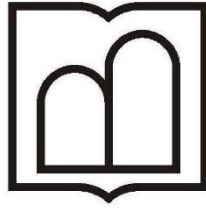


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه ی رساله ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

**مطالعه بهبود اختلالات شناختی و میتوکندریایی توسط بتانین در یک شرایط شبه
آلزایمری ایجاد شده توسط اسکوپولامین در مدل موش صحرایی**

اساتید راهنما:

دکتر احمد سلیمی

دکتر معصومه دادخواه

نگارش:

میثم صبور حور

شماره پایان نامه: ۱۰۵ - ۱۴۰۰/۱۰

زمستان ۱۴۰۰

تقدیم

این پایان نامه تقدیم می شود به :

پدر و مادر گرامی و گرانقدرم که زیر بار سنگین پروردن من با تمام مشقت‌های موجود، لحظه ای شانه خالی نکردند. در نظرم زیستن با شما و صرف عمر در کنار شما با کیفیت ترین نوع زیستن است، حتی اگر هرزگاهی دچار فراموشی شوم.

تشکر و قدردانی

از حضرت مسیح (ع) نقل است که: "درخت را از میوه اش و استاد را از شاگردانش بشناسید"، هرچند بنده به عنوان شاگرد دکتر سلیمی چندان شاخص خوبی برای شناساندن و شناختن همت بلند ایشان نیستم اما همواره از ایشان الگو گرفته ام و سعی ام بر آن بوده که چون ایشان پر تلاش، جست و جو و پژوهشگر باشم. از ایشان بسیار آموخته و از اینکه شاگرد انسان فرهیخته ای همچون دکتر سلیمی بوده ام به خود افتخار می کنم.

همچنین از استاد و پژوهشگر گرانقدر خانم دکتر معصومه دادخواه نیز کمال تشکر را دارم که به عنوان استاد راهنمای دوم بسیار من را یاری نمودند از ایشان نیز بسیار آموخته ام. از تمامی کسانی که مرا در انجام این تحقیق راهنمایی و یاری کردند کمال تشکر را دارم.

مطالعه بهبود اختلالات شناختی و میتوکندریایی توسط بتانین در یک شرایط شبه آلزایمری ایجاد شده توسط اسکوپولامین در مدل موش صحرایی

چکیده :

مقدمه: یکی از پیشرونده ترین انواع بیماری‌های عصبی، بیماری آلزایمر (AD) Alzheimer disease است که به شدت حافظه و عملکرد یادگیری را مختل می‌کند. در این بیماری تجمع پروتئین‌های تاو و پلاک‌های $A\beta$ (Amiloid beta) در سلول‌های عصبی بر پاسخ آنتی‌اکسیدانی و تامین انرژی تأثیر منفی می‌گذارد که منجر به اختلال عملکرد سیناپسی و میتوکندری می‌شود. بنابراین، اختلال عملکرد میتوکندری و استرس اکسیداتیو برای کمک به مکانیسم‌های مسئول پاتوژنز AD شناسایی شده‌اند. اسکوپولامین (SCO) Scopolamine به عنوان یک داروی قوی برای القای اختلال حافظه و اختلال یادگیری با اختلال عملکرد میتوکندری و استرس اکسیداتیو در مدل حیوانی AD مرتبط است. در کارآزمایی‌های بالینی که در رابطه با AD انجام یافته‌اند، مولکول‌هایی با خواص آنتی‌اکسیدانی فواید کمی نشان داده‌اند. احتمالاً بتانین به عنوان یک مولکول چند منظوره با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی می‌تواند در درمان تخریب عصبی موثر باشد. از این رو، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر درمانی احتمالی بتانین علیه AD القا شده با SCO در موش‌های صحرایی ویستار طراحی شد.

مواد و روش‌ها: حیوانات به گروه‌های ۱- اسکوپولامین ۲- اسکوپولامین و بتانین ۳- بتانین ۴- شاهد تقسیم بندی شدند. SCO (با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی برای القای AD در رت‌های نر نژاد ویستار تجویز شد. رت‌ها با دوزهای کم و زیاد بتانین (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۷ روز متوالی به صورت داخل صفاقی تحت درمان قرار گرفتند. در پایان روز هفدهم، حیوانات تحت تست‌های رفتاری مانند تشخیص شی جدید و آزمایش اجتنابی غیرفعال قرار گرفتند و برای مطالعه پارامترهای میتوکندریایی و بافت‌شناسی مغز آن‌ها خارج و در ازت مایع نگهداری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد اختلال حافظه و یادگیری ناشی از SCO توسط بتانین در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین، پارامترهای سمیت میتوکندری مانند فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندری (MMP)، تورم میتوکندری، کاهش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز (SDH) و تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) توسط بتانین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه SCO معکوس شد. علاوه بر این، اثر بهبود دهنده ی بتانین علیه SCO در نتایج هیستوپاتولوژیک هیپوکامپ نیز نشان داده شد.

نتیجه گیری: تحقیق حاضر نشان داد که بتانین با کاهش ROS میتوکندری، اختلالات حافظه ناشی از SCO، آسیب‌های بافتی و اختلال عملکرد میتوکندری را بهبود می‌بخشد، که ممکن است به دلیل عملکرد آنتی‌اکسیدانی قوی بتانین باشد.

کلمات کلیدی: آلزایمر، آنتی‌اکسیدان‌ها، بتانین، اختلالات شناختی

فهرست اختصارات و اصطلاحات

A β : Amoloid Beta

AD: Alzheimer disease

APP: Amyloid Precursor Protein

APoE: Apolipo proptein E

BACE1: Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1

cAMP: Cyclic Adenosine MonoPhosphate

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

IDE: Insulin Degrading Enzyme

GPCRs : G Protein Coupled Receptors

GPx : Glutathione Peroxidase

GSH : Glutathione

MAPT: Microtubule-Associated Protein Tau gene

MMP : Mitochondrial Membrane Protentional

MPT : Mitochondrial Permeability Transition

MPTP : Mitochondrial Permeability Transition pore

MS : Multiple Sclerosis

mt DNA : Mitochondrial DNA

MTT : Measures the reduction of a Tetrazolium component

NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide

NF- κ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NT: Neuro Transmitter

NFT: Neurofibrillary tangles

OMM : Outer Mitochondrial Membrane

LRP1: Low density Lipoprotein Receptor-related Protein 1

ORT:Novel Object Recognition Test

PAT: Passive avoidance Test

RH123 : Rhodamine 123

ROS : Reactive Oxygen Species

SCARB1: Scavenger receptor class B member 1

SDH : Succinate Dehydrogenase

SOD : Superoxide Dismutase

SP: Senescence plaques

TBA : Thiobarbituric acid

TCA : Trichloroacetic acid

TG : Triglyceride

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

TLRs: Toll-Like Receptors

فهرست مطالب

صفحه	عنوان	
مقدمه	فصل اول:	۶.....
۷.....	۱-۱- مقدمه.....	۷.....
۸.....	۱-۲- بیان مساله.....	۸.....
۸.....	۱-۲-۱- دمانس و علل آن.....	۸.....
۹.....	۱-۳- اپیدمیولوژی بیماری آلزایمر (AD).....	۹.....
۱۰.....	۱-۴- اتیولوژی بیماری آلزایمر.....	۱۰.....
۱۱.....	۱-۵- پاتوفیزیولوژی بیماری آلزایمر.....	۱۱.....
۱۲.....	۱-۶- فرضیه‌های ایجاد بیماری آلزایمر.....	۱۲.....
۱۲.....	۱-۶-۱- استرس اکسیداتیو.....	۱۲.....
۱۳.....	۱-۶-۲- فرضیه پپتیدهای بتا آمیلوئید $A\beta$	۱۳.....
۱۷.....	۱-۶-۳- فرضیه پروتئین تائو (Tau).....	۱۷.....
۲۰.....	۱-۶-۴- فرضیه عوامل ژنتیکی و آپولیپو پروتئین E.....	۲۰.....
۲۲.....	۱-۶-۵- فرضیه اختلالات سیستم کولینرژیک.....	۲۲.....
۲۴.....	۱-۶-۵- نقش التهاب نورونی و آستروسیت‌ها در بیماری آلزایمر.....	۲۴.....
۲۸.....	۱-۶-۶- فرضیه اختلال عملکرد میتوکندریها.....	۲۸.....
۳۱.....	۱-۷- بتانین:.....	۳۱.....
۳۳.....	۱-۸- بررسی متون.....	۳۳.....
۳۶.....	۱-۸-۱- اهداف و فرضیات.....	۳۶.....
۳۶.....	۱-۸-۱- اهداف اختصاصی:.....	۳۶.....
۳۶.....	۱-۸-۲- فرضیات یا سوالات تحقیق:.....	۳۶.....
۳۸.....	فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها.....	۳۸.....
۳۹.....	۱-۲- مواد شیمیایی.....	۳۹.....
۴۰.....	۲-۲- تجهیزات و وسایل مورد مطالعه.....	۴۰.....
۴۱.....	۲-۳- بافرها و شناساگرها و ترکیبات آن‌ها.....	۴۱.....
۴۱.....	۲-۳-۱- معرف کوماسی بلو (معرف برادفورد).....	۴۱.....
۴۴.....	۲-۳-۲- تهیه بافرها.....	۴۴.....
۴۴.....	۲-۳-۲- بافر ایزولاسیون.....	۴۴.....
۴۵.....	۲-۳-۳- بافر تورم.....	۴۵.....
۴۵.....	۲-۳-۴- بافر MTT.....	۴۵.....
۴۶.....	۲-۳-۵- بافر MMP.....	۴۶.....
۴۷.....	۲-۳-۶- بافر تنفسی.....	۴۷.....

۴۷	۴-۲- حیوانات مورد مطالعه.....
۴۸	۵-۲- مراحل استخراج میتوکندری از مغز رت.....
۴۹	۶-۲- اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز.....
۵۰	۷-۲- سنجش میزان تورم میتوکندری.....
۵۱	۸-۲- اندازه گیری تولید ROS میتوکندریایی.....
۵۱	۹-۲- سنجش میزان افت پتانسیل غشاء میتوکندری.....
۵۲	۱۰-۲- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی.....
۵۳	۱۱-۲- متودولوژی مطالعه:.....
۵۴	۱۲-۲- روش آنالیز آماری.....
۵۴	۱۳-۲- طرح مطالعه:.....
۵۴	۱۳-۲- تست‌های رفتاری:.....
۵۵	۱-۱۳-۲- آزمون تشخیص شی جدید (NORT) Novel Object Recognition:.....
۵۷	۲-۱۳-۲- تست (PAT) Passive avoidance:.....
۵۹	فصل سوم: نتایج.....
۶۰	۱-۳- بتانین اختلال NORM کوتاه مدت القا شده با SCO را بهبود بخشید.....
۶۱	۲-۳- بتانین اختلال حافظه احترازی غیر فعال القا شده با SCO را بهبود بخشید.....
۶۳	۳-۳- بتانین تغییرات هیستوپاتولوژیک القا شده با SCO را در هیپوکامپ بهبود بخشید.....
۶۳	۴-۳- بتانین فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی را در مغز موش‌های تحت درمان با SCO افزایش داد.....
۶۷	۵-۳- اثر بتانین بر تغییرات القا شده با SCO در پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندریایی.....
۶۸	۶-۳- اثرات بتانین بر تغییرات القاشده با SCO در تورم میتوکندریایی.....
۶۹	۷-۳- بتانین افزایش تشکیل ROS میتوکندریایی القا شده با SCO را کاهش داد.....
۷۰	۸-۳- بتانین تغییر پتانسیل غشای میتوکندریایی القا شده با SCO را تعدیل کرد.....
۷۱	فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری.....
۷۲	۱-۴- بحث:.....
۷۶	۲-۴- نتیجه گیری:.....
۷۶	۳-۴- محدودیت ها:.....
۷۶	۴-۴- پیشنهادات:.....
۷۷	منابع.....

فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۹	شکل ۱-۱: روند شکل‌گیری بیماری آلزایمر در یک نگاه کلی.....
۱۱	شکل ۱-۲: تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی و کلافه‌های نوروفیبریلاری در مغز مبتلایان به آلزایمر.....
۱۳	شکل ۱-۳: نقش استرس اکسیداتیو در پاتوژنز AD.....
۱۴	شکل ۱-۴: تولید βA از کلسترول غشایی.....
۱۶	شکل ۱-۵: $A\beta$ حاصل از تجزیه پروتئولیتیک APP توسط آنزیم‌های بتا و گاما سکرناز.....
۱۷	شکل ۱-۶: مسیرهای پروتئولیتیک APP.....
۱۸	شکل ۱-۷: تجمع پروتئین‌های تائو تشکیل‌گره‌های نوروفیبریلاری.....
۱۹	شکل ۱-۸: پروتئین تائو و میکروتوبول‌ها.....
۲۰	شکل ۱-۹: پروتئین تائو در حالت نرمال و بیماری آلزایمر.....
۲۲	شکل ۱-۱۰: نقش آپولیپوپروتئین E (ApoE) در بیماری آلزایمر (AD).....
۲۴	شکل ۱-۱۱: تغییرات در انتقال پیام عصبی در بیماری آلزایمر.....
۳۱	شکل ۱-۱۲: میتوکندری در بیماری AD.....
۳۳	شکل ۱-۱۳: ساختار شیمیایی Betalains و ماده مشتق شده از آن یعنی Betanin.....
۴۳	شکل ۱-۲: غلظت‌های لود شده BSA به همراه معرف کوماسی بلو.....
۴۳	نمودار ۱-۲: میزان جذب غلظت‌های مختلف آلبومین.....
۴۵	شکل ۲-۲: آنزیم سوکسینات دهیدروژناز واقع در غشای میتوکندری.....
۵۰	شکل ۲-۳: تورم میتوکندریایی.....
۵۲	شکل ۲-۴: ارتباط ROS و پراکسیداسیون لیپیدی که منجر به مرگ سلولی می‌شود.....
۵۷	شکل ۲-۵: تست ORT، حیوان در حال بررسی شیئی جدید.....
۵۸	شکل ۲-۶: Passive avoidance Test یا تست PAT.....
۶۰	شکل ۳-۱: مقایسه داده‌های آزمون تشخیص شی جدید بین گروه‌های درمان نشده و گروه درمان.....
۶۱	شکل ۳-۲: بخش A.....
۶۲	شکل ۳-۲: بخش B.....
۶۳	شکل ۳-۲: بخش C.....
۶۴	شکل ۳-۳: ارزیابی هیستوپاتولوژیک هیپوکامپ.....
۶۶	شکل ۳-۴: اثر SCO، بتانین و SCO به علاوه بتانین بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی در میتوکندری‌های جدا شده از مغز موش صحرائی.....
۶۷	شکل ۳-۵: اثر SCO، بتانین و SCO به علاوه بتانین بر فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندریایی (MDA) در میتوکندری‌های جدا شده از مغز موش صحرائی.....
۶۸	شکل ۳-۶: اثر SCO، بتانین و SCO به علاوه بتانین بر میزان تورم میتوکندری در میتوکندری‌های جدا شده از مغز موش صحرائی.....

شکل ۳-۷. اثر SCO، بتانین و SCO به علاوه بتانین بر تشکیل ROS در میتوکندری‌های جدا شده از مغز موش صحرائی..... ۶۹

شکل ۳-۸. اثر SCO، بتانین و SCO به علاوه بتانین بر پتانسیل غشای میتوکندری در میتوکندری‌های جدا شده از مغز موش صحرائی. ۷۰

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۳۹	جدول (۱-۲) مواد شیمیایی به کار رفته.....
۴۲	جدول (۲-۲) تجهیزات و وسایل مورد مطالعه.....
۴۲	جدول (۳-۲) محتویات محلول کوماسی بلو.....
۴۴	جدول (۵-۲) محتویات بافر ایزولاسیون.....
۴۵	جدول (۶-۲) محتویات بافر تورم.....
۴۶	جدول (۷-۲) محتویات بافر MTT.....
۴۶	جدول (۸-۲) محتویات بافر MMP.....
۴۷	جدول (۹-۲) محتویات بافر تنفسی.....