





دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه‌ی دکتری حرفه‌ای داروسازی

عنوان

بررسی اثر مهاری آزلائیک اسید بر سمیت ناشی از آرسنیک

در جزایر لانگرهانس موش صحرائی

اساتید راهنما

دکتر سارا مصطفی‌لو

دکتر مریم بعیری

استاد مشاور

دکتر حامد حقی

نگارش

سیده فاطمه معافی مدنی

شماره پایان نامه: د-۱۸۵

مهر ۱۴۰۲

سپاس گزاری

با سپاس فراوان از سرکار خانم دکتر سارا مصطفی لو و سرکار خانم دکتر مریم بعیری که زحمت راهنمایی این پایان نامه را عهده دار گردیدند و همواره از دانش و تجربیات گرانبها و راهنمایی های بی دریغشان بهره بردم. تشکر و مراتب سپاس قلبی خود را اعلام نموده و توفیقات روز افزون ایشان را توأم با صحت و سعادت خواستارم.

با سپاس فراوان از جناب آقای دکتر حامد حقی که در طول انجام این مطالعه مشاور بنده بودند. توفیقات روز افزون ایشان را توأم با صحت و سعادت خواستارم.

چکیده

مقدمه

دیابت که با ناهنجاری در تولید و ترشح انسولین مشخص می‌شود، یک نگرانی بهداشت عمومی جهانی است. نشان داده شده است که اسید آزلائیک اسید دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. از این رو ممکن است در برابر دیابت ناشی از آرسنیک محافظت کند. این مطالعه به منظور بررسی اینکه آیا سمیت متابولیکی سدیم آرسنیت نسبت به جزایر لانگرهانس جدا شده از پانکراس موش صحرایی می‌تواند توسط آزلائیک اسید بهبود یابد، انجام شد.

مواد و روش کار

نمونه‌ها جزایر لانگرهانس جدا شده از پانکراس ۱۵ عدد رت نر هستند که آیلتهای جدا شده از پانکراس موش صحرایی به ۳ گروه ۱۰ تایی که شامل گروه کنترل، گروه آرسنیک، گروه آرسنیک به همراه آزلائیک اسید تقسیم و تست‌های بیوشیمیایی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون شامل زنده مانی سلولی، مسیرهای مرگ سلولی، ترشح انسولین، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی بر روی آنها انجام شد.

نتایج

سدیم آرسنیت به صورت وابسته به دوز (۱۰۰LC50 میکرومولار) باعث کاهش زنده مانی، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن ($P \text{ value} < 0.001$)، ترشح انسولین تحت تحریک پایه گلوکز ($P \text{ value} < 0.001$)، آپاپتوز سلول‌ها (۳۰ درصد) و بیان سایتوکاین‌های التهابی ($P \text{ value} < 0.01$)، TNF ($P \text{ value} < 0.01$)، IL-1 ($P \text{ value} < 0.001$) و NF- κ B ($P \text{ value} < 0.05$) شد، و آزلائیک اسید تمام این اثرات را بهبود می‌بخشد به طوری که زنده ماندن و عملکرد جزایر پانکراس نزدیک به گروه کنترل بازیابی و کنترل می‌شود.

بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان می‌دهد که سدیم آرسنیت پتانسیل ایجاد اختلال در هموستاز سلولی و عملکرد در جزایر لانگرهانس را دارد و می‌تواند خطر ابتلا به اختلالات متابولیک مانند دیابت را افزایش دهد. از طرف دیگر، آزلائیک اسید جزایر لانگرهانس را در برابر سمیت متابولیکی سدیم آرسنیت محافظت کرد که عمدتاً به دلیل اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپاپتوز است که نشان می‌دهد آزلائیک اسید ممکن است پتانسیل اجرای مکانیسم‌های درون سلولی مفید برای مقابله با سموم دیابتی مانند آرسنیک را داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: آیلتهای پانکراس، آزلائیک اسید، آرسنیک، استرس اکسیداتیو، انسولین، آپاپتوز، دیابتوزنیک

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۱-۱-۱-۱	بخش اول.....
۲	۱-۱-۱-۱-۱ پانکراس.....
۳	۱-۱-۱-۱-۱ غدد پانکراس وسلول‌های آن.....
۵	۱-۱-۲-۱-۱ انسولین و دیابت.....
۶	۱-۱-۲-۱-۱ سنتز شیمیایی انسولین.....
۶	۱-۱-۲-۲-۱-۱ گیرنده انسولین.....
۸	۱-۱-۲-۳-۱-۱ اثرات اندوکرینی انسولین.....
۸	۱-۱-۳-۲-۱-۱ اثر انسولین بر کبد.....
۹	۱-۱-۳-۲-۱-۱ اثر انسولین بر عضله.....
۹	۱-۱-۳-۳-۲-۱-۱ اثر انسولین بر بافت چربی.....
۱۰	۱-۱-۴-۲-۱-۱ مکانیسم آزادسازی انسولین.....
۱۱	۲-۱-۱ بخش دوم: سیستم اکسیدانت.....
۱۱	۱-۲-۱-۱ تعریف گونه‌های فعال.....
۱۲	۱-۱-۲-۱-۱ شیمی پایه، بیولوژی، سم شناسی گونه‌های فعال اکسیژن.....
۱۳	۱-۲-۱-۲-۱ منابع گونه‌های فعال اکسیژن.....
۱۴	۱-۲-۱-۳-۱-۱ فعالیت‌های بیولوژیکی گونه‌های فعال اکسیژن.....
۱۵	۱-۳-۱-۲-۱-۱ فعال کردن فاکتورهای رونویسی حساس به ردوکس.....
۱۵	۱-۳-۱-۲-۲-۱ فعال سازی پروتئین کیناز ها.....
۱۶	۱-۳-۱-۲-۱-۲ باز کردن کانال‌های یونی.....
۱۶	۱-۳-۱-۲-۲-۱ اثر بر پروتئین.....

- ۱۶-.....DNA اکسیداسیون ۵-۳-۱-۲-۱
- ۱۷-..... استرس اکسیداتیو و نتایج آن ۲-۲-۱
- ۱۸-..... طبقه بندی مرگ سلولی ۳-۲-۲-۱
- ۱۹-..... آپتوز: مسیرها و پروتئین ها ۱-۱-۲-۲-۱
- ۲۲-..... بخش سوم: ارتباط استرس اکسیداتیو و التهاب با دیابت ۳-۱
- ۲۲-..... ارتباط التهاب با دیابت و مقاومت انسولینی ۱-۳-۱
- ۲۳-..... ارتباط استرس اکسیداتیو با دیابت و مقاومت انسولینی ۲-۳-۱
- ۲۵-..... نقش فاکتورهای التهابی در اختلال سلول های بتا در دیابت و مقاومت انسولینی ۳-۳-۱
- ۲۶-..... $IL-1\beta$ و اختلال عملکرد سلول های بتا در دیابت ۱-۳-۳-۱
- ۲۶-..... $TNF-\alpha$ و اختلال عملکرد سلول های بتا در دیابت ۲-۳-۳-۱
- ۲۷-..... نقش گونه های فعال اکسیژن در عملکرد طبیعی انسولین و مقاومت انسولینی ۴-۳-۱
- ۲۹-..... بخش چهارم: آزالائیک اسید و سدیم آرسنیت ۴-۱
- ۲۹-..... نگاهی مختصر به آزالائیک اسید ۱-۴-۱
- ۳۰-..... نگاهی مختصر به سدیم آرسنیت ۲-۴-۱
- ۳۱-..... بخش پنجم: طرح تحقیقاتی ۵-۱
- ۳۱-..... بیان مسئله ۱-۵-۱
- ۳۳-..... بررسی متون ۲-۵-۱
- ۳۵-..... اهداف و فرضیات ۳-۵-۱

فصل دوم: مواد، دستگاه ها و روش ها

- ۳۸-..... بخش اول: دستگاه ها، مواد و کیت های مورد نیاز ۱-۲
- ۳۸-..... دستگاه های مورد استفاده ۱-۱-۲
- ۳۸-..... وسایل مورد استفاده ۲-۱-۲
- ۳۹-..... مواد شیمیایی و کیت های مورد استفاده ۳-۱-۲

- ۲-۲- بخش دوم: مراحل انجام آزمایشات..... ۴۰
- ۲-۲-۱- تهیه بافرهای مورد نیاز..... ۴۰
- ۲-۲-۱-۱- تهیه ی بافر کربس..... ۴۰
- ۲-۲-۱-۲- تهیه بافر فسفات سالین..... ۴۰
- ۲-۲-۲- تهیه حیوان آزمایشگاهی مورد نیاز..... ۴۱
- ۲-۲-۳- تهیه محیط کشت مورد نیاز برای آیلتها..... ۴۱
- ۲-۲-۴- جراحی رت و خارج کردن پانکراس..... ۴۱
- ۲-۲-۵- روش جداسازی جزایر لانگرهانس پانکراس..... ۴۲
- ۲-۲-۶- تشخیص و جداسازی آیلتهای پانکراس..... ۴۳
- ۲-۲-۷- تهیه غلظت‌های مختلف از سدیم آرسنیت..... ۴۴
- ۲-۲-۸- بررسی زنده مانی سلول‌ها به وسیله ی تست MTT..... ۴۵
- ۲-۲-۸-۱- معرفی تست MTT..... ۴۵
- ۲-۲-۸-۲- روش انجام تست MTT..... ۴۶
- ۲-۲-۸-۳- تعیین LC50 سدیم آرسنیت..... ۴۷
- ۲-۲-۸-۴- تعیین EC50 آزلائیک اسید در مقابل سدیم آرسنیت..... ۴۷
- ۲-۲-۹- اندازه گیری میزان استرس اکسیداتیو..... ۴۷
- ۲-۲-۹-۱- معرفی تست گونه‌های فعال اکسیژن..... ۴۷
- ۲-۲-۹-۲- آماده سازی نمونه‌ها جهت تست گونه‌های فعال اکسیژن..... ۴۸
- ۲-۲-۹-۳- روش انجام تست ROS..... ۴۸
- ۲-۲-۹-۴- اندازه گیری میزان پروتئین به روش بردفورد..... ۴۹
- ۲-۲-۹-۵- روش انجام تست بردفورد..... ۵۰
- ۲-۲-۱۰- بررسی میزان آزادسازی انسولین..... ۵۱
- ۲-۲-۱۱- بررسی آپتوز/نکروز به وسیله ی رنگ آمیزی Annexin-PI..... ۵۲
- ۲-۲-۱۲- بررسی تغییرات بیان ژن به روش Real-time PCR..... ۵۴

۵۵RNA کمی
۵۶cDNA به روش رونوشت برداری معکوس
۵۷Real-time PCR واکنش
۵۷ آنالیز داده‌ها
فصل سوم: نتایج	
۵۹۱-۱-۳ نتایج تست MTT
۵۹۱-۱-۳ بررسی اثر غلظت‌های مختلف سدیم آرسنیت بر آیلتهای پانکراس جهت تعیین LC50
۲-۱-۳ بررسی اثر غلظت‌های مختلف آزلائیک اسید جهت محافظت از آیلتهای پانکراس در برابر سمیت
۶۰سدیم آرسنیت جهت تعیین 50ED
۶۱۲-۳ نتایج تست ROS
۶۱۱-۲-۳ بررسی میزان ROS در پانکراس طی مواجهه با سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید
۶۲۳-۳ نتایج تست ترشح انسولین
۱-۳-۳ بررسی اثر مواجهه با سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید بر میزان ترشح انسولین
۶۲آیلتهای رت در فاز هایپرگلیسمی و پایه
۶۳۴-۳ نتایج تست آپاپتوز/ نکروز
۶۳۱-۴-۳ بررسی اثر سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید بر آپاپتوز آیلتهای رت
۶۵۵-۳ نتایج تست بیان ژن مارکرهای التهابی
۱-۵-۳ بررسی تغییر میزان بیان ژن TNF- α طی مواجهه با سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید
۶۵
۶۶۲-۵-۳ بررسی تغییر میزان بیان ژن IL-1 طی مواجهه با سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید
۳-۵-۳ بررسی تغییر میزان بیان ژن NF-KB طی مواجهه با سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید
۶۷

فصل چهارم: نتیجه گیری

۷۰ ۴-۱- بحث

۷۲ ۴-۲- پیشنهادات

۷۳ فهرست منابع

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۱۱	جدول ۱-۱- انواع گونه‌های فعال.....
۳۰	جدول ۲-۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی و فارماکوکینتیکی آزلائیک اسید.....
۳۸	جدول ۱-۲- دستگاه‌های مورد نیاز به همراه مدل و کشور سازنده.....
۳۸	جدول ۲-۲- وسایل مورد نیاز به همراه کشور و شرکت سازنده.....
۳۹	جدول ۳-۲- نام مواد و کیت‌ها به همراه کشور سازنده.....
۴۰	جدول ۴-۲- بافر کربس.....
۴۰	جدول ۵-۲- بافر فسفات سالین.....
۴۸	جدول ۶-۲- بافر استخراج.....
۴۸	جدول ۷-۲- بافر واکنشگر.....
۵۰	جدول ۸-۲- غلظت‌های لازم از BSA برای تهیه‌ی استاندارد پروتئین.....

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- روابط توپوگرافی پانکراس.....	۳
شکل ۲-۱- نمایی از عملکرد پانکراس و جزایر لانگرهانس.....	۵
شکل ۳-۱- گیرنده‌ی انسولین.....	۷
شکل ۴-۱- آبخار انتقال ROS بین گونه‌ها.....	۱۳
شکل ۵-۱- منابع داخلی گونه‌های فعال اکسیژن و مسیرهای سمزدایی.....	۱۴
شکل ۶-۱- مقایسه دو مسیر مرگ سلول؛ نکروز (سمت چپ)، مرگ برنامه ریزی شده سلول (سمت راست)	
.....	۱۹
شکل ۷-۱- ارتباط بین استرس اکسیداتیو، التهاب و دیابت.....	۲۵
شکل ۸-۱- ساختار آزلائیک اسید.....	۲۹
شکل ۱-۲- نمایی از جراحی رت.....	۴۲
شکل ۲-۲- آیلت پانکراس.....	۴۳
شکل ۳-۲- آیلت‌های پانکراس.....	۴۴
شکل ۴-۲- آیلت‌ها زیر استریومیکروسکوپ.....	۴۴
شکل ۵-۲- احیا MTT به کریستال فورمازان.....	۴۶
شکل ۶-۲- تست MTT.....	۴۶
شکل ۷-۲-.....	۵۱
شکل ۸-۲- پلیت حاوی نمونه بر روی انکوباتور شیکر.....	۵۲
شکل ۹-۲- Real-time PCR برای بررسی تغییرات بیان ژن.....	۵۵
شکل ۱۰-۲- ساخت cDNA به روش رونوشت برداری معکوس.....	۵۶
شکل ۱-۳- ارزیابی تست فلوسایتومتری اثر سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید بر سلول‌های جزایر لانگرهانس رت نر.....	۶۴

فهرست نمودار

عنوان	صفحه
نمودار ۱-۳- اثر غلظت‌های مختلف سدیم آرسنیت (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 میکرومولار بر میلی لیتر) بر زنده مانی آیلتهای رت نر.....	۵۹
نمودار ۲-۳- اثر غلظت‌های مختلف آزلائیک اسید (1, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000 میکرومولار بر میلی لیتر) در برابر سمیت سدیم آرسنیت بر زنده مانی آیلتهای رت نر.....	۶۰
نمودار ۳-۳- اثر مواجهه با سم سدیم آرسنیت و آزلائیک اسید و ترکیب این دو بر میزان ROS تولید شده در آیلتهای پانکراس رت نر.....	۶۱
نمودار ۴-۳- اثر مواجهه با سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید و ترکیب این دو بر میزان ترشح انسولین از جزایر سلولی لانگرهانس رت نر	۶۲
نمودار ۵-۳- اثر سم سدیم آرسنیت و داروی آزلائیک اسید بر آپتوز سلول‌های جزایر لانگرهانس رت نر ...	۶۵
نمودار ۶-۳- اثر مواجهه با سم سدیم آرسنیت و آزلائیک اسید بر میزان بیان ژن TNF- α در پانکراس رت نر	۶۶
نمودار ۷-۳- اثر مواجهه با سم سدیم آرسنیت و آزلائیک اسید بر میزان بیان ژن IL-1 در پانکراس رت نر.....	۶۷
نمودار ۸-۳- اثر مواجهه با سم سدیم آرسنیت و آزلائیک اسید بر میزان بیان ژن NF-KB در پانکراس رت نر	۶۸