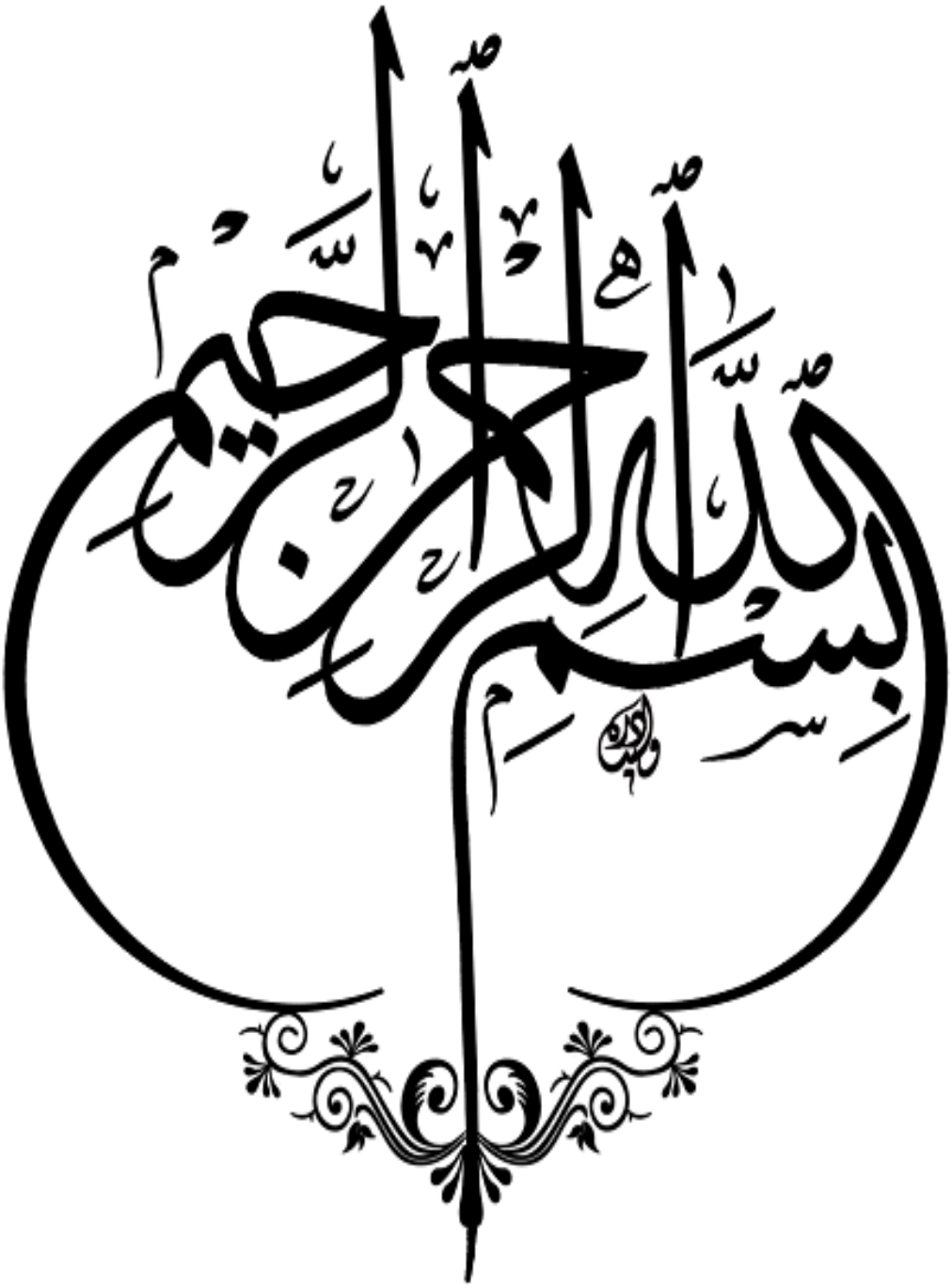
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

پایان نامه جهت دریافت درجه‌ی دکتری حرفه‌ای داروسازی

عنوان:

بررسی اثرات پیشگیرانه شیمیایی وانیلیک اسید در لوسمی ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره (ENU) در مدل موش سوری

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

شادی حدادی

بهار ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: د-۱۷۱

این پایان نامه ضمن تشکر و با کمال افتخار تقدیم می‌شود به

روح پاک مادرم به پاس زحماتش که روشنایی بخش و هموار کننده ی مسیر من بود و به

پدر مهربانم به پاس محبت‌ها و حمایت‌های بی دریغش

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات و تلاش‌های بی وقفه استاد محترم و دانشمند جناب آقای دکتر احمد سلیمی که در تمامی مراحل این مسیر از محضر پر فیض، راهنمایی‌های مدبرانه و تجربیات ارزنده ایشان بهره‌ها بردم، صمیمانه سپاسگزاری می نمایم و از خداوند متعال توفیق روز افزون ایشان را توام با صحت و سعادت خواستارم.

در نهایت از تمامی همکاران و دوستانی که هر کدام به نحوی در این مسیر همراه من بودند تشکر نموده و موفقیت همه آن‌ها را از خداوند متعال خواهانم.

چکیده

مقدمه : لوسمی یکی از بدخیمی‌های خونی است که با تکثیر نئوپلاستیک و تبدیل سلول‌های پیش ساز خون به گلبول‌های سفید نابالغ و تجمع آن‌ها در مغز استخوان، گردش خون و اغلب در اندام‌های مختلف بدن ظاهر می‌شود. یکی از ریسک فاکتورهای جدی برای بروز بدخیمی‌های خونی از جمله لوسمی، ان-اتیل-ان-نیتروز اوره است. ان-اتیل-ان-نیتروز اوره یکی از مواد کارسینوژن و جهش‌زای قوی است که با آلکیلاسیون DNA، کاربامیلاسیون اسیدهای آمینه و تغییر ساختاری پروتئین و همچنین القای استرس اکسیداتیو سلولی اثرات نامطلوب زیادی در سلول ایجاد می‌کند. ترکیبات طبیعی می‌توانند انتخاب اصلی برای درمان یا پیشگیری از بیماری‌های مختلف باشند. ترکیبات فنولی به طور گسترده‌ای به عنوان عوامل شیمیایی پیشگیرانه که دارای ترکیبات زیست فعال با خواص ضد سرطانی هستند، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. وانیلیک اسید یکی از ترکیبات فنولی است که در غلات مختلف، عسل، چای سبز و ... یافت می‌شود. وانیلیک اسید از پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌ها جلوگیری می‌کند و رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) را از بین می‌برد، همچنین مطالعات متعددی فعالیت‌های بیولوژیکی آن از جمله فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، محافظ کبد، ضد آپوپتوز و ضد جهش‌زایی را تایید کرده‌اند. وانیلیک اسید رگزایی و تکثیر سلولی را که برای سازگاری سلول‌های سرطانی با هیپوکسی ریزمحیطی و پیشرفت تومور ضروری است، مهار می‌کند. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات پیشگیرانه وانیلیک اسید در برابر لوسمی القا شده با ان-اتیل-ان-نیتروز اوره (ENU) و تعیین زنده مانی موش‌ها، بررسی تغییرات ظاهری و وزن، بررسی تغییرات ایجاد شده در پارامترهای اکسیداتیو و محتوای ROS در سلول‌های لنفوسیتی است.

مواد و روش‌ها: موش‌های سوری به ۳ گروه ۷ تایی: گروه کنترل، گروه ENU و گروه وانیلیک اسید + ENU تقسیم شدند. گروه وانیلیک اسید + ENU به مدت ۳۰ روز ترکیب وانیلیک اسید را (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز) بصورت داخل صفاقی بعنوان ماده پیشگیری کننده شیمیایی دریافت کردند و موش‌های گروه کنترل به مدت ۳۰ روز نرمال سالین (۵ واحد انسولین در روز) بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. در روز ۳۱ گروه دوم و سوم (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم ENU) بصورت تک دوز دریافت کردند و در ادامه موش‌ها به مدت ۲۱ هفته از نظر پیشرفت سرطان خون و تغییرات وزن تحت نظر قرار گرفتند.

نتایج : نتایج ما نشان داد که وانیلیک اسید به طور معنی داری تا ۵۷ درصد بر زنده مانی موش‌های مورد مطالعه تاثیر مثبت داشته و از طرفی مانع تغییر وزن ناشی از مواجهه با ماده ان-اتیل-ان-نیتروز اوره شده است. همچنین وانیلیک اسید پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره را بهبود بخشید و همینطور مانع تشکیل ROS و آسیب به غشای لیزوزوم و افت پتانسیل غشای میتوکندری شد. در مورد محتوای گلوتاتیون تغییر قابل توجهی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: در نهایت نتایج ما نشان داد که وانیلیک اسید اثر پیشگیرانه بر سمیت ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره را نشان می‌دهد.

کلید واژه: لوسمی، کارسینوژن، ان-اتیل-ان-نیتروز اوره، وانیلیک اسید

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه: ۱

۱-۱-مقدمه و بیان مسئله ۲

۱-۲- سرطان ۳

۱-۲-۱- تعریف سرطان ۳

۱-۲-۱- مواجهه با مواد شیمیایی و بروز سرطان ۵

۱-۲-۳-لوسمی ۶

۱-۳-۲-۱- طبقه بندی لوسمی ۷

۱-۳-۲-۱- اپیدمیولوژی لوسمی ۹

۱-۳-۳-۲-۱- لوسمی در کودکان ۱۰

۱-۴-۳-۲-۱- ریسک فاکتورهای لوسمی ۱۱

۱-۳-عوامل آلکیله کننده ۱۲

۱-۳-۱- طبقه بندی عوامل آلکیله کننده ۱۲

۱-۳-۲- مکانیسم عمل عوامل آلکیله کننده ۱۳

۱-۴- معرفی ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۱۳

۱-۴-۱-تاریخچه ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۱۶

۱-۴-۲-سنتز و خصوصیات فیزیکوشیمیایی ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۱۶

۱-۴-۳- فارماکوکینتیک ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۱۸

۱-۴-۴- مکانیسم‌های سمیت ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۱۹

۱-۴-۴-۱- ENU بعنوان آلکیلاتور ۱۹

۱-۴-۴-۲- اثر ان-اتیل-ان-نیتروز اوره بر پروتئین ۲۲

۱-۴-۴-۳-اثر ان-اتیل-ان-نیتروز اوره بر استرس اکسیداتیو ۲۲

۱-۴-۴-۴- سرکوب مغز استخوان توسط ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۲۶

۱-۴-۵- مسمومیت با ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۲۷

۱-۴-۶- اثر ان-اتیل-ان-نیتروز اوره در ایجاد بدخیمی‌های خونی ۲۸

۱-۴-۷-مکانیسم لوکموژنز ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۲۹

۱-۴-۸- ویژگی‌های بارز لوسمی ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره در موش ۳۰

۱-۵- اثرات پیشگیرانه شیمیایی ترکیبات طبیعی ۳۱

۱-۵-۱- فیتوکمیکال‌های فنولی ۳۲

۱-۶- وانیلیک اسید ۳۵

۱-۶-۱- معرفی وانیلیک اسید ۳۵
۱-۶-۲- منابع طبیعی وانیلیک اسید ۳۶
۱-۶-۳- ویژگی‌های وانیلیک اسید ۳۶
۱-۶-۴- بیوسنتز وانیلیک اسید: ۳۷
۱-۶-۵- مشتقات وانیلیک اسید ۴۰
۱-۶-۶-اثرات فارماکولوژیک وانیلیک اسید: ۴۲
۱-۶-۶-۱-اثرات محافظت کننده کبدی ۴۲
۱-۶-۶-۲-اثر ضد التهابی وانیلیک اسید ۴۳
۱-۶-۶-۳-اثر محافظت کننده عصبی ۴۳
۱-۶-۶-۴-اثرات محافظت کننده قلبی وانیلیک اسید ۴۴
۱-۶-۶-۵-سایر اثرات فارماکولوژیک وانیلیک اسید ۴۴
۱-۶-۷- مکانیسم آنتی اکسیدانی وانیلیک اسید: ۴۵
۱-۶-۸- اثر ضد سرطانی ۴۸
۱-۶-۹- فارماکوکینتیک وانیلیک اسید: ۵۰
۱-۶-۱۰-عوارض جانبی ناشی از وانیلیک اسید: ۵۱
۱-۷- بررسی متون ۵۲
۱-۸- اهداف و فرضیات ۵۴
۱-۸-۱- اهداف کلی: ۵۴
۱-۸-۲- اهداف اختصاصی: ۵۴
۱-۸-۳- هدف کاربردی : ۵۵
۱-۸-۴- فرضیات تحقیق: ۵۵

فصل دوم مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها ۵۶

۲-۱-نوع مطالعه ۵۷
۲-۲- محل انجام مطالعه ۵۷
۲-۳-طرح مطالعه ۵۷
۲-۴- نگهداری از حیوانات مورد مطالعه و ملاحظات اخلاقی ۵۸
۲-۵-فلوچارت ۵۹
۲-۶-مواد و دستگاه‌های مورد استفاده ۶۰
۲-۶-۱- مواد شیمیایی ۶۰

۲-۶-۲- تجهیزات و وسایل مورد مطالعه ۶۱
۲-۷- بافرها و شناساگرها و ترکیبات آن‌ها ۷۰
۲-۷-۱- بافر فسفات ۷۰
۲-۷-۲- بافر Tris-HCl (۵۰۰ Mm) ۷۱
۲-۷-۳- بافر محلول واکنش (Reaction solution) ۷۱
۲-۷-۴- محلول‌های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها ۷۲
۲-۷-۴-۱- نحوه ساخت محلول ۲۰ درصد وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید ۷۲
۲-۷-۴-۲- نحوه ساخت محلول ۰/۵ درصد وزنی/ حجمی تیوباربیتوریک اسید ۷۲
۲-۸-گروه‌بندی حیوانات مورد مطالعه و دوره درمانی ۷۳
۲-۹- تهیه محلول‌های وانیلیک اسید و ان-اتیل-ان-نیتروز اوره جهت تزریق ۷۴
۲-۹-۱- آماده سازی وانیلیک اسید ۷۴۷۶
۲-۱۰- جداسازی بافت‌ها: ۷۶
۲-۱۱- جداسازی لنفوسیت: ۷۶
۲-۱۲- اندازه گیری تولید ROS سلولی ۷۸
۲-۱۳- سنجش میزان سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری ۷۹
۲-۱۴-سنجش میزان آسیب لیزوزومی ۸۰
۲-۱۵- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی ۸۱
۲-۱۶-سنجش سطح گلوتاتیون احیا شده (GSH) و اکسید شده (GSSG) ۸۳
۲-۱۷-تحلیل آماری ۸۴
فصل سوم نتایج ۸۵
۳-۱- اثر پیش درمانی با وانیلیک اسید بر تغییرات وزن موش‌های مواجهه‌یافته با ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۸۶
۳-۲- اثر پیش درمانی با وانیلیک اسید بر زنده مانی موش‌های مواجهه‌یافته ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۸۶
۳-۳- اثر پیش درمانی با وانیلیک اسید بر تشکیل ROS سلولی ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۸۷
۳-۴- اثر پیش درمانی با وانیلیک اسید بر آسیب غشای لیزوزمی ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۸۸
۳-۵- اثر پیش درمانی با وانیلیک اسید بر پتانسیل غشای میتوکندری ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۸۹
۳-۶- اثر پیش درمانی با وانیلیک اسید بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۹۰

۷-۳-اثر پیش درمانی با وانیلیک اسید برتغییرات محتوای GSH ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۹۱
۸-۳-اثر پیش درمانی با وانیلیک اسید برتغییرات محتوای GSSG ناشی از ان-اتیل-ان-نیتروز اوره ۹۳
فصل چهارم بحث و نتیجه گیری: ۹۴
۱-۴- بحث ۹۵
۲-۴- نتیجه‌گیری ۱۰۹
۳-۴-محدودیت‌ها ۱۰۹
۴-۴-پیشنهادات ۱۱۰
فهرست منابع ۱۱۱

فهرست شکل‌ها و نمودارها

شکل۱-۱- نقش ژن‌ها و محیط در ایجاد سرطان ۵

شکل۱-۲- طبقه بندی لوسمی..... ۹

شکل۱-۳- A) واکنش آلکیلاسیون B) واکنش‌های SN1 و SN2.....۱۴

شکل ۱-۴- پایداری ENU در pHهای مختلف ۱۷

شکل ۱-۵- ساختارN-ethyl-N-nitrosourea (ENU) ۲۰

شکل ۱-۶- تشکیل DNA adduct ۲۱

شکل ۱-۷- عوامل موثر بر استرس اکسیداتیو ۲۵

شکل ۱-۸- عملکرد N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) در سیستم بیولوژیکی.....۲۷

شکل ۱-۹- ساختار شیمیایی اسیدهای فنولیک رایج. ۳۲

شکل ۱-۱۰- مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنولی. ۳۴

شکل۱-۱۱ - ساختار وانیلین و وانیلیک اسید. ۳۶

شکل ۱-۱۲- تشکیل وانیلیک اسید از فرولیک اسید. ۳۸

شکل ۱-۱۳- مسیرهای بیوسنتزی تولید وانیلین، وانیل الکل و وانیلیک اسید از کافئیک.....۳۸

شکل ۱-۱۴- مسیرهای بیوسنتزی تولید وانیلین، وانیل الکل و وانیلیک اسید از وراتالدئید ۳۹

شکل ۱-۱۵-سنتز وانیلیک اسید از وانیلین به روش اکسید نقره. ۴۰

شکل ۱-۱۶- مشتقات طبیعی وانیلیک اسید. ۴۱

شکل ۱-۱۷- مشتقات سنتز شده به روش شیمیایی از وانیلیک اسید ۴۲

شکل ۱-۱۸- عملکرد آنتی اکسیدانت‌ها. ۴۷

شکل ۱-۱۹- مکانیسم ضد سرطانی وانیلیک اسید. ۴۹

شکل۱-۲۰- متابولیسم وانیلیک اسید. ۵۱
شکل ۲-۱- نمای کلی از طرح مطالعه حاضر ۵۷
شکل ۲-۲- فلوچارت کلی ۵۹
شکل ۲-۳- دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار ۶۳
۲-۴- دستگاه فلوسایتومتری ۶۴
شکل۲-۵-دستگاه انکوباتور ۶۴
شکل ۲-۶- دستگاه یخ ساز ۶۵
شکل ۲-۷- ترازوی دیجیتال ۶۵
شکل ۲-۸-دستگاه مولد آب مقطر ۶۶
شکل ۲-۹-هود زیستی شیمیایی ۶۶
شکل ۲-۱۰- دستگاه lab dancer ۶۷
شکل۲-۱۱- دستگاه هموژنایزر ۶۸
شکل ۲-۱۲- دستگاه ترموبلاک ۶۸
شکل ۲-۱۳- دستگاه اتوکلاو ۶۹
شکل۲-۱۴- دستگاه pH متر ۶۹
شکل ۲-۱۵- وانیلیک اسید ۷۰
شکل۲-۱۶- موش‌های گروه وانیلیک اسید + ENU ۷۴
شکل ۲-۱۷- خون گیری از قلب موش و جداسازی بافت‌ها ۷۶
شکل۲-۱۸- مراحل جداسازی لنفوسیت ۷۷
شکل ۲-۱۹- مراحلی از جداسازی لنفوسیت‌ها در مطالعه ۷۸

شکل ۲-۲۰- مکانیسم DCFH در میتوکندری ۷۹
شکل ۲-۲۱- نمایی شماتیک از افت پتانسیل غشای میتوکندری. ۸۰
شکل۲-۲۲- مکانیسم شماتیک آکریدین اورنج در آسیب لیزوزومی ۸۱
شکل ۲-۲۳- فرایند پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل مالون دی آلدهید ۸۲
شکل ۲-۲۴- تشکیل مالون دی آلدهید. ۸۲
شکل۲-۲۵- واکنش گلوتاتیون. ۸۴
نمودار ۳-۱- ارزیابی تغییرات وزن موش‌ها. ۸۶
نمودار ۳-۲-ارزیابی میزان زنده مانی موش‌ها ۸۷
نمودار ۳-۳-ارزیابی تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن ۸۸
نمودار۳-۴-نتایج ارزیابی میزان آسیب غشای لیزوزومی سلول ۸۹
نمودار۳-۵- نتایج ارزیابی میزان پتانسیل غشای میتوکندری در سلول ۹۰
نمودار۳-۶- نتایج ارزیابی میزان مالون دی آلدهید تولید شده بر اثر پراکسیداسیون لیپیدی در سلول ۹۱
نمودار ۳-۷-ارزیابی محتوای GSH در سلول لنفوسیتی. ۹۲
نمودار ۳-۸-ارزیابی محتوای GSSG در سلول لنفوسیتی. ۹۳

فهرست جدول‌ها

جدول۲-۱-مواد شیمیایی به کار رفته ۶۰

جدول ۲-۲- تجهیزات و وسایل استفاده شده ۶۱

جدول ۲-۳- اجزای بافر فسفات ۷۳

جدول ۲-۴- اجزای تشکیل دهنده بافر محلول واکنش ۷۱

جدول ۲–۵- مواد لازم جهت محلول مورد استفاده در سنجش لیپید پراکسیداسیون ۷۲

فهرست اختصارات و اصطلاحات

ENU: N-Ethyl-N-Nitrosourea

VA: Vanillic Acid

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

RNA: Ribonucleic Acid

HPV: Human Papiluma Virus

HIV: Human Immunodeficiency Viruses

EBV: Epstein–Barr Virus

HSC: Hemopoietic Stem Cells

LSC: Leukemic Stem Cells

BM: Bone Marrow

WBC: White Blood Cell

AML: Acute Myeloid Leukemia

ALL: Acute Lymphocytic Leukemia

CML: Chronic Myeloid Leukemia

CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia

DES: Diethyl Sulfate

DMS: Dimethyl Sulfate

MMS: Methyl Methane Sulfonate

EMS: Ethyl Methane Sulfonate

MNU: N-Methyl-N-Nitrosourea

MNNG: Methyl Nitro Nitroso Guanidine

ENNG: Ethyl Nitro Nitroso Guanidine

DMN: Dimethyl Nitrosamine

DEN: Diethylnitrosamine

SN: Nucleophilic Substitution

Vd: Volume Distribution

CO_2: Carbon Dioxide

tRNA: Transfer RNA

PARP: Poly (ADP-ribose) Polymerase

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide

Nox: NADPH oxidase

ROS: Reactive Oxygen Species

RNS: Reactive Nitrogen Species

RSS: Reactive Sulphur Species

RCS: Reactive Chlorine Species

H_2O_2: Hydrogen Peroxide

GSH: Glutathione

COX-2: Cyclooxygenase 2

SOD: Superoxide Dismutase

CAT: Catalase

MDA: Malondialdehyde

4-HNE: 4-hydroxynonenal

SGPT: Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase

SGOT: Serum Glutamic-Oxaloacetic Transaminase

ALP: Alkaline Phosphatase

BBB: Blood–Brain Barrier

CSF: Cerebrospinal Fluid

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

INOS: Inducible Nitric Oxide Synthase

PI3Ks: Phosphoinositide 3-Kinases

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

PPARγ: Proliferator-Activated Receptor γ

TNFα: Tumour Necrosis Factor α

IL-6: Interleukin 6

IL-1β: Interleukin-1-beta

LPS: Lipopolysaccharide

PGE2: Prostaglandin E2

GPx: Glutathione Peroxidase

GST: Glutathione S-Transferase

PRx: Peroxiredoxin

TRx: Thioredoxins

NAC: N-Acetylcysteine

FA: Ferulic Acid

HIF: Hypoxia-Inducible Factor

EPO: Erythropoietin

mRNA: Messenger RNA

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

LD-50: Lethal Dose 50

H_3PO_4: Phosphoric Acid

MMP : Mitochondrial Membrane Protentional

RH123 : Rhodamine 123

TBA : Thiobarbituric Acid

TCA : Trichloroacetic Acid

DTNB: 5,5′-Dithiobis(2-Nitrobenzoic Acid)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

AO: Acridine Orange

DCF: 2′7′-Dichlorofluorescein

DCFH: 2,7-Dichlorodihydrofluorescein

GSSG: Glutathione Disulfide

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