

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجهی دکتری حرفه ای داروسازی

عنوان

بررسی سمیت ترکیب مت آمفتامین در میتوکندری های ایزوله شده از قلب رت و

بررسی نقش کلسی تریول در مهار سمیت آن

استاد راهنما

دکتر احمد سلیمی

نگارش

مرتضی مینوئی

شماره پایان نامه:

۹۱-۵

شهریور ۱۴۰۰

با احترام، تقدیم میشود به پدر و مادر عزیزتر از
جانم

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.

و با تقدیر و تشکر فراوان از استاد گرامی ، آقای
دکتر احمد سلیمی

که با ذهنی همیشه آموزنده و قلبی همواره مهربان و پر
امید، مرا در تهیه و تدوین این پایان نامه راهنمایی و یاری
نمودند.

چکیده

مقدمه: دینامیک مینوکندریایی به بقای شرایط عادی و هموئوستاز سلولی کمک میکند و به هم خوردن نظم میتوکندری و بروز اختلال در عملکرد طبیعی آن، می‌تواند به شرایط پاتولوژیک شدیدی مثل سمیت قلبی منجر شود. شواهد زیادی وجود دارد مبنی بر اینکه سمیت قلبی ناشی از مت‌آمفتامین مستقیماً میتوکندری را هدف قرار میدهد. در این مطالعه تلاش کردیم این فرضیه را که آیا مت‌آمفتامین میتواند بطور مستقیم و با مسیرهای مرتبط با استرس اکسیداتیو باعث ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری شود و همچنین آیا کلسی تریول که بعنوان ماده ای که نقش مهمی در عملکرد طبیعی میتوکندری دارد و همچنین ماده ای آنتی اکسیدانت است میتواند اثرات مخرب مت‌آمفتامین را بر روی میتوکندری‌های قلبی ایزوله و جدا شده از قلب موش را تا حدودی خنثی کند یا خیر.

مواد و روش‌ها: میتوکندری‌های قلبی توسط لیز مکانیکی و سانتریفیوژ از قلب موش تهیه شد. میتوکندری‌های ایزوله شده با غلظت ۲۵۰ میکرومولار مت‌آمفتامین و همچنین غلظت‌های مختلف کلسی تریول (۱، ۲.۵ و ۵ میکرومولار) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مواجهه داده شدند. پارامترهای مختلف سمیت میتوکندریایی از جمله افت پتانسیل غشای میتوکندری یا (Mitochondrial membrane potential) MMP، میزان تورم میتوکندری، میزان فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون لیپیدها مورد بررسی قرار گرفتند. ما سعی کردیم در این مطالعه این احتمال را بررسی کنیم که آیا مت‌آمفتامین میتواند بطور مستقیم و بواسطه مسیرهای مرتبط با استرس اکسیداتیو باعث بروز سمیت میتوکندریایی شود و همچنین کلسی تریول که بعنوان یک ماده مورد نیاز میتوکندری برای داشتن فعالیت هادی تلقی میشود، میتواند این سمیت مربوط به مت‌آمفتامین را در میتوکندری‌های ایزوله شده قلب موش تا حدودی کاهش دهد یا خیر.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد مت‌آمفتامین با غلظت ۲۵۰ میکرومولار باعث تغییرات چشمگیری در عملکرد میتوکندری‌های ایزوله شد و میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش داد و باعث افت پتانسیل غشای میتوکندری، ایجاد تورم، افزایش استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای میتوکندری‌ها شد. همچنین در این مطالعه به وضوح مشخص شد که کلسی تریول با غلظت ۵ میکرومولار میتواند آسیب‌های نامبرده را در میتوکندری‌های ایزوله شده کم کند. در مجموع نتیجه ای که از این مطالعه بدست آمد نشانگر این بود که مت‌آمفتامین میتواند بطور مستقیم و با افزایش استرس اکسیداتیو، در عملکرد میتوکندری‌های ایزوله شده قلبی اختلال ایجاد کند و ماده کلسی تریول بعنوان یک ماده آنتی اکسیدان میتواند این اثرات مخرب را تا حدودی مهار نماید.

بحث و نتیجه گیری: در مجموع، نتایج مطالعات ما نشان داد مت‌آمفتامین یک ترکیب کاردیوتوکسیک است و میتواند از مسیرهای مختلفی باعث آسیب رسانی به میتوکندری شود و کلسی تریول نیز به واسطه اثرات آنتی اکسیدانی که دارد میتواند این سمیت را تا حدودی کاهش دهد.

کلمات کلیدی: ویتامین D، استرس اکسیداتیو، سمیت قلبی، کاردیومیوپاتی، داروهای غیرمجاز

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۱-۱-۱	معرفی مت آمفتامین
۲
۱-۲-۱	فارماکوکینتیک مت آمفتامین
۴
۱-۳-۱	شیوع مصرف مت آمفتامین در جهان
۵
۱-۴-۱	ورود مت آمفتامین به ایران
۶
۱-۴-۱	شیوع مصرف مت آمفتامین در بین مردم ایران
۷
۱-۴-۲	محبوبیت مت آمفتامین در بین معتادان مواد مخدر در ایران
۸
۱-۴-۳	شیوع مصرف مت آمفتامین در بین زنان ایرانی
۸
۱-۵-۱	عوارض مت آمفتامین
۹
۱-۵-۱	عوارض قلبی عروقی مت آمفتامین
۱۲
۱-۵-۱-۱	مکانیسم‌های بروز سمیت در سیستم قلب و عروق
۱۳
۱-۵-۱-۲	انقباض عروقی و پرفشاری خونی ریوی مرتبط با مت آمفتامین
۱۵
۱-۵-۱-۳	نقش مت آمفتامین در بیماریهای آترواسکلروتیک قلبی
۱۷
۱-۵-۱-۴	مت آمفتامین و آریتمی قلبی
۱۸
۱-۵-۱-۵	مت آمفتامین و کاردیومیوپاتی
۱۹
۱-۵-۱-۶	جمع‌بندی عوارض قلبی-عروقی مت آمفتامین
۲۰
۱-۶-۱	ساختمان قلب
۲۲
۱-۷-۱	هایپرتروفی قلبی
۲۴
۱-۸-۱	نارسایی قلبی
۲۵
۱-۹-۱	پاسخهای برگشت پذیر و برگشت ناپذیر سمیت قلبی
۲۵
۱-۱۰-۱	مرگ سلول‌های قلبی و مسیرهای بیوشیمیایی مرتبط
۲۵
۱-۱۰-۱	آپوپتوز در سلول‌های قلبی
۲۵
۱-۱۰-۲	نکروز در سلول‌های قلبی
۲۶
۱-۱۰-۳	نقش میتوکندری در کنترل مرگ سلولی
۲۶
۱-۱۰-۴	بیوسنتز غیر عادی مولکولهای زیستی در میتوکندری
۲۷
۱-۱۰-۵	تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)
۲۷
۱-۱۱-۱	ویتامین D
۲۸
۱-۱۱-۱	اثرات مهم و مفید ویتامین D در سیستم قلبی-عروقی بدن
۳۱

- ۱۲-۱- اهداف ۳۲
- ۱-۱۲-۱- هدف کلی ۳۲
- ۲-۱۲-۱- اهداف اختصاصی ۳۲
- ۱۳-۱- فرضیات یا سوالات پژوهش ۳۲

فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها

- ۱-۲- مواد شیمیایی ۳۵
- ۲-۲- تجهیزات و وسایل ۳۶
- ۳-۲- بافرها و شناساگرها و ترکیبات آنها ۳۷
- ۱-۳-۲- معرف کوماسی بلو (معرف برادفورد) ۳۷
- ۲-۳-۲- تهیه بافرها ۳۹
- ۱-۲-۳-۲- بافر شستشو ۴۰
- ۲-۲-۳-۲- بافر ایزولاسیون ۴۱
- ۳-۲-۳-۲- بافر تورم ۴۲
- ۴-۲-۳-۲- بافر MTT ۴۲
- ۵-۲-۳-۲- بافر MMP ۴۳
- ۶-۲-۳-۲- بافر تنفسی ۴۴
- ۴-۲- حیوانات مورد مطالعه ۴۴
- ۵-۲- مراحل استخراج میتوکندری از قلب موش‌ها ۴۴
- ۶-۲- تهیه غلظت‌های مختلف از ماده مت‌آمفتامین ۴۶
- ۷-۲- تهیه غلظت‌های مختلف کلسی تریول ۴۸
- ۸-۲- گروه‌های مورد مطالعه ۴۹
- ۹-۲- اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز ۴۹
- ۱۰-۲- سنجش میزان تورم میتوکندری ۵۰
- ۱۱-۲- اندازه‌گیری تولید ROS میتوکندریایی ۵۲
- ۱۲-۲- سنجش میزان افت پتانسیل غشاء میتوکندری ۵۳
- ۱۳-۲- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید ۵۳
- ۱۴-۲- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری آنها ۵۵

فصل سوم: نتایج

- ۱-۳- افت فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی توسط مت‌آمفتامین و مقابله کلسی تریول با آن ۵۷
- ۲-۳- اثر محافظتی کلسیتریول در مقابل تورم میتوکندریایی ناشی از سمیت مت‌آمفتامین ۵۹

- ۳-۳- تاثیر کلسی تریول بر میزان ROS تولید شده در میتوکندری توسط مت آمفتامین ۶۰
- ۳-۴- اثر محافظتی کلسی تریول در جلوگیری از افت پتانسیل غشای میتوکندری ناشی از مت امفتامین... ۶۱
- ۳-۵- اثر مهاری کلسی تریول بر روی لیپید پراکسیداسیون میتوکندری ناشی از مت آمفتامین ۶۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

- ۴-۱- بحث و نتیجه گیری ۶۶
- ۴-۲- نتیجه نهایی ۷۴
- ۴-۳- محدودیت‌ها ۷۵
- ۴-۴- پیشنهادات ۷۵
- فهرست منابع و ماخذ ۷۶
- چکیده انگلیسی ۹۱

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۳۵	جدول (۱-۲) مواد شیمیایی به کار رفته
۳۶	جدول (۲-۲) تجهیزات و وسایل به کار رفته
۳۷	جدول (۳-۲) محتویات محلول کوماسی بلو
۴۰	جدول (۴-۲) اجزای بافر شستشو
۴۱	جدول (۵-۲) محتویات بافر ایزولاسیون
۴۲	جدول (۶-۲) محتویات بافر تورم
۴۳	جدول (۷-۲) محتویات بافر MTT
۴۳	جدول (۸-۲) محتویات بافر MMP
۴۴	جدول (۹-۲) محتویات بافر تنفسی

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل (۱-۱) بلورهای مت‌آمفتامین	۲
شکل (۲-۱) ساختار شیمیایی آمفتامین (چپ) و مت‌آمفتامین (راست)	۳
شکل (۳-۱) آسیب‌های مت‌آمفتامین در حفره دهانی	۱۱
شکل (۴-۱) مسیر تاثیر داروها و زنوبیوتیک‌ها در بروز نارسایی قلبی	۱۴
شکل (۵-۱) نقش داروها و مواد زنوبیوتیک در بروز نارسایی و هایپرتوفی قلب	۱۵
شکل (۶-۱) سمیت کاتکول آمین و تاثیر آن در بروز اختلالات قلبی	۲۱
شکل (۷-۱) آناتومی مقدماتی قلب	۲۲
شکل (۸-۱) ساختار پروتئین‌های انقباضی عضلات قلبی	۲۳
شکل (۹-۱) انواع هایپرتروفی قلبی	۲۴
شکل (۱۰-۱) عوامل موثر در کنترل مرگ سلولی توسط میتوکندری	۲۷
شکل (۱۱-۱) ساختار مولکولی کوله کلسیفرول	۲۹
شکل (۱۲-۱) ساختار شیمیایی 15-OH و 1,25-(OH) ₂	۳۰
شکل (۱۳-۱) مراحل ساخت مشتقات ویتامین D در بدن انسان	۳۰
شکل (۱-۲) غلظت‌های لود شده BSA به همراه معرف کوماسی بلو	۳۸
شکل (۲-۲) بافر شستشو	۴۰
شکل (۳-۲) بافر ایزولاسیون	۴۱
شکل (۴-۲) موقعیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در غشای میتوکندری	۴۲
شکل (۵-۲) مراحل بیهوشی و خارج کردن قلب موش	۴۶
شکل (۶-۲) تورم میتوکندری	۵۱
شکل (۷-۲) نتایج پراکسیداسیون لیپید توسط رادیکال‌های آزاد	۵۴
شکل (۱-۳) تاثیر غلظت‌های مختلف مت‌آمفتامین بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز	۵۷
شکل (۲-۳) تاثیر محافظتی کلسی تریول در مقابل اثرات سمی مت‌آمفتامین بر روی آنزیم سوکسینات دهیدروژناز	۵۸
شکل (۳-۳) تاثیر کلسی تریول بر میزان تورم میتوکندریایی ناشی از مت‌آمفتامین	۵۹
شکل (۴-۳) تاثیر کلسی تریول بر میزان ROS تولید شده در نتیجه تماس با مت‌آمفتامین	۶۱
شکل (۵-۳) تاثیر محافظتی کلسی تریول بر روی افت MMP ناشی از مت‌آمفتامین	۶۲
شکل (۶-۳) تاثیر کلسی تریول بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندریایی ناشی از مت‌آمفتامین	۶۳

فهرست نمودار

صفحه	عنوان
۳۹	نمودار (۱-۲) میزان جذب غلظت‌های مختلف آلومین

2-AG : 2-arachidonoylethanolamine

AA : Arachidonic Acid

AEA : N-arachidonylethanolamine-anandamide

ATP : Adenosine Triphosphate

BSA : Bovine Serum Albumin

CHF : Congestive Heart Failure

CK : Creatine Kinase

CNS : Central Nervous System

CYP : Cytochrome P450

DCHF-DA : 2',7'-Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate

DM : Diabetes Mellitus

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

DNA : Deoxyribonucleic Acid

ECM : Extracellular Matrix

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid

ETC : Electron Transport Chain

FFA : Free Fatty Acid

GPCRs : G Protein Coupled Receptors

GPx : Glutathione Peroxidase

GSH : Glutathione

GSSG : Glutathione Disulfide

HDL : High-density Lipoprotein

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HTN : Hypertension

IFN γ : Interferon Gamma

IMM : Inter Mitochondrial Membrane

IQ : intelligence Quotient

LDL : Low-density Lipoprotein

LPS : Lipopolysaccharide

MDA : Malondialdehyde

MHC : Myosin Heavy Chain

MI : Myocardial Infarction

MLC : Myosin Light Chain

MMP : Mitochondrial Membrane Protentional
MPT : Mitochondrial Permeability Transition
MPTP : Mitochondrial Permeability Transition pore
MS : Multiple Sclerosis
mt DNA : Mitochondrial DNA
MTT : Measures the reduction of a Tetrazolium component
NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF- κ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMDA : N-Methyl-D-aspartic acid or N-Methyl-D-aspartate
OMM : Outer Mitochondrial Membrane
RH123 : Rhodamine 123
ROS : Reactive Oxygen Species
SDH : Succinate Dehydrogenase
SOD : Superoxide Dismutase
SIRT3 : Sirtuin (Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog)3
TBA : Thiobarbituric acid
TCA : Trichloroacetic acid
TG : Triglyceride
TNF- α : tumor necrosis factor alpha