بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه برای دریافت درجه دکترای داروسازی

عنوان :

بررسی نقش حفاظتی ویتامین D علیه سمیت میتوکندریایی قلبی داروی اریترومایسین در موش صحرایی

استاد راهنما :

دکتر احمد سلیمی

نگارنده :

امیر مرسا

فروردین ۹۹

شماره پایان نامه : د-۹۹-۹۹/۰۲

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است. خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، همسری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودش بیاسایم و از ریشه آن شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودش در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. همسری که بودنش تاج افتخاری است بر سرم و نامش دلیلی است بر بودنم. این پایان نامه را به همسر مهربانم تقدیم می کنم که مسیح وار با صبرش در تمامی لحظات رفیق راه بود و سایه مهربانیش سایه سار زندگیم، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود و در سایه همیاری و همدلی او به این منظور نائل شدم.

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم. نمی توانم معنایی بالاتر از تقدیر و تشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استاد خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم و سرایم،کم گفته ام. بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگارم. اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه از استاد با کمالات و شایسته، جناب آقای دکتر احمد سلیمی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید کمال تشکر و قدردانی را دارم باشد که این خردترین، بخشی از زحمات ایشان را سپاس گویم.

چکیده

مقدمه

از آنجا که یکی از ریسک فاکتورهای سمیت میتوکندریایی قلبی، اریترومایسین است و کمبود ویتامین D می تواند این نقص عملکرد میتوکندریایی را بیشتر کند. در مطالعه ی حاضر فرضیه ی آسیب اریترومایسین به عملکرد میتوکندری و ایجاد استرس اکسیداتیو در میتوکندری ایزوله شده قلب موش صحرایی و نقش کلسی تریول در محافظت از آن بررسی شد.

مواد و روش ها

میتوکندری قلب موش صحرایی با لیز مکانیکی و سانتریفیوژ افتراقی ایزوله شد. سپس میتوکندری های ایزوله شده در معرض سه غلظت متفاوت ۲/۵، ۵و ۱۰ میکرومولار از کلسی تریول برای ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و تحت ۱۰ میکرومولار اریترومایسین، قرار داده شد. بعد از ۱ ساعت انکوباسیون از جریان فلوسایتومتری و ارزیابی های بیوشیمیایی استفاده شد. پارامترهای سمیت میتوکندریایی شامل : فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، تورم میتوکندریایی، سقوط پتانسیل غشا میتوکندریایی، تولید گونه های اکسیژن آزاد و پر اکسیداسیون لیپید ارزیابی شد. نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میکرومولار اریترومایسین سبب تغییر چشمگیر در فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، تورم میتوکندریایی، سقوط پتانسیل غشا میتوکندریایی، تولید گونه های اکسیژن آزاد و افزایش پراکسیداسیون لیپید و استرس اکسیداتیو شد. ده میکرومولار کلسی تریول اثرات اریترومایسین روی پارامتر های تست شده را به حالت اول برگرداند.

بحث و نتیجه گیری: در این مطالعه نشان داده شد که در میتوکندری های ایزوله شده قلب موش صحرایی، اریترومایسین سبب آسیب عملکرد میتوکندریایی و القای سمیت میتوکندریایی شد که این اثرات با کلسی تریول منجر به بهبودی شد. این یافته ها پیشنهاد می کند که کلسی تریول ممکن است به عنوان محافظت کننده یا استراتژی درمانی برای عوارض سمیت قلبی ایجاد شده توسط اریترومایسین کاربرد داشته باشد.

کلید واژه ها : اریترومایسین، کلسی تریول، میتوکندری، سمیت قلبی ، ۱و۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D_3

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول(مقدمه) ۱

۱-۱)میتوکندری و نقش آن در سلول ۲

۱-۲) DNA میتوکندری ۳

۱-۳) ارتباطات میتوکندری و هسته ۳

۱-۴) پروتئین سازی در میتوکندری ها ۴

۱-۵) زنجیره انتقال الکترون ۵

۱-۶) سمیت قلبی وابسته به میتوکندری ۶

۱-۷) قلب و سمیت قلبی ۷

۱-۸) سمیت میتوکندریایی ناشی از دارو ۸

۱-۹) اریترومایسین ۸

۱-۱۰) سمیت قلبی اریترومایسین ۱۰

۱-۱۱) سمیت میتوکندریایی اریترومایسین ۱۰

۱-۱۲) مکانیسم سمیت میتوکندریایی اریترومایسین ۱۱

۱-۱۳) ویتامین D و نقش آن ۱۲

۱-۱۴) نقش ویتامین D در کنترل بیماری های قلبی ۱۴

۱-۱۵) گردش کار پروژه ۱۵

فصل دوم(مواد ودستگاه ها و روش ها) ۱۶

۲-۱) مواد شیمیایی ۱۷

۲-۲) وسایل آزمایشگاهی و دستگاه ها ۱۹
۲-۳) محتویات و طرز تهیه بافر ها و محلول ها ۲۰
۲-۳-۱) بافر ایزوله کردن میتوکندری ۲۰
۲-۳-۲) بافر سنجش تورم میتوکندری ۲۱
۲-۳-۳) بافر اندازه گیری سوکسینات دهیدروژناز ۲۲
۲-۳-۴) بافر تعیین تشکیل گونه های فعال اکسیژن(بافر تنفسی) ۲۳
۲-۳-۵) بافر تعیین میزان سقوط پتانسیل غشا ۲۴
۲-۳-۶) بافر تعیین پراکسیداسیون لیپیدها ۲۴
۲-۳-۷) تعیین غلظت پروتئین میتوکندری ۲۵
۲-۴) نحوه ساخت غلظت ها ۲۷
۲-۴-۱) روش ساختن غلظت های داروی اریترومایسین ۲۷
۲-۴-۲) ساخت غلظت های مختلف ویتامین D_3 ..... ۲۸
۲-۵) مراحل ایزوله کردن میتوکندری از سلول های قلبی ۳۰
۲-۵-۱) حیوان آزمایشگاهی و نگهداری از آن ۳۰
۲-۵-۲) مرحله خارج سازی قلب موش صحرایی ۳۱
۲-۵-۳) مرحله ایزوله کردن میتوکندری ۳۱
۲-۶) آزمایش بردافورد جهت تعیین مقدار پروتئین میتوکندری ۳۳
۲-۷) آزمایش ها ۳۴
۲-۷-۱) اندازه گیری فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری ۳۴
۲-۷-۲) تست تورم میتوکندری ۳۴
۲-۷-۳) تعیین میزان گونه های فعال اکسیژن ۳۵
۲-۷-۴) سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۳۶

۲-۷-۵) سنجش پراکسیداسیون لیپید ۳۸

۲-۸) آنالیز آماری ۳۹

فصل سوم(نتایج) ۴۰

۳-۱) فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۴۱

۳-۲) تشکیل گونه های فعال اکسیژن میتوکندریایی ۴۳

۳-۳) تورم میتوکندریایی ۴۵

۳-۴) سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ۴۶

۳-۵) پراکسیداسیون لیپید ۴۸

فصل چهارم(بحث و نتیجه گیری و پیشنهادات) ۵۰

۴-۱) بحث ۵۱

۴-۲) پیشنهادات ۵۷

خلاصه گرافیکی پایان نامه ۵۸

فهرست منابع ۵۹

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول۱-۲) لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه.....۱۷

جدول۲-۲) وسایل آزمایشگاهی و دستگاه های استفاده شده ۱۹

جدول۳-۲) بافر ایزوله کردن میتوکندری ۲۰

جدول۴-۲) بافر سنجش تورم میتوکندری ۲۱

جدول ۵-۲) بافر آزمایش تعیین فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری.....۲۳

جدول ۶-۲) بافر آزمایش تعیین فعالیت میتوکندری.....۲۳

جدول۷-۲) بافر آزمایش تعیین فعالیت میتوکندری ۲۴

جدول ۸-۲) محلول های مصرفی.....۲۵

جدول ۹-۲) محلول کوماسی بلو.....۲۵

جدول ۱۰-۲) بافر استاندارد برادفورد ۲۶

جدول ۱۱-۲) ساخت غلظت های مختلف ویتامین D3 با غلظت های مختلف اریترومایسین.....۳۰

جدول ۱۲-۲)نحوه انجام تست برادفورد در پلیت ها.....۳۳

جدول ۱۳-۲) تعیین تست تورم میتوکندری ۳۵

جدول ۱۴-۲) تعیین میزان گونه های فعال اکسیژن.....۳۶

جدول ۱۵-۲) سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری.....۳۷

جدول ۱۶-۲) سنجش پراکسیداسیون لیپید.....۳۹

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱) داروی اریترومایسین و ساختمان شیمیایی آن ۹

شکل۲-۱) ساختمان شیمیایی ویتامین D ۱۲

شکل ۱-۳) سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز در حضور اریترومایسین ۴۱

شکل ۲-۳) سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز در حضور اریترومایسین و ویتامین D3 ..... ۴۲

شکل ۳-۳) سنجش میزان گونه های فعال اکسیژن در حضوراریترومایسین و اریترومایسین و ویتامین D3..... ۴۴

شکل ۴-۳) سنجش میزان گونه های فعال اکسیژن در حضور ویتامین D3 ..... ۴۵

شکل۵-۳) سنجش تورم میتوکندریایی در مواجه اریترومایسین و ویتامین D3 ..... ۴۵

نمودار۶-۳) سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری درحضور اریترومایسین و ویتامین D3..... ۴۷

شکل ۷-۳) سنجش سقوط پتانسیل غشای میتوکندری در حضور اریترومایسین و ویتامین D_3 ..... ۴۷

شکل ۸-۳) پراکسیداسیون لیپید در حضور اریترومایسین و ویتامین D_3 ..... ۴۹

شکل ۱-۴ خلاصه گرافیکی پایان نامه..... ۵۸

فهرست اختصارات و اصطلاحات

ANOVA: Analysis of variance

ATP: Adenosine Triphosphate

BSA: Bovine serum albumin

CAT: Catalase

DCFH-DA: 2 ′,7 ′-dichlorofuorescin diacetate

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DNA: Deoxyribonucleic acid

ECG: Electrocardiogram

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: (ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N′, N′-tetraacetic acid), also known as egtazic acid

ENAs: Erythrocytic nuclear abnormalities

GP: Glutathione Peroxidase

GPx: Glutathione peroxidase

GRed: Glutathione reductase

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

HERG: Human ether-a-go-go-related gene

LP: Lipid peroxidation

MDA: Malondialdehyde

MMP: Mitochondrial Membrane Protentional

MPT: Mitochondrial Permeability Transition

MTT: Erythromycin, Sucrose, 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MOPS: 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid

ROS: Reactive oxygen species

SDH: Succinate dehydrogenase

TBA: Thiobarbituric acid

TCA: Trichloroacetic acid

TdP: Torsades de pointes

TRIS: Magnesium chloride 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

VDR: Vitamin D receptor