

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه برای دریافت درجه دکترای عمومی داروسازی

تحت عنوان:

اثر حفاظتی اپی ژنین در مهار سمیت سلولی ایجاد شده توسط فسفید آلومینیوم بر روی

کاردیومیوسیت های ایزوله شده از قلب موش صحرائی

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارنده:

عسل جاهدثانی

تیر ۹۹

شماره پایان نامه: ۹۹/۴-۳۸د

بسمه تعالی

گواهی اصالت پایان نامه

بدینوسیله اعلام می نماید که این پایان نامه بر اساس نتایج بررسی ها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب بوده و بوسیله خودم انشا گردیده است و قبلاً بعنوان پایان نامه در سایر مقاطع و دوره های تحصیلی ارایه نگردیده است.

بدینوسیله اصالت (ORIGINALITY) و صحت نتایج این پایان نامه مورد تأیید اینجانب، استاد راهنما می باشد.

تقدیم به پدر و مادرم:۞

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پر بار
وجودشان بیاسایم و از ریشه آن ها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش
تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که
این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی
زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، و انسان بودن را معنا کردند.....

بوسه بر دستان پرمهرتان

تقدیم به برادرم:۞

که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات بوده و وجودش
مایه دلگرمی من می باشد.

استاد گرامی جناب آقای دکتر احمد سلیمی

دلسوزی، تلاش و کوشش حضرت تعالی در تعلیم و تربیت و انتقال معلومات و تجربیات ارزشمند در کنار برقراری رابطه صمیمی و دوستانه با دانشجویان و ایجاد فضائی دلنشین برای کسب علم و دانش و درک شرایط دانشجویان حقیقتاً قابل ستایش است. اینجانب بر خود وظیفه میدانم در کسوت شاگردی از زحمات و خدمات ارزشمند شما استاد گرانقدر تقدیر و تشکر نمایم ■

از خداوند متعال برایتان سلامتی، موفقیت و همواره یاد دادن را مسئلت دارم.

چکیده

مقدمه:

اپی ژنین یک ترکیب طبیعی است که به میزان فراوانی در میوه ها و سبزیجات یافت میشود. در مطالعات حیوانی و بالینی این فلاونوئید طبیعی اثرات قوی محافظت کننده ی قلبی را نشان داده است. عوارض قلبی و عروقی عامل اصلی مرگ ناشی از فسفیدآلومینیوم (AIP) است. به این منظور اثر اپی ژنین به عنوان عامل محافظت کننده ی قلبی در برابر سمیت قلبی ایجاد شده در اثر مصرف فسفید آلومینیوم بررسی شده است.

مواد و روش:

کاردیومیوسیت های بدست آمده از بطن قلب موش با استفاده از روش های بیوشیمیایی و فلوسیتومتری بررسی و پارامترهای زنده ماننی سلولی، تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS)، پتانسیل غشای میتوکندری (MMP)، پایداری غشای لیزوزومی، مالون دی آلدیید (MDA) و اکسایش / کاهش گلووتاتیون (GSH/GSSG) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:

نتایج ما نشان داد که اپی ژنین دارای اثر حفاظتی یکسان در بالاترین غلظت مورد استفاده ($100 \mu\text{M}$) در مورد صدمات لیزوزومی ناشی از AIP است. در نتیجه، براساس مطالعه حاضر، اپی ژنین طیف گسترده ای از ویژگی های محافظتی را در برابر سمیت قلبی ناشی از AIP دارد. ما نشان دادیم که اپی ژنین می تواند از قلب در برابر صدمات ناشی از AIP محافظت کند. تشکیل ROS، آسیب لیزوزومی، آسیب میتوکندری و پراکسیداسیون لیپید ناشی از AIP نیز توسط اپی ژنین کاهش یافته است.

بحث و نتیجه گیری:

با توجه به نقش غالب سمیت قلبی در بیماران مسموم با AIP، در مطالعه حاضر ما کاردیومیوسیت های قلب موش صحرایی را ارزیابی کردیم تا اثرات محافظتی اپی ژنین را در برابر سمیت سلولی ناشی از AIP بررسی کنیم. اعتقاد بر این است که عوامل آنتی اکسیدان طبیعی ممکن است راهی برای درمان اختلالات قلبی عروقی ایجاد کنند. اپی ژنین یکی از ترکیبات اصلی فعال در بسیاری از گیاهان دارویی است که معمولاً به منظور اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی استفاده می شود.

واژه های کلیدی:

فسفید آلومینیوم، اپی ژنین، کاردیومیوسیت ها، رادیکال های فعال اکسیژن، آسیب میتوکندریایی، آسیب لیزوزومی، سمیت سلولی

فهرست مطالب

۱	فصل اول: مقدمه
۲	۱-۱. قلب
۲	۱-۱-۱. ساختار کلی قلب
۳	۱-۱-۲. سلول های قلبی
۴	۱-۱-۳. ضربان سازی
۵	۱-۱-۴. پتانسیل های عمل قلبی
۸	۱-۱-۵. سمیت قلبی
۹	۱-۲. میتوکندری
۱۰	۱-۲-۱. ساختار میتوکندری
۱۲	۱-۲-۲. زنجیره ی تنفسی میتوکندری
۱۴	۱-۲-۳. نقش میتوکندری در بیماری های قلبی
۱۷	۱-۲-۴. نقص در عملکرد میتوکندری
۱۷	۱-۳. استرس اکسیداتیو
۱۹	۱-۳-۱. تاثیر استرس اکسیداتیو بر روی بدن
۲۰	۱-۳-۲. مدیریت و جلوگیری از استرس اکسیداتیو
۲۱	۱-۴. لیپید پراکسیداسیون
۲۳	۱-۵. گلووتاتیون
۲۶	۱-۶. لیزوزوم
۲۷	۱-۶-۱. غشای لیزوزوم
۲۸	۱-۶-۲. وظایف لیزوزوم در بدن
۲۹	۱-۷. فسفید آلومینیوم
۲۹	۱-۷-۱. تعریف و ساختار فسفید آلومینیوم
۳۰	۱-۷-۲. مسمومیت با فسفید آلومینیوم
۳۱	۱-۷-۲-۱. سمیت قلبی
۳۲	۱-۷-۲-۲. سمیت سیستم گوارشی
۳۲	۱-۷-۲-۳. سمیت سیستم تنفسی
۳۳	۱-۷-۲-۴. سمیت سیستم عصبی
۳۳	۱-۷-۲-۵. سمیت کبدی
۳۳	۱-۷-۲-۶. اختلالات الکترولیتی
۳۴	۱-۷-۳. مکانیسم عمل فسفید آلومینیوم
۳۶	۱-۷-۴. تاثیر فسفید آلومینیوم بر بدن
۳۸	۱-۷-۵. درمان مسمومیت با فسفید آلومینیوم

۴۰	۱-۸. معرفی ماده موثره مورد تحقیق.....
۴۰	۱-۸-۱. فلاونوئیدها.....
۴۱	۱-۸-۱-۱. شیمی فلاونوئیدها.....
۴۲	۱-۸-۱-۲. دسته بندی فلاونوئیدها.....
۴۲	۱-۸-۱-۳. ویژگی های فارماکولوژیکی فلاونوئیدها.....
۴۳	۱-۸-۲. اپی ژنین.....
۴۳	۱-۸-۲-۱. معرفی اپی ژنین.....
۴۴	۱-۸-۲-۲. ساختار شیمیایی و خصوصیات فیزیکی اپی ژنین.....
۴۵	۱-۸-۲-۳. نقش اپی ژنین در بدن.....
۴۶	۱-۹. بررسی متون.....
۴۷	۱-۱۰. اهداف.....
۴۷	۱-۱۰-۱. هدف کلی طرح.....
۴۷	۱-۱۰-۲. اهداف اختصاصی طرح.....
۴۸	۱-۱۱. سوالات و فرضیات.....
۴۹	۱-۱۲. گردش کار.....
۵۰	فصل دوم: مواد و روش ها.....
۵۱	۲-۱. نوع مطالعه و محل انجام آزمایشات.....
۵۱	۲-۱-۱. نوع مطالعه.....
۵۱	۲-۱-۲. محل انجام آزمایش های پایان نامه.....
۵۱	۲-۲. مواد شیمیایی و معرف ها.....
۵۴	۲-۳. طرز ساخت بافر ها و محلول ها.....
۵۴	۲-۳-۱. بافر پرفیوژن.....
۵۴	۲-۳-۲. پاول مدیوم.....
۵۵	۲-۳-۳. بافر کلسیم کلراید.....
۵۵	۲-۳-۴. بافر CCTM.....
۵۶	۲-۳-۵. بافر PRE- PLATING.....
۵۶	۲-۳-۶. بافر DIGESTION.....
۵۷	۲-۳-۷. بافر فسفات.....
۵۷	۲-۳-۸. بافر TRIS-HCL.....
۵۷	۲-۳-۹. Reactive solution.....
۵۸	۲-۳-۱۰. بافر تعیین پراکسیداسیون لیپید ها.....
۵۸	۲-۴. وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی.....
۵۸	۲-۴-۱. وسایل عمومی.....

۵۸.....	۲-۴-۲. وسایل اختصاصی.....
۵۸.....	۲-۴-۳. دستگاه ها و تجهیزات آزمایشگاهی.....
۶۶.....	۲-۵. روش کار.....
۶۶.....	۲-۵-۱. آزمایشات حیوانی.....
۶۷.....	۲-۵-۲. جداسازی و کشت کاردیومیوسیت ها.....
۷۰.....	۲-۵-۳. بررسی میزان زنده ماندن کاردیومیوسیت ها.....
۷۱.....	۲-۵-۴. اندازه گیری میزان رادیکال های فعال اکسیژن.....
۷۱.....	۲-۵-۵. اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری.....
۷۲.....	۲-۵-۶. بررسی غشای لیزوزوم.....
۷۲.....	۲-۵-۷. اندازه گیری لیپید پراکسیداسیون.....
۷۳.....	۲-۵-۸. اندازه گیری GSH و GSSG.....
۷۴.....	۲-۶. تحلیل آماری.....
۷۵.....	فصل سوم: نتایج.....
۷۶.....	۳-۱. نتایج زنده مانی سلول ها.....
۷۸.....	۳-۲. نتایج میزان رادیکال های فعال اکسیژن.....
۸۰.....	۳-۳. نتایج اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری.....
۸۲.....	۳-۴. نتایج بررسی غشای لیزوزوم.....
۸۴.....	۳-۵. نتایج اندازه گیری لیپید پراکسیداسیون.....
۸۶.....	۳-۶. نتایج اندازه گیری GSH و GSSG.....
۸۸.....	فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری.....
۸۹.....	۴-۱. بحث و نتیجه گیری.....
۹۴.....	۴-۲. پیشنهادات.....
۹۴.....	۴-۳. محدودیت ها.....
۹۵.....	منابع.....
۱۰۵.....	چکیده به زبان انگلیسی.....
۱۰۶.....	مقاله ی منتج از پایان نامه.....
۱۰۷.....	مصوبه ی اخلاق در پژوهش.....
۱۰۸.....	ارزشیابی هیئت داوران.....

AC: Activated Charcoal

ALP: Aluminum Phosphide

ANOVA: Analysis Of Variance

AO: Acridin Orang

APG: Apigenin

API: Apigenin

ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome

ATP: Adenosine Triphosphate

AV: Atrioventricular

BP: Blood Pressure

BCL-2: A Family of Apoptotic Proeins

BSA: Bovine Serum Albumin

BHT: Butylated Hydroxytoluene

CVD: Cardiovascular Disease

CHF: Congestive Heart Failure

DCFH-DA: 2' , 7' -Dichlorofluorescin Diacetate

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DOX: Doxorubicin

ECG: Electrocardiography

EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid

EGTA: Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-Tetraacetic Acid

ELISA: Enzyme-Linked Sorbent Assay

FADH₂: Flavin Adenine Dinucleotide

FBS: Fetal Bovine Serum

GPX: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione

GSSG: Glutathione Disulfide

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HR: Heart Rate

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid

LA: Left Atrium

LV: Left Ventricular

MDA: Malondialdehyde

MDA: 3, 4-Methylenedioxyamphetamine

MI: Myocardial Infarction

MMP: Mitochondrial Membrane Protentiona

MPTP: mitochondrial Permeability Transition Pore

MTT: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide

NCLX: Sodium/Potassium/Calcium Exchanger

PBS: Phosphate Buffered Saline

PTSD: Post Traumatic Stress Disorder

Q-NADH: NADH-Coenzyme Q reductase

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

RV: Right Ventricular

SA: Sinoatrial

TBA: ThioBarbituric Acid

TCA: TriChloroacetic Acid

TCM: Traditional Chinese Medicine

TRIS-HCL: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1, 3-propanediol hydrochloride

فهرست جداول

جدول ۱-۲ لیست مواد شیمیایی استفاده شده	۵۲
جدول ۲-۲ اجزای بافر پاور مدیوم	۵۴
جدول ۳-۲ اجزای بافر CCTM	۵۵
جدول ۴-۲ اجزای مدیوم Pre-Plating	۵۶
جدول ۵-۲ اجزای بافر Digestion Buffer	۵۶
جدول ۶-۲ اجزای بافر فسفات	۵۷
جدول ۷-۲ محلول Reactive solution	۵۷
جدول ۸-۲ بافر تعیین پراکسیداسیون لیپید ها	۵۸
جدول ۹-۲ وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی	۵۹

فهرست نمودارها و شکل ها

- شکل ۱-۱ ساختار میتوکندری..... ۱۱
- شکل ۲-۱ زنجیره ی تنفسی میتوکندری..... ۱۳
- شکل ۳-۱ تاثیر داروهای ضد سرطان در میتوکندری..... ۱۵
- شکل ۴-۱ تاثیر داروهای ضد دیابت در میتوکندری..... ۱۵
- شکل ۵-۱ منابع درون سلولی تولید ROS و مکانیسم های دفاعی..... ۱۹
- شکل ۶-۱ پراکسیداسیون لیپید..... ۲۲
- شکل ۷-۱ تعادل بین GSH و GSSG..... ۲۴
- شکل ۸-۱ مکانیسم گاز فسفین..... ۳۵
- شکل ۹-۱ ساختار فلاونوئیدها..... ۴۱
- شکل ۱۰-۱ ساختار مولکولی اپی ژنین..... ۴۴
- شکل ۱-۲ تنظیم pH..... ۵۵
- شکل ۲-۲ هود لامینار..... ۶۰
- شکل ۳-۲ اتوکلاو..... ۶۰
- شکل ۴-۲ ترازو..... ۶۰
- شکل ۵-۲ انکوباتور..... ۶۱
- شکل ۶-۲ میکرو پلیت ریدر..... ۶۲
- شکل ۷-۲ سانتریفیوژ..... ۶۳
- شکل ۸-۲ فلوسایتومتر..... ۶۴
- شکل ۹-۲ سیستم پرفیوژن لانگندورف..... ۶۵
- شکل ۱۰-۲ موش نژاد ویستا..... ۶۷
- شکل ۱۱-۲ جداسازی کاردیومیوسیت های بطنی..... ۶۷
- شکل ۱۲-۲ قلب متصل به سیستم پرفیوژن لانگندورف..... ۶۸

- شکل ۲-۱۳ جداسازی سلول های قلبی با آنزیم کلاژناز..... ۶۹
- شکل ۳-۱ نتایج زنده مانى سلولى..... ۷۷
- شکل ۳-۲ نتایج میزان رادیکال های فعال اکسیژن..... ۷۹
- شکل ۳-۳ نتایج اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری ۸۱
- شکل ۳-۴ نتایج آسیب لیزوزومی..... ۸۳
- شکل ۳-۵ نتایج لیپید پراکسیداسیون..... ۸۵
- شکل ۳-۶ نتایج بررسی میزان GSH و GSSG..... ۸۷