

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه رساله‌ی عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی سمیت مستقیم ترکیب تیموکینون با استفاده از میتوکندری‌های ایزوله شده از
کلیه موش صحرائی

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

پریا ملکی

شماره پایان نامه: د-۱۸۴

مهر ۱۴۰۲

اهداء پایان نامه

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان
به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین

پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت

می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم

تقدیر و تشکر

از استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر سلیمی که وجودشان همیشه قوتی برای انجام کارهایم بوده است و بدون شک انجام این پایان نامه بدون کمک و راهنمایی های ارزنده ایشان امکان پذیر نبوده است ، کمال تشکر را دارم. از اساتیدی که زحمت داوری این رساله را داشتند نیز سپاسگزارم.

تشکر از تمامی معلمان و اساتیدی که توفیق دانش آموزی و دانشجویی در محضرشان را داشتم. از دوستان عزیزم که همراهان همیشگی من بوده اند و اوقات خوشی را در کنار هم سپری کرده ایم ، تقدیر و تشکر دارم.

و در پایان از تمامی عزیزانی که در طول انجام این پروژه مرا یاری کرده اند ، کمال تشکر و قدردانی را ابراز می نمایم.

چکیده

مقدمه:

تیموکینون (TQ, 2-isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) یکی از اصلی‌ترین ترکیبات فعال دانه‌های سیاه‌دانه یا *Nigella sativa* است. این ترکیب می‌تواند توسط ردوکتازهای مختلف به سمی‌کینون^۱ (یک کاهش) و تیموهیدروکینون^۲ (دو کاهش) تبدیل شود. با اینکه مولکول دوم خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد ولی مولکول اول با تولید ROS به عنوان پرواکسیدانت عمل می‌کند. طبق مطالعات، تیموکینون در کنترل بسیاری از اختلالات پاتولوژیک از جمله دیابت، تصلب شرایین، بیماری‌های قلبی، آسم، آرتریت، اختلالات نورودژنراتیو و سرطان به کار می‌رود. با توجه به افزایش مصرف این ترکیب به عنوان دارو، در این مطالعه ما سمیت مستقیم تیموکینون را با استفاده از میتوکندری‌های ایزوله شده از کلیه موش صحرایی بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

میتوکندری‌های کلیه از موش‌های صحرایی، جنس نر، نژاد ویستار و در وزن تقریبی ۲۰۰ گرم جدا شدند و با آزمایش برادفورد میزان میتوکندری در غلظت ۱ mg/ml تنظیم شد. میتوکندری‌های جدا شده به گروه‌های مختلف شامل گروه کنترل مثبت، گروه کنترل منفی و گروه‌های درمان (تیموکینون با غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ تقسیم بندی شدند. سپس پارامترهای سمیت میتوکندریایی همچون فعالیت سوکسینات دهیدروژناز^۳ (SDH)، تورم میتوکندری^۴ (MS)، سقوط پتانسیل غشای میتوکندری^۵ (MMP)، تولید

¹ Semiquinone

² Thymohydroquinone

³ Succinate Dehydrogenase

⁴ Mitochondrial Swelling

⁵ Mitochondrial Membrane Potential

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)^۶ و پراکسیداسیون لیپید (LP)^۷ با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج آزمایشات ما نشان داد که تجویز تیموکینون هیچ تاثیر قابل توجهی بر پتانسیل غشای میتوکندری و فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، تورم میتوکندری، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و استرس اکسیداتیو همراه با پراکسیداسیون لیپید در میتوکندری‌های ایزوله شده از کلیه ندارد.

بحث و نتیجه‌گیری:

طبق این مطالعه میتوکندری به صورت تنها نقش اصلی در سمیت سلولی ناشی از تیموکینون ایفا نمی‌کند. به نظر می‌رسد که برای ارزیابی سمیت تیموکینون نیاز به سلول دست نخورده است زیرا تیموکینون باید به سمی‌کینون که یک پرواکسیدانت است، تبدیل شود.

کلمات کلیدی

ترکیبات گیاهی، تیموکینون، مکانیسم‌های سمیت، سمیت کلیوی، میتوکندری

⁶ Reactive Oxygen Species

⁷ Lipid Peroxidation

فهرست مطالب

فصل اول:	۱
مقدمه	۱
۱-۱- کلیه	۲
۱-۱-۱- ساختار و عملکرد کلیه	۲
۱-۱-۲- سمیت کلیوی و بیماری‌های مرتبط با آن	۹
۱-۱-۳- نقش میتوکندری در بیماری‌های کلیوی	۱۱
۱-۲- میتوکندری	۱۱
۱-۲-۱- ساختار میتوکندری	۱۳
۱-۲-۲- عملکرد میتوکندری	۱۴
۱-۲-۳- میتوکندری و مرگ سلولی	۱۸
۱-۲-۴- سمیت میتوکندری	۲۰
۱-۳- تیموکینون	۲۲
۱-۳-۱- فارماکوکینتیک	۲۴
۱-۳-۲- کاربردها	۲۵
۱-۳-۳- سمیت	۳۰
۱-۴- بررسی متون	۳۶
۱-۵- اهداف	۳۷
۱-۵-۱- هدف کلی	۳۷
۱-۵-۲- اهداف اختصاصی	۳۷
۱-۵-۳- هدف کاربردی	۳۷
۱-۶- فرضیات یا سوالات پژوهش	۳۸

فصل دوم:	۳۹
مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها	۳۹
۲-۱- نوع مطالعه	۴۰
۲-۲- مکان انجام مطالعه	۴۰
۲-۳- فلوجارت انجام کار	۴۰
۲-۴- حیوانات و مواد شیمیایی مورد استفاده	۴۱
۲-۴-۱- حیوانات آزمایشگاهی	۴۱
۲-۴-۲- مواد شیمیایی	۴۱
۲-۴-۳- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌ها	۴۳
۲-۵- محتویات و طرز تهیه بافرها و محلول‌ها	۴۹
۲-۵-۱- بافر ایزولاسیون	۴۹
۲-۵-۲- محلول کوماسی بلو	۴۹
۲-۵-۳- بافر تست برادفورد	۵۰
۲-۵-۴- بافر تورم	۵۰
۵-۵-۲- بافر MTT	۵۱
۵-۵-۲- بافر MMP	۵۲
۲-۵-۷- محلول‌های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها	۵۲
۱-۷-۵-۲- نحوه ساخت محلول ۰.۱٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید	۵۳
۲-۷-۵-۲- تهیه محلول ۲۰٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید و ۰.۵٪ وزنی/حجمی تیوباربیتوریک اسید	۵۳
۸-۵-۲- بافر تنفسی	۵۳
۲-۵-۹- تهیه غلظت‌های مورد نیاز تیموکینون	۵۳
۲-۶- آماده سازی میتوکندری از کلیه موش صحرایی	۵۵
۲-۷- آزمایشات	۵۷

۵۷	۱-۷-۲-آزمایش برادفورد جهت تعیین مقدار پروتئین.....
۵۸	۲-۷-۲-سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز یا عملکرد میتوکندری.....
۵۸	۳-۷-۲-آزمایش تورم میتوکندری.....
۵۹	۴-۷-۲-سنجش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن.....
۶۰	۵-۷-۲-سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری.....
۶۰	۶-۷-۲-سنجش پراکسیداسیون لیپیدی.....
۶۲	فصل سوم:
۶۲	نتایج.....
۶۳	۱-۳-نتایج مرتبط با فعالیت سوکسینات دهیدروژناز یا عملکرد میتوکندری.....
۶۴	۲-۳-نتایج مرتبط با تورم میتوکندری.....
۶۵	۳-۳-نتایج مرتبط با میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن.....
۶۶	۴-۳-نتایج مرتبط با میزان سقوط پتانسیل غشای میتوکندری.....
۶۷	۵-۳-نتایج مرتبط با پراکسیداسیون لیپیدی.....
۶۸	فصل چهارم:
۶۸	بحث و نتیجه‌گیری.....
۶۹	۱-۴-بحث و نتیجه‌گیری.....
۸۰	۲-۴-پیشنهادات.....
۸۱	۳-۴-محدودیت‌ها.....
۸۲	فهرست منابع و ماخذ.....

فهرست اشکال و نمودارها

- شکل ۱-۱ ساختار کلیه ۳
- شکل ۲-۱ ساختار نفرون ۴
- شکل ۳-۱ ساختار گویچه کلیه ۷
- شکل ۴-۱ ساختار سد فیلتراسیونی ۸
- شکل ۵-۱ ساختار میتوکندری ۱۵
- شکل ۶-۱ زنجیره تنفسی میتوکندری ۱۹
- شکل ۷-۱ متابولیسم تیموکینون ۲۷
- شکل ۸-۱ مکانیسم‌های سمیت تیموکینون ۳۱
- شکل ۱-۲ موش صحرایی، جنس نر، نژاد ویستار ۴۱
- شکل ۲-۲ هموژنایزر شیشه‌ای ۴۴
- شکل ۳-۲ pH-Meter ۴۵
- شکل ۴-۲ ترازوی آزمایشگاهی ۴۵
- شکل ۵-۲ سانتریفیوژ یخچال دار ۴۵
- شکل ۶-۲ بن‌ماری ۴۶
- شکل ۷-۲ ست سمپلر ۴۶
- شکل ۸-۲ یخ‌ساز ۴۶
- شکل ۹-۲ انکوباتور CO₂ ۴۷
- شکل ۱۰-۲ Heater Stirrer ۴۷
- شکل ۱۱-۲ یخچال ۴۷
- شکل ۱۲-۲ دستگاه تهیه آب مقطر ۴۸

- شکل ۲-۱۳ میکروپلیت ریدر (ELISA Reader) ۴۸
- شکل ۲-۱۴ فلوسایتومتری ۴۸
- شکل ۲-۱۵ Lab Dancer ۴۹
- شکل ۲-۱۶ مراحل توزین، بیهوشی و فیکس کردن موش صحرایی ۵۶
- شکل ۲-۱۷ مراحل جراحی موش صحرایی، جداسازی و تکه تکه کردن و همگن سازی بافت کلیه آن ۵۶
- شکل ۲-۱۸ آزمایش برادفورد ۵۷
- شکل ۲-۱۹ آزمایش سنجش فعالیت کمپلکس II میتوکندری یا سوکسینات دهیدروژناز ۵۹
- نمودار ۳-۱ اثر تیموکینون بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۶۳
- نمودار ۳-۲ اثر تیموکینون بر تورم میتوکندری ۶۴
- نمودار ۳-۳ اثر تیموکینون بر میزان ROS ۶۵
- نمودار ۳-۴ اثر تیموکینون بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۶۶
- نمودار ۳-۵ اثر تیموکینون بر پرکسیداسیون لیپیدی ۶۷

فهرست جدول‌ها

- جدول ۱-۱ تعداد افراد درگیر بیماری‌های کلیوی در جهان سال ۲۰۱۷ ۱۰
- جدول ۲-۱ ویژگی‌های ترکیب تیموکینون ۲۳
- جدول ۳-۱ فرم‌های سنتتیک تیموکینون و کاربردهای آن‌ها ۲۵
- جدول ۴-۱ خلاصه‌ای از اثرات درمانی تیموکینون بر روی سلول‌های عصبی ۲۹
- جدول ۱-۲ لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه ۴۱
- جدول ۲-۲ وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌های مورد استفاده ۴۳
- جدول ۳-۲ اجزای بافر ایزولاسیون ۴۹
- جدول ۴-۲ اجزای محلول کوماسی بلو ۵۰
- جدول ۵-۲ اجزای بافر تست برادفورد ۵۰
- جدول ۶-۲ اجزای بافر تورم ۵۱
- جدول ۷-۲ اجزای بافر MTT ۵۱
- جدول ۸-۲ اجزای بافر MMP ۵۲
- جدول ۹-۲ اجزای محلول‌های مورد نیاز جهت سنجش پراکسیداسیون لیپید ۵۲
- جدول ۱۰-۲ اجزای بافر تنفسی ۵۳

فهرست علائم، نشانه‌ها و اختصارات

ADP: Adenosine Diphosphate

AGP: Alpha-1 Acid Glycoprotein

AKI: Acute Kidney Disease

ALT: Alanine Transaminase

ANT: Adenine Nucleotide Translocase

ATP: Adenosine Triphosphate

BSA: Bovine Serum Albumin

CADs: Cationic Amphiphilic Drugs

CAT: Catalase

CGNS: Cerebellar Granule Neurons

CKD: Chronic Kidney Disease

CNS: Central Nervous System

COX2: Cyclooxygenase-2

CPK: Creatine Phosphokinase

DTQ: Dithymoquinone

ERK: Extracellular Signal-regulated Kinase

ESRD: End-Stage Renal Disease

FADH₂: Flavin Adenine Dinucleotide

FAK: Focal Adhesion Kinase

FBS: Fasting Blood Glucose

GBM: Glomerular Basement Membrane

HSA: Human Serum Albumin

IV: Intravenous

IP: Intraperitoneal

LDH: Lactate Dehydrogenase

LD: Lethal Dose

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

Mda: Milli Dalton

MDA: Malondialdehyde

MELAS: Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis And Stroke-like Episodes

MERRF: Myoclonic Epilepsy With Ragged Red Fibers

MMP: Mitochondrial Membrane Potential

MPTP: Mitochondrial Permeability Transition pores

mtDNA: Mitochondrial DNA

NAC: N-acetylcysteine

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NOEL: No Observed Effect Level

PBR: Peripheral Benzodiazepine Receptor

PGE₂: Prostaglandin E₂

Pi3K: Phosphatidylinositol-3 Inase

PMCA: The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PO: Per Oral

RNS: Responsive Neurostimulator

ROS:Reactive Oxygen Species

SDH: Succinate Dehydrogenase

TBHQ: Tert-Butyl Hydroquinone

TCA:Three Carboxylic Acid

TP: Total Protein

TQ:Thymoquinone

Vdac: Voltage Dependent Anion Channels

VSS: Vital Sign Score

WHO: World Health Organization