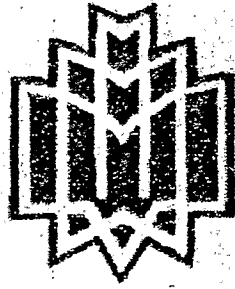




۱۲۵۷۵



دانشگاه تربیت معلم
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد سلولی - تکوینی جانوری

بررسی تاثیر زهر زنبور عسل در بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS) القاء شده
به وسیله اتیدیوم پروماید در رت های نژاد ویستار

استاد راهنما

دکتر مهناز آذرنیا

استاد مشاور

دکتر محمد نبیونی

نگارش

ساره رجبی زلتی

۱۳۸۸ / ۳ / ۲۴

شهریور ماه ۱۳۸۷

اطلاعات دراز می برد
دانشگاه

۱۲۵۷۵۲

تقدیم به

مادر فداکار

و

پدر مهربانم

که دعاهای خیرشان همواره بدرقه راه زندگیم می باشد...

تشکر و قدردانی

خداوند بزرگ را شاکرم که توفیق انجام این تحقیق را بر من میسر گردانید و از زحمات تمامی

اساتیدی که در این تحقیق راهنمایی کردند سپاسگزارم، با سپاس فراوان از

۱- استاد فرزانه سرکار خانم دکتر مهناز آذرنیا که خداوند توفیق شاگردی ایشان را در دوره

کارشناسی ارشد و نیز توفیق استفاده از راهنماییهای مدبرانه و دلسوزانه، ایشان را برای انجام

این پروژه به من ارزانی داشت.

۲- استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد نبیونی که در طول انجام پژوهش حاضر از تعالیم و

رهنمودهای سازنده خویش به بهترین نحو ممکن مرا بهره مند ساخته اند.

۳- استاد بزرگوار جناب آقای دکتر کاظم پریور که بنده را با رهنمودهای خویش یاری نموده

اند و زحمت داوری پایان نامه را به عهده داشتند.

۴- سرکار خانم دکتر هما محسنی کوچصفهانی که افتخار شاگردی ایشان در دوره کارشناسی

ارشد را داشتم و همواره از راهنمایی ایشان بهره مند شدم و همچنین با دقت نظر بی نظیر

خویش زحمت داوری پایان نامه ام را تقبل نموده اند.

۵- مدیریت محترم گروه زیست شناسی سرکار خانم دکتر شهربانو عریان کمال تشکر دارم.

۶- سرکار خانم سیده غدیره میرابوالقاسمی که در تمام مراحل اجرای طرح با راهنمایی های

دلسوزانه خود کمک فراوانی به بنده نموده اند.

۷- جناب آقای دکتر فرید ابوالحسنی مدیریت محترم گروه آناتومی دانشگاه تهران که همواره

در انجام این پروژه مرا مورد لطف و محبت خود قرار دادند.

۸- جناب آقای دکتر مسعود حمادی از دانشکده جنین شناسی دانشگاه تهران که با همکاری صمیمانه خود در تمام مراحل یاری نمودند.

۹- جناب آقای دکتر محمد جوان مدیریت محترم گروه فیزیولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که همکاری لازم را در جهت انجام این پروژه داشتند.

۱۰- جناب آقای امین شرافت و سرکار خانم صبا مظفری از دانشکده فیزیولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که با راهنمایی های بی دریغانه خود در تمام مراحل انجام پروژه کمک شایانی به بنده نمودند.

۱۱- سرکار خانم فرزانه دکتر نجفی و خانم زهره شریف خدایی که در انجام کارهای آماری کمک شایانی به بنده نموده اند.

۱۲- از دوست صمیمی و همیشه مهربانم سرکار خانم الهام حویزی و سمیه ابراهیمی که در تمام مراحل طول تحصیل و در تمام لحظات انجام پروژه همیشه در کنارم بودند صمیمانه سپاسگزارم.

۱۳- و از خواهران و برادر عزیزم که همواره مشوقین اصلی در تمام مراحل تحصیلی ام بوده اند بی نهایت متشکرم.

۱۴- سپاس فراوان دارم از تمامی دوستان عزیزم که در تمام مراحل انجام کار مشوق و یاریگر من بودند: خانم ها اعظم آقا رحیمی، هانیه جلالی، مریم رحیمی، آقایان حامد ادهم، علی طوسی، محمد ناجی، امیر ربیعی، حسین بهبودی، غلامرضا عسگر تهرانی، کیوان حاجی آقا پور

و...

چکیده:

بررسی تاثیر زهر زنبور عسل در بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS) القاء شده به وسیله اتیدیوم بروماید در رت های نژاد ویستار

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یکی از بیماری های دمیلینه کننده التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) است. دمیلینه شدن یک مشخصه کلاسیکی بیماری MS می باشد. دمیلینه شدن توکسیک به وسیله ی اتیدیوم بروماید (EB) یکی از رایج ترین مدل های کاربردی برای کشف ظرفیت جبرانی سیستم عصبی مرکزی است. در مطالعه اخیر نقش الیگودندروسیت های بالغ در رمیلینه شدن پس از القاء با اتیدیوم بروماید که سبب دمیلینه شدن در ساقه مغز رت های ویستار شد صورت گرفت و سپس تاثیر سم زنبور عسل (BV) بر آن مورد بررسی قرار داده شد. سم زنبور درمانی به صورت گسترده ای علیه بیماری MS مورد استفاده قرار گرفت، ولی هنوز اثرات BV به درستی شناخته نشده است. مواد متشکله در سم زنبور (شامل ملیتین، فسفولیپاز A₂، آپامین، هیستامین، هیالورونیداز و...) فعال سازی سلول های لنفوسیت B و T را مهار کرده و نهایتاً سبب کاهش التهاب می گردد. ترکیبات آلرژیکی اولیه سم زنبور هیستامین و فسفولیپاز A₂ تولید اینترلوکین ۱۰ را به وسیله سلول های Th-۲ القاء کرده و تکثیر سلول های T را سرکوب می کند. مطالعات انجام شده پیشنهاد می کنند که ویژگی های ضد التهابی و آنالژزیک سم زنبور مربوط به تعدیل سازی فعالیت آدرنورسپتور نوروترنسمیشن سروتونرژیک است. در این مطالعه از ۲۰ سر رت نژاد ویستار نر با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. رت ها به ۴ گروه تقسیم شدند و به همه گروهها تزریق ۱۰ میکرولیتر EB ۰/۱۵٪ و یا سالین ۰/۹٪ به ترتیب به عنوان گروه تجربی و شم به ناحیه سیسترنای مگنا به کمک دستگاه

استریوتاکسی تزریق شد. پس از ۱۳ روز از تزریق اولیه سم زنبور به مدت ۱۰ روز به صورت درون صفاقی به گروه تجربی تزریق شد. حیوان ها در روزهای ۹، ۱۳ و ۲۷ پس از تزریق اولیه کشته شدند و ساقه مغزی آنها جمع آوری و جهت تهیه مقاطع بافتی و مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شدند. نتایج شمارش سلول های الیگودندروسیت با برنامه SPSS و آنالیز آماری با روش ONE WAY ANOVA تجزیه و تحلیل شد و نمودارها با برنامه نرم افزاری EXCEL رسم گردید. و P Value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج بررسی با میکروسکوپ نوری تاثیر مثبت سم زنبور عسل در مهاجرت سلولهای پروژنیاتور الیگودندروسیت به مناطق واکوتله را نشان داد. در این مطالعه مشاهده شده که BV یک تاثیر مثبت روی آکسون هایی که میلین را از دست داده اند در جهت رمیلینه شدن داشته است، بدین معنی که سم زنبور با کاهش التهاب در مناطق آسیب دیده می تواند سبب افزایش تعداد سلول های الیگودندروسیت و افزایش ضخامت میلین در آکسون های آسیب دیده شود.

واژه های کلیدی: مولتیپل اسکروزیس، اتیدیوم بروماید، تخریب میلین، میلین سازی، ترمیم، زهر زنبور عسل، القاء شیمیایی MS

فهرست مطالب

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۱	مقدمه
۲	۱-۱- دستگاه عصبی مرکزی
۲	۱-۲- بافت شناسی دستگاه عصبی مرکزی
۳	۱-۲-۱- آستروسیت ها
۳	۱-۲-۲- الیگودندروسیت
۳	۱-۲-۳- میکروگلیا
۴	۱-۲-۴- سلول های اپاندیم
۵	۱-۳- تنظیم مولکولی تکوین سلول های عصبی
۱۰	۱-۴- ساختار میلین (Myelin)
۱۱	۱-۴-۱- ترکیبات میلین
۱۲	۱-۵- مکانیسم های میلین سازی در سیستم عصبی
۱۳	۱-۶- مراحل و زمان بندی میلینه شدن
۱۵	۱-۷- سیگنال های درگیر در میلینه شدن CNS
۱۵	۱-۸- دمیلینه شدن Demyelination (از دست رفتن میلین)
۱۶	۱-۹- بیماری مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis MS)

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۱۶	۱-۹-۱- تاریخچه
۱۷	۱-۹-۲- تعریف
۱۸	۱-۹-۳- پاتولوژی MS
۲۱	۱-۱۰- مدل های تجربی دمیلینه شدن در حیوانات آزمایشگاهی
۲۱	۱-۱۰-۱- مدل ویروسی Viral
۲۲	۱-۱۰-۲- مدل توکسیک Toxic
۲۲	۱-۱۰-۳- مدل اتوایمن EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)
۲۳	۱-۱۱- ریمیلینه شدن Remyelination
۲۶	۱-۱۲- اتیدیوم بروماید
۲۷	۱-۱۲-۱- مکانیسم عمل اتیدیوم بروماید
۲۸	۱-۱۳- سم زنبور عسل
۲۸	۱-۱۳-۱- مشخصات سم زنبور
۲۹	۱-۱۳-۲- خواص پروتئین های سم زنبور عسل
۳۰	۱-۱۳-۳- خواص پپتیدهای سم زنبور عسل
۳۲	۱-۹- اهداف تحقیق

فصل دوم

۳۳	مواد و روش ها
۳۴	۲-۱- مواد مورد نیاز

۲-۲- وسائل مورد نیاز	۳۵
۲-۳- طرح کلی پروژه تحقیقاتی	۳۶
۲-۴- حیوانات آزمایشگاهی و دلایل انتخاب آنها	۳۶
۲-۵- چگونگی تهیه محلول اتیدیوم بروماید	۳۷
۲-۶- روش جراحی جهت تزریق محلول اتیدیوم بروماید و سالیین به مغز	۳۸
۲-۷- تعیین LD ₅₀ سم زنبور عسل در رت های مورد آزمایش	۳۹
۲-۸- تشریح رت ها و فیکس کردن نمونه	۳۹
۲-۹- مراحل آماده سازی نمونه ها جهت پروسه هیستوتکنیک	۴۶
۲-۹-۱- آبگیری و شفاف سازی نمونه ها	۴۶
۲-۹-۲- حمام پارافین و قالب گیری نمونه ها	۴۶
۲-۹-۳- برش برداری	۴۶
۲-۹-۴- پهن کردن نوار های پارافینی روی لام	۴۷
۲-۹-۵- رنگ آمیزی	۴۷
۲-۱۰- روش های ساخت محلول های رنگ آمیزی	۴۷
۲-۱۱- روش ساخت محلول های رنگ آمیزی لوکسال فست بلو	۴۸
۲-۱۲- نحوه شمارش سلول های الیگودندروسیت	۵۱
۲-۱۳- آنالیز آماری	۵۱

فصل سوم

- نتایج ۵۲
- ۳-۱- نتایج تاثیر اتیدیوم بروماید بر بافت عصبی ۵۳
- ۳-۲- نتایج تاثیر اتیدیوم بروماید بر سلول های الیگودندروسیت در روز ۹ ۶۰
- ۳-۳- نتایج برگشت سلول های الیگودندروسیت در شروع رمیلینه شدن در روز ۱۳ ۶۱
- ۳-۴- نتایج رمیلینه شدن خود به خودی در گروه تجربی بدون سم زنبور عسل در روز ۲۷ ۶۲
- ۳-۵- نتایج تاثیر سم زنبور عسل بر تعداد سلول های الیگودندروسیت در روند رمیلینه شدن در روز ۲۷ ۶۳
- ۳-۶- نتایج حاصل از مقایسه بین گروه تجربی با سم زنبور عسل و بدون سم زنبور عسل در روز ۲۷ ۶۵

فصل چهارم

- بحث و تفسیر ۶۷
- ۴-۱- انتخاب روش ایجاد بیماری ۶۹
- ۴-۲- استفاده های بیولوژیکی اتیدیوم بروماید EB ۶۹
- نتیجه گیری کلی ۸۰
- پیشنهادات ۸۱

فصل پنجم

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۸۲	منابع
۸۳	منابع فارسی
۸۵	منابع انگلیسی

فصل اول

مقدمه

۱-۱- دستگاه عصبی مهره داران

دستگاه عصبی مهره داران شامل دو بخش است: دستگاه عصبی مرکزی (Central Nervous System (CNS) و دستگاه عصبی محیطی (Peripheral Nervous System (PNS). دستگاه عصبی مرکزی شامل مغز و طناب نخاعی است که در دنباله مغز قرار دارد. دستگاه عصبی محیطی شامل اعصاب مغزی و اعصاب نخاعی می باشد. دستگاه عصبی مرکزی که از نورون ها و سلول های گلیایی تشکیل شده است درون پوشش استخوانی جای دارد به طوری که مغز درون استخوان های جمجمه و طناب نخاعی درون حفره ستون مهره ها قرار دارند (رستمی و نورجاه، ۱۳۷۸).

۱-۲- بافت شناسی دستگاه عصبی مرکزی (CNS)

از نظر ساختمانی بافت های عصبی از دو گروه سلول تشکیل می شود: سلول های عصبی یا نورون ها که دارای استتاله های بلند و متعددی هستند و چندین نوع سلول گلیال یا نورگلی (Neuroglia) که نورون ها را تقویت و محافظت کرده و در فعالیت های عصبی و فرایندهای دفاعی دستگاه عصبی مرکزی شرکت می جویند. بین انواع متعدد نوروگلی ها، اختلاف عملکردی مورفولوژیک به چشم می خورد که در شکل ۱-۱ نشان داده شده است. انواع متعدد نوروگلیا عبارتند از: آستروسیت ها (Astrocytes)، الیگودندروسیت ها (Oligodendrocytes)، میکروگلیا (Microglia)، و سلول های اپاندیمی (Ependymal cells) (Ling, 1973).

۱-۲-۱- آستروسیت ها

آستروسیت ها بزرگترین نوروگلیاها هستند و استتاله های بلند و فراوانی دارند. این سلول ها دارای هسته ای کروی، مرکزی و کم رنگ هستند. سلول های ستاره ای شکل هستند که به وسیله زائده های پنجه ای با رگ های خونی مغز ارتباط دارند. این سلول ها علاوه بر محافظت از سلول های مغز در ایجاد سد خونی-مغزی که مانع گذشتن مواد نامطلوب خون به مغز می شود شرکت دارند (Peters et al., 1976).

۱-۲-۲- الیگودندروسیت ها

نوع دیگری از سلول های پشتیبان که احتمالاً از گلیابلاست ها مشتق می شوند، سلول های الیگودندروسیت ها هستند. این سلول ها از آستروسیت ها بسیار کوچکترند و استتاله های آنها نیز کمتر و کوتاهتر از سایر نوروگلیا ها هستند، هسته این سلول ها کوچکتر و پررنگ تر از هسته آستروسیت ها می باشد (شکل ۱-۱). در میلینه کردن فیبر عصبی در ماده سفید سیستم عصبی مرکزی دخالت دارند و از نظر عملکرد همانند سلول های شوان اعصاب محیطی هستند با این تفاوت که در میلینه کردن بیش از یک آکسون شرکت می جویند (Strangel and Hartung, 2002 ; Baumann and Pham-Dinh, 2001).

۱-۲-۳- میکروگلیا

در نیمه دوم تکامل جنین انسان نوع سومی از سلول های پشتیبان بنام سلول میکروگلیال در CNS تشکیل می شود. این سلول ها دارای قدرت بیگانه خواری زیادی هستند و از مزانشیم

به وجود می آیند. این سلول ها فرمی از ماکروفاژ ها هستند که بعد از آسیب سیستم عصبی

نقشی در فاگوسیتوز دارند (Peters et al., 1976).

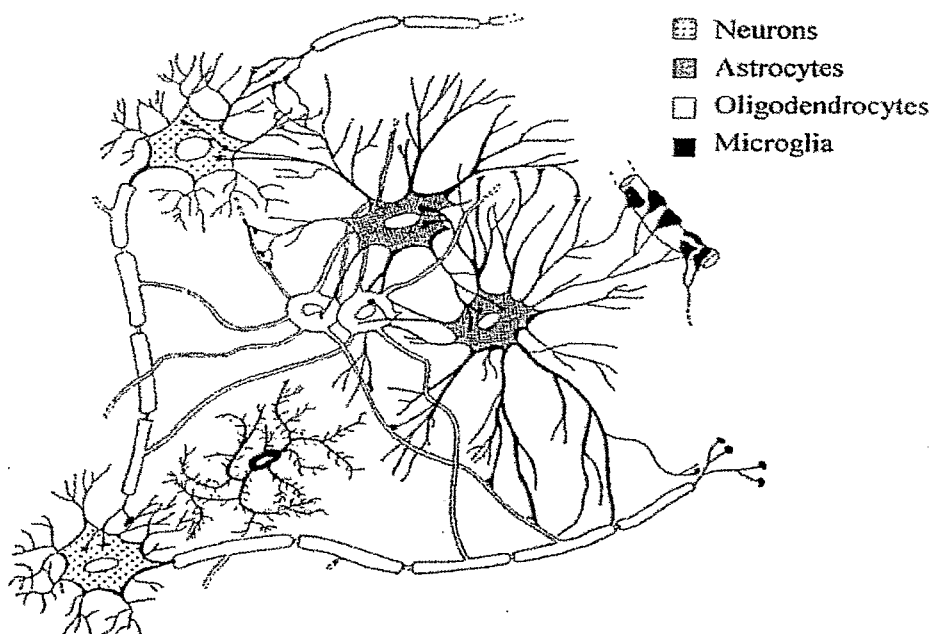
۴-۲-۱- سلول های اپاندیمی

هنگامی که تشکیل نوروبلاست ها از سلول های نوروایی تلیال تمام می شود سلول های

نوروایی تلیال به سلول های اپاندیمال تبدیل می شوند این سلول ها سطح داخلی کانال مرکزی

نخاع و همچنین حفره های مغز را می پوشانند و در ترشح مایع مغزی-نخاعی CSF نقش

دارند (سادلر، ۱۳۷۹).



شکل ۱-۱: تصویر انواع مختلف سلول های گلیال در CNS و ارتباطات متقابل میان خود و با

نورون ها. آستروسیت ها سلول های ستاره ای با زواید متعدد هستند، الیگودندروسیت ها نیز سلول

های سازنده میلین در CNS می باشند یک سری اعمال متقابل بین سلول های گلیال به خصوص بین

آستروسیت ها در CNS صورت می گیرد که یک شبکه گلیالی را شکل می دهد (Baumann and

Pham-Dinh, 2001).

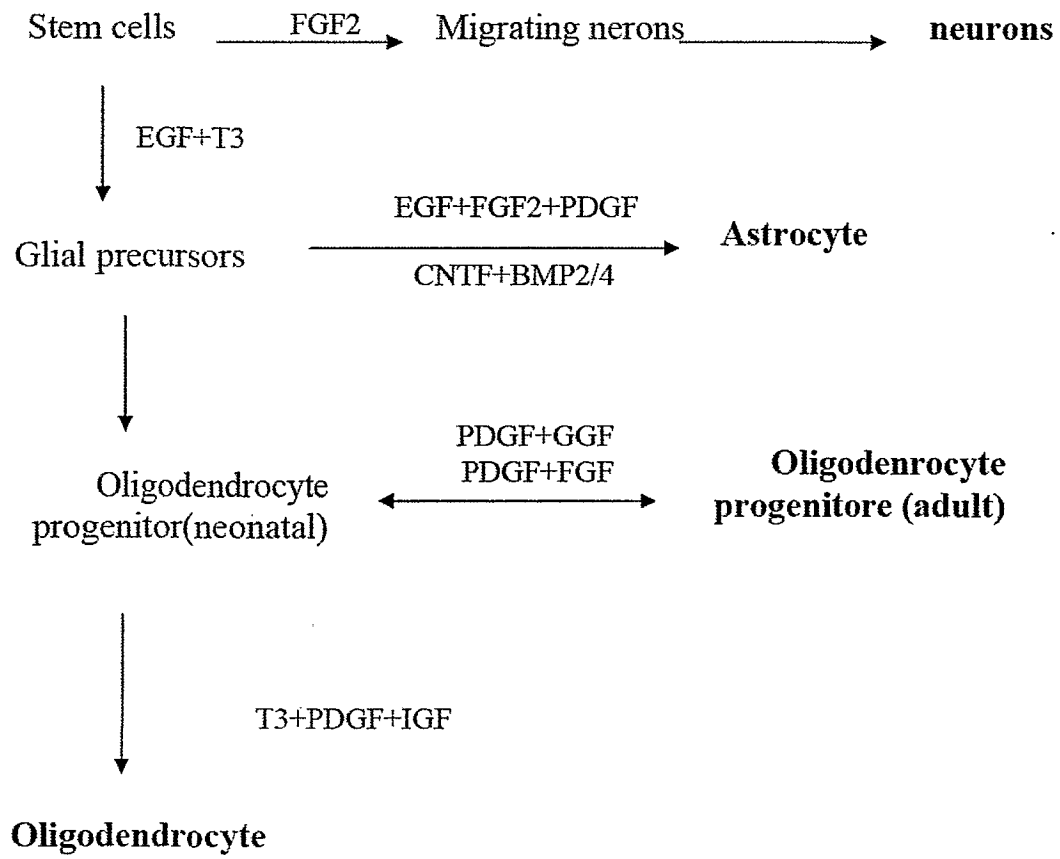
۱-۳- تنظیم مولکولی تکوین سلول های عصبی

سلول های بنیادی عصبی (neural stem cells) موجود در نوروایپ تلیوم در زمان های خاصی از رشدونمو جنین رت تکثیر می یابند و به سلول های تخصص یافته عصبی تمایز می یابند به طوری که در روزهای ۱۰-۱۲ از رشدونمو جنینی سلول های بنیادی عصبی در ناحیه subventricular zone (SVZ) به فاکتور رشد میتوزنیک (fibroblast growth factor) FGF2 پاسخ می دهند و تکثیر می یابند که ابتدا منجر به تولید نورو ن های مهاجر (migrating neurons) و سپس در اثر فاکتور رشد نورو تروفین ها به نورو ن های بالغ تمایز می یابند (Cayre et al., 2006 ; Castro and Bribia, 2005).

در جنین رت ۱۵ یا ۱۶ روزه سلول های بنیادی در ناحیه SVZ به EGF حساس می شوند. EGF (epidermal growth factor) (فاکتور رشد اپیدرمی) یک پلی پپتید به وزن ۶۰۴۵ دالتون است که باعث تحریک تقسیم سلولی از طریق اتصال به گیرنده های تیروزین کینازی به خصوصی در سطح غشاء سلول می شود و فعالیت تیروزین کیناز رسپتور را افزایش می دهد، سپس با کمک هورمون های تیروئیدی سبب تمایز پیش سازهای گلیال خواهد شد. پیش ساز های گلیال به طرف ماده سفید و کورتکس مهاجرت می کنند و در جنین ۱۸-۱۷ روزه تحت یک سری فاکتورهای رشد میتوزنی (platelet driven growth factor) FGF2 + EGF + PDGF و همچنین فاکتورهای القایی BMP2/4 (bone morphogenetic protein) و CNTF (ciliary neurotrophic factor) آستروسیت ها را تولید می کند (Stankoff et al., 2002).

پیش سازهای گلیال در روزهای ۲۱-۱۹ از رشدونمو جنینی سلول های OPCs (oligodendrocyte progenitors) یا سلول های الیگودندروسیت تیپ ۲ آستروسیت (0-2 A) را تولید می کند. این سلول ها همزمان تمایز نمی یابند، تعدادی از این سلول ها در اثر فاکتورهای رشد PDGF، IGF-1، فاکتور رشد شبه انسولین (insulin like growth factor) و هورمون های تیروئیدی تکثیر و تمایز یافته و به سلول های الیگودندروسیت که سازنده میلین در سیستم عصبی مرکزی هستند تبدیل می شوند. تعدادی دیگر از سلولهای OPCs به صورت تمایز نیافته و به فرم بالغ درآمده و در زمان خاصی از رشدونمو در اثر فاکتورهای رشد میتوژنیک PDGF+GGF به فرم نوزاد (neonatal) در آمده و با کمک فاکتورهای القایی T3 و IGF-1 به سلول های الیگودندروسیت تمایز می یابد (شکل ۲-۱). آهنگ این تمایز نسبت به حالت قبلی کندتر انجام می پذیرد. کنترل تمایز توسط رسپتور notch که بر روی سلول های OPCs مستقر است صورت می گیرد، تحریک شدن این گیرنده تمایز سلول های OPCs را به سلول های الیگودندروسیت مهار می کند. به نظر می رسد الیگودندروسیت های تمایز یافته خود اثر مهاری روی سلول های OPCs دارند و از تکثیر و تمایز آنها جلوگیری می کنند، این عمل به وسیله بیان ژن jagged موجود در سلول های الیگودندروسیت ها صورت می گیرد. وقتی که میزان بیان ژن jagged در سطح پایین باشد رسپتورهای موجود در سطح سلول های OPCs تحریک نمی گردند و این سلول ها با حضور فاکتور های القایی به سلول هایی القایی الیگودندروسیت تمایز می یابند. مکانیسم این عمل به طور دقیق شناخته نشده است

(Simons & Trajkovic, 2006 ; Rogister et al., 1999).



شکل ۱-۲- نحوه تمایز سلول های عصبی و سلول های گلیال در حضور فاکتور های مختلف رشد در طی دوران جنینی (Register et al., 1999)

بافت نوروایپتلیوم (NE) محتوی سلول های بنیادی عصبی (Neural Stem Cell) می باشد و اعتقاد بر این است که این سلول ها هم نورون ها و هم سلول های گلایال را تولید می کنند. بنابراین مهم است که برای تولید نورون (neurogenerating) نوروایپتلیوم خزانه سلول های بنیادی را حفظ نماید. در غیر این صورت هیچ منبع پیش سازهای سلول های گلایال وجود ندارد. مهم ترین مکانیسم حفظ و نگهداری به نظر می رسد مهار جانبی به واسطه ی سیگنالینگ notch باشد. ژن های رسپتور notch در سلول های NE و لیگاندهای آنها به صورت گذرا در نورون های تازه تولید شده (نوزاد) که در حال ترک لایه NE هستند، بیان می شوند. این نورون های جوان سیگنالینگ notch سلول های مجاور را فعال کرده منجر به مهار تمایز نورونی می شوند. این گزارشات تعیین می کنند که سیگنال notch هم در مهار اولیه تمایز نورونی و هم در ارتقاء نهایی تمایز گلایال نقش دارند. از آنجایی که ژن های *olig1/2* در PNS در حال رشدونمو بیان نمی شود، یک احتمال وجود دارد که نوروگلین ۱ بیان شده در نورون های newborn با سیگنالینگ notch هماهنگ شده تا تمایز سلول های مجاور را تقویت کند (Liu et al., 2007).

به خوبی مشخص شده که سیگنالینگ notch به عنوان یک تنظیم کننده کلیدی در طی جنبه های مختلف نوروزنریز و گلیوزنریز CNS و PNS است. اولا حذف سیگنالینگ Notch سبب تولید سلول های نورونی premature و از دست رفتن GFAP-glia در منخچه می شود. ثانياً ازدست رفتن سیگنالینگ notch در طی رشدونمو گورخر ماهی منجر به افزایش تولید نورون و همراه با ازدست رفتن الیگودندروسیت ها می شود (Juryneczyk et al., 2005). همچنین مطالعات نشان داده که ATP و ADP مهاجرت OPCs را تحریک می کنند،