بسم الله الرحمن الرحیم
الحمد لله رب العالمین الرحمن الرحیم مالک یوم الدین
اهدنا الصراط المستقیم صراط الذین انعمت علیهم غیر المغضوب علیهم ولا الضالین

مدیریت تحصیلات تکمیلی

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد

زیست شناسی – ژنتیک

بررسی همبستگی پلی مورفیسم در ژن *IL2Rα (CD25)* با بیماران مالتیپل اسکلروزیس جمعیت شرق ایران

استاد راهنما

دکتر عباس نیک روش

اساتید مشاور

خانم ناهید رخشی

دکتر حمیدرضا میری

بابک عباسی نتاج

خرداد ۱۳۹۲

تقدیم به

دستان پدرم

نگرانی های مادرم

کمک های بی دریغ همسرم

برخود لازم می‌دانم از راهنمایی‌های جناب آقای دکتر عباس نیک‌روش و همچنین زحمات سرکارخانم مهندس ناهید رخشی و همدلی‌های جناب آقای دکتر حمیدرضا میری صـمیمانه تشکر و قدردانی کنم.

چکیده

مالتیپل اسکلروزیس[1] یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی[2] است که یکی از دلایل ناتوانی در بالغین جوان می باشد. بنابر شواهد محکم موجود MS یک بیماری خودایمنی است که به طور مستقیم بر علیه میلین یا الیگودندروسیت ها در CNS عمل می کند. علی رغم تلاش های صورت گرفته برای پی بردن به دلایل MS هنوز علت واضحی برای این بیماری دردست نیست. شیوع ام اس در نواحی جغرافیایی و قومیت های مختلف بسیار متفاوت است و این بیماری در ایران نرخ پائینی دارد. متاسفانه در سال های اخیر نرخ ام اس در ایران رو به افزایش است. بعضی از مطالعات در شاخه ژنتیک ام اس پیشنهاد می‌کنند که ژن های زیادی در حساسیت پذیری به این بیماری دخیل‌اند . یکی از این ژن ها *IL2Rα* است که در جایگاه کروموزومی 10p15 قرار گرفته و زنجیره آلفا گیرنده اینترلوکین ۲ را کد می‌کند. مسیر *IL2Rα* یک نقش حیاتی در تنظیم پاسخ ایمنی بازی می‌کند. sIL2Rα می تواند به IL2 اتصال یابد و عملکرد آن را بلوکه کند. در این مطالعه با توجه به شرایط اقلیمی شرق ایران و اینکه جمعیت این منطقه پشتوانه ژنتیکی خاصی دارند، همبستگی پلی‌مورفیسم در ژن (*CD25*) *IL2Rα* با بیماران مالتیپل‌اسکلروزیس را در این جمعیت بررسی کردیم. ابتدا با انجام مطالعه اپیدمیولوژیک افرادی که توسط پزشک متخصص بیمار تشخیص داده شده‌اند برای مطالعه انتخاب شدند. با کسب رضایت از افراد بیمار و کنترل ۵ میلی لیتر خون از آنها گرفته و در لوله های حاوی EDTA ریخته شد. در ادامه استخراج DNA از نمونه ها انجام گرفت و با استفاده از تکنیک PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند.

در این مطالعه نتایج معنی دار مستحکمی بین اسنیپ rs2104286 قرار گرفته در اینترون ۱ ژن *IL2Rα* و بیماران ام اس بدست آمد.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، *IL2Rα*، *CD25*، PCR-RFLP، مالتیپل اسکلروزیس

1. Multiple sclerosis (MS)

2. Central nervous system (CNS)

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات تحقیق ۱

(۱-۱) مالتیپل اسکلروزیس(MS) ۲

(۱-۲) نمود های بالینی و عوارض بیماری MS ۲

(۱-۲-۱) علائم ذهنی ۳

(۱-۳) روش های تشخیصی در MS ۳

(۱-۳-۱) نشانه های قبل از تشخیص MS ۴

(۱-۳-۲) نشانه های رادیولوژیکی شناخته نشده ۴

(۱-۴) انواع MS ۴

(۱-۴-۱) عود کننده – بهبودپذیر(RR-MS) ۵

(۱-۴-۲) پیشرونده اولیه(PP-MS) ۵

(۱-۴-۳) پیشرونده ثانویه (SP-MS) ۵

(۱-۴-۴) پیشرونده - عودکننده (PR-MS) ۶

(۱-۵)کاربرد MRI در MS ۶

(۱-۶) بیماریزایی مالتیپل اسکلروزیس ۷

(۱-۶-۱) سلول های T کمک کننده ۸

(۱-۶-۲) سلول های $TCD8^{+}$ ۹

(۱-۶-۳)سلول های دندریتی ۱۰

(۱-۶-۴) سلول های B در بیماریزایی MS مهم هستند ۱۰

(۱-۶-۵) مهاجرت لکوسیت ها به درون بخش‌های CNS ۱۱

(۱-۷) کموکاین ها ۱۲

(۱-۸) التهاب و خود ایمنی ۱۲

(۱-۹) ماکروفاژها و میکروگلیاها ۱۴

(۱-۱۰) آسیب شناسی نورونی ۱۴

(۱-۱۰-۱) شروع بازسازی میلین ۱۵

(۱-۱۱) ریسک فاکتورهای ژنتیکی ۱۶

(۱-۱۲) وابستگی های ژنتیکی ۱۶

(۱-۱۳) شواهدی برای یک جزء ژنتیکی ۱۷

(۱-۱۴) ویژگی ایمنولوژی MS ۱۸

(۱-۱۴-۱) ایمنی هومورال در MS ۱۹

(۱-۱۴-۲) سلول های خاطره ۱۹

(۱-۱۵) اپیدمیولوژی MS ۱۹

(۱-۱۵-۱) شیوع MS در ایران و جهان ۲۰
(۱-۱۶) خاستگاه نژادی ۲۱
(۱-۱۶-۱) اثر منشاء والد ۲۱
(۱-۱۶-۲)جنسیت در MS ۲۱
(۱-۱۷) ریسک فاکتورهای زیست محیطی ۲۲
(۱-۱۸) برهمکنش فاکتورها ۲۲
(۱-۱۹) پلی‌مورفیسم ۲۳
(۱-۱۹-۱) انواع SNP ۲۴
(۱-۱۹-۲) اهمیت SNP ۲۴
(۱-۲۰) مطالعات همبستگی ۲۵
(۱-۲۱) سایتوکاین ها ۲۵
(۱-۲۱-۱) ویژگی عمومی سایتوکاین ها ۲۶
(۱-۲۱-۲) سایتوکاین ها و MS ۲۷
(۱-۲۲) اینترلوکین ۲ ۲۷
(۱-۲۲-۱) جایگاه کروموزومی IL2 ۲۸
(۱-۲۳) ژن گیرنده اینترلوکین ۲ ۲۸
(۱-۲۳-۱) بیان ژن *IL2Rα* ۳۰
(۱-۲۳-۲) عملکرد *IL2Rα* ۳۱
(۱-۲۳-۳) مکانیزم اثرگذاری برهمکنش IL2/IL2Rα روی بیماریزایی MS ۳۲
(۱-۲۳-۴) ویژگی آنتاگونیستی *IL2Rα* ۳۳
(۱-۲۴) پلی مورفیسم rs2104286 ۳۴
(۱-۲۵) اهداف ۳۴

فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده ۳۵
(۲-۱) مطالعات مالتیپل اسکلروزیس ۳۶
(۲-۲) مطالعات پراکندگی ژنتیکی ریسک های عود کننده ۳۷
(۲-۳) تحقیقات ژنتیک مولکولی در MS ۳۸
(۲-۴) مطالعات ویروس اپشتین- بار (EBV) ۳۸
(۲-۵) تعیین ژنوتیپ ژن های کاندیدا برای MS ۳۹
(۲-۶) مطالعات پلی مورفیسم ۴۰

فصل سوم: مواد وروش ها ۴۵
(۳-۱) بافرها و محلول ها ۴۶

(۳-۱-۱) ساخت محلول EDTA (0.5M,PH= 8) ۴۶
(۳-۱-۲) ساخت بافر A ۴۶
(۳-۱-۳) ساخت محلول شماره یک ۴۷
(۳-۱-۴) ساخت محلول شماره دو ۴۷
(۳-۱-۵) بافر الکتروفورز TAE(50X) در حجم ۱ لیتر ۴۸
(۳-۱-۶) محلول رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید ۴۹
(۳-۲) آنزیم ها ۴۹
(۳-۳) سایر مواد ۴۹
(۳-۴) وسایل ۵۰
(۳-۵) روش ها ۵۰
(۳-۵-۱) جمع آوری نمونه های خون ۵۰
(۳-۵-۲) استخراج DNA از خون تام ۵۰
(۳-۵-۳) کیفیت و کمیت سنجی DNA استخراج شده ۵۱
(۳-۵-۴) اسپکتروفوتومتری ۵۲
(۳-۶) ژل آگارز ۵۲
(۳-۷) مواد و وسایل لازم جهت الکتروفورز ۵۲
(۳-۸) تعیین ژنوتیپ برای اسنیپ rs2104286 ۵۳
(۳-۹) پرایمرها ۵۴
(۳-۹-۱) طراحی پرایمر ۵۴
(۳-۹-۲) آماده سازی پرایمر ۵۴
(۳-۱۰) واکنش های PCR ۵۵
(۳-۱۰-۱) PCR شیب دمایی برای پرایمر ۵۵
(۳-۱۰-۲) مواد و وسایل لازم ۵۵
(۳-۱۱) هضم آنزیمی ۵۷
(۳-۱۱-۱) هضم آنزیمی قطعه حاصل از PCR ۵۸

فصل چهارم: نتایج و بحث ۵۹
(۴-۱) نمونه گیری و اطلاعات بیماران ۶۰
(۴-۲) نتایج استخراج DNA ژنومی ۶۲
(۴-۳)PCR شیب دمایی ۶۳
(۴-۴) هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم محدودالاثر ۶۴
(۴-۵) تایید نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ ۶۶
(۴-۶) آنالیز آماری ۶۷

(۱-۶-۴) نتایج فراوانی ژنوتیپی و آللی برای اسنیپ rs2104286 در دو گروه بیمار و سالم..... ۶۷
(۲-۶-۴) بررسی تعادل هاردی-واینبرگ برای اسنیپ مورد مطالعه در دو گروه بیمار و سالم..... ۶۷
(۷-۴) بحث..... ۷۸

منابع ۸۴

فهرست جدول ها

جدول ۱-۳: مواد لازم برای PCR..... ۵۶
جدول ۲-۳: برنامه PCR شیب دمایی برای تکثیر قطعه حاصل از پرایمر..... ۵۶
جدول ۳-۳ : هضم آنزیمی محصولات PCR توسط آنزیم محدودکننده *Nde* I..... ۵۸
جدول ۱-۴: شرایط هضم آنزیمی با آنزیم *Nde* I..... ۶۵
جدول ۲-۴: فراوانی(درصد) ژنوتیپی، آللی و نتایج بررسی تعادل هاردی واینبرگ در دو جمعیت بیمار و کنترل..... ۶۸
جدول ۳-۴: نتایج آنالیز آماری ژنوتیپی کای مربع برای دو گروه بیمار و کنترل..... ۷۱
جدول۴-۴: نتایج آنالیز آماری آللی کای مربع برای دو گروه بیمار و کنترل ۷۲
جدول ۵-۴: نتایج آنالیز آماری ژنوتیپی کای مربع جمعیت زنان در دو گروه بیمار و کنترل ۷۴
جدول ۶-۴: نتایج آنالیز آماری ژنوتیپی کای مربع برای مردان در دو گروه بیمار و کنترل ۷۵
جدول۷-۴: نتایج آنالیز آماری ژنوتیپی کای مربع برای دو گروه بیمار و کنترل در جمعیت خراسان..... ۷۶
جدول ۸-۴: نتایج آنالیز آماری ژنوتیپی کای مربع برای دو گروه بیمار و کنترل در جمعیت سیستان و بلوچستان..... ۷۷

فهرست شکل ها

شکل ۱- ۱: MS با توجه به نحوه بروز، سیر بالینی و پیشرفت بیماری ۶
شکل ۲-۱: پلاک های مغزی..... ۷
شکل ۳-۱: فعال سازی تهاجمی و توزیع کلونال سلول های $TCD8^{+}$ در MS و EAE..... ۹
شکل ۴-۱: سایتوکاین ها و کموکاین های ترشح شده از سلول B بعد از پاسخ ایمنی ۱۱
شکل ۵-۱: میزان شیوع و بروز MS در جهان ۲۰
شکل ۶-۱: برهمکنش فاکتورها در MS ۲۳
شکل ۷-۱: عملکرد IL2 ..... ۲۸
شکل ۸-۱: جایگاه کروموزومی IL2 ..... ۲۸
شکل ۹-۱: جایگاه کروموزومی *IL2Rα*..... ۲۹
شکل ۱۰-۱: پیام رسانی IL2 و *IL2Rα*..... ۳۰
شکل ۱-۲: ارتباط عفونت حاصل از EBV و MS..... ۳۹
شکل ۱-۳: : برنامه سیکل دمایی برای انجام واکنش PCR..... ۵۷
شکل ۱-۴: دو نمونه از DNA استخراج شده. نمونه ها روی ژل آگارز ۱ درصد لود شده اند..... ۶۲
شکل ۲-۴: نوارهای حاصل از PCR شیب دمایی ۶۳
شکل ۳-۴: محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی ۶۴
شکل ۴-۴: نمایی شماتیک از طراحی پرایمر و توالی تکثیری ۶۵
شکل ۵-۴:نتایج هضم آنزیمی با آنزیم *Nde* I برای اسنیپ rs2104286 روی ژل آگارز ۱/۳درصد..... ۶۶

فهرست نمودارها

نمودار۱-۴: فراوانی (درصد)زیرگروه های مختلف بیماران MS شرکت کننده در مطالعه ۶۱
نمودار ۲-۴: فراوانی (درصد) مردان و زنان شرکت کننده در مطالعه در دو گروه بیمار و کنترل..... ۶۱
نمودار ۳-۴: فراوانی ژنوتیپی(درصد) برای اسنیپ rs2104286 در دو گروه بیمار و سالم ۶۸
نمودار ۴-۴: فراوانی آللی (درصد) برای اسنیپ rs2104286 در دو گروه کنترل و بیمار..... ۶۹
نمودار ۵-۴: درصد فراوانی آلل A (خطر) برای اسنیپ rs2104286 در زیرگروه های مختلف بیماران..... ۷۰
نمودار۶-۴: درصد فراوانی آلل G (محافظ) برای اسنیپ rs2104286 در زیرگروه های مختلف بیماران..... ۷۰

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱: مالتیپل اسکلروزیس[1]

MS یک بیماری التهابی دمیلینه شدن سیستم عصبی مرکزی[2] با سبب شناسی ناشناخته است. این بیماری در دهه دوم یا سوم زندگی فرد بروز می‌یابد و می‌تواند فرد را برای تمام عمر درگیر کند. MS می‌تواند از یک بیماری خوش‌خیم تا یک بیماری به سرعت در حال تحول و ناتوان کننده متفاوت باشد. آزمایشات بالینی نشان داده‌اند که بافت میلین در CNS بیماران، مورد حمله قرار گرفته است. فاکتورهای زیادی از قبیل ژنتیک، محیط، عرض جغرافیایی و غیره می‌تواند در بیماریزایی MS موثر باشد. آسیب آکسونی، آسیب دندریتی و تخریب عصبی باعث تحلیل رفتن فعالیت عصبی در CNS بیماران مبتلا به MS می شوند (Oksenberg and Baranzini, 2010; Cavanillas *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012; Sawcer, 2008; Etemadifar *et al.*, 2010; Katsavos and Anagnostouli, 2013). علائم مشخص پاتولوژیک بیماری MS در سال ۱۸۶۸ ارائه و از سایر ناهنجاری های مزمن و شایع نورولوژیک افتراق داده شد. MS به عنوان یک بیماری پیچیده [3] در نظر گرفته می شود (Bashir and Whitaker, 1998; Bomprezzi *et al*, 2003; Stridh, *et al.*, 2010; Mandel *et al.*, 2004; Racke, 2009; Isik *et al.*, 2013).

۲-۱: نمود های بالینی و عوارض بیماری MS

علائم عصبی در بیماری MS به دلیل درگیری قسمت های عصبی داخلی متنوع می باشد. به خاطر ویژگی‌های بیماری و دخیل بودن قسمت‌های مختلف CNS و چگونگی اثر گذاری فاکتورهای موثر بر بروز بیماری، علائم مختلفی را، بخصوص در اولین حمله بیماری شاهد خواهیم بود، بنابراین

1. Multiple Sclerosis (MS)
2. Central nervous system (CNS)
3. Complex disease

هیچ گاه نمی‌توان فرم کلاسیکی از بیماری را در نظر گرفت. از طرفی در این بیماری قسمت‌هایی مثل عصب بینایی، ساقه مغز، مخچه و نخاع بیشتر درگیر می‌شوند و تظاهرات بالینی ناشی از این ضایعات می تواند کلید تشخیصی در برخورد با این بیماران باشد (Etemadifar *et al.*, 2010، Kaushal, *et al.*, 2010). در ۴۵٪ از بیماران، بیماری با یک علامت شروع می شود که می توان آن را به آسیب محل خاصی از CNS نسبت داد، و در ۵۵٪ بیماران شروع با چندین علامت بالینی پراکنده همراه می-باشد. در بعضی موارد شروع بیماری با یک علامت برجسته است و در بعضی موارد علائم به قدری خفیف هستند که ممکن است بیمار آن را نادیده بگیرد. در اکثر مطالعات رایج ترین علامت در شروع بیماری را ضعف و بی قوتی در اندام ها و یا علائم حسی ذکر کرده اند (حیدری، ۱۳۸۸؛ Racke, Laplaud *et al.*, 2004; Shokrgozar *et al.*, 2009).

۱-۲-۱: علائم ذهنی

پلاک هایی که در اثر دمیلینه شدن در بافت مغزی و آسیب نورون های قشر مغز بوجود می‌آیند می تواند باعث تحلیل رفتن قوای ذهنی گردد. فراموشی، اختلال در توجه و ناتوانی در حل مسائل مشکل و اختلال در قضاوت از دیگر علائمی هستند که در بیماران به چشم می‌خورد (حیدری ۱۳۸۸).

۱-۳: روش های تشخیصی در MS

با وجود پیشرفت هایی که از نظر آزمایشگاهی و رادیولوژی طی سال‌های اخیر در جهت تشخیص بیماری MS انجام شده است هنوز روش آزمایشگاهی یا نشانگر زیستی[1] ویژه‌ای که به تشخیص این بیماری کمک کند فراهم نیست. تشخیص MS امروزه بر اساس ترکیب یک سری شواهد متشکل از کلینیکی و پاراکلینیکی انجام می گیرد (Zuvicha *et al.*, 2009; Katsavos and Anagnostouli, 2013).

1. Biomarker

۱-۳-۱: نشانه های قبل از تشخیص MS

شمار قابل توجهی از افراد با علائم زود هنگام شناخته شده‌اند که می توان آن را به رویداد دمیلینه شدن ابتدایی نسبت داد. افرادی که بصورت ثانویه، علائم بیماری MS در آنها توسعه می‌یابد ممکن است در ابتدای امر خستگی و فرسودگی، افسردگی، و یا اختلالات روانشناختی را تجربه کنند. مطالعات اخیر نیز بر تغییرات رادیولوژی و ایمونولوژی حاصل از آسیب‌های MS تمرکز کرده‌اند (Racke, 2009; Etemadifar *et al.*, 2010; Ramagopalan *et al.*, 2010).

۱-۳-۲: نشانه های رادیولوژیکی شناخته نشده

بعضی از افراد با وجود ویژگی‌های بیماریزایی MS، هرگز وجود MS در زندگی آنها تشخیص داده نمی‌شود، ممکن است بیماری در این افراد فاقد علائم باشد و یا اینکه علائم به حدی شدید نباشد که امکانی برای تشخیص MS باشد. و با وجود اینکه اسکن MRI تأکید بر وجود MS دارد اما فرد هیچگونه علامت و نشانه ای از بیماری را نشان نمی‌دهد (Racke, 2009; Ramagopalan *et al.*, 2010; Kantarova *et al.*, 2012).

۱-۴: انواع MS

از مهمترین مشخصات بیماری MS متناسب بودن تظاهرات بالینی با سیر پیشرفت بیماری است بطوری که بیماری در طی یک سری حمله پیشرفت می‌کند و معمولا در هر حمله میزان بهبودی کمتر از حملات قبل است. فاصله بین اولین حمله تا ظهور علائم بسیار متفاوت است: در ۳۰٪ بیماران حدود یک سال در ۲۰٪ حدود دو سال، در ۲۰٪ دیگر حدود ۵ تا ۹ سال و در ۱۰٪ ممکن است تا ۳۰ سال طول بکشد. لذا MS با توجه به نحوه بروز سیر بالینی و پیشرفت بیماری به سه نوع تقسیم می شود (Farley, 2004; Racke, 2009; Kaushal, *et al.*, 2010). در شکل ۱-۱ MS با توجه به نحوه بروز، سیر بالینی و پیشرفت بیماری نشان داده شده است.

۱-۴-۱: عود کننده – بهبودپذیر[1] (RR-MS)

در اکثر موارد بیماری با این نوع آغاز می شود. علائم در طول دوره حمله بیماری بسته به ناحیه ای از CNS که آسیب دیده است، بصورت های مختلفی بروز می‌یابد. پس از گذشت مدت زمان چند هفته تا چند ماه علائم به طور نسبی یا کامل بهبود می‌یابند. در بین حملات، پیشرفت و بدتر شدن علائم عصبی دیده می شود. این شکل در ۸۰ تا ۹۰٪ بیمارن دیده می شود (Farley, 2004; Etemadifar *et al.*, 2010; Kaushal *et al.*, 2010).

۱-۴-۲: پیشرونده اولیه[2] (PP – MS)

پیشرفت تدریجی ناتوانی از زمان وقوع بیماری وجود دارد. در بعضی دوره ها علائم ثابت می‌مانند ولی عود حمله به واضحی دیده نمی شود. این شکل در کمتر از ۱۰ تا ۲۰٪ بیماران دیده می شود (Farley, 2004; Kaushal, *et al.*, 2010).

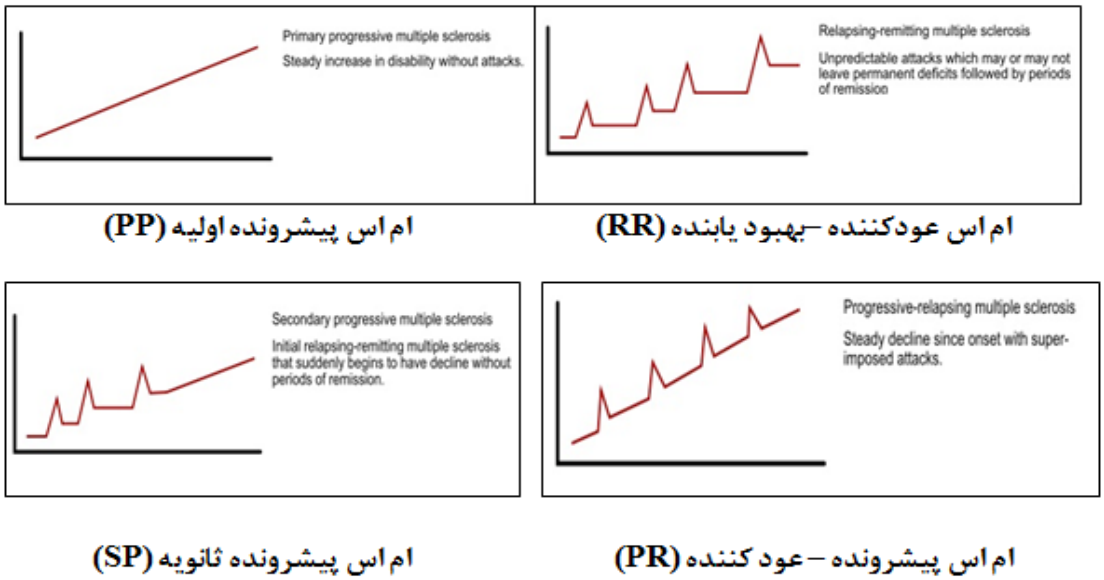
۱-۴-۳: پیشرونده ثانویه[3] (SP – MS)

در ابتدا بیماری شکل عود کننده – بهبود پذیر دارد و در ادامه سیر پیشرونده پیدا می‌کند. مرحله پیشرونده بیماری ممکن است در مدت کوتاهی پس از شروع بیماری آغاز گردد . یا تا سال‌ها بعد به تعویق بیافتد. در این بیماران حملات علائم عصبی تدریجا بدتر می‌گردد. نیمی از بیمارانی که مبتلا به شکل عود کننده – بهبودپذیر هستند در عرض ۱۰ سال به شکل پیشرونده ثانویه تغییر پیدا می‌کنند (Farley, 2004; Kaushal *et al.*, 2010).

1. Relapsing Remitting
2. Primary Progressive
3. Secondary Progressive

۱-۴-۴: پیشرونده-عود کننده[1] (PR - MS)

پیشرفت بمیاری به صورت گام به گام و آهسته است. فازهای متعدد همراه با شدت گـرفتن علائـم مشاهده می شود (Farley, 2004; Kaushal *et al.*, 2010).



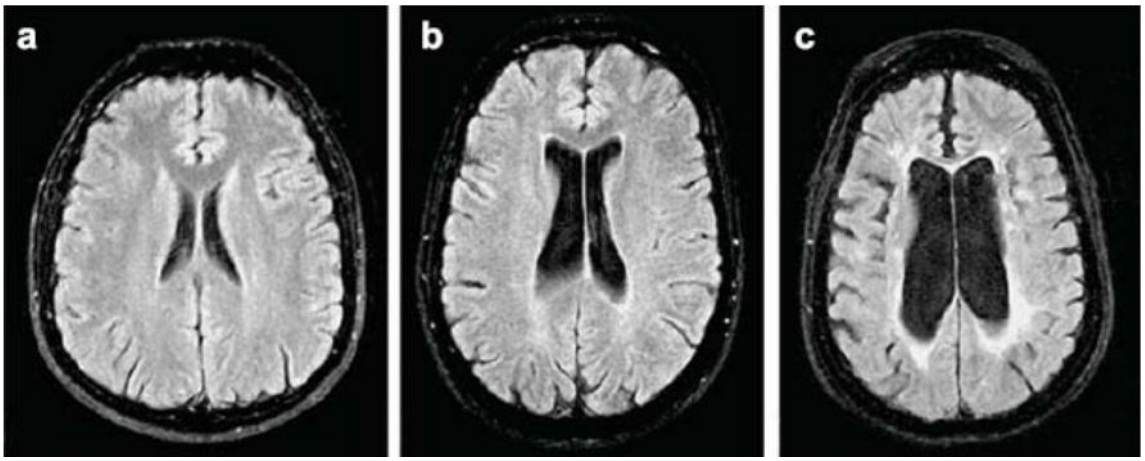
شکل ۱-۱: انواع زیرگروه‌های MS با توجه به نحوه بروز، سیر بالینی و پیشرفت بیماری. PP: پیشرفت تدریجی ناتوانی از زمان وقوع بیماری وجود دارد. RR: پس از گذشت مدت زمان چند هفته تا چند ماه علائم به طور نسبی یا کامل بهبـود می‌یابند. SP: مرحله پیشرونده بیماری ممکن است در مدت کوتاهی پس از شـروع بیمـاری آغـاز گـردد. PR: پیشـرفت بیماری به صورت تدریجی با فازهای متعدد می‌باشد (Kaushal *et al.*, 2010).

۱-۵: کاربرد MRI[2] در MS

تصویربرداری از پلاک ها با روش MRI از دیگر روش‌های مهم تشخیصی می‌باشـد (شـکل ۲-۱). هدف اصلی استفاده از MRI در بیمارن MS تایید تشخیص بالینی است و نیز نقش مهمی در افتراق از سایر بیماری های سیستم عصبی دارد. دستورالعملی که امروزه برای تایید معیارهای تشخیصی مـورد استفاده قرار می‌گیرد معیارهای McDonald می باشد. برای تعیین میزان اختلالات عصـبی و نـاتوانی

1. Progressive-Relapsing (PR)
2. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

های بیمار مبتلا به MS از طبقه بندی EDSS [1] استفاده می شود. این طبقه بندی بـر اسـاس درجـه عملکرد سیستم های مختلف پیرامیدال مخچه، سـاقه مغـز، سیسـتم حسـی، عملکـرد مثانـه و روده، عملکرد بینایی و ذهنی می باشد (Bashir and Whitaker, 1998; Racke, 2009).



شکل ۲-۱: پلاک های مغزی a. بافت مغزی سالم b. بافت مغزی بیمار با MS نوع عود کننده c. بافت مغزی بیمـار بـا پلاک های مغزی (Fedetz, 2009)

۶-۱: بیماریزایی مالتیپل اسکلروزیس

اتیولوژی بیماری MS به طور دقیق مشخص نگردیده است، با این وجود شواهد پیشنهاد می‌کنند که محرک های زیست محیطی مشخص از قبیل عفونت ویروس اپشتین – بار (EBV) و عوامـل ژنتیکـی (مثل HLA-DR2) برای MS مهم هستند. ارتباطات ژنتیکی آنتی‌ژن لکوسیت انسانی [2] کلاس ۲ با MS توسط پژوهشگران نشان داده شده است که به اهمیت نقش سـلول هـای $TCD4^+$ در بیمـاریزایی MS اشاره می‌کنند (Racke, 2009; Etemadifar *et al.*, 2010; Huang and Rae, 2009).

آنالیز سلول های T خودفعال انسان با استفاده از سیستم‌های آزمایشگاهی اطلاعات با ارزشی را فراهم آورده که نقش عملکردی مهم برای سلول های $TCD4^+$ در MS دارد. از طرف دیگر عوامل

1. Expanded Disability Status Scal
2. Human Antigene Luekosit (HLA)

ژنتیکی و محیطی می‌توانند واکنش‌ها و پاسخ های ایمنی را تحت تاثیر قرار دهند و باعث تجمع سلول های ایمنی و محصولات آنها در CNS شوند در نتیجه در سیستم ایمنی اختلال ایجاد می‌شود و خودی از بیگانه تشخیص داده نشده در نتیجه واکنش‌های خود ایمنی بروز می‌کنند (Racke, 2009; Huang and Rae, 2009).

۱-۶-۱: سلول‌های T کمک کننده[1] (Th)

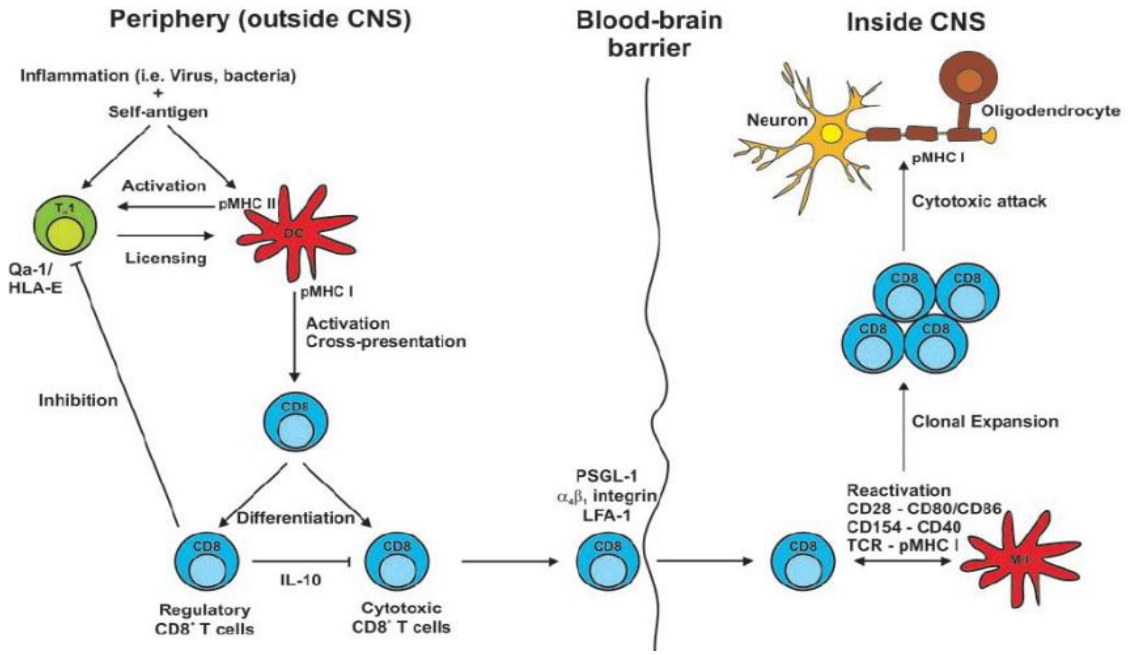
تعادل بین زیرمجموعه های سلول T (مثل؛ سلول های Th1 و Th2) برای MS و EAE که مدل حیوانی MS است، بسیار مهم هستند. سلول‌های Th1 سیتوکین‌های پیش‌التهابی از قبیل IL-2، TNF-α و اینترفرون گاما (IFNγ) و سلول‌های Th2، سیتوکین‌های ضدالتهابی از قبیل IL-4، IL-5 و IL-10 تولید می‌کنند. جزئیات مربوط به آنتی‌ژن‌های خودی که باعث بروز خوایمنی می‌شوند در MS ناشناخته است، اما تجمع سلول‌های T در CNS باعث جدا شدن پپتیدهای کوچکی از شماری پروتئین‌های وابسته به میلین، مانند لیپوپروتئین[2](PLP)، گلیکوپروتئین الیگودندروسیت میلین (MOG)[3] و پروتئین پایه میلین(MBP)[4] می‌شود و احتمال می‌رود که این پپتیدها عامل شروع شروع واکنش‌های خود ایمنی در MS باشند. سلول های T خودفعال در خون، مایع مغزی- نخاعی[5] (CSF) و بافت مغز بیماران مبتلا به MS یافت می‌شوند. پپتیدهای ارائه شده توسط مولکول های کمپلکس اصلی سازگار نسجی[6] (MHC) کلاس ۲ باعث فعال‌سازی سلول‌های Th می‌گردد و یکی از دلایل فعالسازی مجدد سلول‌های T درون CNS تشابه گیرنده‌های سلولی روی سطح سلول‌های Th و

1. T Helper (Th)
2. Protolipid protein (PLP)
3. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)
4. Myelin basic protein (MBP)
5. Cerebro Spinal Fluid (CSF)
6. Major histocompatibility complex (MHC)

پپتیدهای آنتی‌ژنیک ارائه شده بوسیله‌ی مولکول های MHC می‌باشد (Huang and Rae, 2009; Kaushal, *et al.*, 2010).

۲-۶-۱: سلول های $TCD8^+$

مطالعات زیادی، حضور شمار بالایی از سلول های $TCD8^+$ را در CNS و CSF و عبور این سلول ها از سد خونی- مغزی (BBB)[1] را به اثبات رسانده‌اند (شکل ۳-۱). القای EAE درون مدل‌های غیرفعال MS با استفاده از سلول‌های $TCD8^+$ مربوط به پروتئین میلین بیان کننده این واقعیت است که سلول های $TCD8^+$ در MS و EAE دارای نقش بیماریزایی می‌باشند. حضور پپتیدهای عرضه شده بوسیله مولکول های MHC I باعث دوباره فعال شدن سلول‌های $TCD8^+$ درون CNS است (Racke, 2009; Polanczyk *et al.*, 2004; Pfoertner *et al.*, 2006; Huang and Rae, 2009).



شکل ۳-۱: فعال سازی تهاجمی و توزیع کلونال سلول های $TCD8^+$ در MS و EAE. سلول‌های DC در تعامل با MHC باعث فعال شدن سلول و تمایز سلول‌های $TCD8^+$ می‌شود که این سلول‌ها با عبور از BBB در فضای CNS شمار آنها افزایش می‌یابد و در ادامه تخریب غلاف میلین را باعث می‌شود (Fedetz, 2009).

1. Blood–Brain Barrier (BBB)

۳-۶-۱: سلول های دندریتی[1] (DC)

سلول های دندریتی کلاس ویژه ای از سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن (APC)[2] هستند که در بافت ها و اندام های لنفوئیدی ثانویه یافت می‌شوند. آنتی‌ژن‌های مربوط به DCها و سلول های T آغازی برای القا و پشتیبانی مراحل خودایمنی ضروری هستند. مهاجرت DCها از بافت‌ها به اندام‌های لنفوئیدی اختصاصی هم‌زمان با دیگر مولکول‌های APC مانند MHC صورت می‌گیرد. حضور DCها در بافت CNS انسانی بوسیله شماری از آزمایشات اثبات شده است؛ در بیماران MS، افزایش میزان DCها همراه با محرک‌ها و مولکول‌های MHC در CSF یافت می‌شوند. شمار DCهای بالغ محتوای محصولات میلینی بالا است وIL-23 ترشح می‌کنند (Huang and Rae, 2009; Racke, 2009; Ingram *et al.*, 2009).

۴-۶-۱: سلول های B در بیماریزایی MS مهم هستند

اهمیت سلول های B در بیماریزایی MS تا به حال شناخته نشده است، و بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های B در ایمنی هومورال نقش دارند. سلول های B ممکن است نقشی شبیه سلول های APC داشته باشند، به این صورت که سیگنال های کمک-تحریکی سلول های T را فراهم می‌کنند و سیتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و آنتی‌بادی‌هایی تولید می‌کنند (شکل۴-۱) که سلول‌های الیگودندروگلیال را در حضور یا عدم حضور کمپلمن هدف مورد تخریب قرار می‌دهند. نسبت بالای سلول های B مربوط به CSF همچون منوسیت‌ها با پیشرفت سریع MS نسبت مستقیم دارد. سلول های B در بیماریزایی MS نقش مهمی ایفا می‌کنند و هدف جدید برای توسعه داروئی می-باشند(Huang and Rae, 2009; Ingram *et al.*, 2009).

1. Dendretic Cells (DC)
2. Antigene Presenting Cell (APC)