بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان‌نامه‌ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان

بررسی اثر حفاظتی فرم فعال ویتامین D در مهارسمیت عصبی ایجادشده توسط سیتارابین درموش صحرایی نر

استاد راهنما

دکتر احمد سلیمی

نگارش

محنا بی نیاز

شماره پایان نامه

د-۱۲۱

اردیبهشت ۱۴۰۱

تقدیم به

پدرم که در طول تحصیل تنها یارو راهنمای من بوده

و

مادرم که همواره با دلسوزی مشوق من بوده است.

پدر و مادر عزیز و مهربانم از اینکه در تمام مراحل زندگی یار و پشتیبانم بوده‌اید بی‌نهایت سپاسگزارم نتیجه یکی از بزرگترین تلاش های زندگیم را تقدیم مهربانی هایتان می کنم.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و همکاری های بی دریغ و بی شائبه استاد ارجمند اقای دکتر احمد سلیمی که در تمام مراحل تنظیم و تدوین این پایانامه، اینجانب را راهنمایی و ارشاد فرمودند صمیمانه سپاسگزاری نموده و توفیق روز افزون ایشان را در راه تعالی و پیشرفت آموزش عالی کشور عزیزمان، از درگاه خداوند متعال خواستارم.

چکیده

مقدمه و هدف: سیتارابین (Ara-C) یک داروی ضد سرطان موثر در درمان بدخیمی های خونی است و یکی از سمیت های رایج آن سمیت عصبی است. بسته به روش تجویز و دوز سیتارابین، سمیت هایی مانند میلوپاتی، لکوآنسفالوپاتی نکروزه، تشنج نوروپاتی محیطی، اختلال عملکرد مغزی و سندرم حاد مخچه در بیماران مواجهه شده گزارش شده است. سیتارابین از طریق مهار سنتز DNA میتوکندریایی، اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو، کاهش ATP، تشکیل ROS و استرس اکسیداتیو باعث ایجاد سمیت می‌شود. بنابراین، ما فرض کردیم که عوامل محافظ میتوکندری و آنتی اکسیدان ها می توانند سمیت عصبی ناشی از سیتارابین را کاهش دهند.

مواد و روش ها: بیست و چهار موش صحرایی نر ویستار در چهار گروه مساوی شامل گروه کنترل، Ara-C به اضافه ویتامین D، گروه ویتامین D و گروه سیتارابین قرار گرفتند. ویتامین D (500 U/kg، داخل صفاقی) یک بار در روز به مدت ۱۰ روز متوالی از روز اول تا دهم به حیوان داده شد. Ara-C با دوز روزانه 70 mg/kg از روز یازدهم تا پانزدهم در تمام گروه‌های دریافت کننده سیتارابین تجویز شد. فعالیت استیل کولین استراز (AChE) و بوتیریل کولین استراز (BChE)، غلظت آنتی اکسیدان ها (گلوتاتیون کاهش یافته و گلوتاتیون اکسیده شده)، نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو (مالون دی آلدئید)، پارامترهای سمیت میتوکندری (فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، تورم میتوکندریایی، پتانسیل غشاء میتوکندری و تولید گونه های فعال اکسیژن) و همچنین تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت های مغز اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج ما نشان داد که قرار گرفتن در معرض Ara-C به طور قابل توجهی پارامترهای هیستوپاتولوژیک، فعالیت آنزیم های مغز (AChE و BChE)، سطوح بیومارکرهای آنتی اکسیدانی (GSH)، عملکردهای میتوکندری را کاهش می دهد، اما به طور قابل توجهی سطوح بیومارکرهای استرس اکسیداتیو (MDA)، گلوتاتیون اکسیده(GSSG) و سمیت میتوکندری را افزایش می دهد. تقریباً تمام پارامترهای ذکر شده قبلی (به ویژه سمیت میتوکندری) توسط ویتامین D در مقایسه با گروه Ara-C اصلاح شدند. این یافته‌ها به طور قطعی نشان می‌دهند که تجویز ویتامین D از طریق تعدیل فعالیت‌های اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدانی و اثرات محافظتی میتوکندریایی (میتوحفاظتی) محافظت کافی در برابر سمیت عصبی ناشی از Ara-C ایجاد می‌کند.

بحث و نتیجه گیری: در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که Ara-C یک ماده عصبی قوی است و می‌تواند آسیب‌های جدی به میتوکندری وارد کند و ویتامین D می‌تواند با فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود این آسیب‌ها را بهبود بخشد.

کلمات کلیدی: داروهای ضد نئوپلاستیک، میتوکندری، سمیت عصبی، اثر محافظت کننده عصبی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- معرفی سیتارابین ۲

۱-۲- مکانیسم اثر سیتارابین..... ۳

۱-۳- فارماکوکینتیک سیتارابین..... ۴

۱-۴- مسیر تجویز و دوز موثر سیتارابین ۵

۱-۵- اصلاح دوز ۶

۱-۶- مقاومت نسبت به سیتارابین ۶

۱-۷- عوارض سیتارابین ۷

۱-۸- بیماری های تخریب کننده عصب..... ۸

۱-۹- سمیت عصبی با داروهای شیمی درمانی ۹

۱-۱۰- سمیت عصبی با سیتارابین..... ۱۰

۱-۱۱- مکانیسم سمیت عصبی با سیتارابین..... ۱۲

۱-۱۱-۱- میتوکندری ۱۲

۱-۱۱-۲- لیزوزوم ۱۴

۱-۱۱-۳- نارسایی کلیوی..... ۱۵

۱-۱۲- ویتامین D.....۱۶

۱-۱۲-۱- اپیدمیولوژی فقر ویتامین D در جوامع، از گذشته تا به امروز ۱۸

۱-۱۲-۲- اشکال ویتامینD ۱۹

۱-۱۲-۳- ذخیره و دفع ویتامین D..... ۲۲

۱-۱۲-۴- عوامل خطر موثر بر فقر ویتامینD ۲۳

۱-۱۲-۵- گیرنده ویتامین D ۲۳

۱-۱۲-۶- VDRدر سیستم عصبی مرکزی (CNS)..... ۲۴

۱-۱۲-۷- نقش ویتامین D در سیستم عصبی ۲۵

۱-۱۳- بررسی متون ۲۷

۱-۱۴- اهداف ۲۸
۱-۱۴-۱- اهداف کلی ۲۸
۱-۱۴-۲- اهداف اختصاصی ۲۸
۱-۱۵- فرضیات و سوالات تحقیق ۲۹

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- نوع مطالعه ۳۲
۲-۲- مواد شیمیایی ۳۲
۲-۳- بافرها و محلول‌ها ۳۳
۲-۳-۱- بافر ایزولاسیون (جداسازی) میتوکندری ۳۴
۲-۳-۲- بافر تنفس میتوکندری ۳۴
۲-۳-۳- پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) ۳۵
۲-۳-۴- بافر سنجش میتوکندری ۳۵
۲-۳-۵- بافر تورم میتوکندری ۳۷
۲-۴- تجهیزات و لوازم موردنیاز ۳۷
۲-۵- حیوانات مورد مطالعه ۴۱
۲-۷- گروه های مورد مطالعه ۴۴
۲-۸- مطالعات هیستوپاتولوژیک ۴۵
۲-۹- جداسازی میتوکندری ۴۵
۲-۱۰- اندازه گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و بوتریل کولین استراز: ۴۶
۲-۱۱- سنجش پراکسیداسیون لیپید ۴۶
۲-۱۲- اندازه گیری گلوتاتیون کاهش یافته (GSH) و دی سولفید اکسید شده (GSSG) ۴۷
۲-۱۴- اندازه گیری تورم میتوکندری ۴۹
۲-۱۵- اندازه گیری تولید ROS در میتوکندری ۴۹
۲-۱۶- اندازه گیری فروپاشی غشای میتوکندری ۵۰
۲-۱۷- داده ها و تجزیه و تحلیل های آماری ۵۱

فصل سوم: نتایج

۳-۱- اثر مهاری ویتامین D بر تغیرات بافتی مناطق مغز میانی موش صحرایی ناشی از سیتارابین..... ۵۳

۳-۲- اثر مهاری ویتامین D بر استیل‌کولین استراز و بوتیریل‌کولین استراز در سمیت عصبی ناشی از سیتارابین..... ۵۳

۳-۳-اثر مهاری ویتامین D بر روی لیپید پراکسیداسیون ناشی از سیتارابین در بافت مغز..... ۵۵

۳-۴- اثر مهاری ویتامین D بر گلوتاتیون احیاء و اکسیده ۵۶

۳-۵- کاهش فعالیت سوکسینات دی هیدروژناز میتوکندریایی توسط سیتارابین و مقابله ویتامین D با آن ۵۷

۳-۶- اثر محافظتی ویتامین D در مقابل تورم میتوکندریایی ناشی از سمیت سیتارابین ۵۸

۳-۷-تاثیر ویتامین D بر میزان ROS تولید شده در میتوکندری توسط سیتارابین ۵۹

۳-۸-اثر محافظتی ویتامین D در جلوگیری از افت پتانسیل غشای میتوکندری ناشی از سیتارابین ۶۰

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث.....۶۳

۴-۲- نتیجه نهایی ۷۳

۴-۳- محدودیت ها..... ۷۳

۴-۴-پیشنهادات ۷۴

منابع و مآخذ..... ۷۵

چکیده انگلیسی.....۸۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- ساختار شیمیایی سیتارابین ۲

شکل ۱-۲- مکانیسم اثر سیتارابین ۳

شکل ۱-۳- سمیت عصبی ناشی از ara-C در نورون‌های DRG ۱۳

شکل ۱-۴- مکانیسم سمیت عصبی ناشی از سیتارابین در مخچه موش ضحرایی ۱۴

شکل ۱-۵- عرض جغرافیلیی و تاثیر آن در جذب پوستی ویتامین D ۱۸

شکل ۱-۶- تفاوت ساختاری ویتامین D_2 با ویتامین D_3 ..... ۲۰

شکل ۱-۷- کانفورمرهای cZc و tZc ویتامینD ۲۱

شکل ۱-۸- توپوگرافی توزیع VDR در CNS ۲۵

شکل ۲-۱- آنزیم سوکسینات دهیدروژناز ۳۶

شکل ۲-۲- سانتریفیوژ یخچال دار ۳۸

شکل ۲-۳- بن ماری ۳۹

شکل ۲-۴- انکوباتور ۳۹

شکل ۲-۵- یخ ساز ۳۹

شکل ۲-۶- ست سمپلر ۴۰

شکل ۲-۷- هموژنایز شیشه ای ۴۰

شکل ۲-۸- PH سنج ۴۰

شکل۲-۹- ترازو ۴۱

شکل ۲-۱۰- موش صحرایی ۴۲

شکل ۲-۱۱- جداسازی مغز موش ۴۵

شکل ۲-۱۲- سنجش پراکسیداسیون لیپیدی ۴۷

شکل ۲-۱۳- سنجش گلوتاتیون احیا ۴۸

شکل ۲-۱۴- تورم میتوکندری ۴۹
شکل ۲-۱۵- تولید ROS در میتوکندری..... ۵۰
شکل۳-۱- اثر ویتامین D بر تغیرات بافتی مناطق مغز میانی موش صحرایی ناشی از سیتارابین ۵۳
شکل ۳-۲- آ و ب تاثیر ویتامین D بـر میـزان فعالیـت اسـتیل کـولین اسـتراز و بوتیریـل کـولین اسـتراز در میتوکندری های تیمار شده با سیتارابین ۵۴
شکل ۳-۳- تاثیر ویتامین D بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندریایی ناشی از سیتارابین..... ۵۵
شکل ۳-۴- آ و ب تاثیر ویتامین D بر میزان احیاء و اکسیداسیون گلوتاتیون در بافت مغز موش های صحرایی که سیتارابین تزریق شده اند.....۵۶
شکل۳-۵- تاثیر سیتارابین بر روی فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و اثر محافظتی ویتامین D..... ۵۷
شکل ۳-۶- تاثیر ویتامین D بر میزان تورم میتوکندریایی ناشی از سیتارابین..... ۵۸
شکل ۳-۷- تاثیر ویتامین D بر میزان ROS - تولید شده در نتیجه تماس با سیتارابین ۵۹
شکل ۳-۸- تاثیر محافظتی ویتامین D بر روی افت MMP - ناشی از سیتارابین.....۶۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- مواد شیمیایی به کار رفته ۳۲
جدول ۲-۲- اجزای بافر ایزولاسیون میتوکندری ۳۴
جدول ۲-۳- اجزای بافر تنفسی ۳۴
جدول ۲-۴- اجزای بافر MMP ۳۵
جدول ۲-۵- اجزای بافر سنجش میتوکندری ۳۶
جدول ۲-۶- اجزای بافر تورم میتوکندری ۳۷
جدول ۲-۷- لوازم و تجهیزات ۳۷
جدول ۲-۸- انواع متغیرها ۴۲
جدول ۲-۹- محلول مورد استفاده برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و بوتریل کولین استراز ۴۶

اختصارات

Cytarabine: 4-amino-1-β-D-arabinofuranosyl-2-(1H)-pyrimidinone

CML: Chronic myelogenous leukemia

NHL: Non-Hodgkin Lymphoma

MDS: Myelodysplastic Syndromes

DNA: Deoxyribonucleic acid

SC: Subcutaneous injection

IT: Intrathecal injection

IV: Intravenous injection

MS: Multiple Sclerosis

CNS: Central Nervous System

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

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

PNS: Peripheral Nervous System

ROS: Reactive oxygen species

2-AG: 2-Ara-Chidodonoyalglyceral

AA: Ara-Chidonic Acid

AEA: N-Ara-Chidonoyl-ethanolamine-anandamide

ATP: Adenosine Triphosphate

BSA: Bovine Serum Albumin

CHF: Congestive Heart Failure

CK: Creatine Kinase

VDR: Vitamin D receptor

MMP: Mitochondrial membrane potential

MPT: Mitochondrial Permeability Transition

EDTA: Ethylene diaminetetraacetic acid

EGTA: Ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N′, N′-tetraacetic acid

RH123: Rhodamine 123

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

MLH1: MutL homolog 1

MLH2: MutL homolog 2

mPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

TFP: trifluoperazine