم می‌شود به :

پدر و مادر گرانقدرم .

تشکر و قدردانی

خداوند را سپاس می گویم که به من فرصت داد تا عمر خود را در راه تحصیل علم و دانش سپری کنم و همواره استادانی دلسوز و فرزانه بر سر راهم قرار داد تا در این راه دراز و بی پایان علم جویی، راهنمای راهم باشند.

با تشکر فراوان از استاد عزیز و ارجمند جناب آقای دکتر احمد سلیمی که همواره بی دریغ راهنمای من بودند و سپاسگزار از زحمات همه کسانی که مرا در تدوین این پایان نامه یاری کرده اند.

چکیده

مقدمه: ترکیبات شیمیایی و فیزیکی مختلف می‌توانند در ایجاد بیماری سرطان خون نقش داشته باشند. یکی از این ترکیبات ان اتیل نیتروز اوره (ENU) است که یک عامل آلکیله کننده وجهش زای بسیار قوی می‌باشد. قرار گرفتن در معرض ترکیبات N-nitroso (NOCs) در محیط ما از طریق آفت کش ها، تنباکو و گوشت دودی می‌تواند به طور بالقوه سرطان زا باشد. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات پیشگیرانه سیناپیک اسید(SA) در برابر لوکمی ناشی از ان اتیل نیتروز اوره در یک موش سوری و تعیین میزان زنده مانی موش ها، بررسی تغییرات وزنی و ظاهری، بررسی تغییرات ایجاد شده در پارامترهای اکسیداتیو و محتوی ROS در سلول های لنفوسیتی بود.

مواد و روش‌ها: موش‌های سوری ماده به سه گروه هفت تایی کنترل، گروه سیناپیک اسید + ان اتیل ان نیتروز اوره و گروه ان اتیل ان نیتروز اوره تقسیم شدند. سیناپیک اسید (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) به مدت ۳۰ روز به موش‌ها تزریق شد. در روز ۳۱ م ان اتیل ان نیتروز اوره با دوز۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی به موش ها تزریق شد و بعد از آن موش ها به مدت پنج ماه مانیتور شدند.

نتایج: نتایج ما نشان داد که سیناپیک اسید به طور معنی داری تا ۷۱ درصد بر زنده مانی موش های مورد مطالعه تاثیر مثبت داشته و از طرفی مانع تغییر وزن ناشی از مواجه با ماده ان اتیل ان نیتروز اوره شده است. همچنین سیناپیک اسید پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ان اتیل نیتروز اوره را بهبود بخشید و همینطور مانع تشکیل ROS و آسیب به غشا لیزوزوم و افت پتانسیل غشا میتوکندری شد.

نتیجه گیری: در نهایت نتایج ما نشان داد که سیناپیک اسید اثر پیشگیرانه بر سمیت ناشی از ان اتیل ان نیتروز اوره (ENU) دارد.

کلید واژه ها: لوکمی، جهش، ان اتیل ان نیتروز اوره (ENU)، سیناپیک اسید (SA)

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱- مقدمه و بیان مسئله ۲

۱-۲- سرطان ۳

۱-۲-۱- عوامل دخیل در ایجاد سرطان ۳

۱-۲-۲- راه های پیشگیری از سرطان ۴

۱-۲-۳- لوکمی ۵

۱-۲-۳-۱- طبقه بندی لوکمی ۶

۱-۲-۳-۲- اپیدمیولوژی لوکمی ۷

۱-۳- جهش ۸

۱-۳-۱- عوامل جهش زا ۸

۱-۴- ترکیبات آلکیله کننده ۱۱

۱-۴-۱- مکانیسم کلی ترکیبات آلکیله کننده ۱۳

۱-۵- معرفی ان اتیل ان نیتروز اوره ۱۴

۱-۵-۱- تاریخچه و نحوه کشف ان اتیل نیتروز اوره به عنوان عامل موتاژن ۱۵

۱-۵-۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ان اتیل ان نیتروز اوره ۱۵

۱-۵-۳- استفاده بالینی ان اتیل ان نیتروز اوره ۱۶

۱-۵-۴- فارماکوکینتیک ان‌اتیل‌ان نیتروز اوره ۱۷

۱-۵-۵- مسمومیت با ان اتیل ان نیتروز اوره ۱۷

۱-۵-۶- مکانیسم های عملکردی ان اتیل ان نیتروز اوره ۱۸
۱-۵-۶-۱- ان اتیل ان نیتروز اوره به عنوان آلکیلاتور ۱۹
۱-۵-۶-۲- اثر ان اتیل نیتروز اوره بر پروتئین ۲۰
۱-۵-۶-۳- القای استرس اکسیداتیو سلولی توسط ان اتیل نیتروز اوره ۲۱
۱-۵-۶-۴- سرکوب مغز استخوان توسط ان اتیل ان نیتروز اوره ۲۲
۱-۵-۷- ان اتیل ان نیتروز اوره و لوکمی ۲۴
۱-۵-۸- مکانیسم لوکموژنز ان اتیل ان نیتروز اوره ۲۵
۱-۵-۹- جهش زایی ان اتیل ان نیتروز اوره ۲۶
۱-۵-۱۰- طیف جهش زایی ان اتیل ان نیتروز اوره در بافت ها ۲۷
۱-۵-۱۱- سمیت بافتی ان اتیل نیتروز اوره ۲۷
۱-۶- اثرات پیشگیرانه ترکیبات گیاهی در سرطان ۲۸
۱-۷- ترکیبات فنولیک ۲۹
۱-۷-۱- ویژگی های آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی ۳۱
۱-۷-۲- بیوسنتز ترکیبات فنولی ۳۱
۱-۷-۳- انواع ترکیبات فنولیک ۳۳
۱-۸- هیدروکسینامیک اسید ۳۳
۱-۹- سیناپیک اسید ۳۴
۱-۹-۱- مشتقات سیناپیک اسید ۳۴
۱-۹-۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سیناپیک اسید ۳۵
۱-۹-۳- منابع طبیعی سیناپیک اسید ۳۷
۱-۹-۴- فارماکوکینتیک سیناپیک اسید ۳۸

۱-۱۰- تاثیرات دارویی و عملکردی سیناپیک اسید ۴۰
۱-۱۰-۱- فعالیت آنتی اکسیدانی سیناپیک اسید ۴۰
۱-۱۰-۱-۱- توانایی مهار DPPH • ۴۱
۱-۱۰-۱-۲- توانایی مهار $O_2^{\bullet -}$ ۴۱
۱-۱۰-۱-۳- توانایی مهار OH• ۴۱
۱-۱۰-۱-۴- توانایی مهار OOH• ۴۲
۱-۱۰-۱-۵- توانایی مهار $ONOO^-$ ۴۲
۱-۱۰-۲- توانایی مهار لیپید پراکسیداسیون ۴۲
۱-۱۰-۳- اثرات ضد التهابی سیناپیک اسید ۴۲
۱-۱۰-۴- اثرات ضد سرطانی سیناپیک اسید ۴۴
۱-۱۰-۵- اثرات ضد اضطرابی سیناپیک اسید ۴۴
۱-۱۰-۶- اثرات ضد میکروبی سیناپیک اسید ۴۵
۱-۱۰-۷- اثرات محافظ عصبی سیناپیک اسید ۴۵
۱-۱۰-۸- اثرات محافظ قلبی سیناپیک اسید ۴۶
۱-۱۰-۹- اثرات محافظ کبدی سیناپیک اسید ۴۶
۱-۱۱- اثرات سمی سیناپیک اسید ۴۷
۱-۱۲- بررسی متون ۴۸
۱-۱۳- اهداف و فرضیات ۴۹
۱-۱۳-۱- هدف کلی ۴۹
۱-۱۳-۲-اهداف اختصاصی ۵۰
۱-۱۳-۳-هدف کاربردی ۵۰

۱-۱۴- فرضیات تحقیق ۵۰

فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش ها ۵۲

۲-۱- نوع مطالعه ۵۲

۲-۲- مکان انجام مطالعه ۵۲

۲-۳- طراحی مطالعه ۵۳

۲-۴- حیوانات، مواد شیمیایی و وسایل مورد استفاده ۵۴

۲-۴-۱- حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه ۵۴

۲-۴-۲- مواد شیمیایی ۵۴

۲-۴-۳- تجهیزات و وسایل آزمایشگاهی ۵۶

۲-۵- بافرها و شناساگرها و ترکیبات آنها ۶۵

۲-۵-۱- بافر فسفات ۶۵

۲-۵-۲- بافر Tris HCl ۶۵

۲-۵-۳- بافر محلول واکنش ۶۶

۲-۵-۴- محلول های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپید ها ۶۶

۲-۵-۴-۱-نحوه ساخت محلول ۲۰ درصد وزنی/ حجمی تری کلرو استیک اسید ۶۷

۲-۵-۴-۲-نحوه ساخت محلول ۰.۵ درصد وزنی/حجمی تیوباربیتوریک اسید ۶۷

۲-۶- گروه های حیوانات ۶۷

۲-۷- جداسازی بافت های موش ۷۰

۲-۸- جداسازی لنفوسیت ها از خون موش ۷۱

۲-۹- اندازه گیری ROS درون سلولی ۷۲

۲-۱۰- سنجش میزان افت پتانسیل غشاء میتوکندری ۷۴
۲-۱۱- سنجش میزان آسیب لیزوزومی ۷۵
۲-۱۲- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی ۷۶
۲-۱۳- سنجش میزان گلوتاتیون احیا شده (GSH) و دی سولفید اکسید شده(GSSG) ۷۸
۲-۱۴- تحلیل آماری ۷۹
فصل سوم: نتایج ۸۰
۳-۱- اثر پیش درمانی با سیناپیک اسید بر تغییر وزن موش های مواجهه یافته با ان اتیل ان نیتروز اوره ۸۱
۳-۲- اثر پیش درمانی با سیناپیک اسید بر زنده مانی موش های مواجهه یافته با ان اتیل ان نیتروز اوره ۸۲
۳-۳- اثر پیش درمانی با سیناپیک اسید برمحتوی ROS ناشی از القا ان اتیل ان نیتروز اوره ۸۳
۳-۴- اثر پیش درمانی با سیناپیک اسید بر آسیب غشا لیزوزمی ناشی از القا ان اتیل ان نیتروز اوره ۸۴
۳-۵- اثر پیش درمانی با سیناپیک اسید بر افت پتانسیل غشا میتوکندری ناشی از القا ان اتیل ان نیتروز اوره ۸۵
۳-۶- اثر پیش درمانی با سیناپیک اسید بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از القا ان اتیل ان نیتروز اوره ۸۶
۳-۷- اثر پیش درمانی با سیناپیک اسید برمحتوی GSH ناشی از القا ان اتیل ان نیتروز اوره ۸۷
۳-۸- اثر پیش درمانی با سیناپیک اسید برمحتوی GSSG ناشی از القا ان اتیل ان نیتروز اوره ۸۸
فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۸۹
۴-۱- بحث ۹۰
۴-۲- نتیجه گیری ۹۶
۴-۳- محدودیت ها ۹۷
۴-۴- پیشنهادات ۹۷
منابع ۹۸

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- عوامل دخیل در ایجاد سرطان..... ۴

شکل ۱-۲- مراحل تشکیل سلول های خونی و انواع لوکمی..... ۷

شکل ۱-۳- انواع عوامل جهش زا..... ۹

شکل ۱-۴- ساختار خردل گوگردی..... ۱۰

شکل ۱-۵- تاثیر عوامل جهش زا بر سلول..... ۱۱

شکل ۱-۶- واکنش شیمیایی آلکیلاسیون..... ۱۴

شکل ۱-۷- ساختار ان اتیل ان نیتروز اوره..... ۱۴

شکل ۱-۸- عملکردهای ENU در سیستم بیولوژیکی..... ۱۸

شکل ۱-۹- اثر آلکیله کنندگی ان اتیل نیتروزوه بر DNA..... ۲۰

شکل ۱-۱۰- مکانیسم جهش‌های ژنی در سلول‌های مغز استخوان..... ۲۴

شکل ۱-۱۱- لوکموژنز ناشی از ENU..... ۲۶

شکل ۱-۱۲- مسیر بیوسنتر ترکیب سیناپیک اسید..... ۳۲

شکل ۱-۱۳- فرمول های ساختاری سیناپیک اسید و مشتقات آن..... ۳۵

شکل ۱-۱۴- پودر کریستالی سیناپیک اسید..... ۳۶

شکل ۱-۱۵- منابع طبیعی سیناپیک اسید..... ۳۸

شکل ۱-۱۶- تصویر شماتیک از تاثیرات سیناپیک اسید ۴۰
شکل ۱-۱۷- اهداف مولکولی سیناپیک اسید ۴۳
شکل ۲-۱- شمای کلی از مراحل انجام کار ۵۳
شکل ۲-۲- موش سوری ماده ۵۴
شکل ۲-۳- ترازوی دقیق آزمایشگاهی ۵۸
شکل ۲-۴- دستگاه مولد آب مقطر ۵۸
شکل ۲-۵- اتوکلاو ۵۹
شکل ۲-۶- سانتریفیوژ یخچال دار ۵۹
شکل ۲-۷- دستگاه انکوباتور ۶۰
شکل ۲-۸- دستگاه فلوسایتومتری ۶۱
شکل۲-۹- ورتکس ۶۱
شکل ۲-۱۰- PH متر ۶۲
شکل۲-۱۱- دستگاه هموژنایزر ۶۳
شکل ۲-۱۲- دستگاه هیتر بلاک ۶۳
شکل ۲-۱۴- طرح مطالعه ۶۹
شکل ۲-۱۵- وزن گیری هفتگی موش ها ۷۰
شکل ۲-۱۶- خونگیری مستقیم از قلب ۷۱

شکل ۲-۱۷- جداسازی هاله سفید لنفوسیتی ۷۲
شکل ۲-۱۸- تصویری از مراحل جداسازی لنفوسیت ۷۲
شکل ۲-۱۹- مراحل ایجادگونه های فعال اکسیژن در سلول ۷۳
شکل ۲-۲۰- نمایی شماتیک از افت پتانسیل غشا میتوکندری ۷۵
شکل ۲-۲۱- ارتباط بین آکریدین اورنج و لیزوزوم ۷۶
شکل۲-۲۲- فرآیند پراکسیداسیون لیپید ۷۶
شکل ۲-۲۳- فرآیند تشکیل و متابولسیم مالون دی آلدهید ۷۷
شکل ۲-۲۴- واکنش گلوتاتیون (احیا و اکسید) ۷۸
شکل ۳-۱- ارزیابی وزن موش های مورد مطالعه ۸۱
شکل ۳-۲- ارزیابی زنده مانی موش های مورد مطالعه ۸۲
شکل۳-۳- ارزیابی محتوی ROS در سلول لنفوسیتی ۸۳
شکل ۳-۴- ارزیابی آسیب لیزوزومی در سلول لنفوسیتی ۸۴
شکل ۳-۵- ارزیابی افت پتانسیل غشا میتوکندری در سلول لنفوسیتی ۸۶
شکل ۳-۶- ارزیابی محتوی مالون دی آلدهید در سلول لنفوسیتی ۸۷
شکل ۳-۷- ارزیابی محتوی GSH در سلول لنفوسیتی ۸۸
شکل ۳-۸- ارزیابی محتوی GSSG در سلول لنفوسیتی ۸۹

فهرست جدول ها

عنوان صفحه

جدول ۱-۱- ویژگی های فیزیکی- شیمیایی ان اتیل ان نیتروز اوره.....۱۶

جدول ۱-۲- ویژگی های فیزیکی- شیمیایی سیناپیک اسید ۳۷

جدول۲-۱- مواد شیمیایی به کار رفته در پایان نامه.....۵۶

جدول۲-۲- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه های مورد استفاده ۵۷

جدول ۲-۳- اجزای بافر فسفات.....۶۶

جدول ۲-۴- اجزای تشکیل دهنده بافر محلول واکنش.....۶۷

جدول۲-۵- اجزای محلول های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپید ها.....۶۸

فهرست اختصارات و اصطلاحات

AChE: Acetylcholinesterase

ALL: Acute Lymphocytic Leukemia

ALP: Alkaline Phosphatase

AML: Acute Myeloid Leukemia

AO: Acridin Orange

BM: Bone Marrow

CLL: Chronic ymphocytic Leukemia

CML: Chronic Myeloid Leukemia

CNS: Cerebral Nerve System

COX-2: Cyclooxygenase-2

DCF: 2′7′-Dichlorofluorescein

DCFH: 2,7-Dichlorodihydrofluorescein

DES: Diethyl Sulfate

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DMS: Dimethyl Sulfate

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

DTNB: 5,5′-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EI: Ethylene Eimine

EMU: n-Methyl-n-Nitrosourea

EMS: Ethyl Methane Sulfonate

ENU: n-Ethyl-n-Nitrosourea

GABA: Gamma-aminobutyric acid

GSH: Glutathione

GSSG: Glutathione disulfide

HSC: Hemopoietic Stem Cells

IL-1β: Interleukin-1-Beta

iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase

LDL: Low-Density Lipoprotein

MMP : Mitochondrial Membrane Protentional

MMS: Methyl Methane Sulfonate

NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) + Hydrogen (H)

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide

NF-κB : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NOC: Nitrosourea

PARP: Poly (ADP-Ribose) Polymerase

RBC: Red Blood Cell

RH123 : Rhodamine 123

ROS : Reactive Oxygen Species

SA: Sinapic Acid

SGOT: Serum Glutamic-Oxaloacetic Transaminase

SGPT: Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase

SOD : Superoxide Dismutase

TBA : Thiobarbituric Acid

TCA : Trichloroacetic Acid

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor