

## تأثیر آلوکسان در آپوپتوزیس سلولهای بتای لوزالمعدة موش رت

یوسف دوستار<sup>۱</sup>، علیرضا گرجانی<sup>۲</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۱</sup> استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز<sup>۲</sup> استادیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز<sup>۳</sup> دانشجوی PhD ژنتیک مولکولی، دانشکده پزشکی، واحد پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

## چکیده

**سابقه و هدف:** داروی آلوکسان با القاء تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) توکسیسته سلولهای بتا را میانجیگری می‌نماید. رادیکالها همچنین باعث مرگ آپپتوتیک سلولها می‌گردند. هدف از این مطالعه، بررسی نقش آلوکسان در تغییرات مورفولوژیکی الگوی مرگ سلولی از نوع آپپتوزیس با کاربرد دوزهای مختلف داروی آلوکسان بوده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی تعدادی موش صحرانی با وزن تقریبی ۲۰۰ گرم انتخاب و آنها را به چهار گروه پنج تائی تقسیم نمودیم. موشهای گروه تیمار به ترتیب مقادیر ۱۳۵، ۹۰ و ۴۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدنشان به روش داخل صفاقی داروی آلوکسان و گروه کنترل نیز تنها سالین نرمال را دریافت نمودند. بعد از ۴۸ ساعت از تزریق، بافت پانکراس گروههای تیمار و کنترل نمونه برداری و آنها را جهت تهیه مقاطع بافتی ۵-۶ میکرونی و انجام روش تانل به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال نمودیم. همچنین در مدت زمانهای ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو از گروههای تیمار و کنترل نمونه خون تهیه و جهت اندازه گیری قند خون به آزمایشگاه بیوشیمی ارسال نمودیم.

**یافته‌ها:** مطالعات آزمایشگاهی نمونه‌های گروه تیمار نشانگر اشکال متعدد سلولهای آپپتوتیک و قند بالای خون در آنها نسبت به گروه کنترل بود بطوری که میانگین تعداد سلولهای آپپتوتیک در پنج میدان میکروسکوپی از نمونه تهیه شده از رت‌های تحت درمان با آلوکسان با سه دوز به طور معنی داری ( $p < 0.001$ ) بیشتر از گروه کنترل بود.

**نتیجه گیری:** نقش القاء آلوکسان در آپپتوزیس هنوز بطور دقیق مشخص نشده است اما احتمال می‌رود نقش آن در مرگ سلولی از طریق تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن باشد.

**واژگان کلیدی:** آلوکسان، آپپتوزیس، سلولهای بتا پانکراس.

## مقدمه

آلوکسان از اکسیداسیون اسیداوریک بدست می‌آید و شکل داروی آن بصورت پودر بوده و رنگ آن صورتی و در آب به آسانی حل می‌شود. داروی فوق اغلب در موارد سرطانهای بافت پانکراس و بیشتر در موارد تحقیقاتی به عنوان داروی دیابت‌زا کاربرد داشته و اختصاصاً روی سلولهای بتای پانکراس موثر می‌باشد (۱). خلاصه‌ای از اطلاعات ساختار شیمیائی

مربوط به این دارو در جدول شماره یک آورده شده است. آلوکسان موجب القاء دیابت در حیوانات می‌گردد با وجود این مکانیسم اصلی چگونگی اثر آن هنوز به طور دقیق مشخص نشده است. تفاسیر متعددی در مورد چگونگی اثر آلوکسان بیان گردیده است، نتایج تعدادی از تحقیقات اشاره به نقش مهم رادیکالهای سوپراکسید و هیدروژن پراکسید در خصوص مکانیسم مسمومیت آلوکسان دارند، اما تأثیر رادیکال هیدروکسیل در این مورد تأیید نشده است. آلوکسان و استرپتوزوتوسین به علت تشابهات ساختمانی با گلوکز باعث می‌شوند که این مواد از طریق راههای فرعی گیرنده گلوکز، به یاخته‌های بتا متصل شده یا داخل این یاخته‌ها شوند. آلوکسان

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بیمارستان جواهری، بخش اطفال، دکتر معصومه همت‌پار

(email: f\_hemat@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۱/۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱/۲۵

تزریق، میزان قند خون گروهها پس از خون گیری از ناحیه ورید دمی سنجیده و در پایان ۴۸ ساعت موشهای مورد آزمایش را با استفاده از کلروفرم بیهوش و از ناحیه پانکراس نمونه برداری صورت گرفت. نمونه ها را در داخل محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال نمودیم. پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی مناسب و رنگ آمیزیهای معمول و اختصاصی تانل مطالعات پاتولوژیکی بر روی مقاطع فوق انجام گردید بطوری که سلولهای آپوپتوتیک در پنج میدان میکروسکوپی شمارش شدند. برای آنالیز آماری داده ها از ANOVA یک طرفه و t-test استفاده شد.  $p < 0.05$  معنی دار تلقی شد.

#### نحوه اجرای تکنیک تشخیصی TUNEL

ابتدا مقاطع تهیه شده پس از پارافین زدائی و آبدهی با آنزیم پروتئیناز K مجاور و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با محلول PBS شستشو می گردند. سپس مجاور کردن مقاطع بافتی با محلول TUNEL reaction mixture به میزان ۵۰ میکرولیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شستشو با محلول PBS صورت می گیرد. مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول Converter-POD (۵۰ میکرولیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با محلول PBS شستشو و سپس با محلول DAB نیز مجاور گشته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی گراد مجدداً انکوبه می گردند. در نهایت شستشو با PBS و رنگ آمیزی با تولوئیدین بلو صورت می گیرد (۱۲، ۱۱).

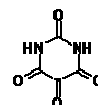
#### یافته ها

مطالعات میکروسکوپی سلولهای بتای جزایر لانگرهانس نشان داد که همواره با افزایش میزان دوز داروی کاربردی تعداد سلولهای آپوپتوتیک افزایش می یابد. در جدول ۲ تغییرات تعداد سلولهای آپوپتوتیک در جزایر بتای غده پانکراس و میزان قند خون در زمانهای مختلف آورده شده است. همانطوری که مشاهده می شود تزریق داخل صفاقی آلوکسان به صورت وابسته به دوز و طی ۱۲ ساعت باعث افزایش قابل ملاحظه در گلوکز خون رت ها می شود. آلوکسان بعد از ۴۸ ساعت در تمام گروههای دریافت کننده دارو به یک میزان موجب افزایش قند خون شده است. به عبارتی آلوکسان بعد از ۴۸ ساعت حداکثر اثر خود را در ایجاد دیابت القا کرده است. به طوری که مقدار قند خون با تزریق داخل صفاقی دوز ۴۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم آلوکسان از  $86 \pm 6$  mg/dl به  $425 \pm 84$  mg/dl یعنی حدود ۴۰۰ درصد افزایش یافته است.

و استرپتوزوتوسین داروهای هستند که بطور انتخابی یاخته های بتا را تخریب می نمایند بنابراین به عنوان یک وسیله مناسب برای ایجاد دیابت تجربی مورد استفاده قرار می گیرند. آلوکسان همچنین موجب تولید گونه های فعال اکسیژن فقط در جزایر پانکراس می شود (۵-۲). مطالعات قبلی نشان می دهد که درمان موشهای آزمایشگاهی با داروهای آنتاگونیست کلسیم نظیر Lanthanum و وراپامیل هیپرگلیسمی حاصله از تجویز آلوکسان را مهار می کند. آلوکسان باعث افزایش کلسیم آزاد سیتوزول سلولهای بتای پانکراس شده و احتمال می رود نقش دیابت زائی آن با میزان کلسیم داخل سیتوزول ارتباط داشته باشد. رادیکالهای آزاد اکسیژن باعث فراگمانتاسیون DNA گشته و با آسیب DNA و تجزیه آنزیم پلی آدنوزین دی فسفات ریبوز پلی مرارز (PARP)<sup>۱</sup> به دو جزء ۸۹ و ۲۴ کیلودالتون، سلول دیگر نمی تواند وارد مسیر ترمیم DNA شده و بنابراین مسیر آپوپتوزیس را پی می گیرد. از طرف دیگر افزایش میزان کلسیم در سیتوزول سلول می تواند با تاثیر بر پتانسیل نفوذپذیری غشاء میتوکندری ها و خروج سیتوکروم C و القاء آپوپتوزیس نقش داشته باشد. این تحقیق با هدف تعیین نوع مرگ سلولی متعاقب تاثیر داروی آلوکسان بر سلولهای بتای غده پانکراس انجام پذیرفته است (۱۰-۶، ۱).

#### جدول ۱- مشخصات شیمیائی داروی آلوکسان

|               |                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------|
| نام شیمیایی   | * 2,4,5,6(1H,3H)-Pyrimidinetrone monohydrate                |
| فرمول شیمیایی | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| وزن مولکولی   | ۱۶۰/۰۹ g/mol                                                |
| نقطه ذوب      | ۲۵۳°C                                                       |
| نقطه جوش      | °C                                                          |



#### مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از سه گروه تیمار و یک گروه کنترل استفاده شد بطوری که ۵ موش رت در هر گروه به ترتیب با عناوین Rat-D/135mgk، Rat-B/90mgk، Rat-A/45mgk و کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. سه گروه تیمار مقادیر مختلف داروی آلوکسان و گروه کنترل سالین نرمال را به روش داخل صفاقی دریافت و در ساعات ۲۴، ۳۶ و ۴۸ بعد از

<sup>۱</sup> Poly (ADP-ribose) polymerase

مهار آنزیم گلوکوکیناز (GK) اعمال می‌کند. این امر از طریق اکسیداسیون دو گروه تیول که محل باز شدن گلوکز بر روی آنزیم می‌باشد، انجام می‌گردد. با مهار آنزیم GK و به همراه آن کاهش بیان ژن‌های مولد آنزیم فوق و آنزیم Glucose Transporter-2 (Glut2) در سلولهای بتا و به دنبال این تغییرات تولید رادیکال‌های آزاد مسیر القای آپوپتوزیس سلولهای بتا راه‌اندازی می‌گردد. رادیکال‌های آزاد باعث افزایش پتانسیل نفوذپذیری غشای میتوکندری‌ها گشته و از این طریق خروج سیتوکروم C و رویداد آبشار کاسپازی آغاز می‌گردد که حاصل این وقایع آپوپتوزیس سلولهای بتا می‌باشد (۱۳). همچنین براساس مطالعات Kim و همکاران در سال ۱۹۹۴ داروی فوق از طریق دیگری نیز باعث القا آپوپتوزیس در سلولهای  $\beta$  می‌گردد و آن با افزایش کلسیم سیتوزول سلول می‌باشد. زمانی که کلسیم سیتوزول سلولی به حداکثر می‌رسد کانالهای PT میتوکندری‌ها باز شده و کلسیم داخل سلول توسط میتوکندری‌ها جذب می‌شود. در این حین با باز شدن کانالهای میتوکندری، سیتوکروم C از میتوکندری‌ها خارج و روند آپوپتوزیس با این عمل آغاز می‌گردد (۱، ۳، ۶). از طرف دیگر با تجویز آلوکسان و کاهش گلوکز داخل سلولی مسیرهای متابولیکی متعددی فعال می‌گردند که محصول نهایی تمامی این مسیرها به تولید رادیکال آزاد اکسیژن منتهی می‌گردد. این مسیرها عبارتند از:

◀ مسیر متابولیسم سوربیتول که اکسیداسیون سوربیتول به-وسیله  $NAD^+$  باعث افزایش نسبت  $NADH:NAD^+$  می‌گردد. این عامل باعث مهار فعالیت GAPDH و کاهش سطح Trios Phosphates و Methylglyoxal و دی‌اسیل‌گلیسرول می‌شود. این وقایع با مصرف  $NAD^+$  به‌وسیله فعال شدن پلی‌آدنوزین-دی‌فسفات ریبوزیلی‌مراز در ارتباط بوده که عامل آغازین آن هیپرگلیسمی حاصله از تجویز آلوکسان بوده و می‌تواند در القاء آپوپتوزیس به‌واسطه آنزیم PARP نقش داشته باشد.

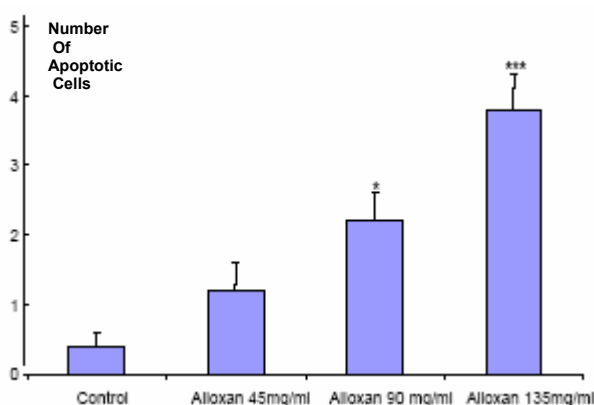
◀ تجویز داروی آلوکسان باعث مهار آنزیم پروتئین‌کیناز C سلولهای بتای پانکراس می‌گردد که علت آن کاهش دی‌اسیل‌گلیسرول می‌باشد. با کاهش میزان دی‌اسیل‌گلیسرول آنزیم پروتئین‌کیناز A فعال و تحمل سلول نسبت به افزایش کلسیم داخل سلولی کاهش می‌یابد. بنابراین شرایط برای القاء آپوپتوزیس مساعد می‌گردد.

◀ مسیر دیگری که در توجیح آپوپتوزیس بدنال تجویز آلوکسان نقش دارد فعال شدن مسیر استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد که محصول نهایی آن تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۶-۳، ۱۴). افزایش میزان رادیکال‌های آزاد

تعداد سلولهای آپوپتوتیک در جزایر لانگرهانس در گروه کنترل که سالین دریافت کرده‌اند و گروههای دریافت‌کننده آلوکسان در شکل ۱ نشان داده شده است. آلوکسان به‌صورت کاملاً وابسته به دوز و معنی‌دار تعداد سلولهای آپوپتوتیک را افزایش داده است بطوری‌که دوز  $135\text{mg/kg}$  تعداد این سلولها را از  $0.4 \pm 0.2$  در گروه کنترل به  $3.8 \pm 0.5$  افزایش داده است ( $p < 0.001$ ).

جدول ۲- میزان قند خون ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف آلوکسان در موشهای صحرایی نر وبستار ( $p < 0.001$ )

| گروهها             | ۱۲     | ۲۴     | ۳۶     | ۴۸     |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|
| کنترل (سالین)      | ۸۶±۶   | ۸۹±۶   | ۸۸±۵   | ۸۵±۶   |
| آلوکسان (۴۵mg/kg)  | ۳۱۴±۵۲ | ۳۷۲±۴۷ | ۴۶۶±۵۳ | ۴۲۵±۸۴ |
| آلوکسان (۹۰mg/kg)  | ۴۲۵±۸۱ | ۴۴۹±۴۶ | ۴۶۰±۵۹ | ۴۹۴±۶۷ |
| آلوکسان (۱۳۵mg/kg) | ۵۰۵±۱۴ | ۵۱۱±۲۵ | ۵۱۴±۴۱ | ۵۹۰±۴۵ |



نمودار ۱- میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در ۵ میدان میکروسکوپی بدست آمده از جزایر لانگرهانس به روش تانل در رت‌های دریافت‌کننده سالین (کنترل) و آلوکسان با دوزهای مختلف ( $p < 0.001$ ،  $p < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل)

## بحث

نتایج نشان داد تزریق IP داروی آلوکسان در موش‌های رت با دوزهای مختلف و صعودی تغییرات مرگ سلولهای بتای جزایر لانگرهانس پانکراس را القا و افزایش می‌دهد. داروی فوق براساس یافته‌های دانشمندانی نظیر Conen و Heikkila در سال ۱۹۷۴ و Takasa در سال ۱۹۹۱ به عنوان داروی هدف DNA سلولهای بتا شناخته شد، بطوری‌که گمان می‌رود آلوکسان نقش تخریبی خود را بر روی سلولهای بتا از طریق

مفیدی را در زمینه مرگ آپوپتوتیکی سلولهای بتا پانکراس به ما می‌دهد. به احتمال قوی اثرات دیابتوژنیک داروی فوق از طریق القای آپوپتوزیس سلولهای بتا پانکراس می‌باشد، بطوری که از نظر تعداد سلولهای آپوپتوتیک آنالیز داده‌های بدست آمده از نتایج کار پژوهش فوق اختلاف معنی‌داری را در بین و داخل گروههای تیمار و کنترل نشان می‌دهد. البته شاید اثرات آلوکسان وابسته به دوز نیز باشد (۳).

### تشکر و قدردانی

با تشکر از استاد ارجمند جناب آقای دانش‌پژوهان که در انجام امور آزمایشگاهی ما را یاری نمودند.

داخل سلولی باعث افزایش پتانسیل نفوذپذیری غشای میتوکندری‌ها و خروج سیتوکروم C می‌گردد که در راه‌اندازی مسیرهای آپوپتوزیس سلولی نقش تعیین‌کننده ای دارد. نتایج تزریق داروی آلوکسان با دوزهای مختلف و افزایش میزان سلولهای آپوپتوتیک با تغییرات صعودی دوز دارو همواره با بیان تغییرات کلسیم سیتوزول سلول و نقش رادیکال‌های آزاد در القا آپوپتوزیس با توجه به مطالب شرح داده شده بالا قابل تفسیر و استدلال می‌باشد. حداکثر و حداقل میزان تغییرات آپوپتوزیس به ترتیب در دوزهای ۱۳۵mg/kg و ۴۵mg/kg از داروی آلوکسان بود که بیان و تفسیر تغییرات مرگ سلولی با استدلال در زمینه‌های نقش مهار آلوکسان در عملکرد آنزیم گلوکوکیناز و GT-2، تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و افزایش  $Ca^{2+}$  سیتوزول سلول اطلاعات

## REFERENCES

۱. سهرابی حق‌دوست ا، جمشیدیان قلعه شاهی ع، مخبردزفولی م. بررسی هیستوپاتولوژیکی ضایعات کبد و لوزالمعده در دیابت ملیتوس تجربی ایجاد شده بوسیله آلوکسان در بز. مجله علوم دامپزشکی ایران، ۱۳۸۳؛ سال اول، شماره یک، صفحات ۴۹-۳۵.
۲. عیسی بیگلر ا. نقش نیتریک اکسید در پاسخ موش سوری مبتلا به دیابت تجربی. پایان نامه دوره دکتری حرفه ای، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، دانشکده دامپزشکی، سال ۱۳۸۱.
3. Hye-won R, Ji-Na L, Hyung-Rhokim M. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced B-cell damage. *Exp Mol Med* 2000;32(1):12-7.
4. Sabin SIW, Claudia D, Patrica SO, Helga G. Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. *Life Sciences* 2001;71:1681-94.
5. Soldani C, Scorassi AI. Play (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis. *Apoptosis* 2002;7:321-28.
6. Jorns A, Tiedge M, Lenzen S. Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islet in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26:1300-4.
7. Hui H, Dotta F, Di Mario U, Perfetti R. Role of caspase in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J Cell Physiol* 2004;200:177-200.
8. Domingo JL, Gomez M, Llobet JM, Corbella J, Keen CL. Improvement of glucose homeostasis by oral vanadyl or vanadate treatment in diabetic rats is accompanied by negative side effects. *Pharmacol Toxicol* 1991;68:249-53.
9. Broca C, Gross R, Petit P, Sauvaire YM. Experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties. *Am J Physiol* 1999;277:E617-E623.
10. Saldeen J. Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* 2000;141:2003-10.
۱۱. دوستار ی. مطالعه آزمایشی آپوپتوزیس القاء شده توسط ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها با استفاده از تکنیک‌های تشخیصی TUNEL و میکروسکوپ. پایان‌نامه دوره دکتری تخصصی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، سال ۱۳۸۳.
12. Suresh Y, Das N. Protective action of arachidonic acid against alloxan-induced cytotoxicity and diabetes mellitus. *Prostaglandine Leukotrienes Journal* 2000;64:37-52.
13. Federici M, Rival M, Perego L, Ranalli M. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 2001;50:1290-1301.
14. Cushman S, Wardzala L. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1980;255:4758-62.

15. Dunger A, Augstein P, Schmidt S, Fisher U. Identification of interleukin 1-induced apoptosis in rat islets using in situ specific labelling of fragmented DNA. *J Autoimmune* 1996;9:309-13.
16. Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to alloaxn-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2301-4.