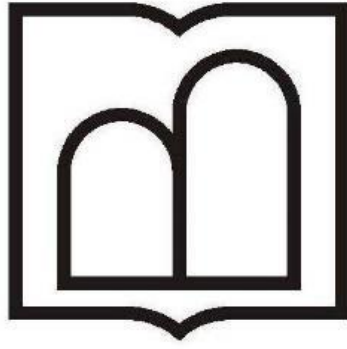


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه‌ی رساله‌ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

ارزیابی اثر ترکیب وانیلیک‌اسید 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

زلیخا وهاب‌زاده

شماره پایان نامه: د-۲۲۳

بهار ۱۴۰۳

## اهدای پایان نامه

این پایان نامه را ضمن تشکر و قدردانی و  
با کمال افتخار به پدر و مادر عزیزم که  
همواره پشتیبان و حامی من بوده اند و به  
خواهرهای دلسوزم که حضورشان برای  
من دلگرمی است تقدیم می کنم.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات و تلاشهای بی وقفه  
استاد محترم و دانشمند جناب آقای دکتر احمد  
سلیمی که در تمامی مراحل این مسیر از محضر  
پر فیض، راهنمایی‌های مدبرانه و تجربیات  
ارزنده ایشان بهره‌ها بردم، صمیمانه  
سپاسگزاری می‌نمایم و از خداوند متعال توفیق  
روز افزون ایشان را توأم با صحت و سعادت  
خواستارم.

و خالصانه از بزرگواری و حمایت‌های جناب  
آقای دکتر صالح خضری تشکر کرده، و از درگاه  
ایزدمنان دوام عزت و سلامت را خواستارم.

از دوستان عزیزم که سختی‌های این مسیر  
دشوار را با شیرینی حضورشان بر من آسان  
نمودند کمال تشکر را دارم.

## چکیده

### مقدمه

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 چربی‌دوست مانند آتورواستاتین می‌توانند به راحتی به سلول‌های  $\beta$  نفوذ کرده و به میتوکندری برسند و در نتیجه باعث اختلال عملکرد میتوکندری، استرس اکسیداتیو، کاهش ترشح انسولین می‌شوند. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که محصولات طبیعی می‌توانند از اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از دارو در بافت‌های مختلف محافظت کنند. برای این منظور، هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی قدرت محافظت میتوکندریایی وانیلیک‌اسید به عنوان ترکیب طبیعی در برابر اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از آتورواستاتین در میتوکندری‌های جدا شده از پانکراس بود.

### مواد و روش‌ها

با استفاده از لیز مکانیکی و سانتریفیوژ افتراقی، میتوکندری‌ها از پانکراس موش صحرایی جدا شده و مستقیماً با غلظت‌های سمی آتورواستاتین (۵۰۰ میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف وانیلیک‌اسید (۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به طور جداگانه مواجهه داده شدند. پارامترهای سمیت میتوکندری مانند فعالیت سوکسینات دهیدروژنازها (SDH)، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، تورم میتوکندری، ریزش پتانسیل غشای میتوکندری (MMP)، کاهش گلوتاتیون (GSH) و تولید مالون‌دی‌آلدئید در ساعت اندازه‌گیری شد.

### نتایج

یافته‌های ما نشان داد که آتورواستاتین مستقیماً سمیت میتوکندریایی را در غلظت ۵۰۰ میکرومولار و بالاتر در میتوکندری پانکراس ایجاد می‌کند. به جز MDA، آتورواستاتین باعث کاهش قابل توجهی در فعالیت SDH، تشکیل ROS، تورم میتوکندری، فروپاشی MMP و کاهش GSH در میتوکندری‌های جدا شده از پانکراس موش شد. در حالی که داده‌های ما نشان داد که ترکیب محافظ وانیلیک‌اسید در غلظت‌های پایین، اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از آتورواستاتین را با افزایش فعالیت SDH، بهبود فروپاشی MMP، تورم میتوکندری و GSH میتوکندری، و کاهش تشکیل ROS در میتوکندری‌های جدا شده از پانکراس بهبود می‌بخشند.

### بحث و نتیجه‌گیری

می‌توان نتیجه گرفت که وانیلیک‌اسید می‌تواند به طور مستقیم سمیت آتورواستاتین را در میتوکندری‌های جدا شده از پانکراس موش صحرایی معکوس کند که ممکن است برای محافظت در برابر اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از دیابت در سلول‌های  $\beta$  پانکراس مفید باشد.

### کلمات کلیدی

استاتین‌ها، وانیلیک‌اسید، آتورواستاتین، سمیت میتوکندریایی، داروی دیابت‌زا، آنتی‌اکسیدان‌ها، پیشگیری از دیابت، اثرات ضدپیش‌دیابتی

## فهرست

فصل اول	۱
۱-۱-مقدمه	۲
۲-۲-۱-انواع دیابت	۵
۳-۲-۱-دیابت تایپ ۲	۵
۴-۲-۱-دیابت تایپ ۱	۵
۵-۲-۱-عوامل دیابتوژنیک تایپ ۲	۶
۶-۲-۱-عوامل آنتی اکسیدانی و نقش آن‌ها در دیابت	۶
۳-۱-استاتین‌ها	۶
۱-۳-۱-آتورواستاتین	۷
۲-۳-۱-فارماکودینامیک آتورواستاتین	۷
۳-۳-۱-فارماکوکینتیک آتورواستاتین	۸
۴-۱-نقش میتوکندری در آزادسازی انسولین از سلول‌های بتای پانکراس	۸
۵-۱-آسیب میتوکندری ناشی از آتورواستاتین و ایجاد دیابت	۹
۶-۱-عوامل آنتی اکسیدانی و نقش آن‌ها در پیشگیری از سمیت میتوکندریایی در دیابت	۱۰
۷-۱-ترکیبات شیمیایی گیاهی فنولی	۱۱
۸-۱-وانیلیک اسید	۱۳
۱-۸-۱-معرفی وانیلیک اسید	۱۳
۲-۸-۱-منابع طبیعی وانیلیک اسید	۱۴
۳-۸-۱-ویژگی‌های وانیلیک اسید	۱۵
۴-۸-۱-اثرات فارماکولوژیک وانیلیک اسید	۱۵
۵-۸-۱-مکانیسم آنتی اکسیدانی وانیلیک اسید	۱۶
۶-۸-۱-اثر ضد التهابی وانیلیک اسید	۱۷
۷-۸-۱-فارماکوکینتیک وانیلیک اسید	۱۸
۹-۱-بررسی متون	۱۹
۱۰-۱-اهداف و فرضیات	۲۰
۱-۱۰-۱-هدف کلی طرح	۲۰
۲-۱۰-۱-اهداف اختصاصی	۲۰

۲۱.....	۱-۱۰-۳-هدف کاربردی
۲۱.....	۱-۱۰-۴-فرضیات پژوهش
۲۲.....	فصل دوم مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها
۲۳.....	۲-۱-نوع مطالعه
۲۳.....	۲-۲-محل انجام مطالعه
۲۳.....	۲-۳-نگهداری از حیوانات مورد مطالعه وملاحظات اخلاقی
۲۳.....	۲-۴-کد اخلاق
۲۵.....	۲-۵-فلوچارت
۲۶.....	۲-۶-مواد و دستگاه‌های مورد استفاده
۲۶.....	۲-۶-۱-مواد شیمیایی
۲۸.....	۲-۶-۲-تجهیزات و وسایل مورد مطالعه
۴۰.....	۲-۷-بافر‌ها و شناساگرها و ترکیبات آنها
۴۰.....	۲-۷-۱-بافر ایزولاسیون
۴۱.....	۲-۷-۲-بافر MTT
۴۲.....	۲-۷-۳-بافر MMP
۴۳.....	۲-۷-۴-محلول کوماسی بلو
۴۳.....	۲-۷-۵-بافر فسفات
۴۴.....	۲-۷-۶-بافر تورم
۴۵.....	۲-۷-۷-بافر مورد استفاده در سنجش پراکسیداسیون لیپیدی
۴۵.....	۲-۷-۸-بافرهای مورد استفاده در سنجش گلوکاتایون احیاء
۴۶.....	۲-۸-آماده سازی میتوکندری از پانکراس موش صحرائی نر
۴۹.....	۲-۹-تست‌ها
۴۹.....	۲-۹-۱-آزمایش برادفورد جهت تعیین مقدار پروتئین
۵۰.....	۲-۹-۲-سنجش فعالیت سوکسینات‌دهیدروژناز میتوکندری
۵۱.....	۲-۹-۳-سنجش گونه‌های فعال اکسیژن میتوکندری
۵۱.....	۲-۹-۴-سنجش پراکسیداسیون لیپیدی
۵۲.....	۲-۹-۵-سنجش میزان سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری
۵۳.....	۲-۹-۶-سنجش میزان تورم میتوکندریایی

۵۴.....	۲-۹-۷-سنجش میزان گلوتاتیون-احیاء
۵۶.....	فصل سوم نتایج
۵۷.....	۳-۱-اندازه‌گیری فعالیت سوکسینات دهیدروژناز
۵۹.....	۳-۲-نتایج مرتبط با تشکیل رادیکال فعال اکسیژن
۶۰.....	۳-۳-نتایج مرتبط با میزان تورم میتوکندریایی
۶۱.....	۳-۴-نتایج مربوط به سقوط پتانسیل غشای میتوکندری
۶۳.....	۳-۵-تعیین میزان پراکسیداسیون لیپید
۶۵.....	۳-۶-بررسی میزان تغییرات گلوتاتیون احیاء (GSH)
۶۶.....	فصل چهارم
۶۷.....	۴-۱-بحث
۷۴.....	۴-۲-نتیجه‌گیری
۷۵.....	۴-۳-محدودیت‌ها
۷۵.....	۴-۴-پیشنهادات
۷۶.....	فهرست منابع



## فهرست اشکال

- شکل ۱-۱- ساختار شیمیایی اسیدهای فنولیک رایج..... ۱۲
- شکل ۱-۲- ساختار وانیلین و وانیلیک اسید..... ۱۴
- شکل ۱-۳- متابولیسم وانیلیک اسید..... ۱۸
- شکل ۱-۲- موش صحرایی نژاد ویستار..... ۲۴
- شکل ۲-۲- دستگاه سانتریفیوژ..... ۳۰
- شکل ۲-۳- دستگاه فلوسایتومتری..... ۳۱
- شکل ۲-۴- دستگاه یخساز..... ۳۱
- شکل ۲-۵- ترازوی دیجیتالی..... ۳۲
- شکل ۲-۶- دستگاه مولد آب مقطر..... ۳۲
- شکل ۲-۷- دستگاه Lab Dancer..... ۳۳
- شکل ۲-۸- دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک..... ۳۴
- شکل ۲-۹- دستگاه ترموبلاک..... ۳۴
- شکل ۲-۱۰- دستگاه pH متر..... ۳۵
- شکل ۲-۱۱- هموژنایزر..... ۳۵
- شکل ۲-۱۲- سمپلر..... ۳۶
- شکل ۲-۱۳- انکوباتور..... ۳۷
- شکل ۲-۱۴- هیتر استیرر..... ۳۸
- شکل ۲-۱۵- دستگاه الیزا..... ۳۸
- شکل ۲-۱۶- پلیت کشت سلولی..... ۳۹
- شکل ۲-۱۷- وانیلیک اسید..... ۴۰
- شکل ۲-۱۸- مراحل بیهوش کردن و جداسازی پانکراس..... ۴۸

## فهرست جداول

- جدول ۱-۲- مواد شیمیایی به کار رفته..... ۲۶
- جدول ۲-۲- تجهیزات و وسایل مورد استفاده ..... ۲۸
- جدول ۳-۲- اجزای بافر ایزولاسیون..... ۴۰
- جدول ۴-۲- اجزای بافر MTT ..... ۴۱
- جدول ۵-۲- اجزای بافر MMP ..... ۴۲
- جدول ۶-۲- اجزای محلول کوماسی بلو..... ۴۳
- جدول ۷-۲- اجزای بافر فسفات..... ۴۴
- جدول ۸-۲- اجزای بافر تورم..... ۴۴
- جدول ۹-۲- اجزای بافر مورد استفاده در پراکسیداسیون لیپیدی..... ۴۵
- جدول ۱۰-۲- اجزای بافر محلول واکنش..... ۴۶

## فهرست نمودار

- نمودار ۱-۳- اثر آتورواستاتین بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز و اثر محافظت کننده ی ترکیب وانیلیک اسید..... ۵۸
- نمودار ۲-۳- اثر آتورواستاتین بر تشکیل ROS و اثر محافظتی وانیلیک اسید..... ۶۰
- نمودار ۳-۳- تاثیر آتورواستاتین بر تورم میتوکندریایی و اثر محافظتی وانیلیک اسید..... ۶۱
- نمودار ۴-۳- اثر داروی آتورواستاتین بر MMP و اثر حفاظتی ترکیب وانیلیک اسید..... ۶۳
- نمودار ۵-۳- القای پراکسیداسیون لیپیدها در میتوکندری های پانکراس پس از انکوباسیون با آتورواستاتین و اثر محافظتی وانیلیک اسید..... ۶۴
- نمودار ۶-۳- تغییرات گلوکوتایون احیاء بر اثر مواجهه با آتورواستاتین و اثر حفاظتی ترکیب وانیلیک اسید..... ۶۵

**AGE:** advanced glycation end product

**ATP:** Adenosine Triphosphate

**AUC:** Area Under the Curve

**cAMP:** Cyclic adenosine monophosphate

**CAT:** Catalase

**Cmax:** Maximum concentration

**COX2:** cyclooxygenase 2

**CVD:** Cardiovascular disease

**DCF-DA:** 2-7-Dichlorofluorescin Diacetate

**DCFH-DA:** 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

**DM:** Diabetes mellitus

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**DPPH:** Diphenyl picrylhydrazyl

**DTNB:** Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

**DW:** Deionized water

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic

**EGTA:** Ethylene Glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)

**ELISA:** The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**ETC:** Electron transport chain

**FAD:** Coenzyme Flavin Adenine Dinucleotide

**GDM:** Gestational diabetes mellitus

**GSH:** Glutathione

**GTP:** guanosine tri-phosphatase

**HDL:** high-density lipoprotein

**HEPES:** N-(2-Hydroxyethyl) Piperazine-N 0-(2-ethanesulfonic acid)

**HMG-COA:** 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA

**IL-6:** Interleukin 6

**INS:** Insulin Secretion

**LDL: Low-density lipoprotein**

**LPS: Lipopolysaccharide**

**MDA: Malondialdehyde**

**MMP: Mitochondria Membrane Potential**

**MOPS: 3-Morpholinopropane-1-Sulfonic**

**MPT: Mitochondrial Membrane Permeability Transition**

**mtDNA : Mitochondrial DNA**

**MTT: 3-(4,5 -dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide**

**NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide**

**NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells**

**NODM: new-onset diabetes mellitus**

**OATP: Organic Anion Transporting Polypeptide**

**OMM: Outer Mitochondrial Membrane**

**PI3Ks: Phosphoinositide 3-Kinases**

**ROS: Reactive Oxygen Species**

**SDH: Succinate Dehydrogenase**

**T1DM: Type 1 diabetes mellitus**

**T2DM: Type 2 diabetes mellitus**

**TBA: Thiobarbituric Acid**

**TCA: Trichloroacetic Acid**

**TNF $\alpha$ : Tumour Necrosis Factor  $\alpha$**

**VA: Vanillic Acid**

**VLDL: Very Low Density Lipoprotein**