بررسی تاثیر امپاگلیفلوزین بر اندکس‌های بازسازی سلولی در مدل حیوانی نارسایی قلبی پس از القای ایسکمی میوکارد

شناسنامه طرح

کد رهگیری طرح	4020221
تاریخ تصویب پیش پروپوزال	
عنوان طرح	بررسی تاثیر امپاگلیفلوزین بر اندکس‌های بازسازی سلولی در مدل حیوانی نارسایی قلبی پس از القای ایسکمی میوکارد
عنوان لاتین طرح	The Effect of Empagliflozin on Cellular Regeneration Indices in an Animal Model of Myocardial Ischemia–Induced Heart Failure
تلفن	09123957125
پست الکترونیکی	azimi7619@gmail.com
نوع مطالعه	مطالعه حیوانی
تاریخ شروع	1402/11/01
تاریخ خاتمه	1403/06/31
آیا طرح چند مرکزی است؟	خیر
مرکز/مراکز دیگر	
نام سازمان تصویب کننده اولیه پروپوزال	
محل اجرای طرح	
محل اجرای طرح	بیمارستان قلب شهید رجایی
سازمان مجری	بیمارستان قلب شهید رجایی
سازمان مجری	
دانشکده/محل خدمت	Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences
رشته تخصصی	قلب و عروق_ نارسایی
توضیحات	
نوع طرح ها	

مجری همکاران

نام و نام خانوادگی	سمت در طرح	نوع همکاری	توضیحات
محمدحسین مظفری بازرگانی	مجری ونویسنده مقاله	نوشتن مقاله	
امیر عظیمی	مجری ونویسنده مقاله	نوشتن مقاله	
نسیم نادری	مجری اصلی / نویسنده مقاله	طراحی و تدوین طرح	
سارا ادیمی	مجری ونویسنده مقاله	نوشتن مقاله	
سعیده مظلوم زاده	همکار طرح و نویسنده مقاله	مشاوره و آنالیز آماری	
امیر دربندی آذر	همکار طرح و نویسنده مقاله	بررسی آزمایشگاهی	
هومن بخشنده آبکنار	ناظر	نظارت بر اجرای طرح	
فاضل گرجی پور	همکار طرح	بررسی آزمایشگاهی	

دانشده/مرکز مربوطه

رده	نوع ارتباط با مرکز
گروه داخلی	وارد کننده

اطلاعات تفصیلی

آیتم ها	متن
بیان مسئله	پس از AMI (Acute Myocardial Infarction) بخشی از بافت قلب که تحت ischemia و infarction قرار گرفته است، بخشی از سلول‌های cardiomyocyte خود را از دست می‌دهد و برای جبران بخشی از سلول‌های از دست رفته دچار remodeling پاتولوژیک می‌گردد و حتی ممکن است عملکرد پمپ قلب تحت تاثیر قرار بگیرد. سلول‌های MSC (multipotent Mesenchymal Stem Cell) انسان بالغ پتانسیل خوبی برای regeneration و جبران بافت قلبی عروقی از خود نشان داده است [1-3]. شواهد موجود نشان گر این است که استفاده از سلول‌های exogenous MSC بدست آمده از بافت‌های مختلف من جمله مغز استخوان سبب regeneration بخشی از قلب که تحت ischemia قرار گرفته است و angiogenesis و differentiation به سلول‌های endothelial، smooth muscle و fibroblast می‌شود[4-7]. در گذشته این اعتقاد وجود داشت که قلب فاقد regenerative cell است، اما در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار تعدادی سلول endogenous cardiac stem cell در پستانداران بالغ با بیان c-kit یافته شد[8]. در مطالعات جدیدتر شواهدی یافتند که ثابت کرد سلول‌های endogenous MSC قلبی وجود دارند و توانایی differentiate کردن به سلول‌های functional cardiomyocytes را دارند. یکی از مهمترین فاکتور در بیان و عملکرد سلول‌های endogenous MSC، niche سلول‌ها است [9-12]. مطالعات اخیر حاکی از این است که قلب انسان حاوی تعدادی سلول multipotent Cardiac (CSC / CPC Stem/Progenitor Cell) است که توانایی regeneration بافت عروقی و cardiomyocyte را پس از آسیب بافتی دارند. علاوه بر این، توانایی regeneration سلول‌های CSC در پاسخ به آسیب بافتی، افزایش می‌یابد. [12]. استفاده از سلول‌های CSC در مدل‌های حیوانی CHF (Chronic Heart Failure) نتایج خوبی از پتانسیل regeneration بافتی این سلول‌های را نشان داده است. با این وجود، کفایت سرعت turnover سلول‌های cardiomyocyte در بالغین برای regenerate کردن کامل آسیب وسیع و قابل توجه ناشی از ischemia هنوز مورد بحث و بررسی است. هفت نوع دسته از CSC تا کنون گزارش شده است، که توانایی differentiation آنها به سلول‌های قلبی متفاوت است. بنابراین به بیش از یک marker برای یافتن CSC های functional نیاز است [12].

c-kit در بخش‌های حیاتی از مکانیسم سلول‌های progenitor من جمله differentiation، تقسیم و migration نقش دارند. سلول‌های c-kitpos CSC در قلب mouse ،rat، سگ، خوک و انسان یافته شده است[12]. سلول‌های c-kitpos CSC توسط ماکرهای غشائی از جمله Flk-1 ،Abcg-2 ،Sca-1 و PDGFRα و فاکتورهای transcription از جمله GATA4 ،Nkx2.5 ،Isl-1 و Wt-1 قابل افتراق و تشخیص هستند [11, 13-16].

دسته‌ای از CSC که بیان قابل توجهی از Vimentin به همراه PDGFRα ،CD105 ،CD90 ،CD44 ،CD29، و DDR2 داشته‌اند، در فاز اولیه ischemia افزایش بیان داشته‌اند. مضاف بر این، سلول‌های MSC نوع DDR CD44-CD45 ، بصورت in-vitro قابل کشت و multipotent هستند[17].

یکی از داروهای جدیدی که برای کنترل قند خون در بیماران دیابتی معرفی شده، (SLGT-2 inhibitor (Sodium-Glucose-co-Transporter Type 2 Inhibitor است. SGLT-2 inhibitor ها داروهای safe و مؤثری برای کنترل دیابت هستند. گیرنده‌ی SGLT-2 بیشتر در لوله‌ی پروگزیمال کلیه بیان می‌شود و بیشترین نقش را در بازجذب گلوکز دارد، که بر پایه‌ی همین مکانیسم SGLT-2 inhibitor ها مانع بازجذب گلوکز از کلیه شده و سبب کاهش سطح گلوکز خون می‌شوند. مطالعات اخیر مضاف بر تاثیراتی که پیش‌تر ذکر شد، تاثیرات مثبت دیگری نیز از SGLT-2 inhibitorها گزارش کرده‌اند ازجمله بهبود پروفایل چربی، کاهش وزن، کاهش فشار خون و همچنین کاهش ریسک cardiovascular events [18-20].

یافته‌های مطالعات اخیر برروی مدل حیوانی حاکی از تاثیر مثبت SGLT-2 inhibitor ها بر regeneration سلول‌های بتا پانکراس بوده است و سبب افزایش سطح انسولین خون شده است، با وجود اینکه سلول‌های بتای پانکراس گیرنده‌ی SLGT-2 را بیان نمی‌کنند. بر همین اساس احتمال تاثیر SLGT-2 inhibitor ها به وسیله‌ی فاکتورهای واسطه‌ی ناشناخته بر microenvironment جزیره‌ی لانگرهانس بیان شده است [21, 22].

درمان مدل حیوانی mouse با SGLT-2 inhibitor ها علاوه بر تاثیر بر regeneration سلول‌های پانکراس، می‌توانند سب بهبود regeneration کلیه به واسطه‌ی سلول‌های (CoRL (Cells of Renin Lineage و بهبود kidney injury شود[23]. Empagliflozin یکی از داروهای گروه SGLT-2 inhibitor است. Empagliflozin در بیماران Heart (HFpEF (Failure with Preserved Ejection Fraction)، سبب کاهش ریسک cardiovascular death، بستری به دلیل heart failure شده است که این تاثیر مستقل از ابتلا یا عدم ابتلا به دیابت بوده است [24, 25]. تاثیرات مثبت قلبی empagliflozin در تمام رنج‌های (EF (Ejection Fraction) مشهود بوده است، اما این تاثیر در EF های بالاتر کمتر مشهود است [26]. در مدل حیوانی mice، درمان با empagliflozin در موش‌هایی غیر دیابتیک که به وسیله‌ی pressure overload دچار heart failure شده بودند، سبب کاهش افت EF گردید [27].

مسیرهای سیگنالینگ اصلی که در پرولیفراسیون و تمایز میوکارد نقش دارند عبارتند از:

1. Wnt-β-catenin signaling:

این مسیر در تمیز ابتدایی سلول‌های پروژنیتور قلبی از مزودرم نقش دارد. در این مسیر، ژن‌های GATA4 ،Nkx2.5 و TBX5 نقش تنظیمی دارند.

1. FGF signaling:

در این مسیر سیگنالینگ یا بیان ژن C/EBPβ سبب افزایش پرولیفراسون سلول‌های پروژنیتور قلبی می‌شود. از طرفی سلول‌های پروژنیتور قلبی ژن‌های CITED4 ،c-kit و sca-1 را بیان می‌کنند. از این رو افزایش بیان این ژن‌ها نشان دهنده‌ی افزایش پرولیفراسیون این دسته از سلول‌های است.

1. BMP-TGF-β signaling:

فعال شدن این مسیر در سلول‌های پروژنیتوز سبب کاهش بیان ژن‌های تحریک کننده‌ی پرولیفراسیون مثل C/EBPβ می‌گردد و در عین حال باعث افزایش فاکتورهای تمایز دهنده‌ی سلولی می‌گردد.

ژن‌های Nx2.5 ،GATA4 و TBX5 نیز این مسیر را تنظیم می‌کنند.

1. Notch signaling:

	این مسیر تعادل بین پرولیفراسیون و تمیز سلولی را تنظیم می‌کند. 2. Calcineurin–NFAT signaling: این مسیر در تمایز نهایی سلول‌های پروژنیتور به سلول‌های کاردیومیوسیت نقش دارد. در این مسیر ژن Mef2c از فاکتورهای کلیدی است که با تعامل با ژن‌های GATA4 و TBX5 سبب فعال سازی ژن‌های مرتبط با سلول‌های کاردیومیوسیت تمایز یافته می‌گردد. با توجه به اصل validation نتایج مسیرهای سیگنالینگ با چند ژن و اهمیت تفسیر همزمان نتایج بیان ژن‌های مختلف در از مسیر سیگنالینگ چند ژن را برای بررسی هر مسیر انتخاب کردیم. بطور خاص در مورد ژن c–kit، مطالعای Klopsch et al. 2017; Scalise et al. 2019 بیان کرد که تنها 1 تا 2 درصد از سلول‌های بنیادی قلبی بیان کننده‌ی c–kit سب پرولیفراسیون سلول‌های کاملا تمایز یافته‌ی کاردیومیوسیت می‌شوند. به همین دلیل با بررسی همزمان بیان سایر ژن‌های مؤثر در پرولیفراسیون سلول‌های بنیادی قلبی من جمله sca–1 می‌توان سلول‌های بنیادی قلبی با توانایی کامل در regeneration قلبی می‌توان به این مشکل فائق آمد. با توجه به اینکه داروهای SGLT–2 inhibitor از جمله empagliflozin تاثیر چشمگیری بر کاهش ریسک cardiovascular و کاهش افت HF پس از MI) Myocardial Infarction) و همچنین افزایش regeneration سلولی در بافت‌های مختلف که در مطالعات حال حاضر گزارش شده است، این مطالعه را طراحی کردیم تا برای نخستین بار به مقایسه‌ي تاثیر Empagliflozin بر میزان بیان CSC ها در مدل حیوانی rat که با روش ligation induced MI، دچار heart failure شده است در مقایسه با گروه کنترل بپردازیم.
ضرورت اجرا	با توجه به اینکه داروهای SGLT–2 inhibitor از جمله empagliflozin تاثیر چشمگیری بر کاهش ریسک cardiovascular و کاهش افت HF پس از MI) Myocardial Infarction) و همچنین افزایش regeneration سلولی در بافت‌های مختلف که در مطالعات حال حاضر گزارش شده است، این مطالعه را طراحی کردیم تا برای نخستین بار به مقایسه‌ي تاثیر Empagliflozin بر میزان بازسازی سلول های قلبی در مدل حیوانی rat که با روش ligation induced MI، دچار heart failure شده است در مقایسه با گروه کنترل بپردازیم.
بررسی متون	در سال ۲۰۱۷، Byrne و همکارانش مطالعه‌ای تحت عنوان "Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an Experimental Model of Pressure Overload–Induced Heart Failure" را در مجله‌ی JACC: Basic to Translational science به چاپ رساندند. در این مطالعه مدل‌های حیوانی C57BL/6 mice به دو گروه sham یا جراحی تنگ کردن شریان transverse aorta تقسیم شدند. مدل‌های با روش pressure induced دچار heart failure شدند. پس از جراحی، موش‌هایی که دچار heart failure شدند، دو هفته تحت درمان vehicle یا empagliflozin قرار گرفتند. پس از دو هفته درمان، عملکرد قلبی مدل‌های حیوانی به وسیله‌ی echocardiography بصورت in vivo و به کمک isolated working hearts بصورت ex vivo مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت، موش‌هایی که تحت درمان با empagliflozin بودند، در بررسی in vivo و ex vivo افت عملکرد قلبی کمتری را نسبت به گروه vehicle نشان دادند [27]. در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۲۱ توسط Anker و همکارانش در مجله‌ی The New England Journal of Medicine تحت عنوان "Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction" به چاپ رساندند، بصورت double blind random ۵,۹۹۸ بیمار HFpEF با کلاس II–IV و EF بالاتر از ۴۰ درصد را به دو گروه placebo و empagliflozin تقسیم کردند. میانه‌ی مدت فالوآپ بیماران ۲۶,۲ ماه بوده است. بروز cardiovascular death و بستری به علت heart failure در بیمارانی که تحت درمان با empagliflozin بودند بطور معنی داری کمتر از گروه placebo گزارش شد (Hazard Ratio: 0.79, 95%Confidence Interval [CI]: 0.69 to 0.90; p<0.001). این تاثیر مثبت در بیماران مبتلا و غیر مبتلا به دیابت بطور مشابه گزارش شد [24]. Zelniker و همکارانش در سال ۲۰۱۸ مطالعه‌ی سیستماتیک ریویو و متاآنالیز تحت عنوان "SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a

systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials" در مجله‌ی Lancet به چاپ رساندند. سه trail بزرگ شامل ۳۴,۳۲۲ بیمار در این مطالعه وارد شدند. نتایج این مطالعه حاکی از کاهش Major cardiovascular death، Adverse Cardiovascular Events (MACE)، بستری به دلیل heart failure و کاهش روند پیشرفت بیماری کلیوی در بیماران تحت درمان با empagliflozin بود [25].

سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای تحت عنوان "Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate Early in the Ischemic Heart" توسط Klopsch و همکارانش در مجله‌ی European Surgical Research چاپ شد. در این مطالعه ۱۶ مدل حیوانی rat تحت Left Anterior Descending (LAD) coronary artery ligation بطور دائمی قرار گرفتند و سپس در فاز early، بافت قلبی، Cardiac Mononuclear cells (MNCs) با روش confocal laser Immunohistology، scanning microscopy و flow cytometry مورد بررسی قرار گرفتند. دز فاز early پس از ischemia، سلول‌های MSCs خاصی به روش Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) تخلیص شده و کشت داده شدند و سپس از جهت عملکرد multipotent differentiation مورد بررسی قرار گرفتند. CSC niche بصورت خوشه‌های سلولی intramyocardial پس از MI یافته شد که vimentin, CD29, CD44, CD90, CD105, PDGFRα و DDR2 را بیان میکردند. تکثیر سلولی در فاز early پس از MI شروع شد. اندازه‌ی این خوشه‌های CSC niche ۲۴ ساعت پس از MI در نواحی peri-infarct و non-infarct نسبت به قلبی که تحت infarct قرار نگرفته است به ترتیب ۱۵۷ و ۶۴ درصد افزایش داشت. همچنین flow cytometry افزایش متوسطی از cardiac MNC CD44 CD45-DDR2 را به دنبال ischemia نشان داد. در نهایت نتیجه گرفتند که MI در فاز early سبب تحریک تقسیم سلولی در cardiac MSC niches که بصورت خوشه‌های intramyocardial پخش شده‌اند می‌شود. سلول‌های MCS DDR2 CD44-CD45 سلول‌هایی با قابلیت multipotent differentiation هستند [17]

منابع

1. Furfaro, E.M. and M.A. Gaballa, Do adult stem cells ameliorate the damaged myocardium? Human cord blood as a potential source of stem cells. Current Vascular Pharmacology, 2007. **5**(1): p. 27-44.

2. Yerebakan, C., et al., Autologous umbilical cord blood mononuclear cell transplantation preserves right ventricular function in a novel model of chronic right ventricular volume overload. Cell transplantation, 2009. **18**(8): p. 855-868.

3. Gaebel, R., et al., Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. Plos one, 2011. **6**(2): p. e15652.

4. Ward, M.R. and D.J. Stewart, Erythropoietin and mesenchymal stromal cells in angiogenesis and myocardial regeneration: one plus one equals three? 2008, Oxford University Press. p. 357-359.

5. Leri, A., J. Kajstura, and P. Anversa, Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. Physiological reviews, 2005. **85**(4): p. 1373-1416.

6. Oswald, J., et al., Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem cells, 2004. **22**(3): p. 377-384.

7. Rangappa, S., et al., Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2003. **126**(1): p. 124-132.

8. Beltrami, A.P., et al., Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. cell, 2003. **114**(6): p. 763-776.

9. Smits, A.M., et al., Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology.

.Nature protocols, 2009. **4**(2): p. 232–243

.van Wijk, B., et al., Cardiac regeneration from activated epicardium. 2012 .10

Chong, J.J., et al., Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. Cell .11
.stem cell, 2011. **9**(6): p. 527–540

Scalise, M., et al., Heterogeneity of Adult Cardiac Stem Cells. Adv Exp Med Biol, 2019. **1169**: .12
.p. 141–178

Smart, N., et al., De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. .13
.Nature, 2011. **474**(7353): p. 640–644

Torella, D., et al., Cardiovascular development: towards biomedical applicability: Resident .14
.cardiac stem cells. Cellular and molecular life sciences, 2007. **64**: p. 661–673

Vincent, S.D. and M.E. Buckingham, How to make a heart: the origin and regulation of cardiac .15
.progenitor cells. Current topics in developmental biology, 2010. **90**: p. 1–41

Torella, D., et al., Growth-factor-mediated cardiac stem cell activation in myocardial .16
.regeneration. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine, 2007. **4**(Suppl 1): p. S46–S51

Klopsch, C., et al., Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate Early in the Ischemic Heart. .17
.Eur Surg Res, 2017. **58**(5–6): p. 341–353

Wiviott, S.D., et al., Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. New .18
.England Journal of Medicine, 2018. **380**(4): p. 347–357

Neal, B., et al., Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. New .19
.England Journal of Medicine, 2017. **377**(7): p. 644–657

Zinman, B., et al., Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. .20
.New England Journal of Medicine, 2015. **373**(22): p. 2117–2128

Jin, J., et al., Effect of empagliflozin on tacrolimus-induced pancreas islet dysfunction and .21
.renal injury. American Journal of Transplantation, 2017. **17**(10): p. 2601–2616

Wei, R., et al., Dapagliflozin promotes beta cell regeneration by inducing pancreatic endocrine .22
.cell phenotype conversion in type 2 diabetic mice. Metabolism, 2020. **111**: p. 154324

van der Pluijm, L., et al., MO074: SGLT2 Inhibition Promotes Intrinsic Kidney Regeneration by .23
Cells of the Renin Lineage. Nephrology Dialysis Transplantation, 2022. **37**(Supplement_3): p.
.gfac063. 026

Anker, S.D., et al., Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. New .24
.England Journal of Medicine, 2021. **385**(16): p. 1451–1461

Zelniker, T.A., et al., SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular .25
and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular
.outcome trials. The Lancet, 2019. **393**(10166): p. 31–39

Butler, J., et al., Effect of empagliflozin in patients with heart failure across the spectrum of left .26
.ventricular ejection fraction. European Heart Journal, 2021. **43**(5): p. 416–424

Byrne Nikole, J., et al., Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an .27
Experimental Model of Pressure Overload-Induced Heart Failure. JACC: Basic to Translational
.Science, 2017. **2**(4): p. 347-354

Naderi, N., et al., High-intensity interval training increase GATA4, CITED4 and c-Kit and .28
.decreases C/EBPβ in rats after myocardial infarction. Life sciences, 2019. **221**: p. 319-326

اهداف: هدف اصلی، اهداف اختصاصی، هدف کاربردی

هدف اصلی:

- تعیین اثر امپاگلیفلوزین بر اندکس‌های بازسازی سلولی در مدل حیوانی نارسایی قلبی پس از القای ایسکمی میوکارد

اهداف فرعی:

- تعیین تأثیر داروی امپاگلیفلوزین بر عملکرد قلبی شامل --LVIDs -LVEF -LVPWd- IVSs- IVSd- LVIDdLVPWs FS -در یک مدل حیوانی از نارسایی قلبی با استفاده از اکوکاردیوگرافی.
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن GATA4 با استفاده از real time rt-PCR
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن Tbx5 با استفاده از real time rt-PCR
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن Sca-1 با استفاده از real time rt-PCR
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن Nkx2.5 با استفاده از real time rt-PCR
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن CEBP/β با استفاده از real time rt-PCR
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن CITED4 با استفاده از real time rt-PCR
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن Mef-2c با استفاده از real time rt-PCR
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن c-Kit با استفاده از real time rt-PCR
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی سطح پروتئین C/EBPβبا استفاده از Western Blot
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی سطح پروتئین C-kitبا استفاده از Western Blot
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی سطح پروتئین Nkx2.5با استفاده از Western Blot
- تعیین تأثیر زمان شروع درمان با امپاگلیفلوزین بر بهبود عملکرد قلبی در مدل حیوانی نارسایی قلبی
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در میزان نکروز بافتی در مدل حیوانی نارسایی قلبی در بررسی لام پاتولوژی
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در میزان فیبروز بافتی در مدل حیوانی نارسایی قلبی در بررسی لام پاتولوژی
- تعیین نقش امپاگلیفلوزین در میزان نئوواسکولازیسیون بافتی در مدل حیوانی نارسایی قلبی در بررسی لام پاتولوژی

اهداف کاربردی:

- تاثیر درمان زود هنگام با امپاگلیفلوزین در بهبود عملکرد و بازسازی سلول‌های قلبی بیماران نارسایی قلبی ناشی از MI) Myocardial Infarction)

فرضیات یا سوالات پژوهشی	• آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در بهبود عملکرد قلبی در یک مدل حیوانی از نارسایی قلبی با استفاده از اکوکاردیوگرافی دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن GATA4با استفاده از real time rt-PCR دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن Tbx5 با استفاده از real time rt-PCR دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن Sca-1 با استفاده از real time rt-PCR دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن Nkx2.5 با استفاده از real time rt-PCR دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن CEBP/β با استفاده از real time rt-PCR دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن CITED4 با استفاده از real time rt-PCR دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن Mef-2c با استفاده از real time rt-PCR دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی اندازه‌گیری بیان RNA ژن c-Kit با استفاده از real time rt-PCR دارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی سطح پروتئین C/EBPβبا استفاده از Western Blotدارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی سطح پروتئین C-kitبا استفاده از Western Blotدارد؟ • آیا داروی امپاگلیفلوزین تأثیری در رشد و بازسازی سلول‌های قلبی به وسیله مطالعه‌ی سطح پروتئین Nkx2.5با استفاده از Western Blotدارد؟
مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع آوری آن	به منظوربررسی عملکرد قلبی از اکوکاردیوگرافی ۲ بعدی ترانس توراسیک، در هفته‌های ۴ و ۶ پس از القای نارسایی قلبی و به منظور بررسی مولکولی از PCR و westernblot استفاده خواهد شد.
روش اجرا	**انتخاب مدل حیوانی:** در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar با سن 10 هفته و وزن 250 تا 300 گرم استفاده می‌شود. موش‌ها در شرایط محیطی کنترل شده در قفس‌های مشابه، در اتاقی در آزمایشگاه حیوانی بیمارستان قلب شهید رجایی با دمای کنترل‌شده ۲۳ درجه سانتی‌گراد، چرخه نور/تاریکی 12 ساعت: 12 ساعت و رطوبت 5 ± 60 درصد نگهداری می‌شوند. موش‌ها آزادانه به غذا و آب دسترسی دارند. **انتخاب گروه‌های آزمایشی:** در این مرحله، موش‌ها به صورت تصادفی به ۴ گروه مساوی ۱۰ تایی تقسیم می‌شوند: ۱. گروه درمان زودهنگام: این گروه تحت عمل جراحی قرار می‌گیرد و شریان نزولی قدامی چپ (LAD) در این گروه مسدود می‌شود. بلافاصله پس از القای انفارکتوس میوکارد، تحت درمان با داروی امپاگلیفلوزین قرار می‌گیرد. ۲. گروه درمان دیرهنگام: این گروه تحت عمل جراحی قرار می‌گیرد و شریان نزولی قدامی چپ (LAD) در این گروه مسدود می‌شود. ۲هفته پس از القای انفارکتوس میوکارد، تحت درمان با داروی امپاگلیفلوزین قرار می‌گیرد. ۳. گروه کنترل (vehicle): این گروه تحت عمل جراحی قرار می‌گیرد و شریان نزولی قدامی چپ (LAD) در این گروه

مسدود می‌شود. سپس پس از القای انفارکتوس میوکارد، تحت گاواژ آب قرار می‌گیرد.

۴. گروه شاهد (sham): این گروه تحت عمل جراحی توراکوتومی مشابه سایر گروه‌ها قرار می‌گیرد، اما بدون بستن شریان نزولی قدامی چپ (LAD).

القای ایسکمی میوکارد:

پس از تخصیص موش‌ها به گروه‌های مطالعه به روش رندوم، در گروه‌های کنترل و درمان زود و دیر هنگام به روش زیر القای ایسکمی میوکارد را انجام می‌دهیم مراحل انجام این عمل به شرح زیر است:

۱. مرحله بیهوشی و آماده‌سازی: موش‌ها تحت تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (60 mg/kg) و زایلازین (5 mg/kg) قرار می‌گیرند. سپس پس از اطمینان از بیهوشی، موش‌ها به صورت supine بر روی پد حرارتی قرار می‌گیرند و به کمک پد و لامپ حرارتی دمای بدن‌شان تا حد ممکن نزدیک ۳۷ درجه‌ي سانتی گراد حفظ می‌شود.

۲. تهویه: موش‌ها پس از بیهوشی تحت intubation قرار می‌گیرند و با استفاده از دستگاه rodent ventilator (VentElite Small Animal, Harvard model 683, Holliston, USA) که برای جوندگان طراحی شده، با هوای اتاق و حجم2–3 ml و ریت تنفسی 65–70/min پشتیبانی و کنترل می‌شود.

۳.مانیتورینگ: قبل از شروع جراحی، لید II ECG استاندارد تعبیه و به وسیله‌ي 8–channel recorder متصل به کامپیوتر با کمک نرم افزارهای جمع‌آوری داده‌ی (ADInstruments, Australia Power Lab 8/35) و نرم افزار Lab Chart در تمام طول عمل جراحی بطور مداوم پایش می‌شود.

۴. جراحی: توراکوتومی در شرایط استریل بر روی دیواره قفسه سینه در چهارمین فضای بین دنده‌ای چپ ایجاد می‌شود تا قلب را قابل دسترس قرار دهد. پس از برش پریکارد برای نمایان شدن سطح قلب، شریان نزولی قدامی چپ (LAD) به طور دائم با استفاده از بخیه سیلک 6–0 در فاصله ۱ـ۲ میلی‌متر دیستال‌تر از منشا آن بطور کامل و دائمی بسته می‌شود. موفقیت ligation به کمک بررسی سیانوز ناحیه‌ای میوکارد و ST elevation بلافاصله پس از ligation، ارزیابی می‌شود.

۵.recovery از جراحی: پس از بستن LAD و تایید موفقیت ligation، لایه‌های دیواره قفسه سینه با نخ سیلک 2–0 بسته می‌شود. ریه‌ها با استفاده از فشار مثبت انتهای بازدمی (PEEP) با دقت باد شده و موش‌ها پس از برقراری تنفس خودبخودی از دستگاه تنفس مصنوعی جدا می‌شوند. سپس به منظور جلوگیری از عفونت، آنتی‌بیوتیک تراپی با سفازولین (10 mg/kg) بصورت داخل وریدی انجام می‌شود.

درمان با امپاگلیفلوزین: داروی امپاگلیفلوزین با دوز 30 میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز به مدت ۱۲ هفته در گروه درمان دیرهنگام و زودهنگام استفاده می‌شود. دارو به صورت هفتگی بر اساس وزن موش‌ها تنظیم می‌شود [28]. دارو به روش گاواژ پس از حل کردن در آب به موش‌ها داده می‌شود.

ارزیابی نارسایی قلبی:

دو، شش، هشت و دوازده هفته پس از انفارکتوس میوکارد، اکوکاردیوگرافی transthoracicتوسط کاردیولوژیست با تجربه در اکوکاردیوگرافی حیوانات کوچک که نسبت به گروه‌ها blind شده بود انجام می‌شود.

جهت اطمینان از القای موثر نارسایی قلبی استفاده می‌شود. در اکوکاردیوگرافی مشاهده اختلال حرکت دیواره قدامی قلب ، کاهش کسر جهشی و کوتاه شدن کسری (FS) به عنوان شاخص های نارسایی قلب در نظر گرفته می‌شود. پس از shave ناحیه‌ی قفسه‌ی سینه، موش‌ها بیهوشی با دوز پائین کتامین (10–20 mg/kg I.P) در حالت supine قرار گرفته و توسط دستگاه اکوکاردیوگرافی ۲ بعدی ترانس توراسیک و 10–MHz linear array transducer متصل به سیستم Vivid 7 expert ultrasound بـــا ســـرعت 100 ,Horten, General Electric–Vingmed Ultrasound) mm/s Norway)، تحت اکوکاردیوگرافی قرار می‌گیرند. به کمک parasternal M–mode و view short–axis دو بعدی در سطح عضلات پاپیلاری اندکس‌های Left Ventricular Internal Diameter in Systole (LVIDs)، Left Ventricular Internal Diameter in Diastole (LVIDd)، Interventricular Septal Wall Thickness in Diastole (IVSd)، Interventricular Ventricular Septal Wall Thickness in Systole (IVSs)، Left Ventricular Posterior Wall Thickness in Diastole (LVPWd) و Left Ventricular Posterior Wall Thickness in Systole (LVPWs). بـا

	استفاده از اندکس‌های فوق طبق فرمول زیر، LVEF (Left Ventricular Ejection Fraction) محاسبه می‌شود: LVEF % = (LVIDd2– LVIDs2)/LVIDd2 همچنین جهت محاسبه‌ی FS (Fractional Shortening%) از فرمول زیر استفاده می‌شود: FS%: [(LVIDd–LVIDs)/LVIDd] ×100 ۲۴ ساعت و دو هفته بعد از ligation جهت ارزیابی موفقیت مدل سازی heart failure تمامی موش‌هایی که تحت ligation قرار گرفته‌اند، تحت اکوکاردیوگرافی قرار می‌گیرند و معیار موفقیت مدل سازی FS ≤ 35% خواهد بود. **بررسی هیستوپاتولوژیک:** پس از ۱۲ هفته از شروع درمان موش ها با اوردوز پنتوباربیتال (200 میلی گرم بر کیلوگرم) قربانی خواهند شد.سپس قفسه سینه آنها باز شده و قلب آن ها برداشته می شود .نیمی از قلب ها بلافاصله به بافر فرمالین ۱۰٪ برای فیکساسیون منتقل می شود. پس از آبگیری و جاسازی در بافر پارافین ، نمونه ها به ضخامت 5 میکرومتر برش داده می شوند و به منظور ارزیابی بافتی از نظر میزان نکروز بافتی، میزان فیبروز و میزان نئوواسکولیزاسیون ، تحت رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و تری کروم ماسون قرار میگیرند. **بررسی مولکولی:** با استفاده از تکنیک PCR وQ-RT-PCR، میزان RNA ژن‌های مشخص شده در بافت قلبی اندازه‌گیری می‌شود. همچنین با استفاده از روش western blotting، سطح پروتئین‌های مشخص شده در بافت قلبی بررسی می‌شود. این پروتئین‌ها و ژن‌ها در مسیرهای بازسازی، تمایز و رشد سلول‌های بنیادی قلبی نقش دارند. این موارد شامل: GATA4 (GATA Binding Protein 4) Tbx5 (T-Box Transcription Factor 5) Sca-1 (Stem Cell Antigen 1) Nkx2.5 (NK2 Homeobox 5) CEBP/β (CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta) CITED4 (Cbp/P300-Interacting Transactivator 4) Mef-2c (Myocyte Enhancer Factor 2C) c-Kit (Stem Cell Factor Receptor
روش محاسبه حجم نمونه و تعدادآن	برای محاسبه‌ی حجم نمونه از مطالعه‌ی [28 .Naderi et al] استفاده شد. بر اساس مقایسه‌ي بیان c-kit بین دو گروه با استفاده از فرمول در هر گروه ۹ نمونه محاسبه شد. با احتساب ده درصد ریزش، ۱۰ نمونه در هر گروه خواهد بود. در این مطالعه از هر گروه ۳ نمونه برای آزمایشات ایمونوهیستوشیمی، ۳ نمونه برای western blot و ۴ نمونه برای پاتولوژی نیاز است که مجموعا تعداد موش های مورد نیاز برای هر گروه ۱۰ موش محاسبه می شود. با احتساب بیست درصد ریزش، حجم نمونه ۱۲ موش در هر گروه خواهد بود.
ملاحظات اخلاقی	۱. حداقل تعداد حیوانات: تلاش بر این است که تعداد حیوانات مورد نیاز برای تحقیقات حداقل باشد. ۲. رفاه حیوانات: حقوق رفاه حیوانات، شامل محیط مناسب، تغذیه، دسترسی به آب و غذا و جلوگیری از درد و رنج، رعایت می‌شود. ۳. مدیریت درد و رنج: پیش از مداخله‌های دردناک، توجه به کاهش رنج حیوانات ضروری است. ۴. تخصص کارشناسان: تحقیقات حیوانی توسط افراد ماهر و با اصول اخلاقی اجرا می‌شود. ۵. تجهیزات مناسب: استفاده از تجهیزات مناسب باعث کاهش خطرات ناشی از تحقیقات می‌شود.

	۶. نظارت مداوم: وضعیت حیوانات به صورت مداوم نظارت می‌شود.
محدودیتهای اجرایی طرح وروش کاهش آنها	از جمله محدودیت های احتمالی می توان به مرگ زودهنگام موش ها ب دنبال جراحی اشاره کرد که با توجه به حضور متخصصین و تجهیزات کامل تا حد امکان از این امر جلوگیری به عمل خواهد آمد از دیگر محدودیت ها به القای نارسایی قلبی به دنبال انفرکتوس میوکارد است که با اکوکاردیوگرافی از افت عملکرد قلبی در آن ها اطمینان کسب خواهد شد.

جدول متغیرها

نام متغیر	نقش متغیر	نوع متغیر کمی ـ پیوسته است؟	نوع متغیر کمی ـ گسسته است؟	نوع متغیر کیفی ـ رتبه ای است؟	نوع متغیر کیفی ـ اسمی است؟	واحد اندازه گیری	تعریف کاربردی	نحوه اندازه گیری
Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF)	وابسته	☒	☐	☐	☐	درصد	کسر جهشی بطن چپ LVEF	با استفاده از فرمول LVEF % = (LVIDd2 – LVIDs2)/LVIDd2
Fractional Shortening (FS %g)	وابسته	☒	☐	☐	☐	درصد	درصد کوتاه شدگی بطن چپ در جریان سیتول	با استفاده از فرمول :FS% [(LVIDd–LVIDs)/LVIDd] ×100
Left Ventricular Internal Diameter in Systole (LVIDs)	مستقل	☒	☐	☐	☐	میلی متر	قطر داخلی بطن چپ در سیستول	اکوکاردیوگرافی
Left Ventricular Internal Diameter in Diastole (LVIDd)	مستقل	☒	☐	☐	☐	میلی متر	قطر داخلی بطن چپ در مرحله دیاستول	اکوکاردیوگرافی
Interventricular Septal Wall Thickness in Diastole (IVSd)	مستقل	☒	☐	☐	☐	میلی متر	ضخامت دیواره بین بطنی در زمان دیاستول	اکوکاردیوگرافی

جدول متغیرها

نام متغیر	نقش متغیر	نوع متغیر کمی ـ پیوسته است؟	نوع متغیر کمی ـ گسسته است؟	نوع متغیر کیفی ـ رتبه ای است؟	نوع متغیر کیفی ـ اسمی است؟	واحد اندازه گیری	تعریف کاربردی	نحوه اندازه گیری
Interventricular Ventricular Septal Wall Thickness in Systole ((IVSs	مستقل	☒	☐	☐	☐	میلی متر	ضخامت دیواره بین بطنی در زمان سیستول	اکوکاردیوگرافی
Left) Ventricular Posterior Wall Thickness in Diastole (LVPWd	مستقل	☒	☐	☐	☐	میلی متر	ضخامت دیواره خلفی بطن چپ در زمان دیاستول	اکوکاردیوگرافی
Left Ventricular Posterior Wall Thickness in Systole ((LVPWs	مستقل	☒	☐	☐	☐	میلی متر	ضخامت دیواره خلفی بطن چپ در زمان سیستول	اکوکاردیوگرافی
C-kit protein level	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به پروتئین Bactin	سطح پروتئین C-kit نسبت به روتئین Bactin	western blot
Tbx5 (T-Box Transcription Factor 5) RNA expression	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به کنترل	بیان ژن Tbx5 نسبت به یک کنترل	q-PCR
GATA4 (GATA Binding Protein 4) RNA expression	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به کنترل	بیان ژن GATA4 نسبت به یک کنترل	q-PCR
Sca-1 (Stem Cell Antigen 1) RNA expression	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به کنترل	بیان ژن Sca-1 نسبت به کنترل	q-PCR

جدول متغیرها

نام متغیر	نقش متغیر	نوع متغیر کمی ـ پیوسته است؟	نوع متغیر کمی ـ گسسته است؟	نوع متغیر کیفی ـ رتبه ای است؟	نوع متغیر کیفی ـ اسمی است؟	واحد اندازه گیری	تعریف کاربردی	نحوه اندازه گیری
Nkx2.5 (NK2 Homeobox 5) RNA expression	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به کنترل	بیان ژن Nkx2.5 نسبت به کنترل	q-PCR
CEBP/β (CCAAT/ Enhancer Binding Protein Beta) RNA expression	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به کنترل	بیان ژن CEBP/βنسبت به کنترل	q-PCR
CITED4 (Cbp/P300-Interacting Transactivator 4)	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به کنترل	بیان ژن CITED4 نست به کنترل	q-PCR
Mef-2c (Myocyte Enhancer Factor 2C) RNA expression	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به کنترل	بیان ژنMef-2c نسبت به کنترل	q-PCR
c-Kit (Stem Cell Factor Receptor) RNA expression	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به کنترل	بیان ژن c-Kit نسبت به کنترل	q-PCR
C/EBPβ protein level	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به پروتئین Bactin	سطح پروتئین C/EBPβ نسبت به پروتئین کنترل	Western blot
سطح پروتئین Nkx2.5	مستقل	☒	☐	☐	☐	نسبت به پروتئین Bactin	سطح پروتئین Nkx2.5 نسبت به پروتئین کنترل Bactin	western blot
میزان نکروز بافتی	مستقل	☒	☐	☐	☐	درصد	به صورت میزان نکروز در هر HPF تعریف می گردد	بررسی لام پاتولوژی
میزان فیبروز بافتی	مستقل	☒	☐	☐	☐	درصد	به صورت درصد فیبروز در بافت قلبی در هر HPF تعریف میگردد	بررسی لام پاتولوژي

جدول متغیرها

نام متغیر	نقش متغیر	نوع متغیر کمی ـ پیوسته است؟	نوع متغیر کمی ـ گسسته است؟	نوع متغیر کیفی ـ رتبه ای است؟	نوع متغیر کیفی ـ اسمی است؟	واحد اندازه گیری	تعریف کاربردی	نحوه اندازه گیری
میزان نئوواسکولاسیون بافتی	مستقل	☒	☐	☐	☐	عدد	تراکم عروق در ناحیه در هر HPF	لام پاتولوژی

زمانبندی و اجرا

شرح مختصر مرحله	درصد مرحله	مدت زمان اجرا ـ ماه	از تاریخ	تا تاریخ
خرید اقلام مصرفی		1		
مداخلات حیوانی و پیگیری حیوانات		2		
انتشار یافته ها		2		

هزینه وسایل و مواد مورد نیاز

نوع	نان دستگاه / مواد اولیه	تعداد مورد نیاز	قیمت دستگاه/ وسیله/ مواد ـ ریال	کشور سازنده	شرکت سازنده	شرکت فروشنده	محل تامین اعتبار	جمع کل هزینه به ریال
مصرفی	محلول RNx Plus	1	25,000,000		سیناکلون		داخل مرکز	25,000,000
مصرفی	کلروفرم	1	11,000,000		DNABiotech		داخل مرکز	11,000,000
مصرفی	اتانول مطلق	1	2,000,000		اراک		داخل مرکز	2,000,000
مصرفی	Proteinase K	1	28,000,000		سیناکلون		داخل مرکز	28,000,000
مصرفی	DNAse I	1	7,500,000		سیناکلون		داخل مرکز	7,500,000
مصرفی	کیت سنتز cDNA	2	30,000,000		سیناکلون		داخل مرکز	60,000,000
مصرفی	مسترمیکس ریل تایم	5	12,000,000		سیناکلون		داخل مرکز	60,000,000
مصرفی	آگارز	1	15,000,000		سیناکلون		داخل مرکز	15,000,000
مصرفی	DNA safe stain	1	9,000,000		سیناکلون		داخل مرکز	9,000,000
مصرفی	Tris	1	10,000,000		آرکاطب		داخل مرکز	10,000,000
مصرفی	EDTA	1	5,000,000		DNABiotech			5,000,000
مصرفی	DNA MW marker 100 bp	1	12,000,000		DNABiotech		داخل مرکز	12,000,000
مصرفی	پرایمر	20	2,000,000		سیناکلون			40,000,000
مصرفی	آنتی بادی C/EBPβ	1	200,000,000		Biorbyt		داخل مرکز	200,000,000

هزینه وسایل و مواد مورد نیاز

نوع	نان دستگاه / مواد اولیه	تعداد مورد نیاز	قیمت دستگاه/ وسیله/ مواد ـ ریال	کشور سازنده	شرکت سازنده	شرکت فروشنده	محل تامین اعتبار	جمع کل هزینه به ریال
مصرفی	آنتی بادی c-kit	1	200,000,000		Biorbyt		داخل مرکز	200,000,000
مصرفی	آنتی بادی Nkx2.5	1	200,000,000		Biorbyt		داخل مرکز	200,000,000
مصرفی	آنتی بادی ثانویه Anti-Rabbit(HRP)	1	70,000,000		Biorbyt		داخل مرکز	70,000,000
مصرفی	مارکر وزن مولکولی پروتئین	1	12,000,000		SMBio		داخل مرکز	12,000,000
مصرفی	SDS	1	4,000,000		DNABiotech		داخل مرکز	4,000,000
مصرفی	APS	1	3,000,000		DNABiotech		داخل مرکز	3,000,000
مصرفی	TEMED	1	2,800,000		DNABiotech		داخل مرکز	2,800,000
مصرفی	Tris base	1	4,500,000		DNABiotech		داخل مرکز	4,500,000
مصرفی	Panceu S	1	4,200,000		GoldBio		داخل مرکز	4,200,000
مصرفی	Methanol	1	7,000,000		SRL chem		داخل مرکز	7,000,000
مصرفی	Glycine	1	2,500,000		DNABiotech		داخل مرکز	2,500,000
مصرفی	ECL substrate	1	6,100,000		CMG		داخل مرکز	6,100,000
مصرفی	ممبران PVD (سایز 10*30)	1	30,000,000		G-Bioscience		داخل مرکز	30,000,000
مصرفی	سرسمپلر آبی	3	1,500,000		Maxwell		داخل مرکز	4,500,000
مصرفی	سرسمپلر زرد	3	1,500,000		Maxwell		داخل مرکز	4,500,000
مصرفی	سرسمپلر کریستالی	2	3,500,000		Maxwell		داخل مرکز	7,000,000
مصرفی	رک سرسمپلر آبی	2	1,000,000		Maxwell		داخل مرکز	2,000,000
مصرفی	رک سرسمپلر زرد	2	1,000,000		Maxwell		داخل مرکز	2,000,000
مصرفی	رک سرسمپلر کریستالی	2	1,000,000		Maxwell		داخل مرکز	2,000,000
مصرفی	کرایوباکس	2	1,200,000		Medwares pro		داخل مرکز	2,400,000
مصرفی	میکروتیوب 2 میل	2	1,400,000		Medwares pro		داخل مرکز	2,800,000
مصرفی	میکروتیوب 0.5 میل	1	2,100,000		Medwares pro		داخل مرکز	2,100,000

هزینه وسایل و مواد مورد نیاز

نوع	نان دستگاه / مواد اولیه	تعداد مورد نیاز	قیمت دستگاه/ وسیله/ مواد ـ ریال	کشور سازنده	شرکت سازنده	شرکت فروشنده	محل تامین اعتبار	جمع کل هزینه به ریال
مصرفی	استریپ ریل تایم	1	23,000,000		Socal Bio		داخل مرکز	23,000,000
مصرفی	دستکش لاتکس	2	1,400,000		OP		داخل مرکز	2,800,000
مصرفی	گاز غیر استریل	1	800,000				داخل مرکز	800,000
مصرفی	زایلازین	20	120,000				داخل مرکز	2,400,000
مصرفی	کتامین(حیوانی10%)	72	140,000				داخل مرکز	10,080,000
مصرفی	ترامادول	48	50,000				داخل مرکز	2,400,000
مصرفی	سفازولین	48	850,000				داخل مرکز	40,800,000
مصرفی	سرنگ انسولین	24	30,000				داخل مرکز	720,000
مصرفی	سرنگ 2 سی سی	24	26,000				داخل مرکز	624,000
مصرفی	آنژیوکت	16	120,000				داخل مرکز	1,920,000
مصرفی	سرم رینگر	288	1,500				داخل مرکز	432,000
مصرفی	آب مقطر	12	50,000				داخل مرکز	600,000
مصرفی	دستکش جراحی	24	185,000				داخل مرکز	4,440,000
مصرفی	دستکش غیر استریل	96	15,000				داخل مرکز	1,440,000
مصرفی	تیغ شیو	16	90,000				داخل مرکز	1,440,000
مصرفی	تیغ بیستوری	16	90,000				داخل مرکز	1,440,000
مصرفی	نخ بخیه سرجیپو0/4	24	1,200,000				داخل مرکز	28,800,000
مصرفی	نخ بخیه پرولن 0/6	24	650,000				داخل مرکز	15,600,000
مصرفی	نخ بخیه سیلک	24	200,000				داخل مرکز	4,800,000
مصرفی	گاز استریل	48	80,000				داخل مرکز	3,840,000
مصرفی	حیوان آزمایشگاهی (رت)	48	1,500,000				داخل مرکز	72,000,000
مصرفی	Acrylamide/bis-acrylamide	1	4,000,000		DNABiotech		داخل مرکز	4,000,000

هزینه آزمایشات و خدمات تخصصی

نام خدمت	نام مؤسسه ارائه کننده خدمت	تعداد یا مقدار لازم	قیمت واحد ـ ریال	قیمت کل ـ ریال
انجام اکوکاردیوگرافی		240	1,500,000	360,000,000

هزینه آزمایشات و خدمات تخصصی

نام خدمت	نام مؤسسه ارائه کننده خدمت	تعداد یا مقدار لازم	قیمت واحد ـ ریال	قیمت کل ـ ریال
هزینه جراحی و ایجاد مدل MI و بیهوشی		48	1,800,000	86,400,000
هزینه نگهداری و تیمار رت ها		48	6,500,000	312,000,000
تفسیر پاتولوژی		32	1,000,000	32,000,000
رنگ آمیزی H&E نمونه پاتولوژی		16	1,000,000	16,000,000
رنگ آمیزی تری کروم نمونه پاتولوژي		16	300,000	4,800,000

جمع کل هزینه های طرح

هزینه پرسنلی (هیات علمی و غیر هیات علمی)	هزینه مواد مصرفی	هزینه مواد غیر مصرفی	هزینه تجهیزات،موادوخدمات موجوددر مرکز	هزینه مسافرت	هزینه چاپ و تکثیر	سایر هزینه ها	جمع کل هزینه ـ ریال
0	1,284,276,000	0	811,200,000	0	0	0	2,095,476,000