بسم الله الرحمن الرحيم

١٩٨٢

۸۷/۱/۱۰۷۷۳۰
۸۸/۱/۲۴

دانشگاه رازی

دانشکده علوم

گروه بیولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی بیوشیمی

عنوان پایان نامه:

طراحی کیت ایمنوکروماتوگرافی برای اندازه گیری میزان دیگوکسین در سرم با استفاده ازنانوذرات طلا

۱۳۸۸ /۱/۲۱

استاد راهنما:

دکتر سهیلا کاشانیان

استاد مشاور :

دکتر کبری امیدفر

نگارش:

سولماز کیا

شهریور ماه ۱۳۸۷

۱۰۹۸۱۸

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشگاه رازی

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی بیوشیمی

نام دانشجو:

سولماز کیا

تحت عنوان:

طراحی کیت ایمنوکروماتوگرافی برای اندازه گیری میزان دیگوکسین در سرم با استفاده ازنانوذرات طلا

۱۳۸۸ /۱/ ۲۱

در تاریخ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

استاد راهنما:	دکتر سهیلا کاشانیان	با مرتبه ی علمی: دانشیار	امضاء
استاد مشاور:	دکتر کبری امیدفر	با مرتبه ی علمی: استادیار	امضاء
استاد داور داخل گروه:	دکتر مهری آزاد بخت	با مرتبه ی علمی: استادیار	امضاء
استاد داور خارج از گروه:	دکتر علی گرگین کرجی	با مرتبه ی علمی: استادیار	امضاء

چکیده

دیگوکسین از داروهای گلیکوزید قلبی است که بطور وسیع جهت درمان نارسایی احتقان قلبی مورد استفاده قرار می گیرد. دیگوکسین دارویی فوق العاده سمی است و علائم سمی ناشی از مصرف زیاد دیگوکسین، با علائم حاصل از کمبود آن مشابهت دارند همچنین به علت طیف باریک درمانی آن، مسمومیت با دیگوکسین در مراتب مختلف یک مشکل معمول درمان با این دارو می‌باشد. میزان متابولیسم این دارو در بیماران مختلف از جمله بیماران تیروئیدی و کلیوی متفاوت است ، به این دلیل مقادیر آن در سرم بیماران تحت درمان باید به طور مداوم اندازه گیری شود.

ذرات طلا از قطر ۱۵ تا ۳۰ نانومتر تهیه و با روش میکروسکوپ الکترونی عبوری مشاهده و اندازه گیری شدند. ذرات طلای هم اندازه و گرد با قطر ۲۰ نانومتر با غلظت های مناسبی از آنتی بادی و در pH مشخصی پوشانیده شده و با آلبومین سرم گاوی ده درصد پایدار گردیدند.در تهیه کانجوگه ذرات طلا – آنتی بادی، غلظت آنتی بادی و pH کلوئید طلا از عوامل بسیار مهم برای اتصال ماکروملکولها به ذرات طلا می باشد. بدین ترتیب برای پوشانیدن ذرات طلا با آنتی بادی از منابع مختلف باید غلظت و pH اپتیم برای هر یک تعیین گردد.

برای اطمینان از پوشانیده شدن ذرات طلا واکنش آگلوتیناسیون تأییدی انجام شد، این نوع واکنش آگلوتیناسیون برای جفت goat-anti-mouse-IgG, Normal mouse-IgG طراحی گردید و نتایج هم از طریق چشمی و هم از طریق اسپکتروفتومتری بررسی گردید. پس از اطمینان از پوشیده شدن ذرات طلا با آنتی بادی، مراحل طراحی کیت ایمنوکروماتوگرافی برای تشخیص بیمارانی که میزان دیگوکسین سرم آنها بیش از دوز درمانی است، انجام شد. به این منظور کانجوگه طلا- آنتی بادی تهیه شد، سپس کانجوگه آنتی ژن متصل به پروتئین مناسب برای قرارگیری در خط تست با اتصال دیگوکسین به آلبومین سرم گاو (BSA) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

همچنین به منظور تأیید و اطمینان از عملکرد کانجوگه طلا – آنتی بادی، خط کنترل حاوی آنتی بادی ثانویه بر علیه آنتی بادی موشی در منطقه مورد نظر قرار گرفت. شایان ذکر است که آنتی بادی مذکور در خط کنترل با غلظت ۶ میلی گرم در میلی لیتر ($\mu l / strip$ ۱) پوشانیده شد علاوه بر آن مقدار مناسب کلوئید طلا پوشیده شده با آنتی بادی مونوکلونال علیه دیگوکسین ($\mu l / strip$ ۰/۷) با شدت جذب نوری مناسب (OD =۶) در هر استریپ قرار داده شد و بر روی سطوح پشم شیشه خشک گردید. ($\mu l / strip$ ۱) Dig-BSA با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر در خط تست روی غشاء نیتروسلولز قرار داده شد.

در مرحله پایانی اجزاء کیت سرهم بندی شده و نمونه های محلول استاندارد وسرم مورد ارزیابی

قرار گرفت. نتایج به دست آمده از کیت تهیه شده با نتایج به دست آمده از روش RIA مقایسه گردید ونتایج حاصل از این دو روش همخوانی خوبی با هم داشتند. نتایج حاصل از سرهم بندی اجزای مذکور (کانجوگه طلا- آنتی بادی تهیه شده در این تحقیق و غشاء نیتروسلولز کیت تجاری) نشان داد که کیت تهیه شده قادر به شناسایی ۲ نانوگرم در میلی لیتر دیگوکسین در سرم می باشد.

کلمات کلیدی: دیگوکسین، تست های تشخیص سریع، ایمنوکروماتوگرافی، کلوئید طلا

فهرست مطالب

۱- مقدمه ۲

۱-۱- گلیکوزیدهای قلبی ۲

۱-۱-۱- شیمی ۲

۱-۱-۲- فارماکوکینتیک ۳

۱-۱-۲-۱- جذب وتوزیع ۳

۱-۱-۲-۲- متابولیسم و دفع ۴

۱-۱-۳- فارماکودینامیک ۵

۱-۱-۴- اثرات گلیکوزیدها ۶

۱-۱-۴-۱- اثرات گلیکوزیدهای قلبی روی قلب ۶

۱-۱-۵-روشهای معمول برای اندازگیری دیگوکسین در سرم ۸

۱-۲-مقدمه‌ای برایمونوشیمی ۹

۱-۲-۱- کاربرد ایمونوشیمی در بالینی ۱۰

۱-۲-۲- سنجش های ایمنی غیر ایزوتوپی ۱۴

۱-۳-کلوئید طلا ۱۵

۱-۳-۱-تاریخچه روش های تهیه کلوئید طلا ۱۷

۱-۳-۲-چگونگی تشکیل کلوئید طلا ۱۹

۱-۳-۳- تکنیک کلوئید – طلا ۲۰

۱-۳-۴-ماهیت ذرات طلا ۲۲

۱-۳-۵- کانجوگه آنتی‌بادی – کلوئید طلا ۲۳

۱-۴-تست‌های سریع ۲۶
۱-۴-۱-مزایای تستهای سریع ۲۷
۱-۴-۲- موارد استفاده از تستهای سریع ۲۷
۱-۴-۳-نشان گرها و تست های سریع ۲۸
۱-۵- ایمونوکروماتوگرافی ۳۰
۱-۵-۱-کیت‌های ایمنوکروماتوگرافی ۳۱
۱-۵-۲-شمای تولید ۳۱
۱-۵-۲-۱-طراحی سنجش ۳۱
۱-۵-۲-۱-۱-پوشش‌دهی آنتی‌بادی بر سطوح مختلف ۳۲
۱-۵-۲-۱-۱-۱-تثبیت واکنش‌دهنده‌های ایمنی بر روی سطح جامد ۳۲
۱-۵-۲-۱-۱-۱-۱-استفاده از پلاستیک به عنوان فاز جامد ۳۳
۱-۵-۲-۱-۱-۱-۱-۱-جذب غیرکووالان پروتئین بر سطوح پلاستیک ۳۳
۱-۵-۲-۱-۱-۱-۱-۲-اتصال کووالان پروتئین بر سطوح پلاستیکی ۳۴
۱-۵-۲-۱-۱-۱-۱-۳-اتصال آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن بر سطوح پلاستیکی
توسط پل‌زدن بوسیله مولکولها ۳۵
۱-۵-۲-۱-۱-۱-۲-استفاده از غشاء نیتروسلولز و کاغذ به عنوان فاز جامد ۳۵
۱-۵-۲-۱-۱-۱-۳-استفاده از شیشه به عنوان فاز جامد ۳۶
۱-۵-۲-۱-۱-۲-فازهای جامد ذره‌ای ۳۶
۱-۵-۲-۱-۱-۲-۱-جامد آگارز، سلولز و سفاکریل ۳۶
۱-۵-۲-۱-۱-۲-۲-ذرات لاتکس(ذرات آلی) ۳۷
۱-۵-۲-۱-۱-۲-۳-ذرات معدنی ۳۷
۱-۵-۳-آنالیت هایی که تا کنون کیت ایمنوکروماتوگرافی برای آنها طراحی گردیده است ۳۸
۱-۵-۴-اجزای ایمنوکروماتوگرافی ۳۹
۱-۵-۴-۱-انواع غشاء ها و اتصالات ۴۰

۱-۵-۴-۲-سرعت حرکت ۴۰
۱-۵-۴-۳-پد جاذب ۴۰
۱-۵-۵-اساس ایمنوکروماتوگرافی ۴۱
۲- مواد و روشها ۴۴
۲-۱- مواد، محلولها و تجهیزات مورد نیاز ۴۴
۲-۱-۱- مواد ۴۴
۲-۱-۲- محلول ها و بافرها ۴۴
۲-۱-۳- تجهیزات مورد نیاز ۴۷
۲-۲- کشت، ذخیره‌سازی و ارزیابی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه Digoxin در سلولهای هیبریدومای BBA ۴۷
۲-۲-۱- کشت سلولهای منجمد شده ۴۷
۲-۲-۲- انجماد سلول ۴۸
۲-۲-۳- تهیه لایه تغذیه‌ای ۴۹
۲-۲-۴- ارزیابی تولید آنتی‌بادی ترشحی از سلولهای هیبریدومای BBA ۵۱
۲-۲-۴-۱- تهیه دیگوکسین متصل به BSA ۵۱
۲-۲-۴-۲-روش انجام کار ELISA ۵۳
۲-۳- تخلیص ۵۴
۲-۳-۱- رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم ۵۵
۲-۳-۲- تخلیص با ستون کروماتوگرافی افینیتی پروتئین G ۵۶
۲-۳-۳-۱- نحوه کار با ستون پروتئین G ۵۷
۲-۴- اندازه گیری غلظت آنتی بادی تخلیص شده با روش برادفورد ۵۸
۲-۴-۱- مواد ۵۹
۲-۴-۱-۱- معرف برادفورد ۵۹
۲-۴-۱-۲- استاندارد پروتئینی ۵۹

۲-۴-۱-۳- ظروف مورد استفاده ۶۰
۲-۴-۲- روش استاندارد ۶۰
۲-۴-۳- روش میکرو ۶۰
۲-۴-۴- نکات مهم در مورد روش برادفورد ۶۱
۲-۵-تهیه ذرات کلوئیدی طلا ۶۲
۲-۵-۱-مواد و وسایل مورد نیاز جهت تهیه کلوئید طلا ۶۲
۲-۵-۱-۱-ظروف مورد نیاز ۶۲
۲-۵-۱-۱-۱-طریقه اسیدواش کردن ظروف ۶۲
۲-۵-۲-روش تهیه ذرات کلوئیدی طلا در اندازه های مختلف ۶۳
۲-۶-پوشانیدن ذرات طلا به آنتی بادی ۶۳
۲-۶-۱-به دست آوردن غلظت بهینه ۶۳
۲-۶-۲-به دست آوردن pH مناسب ۶۴
۲-۶-۳-مراحل پوشانیدن ذرات طلا با آنتی بادی ۶۴
۲-۶-۳-۱-آگلوتیناسیون ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی توسط ایمنوگلبولین های بزی علیه آنتی بادی موشی ۶۵
۲-۶-۳-۲-بررسی افینیتی آنتی بادی مونوکلونال علیه دیگوکسین بعد از اتصال به ذرات کلوئید طلا با استفاده از ELISA ۶۶
۲-۶-۳-۳-تایید غلظت بهینه به کاررفته آنتی بادی مونوکلونال علیه دیگوکسین برای اتصال به ذرات کلوئید طلا با استفاده از ELISA ۶۷
۲-۶-۳-۴-پایداری ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی ۶۸
۲-۷-ایمنوکروماتوگرافی ۶۸
۲-۷-۱-طراحی ایمنوکروماتوگرافی با استفاده از ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی مونوکلونال علیه دیگوکسین ۶۹
۲-۷-۲- تهیه محلول استاندارد ذخیره و سایر محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مختلف در بافر

و سرم ۷۰

۳-نتایج ۷۳

۳-۱-نتایج کشت، ذخیره‌سازی و ارزیابی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه Digoxin در سلولهای هیبریدومایBBA ۷۳

۳-۱-۱-نتیجه آزمایش ELISA برای ارزیابی تولید آنتی‌بادی ترشحی از سلولهای هیبریدومای BBA ۷۴

۳-۱-۲-نتیجه کشت مجدد سلولهای جدید روی لایه تغذیه ای ۷۴

۳-۲-تخلیص آنتی بادی ۷۵

۳-۲-۱-رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۷۵

۳-۲-۲- جداسازی آنتی‌بادی منوکلونال با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی ۷۶

۳-۲-۳-نتیجه ELISA انجام شده برای آنتی بادی های تخلیص شده با ستون پروتئین G ۷۷

۳-۳-نتایج تهیه نشان کلوئید طلا ۷۸

۳-۳-۱-تهیه ذرات کلوئیدی طلا ۷۸

۳-۳-۲-پوشانیدن ذرات طلا با آنتی بادی ۷۹

۳-۳-۲-۱-آگلوتیناسیون ذرات طلای پوشیده شده با آنتی بادی مونوکلونال بوسیله آنتی بادی ثانویه ۸۰

۳-۳-۳-به دست آوردن غلظت و PH بهینه برای اتصال آنتی بادی به ذرات طلا ۸۲

۳-۳-۳-۱-نتیجه ELISA انجام شده برای بررسی افینیتی آنتی بادی مونوکلونال علیه دیگوکسین بعد از اتصال به ذرات کلوئید طلا ۸۲

۳-۳-۳-۲-تایید غلظت بهینه به کاررفته آنتی بادی مونوکلونال علیه دیگوکسین برای اتصال به ذرات کلوئید طلا با استفاده از ELISA ۸۳

۳-۳-۳-۳-نتیجه بررسی پایداری آنتی بادی متصل به ذرات طلا و مقایسه پایداری آن با آنتی بادی های آزاد ۸۴

۳-۴-طراحی ایمنوکروماتوگرافی با استفاده از ذرات طلا پوشیده شده با آنتی بادی مونوکلونال علیه ۸۵

دیگوکسین

۴- بحث و نتیجه گیری ۸۹

۴-۱-ضرورت اندازه گیری سریع میزان دیگوکسین ۸۹

۴-۲-۱-طراحی تست سریع، یک مرحله ای ایمونوکروماتوگرافی ۹۰

۴-۲-۲-اتصال آنتی بادی به تولید کننده سیگنال ۹۱

۴-۲-۳-آماده سازی غشا با آنتی بادی های ثانویه و کمپلکس دیگوکسین-BSA تثبیت شده ۹۳

۴-۲-۴-شرایط شیمیایی راهنمای واکنش آنتی ژن – آنتی بادی ۹۴

۴-۲-۵- جمع بندی ۹۶

پیشنهادها ۹۸

مراجع ۱۰۰

فهرست شکل ها و جدول ها

شکل ۱-۱- ساختمان شیمیائی دیگوکسین ۳

شکل ۱-۲- مدل فرضی انتقال Na^+ و K^+ در عرض غشاء پلاسمائی توسط Na^+/K^+-ATPase ۴

شکل ۱-۳- طرح کینتیکی برای انتقال فعال Na^+ و K^+ توسط Na^+/K^+-ATPase ۶

شکل۲-۱- نمودار استاندارد برادفورد با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) ۶۲

شکل ۳-۱- تصویر ذرات طلای تولید شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ۷۸

شکل۳- ۲-واکنش آگلوتیناسیون کانجوگه آنتی بادی-طلا با اضافه کردن NaCl ۸۰

شکل ۳-۳-اسپکتروسکوپی UV-vis کلوئید طلا ، کانجوگه و کانجوگه طلا- آنتی بادی بعد از آگلوتینه شدن با آنتی بادی ثانویه. ۸۱

شکل ۳—۴-جذب نوری کانجوگه در غلظت های مختلف آنتی بادی ۸۳

Iشکل۳-۵-سنجش پایداری کانجوگه و آنتی بادی آزاد با روش ELISA ۸۴

شکل ۳-۶- طرح شماتیک از کیت ایمونوکروماتوگرافی ۸۶

شکل ۳-۷- نتایج بدست آمده از استریپ ساخته شده در دو نمونه توکسیک وغیر توکسیک ۸۷

جدول ۱-۱- مقایسه ای بین نشان گرهای مختلف آنتی ژن و آنتی بادی ۱۶

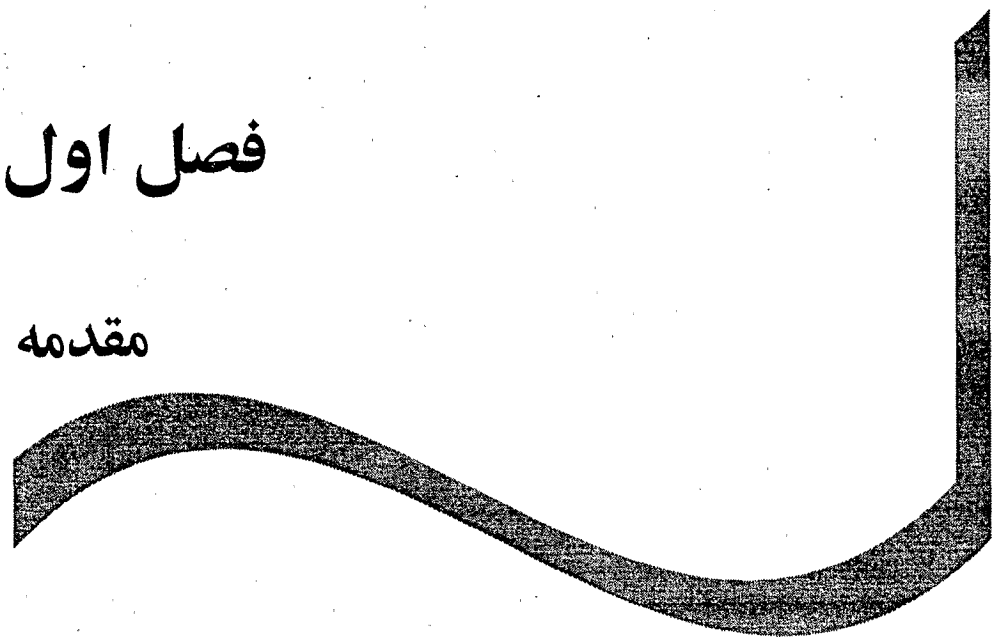
جدول ۳-۱-مقایسه نتایج حاصل از دو روش اندازه گیری دیگوکسین ۸۵

علایم اختصاری

IgG	Immunoglubin G
BSA	Bovine Serum Albumin
FCS	Foetal Calf Serum
Dig-BSA	Digoxin- Bovine Serum Albumin
RIA	Radio Immunoassay
CNS	Central Nervous System
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
EIA	Enzyme Immunoassay
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
HRP	Horseradish Peroxidase
TMB	3,3′,5,5′- Tetramethyl Benzidine
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HEPES	[4(2-Hydroxyethyi)- 1-Piperazine Ethane Solfonic Acid, Sodium Salt]
PEG	Polyethylene Glycol

فصل اول

مقدمه



۱- مقدمه

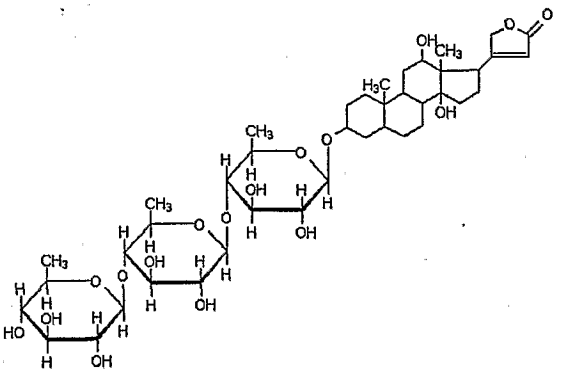
۱-۱- گلیکوزیدهای قلبی

گلیکوزیدهای قلبی نقش مهمی را در درمان نارسائی احتقان قلبی از سال‌ها پیش، اواخر قرن هجدهم میلادی، به‌عهده داشته‌اند. دیگوکسین که از برگ‌های گیاهی بنام دیژیتالیس لاناتا[1] استخراج می‌شود، به‌علت سهولت فارماکوکینتیک دسترسی فراوان به تکنیک‌های اندازه‌گیری آن در سرم و ارزان بودنش، از دهۀ ۱۹۹۰ بیشترین و معمول‌ترین گلیکوزید قلبی در درمان نارسائی قلبی بوده است(Scheiber D. et al., 2006 و Ikeda Y. et al., 2006).

۱-۱-۱- شیمی

ساختمان شیمیایی گلیکوزیدهای قلبی شامل هسته استروئیدی با دو حلقه در کنفیگوراسیون سیس و دو حلقه در کنفیگوراسیون ترانس است، در موقعیت کربن ۱۷ این هسته حلقه لاکتونی غیراشباع ۵ یا ۶ اتمی وجود دارد. باز شدن حلقه لاکتونی موجب از بین رفتن فعالیت فارماکولوژیکی می‌شود. گلیکوزیدهای قلبی طبیعی دارای زنجیره‌ای از ۱ تا ۴ قند با اتصال گلیکوزیدی ۴-۱ هستند و به همین دلیل گلیکوزید نام گرفته‌اند. دیگوگسین و دیژیتوکسین دارای ۳ قند به نام دیژیتوکسوز هستند، اگر بخش قندی را جدا کنیم گلیکوزید به aglycone یا genin تبدیل می‌شود(شکل ۱-۱). Geninها دارای خواص فارماکولوژیکی مشابه گلیکوزیدهای اولیه هستند ولی ممکن است در خواص فارماکوکینتیک آنان تفاوت زیادی وجود داشته باشد، یعنی در جذب، توزیع و سرعت حذف. خواص فارماکودینامیک تا حد زیادی تحت تأثیر تعداد گروه‌های هیدروکسیل متصل به بخش گلیکوزیدی است. (Ball W. et al., 1999 و Katzung B. et al.,1998)

1- Digitalis lanata



شکل ۱-۱- ساختمان شیمیائی دیگوکسین

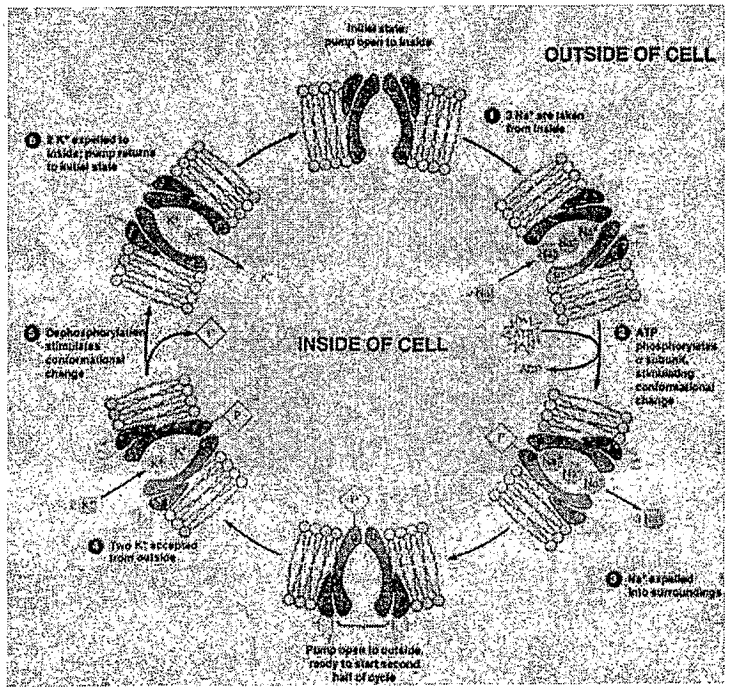
۱-۱-۲- فارماکوکینتیک

۱-۱-۲-۱- جذب وتوزیع

کاردنولیدها[1] (از جمله دیگوکسین و دیژیتوکسین) دارای بخش هیدروفوب (هسته استروئیدی) و بخش‌های هیدروفیل (حلقه لاکتونی، گروه‌های هیدروکسیل و قندها) هستند، موازنه بین این دو بخش اثر مهمی بر جذب، توزیع، متابولیسم و دفع آنها دارد. دیگوکسین بخوبی از طریق خوراکی جذب می‌شود، ولی حدود ۱۰ درصد از افراد دارای باکتری‌های روده‌ای هستند که دیگوکسین را در روده غیرفعال کرده و میزان جذب آن را کاهش می‌دهند(Lindenbaum. J. et al., 1981)، در این صورت باید دوز دارو افزایش یابد. درمان این بیماران با آنتی‌بیوتیک ممکن است منجر به افزایش جذب و مسمویت شود. شاخص درمانی گلیکوزیدهای قلبی خیلی باریک است، بنابراین تغییر جزئی در جذب دارو ممکن است به مسمومیت وخیم یا کاهش اثر فارماکولوژیکی آن منجر شود. با فرمولاسیون محصول دارویی می‌توان جذب دارو را تغیر داد. چون دیژیتوکسین در همه شرایط خوب جذب می‌شود، محدودیت‌های مذکور را ندارد. $\beta - met - Digoxin$ یکی از مشتقات نیمه سنتزی دیگوکسین است. تقریباً به طور کامل از روده جذب شده و در بدن به دیگوکسین تبدیل می‌شود. بعد از جذب، همه گلیکوزیدهای قلبی به طور گسترده در بافت‌ها از جمله سیستم اعصاب مرکزی توزیع می‌شوند و حجم توزیع آنها بستگی به تمایل اتصالی به پروتئین‌های پلاسما دارد. بیشترین غلظت بافتی دیگوکسین در قلب، کلیه‌ها و کبد (۵۰-۱۰ برابر غلظت

1- Cardenolide

پلاسمایی آن) یافت شده‌است. دیگوکسین و دیژیتوکسین به مقدار زیادی لیپوفیل هستند و می‌توانند از سدهای سلولی از جمله سد خونی- مغزی[1] (BBB) و جفت عبور کرده و در شیر نیز دیده شوند(Hurst JW. et al., 1990 و Katzung B. et al., 1998).



شکل ۱-۲- مدل فرضی انتقال Na^+ و K^+ در عرض غشاء پلاسمائی توسط Na^+/K^+-ATPase

۱-۱-۲-۲- متابولیسم و دفع

دیگوکسین به طور گسترده در بدن انسان متابولیزه نمی‌شود بلکه به مقدار زیادی بدون تغییر ساختمانی از کلیه‌ها دفع می‌گردد. دفع کلیوی آن با دفع کلیوی کراتینین ارتباط نزدیکی دارد و در افراد مبتلا به بیماری کلیوی به طور شاخصی کاهش می‌یابد. دیژیتوکسین در کبد متابولیزه شده و از طریق صفرا وارد روده می‌شود. متابولیت‌های فعال‌ساز قلب از جمله دیگوکسین و دیژیتوکسین بدون تغییر از طریق گردش روده‌ای-کبدی و از راه روده باز جذب می‌شوند که موجب افزایش نیمه عمر پلاسمایی آن می‌گردد. آسیب‌های کلیوی تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر نیمه عمر دیژیتوکسین ندارد، پس این دارو را می‌توان گاهی به عنوان دارویی انتخابی در بیمارانی که عملکرد کلیوی خوبی ندارند به کار برد. داروهای القا کننده آنزیم‌های

2- Blood Brain Barrier

کبدی با تسهیل متابولیسم دیژیتوکسین، مقدار آن را در خون کاهش می‌دهند. اتصال دیژیتوکسین به پروتئین‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از دیگوکسین است واین یکی از دلایل نیمه عمر پلاسمایی طولانی‌تر آن است(Katzung B. et al.,1998 و Seifen E. et al., 1994).

۱-۱-۳- فارماکودینامیک

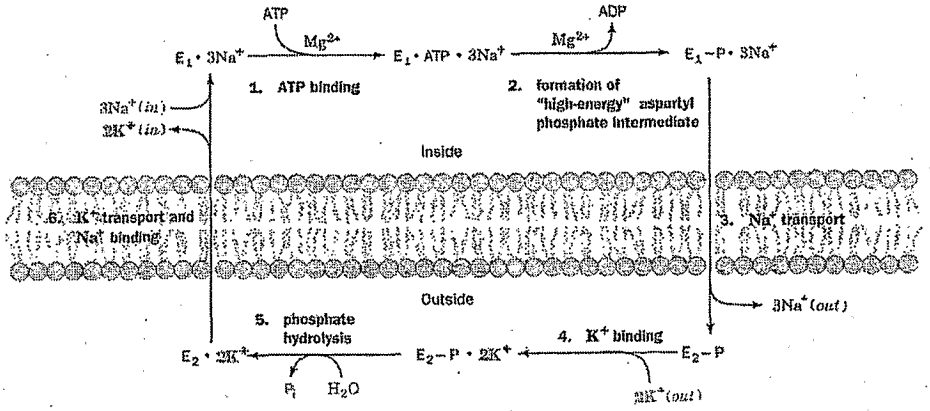
دیژیتال‌ها اثرات مستقیم و غیر مستقیم روی سیستم قلبی-عروقی دارند که نتایج درمانی و نیز سمی (آریتموژنیک) حاصل می‌شود، همچنین دارای اثرات ناخواسته‌ای روی CNS و روده می‌باشد. اثر مستقیم آن بر کلیه (به عنوان دیورتیک) نیز گزارش شده‌است. در سطح مولکولی همه گلیکوزیدهای قلبی که از لحاظ درمانی مفیدند پمپ Na^+/K^+-ATPase (ناقل متصل به غشاء موسوم به پمپ سدیمی) را مهار می‌کنند.

شکل ۱-۲- مدل فرضی انتقال Na^+ و K^+ را در عرض غشاء پلاسمائی توسط پمپ سدیم نشان می‌دهد. به طور کلی برای اینکه سرعت انتقال متعادل وجود داشته باشد انرژی آزاد تمام ترکیبات واسطه بایستی حدوداً برابر باشد. پایداری بیشتر برخی ترکیبات واسطه باعث تجمع آن ترکیبات خواهد شد و این سرعت کلی انتقال را کاهش می‌دهد. مثلا برای اینکه سدیم به خارج سلول منتقل شود (خلاف شیب غلظت) بایستی اتصال آن به E1 در داخل سلول قوی و در خارج سلول به E2 ضعیف باشد. این قضیه با فسفوریلاسیون $E1.3Na^+$ و متعاقب آن تغییر کنفورماسیون آنزیم عملی می‌شود که نتیجه آن تمایل ضعیف Na^+ به E2-P است (مراحل ۲ و ۳ شکل ۱-۳). شبیه همین مسئله در مورد پتاسیم هست به ترتیبی که اتصال قوی K^+ به E2-P در خارج سلول با دفسفوریلاسیون و تغییر کنفورماسیون به نحوی تغییر می‌کند که نتیجه‌اش تمایل کم K^+ به E1 است (مراحل ۵ و ۶ شکل ۱-۳). این عدم پایداری دو طرفه است که سبب انتقال سریع Na^+ و K^+ می‌شود. لازم به ذکر است گلیکوزیدهای قلبی مرحله ۵ در شکل ۱-۳ را مهار می‌کنند.

تاکنون اشکال مختلفی از این آنزیم شناسائی شده‌اند(Jewell EA. et al., 1992)، ایزوفرم‌های مختلف میل ترکیبی متفاوتی برای گلیکوزیدهای قلبی دارند. گاهی غلظت خیلی کم از این دارو آنزیم را تحریک می‌کند ولی در اغلب محدوده‌های دوز درمانی، این آنزیم مهار می‌شود و اثر اینوتروپیک مثبت

دیگوکسین در قلب به‌دلیل مهار این آنزیم است (Voet D. et al., 1995و Chatterjee K. et al., 1994 و Katzung B. et al.,1998).

از آنجایی که پمپ سدیمی برای ابقا پتانسیل استراحت طبیعی در اغلب سلول‌های تحریک‌پذیر لازم است



شکل ۱-۳- طرح کینتیکی برای انتقال فعال Na^+ و K^+ توسط Na^+/K^+-ATPase

احتمالاً مسمومیت‌های دیژیتالی تا اندازه‌ای ناشی از مهار آنزیم Na^+/K^+-ATPase است. رسپتور برای گلیکوزیدهای قلبی روی پمپ سدیمی قرار دارد و مؤید نظریه وجود عوامل شبه دیژیتالی اندوژن است (Angelis CD. et al., 1997).

۱-۱-٤- اثرات گلیکوزیدها

۱-۱-٤-۱- اثرات گلیکوزیدهای قلبی روی قلب

به‌دلیل افزایش غلظت کلسیم آزاد در مجاورت پروتئین‌های انقباضی در طی سیستول برهمکنش رشته‌های اکتین و میوزین سارکومر قلبی افزایش می‌یابد. علل افزایش کلسیم درون سلولی عبارت است از:

۱- مهار پمپ Na^+/K^+-ATPase که نتیجه آن افزایش Na^+ درون سلولی است.

۲- کاهش نسبی خروج کلسیم در سلول (از طریق مبادله گر Ca^{2+} و +Na) به‌دلیل افزایش سدیم درون سلولی ودر نتیجه افزایش کلسیم داخل سلولی.

۳- تسهیل ورود کلسیم از طریق کانالهای کلسیمی‌وابسته به ولتاژ غشاء.