



دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای داروسازی

موضوع:

اثر کروسین بر میزان بیان ژن های $VCAM-1$ ، $ICAM-1$ ، $Nrf2$ در ریه موش های حساس شده با اوآلبومین

اساتید راهنما:

دکتر احمد سلیمی

دکتر محمدرضا اصلانی

نگارش:

نوید پاشا

تابستان ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: د - ۱۷۶

گواهی صحت و اصالت پایان‌نامه

بدین‌وسیله گواهی می‌نمایم کلیه نتایج ارائه‌شده در این پایان‌نامه حاصل کار اینجانب بوده و با رعایت کلیه اصول علمی و اخلاقی نگارش شده است. تمام یا قسمتی از آن توسط فرد یا مرکز علمی دیگر به هیچ صورتی ارائه یا ثبت‌نشده است. موارد استفاده‌شده از آثار دیگران با مشخصات کامل منبع ذکر گردیده است، و همچنین پاسخگویی و مسئولیت در قبال نتایج به عهده اینجانب خواهد بود.

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می‌باشد و هرگونه بهره‌برداری یا تکثیر بخش‌هایی یا کل آن با مجوز دانشکده مجاز است.

تاریخ و امضا:

نام و نام خانوادگی استاد راهنما:

شماره دانشجویی:

نام و نام خانوادگی دانشجو:

تاریخ و امضا:

تقدیم به پدر، مادر و خواهر عزیز و مهربانم
که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یآوری دلسوز و فداکار
و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند؛

و اساتید فرزانه و فرهیخته‌ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند.

تشکر و قدردانی

از پدر و مادر عزیزم... این دو معلم بزرگوaram... که همواره بر کوتاهی و درستی من،
قلم عفو کشیده و در تمام مراحل زندگی یار و یآوری بی چشم داشت برای من بوده
اند؛

از اساتید راهنمای گرانقدرم آقای دکتر سلیمی، آقای دکتر اصلانی و آقای دکتر
جدی که وجودشان همیشه قوتی برای انجام کارهایم بوده است و بدون شک انجام
این پایان نامه بدون کمک و راهنمایی‌های ارزنده آنها امکان پذیر نبوده است؛

از سایر اساتید بزرگوar 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.

و در انتها از دوستان عزیزم که همراهان همیشگی من بوده‌اند و اوقات خوشی را در
کنار هم سپری کرده‌ایم، تقدیر و تشکر دارم.

چکیده

مقدمه: کروسین، یک گلیکوزید دیترپنوئیدی است که مشخص شده است دارای عملکردهای زیادی است از قبیل ضدالتهاب، ضد استرس اکسیداتیو، شل کننده عضلات صاف و ضد آلرژی. در این مطالعه نقش بالقوه کروسین بر روی میزان بیان ژن های VCAM-1، ICAM-1، Nrf2 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 + دگزامتازون (OVA+Dex). موش ها توسط اوآلبومین یا نرمال سالین حساسیت زایی صورت گرفته و در انتهای مطالعه میزان التهاب، تغییرات پاتولوژیک و میزان بیان ژن های VCAM-1، ICAM-1 و Nrf2 در بافت ریه موش ها تعیین شد.

نتایج (یافته ها): حساسیت زایی با اوآلبومین باعث شد که تغییرات پاتولوژیک و التهاب بافت ریه در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یابد. از طرف دیگر، در نتیجه حساسیت زایی با اوآلبومین میزان بیان ژن Nrf2 ($P < 0.001$) کاهش و میزان بیان ژن های ICAM-1، ($P < 0.01$) و VCAM-1 ($P < 0.001$) در بافت ریه موش ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد. مداخله با کروسین به طور معنی داری میزان تغییرات پاتولوژیک ریه و التهاب ناشی از حساسیت زایی با اوآلبومین را مهار نمود. علاوه بر این، در نتیجه مداخله با کروسین (به ویژه در غلظت زیاد) از کاهش بیان ژن Nrf2 و افزایش بیان ژن های ICAM-1، VCAM-1، به طور معنی داری جلوگیری به عمل آمد.

بحث و نتیجه گیری: این نتایج نشان داد که کروسین باعث سرکوب التهاب مجاری هوایی و اصلاح بیان ژن های VCAM-1، ICAM-1، Nrf2 در مدل آسمی در موش ها، بنابراین کروسین ممکن است از پتانسیل بسیار خوبی برای درمان برخوردار باشد.

کلمات کلیدی: آسم، کروسین، موش albino، Nrf2، ICAM-1، VCAM-1.

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه

- ۱-۱- آسم..... ۱
- ۲-۱- تعریف آسم..... ۲
- ۳-۱- اپیدمیولوژی آسم..... ۳
- ۴-۱- ریسک فاکتورها..... ۴
- ۵-۱- فاکتورهای مربوط به میزبان..... ۴
- ۱-۵-۱- ژنتیک..... ۴
- ۲-۵-۱- چاقی..... ۴
- ۳-۵-۱- جنس..... ۵
- ۴-۵-۱- فاکتورهای محیطی..... ۵
- 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- تغییر شکل ساختاری مجاری هوایی..... ۸
- ۱۰-۱- مسیر Nrf2..... ۸
- ۱۱-۱- زعفران:..... ۱۱
- ۱-۱۱-۱- ترکیب شیمیایی زعفران..... ۱۱
- ۲-۱۱-۱- کاربردهای دارویی زعفران..... ۱۳
- ۳-۱۱-۱- پژوهشهای فارماکولوژیک زعفران و مواد موثره آن فارماکوکینتیک..... ۱۳
- ۱-۱۱-۳-۱- اثر بر گیرنده ها (Receptors):..... ۱۳
- ۲-۱۱-۳-۱- اثر ضد تومور..... ۱۳
- ۳-۱۱-۳-۱- اثر آنتی اکسیدان..... ۱۴

- ۱۱-۳-۴- اثر آنتی ژنوتوکسیک ۱۵
- ۱۱-۳-۵- اثر تقویت کننده حافظه و یادگیری: ۱۵
- ۱۱-۳-۶- اثر ضد درد و ضد التهاب ۱۶
- ۱۱-۳-۷- اثر ضد افسردگی ۱۶
- ۱۱-۳-۸- اثر بر دستگاه تنفسی ۱۷
- ۱۱-۳-۹- اثرات ضدباکتری ۱۷
- ۱۲-۱- بیان مسئله: ۱۸
- ۱۳-۱- اهداف و فرضیات طرح: ۲۰
- ۱-۱۳-۱- هدف کلی طرح: ۲۰
- ۲-۱۳-۱- اهداف اختصاصی طرح: ۲۰
- ۱۴-۱- پیشینه تحقیق: ۲۰
- ۱۵-۱- تعریف واژه های اختصاصی ۲۱

فصل دوم مواد و روش ها

- ۱-۲- نوع پژوهش و جمعیت مورد مطالعه ۲۶
- ۲-۲- مواد و محلول های مورد استفاده ۲۷
- ۳-۲- ابزار و دستگاه های مورد استفاده ۲۸
- ۴-۲- روش تهیه مواد ۲۹
- ۱-۴-۲- آماده سازی محلول های مورد نیاز: ۲۹
- ۱-۴-۲-۱- روش تهیه محلول اوالبومین تزریقی ۲۹
- ۲-۴-۲-۱- روش تهیه محلول اوالبومین ۰.۴٪: ۲۹
- ۳-۴-۲-۱- آماده سازی محلول تورک ۲۹
- ۴-۴-۲-۱- آماده سازی محلول فرمالین ۲۹
- ۵-۲- ایجاد آسم تجربی ۳۰
- ۶-۲- جدا کردن بافت ریه: ۳۰

- ۷-۲- گرفتن مایع شستشوی مجاری تنفسی - حبابچه ای BAL = Bronchoalveolar lavage ۳۰
- 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 ۳۱
- ۹-۲- استخراج mRNA از بافت ریه: ۳۲
- ۱۰-۲- سنتز cDNA از mRNA ۳۳
- ۱۱-۲- انجام qPCR ۳۳
- ۱۲-۲- انجام مراحل پاتولوژی و تهیه لام بافتی ۳۷
- ۱-۱۲-۲- فیکسسیون ۳۸
- ۲-۱۲-۲- نمونه برداری و پاس دادن ۳۹
- ۳-۱۲-۲- آبگیری و آغشتگی ۳۹
- ۴-۱۲-۲- قالب گیری ۴۱
- ۵-۱۲-۲- برش با میکروتوم ۴۱
- ۶-۱۲-۲- تیشوفلوت ۴۲
- ۷-۱۲-۲- رنگ آمیزی بافت ها ۴۲
- ۸-۱۲-۲- مونتاز لام و لامل ۴۳
- ۱۳-۲- تجزیه و تحلیل داده ها ۴۴

فصل سوم نتایج

- ۱-۳- تعداد گلبولهای سفید و انواع آن ۴۶
- ۲-۳- اثر کروسین بر میزان بیان ژن های Nrf2 در بافت ریه گروههای مورد مطالعه ۵۳
- ۳-۳- اثر کروسین بر میزان بیان ژن های ICAM-1 در بافت ریه گروههای مورد مطالعه ۵۴
- ۴-۳- اثر کروسین بر میزان بیان ژن های VCAM-1 در بافت ریه گروههای مورد مطالعه ۵۵
- ۵-۳- نتایج بررسی های بافت شناسی ۵۶

فصل چهارم بحث و نتیجه گیری و پیشنهاد

- ۱-۴- بحث ۵۹

۵۹	۴-۲- اثر کروسین بر میزان کل و انواع سلول های دفاعی در مایع لاواژ برونکوی آلوئولار
۶۱	۴-۳- اثر کروسین بر میزان بیان ژن های ICAM-1،Nrf2 و VCAM-1 در بافت ریه موش های مورد مطالعه
۶۵	۴-۴- نتیجه گیری
۶۵	۴-۵- پیشنهادات
۶۶	منابع :

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ ساختمان شیمیایی ترکیبات اصلی زعفران (۶۷) ۱۲
- شکل ۱-۲: BIOSAN vortex v-32 ۲۶
- شکل ۲-۲: DLAB spin ۲۷
- شکل ۳-۲: QIA quant 5plex real time pcr ۲۷
- شکل ۴-۲: تزریق داخل صفاقی به موش سوری نر ۲۹

فهرست نمودار

- نمودار ۱-۲: منحنی melting curve ۳۵
- نمودار ۱-۳: میانگین \pm انحراف معیار تعداد لکوسیت‌ها در هر میلی‌لیتر مایع لاواژ در گروه‌های شاهد (Control) ۴۶
- نمودار ۲-۳: میانگین \pm انحراف معیار درصد (a) و تعداد (b) سلول‌های ائوزینوفیل در هر میلی‌لیتر مایع لاواژ در گروه‌های شاهد (Control) ۴۷
- نمودار ۳-۳: میانگین \pm انحراف معیار درصد (a) و تعداد (b) سلول‌های نوتروفیل در هر میلی‌لیتر مایع لاواژ در گروه‌های شاهد (Control) ۴۸
- نمودار ۳-۴: میانگین \pm انحراف معیار درصد (a) و تعداد (b) سلول‌های ماکروفاژ در هر میلی‌لیتر مایع لاواژ در گروه‌های شاهد (Control) ۴۹
- نمودار ۳-۵: میانگین \pm انحراف معیار درصد (a) و تعداد (b) سلول‌های لنفوسیت در هر میلی‌لیتر مایع لاواژ در گروه‌های شاهد (Control) ۵۰
- نمودار ۳-۶: میانگین \pm خطای معیار میزان بیان ژن Nrf2 در بافت ریه در گروه‌های شاهد (Control) ، گروه حساس شده با اوآلبومین (OVA) ۵۱
- نمودار ۳-۷: میانگین \pm خطای معیار میزان بیان ژن ICAM-1 در بافت ریه در گروه‌های شاهد (Control) ۵۲
- نمودار ۳-۸: میانگین \pm خطای معیار میزان بیان ژن VCAM-1 در بافت ریه در گروه‌های شاهد (Control) ۵۳
- نمودار ۳-۹: مقایسه ایندکس آسیب در بین گروه‌های مورد مطالعه ۵۵

فهرست اختصارات

ARE:	Antioxidant response element
CD-14:	cluster of differentiation 14
CNC:	cap n collar
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule 1
IgE:	Immunoglobulin E
IL:	interleukin
Keap1:	Kelch-like ECH associated protein
LTC4:	Leukotriene C4
Neh:	Nrf2-ECH homology
Nrf2:	Nuclear factor(erythroid-derived2)-like 2
PGD2:	Prostaglandin D2
SELE:	selectin E
SELP:	selectin P
TH2:	T helper2
TNF- α :	Tumor necrosis factor alpha
TREM1:	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
VCAM-1:	vascular cell adhesion molecule 1