بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده دامپزشکی

پایان‌نامه دکتری عمومی در رشته دامپزشکی (D.V.M.)

شماره ثبت : ۲۷۳

بررسی بیان ژن های گیرنده های شبه تول ۲و۴ (TLR2 & TLR4)

در سلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) گاوهای مبتلا به یون با روش

Quantitative Real-time PCR (qPCR)

به کوشش :

مرضیه اسدی

استاد راهنما :

دکتر علیرضا حق پرست

استادان مشاور :

دکتر غلامرضا محمدی

دکتر محمد حسین ناظم شیرازی

مهر ماه ۱۳۹۰

اظهار نامه

اینجانب مرضیه اسدی دانشجوی دوره ی دکتری رشته دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد نویسنده ی پایان نامه بررسی بیان ژن های گیرنده های شبه تول ۲و۴ (TLR2 & TLR4) درسلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMC) گاوهای مبتلا به یون با روش Quantitative Real-time PCR (qPCR) تحت راهنمایی جناب آقای دکتر علیرضا حق پرست متعهد می شوم :

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه فردوسی مشهد » و یا « Ferdowsi University of Mashhad» به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ و امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد .

به نام خدا

گواهی اعضای کمیته‌ی پایان نامه

بررسی بیان ژن های گیرنده های شبه تول ۲و۴ (TLR2 & TLR4) درسلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMC) گاوهای مبتلا به یون با روش Quantitative Real-time PCR (qPCR)

به کوشش

مرضیه اسدی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم جهت اخذ

درجه‌ی دکترای حرفه‌ای

در رشته‌ی دامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

این پایان‌نامه در جلسه‌ی مورخ ۱۳۹۰/۰۷/۲۰ با درجه‌ی ممتاز و نمره‌ی ۱۹/۸۷ به تصویب هیئت محترم داوران رسید.

استاد راهنما: جناب آقای دکتر علیرضا حق پرست ، استادیار بخشهای ایمونولوژی و بیوتکنولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

استاد مشاور: دکتر غلامرضا محمدی ، استادیار بخش علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

استاد مشاور: جناب آقای دکتر محمد حسین ناظم شیرازی ، رئیس آزمایشگاه کنترل کیفیت مواد غذایی شرق کشور، اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی، مشهد

داور: جناب آقای دکتر سید محمد سیدین، استادیارموسسه واکسن و سرم سازی رازی شرق کشور ، مشهد

داور: جناب آقای دکتر غلامرضا هاشمی تبار، استادیار بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

تقدیم به

مادرم و پدرم

به پاس زحمت های بی دریغشان که یاور تمام سال های تحصیلم بودند

و رسیدن تا این مرحله رامدیون شان ،هستم

و

همسر مهربانم کیانوش

به پاس محبت، همراهی و پشتیبانی اش که طی دوران دانشگاه همراه همیشگی ام بوده

و

عزیزانم مهدی، محمد و نسترن و خانواده همسرم

یاوران همیشه و پشتیبانان زندگی ام

«دوستتان دارم»

سپاسگزاری

بر خود واجب می دانم تا مراتب قدردانی و سپاس خود را از این عزیزان اعلام نمایم:

جناب آقای دکتر حق پرست استاد راهنمای گرانقدرم، که صبورانه کاستی های من طی این تحقیق را با محبت خویش به آموزه ها بدل کردند و شاگردی ایشان را افتخار خود می دانم.

جناب آقای دکتر محمدی استاد مشاور گرامی، که وجود ایشان تحقیق را انجام شدنی نمود، کمال تشکر را دارم.

جناب آقای دکتر ناظم شیرازی استاد مشاور ارجمند که تجربه کار در آزمایشگاه در فضایی به یادماندنی را مدیون ایشان هستم.

جناب آقای دکتر سیدین و دکتر هاشمی تبار که زحمت داوری این پایان نامه را کشیدند.

جناب آقای دکتر نصیری از دانشکده کشاورزی و اساتید بزرگوار در دانشکده دامپزشکی جناب آقای دکتر دهقانی، دکتر باسامی، دکتر افخمی و دکتر عزیززاده که با راهنمایی های مفیدشان راه را برایم هموار ساختند.

و همچنین جناب آقایان دکتر فرزین دکتر نعیمی پور و سرکار خانم دکتر محمدی در دانشکده دامپزشکی که طی انجام این تحقیق یاری ام نموده اند.

سرکارخانم مهندس ترابی و جناب آقای مهندس زواری در آزمایشگاه اداره کل دامپزشکی

که همراهی و راهنمایی شان موجب پیش رفتن این بررسی شد.

و

جناب آقای دکتر براتی مسئولین گاودار ی

و

جناب آقای دکتر یاسر طوسی زاده نهایت همکاری راطی انجام این تحقیق بویژه در مرحله نمونه گیری بابنده داشتند.

و

آقای علی دهقانی خانم سمانه شجاعی خانم نوشین سلیمانی خانم لیلی تاران مرجان رحمان مشهدی

که طی انجام امور پایان نامه بسیار زحمتشان دادم

و

از بهترین دوستان و همراهان؛ سرکار **خانم ایمان طلب خانم رو جنخش، آقای مهندس هاشمی و خانم مهندس رحیمی** که طی دوران تحصیل همیشه یار و یاور من بودند.

و

دوستانم در ورودی 83 دامپزشکی خانم ها محبوبه آزاد، الهام رحمتیان، مریم اسدیان، هدی حسن زاده، ندی عسگری، گلشن شاکری، فاطمه صدر نیا، سحر جامی الاحمدی، مریم شعبانی، فریده قاسمی و آقایان سعید صابرالشعرا، حمید رضا فدایی، مجتبی صحرا گرد، مهدی باقری، شاهین احمدی، مهدی پورتقی، احسان زیادلو، علی اکبر رحمانی، یاسر طوسی زاده، الیاس علیشاهی که سال هایی پر از خاطرات شیرین را در کنارشان سپری کردم.

بگذار سپیده سر زند

چه باک که من بمیرم و شبنم فرو خشکد

و شبگیر خاموش شود و شباهنگ گنگ گردد

و مهتاب رنگ باز دوستاره سحر باز گردد

و راه کهکشان بسته شود . . .

بگذار سپیده سر زند و پروانه بسوی آفتاب پر کشد

چکیده

بررسی بیان ژن های گیرنده های شبه تول ۲و۴ (TLR2 & TLR4) درسلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMC) گاوهای مبتلا به یون با روش Quantitative Real-time PCR (qPCR)

به کوشش:
مرضیه اسدی

بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس، یک آنتریت گرانولوماتوز با عامل مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (Map) دربین نشخوارکنندگان است که دارای شیوع بیشتر در گاو و شیوع کمتر در گوسفند و بز است. Map مثل سایر مایکوباکتریومها یک پاتوژن درون سلولی است و توانایی بقا و تکثیر درون ماکروفاژها را دارد، که به مکانیسم آن از طریق جلوگیری از تشکیل فاگولیزوزم در مطالعات زیادی اشاره شده است. ماکروفاژهای فعال شده سلولهای اصلی در واکنش با مایکوباکتریومها هستند. گیرنده های شناسایی الگو (PRRs) از گیرنده های اصلی ایمنی ذاتی به شمار می آیند که دارای نقش کلیدی در شروع وتنظیم پاسخهای ایمنی میزبان در مقابل پاتوژنها می باشند. در میان آنها، گیرنده های شبه تول (TLRs) نقش محوری در القاء پاسخهای ایمنی ذاتی به عوامل مختلف عفونی، از جمله گونه های مایکوباکتریوم را بازی میکنند. تحریک این گیرنده ها توسط الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژنها (PAMPs) موجب ایجاد پاسخهای التهابی و ترشح سایتوکاینهای پیش التهابی مثل TNF- α ازماکروفاژها می گردد. در این تحقیق، به منظور شناخت بهتر مکانیسمهای سلولی مولکولی درگیر در ایمونوپاتوژنز مایکوباکتریوم پاراتوبرکولوزیس، میزان بیان ژنهای TLR2 و TLR4 در سلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMC) گاوهای یونی مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. بدین منظور، از دو گروه پنج راسی مثبت و منفی گاو هولشتاین از نظر تست الایزا برای بیماری یون خونگیری بعمل آمد. پس از جداسازی لنفوسیتها و مونوسیتها (PBMC)، میزان بیان ژنهای TLR2 و TLR4 با روش qPCR در گاوهای سالم و یونی مورد مقایسه قرار گرفت. از ژنهای GAPDH و β-actin به عنوان کنترل درونی و کالیبراتور واکنشهای qPCR استفاده گردید. با استفاده از رابطه $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ تفاوت بیان ژن در این دو گروه مورد بررسی قرار گرفت ، و به منظور بررسی وجود رابطه معنادار تفاوت بیان ژن دو گروه، از روش T-test در نرم افزار SPSS استفاده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژنهای TLR2 و TLR4 در PBMC گاوهای یونی نسبت به گاوهای سالم دارای افزایش می باشد. آنالیز تست معنی داری بیان ژنها نشان داد که بیان TLR2 و TLR4 در گروه بیمار دارای افزایش قابل ملاحظه معنی داری نسبت به گروه کنترل می باشد ($P<0.001$)که بیانگر نقش این گیرنده ها در ایمونوپاتوژنز یون می باشد .

کلمات کلیدی: بیان ژن، گیرنده های شبه تول (TLRs)، qPCR، یون

فهرست مطالب

بررسی بیان ژن های گیرنده های شبه تول ۲و۴ درسلولهای تک هسته ای خون محیطی گاوهای مبتلا به یون با روش Quantitative Real-time PCR (qPCR)

مقدمه ۱

فصل اول- مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۱- بیماری یون ۵

۱-۱-۱- سبب شناسی ۵

۱-۱-۱-۱- معرفی مایکوباکتریوم ها ۵

۱-۱-۱-۲- تاکسنومی و طبقه بندی مایکو باکتریوم ها ۶

۱-۱-۱-۳- ترکیبات سلولی مایکوباکتریوم ۷

۱-۱-۱-۴- مایکوباکتریوم های بیماری زا ۸

۱-۱-۱-۵- مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزس ۱۱

۱-۱-۱-۶-۱- مشخصات ۱۱

۱-۱-۱-۶-۲- سویه ها ۱۲

۱-۱-۱-۶-۳- طیف میزبانی در گونه های حیات وحش و بیگانه ۱۲

۱-۱-۲- اپیدمیولوژی بیماری یون ۱۲

۱-۱-۲-۱- دوره کمون ۱۳

۱-۱-۲-۲- شیوع عفونت ۱۳

۱-۱-۲-۳- میزان مرگ و میر ۱۴

۱-۱-۳- اهمیت بیماری یون ۱۴

۱-۱-۳-۱- اهمیت عفونت MAP در انسان و بحث زئونوز بیماری ۱۴

۱-۱-۳-۲- اهمیت اقتصادی بیماری یون ۱۶

۱-۱-۳-۳- *انتقال* *۱۶*

۱-۱-۳-۴- انتقال پیش از تولد ۱۷

۱-۱-۳-۵- انتقال بعد از تولد ۱۷

۱-۱-۳-۶- دیگر راه های انتقال ۱۸

۱-۱-۳-۷- انتقال در بین گله ها ۱۸

۱-۱-۴- مراحل بیماری و علایم بالینی ۱۸

۱-۱-۵-۱- مرحله اول: عفونت خاموش ۱۸
۱-۱-۵-۲- مرحله دوم عفونت : عفونت تحت بالینی ۱۹
۱-۱-۵-۳-مرحله سوم : عفونت بالینی ۱۹
۱-۱-۵-۴- مرحله چهارم: بیماری پیشرفته بالینی ۲۰
۱-۱-۶- روش های تشخیصی در گاو ۲۰
۱-۱-۶-۱- روش های کشت و ردیابی ارگانیسم ۲۱
۱-۱-۶-۱-۱- کشت نمونه مدفوع ۲۱
۱-۱-۶-۱-۲- کشت نمونه شیر ۲۲
۱-۱-۶-۱-۳- بررسی میکروسکوپیک و رنگ آمیزی زیل نلسون اسمیر مدفوع ۲۲
۱-۱-۶-۱-۴- پروب های ژنتیکی ۲۲
۱-۱-۶-۱-۵- بیوپسی (بررسی بافت شناسی و کشت باکتری) ۲۴
۱-۱-۶-۲- روش های ایمنی شناسی ۲۴
۱-۱-۶-۲-۱- آزمایش ثبوت عناصر مکمل(CFT) ۲۴
۱-۱-۶-۲-۲- آگار ژل ایمنودیفیوژن (AGID) ۲۵
۱-۱-۶-۲-۳- الایزا (ELISA) ۲۵
۱-۱-۷- کنترل بیماری ۲۶
۱-۱-۸- واکسیناسیون ۲۷
۱-۲- مروری بر پاسخ های ایمنی ۲۸
۱-۲-۱- خصوصیات عمل شناسایی توسط ایمنی ذاتی در مقایسه با ایمنی اکتسابی ۲۹
۱-۲-۲- نقش ایمنی ذاتی در تحریک پاسخ های ایمنی تطبیقی ۳۲
۱-۲-۳- ایمنی در مقابل باکتری های درون سلولی ۳۳
۱-۲-۳-۱- ایمنی ذاتی در مقابل باکتری های داخل سلولی ۳۳
۱-۲-۳-۲- ایمنی تطبقی در مقابل باکتری های داخل سلولی ۳۴
۱-۲-۳-۳- عامل تعیین کننده میزان پیشرفت عفونت و سیر بالینی بیماری ۳۵
۱-۲-۳-۴- گریز باکتری های داخل سلولی از سیستم های ایمنی ۳۷
۱-۲-۵- پاسخ ایمنی علیه عامل بیماری یون و مکانیسم های بیماری زایی آن ۳۸
۱-۲-۶- گیرنده های شناسایی الگوی سلولی ۴۰
۱-۲-۶-۱- گیرنده های شبه تول(TLRs) ۴۱
۱-۲-۶-۲- لکتین نوع C ۴۱
۱-۲-۶-۳- گیرنده های رفتگر(Scavenger) ۴۱
۱-۲-۶-۴- گیرنده های N– فورمیل متیونین – لوسین – فنیل آلانین ۴۱
۱-۲-۶-۵- NLR ها (NACHT-LRR ها) ۴۲
۱-۲-۶-۶- پروتئین های حاوی دامین فعال سازی و فراخوانی کاسپاز (CARD) ۴۲
۱-۳- نگاهی عمیق تر به گیرنده های شبه تولTLRs ۴۳
۱-۳-۱- ساختار مولکولی گیرنده های شبه تول (TLRs) ۴۳
۱-۳-۲- انواع گیرنده های شبه تول (TLRs) ۴۴

۱-۳-۴- لیگاند ها ی گیرنده های شبه تول (TLRs) ۴۴
۱-۳-۵- انتقال پیام های درون سلولی توسط گیرنده های شبه تول (TLRs) ۴۸
۱-۳-۵-۱- مسیر پیام رسانی وابسته به .MyD88 ۵۰
۱-۳-۵-۲- مسیر پیام رسانی وابسته به TRIF ۵۰
۱-۳-۶- اهمیت TLRs در پاسخ های ایمنی منجر به شناسایی مایکوباکتریوم ها ۵۱
۱-۳-۶-۱- اجزای درون سلولی فرودست سیگنال دهی TLR در عفونت مایکوباکتریومی ۵۳
۱-۴- روشهای بررسی بیان ژن ۵۶
۱-۴-۱- بررسی بیان m-RNA ژنهای گیرنده شبه تول با روش های مولکولی ۵۷
۱-۴-۲- Real-time quantitative PCR یا PCR کمی(q-PCR) ۵۸
۱-۴-۳- روش‌های سنجش با qPCR ۶۰
۱-۴-۳-۱-روش غیر اختصاصی یا رنگ های فلورسنت متصل شونده به DNA ۶۰
۱-۴-۳-۱-۱- آنالیز منحنی ذوب (Melt Curve Analysis) ۶۲
۱-۴-۳-۲- روش های اختصاصی ۶۲
۱-۴-۳-۲-۱- پروبهای هیدرولیز شوند ۶۲
۱-۴-۳-۲-۱-۱- پروب‌های TaqMan ۶۳
۱-۴-۳-۲- ۲- پروب های هیبریداسیون ۶۳
۱-۴-۳-۲-۳- پروب های سنجاق سری ۶۴
۱-۴-۳-۲-۳-۱- بی‌کون‌های مولکولی ۶۴
۱-۴-۳-۲-۳-۲- اسکورپیون‌ها ۶۵
۱-۴-۴- انواع روش های تعیین کمییت در q PCR ۶۶
۱-۴-۴-۱- روش تعیین کمییت مطلق یا روش منحنی استاندارد ۶۶
۱-۴-۴-۱-۱- چگونگی رسم یک منحنی استاندارد ۶۷
۱-۴-۴-۲- روش تعیین کمیت نسبی ۶۸
۱-۴-۴-۲-۱- تعیین راندمان یا بازده واکنش ۶۹
۱-۴-۵- پردازش اطلاعات در qPCR نسبی ۶۹
۱-۵- هدف از انجام این بررسی ۷۲

فصل دوم :مواد و روش ها
۲- روش کار ۷۵
۲-۱- تهیه پرایمر ها و بررسی آنها ۷۶
۲-۲- انتخاب نمونه ها، نمونه گیری و بررسی مجدد وضعیت بیماری یون ۷۷
۲-۳- جدا سازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMCs ۷۷
۲-۴- استخراج RNA تام و بررسی کمی و کیفی آن ۷۸
۲-۵- انجام واکنش رونوشت برداری معکوس (ساخت cDNA) و بررسی کمی آنها ۷۸
۲-۶- تعین دمای مرحله اتصال به وسیله PCR گرادیانت دمایی برای چهار جفت پرایمر ۸۰
۲-۷- بررسی cDNA ها ساخته شده در واکنش PCR ۸۱

۲-۸- واکنش qRT-PCR و بررسی منحنی ذوب با برنامه دمایی اولیه..... ۸۱
۲-۹- بهینه سازی واکنش qRT PCR از لحاظ میزان پرایمر و میزان cDNA..... ۸۲
۲-۱۰- تهیه سری رقت از cDNA یک نمونه گاو سالم و انجام qPCR برای سه جفت پرایمر به جهت تعیین راندمان واکنش و تعین روش محاسبه بیان ژن..... ۸۲
۲-۱۱- انجام qRT PCR سه جفت پرایمر و بررسی منحنی ذوب با استفاده از برنامه دمایی ثانویه..... ۸۳
۲-۱۲- انجام واکنش qPCR برای نمونه ها به صورت دوبار تکرار..... ۸۳
۲-۱۳- بررسی عملکرد صحیح ژنهای کالیبرلتور و عدم تاثیر پذیری آن ها در حالت بیماری..... ۸۴
۲-۱۴- محاسبه کمی تغییر بیان ژن نسبی (RFC)و آنالیز آماری..... ۸۵
۲-۱۵- انتقال محصولات واکنش qPCR به روی ژل آگاروز ۲ ٪ و ارزیابی انها زیر پرتو UV..... ۸۶

فصل سوم: نتایج
۳-۱- نتایج آنالیز و بررسی پرایمرها..... ۸۸
۳-۲-نتایج بررسی مجدد تایید بیماری یون ۸۸
۳-۳-. نتایج استخراج RNA و ساخت cDNA و بررسی کمی و کیفی آنها..... ۹۰
۳-۴- نتایج واکنش PCR با گرادیانت دمایی برای تعیین دمای مطلوب مرحله اتصال هر پرایمر ۹۳
۳-۵- نتایج واکنش qPCR برای TLR2، TLR4 و GAPDH و بررسی منحنی ذوب با استفاده از برنامه حرارتی اولیه..... ۹۴
۳-۶- نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش qPCR از نظر میزان پرایمر و میزان cDNA..... ۹۴
۳-۷- نتایج تعیین بازده واکنشها و روش محاسبه بیان ژن..... ۹۶
۳-۸- انجام Real-time RT PCR سه جفت پرایمر و بررسی منحنی ذوب با با استفاده از برنامه دمایی ثانویه..... ۹۷
۳-۹- نتایج انجام واکنش qPCR برای نمونه ها به صورت دوبار تکرار با برنامه دمایی ثانویه..... ۹۸
۳-۱۰- نتایج بررسی عملکرد صحیح ژن کالیبراتور و عدم تاثیر پذیری آن ها در حالت بیماری..... ۱۰۲
۳-۱۱- نتایج محاسبه کمی تغییر بیان ژن و آنالیز آماری..... ۱۰۳
۳-۱۲- نتایج انتقال محصولات واکنش Real time PCR به روی ژل آگاروز ۲ ٪ و ارزیابی انها زیر پرتوUV. ۱۰۶

فصل چهارم :بحث، نتیجه گیری و پیشنهاد ها..... ۱۰۷

منابع و مراجع..... ۱۱۵

ضمائم..... ۱۲۶

فهرست جدول ها

عنوان و شماره صفحه

فصل اول

جدول۱-۱: مایکوباکتریوم های بیماری زا در انسان و دام ۹

جدول ۱-۲: مشخصات و اجزای ایمنی ذاتی و تطبیقی ۲۸

جدول ۱-۳ : نمونه هایی از مولکولهای شناسایی کننده الگو در ایمنی ذاتی و الگوهای مولکولی میکروب های که مورد شناسایی قرارمیگیرند ۳۰

جدول ۱-۴ : مکانیسم های فرار از ایمنی باکتری های درون سلولی ۳۷

جدول۱-۵ : انواع گیرنده های شبه تول (TLRs) و لیگاندهای مربوط به آنها ۴۷

جدول۱-۶ : پروتئین ها و چربی های مختلف مایکوباکتریومی که به طور جداگانه در آبشار سیگنالینگ وابسته به TLR و پاسخهای ایمنی ذاتی درگیر هستند ۵۳

جدول ۱-۷: روشهای تعیین کمیت RNA ۵۷

فصل دوم

جدول ۲-۱: مشخصات پرایمر های مورد استفاده در این بررسی ۷۶

جدول۲-۲: مواد مورد نیاز و حجم مورد استفاده آنها برای انجام واکنش RT-PCR ۷۹

جدول ۲-۳: ترکیب مواد مورد استفاده در PCR با گرادیانت دمایی به منظور تعیین دمای مرحله اتصال هر پرایمر ۸۰

جدول۲-۴: برنامه حرارتی مورد استفاده در PCR با گرادیانت دمایی به منظور تعیین دمای مرحله اتصال ۸۱

جدول ۲-۵ : برنامه اولیه حرارتی برای بررسی پرایمرها در واکنش qPCR و منحنی ذوب ۸۲

جدول ۲-۶: برنامه حرارتی ثانویه برای بررسی پرایمرها در واکنش qPCR و منحنی ذوب ۸۳

جدول۲-۷: ترکیب مواد مورد استفاده در واکنشهای نهایی qPCR ۸۴

فصل سوم

جدول ۳-۱: دمای ذوب(T_M) مورد انتظار برای محصولات چها پرایمر ۸۸

جدول۳-۲: سابقه گاوداری از لحاظ وضعیت بیماری یون برای ۱۰ راس گاو شرکت داده شده در این بررسی و بررسی مجدد در زمان نمونه گیری از طریق تست الیزای سرم ۸۹

جدول۳-۳: ارزیابی کمی RNA استخراج شده و cDNA هر نمونه با استفاده از دستگاه نانودراپ ۹۱

جدول۳-۴: دمای مناسب برای مرحله اتصال چهار جفت پرایمر بر اساس گرادیانت دما و طول قطعات محصول آنها ۹۳

جدول۳-۵: ترکیب مواد بهینه شده برای واکنشهای Real-time PCR ۹۴

فهرست تصاویر و نمودار ها

عنوان و شماره صفحه

فصل اول

تصویر۱-۱: ترکیبات جدار سلولی مایکوباکتریومها ۷

تصویر ۱-۲: عکس میکروسکوپی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس ۱۱

تصویر ۱-۳: بافت رودهای بیمار یون دامی و کرون انسانی ۱۵

تصویر ۱-۴: ایمنی ذاتی و تطبیقی در مقابل باکترهای داخل سلولی ۳۳

تصویر۱-۵: همکاری سلول های $CD4^{+}T$ و $CD8^{+}T$ برای دفاع در مقابل میکروب های داخل سلولی ۳۵

تصویر۱-۶: نقش سلول های T و سایتوکاین ها در تعیین پیامد عفونت ها ۳۶

تصویر۱-۷: ساختار گیرنده های شبه تول (TLRs) ۴۴

تصویر۱-۸: انواع محل های قرارگیری گیرنده های شبه تول (TLRs) . لیگاندهاي آنها ۴۸

تصویر ۱-۹ : مسیر پیامرسانی وابسته به MyD88 و وابسته به TRIF برای TLR4 و هترودایمرهای TLR2 ۵۱

تصویر ۱-۱۰: نمایش شماتیک یک مدل برای سیگنال دهی TLR در پاسخ به عفونت مایکوباکتریومی و مولکول های که در فعال سازی MAPK به دنبال تحریک آگونیست مایکوباکتریومی نقش دارند ۵۵

تصویر ۱-۱۱: نمودار تکثیر واکنش Real-time و مراحل آن ۵۸

تصویر ۱-۱۲:qPCR با استفاده از رنگ سایبر گرین ۶۱

تصویر ۱-۱۳: q PCR با استفاده از پروب TaqMan ۶۳

تصویر ۱-۱۴: پروب های هیبریداسیون ۶۴

تصویر ۱-۱۵: qPCR با استفاده از بی‌کون‌های مولکولی ۶۵

تصویر ۱-۱۶:qPCR با استفاده از اسکورپیون‌ها ۶۶

تصویر ۱-۱۷: نمودار تکثیر، منحنی ذوب و نمودار استاندارد یک واکنش سری رقت ۶۷

تصویر ۱-۱۸: توصیف منحنی استاندارد با بازدهی ایده آل (دایرههای توپر)و بازدهی پایین(دایرههای توخالی) ۶۹

فصل سوم

تصویر ۳-۱: ژل چند نمونه از RNA های استخراج شده ۹۰

تصویر ۳-۲: نمودار یک نانودراپ یکی از نمونه های RNA استخراج شده ۹۲

تصویر ۳-۳: نمودار نانودراپ یکی از نمونه های cDNA ساخته شده ۹۲

تصویر ۳-۴: ژل محصولات PCR چهار پرایمر ۹۳
تصویر ۳-۵: نمودار تکثیر(الف) و منحنی ذوب (ب)واکنش دوتایی مربوط به پرایمر TLR2 ..... ۹۸
تصویر ۳-۶: نمودار تکثیر(الف) و منحنی ذوب (ب)واکنش دوتایی مربوط به پرایمر TLR4 ..... ۹۹
تصویر ۳-۷: نمودار تکثیر (الف) و منحنی ذوب(ب) واکنش دوتایی مربوط به پرایمر β-actin ۱۰۰
تصویر ۳-۸: نمودار تکثیر (الف) و منحنی ذوب (ب)واکنش دوتایی مربوط به پرایمر GAPDH ۱۰۱
تصویر ۳- ۹: تصویر ژل محصول واکنش qPCR مربوط به ژن TLR2 ..... ۱۰۶
تصویر ۳- ۱۰: تصویر ژل محصول واکنش qPCR مربوط به ژنTLR4 ..... ۱۰۶
تصویر ۳- ۱۱: تصویر ژل محصول واکنش qPCR مربوط به ژن β–actin ۱۰۶
تصویر ۳- ۱۲: تصویر ژل محصول واکنش qPCR مربوط به ژن GAPDH ۱۰۶
نمودار۳-۱: منحنی استاندارد سریال رقت برای پرایمرTLR4 ..... ۹۵
نمودار ۳-۲: منحنی استاندارد سریال رقت برای پرایمرTLR2 ..... ۹۵
نمودار ۳-۳: منحنی استاندارد سریال رقت برای پرایمرGAPDH ۹۶
نمودار ۳-۴: منحنی استاندارد سریال رقت برای پرایمرβ-actin ۹۶
نمودار۳-۵: نتایج حاصل از واکنش qPCR دوبار تکرار ژن TLR2 ..... ۱۰۳
نمودار۳-۶: نتایج حاصل از واکنش qPCR دوبار تکرار ژن TLR4 ..... ۱۰۴

فهرست ضمائم

عنوان و شماره صفحه

پیوستI: لوازم و تجهیزات و مواد مورد استفاده ۱۲۷
پیوستII: الیزای سرم برای یون با استفاده از کیت Prionics ۱۲۹
پیوستIII: اصول و شرایط کار با RNA..... ۱۳۱
پیوستIV: استخراج RNA با کیت High pure Roche ۱۳۲
پیوستV: الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز..... ۱۳۴
پیوست VI: بررسی انطباق کامل پرایمر TLR2 با توالی mRNA آن..... ۱۳۵
پیوستVII: منحنی تکثیر و ذوب سریال رقت سه پرایمر ۱۳۶
پیوستVIII: مقادیر C_T نمونه ها در واکنشهای دوبار تکرار..... ۱۴۰
پیوست IX: آناایز آماری..... ۱۴۴

مقدمه:

سه بیماری اصلی مایکوباکتریومی شامل، سل [1]، جذام[2] و یون [3] علی رغم تحت تاثیر قرار دادن بافت های مختلف، شباهت های زیادی با هم دارند و بیماری زایی هر سه بیماری ، با ورود عوامل بیماری زای درون سلولی به ماکروفاژها ایجاد میشود. در حیوانات بیماری های یون و سل حائز اهمیت اند. [۱] بیماری یون، یک آنتریت مزمن باکتریایی، گرانولوماتوزی، پیش رونده، با عامل مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکولوزیس [4] (Map) است که گسترش جهانی دارد و باعث عفونت در حیوانات اهلی و وحشی شده، و عمدتا نشخورکنندگان به آن مبتلا میشوند. [۲-۴]

به لحاظ اقتصادی یون یکی از زیانبارترین بیماریها محسوب میشود. [۱, ۳]، خسارات سالانه این بیماری برای یک گله ۵۰ راسی نزدیک به ۲۵۰۰ دلار برآورد شده [۵] و تخمین زده میشود، سالیانه ۲۰۰ تا ۲۵۰میلیون دلار در آمریکا خسارت وارد میکند. [۶, ۷] حالت تحت بالینی این بیماری باعث کاهش وزن پیشرونده، کاهش تولید شیر، کاهش ارزش لاشه، حذف زودهنگام میشود و اثر منفی روی باروری و سلامت پستان دارد. حالت بالینی باعث اسهال مزمن واضح، لاغری، ضعف و نهایتا مرگ میگردد. [۸]

عفونت معمولاً در ابتدای زندگی اتفاق میافتد، انتقال این بیماری غالباً به صورت دهانی - مدفوعی از طریق آغوز یا شیر آلوده صورت میگیرد و انتقال داخل رحمی و انتقال از طریق مایع تولید مثلی دام نر نیز ممکن است.[۹, ۱۰] دامهای مبتلا منابع بالقوه گسترش بیماری میباشند، زیرا مقادیر زیادی از باکتری را از طرق مدفوع در محیط پخش میکنند. [۳] این بیماری می تواند برای سالها در گله ناشناخته باقی بماند، شیوع عفونت به تدریج در گله افزایش می یابد و تعداد زیادی از گاوها بیمار می شوند. دوره کمون بیماری در گاو چهار ماه تا پانزده سال است[۱۱] و راه درمانی مؤثر وجود ندارد و باید پیش گیری برای کنترل و ریشه کنی مدنظر قرار گیرد.[۱۲]، و کنترل این بیماری بدون در نظر گرفتن آزمونی که بتواند ناقلین بدون علائم بالینی(مرحله تحت بالینی) را شناسایی کند، امکان پذیر نیست.[۹, ۱۳, ۱۴] انجام واکسیناسیون نیز برای این بیماری موفق نبوده علاوه بر آنکه با تست تشخیص سل تداخل ایجاد میکند .[۴] به دلیل امکان انتقال Map آن از حیوان به انسان از طریق شیر و تحمل گرمایی و حضور آن در شیر پاستوریزه و همچنین احتمال ارتباط آن با بیماری مزمن روده ای در انسان به نام بیماری کرون [5] ، به عنوان یک عامل بیماری زای مشترک مهم در مطالعات محسوب میشود. [۳]

---

1. Tuberculosis
2. Leprosy
3. John’s disease
4. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (Map)
5. Crohn’s disease

سیستم ایمنی همیشه در شناخت و نابودی پاتوژنهای مواجه شده موفق نیست. دفاع میزبان علیه مایکوباکتریوم ها با رویدادهای متوالی پیچیدهای برای پاکسازی عفونت شناخته میشود. از اولین خطوط دفاعی درمقابل این عوامل ماکروفاژها هستند، در حالی که مایکوباکتریوم ها درون این سلولها توانایی بقای دارند و بدین ترتیب مکانی را برای در امان ماندن از پاسخ ایمنی هومورال [1] میيابند، [۱۱] اما به دنبال این وقایع پاسخ ایمنی وابسته به سلول [2] تحریک میشود. به طورکلی حیوانات آلوده در این عفونت، ابتدا پاسخ ایمنی وابسته به سلول را ایجاد میکند و بعد با پاسخ هومورال که برمبنای باکتریهای آزاد شده از ماکروفاژهای مرده است، دنبال میشود. اما این پاسخها همیشه موفق نیست و واکنشهای التهابی ایجاد شده و در ادامه تشکیل گرانولوما[3] در اطراف میکروبها برای کنترل عفونت، باعث آسیب بافتی میشود که منجر به ضخیم و چین دار شدن بافت روده و به دنبال آن اختلال در جذب خواهد شد. ترشح سایتوکاینهای پیش التهابی مثل IL-1، IL-b، TNF-α و در ادامه ترشح سایتوکاین IFN-γ به محدود کردن عفونت مایکوباکتریومی نسبت داده می - شود.

در بعضی از میزبانها، پاکسازی عفونت ناموفق است. بعلاوه، مشخص شده است که اگر عفونت به سوی مراحل بالینی پیشروی کند، تولید سایتوکاینهای پیش التهابی سرکوب میشود و بیان سایتوکاینهای ضد التهابی افزایش مییابد. عامل اینکه یک میزبان میتواند با موفقیت عفونت را کنترل کند و در میزبان دیگر بیماری ایمنوپاتولوژیکی وخیم بوجود میآید، مشخص نیست. در بهترین حالت پاکسازی عفونت صورت می - گیرد و البته کنترل کافی عفونت بیشتر محتمل است. فقدان کنترل مشاهده شده در بعضی از میزبانها ممکن است در نتیجه فاکتورهای ژنتیکی افزایش دهنده ریسک استعداد یا تحریک محرک تنشزای خارجی مثل زایمان، سوءتغذیه یا عفونتهای ثانویه ویروسی یا باکتریایی باشد. [۱۵]

مشخصه بیماریزایی مایکوباکتریومها ، توانایی آنها در بقا و حتی تکثیر درون ماکروفاژها است. چگونگی بقای Map و سایر مایکوباکتریومها داخل ماکروفاژها به خوبی مشخص نیست. یافتههای مطالعات در این باره قابل تقسم به سه احتمال است :

۱- مایکوباکتریومها با بیان پروتئینهای میزبان تداخل کرده و از بلوغ فاگوزوم جلوگیری میکنند.
۲- مایکوباکتریومها پروتئینهایی را بیان میکنند که در فعالسازی ماکروفاژها دخالت میکنند.
۳- مایکوباکتریومها از طریق گیرنده های شبه تول [4] (TLRs)و مکانیسمهای دیگری که هنوز شناخته شده نیست، در فرآیندهای فعالسازی ماکروفاژها تاثیرگذارند . [۱۶]

روندهای پیشنهادی در جلوگیری از بلوغ فاگوزوم، عبارتند از کاهش فعالیت آنزیم ماکروفاژها، اسفینگوزین کیناز[5] ، ترشح لیپوفسفات که تولید فسفاتیدیل اینوزیتول [1] را مهار میکند و بدین ترتیب، مانع از هدفیابی

[1] . Humoral Immune Response
[2] . Cell-Mediated Immune (CMI) Response
[3] . Granulomas
[4] . Toll like receptors (TLRs)
[5] . Sphingosine kinase

جزء لیزوزومی تشکیلدهنده فاگوزولیزوزم [۲] میشود، دخالت کلاه مانوزی لیپو آرابینومنان (Man LAM)[۳] مایکوباکتریال با گیرندههای مانوز ماکروفاژها منجر به محدودیت در تشکیل فاگولیزوزم میشود. [۱۵] ، اثر سولفید موجود در غشاء آنها [۱۷] و دخالت گیرندههای شبه تول (TLRs) از طریق مسیرهای خاص [۱۸] بر جلوگیری از این روند احتمالاتی هستند که در این رابطه بیان شدهاند.

بعد از دریافت دهانی ارگانیسم بیماریزا ، در روده Map توسط سلولهای M[۴] در پلاکهای پایر [۵] ناحیه ایلئوم آندوسیتوز و سپس توسط ماکروماژهای موجود در نواحی زیر و بین سلولهای پوششی فاگوسیتوز میشود و درون آنها از تبدیل فاگوزوم به فاگولیزوزم جلوگیری میکند [۱۱]. باسیل Map درون فاگوزومها باقی مانده و حتی به صورت درون سلولی تکثیر میشود و بدین وسیله محلی را میابد تا از تخریب توسط پاسخ ایمنی هومورال نیز در امان بماند.[۲]

گیرنده های شبه تول (TLRs) یکی از انواع گیرندههای شناسایی الگو[۶] (PRRs) هستند و نقش کلیدی در شروع واکنشهای ایمنی ذاتی دارند. این گیرندهها طیف وسیعی از مولکولهای مشتق شده از پاتوژنها[۷](PAMPs) را شناسایی میکنند و در شکل دادن تعامل میزبان و پاتوژن نقش مهمی دارند. مطالعات مختلف در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط زنده نشان دادهاند که مایکوباکتریوم کامل و یا اجزای مایکوباکتریومی به عنوان آگونیست برای TLRs عمل میکنند . [۱۸] هترودایمر TLR2-TLR1/TLR6 و TLR4 ، که از انواع TLRs خارج سلولی هستند و PAMPs مایکوباکتریوم را با فعالسازی سلولهای دندریتیک و ماکروفاژ شناسایی میکنند. هترودایمر TLR2 با TLR1 و TLR6، طیف گسترده مختلفی از اجزای سلولی باکتریایی نظیر لیپوپلی ساکاریدها و لیپوپروتئینها را شناسایی میکنند و سیگنال دهی مسیر NF-κB را القا میکنند. که موجب القای بیان ژنهای سایتوکاین های پیش التهابی و پاسخ ایمنی ذاتی میشود.[۱۹]

با توجه به اینکه تا کنون در گاو، مکانیسم دقیق نقش گیرندههای شبه تول(TLRs) در ایمونوپاتوژنز در بیماری پاراتوبر کلوزیس کاملا مشخص نشده، به این منظور و به عنوان یک گام اولیه ، بررسی تفاوت بیان ژنهای دو گیرنده شبه تول ۲ و ۴ (TLR2 و TLR4) که نقش مهمی در شناسایی ساختارهای موجود در دیواره مایکوباکتریوم ها دارند، مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی از گاوهایی که وجود بیماری یون در آنها با روش الایزا مورد تایید قرار گرفته بود، خونگیری بعمل آمده و با جداسازی لنفوسیتها و مونوسیتهای خون، تغییرات کمی بیان ژنهای TLR2 و TLR4 با روش Real-time quantitative PCR (qPCR) در گاوهای بیمار نسبت به گاوهای سالم مورد آنالیز قرار گرفت.

---

[1] . phosphatidylinositol 3 phosphate
[2] . Phagolysosom
[3] . Lipoarabinomannan(Man LAM)
[4] . M-cells
[5] . Peyer's patches
[6] . Pattern Recognition Receptors (PRRs)
[7] . Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)