

دانشگاه آزاد اسلامی

**واحد علوم دارویی**

**پایان نامه**

**جهت دریافت درجه دکتری داروسازی**

موضوع:

بررسی متابولیسم داروی نوسکاپین در سلولهای

مجزای کبد موش

**اساتید راهنما**

**استاد مشاور**

**نگارش**

**فهرست مطالب**

**عنوان صفحه**

چکیده پایان نامه

**بخش اول: مقدمه**

مقدمه

1-1- اوپیوییدها

1-1-1- تاریخچه

1-1-2- آلکالوییدهای تریاک

1-1-3- پپتیدهای اوپیویید درون زاد

1-1-4- آثار اوپیوییدها بر اعضاي مختلف

1-1-5- مصارف باليني اوپیوییدها

1-2- متابولیسم

1-2-1- تاریخچه

1-2-2- کلیات متابولیسم

1-2-3- مکان های متابولیسم داروها

1-2-4- عوامل تعیین کننده سرعت تغییر شکل زیستی

1-2-5- تکنیک های تجربی بررسی متابولیسم

1-2-6- کاربرد و اهمیت بررسی متابولیسم

1-3- جداسازی سلولهای کبد

1-4- روش های مطالعه شده برای شناسایی و اندازه گیری نوسکاپین و متابولیت هایش

1-5- کلیاتی درباره کروماتوگرافی و HPLC

1-5-1- تاریخچه

1-5-2- اساس کروماتوگرافی

1-5-3- فازهای متحرک و ساکن در کروماتوگرافی مایع

1-5-4- کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

1-5-5- اساس دستگاه HPLC

**عنوان صفحه**

1-6- نوسکاپین

1-6-1- برخی اثرات نوسکاپین

1-6-2- فارماكوكينتيك نوسكاپين

1-6-3- مروری بر روند متابولیسم نوسکاپین

**بخش دوم: روشها و مواد**

2-1- اهداف مطالعه

2-2- دستگاه ها و وسایل

2-3- مواد

2-4- تهیه بافرهای پرفیوژن

2-4-1- محلول Stock بافر هنکس با غلظت 10 برابر

2-4-2- محلول Stock بافر کربس- هنزلیت با غلظت 2 برابر

2-4-3- بافر هنکس یک

2-4-4- بافر هنکس دو

2-4-5- بافر کربس آلبومین

2-4-6- بافر کربس- هپس

2-5- تهیه محلول کلاژن و کوت کردن پلیت 6خانه

2-6- محیط کشت

2-6-1- مراحل تهیه محیط کشت: (1:1) DMEM, F12

2-7- سرم جنین گاو (FBS)

2-8- کیت استریل پرفیوژن

2-9- تهیه هپاتوسیت های تازه

2-9-1- نگهداری سلولهای به دست آمده از کبد موش

2-9-2- بررسی حیات سلولی و نحوه اثر دادن دارو روی سلولهای جدا شده از کبد موش

2-9-3- تهیه نمونه برای انجام آنالیز

2-10- روش سنتز مکونین (6 و 7- دی متوکسی فتالید)

2-11- دلایل انتخاب HPLC

**عنوان صفحه**

2-11-1- مشخصات دستگاه HPLC

2-11-2- انواع روش های HPLC آزمایش شده

2-11-3- روش تهیه بافر 10X استات با 4 pH=

2-11-4- روش تهیه بافر فسفات سدیم Mm 25 با 5/4 pH=

2-12- استخراج متابولیت از ادرار انسان

**بخش سوم: نتایج**

3-1- جداسازی سلولهای کبد

3-2- سنتز مکونین

3-3- روش کروماتوگرافی با کارکرد عالی (HPLC)

**بخش چهارم: بحث و نتیجه گیری**

4-1- جداسازی سلول های کبد موش

4-2- روش کروماتوگرافی با کارکرد عالی (HPLC)

4-3- متابولیسم نوسکاپین

4-4- متابولیسم نوسکاپین در ادرار انسان

خلاصه انگلیسی

منابع

اختصارات

**چکیده**

اطلاع از مسیرهای متابولیسم دارو نقش مهمی در درک سمیت دارو دارد. این اطلاعات می توانند در طراحی داروهای جدید و روشن کردن مکانیسم سرطان زایی ترکیبات شیمیایی به کار روند. از   
این رو یافتن روشی مناسب برای بررسی متابولیسم داروها گام مهمی در جهت رسیدن به دیگر اطلاعات با ارزش در مورد داروها است. متابولیسم نوسکاپین در ادرار انسان، خرگوش و موش صحرایی بررسی شده است. طبق نتایج به دست آمده از این مطالعات نوسکاپین از دو مسیر o- دمتيلاسیون و شکسته شدن پیوند C1-9 متابولیزه می شود و مکونین به عنوان محصول عمده متابولیسم آن شناخته شده است. در این تحقیق متابولیسم نوسکاپین توسط یک روش ex vivo، سلولهای جدا شده کبدی، مورد بررسی قرار گرفت این روش از چند جنبه دارای اهمیت است: اين روش حد واسط مناسبی بین روشهای قبلی مانند آنزیم های حل شده، فراکسیون ارگان جدا شده و مطالعه مستقیم روی حیوان کامل است. این سلولها خصوصیات لازم بافت دست نخورده مانند نفوذپذیری غشا را دارا هستند از این رو در بسیاری از مطالعات بیوشیمیایی به کار می روند.

در این تحقیق سلولهای کبد موش صحرایی طی یک فرآیند دقیق جدا شدند و زنده بودن آنها با آزمایش منع تریپان آبی %1/0 و مشاهده میکروسکوپی سلولها تأیید شد. شناسایی استاندارد داروی نوسکاپین و متابولیت اصلی آن، مکونین توسط روش HPLC صورت گرفت. اگر چه استانداردهای نوسکاپین و متابولیت اصلی آن در محلولهای Spike شده مشاهده شدند اما این روش قادر به شناسایی متابولیت ها در عصاره سلولی نبود. به نظر می رسد که افزایش حساسیت روش به مشاهده همزمان نوسکاپین و متابولیت ها کمک کند.

**اختصارات**

- ACEIS: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors

- BSA: Bovine Serum Albomin

-DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

- DMSO: Dimethyl sulfoxide

EXP: Exposure

EXT: Extract

FBS: Fetal Bovine Serum

FCS: Fetal Calf Serum

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

MTT: 3- [4, 5- Dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyl tetrazolium bromide

ml: milliLiter

mM: millimole

: ug: Microgram

: Microlitre

Rt = Retention time

SPE= Solid Phase Extraction

v = volume

w = weight

### مقدمه:

### متابوليسم يكي از مراحل مهم فاركوكينتيك داروها است. مطالعه در مورد متابوليسم داروها براي دستيابي به اطلاعاتي در مورد سميت داروها و مكانيسم اثر آنها مفيد است. روش هاي مختلفي براي بررسي متابوليسم وجود دارند كه عبارتند از: خوراندن تركيبات به حيوانات در حالت عادي يا با كانول در راههاي صفراوي و مطالعه و جستجوي متابوليت هاي دارو در مايعات بيولوژيك مانند خون، ادرار، و ... ، مطالعات آنزيمي بر روي برشهاي بافتي، هموژنه ها و اجزاي سلولي. مطالعه روي حيوان داراي مشكلاتي است بنابراين در اين مطالعه از سوسپانسيون سلولهاي جدا شده كبدي استفاده شده است. اين روش علاوه بر بررسي متابوليسم در ساير مطالعات بيوشيميايي از جمله مطالعه روي گلوكونئوژنز، گليكوليز، سنتز پروتئين، ليپيد، اسيدهاي چرب و اوره، انتقالات غشاء و ... نيز مي تواند مورد استفاده قرار گيرد.