بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه فردوسی مشهد

دانشکده دامپزشکی

گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی دامپزشکی

((بررسی تاثیر آنتی ژنهای پروتواسکولکس کیست هیداتید بر بیان ژنهای TLR2 و TLR4 در سلولهای تک هسته ای خون محیطی گوسفند سالم (بره های تازه متولد شده) با روش Real time quantitative PCR))

به کوشش:

حمیدرضا کرمی

اساتید راهنما

دکتر جلیل مهرزاد

دکتر ابولقاسم نقیبی

اساتید مشاور

دکتر حسن برجی ، دکتر علیرضا حقپرست

۱۳۹۰

اظهار نامه

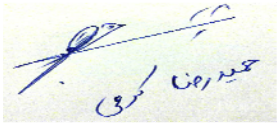
عنوان پایان نامه:

((بررسی تاثیر آنتی ژنهای پروتواسکولکس کیست هیداتید بر بیان ژنهای TLR2 و TLR4 در سلولهای تک هسته ای خون محیطی گوسفند سالم (بره های تازه متولد شده زیر یکماه سن) *با روش Real time quantitative PCR*))

اینجانب حمیدرضا کرمی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی دکتر ابولقاسم نقیبی و دکتر جلیل مهرزاد ، متعهد می شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ :
نام و امضاء دانشجو



مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوي اين اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه هاي رايانه اي، نرم افزارها و تجهيزات
ساخته شده) به دانشگاه فردوسي مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه كتبي از دانشگاه قابل واگذاري به شخص
ثالث نيست.

استفاده از اطلاعات و نتايج اين پايان نامه بدون ذكر مرجع مجاز نيست

گواهی اعضای کمیته‌ی پایان نامه

((بررسی تاثیر آنتی ژنهای پروتواسکولکس کیست هیداتید بر بیان ژنهای TLR2 و TLR4 در سلولهای تک هسته ای خون محیطی گوسفند سالم (بره های تازه متولد شده) با روش Real time quantitative PCR))

به کوشش

حمیدرضا کرمی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از فعالیت‌های

تحصیلی لازم جهت اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی انگل شناسیدامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

این پایان‌نامه در جلسه‌ی مورخ..... با درجه‌ی ..... و نمره‌ی ..... به تصویب هیئت محترم داوران رسید.

استاد راهنما: جناب آقای دکتر جلیل مهرزاد سلاکجانی، استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

استاد راهنما: جناب آقای دکتر ابوالقاسم نقیبی، دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

استاد مشاور: جناب آقای دکترعلیرضا حقپرست، استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

داور: جناب آقای دکتر غلامرضا رزمی، استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

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

تقدیم به دو نور چشمم، ((پدر و مادر مهربانم)) که مانند خورشید و ماه، زندگی این حقیر را نورانی نمودند و مانند دو اسطوره خوبی و معلم زندگی راه درست زندگیکردن را در سایه ایزد منان به این حقیر آموختند و سختی های زندگی را بر من هموار نمودند.

تقدیم به یک فرشته بی همتا ، خواهر مهربان و دلسوزم که همواره مشوق ، راهنما و حامی بزرگوار برادر کوچک خود بوده است. از خداوند منان همیشه خوشحالی و موفقیت روز افزون را برای این بزرگوار خواستارم.

تقدیم به برادر عزیزم که با بزرگواری خود، همیشه برادرش را مورد الطاف خود قرار داده است.

و با تمام وجود ، تقدیم به همسر عزیز و مهربانم که همیشه امید و یار و یاور اینجانب بوده و همیشه با بزرگ منشی و دلسوزی به این حقیر ، دلگرمی و امید زندگی داده است.

و تقدیم به دائی زبیر عزیزم.

و تقدیم به دوست عزیز و بزرگوارم ، جناب آقای علی اصغر دهقانی و استاد بزرگوارم جناب دکتر ابوالقاسم نقیبیو همچنین اساتید و دوستان

بزرگوارم در دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه ، آقایان : دکتر مهرداد پویانمهر ، و استاد بزرگوارم مرحوم دکتر امین بحیرائی.

سپاسگذاری

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

با تشکر از اساتید بزرگوارم بخصوص جناب آقای دکتر ابوالقاسم نقیبی و آقای دکتر جلیل مهرزاد، وبا تشکر از آقای دکتر رزمی، آقای دکتر برجی، آقای دکتر حقپرست، آقای دکتر مشاورنیا و آقای دکتر باسامی که از هیچ راهنمائی نسبت به اینجانب دریغ ننمودند.

همچنین با کمال تشکر از آقای دکتر وهابی و سرکارخانم دکتر محمدی، دانشجویان Δ.Πη رشته بیوتکنولوژی و سرکار خانم دکتر الهام السادات مقدسی و دوست و همکلاسی بزرگوارم آقای سعید یغفوری و همچنین سرکار خانم دکتر نونا مرادپور .

و با تشکر از آقای ماهوتی، کارشناس آزمایشگاه ایمنی شناسی د آقایان آذری و عشرتی کارشناسان بخش انگل شناسی انشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد.

و با تشکر از دوستان عزیزم، آقایان اسماعیل زندی، حمید صادقی، دکتر ولی عابدی و دکتر علی سارانی که با راهنمائی های دلسوزانه اینجانب را در به اتمام رساندن این پایان نامه یاری نمودند،

همچنین با تشکر از همکلاسی های بزرگوارم، آقایان احمدی، پورحسینی، رشیدی، امام پور، دینی، سید آبادی، جهانگیری و سرکار خانم ها تاران، سلیمانی، فتوحی و سلطانی و تمام کسانی که اینجانب را در به اتمام رساندن هرچه بهتر این پایان نامه یاری نمودند.

چکیده

بررسی تاثیر آنتی ژنهای پروتواسکولکس کیست هیداتید بر بیان ژنهایTLR2 و TLR4در سلولهای تک هسته ای خون محیطی گوسفندان سالم (بره های تازه متولد شده) با روش Real-time quantitative PCR

به کوشش

حمیدرضا کرمی

بیماری هیداتیدوزیس توسط مرحله لاروی انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس ، به عنوان یکی از بیماریهای زئونوز انسان و پستانداران میباشد. کیست هیداتید، دارای قسمتهای مختلفی میباشد که عبارتند از: دیواره کیست ، مایع کیست و پروتواسکولکسها که هر کدام از این قسمتها دارایمولکولهایایمونوژن خاصی میباشند که بعضی از این مولکولها بین آنتی ژنهای کیست هیداتید و پروتواسکولکس مشترک میباشند. این مولکولهایایمونوژن از طریق گیرنده های سطحی سلولهای سیستم ایمنی، مانند : TLRها و... قادر به تحریک سیستم ایمنی میباشند.

در تحقیق حاضر در یک دوره ۵ماهه نمونه های ریه وکبد محدودی از تعداد مشخصی گوسفند به دست آمد تعداد۱۰کبد مبتلا به کیست هیداتید از خط کشتار گوسفندی کشتارگاه صنعتی شهرستان مشهد تهیه گردید و به طور استریل پس از آسپیره کردن محتویات درون کیستها که علاوه بر این آنالیزهای آماری در مورد شیوع آلودگی به کیست هیداتید در گوسفندان کشتار شده در کشتارگاه صنعتی گوشت مشهد نیز انجام شد، اقدام به جداسازیپروتواسکولکسها، استخراج آنتی ژنهاییپروتواسکولکسها، سپس غلظت آنتی ژنهای حاصلهبه روش برادفورد انجام شد. بعداز خونگیری از ۲۰ راس بره ۵تا۷روزهPBMCهای خون محیطی بره هاجداسازیشد.

بعد از برخورد آنتی ژنها و PBMCهادر زمانهای ۲ساعت و ۶ساعت و دوز۵میکروگرم بر میلی لیتر از آنتی ژنهای پروتواسکولکس ، اقدام به جداسازی RNA و تبدیل آنها به c DNA شد. سپس مراحل PCRمعمولی بر رویc DNAهای بدست آمده و Real time quantitative PCR انجام شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پروتواسکولکسهای کیست هیداتید سبب بیان ژنهای TLR2و TLR4 در اثر مواجهه با PBMCs بره های تازه متولد شده در شرایط Invitro به صورت افزایش بیان این ژنها و Upregulation میشود.

کلمات کلیدی

آنتی ژنهای پروتواسکولکس کیست هیداتید، بره های تازه متولد شده، TLR2 ، TLR4 ، PBMC، Real-time Q PCR

فهرست

فصل اول : مقدمه ۲

فصل دوم :کلیات.....۶

۲-۱: *طبقه بندی اکینوکوکوس* ۷

۲-۲: *مورفولوژی اکینوکوکوس گرانولوزوس* ۸

۲-۳: *بیولوژی کینوکوکوس گرانولوزوس*.....۹

۲-۴: *شکل گیری پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولولوزوس*.....۱۱

۲-۵: *چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس* ۱۱

۲-۶: *روند رشد طبیعی هیداتید* ۱۲

۲-۷: *انتشارات جغرافیایی اکینوکوکوس گرانولوزوس*.....۱۲

۲-۸: *اختصاصیت و حساسیت میزبان نسبت به E.granulosus*.....۱۳

۲-۹: *بیماری زایی کیست هیداتیک* ۱۴

۲-۱۰: *عوارض ایجاد شده در اثر رشد طبیعی کیست هیداتیک* ۱۵

۲-۱۱: *درمان کیست هیداتید و انگل بالغ* ۱۵

۲-۱۲: *روش درمانی* Puncture,Aspiration,Injeetion,respiration ۱۶

۲-۱۳: *بیوشیمی اکینوکوکوس* ۱۶

۲-۱۴: *متابولیسم تنفسی*.....۱۷

۲-۱۵: *پروتئین های اکینوکوکوس گرانولوزوس*.....۱۸

۲-۱۶: *چربی ها* ۱۹

۲-۱۷: *آنتی ژن های کیست هیداتیک* ۱۹

۲-۱۸: *تعیین خصوصیات آنتی ژن های کیست هیداتیک*.....۲۰

۲-۱۹: *ایمنی سلولی در هیداتیدوزیس*.....۲۰

۲-۲۰: *نقش سایتوکین ها در بیماری کیست هیداتیک* ۲۱

۲-۲۱: *ایمنی کیست هیداتیک در میزبان واسط* ۲۳

۲-۲۲: *مقاومت ذاتی و ایمنی اولیه* ۲۳

۲-۲۳: *تست های ایمونولوژیکی* ۲۴

۲-۲۴: *تست های سرولوژی* ۲۴

۲-۲۵: *PRRها*.....۲۶

۲-۲۶: *رسپتورهای سیستم ایمنی ذاتی*.....۲۶

۲-۲۷: *Toll Like Receptors*.....۲۷

۲-۲۸: *ساختار مولکولی رسپتورهای شبه Toll (TLRs)*.....۲۸

۲-۲۹: *لیگاندهای معمول TLRs*.....۲۹

۲-۳۰: *سیگنالینگ درون سلولی TLRs*.....۳۲

۲-۳۱: *مسیرهای انتقال سیگنال‌های درون سلولی* ۳۳

۲-۳۲: *تکنیکهای مولکولی مرتبط با TLRs در سلولهای سیستم ایمنی ذاتی*.....۳۴

۲-۳۳: PCR ،RT PCR ،Real-Time PCR ۳۴
۲-۳۴: کاربردهای Real-Time PCR ۳۷
۲-۳۵: انواع رنگها یمورداستفادهدر Real Time PCR ۳۹
۲-۳۶: روشها یسنجشبا Real Time PCR ۴۰
۲-۳۷: Multiplex Real-time PCR ۴۲
۲-۳۸: Relative Quantification ۴۳
فصل سوم: مواد و روشها ۴۶
۳-۴: نمونه گیری و استخراج آنتی ژنهای پروتواسکولکس از کیست هیداتید ۴۷
۳-۴: تغلیظ آنتی ژنها (کیسه دیالیز) ۴۹
۳-۴: تعیین غلظت نمونه ها ۴۹
۳-۴: خونگیری از بره هایزیر ۱هفته سن و جداسازی PBMCها با روش فیکول ۵۱
۳-۴: شمارش سلولهای جدا شده ۵۲
۳-۴: کشت سلولها و مواجهه دادن رقتهای مختلف آنتی ژنها با سلولها ۵۳
۳-۴: جداسازی RNA ۵۳
۳-۴: روند استخراج RNA ۵۴
۳-۴: تعیین غلظت RNA به دست آمده:(اسپکتروفوتومتر و نانو دراپ) ۵۷
۳-۴: ساختن c DNA از RNAهای استخراج شده ۵۷
۳-۴ : PCR ۵۹
۳-۴: مشخصات پرایمرها ۵۹
فصل چهارم: نتایج ۶۵
فصل پنجم: بحث ، نتیجه گیری و پیشنهاها ۷۲

فهرست جدولها

جدول شماره ۱
جدول شماره ۲
جدول شماره ۳
جدول شماره ۴
جدول شماره ۵
جدول شماره ۶
جدول شماره ۷

فهرست تصاویر

(تصویر شماره ۱) انگل بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس .....

تصویر شماره ۲) تصویر شماتیک کیست هیداتید و اجزاء آن.....
(تصویر شماره ۳: پرونواسکولکسهای کیست هیداتید .....
(تصویر شماره ۴) چرخه زندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس.....
(تصویر شماره ۵ . TLRهای درون سلولی و خارج سلولی.....
(تصویر شماره ۶) .سلولهای دندریتیک ، ماست سلها و ماکروفاژها.....
(تصویر شماره ۷ . ساختار مولکولی TLRs.....
تصویر شماره ۸ . همو دایمر و هترو دایمر شدن TLRها.....
تصویر شماره ۹ . سیگنالینگ درون سلولیTLRs .....
تصویر شماره ۱۰ . کبد گوسفند آلوده به کیست هیداتید.....
تصویر شماره ۱۱ . پروتواسکولکسهای جداشده و رنگ آمیزی شده با تریپان بلو.....
تصویر شماره ۱۲ . الگوی پروتئینی ناشی از ران کردن آنتی ژنهای تغلیظ شده پروتواسکولکسها.....
تصویر شماره ۱۳ . بره هائی مورد استفاده در پایان نامه حاضر.....
تصویر شماره ۱۴: جداسازی PBMCها .....
تصویر شماره ۱۵ . تصویر لایه ابری حاوی PBMCها.....
تصویر شماره ۱۶ . شمارش سلولهایPBMC جدا شده با استفاده از لام نئوبار.....
تصویر شماره ۱۷ . مواجهه دادن PBMCها با آنتی ژنهای پروتواسکولکس در پلیتهای ۲۴خانه.....
تصویر شماره ۱۸ . جداسازی RNA.....
تصویر شماره ۱۹ . ران کردن RNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز.....
تصویر شماره ۲۰: نمونه آنالیز بیان ژنهای TLR2 ، TLR4.....

منابع

.....

۷۷.....

«فصل اول»

مقدمه

کیست هیداتید بیماری خطرناک زئونوزی است که توسط مرحله لاروی سستود سگ متعلق به جنس اکینوکوکوس (خانواده تنیده Teniidae) ایجادمی شود.هیداتیدوز یکی از بیماری‌های بومی کشور می‌باشد کیست هیداتید میتواند تمام پستانداران و انسان را به عنوان میزبان واسط آلوده کند و خسارات زیادی را به انسان و حیوانات اهلی وارد نماید. کیست هیداتید در اندامهای داخلی انسان و پستاندارانبه صورت کیسه ایuniocular که پر از مایع میباشد ،توسعه مییابد(۵،۹،۳۴،۹۲،۹۵،۹۸).

از نظر ساختاری کیست هیداتید دارای قسمتهای مختلفی میباشد که شامل موارد زیر میباشد:

۱) غشای خارجی ارتجاعی و سخت از جنس هیالن، چند لایه و بدون هسته، به قطر 1mm میباشد. این لایه ها نسبت به میکروبها غیرقابل نفوذ میباشد ولی مواد کریستالوئیدی و کلوئیدی را به طریق اسمز از خود عبور میدهد. این لایه توسط لایه زایا ترشح میشود.۲) غشاء داخلییا زایا(germinal layer)لایه ای است بسیار نازک و دانه دار ، ضخامت این لایه بین۱۵تا۲۵میکرون است و دارای سلولهای اپیتلیوئید و تعداد زیادی هسته میباشد که در سطح آن کیسه های زایا شکل می گیرد. این لایه مانند تگومنت کرم بالغ از سنسیتیوم سیتوپلاسمی تشکیل شده و میکروتریکسهااز آن وارد لایه مطبق فوقانی میشوند(۲،۴).۳) کیسه زایا از لایه زایا منشا میگیرد که توسط رشته هائی به جدار داخلی غشاء زایا متصل میباشد و قطر آنها۲۵۰تا۵۰۰میکرون میباشد..جدار داخلی هر کیسه از اپیتلیوم زایا پوشیده شده که پروتواسکولکسها(۳تا۴عدد در هر کیسه) به وسیله تقسیم غیرجنسی از آن بوجود می آیند. قطر آنها ۱۶۰میکرون و دارای ۴بادکش و نیز روستلوم مسلح که در ۲ردیف دارای۲۴تا۴۲ عدد قلاب میباشند.سر پروتواسکولکس معمولا همیشه به داخل فرو رفته و شکل گرد تا بیضی دارند، معمولا تعداد پروتواسکولکسها در هر کیست بسیار زیاد و تا ۴میلیون نیز میرسد(۲،۴،۶،۴۳).۴) مایع کیست هیداتید:مایعی است صاف،شفاف،زرد روشن تا بیرنگ که حاصل تراوش سرم میزبان و فعالیت خود کیست میباشد و وزن مخصوص آن ۱/۰۰۷ تا ۱/۰۱۵ میباشد. این مایع بصورت مایع آمنیوتیک برای تغذیه و حفاظت پروتواسکولکسها که در آن شناور میباشند،عمل مینماید.. این مایعحاوی ترکیباتی مانند اسید استیک، اسید والریک، اسید پروپیونیک، اسید سوکسینیک،اسیدهای چرب،اسیدهای آمینه،کلرید سدیم، فسفات سدیم،سولفات سدیم، سولفور و کلسیم میباشد. میزان سولفور مایع کیست هیداتید بیشتر از سایر کیستها میباشد.pHمایع کیست هیداتید کمی اسیدی میباشد. رشد پیوسته کیست هیداتید به افزایش مداوم حجم مایع درون آن بستگی دارد(۲،۴،۶،۴۳).۵) لایه فیبروزی ، اطراف کیست هیداتید را بویژه در کبد یک غشای فیبروزی سه لایه، که واکنش آماسی سلولی میزبان در برابر انگل است و معمولا چسبیده به آن نمیباشد،احاطه کرده است.این لایه کمی بعد از شروع رشد انکوسفر به دور آن تشکیل میشود.شدت این واکنش در میزبانهای مختلف متفاوت است و تعیین کننده سرنوشت کیست میباشد.واکنش شدید موجب دژنرسانس و مرگ انگل خواهد شد.در صورتی

که در میزبانهای مناسب، همین واکنشها موجب تشکیل لایه فیبروزی شده وانگل به رشد خود ادامه میدهد(۲،۴،۶).

سیتم ایمنی (غیر اختصاصی) ذاتی از بدو تولد وجود دارد و شامل عوامل متعددی است که نسبتا غیر اختصاصی میباشند، یعنی تقریبا علیه هر ماده خارجی ای که بدن را تهدید بکند،عمل می نماید. نقش اصلی آن ایجاد خط اولیه غیراختصاصی زودرس از دفاع در برابر عوامل بیماریزا میباشد. اکثر میکروارگانیسمهائی که یک فرد سالم روزانه با آن مواجه میشود، ظرف چند دقیقه تا چند ساعت توسط مکانیسمهای دفاعی ذاتی شناسائی و تخریب میشوند. سیستم ایمنی ذاتی دارای اجزائ متعدد و فراوانی میباشد که از غشاهای مخاطی ،رفلکس سرفه،pH و اسیدهای چرب ترشح شده گرفته تا سیستم سیستم کمپلمان و مولکولهای متعدد مانند پدیده جزء سیستم ایمنی ذاتی میباشند اجزاء متعدد دیگر سیستم ایمنی ذاتی عبارتنداز:تب، اینترفرونها، سایر مواد رها شده از سلولهای سفید خون. Pattern recognition molecules،مانند گیرنده های شبه تول(Toll like reseptors) و انواعیاز پروتئینهای سرمی،مانند بتا لایزین،پلی آمینها و کینین ها میباشند(۱،۳).

سلول های دندریتیک (DCs) سلولهای کلیدی سیستم ایمنی ذاتی به واسطه TLRs برای راه اندازی فعالیت Bcells و Tcells میباشند. DCs در تولید پاسخ ایمنی سلولهای چند کاره مانند Th1، CTL و B cells لازم میباشند،همچنین برای تحمل در برابر آنتیژنهای خودی مهم هستند. Toll like reseptors(1,3,29). *(TLRs) خانواده ای از پروتئین ها در پستانداران هستند که همولوگ گیرنده تول در مگس سرکه می باشند، که این پروتئین در تکوین و ایمنی مگس نقش دارد TLRs به عنوان گیرنده های شناساگر الگوی اصلی یا PRR در بسیاری از موجودات بیان می شوند. در مهره داران، بیان TLRs در ابتدا در سلول های ایمنی بویژه ماکروفاژها و نوتروفیل ها گزارش گردید، اما اکنون مشخص شده است که این گیرنده در بسیاری از انواع سلول های بدن یافت می شوند. گیرنده های شبه تول شباهت های ساختاری زیادی با یکدیگر دارند اما در لیگاندها و الگوی بیان و جایگاه عملکرد در سلول متفاوتند.تا کنون سیزده TLR در پستانداران شناخته شده که TLR3، TLR7، TLR8 و TLR9 در وزیکول های اندوزمی داخل سلول دیده می شوند، درحالیکه TLR1، TLR2، TLR4، TLR5 ، TLR6 و TLR10 در سطح سلول حاضر هستند.*

فعال شدن TLRs در سلول های ایمنی منجر به آغاز مسیر پیامدهی داخل سلولی می گردد، این آبشار یا توسط فاکتور تمایز میلوئیدی ۸۸ (MyD88) از آداپتورها یا فعالگر اینترفرون مرتبط با گیرنده تول (TRIF) به راه می افتدکه منجر به راه انداختن مسیر های پیامی گوناگون وبعضی اوقات متضاد میشود(۱،۳،۱۰،۳۰،۴۷،۵۵،۵۶،۷۲،۹۳،۹۴)

TLR4 جزء گیرنده های خانواده ایمنی ذاتی میباشد که یک دامنه خارج سلولی غنی از تکرارهای اسید آمینه لوسین، یک سیگنال انتقال غشائی و یک بخش سیگنالی کوچک سیتوپلاسمیک دارد که آداپتور پروتئین MyD88 میباشد(۵۸،۹۱)

TLR4برای پاسخ به لیپو پلی ساکارید باکتری های گرم منفی لازم و ضروری میباشد(۵۸،۹۱)

Pathogen-associated molecular pattern یا Microbial-associated molecular pattern

PAMPیا MAMP مولکول های خارجی خاصی وابسته به عوامل بیماریزا می باشند که گیرنده های شناساگر الگو مثل TLRs ، که مخصوصاً در سلولهای سیستم ایمنی ذاتی مثل سلولهای عرضه کنندی آنتی ژن که وظیفه فراآوری و عرضه آنتی ژنها را بر عهده دارندمخصوصاً سلولهای دندریتیک وجود دارند، توانائی شناسائی آنها را دارند که با فعالیت TLRs فعالیت سیگنالینگ سلولی برای تحریک ایمنی ذاتی و برای ایجاد ایمنی اکتسابی لازم شروع خواهد شد. TLRs وظائف مشترک ،مانند:تحریک تولید سایتوکاین های التهابی و یا تنظیم تحریک بیان مولکول دارند و نیز وظائف اختصاصی،مانند:تحریک تولید سایتوکاینهای التهاب زا مثل TNFα, IL1B, IL8, اینترفرون بتا،(3)و اینترفرون تیپ I دارند. TLR4 در این زمینه یکی از نقش های کلیدی در پاسخ های ایمنی ذاتی و متعاقب آن ایمنی اکتسابی دارد. همه روزه شواهد بیشتری از نقش TLRs در ایجاد کنترل پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی بدست می آیند(۱۹،۳۷،۸۴،۹۴)

با توجه به اهمیت بسیار زیاد TLRها در شناساندن آنتی ژنها و راه انداختن سیگنالینگ درون سلولی سیستم ایمنی و اینکه در مورد نقش آنتی ژنهای پروتواسکولکس کیست هیداتید رویTLR ها هیچگونه مطالعه ای صورت نگرفته است و تا کنون گزارشی در این مورد به چاپ نرسیده استو با توجه به اهمیت TLR4 و TLR2 در شناسائی پاتوژنها TLR2 و TLR4 برای طرح حاضر انتخاب شده اند.

پروتواسکولکسهای کیست هیداتید دارای آنتی ژنهای ایمونوژنیک می باشند(۴).

همانطور که در بالا توضیح داده شد، با توجه به اینکه TLRs در سطح سلولهای ایمنی مثل APC ها بوفور بیان می شود و نقش های خاصی در شناسائی and DAMPs PAMPs and MAMPs و متعاقب آن سیگنالینگ درون سلولی در سلولهای ایمنی دارند، عقیده ما بر این است که آنتی ژنهای موجود در پروتواسکولکس کیست هیداتید عمل خود را بر سلول از طریق کنترل و غلبه بر سیستم ایمنی مخصوصاً رویTLRs انجام میدهد.با توجه به مطالعات تحقیقاتی ناکافی در زمینه فوق یکی از مهمترین اهداف دراز مدت طرح حاضر زمینه ای برای مطالعات سلولی-مولکولی در حیطه ایمونوپارازایتولوژی آنتی ژنهایکیست هیداتید میباشد. یکی دیگر از

اهداف طرح حاضر یافتن مسیرهای فعال شدن سیستم ایمنی علیه آنتی ژنهای پروتواسکولکس کیست هیداتید میباشد که از آن میتوان به عنوان سدی در مقابل این انگل استفاده کرد.

«فصل دوم»

کلیات

اکینوکوکوس Echinococcosکرم مسطح و کوچکی است که نام آن از دو کلمه یونانی اکینوس به معنی خار و کوکوس به معنی دانه گرفته شده است. برای اولین بار ، هارتمن در سال 1695 بدون اینکه ارتباط این انگل را با بیماری هیداتیدوزیس بداند، کرم بالغ را در روده سگ پیدا کرد. در سال 1771 پالوس عامل بیماری هیداتیدوزیس را کرم اعلام کرد. در سال 1782 ، گوس ، کرم نواری شکل و کوتاهی را که در مرحله بلوغ در روده سگ زندگی میکرد، تنیا اکینوکوکوس گرانولوزوس نامید. در سال 1801 ، رودولفی ، انگل را اکینوکوکوس نامگذاری کرد و آنرا به طور کامل توصیف نمود و کیست های ناشی از آنرا کیست هیداتید نامید

(تصویر شماره ۱) انگل بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس که دارای ۳تا۴بند میباشد که شامل اسکولکس، بند نابالغ، بالغ و بارور میباشد. اقتباس از
Echinococcusmultilocularis wywołuję tzw. bąblowicę ,Inny gatunek

طبقه بندی اکینوکوکوس

انگل اکینوکوکوس ازتحت شاخه کرمهای پهن و در رده سستودا و در زیر رده یوسستودا و راسته سیکلوفیلیده و خانواده تنیده میباشد. در حال حاضر جنس اکینوکوکوس دارای پنج گونه میباشد که عبارتند از : (۲)

۱: اکینوکوکوس گرانولوزوس Echinococcos granulosus
۲: اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس Echinococcos multilucolaris
۳: اکینوکوکوس اولیگارتروس Echinococcos oligaretrus
۴: اکینوکوکوس ووجلی Echinococcos vogeli

۵: اکینوکوکوس کروزی *Echinococcos cruzi*

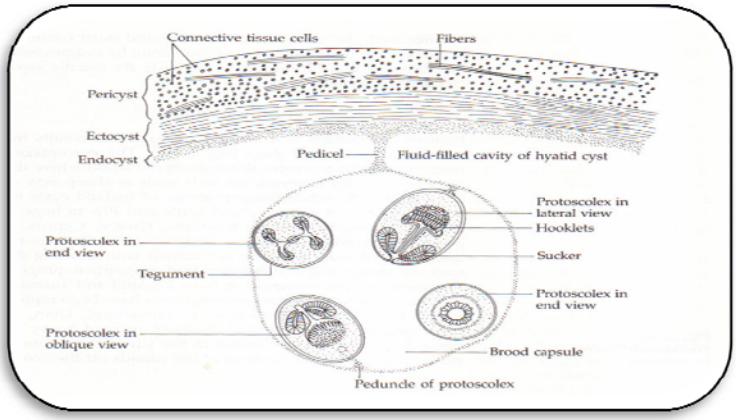
وضعیت گونه پنجم هنوز مشخص نیست و تحقیقات بسیار اندکی روی آن انجام شده است(۲،۵۰)

مورفولوژی اکینوکوکوس گرانولوزوس (E.granulosus)

کرم بالغ: کرم بالغ به طول 8-2 میلیمتر و دارای اسکولکس کروی و یک خرطوم با 26- 30 عدد قلاب است که در دو ردیف قرار گرفته اند و اندازه آنها 40-20 میکرون است. بدن کرم شامل سر، گردنو بندها میباشد که دارای سه بند و ندرتا چهار بند است. اولین بند نابالغ، بند میانی بالغ و دارای اندامهای تولید مثلی، بند آخر یا بند بارور دارای رحم میانی با 15-12 شاخه متصل و به طور متوسط حدود 500 عدد تخم دارد. تخمها گرد متمایل به بیضی به اندازه 50-30 میکرون با جدار کلفت مخطط که انکوسفر شش قلابی را احاطه کرده است. تخم اکینوکوکوس را نمیتوان از تخم سایر تنیاها تشخیص داد. در بندهای بالغ E.granulosusتعداد ۴۵تا۶۵ بیضه در دوطرف بند پراکنده هستند و تخمدانها شبیه کیسه با منافظ تناسلی متناوب نامرتب میباشند. در بند بارور رحم دارای انشعاب ، واژن دارای اسفنکتر و واجد رسپتاکل سمینال میباشد(۲)

مرحله لاروی یا متاستود: مرحله لاروی E.granulosus ، کیست هیداتید نامیده میشود و در بدن انواع مختلف پستانداران و همچنین انسان که میزبان واسط هستند تشکیل میشود. کیست هیداتید دارای ساختمانهایی میباشد که عبارتند از: ۱) غشای خارجی ارتجاعی و سخت از جنس هیالن، چند لایه و بدون هسته، به قطر 1mm میباشد. این لایه نسبت به میکروبها غیرقابل نفوذ میباشد ولی مواد کریستالوئیدی و کلوئیدی را به طریق اسمز از خود عبور میدهد. این لایه توسط لایه زایا ترشح میشود. ۲) غشاء داخلی یا زایا(germinal dayer):لایه ای است بسیار نازک و دانه دار، ضخامت این لایه۱۵-۲۵میکرون است و دارای سلولهای اپیتلیوئید و تعداد زیادی هسته میباشد که در سطح آن کیسه های زایا شکل می گیرد. این لایه مانند تگومنت کرم بالغ از سنسیتیوم سیتوپلاسمی تشکیل شده و میکروتریکسهااز آن وارد لایه مطبق فوقانی میشوند. ۳) کیسه زایا:از لایه زایا منشا میگیرد که توسط رشته هائی به جدار داخلی غشاء زایا متصل میباشد و قطر آنها۲۵۰-۵۰۰میکرون میباشد. جدار داخلی هر کیسه از اپیتلیوم زایا پوشیده شده که پروتواسکولکسها(۳-۴عدد در هر کیسه) به وسیله تقسیم غیرجنسی از آن بوجود میایند. قطر آنها ۱۶۰میکرون و دارای ۴بادکش و نیز روستلوم مسلح که در ۲ردیف دارای 42-24 عدد قلاب میباشند.سر پروتواسکولکس معمولا همیشه به داخل فرو رفته و شکل گرد تا بیضی دارند، معمولا تعداد پروتواسکولکسها در هر کیست بسیار زیاد و تا ۴میلیون نیز میرسد. ۴) مایع کیست هیداتید:مایعی است صاف،شفاف،زرد روشن تا بیرنگ که حاصل تراوش سرم میزبان و فعالیت خود کیست میباشد و وزن مخصوص آن ۱.۰۰۷تا۱.۰۱۵ میباشد.(۲) این مایع بصورت مایع آمنیوتیک برای تغذیه و

حفاظت پروتواسکولکسها که در آن شناور میباشند،عمل مینماید. این مایع حاوی اسید استیک، اسید والریک، اسید پروپیونیک، اسید سوکسینیک،اسیدهای چرب،اسیدهای آمینه،کلرید سدیم، فسفات سدیم،سولفات سدیم، سولفور و کلسیم میباشد. میزان سولفور کیست هیداتید بیشتر از سایر کیستها میباشد.pHمایع کیست هیداتید کمی اسیدی میباشد. رشد پیوسته کیست هیداتید به افزایش مداوم حجم مایع درون آن بستگی دارد.۵) اطراف کیست هیداتید را بویژه در کبد یک غشای فیبروزی سه لایه، که واکنش آماسی سلولی میزبان در برابر انگل است و معمولا چسبیده به آن نمیباشد،احاطه کرده است.این لایه کمی بعد از شروع رشد انکوسفر به دور آن تشکیل میشود.شدت این واکنش بر حسب میزبانهای مختلف متفاوت است و تعیین کننده سرنوشت کیست میباشد.واکنش شدید موجب دژنرسانس و مرگ انگل خواهد شد.در صورتی که در میزبانهای مناسب، همین واکنشها موجب تشکیل لایه فیبروزی شده وانگل به رشد خود ادامه میدهد(۲)



تصویر شماره ۲) تصویر شماتیک کیست هیداتید و اجزاء آن که شامل لایه خارجی، مایع، کیستهای دختر و پروتواسکولکسها میباشد. اقتباس از
Echinococcusmultilocularis wywołuję tzw. ,Inny gatunek

بیولوژی اکینوکوکوس گرانولوزوس

کرم بالغ

میزبان نهایی این کرم پستانداران گوشتخوار میباشند و علت این امر فاکتورهای مناسب فیزیولوژیکی در روده میزبان و نیز عوامل ایمونولوژیکی است. میزبان نهایی با خوردن پروتواسکولکسها آلوده میشود. پروتواسکولکسهای اینواژینه قدرت آلوده کنندگی بیشتری نسبت به پروتواسکولکسهای آواژینه دارند. پروتواسکولکسهای اینواژینه در روده تحت تاثیر درجه حرارت، فشار اسمزی و صفرا ، آواژینه میشوند. پس از اواژیناسیون پروتواسکولکس ها ابتدا خیلی فعالند. این فعالیت پس از سه ساعت و با اتمام ذخایر گلیکوژن کاهش چشمگیری می یابد. این فعالیت برای استقرار انگل در روده کوچک میزبان لازم و ضروری است و به فرو رفتن کرم در بین پرزهای روده و گاهی اوقات در میان کریپت های لیبرکون کمک زیادی می کند. در غیر این صورت کرم جوان به دلیل حرکات دودی روده کوچک دفع می شود. کرم جوان به

کمک بادکش های عضلانی اسکولکس تکه هایی از بافت روده کوچک را در بر می گیرد و قلاب ها نیز تا حدودی به داخل اپیتلیوم مخاط روده فرو رفته و مانند لنگری مانع جابجایی کرم از محل استقرار خود می شوند(۲). اکینوکوکوس گرانولوزوس در یک چهارم قدامی روده و مولتی لوکولاریس عمدتا در نواحی خلفی روده کوچک میزبان نهایی مستقر می شوند که این اختلاف ناشی از تفاوت نیاز های متابولیکی این دو گونه انگلی می باشد. بافت های در بر گرفته شده میزبان توسط بادکش ها تا حدی نکروزه می شوند ولی آسیب چندانی به بافت وارد نمی آید. با وجود این کرم قادر است پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را در میزبان ایجاد نماید وIgG اختصاصی در سرم میزبان یافت شده است. رشد قلاب های روستلوم در میزبان نهایی نیز ادامه می یابد. رشد قلاب ها فقط مربوط به مناطق خاصی از قلاب است و تیغه قلاب ها در این فرآیند بدون تغییر باقی مانده و رشد قابل توجهی ندارند. فرآیند تکامل کرم بالغ شامل چهار مرحله ایجاد پروگلوتید بلوغ رشد و جدایی بند ها می باشد. در برخی از سستودها از جمله اکینوکوکوس ایجاد پروگلوتید می تواند بدون ایجاد بند های واقعی رخ دهد. بنابراین در فرآیند تکامل کرم بالغ اکینوکوکوس غشای جداکننده ای بین بندها مشاهده نمی شود و جدایی بندها از یکدیگر ظاهری بوده و در نتیجه تا خوردگی تگیومنت در هر بند در محل اتصال با بند مجاور پدید می آید. در مورد نحوه تولید مثل جنسی در اکینوکوکوس هنوز توافق وجود ندارد. چنانکه می دانیم اکینوکوکوس بالغ یک کرم هرمافرودیت است و قابلیت خود بارور سازی دارد ولی هنوز مشخص نیست که آیا باروری متقاطع بین دو کرم بالغ صورت می گیرد یا خیر. نتایج بررسی های اخیر در استرالیا و برزیل نشان می دهد که در جمعیت های طبیعی اکینوکوکوس گرانولوزوس هر دو طریق خود باروری می تواند انجام پذیرد(۵۰).

تخم

پس از بارور سازی و تشکیل زایگوت تکامل تخم کرم آغاز می گردد. زمان آغاز تولید تخم در اکینوکوکوس بسته به گونه و حتی گونه های مختلف متفاوت می باشد. در گونه گرانولوزوس این زمان بین ۳۴ تا ۵۸ روز و در مولتی لوکولاریس این فرآیند بسیار سریع تر و بین ۲۸ تا ۳۵ روز پس از آلودگی بارور می گردد. تعداد تخم در هر بند بین ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ عدد متفاوت می باشد و این میزان در گونه مولتی لوکولاریس کمتر از گرانولوزوس می باشد. تخمین زده می شود که هر ۷-۱۴ روز یک بند بارور از کرم بالغ جدا شده و دفع می گردد. تخم ها هنگام دفع از میزبان نهایی کاملا جنین دار و رسیده بوده و قدرت آلوده کنندگی دارند. گرچه شاید تخم هایی نیز یافت شوند که نارس بوده و نیازمند گذران مدتی در محیط باشند تا بتوانند میزبان واسطی را آلوده نمایند. تخم های اکینوکوکوس مانند تخم سایر تنیاها کروی یا بیضوی شکل بوده و اندازه آن بین ۳۰-۵۰ میکرون و ۲۲-۴۴ میکرون در دو قطر متفاوت است. از نظر ساختمانی تخم جنس های خانواده تنیده شباهت زیادی داشته و از نظر مورفولوژیکی از یکدیگر قابل تمیز نیستند(۲،۵۰).