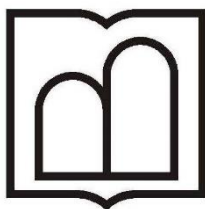


اللَّهُمَّ احْمِمْ لِي



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه‌ی رساله‌ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی سمیت میتوکندریایی داروی ایفوسفامید با استفاده از میتوکندری‌های ایزوله

شده از قلب موش صحرائی نر

استاد راهنما:

دکتر احمد سلیمی

نگارش:

ویدا کامرانی مقدم

شماره پایان نامه:

۱۴۰۲/۱۱ - ۲۰۲۵

زمستان ۱۴۰۲

اهداء پایان نامه

خداوند سبحان را سپاسگذارم که به بنده حقیر توفیق انجام و اتمام پژوهش حاضر را عنایت فرمود.

بعد از مدتها، پس از پیمودن راه های فراوان که با حضور شیرین اساتید عزیزم، با راهنمایی ها و دغدغه های

فراوانشان و شیطنت های زیبای آن دوران، نگاه های پدر و مادرم با چشم های پر از برق و شوق و زیبایی

حضور دوستان در کنارم که محنتی های این راه را به امید و روشنی راه تبدیل کردند امیدوارم بتوانم در

آینده ای نزدیک جو بکوی این همه محبت آنها باشم...

اکنون با احترام فراوان برای این همه تلاش این عزیزان برای موفقیت من، این پایان نامه را به پدر و

مادر فداکار، برادر دلوز و همسر مهربانم اهدا می نمایم.

امیدوارم قادر به درک زیبایی های وجودشان باشم...

تقدیر و تشکر

در آغاز از استاد بزرگ و دانشمند جناب آقای دکتر احمد سلیمی که راهنمایی این پایان نامه را به عهده داشته‌اند کمال تشکر را دارم. از درگاه ایزدمنان دوام عزت و سلامت، تداوم حضور و تاثیر آن بزرگوار را مسئلت دارم. تشکر و تقدیر برای شماست که همواره لطفان را به من ارزانی داشتید؛ از زحماتان بی نهایت تشکر می‌کنم.

خالصانه از تمامی اساتید و معلمان و مدرسانی که در مقاطع مختلف تحصیلی به من علم آموختند و مرا از سرپرشتمه دانایی سیراب کرده‌اند، تشکر می‌کنم.

از تمامی دوستان عزیزم که سختی‌های این مسیر دشوار را با شیرینی حضورشان بر من آسان نمودند کمال تشکر را دارم.

باشد که قردادان زحمات تمامی شما عزیزان باشم.

خلاصه پایان نامه

مقدمه:

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که سمیت میتوکندریایی، منجر به انواع سمیت‌های قلبی می‌شود. میتوکندری‌های ایزوله شده به‌عنوان سنجش‌های غربالگری با کارایی بالا برای ارزیابی سمیت میتوکندری، پیش‌بینی سمیت قلبی و بررسی‌های مکانیکی، استفاده شده‌اند. ایفوسفامید به‌عنوان یک داروی ضدسرطان با افزایش خطر مسمومیت قلبی 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 ایزوله شده از قلب بود.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه میتوکندری‌ها با لیز مکانیکی و سانترفیوژ افتراقی از اندام قلب جدا شده و با غلظت‌های مختلف ایفوسفامید (۰، ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار) مواجهه داده شدند. با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و فلوسایتومتری فعالیت سوکسینات دهیدروژنازهای میتوکندری (SDH)، تورم میتوکندری، پراکسیداسیون لیپید میتوکندری، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) را در طول ۱ ساعت ارزیابی کردیم.

نتایج:

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

بحث و نتیجه گیری:

به طور کلی داده‌های این مطالعه نشان داد که ایفوسفامید مستقیماً در میتوکندری‌های ایزوله شده از قلب، سمیت ایجاد نمی‌کند و احتمالاً مسیرها و متابولیسم‌های دیگری در سمیت این ترکیب نقش دارند. همچنین این مطالعه ثابت کرد که میتوکندری به تنهایی نقش اصلی در سمیت قلبی ناشی از ایفوسفامید را ندارد. می‌توان پیشنهاد کرد سایر مسیرهای تولید کننده‌ی متابولیت‌های سمی نیز جهت کاهش سمیت این دارو، مورد مطالعه قرار گیرد.

کلمات کلیدی:

ایفوسفامید، میتوکندری، مکانیسم‌های سمیت، سمیت قلبی

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه.....	۱
۱-۱-مقدمه و بیان مسئله.....	۲
۱-۲-داروهای آنتی نئوپلاستیک آلکیله کننده.....	۳
۱-۲-۱-تاریخچه.....	۳
۱-۲-۱-۲-عملکرد داروهای آنتی نئوپلاستیک آلکیله کننده.....	۶
۱-۲-۳-طبقه بندی داروهای آنتی نئوپلاستیک آلکیله کننده.....	۷
۱-۳-ایفوسفامید.....	۸
۱-۳-۱-تاریخچه.....	۸
۱-۳-۱-۲-فارماکوکینتیک.....	۹
۱-۳-۳-فارماکودینامیک.....	۱۲
۱-۳-۴-مکانیسم عمل.....	۱۴
۱-۳-۵-کاربرد دارویی ایفوسفامید.....	۱۸
۱-۳-۶-۱-عوارض جانبی.....	۲۰
۱-۳-۶-۱-۱-عوارض سیستم عصبی مرکزی.....	۲۰
۱-۳-۶-۱-۲-عوارض کلیوی.....	۲۱
۱-۳-۶-۳-عوارض گوارشی و کبدی.....	۲۲
۱-۳-۶-۳-۱-عوارض خونی.....	۲۲
۱-۳-۶-۳-۱-۵-عوارض قلبی و عروقی.....	۲۳
۱-۴-قلب.....	۲۴

۲۴	۱-۴-۱- ساختار و عملکرد قلب
۲۶	۲-۴-۱- تاریخچه بیماری‌های قلبی و عروقی
۲۶	۱-۴-۳- اپیدمیولوژی و ریسک فاکتورهای بیماری‌های قلبی و عروقی
۲۷	۱-۵- میتوکندری
۲۷	۱-۵-۱- تاریخچه
۲۹	۲-۵-۱- ساختار میتوکندری
۲۹	۳-۵-۱- عملکرد میتوکندری
۳۴	۴-۵-۱- مورفولوژی میتوکندری در بیماری‌های قلبی و عروقی
۳۴	۱-۵-۵- اثرات ROS میتوکندری بر قلب و نقش در بیماری
۳۴	۱-۵-۵-۱- اثرات ROS میتوکندری بر میوسیت‌ها
۳۵	۲-۵-۵-۱- اثرات ROS میتوکندری بر سلول‌های اندوتلیال
۳۵	۳-۵-۵-۱- نقش ROS میتوکندری در انفارکتوس میوکارد
۳۶	۶-۵-۱- تغییرات کمپلکس‌های مختلف زنجیره انتقال الکترون پس از آسیب بافت قلبی
۳۶	۱-۶-۵-۱- تغییرات کمپلکس I در میتوکندری
۳۶	۲-۶-۵-۱- تغییرات کمپلکس II میتوکندری
۳۷	۳-۶-۵-۱- تغییرات کمپلکس III میتوکندری
۳۷	۴-۶-۵-۱- تغییرات کمپلکس IV میتوکندری
۳۹	۶-۱- اهداف
۳۹	۱-۶-۱- اهداف کلی
۳۹	۱-۶-۲- اهداف اختصاصی
۳۹	۱-۶-۳- هدف کاربردی
۳۹	۱-۶-۴- فرضیات یا سوالات پژوهش

۴۱	فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها.....
۴۲	۲-۱-نوع مطالعه.....
۴۲	۲-۲-مکان انجام مطالعه.....
۴۲	۲-۳-فلوچارت انجام کار.....
۴۲	۲-۴-مواد شیمیایی و وسایل مورد استفاده.....
۴۳	۲-۴-۱-مواد شیمیایی.....
۴۵	۲-۴-۲-وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌ها.....
۶۴	۲-۵-حیوانات مورد مطالعه.....
۶۶	۲-۶-محتویات و طرز تهیه بافرها و محلول‌ها.....
۶۶	۲-۶-۱-محلول کوماسی بلو.....
۶۷	۲-۶-۲-بافر برادفورد.....
۶۸	۲-۶-۳-بافر ایزولاسیون.....
۶۹	۲-۶-۴-بافر تورم.....
۷۰	۲-۶-۵-بافر MTT.....
۷۲	۲-۶-۶-بافر MMP.....
۷۴	۲-۶-۷-بافر تنفسی.....
۷۶	۲-۶-۸-محلول‌های مورد استفاده در سنجش پراکسیداسیون لیپیدی.....
۷۷	۲-۶-۸-۱-نحوه ساخت محلول ۰/۱٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید.....
۷۷	۲-۶-۸-۲-تهیه محلول ۲۰٪ وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید.....
۷۷	۲-۶-۸-۳-تهیه محلول ۰/۵٪ وزنی/حجمی تیوباربتوریک اسید.....
۷۷	۷-۲-آماده سازی میتوکندری از قلب موش صحرایی.....
۷۹	۲-۸-تهیه غلظت‌های مختلف ایفوسفامید.....

۸۰آزمایش‌ها
۸۰۲-۹-۱-آزمایش برادفورد جهت تعیین مقدار پروتئین
۸۴۲-۹-۲-آزمایش تورم میتوکندریایی
۸۵۲-۹-۳-سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری (MTT Test)
۸۷۲-۹-۴-سنجش میزان سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری (MMP Test)
۸۸۲-۹-۵-سنجش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)
۹۸۲-۹-۶-سنجش پراکسیداسیون لیپیدی
۹۱۲-۱۰-روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری
۹۲ فصل سوم: نتایج
۹۴۳-۱-اثر داروی ایفوسفامید بر تورم میتوکندریایی
۹۵۳-۲-اثر داروی ایفوسفامید بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی
۹۶۳-۳-اثر داروی ایفوسفامید بر سقوط پتانسیل غشای میتوکندری
۹۷۳-۴-اثر داروی ایفوسفامید بر میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)
۹۸۳-۵-اثر داروی ایفوسفامید بر پراکسیداسیون لیپید
۹۹ فصل چهارم : بحث و نتیجه‌گیری
۹۹۴-۱-بحث
۱۰۶۴-۲-نتیجه‌گیری
۱۰۷۴-۳-پیشنهادات
۱۰۷۴-۴-محدودیت‌ها
۱۰۸فهرست منابع و مراجع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ ساختار شیمیایی بیس (۲-کلرواتیل) سولفید یا گاز خردل..... ۴
- شکل ۲-۱ مسیر متابولیسم داروی ایفوسفامید..... ۱۱
- شکل ۳-۱ ساختار شیمیایی داروی ایفوسفامید..... ۱۲
- شکل ۴-۱ مکانیسم عمل داروی سیکلوفسفامید..... ۱۴
- شکل ۵-۱ مکانیسم عمل متابولیت خردل فسفرامید..... ۱۶
- شکل ۶-۱ ساختار قلب..... ۲۵
- شکل ۷-۱ زنجیره انتقال الکترون و چرخه کربس..... ۳۳
- شکل ۱-۲ هموژنایزر شیشه‌ای..... ۴۸
- شکل ۲-۲ pH-متر..... ۴۷
- شکل ۳-۲ ترازوی آزمایشگاهی..... ۴۹
- شکل ۴-۲ سانتریفیوژ یخچال‌دار..... ۴۹
- شکل ۵-۲ بن‌ماری..... ۵۱
- شکل ۶-۲ ست سمپلر..... ۵۲
- شکل ۷-۲ دستگاه یخ‌ساز..... ۵۴
- شکل ۸-۲ انکوباتور CO₂..... ۵۳
- شکل ۹-۲ هیتر استیرر..... ۵۵
- شکل ۱۰-۲ یخچال فریزر..... ۵۶
- شکل ۱۱-۲ یخچال ۸۰- درجه سانتیگراد..... ۵۶
- شکل ۱۲-۲ دستگاه مولد آب مقطر..... ۵۷
- شکل ۱۳-۲ الایزا ریدر..... ۵۸
- شکل ۱۴-۲ دستگاه فلوسایتومتری..... ۵۹

- شکل ۱۵-۲ ورتکس..... ۵۹
- شکل ۱۶-۲ هموژنایزر اولتراسونیک..... ۶۰
- شکل ۱۷-۲ دستگاه ترموبلاک..... ۶۲
- شکل ۱۸-۲ اتوکلاو..... ۶۳
- عکس ۱۹-۲ پلیت کشت سلولی..... ۶۴
- شکل ۲۰-۲ موش صحرایی نر نژاد ویستار..... ۶۴
- شکل ۲۱-۲ مراحل بیهوش و فیکس کردن موش صحرایی..... ۷۹
- شکل ۲۲-۲ مراحل جراحی موش صحرایی و جداسازی و هموژن کردن بافت قلبی آن..... ۷۹
- شکل ۲۳-۲ تست برادفورد..... ۸۱
- شکل ۲۴-۲ آزمایش سنجش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز (تست MTT)..... ۸۷
- شکل ۲۵-۲ واکنش مالون دی‌آلدهید با تیوباربیتوریک اسید..... ۸۹

فهرست جداول

- جدول ۱-۲ لیست مواد شیمیایی استفاده شده در پایان نامه..... ۴۳
- جدول ۲-۲ لیست وسایل آزمایشگاهی و دستگاه‌های مورد استفاده در پایان نامه..... ۴۵
- جدول ۳-۲ اجزای محلول کوماسی بلو..... ۶۶
- جدول ۴-۲ اجزای بافر برادفورد..... ۶۷
- جدول ۵-۲ اجزای بافر ایزولاسیون..... ۶۸
- جدول ۶-۲ اجزای بافر تورم..... ۶۹
- جدول ۷-۲ اجزای بافر MTT..... ۷۰
- جدول ۸-۲ اجزای بافر MMP..... ۷۲
- جدول ۹-۲ اجزای بافر تنفسی..... ۷۵
- جدول ۱۰-۲ اجزای محلول‌های مورد نیاز جهت سنجش پراکسیداسیون لیپید..... ۷۶

فهرست نمودارها

- نمودار ۱-۲ تست برادفورد..... ۸۲
- نمودار ۱-۳ اثر داروی ایفوسفامید بر تورم میتوکندریایی..... ۹۴
- نمودار ۲-۳ اثرات داروی ایفوسفامید بر فعالیت سوکسینات دهیدروژناز..... ۹۵
- نمودار ۳-۳ اثر داروی ایفوسفامید بر پتانسیل غشای میتوکندری..... ۹۶
- نمودار ۴-۳ اثر داروی ایفوسفامید بر تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)..... ۹۶
- نمودار ۵-۳ اثر داروی ایفوسفامید بر میزان پراکسیداسیون لیپید..... ۹۷

ADP: Adenosine Diphosphate

AIF: Apoptosis-Inducing Factor

ATP: Adenosine Triphosphate

BSA: Bovin Serum Albumin

CHD: Coronary Heart Disease

DCF-DA: 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic

EGTA: Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl ether)

ELISA: The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAD: Coenzyme Flavin Adenine Dinucleotide

FADH₂: Flavin Adenine Dinucleotide

GSH: Glutathione

H₂DCF: 2',7'-Dichlorofluorescein

HEPES: N-(2-Hydroxyethyl) Piperazine-N 0-(2-ethanesulfonic acid)

HF: Heart Failure

IFO: Ifosfamide

LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction

MMP: Mitochondria Membrane Potential

MDA: Malondialdehyde

MOPS: 3-Morpholinopropane-1-Sulfonic

MPT: Mitochondrial Membrane Permeability Transition

MPTP: Mitochondrial Permeability Transition Pore

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

mtDNA: Mitochondrial DNA

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey

OMM: Outer Mitochondrial Membrane

OXPHOS: Mitochondrial Oxidative Phosphorylation

PNR: Point of no Return

PTP: Mitochondrial Permeability Transition Pores

ROS: Reactive Oxygen Species

SDH: Succinate Dehydrogenase

TBA: Thiobarbituric Acid

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substance

TCA: Trichloroacetic Acid

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substance

Vd: Volume of Distribution