

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای داروسازی

موضوع :

اثر کروسین بر میزان بیان ژن های *Nrf2*، *IL-17* و *NF-kB* در ریه موش های حساس شده با اوآلبومین

استاتید راهنما :

دکتر مجتبی امانی

دکتر محمدرضا اصلانی

استاد مشاور:

دکتر فرهاد جدی

دکتر علی عابدی

نگارش:

محمدعلی بردبارآذر

پاییز ۱۴۰۱

شماره پایان نامه: د-۱۴۶

تقدیم به پدر و مادر عزیزم —————
خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه
درخت پر بار وجودشان بی‌سایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گی‌م و از سایه وجودشان
در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم.
والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا
که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن
را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند.

اساتیدی که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردند
و همه عزیزانی که همراه و پشتیبان بنده در این مسیر بودند
حال این برگ سبزی است تحفه درویش تقدیم آنان...

تشکر و قدردانی

اکنون که به یاری خداوند این دوره را به پایان رسانیده‌ام، بر خود واجب می‌دانم از عزیزانم مخصوصاً پدر و مادر
عزیزم که همیشه پشتیبانم بودند و بنده را در تمامی مراحل زندگی همراهی و تشویق کردند کمال تشکر خود
را به جا بیاورم
از اساتید راهنمای بزرگوارم آقای دکتر امانی و آقای دکتر اصلانی به پاس زحمات بی‌شائبه شان در طی انجام این
تحقیق سپاسگزار می‌نمایم.
همچنین از اساتید مشاور عزیز آقای دکتر جدی و آقای دکتر عابدی به پاس تلاش و همراهی بنده در طی انجام
این تحقیق سپاسگزار می‌نمایم.
از سایر اساتید بزرگوار که شاگردی محضرشان از بزرگترین افتخارات زندگی علمی‌ام می‌باشد، کمال تشکر را
دارم.
و همچنین دانشکده داروسازی و عزیزانی که در این دانشکده زحمت می‌کشند تشکر می‌نمایم
در نهایت از همه عزیزانی که همراه بنده در این مسیر بودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه

- ۱-۱- آسم..... ۱
- ۲-۱- تعریف آسم..... ۲
- ۳-۱- اپیدمیولوژی آسم..... ۳
- ۴-۱- ریسک فاکتورها..... 4
- ۵-۱- فاکتورهای مربوط به میزبان..... ۴
- ۱-۵-۱- ژنتیک..... ۴
- ۲-۵-۱- چاقی..... ۴
- ۳-۵-۱- جنس..... ۴
- ۴-۵-۱- فاکتورهای محیطی..... 5
- ۵-۵-۱- فاکتورهای تعامل گر..... ۵
- ۶-۱- خصوصیات آسم..... ۵
- ۷-۱- پاسخ فاز حاد..... ۶
- ۸-۱- پاسخ تاخیری مجاری هوایی..... ۷
- ۹-۱- مسیر Nrf2..... 8
- ۱۱-۱- زعفران:..... ۱۱
- ۱-۱۱-۱- ترکیب شیمیایی زعفران..... 1۱۱
- ۲-۱۱-۱- کاربردهای دارویی زعفران..... ۱۲
- ۳-۱۱-۱- پژوهشهای فارماکولوژیک زعفران و مواد موثره آن فارماکوکینتیک..... 13
- ۱-۱۱-۳-۱- اثر بر گیرنده ها (Receptors):..... 13
- ۲-۱۱-۳-۱- اثر ضد تومور..... ۱۳
- ۳-۱۱-۳-۱- اثر آنتی اکسیدان..... 14
- ۴-۱۱-۳-۱- اثر آنتی ژنوتوکسیک..... ۱۴

- ۱۱-۳-۵- اثر تقویت کننده حافظه و یادگیری: ۱۵
- ۱۱-۳-۶- اثر ضد درد و ضد التهاب ۱۵
- ۱۱-۳-۷- اثر ضد افسردگی ۱۶
- ۱۱-۳-۸- اثر بر دستگاه تنفسی ۱۶
- ۱۱-۳-۹- اثرات ضد باکتری ۱۷
- ۱۲- بیان مسئله: ۱۷
- ۱۳- اهداف و فرضیات طرح: ۲۰
- ۱-۱۳-۱- هدف کلی طرح: ۲۰
- ۲-۱۳-۱- اهداف اختصاصی طرح: ۲۰
- ۱۴- پیشینه تحقیق: ۲۰
- ۱۵- تعریف واژه های اختصاصی ۲۱

فصل دوم مواد و روش ها

- ۱-۲- نوع پژوهش و جمعیت مورد مطالعه ۲۳
- ۲-۲- مواد و محلول های مورد استفاده ۲۴
- ۳-۲- ابزار و دستگاه های مورد استفاده ۲۵
- ۴-۲- روش تهیه مواد ۲۶
- ۱-۴-۲- آماده سازی محلول های مورد نیاز: ۲۶
- ۱-۴-۲- روش تهیه محلول اوالبومین تزریقی ۲۶
- ۲-۴-۲- روش تهیه محلول اوالبومین ۰.۴٪: ۲۶
- ۳-۴-۲- آماده سازی محلول تورک ۲۶
- ۴-۴-۲- آماده سازی محلول فرمالین ۲۶
- ۵-۲- ایجاد آسم تجربی ۲۷
- ۶-۲- جدا کردن بافت ریه: ۲۷
- ۷-۲- گرفتن مایع شستشوی مجاری تنفسی - حبابچه ای BAL = Bronchoalveolar lavage ۲۷

- ۸-۲- تهیه نمونه بافتی و قرار دادن در فرمالین ۱۰٪ و ارسال آن جهت بررسی میزان التهاب بافت ریه و تراشه از نظر پاتولوژی 28
- ۹-۲- استخراج mRNA از بافت ریه: 29
- ۱۰-۲- سنتز cDNA از mRNA 30
- ۱۱-۲- انجام qPCR 30
- ۱۲-۲- تجزیه و تحلیل داده ها 32

فصل سوم نتایج

- ۱-۳- تعداد گلبولهای سفید و انواع آن 33
- ۲-۳- اثر کروسین بر میزان بیان ژنهای Nrf2 در بافت ریه گروههای مورد مطالعه 35
- ۳-۳- اثر کروسین بر میزان بیان ژنهای IL-17 در بافت ریه گروههای مورد مطالعه 35
- ۴-۳- اثر کروسین بر میزان بیان ژنهای NF-kB در بافت ریه گروههای مورد مطالعه 36
- ۵-۳- نتایج بررسی های بافت شناسی 36

فصل چهارم بحث و نتیجه گیری و پیشنهاد

- ۱-۴- بحث 48
- ۲-۴- اثر کروسین بر میزان کل و انواع سلول های دفاعی در مایع لاواژ برونکوالوئولار 48
- ۳-۴- اثر کروسین بر میزان بیان ژنهای IL-17, Nrf2 و NF-kB در بافت ریه موش های مورد مطالعه 50
- ۴-۴- نتیجه گیری 55
- ۵-۴- پیشنهادات 56
- منابع : 57

فهرست نمودار

- نمودار ۱-۳: میانگین \pm خطای معیار تعداد لکوسیت ها در هر میلی لیتر مایع لاواژ)،..... ۳۵
- نمودار ۲-۳: میانگین \pm خطای معیار درصد (a) و تعداد (b) سلول های ائوزینوفیل ۳۶
- نمودار ۳-۳: میانگین \pm خطای معیار درصد (a) و تعداد (b) سلول های نوتروفیل ۳۷
- نمودار ۴-۳: میانگین \pm خطای معیار درصد (a) و تعداد (b) سلول های ماکروفاژ ۳۸
- نمودار ۵-۳: میانگین \pm خطای معیار درصد (a) و تعداد (b) سلول های لنفوسیت ۳۹
- نمودار ۶-۳: میانگین \pm خطای معیار میزان بیان ژن Nrf2 در بافت ریه ۴۰
- نمودار ۷-۳: میانگین \pm خطای معیار میزان بیان ژن IL-17 در بافت ریه ۴۱
- نمودار ۸-۳: میانگین \pm خطای معیار میزان بیان ژن NF-kB در بافت ریه ۴۲
- نمودار ۹-۳: مقایسه ایندکس آسیب در بین گروه های مورد مطالعه ۴۳
- شکل ۱-۳: آسیب شناسی بافت ریه در گروههای در گروههای شاهد (Control)،..... ۴۴

فهرست اختصارات

Nrf2:	Nuclear factor(erythroid-derived2)-like 2
IL:	Interleukin
NF-kB:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
IgE:	Immunoglobulin E
LTC4:	Leukotriene C4
TNF- α :	Tumor necrosis factor alpha
ARE:	Antioxidant response element
PGD2:	Prostaglandin D2
CNC:	cap n collar
Keap1:	Kelch-like ECH associated protein
Neh:	Nrf2-ECH homology

چکیده

مقدمه: کروسین، یک گلیکوزید دیترپنوئیدی است که مشخص شده است دارای عملکردهای زیادی است از قبیل ضد التهاب، ضد استرس اکسیداتیو، شل کننده ی عضلات صاف و ضد آلرژی. در این مطالعه نقش بالقوه کروسین بر روی میزان بیان ژنهای NF-kB، Nrf2 و IL-17 در بافت ریه موش های حساس شده با اوآلبومین مورد ارزیابی قرار گرفت.

شیوه اجرا: موش ها به ۵ گروه (۱۰ موش در هر گروه) تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه اوآلبومین (OVA)، گروه اوآلبومین + کروسین ۳۰ (OVA+Cr30)، گروه اوآلبومین + کروسین ۶۰ (OVA+Cr60)، و گروه اوآلبومین + دکزامتازون (OVA+Dex). موشها توسط اوآلبومین یا نرمال سالین حساسیت زایی صورت گرفته و در انتهای مطالعه میزان التهاب، تغییرات پاتولوژیک و میزان بیان ژن های NF-kB و IL-17 و Nrf2 در بافت ریه موشها تعیین شد.

نتایج (یافته ها): حساسیت زایی با اوآلبومین باعث شد که تغییرات پاتولوژیک و التهاب بافت ریه در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری افزایش یابد. از طرف دیگر، در نتیجه ی حساسیت زایی با اوآلبومین میزان بیان ژن Nrf2 ($P < 0.001$) کاهش و میزان بیان ژنهای IL-17، NF-kB ($P < 0.01$) در بافت ریه موشها در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد. مداخله با کروسین بطور معنی داری میزان تغییرات پاتولوژیک ریه و التهاب ناشی از حساسیت زایی با اوآلبومین را مهار نمود. علاوه براین، در نتیجه مداخله با کروسین (بویژه در غلظت زیاد) از کاهش بیان ژن Nrf2 و افزایش بیان ژنهای IL-17، NF-kB بطور معنی داری جلوگیری بعمل آمد.

بحث و نتیجه گیری: این نتایج نشان داد که کروسین باعث سرکوب التهاب مجاری هوایی و اصلاح بیان ژنهای NF-kB، IL-17 و Nrf2 در مدل آسمی در موشها، بنابراین کروسین ممکن است از پتانسیل بسیار خوبی برای درمان برخوردار باشد.

کلمات کلیدی: آسم، کروسین، موش albino، NF-kB، IL-17، Nrf2.