بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه‌ی جهت دریافت مدرک دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی سمیت مستقیم ترکیب تیموکینون با استفاده از میتوکندری‌های ایزوله شده از کبد موش صحرایی

استاد راهنما :

دکتر احمد سلیمی

نگارنده :

کوثر حلمی کهنه شهری

مهر ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: د-۱۷۸

اهدای پایان نامه

خدارا شاکرم که در همه‌ی دوران تحصیل یار و یاورم بود و انسان‌های بزرگ و عزیزی را سر راهم قرار داد تا در پایان رساندن این دوران از زندگی‌ام کنارم باشند.
فلذا این رساله را تقدیم می‌کنم به:
مادر و پدر مهربانم که با وجود همه‌ی مشکلات هیچ وقت در سختی‌ها تنهایم نگذاشتند و وجودشان برایم گنجی در زندگی است.

و

خواهرهای عزیزم که در این راه پر فراز و نشیب کنارم بودند.

و

استاد عزیزم که همچون پدری مهربان در تمام مراحل انجام این پروژه کنارم بود و از هیچ کمکی دریغ نکرد.

و

در آخر به همه‌ی دوستان و اساتیدی که این سال‌ها کنارم بودند

تقدیر و تشکر

از استاد گرامی جناب آقای دکتر احمد سلیمی نهایت تقدیر و تشکر را دارم کـه در ایـن راه دشـوار همـواره راهنما و پشتیبان بودند. مطمئنا حضور ایشان به عنـوان عضـوی از خـانواده‌ی بـزرگ داروسـازی، موهبـت بزرگی می‌باشد از خداوند برای ایشان عمری طولانی مسئلت دارم.

و همچنین تقدیر و تشکر دارم از تمامی اساتید دوره‌ی دکتری عمومی که مرا در پیمودن این مسیر دشـوار همراهی کردند.

سوگند نامه

اکنون که با عنایات و الطاف بیکران الهی دوره دکتری داروسازی را با موفقیت به پایان رسانده‌ام و مسئولیت خدمت به خلق را بر عهده گرفته ام، در پیشگاه قرآن کریم *به خداوند قادر متعال که دانای آشکار و نهان است و یادش آرامش دلهای خردمندان و یادش شفای آلام دردمندان، سوگند یاد می‌کنم که : همواره حدود الهی و احکام مقدس دینی را محترم شمارم، از تضییع حقوق بیماران بپرهیزم و سلامت و بهبود آنان را بر منافع مادی و امیال نفسی خود مقدم دارم ، در امور مربوط به حرفه خویش حریم عفاف را رعایت کنم و اسرار بیماران خود را ،جز به ضرورت شرعی و قانونی ، فاش نسازم ،خود را نسبت به حفظ قداست حرفه خویش و حرمت همکاران متعهد بدانم و از آلودگی به اموری که با پرهیزکاری و اخلاق منافات دارد اجتناب ورزم،همواره برای ارتقاء دانش خویش تلاش کنم و از دخالت در اموری که آگاهی و مهارت لازم را در آن ندارم خودداری نمایم ،در امر بهداشت،اعتلاء فرهنگ و آگاهی‌های عمومی تلاش نمایم و تامین ،حفظ و ارتقاء سلامت جامعه را مسئولیت اساسی خویش بدانم. اینک با پیمانی استوار زیر این سوگندنامه را به دست خویش امضاء نموده و آن را به عنوان سند شرافت علمی خویش به دفتر دانشکده می سپارم.

نام ونام خانوادگی دانشجو محل امضا

خلاصه ی پایان نامه

مقدمه:

تیموکینون که با نام علمی 2-methyl 5-isopropyl 1,4-benzo quinone شناخته می‌شود، جز ماده موثره‌ی دانه‌های سیاه دانه با نام علمی Nigella sativa می‌باشد، تحقیقات مختلفی در زمینه‌ی خواص ضد سرطانی این ترکیب وجود دارد، زیرا این ترکیب، خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی زیادی دارد. حساسیت میتوکندری‌ها به داروها و سایر ترکیبات خارجی یکی از مسائل جدی و مهم، برای افراد مواجهه یافته است. چرا که چنین ترکیباتی می‌تواند به بافت‌ها و اندام‌های حیاتی مهم چون مغز، کبد ، قلب، کلیه و عضلات آسیب برساند. سمیت میتوکندری ناشی از ترکیبات با پتانسیل دارویی همواره یکی از نگرانی‌های عمده صنایع دارویی است. چرا که می‌تواند باعث حذف داروی ارائه شده در بازار شود. هدف مطالعه پیش رو برپایه‌ی ارزیابی سمیت مستقیم ترکیب تیموکینون به عنوان یک ترکیب طبیعی با اثرات بالقوه درمانی بر میتوکندری‌های ایزوله شده از کبد موش صحرایی طراحی شده‌است.

مواد و روش‌ها:

میتوکندری‌ها با استفاده از روش‌های لیز مکانیکی و سانتریفیوژ افتراقی از بافت‌های تازه کبد موش‌های صحرایی نر جدا شدند. سپس میتوکندری های جدا شده به دو گروه کنترل و غلظت تیموکینون (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میکرومولار) تقسیم شدند. اثرات **Thymoquinone** بر روی یک سری از پارامترهای میتوکندری از جمله فعالیت دهیدروژنازهای سوکسینات میتوکندری (**SDH**)، تورم میتوکندری، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (**ROS**)، پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندری در طی ۱ ساعت انکوباسیون با تیموکینون مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج:

تیموکینون تغییرات مضر در عملکرد میتوکندری، تورم میتوکندری، SDH، پراکسیداسیون لیپیدی، تشکیل ROS و MMP در میتوکندری های جدا شده از کبد ایجاد نکرد. در مجموع، داده‌های این مطالعه نشان داد که تیموکینون مستقیماً در میتوکندری‌های جدا شده از کبد سمی نیست و احتمالاً مسیرها و متابولیسم‌های دیگری در سمیت این ترکیب نقش دارند.

کلمات کلیدی:

تیموکینون، میتوکندری، سمیت کبدی، سیاه دانه و آنتی‌اکسیدان

فهرست مطالب

عنوان .....صفحه

فهرست مطالب.....أ
فصل اول: ۱
مقدمه ۱
۱-۱- تاریخچه‌ی بیماری‌های کبدی ۲
۱-۲- کبد ۳
۱-۲-۱ - ساختار و عملکرد کبد ۳
۱-۲-۱- بیماری‌های کبدی..... ۴
۱-۳- مورفولوژی میتوکندری در بیماری‌های کبدی ۵
۱-۳-۱- میتوکندری..... ۵
۱-۳-۲-ساختار میتوکندری ۶
۱-۳-۳- عملکرد میتوکندری..... ۷
۱-۳-۴- انرژی زیستی میتوکندریایی ۸
۱-۳-۵- میتوکندری و مرگ سلولی..... ۱۱
۱-۳-۶- پروتئین‌های آپوپتوژنیک و میتوکندری ۱۲
۱-۴- تیموکینون ۱۳
۱-۴-۱- تاریخچه..... ۱۳
۱-۴-۲- عملکرد تیموکینون..... ۱۵
۱-۴-۳- اثر تعدیل کنندگی ایمنی تیموکینون ۱۸
۱-۴-۴- تیموکینون عامل کموتراپیوتیک..... ۲۰
۱-۴-۵- مکانیسم عمل تیموکینون..... ۲۳
۱-۴-۶- فارماکوکینتیک ۲۴
۱-۴-۷- کاربرد..... ۲۵
۱-۴-۷-۱- تیموکینون در سرطان تخمدان..... ۲۵
۱-۴-۷-۲- سرطان کولون..... ۲۶
۱-۴-۷-۳- سرطان شش ۲۷

۴-۷-۴-۱- سرطان کبد ۲۸
۵-۷-۴-۱- سرطان دهان ۲۹
۶-۷-۴-۱- لوکمی ۲۹
۵-۱- بررسی متون ۳۰
۶-۱- اهداف ۳۳
۱-۶-۱- هدف کلی ۳۳
۲-۶-۱- اهداف اختصاصی ۳۳
۷-۱- فرضیات یا سوالات پژوهش ۳۴
فصل دوم: ۳۵
مواد،دستگاه‌ها و روش‌ها ۳۵
۱-۲-نوع مطالعه ۳۶
۲-۲- مکان انجام مطالعه ۳۶
۳-۲- نمودار انجام کار ۳۶
۴-۲- حیوانات و مواد شیمیایی و تجهیزات مورد استفاده ۳۸
۲-۴-۱-حیوانات آزمایشگاهی ۳۸
۲-۴-۲- مواد شیمیایی ۳۹
۳-۴-۲- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌ها ۴۰
۵-۲- محتویات و طرز تهیه‌ی بافرها و محلول‌ها ۴۵
۱-۵-۲- بافر شست و شو ۴۵
۲-۵-۲- بافر ایزولاسیون ۴۶
۳-۵-۲- محلول کوماسی بلو ۴۶
۴-۵-۲- بافر تست برادفورد ۴۷
۵-۵-۲- بافر تورم ۴۷
۶-۵-۲- بافر MTT ۴۸
۷-۵-۲- بافر MMP ۴۸

۸-۵-۲- محلول‌های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها ۴۹
۱-۸-۵-۲- نحوه‌ی ساخت محلول٪ ۰.۱ وزنی /حجمی تری کلرو استیک اسید ۴۹
۲-۸-۵-۲ - تهیه محلول ۲۰ ٪وزنی/حجمی تریکلرواستیک اسید و ۰/۵ ٪ وزنی/حجمی تیوباربیتوریک اسید ۴۹
۹-۵-۲- بافر تنفسی ۴۹
۱۰-۵-۲- تهیه‌ی غلظت مورد نیاز تیموکینون..... ۵۰
۶-۲- آماده‌سازی میتوکندری از کبد موش صحرایی ۵۰
۷-۲- آزمایشات ۵۴
۱-۷-۲-آزمایش برادفورد جهت تعیین مقدار پروتئین..... ۵۴
۲-۷-۲- آزمایش تورم میتوکندری ۵۵
۳-۷-۲- سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز یا عملکرد میتوکندری..... ۵۶
۴-۷-۲- سنجش پراکسیداسیون لیپیدی ۵۷
۵-۷-۲- اندازه‌گیری میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن..... ۵۹
۶-۷-۲- سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۶۰
۸-۲- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری ۶۱
فصل سوم نتایج :..... ۶۲
۱-۳- نتایج مرتبط با تورم میتوکندری تیموکینون..... ۶۳
۲-۳- نتایج مرتبط با فعالیت سوکسینات دهیدروژناز یا عملکرد میتوکندری..... ۶۴
۳-۳- نتایج مرتبط با پراکسیداسیون لیپیدی ۶۵
۴-۳- نتایج مرتبط با میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن.....۶۶
۵-۳- نتایج مرتبط با میزان سقوط پتانسیل غشای میتوکندری..... ۶۷
فصل چهارم :..... ۶۸
بحث و نتیجه گیری..... ۶۸
۱-۴-بحث و نتیجه‌گیری..... ۶۹
۲-۴- پیشنهادات..... ۷۶
۳-۴- محدودیت‌ها ۷۷
منابع و ماخذ..... ۹۷

فهرست جداول

عنوان .....صفحه

جدول۱-۱ خواص آنتی اکسیدانی تیموکینون (۲۸) ۱۶
جدول۱-۲: از اثرات ایمونولوژیک تیموکینون بر روی مدل‌های مختلف (۲۸) ۱۸
جدول ۲-۱: لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه ۳۹
جدول ۲-۲: وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌های مورد استفاده..... ۴۰
جدول ۲-۳ : اجزای بافر شست‌وشو..... ۴۶
جدول ۲-۴: اجزای بافر ایزولاسیون..... ۴۶
جدول ۲-۵ : مواد لازم برای تهیه محلول..... ۴۶
جدول ۲-۶: اجزای بافر تست برادفورد ۴۷
جدول ۲-۷ : اجزای بافر تورم..... ۴۷
جدول ۲-۸: اجزای بافر MTT ۴۸
جدول ۲-۹: اجزای بافر MMP..... ۴۸
جدول۲-۱۰ : مواد مورد نیاز ساخت محلول‌های پراکسیداسیون ۴۹
جدول ۲-۱۱: اجزای بافر تنفسی..... ۴۹

فهرست اشکال

عنوان .....صفحه

شکل ۱-۱: Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Third Edition) ۳
شکل ۱-۲ : چرخه‌ی ذخیره‌ی چربی در کبد ۵
شکل ۱-۳:چرخه‌ی تولید انرژی زیستی در زنجیره‌ی غشای داخلی میتوکندری..... ۱۱
شکل۱-۴ : مسیر فعال شدن آپوپتووز ۱۳
شکل۱-۶: شکل دارویی و مسیر تبدیل تیموکینون به هیدروتیموکینون و سمی‌کینون(۲۸)..... ۱۶
شکل۱-۷: خلاصه‌ای از خواص تیموکینون و فراهمی زیستی آن..... ۲۰
شکل۱-۸: مکانیسم اثر تیموکینون در سلول‌های سرطانی پستان(۲۸)..... ۲۱
شکل ۱-۹ : مکانیسم القای آپوپتوز توسط تیموکینون..... ۲۳
شکل۱-۱۰ : 2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone ۲۴
شکل ۲-۱: موش‌های آزمایش‌شده در آزمایشگاه ۳۸
شکل۲-۲: هموژنایزر ۴۱
شکل۲-۳: pH - Meter..... ۴۱
شکل ۲-۴: ترازوی آزمایشگاهی ۴۱
شکل۲-۵: سانترفیوژ ۴۲
شکل۲-۶: بن ماری ۴۲
شکل ۲-۷: ست سمپلر ۴۲
شکل۲-۸ : یخ ساز ۴۳
شکل۲-۹ : انکوباتور CO_2..... ۴۳
شکل۲-۱۰ : Heater Stirrer ۴۳
شکل۲-۱۱: یخچال ۴۴
شکل ۲-۱۲: دستگاه تهیه‌ی آب مقطر ۴۴
شکل ۲-۱۳: میکروپلیت ریدر (ELISA Reader) ۴۵
شکل ۲-۱۴: lab Dancer ۴۵
شکل ۲-۱۵: توزین موش ۵۱
شکل ۲-۱۶: بیهوشی موش ۵۲
شکل ۲-۱۷: آماده سازی موش برای جراحی ۵۲
شکل ۲-۱۸: جراحی موش..... ۵۲

شکل ۲-۱۹: کبد تکه تکه شد و آماده‌ی هموژن شدن ۵۳
شکل ۲-۲۰:توزین تیموکینون جهت ساخت غلظت‌های مختلف ۵۳
شکل ۲-۲۱: هموژن کردن میتوکندری در حمام یخ ۵۳
شکل۲-۲۲: پلیت آزمایش برادفورد ۵۵
شکل۲-۲۳: آزمایش تورم ۵۶
شکل ۲-۲۴: فالکون‌های مورد آزمایش در سنجش پراکسیداسیون لیپید ۵۸

فهرست نمودارها

عنوان .....صفحه

نمودار ۳-۱: اثر تیموکینون بر سقوط پتانسیل غشایی میتوکندری ۶۳
نمودار ۳-۲: اثر تیموکینون بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز..... ۶۴
نمودار ۳-۳: اثر تیموکینون بر میزان فعالیت مالون دی آلدهید ۶۵
نمودار ۳-۴: اثر ترکیب تیموکینون بر میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن کبد موش صحرایی ۶۶
نمودار ۳-۵: تاثیر ترکیب تیموکینون بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری..... ۶۷

اختصارات

ATP: Adenosine Triphosphate

ADP: Adenosine Diphosphate

AUC: Area Under the Curve

AChE: Acetyl CholinEsterase

AHA: American Hospital Association

BSA: Bovine Serum Albumin

BDE: Bond Dissociation Enthalpy

CDH11: Cadherin-11

CYP450: Cytochromes P450

CAT: Catalase

COX-1: Cyclo Oxygenase-1

COX-2: Cyclo Oxygenase-2

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate

DNA: Deoxyribo Nucleic Acid

DCFH-DA: Dichloro-Dihydro-Fluorescein Diacetate

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

ETC: Electron Transport Chain

EGTA: Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N′,N′-Tetraacetic acid

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

ELISA: Enzyme-Linked Immunoassay

e-NOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase

FADH2: Flavin Adenine Dinucleotide

FDA: Food and Drug Administration

GST: Glutathione S-transferase

GRx: Glutathione Reductase

GPx: Glutathione Peroxidase

GERD: Gastroesophageal Reflux Disease

HLEC: Human Lens Epithelial Cell

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HAT: Hydrogen Atom Transfer

IL-1: Interleukin 1

IP: Ionization Potential

LPS: Lipopolysaccharide

LG: lauryl Gallate

LP: Lipid Peroxidation

MDA: Malon Dialdehyde

MMP: Mitochondrial Membrane Potential

mPTP: Mitochondrial Permeability Transition Pore

N.sativa : Nigella Sativa

NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease (MAFLD)

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

NSAIDs: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NF-κB: Nuclear Factor kappa B

OTC: Over-The-Counter

OG: Octyl Gallate

PGF2α: Prostaglandin F2α

PTGS: Prostaglandin-endoperoxide Synthase

PG: Propyl Gallate

ROS: Reactive Oxygen Species

RNS: Reactive Nitrogen Species

SET: Single Electron Transfer

SOD: Superoxide Dismutase

SLS: Sodium Lauryl Sulfate

SDH: Succinate Dehydrogenase

TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α

TCA: Trichloroacetic Acid

TBA: Thiobarbituric Acid

TQ: Thymoquinon

tRNA: Transfer Ribonucleic Acid

UV-B: Ultraviolet-B