

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکتری حرفه‌ای داروسازی

عنوان

**بررسی اثرات بالقوه درمانی ترکیب کرایسین در مهار سمیت قلبی ایجاد شده توسط
تراستوزومب در موش صحرایی**

اساتید راهنما

دکتر احمد سلیمی

دکتر لیلا رضایی شیرمرد

نگارش

نسیم زمانی

شماره پایان نامه

د-۱۲۲

خرداد ۱۴۰۱

تقدیم به:

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان رسانم.
ماحصل آموخته‌هایم را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می‌نمایم.

به: محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم،

کسانی که سرآغاز تولد من هستند، از یکی زاده می‌شوم و از دیگری جاودانه

مادرم که سجده ایثارش گل محبت در وجودم پروراند و دامان گهربارش لحظه‌های مهربانی به من
آموخت.

پدر مهربانم که همواره حامی من و بودنش تاج افتخاری است بر سرم؛ والدینی که نامشان دلیلی بر
بودنم

و در نهایت عشق تقدیم به:

برادر نازنینم که وجودش همچون مرواریدی درخشان در پیله صدف وار من است.

تقدیر و تشکر

نخستین سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بنده کوچکس را در دریای بیکرانیش اندیشه، قطره‌ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه ناب آموزگارانی بزرگ به تماشا نشیند.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از اساتید راهنمای فرهیخته دکتر احمد سلیمی و دکتر لیلا رضایی شیرمرد که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های کارساز و سازنده بارور ساختند؛ تقدیر و تشکر می‌نمایم.

از هیئت محترم داوران که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

و با تشکر خالصانه از همه دوستانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نمودند.

چکیده

مقدمه:

تراستوزومب یک آنتی بادی مونوکلونال انسانی است که گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدمی انسانی (HER2) را هدف قرار می‌دهد، که به طور چشمگیری بیماران مبتلا به HER2 مثبت را بهبود بخشیده است. یکی از عوارض جانبی تراستوزومب سمیت قلبی آن است که منجر به قطع دارو در بیماران سرطانی می‌شود. مطالعات نشان داده است که تراستوزومب از طریق مسیر میتوکندریایی وابسته به تولید ROS و استرس اکسیداتیو، سمیت قلبی را القا می‌کند. بنابراین استفاده از عوامل آنتی اکسیدان و محافظ میتوکندری می‌تواند نقش مهمی در کاهش آسیب میتوکندری ناشی از تراستوزومب ایفا کند. ترکیب کرایسین به عنوان محافظ بالقوه عملکرد قلبی عروقی در مدل‌های حیوانی است که در این مطالعه هدف ما ارزیابی توانایی کرایسین برای کاهش اختلالات میتوکندری ناشی از تراستوزومب و سمیت قلبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و فلوسایتومتری فاکتورهای خونی شامل (تروپونین، لاکتات دهیدروژناز و CKME کراتین کیناز)، گلوتاتیون اکسیده یا GSSG، فاکتورهای میتوکندریایی (تورم - MTT، سقوط پتانسیل غشا MMP - گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS) و لیپیداکسیداسیون MDA در سلول‌های قلبی جدا شده از قلب موش اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها:

یافته‌هایی که به دست آوردیم نشان می‌دهد که تراستوزومب (۲/۲۵ mg) می‌تواند باعث بروز سمیت سلولی، تشکیل رادیکال فعال، سقوط پتانسیل غشای میتوکندری، لیپیداکسیداسیون و استرس اکسیداتیو شود در حالی که کرایسین می‌تواند از بروز عوارض جلوگیری کرده و باعث کاهش سمیت قلبی ناشی از تراستوزومب شود.

بحث و نتیجه گیری:

براساس نتایج به دست آمده، کرایسین از طریق مهار رادیکال فعال و مهار اختلال در عملکرد میتوکندری از کاردیومیوسیت‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از کرایسین را نشان می‌دهد و می‌تواند یک عامل امیدوار کننده در درمان بیمارانی که دچار سمیت قلبی ناشی از تراستوزومب می‌شوند باشد.

واژگان کلیدی:

تراستوزومب - کرایسین - کاردیوتوکسیستی - کاردیومیوسیت

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه.....	۱
۱-۱- تراستوزومب.....	۲
۱-۱-۱- ساختار تراستوزومب.....	۲
۱-۱-۲- مکانیسم اثر داروی تراستوزومب.....	۳
۱-۱-۳- مکانیسم سمیت قلبی داروی تراستوزومب.....	۳
۱-۱-۴- موارد مصرف تراستوزومب.....	۵
۱-۱-۵- عوارض تراستوزومب.....	۵
۱-۱-۶- تداخلات دارویی تراستوزومب.....	۵
۲-۱- قلب.....	۵
۱-۲-۱- ساختار کلی قلب.....	۶
۲-۲-۱- سلول‌های قلبی.....	۷
۲-۲-۳- ضربان سازی.....	۷
۲-۲-۴- میوسیت.....	۸
۲-۲-۵- قلب و ATP.....	۸
۲-۲-۶- انقباض پذیری.....	۹
۲-۲-۷- سمیت قلبی.....	۹
۳-۱- سمیت خونی.....	۱۰
۴-۱- میتوکندری.....	۱۱
۱-۴-۱- نقش میتوکندری در بیماری‌های قلبی.....	۱۳
۲-۴-۱- میتوکندری و رادیکال‌های فعال اکسیژن.....	۱۴
۳-۴-۱- اثرات تراستوزومب بر روی میتوکندری.....	۱۷
۴-۴-۱- میتوکندری و مرگ سلولی.....	۱۸
۵-۱- گلوکوتایون.....	۱۹
۶-۱- پراکسیداسیون لیپید.....	۲۰
۷-۱- فلاونوئیدها.....	۲۱
۱-۷-۱- دسته بندی انواع فلاونوئیدها.....	۲۲
۲-۷-۱- ویژگی‌های فارماکولوژیکی فلاونوئیدها.....	۲۳
۸-۱- کرایسین.....	۲۳
۱-۸-۱- مکانیسم عمل کرایسین.....	۲۴
۲-۸-۱- اثر محافظت قلبی کرایسین.....	۲۵
۹-۱- بررسی متون.....	۲۶
۱۰-۱- اهداف و فرضیات.....	۲۷

۲۷	۱-۱۰-۱- هدف کلی
۲۷	۲-۱۰-۱- اهداف اختصاصی
۲۸	۱۱-۱-سوالات و فرضیات
۲۹	۱۲-۱- گردش کار
۳۰	فصل دوم: موادوروشها
۳۱	۱-۲-موادشیمیایی
۳۲	۲-۲- وسایل وتجهیزات آزمایشگاهی
۳۲	۱-۲-۲ وسایل اختصاصی
۳۲	۲-۲-۲ وسایل عمومی
۳۴	۳-۲-بافرها و محلولها
۳۴	۱-۳-۲-Isolation بافر
۳۵	۲-۳-۲-Assay بافر
۳۵	۳-۳-۲-MMP بافر
۳۶	۲-۳-۴-ROS بافر
۳۶	۲-۳-۵-بافر فسفات
۳۷	۲-۳-۶-بافر تعیین اکسیداسیون لیپیدها
۳۷	۲-۳-۷- محلول TRIS-HCL
۳۷	۲-۳-۸-محلول واکنش GSSG
۳۷	۲-۳-۹-مراحل ساخت محلول معروف کوماسی بلو
۳۸	۲-۳-۱۰-مراحل ساخت غلظت‌های استاندارد آلبومین
۳۸	۲-۳-۱۱-تست بردفورد
۳۸	۲-۴-۱-روش کار
۳۸	۲-۴-۱-آزمایشات حیوانی
۳۹	۲-۴-۲-جداسازی میتوکندری قلبی
۴۰	۲-۴-۳- بررسی هیستوپاتولوژیک
۴۰	۲-۴-۴- اندازه گیری فاکتورهای سرمی
۴۰	۲-۴-۵-اندازه گیری میزان GSH و GSSG
۴۱	۲-۴-۶-اندازه گیری مالون دی آلدهید
۴۱	۲-۴-۷-اندازه گیری فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز (تست MTT)
۴۲	۲-۴-۸-اندازه گیری تورم میتوکندریایی
۴۲	۲-۴-۹-اندازه گیری میزان رادیکال فعال اکسیژن
۴۳	۲-۴-۱۰- اندازه گیری سقوط پتانسیل غشای میتوکندری یا MMP
۴۳	۲-۵- تحلیل آماری

فصل سوم: نتایج.....	۴۵
۱-۳- نتایج هیستوپاتولوژیک.....	۴۶
۲-۳- نتایج اندازه‌گیری فاکتورهای سرمی.....	۴۶
۳-۳- نتایج اندازه‌گیری پارامترهای استرس اکسیداتیو.....	۴۸
۳-۳-۱- اثر کرایسین بر تغییرات گلوتاتیون اکسید GSSG ناشی از تراستوزومب.....	۴۸
۳-۳-۲- اثر کرایسین بر تغییرات گلوتاتیون احیا (GSH) ناشی از تراستوزومب.....	۴۹
۳-۳-۳- اثر کرایسین بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تراستوزومب در بافت قلب.....	۵۰
۴-۳- نتایج اندازه‌گیری عملکرد میتوکندری.....	۵۱
۳-۵- نتایج اندازه‌گیری تورم میتوکندریایی.....	۵۲
۳-۶- نتایج اندازه‌گیری میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن.....	۵۳
۳-۷- نتایج اندازه‌گیری پتانسیل غشای میتوکندری.....	۵۵
فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری.....	۵۷
۴-۱- بحث و نتیجه‌گیری.....	۵۸
۴-۲- محدودیت‌ها.....	۶۰
۴-۳- پیشنهادات.....	۶۱
منابع.....	۶۲
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED مصوبه کمیته اخلاق.....	
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED ارزشیابی هیات داوران.....	

$\Delta\phi_m$: Intrinsic mitochondrial membrane potential
ADCC: Anti body-dependent cellular cytotoxicity
ANOVA: Analysis of variance
AO: Acridine Orange
ATP: Adenosin Triphosphate
AV: Atrioventricular
Bax: Bcl-2-associated X protein
CBC: Complete blood count
CDR: call detail records
COX2: Cyclooxygenase-2
DCFH-DA: 2'-7'-dichlorofluorescin diacetate
DMSO: Dimethyl sulfoxide
DTNB: 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
DRDS: Division Of Respiratorg Disease Studies
EDATA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGTA: Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl ether) –N,N,N',N'- Tetraacetic Acid
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
ERK12: Extracellular regulated kinase $1\frac{1}{2}$
FAKS: Focal Adhesion Kinases
G-CSF: Granulocyte –Colony Stimulatiny Factor
HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HER-2: human epidermal growth factor receptor 2
LDH: Lactate dehydrogenase
LPO: Lipid peroxidation
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MMP: mitochondrial membrane potential
MPTP: mitochondrial permeability transition pore
MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCLX: Nova Chemicals Incorporated
NF-NB: Nuclear Factor Kappa B Cells
NK: Natural Killer
NRG1: Neuregulin 1
PDAR-Y: Peroxisome activated receptors
PDGF: Platelet-derived growth factor
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
ROS: Reactive oxygen species
RTK: Real-time kinematic
SA: Sino Atrial
SOD: Superoxide dismutase
TBA: Thio barbituric acid
TCA: Trichloroacetic Acide
TNF- α : Tumor necrosis factor
TRIS-HCL: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol hydrochloride
TZM : Trastuzumab
VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

فهرست جداول

جدول ۱-۲	لیست موادشیمیایی استفاده شده در پایان نامه	۳۱
جدول ۲-۲	وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی	۳۲
جدول ۳-۲	اجزای بافر ISOLATION	۳۴
جدول ۴-۲	اجزای بافر ASSAY	۳۵
جدول ۵-۲	اجزای بافر MMP	۳۵
جدول ۶-۲	اجزای بافر ROS (RESPIRATION BUFFER)	۳۶
جدول ۷-۲	اجزای بافر فسفات ۰/۱ مولار	۳۶
جدول ۸-۲	اجزای بافر تعیین اکسیداسیون لیپیدها	۳۷
جدول ۹-۲	اجزای محلول واکنش GSH	۳۷

فهرست نمودارها و شکل‌ها

- شکل ۱-۱: ساختار تراستوزومب ۲
- شکل ۱-۲: ساختار قلب و قسمت‌های تشکیل دهنده ی آن ۶
- شکل ۱-۳: میتوکندری ۱۳
- شکل ۱-۴: زنجیره انتقال الکترون ۱۶
- شکل ۱-۵: مکانیسم تولید رادیکال آزاد، آسیب و مرگ سلولی ۱۷
- شکل ۱-۶: پراکسیداسیون لیپید ۲۱
- شکل ۱-۷: ساختار فلاونوئید ۲۲
- شکل ۱-۸: ساختار کرایسین ۲۴
- شکل ۱-۹: تاثیر کرایسین بر بدن ۲۶
- شکل ۲-۱: میکروپلیت ریدر ۳۳
- شکل ۲-۲: فلوسایتومتر ۳۴
- شکل ۲-۳: موش نر نژاد ویستار ۳۹
- شکل ۲-۴: اندازه‌گیری مالون دی آلدهید ۴۱
- شکل ۳-۱: نتایج اندازه‌گیری هیستوپاتولوژیک ۴۶
- شکل ۳-۲: نتایج اندازه‌گیری LDH ۴۷
- شکل ۳-۳: نتایج اندازه‌گیری CK ۴۷
- شکل ۳-۴: نتایج اندازه‌گیری تروپونین ۴۸
- شکل ۳-۵: نتایج اندازه‌گیری GSSG ۴۹
- شکل ۳-۶: نتایج اندازه‌گیری GSH ۵۰
- شکل ۳-۷: نتایج اندازه‌گیری MDA ۵۱
- شکل ۳-۸: نتایج اندازه‌گیری عملکرد میتوکندری ۵۲
- شکل ۳-۹: نتایج اندازه‌گیری تورم میتوکندریایی ۵۳
- شکل ۳-۱۰: نتایج اندازه‌گیری میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن ۵۴
- شکل ۳-۱۱: نتایج اندازه‌گیری میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن : تاثیر تراستوزومب بر تشکیل ROS و اثر محافظتی کرایسین در کاردیومیوسیت‌های جدا شده ۵۴
- شکل ۳-۱۲: نتایج اندازه‌گیری پتانسیل غشای میتوکندری ۵۵
- شکل ۳-۱۳: نتایج اندازه‌گیری پتانسیل غشای میتوکندری : تاثیر تراستوزومب به فروپاشی MMP و اثر محافظتی کرایسین در کاردیومیوسیت‌های جدا شده ۵۶