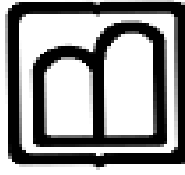


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه

جهت دریافت درجه‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی

عنوان:

بررسی سمیت مستقیم داروی آیفوسفاماید بر روی میتوکندری‌های ایزوله شده
از کلیه موش صحرائی نر

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

نیما امیرجهادی

شهریور ۱۴۰۲

کد پایان نامه: د-۱۸۰

یا رب دل ما را تو به رحمت جان ده
درد همه را به صابری درمان ده
این بنده چه داند که چه می باید جست
داننده تویی هر آنچه دانی آن ده ...

تقدیم به پدر و

مادر مهربانم

و خانواده عزیزم

تشکر و قدردانی

خداوند را سپاس می گویم که به من فرصت داد تا عمر خود را در راه تحصیل علم و دانش سپری کنم و همواره استادانی دلسوز و فرزانه بر سر راهم قرار داد تا در این راه دراز و بی پایان علم جویی، راهنمای راهم باشند. در اینجا لازم است از همه ایشان مراتب سپاس قلبی و تشکر خالصانه خود را داشته باشم.

از استاد ارجمند و مهربانم جناب آقای دکتر سلیمی که مسئولیت استاد راهنمای این رساله را به عهده گرفتند و با حوصله ی بسیار و باریک بینی ژرف مرا در این رساله یاری کردند، صمیمانه تشکر می نمایم و قدردان زحماتشان هستم. در پایان از تمامی عزیزانی که در آزمایشگاه های دانشکده داروسازی علوم پزشکی اردبیل و دوستان عزیزانی که مرا حمایت نمودند نهایت قدردانی را دارم.

چکیده فارسی

مقدمه: آیفوسفاماید یک پیش داروی ضد نئوپلاستیک است که در بدخیمی‌های مختلف استفاده می‌شود و عوارض مختلف از جمله عوارض کلیوی از خود نشان می‌دهد. از طرفی میتوکندری به عنوان یکی از مهم ترین اندامک های سلولی، با فراهم کردن آدنوزین تری فسفات (ATP) مورد نیاز برای سلول‌های کلیوی، انرژی لازم برای فعالیت آن را فراهم می‌کند. کلیه به علت فعالیت بالا انرژی زیادی نیاز دارد و به همین دلیل یکی از ارگان هایی است که تعداد بالای میتوکندری را در خود جای داده است. فعالیت طبیعی کلیه وابسته به میتوکندری است و هر عاملی که منجر به بروز اختلال در عملکرد میتوکندری شود منجر به بروز مشکل در فعالیت کلیه می‌شود. در این مطالعه، این فرض که آیفوسفاماید می‌تواند با تاثیر منفی روی میتوکندری‌های کلیه منجر به اختلال عملکرد کلیوی شود بررسی شد.

مواد و روش‌ها: میتوکندری‌های کلیوی با لیز مکانیکی و سانتریفیوژ افتراقی از کلیه موش جدا شدند. میتوکندری‌های کلیوی ایزوله شده در گروه‌های مورد مطالعه با غلظت‌های مختلفی از آیفوسفاماید (μM) 500، 100، 50، به مدت 1 ساعت و در دمای 37°C انکوبه شدند. سپس اثرات آیفوسفاماید در گروه‌های مورد مطالعه بر روی فعالیت سوکسینات دهیدروژناز (SDH)، تورم میتوکندری، تولید گونه‌های فعال واکنش‌گر اکسیژن (ROS)، افت پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) و پراکسیداسیون لیپید در میتوکندری‌های جدا شده کلیوی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج تست های مختلف نشان داد، آیفوسفاماید تغییرات مخربی در عملکرد میتوکندری، تولید ROS، افت پتانسیل غشاء میتوکندری، تورم میتوکندری، استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید در غلظت‌های به کار رفته ندارد.

بحث و نتیجه‌گیری: یافته های این پژوهش نشان داد که آیفوسفاماید به طور مستقیم در میتوکندری‌های جدا شده کلیوی موش صحرايي سمی نیست و احتمالاً متابولیت‌های حاصل از این دارو در بروز سمیت کلیوی نقش دارند.

کلمات کلیدی: سمیت کلیوی، نروپاتی، آیفوسفاماید، عملکرد میتوکندری

فهرست مطالب

	عنوان	صفحه
۵	چکیده فارسی	
و	فهرست مطالب	
ی	فهرست علائم ، نشانه ها و اختصارات	
ک	فهرست جدول ها	
ل	فهرست نمودارها و عکس ها	
۱	۱- فصل اول : مقدمه تحقیق	
۲	۱-۱- مقدمه و معرفی داروی آیفوسفاماید	
۳	۱-۲- مهمترین عوارض جانبی داروی آیفوسفاماید	
۴	۱-۲-۱- عوارض قلبی	
۴	۱-۲-۲- عوارض عصبی	
۴	۱-۲-۳- عوارض کبدی	
۴	۱-۲-۴- عوارض کلیوی	
۵	۱-۳- مروری بر داروی آیفوسفاماید و کاربردهای درمانی آن	
۶	۱-۴- فارماکولوژی داروی آیفوسفاماید	
۸	۱-۵- مقاومت دارویی آیفوسفاماید	
۹	۱-۶- فارماکوکینتیک داروی آیفوسفاماید	
۹	۱-۶-۱- جذب آیفوسفاماید	
۱۰	۱-۶-۲- حذف آیفوسفاماید	
۱۲	۱-۷- کلیه و عوامل مؤثر بر بروز عوارض کلیوی	
۱۵	۱-۸- آسیب های کلیوی ناشی از داروها و توکسین ها	
۱۵	۱-۹- مکانیسم های بروز آسیب های کلیوی ناشی از داروی آیفوسفاماید	
۱۶	۱-۹-۱- تأثیر بر روی سیستم رنین و آنژیوتانسین	
۱۶	۱-۹-۲- تأثیر بر روی آزادسازی مونوکسید نیتروژن	
۱۷	۱-۹-۳- سندروم فانکونی	

۱۸	۴-۹-۱- آسیب حاد کلیوی
۱۸	۵-۹-۱- آسیب مزمن کلیوی
۱۹	۱۰-۱- اندامک میتوکندری و اهمیت آن در کلیه
۲۱	۱-۱۰-۱- فسفریلاسیون اکسیداتیو
۲۲	۲-۱۰-۱- استرس اکسیداتیو و پیامدهای ناشی از آن
۲۳	۳-۱۰-۱- گونه های فعال اکسیژن
۲۴	۴-۱۰-۱- سم زدایی گونه های فعال اکسیژن
۲۵	۵-۱۰-۱- تأثیر مستقیم افزایش ROS میتوکندریایی بر روی سلول های کلیوی
۲۶	۱۱-۱- ارتباط بین اختلال میتوکندریایی و بروز بیماری های کلیوی
۲۹	۱۲-۱- تأثیر داروی آیفوسگاماید بر روی میتوکندری
۲۹	۱۳-۱- اهداف و فرضیات
۲۹	۱-۱۳-۱- هدف کلی
۲۹	۲-۱۳-۱- اهداف اختصاصی
۳۰	۳-۱۳-۱- فرضیات پژوهش
۳۱	۳- فصل دوم: مواد ، دستگاه ها و روش ها
۳۲	۱-۲- مواد شیمیایی، وسایل آزمایشگاهی، دستگاه ها و حیوانات مورد استفاده
۳۲	۱-۲-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده
۳۳	۲-۲-۱- تجهیزات دستگاهی
۳۴	۱-۲-۲- ترازوی آزمایشگاهی
۳۴	۲-۲-۱-۲- سانتریفیوژ یخچال دار
۳۵	۳-۲-۱-۲- انکوباتور
۳۵	۴-۲-۱-۲- pH متر
۳۶	۵-۲-۱-۲- دستگاه فلوسایتومتری
۳۶	۶-۲-۱-۲- دستگاه یخ ساز
۳۷	۷-۲-۱-۲- دستگاه مولد آب مقطر
۳۷	۸-۲-۱-۲- هود زیستی شیمیایی
۳۸	۲-۲- آماده سازی شناساگرها و بافرهای مورد استفاده در این پژوهش
۳۸	۱-۲-۲- تهیه شناساگر کوماسی بلو یا معرف برادفورد (Bradford)

۳۸	۲-۲-۲- آماده سازی بافرهای مورد نیاز
۳۹	۲-۲-۲-۱- آماده سازی بافر ایزولاسیون (Isolation)
۳۹	۲-۲-۲-۲- آماده سازی بافر تورم (Swelling buffer)
۴۰	۲-۲-۲-۳- آماده سازی بافر (SDH) Mitochondrial succinate dehydrogenase
۴۱	۲-۲-۲-۴- آماده سازی بافر (MMP) Mitochondrial membrane potential
۴۱	۲-۲-۲-۵- آماده سازی بافر Respiration
۴۲	۲-۳- تهیه و آماده سازی حیوانات آزمایشگاهی
۴۲	۲-۴- مراحل جداسازی و آماده سازی میتوکندری
۴۳	۲-۴-۱-۱- تعیین غلظت پروتئین میتوکندری‌های ایزوله شده با روش برادفورد
۴۵	۲-۵- گروه های مورد مطالعه
۴۵	۲-۶- روش انجام تست های سمیت
۴۵	۲-۶-۱- بررسی فعالیت سوکسینات دهیدروژناز یا عملکرد میتوکندری
۴۶	۲-۶-۲- بررسی مقدار تورم میتوکندری
۴۷	۲-۶-۳- بررسی مقدار گونه های فعال اکسیژن تولید شده در میتوکندری
۴۸	۲-۶-۴- بررسی افت پتانسیل غشاء میتوکندری
۴۸	۲-۶-۵- بررسی پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی میتوکندری
۴۹	۲-۷- روش تجزیه و تحلیل داده ها
۵۰	۴- فصل سوم: نتایج
۵۱	۳-۱- بررسی تست های سمیت در میتوکندری‌های ایزوله شده از کلیه موش نر صحرایی
۵۱	۳-۱-۱- بررسی فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز ناشی از آیفوسفاماید در میتوکندری‌های ایزوله شده
۵۲	۳-۱-۲- بررسی مقدار تورم ناشی از آیفوسفاماید در میتوکندری‌های ایزوله شده
۵۳	۳-۱-۳- بررسی مقادیر ROS تولید شده ناشی از آیفوسفاماید در میتوکندری‌های ایزوله شده
۵۴	۳-۱-۴- بررسی افت پتانسیل غشاء میتوکندری ناشی از آیفوسفاماید در میتوکندری‌های ایزوله شده
۵۵	۳-۱-۵- بررسی پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از آیفوسفاماید در میتوکندری‌های ایزوله شده
۵۶	۵- فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری
۵۸	۴-۱- بحث و بررسی مزایا و معایب درمانی داروی آیفوسفاماید
۶۲	۴-۲- بحث و مطالعات مربوط به سمیت میتوکندری ناشی از داروی آیفوسفاماید

۶۵

۴-۳- نتیجه گیری

۶۵

۴-۴- پیشنهادات

۶۷

منابع و مأخذ

فهرست علائم ، نشانه ها و اختصارات

ATP: Adenosine triphosphate
SDH: Succinate dehydrogenase
ROS: reactive oxygen species
MMP: Mitochondrial membrane potential
CYP: Cytochrome
CAA: Chloroacetaldehyde
ECG: Electrocardiography
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SDBS: Sodium dodecyl benzene sulfonate
DNA: Deoxyribonucleic acid
BMI: Body mass index
TGF-β¹: Transforming growth factor beta-¹
ECM: Extracellular matrix
AKD: Acute Kidney Disease
CKA: Chronic Kidney Disease
NO: Nitric oxide
BBB: blood–brain barrier
ADH: Antidiuretic hormone
LMW: Pr: Low Molecular weight protein
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide
HEPES: ε-(γ-hydroxyethyl)-β-piperazineethanesulfonic acid
EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid
BSA: Bovine serum albumin
MTT: ۳-(۴, ۵-dimethylthiazol-۲-yl)-۲, ۵-diphenyl tetrazolium bromide
Tris: ۲-Amino-۲-hydroxymethyl- propane-۱, ۳-diol
EGTA: Ethylene glycol-bis (b-aminoethyl ether
H₂DCF: ۲', ۲'-Dichlorofluorescein
MDA: Malon dialdehyde
TBA: Tree barbituric acid
TCA: Tree chloride acid
DSMO: Dimethyl sulfoxide
SD: Standard Deviation
FDA: Food and Drug Administration
IV: Intravenous
MPTP: Mitochondrial permeability transition pore

فهرست جدول ها

صفحه	عنوان
۳۰.....	جدول ۲-۱- فهرست مواد شیمیایی مصرفی.....
۳۱.....	جدول ۲-۲- فهرست دستگاه های استفاده شده.....
۳۶.....	جدول ۲-۳- مواد و مقادیر مورد استفاده برای ساخت ۱۰۰۰ mL شناساگر کوماسی بلو.....
۳۷.....	جدول ۲-۴- مواد و غلظت مورد استفاده برای ساخت بافر ایزولاسیون.....
۳۸.....	جدول ۲-۵- مواد و غلظت مورد استفاده برای ساخت بافر تورم.....
۳۸.....	جدول ۲-۶- مواد و غلظت مورد استفاده برای ساخت بافر سوکسینات دهیدروژناز.....
۳۹.....	جدول ۲-۷- مواد و غلظت مورد استفاده برای ساخت بافر MMP.....
۴۰.....	جدول ۲-۸- مواد و غلظت مورد استفاده برای ساخت بافر Respiration.....

فهرست نمودارها و عکس ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- ساختارهای شیمیایی داروهای آیفوسفاماید و سیکلوفسفاماید	۳
شکل ۱-۲- مسیر آنزیمی متابولیسم آیفوسفاماید	۸
شکل ۱-۳- مسیر متابولیسمی داروی آیفوسفاماید	۱۱
شکل ۱-۴- ساختار نفرون	۱۴
شکل ۱-۵- شکل شماتیک از تولید انرژی در میتوکندری	۱۹
شکل ۱-۶- شکل شماتیک تأثیر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در میتوکندری	۲۴
شکل ۱-۷- شکل شماتیک از محیط کاهش و اکسایش در میتوکندری	۲۶
شکل ۱-۸- مسیر فعال شدن آپاپتوز در میتوکندری	۲۶
شکل ۲-۱- تصویری از ترازوی آزمایشگاهی	۳۲
شکل ۲-۲- تصویری از سانتریفیوژ یخچال دار	۳۲
شکل ۲-۳- تصویری از انکوباتور	۳۳
شکل ۲-۴- تصویری از pH متر	۳۳
شکل ۲-۵- تصویری از فلوسایتومتری	۳۴
شکل ۲-۶- تصویری از یخ ساز	۳۴
شکل ۲-۷- تصویری از مولد آب مقطر	۳۵
شکل ۲-۸- تصویری از هود زیستی شیمیایی	۳۵
شکل ۹-۲- غلظت‌های لود شده از BSA به همراه کوماسی بلو	۴۲
شکل ۲-۱۰- نمودار جذب (محور عمودی) نمونه های آلبومین براساس غلظت (محور افقی)	۴۲
شکل ۳-۱- تأثیر آیفوسفاماید بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، (N=3, *** P<0.001)	۴۹
شکل ۳-۲- تأثیر آیفوسفاماید بر مقدار تورم میتوکندری، (N=3, *** P<0.001)	۵۰
شکل ۳-۳- تأثیر آیفوسفاماید بر مقدار ROS تولید شده در میتوکندری، (N=3, *** P<0.001)	۵۱
شکل ۳-۴- تأثیر آیفوسفاماید بر افت پتانسیل غشاء میتوکندری، (N=3, *** P<0.001)	۵۲
شکل ۳-۵- تأثیر آیفوسفاماید بر لیپید پراکسیداسیون میتوکندری، (N=3, *** P<0.001)	۵۳