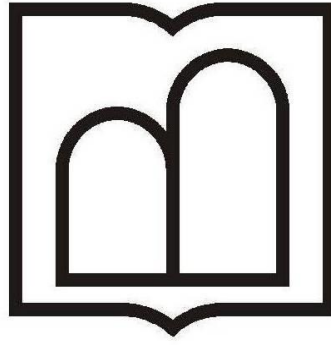


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای داروسازی

عنوان:

اثر حفاظتی کرایسین در مهار سمیت ایجاد شده توسط فسفید آلومینیوم در  
کاردیومیوسیت‌های ایزوله شده از عضله قلب موش صحرائی

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

صالح خضری

دی ۹۹

شماره پایان نامه:

۹۹/۱۰ د-۶۲

## اهداء پایان نامه

سپاس ایزد منان که به من این فرصت را داد تا به این مرحله از علم رسیده و از هیچ محبتی دریغ نکرد و در تمام مراحل زندگی مرا قوت قلب بود.

تقدیم به پدر و مادرم:

تقدیم به پدر مادر مهربانم که هر لحظه وجودم را از چشمه سار پر از عشق چشمانشان سیراب می کنند...  
خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند.

## تشکر و قدردانی

اینک که این رساله تحقیقی به پایان رسیده است بر خود واجب می‌دانم از استاد فرزانه و گران قدر جناب آقای دکتر احمد سلیمی که به عنوان استاد راهنما در مراحل مختلف پایانامه همواره با سعه صدر و گشاده‌رویی در کنار من بودند و در طول مدت تحصیل از راهنمایی‌های اخلاقی و علمی ایشان بهره‌جسته‌ام، از صمیم قلب نهایت تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

## خلاصه پایان نامه

### مقدمه:

مسمومیت با آلومینیوم فسفید یکی از تهدید حیات کننده‌ترین موارد اورژانسی است. گاز فسفین یک گاز بسیار سمی است که زمانی که قرص‌های آلومینیوم فسفید در مواجهه با رطوبت قرار می‌گیرند آزاد می‌شود و باعث نارسایی اندام‌ها در چند سیستم بدن می‌گردد. عوارض قلبی-عروقی دلیل اصلی مرگ ناشی مسمومیت با فسفید آلومینیوم که با استرس اکسیداتیو و تخریب میتوکندری در ارتباط است. جدای از خواص ضدسرطانی، ضد التهابی و مهارکنندگی آروماتاز، کرایسین در محافظت در برابر اختلالات قلبی-عروقی نیز نقش دارد. بر همین اساس، ما تاثیر کرایسین به عنوان یک آنتی اکسیدانت و یک عامل محافظتی برای میتوکندری در برابر سمیت القاشده از فسفید آلومینیوم در کاردیومیوسیت‌های ایزوله شده از بطن قلب موش صحرایی را بررسی کردیم.

### مواد و روش‌ها:

سلول‌های قلبی جدا شده از موش صحرایی، جنس نر، نژاد ویستار در هفت گروه شامل گروه‌های کنترل، گروه درمان (حاوی غلظت‌های مختلف کرایسین (۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به علاوه ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفید آلومینیوم است)، گروه فسفید آلومینیوم (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و گروه کرایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تقسیم بندی شدند. میزان زنده مانده سلول، تولید گونه‌های فعال اکسیژن، سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری، آسیب لیزوزومی، پراکسیداسیون لیپید (محتوای مالون دی آلدئید) و گلوتاتیون احیا و اکسید با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و فلوسایتومتری ارزیابی شدند. نتایج هر آزمایش به صورت جداگانه بین گروه‌ها مقایسه شد.

### نتایج:

نتایج ما نشان داد که تجویز کرایسین تا ۱۰ میکرومولار به طور کارآمد ( $p < 0.05$ ) باعث کاهش سمیت سلولی، اکسیداتیو، لیزوزومی و آسیب میتوکندریایی ناشی از فسفید آلومینیوم در کاردیومیوسیت ایزوله شده می‌شود.

## بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که درمان منطقی اختلال عملکرد سلولی القا شده توسط فسفید آلومینیوم می‌تواند عاملی باشد که از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت کند و علائم ناشی از آسیب سلولی پیشرونده را متوقف کند، کرایسین می‌تواند یک درمان امیدوارکننده برای مسمومیت با فسفید آلومینیوم باشد.

## کلمات کلیدی:

فسفید آلومینیوم، کرایسین، سمیت قلبی استرس اکسیداتیو، آنتی اکسیدان

فصل ۱: مقدمه.....	۱
۱-۱- فسفید آلومینیوم.....	۲
۱-۱-۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی.....	۲
۱-۱-۲- قرص‌های فسفید آلومینیوم.....	۳
۱-۱-۳- گاز فسفین.....	۴
۱-۱-۴- مسمومیت با فسفید آلومینیوم.....	۴
۱-۱-۵- آمار مسمومیت با فسفید آلومینیوم.....	۵
۱-۱-۶- توکسیکوکینتیک.....	۶
۱-۱-۷- مکانیسم سمیت فسفین.....	۶
۱-۱-۷-۱- نقش استرس اکسیداتیو و پروکسیداسیون لیپید.....	۷
۱-۱-۷-۲- سیستم‌های سم زدایی کننده.....	۸
۱-۱-۷-۳- آسیب به DNA.....	۸
۱-۱-۸- نقش میتوکندری.....	۸
۱-۱-۸-۱- عملکرد فیزیولوژیک میتوکندری.....	۹
۱-۱-۸-۲- میتوکندری و رادیکال‌های فعال اکسیژن.....	۱۱
۱-۱-۸-۳- اثرات فسفین بر میتوکندری.....	۱۱
۱-۱-۹- تظاهرات بالینی ناشی از مسمومیت با فسفید آلومینیوم.....	۱۳
۱-۱-۹-۱- سیستم عصبی.....	۱۳
۱-۱-۹-۲- سیستم تنفسی.....	۱۴
۱-۱-۹-۳- سیستم گوارشی.....	۱۴
۱-۱-۹-۴- اختلالات متابولیکی و الکترولیتی.....	۱۵
۱-۱-۹-۵- سمیت خونی.....	۱۵
۱-۱-۹-۶- اختلال کبدی.....	۱۶
۱-۱-۹-۷- سمیت قلبی.....	۱۷
۱-۱-۹-۸- سایر تظاهرات بالینی.....	۱۸

- ۱۸..... ۹-۹-۱-۱- مروری بر سیر علایم مسمومیت.....
- ۱۹..... ۱۰-۱-۱- درمانهای فعلی مسمومیت با فسفید آلومینیوم.....
- ۱۹..... ۱-۱۰-۱-۱- اقدامات درمانی در مسمومیت حاد.....
- ۲۰..... ۲-۱۰-۱-۱- سم زدایی دستگاه گوارش.....
- ۲۰..... ۳-۱۰-۱-۱- حمایت های قلبی عروقی.....
- ۲۰..... ۴-۱۰-۱-۱- حمایت از سیستم تنفسی.....
- ۲۱..... ۵-۱۰-۱-۱- سایر رویکردهای درمانی.....
- ۲۲..... ۱۱-۱-۱- پیشگیری.....
- ۲۲..... ۲-۲- ساختار و عملکرد قلب.....
- ۲۲..... ۱-۲-۱- غشا پایه.....
- ۲۳..... ۱-۱-۲-۱- سارکولما.....
- ۲۴..... ۲-۱-۲-۱- پمپها و کانالهای یونی.....
- ۲۵..... ۳-۱-۲-۱- اسکلت سلولی میوسیتها.....
- ۲۵..... ۴-۱-۲-۱- میتوکندری.....
- ۲۶..... ۵-۱-۲-۱- کوپل شدن تحریک-انقباض.....
- ۲۶..... ۶-۱-۲-۱- انقباض.....
- ۲۷..... ۲-۲-۱- لیزوزوم و مرگ سلولی.....
- ۲۹..... ۳-۱- کرایسین.....
- ۳۰..... ۱-۳-۱- منابع کرایسین در فراوده های طبیعی.....
- ۳۰..... ۱-۱-۳-۱- بره موم.....
- ۳۱..... ۲-۱-۳-۱- عسل.....
- ۳۲..... ۳-۱-۳-۱- گل ساعتی.....
- ۳۴..... ۲-۳-۱- فارماکوکینتیک.....
- ۳۵..... ۳-۳-۱- فواید و سمیت انسان.....
- ۳۵..... ۴-۳-۱- اثر فعالیت کرایسین.....
- ۳۵..... ۱-۴-۳-۱- اثر محافظت از سیستم عصبی.....
- ۳۶..... ۲-۴-۳-۱- اثر محافظت کبدی.....
- ۳۶..... ۳-۴-۳-۱- اثر ضد آرتريت.....



- ۳۷.....۱-۳-۴-۴- اثر ضد التهابی.....
- ۳۷.....۱-۳-۴-۵- اثر ضد آسم.....
- ۳۷.....۱-۳-۴-۶- فعالیت ضد سرطانی کرایسین.....
- ۳۹.....۱-۳-۴-۷- اثر ضد چربی خون.....
- ۳۹.....۱-۳-۴-۸- اثر ضد اضطراب.....
- ۳۹.....۱-۳-۴-۹- اثر محافظت از قلب.....
- ۴۰.....۱-۳-۵- مکانیسم عملکرد کرایسین.....
- ۴۱.....۱-۴- دلایل انتخاب موضوع:.....
- ۴۳.....۱-۵- بررسی متون.....
- ۴۵.....۱-۶- اهداف:.....
- ۴۵.....۱-۶-۱- هدف کلی:.....
- ۴۵.....اهداف اختصاصی.....
- ۴۶.....۱-۶-۲- فرضیات یا سوالات پژوهش:.....
- ۴۷.....فصل ۲: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها.....
- ۴۹.....۲-۱- حیوانات و مواد مورد استفاده.....
- ۴۹.....۲-۱-۱- حیوانات آزمایشگاهی.....
- ۵۰.....۲-۲- مواد شیمیایی.....
- ۵۱.....۲-۳- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌ها.....
- ۶۴.....۲-۴- محتویات و طرز تهیه بافرها و محلول‌ها.....
- ۶۴.....۲-۴-۱- بافر پاول مدیوم (Powell medium).....
- ۶۵.....۲-۴-۲- بافر کلسیم کلراید.....
- ۶۵.....۲-۴-۳- بافر پرفیوژن.....
- ۶۶.....۲-۴-۴- بافر CCTM.....
- ۶۷.....۲-۴-۵- بافر Plating Medium.....
- ۶۸.....۲-۴-۶- بافر PBS.....
- ۶۹.....۲-۴-۷- بافر تعیین تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (بافر تنفس).....

- ۷۰ ..... ۲-۴-۸- بافر تعیین کننده میزان سقوط پتانسیل (MMPC).....
- ۷۱ ..... ۲-۴-۹- بافر تعیین کننده میزان آسیب لیزوزومی.....
- ۷۲ ..... ۲-۴-۱۰- بافر فسفات (0/1 M).....
- ۷۳ ..... ۲-۴-۱۱- بافر Tris HCl (500 mM).....
- ۷۳ ..... ۲-۴-۱۲- بافر محلول واکنش (Reaction solution).....
- ۷۴ ..... ۲-۴-۱۳- محلول های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها در جدول ۲-۱۲ قید شده است.....
- ۷۵ ..... ۲-۵-۵- آزمایشها.....
- ۷۷ ..... ۲-۵-۱- استریل کردن.....
- ۷۷ ..... ۲-۵-۲- مراحل ایزوله کردن سلول های قلبی.....
- ۷۹ ..... ۲-۵-۲- مرحله ایزوله کردن سلول های قلبی.....
- ۸۳ ..... ۲-۵-۳- تعیین میزان زنده مانی سلول های قلبی.....
- ۸۴ ..... ۲-۵-۴- ارزیابی میزان گونه های فعال اکسیژن.....
- ۸۷ ..... ۲-۵-۵- سنجش میزان سقوط پتانسیل غشاء.....
- ۹۰ ..... ۲-۵-۶- سنجش میزان آسیب لیزوزومی.....
- ۹۱ ..... ۲-۵-۷- تعیین میزان پراکسیداسیون لیپید.....
- ۹۳ ..... ۲-۵-۸- تعیین میزان گلوکاتایون احیاء و اکسید.....
- ۹۵ ..... ۲-۶- روش تجزیه و تحلیل دادهها و بررسی آماری.....
- ۹۶ ..... فصل ۳: نتایج.....
- ۹۷ ..... ۲-۱- میزان زنده ماندن سلولها.....
- ۹۹ ..... ۲-۲- نتایج مرتبط با میزان رادیکال های فعال اکسیژن.....
- ۱۰۰ ..... ۲-۳- نتایج مرتبط با میزان سقوط پتانسیل غشاء.....
- ۱۰۲ ..... ۲-۴- نتایج مرتبط با میزان آسیب لیزوزومی.....
- ۱۰۴ ..... ۲-۵- نتایج مرتبط با میزان پراکسیداسیون لیپید.....
- ۱۰۵ ..... ۲-۶- نتایج مرتبط با میزان گلوکاتایون احیاء و اکسید.....
- ۱۰۷ ..... فصل ۴: بحث و بررسی.....

۱۱۳.....	پیشنهادات
۱۱۳.....	محدودیت‌ها
۱۱۴.....	صفحه‌ی اول مقاله
۱۱۵.....	منابع
۱۲۵.....	چکیده به زبان انگلیسی (Abstract)
۱۲۷.....	مصوبه کمیته اخلاق

## فهرست شکل‌ها و نمودارها

- شکل ۱-۱ ساختار شیمیایی فسفید آلومینیوم ..... ۳
- شکل ۲-۱ قرص‌های فسفید آلومینیوم با ظاهر و بسته بندی متفاوت ..... ۳
- شکل ۳-۱ واکنش فنتون و هابر-ویس ..... ۷
- شکل ۴-۱ زنجیره تنفسی میتوکندری و تولید گونه های فعال اکسیژن و حذف آن ها ..... ۹
- شکل ۵-۱ مکانیسم سمیت فسفید آلومینیوم ..... ۱۲
- شکل ۶-۱ آنزیم های دخیل در تبدیل ROS ..... ۱۲
- شکل ۷-۱ تشکیل اجسام هینز ..... ۱۵
- شکل ۸-۱ تصویر شماتیک از برش عرضی میوسیت‌های قلبی ..... ۲۲
- شکل ۹-۱ پتانسیل عمل ..... ۲۴
- شکل ۱۰-۱ شکل شماتیک از کوپل شدن تحریک-انقباض ..... ۲۶
- شکل ۱۱-۱ مقایسه شرایط استرس با شرایط نرمال ..... ۲۸
- شکل ۱۲-۱ دسته بندی فلاونوئیدها ..... ۲۹
- شکل ۱۳-۱ ساختار شیمیایی کرایسین ..... ۳۰
- شکل ۱۴-۱ عسل ..... ۳۲
- شکل ۱۵-۱ گل ساعتی ..... ۳۳
- شکل ۱-۲ اتوکلاو ..... ۵۲
- شکل ۲-۲ یخچال فریزر ..... ۵۳
- شکل ۳-۲ بن ماری ..... ۵۳
- شکل ۴-۲ ترازوی دقیق آزمایشگاهی ..... ۵۴
- شکل ۵-۲ مولد آب مقطر ..... ۵۴
- شکل ۶-۲ ورتکس (Lab dancer) ..... ۵۵
- شکل ۷-۲ pH متر ..... ۵۵
- شکل ۸-۲ فیلتر غشایی ..... ۵۶
- شکل ۹-۲ هود بیوزیستی لامینار کلاس ۲ ..... ۵۶

- شکل ۲-۱۰ سانتریفیوژ یخچال دار ..... ۵۷
- شکل ۲-۱۱ سیستم پرفیوژن لانگاندورف ..... ۵۸
- شکل ۲-۱۲ پلیت کشت سلولی ..... ۵۹
- شکل ۲-۱۳ انکوباتور CO<sub>2</sub> ..... ۵۹
- شکل ۲-۱۴ هموژنایزر التراسونیک ..... ۶۰
- شکل ۲-۱۵ دستگاه الیزا ریدر ..... ۶۱
- شکل ۲-۱۶ فلوسایتومتری ..... ۶۲
- شکل ۲-۱۷ موش صحرائی، جنس نر، نژاد ویستار ..... ۷۶
- شکل ۲-۱۸ توزین و فیکس کردن موش صحرائی پس از بیهوشی کامل ..... ۷۷
- شکل ۲-۱۹ جداسازی بافت قلب ..... ۷۷
- شکل ۲-۲۰ اتصال نیدل به بافت قلب ..... ۷۸
- شکل ۲-۲۱ بهترین مکان اتصال نیدل به بافت قلب جهت پرفیوژن ..... ۷۸
- شکل ۲-۲۲ اتصال بافت قلبی به سیستم لانگاندورف ..... ۷۹
- شکل ۲-۲۳ الک ۲۰۰ میکرو متر جهت فیلتر ..... ۷۹
- شکل ۲-۲۴ سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ شده ..... ۸۰
- شکل ۲-۲۵ نمونه‌ای از سلول قلبی در زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۱۰X ..... ۸۲
- شکل ۲-۲۶ نحوه ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در داخل سلول و میتوکندری قلب ..... ۸۴
- شکل ۲-۲۷ نحوه ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در داخل سلول و میتوکندری قلب و از بین رفتن آن ..... ۸۵
- شکل ۲-۲۸ مقایسه تفاوت مواد فلورسنت کاتیونی در پتانسیل‌های مختلف غشای میتوکندری ..... ۸۶
- شکل ۲-۲۹ فعل و انفعالات در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری ..... ۸۷
- شکل ۲-۳۰ شکل شماتیک ارتباط بین آکریدین اورنج و لیزوزم ..... ۸۸
- شکل ۲-۳۱ فرایند پراکسیداسیون لیپید ..... ۹۰
- شکل ۲-۳۲ فرایند تشکیل و متابولیسم مالون دی آلدید ..... ۹۰
- شکل ۲-۳۳ واکنش گلوکاتیون احیا و اکسید ..... ۹۲

## فهرست جدول‌ها

عنوان

صفحه

جدول ۱-۲ لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه .....	۴۹
جدول ۲-۲ وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌ها مورد استفاده .....	۵۱
جدول ۳-۲ اجزای بافر ایزوله کردن سلول‌های قلبی .....	۶۳
جدول ۴-۲ اجزای بافر محیط کشت .....	۶۵
جدول ۵-۲ اجزای بافر Plating Medium .....	۶۶
جدول ۶-۲ اجزای بافر PBS .....	۶۷
جدول ۷-۲ اجزای بافر تنفسی .....	۶۸
جدول ۸-۲ اجزای بافر MMP .....	۶۹
جدول ۹-۲ اجزای بافر لیزوزومی .....	۷۰
جدول ۱۰-۲ اجزای بافر فسفات .....	۷۱
جدول ۱۱-۲ اجزای تشکیل دهنده بافر محلول واکنش .....	۷۲
جدول ۱۲-۲ محلول‌های مورد استفاده برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها .....	۷۳

## فهرست نمودارها

- نمودار ۱-۳ نتایج سمیت سلولی ..... ۹۵
- نمودار ۲-۳ نتایج اندازه گیری تشکیل میزان گونه های فعال اکسیژن ..... ۹۷
- نمودار ۳-۳ نتایج ارزیابی میزان سقوط پتانسیل غشای میتوکندری ..... ۹۹
- نمودار ۴-۳ نتایج ارزیابی میزان آسیب غشای لیزوزومی سلول ..... ۱۰۱
- نمودار ۵-۳ نتایج ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپید ..... ۱۰۲
- نمودار ۶-۳ نتایج ارزیابی میزان گلوتاتیون ..... ۱۰۴

## فهرست علائم، نشانه ها و اختصارات

### Abbreviation

**ALP:** Aluminum Phosphide

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**GSH:** Glutathione

**MDA:** Malondialdehyde

**NADH:** Nicotinamide adenine dinucleotide

**ATP:** Adenosine triphosphate

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**SVT:** Supraventricular tachycardia

**NADPH:** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

**ARDS:** Acute Respiratory Distress Syndrome

**ALI:** Acute Lung Injury

**ICU:** Intensive Care Unit

**PET:** Post-Exposure Treatment

**STEL:** Short-Term Exposure Limit

**ECG:** Electrocardiogram

**PCB:** Programmed cell death

**PLGA:** poly(lactic-co-glycolic acid)

**PEG:** Polyethylene glycol

**BDNF:** Brain-derived neurotrophic factor

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**IL-b:** Interleukin 1 beta

**RA:** Rheumatoid arthritis



**COX-2:** Cyclooxygenase 2

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

**HepG2:** Human liver cancer cell line

**ERK1/2:** Extracellular signal-regulated protein kinase

**HDL:** High-density lipoprotein

**CHD:** Chronic Heart Disease

**DOX:** Doxorubicin

**PPAR- $\gamma$ :** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

**CK-MB:** Creatine kinase-MB

**LDH:** Lactate dehydrogenase

**CAT:** Catalase

**SOD:** Superoxide dismutase

**NO:** Nitric oxide

**iNOS:** Nitric oxide synthases

**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase

**NAC:** N-acetylcysteine

**EGCG:** Epigallocatechin-3-gallate

**HEPA:** High-efficiency particulate air

**LPS:** Langendorff Perfusion System

**ELISA:** Enzyme-Linked Sorbent Assay

**HEPES:** 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethane-sulfonic acid

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**TRIS-HCL:** 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1, 3-propanediol hydrochloride

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

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

**CCTM:** Cell Culture Test Materials

**DCFH-DA:** 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate

**MMPC:** Mitochondrial Membrane Potential Collapse

**DTNB:** 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

**TCA:** Trichloroacetic acid

**TBA:** 2-Thiobarbituric acid

**MPTP:** Mitochondrial permeability transition pore

**MDA:** Malondialdehyde

**MOMP:** Mitochondrial outer membrane permeabilization

**LMP:** Lysosomal membrane permeabilization

**GSSG:** Glutathione Disulfide

**ANOVA:** Analysis Of Variance