



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه برای دریافت درجه دکترای داروسازی

بررسی اثر داروی بواسیزومب بر روی کمپلکس‌های میتوکندریایی

در میتوکندری‌های ایزوله‌شده از قلب رت

استاد راهنما :

دکتر احمد سلیمی

نگارش :

الهام محمدخانلو

بهمن ۹۸

تقدیم به آنان که همواره بودند بی آنکه صدایشان  
کرده باشیم

تقدیم به آنان که در فریادهایمان سکوت کردند

و در سکوتمان به فریادمان رسیدند

و تقدیم به آنان که بی ادعا دوستان دارند

پدر، مادر، خواهر و آنان که زمین را جای بهتری  
برای زیستن می‌کنند

حضور در محضر بزرگان افتخار بزرگی است و فرصتی است گرانقدر جهت اندوختن توشه ای از علم و تجربه.

خداوند را شاکرم که این افتخار را نصیب بنده فرمود تا در محضر انسان عالی مرتبه و استاد گرانقدر جناب آقای دکتر سلیمی حضور داشته و زمانی را به شاگردی ایشان بگذرانم.

از استاد بزرگووارم به خاطر تمام آموزه ها و تجربیاتی که در اختیار بنده قرار دادند و صبر و تحملشان، صادقانه و از صمیم قلب متشکرم و یاری هرچه بیشتر خداوند منان را جهت ادامه این مسیر پربها برای ایشان مسئلت می دارم .

## چکیده

**مقدمه:** سمیت قلبی القا شده دارویی معمولاً موجب ایجاد نارسایی قلبی یا اختلال عملکرد سیستولی بطن چپ می‌شود. اختلال عملکرد بطن چپ قلبی از عوارض جانبی نادر گزارش شده به دنبال مصرف بواسیزومب است که شیوع ۱/۲٪ دارد و این میزان شیوع مستقل از روش تجویز دارو می‌باشد. نظر به اینکه یک دارو از راه‌های مختلف می‌تواند تاثیرگذاری داشته و تغییراتی را در بدن ایجاد کند، شناخت این راه‌ها کمک می‌کند تا از عوارض جانبی آن‌ها جلوگیری شده و یا در جهت تقویت اثرات مفید آن‌ها گام برداشته شود. با توجه به فعالیت دائمی قلب، یکی از مهم‌ترین اندام‌های این اندام، میتوکندری است تا نیاز دائمی قلب به انرژی را برطرف کند. در این پایان‌نامه سعی شده است که تاثیر بواسیزومب بر روی فعالیت کمپلکس‌های میتوکندری بررسی شود. میتوکندری‌های قلب رت توسط سانتریفیوژهای افتراقی از رت‌های ویستار ایزوله شدند. با استفاده از ارزیابی‌های زیست‌شیمیایی و اسپکتروفوتومتری فعالیت کمپلکس‌های میتوکندریایی، سوکسینات دهیدروژناز و تورم میتوکندریایی در میتوکندری‌های ایزوله شده محاسبه شد. تنها کاهش فعالیت کمپلکس II پس از مواجهه با بواسیزومب ( $50$  و  $100 \mu\text{g/ml}$ ) مشاهده گردید. در مجموع برای اولین بار با این مطالعه مقدماتی، کاهش مشهود فعالیت کمپلکس II پس از مواجهه با بواسیزومب مشاهده گردید.

**مواد و روش کار:** ابتدا رت‌های نر ویستار که بازه‌ی وزنی در حدود  $300$ – $200$  گرم داشتند انتخاب گردید. بافرها و مواد آزمایش مهیا شد. رت بی‌هوش شده و طی جراحی قلب آن جدا گردیده سپس خرد شده با هموژنایزر شیشه‌ای در  $10 \text{ ml}$  از بافر ایزولاسیون هموژن شد. پس از دوبار سانتریفیوژ کردن به مدت  $10$  دقیقه به ترتیب با دور  $1000 \text{ g}$  و برداشتن محلول رویی و  $10000 \text{ g}$  دور ریختن محلول رویی، میتوکندری‌ها در بافر assay حل گردید. با آزمایش برادفورد میزان میتوکندری به دست آمد. غلظت میتوکندری بر روی  $1 \text{ mg/mL}$  تنظیم شد. با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در حضور غلظت  $50 \mu\text{M}$  و  $100 \mu\text{M}$  بواسیزومب میزان فعالیت کمپلکس‌های میتوکندریایی اندازه‌گیری شد. آزمایشات مربوط به میزان فعالیت هر کمپلکس حداقل سه بار انجام گردید.

**نتایج:** طبق بررسی‌های مربوط به فعالیت آنزیمی OXPHOS بر روی میتوکندری‌های ایزوله شده از قلب رت مشاهده شد که با غلظت‌های  $50 \mu\text{M}$  و  $100 \mu\text{M}$  بواسیزومب فعالیت آنزیمی کمپلکس II به شدت نسبت به کنترل کاهش پیدا کرد. فعالیت کمپلکس‌های I و III و VI در مواجهه با بواسیزومب کاهش نیافت. به همین منوال کمپلکس‌های I+III و II+III نیز کاهش شاخصی را نشان ندادند. در مجموع این نتایج نشان می‌دهد که کمپلکس II هدف اصلی بواسیزومب در زنجیره تنفسی میتوکندری‌های قلب رت است.

**کلمات کلیدی:** بواسیزومب، سمیت قلبی، میتوکندری، کمپلکس میتوکندریایی، سمیت میتوکندریایی

## فهرست مطالب

۱	..... مقدمه
۲	..... ۱-۱ قلب
۲	..... ۱-۱-۱ قلب (ساختار کلی)
۴	..... ۲-۱-۱ قلب (ساختار درونی)
۴	..... ۱-۲-۱-۱ میوسیت ها
۴	..... ۲-۲-۱-۱ ضربان سازی
۴	..... ۳-۲-۱-۱ انقباض پذیری
۵	..... ۴-۲-۱-۱ قلب و ATP
۷	..... ۳-۱-۱ سمیت قلبی
۸	..... ۱-۳-۱-۱ سمیت حاد قلبی
۸	..... ۲-۳-۱-۱ سمیت مزمن قلبی
۹	..... ۲-۱ میتوکندری
۱۲	..... ۱-۲-۱ نقش های میتوکندری
۱۲	..... ۱-۱-۲-۱ هوموستاز کلسیم و منافذ نفوذپذیر میتوکندری
۱۳	..... ۲-۱-۲-۱ استرس اکسیداتیو میتوکندری
۱۵	..... ۳-۱-۲-۱ میتوکندری و مرگ سلولی
۱۹	..... ۲-۲-۱ سمیت میتوکندریایی
۱۹	..... ۱-۲-۲-۱ اختلالات میتوکندریایی
۲۲	..... ۲-۲-۲-۱ میتوکندری به عنوان واسطه ای برای سمیت القا شده توسط داروها
۲۳	..... ۳-۲-۲-۱ نقص در فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی
۲۳	..... ۴-۲-۲-۱ بیوسنتز غیر عادی میتوکندری
۲۴	..... ۵-۲-۲-۱ سمیت میتوکندریایی سلول های قلبی
۲۵	..... ۳-۲-۱ ارتباط سمیت قلبی ، رسپتور های مرگ و میتوکندری
۲۶	..... ۳-۱ زنجیره تنفس میتوکندریایی
۲۹	..... ۴-۱ کمپلکس ها
۲۹	..... ۱-۴-۱ کمپلکس I
۳۳	..... ۲-۴-۱ کمپلکس II
۳۴	..... ۳-۴-۱ کمپلکس III
۳۶	..... ۴-۴-۱ کمپلکس IV
۳۸	..... ۵-۴-۱ سنتاز ATP
۳۹	..... ۵-۱ سرطان
۳۹	..... ۱-۵-۱ نارسایی قلبی ناشی از مصرف داروهای ضدسرطان
۴۳	..... ۶-۱ بواسیزومب

۴۵	۱-۶-۱. اطلاعات دارویی بواسیزومب .....
۴۸	۷-۱. بررسی متون .....
۴۸	۸-۱. اهداف .....
۴۹	۹-۱. سوالات و فرضیات .....
۵۱	۱-۲. مواد آزمایش .....
۵۳	۲-۲. بافرها و محلول‌ها .....
۵۳	۱-۲-۲. محلول کوماسی بلو .....
۵۳	۲-۲-۲. بافر آزمایش برادفورد .....
۵۳	۳-۲-۲. بافر ایزوله کردن میتوکندری .....
۵۴	۴-۲-۲. بافر آزمایش سنجش تورم میتوکندری .....
۵۴	۵-۲-۲. بافر آزمایش MTT (بافر assay) .....
۵۵	۳-۲. بافر ها و محلول های مورد نیاز برای ارزیابی کمپلکس ها .....
۵۶	۱-۳-۲. طرز تهیه بافرها و محلول ها .....
۶۰	۴-۲. وسایل و تجهیزات آزمایش .....
۶۳	۵-۲. روش کار .....
۶۳	۱-۵-۲. مراحل ایزوله کردن میتوکندری از سلول های قلبی .....
۶۳	۱-۱-۵-۲. مرحله خروج قلب .....
۶۳	۲-۱-۵-۲. مرحله ایزوله کردن میتوکندری .....
۶۵	۲-۵-۲. آزمایش برادفورد جهت تعیین مقدار میتوکندری .....
۶۷	۳-۵-۲. آزمایشات MTT و تورم جهت دست یابی به غلظت سمی بواسیزومب برای میتوکندری .....
۶۷	۱-۳-۵-۲. آزمایش تورم .....
۶۸	۲-۳-۵-۲. آزمایش MTT .....
۷۰	۴-۵-۲. آزمایش های مربوط به فعالیت کمپلکس ها .....
۷۰	۱-۴-۵-۲. آزمایش سنجش فعالیت کمپلکس I .....
۷۱	۲-۴-۵-۲. آزمایش سنجش فعالیت کمپلکس II .....
۷۲	۳-۴-۵-۲. آزمایش سنجش فعالیت کمپلکس III .....
۷۳	۴-۴-۵-۲. آزمایش سنجش فعالیت کمپلکس IV .....
۷۴	۵-۴-۵-۲. آزمایش سنجش فعالیت کمپلکس I + کمپلکس III .....
۷۵	۶-۴-۵-۲. آزمایش سنجش فعالیت کمپلکس II + کمپلکس III .....
۷۶	۶-۲. آنالیز آماری .....
۷۸	۱-۳. نتایج .....
۷۹	۲-۳. نتایج حاصل از آزمایش MTT و swelling .....
۸۰	۳-۳. نتایج حاصل از آزمایش های کمپلکس I .....
۸۱	۴-۳. نتایج حاصل از آزمایش های کمپلکس II .....
۸۳	۵-۳. نتایج حاصل از آزمایش های کمپلکس III .....
۸۴	۶-۳. نتایج حاصل از آزمایش های کمپلکس IV .....

۸۶	۷-۳. نتایج حاصل از آزمایش‌های کمپلکس I + کمپلکس III
۸۷	۸-۳. نتایج حاصل از آزمایش‌های کمپلکس II + کمپلکس III
۸۹	۱-۴. بحث و نتیجه‌گیری
۹۴	۲-۴. پیشنهادات
۹۴	۳-۴. محدودیت‌ها

## فهرست جدول‌ها

### فصل اول

جدول ۱-۱ . لیست داروهای ضد سرطان ایجاد کننده نارسایی قلبی بر اساس تیپ ..... ۴۰

جدول ۱-۲ . لیست داروهای ایجاد کننده نارسایی قلبی ..... ۴۱

### فصل دوم

جدول ۲-۱ . لیست مواد ..... ۵۱

جدول ۲-۲ . لیست شرایط نگهداری و غلظت بافرها و محلول‌ها ..... ۵۵

جدول ۲-۳ . لیست تجهیزات ..... ۶۰



## فهرست شکل‌ها و نمودارها

### فصل اول

- شکل ۱-۱. ساختار قلب و قسمت‌های تشکیل دهنده آن ..... ۲
- شکل ۱-۲. فیلامنت‌های اکتین و میوزین در حالت انقباض و استراحت سلول‌های ماهیچه‌ای ..... ۵
- شکل ۱-۳. میتوکندری ..... ۹
- شکل ۱-۴. ارتباط میتوکندری و استرس اکسیداتیو ..... ۱۴
- شکل ۱-۵. شکل ساده‌ای از مسیرهای داخلی و خارجی برای آپوپتوز ..... ۱۷
- شکل ۱-۶. فاکتورهای مهمی که روی MPTP میتوکندریایی و مرگ سلول‌های قلبی تاثیر می‌گذارند ..... ۲۲
- شکل ۱-۷. زنجیره تنفس میتوکندریایی ..... ۲۶
- شکل ۱-۸. کلتی از کار میتوکندری و کمپلکس‌های میتوکندریایی ..... ۲۹
- شکل ۱-۹. مکانیسم اثر بواسیزومب ..... ۴۳

### فصل دوم

- شکل ۲-۱. هموژنایزر شیشه‌ای ..... ۶۰
- شکل ۲-۲. PH متر sartorius ..... ۶۱
- شکل ۲-۳. ترازوی sartorius با دقت ۰.۱ mg ..... ۶۱
- شکل ۲-۴. سانتی‌فیوژ سیگما ..... ۶۲
- شکل ۲-۵. میکروپلیت ریدر بیوتک اپوک ..... ۶۲
- شکل ۲-۶. مراحل جراحی و هموژن کردن قلب جهت ایزوله کردن میتوکندری ..... ۶۴
- شکل ۲-۷. آزمایش برادفورد ..... ۶۶
- شکل ۲-۸. آزمایش تورم و MTT ..... ۶۹

### فصل سوم

- شکل ۳-۱: مجموعه نتایج بررسی اثر دارو بر روی کمپلکس‌های میتوکندریایی ..... ۷۸
- شکل ۳-۲ نتایج حاصل از آزمایش MTT و swelling ..... ۷۹
- شکل ۳-۳. نتایج کمپلکس I ..... ۸۰
- شکل ۳-۴. نتایج کمپلکس II ..... ۸۱
- شکل ۳-۵. نتایج کمپلکس III ..... ۸۳
- شکل ۳-۶. نتایج کمپلکس IV ..... ۸۵
- شکل ۳-۷. نتایج کمپلکس I + کمپلکس III ..... ۸۶
- شکل ۳-۸. نتایج کمپلکس II + کمپلکس III ..... ۸۷

## فهرست علائم، نشانه‌ها و اختصارات

BEV	Bevacizumab
SR	Sarcoplasmic Reticulum
OXPHOS	Oxidative Phosphorylation
MRC	Mitochondrial Respiratory Chain
ETC	(Mitochondrial) Electron Transport Chain
ROS	Reactive Oxygen Species
MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
AIF	Apoptotic Induced Factor
ER	Endoplasmic Reticulum
PTP	Permeability Transition Pore
MELAS	Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes
I/R	Ischemia/Reperfusion
NRTI	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors
TCA	TriCarboxylic Acid
ETF	Electron Transfer Flavoprotein
PMF	Proton Motive Force
A/D	Active/Deactive
TTFA	2-ThenoylTriFluoroAcetone
IMS	InterMembrane Space
IMM	Inner Mitochondrial Membrane
HER-2	Human Epithelial growth factor Receptor 2
HRT	Hormone Replacement Therapy
OCP	Oral Contraceptive Pill

BSA	Bovine Serum Albomin
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
GTP	Guanosine triphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetaacetic acid