بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان‌نامه‌ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان

بررسی اثر حفاظتی ترکیب تیموکینون در مهار سمیت عصبی ایجاد شده توسط سیتارابین در موش صحرایی

استاد راهنما

دکتر احمد سلیمی

نگارش

امیررضا نیکجو

شماره پایان نامه

د ۱۴۹

آذر ۱۴۰۱

تقدیم به

ماحصل آموخته هایم را تقدیم میکنم به:

پدر بزرگوار و مادر مهربانم

ای پدر از تو هر چه می گویم باز هم کم می آورم، خورشیدی شدی و از روشنایی ات جان گرفتم و در ناامیدی ها نازم را کشیدی و لبریزم کردی از شوق اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد.

و تو ای مادر، ای شوق زیبایی نفس کشیدن شادی هایم شدی و لحظه ها را با تمام وجود از من دور کردی و عمری خستگی ها را به جان خریدی تا اکنون توانستی طعم خوش پیروزی را به من بچشانی.

تشکر و قدردانی

شکر و سپاس پروردگار عالم را که مرا موفق گردانید تا در عرصه علم و دانش، پله‌های سعادت و تعالی را طی کنم و در

این راه پر فراز و نشیب خالصانه و دلسوزانه تاثیرکوچکی داشته باشم ،را بر خود واجب می دانم .

از استاد فاضل و اندیشمند جناب دکتر احمد سلیمی به عنوان اساتید راهنما که همواره با راهنمایی‌های ارزنده و حمایت‌های

بی‌دریغ خود، مرا مورد لطف و محبت خود قرار داه اند کمال تشکر را دارم .

چکیده

مقدمه: سیتارابین یک ماده ی آنتی متابولیک و آنتی نئوپلاستیک است که در درمان انواع لوسمی بکار می‌رود. مصرف این دارو با عوارضی چون تب، درد عضلانی و استخوانی و سمیت عصبی همراه است. سمیت عصبی یک عارضه غیرمعمول اما مخرب در استفاده از آن است، که ممکن است از خواب آلودگی و آتاکسی تا حتی تشنج و مرگ متغیر باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر حفاظتی ترکیب تیموکینون، یک اسانس موجود در دانه‌ی سیاهدانه، در مهار سمیت عصبی ایجاد شده توسط سیتارابین در موش صحرایی است.

مواد و روش کار: در این مطالعه ابتدا ۲۴ موش صحرایی نر نژاد spraque dewley تهیه و سازگار شدند و به چهارگروه شامل گروه کنترل، گروه دریافت کننده سیتارابین، گروه دریافت کننده تیموکینون، گروه دریافت کننده تیموکینون و سیتارابین تقسیم شدند. سپس تیموکینون با دوز ۰/۵mg به مدت ۱۰ روز و سپس سیتارابین با دوز ۷۰mg به مدت ۵ روز به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. ۲۴ ساعت بعد بافت مغز رت جداسازی و پارامترهای میتوکندریایی نظیر SDH، تورم میتوکندریایی، ROS, MMP و پارامتر های آسیب عصبی نظیر AchE و BchE و استرس اکسیداتیو و آسیب‌های هیستوپاتولوژیک بررسی شدند.

یافته ها: نتایج نشان می‌دهد تزریق داخل صفاقی تیموکینون میتواند اثرات سوء ناشی ازسیتارابین را در رت ها جبران کند و موجب بهبود پارامترهای میتوکندریایی از جمله MMP, ROS سطح آنزیم AchE، پراکسیداسیون لیپید، آسیب غشای میتوکندری، فعالیت آنزیم SDH و افزایش سطح GSH شود اما نتوانست سطوح تغییر یافته GSSG و BchE و آسیب‌های هیستوپاتولوژیک ناشی از سمیت عصبی سیتارابین را بازگرداند. در مجموع نتیجه به دست آمده به این صورت بود که سیتارابین موجب اختلال میتوکندریایی میشود و تیموکینون میتواند تا حد زیادی اثرات مخرب را مهار کند.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد که ترکیب تیموکینون با دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی در مهار سمیت عصبی ایجاد شده توسط سیتارابین در موش صحرایی اثر حفاظتی مناسبی دارد.

کلید واژه‌ها: تیموکینون، سمیت عصبی، سیتارابین، میتوکندری، استرس اکسیداتیو

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- سمیت عصبی ناشی از داروهای شیمی درمانی ۲

۱-۲- لوسمی ۲

۱-۳- معرفی سیتارابین ۳

۱-۳-۱- فارکودینامیک سیتارابین ۳

۱-۳-۱-۱- مکانیسم عمل سیتارابین ۴

۱-۳-۲- فارماکوکینتیک سیتارابین ۶

۱-۳-۳- موارد و میزان مصرف سیتارابین ۷

۱-۳-۴- عوارض سیتارابین ۸

۱-۳-۴-۱- سمیت گوارشی سیتارابین ۹

۱-۳-۴-۲- سمیت کلیوی سیتارابین ۹

۱-۳-۴-۳- سندرم سیتارابین ۱۰

۱-۳-۴-۴- سمیت چشمی سیتارابین ۱۰

۱-۳-۴-۵- سمیت پوستی ۱۱

۱-۳-۴-۶- سمیت عصبی ناشی از سیتارابین ۱۱

۱-۳-۴-۶-۱- سمیت عصبی محیطی ناشی از سیتارابین ۱۴

۱-۴- نقش ترکیبات طبیعی در مهار سمیت عصبی ۱۴

۱-۴-۱- کینون ها ۱۵

۱-۵- معرفی ترکیب تیموکینون ۱۶

۱-۵-۱- ساختار شیمیایی تیموکینون ۱۶

۱-۵-۲- فارماکوکینتیک تیموکینون ۱۷

۱-۵-۳- مکانیسم چرخه اکسایش کاهش تیموکینون ۱۷

۱-۵-۴- اثرات تیموکینون ۱۸

۱-۵-۴-۱- حذف رادیکال های آزاد توسط تیموکینون ۱۸
۱-۵-۴-۲- تعدیل آنزیم های آنتی اکسیدانی/گلوتاتیون توسط تیموکینون ۱۹
۱-۵-۴-۳- جمع بندی فعالیت های فیزیولوژیکی و آنتی اکسیدانی تیموکینون ۲۰
۱-۵-۴-۴- اثرات ضد تشنج تیموکینون ۲۰
۱-۵-۴-۵- تاثیر تیموکینون در AML ۲۱
۱-۵-۴-۶- اثرات محافظتی تیموکینون بر سیستم عصبی ۲۲
۱-۵-۴-۷- ویژگی های محافظت عصبی TQ در آسیب تروماتیک مغزی(TBI) و ایسکمی مغزی ۲۲
۱-۶- عملکرد و نقش های فیزیولوژیک میتوکندری در بدن ۲۳
۱-۶-۱- میتوکندری و مرگ سلولی ۲۷
۱-۶-۲- گونه های فعال اکسیژن و آنتی اکسیدانت ها ۲۸
۱-۶-۲-۱- تولید گونه های فعال اکسیژن در میتوکندری ۳۰
۱-۶-۳- استرس اکسیداتیو ۳۱
۱-۶-۴- نقش میتوکندری در ایجاد بیماریهای نورودژنراتیو ۳۲
۱-۷- اهداف ۳۳
۱-۷-۱- هدف کلی ۳۳
۱-۷-۲- اهداف اختصاصی ۳۳
۱-۸- سوالات تحقیق ۳۴

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- مقدمه ۳۶
۲-۲- نوع مطالعه ۳۶
۲-۳- مکان انجام مطالعه ۳۶
۲-۴- مراحل انجام کار ۳۶
۲-۵- حیوانات مورد مطالعه، مواد شیمیایی و تجهیزات آزمایشگاهی ۳۷
۲-۵-۱- حیوانات مورد مطالعه ۳۷
۲-۵-۲- مواد، شیمیایی ۳۷

۲-۵-۳- تجهیزات و دستگاه های آزمایشگاهی ۳۸
۲-۶- محتویات و طرز تهیه بافرها و محلولها ۴۰
۲-۶-۱- بافر ایزولاسیون (Isolation Buffer) ۴۰
۲-۶-۲- بافر تورم (Swelling Buffer) ۴۰
۲-۶-۳- بافر MTT ۴۱
۲-۶-۴- بافر تنفسی (Respiration Buffer) ۴۱
۲-۶-۵- بافر MMP (Mitochondrial Membrane Potential Buffer) ۴۲
۲-۶-۶- بافر فسفات سالین PBS (Phosphate Saline Buffer) ۴۲
۲-۶-۷- محلول کوماسی بلو (معرف Bradford) برای انجام تست برادفورد ۴۳
۲-۷- محلولهای مورد استفاده جهت سنجش پراکسیداسیون لیپید ۴۳
۲-۷-۱- نحوه ساخت محلول ۰/۱٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید ۴۳
۲-۷-۲- تهیه محلول ۲۰٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید و ۰/۵٪ وزنی/حجمی تیوباربیتوریک اسید... ۴۴
۲-۸- محلولهای مورد استفاده در سنجش گلوتاتیون اکسیده و احیاء ۴۴
۲-۸-۱- محلول واکنش گلوتاتیون احیاء (GSH) ۴۴
۲-۸-۲- محلول واکنش گلوتاتیون اکسید (GSSG) ۴۵
۲-۹- محلولهای مورد استفاده در سنجش میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز ۴۵
۲-۹-۱- سوبسترای آنزیم استیل کولین استراز ۴۶
۲-۹-۲- سوبسترای آنزیم بوتیریل کولین استراز ۴۶
۲-۱۰- گروه بندی حیوانات و دورهی درمانی ۴۶
۲-۱۱- روش انجام آزمایشات ۴۷
۲-۱۱-۱- سنجش پارامترهای هیستوپاتولوژیک ۴۷
۲-۱۱-۲- سنجش میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) و بوتیریل کولین استراز (BChE)..... ۴۷
۲-۱۱-۳- سنجش لیپید پراکسیداسیون ۴۹
۲-۱۱-۴- سنجش میزان گلوتاتیون احیاء (GSH) و گلوتاتیون دی سولفید اکسیده (GSSG) ۵۰
۲-۱۱-۵- جداسازی میتوکندری با روش سانتریفیوژ افتراقی ۵۱
۲-۱۱-۶- تست بردفورد ۵۲

۲-۱۱-۷- سنجش فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز ۵۳
۲-۱۱-۸- سنجش میزان تورم میتوکندریایی ۵۵
۲-۱۱-۹- تولید گونههای فعال اکسیژن ۵۵
۲-۱۱-۱۰- سنجش میزان سقوط پتانسیل غشا ۵۶
۲-۱۲- روش تجزیه و تحلیل دادهها و بررسی آماری ۵۷

فصل سوم: نتایج

۳-۱- اثر تیموکینون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده توسط سیتارابین ۵۹
۳-۲- اثر تیموکینون بر میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AchE) و بوتریل کولین استراز (BchE) در حضور سیتارابین در بافت مغز ۵۹
۳-۳- اثر تیموکینون بر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از سیتارابین در بافت مغز ۶۱
۳-۴- اثر تیموکینون بر تغییرات گلوتاتیون احیا (GSH) و گلوتاتیون دیسولفیداکسید (GSSG) ناشی از سیتارابین ۶۲
۳-۵- اثر تیموکینون بر فعالیت کمپلکس میتوکندری (SDH) در حضور سیتارابین ۶۴
۳-۶- اثر تیموکینون بر تورم میتوکندریایی ناشی از سیتارابین ۶۵
۳-۷- اثر تیموکینون بر تشکیل گونههای فعال اکسیژن (ROS) میتوکندری در حضور سیتارابین ۶۷
۳-۸- اثر تیموکینون بر سقوط پتانسیل غشا میتوکندری (MMP) ناشی از سیتارابین ۶۸

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث ۷۰
۴-۲- نتیجه گیری ۷۳
۴-۳- محدودیت ها ۷۳
۴-۴- پیشنهادات ۷۴
فهرست منابع ۷۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- لیست مواد شیمیایی استفاده شده ۳۷

جدول ۲-۲- وسایل و دستگاه های مورد استفاده ۳۹

جدول ۲-۳- اجزای بافر ایزولاسیون ۴۰

جدول۲-۴- اجزای بافر تورم ۴۰

جدول ۲-۵- اجزای بافرMTT ۴۱

جدول ۲-۶- اجزای بافرتنفسی ۴۱

جدول ۲-۷- اجزای بافرMMP ۴۲

جدول ۲-۸- اجزای بافرفسفات سالین ۴۲

جدول ۲-۹- محلول کوماسی بلو ۴۳

جدول ۲-۱۰- محلول های مورد نیاز ۴۳

جدول ۲-۱۱- اجزای محلولTris-Hcl ۴۴

جدول ۲-۱۲- اجزای محلول واکنش گلوتاتیون احیاء(GSH) ۴۵

جدول ۲-۱۳- اجزای محلول واکنش گلوتاتیون اکسیده (GSSG) ۴۵

جدول ۲-۱۴- اجزای معرف DTNB ۴۶

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- توصیف شماتیک انتقال و متابولیسم سیتارابین ۵

شکل ۱-۲- مقایسه ساختار سیتارابین و سیتیدین ۶

شکل ۱-۳- تعدیل آنزیم های گلوتاتیون و آنتی اکسیدان توسط تیموکینون ۲۰

شکل ۱-۴- ۲۶

شکل ۲-۱- تشخیص تیول ها از طریق معرف DTNB ۴۸

شکل ۲-۲- شروع لیپید پراکسیداسیون و تشکیل رادیکال های لیپیدی جدید ۴۹

شکل ۲-۳- مکانیسم تشکیل کمپلکس صورتی رنگ از مالون دی الدهید و تیوباربیتوریک اسید ۵۰

شکل ۲-۴- مکانیسم تبدیل GSH و GSSG به یکدیگر ۵۱

شکل ۲-۵- منحنی استاندارد تست بردفورد ۵۳

شکل ۲-۶- ساختار کمپلکس انزیم سوکسینات دهیدروژناز ۵۴

شکل ۲-۷- تشکیل ماده فلورسنت DCF توسط گونه های فعال اکسیژن (ROS)..... ۵۶

شکل ۳-۱- اثر تیموکینون بر میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AchE) و بوتریل کولین استراز (BchE) در حضور سیتارابین در بافت مغز..... ۵۹

شکل ۳-۲- اثر تیموکینون بر میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AchE) در حضور سیتارابین در بافت مغز . ۶۰

شکل ۳-۳- اثرتیموکینون بر میزان فعالیت آنزیم بوتریل کولین استراز (BchE) در حضور سیتارابین در بافت مغز . ۶۱

شکل ۳-۴- اثر تیموکینون بر پراکسیداسیون لیپید ناشی از سیتارابین در بافت مغز ۶۲

شکل ۳-۵- اثر تیموکینون بر تغییرات گلوتاتیون احیا (GSH) ناشی از سیتارابین ۶۳

شکل ۳-۶- اثر تیموکینون بر تغییرات گلوتاتیون دی سولفید اکسیده (GSSG) ناشی از سیتارابین ۶۴

شکل ۳-۷- اثر تیموکینون بر فعالیت کمپلکس میتوکندری (SDH) در حضور سیتارابین ۶۵

شکل ۳-۸- اثر تیموکینون بر تورم میتوکندریایی ناشی از سیتارابین ۶۶

شکل ۳-۹- اثر تیموکینون بر تشکیل گونههای فعال اکسیژن (ROS) میتوکندری در حضور سیتارابین..... ۶۷

شکل ۳-۱۰- اثر تیموکینون بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) ناشی از سیتارابین..... ۶۸

اختصارات

PBS : Phosphate Buffer Solution

HENT : Human Equilibrative Nucleoside Transporter

NE : Necrotizing Enterocolitis

INF-α : Interferon-alpha

TNF-α : Tumor Necrosis Factor-alpha

IL6 : Interleukin 6

BBB : Blood Brain Barrier

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

DRG : Dorsal Root Ganglion

ARA U: Urasil Arabinoside

TQ : Thymoquinone

TBHQ : Tert Butyl Hydroquinone

GST : Glutathione S Transferase

PTS: Pentylenetetrazol

MES : Maximum Electroshock Seizure

BZD : Benzodizepin

AD : Alzheimer Disease

PD : Parkinsone Disease

INOS : Inducible Nitric Oxide Synthese

PGE2 : Prostaglandin E2

LPS : Lipopoly Saccharide

LPO : Lipid Peroxidation

GGA : Geranyl Geranyl Acetone

BACE : Beta Site Amyloid Percursor Protein Clearing Enzyme/ Beta Secretase

AB : Amyloid Beta

TBI : Traumatic Brain Injury

IMS : Inter Membrane Space

ADP : Adenosine Diphosphate

ANT : Adenine Nucleotide Translocase

CYPD : Cyclophilin D

CSA : Cyclophilin A

NOX : NADPH-Oxidase

DUOX : Dual Oxidase

μM : Micro Molar

RIRR : ROS Induced ROS Release

IMAC : Intra Membrane Anion Channel

BW : Body Weight

APAF_ 1: Apoptotic Protease Activating Factor 1

AUC : Area Under The Curve

GS_TQ : Gsh and Thymoquinone reduced complex

Ara-C: Cytarabine

ALL: Acute lymphocytic leukemia

AML: Acute myeloid Leukemia

DCK: deoxy cytidine kinase

Ara – CTP: Arabino furanosyl cytosine triphosphate

CMPK : cytidine mono phosphate kinase

NDPK : nucleoside diphosphate kinase

ROS : reactive oxygen species

H_2O_2 : Hydrogen peroxide

AChE : Acetylcholinesterase

ATP : Adenosine Triphosphate

BChE : Butyrylcholinesterase

BSA : Bovine Serum Albumin

CAT : Catalase

COX : Cyclooxygenase

CSF : Cerebrospinal fluid

CNS : Central Nervus System

PNS : Peripheral Nervus System

CYP : Cytochrome DMSO : Dimethyl Sulfoxide

DNA : Deoxyribonucleic Acid

DTNB : 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

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

GPx : Glutathione Peroxidase

GSH : Glutathione

GSSG : Glutathione Disulfide

H2DCF : 2′,7′-Dichloro-dihydro-fluorescein

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

MDA : Malondialdehyde

MMP & ΔΨm : Mitochondrial Membrane Protentional

MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

MPTP : Mitochondrial Permeability Transition pore

mtDNA : Mitochondrial DNA

MTT : Measures the reduction of a Tetrazolium component

NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) + Hydrogen (H)

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide

NF-κB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

SDH : Succinate Dehydrogenase

SOD : Superoxide Dismutase

TBA : Thiobarbituric acid

TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances

TCA : Trichloroacetic acid

DCK : deoxy cytidine kinase

RNS : reactive nitrogen species

CML: Chronic Myelogenous Leukemia

CLL : Chronic Lymphocytic Leukemia

RNA : Ribo Nucleic Acid

IV : Intravenous

IP : Intraperitoneal

mRNA : Messenger RNA

tRNA : Transfer RNA

GTP : Guanosine Triphosphate

FADH2 : Flavin Adenine Dinucleotide

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

DCFH-DA : Dichloro-dihydro-fluorescein Diacetate

DCF : Dichloro-dihydro-Fluorescein