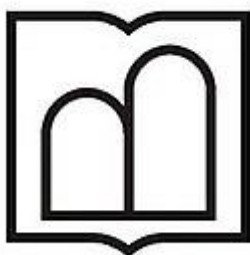


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه

رساله دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی سمیت میتوکندریایی داروی ایفوسفامید با استفاده از میتوکندری‌های  
ایزوله شده از کبد موش صحرائی در توجیه سمیت کبدی آن

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

مهدی شاهی

آبان ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: د-۱۹۴

تقدیم به

این پایان نامه را تقدیم میکنم به پدر و مادر عزیزم که بزرگترین و ارزشمندترین آموزگاران زندگی و تکیه گاه امن  
و مطمئن بوده اند.

## تقدیر و سپاس فراوان از

استاد فرهیخته و فرزانه دکتر احمد سلیمی که با نکته‌های دلاویز و گفته‌های بلند، صحیفه‌های سخن را علم‌پرور نمود و همواره راه‌ما و راه‌کشای نگراننده در اتمام و اكمال پایان نامه بوده است.

## چکیده

**مقدمه:** نشان داده شده است که سمیت میتوکندریایی به انواع سمیت های اندام مانند کبد کمک می کند. میتوکندری های ایزوله شده به عنوان ابزارهای غربالگری با کارایی بالا برای ارزیابی سمیت میتوکندری، پیش بینی سمیت اندام ها و بررسی های مکانیسمی مورد استفاده قرار گرفته اند. ایفوسفامید به عنوان یک داروی ضد سرطان، با افزایش خطر سمیت عصبی، سمیت قلبی، سمیت کلیوی، سمیت کبدی و سیستمیت هموراژیک همراه است. با توجه به نبود اطلاعات کامل در مورد اثر مستقیم ایفوسفامید بر عملکرد میتوکندری، هدف از این مطالعه بررسی اثر مستقیم ایفوسفامید بر روی میتوکندری های ایزوله شده از کبد موش صحرائی نر است.

**روش کار:** میتوکندری ها با لیز مکانیکی و سانتریفیوژ افتراقی از کبد جدا شده و با غلظت های مختلف ایفوسفامید (۰، ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار) تیمار شدند. با استفاده از روش های بیوشیمیایی و سایتومتری، ما فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری (SDH)، تورم میتوکندری، پراکسیداسیون لیپید میتوکندری (LPO)، تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) و پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) را در طول ۱ ساعت ارزیابی کردیم.

**نتایج:** داده های ما نشان داد که ایفوسفامید تغییرات مضر در عملکرد میتوکندری، تورم میتوکندری، پراکسیداسیون لیپیدی، تشکیل ROS و فروپاشی MMP در میتوکندری های ایزوله شده از کبد ایجاد نمی کند.

**نتیجه گیری:** در مجموع، داده های این مطالعه نشان داد که ایفوسفامید مستقیماً در میتوکندری های ایزوله شده از کبد سمی نیست و احتمالاً سایر مسیرها و مکانیسم ها در سمیت این ترکیب نقش دارند. همچنین این مطالعه ثابت کرد که میتوکندری به تنهایی نقش اصلی را در سمیت ایفوسفامید ایفا نمی کند و پیشنهاد می کند برای کاهش سمیت این دارو مسیرهای دیگری که منجر به تولید متابولیت های سمی می شوند، باید در نظر گرفته شود.

کلیدواژه ها: میتوکندری، ایفوسفامید، پیش بینی سمیت، مکانیسم های سمیت

## فهرست مطالب

چکیده	۵
اختصارات	۷
<b>فصل ۱: مقدمه</b>	<b>۱</b>
۱-۱- ایفوسفامید	۲
۱-۱-۱- معرفی ایفوسفامید	۲
۲-۱-۱- فارماکوکینتیک داروی ایفوسفامید	۴
۳-۱-۱- مکانیسم درمانی داروی ایفوسفامید	۷
۴-۱-۱- کاربرد بالینی داروی ایفوسفامید	۷
۵-۱-۱- سمیت داروی ایفوسفامید	۸
۱-۱-۵-۱- سیستمیت هموراژیک	۸
۲-۵-۱-۱- سمیت عصبی	۹
۳-۵-۱-۱- سمیت کلیوی	۱۰
۴-۵-۱-۱- سمیت خونی	۱۰
۵-۵-۱-۱- سمیت‌های متفرقه	۱۱
۶-۵-۱-۱- سمیت کبدی داروی ایفوسفامید	۱۱
۶-۱-۱- مکانیسم احتمالی سمیت کبدی ایفوسفامید	۱۲
۷-۱-۱- اثر ایفوسفامید بر آزمایش‌های تشخیصی	۱۳
۲-۱- میتوکندری	۱۴
۱-۲-۱- کلیات	۱۴
۲-۲-۱- نقش میتوکندری در سمیت کبدی داروها و مواد شیمیایی	۱۶
۳-۲-۱- اهمیت میتوکندری در شناسایی سمیت داروها و مواد شیمیایی	۲۰
۴-۲-۱- ایفوسفامید و سمیت میتوکندریایی	۲۲
۵-۲-۱- میتوکندری‌های ایزوله شده	۲۶
۳-۱- اهداف پژوهش	۲۸
۱-۳-۱- هدف کلی	۲۸
۲-۳-۱- اهداف اختصاصی	۲۸
۳-۳-۱- هدف کاربردی	۲۸
۴-۳-۱- فرضیات پژوهش	۲۹
<b>فصل ۲: مواد و روش‌ها</b>	<b>۳۰</b>
۱-۲- حیوانات مورد استفاده و شرایط نگهداری	۳۱
۲-۲- تجهیزات، دستگاه‌ها و مواد شیمیایی	۳۲
۳-۲- جامعه مورد مطالعه و حجم نمونه	۳۴
۴-۲- گروه‌های مورد مطالعه	۳۴
۵-۲- محتویات و طرز تهیه بافرها و محلول‌ها	۳۵
۱-۵-۲- آماده‌سازی بافر برادفورد	۳۵
۲-۵-۲- بافر ایزولاسیون میتوکندری ایزولاسیون	۳۶
۳-۵-۲- بافرسنجش سوکسینات دهیدروژناز	۳۷

۳۸	.....۴-۵-۲- بافر تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال میتوکندری
۳۹	.....۵-۵-۲- بافر پتانسیل غشای میتوکندری
۴۰	.....۶-۵-۲- بافر سنجش تورم میتوکندری
۴۱	.....۶-۲- پروتکل تحقیق
۴۱	.....۱-۶-۲- روش جداسازی میتوکندری از کبد
۴۲	.....۲-۶-۲- سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری (SDH)
۴۳	.....۳-۶-۲- سنجش سطح ROS میتوکندریایی
۴۴	.....۴-۶-۲- سنجش سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری
۴۵	.....۵-۶-۲- سنجش تورم میتوکندری
۴۶	.....۶-۶-۲- سنجش میزان مالون دی آلدهید میتوکندریایی
۴۸	.....۷-۲- تجزیه و تحلیل آماری
۴۹	..... <b>فصل ۳: نتایج</b>
۵۰	.....۱-۳- تست برادفورد
۵۲	.....۲-۳- بررسی تست های سمیت در میتوکندری های ایزوله شده از کبد موش صحرائی نر
۵۲	.....۱-۲-۳- بررسی فعالیت آنزیم سوکسینات د هیدروژناز ناشی از ایفوسفامید روی میتوکندری های ایزوله شده از کبد موش صحرائی نر ...
۵۳	.....۲-۲-۳- بررسی مقدار تورم ناشی از ایفوسفامید در میتوکندری های ایزوله شده از کبد موش صحرائی نر
۵۴	.....۳-۲-۳- بررسی پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندری ناشی از ایفوسفامید روی میتوکندری های ایزوله شده از کبد موش صحرائی نر
۵۵	.....۴-۲-۳- بررسی مقدار ROS تولید شده ناشی از ایفوسفامید در میتوکندری های ایزوله شده از کبد موش صحرائی نر
۵۶	.....۵-۲-۳- بررسی افت پتانسیل غشایی میتوکندری ناشی از ایفوسفامید در میتوکندری های ایزوله شده از کبد موش صحرائی نر
۵۷	..... <b>فصل ۴: بحث و نتیجه گیری</b>
۵۸	.....۱-۴- بحث
۶۵	.....۲-۴- نتیجه گیری
۶۵	.....۳-۴- محدودیت ها
۶۵	.....۵-۳- پیشنهادها
۶۶	..... فهرست منابع
۷۴	..... پیوست

## فهرست جداول

جدول ۱-۲	مواد مورد استفاده	۳۲
جدول ۲-۲	وسایل استفاده شده در آزمایش	۳۳
جدول ۳-۲	مواد و مقادیر استفاده شده در بافر برادفورد	۳۵
جدول ۴-۲	مواد و مقادیر مورد استفاده برای ساخت بافر ایزولاسیون	۳۶
جدول ۵-۲	مواد و مقادیر مورد برای ساخت بافر SDH	۳۷
جدول ۶-۲	مواد و مقادیر مورد استفاده برای ساخت بافر تنفسی	۳۸
جدول ۷-۲	مواد و مقادیر مورد استفاده برای ساخت بافر MMP	۳۹
جدول ۸-۲	مواد و مقادیر مورد استفاده برای ساخت بافر تورم میتوکندری	۴۰



## فهرست اشکال

- شکل ۱-۱- ساختار داروی ایفوسفامید ..... ۳
- شکل ۱-۲- تصویر مربوط به متابولیسم داروی ایفوسفامید ..... ۶
- شکل ۲-۴- ترکیب واکنش ماده مالون دی آلدهید با تیوباربیتوریک اسید ..... ۴۷
- شکل ۲-۵- تصویر مکانسیم لیپید پراکسیداسیون ..... ۴۷
- شکل ۳-۱- غلظت های آلبومین گاوی در حضور شناساگر کوماسی بلو ..... ۵۰
- شکل ۳-۱- نمودار جذب (محور عمودی) نمونه های آلبومین براساس غلظت (محور افقی) ..... ۵۱
- شکل ۳-۲- نمودار سنجش فعالیت سوکسینات دهیدورژناز میتوکندری در غلظت های مختلف ..... ۵۲
- شکل ۳-۳- نمودار سنجش تورم میتوکندری در غلظت های مختلف ایفوسفامید ..... ۵۳
- شکل ۳-۴- نمودار سنجش میزان مالودن دی آلدهید میتوکندریایی ..... ۵۴
- شکل ۳-۵- نمودار سنجش سطح ROS میتوکندریایی در غلظت های مختلف ایفوسفامید ..... ۵۵
- شکل ۳-۶- نمودار سنجش سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری در غلظت های مختلف ایفوسفامید ..... ۵۶

## اختصارات

**IP** : Intraperitoneal

**SDH** : Succinate Dehydrogenase

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**MDA** : Malondialdehyde

**DCF**: 2',<sup>7</sup>-dichlorofluorescein

**MMP** : Mitochondrial Membrane Potential

**HIV** : Human Immunodeficiency Virus

**DNA** : Deoxyribonucleic Acid

**RNA** : Ribo Nucleic Acid

**RA** : Rheumatoid Arthritis

**SLE** : Systemic Lupus Erythematosus

**MS** : Multiple Sclerosis

**ATP** : Adenosine Triphosphate

**OXPPOS** : Oxidative Phosphorylation Pathway

**MtDNA** : Mitochondrial DNA

**HSP** : Hereditary Spastic Paraplegia

**UCPs** : Uncoupling proteins

**Ld50** : Lethal Dose

**AMI** : Acute Myocardial Infarction

**LPO** : Lipid Peroxidation

**GSSG** : Glutathione Disulfide

**GSH** : Glutathione

**AML**: Acute myeloid Leukemia

**MTT**: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

**OD** : Optical Density

**TBA** : Thiobarbituric acid

**ANOVA** : Analysis of Variance

**COX** : Cyclooxygenase

**CNS** : Central Nervus System

**PNS** : Peripheral Nervus System

**EDTA** : Ethylenediaminetetraacetic acid

**EGTA** : Ethylene Glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid

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

**MPTP** : Mitochondrial Permeability Transition Pore

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

**NADPH** : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphide

**TCA** : Trichloroacetic acid

**RNS** : Reactive Nitrogen Species

**DMSO** : Dimethyl Sulfoxide

**$\mu$ M** : Micro Molar

**RPTC**: Renal Proximal Tubule Cells