بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه برای دریافت درجه دکترای داروسازی

عنوان:

بررسی اثرات محافظتی اسید گالیک بر سمیت قلبی ناشی از کتامین در موش صحرایی نر

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

آرمین سرایی

دی ۱۴۰۱ **شماره پایان نامه: د-۱۵۴**

اهدا پایان نامه

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

پدر و مادر مهربانم که فداکارانه در تمامی لحظات زندگی پشیتیبانم بودند.

همسر مهربانم که در تمامی مدت پژوهش همراه و همگام من بوده است .

استاد فرهیخته و فرزانه ام که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند.

تشکر و قدردانی

با سپاس از سه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم...

موهایشان سپید شد تا ما رو سفید شویم...

و عاشقانه سوختند تا گرما بخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند ...

پدرانمان

مادرانمان

استادانمان

چکیده

مقدمه

گزارش شده است که کتامین یک عامل قلبی در پستانداران است و می‌تواند ATP را در قلب از طریق اختلال عملکرد میتوکندری در میتوکندری قلب کاهش دهد. به دلیل نیاز بالای قلب به انرژی ، تغییرات در عملکرد میتوکندری به استرس اکسیداتیو، التهاب، اختلال عملکرد قلب و سمیت قلبی منجر می شود . بنابراین، ترکیبات طبیعی با خواص محافظتی و آنتی‌اکسیدانی میتوکندری احتمالا می‌توانند نقش موثری در کاهش سمیت قلبی کتامین مربوط به اختلال عملکرد میتوکندری ایفا کنند. در مطالعه حاضر، ما اثرات اسید گالیک را در سمیت قلبی ناشی از کتامین در موش‌ها بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها:

در مجموع ۲۴ موش صحرایی نر ویستار به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند که هر گروه دارای ۶ موش است: گروه ۱ (شاهد): به موش‌ها به مدت ۱۴ روز نرمال سالین داخل صفاقی داده شد. گروه ۲ (کتامین): در روز چهاردهم مطالعه، 60 mg/kg کتامین به صورت داخل صفاقی تجویز شد. سپس 60 mg/kg کتامین به صورت داخل صفاقی هر ۱۰ دقیقه به مدت ۳ ساعت تجویز شد. گروه ۳ (اسید گالیک + کتامین): به موش‌ها ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز گالیک اسید به مدت ۱۴ روز به صورت داخل صفاقی تزریق شد و در روز چهاردهم مطالعه، 60 mg/kg کتامین به صورت داخل صفاقی تجویز شد. سپس 60 mg/kg کتامین به صورت داخل صفاقی هر ۱۰ دقیقه به مدت ۳ ساعت تجویز شد. گروه ۴ (اسید گالیک): به موش‌ها تنها 15 mg/kg/day گالیک اسید به مدت ۱۴ روز به صورت داخل صفاقی تزریق شد. نشانگر سرمی قلب (کراتین کیناز، لاکتات دهیدروژناز و تروپونین)، نشانگرهای استرس اکسیداتیو بافت قلب (گلوتاتیون و مالون دی آلدئید)، تجزیه و تحلیل هیستوپاتولوژیک و پارامترهای سمیت میتوکندری (فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، تورم میتوکندری، تولید پتانسیل واکنشی غشاء و فرآیندهای غشایی اکسیژن و گونه های کوکولاپس) میتوکندری‌های جدا شده اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها:

نتایج نشان داد که تجویز کتامین باعث افزایش نشانگرهای قلبی سرم، پارامترهای استرس اکسیداتیو، تغییرات هیستوپاتولوژیک و اختلال عملکرد میتوکندری در بافت قلب شد. تجویز گالیک اسید در حضور کتامین برای کاهش نشانگرهای قلبی سرم، پارامترهای استرس اکسیداتیو، تغییرات هیستوپاتولوژیک و اختلال عملکرد میتوکندری در بافت قلب مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری:

نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که اسید گالیک از طریق محافظت از میتوکندری، خواص آنتی‌اکسیدانی و در نهایت بهبود عملکرد میتوکندری و عملکرد قلب، محافظت قلبی را اعمال می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سمیت قلبی؛ اختلال عملکرد میتوکندری؛ ترکیبات طبیعی؛ مواد مخدر غیر قانونی

فهرست مطالب

فصل اول- مقدمه ۱

۱-۱- کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ۲
۱-۲- فراهمی زیستی ۴
۱-۳- بیوسنتز ۷
۱-۴- ساختار ۸
۱-۵- اثر آنتی‌اکسیدانی ۸
۱-۵-۱- حالت کلی عمل ۸
۱-۵-۲- فعالیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد ۹
۱-۵-۳- حفظ سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی درون‌زا ۱۰
۱-۵-۴- پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی ۱۰
۱-۶- کاربردهای بالقوه بالینی ۱۱
۱-۶-۱- اثرات ضد سرطانی ۱۱
۱-۶-۲- اثر ضد التهابی ۱۲
۱-۶-۳- اثرات ضد میکروبی ۱۳
۱-۶-۴- آنتی ملانوژن ۱۳
۱-۶-۵- ضد ویروس ۱۴
۱-۶-۶- اثرات محافظت کننده عصبی ۱۴
۱-۶-۷- اثرات محافظتی بر کبد و کلیه ۱۴
۱-۶-۸- اثرات قلبی عروقی ۱۴
۱-۷- کتامین ۱۵
۱-۷-۱- تاریخچه ۱۶
۱-۷-۲- خواص فارماکولوژیکی ۱۷
۱-۷-۳- خواص فارماکوکینتیکی ۱۸
۱-۷-۴- مقدار مصرف ۱۹
۱-۸- گیرنده‌های کتامین ۲۰
۱-۸-۱- گیرنده گلوتامات ۲۰
۱-۸-۲- گیرنده‌های NMDA ۲۰
۱-۸-۳- گیرنده‌های اپیوئیدی ۲۲
۱-۸-۴- گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین ۲۳
۱-۸-۵- گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین ۲۳
۱-۸-۶- گیرنده‌های $GABA_A$ ۲۴
۱-۹- اثرات بالینی ۲۵
۱-۹-۱- فشار داخل جمجمه‌ای و جریان خون مغزی ۲۵

۱-۹-۲- محافظت عصبی ۲۵
۱-۹-۳- سمیت عصبی ۲۵
۱-۹-۴- اثرات قلبی عروقی ۲۶
۱-۹-۵- اثرات برونش ریوی ۲۷
۱-۱۰- کاربرد بالینی ۲۷
۱-۱۰-۱- ضد درد ۲۷
۱-۱۰-۲- بیهوشی ۲۸
۱-۱۰-۳- نورومونیتورینگ ۲۹
۱-۱۰-۴- درمان درد ۲۹
۱-۱۰-۴-۱- درد حاد ۲۹
۱-۱۰-۴-۲- درد مزمن ۲۹
۱-۱۱- اثرات جانبی ۳۰
۱-۱۲- موارد منع مصرف ۳۱
۱-۱۳- سو مصرف ۳۲
۱-۱۴- اهداف ۳۳
۱-۱۴-۱- اهداف کلی ۳۳
۱-۱۴-۲- اهداف اختصاصی ۳۳
۱-۱۴-۳- هدف کاربردی ۳۴
۱-۱۵- فرضیات یا سوالات تحقیق ۳۴

فصل دوم - مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها ۳۵

۲-۱- نوع مطالعه ۳۶
۲-۲- مکان انجام مطالعه ۳۶
۲-۳- حیوانات و مواد شیمیایی و وسایل مورد استفاده ۳۶
۲-۳-۱- حیوانات آزمایشگاهی ۳۶
۲-۳-۲- مواد شیمیایی ۳۷
۲-۳-۳- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌ها ۳۸
۲-۴- بافرها و شناساگرها و ترکیبات آنها ۴۳
۲-۴-۱- بافر شست و شو ۴۳
۲-۴-۲- بافر ایزولاسیون ۴۳
۲-۴-۳- محلول کوماسی بلو ۴۳
۲-۴-۴- بافر تست برادفورد ۴۴
۲-۴-۵- بافر تورم ۴۴
۲-۴-۶- بافر MTT ۴۵
۲-۴-۷- بافر MMP ۴۵

۲-۴-۸- محلول‌های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها ۴۶
۲-۴-۸-۱- نحوه ساخت محلول ۰.۱ ٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید ۴۶
۲-۴-۸-۲- تهیه محلول ۲۰٪ وزنی/حجمی تری‌کلرواستیک اسید و ۰.۵٪ وزنی/حجمی تیوبابیتوریک اسید ۴۶
۲-۴-۹- بافر تنفسی ۴۶
۲-۵- القای سمیت قلبی توسط کتامین ۴۷
۲-۶- گروه‌های حیوانات ۴۷
۲-۷- آزمایش‌ها ۴۸
۲-۷-۱- تشخیص سطح تروپونینI ، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و کراتین کیناز(CK) ۴۸
۲-۷-۲- مطالعات هیستوپاتولوژیک ۴۸
۲-۷-۳- پراکسیداسیون لیپیدی ۴۸
۲-۷-۴- اندازه‌گیری سطح گلوتاتیون بافت قلبی (GSH) و گلوتاتیون دی سولفید(GSSG) ۴۹
۲-۷-۵- روش جداسازی میتوکندری قلبی ۵۰
۲-۷-۶- اندازه‌گیری فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۵۰
۲-۷-۷- اندازه‌گیری تورم میتوکندری ۵۱
۲-۷-۸- اندازه‌گیری ROS میتوکندری ۵۱
۲-۷-۹- اندازه‌گیری پتانسیل فروپاشی غشای میتوکندری ۵۲
۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری ۵۲

فصل سوم - نتایج ۵۴

۳-۱- یافته‌های بیوشیمیایی ۵۵
۳-۱-۱- اثر گالیک اسید بر میزان لاکتات دهیدروژناز(LDH) در حضور کتامین ۵۵
۳-۱-۲- اثر کتامین بر میزان تولید تروپونین ناشی از کتامین ۵۵
۳-۱-۳- اثر گالیک اسید بر میزان گراتین فسفو کیناز در حضور کتامین ۵۶
۳-۲- یافته‌های نشانگر اکسیداتیو ۵۷
۳-۲-۱- اثر گالیک اسید بر تغییر گلوتاتیون دی سولفید (GSSG) ناشی از کتامین ۵۷
۳-۲-۲- اثر گالیک اسید بر تغییر میزان گلوتاتیون احیا (GSH) ناشی از کتامین ۵۸
۳-۲-۳- اثر گالیک اسید بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از کتامین ۵۹
۳-۳- یافته‌های بافت شناسی ۶۰
۳-۴- یافته‌های عملکرد میتوکندری ۶۱
۳-۵- اثر گالیک اسید بر میزان تورم میتوکندری در حضور کتامین ۶۲
۳-۶- تولید ROS میتوکندری ۶۳
۳-۷- فروپاشی بالقوه غشای میتوکندری ۶۴

فصل چهارم - بحث و نتیجه گیری ۶۶

۴-۱- بحث ۶۷
۴-۲- نتیجه گیری ۶۹
۴-۳- محدودیت‌ها ۷۰
۴-۴- پیشنهادات ۷۰
منابع ۷۱

فهرست علائم، نشانه‌ها و اختصارات

ATP : Adenosine Triphosphate

CYP : Cytochrome P450

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

DNA : Deoxyribonucleic Acid

DTNB : 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

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

GPx : Glutathione Peroxidase

GSH : Glutathione

GSSG : Glutathione Disulfide

H2DCF : 2′ ,7′ -Dichloro-dihydro-fluorescein

H2O2 : Hydrogen peroxide

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

LDL : Low-density Lipoprotein

MDA : Malondialdehyde

MMP & ΔΨm : Mitochondrial Membrane Protentional

MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

PCP : N-(1-phenyl-cyclohexyl)-piperidine

PTP : Permeability Transition pore

MTT : Measures the reduction of a Tetrazolium component

NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) + Hydrogen (H)

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide

NO : Nitric Oxide

NMDA : N-methyl-D-aspartic acid

ROS : Reactive Oxygen Species

SOD : Superoxide Dismutase

TBA : Thiobarbituric acid

TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances

TCA : Trichloroacetic acid

TNF-α : Tumor Necrosis Factor Alpha

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱- لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه..... ۳۷
جدول ۲-۲- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌های مورد استفاده..... ۳۸
جدول ۲-۳- اجزای بافر شست و شو..... ۴۳
جدول ۲-۴- اجزای بافر ایزولاسیون..... ۴۳
جدول ۲-۵- اجزای محلول کوماسی بلو..... ۴۴
جدول ۲-۶- اجزای بافر تست برادفورد..... ۴۴
جدول ۲-۷- اجزای بافر تورم..... ۴۴
جدول ۲-۸- اجزای بافر MTT..... ۴۵
جدول ۲-۹- اجزای بافر MMP..... ۴۵
جدول ۲- ۱۰- اجزای محلول مورد نیاز جهت سنجش پر اکسیداسیون لیپید..... ۴۶
جدول ۲-۱۱- اجزای بافر تنفسی..... ۴۶

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- کلشی سین ۴
شکل ۱-۲- موادی که گالیک اسید در ساختار آنها بکار رفته است ۴
شکل ۱-۳- ساختار شیمیایی اسید گالیک و برخی از مشتقاتn -آلکیل استر آن ۵
شکل ۱-۴- مواد طبیعی که گالیک اسید در آنها وجود دارد ۵
شکل ۱-۵- شراب و کاکائو دو منبع غنی از آنتی‌اکسیدان ۶
شکل ۱-۶- مسیرهای ممکن برای بیوسنتز اسید گالیک (۱: GA؛ ۲: ۳- دهیدروشیکیمیک اسید؛ ۳: پروتوکاتچوئیک اسید؛ ۴: فنیل آلانین) ۷
شکل ۱-۷- کانفورمرهای گالیک اسید ۸
شکل ۱-۸- مهمترین مکانیسم‌های اسید گالیک به واسطه فعالیت‌های دارویی آن ۱۵
شکل ۱-۹- ساختار شیمیایی کتامین ۱۷
شکل ۱-۱۰- گیرنده NMDA ۲۱
شکل ۱-۱۱- گیرنده اوپیوییدی ۲۳
شکل ۱-۱۲- مدل گیرنده اسید γ–آمینوبوتیریک $GABA_A$ ۲۴
شکل ۲-۱- موش صحرایی، جنس نر، نژاد ویستار ۳۶
شکل ۲-۲- هموژنایزر شیشه‌ای ۳۸
شکل ۲-۳- PH-Meter ۳۸
شکل ۲-۴- ترازوی آزمایشگاهی ۳۹
شکل ۲-۵- سانتریفیوژ یخچال دار ۳۹
شکل ۲-۶- بن ماری ۳۹
شکل ۲-۷- ست سمپلر ۴۰
شکل ۲- ۸- یخ ساز ۴۰
شکل ۲- ۹- انکوبانور CO_2 ۴۰
شکل ۲-۱۰- Heater stirrer ۴۱
شکل ۲- ۱۱- یخچال ۴۱
شکل ۲- ۱۲- دستگاه تهیه آب مقطر ۴۱
شکل ۲-۱۳- میکرو پلیت ریدر (ELISA Reader) ۴۲
شکل ۲-۱۴- فلوسایتومتری ۴۲
شکل ۲- ۱۵- Lab Dancer ۴۲
شکل ۲-۱۶- تزریق داخل صفاقی گالیک اسید به موش صحرایی ۴۷
شکل ۲-۱۷- یکی از گروه‌های موش‌های صحرایی نر ۴۷
شکل ۳-۱- اثر گالیک اسید بر میزان تولید لاکتات دهیدروژناز ناشی از کتامین ۵۵
شکل ۳-۲- اثر گالیک اسید بر میزان تولید تروپونین ناشی از کتامین ۵۶
شکل ۳-۳- اثر گالیک اسید بر میزان کراتین فسفوکیناز در حضور کتامین ۵۷
شکل۳-۴- اثر گالیک اسید بر میزان تغییرات گلوتاتیون دی سولفید (GSSG) ناشی از کتامین ۵۸

شکل ۳-۵- اثر گالیک اسید بر میزان تغییرات گلوتاتیون احیا (GSH)ناشی از کتامین..... ۵۹
شکل۳-۶- اثر کتامین بر پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندریایی..... ۶۰
شکل ۳-۷- مقاطع بافت قلبی زیر میکروسکوپ نوری (X ۴۰۰)..... ۶۱
شکل ۳-۸- اثر گالیک اسید بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز در حضور کتامین..... ۶۲
شکل ۳-۹- نمودارهای معرف تورم میتوکندری میتوکندری‌های قلب جدا شده از گروه‌های مختلف..... ۶۳
شکل ۳-۱۰- تولید ROS را در میتوکندری‌های قلبی جدا شده از گروه‌هایی مختلف نشان می‌دهد..... ۶۴
شکل۳-۱۱- شدت فلورسانس رودامین ۱۲۳ در گروه‌های مختلف مورد آزمایش..... ۶۵