بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکدهٔ علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ زیست شناسی، گرایش میکروبیولوژی

بررسی ارتباط احتمالی عفونت با باکتری کلامیدیا پنومونیه و بیماری مولتیپل اسکلروزیس

استادان راهنما :

دکتر رسول روغنیان

دکتر سید حمید زرکش

پژوهشگر :

زویا اسکندریان

۱۸ اسفند ۸۹

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نو آوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکدهٔ علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی

خانم

زویا اسکندریان

تحت عنوان

بررسی ارتباط احتمالی عفونت با باکتری کلامیدیا پنومونیه و بیماری مولتیپل اسکلروزیس

در تاریخ ۸۹/۱۲/۱۸ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجهٔ عالی به تصویب رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر رسول روغنیان با مرتبهٔ علمی استادیار امضا

۲- استاد راهنمای پایان نامه دکتر سید حمید زرکش با مرتبهٔ علمی دانشیار امضا

۳- استاد داور داخل دکتر محمد ربانی با مرتبهٔ علمی دانشیار امضا

۴- استاد داور خارج دکتر مرجان قراگوزلو با مرتبهٔ علمی استادیار امضا

امضای مدیر گروه

دانشگاه اصفهان

دانشکدهٔ علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی

خانم

زویا اسکندریان

تحت عنوان

بررسی ارتباط احتمالی عفونت با باکتری کلامیدیا پنومونیه و بیماری مولتیپل اسکلروزیس

در تاریخ ..... توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجهٔ ..... به تصویب رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر رسول روغنیان با مرتبهٔ علمی استادیار امضا

۲- استاد راهنمای پایان نامه دکتر سید حمید زرکش با مرتبهٔ علمی دانشیار امضا

۳- استاد داور داخل دکتر محمد ربانی با مرتبهٔ علمی دانشیار امضا

۴- استاد داور خارج دکتر مرجان قراگوزلو با مرتبهٔ علمی استادیار امضا

امضای مدیر گروه

حال که با الطاف بی کران خداوند مهربان توانسته ام گامی کوچک در مسیر تحصیل علم بردارم و یک طرح پژوهشی را به سرانجام برسانم بر خود واجب می دانم که صمیمانه از تمامی عزیزانی که مرا در راه رسیدن به این هدف یاری رساندند سپاسگزاری کنم. کسانی که بدون راهنمایی، دلسوزی و همراهیشان این روز و این لحظه را هرگز تجربه نمی کردم.

پس سپاسگزارم از:

استاد گرانقدر جناب آقای دکتر روغنیان که نه تنها در زمینهٔ علمی که در حوزهٔ اخلاق و انسانیت نیز بسیار از ایشان آموخته ام و همواره از این که افتخار شاگردی ایشان را داشته ام بر خود می بالم.

و از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر زرکش که هربار نا امید و خسته از چالشها و مشکلات کار تحقیقاتی نزد ایشان رفتم از رهنمودهای علمی ایشان بهره بردم و از کلام دلسوزانه و لبخند امید بخششان نیرویی دوباره گرفتم. بهترینها را برایشان آرزومندم.

صمیمانه تشکر می کنم از خانم دکتر قراگوزلو و جناب آقای دکتر ربانی بخاطر پذیرش داوری این پایان نامه.

همچنین لازم می دانم از آقای دکتر اعتمادیفر و پرسنل زحمت کش کلینیک MS اصفهان که در جمع آوری نمونه‌های مورد نیاز ما را یاری فرمودند تشکر کنم. از مسؤولین محترم مرکز تحقیقات عفونتهای گرمسیری اصفهان و همچنین از استاد ارجمند آقای دکتر طالبی در دانشکدهٔ آمار دانشگاه اصفهان بسیار سپاسگزارم. از استادان محترم بخش میکروبیولوژی و گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان کمال تشکر را دارم.

مانند هر دانشجوی تحصیلات تکمیلی، همواره بخشی از نگرانیها و دغدغه‌هایم را از خانهٔ دومم دانشگاه به خانهٔ اول و نزد خانواده منتقل کرده ام! و به مانند هر فرزندی توان جبران مهربانیها، صبوریها و دلگرمی دادنهای پدر و مادرم را ندارم. پس به پاس زحمتشان این لحظه را بعنوان یکی از شادترین و پرافتخارترین لحظات زندگی ام به پدر و مادرم تقدیم میکنم به آنان که حضورشان زیباترین نعمت و بزرگترین شادی زندگی من است.

از دوستان و همکلاسی هایم که خواهرانه و برادرانه در کنارم بودند و همراهیم کردند ممنونم و هرگز مهرورزی و محبتشان را فراموش نخواهم کرد.

در پایان نتیجهٔ این تحقیق را به عنوان دستآوردی هر چند کوچک به تمامی بیماران مبتلا به بیماری MS تقدیم میکنم و از او که مهربانترین است برای همهٔ بیماران شفای عاجل و بهبودی کامل خواستارم.

تقدیم به تمامی بیماران مبتلا به بیماری

مولتیپل اسکلروزیس

چکیده

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری التهابی تخریب کنندهٔ میلین سیستم اعصاب مرکزی است که به ناتوانی حرکتی و اختلال در عملکرد حواس منجر می‌شود. این بیماری معمولاً بین ۲۰ تا ۴۰ سالگی بروز می‌کند و میزان ابتلای به آن در زنان ۱/۶ تا ۲ برابر بیش از مردان است. از نظر بالینی ۴ فرم کلی برای این بیماری در نظر گرفته می‌شود: پیشرونده- اولیه، پیشرونده- ثانویه، پیشرونده- عود کننده و تشدیدیابنده- بهبودپذیر. هر چند علت اصلی و دقیق این بیماری هنوز شناخته نشده است ولی پژوهش‌های صورت گرفته جهت درک سبب شناسی MS، آن را به عنوان یک بیماری خودایمن معرفی می‌کند که عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی اعم از هورمونی، شرایط جغرافیائی و عفونی در بروز آن نقش دارند. در بین عوامل عفونی نقش ویروسهایی مانند اپشتین بار ویروس و هرپس ویروس که می‌توانند عفونتهای پایدار و مزمن در انسان ایجاد کنند مورد بررسی قرار گرفته است. از میان باکتریها نیز نقش استرپتوکوکها، اسینتوباکتر، هلیکوباکتر پیلوری و همچنین کلامیدیا پنومونیه در القای خودایمنی و بروز MS مورد مطالعه قرار گرفته است. کلامیدیا پنومونیه یک باکتری گرم منفی است که به دلیل نقصان سیستم تولید انرژی به سلول میزبان وابسته است و انگل داخل سلولی است.

هدف از این پژوهش، بررسی ارتباط احتمالی عفونت با کلامیدیا پنومونیه و بروز بیماری مولتیپل اسکلروزیس است.

در این تحقیق، ۷۱ نمونهٔ مایع مغزی- نخاعی شامل ۳۵ نمونه از بیماران مبتلا به MS و ۳۶ نمونه از افراد مبتلا به سایر بیماریهای عصبی مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی ارتباط بیماری MS و سابقهٔ عفونت با کلامیدیا پنومونیه حضور IgG علیه آنتی ژنهای این باکتری در مایع مغزی- نخاعی (CSF) از طریق آزمون الایزا مورد آزمایش قرار گرفت. وجود DNA کلامیدیا پنومونیه در مایع مغزی- نخاعی بیماران نیز با استفاده از PCR بررسی شد. برای انجام محاسبات آماری، از آزمونهای آماری Mann-Whitney و x^2 استفاده شد.

نتایج بدست آمده از آزمون ELISA با آزمون Mann-Whitney مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت معناداری در بین دو گروه مورد مطالعه در این پژوهش نشان نداده نشد (P value=۰/۸۵>، α=۰/۰۵) . اما نتایج حاصل از PCR نشان داد که درصد نمونه‌های مثبت از نظر وجود کلامیدیا پنومونیه در بین نمونه های CSF بیماران مبتلا به MS ٪۲۳ بیش از مبتلایان به سایر بیماریهای عصبی است. وجود تعدادی نمونه که از نظر IgG علیه کلامیدیا پنومونیه مثبت هستند ولی نتیجهٔ PCR آنها منفی است نشان دهندهٔ آن است که برخی از افراد در هر دو گروه، در طول دوران زندگی خود با باکتری کلامیدیا پنومونیه برخورد داشته اند و به همین دلیل در سیستم اعصاب مرکزی آنها علیه این باکتری آنتی بادی ساخته شده است ولی عامل باکتریایی پس از مدتی از CSF بیماران توسط سیستم ایمنی حذف شده است و تیتر IgG در مایع نخاع آنها همچنان بالا مانده است. تعداد بالاتر نمونه‌های مثبت در گروه MS، نشان دهندهٔ آن است که سابقهٔ عفونت با کلامیدیا پنومونیه می‌تواند بعنوان یک عامل در سبب شناسی بیماری MS در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، کلامیدیا پنومونیه، مایع مغزی- نخاعی، PCR، الایزا

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: کلیات

۱-۱مقدمه ۱

۱-۲بیماری مولتیپل اسکلروزیس..... ۱۰

۱-۲-۱ تاریخچه..... ۱۰

۱-۲-۲ توزیع جغرافیای ۱۲

۱-۳ آسیب شناسی بیماری مولتیپل اسکلروزیس..... ۱۳

۱-۳-۱ علائم و نشانه ها..... ۱۳

۱-۳-۲ سیر بالینی ۱۳

۱-۴ درمان بیماری مولتیپل اسکلروزیس ۱۶

۱-۵ سبب شناسی بیماری MS..... ۱۷

۱-۵-۱ عوامل میزبانی ۱۷

۱-۵-۱-۱ زمینهٔ ژنتیک ۱۷

۱-۵-۱-۲ زمینهٔ ایمونولوژیک ۱۸

۱-۵-۲ عوامل محیطی ۲۰

۱-۵-۲-۱ عوامل غیر عفونی..... ۲۱

۱-۵-۲-۲ عوامل عفونی ۲۲

۱-۶ مکانیسمهای مورد استفاده توسط عوامل عفونی در القای مولتیپل اسکلروزیس..... ۲۲

۱-۶-۱ ساز و کار تقلید مولکولی..... ۲۳

۱-۶-۲ فعال شدن فرعی..... ۲۴

عنوان **صفحه**

۱-۷ نقش عفونتهای ویروسی درسبب ۲۶

۱-۸ نقش عفونتهای باکتریایی ۲۶

۱-۹ خانواده کلامیدیاسه ۲۷

۱-۹-۱ کلامیدیا پنومونیه ۲۸

۱-۹-۲ روشهای تشخیص آزمایشگاهی کلامیدیا پنومونیه ۳۰

۱-۱۰ آزمایش PCR ۳۱

۱-۱۰-۱ چرخه های PCR ۳۱

۱-۱۰-۱-۱ مرحلهٔ واسرشت ۳۱

۱-۱۰-۱-۲ مرحلهٔ اتصال ۳۲

۱-۱۰-۱-۳مرحلهٔ ساخت ۳۲

۱-۱۰-۲ مواد اولیه واکنش PCR ۳۳

۱-۱۰-۲-۱ آنزیم DNA Polymerase ۳۳

۱-۱۰-۲-۲ داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) ۳۳

۱-۱۰-۲-۳ یون منیزیم ۳۳

۱-۱۰-۲-۳-۱ اتصال پرایمرها ۳۳

۱-۱۰-۲-۳-۲ دمای تفکیک یا جداسازی ۳۳

۱-۱۰-۲-۳-۳ فعالیت آنزیم Taq DNA Polymerase ۳۴

۱-۱۰-۲-۳-۴ تشکیل کمپلکس با نوکلئوتیدها ۳۴

۱-۱۰-۲-۴ پرایمرها ۳۴

۱-۱۰-۳ بررسی محصولات PCR ۳۵

عنوان **صفحه**

۱-۱۰-۳-۱ الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳۵
۱-۱۰-۳-۲ بافر TBE ۳۵
۱-۱۰-۳-۳ رنگ بارگذاری ۳۶
۱-۱۱ آزمایش الایزا ۳۷
۱-۱۱-۱ مقدمه ۳۷
۱-۱۱- ۲ تاریخچه ۳۷
۱-۱۱-۳ مراحل سیستم الایزا ۳۹
۱-۱۱-۳-۱ فاز جامد ۳۹
۱-۱۱-۳-۲ فرآیند کوتینگ ۴۰
۱-۱۱-۳-۳ شستشو ۴۰
۱-۱۱-۳-۴ اتوگذاری ۴۱
۱-۱۱-۳-۵ آنزیم نشاندار و سوبسترا ۴۱
۱-۱۱-۳-۶ واکنش متوقف کننده ۴۲
۱-۱۱-۳-۷ قرائت نتایج ۴۲
۱-۱۲ علامتهای اختصاری در الایزا ۴۲
۱-۱۳ طبقه بندی انواع الایزا ۴۳
۱-۱۴ اهداف ۴۳

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ مواد مورد نیاز ۴۵
۲-۲ ابزارها و تجهیزات مورد نیاز ۴۶
۲-۳ طرز تهیه محلولها و بافرهای مورد نیاز ۴۷
۲-۳-۱ محلول TBE (Tris buffer EDTA) ۴۷
۲-۳-۲ محلول Tris – Buffer ۴۷
۲-۴ نحوهٔ جمع آوری نمونه‌ها ۴۸
۲-۵ روش استخراج DNA از نمونه های مایع مغزی- نخاعی ۴۹
۲-۶ واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۵۰
۲-۶-۱ آماده کردن مخلوط برای انجام PCR ۵۰
۲-۶-۲ بهینه سازی سیستم PCR ۵۱

عنوان **صفحه**

۲-۶-۳ تعداد چرخه های در آزمایش PCR ۵۲
۲-۶-۴ ویژگی های پرایمرهای omp_1 باکتری کلامیدیا پنومونیه ۵۲
۲-۶-۵ روش انجام PCR با پرایمرهای omp_1 ..... ۵۲
۲-۶-۶ روش انجام PCR با پرایمرهای GAPDH ۵۲
۲-۷ بررسی محصولات PCR ۵۵
۲-۷-۱ روش کار ۵۵
۲-۸ مشخصات کیت الایزای IgG ۵۷
۲-۸-۱ مشخصات محلولها و مواد داخل کیت ۵۷
۲-۸-۱-۱ محلولها و مواد داخل کیت ۵۷
۲-۸-۱-۲ آنتی بادی نشاندار شده با آنزیم ۵۷
۲-۸-۱-۳ سوبسترا/ماده رنگ زا ۵۸
۲-۸-۱-۴ رقیق کنندۀ نمونه ۵۸
۲-۸-۱-۵ محلول متوقف کننده ۵۸
۲-۸-۲ مشخصات پلیت الایزا IgG ۵۸
۲-۹ مشخصات دستگاه الایزا ریدر ۵۸
۲-۱۰ روش کار ۵۹
۲-۱۰-۱ روش انجام آزمایش الایزا ۵۹
۲-۱۱ محاسبۀ Cut- Off و تفسیر نتایج ۶۰
۲-۱۱-۱ روش نیمه کمی ۶۰
۲-۱۱-۲ روش کمی ۶۱
۲-۱۲ کنترل کیفی ۶۲
۲-۱۳ روش انجام محاسبات مربوط به اندازه گیری آنتی بادی کلامیدیا پنومونیه در CSF ۶۲
۲-۱۴ روش انجام آنالیز آماری ۶۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱ مشخصات و اطلاعات مربوط به نمونه ها ۶۴
۳-۲ ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از نمونه های CSF ۶۵
۳-۳ بهینه‌سازی سیستم PCR برای ژن *omp1* ۶۵

عنوان **صفحه**

۳-۴ بررسی توزیع فراوانی عفونت با کلامیدیا پنومونیه در گروه بیماران مولتیپل اسکلروزیس وگروه مبتلایان به سایر اختلالات عصبی با روش PCR ۶۶
۳-۵ نتیجهٔ محاسبات مربوط به مقایسهٔ دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس ۶۸
۳-۶ بررسی فراوانی عفونت با کلامیدیا پنومونیه در گروههای کنترل و بیماران مولتیپل اسکلروزیس با روش ELISA ۶۹
۳-۷ نتیجهٔ محاسبات مربوط به مقایسهٔ دو گروه کنترل و بیماران مولتیپل اسکلروزیس در آزمون ELISA ۶۹
۳-۸ مقایسه نتایج آزمایش PCR و الایزا ۷۱

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱ مقدمه ۷۲
۴-۲ خصوصیات جمعیت مورد مطالعه ۷۳
۴-۳ بررسی نتایج PCR برای جستجوی DNA کلامیدیا پنومونیه ۷۴
۴-۴ بررسی نتایج الایزا برای جستجوی IgG علیه کلامیدیا پنومونیه ۷۸
۴-۵ مقایسه نتایج مربوط به روش PCR و الایزا ۷۹
۴-۶ بررسی وجود DNA کلامیدیا پنومونیه در زیرگروههای MS ۸۱
۴-۷ نتیجه گیری ۸۱
۴-۸ پیشنهادها ۸۳

فهرست شکلها

شکل۱-۱ انواع گوناگون سیر کلینیکی در بیماری مولتیپل اسکلروزیس ۱۴
شکل۱-۲ برخی از انواع هومولوژی و تقلید مولکولی ۲۵
شکل۱-۳ چرخهٔ زندگی باکتریهای خانوادهٔ کلامیدیا ۲۹
شکل ۱-۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی از فرم مشبک (R) و اولیهٔ (E) کلامیدیا پنومونیه ۳۰
شکل۳-۱ الکتروفورز محصولات PCR با پرایمرهای GAPDH بر روی ژل آگارز ۶۵
شکل ۳-۲ الکتروفورز محصولات حاصل از PCR با پرایمرهای omp_1 بر ژل آگارز ۶۶

عنوان **صفحه**

شکل۳-۳ الکتروفورز محصولات حاصل از PCR با پریمرهای *omp1* بر روی ژل آگارز ۶۷
شکل ۳-۴ نمودار مربوط به شیوع عفونت با کلامیدیا پنومونیه به روش PCR در
دو گروه MS و کنترل ۶۸
شکل ۳-۵ تفاوت میانگین جذب نوری در دو گروه مورد بررسی در این پژوهش ۷۰
شکل ۳-۶ تعداد نمونه‌های مثبت و منفی در گروه مبتلایان به MS وگروه کنترل ۷۱

فهرست جدولها

جدول ۱-۱ نتایج مربوط به پژوهش‌های انجام شده جهت بررسی ارتباط کلامیدیا پنومونیه و MS.....۹
جدول۱ -۲ تغییرات معیار مک دونالد برای تشخیص بیماری MS ۱۵
جدول۱-۳ مکانیسمهای عوامل عفونی برای فعال سازی سلولهای T و B خود واکنشگر.....۲۳
جدول۱-۴ نسبتهای مربوط به درصد ژل آگارز به اندازهٔ قطعهٔ DNA ۳۶
جدول ۲-۱ توالی پرایمرهای کلامیدیا پنومونیه به کار رفته جهت انجام PCR برای ژن *omp1* ۵۳
جدول ۲-۲ مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR برای تکثیر ژن *omp1* کلامیدیا پنومونیه.....۵۳
جدول ۲-۳ برنامه دستگاه ترموسایکلر جهت انجام PCR با پرایمرهای ژن *omp1* کلامیدیا پنومونیه.....۵۴
جدول ۲-۴ مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR برای تکثیر ژن GAPDH انسانی ۵۴
جدول ۲-۵ توالی پرایمرهای بکار رفته برای ژن GAPDH انسانی ۵۵
جدول ۲-۶ شرایط بهینه برای انجام PCR با پرایمرهای ژن GAPDH انسانی ۵۵
جدول ۲-۷ مقادیر مورد انتظار جذب نوری کنترل‌ها و کالیبراتورها ۶۲
جدول ۳-۱ نوع بالینی MS در بیماران مورد بررسی در این پژوهش ۶۴
جدول ۳-۲ توزیع فراوانی عفونت با کلامیدیا پنومونیه در بین گروههای MS و کنترل ۶۷
جدول ۳-۳ جدول توافقی مربوط به محاسبه میزان معنادار بودن تفاوت
بین دو گروه کنترل و MS ۶۸
جدول ۳-۴ میانگین و انحراف از معیار هر یک از گروههای مورد بررسی ۷۰
جدول ۳-۵ مقایسه نتایج PCR و الایزا ۷۱

فصل اول

کلیات

۱-۱ مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس[1]، یک بیماری التهابی است که بر سیستم اعصاب مرکزی[2] اثر می‌کند و به ناتوانی حرکتی و اختلال عملکرد حواس منجر می‌شود(Al-Omaishi et al., 1999). این بیماری معمولاً بین سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی بروز می‌کند و اگر چه در اغلب موارد منجر به مرگ نمی‌شود اما بعد از آسیبهای مغزی دومین عامل ناتوانی در بالغین جوان است (McFarlin and McFarland,1982). مشخصهٔ اصلی این بیماری تخریب میلین[3] در سیستم اعصاب مرکزی است که منجر به اختلالات عصبی متعددی می‌گردد. میلین که از غشای دو لایهٔ چربی تشکیل یافته است به مانند غلافی آکسونها[4] را فرا می‌گیرد و وجود آن برای انتقال پیامهای عصبی ضروری است. میلین در عین حال که آکسون را از تأثیر فاکتورهای خارجی مخرب حفظ می‌کند، انتقال پیامهای عصبی از یک نقطهٔ سیستم اعصاب مرکزی به نقطهٔ دیگر را تقویت کرده و بهبود می‌بخشد. توجه به این نکته ضروری است که در بیماری MS این غشای میلین و سلولهای سازندهٔ آن یا الیگودندروسیتها[5] هستند که تخریب می‌شوند. سایر عوارض این بیماری نظیر از دست دادن آکسون و آتروفی[6] سیستم اعصاب مرکزی با گذشت زمان ممکن است رخ دهد. این عوارض مجموعاً می‌تواند باعث اختلالات حرکتی و اشکال در عملکرد حواس شود. علائم عصبی در بیماری MS بخاطر درگیری قسمتهای مختلف سیستم اعصاب مرکزی متنوع است. در ٪۴۵ از موارد، بیماری با یک علامت[7] شروع می‌شود که می‌توان این علامت را به آسیب محل خاصی از سیستم اعصاب مرکزی ربط داد.

---

[1] Multiple Sclerosis
[2] Central Nervous System
[3] Demyelination
[4] Axon
[5] Oligodendrocytes
[6] Atrophy
[7] Monosymptomatic

در حالی که در ٪۵۵ از موارد، شروع بیماری با چندین علامت بالینی پراکنده[1] می‌باشد (اعتمادی فر و اشتری، ۱۳۸۱) . سیر بالینی بیماری MS در بین بیماران گوناگون و در یک بیمار در زمان های مختلف متفاوت می‌باشد، اما برای جلوگیری از پراکندگی در بین منابع مختلف می‌توان فرمهای مختلف بیماری را در چهار فرم کلی به صورت تشدید یابنده- بهبودپذیر[2]، پیشرونده- اولیه[3]، پیشرونده- ثانویه[4] و پیشرونده– عود کننده[5] دسته بندی کرد (Pugliatti et al., 2006). در بیماری MS، حمله به یک دوره ای از اختلالات عصبی در بیماران اطلاق می‌گردد که حداقل ۲۴ ساعت طول بکشد. در برخی از افراد تنها یک حمله از نوع متناسب با بیماری MS مثل التهاب عصب چشم حادث می‌شود که این حالت CIS[6] گفته می شود. در بیشتر از ٪۸۰ موارد، این حالت بصورت بیماری MS توسعه پیدا می‌کنند و در کمتر از ٪۲۰ از موارد، بصورت فرآیند خود محدود شونده باقی می‌مانند. امروزه معیار مک دونالد برای تشخیص بیماری MS استفاده می‌شود که با تمرکز بر علائم بالینی داده‌های آزمایشگاهی و رادیولوژیک تعریف می‌شود. این معیار در سال ۲۰۰۱ توسط یک هیأت بین المللی و مرتبط با انجمن ملی MS در امریکا ابداع شد. این معیار جدید با استفاده از تکنیکهای پیشرفتهٔ ام. آر.آی[7] تشخیص بیماری را در بیمارانی که علائم مشخص دارند تسهیل می‌کند که این شامل افراد با بیماری تک علامتی، بیماران با حالت تشدید یابنده- بهبودپذیر و افراد با بیماری پیشرونده وبدون حملات مکرر می‌شود (McDonald et al ., 2001). برای تعیین میزان ناتوانی ایجاد شده در این بیماری نیز چندین معیار وجود دارد که رایج‌ترین آنها معیار کورتزکه[8] است. در این مقیاس به درجهٔ ناتوانی[9] حاصل از هر کدام از قسمتهای عملکرد دستگاه عصبی درجهٔ خاصی تعلق می‌گیرد وبه این ترتیب میزان ناتوانی کلی در بیماری به ۲۰ درجه (۱۰ ،.....، ۰،۰/۱، ۱، ۵/۵) تقسیم می‌شود (Kurtzke, 1983a). شیوع بیماری MS با عرض جغرافیایی تغییر می‌کند. در نواحی جنوبی اروپا و جنوب ایالات متحده تقریباً یک نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر به این بیماری مبتلا می‌شود در حالی که در کانادا، اروپای شمالی و شمال ایالات متحده شمار مبتلایان به ۳۰ تا ۸۰ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌رسد. افزایش شیوع بیماری با عرض جغرافیایی به خوبی بررسی و اثبات شده است. مطالعات مرتبط با مهاجرت نشان می‌دهد احتمال ابتلا به MS در افرادی که پیش از سن پانزده سال مهاجرت کرده‌اند تحت تأثیر محل جدید

---

[1] Polysymptomatic
[2] Relapsing Remitting(RR-MS)
[3] Primary Progressive(PP-MS)
[4] Secondary Progressive(SP-MS)
[5] Progressive Relapsing(PR-MS)
[6] Clinically Isolated Syndrome
[7] Magnetic Resonance Imaging(MRI)
[8] Kurtzke
[9] Expanded Disability Status Score(EDSS)

سکونت آنها یا محیطی که به آن مهاجرت کرده‌اند قرار می‌گیرد اما مهاجرت پس از پانزده سالگی تأثیری بر احتمال ابتلای فرد ندارد و ریسک ابتلای فرد مهاجر تابع منطقه زادگاه اوست. این یافته ها نقش عوامل محیطی را در بروز MS ثابت می‌کند. با این حال نقش عوامل ژنتیکی در ابتلا به این بیماری را نمی‌توان در نظر نگرفت(Adams and Maurice, 1993). مطالعات جمعیتی خانواده نشان می‌دهد که تقریباً ٪۱۵ بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس در بین اعضای خانواده خود یک فرد مبتلا به این بیماری دارند و خویشاوندان درجهٔ اول افراد مبتلا به MS به طور تقریبی ۵۰ -۲۰ برابر از خطر بالاتری برای ابتلا به این بیماری برخوردارند(Dyment, 2004; McFarland, 1992). علی رغم پیشرفتهای چشمگیر در بررسی عوامل ژنتیکی و بکارگیری روش‌های پیشرفته در بررسی ژنوم، جستجو برای یافتن ژنهای مشخصی که در بروز بیماری MS نقش اصلی دارند هنوز تا حدود زیادی ناکام مانده است(Sospedra and Martin, 2005). اما مطالعاتی که تا کنون انجام شده، نقش یک یا چند ژن مستعد بر روی کروموزوم 6p21 انسانی را در ناحیهٔ کمپلکس سازگاری نسجی اصلی[1] مشخص می‌کند(Hillert et al.,1993; Haines et al., 1998). ترکیب سلولی مغز و سلولهای نفوذ کننده به مایع مغزی- نخاعی[2]بیماران و داده‌های حاصل از مدلهای انسفالومیلیت اتوایمیون تجربی [3](EAE)، نظریهٔ مربوط به خود ایمن بودن این بیماری را تأیید می‌کنند(Zamvil and Steinman, 1990). EAE مدل حیوانی بیماری MS است که اغلب در حیواناتی مانند موش از طریق تزریق آنتی ژنهای طبیعی میلین اعصاب ایجاد می‌گردد (خلیلی و همکاران، ۱۳۸۶). تزریق اجزای میلین به حیوانات مستعد می‌تواند منجر به بیماری خودایمن وابسته به سلولهای CD_4^+ T مشابه با آنچه در MS دیده می‌شود،گردد و می توان این مدل را به اشکال اکتسابی از طریق سلولهای CD_4^+ T از حیوانات دارای علائم به حیوانات مستعد منتقل نمود(Martin et al., 1992; Zamvil and Steinman,1990). نقش سلولهای T CD_4^+ در این بیماری را بطور غیر مستقیم بوسیلهٔ این حقیقت که مولکولهای HLA Class II خاصی بعنوان مهمترین عامل خطر ساز ژنتیکی در این بیماری محسوب می‌شوند، می‌توان اثبات کرد. در واقع از دیدگاه ایمنی شناسی، پدیده آغازین در بیماری MS هنوز شناخته شده نیست اما پژوهش‌های صورت گرفته در سالهای اخیر نقش سلولهای Th17 را در بروز این بیماری نشان می‌دهد. این دیدگاه با مشاهدهٔ سطح افزایش یافتهٔ IL-17[4] و IL-23[5] در CSF بیماران مبتلا به MS، قوت می‌یابد (Hannigan et al, 2009). سلولهای Th-17 از

[1]Major Histocompatibility Complex(MHC)
[2]Cerebrospinal fluid(CSF)
[3]Experimental Autoimmune Encephalitis(EAE)
[4]Interleukin-17
[5]Interleukin-23

سلولهای CD_4^+ T در حضور IL-6[1] و TGF-β[2] متمایز می‌شوند(McGeachy et al., 2009). یکی از ویژگیهای مهم این سلولها توانایی بالای آنها در القای تولید سایتوکاینهای[3] جذب کنندهٔ نوتروفیلها، نظیر CXCL1[4] و CXCL2[5] در انواع گوناگونی از سلولهاست (Kolls and Linden, 2004). نوتروفیلها نفوذپذیری عروق را در سیستم اعصاب مرکزی تحت تأثیر قرار می‌دهند. پژوهش‌ها در این باره نشان می‌دهد که واکنش بین سایتوکینهای نام برده و گیرندهٔ مخصوصشان یا CXCR2[6] برای تخریب سد خونی-مغزی ضروری است و باعث بروز علائم EAE در موشهای ایمیونیزه می‌شود(Carlson et al., 2008). در MS وجود ژنهای خاص HLA-DR ، DQ ریسک ابتلا به این بیماری را افزایش می‌دهند. هاپلوتیپ HLA-DR 15 در بین سفید پوستان و همچنین ژنهای دیگر HLA-DR در جمعیتهایی با نژادهای دیگر در بروز MS نقش دارند(Barcellos et al., 2003). علاوه بر عوامل ژنتیکی نقش عوامل محیطی در بروز این بیماری بسیار حائز اهمیت است. تفاوت میزان شیوع بیماری در مناطق جغرافیایی گوناگون، انطباق میزان شیوع این بیماری در فرزندان مهاجران با میزان شیوع در منطقهٔ جدید سکونت، میزان تطابق کمتر از ٪۱۰۰ در دو قلوهای همسان از نظر ابتلا به MS و سرعت تغییر در میزان شیوع این بیماری که با عوامل ژنتیکی قابل توجیه نمی‌باشد(Elian et al., 1990, Kurzte, 1995, Adams and Maurice., 1993). با توجه به این که تعداد زنان مبتلا به بیماری MS نسبت به مردان ۲-۱/۶ برابر است، لذا تغییرات هورمونی می‌تواند بعنوان یک عامل محیطی و غیر عفونی مؤثر در ابتلای به این بیماری در نظر گرفته شود. عود کمتر بیماری در دوران بارداری و بازگشت مجدد علائم آن پس از پایان این دوره و همچنین شدت یافتن بیماری در دورهٔ عادت ماهیانه از دلایل اثبات نقش عوامل هورمونی در بروز و شدت یافتن این بیماری هستند (Runmarker and Anderson, 1995). از دیگر عوامل غیر عفونی مؤثر در بروز MS، کاهش نور خورشید بر مبنای عرض جغرافیایی است. به نظر می رسد که اشعهٔ فرابنفش خورشید می‌تواند از طریق اثر بر سلولهای تنظیم کننده ایمنی یا بیوسنتز ویتامین D در جلوگیری از بیماری نقش داشته باشد (Hayes, 1997). پژوهش‌های دیگری نوعی ارتباط بین بیماری MS و میزان چربی موجود در رژیم غذایی را نشان داد (Swank., 1950). همچنین مشخص شده است که چربی اشباع شدهٔ حیوانات می‌تواند در بروز بیماری نقش داشته باشد ومیزان کمتر چربی در رژیم غذایی می‌تواند علائم بیماری و

---

[1] Interleukin-6
[2] Transforming Growth Factor
[3] Cytokines
[4] (C-X-C) Ligand1
[5] (C-X-C) Ligand2
[6] CXC- Receptor

مرگ ومیر ناشی از آن را کاهش دهد (Swank.,1991). عفونتهای ویروسی و باکتریایی نیز بعنوان عوامل محیطی، می توانند بعنوان گزینه هایی منطقی در سبب شناسی بیماری مطرح شوند. سبب شناسی برخی بیماریهای ویروسی در انسان مانند لوکوانسفالوپاتی چند کانونی پیشرونده که به وسیله پاپوویروس[۱] ایجاد می‌شود ویا SSPE[۲] که توسط ویروس سرخجه ایجاد می‌گردد، می‌تواند تأیید کننده نقش ویروسها در ایجاد MS باشند (Johnson., 1994; Soldan and Jacobson., 2001). البته بیماری MS چنان پیچیده است که شناسایی یک میکرواورگانیسم منفرد بعنوان تنها عامل بیماری تاکنون میسر نشده‌است و در نتیجه، قانون کخ[۳] مبنی بر یک اورگانیسم- یک بیماری در مورد MS صدق نمی‌کند (Kamrad and Mitchison, 2001; Sospedra and Martin 2005). لازم به ذکر است که این پاتوژنها می‌توانند میکرواورگانیسمهایی باشند که در جمعیت عادی از شیوع بالایی برخوردارند (Sospedra and Martin, 2005). مکانیسم‌های متعددی برای توضیح چگونگی القا و تشدید MS توسط عوامل عفونی پیشنهاد شده‌است. فعال شدن وگسترش کلنی هایی از سلولهای خودواکنشگر[۴] در ایجاد بیماریهای خودایمن مانند MS، یک مرحله اساسی محسوب می‌شود (Wucherpfenning, 2001). از میان ساز و کارهای ارائه شده، مکانیسم تقلید مولکولی[۵] و همچنین فعال سازی فرعی[۶] بعنوان دو مکانیسم اصلی پیشنهاد شده برای القای MS توسط عوامل عفونی محسوب می‌شوند و البته گروهی نیز پیشنهاد می‌کنند که ترکیبی از این دو ساز و کار باعث القای این بیماری می‌گردد (Sospedra and Martin, 2005). تقلید مولکولی بصورت فعال شدن سلولهای T و B به وسیله شاخص‌های آنتی ژنی و یا پپتیدهای مشابه یا مشترک بین آنتی ژنهای خودی و عوامل عفونی تعریف می‌شود. گرایش[۷] متوسط سلولهای T در طول دوران گزینش در تیموس[۸] منجر به رخ داد پدیده‌ای به نام انتخاب مثبت و انتقال آنها به خون محیطی می‌شود. واکنش متقابل این سلولها، با آنتی ژنهای بیگانه می‌تواند سبب فعال شدن آنها در خلال عفونت شود. سلولهای فعال شده می‌توانند از سد خونی-مغزی[۹] عبور کنند و به سیستم اعصاب مرکزی نفوذ نمایند و اگر این سلولهای فعال، آنتی ژن بیان شده در مغز را شناسایی کنند، آسیب بافتی صورت گرفته و بیماری های خود ایمن نظیر MS بوجود می‌آید(Sospedra and Martin, 2005). در ابتدا، پژوهشها با این دیدگاه انجام شده‌است

---

[1] Papova Virus
[2] Subacute sclerosing panencephalitis(SSPE)
[3] Koch
[4] Self Reactive
[5] Molecular Mimicry
[6] Bystander Activation
[7] Affinity
[8] Thymic Selection
[9] Blood-Brain Brrier

که واکنش ایمنی سلولی و هومورال تا حد بسیار زیادی اختصاصی است و برای تقلید مولکولی هومولوژی کاملی بین پروتئین پایهٔ میلین وپروتئین خارجی نیاز است. گرچه مثالهایی از هومولوژی کامل برای پروتئین پایهٔ میلین و ویروسها گزارش شده‌است ولی مطابقت کامل توالی، یک رویداد نادر و کمیاب است (Tejada-Simon et al., 2003; Evavold et al., 1993) اما مطالعات بعدی نشان دادکه برای شناسایی یک پپتید توسط سلولهای T برخی از جایگاه های اسید آمینه از اهمیت بیشتری برخوردارند و تنها اگر تماس بین TCR[1] و MHC ایجاد شود، این شناسایی صورت می‌گیرد(Ohashi et al., 1991). ساز و کار فعال شدن فرعی می-تواند در ۲ بخش دسته بندی شود. شامل فعال شدن مستقل از TCR سلولهای T خود واکنشگر توسط سایتوکاینهای پیش التهابی[2]، سوپر آنتی ژنها و فعال شدن TLR[3] می‌باشد. دومین بخش شامل نمایان شدن آنتی ژنهای میزبان یا خودی و اثر ادجوانتی عوامل عفونی بر روی سلولهای عرضه کنندهٔ آنتی ژن است(Sospedra and Martin, 2005). به عنوان مثال واکنش متقابل LPS[4] با TLR-4 امکان دارد در MS و در حین عفونت با باکتریهایی مانند کلامیدیا پنومونیه[5] اتفاق افتد و باعث فعال شدن مونوسیتها ومیکروگلی[6] گردد و همچنین سبب فعال سازی سلولهای T خود واکنشگر در سیستم محیطی گردد (Waldner et al, 2004). پدیدار شدن و عرضه آنتی ژنهای خودی به دنبال آسیب بافتی ناشی از عفونتهای ویروسی نمونه دیگری از ساز و کار فعال شدن فرعی است. لنفوسیتهای T فعال شده بر اثر عفونت ویروسی وارد بافت دچار عفونت می‌گردند، در این مکان اپی توپهای[7] ویروسی را مورد شناسایی قرار می‌دهند و سلولهای آلوده را از بین می‌برند. از بین رفتن سلولهای آلوده منجر به تخریب بافت خودی وآزاد سازی آنتی ژنهای خودی می‌گردد. نمایان شدن آنتی ژنهای خودی همراه با اثر ادجوانتی عوامل عفونی منجر به فعال شدن سلولهای T خود واکنشگر در محل مذکور می-شود. از بین عوامل عفونی، باکتری ها بعنوان یکی از عوامل عفونی بسیار مهم در جوامع بشری می‌توانند یکی از عوامل دخیل در بروز بیماری MS باشند. غالباً باکتری هایی که در جمعیت عادی شیوع بالایی دارند به عنوان گزینه های احتمالی برای ایجاد این بیماری در نظر گرفته می‌شوند(Sospedra and Martin, 2005). پتانسیل باکتری‌ها در تقلید مولکولی بعنوان مکانیسم مؤثر در القای MS به مراتب بیشتر از ویروسهاست(Kurtzke and Hyllestal., 1987). بنابراین با توجه به گستردگی و تنوع باکتری‌ها از یک

---

[1] T Cell Receptor
[2] Proinflammatory Cytokines
[3] Toll-like Receptor
[4] Lipopolysaccharide
[5] *Chlamydia pneumoniae*
[6] Microglia
[7] Epitope