بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته ایمنی شناسی پزشکی

عنوان

تعیین الگوی اتوآنتی بادیها (ایمونکولوس) در روند سالمندی و تشخیص آنتی ژنهای کلیوی واکنشگر با اتو آنتی بادیهای طبیعی در بیماران کلیوی

نگارش

میر هادی جزایری

استاد راهنما

دکتر علی اکبر پور فتح اله

استاد مشاور

دکتر محمدجواد رسائی

بهار **۱۳۹۲**

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای میر هادی جزایری رشته **ایمنی شناسی پزشکی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **تعیین الگوی اتوآنتی بادیها (ایمونکولوس) در رونـد سـالمندی و تشـخیص آنتـی ژنهـای کلیـوی واکنشگر با اتوآنتی بادیهای طبیعی در بیماران کلیوی**»در تاریخ **۱۳۹۲/۳/۲۸** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنـرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر علی اکبر پور فتح اله	
استاد مشاور	دکتر محمدجواد رسایی	
استاد ناظر	دکتر سید محمد موذنی	
استاد ناظر	دکتر محمد وجگانی	
استاد ناظر	دکتر محمود جدی تهرانی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر زهیر صراف	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **میر هادی جزایری** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی ۸۹-۸۸ مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

۹۲/۳/۲۸

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **ایمنی شناسی پزشکی**است که در سال **۱۳۹۲**در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکترعلی اکبرپورفتح اله**، مشاوره**دکتر محمد جواد رسائی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **میر هادی جزایری** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی میرهادی جزایری

تاریخ و امضا ۹۲/۳/۲۸

تقدیم به:

مادر مهربانم

همسر خوبم

و

فرزندان عزیزم

هومن و هیلدا

تشکر و قدردانی

- از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر علی اکبر پور فتح اله که راهنمایی اینجانب را در تمامی مراحل رساله بر عهده داشته و از هیچ مساعدتی دریغ نکردند، و در تمام مراحل کار همراه و پشتیبان اینجانب بودند، صمیمانه تشکر می کنم.
- از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر محمد جواد رسائی به خاطر تمام همکاریهایشان کمال تشکر را دارم.
- از اساتید محترم گروه ایمنی شناسی جناب آقای دکتر حسن، جناب آقای دکتر مؤذنی، سرکار خانم دکتر ابتکار، و جناب آقای دکتر زواران به خاطر تمام همکاریهایشان کمال تشکر را دارم.
- از استاد محترم پژوهشگاه ابن سینا جناب آقای دکتر جدی تهرانی به خاطر همکاریهای بی دریغشان کمال تشکر را دارم.
- از جناب آقای دکتر ابراهیمی و سرکار خانم زارعی به خاطر تمام همکاریهای بی دریغشان کمال تشکر را دارم.
- از سرکار خانم واحدیان و سرکار خانم قاسمی و جناب آقای پازکی به خاطر همکاریهای بی دریغ شان کمال تشکر را دارم.
- از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر علی مصطفایی، سرکار خانم کیانی، جناب آقای پروانه و جناب آقای باقریه خاطر تمام همکاریهایشان کمال تشکر را دارم.
- از استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر پورپاک به خاطر تمام همکاریهایشان کمال تشکر را دارم.
- از کلیه پرسنل دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه ابن سینا به خاطر همکاریهای بی دریغشان کمال تشکر را دارم.

چکیده

مقدمه :تغییرات در سطح اتو آنتی بادی های طبیعی در روند سالمندی و نقش آنها در ایجاد هموستازی بدن وهمچنین سلولهای B-1 به عنوان منبع اصلی تولید کننده اتو آنتی بادی ها مطرح هستند. بنابراین در مطالعه حاضر ما بر آن بودیم که تغییرات سلول های B-1 ، سطح اتو آنتی بادی های طبیعی بر علیه ۲۴ ساختار آنتی ژن در بدن و آنتی بادی های IgG , IgM تام را در طی سالمندی بررسی کنیم. همچنین پیشنهاد شده است که از آنتی بادی های طبیعی می توان در تشخیص زود هنگام بیماری ها و اختلالات عملکردی اندام ها سود جست. لذا هدف دیگر ما پاسخ به این سوال بود که آیا درمورد بیماران کلیوی این موضوع صحت دارد یا خیر.

مواد و روش ها: تعیین درصد سلول های B-1 خون محیطی در گروه های سنی مختلف با کمک مارکر های سطحی CD5 و CD19 به روش فلو سایتومتری و سطح سرمی IgG , IgM تام در سرم افراد با تکنیک نفلو متری تعیین شد. الیزا روش مورد استفاده برای تعیین سطح اتو آنتی بادی نسبت به ۲۴ اتو آنتی ژن خاص بود و با لیزات سل لاین کلیوی HEK-293 و روش الکترو فورز دو بعدی آنتی ژن های اختصاصی واکنش گر با اتو آنتی بادی در سرم بیماران کلیوی تعیین شد.

نتایج: در گروه های سنی مختلف در داوطلبان سالم با افزایش سن درصد سلول های B-1 روند کاهشی، سطح سرمی IgG تام روند افزایشی و در مورد IgM تام تا میانسالی روند افزایشی و پس از ۴۰ سالگی روند کاهشی مشاهده شد. میانگین واکنش گری سیستم ایمنی(MIR) نسبت به ۲۴ اتو آنتی ژن نیز با افزایش سن روند صعودی دارد. باند پروتئینی KD ۵۰ در لیزات HEK-293 تعیین شد که با سرم افراد با اختلال کلیوی واکنش می دهند ولی با سرم افراد سالم واکنش گر نیستند.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر نشان داده شده در طی سالمندی تغییرات مشخصی در سطح و الگوی اتوآنتی بادی های اختصاصی اندام و غیر اختصاصی اندام ها اتفاق می افتد که می تواند باعث بروز عوارض سالمندی شوند. شاید بتوان با تقویت تولید سلول های B-1 و Ig M تام که در نیمه دوم حیات افراد روند کاهشی دارند عوارض ناشی از سالمندی را کاهش داد. همچنین باند پروتئینی بدست آمده از لیزات HEK-293 می توان به عنوان کاندیدای مناسبی برای تشخیص های بالینی در آینده باشد.

کلمات کلیدی: اتوآنتی بادی های طبیعی، سالمندی، سلول های B-1، الکتروفورز دو بعدی

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱
۱-۱. اتو آنتی بادی های طبیعی(NAA) ۲
۱-۲. سالمندی ۴
۱-۲-۱. جنبه های مختلف سالمندی ایمونولوژیک ۵
۱-۳. نظریه ایمونولوژیکال همونکلوس(ایمونکولوس) ۷
۱-۴. پیش آگهی در تشخیص های ایمونولوژیک ۸
۱- ۵ . سلولهای B-1 بعنوان منبع تولید کننده NAA ۹
۱-۶ فلوسیتومتری (Flow = جریان Cyto = سلول Metry= اندازه گیری) ۱۴
۱-۷.آزمون نفلومتری ۱۶
۱-۸ .پروتئومیکس(علم بررسی پروتئینها) ۱۶
۱-۸-۱.نقش الکتروفورز در تفکیک و مطالعه پروتئین های سلول ۱۸
۱-۸-۲. الکتروفورز دو بعدی ۱۸
۱-۸-۳. ایزوالکتریک فوکوسینگ ۱۹
۱-۸-۴. بعد دوم - الکتروفورز در ژل آکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) ۲۱
۱-۹. اختلالات کلیوی ۲۲
۱-۹-۱. انواع نارسایی های کلیه ۲۲
۱-۹-۲. علل نارسایی کلیه ۲۲
۱-۱۰. اهداف و فرضیات مطالعه ۲۳
۱-۱۰-۱. بررسی فراوانی سلولهای B-1 در گروه های سنی مختلف ۲۴
۱-۱۰-۲. ارزیابی غلظت سرمی IgG و IgM تام افراد سالم در گروه های سنی مختلف با روش نفلومتری ۲۴
۱-۱۰-۳. بررسی تک تک ۲۴ آنتی ژن و مقایسه میانگین تغییرات آنها در گروه های سنی ۲۴
۱-۱۰-۴. بررسی تغییرات الگوی آنتی بادی های طبیعی در بیماران کلیوی و افراد سالم نسبت به سل لاین کلیوی HEK-293 هضم شده ۲۵
فصل دوم : مواد و روشها ۲۶
۲-۱.فلوسایتومتری ۲۷

۲-۱-۱. بررسی شاخص های سطحی سلول های B-1 ..... ۲۷
۲-۱-۲. روش کار و آماده سازی نمونه خون محیطی ۲۸
۲-۱-۳. نحوه بررسی نمونه ها و خواندن تست فلوسایتومتری با کمک یک مثال: ۲۹
۲-۲. نفلومتری ۳۰
۲-۳. بررسی اتو آنتی بادی های اختصاصی نسبت به ۲۴ اتو آنتی ژن ۳۲
۲-۳-۱. ۲۴ اتوآنتی ژن (بیومارکر) مورد بررسی ۳۲
۲-۳-۲.بافرها و محلول ها و مواد مورد استفاده ۳۴
۲-۳-۲-۱. تهیه بافر نمکی فسفات(PBS) ۳۴
۲-۳-۲-۲. تهیه محلول اسید واش ۳۶
۲-۳-۲-۳. تهیه بافر پوشاننده در الایزا ۳۶
۲-۳-۲-۴. تهیه بافر رقیق کننده در الایزا ۳۷
۲-۳-۲-۵. تهیه بافر شستشو برای الایزا ۳۸
۲-۳-۲-۶. تهیه محلول متوقف کننده برای الایزا ۳۸
۲-۳-۲-۷. تهیه بافر رقیق کننده نمونه در الایزا ۳۹
۲-۳-۲-۱. محلولها ی مورد استفاده در بررسی ۲۴ اتو آنتی ژن به روش ELISA ۴۰
۲-۳-۲-۲سرم کنترل ۴۰
۲-۳-۲-۳. دستگاهها ۴۱
۲-۳-۳. آماده سازی نمونه سرم برای تست الیزا ۴۱
۲-۳-۴. روش آنالیز داده ها درمحاسبه MIR ۴۳
۲-۴.بخش بررسی الکتروفورز دو بعدی ۴۵
۲-۴-۱. سل لاین های کلیوی ۴۵
۲-۴-۱-۱. شستشوی سلولها ۴۶
۲-۴-۲. بافرها و محلول ها و مواد مورد استفاده در کشت سلول ۴۶
۲-۴-۲-۱. تهیه محیط کشت RPMI-1640 ..... ۴۶
۲-۴-۲-۲. تهیه محیط کشت RPMI کامل ۴۷
۲-۴-۲-۳. تهیه محیط کشت DMEM ۴۸
۲-۴-۳. روش کار استخراج عصاره پروتئین جهت انجام SDS-PAGE ۵۰
۲-۴-۳-۱. اندازه گیری مقدار کمی پروتئین های محلول با روش برادفورد (۱۹۷۶) ۵۰
۲-۴-۳-۲ تهیه معرف های برادفورد ۵۱
۲-۴-۳-۳.تهیه استانداردهای پروتئینی از سرم آلبومین گاوی (BSA) ۵۱
۲-۴-۳-۴. روش استاندارد برای تعیین غلظت پروتئین ۵۲

۲-۴-۳. بافرها و محلول ها و مواد مورد استفاده در الکتروفورز دو بعدی ۵۳
۲-۴-۳-۱. بافر شستشو(TBS-T) ۵۳
۲-۴-۳-۲. تهیه محلول مسدود کننده ۵۴
۲-۴-۳-۳. بافر نمونه ۵۴
۲-۴-۳-۴. بافر لیز کننده برای SDS-PAGE ۵۵
۲-۴-۳-۵. بافر لیز کننده برای 2 D ۵۵
۲-۴-۳-۶. بافر انتقال ۵۶
۲-۴-۳-۷. بافر الکترود ۵۶
۲-۴-۳-۸. ژل بزرگ ۲۰x۲۰ برای بعد دوم ۵۶
۲-۴-۳-۹. متعادلسازی بین بعدهای الکتروفورز: ۵۷
۲-۵. الکتروفورز پروتئین ها ۵۸
۲-۵-۱. آماده سازی نمونه ها برای الکتروفورز ۶۰
۲-۵-۲. رنگ آمیزی و نگهداری ژل پلی اکریل آمید ۶۰
۲-۵-۳. مواد مورد نیاز برای رنگ آمیزی با کوماسی آبیR-250 ..... ۶۱
۲-۵-۴. روش رنگ آمیزی ۶۱
۲-۵-۵. نشانگرهای مورد استفاده در الکتروفورز ۶۲
۲-۵-۶. محلولهای مورد نیاز برای SDS-PAGE ۶۲
۲-۶. آنالیز پروتئوم ۶۶
۲-۶-۱. روش استخراج عصاره پروتئین جهت انجام الکتروفورز دو بعدی (2D) ۶۶
۲-۶-۲.آبگیری مجدد ۶۷
۲-۶-۳. الکتروفورز بعد اول(IEF) ۶۷
۲-۶-۴. تهیه ژل الکتروفورز دو بعدی ۶۹
۲-۶-۵ . الکتروفورز بعد دوم ۶۹
۲-۶-۶. رنگ آمیزی و نگهداری ژل ۷۰
۲-۶-۶-۱. رنگ آمیزی نقره اسیدی ۷۰
۲-۶-۶-۱-۱. مواد مورد نیاز ۷۰
۲-۶-۶-۱-۲. روش رنگ آمیزی ۷۱
۲-۶-۶-۲. رنگ آمیزی با کوماسی آبیR-350 ..... ۷۳
۲-۷. تهیه خون محیطی ۷۳
فصل سوم : نتایج و یافته ها ۷۶
۳-۱. گروه های سنی ۷۶

۳-۲. بررسی شاخصهای سطحی سلولهای B-1 ..... ۷۷
۳-۳-۱. یافته های مربوط به تغییرات درصد سلولهای ۹۳
.۳-۳. آزمایش های نفلومتری ۹۵
۳-۴ -۱.یافته های مربوط به تغییرات در مقادیر نرمال ۹۶
۳-۴. یافته های مربوط به اتوآنتی بادی اختصاصی ۱۰۲
۳-۴-۱. یافته های مربوط به MIR در گروه های سنی مختلف ۱۰۲
بررسی تک تک ۲۴ آنتی ژن و مقایسه میانگین تغییرات آنها در گروه های سنی ۱۰۵
۳-۵ یافته های پروتومیکس SDS-PAGE ۱۳۲
فصل ۴. بحث ، نتیجه گیری و پیشنهاد ها ۱۴۵
۴-۱. سالمندی ۱۴۶
۴-۲. سلولهای B-1 به عنوان یک منبع اصلی تولید کننده آنتی بادی های طبیعی ۱۴۷
۴-۳. بررسی سطح طبیعی IgG تام در سرم افراد سالم ۱۴۹
۴-۴. بررسی سطح طبیعی IgM تام در سرم افراد سالم ۱۵۰
۴-۵. مقایسه روند کاهشی سلول های B-1 و سطح سرمی IgM تام ۱۵۲
۴-۶. بررسی آنتی بادی بر علیه ۲۴ اتو آنتی ژن طبیعی ۱۵۲
۴-۷. بررسی حضور آنتی بادی های اختصاصی در سرم بیماران کلیوی بر علیه لیزات سل لاین کلیوی HEK-293 ..... ۱۵۳
۴-۸. با روش SDS-PAGE ۱۵۴
۴-۹. با روش الکتروفورز دوبعدی (2D) ۱۵۵
۴-۱۰. بررسی و تائید حضور آنتی بادی برعلیه پروتین KD 50 در سرم بیماران کلیوی با روش الیزا ۱۵۶
فهرست منابع ۱۶۱

فهرست جداول

جدول ۲-۱.جدول نتایج یکی از نمونه های خوانده شده توسط دستگاه فلو سیتومتری..... ۳۰
جدول ۲-۲. جدول ۲۴ اتوآنتی ژن مورد بررسی..... ۳۲
جدول ۲ -۳. جدول سل لاین های کلیوی..... ۴۵
جدول ۲-۴. مقادیر مواد مورد نیاز برای تهیه ژل..... ۵۹
جدول ۲-۵. ترکیب نشانگرهای استفاده شده در الکتروفورز ۶۲
جدول ۲-۶. نحوه تهیه بافر 4X ژل تحتانی..... ۶۳
جدول ۲-۷. نحوه تهیه بافر 4X ژل فوقانی..... ۶۳
جدول ۲-۸. نحوه تهیه محلول رنگ آمیزی..... ۶۴
جدول ۲-۹. نحوه تهیه محلول رنگ بر ۶۴
جدول ۲-۱۰. نحوه تهیه بافر نمونه..... ۶۵
جدول ۲-۱۱. نحوه تهیه بافر الکترود یا بافر تانک..... ۶۵
جدول ۲-۱۲. مقادیر مواد مورد نیاز برای تهیه ژل ۱۳/۵ درصد..... ۶۹
جدول ۳-۱. نتایج آنالیز نرم افزار پارتک برای یک نمونه خون محیطی با گراف بالا در بررسی سلول های B-1..... ۷۸
جدول ۳-۲. گروه سنی ۱: ۲۸ موردنمونه خون بند ناف..... ۸۰
جدول۳-۳. گروه سنی ۲: ۱۶ مورد نمونه خون نوزاد زیر ۱ سال ۸۱
جدول ۳-۴. گروه سنی ۳: کودکان ۲-۱۲ سال..... ۸۲
جدول ۳-۵. گروه سنی ۴: نوجوانان ۱۳- ۱۹ سال ۸۴
جدول ۳-۶. گروه سنی ۵: جوانان ۲۰ -۳۹ سال..... ۸۶
جدول ۳-۷. گروه سنی ۶: میانسالان ۴۰- ۶۵ سال..... ۸۸
جدول ۳-۸. گروه سنی ۷: افراد ۶۵ ساله و بالاتر..... ۹۰
جدول ۳-۹. گروه پیوند کلیوی: بیماران با اختلال کلیوی در انتظار پیوند کلیه..... ۹۲
جدول ۳-۱۰. مقایسه درصدسلولهای B-1 درگروه های سنی مختلف..... ۹۳
جدول ۳-۱۱. سطح سرمی IgG تام (g.l) در افراد سالم به تفکیک گروه سنی..... ۹۷
جدول ۳-۱۲. سطح سرمی IgM تام (g.l) در افراد سالم به تفکیک گروه سنی..... ۹۸
جدول ۳-۱۳. جدول P value مربوط به گروه های سنی بر مبنای میانگین..... ۱۰۰

جدول۳-۱۴. نمونه ای از نتایج بدست آمده برای هر داوطلب می باشد. ۱۰۲
جدول ۳-۱۵. نتایج بدست آمده ازمیانگین MIR در گروه های سنی مختلف ۱۰۳
جدول۳-۱۶. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن(TrM) Platelet در گروه ها ۱۰۶
جدول۳-۱۷. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن(ANCA) Vesseles در گروه ها.....۱۰۷
جدول۳-۱۸. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن(CoM – h) 1 – Heart در گروه ها.....۱۰۸
جدول۳-۲۰. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن(Ins) 1 – Pancreas در گروه ها.....۱۱۰
جدول۳-۲۱. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن(Ins R) 2 – Pancreas در گروه ها ۱۱۱
جدول۳-۲۲. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن(Hes) 1 – Liver در گروه ها.....۱۱۲
جدول۳-۲۳. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن(HMMP) 2 – Liver در گروه ها.....۱۱۳
جدول۳-۲۴. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (LuM) 1 – Lungs در گروه ها.....۱۱۴
جدول۳-۲۵. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (LuS) 2 – Lungs در گروه ها ۱۱۵
جدول۳-۲۶. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (GaM) Stomach در گروه ها.....۱۱۶
جدول۳-۲۷. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (ItM) Small Intestine در گروه ها.....۱۱۷
جدول۳-۲۸. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (TG) 1- Thyroid در گروه ها ۱۱۸
جدول۳-۲۹. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (TsHR) 2 – Thyroid در گروه ها ۱۱۹
جدول۳-۳۰. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (AdrM) Adrenal در گروه ها ۱۲۰
جدول۳-۳۱. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (Spr) Prostate در گروه ها ۱۲۱
جدول۳-۳۲. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (kiM) 1 – Kidney در گروه ها.....۱۲۲
جدول۳-۳۳. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (KiS) 2- Kidney در گروه ها.....۱۲۳
جدول۳-۳۴. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن dsDNA در گروه ها.....۱۲۴
جدول۳-۳۵. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن β2-GP I در گروه ها.....۱۲۵
جدول۳-۳۶. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن IgG - FC در گروه ها.....۱۲۶
جدول۳-۳۷. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (S100) 1- Nervous در گروه ها.....۱۲۷
جدول۳-۳۸. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (GFAP) 2- Nervouss در گروه ها.....۱۲۸
جدول۳-۳۹. نتایج بدست آمده مربوط به آنتی ژن (MBP) 3- Nervous در گروه ها.....۱۲۹

فهرست نمودارها

نمودار: ۳-۱ نمودار آنالیز نرم افزار پارتک برای نمونه خون محیطی با گراف بالا در بررسی سلول های B-1 ..... ۷۸

نمودار ۳-۲: نمودار همبستگی میان درصد سلول های B-1 و گروه سنی ۹۴
نمودار ۳-۳: نمودار همبستگی میان درصد سلول های B-1 و سن افراد مورد مطالعه با مدل ریاضی GAM ۹۴
نمودار۳-۴: نمودار تغییرات سطح IgG تام در گروه های سنی مختلف ۹۷
نمودار۳-۵: نمودار تغییرات سطح IgM تام در گروه های سنی مختلف ۹۸
نمودار ۳-۶: نمودار تغییرات سطح IgM تام درمقایسه با درصد سلول های B-1 در گروه های سنی مختلف ۹۹
نمودار۳-۷. نمودار پراکندگی تعداد افراد در گروه های سنی مختلف با توجه به جنسیت داوطلبان ۱۰۰
نمودار۳-۸. نمودار پراکندگی جنسیت در نمونه گیری از ۳۰۰ داوطلب شرکت کننده در طرح ۱۰۰
نمودار۳-۹. نمودار مربوط به نتایج حاصل از بررسی ۲۴ اتو آنتی بادی در یک داوطلب که وضعیت وی را از لحاظ بالانس بودن سیستم ایمنی فردی نشان می دهد. ۱۰۴
نمودار۳-۱۰: نمودار تغییرات سطح MIR در گروه های سنی مختلف ۱۰۵
نمودار۳-۱۱ : نمودار تغییرات سطح IR نسبت به TrM-03 در گروه های مختلف ۱۰۶
نمودار۳-۱۲ : نمودار تغییرات سطح IR نسبت به ANCA در گروه های مختلف ۱۰۹
نمودار۳-۱۳. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به CoM-02 در گروه های مختلف ۱۰۸
نمودار۳- ۱۴. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به B1-Adrenoreceptor در گروه های مختلف ۱۰۹
نمودار۳- ۱۵. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به Insulin در گروه های مختلف ۱۱۰
نمودار۳- ۱۶. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به Insulin Receptors در گروه های مختلف ۱۱۱
نمودار۳- ۱۷. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به HeS-08 در گروه های مختلف ۱۱۲
نمودار۳- ۱۸. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به HMMP در گروه های مختلف ۱۱۳

نمودار۳-۱۹. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به LuM-02 در گروه های مختلف.....۱۱۴
نمودار۳-۲۰. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به LuS-06 در گروه های مختلف.....۱۱۵
نمودار۳-۲۱. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به GaM-02 در گروه های مختلف.....۱۱۶
نمودار۳-۲۲. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به ItM-07 در گروه های مختلف.....۱۱۷
نمودار۳-۲۳. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به Thyroglobulin در گروه های مختلف.....۱۱۸
نمودار۳-۲۴. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به TSH Receptor در گروه های مختلف.....۱۱۹
نمودار۳-۲۵. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به AdrM-D/C در گروه های مختلف.....۱۲۰
نمودار۳-۲۶ . نمودار تغییرات سطح IR نسبت به Spr-06 در گروه های مختلف.....۱۲۱
نمودار۳-۲۷. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به KiM-05 در گروه های مختلف.....۱۲۲
نمودار۳-۲۸. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به KiS-07 در گروه های مختلف ۱۲۳
نمودار۳-۲۹. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به dsDNA در گروه های مختلف.....۱۲۴
نمودار۳-۳۰. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به β2-GP I در گروه های مختلف.....۱۲۵
نمودار۳-۳۱. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به Fc-Ig در گروه های مختلف.....۱۲۶
نمودار۳-۳۲. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به S_{100} در گروه های مختلف.....۱۲۷
نمودار۳-۳۳. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به GFAP در گروه های مختلف.....۱۲۸
نمودار۳-۳۴. نمودار تغییرات سطح IR نسبت به MBP در گروه های مختلف.....۱۲۹
نمودار۳-۳۵. نمودار اتو آنتی ژن هایی که در افراد پیوندی افزایش معنی داری نسبت به افراد سالم نشان می دهند.....۱۳۰
نمودار۳-۳۶. نمودار اتو آنتی ژن هایی که در افراد پیوندی کاهش معنی داری نسبت به افراد سالم نشان می دهند.....۱۳۱
نمودار۳-۳۷. نمودار اتو آنتی ژن هایی که در افراد پیوندی و افراد سالم اختلاف معنی داری ندارند.....۱۳۱

فهرست شکل ها

شکل ۲-۱. تصویر دستگاه نفلومتر ۳۱
شکل۲-۲ تصویر نمودار منحنی استاندارد برادفورد با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) ۵۲
شکل ۲-۳. تصویردستگاه الکتروفورز مولتی فور II ۶۸
شکل ۳-۱.تصویر گراف های مربوط به یکی از نمونه های خوانده شده توسط دستگاه فلو سیتومتری پارتک..... ۷۸
شکل۳-۲. تصویر سل لاین کلیوی HEK 293 با میکروسکوپ اینورت.....۱۳۲
شکل۳-۳. SDS-PAGE برای غلظت های مختلف لیزات سل لاین کلیوی HEK 293 جهت بررسی الگوی پروتینی ۱۳۳
شکل۳- ۵ . Western Bloting برای تعیین رقت آنتی بادی اولیه و رقت و نوع آنتی بادی ثانویه ۱۳۴
شکل۳-۶. : Western Bloting برای دو گروه سرم افراد سالم و بیماران کلیوی با غلظت های مختلف هضم سلولی HEK 293. باند حدود ۵۰KD بصورت اختصاصی با سرم بیماران کلیوی تشکیل می شود.....۱۳۵
شکل۳-۷. :تصویر باند مشخص شده در Western Bloting بیماران کلیوی بر روی ژل SDS-PAGE.....۱۳۶
شکل۳-۸. تصویر 2D هضم سل لاین کلیوی HEK 293 جهت بررسی الگوی پروتینی (رنگ آمیزی با کوماسی).....۱۳۶
شکل۳-۹. تصویر 2D هضم سل لاین کلیوی HEK 293 جهت بررسی الگوی پروتینی (رنگ آمیزی با نیترات نقره).....۱۳۷
شکل ۳-۱۰. تصویر ژل الکتروفورز دو بعدی بعد از انجام لکه گذاری، جهت بررسی موفقیت آمیز بودن انتقال لکه ها به غشاء PVDF (رنگ آمیزی با کوماسی).....۱۳۷
شکل ۳-۱۱. تصویرلکه های منتقل شده بر روی غشاء PVDF . سرم افراد نرمال آنتی بادی اولیه، آنتی بادی ثانویه بر علیه IgM انسانی بشکل کونژوگه و رنگ آمیزی با رسوب DAB بر روی غشاء با PVDF انجام شده است.....۱۳۸
شکل ۳-۱۲. تصویرلکه های منتقل شده بر روی غشاء PVDF . سرم افرادپیوندی آنتی بادی اولیه، آنتی بادی ثانویه بر علیه IgM انسانی بشکل کونژوگه و رنگ آمیزی با رسوب DAB بر روی غشاء با PVDF انجام شده است.....۱۳۸
شکل ۳-۱۳. مقایسه عکس های اسکن شده از وسترن بلات افراد سالم و بیماران کلیوی توسط نرم افزار.....۱۳۹

شکل ۳-۱۴. ترکیب عکس های اسکن شده توسط نرم افزار جهت آنالیز اطلاعات.....۱۳۹
شکل ۳-۱۵. تصویرآنالیز شده غشاء PVDF که با سرم افراد نرمال مجاور شده.....۱۴۰
شکل ۳-۱۶. تصویرآنالیز شده غشاء PVDF که با سرم افراد بیماران کلیوی مجاور شده.....۱۴۰
عکس۳-۱۷ :تصویر SDS-PAGE برای لیزات سل لاین کلیوی HEK 293 جهت جداسازی باند ۵۰KD با کمک فیلتر ۵۰KD و۳۰KD.....۱۴۱
شکل ۳-۱۸. : تصویربررسی واکنش سرم بیماران کلیوی (ستون ۱-۷) و افراد سالم (ستون ۸-۱۱) با پروتئین KD ۵۰ بدست آمده از سل لاین HEK-293 . ستون ۱۲ کنترول منفی بوده ودر ۴ ردیف بالا آنتی بادی ثانویه Anti-IgM بود و برای ۴ ردیف پائین Anti-IgG ۱۴۳
شکل ۳-۱۹. : تصویرنتایج الیزا که برای نمونه سرم بیماران کلیوی با کونژوگه Anti –IgM بشکل معنی داری بالاتر است.....۱۴۳

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته