|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | (RES-03) |  |

**الف) چکیده**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **تیم طرح** | | | |
| |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **نام و نام خانوادگی** | **مقطع تحصیلی** | **رشته تحصیلی** | **شماره دانشجویی** | |  |  |  |  | |  |  |  |  | |  |  |  |  | |  |  |  |  | | | | |
| **عنوان طرح** | | | |
| **عنوان طرح به فارسی**  **بررسی اثر ایمودین جداشده از گیاه دارویی *Viscum album* بر پیشگیری و برگشت‌پذیری پلاک آترواسکلروز از طریق تغییر فعالیت آنزیم UGT1A1 و سطح بیلی‌روبین سرم** | | | |
| **عنوان طرح به انگلیسی**  **Evaluation of the Effect of Emodin Isolated from *Viscum album* on Atherosclerotic Plaque Progression and Reversibility through Changing the Activity of UGT1A1 Enzyme and Serum Bilirubin Level** | | | |
| **چکیده** | | | |
| **خلاصه بیان مساله و ضرورت اجرا (حداکثر 300 کلمه)**  C:\Users\AsUs\Desktop\مرحله گروهی\دوره 16\پروپوزال\Central Topic.png | | | |
| **خلاصه روش اجرا (حداکثر 300 کلمه)** | | | |
| **کلیدواژه­ها** | | | |
| **سه تا پنج کلیدواژه به زبان انگلیسی و بر اساس MeSH** | | | |
| **بودجه درخواستی از دانشگاه (ریال)** |  | **مدت زمان اجرا (ماه)** |  |

**ب) اطلاعات طرح**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **اهداف اختصاصی** | | | |
|  | | | |
| **بیان مساله و ضرورت اجرای مطالعه** | | | |
| **با در نظر گرفتن مطالعات قبلی، ضرورت اجرای مطالعه را تبیین کنید.**  **(حداکثر 1500 کلمه)**  آترواسکلروز: تعریف، شیوع و بروز، عوارض، بار (DALYs) و هزینه‌های اقتصادی / SDG  پاتوفیزیولوژی و مکانیسم‌ها (تاریخچه که ابتدا چربی و سپس خودایمنی) / آترواسکلروز به عنوان فرایند aging در همه + اما در کل پیچیده (Complex): استرس اکسیداتیو، آسیب اندوتلیال (اولین گام ایجاد آترواسکلروز)، هایپرتنشن، مرگ سلولی  تاریخچۀ درمانی و استاتین‌ها به عنوان درمان استاندارد اما شیوع و بروز کماکان بالا (میزان پول مصرفی برای استاتین؟)  لزوم گذر از استاتین‌ها و رسیدن به درمان‌های نوین. به منظور این هدف، لزوم شناسایی ترکیبات بالادستی موثر  یکی از مکانیسم‌های بالادستی نوین، بیلی‌روبین. سندرم ژیلبرت و مهار ژنتیکی آنزیم UGT1A1. شیوع ژیلبرت و سطح بیلی‌روبین. حتی اثر خود آنزیم UGT1A1. زردی فیزیولوژیک نوزادی. علاوه بر قلبی-عروقی، آثار دیگر / البته تناقضاتی نیز به چشم می‌خورد که ناشی از تفاوت غلظت بیلی‌روبین و یا نوع غالب آن (کنژوگه/غیرکنژوگه) است.  مکانیسم‌های اثر بیلی‌روبین: قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان بدن، ضدالتهاب، تنظیم‌کنندۀ لیپید سرم، یکپارچگی اندوتلیال عروق، افزایش ظرفیت ورزشی / پلاکت  آنزیم UGT1A1 و مهار آن / داروی گیاهی x / بومی ایران  ما در این مطالعه قصد داریم با بررسی اثر داروی گیاهی x بر میزان فعالیت آنزیم UGT1A1 و به دنبال آن تغییرات سطح سرمی بیلی‌روبین، به تعیین تاثیر این ترکیب گیاهی بر پلاک آترواسکلروتیک از طریق این مسیر بپردازیم.   * **Rheum palmatum** (Rhubarb): This is one of the primary sources of emodin, with significant concentrations found in its roots and rhizomes. It has been used in traditional Chinese medicine for centuries. * **Polygonum cuspidatum** (Japanese Knotweed): Another important source of emodin, this plant is often used in herbal formulations and is known for its health benefits. * **Polygonum multiflorum** (Fo-Ti or He Shou Wu): This herb is also rich in emodin and is commonly used in traditional Chinese medicine for its purported anti-aging and health-promoting properties. * **Cassia obtusifolia** and **Cassia tora**: Both of these herbs from the Fabaceae family contain emodin and are used in various traditional remedies. * **Aloe vera**: Known for its soothing properties, aloe vera also contains emodin, particularly in its latex and leaves, contributing to its medicinal uses. * **Reynoutria japonica**: This herb is another source of emodin, often used for its anti-inflammatory properties. * **Rumex abyssinicus** and **Odontites serotina**: These lesser-known herbs also contain emodin and are used in traditional medicine systems.   آترواسکلروز یا تصلب شرایین نوعی بیماری عروقی بوده که مشخصۀ آن رسوب لیپیدها به درون دیوارۀ عروق، کلسیفیکاسیون و سخت‌شدن دیوارۀ عروق -به خصوص عروق کرونر- و در نهایت تنگی لومن رگ می‌باشد. در میان بیماری‌های قلبی-عروقی -که علت 31% از مرگ و میر در سراسر جهان بوده و شایع‌ترین علت مورتالیتی هستند-، اختلالات مرتبط با آترواسکلروز در صدر این لیست جای گرفته‌اند تا جایی که پیش‌بینی می‌شود تا سال 2030، سالانه حدود 24 میلیون نفر به علت آترواسکلروز جان خود را از دست خواهند داد. این بیماری‌ها علاوه بر مورتالیتی بالا، موربیدیتی قابل‌توجهی نیز از خود بر جای می‌گذارند به طوری که DALYs. همۀ این موارد در کنار یکدیگر منجر به ایجاد بار اقتصادی سنگین آترواسکلروز بر نظام سلامت کشورها شده است؛ به طوری که در حال حاضر سالانه حدود 400 میلیارد دلار در کشور ایالات متحده برای آترواسکلروز هزینه شده و پیش‌بینی می‌شود تا سال 2050 چهار برابر شود. این رقم در ایران سالانه 5571 میلیارد ریال بوده که پس از اجرای طرح تحول نظام سلامت با افزایش چشمگیر مواجه شده و تا 6700 میلیارد ریال نیز رسیده است.  بار بالای این بیماری، لزوم بررسی مکانیسم‌های سلولی-مولکولی ایجادکنندۀ آن را به منظور ارائۀ راهکارهای درمانی مشخص می‌کند. تاریخچۀ پاتوفیزیولوژی این بیماری به اواسط قرن 19 بر می‌گردد، جایی که که رودولف ویرشو -پاتولوژیست شهیر آلمانی- تجمعات لیپیدی را درون عروق بیماران فوت‌شده به علت بیماری‌های انسدادی مشاهده کرد. در دهۀ 1950 میلادی نیز نتایج کوهورت بزرگ فرامینگهام حاکی از همراهی قوی بین افزایش سطح کلسترول سرم و آترواسکلروز بود. در نتیجه، تا پیش از سال 2000، عقیدۀ عمومی بر این بود که دیس‌لیپیدمی (افزایش سطح سرمی LDL-کلسترول و تری‌گلیسرید در کنار کاهش HDL سرم) علت اصلی ایجاد آترواسکلروز است. در این میان، برای اولین بار در دهۀ 1970 میلادی، فرضیۀ ایجاد آترواسکلروز از طریق مکانیسم‌های ایمونولوژیک و التهابی توسط خود ویرشو مطرح شد؛ هر چند که موردتوجه قرار نگرفت. این روند تا اوایل قرن 21 ادامه داشت تا اینکه در مجمع انجمن قلب اروپا برای آترواسکلروز در سال 2001، شرکت‌کنندگان آخرین یافته‌ها در زمینۀ پاتوفیزیولوژی آترواسکلروز را به اشتراک گذاشتند و متفق‌القول بر نقش برجستۀ سیستم ایمنی در ایجاد این بیماری صحه گذاشته و نقش عوامل سنتی (از قبیل دیس‌لیپیدمی و بیماری‌های متابولیک) را کمتر از آنچه فرض می‌شد، اعلام کردند.  از آن پس مطالعات در زمینۀ نقش مکانیسم‌های ایمونولوژیک در ایجاد آترواسکلروز بیشتر شد، تا آنجا که هم‌اکنون این بیماری را ناشی از فرایندهای التهابی خفیف مزمن می‌دانند. برخی پا را این فراتر گذاشته و آترواسکلروز را به عنوان نوعی بیماری اتوایمیون در نظر می‌گیرند. با این حال، در ضمن پرداختن به مکانیسم‌های التهابی مشخص شده است که پاتوژنز آترواسکلروز بسیار پیچیده‌تر از چند عامل مشخص بوده و فاکتورهای متعددی در ایجاد این بیماری دخیل هستند. از جملۀ این عوامل می‌توان به نقش عفونت‌ها، استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد اندوتلیوم، نیروهای همودینامیک جریان خون و سیستم اتونوم، انواع مرگ سلولی، شیفت فنوتایپی سلول‌های عضلۀ صاف دیوارۀ عروق، اختلال عملکرد میتوکندری، میکروبیوم روده، انواع RNA در کنار عوامل سنتی از قبیل دیس‌لیپیدمی و هایپرتنشن اشاره کرد.  در حال حاضر استاتین‌ها به عنوان درمان خط اول و استاندارد آترواسکلروز شناخته می‌شوند. مکانیسم اصلی عملکرد این دارو، مهار آنزیم HMG-CoA-Reductase به عنوان آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز کلسترول است. نتایج کوهورت فرامینگهام منجر به تلاشی وسیع به منظور کشف داروی کاهندۀ سطح کلسترول سرم شد که در نهایت به کشف اولین استاتین (لوواستاتین) در سال 1978 میلادی ختم شد. اما پس از پررنگ‌شدن نقش سیستم ایمنی در ایجاد آترواسکلروز و کم‌رنگ‌شدن اتیولوژی دیس‌لیپیدمی در عین حال مشاهدۀ تداوم اثرگذاری استاتین‌ها، این فرضیه به وجود آمد که احتمالا استاتین‌ها علاوه بر تعدیل دیس‌لیپیدمی، اثر مهاری بر مکانیسم‌های التهابی نیز دارند و پس از انجام مطالعات، این فرضیه به تایید رسید. با این حال، علاوه بر عوارض جانبی استاتین‌ها (از جمله احتمال ایجاد دیابت) و بار اقتصادی بالای استفاده از این داروها (با هزینۀ بیش از 10 میلیارد دلار در آمریکا در سال 2019)، با توجه اینکه اثر اصلی این دستۀ دارویی نه بر مکانیسم اصلی ایجاد آترواسکلروز (فرایندهای التهابی)، بلکه بر مکانیسم‌های جانبی ایجاد آن بود؛ بسیاری از پژوهشگران، شکست استاتین‌ها در کاهش مطلوب آترواسکلروز و بار بالای این بیماری در حال حاضر را به این قضیه نسبت می‌دهند و لزوم گذر از این دستۀ دارویی را مطرح می‌کنند. با توجه به سایه‌روشن‌های تجربۀ استفاده از استاتین‌ها، به نظر برای رسیدن به یک درمان موثرتر باید به دنبال مولکولی در بالادست مسیرهای ایجاد آترواسکلروز باشیم که به صورت چندجانبه بر مسیرهای مختلف ایجاد این بیماری -با تمرکز بیشتر بر مکانیسم‌های ایمونولوژیک و التهابی- اثر بگذارد.  یکی از مولکول‌هایی که به نظر از چنین ویژگی برخوردار است، بیلی‌روبین می‌باشد. این فرضیه که بیلی‌روبین می‌تواند اثر آنتی‌آتروژنیک داشته باشد، از مبتلایان به سندرم ژیلبرت الهام گرفته شده است. در این سندرم شایع -با الگوی وراثت اتوزوم مغلوب و میانگین شیوع حدود 10%- موتاسیون ژن بیان‌کنندۀ آنزیم یوریدین دی‌فسفات-گلوکورونوزیل‌ترنسفراز (UGT1A1) منجر به کاهش ژنتیکی فعالیت این آنزیم که وظیفۀ گلوکورونیداسیون و کنژوگاسیون بیلی‌روبین را بر عهده دارد، شده و در نتیجه هایپربیلی‌روبینمی خفیف (بیلی‌روبین توتال معمولا کمتر از 3-4 mg/dL) به صورت مداوم در این افراد وجود دارد. با این وجود، این افراد نه تنها عوارضی از این هایپربیلی‌روبینمی متحمل نمی‌شوند، بلکه به صورت قابل‌توجه شیوع بیماری‌های قلبی-عروقی نیز در آنها کمتر از سایر افراد جامعه است. جالب اینجاست که مشاهده شده است که نوزادان مبتلا به زردی فیزیولوژیک نوزادی در آینده با احتمال کمتری به بیماری‌های قلبی-عروقی مبتلا می‌شوند که این مورد نقش بیلی‌روبین را بیش از پیش برجسته می‌کند. با اینکه حتی مطالعۀ GWAS روی داده‌های کوهورت بزرگ فرامینگهام حاکی از این بود که ژن UGT1A1 نقش موثری در ایجاد آترواسکلروز دارد و می‌تواند هدف داروهای آنتی‌آترواسکلروز قرار گیرد اما این موضوع تا کنون مورد توجه قرار نگرفته است. علاوه بر آثار حفاظت‌کنندۀ قلبی-عروقی،  مسیرهای سلولی-مولکولی مختلفی برای توجیه اثر آنتی‌آتروژنیک بیلی‌روبین قابل طرح است. از طرفی بیلی‌روبین اثرات آنتی‌اکسیدانی فوق‌العاده‌ای از خود بر جای می‌گذارد، تا آنجا که به عنوان قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان بدن انسان شناخته می‌شود. همچنین این مولکول اثر با کاهش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و افزایش سایتوکاین‌های ضدالتهابی در تنظیم و تعدیل التهاب نیز نقش دارد. از طرف دیگر، بیلی‌روبین سطح LDL-C و تری‌گلیسرید سرم را کاهش داده و در مقابل سطح HDL را افزایش می‌دهد که این عملکرد تا حدی ناشی از مهار آنزیم HMG-CoA-Reductase (آنزیمی که توسط استاتین‌ها مهار می‌شود) است. علاوه بر این، بیلی‌روبین سبب کاهش فشار خون و افزایش یکپارچگی اندوتلیال می‌شود. جالب‌تر شیوع بالاتر سندرم ژیلبرت در ورزشکاران منجر به انجام مطالعاتی در این زمینه شده و نتایج این مطالعات حاکی از این است که بیلی‌روبین سبب افزایش ظرفیت ورزشی نیز می‌شود و می‌تواند از طریق کاهش سبک زندگی کم‌تحرک نیز منجر به کاهش بار پلاک آترواسکلروز شود.  البته مطالعات حاوی نتایج متناقض با آنچه در رابطه با بیلی‌روبین اشاره شد نیز وجود دارد که در آن به بی‌اثربودن و یا آثار منفی بیلی‌روبین تکیه شده است. ضمن تعداد بسیار کمتر این دسته از مطالعات نسبت به مطالعات به نفع اثربخشی بیلی‌روبین، برخی معتقدند که این تناقض به علت تفاوت در نوع بیلی‌روبین موردمطالعه (کنژوگه/غیرکنژوگه) و غلظت آن بوده است. در واقع از مطالعات اینطور به نظر می‌رسد که بیلی‌روبین دارای اثر هورمتیک (Hormetic) بوده؛ به این صورت که در یک بازۀ مشخص از غلظت، اثربخشی مطلوب دارد، در حالی که در بازۀ کمتر و بیشتر از آن، اثرات منفی از خود بر جای می‌گذارد.  با توجه به همۀ این موارد، می‌توان افزایش بیلی‌روبین -در یک بازۀ مشخص- را به عنوان یک روش درمانی نوین برای آترواسکلروز مدنظر قرار داد. روش‌های متعددی برای ایجاد وضعیت هایپربیلی‌روبینمی خفیف در بدن وجود دارد که یکی از آنها مهار آنزیم UGT1A1 است. در واقع می‌توان از این طریق می‌توان وضعیتی مشابه با بیماران مبتلا به سندرم ژیلبرت ایجاد کرد، با این تفاوت که در این سندرم، فعالیت آنزیم UGT1A1 به صورت ژنتیکی کاهش یافته است، اما در روش درمانی پیشنهادی، فعالیت آنزیم به صورت فارماکولوژیک و کنترل‌شده مهار می‌شود.  به منظور مهار فعالیت آنزیم UGT1A1، ترکیبات متعدد طبیعی و سنتتیک را می‌توان مورد استفاده قرار داد. برخی از داروهای شناخته‌شده که برای کاربردهای دیگری در پزشکی به کار می‌روند – از جمله مهارکننده‌های SGLT2 (داپاگلیفلوزین، کاناگلیفلوزین) و داروهای آنتی‌وایرال (آتازاناویر، تولکاپون، انتکاپون)-، به صورت جانبی این آنزیم را نیز مهار می‌کنند. همچنین نشان داده شده است که برخی ترکیبات طبیعی و گیاهی نیز می‌توانند آنزیم UGT1A1 را مهار کنند که عمدۀ این ترکیبات شامل فلاونوئیدها (آکاستین، کمپفرول و آمنتوفلاون)، آنتراکینون‌ها (ایمودین) و گیاه *Polygonum multiflorum* اشاره کرد. همچنین از آنجا که برخی از این دسته ترکیبات به صورت مجزا نیز آثار محافظت‌کنندۀ قلبی-عروقی از خود بروز داده‌اند، به نظر گزینۀ مناسبی برای مطالعه در زمینۀ درمان آترواسکلروز به شمار می‌روند. با این حال، ترکیبات مطالعه‌شده در این زمینه عمدتا گیاهان بومی کشور چین بوده‌اند و تهیۀ آنها برای انجام مطالعه در ایران دشوار و از نظر اقتصادی غیرمنطقی است. از میان گیاهان بومی کشور ایران، گیاه *Viscum album* که با نام دارواش شناخته می‌شود، حاوی ترکیبات متعدد از قبیل فلاونوئیدها و آنتراکینون‌ها است. این گیاه دارویی که در جنگل‌های شمال ایران برای تاج درختان بلوط، افرا و برخی درختان دیگر رشد می‌کند، از خود خواص درمانی متعددی بر جای گذاشته است که از مهم‌ترین آنها اثر ضد‌هایپرتنشن و ضددیابتی این داروی گیاهی است.  علاوه بر این، ترکیب ایمودین با داشتن خاصیت حساسیت به امواج اولتراسوند (Sonosensitizer) به منظور سونوداینامیک‌تراپی (SDT) در سرطان‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد. SDT روشی است که در آن ... اخیرا این روش به منظور درمان آترواسکلروز نیز مورد استفاده قرار گرفته است؛ منتها ترکیبات Sonosensitizer به این منظور شامل ALA، کورکومین و ... بوده است.  بر اساس مطالب ذکرشده، ما قصد داریم که در این مطالعه به بررسی اثر گیاه دارویی *Viscum album* بر پلاک آترواسکلروز از طریق تغییر فعالیت آنزیم UGT1A1 و به دنبال آن تغییر سطح سرمی بیلی‌روبین بپردازیم. | | | |
| **روش اجرا** | | | |
| **نوع و جهت مطالعه، مراحل اجرای مطالعه، معيارهاي ورود و خروج، روش نمونه‌گيري، محاسبة حجم نمونه، روش‌هاي جمع‌آوري اطلاعات، روايي و پايايي ابزار گردآوري داده‌ها، نحوه آموزش، شرح مداخله يا تجويز دارو، روش­ها و ابزارهای تجزيه و تحليل اطلاعات و ...**  این مطالعه پس از دریافت کد اخلاق از کمیتۀ مربوطه، در دو فاز حیوانی و انسانی مطابق با ذیل به اجرا خواهد رسید.  پیش از شروع مطالعه، ترکیب مدنظر (ایمودین) با استفاده از روش کروماتوگرافی ستونی از برگ گیاه سنا جداسازی شده و ...   * **فاز حیوانی**  1. **مدل‌سازی و سنجش‌های پیش از تیمار**   تعداد 75 عدد موش 8 هفته با بک‌گراند C57BL6 (10 موش Wild Type و 30 موش ApoE-/-) با نسبت نر/ماده 10±50% به کل جمعیت (این نسبت در تمام گروه‌بندی‌ها رعایت خواهد شد) از مرکز آزمایشگاه پیش‌بالینی تهران تهیه خواهد شد. موش‌ها در دمای 26 درجه، با دسترسی نامحدود به غذا با رژیم Western Diet (WD) -شامل 21% چربی و 0.2% کلسترول- و سیکل شبانه روزی 12/12 نگهداری خواهند شد. جهت اطمینان از ایجاد مدل آترواسکلروز، موش‌ها به مدت 13 هفته در آزمایشگاه با شرایط مذکور نگهداری خواهند شد. در این مدت وزن و میزان غذای مصرفی موش‌ها به صورت روزانه توسط مسئول نگهداری ثبت خواهد شد تا اشتها و سبک زندگی موش‌ها نیز بررسی شود. در روز 60، تعداد 10 موش به صورت رندوم از موش‌های WT و ApoE-/- (از هر کدام 5 موش) انتخاب شده و پس از یک روز Fasting از طریق تزریق داخل‌صفاقی سدیم‌پنتوباربیتال کشته خواهند شد. سپس با واردکردن مستقیم سوزن به آئورت شکمی، نمونۀ خون موش‌ها جمع‌آوری خواهد شد. همچنین از آئورت شکمی و بافت کبد نمونه‌برداری شده و در فرمالین 10% یا نیتروژن به منظور انجام سنجش‌های مدنظر نگهداری خواهد شد (رجوع کنید به بخش سنجش‌ها).   1. **فاز 1 تیمار (پیشگیری از آترواسکلروز)**   روز 61 موش‌های ApoE-/- به 5 گروه 5 تایی تقسیم خواهند شد (با رعایت نسبت جنسیت). بنابراین در مجموع 6 گروه ذیل را در مطالعه خواهیم داشت:   1. موش نرمال 2. موش مدل آترواسکلروز (ApoE-/-) 3. موش مدل آترواسکلروز + آتورواستاتین خوراکی 4. موش مدل آترواسکلروز + بیلی‌روبین تزریقی 5. موش مدل آترواسکلروز + آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنزیم UGT1A1 / داپاگلیفلوزین 6. موش مدل آترواسکلروز + ایمودینبا دوز پایین (20mg/kg) 7. موش مدل آترواسکلروز + ایمودینبا دوز متوسط (40mg/kg) 8. موش مدل آترواسکلروز + ایمودینبا دوز بالا (80mg/kg) 9. موش مدل آترواسکلروز + ایمودینبا دوز توکسیک   از روز 85، مداخلات روزانه به مدت 13 هفته آغاز خواهد شد. روزانه. هر هفته به مدت 13 هفته سنجش متغیرهای خونی ،مدفوع و میانگین روزانه وزن موش‌های هر گروه در این بازه‌های زمانی را ادامه میدهیم. به گروه مداخله دارو X را با دوز معین (اگر ۳ دوز است) تزریق میکنیم ((ApoE-/-X. برای به دست آوردن مقادیر پایه متغیرها در شرایط آترواسکلروز بدون مداخله موش‌های گروه کنترل را با همان رژیم و تزریق پلاسبو در گروه کنترل منفی قرار می‌دهیم (ApoE-/-WD). ۳گروه کنترل مثبت تزریق استاتین با دوز معین (ApoE-/-)، داپاگلیفلوزین 10میلی‌گرم (mg) (مهارکننده SGLT2) (ApoE-/-check.enzyme) تزریق اینتراپریتونئال بیلی‌روبین با دوز 20mg/kg/day (ApoE-/-BR) را به ترتیب جهت بررسی کارایی دارو در کنترل آترواسکلروز، کارایی دارو در مقایسه با دارو مهار کننده آنزیم/مهار آنزیم در سطح ژن/ مهار آنزیم با وکتور و کارایی دارو در مقایسه با تزریق اینتراپریتونئال بیلی‌روبین به عنوان روش پیشنهادی مقالات گذشته جهت کنترل آترواسکلروز تیمار می‌کنیم. در پایان مداخله پس از کشتن موش‌ها با روش‌های اخلاقی تایید شده آئورت، کاروتید و کبد موش‌ها را جهت بررسی سلولی مولکولی جداسازی می‌کنیم.   1. **فاز 2 تیمار (برگشت‌پذیری پلاک آترواسکلروز)**   در فاز دوم تیمار حیوانات، اثر سونوداینامیک‌تراپی (Sonodynamic Therapy یا SDT) بر برگشت‌پذیری پلاک آترواسکلروز با واسطۀ ایمودین می‌پردازیم. در این مرحله موش‌های باقی‌مانده در انتهای فاز قبلی به دو گروه تقسیم شده که یکی از گروه‌ها SDT دریافت کرده و دیگری . پروتوکل دریافت SDT به این صورت است که مساحت 0.4 cm2 بر قفسۀ سینه به مدت 15 دقیقه و دو ساعت پس از تزریق   1. **سنجش‌**   **الف) سنجش بافتی**  ظاهر کلی ضایعات آترواسکلروتیک و مساحت پلاک‌ها را در برش طولی شریان‌ها ثبت می‌کنیم. در برش عرضی شریان‌ها و رنگ‌آمیزی با Oil-Red با میکروسکوپ نوری ضخامت پلاک، لایه‌های مختلف، وضعیت سلول‌های اندوتلیال پلاک‌ها و میزان چربی تجمع یافته در دیواره پلاک را بررسی می‌کنیم. همچنین نمونه‌هایی از مقطع عرضی دیواره شریان‌ها را جهت بررسی ایمونوهیستو شیمی با میکروسکوپ فلوروسانس آماده می‌کنیم تا میزان ماکروفاژهای موجود در پلاک، اتصال مونوسیت‌ها به اندوتلیال، مهاجرت سلول‌ها عضله صاف‌، میزان نکروز پلاک‌ها و میزان کلاژن دیواره را بررسی کنیم و رنگ‌آمیزی را انجام می‌دهیم و در مرحله‌ای دیگر نمونه شریان‌ها را جهت بررسی نوع ماکروفاژها توسط فلوسایتومتری آماده میکنیم.  ظاهر کلی کبد از نظر سایز، میزان چربی را بررسی می‌کنیم. مقطع عرضی کبد را جهت بررسی ایمونوهیستوشیمی آماده می‌کنیم و در کبد به بررسی سطح ماده موثر دارو X ، میزان محصول آنزیم، میزان آنزیم موجود، اتصال دارو به آنزیم، کلسترول بافتی، بیلی‌روبین موجود می‌پردازیم.  ب) سنجش سرمی  آنزیم‌های کبدی (AST، ALT) به منظور بررسی سمیت ایمودین  ج) سنجش مدفوع  پس از اطمینان از ایجاد مدل آترواسکلروز در موش‌ها و تشکیل پلاک‌های اولیه، از باقی موش‌ها‌ نمونۀ خون جمع‌آوری خواهد شد تا متغیرهای خونی مربوط به آترواسکلروز (شماره جدول)، التهاب (شماره جدول)، بیلی‌روبین (توتال، مستقیم و غیرمستقیم)، محصول\_آنزیم با 0PET/خون و پروفایل لیپیدی موش‌ها (یا کلا الایزا؟) را به روش (کیت بررسی متابولیت) وسترن بلات برای پروتئین‌ها و کیت سنجش برای پروفایل لیپیدی سنجیده شود. همچنین یک نمونه مدفوع از موش‌ها نیز جهت بررسی میزان اسید‌های صفراوی و بیلی‌وردین دفعی موش تهیه خواهد شد و میزان این متغیرها با کیت مخصوص خود سنجیده خواهد شد.  در ادامه توضیحات تست‌ها و روش آماری مورد نیاز جهت آنالیز داده ها ارائه می‌شود. مارکر مورد استفاده در هر تست در ستون مربوطه در جدول متغیر ذکر شده است.  **Staining (silver, zinc,...)**  روش انجام تست: رنگ‌آمیزی ژل یا غشاء با مواد مختلف برای آشکارسازی مولکول‌ها. / واحد اندازه گیری: شدت رنگ، یا تراکم باند. / ماده مورد سنجش برای کنترل مثبت: نمونه‌ای با غلظت مشخص از ماده مورد نظر. / روش آماری پیشنهادی برای عددی‌سازی و تعیین p.value: آنالیز واریانس (ANOVA) برای مقایسه شدت رنگ بین گروه‌های مختلف، یا تست t برای مقایسه دو گروه.  **Western blot**  روش انجام تست: در این روش، پروتئین های موجود در نمونه (مانند لیزات سلولی) با استفاده از SDS-PAGE بر اساس وزن مولکولی تفکیک می شوند. سپس پروتئین ها به غشای نیتروسلولز منتقل شده و با استفاده از آنتی بادی اختصاصی به پروتئین مورد نظر شناسایی می شوند. پس از شستشو و اضافه کردن آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم، با استفاده از سوبسترا، واکنش آنزیمی رخ می دهد و باندهای پروتئینی مربوط به پروتئین مورد نظر قابل مشاهده می شوند.. / واحد اندازه گیری: شدت باند در غشاء نسبت به شدت باند پروتئین مرجع/ ماده مورد سنجش برای کنترل مثبت؛ پروتئین استاندارد با غلظت مشخص / روش آماری پیشنهادی برای عددی‌سازی و تعیین p.value: آنالیز واریانس (ANOVA) برای مقایسه شدت باند بین گروه‌های مختلف، یا تست t برای مقایسه دو گروه.  **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**  روش انجام تست: در این روش، آنتی بادی های اختصاصی به پروتئین مورد نظر بر روی سطح یک صفحه 96 چاهکی پوشش داده می شوند. سپس نمونه (مانند سرم، پلاسما یا لیزات سلولی) به چاهک ها اضافه شده و پروتئین مورد نظر به آنتی بادی متصل می شود. پس از شستشو، آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم به پروتئین متصل شده و با اضافه کردن سوبسترا، واکنش آنزیمی رخ می دهد. شدت رنگ ایجاد شده با شدت پروتئین مورد نظر متناسب است و با استفاده از دستگاه ELISA reader اندازه گیری می شود. / واحد اندازه گیری: ng/mL, pg/mL, IU/mL (بسته به کیت و پروتئین مورد سنجش) / ماده مورد سنجش برای کنترل مثبت: استاندارد پروتئین مورد نظر با غلظت مشخص (معمولاً در کیت ELISA ارائه می شود) / روش آماری پیشنهادی برای عددی‌سازی و تعیین p.value: ANOVA یا t-test برای مقایسه گروه های مختلف.  **Immunohistochemistry (IHC)**  روش انجام تست: در این روش، برش های بافتی با آنتی بادی اختصاصی به پروتئین مورد نظر رنگ آمیزی می شوند. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری، شدت رنگ آمیزی در سلول ها ارزیابی می شود. / واحد اندازه گیری: شدت رنگ آمیزی (مثلاً 0 تا 3+)، درصد سلول های مثبت / ماده مورد سنجش برای کنترل مثبت: بافت یا سلول هایی که بیان پروتئین مورد نظر در آنها به طور مشخص بالا است. / روش آماری پیشنهادی برای عددی‌سازی و تعیین p.value: ارزیابی شدت رنگ آمیزی توسط چندین ناظر مستقل و استفاده از آزمون های آماری مانند Chi-square یا Fisher's exact test برای مقایسه گروه های مختلف..  **Flow cytometry**  روش انجام تست: در این روش، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های فلورسنت علامت‌گذاری می‌شوند و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری، تعداد و نوع سلول‌ها بر اساس خواص فلورسانس آنها شمارش می‌شوند. واحد اندازه گیری: تعداد سلول‌ها در هر گروه، یا درصد سلول‌ها در هر فاز سلولی / ماده مورد سنجش برای کنترل مثبت: سلول‌های با DNA content یا apoptosis شناخته شده / روش آماری پیشنهادی برای عددی‌سازی و تعیین p.value: تست t برای مقایسه تعداد یا درصد سلول‌ها بین گروه‌های مختلف، یا آنالیز واریانس (ANOVA) برای مقایسه چند گروه.  **Using Metabolites?**  روش انجام تست: اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌ها در نمونه‌های بیولوژیکی مانند خون، ادرار، یا بافت. / واحد اندازه گیری: غلظت متابولیت‌ها (μg/mL، mM، و غیره) / ماده مورد سنجش برای کنترل مثبت: نمونه‌ای با غلظت مشخص از متابولیت مورد نظر / روش آماری پیشنهادی برای عددی‌سازی و تعیین p.value: تست t برای مقایسه غلظت متابولیت‌ها بین گروه‌های مختلف، یا آنالیز واریانس (ANOVA) برای مقایسه چند گروه.  **آمار**   * **فاز انسانی**  1. **نمونه‌گیری**   پس از انجام فاز حیوانی و اطمینان از بی‌خطربودن و مشاهدۀ اثربخشی معنی‌دار مداخله، فاز انسانی به اجرا خواهد رسید. این بخش از مطالعه نوعی کارآزمایی تصادفی و سه‌سوکور خواهد بود.  پس از توضیح کامل فرایند مطالعه به افراد متقاضی برای شرکت در مطالعه، از تمامی آنها رضایت آگاهانه به صورت کتبی اخذ خواهد شد. شرکت‌کنندگان برای ورود به مطالعه باید حائز شرایط ذیل باشند:   * معیارهای ورود: سن بین 40-65 سال، تشخیص تنگی بیش از 20% در یک رگ کرونر ناشی از پلاک آترواسکلروتیک از طریق تصویربرداری MDCT یا آنژیوگرافی تهاجمی، مصرف مرتب یک دارو از گروه استاتین‌ها طی 4 هفته پیش از مطالعه، تکمیل فرم رضایت آگاهانه * معیارهای عدم ورود: مصرف داروها یا مکمل‌هایی که روی سطح لیپید سرم و یا مارکرهای التهابی اثر می‌گذارد (به جز استاتین)، ابتلا به برخی بیماری‌های کبدی (سیروز، هپاتیت حاد یا اتوایمیون، کبد چرب الکلی/غیرالکلی)، GFR<60، BMI>40kg/m2، سابقۀ MI/سکتۀ مغزی/آریتمی خطرناک/نارسایی قلبی تشخیص‌داده‌شده، بارداری یا شیردهی، بیماری‌های ژنتیکی موثر بر سطح لیپید سرم * معیارهای خروج: عدم تمایل به ادامۀ مطالعه، عدم رعایت پروتکل مطالعه، فوت بیمار، ایجاد هر یک از موارد ذکرشده در "معیارهای عدم ورود"   [با در نظرگرفتن قدرت 80% و حجم نمونه؟ 80 بیمار مبتلا به پلاک آترواسکلروز -که تشخیص توسط CCTA به تایید رسیده است-.]  پس از تطابق شرکت‌کنندگان با شرایط فوق و پیش از تصادفی‌سازی، Run-in Period دو هفته‌ای به منظور بررسی صلاحیت شرکت‌کنندگان، تثبیت وضعیت تغذیه‌ای و دارویی آنها و حذف داروهای دارای تداخل با مطالعه اجرا خواهد شد.   1. **مداخله**   سپس افرادی که در Run-in Period حائز صلاحیت و همکاری برای اجرای مطالعه شناخته شدند، به صورت تصادفی با نسبت 1:1 در دو گروه مداخله و کنترل تقسیم خواهند شد. با استناد به کدهای 31گانه اخلاق در پژوهش و با توجه به اینکه درمان موثر و تاییدشده‌ای برای آترواسکلروز وجود دارد، نمی‌توان گروهی را از این درمان محروم کرد. بنابراین در طول مطالعه هر دو گروه درمان استاندارد (استاتین) را دریافت خواهند کرد و تفاوت گروه مداخله و کنترل در دریافت داروی دوم (ایمودین یا دارونما) است.  طول مدت مطالعه 9 ماه خواهد بود و در صورتی که اثربخشی دارو طی 9 ماه مشاهده نشده باشد، مطالعه به مدت 9 ماه دیگر (مجموعا 18 ماه) تمدید خواهد شد. در طول این مدت، گروه مداخله روزانه ایمودین (دوزی که بیشترین اثربخشی را در فاز حیوانی داشته است) و گروه کنترل نیز پلاسبو که از نظر رنگ، اندازه، شکل، وزن و بو مشابه با ایمودین خواهد بود، دریافت خواهد کرد.   1. **سنجش**   **الف) تصویربرداری**  در ابتدای مطالعه و پیش از اعمال مداخله، بیماران تحت تصویربرداری MDCT آنژیوگرافی کرونر (به عنوان Baseline) قرار خواهند گرفت و سپس این تصویربرداری در ماه 9 و 18 مطالعه (در صورت تمدید) نیز تکرار خواهد شد و بر اساس نتیجۀ تصویربرداری (گزارش کمی به صورت واحد هانسفیلد)، وضعیت پلاک آترواسکلروتیک عروق کرونر (از نظر حجم و ترکیب) بررسی خواهد شد.  **ب) اطلاعات دموگرافیک و معاینۀ فیزیکی**  همچنین در ابتدای مطالعه، ماه 9 و 18 (در صورت تمدید مطالعه)، علاوه بر تصویربرداری، معاینۀ فیزیکی شامل اندازه‌گیری فشار خون، قد و وزن (BMI) انجام شده و  **ج) سنجش سرمی**  همزمان با ویزیت حضوری شرکت‌کنندگان (ابتدای ماطلعه، ماه 9 و 18) نمونۀ خون کافی به منظور آزمایشات مرتبط خون شامل فعالیت آنزیم UGT1A1، سطح بیلی‌روبین (توتال، مستقیم و غیرمستقیم)، سطح سرمی انواع لیپیدها، مارکرهای التهابی شامل CRP و ESR از بیماران دریافت خواهد شد.  **د) پیگیری غیرحضوری**  علاوه بر این بررسی‌ها که در ویزیت حضوری صورت خواهد گرفت، ماهیانه نیز به صورت تلفنی بیماران از نظر پایبندی به پروتکل مطالعه و مصرف دارو/دارونما بررسی خواهند شد. همچنین در انتهای مطالعه نیز قوطی داروی شرکت‌کنندگان از ایشان دریافت خواهد شد تا میزان همکاری بیماران در اجرای طرح بررسی شود.  عوارض جانبی مداخله نیز در طول مطالعه به طور مداوم مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت و در صورت رخ‌دادن عارضۀ جدی، بلافاصله مطالعه قطع خواهد شد. به طور کلی تمامی مراحل مطالعه بر مبنای معاهدۀ هلسینکی انجام خواهد شد.   1. **آنالیز آماری**   داده‌های آمار توصیفی در قالب Mean ± SD (انحراف معیار ± میانگین) گزارش خواهد شد. همچنین در آمار تحلیلی، به منظور مقایسۀ میان میانگین‌های دو گروه از آزمون t مستقل و جهت مقایسۀ واریانس چند گروه از آزمون ANOVA (به همراه Post-hoc) استفاده خواهد شد. در صورتی که داده‌ها از توزیع نرمال پیروی نکنند (پیش‌فرض آزمون‌های آماری پارامتریک برقرار نباشد)، از آزمون‌های معادل غیرپارامتریک یعنی Mann-Whitney U test به جای آزمون t مستقل و Kruskal-Wallis test به جای ANOVA استفاده خواهد شد. | | | |
| **متغیرهای مطالعه** | | | |
| |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | |  | **رديف** | **متغیرها** | مستقل | وابسته | **كمي** | | **كيفي** | | | **نحوه اندازه گیری** | |  | پيوسته | گسسته | اسمي | رتبه‌اي | | |  | **1** | غذای مصرفی gram/day |  | \* | \* |  |  | |  | با استفاده از ترازو | | سیر پیشروی | **2** | سایز ضایعه |  | \* | \* |  |  | |  | CT یا PET | | **3** | محل ضایعه |  | \* |  |  | \* | |  | CT یا PET | | **4** | حاشیه و مرز ضایعه |  | \* | \* |  |  | |  | CT یا PET | | **5** | کلسیفیکاسیون |  | \* | \* |  |  | |  | CT یا PET | | هسته لیپیدی | **6** | مساحت هسته لیپیدی |  | \* | \* |  |  | |  | رنگ­آمیزی oil red O و میکروسکوپ نوری | | **7** | ضخامت هسته لیپیدی در لایه­های­مختلف عروق |  | \* | \* |  |  | |  | رنگ­آمیزی oil red O و میکروسکوپ نوری | | کلاهک فیبروزی | **8** | ضخامت کلاهک فیبروزی |  | \* | \* |  |  | |  | توموگرافی انسجام نوری | | **9** | محتوی کلاژن کلاهک فیبروزی |  | \* | \* |  |  | |  | رنگ­آمیزی picrosirus red و میکروسکوپ نوری | | **10** | ریمدلینگ دیواره |  | \* | \* |  |  | |  | توموگرافی انسجام نوری | | **11** | خونریزی درون پلاک |  | \* | \* |  |  | |  | MRI | | **12** | میکروکلسیفیکاسیون پلاک |  | \* | \* |  |  | |  | CT اسکن یا رنگ­­آمیزی با von­ kossa و میکروسکوپ نوری | |  | نئو واسکولاسیون |  | \* | \* |  |  | |  | CT اسکن | | پروفایل لیپیدی | **13** | لیپوپروتئین کم چگال (LDL) |  | \* | \* |  |  | |  | اسپکتروفتومتری | | **14** | لیپوپروتئین پرچگال (HDL) |  | \* | \* |  |  | |  | اسپکتروفتومتری | | **15** | LDL اکسید شده |  | \* | \* |  |  | |  | اسپکتروفتومتری | | التهاب> | **16** | CRP با حساسیت بالا |  | \* | \* |  |  | |  | hs CRP Biogene Kit | |  | **17** | فوم سل­ها |  | \* | \* |  |  | |  | رنگ­آمیزی oil red O و میکروسکوپ نوری | | Mac1 | **18** | CD38 |  | \* | \* |  |  | |  | فلوسایتومتری | |  | Fpr2 |  | \* | \* |  |  | |  | فلوسایتومتری | |  | Gpr18 |  | \* | \* |  |  | |  | فلوسایتومتری | | Mac2 | **19** | CD163 |  | \* | \* |  |  | |  | فلوسایتومتری | |  | Egr2 |  | \* | \* |  |  | |  | فلوسایتومتری | |  | C-MYC |  | \* | \* |  |  | |  | فلوسایتومتری | | adhesion | **20** | VCAM |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات | | **21** | اینتگرین |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات | | سایتوکاین | **22** | اینترلوکین 1- بتا |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات و الایزا | | **23** | اینترلوکین 6 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات و الایزا | | **24** | اینترلوکین 10 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات و الایزا | | **25** | TGF-β |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات و الایزا | | **26** | اینترلوکین 4 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات و الایزا | | **27** | TNF |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات و الایزا | | **28** | اینترفرون گاما |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات و الایزا | | **29** | اینترلوکین 17 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات و الایزا | | TH1 | **30** | فاکتور رونویسی T-bet |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | |  | CD4 |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | |  | CXCR3 |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | | TH2 | **31** | CCR4 |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | |  | GATA-3 |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | |  | IL-17 l |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | | Treg | **32** | فاکتور رونویسی Foxp3 |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | |  | CCR4 |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | |  | CCR6’ |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | | Th17 | **33** | CD128 |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | | مهاجرت SMC | **34** | α­-SMA |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | |  | SM22 |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | |  | Calopin |  | \* | \* |  |  | |  | ایمونوهیستوشیمی | | نکروز | **35** | HMGB1 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | |  | FK-18 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | | آپوپتوز | **36** | کاسپاز 5، 8، 18 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | |  | p-69 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | |  | آنکسین V |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | | اتوفاژی |  | بکلین 1 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | |  | LH-3 |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | | فروپتوز |  | رسپتور ترانسفرین |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | |  | PTGS2 mRNA |  | \* | \* |  |  | |  | نورثرن بلات | |  | 4-HNE |  | \* | \* |  |  | |  | وسترن بلات | | رنگ­آمیزی |  | پلاک |  | \* | \* |  |  | |  | H/E | |  | هسته لیپیدی و فوم­سل های پلاک |  | \* | \* |  |  | |  | Oil red O | |  | گونه های آزاد اکسیژن |  | \* | \* |  |  | |  | DHE | |  | کلسیم درون پلاک |  | \* | \* |  |  | |  | Von kossa | |  | کلاژن کلاهک فیبروزی |  | \* | \* |  |  | |  | Picrosirius Red, Masson trichrome | |  |  | دوز بیلی­روبین(درصورت تعیین دوز) | \* |  | \* |  |  | |  |  | | | | |
| **نام متغیر** | **نقش** (مستقل یا وابسته) | **نوع** (کیفی اسمی، کیفی رتبه­ای، کمی) | **واحد اندازه گیری** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
| **محدودیت­ها** | | | |
| **مهمترین موانع قابل پش­بینی بر سر راه اجرای مطالعه کدامند و آیا راهی برای برخورد با آنها در نظر گرفته شده است؟**  محدودیت مطالعه: اثر Hormetic و عدم تعیین دوز دقیق و اینکه به ازای مصرف چه دوزی از دارو، چه میزان بیلی‌روبین بالا می‌رود  نداشتن Reference Range برای گیاه دارویی و عدم امکان استفاده از 3 گروه متفاوت دوز دارویی  نداشتن مرجع برای سطح بیلی‌روبین  موش و خرگوش  LDLR و ApoE  زیست‌فراهمی (Bioavailability) | | | |
| **منابع** | | | |
| **حداکثر 50 منبع و طبق الگوی ونکوور** | | | |

**ج) ملاحظات اخلاقی**

|  |
| --- |
| **مطالعات حیوانی** |
| **اگر این مطالعه نیازمند استفاده از حیوانات آزمایشگاهی است، در بخش روش اجرای پروپوزال، گونه، تعداد گروهها و تعداد مورد نیاز در هر گروه و نحوه تهیه و انتقال، محل و شرایط نگهداری و تغذیه، وضعیتهای قابل قبول و غیر قابل قبول ورود به مطالعه، شرح کامل اقداماتی که در هر گروه انجام می شود شامل دوزاژ دقیق و راه تجویز داروها و انجام پروسیجرها و اقدامات متعاقب (نظیر القای وضعیت بیماری، جراحی و بیهوشی و بیدردی و امثال آن) را ذکر کنید. شاخصها و روشهای ارزیابی پژوهشی و ارزیابی های متناوب جهت پایش درد و رنج بیش از حد و (ملاکهای خاتمه دادن پیش از موعد پژوهش در آن صورت) ، و نحوه قربانی کردن نهایی و مرگ آرام را دقیق توضیح دهید.**  **در این جا (ملاحظات اخلاقی) ذکر فرمایید چه ملاحظات کلی را برای رعایت ایمنی و حقوق آنان در نظر گرفته اید نظیر استفاده از گونه های ساده تر ، رعایت شرایط استاندارد نگهداری، عدم استفاده از حیوان دچار ...، داشتن برگه های ارزیابی یک یا چند روز یکبار و ضمیمه کردن آن، استفاده از روشهای بیدردی ، استفاده از روش .. جهت مرگ آرام و .... در صورتی که امکان نگهداری حیوان یا ذخیره سازی بافتهای حیوان و استفاده در مطالعات دیگر وجود دارد ذکر فرمایید. این جمله را هم پر رنگ کنید : پژوهش با رعایت آیین نامه های اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی کمیته ملی اخلاق در پژوهشهای زیست پزشکی انجام می شود.**  **( این آیین نامه ها را در سایت مربوطه به این آدرس مطالعه فرمایید.**  **)https://ethics.research.ac.ir/AnimalLabs.php**  ابتدا از ایمنی مداخله اطمینان حاصل می­کنیم و دوز سمیت دارو را از مطالعات قبلی بدست می­آوریم. به منظور کاهش تعداد حیوانات استفاده شده در مطالعه به جای کشتن موش ها در هر مرحله از روش های جایگزین مثل تست­های سرمی و تصویربرداری برای بررسی روند آترواسکلروز استفاده خواهیم کرد. برای کاهش استرس حیوان به هنگام انجام مداخله، مداخله را به صورت خوراکی خواهیم داد. محیط زندگی حیوانات را به گونه­ای ایجاد خواهیم کرد که حیوان کمترین استرس و فشار را در حین مطالعه متحمل شود. ( درصورت محدودیت کلمات میتونیم این رو بنویسیم : حین کار با حیوانات آزمایشگاهی، اصول اخلاقی در مورد آن­ها به طور کامل رعایت خواهد شد.) |
| **آزمودنی­های انسانی (human subjects)** |
| **اگر این مطالعه (مشاهده ای یا مداخله ای) بر روی انسان­ها انجام می­شود، اقدامات مشاهده ای یا مداخله ای و نحوه ارزیابیها را در بخش روش اجرای پروپوزال و در رضایتنامه دقیقا تشریح کنید و یک نمونه از فرم رضایت آگاهانه و کلیه پرسشنامه ها و فرمهای ارزیابی را پیوست پروپوزال نمایید.**  **لازم است ملاحظات در نظر گرفته شده برای رعایت حقوق و اختیار افراد مورد پژوهش (سابجکت یا آزمودنی یا شرکت کننده)، حفظ محرمانگی اطلاعات، حفاظت از آزمودنی‌ها و حفظ ایمنی آنها در طول مطالعه را در این جا تبیین کنید. بدین منظور موارد مرتبط در بخش آیین نامه های عمومی و اختصاصی سامانه کمیته ملی اخلاق ethics.research.ac.ir مطالعه شده و موارد ذیل پر رنگ شده و رعایت گردد:**   1. **پیش از شروع به اجرای پژوهش، تایید علمی، اخلاقی و مجوزهای لازم اخذ خواهد شد.** 2. **هدف از انجام پژوهش به مسئولین محیط اجرای پژوهش توضیح داده شده وهمکاری آن هارا جلب می شود.** 3. **جهت انجام مداخله از پزشک معالج بیمار کسب اجازه می شودو متخصص بالینی مرتبط با تعهد لازمه در طرح حضور خواهد داشت .** 4. **به کلیه افراد مناسب برای شرکت در کلیه گروههای مطالعه (یا تصمیم گیرنده جانشین ایشان در موارد عدم هوشیاری و عدم ظرفیت تصمیم گیری) اهداف ونحوه کار را توضیح داده و رضایت نامه کتبی از آنان کسب خواهد شد.** 5. **به ایشان اطمینان داده می شود که در صورت تمایل نتایج پژوهش در اختیار آنان قرار خواهد گرفت.** 6. **به ایشان اطمینان داده می شود که برای شرکت یا عدم شرکت خود یا فرزند یا بیمارشان در پژوهش آزاد خواهند بود و در صورت عدم شرکت و همکاری، روند آموزش، درمان یا مراقبتهای بیمار تحت تاثیر قرار نخواهد گرفت و به صورت معمول پی گیری خواهد شد.** 7. **به ایشان اطمینان داده می شود در هر مرحله از پژوهش می توانند تصمیم به خروج از پژوهش بگیرند و این امر تبعات سوئی برای بیمار نخواهد داشت.** 8. **به ایشان اطمینان داده می شود که پژوهشگران متعهد به حفظ رازداری و محرمانگی اطلاعات شرکت کنندگان هستند و نتایج تنها به صورت کلی ، گروهی و بدون نام منتشر خواهد شد.** 9. **به ایشان اطمینان داده می شود انجام پژوهش هیچ گونه هزینه اضافه بر خدمات معمول تشخیصی و درمانی برای بیمار وخانواده وی نخواهد داشت.** 10. **پس از اعلام عوارض احتمالی اقدامات مورد مطالعه، به شرکت کنندگان ( و سرپرست ایشان) در مطالعه اطمینان داده خواهد شد که در صورت بروز هرگونه آسیب بواسطه انجام پژوهش، جبران/درمان شده و هزینه های مربوطه توسط پژوهشگر تامین خواهد شد.** 11. **در اقدامات مداخله ای غیر دارویی (آموزشی، روانشناسی، تربیتی، برخی روشهای طب مکمل، ...) ، گروههای شاهد پس از پایان مطالعه، مداخله موثر را دریافت میدارند.**   ابتدا از دوز اثربخش و سمیت دارو اطمینان حاصل میکنیم. به تک تک افراد مورد مطالعه درباره هدف مطالعه، مدت زمان احتمالی مداخله، خطرات احتمالی مداخله، شیوه کورسازی و اثرات خروج زودهنگام از مطالعه توضیح خواهیم داد و در­صورت رضایت آگاهانه فرد به صورت کتبی، مداخله را شروع خواهیم کرد. افراد در هر مرحله­ از پژوهش در صورت عدم تمایل به همکاری، می­تواند بدون مشکل از پژوهش خارج شوند بدون اینکه تداخلی در روند درمانی پیشین خود متحمل شوند. انتخاب و گروهبندی افراد از بین نمونه کاملا تصادفی خواهد بود و متاثر از شغل، جایگاه اجتماعی و وضعیت مالی فرد نخواهد بود. مداخله توسط افراد متخصص و مجرب انجام خواهد گرفت و تمامی آزمودنی­ها توسط پزشک متخصص در تمام طول مطالعه مورد پایش قرار خواهند گرفت. اگر در حین اجرای مداخله مشخص شود که خطرات شرکت در این پژوهش برای شرکت­‌کنندگان بیشتر از فواید آن است، این پژوهش بلافاصله متوقف خواهد شد. درصورت ایجاد مشکل برای هر یک از آزمودنی ها بلافاصله مداخله را برای آن شخص متوقف خواهیم کرد و از طریق بیمه پژوهشی به جبران خسارات وارده خواهیم پرداخت. در حین و پس از پژوهش، اصل رازداری و حریم شخصی افراد رعایت خواهد شد و اطلاعات شخصی افراد مورد مطالعه تنها در این پژوهش مورد استفاده قرار خواهد گرفت. در صورت لزوم انتشار اطلاعات شخصی افراد، این کار با رضایت آن­ها انجام خواهد شد. |
| **بافت­ها یا نمونه­های زیستی انسانی** |
| **اگر در این مطالعه، از بافت یا نمونه­های زیستی مشتق از انسان نظیر خون و مشتقات آن ، ادرار، جفت، بافتهای تومورال، دندان، ... استفاده می­شود، ملاحظات اخلاقی اخذ (و آرشیوسازی احتمالی) نمونه های مربوطه را در این جا و نوع و تعداد نمونه­ها و روش دقیق اخذ (و ذخیره) و شرایط و محل آن را در بخش روش اجرای پروپوزال و در رضایتنامه بیان کنید.**  **نمونه هایی که از قبل در یک آرشیو موجود است به شرط وجود رضایتی که با رعایت ملاحظات خاص اخلاقی ذخیره سازی و استفاده های پژوهشی بعدی از صاحبان نمونه ها اخذ شده است و به صورت بدون هویت، قابل استفاده است و در صورت نیاز به هویت صاحب نمونه، باید رضایت مجددی اخذ گردد. نمونه های دور ریز، باید به صورت بدون هویت اخذ و استفاده شود و به صورت طبیعی یا بدلیل اندیکاسیون طبی خود از بدن افراد خارج شده باشد.**  **موارد مرتبط در بخش آیین نامه های سامانه کمیته ملی اخلاق ethics.research.ac.ir مطالعه شود.** |
| **مطالعات آزمایشگاهی** |
| **این جملات پر رنگ شده و رعایت شود:**  **شرایط احتمالی مراکز در اختیار گزارنده ی مواد یا دستگاههای خاص ، رده های سلولی و امثال آن و استانداردهای کار با و امحا مواد بیولوژیک و آزمایشگاهی رعایت خواهد شد.** |
| **مطالعات آرشیوی یا بر روی داده ها** |
| **موارد مرتبط در بخش آیین نامه های سامانه کمیته ملی اخلاق مطالعه شده و این موارد (بند یک و 5 به فراخور طرح) پر رنگ شده و عمل گردد:**   1. **در صورتی که داده ها در بخش خدمات اموزشی، درمانی ، بهداشتی و امثال آن جمع آوری شده ، پژوهش با هماهنگی کتبی با مسئول آرشیو مربوطه صورت خواهد گرفت./ اگر آرشیو یا داده ها طی اجرای یک پژوهش جمع آوری شده است، هماهنگی کتبی با مجری اصلی آن پژوهش به نمایندگی از تیم پژوهش و دانشگاه (یا سایر حامیان مالی پژوهش)، انجام می شود. / استفاده از داده های طبقه بندی شده (محرمانه) سازمانی، نیازمند اخذ مجوز اختصاصی از کمیته اخلاق است.** 2. **فرد/افراد دسترسی یابنده به آرشیو در مستند فوق مشخص شده و متعهد به رازداری و حفظ محرمانگی اطلاعات خواهد/خواهند بود.** 3. **مدت زمان دسترسی به آرشیو در مستند فوق مشخص خواهد شد.** 4. **اطلاعات به صورت کاملا بدون نام و هویت (de-identified) استخراج و ثبت خواهد شد. (در صورت نیاز به اخذ هویت مجوز کمیته اخلاق لازم است).** 5. **در صورت استفاده از آرشیو نمونه های بیولوژیک، ملاحظات ایمنی مربوطه برای پژوهشگران و سایر افرادی که با نمونه ها تماس خواهند یافت و ملاحظات اخلاقی در خصوص رضایت صاحبان نمونه ها مد نظر قرار خواهد گرفت.**   **موارد مرتبط در بخش آیین نامه های سامانه کمیته ملی اخلاق ethics.research.ac.ir مطالعه شود.** |
| **ملاحظات اخلاقی انتشار نتایج** |
| **موارد مرتبط در بخش آیین نامه های سامانه کمیته ملی اخلاق ethics.research.ac.ir مطالعه شده و این جملات به همین صورت باقی بماند و رعایت شود:**  **ضمن رعایت کلیه اصول اساسی اخلاق در انتشار آثار پژوهشی نظیر عدم داده سازی یا تحریف یا پوشاندن برخی نتایج، استفاده از منابع با استناد صحیح، عدم سرقت ادبی، عدم انتشار دو یا چندگانه یا تکه تکه نتایج، رعایت شرایط نویسندگی، عدم استفاده از نشریات نامعتبر و راههای غیر قانونی تهیه مقاله و انتشار آن ، اجتناب از انتشار نتایج حاصل از پژوهش‌ از طریق رسانه‌های عمومی (شامل رادیو، تلویزیون، جراید و شبکه های مجازی) پیش از آنکه در نشریات دارای مرور همتا منتشر شده باشند و غیره، مجری اصلی متعهد میگردد که کلیه تیم پژوهش را کتبا در جریان حقوق و مسئولیت مجری اصلی طرح نسبت به هدایت و اعمال تغییرات لازم در کلیه مراحل تنظیم پروپوزال، اجرای طرح، تهیه و تصویب گزارش نهایی و تالیف مقاله منتج از طرح (شامل ترتیب اسامی همکاران و اضافه یا حذف نمودن نام افراد) بر اساس و در چارچوب اصول علمی و اخلاقی مصوب کمیته ملی اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی و این که این امر صرفاً جهت تسهیل فرایندهای اجرایی بوده و ناقض مسئولیت سایر همکاران طرح در رابطه با رعایت اصول یاد شده نمی باشد، قرار داده و توافقات لازمه را صورت داده است.** |
| **تعارض منافع** |
| **در صورتی که هر گونه هم سویی/ تداخل /تعارض منافعی (یعنی شرایطی که بتواند موجب شود تصمیم گیری حرفه ای افراد تحت تاثیر منفعت ثانویه ایشان قرار گیرد)، مابین هر کدام از افراد تیم پژوهش یا نزدیکان ایشان و حامیان مالی طرح و مجریان بخشهای خدمات طرح و امثال آن وجود دارد (نظیر عضویت یکی از افراد یا نزدیکان تیم پزوهش در شرکت حامی مالی و جز آن) در این جا تبیین شود و یا تصریح شود هیچ گونه تعارض منافعی در این طرح وجود ندارد.در بخش جداول هزینه ای نیز کلیه تعاملات مالی طرح باید کاملا مشخص شده باشد.** |

**د) جدول زمان­بندی**

**جدول زماني مراحل اجراي طرح حیوانی**

مدت زمان لازم برای انجام کل طرح: 11ماه

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| رديف | **شرح فعاليت ‌های اجرايي طرح** | **مدت**  **(ماه)** | **زمان اجرا (به ماه)**  (از کاراکتر \* برای پر کردن خانه‌ها استفاده شود) | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1 | تایید پروپزال پژوهشی و دریافت کد اخلاق | 1 | \* |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 | هماهنگی با مرکز آزمایشگاهی جهت در اختیار گرفتن آزمایشگاه و امکانات حین مطالعه، هماهنگی با متخصص پاتولوژی جهت بررسی و گزارش نمونه‌ها و هماهنگی با مهندس داده جهت تحلیل آماری نتایج | 2 |  | \* | \* |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3 | تهیه مدل‌های موشی و گذر از دوره رشد موش‌ها و تایید مدل آترواسکلروز ایجاد شده در روز 60 سن موش‌ها | 3 |  | \* | \* | \* |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4 | نمونه‌گیری اولیه و سپس انجام مداخلات و نمونه‌گیری‌های دوره‌ای و ثبت داده‌ها | 2 |  |  |  |  | \* | \* |  |  |  |  |  |  |
| 5 | تهیه، رنگ‌آمیزی و استخراج داده از نمونه‌های بافتی توسط پاتولوژیست | 2 |  |  |  |  |  |  | \* | \* |  |  |  |  |
| 6 | تحلیل داده‌های به دست آمده از بخش 4و5 توسط مهندس داده | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  | \* | \* |  |  |
| 7 | جمع‌بندی نتایج به دست آمده و نگارش گزارش نهایی پروژه | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  | \* | \* |  |
|  | زمان تخمینی مورد نیاز برای کل پروژه | 11 | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* |  |

**جدول زماني مراحل اجراي طرح انسانی (در صورت تایید کارایی دارو در طرح حیوانی)**

مدت زمان لازم برای انجام کل طرح: 10 ماه

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| رديف | **شرح فعاليت ‌های اجرايي طرح** | **مدت**  **(ماه)** | **زمان اجرا (به ماه)**  (از کاراکتر \* برای پر کردن خانه‌ها استفاده شود) | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1 | انتخاب بیماران برای ورود به مطالعه و انجام تست­های کلینیکی اولیه | 2 | \* | \* |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 | نمونه­گیری از بیماران | 1 |  |  | \* |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3 | شروع مداخله و نمونه‌گیری دوره‌ای از بیماران | 3 |  |  |  | \* | \* | \* |  |  |  |  |  |  |
| 5 | استخراج و ثبت داده‌های حاصل از نمونه‌های سرمی و مدفوعی بیماران | 3 |  |  |  |  | \* | \* | \* |  |  |  |  |  |
|  | تحلیل داده‌های به دست آمده از بخش 4و5 توسط مهندس داده | 2 |  |  |  |  |  |  |  | \* | \* |  |  |  |
|  | جمع‌بندی نتایج به دست آمده و نگارش گزارش نهایی پروژه | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  | \* | \* |  |  |
| 6 | زمان تخمینی مورد نیاز برای کل پروژه | 10 | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* | \* |  |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **عنوان فعالیت** | **مدت زمان اجرا (ماه)** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** | **13** | **14** | **15** | **16** | **17** | **18** | **19** | **20** | **21** | **22** | **23** | **24** | **25** | **26** | **27** | **28** | **29** | **30** |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**کل زمان اجرای مطالعه (ماه): تاریخ تقریبی شروع مطالعه:**