





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای داروسازی

عنوان:

بررسی سمیت میتوکندریایی داروی ایفوسفامید با استفاده از

میتوکندری های ایزوله از مغز موش صحرایی

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

سپیده عزیزیان

آبان ۱۴۰۲

شماره پایان نامه:

د-۱۹۲

اهداء پایان نامه

سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست، به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم.

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم به پدر بزرگوار و مادر مهربانم، آن دو فرشته‌ای که از خواسته‌هایشان گذشتند، سختی‌ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده‌ام برسم.

تقدیم به همسر مهربانم که سایه مهربانیش سایه سار زندگی‌م می‌باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.

تقدیم به برادرم که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بود و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات و وجودش مایه دلگرمی من می‌باشد.

تشکر و قدردانی

استاد راهنمای گرامی جناب آقای دکتر احمد سلیمی

دلسوزی، تلاش و کوشش حضرت عالی در تعلیم، تربیت، انتقال معلومات و تجربیات ارزشمند در کنار برقراری رابطه صمیمی و دوستانه با دانشجویان و ایجاد فضائی دلنشین برای کسب علم و دانش و درک شرایط دانشجویان حقیقتاً قابل ستایش است. اینجانب بر خود وظیفه میدانم در کسوت شاگردی از زحمات و خدمات ارزشمند شما استاد گرانقدر تقدیر و تشکر نمایم.

خلاصه پایان نامه

مقدمه

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که سمیت میتوکندریایی منجر به انواع سمیت‌های مغزی می‌شود. میتوکندری‌های جدا شده به عنوان سنجش‌های غربالگری با کارایی بالا برای ارزیابی سمیت میتوکندری، پیش‌بینی سمیت مغزی و بررسی‌های مکانیکی استفاده شده است. ایفوسفامید به عنوان یک داروی ضد سرطان، با افزایش خطر مسمومیت عصبی همراه است. با توجه به عدم وجود اطلاعات کامل در مورد اثر مستقیم ایفوسفامید بر عملکرد میتوکندری، هدف از این مطالعه بررسی اثر مستقیم ایفوسفامید بر روی میتوکندری‌های جدا شده از مغز بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه میتوکندری‌ها با لیز مکانیکی و سانتریفیوژ افتراقی از اندام مغز جدا شدند و با غلظت‌های مختلف ایفوسفامید (۰، ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار) تیمار شدند. با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و فلوسیتومتری، ما فعالیت سوکسینات دهیدروژنازهای میتوکندری (SDH)، تورم میتوکندری، پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندری، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و سقوط پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) را در طول ۱ ساعت ارزیابی کردیم.

نتایج

نتایج آزمایشات انجام شده نشان داد که مواجهه مستقیم ایفوسفامید تغییرات مضر در عملکرد میتوکندری، تورم میتوکندری، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسیداسیون لیپیدی و سقوط پتانسیل غشای میتوکندری در میتوکندری‌های جدا شده از مغز ایجاد نمی‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی داده‌های این مطالعه نشان داد که ایفوسفامید مستقیماً در میتوکندری‌های جدا شده از مغز سمیت ایجاد نمی‌کند و احتمالاً مسیرها و متابولیسم‌های دیگری در سمیت این ترکیب نقش دارند. همچنین این مطالعه

ثابت کرد که ایفوسفامید در محیط برون تنی یا *in vitro* به صورت مستقیم باعث ایجاد سمیت میتوکندریایی نشده است و احتمالاً بروز سمیت میتوکندریایی ایفوسفامید توسط متابولیت‌ها و مکانیسم‌های واسطه صورت می‌گیرد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند برای کاهش سمیت این دارو، مسیرهای دیگری که منجر به تولید متابولیت‌های سمی می‌شود در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی:

ایفوسفامید، میتوکندری، مکانیسم‌های سمیت، سمیت مغزی

۱ - فصل یک: مقدمه.....	۲
۱ □ ۱ □ مقدمه و بیان مسئله.....	۲
۱ - ۲ - عوامل آلکیله کننده.....	۳
۱ □ ۲ □ ۱ □ مکانیسم عمل داروهای آلکیله کننده.....	۳
۱ - ۲ - ۲ - طبقه‌بندی عوامل آلکیله کننده.....	۴
۱ - ۳ - ایفوسفامید.....	۵
۱ - ۳ - ۱ - تاریخچه.....	۵
۱ - ۳ - ۲ - خصوصیات فیزیکی شیمیایی.....	۶
۱ □ ۳ □ ۳ □ فارماکوکینتیک.....	۷
۱ □ ۳ □ ۴ □ فارماکودینامیک.....	۱۰
۱ □ ۳ □ ۵ □ مکانیسم سمیت ایفوسفامید.....	۱۳
۱ □ ۳ □ ۶ □ کاربرد.....	۱۵
۱ □ ۳ □ ۷ □ عوارض جانبی ایفوسفامید.....	۱۷
۱ - ۳ - ۸ - منع مصرف.....	۱۹
۱ - ۴ - میتوکندری.....	۱۹
۱ □ ۴ □ ۱ □ ساختار میتوکندری.....	۲۰
۱ □ ۴ □ ۲ □ نقش میتوکندری.....	۲۲
۱ - ۴ - ۳ - عملکرد فیزیولوژیک میتوکندری.....	۲۵
۱ □ ۴ □ ۴ □ نقش میتوکندری در سرطان.....	۲۹
۱ □ ۴ □ ۵ □ رادیکال فعال اکسیژن (ROS).....	۳۰
۱ - ۴ - ۶ - استرس اکسیداتیو.....	۳۲
۱ □ ۵ □ مغز.....	۳۴
۱ - ۵ - ۱ - ساختار مغز.....	۳۴
۱ - ۵ - ۱ - ۱ - مخ.....	۳۵
۱ - ۵ - ۱ - ۲ - قشر مغزی.....	۳۵
۱ - ۵ - ۱ - ۳ - ساقه مغز.....	۳۵
۱ □ ۵ □ ۱ □ ۴ □ مخچه.....	۳۶
۱ - ۵ - ۲ - میتوکندری مغزی.....	۳۸
۱ □ ۵ □ ۳ □ CYP میتوکندری مغزی.....	۳۸
۱ □ ۵ □ ۴ □ سمیت مغزی ایفوسفامید.....	۳۹
۱ □ ۵ □ ۵ □ بررسی‌ها و تشخیص سمیت مغزی ایفوسفامید.....	۴۰

۴۱.....	۶۵۱	ریسک فاکتور برای اثرات نوروتوکسیک ایفوسفامید
۴۲.....	۶۱	بررسی متون
۴۳.....	۷۱	اهداف
۴۳.....		اهداف کلی
۴۳.....	۱۷۱	اهداف اختصاصی
۴۴.....	۲۷۱	هدف کاربردی
۴۴.....	۳۷۱	فرضیات تحقیق
۴۶.....	۲	فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها
۴۷.....	۱۲	مواد شیمیایی و دستگاه‌های مورد استفاده
۴۷.....	۱۱۲	مواد شیمیایی
۴۹.....	۲۱۲	وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده
۶۳.....	۲۲	حیوانات مورد مطالعه
۶۴.....	۳۲	محتویات و طرز تهیه بافرها و محلول‌ها
۶۴.....	۱۳۲	محلول کوماسی بلو
۶۴.....	۲۳۲	بافر برادفورد
۶۵.....	۳۳۲	بافر ایزولاسیون
۶۶.....	۱۳۳۲	نحوه ساخت ۱۰ میلی‌لیتر سدیم هیدروکساید ۲ مولار:
۶۶.....	۳- ۴- ۲	بافر تورم
۶۸.....	۵۳۲	بافر MTT
۶۹.....	۳- ۶- ۲	بافر MMP
۷۱.....	۷۳۲	بافر تنفسی
۷۲.....	۳- ۸- ۲	بافر پراکسیداسیون لیپیدی
۷۳.....	۴- ۴- ۲	آزمایش‌ها
۷۳.....	۱۴۲	مراحل ایزوله سازی میتوکندری‌های مغزی
۷۵.....	۲- ۴- ۲	تهیه غلظت‌های مورد نیاز ایفوسفامید
۷۶.....	۳- ۴- ۲	تست برادفورد
۷۸.....	۴۴۲	سنجش میزان تورم میتوکندری (Swelling Test)
۷۶.....	۵- ۴- ۲	سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری (MTT Test)
۸۲.....	۶۴۲	سنجش میزان سقوط پتانسیل غشای میتوکندری (MMP Test)
۸۴.....	۷۴۲	سنجش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS Test)
۸۷.....	۳- ۴- ۸- ۲	سنجش پراکسیداسیون لیپیدی
۹۰.....	۵۲	روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری
۹۲.....	۳	فصل سوم: نتایج

۹۲.....	۳- ۱- اثر ایفوسفامید بر تورم میتوکندری.....
۹۳.....	۳- ۲- اثر ایفوسفامید بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری.....
۹۴.....	۳- ۳- اثر ایفوسفامید بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری.....
۹۵.....	۳- ۴- اثر ایفوسفامید بر میزان گونه‌های فعال اکسیژن.....
۹۶.....	۳- ۵- اثر ایفوسفامید بر پراکسیداسیون لیپیدی.....
۹۸.....	۴- فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری.....
۹۸.....	۴- ۱- بحث.....
۱۰۸.....	۴- ۲- نتیجه‌گیری.....
۱۰۸.....	۴- ۳- پیشنهادات.....
۱۰۸.....	۴- ۴- محدودیت.....

شکل ۱-۱ مکانیسم عمل داروهای آلکیله کننده.....	۴
شکل ۲-۱ ساختار شیمیایی ایفوسفامید.....	۷
شکل ۳-۱ مکانیسم فارماکوکینتیک ایفوسفامید.....	۱۰
شکل ۴-۱ مکانیسم فارماکودینامیک ایفوسفامید.....	۱۳
شکل ۵-۱ مکانیسم سمیت ایفوسفامید.....	۱۵
شکل ۶-۱ ساختار میتوکندری.....	۲۲
شکل ۷-۱ زنجیره انتقال الکترون میتوکندری.....	۲۹
شکل ۸-۱ ساختار مغز.....	۳۷
شکل ۹-۱ سمیت مغزی ایفوسفامید.....	۴۰
شکل ۱-۲ ورتکس.....	۵۰
شکل ۲-۲ پلیت کشت سلولی.....	۵۱
شکل ۳-۲ pH-سنج.....	۵۱
شکل ۴-۲ دستگاه یخساز.....	۵۲
شکل ۵-۲ دستگاه مولد آب مقطر.....	۵۲
شکل ۶-۲ هیتر استیرر.....	۵۳
شکل ۷-۲ ست سمپلر.....	۵۳
شکل ۸-۲ هموژنایزر التراسونیک.....	۵۴
شکل ۹-۲ هموژنایزر دستی.....	۵۵
شکل ۱۰-۲ ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی.....	۵۵
شکل ۱۱-۲ یخچال فریزر.....	۵۶
شکل ۱۲-۲ فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد.....	۵۶
شکل ۱۳-۲ اتوکلاو.....	۵۷
شکل ۱۴-۲ نکوباتور CO ₂ دار.....	۵۸
شکل ۱۵-۲ سانتریفیوژ یخچال دار.....	۵۹
شکل ۱۶-۲ فلوسایتومتری.....	۶۰
شکل ۱۷-۲ الیزا ریدر.....	۶۱
شکل ۱۸-۲ دستگاه ترموبلاک.....	۶۲
شکل ۲۰-۲ فیکس کردن رت.....	۷۵
شکل ۱۹-۲ بیهوش کردن رت.....	۷۵
شکل ۲۱-۲ مکانیسم تورم میتوکندریایی.....	۷۹

۷۷	شکل ۲-۲۲ تست بردفورد
۸۱	شکل ۲-۲۳ مکانیسم تست MTT در میتوکندری
۸۲	شکل ۲-۲۴ تست MTT
۸۳	شکل ۲-۲۵ مکانیسم عملکرد رودامین ۱۲۳ در تست MMP
۸۵	شکل ۲-۲۶ مکانیسم تولید ROS میتوکندریایی
۸۶	شکل ۲-۲۷ تاثیر میزان ROS بر وضعیت میتوکندری
۸۸	شکل ۲-۲۸ بروز پراکسیداسیون لیپیدی در میتوکندری
۸۹	شکل ۲-۲۹ مکانیسم تشکیل مالون دی آلدهید
۹۰	شکل ۲-۳۰ تست پراکسیداسیون لیپیدی

صفحه

فهرست جداول و نمودارها

جدول ۱-۱	درجه بندی بالینی انسفالوپاتی ناشی از ایفوسفامید.....	۴۱
جدول ۱-۲	لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه.....	۴۷
جدول ۲-۲	لیست دستگاه‌ها و وسایل استفاده شده در پایان نامه.....	۴۹
جدول ۳-۲	اجزای محلول کوماسی بلو.....	۶۴
جدول ۴-۲	اجرای بافر برادفورد.....	۶۵
جدول ۵-۲	اجرای بافر ایزولاسیون.....	۶۵
جدول ۶-۲	اجرای بافر تورم.....	۶۷
جدول ۷-۲	اجرای بافر MTT.....	۶۸
جدول ۸-۲	اجرای بافر MMP.....	۶۹
جدول ۹-۲	اجزای بافر تنفسی.....	۷۱
جدول ۱۰-۲	اجزای بافر پراکسیداسیون لیپیدی.....	۷۲
نمودار ۱-۳	اثر ایفوسفامید بر تورم میتوکندری.....	۹۲
نمودار ۲-۳	اثر ایفوسفامید بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری.....	۹۳
نمودار ۳-۳	اثر ایفوسفامید بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری.....	۹۴
نمودار ۴-۳	اثر ایفوسفامید بر تشکیل میزان گونه‌های فعال اکسیژن.....	۹۵
نمودار ۵-۳	اثر ایفوسفامید بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی.....	۹۶

فهرست علائم، نشانه‌ها و اختصارات

ADP: Adenosine Diphosphate

ALDH1A1: Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1

ANOVA: Analysis of Variance

ATP: Adenosine Triphosphate

BCL2: B-cell Lymphoma 2

BHT: Butylated Hydroxytoluene

BSA: Bovine Serum Albumin

CAA: Chloroacetaldehyde

CT Scan: Computed Tomography Scan

DCE: Dichloroethyl phosphamide

DLBCL: Diffuse Large B Cell Lymphoma

DMF: Dimethylformamide

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EEG: Electroencephalogram

EGTA: Ethylene glycol-bis (b-aminoethyl ether

ELISA: The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ETC: Electron Transport Chain

FADH2: Flavin Adenine Dinucleotide

GSH: Glutathione

HClO: Hypochlorous acid

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

IFO: Ifosfamide

IL-2: Interleukin-2

IMS: Intermembrane Space

IP: Intraperitoneal

MDA: Malondialdehyde

MMP: Mitochondria Membrane Potential

MPT: Membrane Permeability Transition

MPTP: Mitochondrial Permeability Transition Pore

MRI: Magnetic Resonance Imaging

mtDNA: Mitochondrial DNA

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NK cells: Natural Killer Cell

OSCP: Oligomycin-Sensitivity Conferring Protein

OXPHOS: Oxidative Phosphorylation

PMF: Proton Motive Force

PNR: Point of No Return

PXR: Pregnane X Receptor

ROS: Reactive Oxygen Species

SCMC: S-Carboxymethylcysteine

SDH: Succinate Dehydrogenase

SOD: Superoxide Dismutase

TBA: Thiobarbituric Acid

TCA: Trichloroacetic Acid

TCA: Tricarboxylic Acid

TDGA: Thioglycolic Acid

TMRE: Tetramethylrhodamine Ester

TMRM: Tetramethylrhodamine Methyl

TXNRD1: Thioredoxin Reductase 1

PMCA: Plasma Membrane Calcium ATPase