مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۸۵، صفحات ۲۹ تا ۳۳

Original Article

تاثیر آلوکسان در آپوپتوزیس سلولهای بتای لوزالمعده موش رت

یوسف دوستار[۱]، علیرضا گرجانی[۲]، مهرداد هاشمی[۳]

[۱] استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز
[۲] استادیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
[۳] 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) توکسیسیته سلولهای بتا را میانجیگری می‌نماید. رادیکال‌ها همچنین باعث مرگ آپوپتوتیک سلولها می‌گردند. هدف از این مطالعه، بررسی نقش آلوکسان در تغییرات مورفولوژیکی الگوی مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس با کاربرد دوزهای مختلف داروی آلوکسان بوده است.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی تعدادی موش صحرائی با وزن تقریبی ۲۰۰ گرم انتخاب و آنها را به چهار گروه پنج تائی تقسیم نمودیم. موشهای گروه تیمار به ترتیب مقادیر ۱۳۵، ۹۰و ۴۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدنشان به روش داخل صفاقی داروی آلوکسان و گروه کنترل نیز تنها سالین نرمال را دریافت نمودند. بعد از۴۸ ساعت از تزریق، بافت پانکراس گروههای تیمار و کنترل نمونه‌برداری و آنها را جهت تهیه مقاطع بافتی ۶-۵ میکرونی و انجام روش تانل به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال نمودیم. همچنین در مدت زمانهای ۱۲،۲۴، ۳۶ و ۴۸ساعت بعد از تزریق دارو از گروههای تیمار و کنترل نمونه خون تهیه و جهت اندازه‌گیری قند خون به آزمایشگاه بیوشیمی ارسال نمودیم.*

یافته‌ها: *مطالعات آزمایشگاهی نمونه‌های گروه تیمار نشانگر اشکال متعدد سلولهای آپوپتوتیک و قند بالای خون در آنها نسبت به گروه کنترل بود بطوری‌که میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در پنج میدان میکروسکوپی از نمونه تهیه شده از رت‌های تحت درمان با آلوکسان با سه دوز به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) بیشتر از گروه کنترل بود.*

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

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

مقدمه

آلوکسان از اکسیداسیون اسیداوریک بدست می‌آید و شکل داروی آن بصورت پودر بوده و رنگ آن صورتی و در آب به‌آسانی حل می‌شود. داروی فوق اغلب در موارد سرطانهای بافت پانکراس و بیشتر در موارد تحقیقاتی به‌عنوان 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 به‌طور 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 هیدروژن‌پراکسید در خصوص مکانیسم مسمومیت آلوکسان دارند، اما تاثیر رادیکال هیدروکسیل در این مورد تائید 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

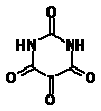
آدرس نویسنده مسئول: تهران، بیمارستان جواهری، بخش اطفال، دکتر معصومه همت‌یار
(**email**: f_hemat@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸٤/۱۱/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱/۲۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-09-27]

و استرپتوزوتوسین داروهای هستند که بطور انتخابی یاخته‌های بتا را تخریب می‌نمایند بنابراین به‌عنوان یک وسیله مناسب برای ایجاد دیابت تجربی مورد استفاده قرار می‌گیرند. آلوکسان همچنین موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن فقط در جزائر پانکراس می‌شود (۵-۲). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که درمان موشهای آزمایشگاهی با داروهای آنتاگونیست کلسیم نظیر Lanthanum و وراپامیل هیپرگلیسمی حاصله از تجویز آلوکسان را مهار می‌کند. آلوکسان باعث افزایش کلسیم آزاد سیتوزول سلولهای بتای پانکراس شده و احتمال می‌رود نقش دیابت‌زائی آن با میزان کلسیم داخل سیتوزول ارتباط داشته باشد. رادیکالهای آزاد اکسیژن باعث فراگمانتاسیون DNA گشته و با آسیب DNA و تجزیه آنزیم پلی‌آدنوزین‌دی فسفات ریبوز پلی‌مراز(PARP)[1] به دو جزء ۸۹ و ۲۴ کیلودالتون، سلول دیگر نمی‌تواند وارد مسیر ترمیم DNA شده و بنابراین مسیر آپوپتوزیس را پی می‌گیرد. از طرف دیگر افزایش میزان کلسیم در سیتوزول سلول می‌تواند با تاثیر بر پتانسیل نفوذپذیری غشاء میتوکندری‌ها 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)-Pyrimidinetetrone monohydrate
فرمول شیمیایی	$C_4H_4N_2O_2$
وزن مولکولی	۱۶۰/۰۹g/mol
نقطه ذوب	۲۵۳°c
نقطه جوش	۰°c



مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از سه گروه تیمار و یک گروه کنترل استفاده شد بطوری‌که ۵ موش رت در هرگروه به ترتیب با عناوین Rat-A/45mgk، Rat-B/90mgk، Rat-D/135mgk 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،۱۲، ۳۶ و ۴۸ بعد از تزریق، میزان قند خون گروهها پس از خون‌گیری از ناحیه ورید دمی سنجیده و در پایان ۴۸ ساعت موشهای مورد آزمایش را با استفاده از کلروفرم بیهوش و از ناحیه پانکراس نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها را در داخل محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال نمودیم. پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی مناسب و رنگ‌آمیزیهای معمول و اختصاصی تانل مطالعات پاتولوژیکی بر روی مقاطع فوق انجام گردید بطوری‌که سلولهای آپوپتوتیک در پنج میدان میکروسکوپی شمارش شدند. برای آنالیز آماری داده‌ها از ANOVA یک‌طرفه و t-test استفاده شد. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد.

نحوه اجرای تکنیک تشخیصی TUNEL:

ابتدا مقاطع تهیه شده پس از پارافین‌زدائی و آب‌دهی با آنزیم پروتئیناز K مجاور و پس از انکوباسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول PBS شستشو می‌گردند. سپس مجاور کردن مقاطع بافتی با محلول TUNEL reaction mixture به میزان ۵۰ میکرولیتر به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شستشو با محلول PBS صورت می‌گیرد. مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول Converter-POD (۵۰ میکرولیتر) به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول PBS شستشو و سپس با محلول DAB نیز مجاور گشته و به‌مدت۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد مجدداً انکوبه می‌گردند. در نهایت شستشو با PBS و رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو صورت می‌گیرد (۱۲،۱۱).

یافته‌ها

مطالعات میکروسکوپی سلولهای بتای جزایر لانگرهانس نشان داد که همواره با افزایش میزان دوز داروی کاربردی تعداد سلولهای آپوپتوتیک افزایش می‌یابد. در جدول ۲ تغییرات تعداد سلولهای آپوپتوتیک در جزایر بتای غده پانکراس و میزان قند خون در زمانهای مختلف آورده شده است. همانطوری‌که مشاهده می‌شود تزریق داخل صفاقی آلوکسان به‌صورت وابسته به‌دوز و طی ۱۲ ساعت باعث افزایش قابل ملاحظه در گلوکز خون رت‌ها می‌شود. آلوکسان بعد از ۴۸ ساعت در تمام گروههای دریافت‌کننده 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. به‌طوری‌که مقدار قند خون با تزریق داخل صفاقی دوز ۴۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم آلوکسان از ۸۶±۶mg/dl به ۴۲۵±۸۴mg/dl یعنی حدود ۴۰۰ درصد افزایش یافته است.

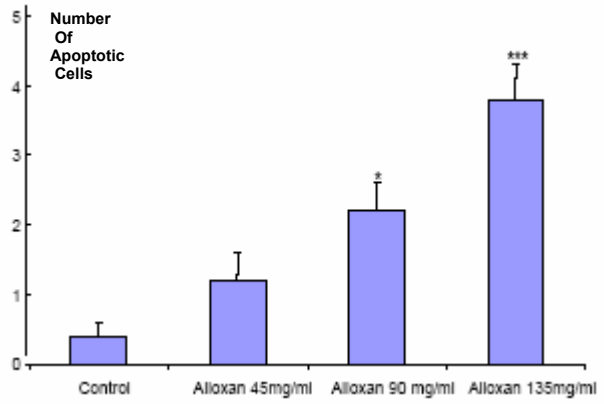
[1] Poly (ADP-ribose) polymerase

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-09-27]

تعداد سلولهای آپوپتوتیک در جزایر لانگرهانس در گروه کنترل که سالین دریافت کرده‌اند و گروههای دریافت‌کننده آلوکسان در شکل۱ نشان داده شده است. آلوکسان به‌صورت کاملا وابسته به دوز و معنی‌دار تعداد سلولهای آپوپتوتیک را افزایش داده است بطوری‌که دوز ۱۳۵mg/kg تعداد این سلولها را از۰/۴±۰/۲ در گروه کنترل به ۳/۸±۰/۵ افزایش داده است ($p<0/001$).

جدول ۲- میزا ن قند خون ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف آلوکسان در موشهای صحرایی نر ویستار (* $p<0/001$)

گروهها	مقدارقندخون پس از تزریق آلوکسان (ساعت)			
	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 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 (Glutz) در سلولهای بتا و به‌دنبال 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 ماحصل 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 β می‌گردد و آن با افزایش کلسیم سیتوزول سلول می‌باشد. زمانی‌که 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 (۶،۳،۱). از طرف دیگر با تجویز آلوکسان و کاهش گلوکز داخل سلولی مسیرهای متابولیکی متعددی فعال می‌گردند که محصول نهائی تمامی این مسیرها به تولید رادیکال آزاد اکسیژن منتهی می‌گردد. این مسیرها عبارتند از:

◄ مسیر متابولیسم سوربیتول که اکسیداسیون سوربیتول به‌وسیله 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 ریبوزپلی‌مراز 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 دی‌اسیل گلیسرول 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 بدنبال تجویز آلوکسان نقش دارد فعال شدن مسیر استرسهای اکسیداتیو می‌باشد که محصول نهائی آن تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۶-۳،۱۴). افزایش میزان رادیکال‌های آزاد

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-09-27]

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 شدهء 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 مهاری آلوکسان در عملکرد آنزیم گلوکوکیناز و GT-2، تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و افزایش Ca_2^+ سیتوزول سلول اطلاعات مفیدی را در زمینه مرگ آپوپتوتیکی سلولهای بتا پانکراس به ما می‌دهد. به احتمال قوی اثرات دیابتوژنیکی داروی فوق از طریق القای آپوپتوزیس سلولهای بتا پانکراس می‌باشد، بطوری‌که 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.

REFERENCES

۱. سهرابی حقدوست ا، جمشیدیان قلعه شاهی ع، مخبردزفولی م. بررسی هیستوپاتولوژیکی ضایعات کبد و لوزالمعده در دیابت ملیتوس تجربی ایجاده شده بوسیله آلوکسان در بز. مجله علوم دامپزشکی ایران، ۱۳۸۳؛ سال اول، شماره یک، صفحات ۴۹-۳۵.

۲. عیسی بیگلو 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-producingcells. Endocrinology 2000;141:2003-10.

۱۱. دوستار ی. مطالعهٔ 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 cytoxicity and diabetes mellitus. Prostaglandine Leuktrienes 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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-09-27]

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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-09-27]