

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و  
خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجهی دکتری حرفه‌ای داروسازی

عنوان:

اثر chrysin در مهار سمیت ایجاد شده توسط فسفید آلومینیم در میتوکندریهای ایزوله شده از  
عضله قلب موش صحرائی

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارنده:

توحید سبزعلی پور زرج آباد

شماره پایان نامه:

۹۸/۱۰ ۲۱-د

دی ۱۳۹۸

با احترام تقدیم به :

روح پاک پدر و مادرم که عالمانه به من آموختند تا چگونه در عرصه زندگی،  
ایستادگی را تجربه نمایم

و دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایشان همه رنج بود و  
وجودشان برایم همه مهر

و تقدیم به

همسر عزیزم، دلیل بودنم، که در تکمیل تحصیل مشوقم بود.

با تقدیر و تشکر شایسته از:

استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر احمد سلیمی که با نکته‌های دلاویز و گفته‌های بلند، صحیفه‌های سخن را علم پرور نمود و همواره راهنما و راه‌گشای نگارنده در اتمام واکمال پایان نامه بوده است.

معلمان مقامت ز عرش بالاتر باد  
همیشه توسن اندیشه ات مظفر باد

## چکیده

### مقدمه:

جدای از اثرات ضدسرطان ، آنتی اکسیدان ، ضدالتهاب و مهار آنزیم مهارکننده آروماتاز ، کرایسین در حمایت از اختلالات قلبی عروقی نقش دارد. عوارض قلبی و عروقی عامل اصلی مرگ ناشی از فسفیدآلومینیوم (AIP) است که با استرس اکسیداتیو و آسیب های میتوکندری مرتبط است. به این منظور، اثر کرایسین به عنوان یک ماده محافظ کننده از میتوکندری و آسیب های ناشی از رادیکال های فعال در برابر سمیت ناشی از فسفیدآلومینیوم در میتوکندری های جدا شده بررسی شده است.

### مواد و روش ها:

میتوکندری بدست آمده از بطن قلب موش با استفاده از روش های بیوشیمیایی و فلوسیتومتری بررسی و پارامترهای سمیت میتوکندری مانند فعالیت میتوکندری NADH / succinate دهیدروژناز (میزان فعالیت میتوکندری)، تورم میتوکندری، تشکیل گونه های اکسیژن واکنش پذیر، پتانسیل غشای میتوکندری و پراکسیداسیون لیپیدها در میتوکندری های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت.

### بحث و نتیجه گیری

یافته های ما در میتوکندری های جدا شده نشان داد که کرایسین (حداقل ۱۰ میکرومولار) به طور معنی داری ( $P < 0.001$ ) باعث کاهش سمیت میتوکندری هایی که به صورت حاد با فسفیدآلومینیوم تماس داشتند، شده است. این یافته ها نشان داد که کرایسین به عنوان یک ماده محافظ آنتی اکسیدانی و اثر محافظتی بر میتوکندری ها داشته و اثرات سمی فسفیدآلومینیوم را کاهش می دهد. با توجه به اثرات بسیار خوب کرایسین در میتوکندری ها، این ترکیب می تواند یک عامل امیدوار کننده در درمان مسمومیت فسفیدآلومینیوم باشد.

### کلمات کلیدی:

فسفیدآلومینیوم، کرایسین، سمیت قلبی، پراکسیداسیون لیپید، تورم میتوکندری، گونه های فعال اکسیژن، سقوط پتانسیل غشا میتوکندری

## فهرست مطالب

فصل ۱: مقدمه	۱
۱-۱- فسفیدآلومینیوم	۲
۲-۱- کاربرد فسفیدآلومینیوم	۳
۳-۱- مسمومیت با فسفیدآلومینیوم	۴
۴-۱- آمار مسمومیت با فسفیدآلومینیوم	۵
۵-۱- نحوه مسمومیت با فسفیدآلومینیوم	۷
۶-۱- اثرات فسفیدآلومینیوم بر بدن انسان	۷
۱-۶-۱- توکسوکینتیک	۸
۲-۶-۱- علائم ناشی از مسمومیت فسفیدآلومینیوم در اندام‌های مختلف	۹
۳-۶-۱- سمیت قلبی	۱۱
۴-۶-۱- سمیت سیستم گوارشی	۱۷
۵-۶-۱- سمیت کبدی	۱۸
۶-۶-۱- سمیت سیستم تنفسی	۱۹
۷-۶-۱- سمیت عصبی	۲۰
۸-۶-۱- ناهنجاری‌های الکترولیت و متابولیسم بدن	۲۰
۹-۶-۱- سایر سمیت‌ها	۲۱
۷-۱- مکانیسم مسمومیت فسفیدآلومینیوم	۲۲
۱-۷-۱- استرس اکسیداتیو	۲۲
۱-۱-۷-۱- سیستم‌های سم زدایی	۲۴
۲-۱-۷-۱- آسیب DNA	۲۴
۲-۷-۱- میتوکندری	۲۵

- ۱-۲-۷-۱- میتوکندری و گونه‌های فعال اکسیژن ..... ۲۵
- ۱-۲-۷-۲- میتوکندری و مرگ سلولی ..... ۲۷
- ۱-۲-۷-۳- اثرات فسفین بر میتوکندری ..... ۲۹
- ۱-۸- تظاهرات بالینی ..... ۳۳
- ۱-۸-۱- مسمومیت حاد ناشی از مصرف خوراکی ..... ۳۳
- ۱-۸-۲- مسمومیت حاد ناشی از استنشاق ..... ۳۳
- ۱-۸-۳- مسمومیت مزمن ..... ۳۳
- ۱-۸-۴- یافته‌های آزمایشگاهی ..... ۳۴
- ۱-۸-۵- آزمایش نمونه بالینی برای فسفین ..... ۳۴
- ۱-۸-۶- روش‌های روتین تشخیص و تعیین کمیت ..... ۳۵
- ۱-۸-۷- تشخیص افتراقی ..... ۳۶
- ۱-۹- درمان مسمومیت حاد ..... ۳۶
- ۱-۹-۱- دستگاه گوارش ..... ۳۷
- ۱-۹-۲- پشתיبانی قلبی و عروقی ..... ۳۹
- ۱-۹-۳- پشתיبانی تنفسی ..... ۳۹
- ۱-۹-۴- درمان‌های دیگر ..... ۴۰
- ۱-۱۰- اثر ترکیبات طبیعی بر سمیت ها و حفاظت از بدن در برابر مسمومیت ..... ۴۲
- ۱-۱۱- کرایسین به عنوان یک مکمل ..... ۴۳
- ۱-۱۱-۲- نحوه اثر کرایسین در بدن: ..... ۴۴
- ۱-۱۱-۳- استفاده و اثربخشی ..... ۴۴
- ۱-۱۱-۴- دوز بندی و اشکال دارویی کرایسین ..... ۴۵
- ۱-۱۲- مطالعات انجام شده بر روی کرایسین و اثرات آن ..... ۴۵
- ۱-۱۳- هدف و انگیزه پروژه ..... ۴۹

۱۴-۱- گردش کار پروژه.....	۵۱
فصل ۲: مواد و روش ها.....	۵۲
۱-۲- مواد شیمیایی.....	۵۳
۲-۲- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه ها.....	۵۴
۳-۲- محتویات و طرز تهیه بافر ها و محلول ها.....	۵۵
۱-۳-۲- بافر ایزوله کردن میتوکندری.....	۵۵
۲-۳-۲- تعیین غلظت پروتئین میتوکندری.....	۵۵
۳-۳-۲- بافر سنجش تورم میتوکندری.....	۵۶
۴-۳-۲- بافر سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری.....	۵۶
۵-۳-۲- بافر تعیین پراکسیداسیون لیپیدها.....	۵۷
۶-۳-۲- بافر تعیین تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (بافر تنفس).....	۵۷
۷-۳-۲- بافر تعیین میزان سقوط پتانسیل غشا.....	۵۸
۴-۲- آزمایش‌ها.....	۵۸
۱-۴-۲- مراحل ایزوله کردن میتوکندری از سلول‌های قلبی.....	۶۰
۱-۱-۴-۲- حیوانات آزمایشگاهی و نگهداری از آن‌ها.....	۶۰
۲-۱-۴-۲- مرحله خارج سازی قلب موش صحرایی.....	۶۰
۳-۱-۴-۲- مرحله ایزوله کردن میتوکندری.....	۶۰
۴-۱-۴-۲- آزمایش برادفورد جهت تعیین مقدار پروتئین میتوکندری.....	۶۱
۲-۴-۲- سنجش میزان عملکرد میتوکندری.....	۶۱
۳-۴-۲- آزمایش تورم میتوکندری.....	۶۳
۴-۴-۲- تعیین میزان گونه‌های فعال اکسیژن.....	۶۴
۵-۴-۲- سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری.....	۶۵
۶-۴-۲- سنجش پراکسیداسیون لیپید.....	۶۶



۶۷	۲-۴-۷- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری
۶۹	فصل ۳: نتایج
۷۰	۳-۱- سنجش فعالیت میتوکندری‌های ایزوله شده
۷۲	۳-۲- تورم میتوکندری
۷۴	۳-۳- تغییرات میزان گونه‌های فعال اکسیژن
۷۶	۳-۴- سقوط پتانسیل غشای میتوکندری
۷۷	۳-۵- میزان پراکسیداسیون لیپیدها
۷۹	فصل ۴: بحث و نتیجه‌گیری
۸۰	۴-۱- نتیجه‌گیری
۸۳	منابع

**8-OH-dGuo:** 8-Oxo-2'-deoxyguanosine

**AChE:** Acetylcholine Esterase

**ADR:** Adverse Drug Reaction

**ADR:** Adverse Drug Reaction

**AIDS:** Acquired Immune Deficiency Syndrome

**Akt:** Serine/threonine-specific protein kinase

**ALP:** Aluminum Phosphide

**AMPK:** 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase

**ANOVA:** Analysis of variance

**ATP:** Adenosine Triphosphate

**BAD:** Bcl-2-associated death promoter

**BAX:** Bcl-2-associated X protein

**BCL-2:** A family of Apoptotic Proteins

**CNS:** Central Nervous System

**CVP:** Central venous pressure

**DCFH-DA:** Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate

**DCPIP:** 2,6-Dichlorophenolindophenol

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**DNA:** Deoxyribonucleic acid

**DUB:** Dysfunctional uterine bleeding

**ECG:** Electrocardiogram

**ECG:** Electrocardiography

**ECM:** Extracellular Matrix

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**EGTA:** (ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid), also known as egtazic acid

**G6PD:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase

**GP:** Glutathione Peroxidase

**GSH:** Glutathione

**HDL:** High-density lipoprotein

**HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ) is a zwitterionic organic chemical buffering agent and is categorized as a "Good" buffer capacity

**HIV:** Human immunodeficiency virus

**HTN:** Hypertension

**IABP:** Intra-aortic balloon pump

**IMM:** Inner Mitochondrial Membrane

**LDL:** Low-density lipoprotein

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinases

**MDA:** 3,4-methylenedioxyamphetamine

**MI:** Myocardial infarction

**MMP:** Matrix metalloproteinases

**MMP:** Mitochondrial Membrane Protentional

**MPT:** Mitochondrial Permeability Transition **MPTP:** Mitochondrial permeability transition pore **mtDNA :** Mitochondrial DNA

**MPTP:** (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

**MTT:** Measures the reduction of a Tetrazolium component

**NAD<sup>+</sup> :** Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form)

**NADH:** Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)

**NADPH:** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

**NF- $\kappa$ B:** Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer

**OMM:** Outer Mitochondrial Membrane **PhosphocreatinePcr :** inorganic phosphate **Pi:**

**P-53:** p53, also known as TP53 or tumor protein is a gene that codes for a protein that regulates the cell cycle and hence functions as a tumor suppression.

**PAWP:** Pulmonary artery wedge pressure

**PDGF:** Platelet-derived growth factor

**PDK1:** 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1

**PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase inhibitor

**PKB:** Protein kinase B

**PTP:** Post-transfusion purpura

**Rh123:** Rhodamine 123

**ROS:** Reactive oxygen species

**SDH:** Succinate dehydrogenase

**SOD:** Superoxide Dismutase

**TBARS:** Thiobarbituric acid reactive substances

**TCA:** Trichloroacetic acid

**TMRE:** Tetramethylrhodamine ethyl ester

**TMRM:** Tetramethylrhodamine methyl ester

**TNF $\alpha$ :** Tumor necrosis factor alpha

**U937:** A type of Human monocytic cell line

**XIAP:** X-linked inhibitor of apoptosis protein

**$\Delta\psi_m$ :** Intrinsic Mitochondrial Membrane Potential

## فهرست جداول

- جدول ۱-۲ لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه ..... ۵۳
- جدول ۲-۲ وسایل آزمایشگاهی و دستگاه ها استفاده شده ..... ۵۴
- جدول ۳-۲ بافر ایزوله کردن میتوکندری ..... ۵۵
- جدول ۴-۲ محلول کوماسی بلو ..... ۵۵
- جدول ۵-۲ بافر استاندارد برادفورد ..... ۵۵
- جدول ۶-۲ بافر سنجش تورم میتوکندری ..... ۵۶
- جدول ۷-۲ بافر آزمایش تعیین فعالیت میتوکندری ..... ۵۶
- جدول ۸-۲ محلول های مصرفی ..... ۵۷
- جدول ۹-۲ بافر تعیین گونه های فعال اکسیژن ..... ۵۷
- جدول ۱۰-۲ بافر تعیین میزان سقوط پتانسیل غشا ..... ۵۸
- جدول ۱۱-۲ غلظت های استفاده شده در چاهک های مختلف پلیت ..... ۶۲

## فهرست شکل‌ها و نمودارها

- شکل ۱-۱ بسته بندی و قرص فسفیدآلومینیوم موجود در بازار ..... ۲
- شکل ۱-۲ ساختار کریستالی Zinblende ..... ۳
- شکل ۱-۳ استفاده از فسفیدآلومینیوم در جلوگیری از آفت غلات ..... ۴
- شکل ۱-۴ ساختار شیمیایی فسفین و آتشگیری خود به خودی آن ..... ۶
- شکل ۱-۵ هینز بادی در داخل یک گلوبول قرمز ..... ۹
- شکل ۱-۶ تغییرات هیستوپاتولوژیکی فسفیدآلومینیوم به ترتیب در معده، کبد و قلب سگ ..... ۱۱
- شکل ۱-۷ تغییرات هیستوپاتولوژیکی فسفیدآلومینیوم به ترتیب در مغز و ریه سگ ..... ۱۱
- شکل ۱-۸ شیوه انقباض عضله قلبی بر اساس فیزیولوژی گانونگ ..... ۱۳
- شکل ۱-۹ دژنراسیون بافت قلبی ..... ۱۵
- شکل ۱-۱۰ پارگی بطن چپ در اثر مسمومیت با فسفیدآلومینیوم ..... ۱۷
- شکل ۱-۱۱ سختی مری در فرد مسموم شده با فسفیدآلومینیوم توسط باریم کلراید ..... ۱۸
- شکل ۱-۱۲ نحوه تولید گونه‌های فعال اکسیژن توسط فسفیدآلومینیوم ..... ۲۳
- شکل ۱-۱۳ زنجیره تنفسی میتوکندری و تولید گونه‌های فعال اکسیژن و حذف آن‌ها ..... ۲۶
- شکل ۱-۱۴ مرگ سلولی به واسطه میتوکندری ..... ۲۷
- شکل ۱-۱۵ مکانیسم سمیت فسفیدآلومینیوم ..... ۳۲
- شکل ۱-۱۶ فلوجارت درمان مسمومیت با فسفیدآلومینیوم در ایران (۱۱۰) ..... ۳۸
- شکل ۱-۱۷ طبقه بندی فلاونوئیدها ..... ۴۲
- شکل ۱-۱۸ ساختار شیمیایی کرایسین و گیاهی که از آن استخراج می‌شود (*Passiflora coerulea*) ..... ۴۴
- شکل ۱-۱۹ اشکال دارویی کرایسین ..... ۴۵
- شکل ۱-۲۰ مسیر پیشنهادی اثر کرایسین در آپتوز سلولهای سرطانی ..... ۴۸

- شکل ۱-۲ سنجش عملکرد میتوکندری به روش احیای MTT ..... ۶۲
- شکل ۲-۲ مکانیسم تورم میتوکندری القا شده با  $\text{CaCl}_2$  ..... ۶۴
- شکل ۳-۲ نحوه ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در داخل میتوکندری و از بین رفتن آن ..... ۶۵
- شکل ۴-۲ مقایسه تفاوت مواد فلورسنت کاتیونی در پتانسیل‌های مختلف غشای میتوکندری ..... ۶۶
- شکل ۵-۲ لیپید پراکسیداسیون و عواقب ناشی از آن در میتوکندری کاردیومیوسیت ها ..... ۶۷
- شکل ۱-۳ تأثیر فسفیدآلومینیوم بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز و اثر محافظ کرایسین ..... ۷۰
- شکل ۲-۳ ارزیابی تورم میتوکندری ..... ۷۲
- شکل ۳-۳ نمودار فلوسایتومتری تأثیر فسفیدآلومینیوم در تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن ..... ۷۵
- شکل ۴-۳ تعیین میزان سقوط پتانسیل غشای میتوکندری به وسیله رودامین ۱۲۳ ..... ۷۶
- شکل ۵-۳ میزان پراکسیداسیون چربی ها در میتوکندری ..... ۷۷