دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان‌نامه‌ی رساله‌ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

ارزیابی اثر ترکیب هسپریدین بر سمیت میتوکندریایی ایجاد شده توسط آتورواستاتین در میتوکندری‌های ایزوله شده از پانکراس موش صحرایی نر

استاد راهنما

دکتر احمد سلیمی

استاد مشاور

دکتر صالح خضری

نگارش

روژین صمیمی

بهار ۱۴۰۳

شماره پایان امه: د-۲۱۷

تقدیم:

این پایان‌نامه تقدیم می‌شود به:

پدر و مادر عزیزم

و

همسر عزیزم

تشکر و قدردانی

اکنون که به یاری پروردگار و راهنمایی اساتید بزرگ موفق به پایان این رساله شده‌ام وظیفه خود دانسته که نهایت سپاسگزاری را از تمامی عزیزانی که در این راه به من کمک کرده‌اند را به عمل آورم:

- تشکر قلبی و لسانی خود را از استاد عالی قدر جناب آقای **دکتر احمد سلیمی** که زحمت راهنمایی این پایان نامه را عهده‌دار گردیدند و در تمامی مراحل انجام رساله از راهنمایی‌های مدبّرانه ایشان استفاده نمودم ابراز می دارم و توفیقات روز افزون ایشان را توأم با صحت و سعادت خواستارم.

- جناب آقای **دکتر صالح خضری** به عنوان استاد مشاورکه بدون حمایت‌ها، راهنمایی‌ها و روحیه بخشی ایشان، انجام بخش مهمی از این رساله میسر نمی‌شد. بدین وسیله از بزرگواری، حسن سلوک و حمایت بی دریغ ایشان تشکر کرده و برای ایشان طول عمر توام با سربلندی را آرزومندم.

- خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نسبیم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی‌ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند....

- همسر مهربانم که در مسیر ناهموار زندگی واژه صبر را برایم به تصویر کشید و برق امید چشمانش چراغ دلم را روشن کرد به پاس قدر دانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است.

- دوستان مهربان و پرتلاشم که در این مسیر همواره با همدلی و همیاری مرا یاری کردند و وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه‌ی آرامش من است.

چکیده:

داده‌های به دست آمده از مطالعات مشاهده‌ای نشان داده است که استفاده از استاتین‌ها با افزایش خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ مرتبط است. گزارش شده است که استاتین‌های لیپوفیل مانند آتورواستاتین می توانند با سهولت بیشتری به سلول‌های β نفوذ کرده و به میتوکندری برسند و منجر به اختلال عملکرد میتوکندری، استرس اکسیداتیو و کاهش ترشح انسولین شوند. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که محصولات طبیعی می‌توانند از اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از دارو در بافت‌های مختلف محافظت کنند. بنابراین هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی قدرت محافظت میتوکندریایی هسپریدین به عنوان یک ترکیب طبیعی در برابر اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از آتورواستاتین در میتوکندری‌های جدا شده از پانکراس است.

مواد و روش‌ها:

با استفاده از لیز مکانیکی و سانتریفیوژ افتراقی، میتوکندری‌ها از پانکراس موش صحرایی جدا شدند و مستقیماً با غلظت سمی آتورواستاتین (500 µM) در حضور غلظت‌های مختلف هسپریدین (1-10-100 µM) به طور جداگانه مواجهه داده شدند. فعالیت سوکسینات دهیدروژناز (SDH[1])، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[2])، تشکیل تورم میتوکندری، پتانسیل غشای میتوکندری (MMP[3])، کاهش گلوتاتیون (GSH[4]) و تولید مالون دی‌آلدئید(MDA[5]) به عنوان پارامترهای سمیت میتوکندریایی حاصل از آتورواستاتین در یک ساعت اندازه‌گیری شد.

نتایج:

نتایج نشان دادند که آتورواستاتین در غلظت 500 µM و بالاتر سبب بروز سمیت میتوکندریایی در میتوکندری‌های ایزوله شده از پانکراس موش صحرایی نر شد. به جز MDA، آتورواستاتین باعث کاهش قابل توجه‌ای در فعالیت SDH، تشکیل ROS، تورم میتوکندری، فروپاشی MMP و کاهش GSH در میتوکندری‌های جدا شده از پانکراس موش شد. داده‌های ما نشان داد که ترکیب محافظ در غلظت‌های پایین، اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از آتورواستاتین را با افزایش فعالیت SDH، بهبود فروپاشی MMP، تورم میتوکندری و GSH میتوکندریایی و کاهش تشکیل ROS در میتوکندری‌های جدا شده از پانکراس بهبود می‌بخشد.

۱- Succinate dehydrogenase.
۲- reactive oxygen species.
۳- Mitochondria membrane potential.
۴- Glutathione.
۵- malondialdehyde.

بحث و نتیجه‌گیری:

می‌توان نتیجه گرفت که هسپریدین می‌تواند مستقیماً سمیت میتوکندریایی ناشی از آتورواستاتین را در میتوکندری‌های ایزوله شده از پانکراس موش صحرایی نر معکوس کند که ممکن است برای محافظت در برابر اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از دیابت در سلول‌های β پانکراس مفید باشد.

کلمات کلیدی: استاتین‌ها؛ داروی دیابت زا؛ آنتی اکسیدان‌ها؛ پیشگیری از دیابت؛ اثرات آنتی دیابتیک

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فصل اول: ۱

مقدمه ۱

۱-۱-مقدمه و بیان مساله: ۲

۱-۲- بیماری دیابت ۵

۱-۲-۱- انواع بیماری دیابت..... ۶

۱-۲-۲-۱-دیابت تایپ ۲..... ۷

۱-۲-۳-۱-ریسک فاکتورهای دیابت تایپ ۲ ..... ۸

۱-۳-۱-استاتین‌ها..... ۹

۱-۳-۱-آتورواستاتین ۱۱

۱-۴-نقش میتوکندری در آزادسازی انسولین از سلول‌های بتای پانکراس ۱۱

۱-۵- آسیب میتوکندریایی ناشی از آتورواستاتین و نقش آن در ایجاد دیابت..... ۱۴

۱-۶-عوامل آنتی اکسیدانی و نقش آن‌ها در پیشگیری از سمیت میتوکندریایی..... ۱۵

۱-۷-ترکیبات طبیعی ۱۶

۱-۷-۱- هسپریدین ۱۶

۱-۷-۲-فارماکوکینتیک و جذب هسپریدین ۱۸

۱-۷-۳-اثرات آنتی اکسیدانی ترکیب هسپریدین ۱۹

۱-۷-۴- رابطه SAR هسپریدین با اثرات آنتی اکسیدانی..... ۲۰

۱-۷-۵- اثر ضد التهابی هسپریدین ۲۲

۱-۷-۶- مکانیسم مولکولی هسپریدین ۲۴

۱-۸-بررسی متون ۲۴

۹-۱- اهداف و فرضیات ۲۵
۱-۹-۱- هدف کلی ۲۵
۲-۹-۱- اهداف اختصاصی ۲۵
۳-۹-۱- هدف کاربردی ۲۶
۴-۹-۱-فرضیات تحقیق ۲۶
فصل دوم ۲۸
مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها ۲۸
۱-۲-نوع مطالعه ۲۹
۲-۲-محل انجام مطالعه ۲۹
۳-۲- حیوانات و مواد شیمیایی و دستگاه‌های مورد مطالعه ۲۹
۱-۳-۲-حیوانات: ۲۹
۲-۳-۲-مواد شیمیایی ۳۰
۳-۳-۲- تجهیزات و وسایل مورد استفاده ۳۱
۴-۲- محتویات و طرز تهیه‌ی بافرها و محلول‌ها ۳۹
۱-۴-۲- بافر ایزولاسیون ۳۹
2-4-2-بافر تورم (swelling) ۳۹
۳-۴-۲-بافر MTT ۴۰
۴-۴-۲- محلول کوماسی بلو ۴۱
۵-۴-۲- بافر MMP ۴۱
۶-۴-۲-بافر تنفسی(respiration buffer) ۴۲
۸-۴-۲- بافر مورد استفاده در سنجش پراکسیداسیون لیپیدی ۴۳
۹-۴-۲- بافرهای مورد استفاده در سنجش گلوتاتیون احیا ۴۳
۱-۹-۴-۲- بافرTris-Hcl ۴۳

۲-۴-۹-۲-محلول واکنش گلوتاتیون احیا(GSH) ۴۳
۲-۵-روش انجام آزمایشات ۴۴
۲-۶-تست‌ها ۴۶
۲-۶-۱-سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۴۶
۲-۶-۲-سنجش تورم میتوکندری ۴۶
۲-۶-۳- سنجش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن ۴۷
۲-۶-۴- سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۴۷
۲-۶-۵-سنجش پراکسیداسیون لیپیدی ۴۸
۲-۶-۶-سنجش میزان گلوتاتیون-احیا ۴۸
فصل سوم ۵۰
نتایج ۵۰
۳-۱-اندازه گیری فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۵۱
۳-۲- نتایج مرتبط با تشکیل رادیکال فعال اکسیژن ۵۲
۳-۳- نتایج مرتبط با میزان تورم میتوکندریایی: ۵۴
۳-۴- تعیین فروپاشی MMP ۵۵
۳-۵-تعیین میزان پراکسیداسیون لیپید ۵۷
۳-۶- بررسی میزان تغییرات گلوتاتیون احیاء (GSH) ۵۹
فصل چهارم ۶۱
بحث و نتیجه‌گیری ۶۱
۴-۱-بحث ۶۲
۴-۲-نتیجه گیری ۶۹
۴-۳-محدودیت‌ها ۶۹
۴-۴- پیشنهادات ۷۰

فهرست منابع و مآخذ ۷۰

فهرست جدول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۱- مقدار هسپریدین موجود در مرکبات: ۱۷

جدول۲-۱. مواد شیمیایی به کار رفته در روند کار پایان‌نامه: ۲۹

جدول۲-۲ دستگاه‌های مورد استفاده: ۳۰

جدول۲-۳- بافر ایزولاسیون: ۳۸

جدول۲-۴- بافر تورم: ۳۸

جد.ل ۲-۵-بافر MTT: ۳۹

جدول۲-۶-محلول کوماسی بلو: ۳۹

جدول۲-۷- بافر MMP: ۴۰

جدول۲-۸- بافرROS: ۴۰

جدول۲-۹- اجزای بافر فسفات: ۴۱

جدول۲-۱۰- اجزای محلول مورد نیاز جهت سنجش پراکسیداسیون لیپید: ۴۱

جدول۲-۱۱-اجزای بافرTris-Hcl: ۴۲

جدول ۲-۱۲-اجزای محلول واکنش گلوتاتیون احیاء (GSH): ۴۲

فهرست شکل

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱-مکانیسم‌های اصلی ایجاد T2DM ناشی از استاتین‌ها: ۱۰

شکل 1-۲—بخش‌های مختلف میوه مرکبات: ۱۷

شکل۱-۳- تأثیر مستقیم هسپریدین بر شاخص‌های مرتبط با اکسیداسیون و عوامل التهابی که درجه التهاب و آسیب اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی و چربی خون را بهبود می‌بخشد: ۲۳

شکل۲-۱- پنج سر موش صحرایی نر ویستار: ۲۹

شکل ۲-۲- سانتریفیوژ یخچال دار: ۳۱

شکل ۲-۳- دستگاه ph متر: ۳۲

شکل ۲-۴- دستگاه یخ ساز: ۳۲

شکل۲-۵- دستگاه مولد آب مقطر: ۳۳

شکل۲-۶-دستگاه ترموبلاک: ۳۳

شکل۲-۷-یخچال: ۳۴

شکل ۲-۸-دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک: ۳۴

شکل۲-۹-دستگاه انکوباتور: ۳۵

شکل۲-۱۰-دستگاه ترازوی دیجیتال با دقت ۴ رقم اعشار: ۳۵

شکل۲-۱۱-دستگاه Eliza reader: ۳۵

شکل۲-۱۲-دستگاه فلوسایتومتری: ۳۶

شکل۲-۱۳-ست سمپلر: ۳۶

شکل۲-۱۴-lab dancer: ۳۷

شکل۲-۱۵-هیتر استیرر: ۳۷

شکل۲-۱۶-عملیات بیهوشی، جداسازی پانکراس رت و آماده‌سازی میتوکندری: ۴۴

شکل۳-۱-اثر آتورواستاتین بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز و اثر محافظت کننده‌ی ترکیب هسپریدین: ۵۱

شکل۳-۲-اثر آتورواستاتین بر تشکیل ROS و اثر محافظتی هسپریدین: ۵۲
شکل ۳-۳-تاثیر آتورواستاتین بر تورم میتوکندری و اثر محافظتی هسپریدین: ۵۴
شکل۳-۴-اثر داروی آتورواستاتین بر MMP و اثر حفاظتی ترکیب هسپریدین: ۵۵
شکل۳-۵-القای پراکسیداسیون لیپیدها در میتوکندری‌های ایزوله شده از پانکراش موش صحرایی پس از انکوباسیون با آتورواستاتین و اثر محافظتی ترکیب هسپریدین: ۵۷
شکل۳-۶-تغییرات گلوتاتیون احیاء بر اثر مواجهه با آتورواستاتین و اثر حفاظتی ترکیب هسپریدین بر آن: ۵۸

فهرست اختصارات

AGE: Advanced Glycation End Products

ATP: Adenosine Triphosphate

BHA: Butylated Hydroxyanisole

BHT: Butylated Hydroxytoluene

CAT: Catalase

CoQ10: Coenzyme Q-10

COX-2: Cyclooxygenase-2

CRP: C-Reactive Protein

DCF: 2′7′-Dichlorofluorescein

DCFH: 2,7-Dichlorodihydrofluorescein

DMI: Diabetic Muscle Infarction

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DNA: Deoxyribonucleic Acid

DTNB: 5,5′-Dithiobis-2-Nitrobenzoic Acid

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

EGTA: Ethylene Glycol-Bis(B-Aminoethyl Ether)-N,N,N′,N′-Tetraacetic Acid

ETC: Electron Transport Chain

FFA: Free Fatty Acids

GDM: Gestational diabetes mellitus

GLUT: Glucose Transporter

GPX: Glutathione Peroxidase.

GR: Glutathione Reductase.

GSH: Glutathione

GST: Glutathione S-Transferases

H2O2: Hydrogen Peroxide GSH: Glutathione

HDL: High-Density Lipoprotein

HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Yl]Ethanesulfonic Acid

HLA: Human Leukocyte Antigens

HMG-Coa Reductase: (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A Reductase

IL-1B: Interleukin-1-Beta

IL-6: Interleukin-6

INOS: Inducible Nitric Oxide Synthase

IR: Insulin Resistance

KEAP1_NRF2: Kelch-Like ECH-Associated Protein 1–Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2

LDL: Low-Density Lipoprotein

MAPKS: The Mitogen-Activated Protein Kinases

MDA: Malondialdehyde

MIM: Mitochondrial Import Complex

MMP: Mitochondrial Membrane Protentional

MOPS: (3-(N-Morpholino)Propanesulfonic Acid)

MPT: Mitochondrial Permeability Transition.

MRNA: Messenger RNA

MTT: 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-Yl]-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromide

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide

NF-Kb: Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells

NO: Nitric Oxide

OATP 2B1: The Organic Anion Transporting Polypeptide

PGs: Prostaglandins

PPAR-Γ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma

ROS: Reactive Oxygen Species

SDH: Succinate Dehydrogenase

SOCS-3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3

SOD: Superoxide Dismutase

T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus

TBA: Thiobarbituric Acid

TCA: Trichloroacetic Acid

TG:Triglyceride

TNF-A:Tumor Necrosis Factor Alpha

TRIS: Hydroxymethyl)Aminomethane

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1