





دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه‌ی رساله‌ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

**اثر ترکیبات گالیک اسید و الاجیک اسید در مهار سمیت میتوکندریایی ایجاد شده توسط
سلکوکسیب در میتوکندری‌های ایزوله شده از قلب موش صحرایی**

استاد راهنما

دکتر احمد سلیمی

نگارش

سامان آتش بار

شماره پایان نامه

د-۹۰ ۱۴۰۰/۶

شهریور ۱۴۰۰

اهداء پایان نامه

خداوند سبحان را سپاسگذارم که به بنده حقیر توفیق انجام و اتمام پژوهش حاضر را عنایت فرمود.

بعد از مدتها، پس از پیمودن راه های فراوان که با حضور شیرین استاد عزیزم، با راهنمایی ها و دغدغه های فراوانشان و شیطنت های زیبای آن دوران، نگاه های پدر و مادرم با چشم های پر از برق و شوق و زیبایی حضور برادرم در کنارم که خستگی های این راه را به امید و روشنی راه تبدیل کرده و امیدوارم بتوانم در آینده ی نزدیک جوابگوی این همه محبت آنها باشم...

اکنون با احترام فراوان برای این همه تلاش این عزیزان برای موفقیت من ، این پایان نامه را به پدر و مادرم ، استاد عزیز و برادر مهربانم تقدیم میکنم.

امیدوارم قادر به درک زیبایی های وجودشان باشم...

تقدیر و تشکر

در آغاز از استاد بزرگ و دانشمند جناب آقای دکتر احمد سلیمی که راهنمایی این پایان نامه را به عهده داشته‌اند کمال تشکر را دارم. از درگاه ایزد منان دوام عزت و سلامت، تداوم حضور و تاثیر آن بزرگوار را برای مجموعه داروسازی، مسئلت دارم. تشکر و تقدیر برای شماست که همواره لطفتان رابه من ارزانی داشتید؛ از زحماتتان بی نهایت تشکر می کنم.

خالصانه از تمامی اساتید و معلمان و مدرسانی که در مقاطع مختلف تحصیلی به من علم آموخته و مرا از سرچشمه دانایی سیراب کرده‌اند ، متشکرم.

خلاصه پایان نامه

مقدمه:

داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAID) امروزه جهت درمان بیماری‌های مختلفی همچون آرتريت روماتوئید و استئوآرتريت و غیره مصارف زیادی دارند. انواع مختلفی از NSAIDها وجود دارند: غیرانتخابی و انتخابی COX-II. سلوکسیب یکی از داروهای اختصاصی مهارکننده آنزیم COX-II می‌باشد. با توجه به افزایش مصرف این دارو و عوارض قلبی ناشی از مصرف آن، بر آن شدیم تا ترکیباتی را برای کاهش سمیت قلبی ایجاد شونده توسط قرص سلوکسیب مورد ارزیابی و آزمایش قرار دهیم. این مطالعه به بررسی اثر محافظتی ترکیبات الاجیک‌اسید و گالیک‌اسید در برابر سمیت سلولی و میتوکندریایی ناشی از سلوکسیب در قلب و میتوکندری‌های ایزوله شده از آن، می‌پردازد.

مواد و روش‌ها:

میتوکندری‌های قلبی از موش صحرایی، جنس نر، نژاد ویستار و در محدوده وزنی ۲۰۰-۳۰۰ گرم جدا شدند و با آزمایش برادفورد میزان میتوکندری در غلظت ۱ mg/ml تنظیم شد و میتوکندری‌های جدا شده به گروه‌های مختلف شامل گروه کنترل، گروه سلوکسیب (حاوی ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، گروه‌های درمان (حاوی ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار الاجیک‌اسید به علاوه ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلوکسیب و همچنین ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار گالیک‌اسید به علاوه ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلوکسیب) و گروه الاجیک‌اسید (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و گروه گالیک‌اسید (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تقسیم بندی شدند. سپس پارامترهای سمیت میتوکندریایی همچون فعالیت سوکسینات دهیدروژناز (SDH)، تورم میتوکندری، سقوط پتانسیل غشای میتوکندری (MMP)، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون لیپید (LP) با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج:

نتایج آزمایشات ما نشان داد که تجویز سلوکسیب (۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باعث کاهش قابل توجهی در زنده ماندن سلول، پتانسیل غشای میتوکندری و فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، تورم میتوکندری و همچنین تشکیل گونه‌های فعال

اکسیژن و استرس اکسیداتیو همراه با پراکسیداسیون لیپید در میتوکندری‌های ایزوله شده می‌شود. نتایج آزمایشات ما نشان داد که مصرف همزمان ال‌جیک‌اسید (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) با سلوکسیب به طور قابل توجهی اثرات سمیت سلولی و میتوکندریایی ناشی از سلوکسیب را کاهش می‌دهد. همچنین کاردیومیوسیت‌ها و میتوکندری‌های تحت درمان با سلوکسیب و گالیک‌اسید (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به طور قابل توجه و وابسته به دوز ($p < 0.01$) و ($p < 0.001$) موجب بازگرداندن سطوح تغییر یافته‌ی پارامترهای سلولی و میتوکندریایی می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری:

داده‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مکمل گالیک‌اسید یا مکمل ال‌جیک‌اسید ممکن است سمیت سلولی و میتوکندریایی ناشی از سلوکسیب را کاهش دهند و ممکن است بتوانند به عنوان یک کاندید احتمالی پیشگیری کننده از اختلال عملکرد میتوکندری و سمیت قلبی ناشی از سلوکسیب عمل نمایند.

کلمات کلیدی:

داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی، مهار کننده‌های اختصاصی سیکلواکسیژناز-۲، سلوکسیب، ال‌جیک‌اسید، گالیک‌اسید، سمیت قلبی، میتوکندری

فهرست

- فصل اول: مقدمه ۱
- ۱-۱- تاریخچه بیماری‌های قلبی-عروقی ۲
- ۱-۲- قلب ۳
- ۱-۲-۱- ساختار و عملکرد قلب ۳
- ۱-۲-۲- بیماری‌های قلبی ۴
- ۱-۲-۳- مورفولوژی میتوکندری در بیماری‌های قلبی ۵
- ۱-۳- میتوکندری ۵
- ۱-۳-۱- ساختار میتوکندری ۶
- ۱-۳-۲- عملکرد میتوکندری ۶
- ۱-۳-۳- انرژی‌زیستی میتوکندریایی ۷
- ۱-۳-۴- میتوکندری و مرگ سلولی ۱۰
- ۱-۳-۵- پروتئین‌های آپوپتوزنیک و میتوکندری ۱۰
- ۱-۴- داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی ۱۱
- ۱-۴-۱- تاریخچه ۱۱
- ۱-۴-۲- مکانیسم عمل داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی ۱۲
- ۱-۴-۳- طبقه بندی داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی ۱۴
- ۱-۴-۴- عملکردهای COX-1 و COX-2 ۱۵
- ۱-۴-۴-۱- عملکرد روی دستگاه گوارش ۱۵

- ۱۶-۴-۴-۲ عملکرد روی کلیه.....
- ۱۶-۴-۴-۳ عملکرد روی سیستم اعصاب مرکزی.....
- ۱۷-۴-۴-۴ عملکرد روی سیستم تولید مثل.....
- ۱۷-۴-۴-۵ عملکرد روی اندوتلیوم.....
- ۱۷-۴-۵ عوارض جانبی داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی.....
- ۱۸-۴-۶ شیوع بیماری‌های قلبی عروقی ناشی از NSAIDها.....
- ۲۰-۴-۷ مهارکننده‌های اختصاصی COX-2.....
- ۱-۵-۱ سلوکسیب**.....
- ۲۱-۵-۱ مکانیسم اثر.....
- ۲۱-۵-۲ فارماکوکینتیک.....
- ۲۲-۵-۳ کاربرد.....
- ۲۳-۵-۴ عوارض جانبی.....
- ۲۳-۵-۵ موارد منع مصرف.....
- ۲۴-۵-۶ عوارض قلبی سلوکسیب و سایر مهارکننده‌های اختصاصی COX-2.....
- ۱-۶-۱ میتوکندری؛ اصلی‌ترین ارگان هدف داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی**.....
- ۲۷-۶-۱ اثر سلوکسیب و داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی بر روی میتوکندری.....
- ۱-۷-۱ گالیک‌اسید (GA)**.....
- ۳۱-۷-۱ فراهمی‌زیستی.....
- ۳۲-۷-۲ مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی.....

۳۳	۳-۷-۱- فعالیت ضد میکروبی
۳۳	۴-۷-۱- فعالیت ضد سرطانی
۳۳	۵-۷-۱- عملکرد روی بیماری‌های دستگاه گوارش
۳۴	۶-۷-۱- عملکرد روی بیماری‌های قلبی-عروقی
۳۴	۷-۷-۱- عملکرد روی بیماری‌های اعصاب و روان
۳۴	۸-۱-۱- الاجیک اسید (EA)
۳۵	۱-۸-۱- فراهمی زیستی
۳۶	۲-۸-۱- مکانیسم فعالیت آنتی‌اکسیدانی
۳۷	۳-۸-۱- فعالیت ضد التهابی
۳۷	۴-۸-۱- فعالیت ضد توموری
۳۸	۵-۸-۱- فعالیت محافظت‌کنندگی سلول‌های عصبی
۳۸	۶-۸-۱- فعالیت محافظت‌کنندگی سلول‌های کبدی
۳۹	۷-۸-۱- اثرات روی سیستم قلبی-عروقی
۳۹	۹-۱- بررسی متون
۴۰	۱۰-۱- اهداف
۴۰	۱-۱۰-۱- هدف کلی
۴۰	۲-۱۰-۱- اهداف اختصاصی
۴۱	۱۱-۱- فرضیات یا سؤالات پژوهش
۴۳	فصل دوم: مواد و روش‌ها

۴۴	۲-۱- نوع مطالعه
۴۴	۲-۲- مکان انجام مطالعه
۴۴	۲-۳- فلوجارت انجام کار
۴۵	۲-۴- حیوانات و مواد شیمیایی و وسایل مورد استفاده
۴۵	۲-۴-۱- حیوانات آزمایشگاهی.....
۴۵	۲-۴-۲- مواد شیمیایی
۴۷	۲-۴-۳- وسایل آزمایشگاهی و دستگاهها.....
۵۳	۲-۵- محتویات و طرز تهیه بافرها و محلول ها
۵۳	۲-۵-۱- بافر شست و شو.....
۵۳	۲-۵-۲- بافر ایزولاسیون.....
۵۳	۲-۵-۳- محلول کوماسی بلو.....
۵۴	۲-۵-۴- بافر تست برادفورد.....
۵۴	۲-۵-۵- بافر تورم.....
۵۵	۲-۵-۶- بافر MTT.....
۵۵	۲-۵-۷- بافر MMP.....
۵۶	۲-۵-۸- محلول های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها.....
۵۶	۲-۸-۵-۱- نحوه ساخت محلول ۰/۱٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید.....
۵۶	۲-۸-۵-۲- تهیه محلول ۰/۲۰٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید و ۰/۱۵٪ وزنی/حجمی تیوباربتوریک اسید.....
۵۶	۲-۵-۹- بافر تنفسی.....

۵۷	۱۰-۵-۲- تهیه غلظت مورد نیاز سلوکوسیپ.....
۵۷	۱۱-۵-۲- تهیه غلظت‌های مورد نیاز الاجیک‌اسید.....
۵۸	۱۲-۵-۲- تهیه غلظت‌های مورد نیاز گالیک‌اسید.....
۵۸	۶-۲- آماده‌سازی میتوکندری از قلب موش صحرایی.....
۶۰	۷-۲- آزمایشات.....
۶۰	۱-۷-۲- آزمایش برادفورد جهت تعیین مقدار میتوکندری.....
۶۱	۲-۷-۲- آزمایش تورم میتوکندری.....
۶۲	۳-۷-۲- سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز یا عملکرد میتوکندری.....
۶۳	۴-۷-۲- سنجش پراکسیداسیون لیپیدی.....
۶۴	۵-۷-۲- اندازه گیری میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن.....
۶۴	۶-۷-۲- سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری.....
۶۵	۸-۲- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری.....
۶۶	فصل سوم: نتایج.....
۶۷	۱-۳- نتایج مرتبط با تورم میتوکندری.....
۶۷	۱-۱-۳- نتایج سلوکوسیپ با الاجیک‌اسید.....
۶۸	۲-۱-۳- نتایج سلوکوسیپ با گالیک‌اسید.....
۶۹	۲-۳- نتایج مرتبط با فعالیت سوکسینات دهیدروژناز یا عملکرد میتوکندری.....
۶۹	۱-۲-۳- نتایج سلوکوسیپ با الاجیک‌اسید.....
۷۰	۲-۲-۳- نتایج سلوکوسیپ با گالیک‌اسید.....

۷۲	۳-۳- نتایج مرتبط با پراکسیداسیون لیپیدی
۷۲	۳-۳-۱- نتایج سلوکسیب با الاجیک اسید
۷۳	۳-۳-۲- نتایج سلوکسیب با گالیک اسید
۷۴	۳-۴- نتایج مرتبط با میزان رادیکال های فعال اکسیژن
۷۴	۳-۴-۱- نتایج سلوکسیب با الاجیک اسید
۷۴	۳-۴-۲- نتایج سلوکسیب با گالیک اسید
۷۵	۳-۵- نتایج مرتبط با میزان سقوط پتانسیل غشای میتوکندری
۷۵	۳-۵-۱- نتایج سلوکسیب با الاجیک اسید
۷۶	۳-۵-۲- نتایج سلوکسیب با گالیک اسید
۷۸	فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری
۷۹	۴-۱- بحث و نتیجه گیری
۸۳	۴-۲- پیشنهادات
۸۳	۴-۳- محدودیت ها
۸۴	فهرست منابع و مأخذ
۹۵	صفحه ی اول مقاله
۹۷	Thesis Summary
۱۰۰	مصوبه کمیته اخلاق

فهرست شکل‌ها، نمودارها و جداول

- شکل ۱-۱ سیستم گردش خون و ساختار قلب ۳
- شکل ۱-۲ زنجیره تنفسی میتوکندری ۱۰
- شکل ۱-۳ فعال سازی آپوپتوز از طریق مسیر ذاتی ۱۱
- شکل ۱-۴ مکانیسم عمل داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی ۱۴
- شکل ۱-۵ ساختار سلوکوسیپ ۲۱
- شکل ۱-۶ مکانیسم‌های دخیل در سمیت قلبی توسط داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی ۳۰
- شکل ۱-۷ گالیک‌اسید و دیگر مشتقات آن ۳۱
- شکل ۱-۸ ساختار الاجیک‌اسید ($C_{14}H_6O_8$) ۳۵
- شکل ۱-۹ مکانیسم عمل شلاته‌کنندگی الاجیک‌اسید ۳۷
- شکل ۲-۱ موش صحرایی، جنس نر، نژاد ویستار ۴۵
- شکل ۲-۲ هموژنایزر شیشه‌ای ۴۸
- شکل ۲-۳ PH-Meter ۴۸
- شکل ۲-۴ ترازوی آزمایشگاهی ۴۹
- شکل ۲-۵ سانتریفیوژ یخچال دار ۴۹
- شکل ۲-۶ بن‌ماری ۴۹
- شکل ۲-۷ ست سمپلر ۵۰
- شکل ۲-۸ یخ‌ساز ۵۰
- شکل ۲-۹ انکوباتور CO_2 ۵۰
- شکل ۲-۱۰ Heat er Stirrer ۵۱
- شکل ۲-۱۱ یخچال ۵۱

- شکل ۲- ۱۲ دستگاه تهیه آب مقطر..... ۵۱
- شکل ۲- ۱۳ میکروپلیت ریدر (ELISA Reader)..... ۵۲
- شکل ۲- ۱۴ فلوسایتومتری..... ۵۲
- شکل ۲- ۱۵ Lab Dancer..... ۵۲
- شکل ۲- ۱۶ مراحل توزین، بیهوشی و فیکس کردن موش صحرایی..... ۵۹
- شکل ۲- ۱۷ مراحل جراحی موش صحرایی و جداسازی، شست‌وشو و تکه‌تکه کردن بافت قلبی آن..... ۶۰
- شکل ۲- ۱۸ آزمایش برادفورد..... ۶۱
- شکل ۲- ۱۹ آزمایش سنجش تورم میتوکندری..... ۶۲
- شکل ۲- ۲۰ آزمایش سنجش فعالیت کمپلکس II میتوکندری یا سوکسینات دهیدروژناز..... ۶۳

فهرست جدول‌ها

- جدول ۲-۱ لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه ۴۶
- جدول ۲-۲ وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌های مورد استفاده ۴۷
- جدول ۲-۳ اجزای بافر شست‌وشو ۵۳
- جدول ۲-۴ اجزای بافر ایزولاسیون ۵۳
- جدول ۲-۵ اجزای محلول کوماسی بلو ۵۳
- جدول ۲-۶ اجزای بافر تست برادفورد ۵۴
- جدول ۲-۷ اجزای بافر تورم ۵۴
- جدول ۲-۸ اجزای بافر MTT ۵۵
- جدول ۲-۹ اجزای بافر MMP ۵۵
- جدول ۲-۱۰ اجزای محلول‌های مورد نیاز جهت سنجش پراکسیداسیون لیپید ۵۶
- جدول ۲-۱۱ اجزای بافر تنفسی ۵۶

فهرست نمودارها

- نمودار ۳-۱ اثر الاجیک اسید در حضور سلکوسیپ بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۶۷
- نمودار ۳-۲ اثر گالیک اسید در حضور سلکوسیپ بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۶۸
- نمودار ۳-۳ اثر سلکوسیپ بر فعالیت سوکسینات دی هیدروژناز ۶۹
- نمودار ۳-۴ اثر الاجیک اسید در حضور سلکوسیپ بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۷۰
- نمودار ۳-۵ اثر سلکوسیپ بر فعالیت سوکسینات دی هیدروژناز ۷۱
- نمودار ۳-۶ اثر گالیک اسید در حضور سلکوسیپ بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۷۱
- نمودار ۳-۷ اثر الاجیک اسید در حضور سلکوسیپ بر پراکسیداسیون لیپیدی ۷۲
- نمودار ۳-۸ اثر گالیک اسید در حضور سلکوسیپ بر پراکسیداسیون لیپیدی ۷۳
- نمودار ۳-۹ اثر الاجیک اسید در حضور سلکوسیپ بر ROS ۷۴
- نمودار ۳-۱۰ اثر گالیک اسید در حضور سلکوسیپ بر ROS ۷۵
- نمودار ۳-۱۱ اثر الاجیک اسید در حضور سلکوسیپ بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۷۶
- نمودار ۳-۱۲ اثر الاجیک اسید در حضور سلکوسیپ بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۷۷

Abbreviation

AChE: acetylcholinesterase

ADP: Adenosine diphosphate

AHA: American Hospital Association

ATP: Adenosine triphosphate

AUC: area under the curve

Bad: BCL2 associated agonist of cell death

BDE: Bond dissociation enthalpy

BSA: Bovine Serum Albumin

CABG: Coronary Artery Bypass Graph

cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate

CAT: catalase

CDH11: cadherin-11

CHF: Congestive Heart Failure

CK-MB: creatine kinase-MB

COX-1: Cyclooxygenase-1

COX-2: Cyclooxygenase-2

cTnT: cardiac troponin T

CYP450: Cytochromes P450

DCFH-DA: Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DNA: Deoxyribonucleic Acid

EA: Ellagic acid

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

ELISA: Enzyme-linked Immunoassay

e-NOS: endothelial Nitric Oxide Synthase

ETC: electron transport chain

FADH_γ: Flavin adenine dinucleotide

FDA: Food and Drug Administration

GA: Gallic acid

GERD: Gastroesophageal reflux disease

GP_x: Glutathione peroxidase

GR_x: Glutathione reductase

GST: glutathione S-transferase

HAT: Hydrogen atom transfer

HF: Heart Failure

HLEC: Human Lens Epithelial Cell

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IL-1: Interleukin 1

IP: Ionization potential

LG: lauryl gallate

LP: Lipid peroxidation

LPS: Lipopolysaccharide

LVH: Left Hypertrophy Ventricular

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MDA: Malondialdehyde

MI: myocardial infarction

MMP: Mitochondrial Membrane Potential

mPTP: Mitochondrial Permeability Transition Pore

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

NSAIDs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs

OG: octyl gallate

OTC: Over-the-counter

PARP: poly adenosine diphosphate-ribose polymerase

PG: propyl gallate

PGF2 α : Prostaglandin F2 α

PTGS: Prostaglandin-endoperoxide synthase

ROS: Reactive Oxygen Species

RNS: Reactive Nitrogen Species

SDH: Succinate dehydrogenase

SET: Single electron transfer

SLS: Sodium Lauryl Sulfate

SOD: Superoxide dismutase

TBA: Thiobarbituric acid

TCA: Trichloroacetic acid

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

tRNA: Transfer Ribonucleic acid

UV-B: Ultraviolet-B

VIGOR: Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research