بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه‌ی دکتری حرفه‌ای داروسازی

عنوان:

ارزیابی اثر ترکیب سیناپیک اسید 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:
پریا رجبی

بهار ۱۴۰۳
شماره پایان نامه : د–۲۲۴

تقدیم

این پایان‌نامه تقدیم می‌شود به:

پدر و مادر گرانقدرم.

تشکر و قدردانی

سپاس خدای بزرگ را که مرا یاری رساند تا بتوانم این مقطع تحصیلی را به پایان رسانده و گامی در راستای اعتلای علم بردارم. از استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر احمد سلیمی که وجودشان همیشه قوتی برای انجام کارهایم بوده است و بدون شک انجام این پایان نامه بدون کمک و راهنمایی‌های ارزنده آنها امکان پذیر نبوده است، کمال تقدیر و تشکر را دارم. از جناب آقای دکتر صالح خضری که زحمت مشاوره این پایان‌نامه را داشتند و کمک‌های بی‌دریغشان همواره راهنمای راه بوده و هست نهایت سپاس‌گزاری را دارم.

از خانواده عزیزم، پدر، مادر و خواهران عزیزم که با وجود پرمهرشان همچون کوهی استوار همواره در تمامی مراحل زندگی و تحصیلی حامی و پشتیبان من بوده‌اند، سپاس‌گزاری می‌نمایم.

و در نهایت از تمامی کسانی که مرا در تدوین این پایان‌نامه یاری کرده‌اند، نهایت تقدیر و 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 چربی دوست مانند آتورواستاتین می‌توانند با سهولت بیشتری به سلول‌های بتا 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 مطالعه حاضر بررسی قدرت محافظت میتوکندریایی سیناپیک اسید به عنوان ترکیبات طبیعی در برابر اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از آتورواستاتین در میتوکندری‌های جدا شده پانکراس است.

مواد و روش‌ها: با استفاده از لیز مکانیکی و سانتریفیوژ افتراقی، میتوکندری‌ها از پانکراس موش صحرایی جدا شده و مستقیماً با غلظت سمی آتورواستاتین (۵۰۰ میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف سیناپیک‌اسید (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به طور جداگانه مواجهه داده شدند. همچنین میتوکندری‌های ایزوله شده از پانکراس موش صحرایی به صورت جداگانه با غلظت سمی داروی آتورواستاتین به تنهایی مواجهه داده شدند. پارامترهای سمیت میتوکندری مانند فعالیت سوکسینات دهیدروژناز(SDH)، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن(ROS)، تورم میتوکندری، سقوط پتانسیل غشای میتوکندری(MMP)، کاهش گلوتاتیون (GSH) و تولید مالون‌دی‌آلدئید(MDA) در مدت زمان یک ساعت در میتوکندری‌های ایزوله شده از پانکراس اندازه‌گیری شد.

نتایج: یافته‌ها 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 سیناپیک‌اسید در غلظت‌های پایین (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار)، اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از آتورواستاتین را با افزایش فعالیت SDH، بهبود فروپاشیMMP، تورم میتوکندری و GSH میتوکندری و کاهش تشکیل ROS در میتوکندری‌های جدا شده از پانکراس بهبود می‌بخشند.

بحث و نتیجه‌گیری: می‌توانیم نتیجه بگیریم که سیناپیک‌اسید 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 بتا پانکراس مفید باشد.

کلید واژه‌ها: استاتین‌ها داروی دیابت زا؛ آنتی اکسیدان‌ها؛ پیشگیری از دیابت؛ اثرات ضد پیش دیابتی

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱-مقدمه و بیان مسئله ۲

۱-۲-دیابت ۳

۱-۲-۱-انواع دیابت ۳

۱-۲-۲- دیابت نوع۲ ..... ۴

۱-۲-۳-عوامل ایجاد کننده دیابت نوع۲ ..... ۵

۱-۳-استاتین‌ها ۵

۱-۳-۱-آتورواستاتین ۶

۱-۴-نقش میتوکندری در آزادسازی انسولین از سلول‌های بتای پانکراس ۷

۱-۵-آسیب میتوکندری ناشی از آتورواستاتین و ایجاد دیابت ۸

۱-۶-عوامل آنتی اکسیدانی و نقش آن‌ها در پیشگیری از سمیت میتوکندری ۱۰

۱-۷-ترکیبات طبیعی ۱۰

۱-۷-۱- ترکیبات فنولیک ۱۱

۱-۷-۲-ویژگی آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی ۱۳

۱-۷-۳- انواع ترکیبات فنولیک ۱۳

۱-۷-۴-هیدروکسینامیک‌اسید ۱۴

۱-۷-۵-سیناپیک‌اسید ۱۴

۱-۷-۶-خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سیناپیک اسید ۱۶

۱-۷-۷-منابع طبیعی سیناپیک اسید ۱۶

۱-۷-۸-فارماکوکینتیک سیناپیک‌اسید ۱۷

۱-۸-تاثیرات دارویی و عملکردی سیناپیک اسید ۱۹

۱-۸-۱-فعالیت آنتی اکسیدانی سیناپیک‌اسید ۲۰
۱-۸-۱-۱-توانایی مهار ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل ($DPPH^{\cdot}$) ۲۰
۱-۸-۱-۲-توانایی مهار سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) ۲۰
۱-۸-۱-۳-توانایی مهار هیدروکسیل (HO) ۲۱
۱-۸-۱-۴-توانایی مهار پرهیدروکسیل ($^{\cdot}OOH$) ۲۱
۱-۸-۱-۵-توانایی مهار پراکسی‌نیتریت ($ONOO^-$) ۲۱
۱-۸-۲- توانایی مهار لیپید پراکسیداسیون ۲۱
۱-۸-۳-اثرات ضدالتهابی سیناپیک‌اسید ۲۲
۱-۸-۴-اثرات ضددیابتی سیناپیک‌اسید ۲۲
۱-۹-بررسی متون ۲۳
۱-۱۰-اهداف و فرضیات ۲۵
۱-۱۰-۱-هدف کلی ۲۵
۱-۱۰-۲-اهداف اختصاصی ۲۵
۱-۱۰-۳-هدف کاربردی ۲۶
۱-۱۰-۴-فرضیات تحقیق ۲۶
فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها ۲۸
۲-۱-نوع مطالعه ۲۹
۲-۲-مکان انجام مطالعه ۲۹
۲-۳-حیوانات، مواد شیمیایی و وسایل مورد استفاده ۲۹
۲-۳-۱-حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه ۲۹
۲-۳-۲-مواد شیمیایی ۳۰
۲-۳-۳-تجهیزات و وسایل آزمایشگاهی ۳۱
۲-۴-بافرها، شناساگرها و ترکیبات آن‌ها ۴۱
۲-۴-۱-بافر فسفات ۴۱

۲-۴-۲-بافر ایزولاسیون ۴۲
۲-۴-۳-بافر تورم ۴۲
۲-۴-۴-بافر MTT ۴۳
۲-۴-۵-محلول کوماسی‌بلو ۴۳
۲-۴-۶-بافر MMP ۴۴
۲-۴-۷-بافر تنفسی ۴۵
۲-۴-۸- بافرهای مورد نیاز جهت ارزیابی پراکسیداسیون لیپید ۴۵
۲-۴-۸-۱-نحوه ساخت محلول ۲۰ درصد وزنی/حجمی تری‌کلریک‌اسید ۴۶
۲-۴-۸-۲-نحوه ساخت محلول ۰.۵ درصد وزنی/حجمی تیوباربیتوریک اسید ۴۶
۲-۴-۹-بافرهای مورد استفاده در سنجش گلوتاتیون احیا ۴۶
۲-۴-۹-۱-بافر Tris-HCl ۴۶
۲-۴-۹-۲-محلول واکنش گلوتاتیون احیا (GSH) ۴۶
۲-۵-روش انجام آزمایشات ۴۷
۲-۵-۱-آماده سازی میتوکندری از پانکراس موش صحرایی نر ۴۷
۲-۶-تست‌ها: ۴۹
۲-۶-۱-سنجش فعالیت سوکسینات‌دهیدروژناز ۴۹
۲-۶-۲-سنجش تورم میتوکندریایی ۵۰
۲-۶-۳-سنجش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن ۵۱
۲-۶-۴-سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۵۱
۲-۶-۵-سنجش پراکسیداسیون لیپیدی ۵۲
۲-۶-۶-سنجش میزان گلوتاتیون احیا ۵۳
۲-۶-۷-تحلیل آماری ۵۳
فصل سوم: نتایج ۵۴
۳-۱-اندازه گیری فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۵۵

۳-۲-نتایج مرتبط با تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن ۵۷
۳-۳-نتایج مرتبط با میزان تورم میتوکندریایی ۵۸
۳-۴-تعیین فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندری..... ۶۰
۳-۵-تعیین میزان لیپید پراکسیداسیون..... ۶۲
۳-۶-بررسی میزان تغییرات گلوتاتیون احیاء ۶۴
فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۶۶
۴-۱-بحث..... ۶۷
۴-۲-نتیجه‌گیری..... ۷۳
۴-۳-محدودیت‌ها ۷۴
۴-۴-پیشنهادات..... ۷۴
منابع..... ۷۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱-مسیر بیوسنتر ترکیب سیناپیک اسید ۱۵

شکل۱-۲-منابع طبیعی سیناپیک اسید ۱۷

شکل۱-۳-تصویر شماتیک از تاثیرات سیناپیک اسید ۱۹

شکل۲-۱-ترازوی دقیق آزمایشگاهی ۳۳

شکل۲-۲-دستگاه مولد آب مقطر ۳۳

شکل۲-۳-سانتریفیوژ یخچال‌دار ۳۴

شکل۲-۴-دستگاه انکوباتور ۳۵

شکل۲-۵-دستگاه فلوسایتومتری ۳۶

شکل۲-۶-ورتکس ۳۶

شکل۲-۷-دستگاه pH متر ۳۷

شکل۲-۸-دستگاه هموژنایزر ۳۸

شکل۲-۹-دستگاه هیتر استیرر ۳۸

شکل۲-۱۰-ست سمپلر ۳۹

شکل۲-۱۱-دستگاه ELISA Reader ۳۹

شکل۲-۱۲-دستگاه یخ ساز ۴۰

شکل۲-۱۳-دستگاه هیتر بلاک ۴۰

شکل۲-۱۴-بخشی از عملیات بی‌حسی و بیهوشی موش، جداسازی پانکراس و آماده‌سازی میتوکندری ۴۹

شکل۳-۱-اثر آتورواستاتین بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۵۶

شکل۳-۲- اثر محافظت کننده ترکیب سیناپیک اسید بر روی سوکسینات‌دهیدروژناز ۵۶

شکل۳-۳-اثر آتورواستاتین بر تشکیل ROS و اثر محافظت کنندگی ترکیب سیناپیک اسید ۵۸

شکل۳-۴-تاثیر آتورواستاتین بر تورم میتوکندریایی و اثر محافظتی ترکیب سیناپیک اسید ۵۹

شکل۳-۵-اثر آتورواستاتین بر MMP و اثر محافظتی ترکیب سیناپیک اسید ۶۱
شکل۳-۶- القای پراکسیداسیون لیپیدها در میتوکندری با آتورواستاتین و اثر محافظتی سیناپیک اسید ۶۳
شکل۳-۷-تغییرات گلوتاتیون احیاء در اثر مواجهه با آتورواستاتین و اثر محافظتی ترکیب سیناپیک اسید ۶۵

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱- مواد شیمیایی به کار رفته در روند پایان نامه ۳۰

جدول۲-۲- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌های مورد استفاده ۳۱

جدول۲-۳-اجزای بافر فسفات ۴۱

جدول۲-۴-اجزای بافر ایزولاسیون ۴۲

جدول۲-۵-اجزای بافر تورم ۴۲

جدول۲-۶-اجزای بافر MTT ۴۳

جدول۲-۷-اجزای محلول کوماسی بلو ۴۴

جدول۲-۸-اجزای بافر MMP ۴۴

جدول۲-۹-اجزای بافر ROS ۴۵

جدول۲-۱۰-اجزای محلول‌های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها ۴۵

جدول۲-۱۱-اجزای بافر Tris-HCl ۴۶

جدول۲-۱۲-اجزای محلول واکنش گلوتاتیون احیاء ۴۶

فهرست اختصارات و اصطلاحات

AIF: Apoptosis-Inducing Factor

ATP: Adenosine triphosphate

COX-2: Cyclooxygenase-2

CoQ10: Coenzyme Q-10

DCF: 2′7′-Dichlorofluorescein

DCFH: 2,7-Dichlorodihydrofluorescein

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DTNB: 5,5′-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ETC: Electron Transport Chain

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

FAD: Flavin Adenine Dinucleotide

GDM: Gestational Diabetes Mellitus

GLUT: Glucose Transporter

GPX: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione

GSIS: Glucose-induced insulin secretion

HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

H_2DCF: 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein

DCF: Dichlorofluorescein

HMG-CoA reductase: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase

IGVs: Insulin Granule Visicoles

IL-1β: Interleukin-1-Beta

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase

LDL: Low-Density Lipoprotein

MMP: Mitochondrial Membrane Protentional

MDA: Malondialdehyde

MIM: Mitochondrial Import Complex

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

MOPS: (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)

MPT: Mitochondrial Permeability Transition

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF-κB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

RNS: Reactive nitrogen species

ROS: Reactive Oxygen Species

SA: Sinapic acid

SDH: Succinate dehydrogenase

SOD: Superoxide dismutase

TBA: Thiobarbituric Acid

TCA: Trichloroacetic Acid

T2DM: Type 2 diabetes mellitus

TNF-α: Tumour Necrosis Factor alpha