



دانشگاه علوم پزشکی  
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل  
ARDABIL UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد علوم تشریحی

عنوان:

ارزیابی تاثیر نوروپروتکتیو کارودیلول بر میزان بیان فاکتورهای التهابی در مدل ضایعه  
نخاعی در موش صحرائی نر بالغ

نگارش:

محمدجواد خوشنواي فومنی

اساتید راهنما:

دکتر علی نیاپور

دکتر زینب نامجو

استاد مشاور:

دکتر کیوان امیرشاهرخی

شهریور ماه ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: ۰۹۱

تقدیم به

**پدر بزرگوار و مادر مهربانم**

که با لطف، محبت و حمایت هایشان

توان پرواز در آسمان علم را به من بخشیدند

و

**خواهر عزیزم**

که در تمام سختی ها همیشه پشتیبان من بوده

## تشکر و قدردانی

سپاس ویژه دارم از استاد بزرگوار و ارجمند

**جناب آقای دکتر علی نیاپور**

بابت تمام زحمات، آموزه ها و راهنمایی های ایشان،

**از سرکار خانم دکتر زینب نامجو**

که در تمامی مراحل این پژوهش با لطف بیکران خود حامی من بودند،

**و از جناب آقای دکتر کیوان امیرشاهرخی و الطاف ایشان**

کمال تشکر را دارم.

همچنین از استاد فرزانه **جناب آقای دکتر رامین سلیم نژاد**،

کارشناس محترم آزمایشگاه **سرکار خانم دکتر شهناز حسین زاده**،

**جناب آقای یاور محبی** کارشناس ارشد زیست فناوری پزشکی،

**جناب آقای سعید سلیم پور** کارشناس ارشد فیزیولوژی پزشکی،

**جناب آقای عرفان قریشی زاده**، کارشناس ارشد میکروبی شناسی پزشکی

و سایر دوستان و همکارانی که در این راه مرا یاری نمودند

کمال تشکر و قدردانی را دارم .

## فهرست

## عنوان

## صفحه

چکیده:	۱۰
فصل اول: مقدمه	۱۱
۱-۱- مقدمه	۱۲
۱-۲- بیان مساله	۱۳
۱-۲-۱- مفهوم اینفلامازوم	۱۷
۱-۲-۲- انواع اینفلامازوم های دخیل در آسیب های تروماتیک	۲۱
۱-۲-۳- اینفلامازوم NALP1/NLRP1	۲۲
۱-۲-۴- اینفلامازوم NALP3/NLRP3	۲۳
۱-۲-۵- اینفلامازوم AIM2	۲۴
۱-۲-۶- فعال سازی اینفلامازوم ها پس از SCI	۲۵
۱-۲-۷- اینفلامازوم ها به عنوان هدف های درمانی در جراحی های CNS	۲۷
۱-۲-۸- راه های پیشگیری و جلوگیری از گسترش آسیب نخاعی	۲۷
۱-۲-۹- راه های درمان آسیب نخاعی	۲۸
۱-۳- اهداف و فرضیات طرح	۳۱
۱-۳-۱- هدف اصلی طرح	۳۱
۱-۳-۲- اهداف فرعی طرح	۳۱
۱-۳-۳- اهداف کاربردی طرح	۳۱
۱-۳-۴- فرضیات یا سوالات پژوهش	۳۲
۱-۴- تعریف واژه های اختصاصی	۳۲
فصل دوم: بررسی متون	۳۳

- ۳۴-۲-۱- التهاب عصبی..... ۳۴
- ۳۷-۲-۲- کارودیلول و کاهش التهاب در بیماری های مختلف سیستم عصبی و غیر عصبی..... ۳۷
- ۴۰- فصل سوم: مواد و روش ها..... ۴۰
- ۴۱-۳-۱- نوع مطالعه..... ۴۱
- ۴۱-۳-۲- ملاحظات اخلاقی..... ۴۱
- ۴۱-۳-۳- مکان و زمان انجام مطالعه..... ۴۱
- ۴۱-۳-۴- مواد، ترکیبات شیمیایی و کیت های آنزیمی مورد استفاده در تحقیق..... ۴۱
- ۴۲-۳-۵- تجهیزات الکتریکی مورد استفاده..... ۴۲
- ۴۳-۳-۶- نام ظروف و وسایل مورد استفاده..... ۴۳
- ۴۴-۳-۷- مطالعه In vitro..... ۴۴
- ۴۴-۳-۷-۱- تهیه و کشت سلول ها..... ۴۴
- ۴۴-۳-۷-۲- پاساژ سلول ها..... ۴۴
- ۴۵-۳-۷-۳- تعویض محیط کشت..... ۴۵
- ۴۵-۳-۷-۴- فریز و ذوب کردن سلول ها..... ۴۵
- ۴۶-۳-۷-۵- شمارش سلولی..... ۴۶
- ۴۶-۳-۷-۶- مواجهه سلول ها با LPS و CVL و تعیین دوز مناسب..... ۴۶
- ۴۷-۳-۷-۷- تست MTT..... ۴۷
- ۴۸-۳-۷-۸- بررسی میزان ROS..... ۴۸
- ۴۸-۳-۷-۹- بررسی تاثیر CVL بر بقا سلول های SH-SY5Y..... ۴۸
- ۴۸-۳-۷-۱۰- بررسی میزان بیان ژن های NF- $\kappa$ B، IL-1 $\beta$  و NLRP3..... ۴۸
- ۵۰-۳-۷-۱۱- استخراج RNA کل..... ۵۰
- ۵۱-۳-۷-۱۲- بررسی غلظت و درجه خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری..... ۵۱
- ۵۱-۳-۷-۱۳- تیمار RNA با DNase..... ۵۱
- ۵۲-۳-۷-۱۴- سنتز cDNA..... ۵۲

- ۱۵-۳-۷- واکنش زنجیره پلی مرز ..... ۵۲
- ۱۶-۳-۷- ژل الکتروفورز ..... ۵۴
- ۱۷-۳-۷- بررسی میزان بیان پروتئین IL-1 $\beta$  ..... ۵۵
- ۱۸-۳-۷- وسترن بلات ..... ۵۵
- ۳-۸- مطالعه In vivo ..... ۶۳
- ۱-۳-۸- تهیه و گروه بندی موش های صحرایی ..... ۶۳
- ۲-۳-۸- ایجاد ضایعه نخاعی ..... ۶۴
- ۳-۳-۸- مراقبت از حیوان بعد از جراحی ایجاد مدل ضایعه نخاعی ..... ۶۷
- ۴-۳-۸- بررسی فعالیت حرکتی موش های صحرایی با استفاده از تست BBB ..... ۶۷
- ۵-۳-۸- نحوه امتیازبندی تست BBB ..... ۶۸
- ۶-۳-۸- نمونه برداری از نخاع ..... ۷۰
- ۷-۳-۸- تکنیک رنگ آمیزی H&E ..... ۷۰
- ۸-۳-۸- رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین ..... ۷۲
- ۹-۳-۸- مقایسه اندازه حفره محل ضایعه ..... ۷۲
- ۱۰-۳-۸- بررسی میزان بیان ژن های NF- $\kappa$ B و NLRP3 با روش RT-PCR ..... ۷۳
- ۹-۳- روش آماری تجزیه و تحلیل داده ها ..... ۷۳
- فصل چهارم: نتایج ..... ۷۴
- ۱-۴- تعیین دوز دارو در سلول های BV2 ..... ۷۵
- ۲-۴- کارودیلول سبب کاهش تولید ROS می شود ..... ۷۶
- ۳-۴- کارودیلول بیان ژن های التهابی در سلول های BV2 را کاهش می دهد ..... ۷۶
- ۴-۴- کارودیلول از طریق تاثیر در مسیر های Notch و PPAR- $\gamma$  می تواند میزان پروتئین های التهابی و نسبت M1/M2 سلول های BV2 را تغییر دهد ..... ۷۸
- ۵-۴- تاثیر CVL بر بقا سلول های SH-SY5Y ..... ۸۰
- ۶-۴- ارزیابی حیوانات جهت تایید مدل ضایعه نخاعی ..... ۸۱

- ۷-۴- تاثیر CVL بر بهبود حرکتی در موش های صحرایی با SCI ..... ۸۲
- ۸-۴- تاثیر CVL بر تمامیت بافتی در نخاع موش های صحرایی با SCI ..... ۸۳
- ۹-۴- نتایج مطالعه بافتی اندازه حفره کیستیک در محل ضایعه ..... ۸۴
- ۱۰-۴- تاثیر CVL بر بیان ژن های NF-κB و NLRP3 موش های صحرایی ..... ۸۵
- فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ..... ۸۸
- ۱-۵- بحث ..... ۸۹
- ۲-۵- محدودیت های مطالعه ..... ۹۷
- ۳-۵- نتیجه گیری ..... ۹۸
- ۴-۵- پیشنهادات ..... ۹۹
- ۵-۵- ترجمان دانش ..... ۱۰۰
- ۶-۵- منابع ..... ۱۰۱

### فهرست اشکال، جداول و نمودارها

- شکل ۱-۱- تصویر شماتیک از وقایع مرتبط با آسیب نخاعی (SCI) در مراحل یا فازهای اولیه و ثانویه ..... ۷
- شکل ۱-۲- ساختار اینفلامازوم ها و نحوه فعال سازی آن از سطح غشا ..... ۹
- شکل ۱-۳- ساختار یک اینفلامازوم، نحوه فعال سازی و اثرات آن بر روی هسته و ایجاد التهاب ..... ۱۱
- شکل ۱-۴- انواع اینفلامازوم های کشف شده در سیستم عصبی و ساختار آن ها ..... ۱۳
- جدول ۱-۳- توالی ها و اندازه پرایمرهای مورد مطالعه در بخش *In vitro* ..... ۴۴
- جدول ۲-۳- حجم های مورد استفاده برای تهیه ژل جداکننده ۸٪ ..... ۴۹
- جدول ۳-۳- حجم های مورد استفاده برای تهیه ژل متراکم کننده ۴٪ ..... ۵۰

- جدول ۳-۴- آنتی بادی های مورد استفاده در تکنیک وسترن بلات ..... ۵۳
- شکل ۳-۱- آماده سازی حیوان برای انجام جراحی ..... ۵۶
- شکل ۳-۲- نخاع اکسیپوز شده و نحوه ایجاد ضایعه نخاعی با تکنیک compression ..... ۵۶
- جدول ۳-۵- توالی ها و اندازه پرایمرهای مورد مطالعه در بخش In vivo ..... ۶۳
- شکل ۴-۱- تاثیر دوزهای افزایشی CVL و LPS بر میزان بقا سلول های BV2 پس از ۴۸ ساعت ..... ۶۵
- شکل ۴-۲- میزان ROS سلول های BV2 ..... ۶۶
- شکل ۴-۳- تاثیر CVL بر بیان ژن های التهابی در سلول های BV2 ..... ۶۷
- شکل ۴-۴- تاثیر CVL بر بیان پروتئین های التهابی در سلول های BV2 ..... ۶۹
- شکل ۴-۵- تاثیر CM سلول های BV2 پس از پیش تیمار و پس تیمار با CVL و LPS بر میزان بقا سلول های SH-SY5Y ..... ۷۱
- شکل ۴-۶- تایید هیستولوژیک حیوانات مدل شده SCI بعد از رنگ آمیزی H&E ..... ۷۲
- شکل ۴-۷- تست رفتاری BBB جهت ارزیابی فعالیت حرکتی اندام خلفی موش های صحرایی ..... ۷۳
- شکل ۴-۸- رنگ آمیزی بافتی موش های صحرایی ۷۲ ساعت پس از ایجاد ضایعه نخاعی ..... ۷۴
- شکل ۴-۹- بررسی اندازه حفره کیستیک محل ضایعه در گروه های مورد مطالعه ..... ۷۵
- شکل ۴-۱۰- تاثیر CVL بر میزان بیان ژن های التهابی در موش های صحرایی ..... ۷۶



## فهرست اختصارات

**AIM:** Absent in melanoma

**ASC:** Adaptor apoptosis-associated speck-like protein protein containing a CARD

**ATP:** Adenosine triphosphate

**BBB:** Basso, Beattie and Bresnahan

**CARD:** Caspase activation and recruitment domain

**COX:** Cyclooxygenase

**CSF:** Cerebrospinal fluid

**CVL:** Carvedilol

**DAMP:** Damage-associated molecular patterns

**DEPC:** Diethyl pyrocarbonate

**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay

**GSH:** Glutathione

**GSDMD:** Gasdermin D

**H&E:** Hematoxylin and Eosin

**HES:** Hairy and enhancer of split

**IFN:** Interferon

**IHC:** Immunohistochemistry

**IL:** Interleukin

**ISA:** Intrinsic sympathomimetic activity

**LFB:** Luxal Fast Blue

**LPS:** Lipopolysaccharide

**LRR:** Leucine rich repeat

**MDA:** Malondialdehyde

**MMP:** Matrix metalloproteinase

**MPO:** Myeloperoxidase

**mRNA:** Messenger RNA

**NF-κB:** Nuclear factor kappa B

**NICD:** Notch intracellular domain

**NICE:** The national institute for health and care excellence

**NLRP:** Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich Repeat and pyrin domain containing

**NOD-like:** Nucleotide oligomerization domain

**NOX2:** NADPH oxidase 2

**OD:** Optical density

**PAMP:** Pathogen-associated molecular patterns

**PPAR:** Peroxisome proliferator-activated receptor

**PRR:** Pattern recognition receptor

**PYD:** Pyrin domain

**RANK:** Receptor activator of nuclear factor kappa beta

**RANKL:** Receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand

**ROS:** Reactive oxygen species

**SCI:** Spinal Cord Injury

**SDF-1α:** Stromal cell-derived factor-1 alpha

**SOD:** Superoxide dismutase

**T1:** Thoracic segment 1

**TBI:** Traumatic brain injury

**TLR:** Toll-like receptor

**TNF-α:** Tumor necrosis factor alpha

**WB:** Western blot

ارزیابی تاثیر نوروپروتکتیو کارودیلول بر میزان بیان فاکتورهای التهابی در مدل ضایعه نخاعی در موش صحرائی نر بالغ

چکیده:

**زمینه:** التهاب عصبی از ویژگی های مهم آسیب ثانویه ضایعه نخاعی است. اینفلامازوم ها در ایجاد آپوپتوز و التهاب در بافت های مختلف نقش دارند. این کمپلکس ها آغازگر آبشارهای آپوپتوز و التهاب به دنبال ضایعه نخاعی می باشند.

**هدف:** بررسی تاثیر داروی کارودیلول بر میزان بیان فاکتورهای التهابی پس از ضایعه نخاعی

**مواد و روش ها:** در بخش *in vitro*، اثر این دارو بر تغییرات بیان فاکتورهای التهابی در سلول های BV2 تیمار شده با LPS به وسیله RT-PCR، ELISA و Western blot مورد بررسی قرار گرفت. در بخش *in vivo*، میزان بیان کمپلکس اینفلامازومی NLRP3 و فاکتورهای التهابی در مدل ضایعه نخاعی در موش صحرائی پس از تجویز ۷۲ ساعته داروی کارودیلول با استفاده از RT-PCR سنجیده شد. همچنین تست رفتاری و رنگ آمیزی بافتی جهت بررسی تغییرات اندازه حفره ایجاد شده در نخاع صورت گرفت.

**نتایج:** نتایج در بخش *in vitro* نشان داد که کارودیلول می تواند منجر به کاهش فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو سلول های BV2 تیمار شده با LPS شود. همچنین نسبت سلول های M1/M2 را تغییر می دهد. این موارد از طریق تنظیم مسیر پیام رسانی Notch و PPAR $\gamma$  انجام می شود. نتایج تست های رفتاری، بافتی و مولکولی نشان داد که درمان با کارودیلول توانست حفره محل ضایعه و میزان بیان کمپلکس اینفلامازومی NLRP3 و NF-kB p65 ناشی از ضایعه نخاعی را کاهش داده و با بهبود عملکرد حرکتی همراه باشد.

**نتیجه گیری:** کارودیلول با اثر بر کمپلکس اینفلامازومی، فاکتورهای التهابی و اعمال تغییراتی در مسیر های پیام رسانی بالادستی و همچنین افزایش نسبت سلول های M2 میکروگلیا می تواند منجر به کاهش التهاب پس از ضایعه نخاعی شود و میزان مرگ سلولی و فاکتورهای استرس اکسیداتیو را کنترل کند.

**کلمات کلیدی:** کارودیلول، ضایعه نخاعی، التهاب، اینفلامازوم