بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت اخذ دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

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

اساتید راهنما:

دکتر احمد سلیمی

دکتر لیلا رضایی شیرمرد

نگارش:

امین آشنا مقدم

شماره پایان نامه : د-۱۹۵

آذر ماه ۱۴۰۲

«تقدیم»

بـــه یـــاد او کـــه ســـالهـــاســت جـــهـان منـتظر اوســـت

تقدیم با بوسه بر دستان پدر و مادر عزیزم، که با شور و اشـتیاق در تمام پستی‌ها و بلندی‌های زندگی پشتیبانی محکم و یـاوری مهربان برای من بوده و محبت خود را بی‌دریغ ارزانی داشته اند. سایه شان بر سرم مستدام باد.

و تقدیم به همقدم و همسر عزیزتر از جانم، که با آمدنش رنگ و بویی تازه به زندگی ام داد، کسی که شیرینی بخش روزهای من شد و امید و آرزو را در قلبم زنده کرد، امید به روزهای خـوب و آرزوی خانه ای با عطر او.

«تشکر و قدردانی»

سپاس خدای را که به ید قدرت بی منتهایش دریای آفرینش را جاری کرد و به اراده ازلی اش همه‌ی خلق را صورت بخشید؛ هر کس را در سایه اراده اش به راهی راهرو گردانید و آتش عشق خود را در وجودشان برانگیخت؛ نه از آن سوی که پیش فرستادشان توان برگشت دارند و نه در این سوی که بازشان داشت توان سبقت.

با تقدیر و تشکر از اساتید بزرگوارم که شایسته هر نوع سپاس، تجلیل و تکریم اند؛ اساتید ارجمندی که صبورانه، با ارائه رهنمودها، انتقادها و پیشنهادهایشان، نه تنها در تمامی مراحل اجرای این پایان نامه بلکه در کل دوران تحصیلم مرا حمایت و تشویق نمودند و بدون شک انجام این پایانامه بدون کمک و راهنمایی‌های ارزنده آنها امکان پذیر نبوده است.

و با قدردانی از همه دوستانی که به نوعی در به ثمر رسیدن این رساله زحمت کشیده اند.

«چکیده»

مقدمه:

مطالعات قبلی نشان داده‌اند استفاده از داروی تراستوزومب در درمان بیماران سرطانی می‌تواند سبب ایجاد عارضه‌ی مهم سمیت قلبی و مرگ کاردیومیوسیت‌ها شود و یکی از مکانیسم‌های مطرح برای این موضوع ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها است. همچنین ترکیب کورکومین در مطالعات بسیاری اثرات خوب آنتی اکسیدانی و ضد التهابی از خود نشان داده است. بر این اساس، این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات محافظتی کورکومین در سمیت قلبی ناشی از تراستوزومب و بررسی اثرات بالقوه آن بر میتوکندری در موش‌های صحرایی طراحی شد.

مواد و روش‌ها:

۲۴ موش صحرایی نر بالغ ویستار به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه اول (شاهد) تحت درمان با نرمال سالین، گروه دوم تحت درمان با تراستوزومب (۲/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق داخل صفاقی روزانه)، گروه سوم تحت درمان با کورکومین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تزریق داخل صفاقی، روزانه) و گروه چهار تحت درمان با تراستوزومب به همراه کورکومین. خون و بافت قلب موش‌ها در روز ۱۱ جمع‌آوری شد و برای ارزیابی کراتین کیناز، لاکتات دهیدروژناز، تروپونین قلبی، مقدار مالون دی آلدئید، سطح گلوتاتیون و پارامترهای سمیت میتوکندریایی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین بافت قلب برای آنالیز هیستوپاتولوژیک ارسال شد.

نتایج:

تراستوزومب افزایش قابل توجهی در سطح کراتین کیناز، لاکتات دهیدروژناز، تروپونین قلبی، مالون دی آلدئید و گلوتاتیون اکسید شده ایجاد کرد. همچنین تراستوزومب باعث افزایش اختلالات میتوکندری و تغییرات هیستوپاتولوژیک در قلب موش صحرایی شد. در بیشتر آزمایش‌ها، تزریق همزمان کورکومین با تراستوزومب سطح پارامترهای اندازه گیری شده را به حد نرمال و نزدیک گروه شاهد رساند و اختلالات میتوکندری و تغییرات هیستوپاتولوژیک را بازیابی کرد.

نتیجه گیری:

این مطالعه اثرات محافظت قلبی کورکومین را در برابر سمیت قلبی ناشی از تراستوزومب نشان داد که می‌تواند به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و محافظت از میتوکندری آن نسبت داده شود. این ترکیب به عنوان کاندیدای درمانی خوب برای آزمایش در محیط بالینی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی:

محافظ قلب؛ آنتی‌اکسیدان؛ میتوکندری قلبی؛ تراستوزومب؛ کورکومین

«فهرست مطالب»

۱- فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱- سرطان ۲

۱-۱-۱- لغت شناسی و تعریف ۲

۱-۱-۲- علائم و اظهارات بیمار ۲

۱-۱-۳- متاستاز ۳

۱-۱-۴- علل ایجاد ۴

۱-۲- سرطان سینه ۴

۱-۳- گیرنده HER2 ..... ۷

۱-۴- تراستوزومب ۸

۱-۵- کورکومین ۱۱

۱-۵-۱- ساختار، ویژگی‌ها و خواص ۱۱

۱-۵-۲- فراهمی زیستی، متابولیت‌ها و راه‌های تجویز ۱۲

۱-۵-۳- خواص کورکومین ۱۳

۱-۵-۴- خواص آنتی اکسیدانی و ضد رادیکال‌های آزاد ۱۴

۱-۵-۵- خواص ضدالتهابی ۱۶

۱-۵-۶- بررسی خواص ضد توموری کورکومین ۱۷

۱-۵-۷- کورکومین و جلوگیری از عوارض قلبی عروقی ۱۸

۱-۶- بررسی متون ۲۰

۱-۶-۱- سمیت ایجاد شده توسط تراستوزومب در بافت قلب و عروق ۲۰

۱-۶-۲- اثرات حفاظتی کورکومین در سمیت قلبی القا شده با داروها ۲۱

۱-۷- اهداف ۲۲

۱-۷-۱- هدف کلی ۲۲

۱-۷-۲- اهداف اختصاصی ۲۲

۱-۷-۳- هدف کاربردی ۲۳

۱-۷-۴- فرضیات یا سئوالات پژوهش ۲۳

۲- فصل دوم: مواد و روش‌ها..... ۲۴

۲-۱- نوع مطالعه..... ۲۵

۲-۲- مکان انجام مطالعه..... ۲۵

۲-۳- مواد و دستگاه‌های مورد استفاده..... ۲۵

۲-۳-۱- مواد شیمیایی..... ۲۵

۲-۳-۲- وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌ها..... ۲۶

۲-۴- جمعیت حیوانی..... ۲۷

۲-۵- گروه بندی حیوانات جهت مطالعه..... ۲۸

۲-۶- تشخیص سطوح کراتین کیناز (CK)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و تروپونین I..... ۲۸

۲-۷- ارزیابی های هیستوپاتولوژی..... ۳۱

۲-۸- تهیه بافر PBS..... ۳۲

۲-۹- لیپید پراکسیداسیون..... ۳۳

۲-۹-۱- محلول‌های مورد استفاده..... ۳۳

۲-۹-۲- اندازه گیری MDA..... ۳۳

۲-۱۰- محتوای GSH و GSSG..... ۳۵

۲-۱۰-۱- بافر فسفات(۰/۱ مولار)..... ۳۶

۲-۱۰-۲- بافر Tris HCL(۵۰mM)..... ۳۷

۲-۱۰-۳- اندازه گیری گلوتاتیون کاهش یافته (GSH) و دی سولفید اکسید شده (GSSG)..... ۳۷

۲-۱۱- روش جداسازی میتوکندری قلبی..... ۳۷

۲-۱۲- اندازه گیری فعالیت سوکسینات دهیدروژناز..... ۳۸

۲-۱۳- اندازه گیری تورم میتوکندری..... ۳۸

۲-۱۴- سنجش رادیکال‌های فعال اکسیژن..... ۳۹

۲-۱۴-۱- تهیه بافر تنفسی(تعیین کننده میزان ROS)..... ۳۹

۲-۱۴-۲- اندازه گیری ROS..... ۴۰

۲-۱۵- سنجش سقوط پتانسیل غشاء میتو کندری..... ۴۰

۲-۱۵-۱- تهیه بافر تعیین کننده میزان سقوط پتانسیل(MMPc)..... ۴۰

۲-۱۵-۲- اندازه‌گیری میزان سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری..... ۴۱

۲-۱۶- تست بردفورد..... ۴۲

۲-۱۷- تحلیل آماری ۴۲

۳- فصل سوم: نتایج ۴۳

۳-۱- بررسی نتایج هیستوپاتولوژی ۴۴

۳-۲- بررسی اثرات درمان بر فاکتورهای سرمی ۴۵

۳-۳- بررسی اثرات درمان بر پارامترهای استرس اکسیداتیو ۴۷

۳-۳-۱- اثر کورکومین بر پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) ناشی از تراستوزومب ۴۷

۳-۳-۲- اثر کورکومین بر تغییرات گلوتاتیون احیاء (GSH) ناشی از تراستوزومب ۴۸

۳-۳-۳- اثر کورکومین بر تغییرات گلوتاتیون اکسید GSSG ناشی از تراستوزومب ۴۹

۳-۴- تاثیر درمان کورکومین بر سمیت حاصل از تراستوزومب در میتوکندری ۵۰

۳-۴-۱- سوکسینات دهیدروژناز ۵۰

۳-۴-۲- تورم میتوکندری ۵۱

۳-۴-۳- تشکیل ROS میتوکندری ۵۲

۳-۴-۴- فروپاشی MMP ۵۳

۴- فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۵۵

۴-۱- بحث ۵۶

۴-۲- نتیجه گیری ۶۴

۴-۳- پیشنهادات ۶۴

۴-۴- محدودیت‌ها ۶۵

«فهرست اشکال»

شکل ۱-۱ دایمرهای قابل تشکیل توسط خانواده HER ۸

شکل ۱-۲ مکانیسم‌های مولکولی استرس اکسیداتیو القا شده با تراستوزوماب ۱۰

شکل ۱-۳ ساختار شیمیایی مولکول کورکومین ۱۲

شکل ۲-۱ نقش کراتین کیناز در سلول‌ها ۲۹

شکل ۲-۲ شماتیک عضله قلب و انواع تروپونین‌ها ۳۰

شکل ۲-۳ مکانیسم عملکرد لاکتات دهیدروژناز ۳۱

شکل ۲-۴ نحوه‌ی ایجاد مالون دی آلدهید و اثرات آن ۳۴

شکل ۲-۵ ترکیب صورتی رنگ حاصل از واکنش MDA و TBARS ۳۵

شکل ۲-۶ گلوتاتیون احیاء و اکسید شده ۳۶

شکل ۳-۱ تأثیر کورکومین بر تصاویر رنگ‌آمیزی H&E بافت قلب ۴۴

شکل ۳-۲ اثرات کورکومین بر سطح سرمی کراتین کیناز ۴۵

شکل ۳-۳ اثرات کورکومین بر سطح سرمی لاکتات دهیدروژناز ۴۶

شکل ۳-۴ اثرات کورکومین بر سطح سرمی تروپونین ۴۷

شکل ۳-۵ تأثیر کورکومین بر سطح مالون دی آلدهید ۴۸

شکل ۳-۶ تأثیر کورکومین بر سطح گلوتاتیون احیاء ۴۹

شکل ۳-۷ تأثیر کورکومین بر گلوتاتیون اکسید ۵۰

شکل ۳-۸ اثرات کورکومین بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز ۵۱

شکل ۳-۹ اثرات کورکومین بر تورم میتوکندری ۵۲

شکل ۳-۱۰ اثرات کورکومین بر تشکیل ROS میتوکندری ۵۳

شکل ۳-۱۱ اثرات کورکومین بر فروپاشی پتانسیل غشای میتوکندری ۵۴

شکل ۴-۱ مکانیسم عملکرد تراستوزومب بروی سلول و میتوکندری آن ۶۳

«فهرست جدول‌ها»

جدول ۲-۱ مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه ۲۵

جدول ۲-۲ دستگاه‌های استفاده شده در این مطالعه ۲۶

جدول ۲-۳ اجزای تشکیل دهنده بافر PBS ۳۲

جدول ۲-۴ محلول‌های استفاده شده در تعیین مقدار MDA ۳۳

جدول ۲-۵ اجزای بافر ۰/۱ مولار فسفات ۳۶

جدول ۲-۶ اجزای بافر تنفسی ۳۹

جدول ۲-۷ اجزای بافر MMP ۴۱

«فهرست علائم اختصاری»

IP: Intraperitoneal

LDH: Lactate dehydrogenase

LOX: Lipoxygenase

MDA: Malondialdehyde

MMP: Mitochondrial membrane potential

mTOR: mammalian/mechanistic target of rapamycin

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide

NO: Nitric oxide

NRG1: Neuregulin 1

PD-L1: Programmed Death- Ligand 1

Pl3k: Phosphatidylinositol 3 - kinase

QR: Quinone Reductase

ROS: Reactive oxygen species

SOD: Superoxide dismutase

TBA: Thiobarbituric acid

TCA: Trichloroacetic acid

TNF: Tumor Necrosis Factor

TOP2B: DNA Topoisomerase 2 Beta

CUR: Curcumin

TRIS-HCL: 2-Amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol hydrochloride

TZM: Trastuzumab

ΔΨm: Intrinsic mintochondrial membrane potential

Akt: Protein kinase B

BHT: Butylated Hydroxy Toluene

BSA: Bovine Serum Albumin

CAT: Catalase

CK: Creatine kinase

COX-2: Cyclooxygenase-2

CPK: Creatine phosphokinase

DCFH-DA: 2'-7'dichlorofluorescin diacetate

DFS: Disease free survival

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

EGFR: Epidermal Growth factor receptor

ERK: Extracellular receptor kinase

FDA: Food and Drug Administration

GPx: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione

GSSG: Glutathione Disulfide

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HDAC: Histone Deacetylase

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

HER: Human epidermal growth factor receptor

HPAC: Human Panceratic Adenocarcinoma Epithelial Cell line