Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی

مقایسه تولید تومور نکروز فاکتور آلفا در منوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس با افراد سالم

استاد راهنما:

دکتر سید حمید زرکش

پژوهشگر:

مریم سادات جعفری علوی

اسفندماه ۱۳۸۹

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی

خانم مریم سادات جعفری علوی

تحت عنوان

مقایسه تولید تومور نکروز فاکتور آلفا در منوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس با افراد سالم

در تاریخ ۸۹/۱۲/۹ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر سید حمید زرکش با مرتبه‌ی علمی دانشیار	امضاء
۲- استاد داور داخل گروه	دکتر رسول روغنیان با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء
۳- استاد داور خارج از گروه	دکتر مینو ادیب با مرتبه‌ی علمی استاد	امضاء

امضای مدیر گروه

Department Of Biology

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

چکیده

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری عصبی با واسطه ایمنی است که در آن از بین رفتن میلین سلولهای عصبی روی می‌دهد و بیماری فرساینده دستگاه عصبی مرکزی (CNS) است. هیچ آنتی‌ژن هدف مخصوصی که به وسیله سیستم ایمنی بیماران MS مورد حمله قرار گیرد هنوز شناخته نشده‌است. علت بیماری MS هنوز شناخته شده نیست. عقیده بر این است که این بیماری با فاکتورهای میکروبی، ژنتیکی و یا محیطی ارتباط دارد. مولتیپل اسکلروزیس به عنوان یک بیماری با واسطه Th1 بررسی شده است. این نظریه بر اساس مطالعه آسیب های مغزی و مایع مغزی نخاعی و همچنین بررسی مدلهای حیوانی این بیماری می باشد. ثابت شده است که پاسخ های ایمنی نابجا در MS رخ می دهد و طیف سایتوکاین هایی که تولید می شود قطعاً نتیجه بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهد. سایتوکاین ها پروتئین های محلول یا گلیکوپروتئین هایی هستند که هم در واکنش های التهابی ایمونولوژیک و هم در واکنش های غیر ایمونولوژیک شرکت می کنند. سایتوکاین ها همه مراحل پاسخ ایمنی را از ابتدا تا انتهای بیماری هماهنگ می کنند. آنها به وسیله انواع سلول ها ترشح می شوند و روی سلولهایی که گیرنده مناسب سایتوکاین را بیان می کنند عمل می کنند. تومور نکروز فاکتور آلفا (TNF-α) یک سایتوکاین تنظیم کننده ایمنی است که در بیماری های التهابی معینی مثل MS و روماتوئید آرتریت (RA) دخیل می باشد. در بررسی افراد مستعد به MS، آلل های TNF که در منطقه کلاس III کمپلکس سازگار نسجی (MHC) قرار دارند به عنوان ژنهای کاندید مطالعه می‌شوند. سلولهای دودمان منوسیت/ ماکروفاژ بزرگترین منبع تولید TNF-α می‌باشند. یکی از قوی ترین محرکها برای منوسیت ها اندوتوکسین (LPS) باکتریایی است که از دیواره سلولی خارجی باکتریهای گرم منفی مشتق شده است. در پاسخ به لیپوپلی ساکارید (LPS)، منوسیت ها مقدار زیادی سایتو کاین های پیش التهابی مثل TNF-α، اینترلوکین شش (IL-6) و اینترلوکین یک (IL-1) را تولید می‌کنند. سلول هایی که این سایتوکاین را تولید می کنند در آسیب های MS شناسایی شدند و نشان داده شده که بیان تومور نکروز فاکتور آلفا در منوسیت های خون بیماران MS با فعالیت بیماری ارتباط دارد. چندین مطالعه سطوح سایتوکاین ها را در مولتیپل اسکلروزیس بررسی نموده اند که نتایج متفاوتی در بر داشته است.

لپتین یک پروتئین غیر گلیکوزیله ۱۶ کیلودالتونی است که به وسیله ژن *ob* کد می شود که روی کروموزوم ۷ انسانی و روی کروموزوم ۶ موشی قرار گرفته است. علاوه بر نقش مهم آن در اعمال فیزیولوژیکی، لپتین به عنوان یک هورمون مشابه سایتوکاین با اعمال متفاوت در تنظیم پاسخ های ایمنی شناخته شده است. بعلاوه لپتین می تواند منوسیت ها، سلول های دندریتیک و ماکروفاژها را فعال کند و آنها را برای تولید سایتوکاین نوع Th1 تحریک کند. پیشنهاد شده که این هورمون ممکن است نقشی را در تعدادی از بیماری های خود ایمن مانند MS وRA که در آنها عدم تعادل در Th1/ Th2 ایجاد می شود داشته باشد. در این مطالعه، تولید سایتوکاین پیش التهابی تومورنکروزفاکتور آلفا به وسیله منوسیت های بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم تحریک شده با LPS و لپتین مورد بررسی قرار گرفت. سنجش سایتوکاین TNF-α در داخل سلول به روش فلوسایتومتری و در پلاسما به وسیله الایزا انجام شد. در خصوص سنجش فلوسایتومتری از ۱۷ بیمار مبتلا به MS (۱۴ زن و۳ مرد) با میانگین سنی ۹/۱۲ ± ۳۴/۳۵ و ۱۷ فرد سالم (۱۴ زن و ۳ مرد) با میانگین سنی ۸/۶۸ ± ۳۱/۸۲ به عنوان نمونه کنترل، خون محیطی تهیه شد. ۱۰۰ µl خون محیطی فرد سالم یا بیمار با LPS و لپتین برای مدت زمان های متفاوت تحریک گردیدند و سپس سلول ها با پارافرمالدئید ۴٪ تثبیت

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

شدند و با ساپونین ۰/۰۵ درصد نفوذپذیر شدند. در پایان، سلول ها با آنتی بادی ضد TNF-α رنگ آمیزی شـدند و مـورد سنجش فلوسایتومتری قرار گرفتند. با توجه به آنالیز های آماری، میـانگین درصـد سـلول هـای TNF مثبـت در حالـت تحریک با لپتین در افراد مبتلا به MS (۱/۶۴±۲/۵۳) و افراد سالم (۱/۱۴±۲/۹۴) تفاوت معنی داری نداشت (P=۰/۲۶۳). همچنین شدت فلورسنت سلول ها در دو گروه اختلاف معنی داری نداشت (P=۰/۹۸۴). با مقایسه میانگین درصـد سـلول های TNF مثبت در حالت تحریک با LPS در افراد مبتلا به MS (۸/۲۱±۱۶/۸۰) و افراد سالم (۸/۲۳±۱۶/۵۲) اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P=۰/۸۵۰). شدت فلورسنت مربوط به TNF-α دو گروه بیمار و سالم نیـز دارای تفـاوت معنـی داری نبود (P=۰/۲۹۳). برای سنجش غلظت TNF-α تحریک شده توسط سلول ها در دو گروه بیمار و سالم، پلاسـمای ۱۳ بیمار مبتلا به MS و ۱۳ فرد سالم بررسی شد. خون محیطی افراد با LPS و لپتین تحریک شده و پلاسمای آنها جدا شدند و به وسیله الایزا مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان دادند که میانگین غلظت TNF-α در حالت تحریک با LPS در پلاسمای بیماران (۱۲۸۹۶/۱۵±۲۷۸۳۰) و افراد سالم (۲۳۷۸۴/۱۴±۴۰۲۱۷/۶۹) معنـی دار نبـود (P=۰/۱۹۱). در مورد پلاسمای تحریک شده با لپتـین میـانگین غلظـت TNF-α در پلاسـمای بیمـاران MS (۴۰۳/۲۳±۴۷۹/۹۳) در مقایسه با افراد سالم (۵۱۱/۶۲±۸۵۴/۰۲) به طور ضعیف معنی دار بود (P<۰/۰۵). در بخش دیگری از تحقیق آنتی بادی ضد LPS اشریشیاکلی در ۶۰ بیمار مبتلا به MS و ۶۰ فرد سالم به روش الایزا بررسی شد. با توجه به مقایسـه میـانگین ها، میزان جذب نوری مشاهده شده در بین دو گـروه بیمـار (۰/۳۹۱±۰/۷۲۲) و کنتـرل (۰/۳۸۱±۰/۶۳۳) دارای اخـتلاف معنی داری نبود (P=۰/۱۷۱). با توجه به این مشاهدات می توان نتیجه گرفت که LPS و لپتین قادر به تحریک منوسیت ها و ترشح سایتوکاین های پیش التهابی می باشند. در مورد بیماریزایی مولتیپل اسکلروزیس نمی توان نقش TNF-α را نادیده گرفت. بررسی نقش سایتوکاین های مختلف در مولتیپل اسکلروزیس نیاز به مطالعات بیشتر و دقیق تری دارد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، سایتوکاین پیش التهابی، تومور نکروز فاکتور آلفـا، لیپـوپلی سـاکارید، لپتـین، فلوسایتومتری، الایزا

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- بیماری مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۱

۱-۲- سیر بالینی بیماری---------- ۲

۱-۳- آسیب شناسی مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۴

۱-۳-۱- طبقه بندی آسیب های مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۴

۱-۴- بیماریزایی مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۵

۱-۵- علت شناسی بیماری مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۷

۱-۵-۱- فاکتورهای ژنتیکی---------- ۷

۱-۵-۲- فاکتورهای محیطی ---------- ۸

۱-۶- آنتی ژن های خودی هدف در مولتیپل اسکلروزیس---------- ۹

۱-۷- پاسخ های ایمنی در بیماریزایی مولتیپل اسکروزیس ---------- ۱۰

۱-۸- سایتوکاین ها ---------- ۱۲

۱-۹- مسیرهای پیام دهی سایتوکاین ها در مولتیپل اسکروزیس ---------- ۱۳

۱-۱۰- تومور نکروز فاکتور آلفا (TNF-α) ---------- ۱۵

۱-۱۰-۱- ساختار، سایت های اتصالی---------- ۱۷

۱-۱۰-۲- موقعیت کروموزومی ژن تومور نکروز فاکتور آلفا ---------- ۱۹

۱-۱۰-۳- ارتباط بین سطوح سایتوکاین TNF-α و سیر بالینی مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۲۰

۱-۱۱- لیپوپلی ساکارید (LPS) ---------- ۲۱

۱-۱۲- رابطه باکتری ها با مولتیپل اسکلروزیس---------- ۲۳

۱-۱۳- لپتین به عنوان یک نورواندوکرین و واسطه ایمنی ---------- ۲۴

۱-۱۴- انتقال پیام لپتین در سلول های ایمنی---------- ۲۵

۱-۱۵- لپتین در ایمنی ذاتی و اکتسابی ---------- ۲۷

۱-۱۶- لپتین در خود ایمنی ---------- ۲۹

۱-۱۶-۱- لپتین در خود ایمنی مخصوص ارگان دستگاه عصبی مرکزی ---------- ۲۹

۱-۱۷- اندازه گیری سایتوکاین داخل سلولی به وسیله فلوسایتومتری ---------- ۳۰

اهداف تحقیق: ---------- ۳۲

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

اهمیت و کاربرد نتیجه‌های تحقیق: ---------- ۳۲

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری نمونه های آزمایشگاهی برای انجام فلوسایتومتری ---------- ۳۳

۲-۲- تحریک سلول های خون محیطی نمونه ها با لیپوپلی ساکارید ---------- ۳۴

۲-۲-۱- مواد و وسائل مورد استفاده ---------- ۳۴

۲-۲-۲- مراحل انجام رنگ آمیزی داخل سلولی TNF-α ---------- ۳۶

۲-۳- تحریک سلول های خون محیطی نمونه ها با لپتین ---------- ۳۸

۲-۳-۱- مواد و وسائل مورد استفاده ---------- ۳۸

۲-۳-۲- روش کار برای تحریک سلول های خون محیطی با لپتین ---------- ۳۹

۲-۴- مقایسه محلول فیکساسیون و نفوذپذیرکننده خانگی با محلولهای تجاری شرکت Dako ---------- ۳۹

۲-۵- آنالیز آماری ---------- ۴۰

۲-۶- بررسی آنتی بادی ضد لیپوپلی ساکارید در سرم بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم به روش الایزا ---------- ۴۱

۲-۶-۱- نمونه های مورد استفاده در آزمایش ---------- ۴۱

۲-۶-۲- مواد و وسائل مورد نیاز ---------- ۴۱

۲-۶-۳- مراحل انجام الایزا ---------- ۴۳

۲-۶-۴- تعیین غلظت بهینه مواد در سیستم الایزا ---------- ۴۵

۲-۶-۵- بررسی اختصاصیت سیستم الایزای طراحی شده ---------- ۴۶

۲-۷- آنالیز آماری ---------- ۴۶

۲-۸- بررسی غلظت تومور نکروز فاکتور آلفا در نمونه های پلاسمای تحریک شده و اندازه‌گیری غلظت TNF-α با استفاده از منحنی استاندارد ---------- ۴۷

۲-۸-۱- نمونه های مورد استفاده در آزمایش ---------- ۴۷

۲-۸-۲- مواد و وسائل مورد نیاز ---------- ۴۷

۲-۸-۳- مراحل انجام الایزا طبق پروتکل کیت Sanquin ---------- ۴۹

۲-۹- آنالیز آماری ---------- ۵۲

فصل سوم: نتایج

۳-۱- مطالعه جمعیت شناختی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم در بررسی فلوسایتومتری ---------- ۵۳

۳-۲- بررسی عملکرد آنتی بادی ضد TNF-α، مشخص کردن محدوده منوسیت ها و عملکرد LPS به عنوان

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

محرک منوسیت ها ---------- ۵۴
۳-۲-۱- سنجش فلوسایتومتری منوسیت های خون محیطی افراد سالم و افراد بیمار در حالت طبیعی و بدون تحریک ---------- ۵۴
۳-۲-۲- بررسی فلوسایتومتری منوسیت های تحریک شده با LPS، با استفاده از آنتی بادی ضد TNF-α، آنتی بادی کنترل منفی و بدون آنتی بادی ---------- ۵۶
۳-۲-۳- مقایسه محلول فیکساسیون و نفوذ پذیرکننده شرکت Dako و محلول خانگی (Home) به وسیله فلوسایتومتری ---------- ۵۸
۳-۳- اندازه گیری TNF-α داخل سلولی منوسیت ها در افراد مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۵۹
۳-۳-۱- سنجش فلوسایتومتری نمونه های خون محیطی تیمار شده با PBS در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم ---------- ۵۹
۳-۳-۲- سنجش های فلوسایتومتری نمونه های خون محیطی تحریک شده با LPS در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم ---------- ۶۰
۳-۳-۳- سنجش فلوسایتومتری نمونه های خون محیطی تحریک شده با لپتین در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم ---------- ۶۱
۳-۴- درصد سلول های تولید کننده TNF-α در تیمارهای متفاوت ---------- ۶۲
۳-۴-۱- بررسی توصیفی درصد منوسیت های تولید کننده TNF-α در تیمارهای متفاوت ---------- ۶۲
۳-۴-۲- مقایسه میانگین ها ---------- ۶۳
۳-۵- بررسی شدت فلورسنت منوسیت های تولید کننده TNF-α در تیمارهای متفاوت ---------- ۶۴
۳-۵-۱- بررسی توصیفی شدت فلورسنت منوسیت های تولید کننده TNF-α در تیمارهای متفاوت -------- ۶۵
۳-۵-۲- مقایسه میانگین ها ---------- ۶۵
۳-۶- بررسی غلظت TNF-αدر پلاسما ---------- ۶۷
۳-۶-۱- مطالعه جمعیت شناختی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم در بررسی غلظت TNF-α به روش الایزا ---------- ۶۷
۳-۶-۲- بررسی میزان جذب نوری نمونه های استاندارد تهیه شده با رقت های مختلف و رسم منحنی استاندارد ---------- ۶۷
۳-۶-۳- محاسبه غلظت TNF-α در نمونه های پلاسمای کنترل و بیمار با استفاده از منحنی استاندارد ----- ۶۸
۳-۶-۴- مقایسه میانگین ها ---------- ۷۰
۳-۷- بررسی سرولوژی آنتی بادی IgM ضد لیپوپلی ساکارید در سرم ---------- ۷۲
۳-۷-۱- مطالعه جمعیت شناختی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم در بررسی آنتی بادی IgM

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

ضد LPS به روش الایزا ---------- ۷۲
۳-۷-۲- میزان آنتی بادی IgM ضد LPS در نمونه های سرم ---------- ۷۲
۳-۷-۳- بررسی اختصاصیت سیستم الایزای استفاده شده ---------- ۷۴
فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات
۴-۱- رابطه TNF-α و مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۷۶
۴-۲- رابطه LPS اشریشیاکلی و مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۸۳
نتیجه گیری کلی ---------- ۸۵
پیشنهادات ---------- ۸۶
پیوست ها
پیوست ۱ درصد منوسیت های TNF-α مثبت در تیمارهای متفاوت به روش فلوسایتومتری در افراد سالم ---- ۸۷
پیوست ۲ درصد منوسیت های TNF-α مثبت در تیمارهای متفاوت به روش فلوسایتومتری در بیماران مبتلا به MS ---------- ۸۸
پیوست ۳ شدت فلورسنت منوسیت های TNF-α مثبت در تیمارهای متفاوت به روش فلوسایتومتری در افراد سالم ---------- ۸۹
پیوست ۴ شدت فلورسنت منوسیت های TNF-α مثبت در تیمارهای متفاوت به روش فلوسایتومتری در بیماران مبتلا به MS ---------- ۹۰
پیوست ۵ میزان قرائت جذب نوری آنتی بادی IgM ضد لیپوپلی ساکارید در طول موج ۴۵۰ نانومتر در سرم بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۹۱
پیوست ۶ میزان قرائت جذب نوری TNF-α در طول موج ۴۵۰ نانومتر در پلاسمای افراد سالم ---------- ۹۳
پیوست ۷ میزان قرائت جذب نوری TNF-α در طول موج ۴۵۰ نانومتر در پلاسمای بیماران مبتلا به MS ---- ۹۴
منابع و مآخذ ---------- ۹۵

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ انواع مختلف سیر کلینیکی در بیماری مولتیپل اسکلروزیس ---------- ۳

شکل ۱-۲ همولوژی توالی بین MBP و آنتی ژنهای خارجی cross-reactive پلی مراز ویروس هپاتیت B (HBV-P) و ترمیناز ویروس هرپس سیمپلکس (HSV) ---------- ۹

شکل ۱-۳ آنتی ژنهای خودی مولتیپل اسکلروزیس در ماده سفید دستگاه عصبی مرکزی ---------- ۱۰

شکل ۱-۴ تمایز Thl در مقابل Th2 و تولید سایتوکاین از طریق STAT4 و STAT6 ---------- ۱۵

شکل ۱-۵ مسیر انتقال سیگنال که با اتصال TNF-α سه قسمتی به گیرنده اش (TNF-R) آغاز می شود----- ۱۹

شکل ۱-۶ نمودار ساده شده کمپلکس آنتی ژن لوکوسیتی انسانی روی کروموزوم ۶ ---------- ۲۰

شکل ۱-۷ ساختمان لیپوپلی ساکارید ---------- ۲۳

شکل ۱-۸ نمایش شماتیک از سیگنال دهی لپتین---------- ۲۶

شکل ۱-۹ نمایش شماتیک از اثرات لپتین در ایمنی ذاتی و اکتسابی ---------- ۲۸

شکل ۲-۱ دستگاه فلوسایتومتری ---------- ۳۸

شکل ۲-۲ دستگاه خواننده الایزا ---------- ۴۵

شکل ۳-۱ تصویر فلوسایتومتری سلول های خون محیطی انسان در شرایط بدون تحریک و بدون آنتی بادی -- ۵۵

شکل ۳-۲ نمودارهای هیستوگرام مربوط به منوسیت های خون محیطی در حالت‌های a) بدون تحریک b) تحریک با c PBS) تحریک با LPS پس از رنگ آمیزی با آنتی بادی فلورسنت ضد TNF-α ---------- ۵۶

شکل ۳-۳ حالت تحریک با LPS بدون آنتی بادی ---------- ۵۶

شکل ۳-۴ حالت تحریک با LPS همراه با آنتی بادی کنترل منفی ---------- ۵۷

شکل ۳-۵ حالت تحریک با LPS همراه با آنتی بادی ضد TNF-α ---------- ۵۷

شکل ۳-۶ تصاویر فلوسایتومتری مربوط به محلول فیکس کننده و نفوذ پذیرکننده Dako و خانگی در حالت تحریک با LPS همراه با آنتی بادی ضد TNF-α ---------- ۵۸

شکل ۳-۷ تصویر فلوسایتومتری منوسیت های خون محیطی در حالت تیمار شده با PBS در افراد سالم ----- ۵۹

شکل ۳-۸ تصویر فلوسایتومتری منوسیت های خون محیطی در حالت تیمار شده با PBS در فرد مبتلا به MS ---------- ۵۹

شکل ۳-۹ تصویر فلوسایتومتری منوسیت های خون محیطی در حالت تحریک شده با LPS در فرد سالم ---- ۶۰

شکل ۳-۱۰ تصویر فلوسایتومتری منوسیت های خون محیطی در حالت تحریک شده با LPS در فرد مبتلا به MS ---------- ۶۱

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

شکل ۳-۱۱ تصویر فلوسایتومتری منوسیت های خون محیطی در حالت تحریک شده با لپتین در فرد سالم ---------- ۶۱
شکل ۳-۱۲ تصویر فلوسایتومتری منوسیت های خون محیطی در حالت تحریک شده با لپتین در فرد مبتلابه MS ---------- ۶۲
شکل ۳-۱۳ میانگین درصد منوسیت های TNF مثبت درتیمارهای متفاوت در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۶۴
شکل ۳-۱۴ میانگین شدت فلورسنت منوسیت های TNF-α مثبت در تیمارهای متفاوت در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۶۶
شکل ۳-۱۵ منحنی استاندارد ترسیم شده با غلظت های معلوم TNF-α استاندارد ---------- ۶۸
شکل ۳-۱۶ میانگین غلظت TNF-α پلاسمایی در تیمارهای متفاوت با PBS، لپتین و بدون تحریک در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۷۱
شکل ۳-۱۷ میانگین غلظت TNF-α پلاسمایی در حالت های تحریک با LPS و لپتین در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۷۱
شکل ۳-۱۸ میانگین میزان آنتی بادی IgM ضد LPS در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۷۳

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ اثرات سیستماتیک TNF در حالت حاد و مزمن ---------- ۱۷
جدول ۱-۲ انواع تیمارها برای تحریک منوسیت های خون محیطی و تولید TNF-α داخل سلولی ---------- ۳۹
جدول ۲-۲ بررسی اختصاصیت سیستم الایزا ---------- ۴۶
جدول ۲-۳ تهیه رقت بهینه برای نمونه های پلاسمای تیمار شده با PBS، LPS و لپتین ---------- ۵۱
جدول ۳-۱ مشخصات جمعیت شناختی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم ---------- ۵۴
جدول ۳-۲ جمع بندی نتایج حاصل از آمار توصیفی درصد سلولهای TNF-α مثبت در تیمارهای متفاوت در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۶۳
جدول ۳-۳ مقایسه میانگین سلول های TNF-α مثبت در تیمارهای متفاوت در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم ---------- ۶۴
جدول ۳-۴ جمع بندی نتایج حاصل از آمار توصیفی شدت فلورسنت سلول های تولید کننده TNF-α در تیمارهای متفاوت در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۶۵
جدول ۳-۵ مقایسه میانگین میزان شدت فلورسنت سلول های تولید کننده TNF-α در تیمارهای متفاوت در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۶۶
جدول ۳-۶ مشخصات جمعیت شناختی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم ---------- ۶۷
جدول ۳-۷ میزان جذب نوری غلظت های استاندارد TNF-α در طول موج ۴۵۰nm، میانگین میزان جذب نوری آنها ارائه گردیده است. ---------- ۶۸
جدول ۳-۸ جمع بندی نتایج حاصل از آمار توصیفی غلظت TNF-α پلاسمایی در تیمارهای متفاوت در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۶۹
جدول ۳-۹ مقایسه میانگین غلظت های TNF-α پلاسمایی در تیمارهای متفاوت در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۷۰
جدول ۳-۱۰ مشخصات جمعیت شناختی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم ---------- ۷۲
جدول ۳-۱۱ بررسی توصیفی آنتی بادی IgM ضد LPS در سرم بیماران مبتلا به MS و افراد سالم ---------- ۷۳
جدول ۳-۱۲ مقایسه میانگین مقادیر IgM در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم ---------- ۷۴
جدول ۳-۱۳ بررسی اختصاصیت سیستم الایزا، هر کدام از نمونه ها به صورت دوتایی انجام شده است و میانگین میزان جذب نوری آنها ارائه گردیده است ---------- ۷۵

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

فصل اول

مقدمه

۱-۱- بیماری مولتیپل اسکلروزیس

مولتیپل اسکلروزیس[1](MS)، بیماری التهابی مزمن دستگاه اعصاب مرکزی[2] (CNS) است که بیش از یک میلیون نفر را در جوامع غربی تحت تأثیر قرار داده است (Sospedra and Martin, 2005). در این بیماری سلولهای خود واکنشگر به غلاف میلین حمله می‌کنند و میلین را تخریب می کنند (Noseworthy, 2000). مولتیپل اسکلروزیس اولین بار به وسیله Charcot و Vulpian در سال ۱۸۶۶ شرح داده شد (Compston, 1998). التهاب در این بیماری باعث ایجاد تکه های آسیب دیده می‌شود که پلاک[3] یا آسیب[4] نامیده می شوند که به طور عمده در ماده سفید دستگاه عصبی مرکزی قرار دارند (Reipert, 2004). وقتی میلین از بین می‌رود انتقال سیگنال‌های عصبی کند و یا حتی متوقف می‌شود. غلاف میلین اطراف آکسونها بعد از التهاب تا حدودی می

[1] Multiple Sclerosis (MS)
[2] Central nervous system (CNS)
[3] Plaques
[4] Lesions

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

تواند ترمیم شود که این فرآیند دوباره سازی میلین[1] نامیده می شود و به وسیله الیگودندروسیت‌ها[2] انجام می شود. زمانی که بیماری پیشرفت می کند الیگودندروسیت ها و سرانجام آکسون ها تخریب می شوند که منجر به بدتر شدن علائم بیماری می شود (Reipert, 2004). مولتیپل اسکلروزیس در زنان نسبت به مردان شایع تر است (تقریباً ۱/۶ به ۱) که اغلب این بیماری در دوره جوانی ایجاد می شود (Sospedra and Martin, 2005). معمولی ترین نشانه بیماری نقص دید و بینایی به سبب التهاب عصب بینایی می باشد. نشانه های دیگر شامل ضعف عضلانی و فلج، کمبود حسی، ناهماهنگی حرکتی، خستگی، بی‌اختیاری ادرار و مدفوع می‌باشد. آسیب های شناختی مثل اشکال در حافظه، تمرکز و دیگر مهارت های فکری و روانی هم به دفعات رخ می دهد (Al-Omaishi et al., 1999).

۱-۲- سیر بالینی بیماری

مولتیپل اسکلروزیس به شکل های بالینی متفاوت رخ می دهد و به وسیله سیر بالینی اش می تواند متمایز شود. این شکل ها شامل پیشرونده اولیه[3] (PP)، پیشرونده ثانویه[4] (SP)، تشدید یابنده – بهبودپذیر[5](RR) و پیشرونده عودکننده[6](PR) می باشد (شکل ۱-۱).

فرم تشدید یابنده- بهبودپذیر (RR): اختلالات نورولوژیک در طی چند روز تا چند هفته بروز کرده و سپس بهبودی کامل یا نسبی بروز می کند و یا گاه بهبودی واضحی رخ نمی دهد. بهبودی معمولاً طی چند هفته تا چند ماه بعد از وقوع علائم بروز کرده ولی به ندرت ممکن است تا ۲ سال هم طول بکشد. در بین حملات هیچ گونه پیشرفت و بدتر شدن علائم عصبی وجود ندارد.

فرم پیشرونده ثانویه (SP): این فرم از بیماری معمولاً به صورت فرم تشدید یابنده- بهبودپذیر ظاهر می شود ولی سپس به شکل پیشرونده تغییر فرم می دهد. در این بیماران بین حملات، علائم عصبی تدریجاً تشدید می‌شود.

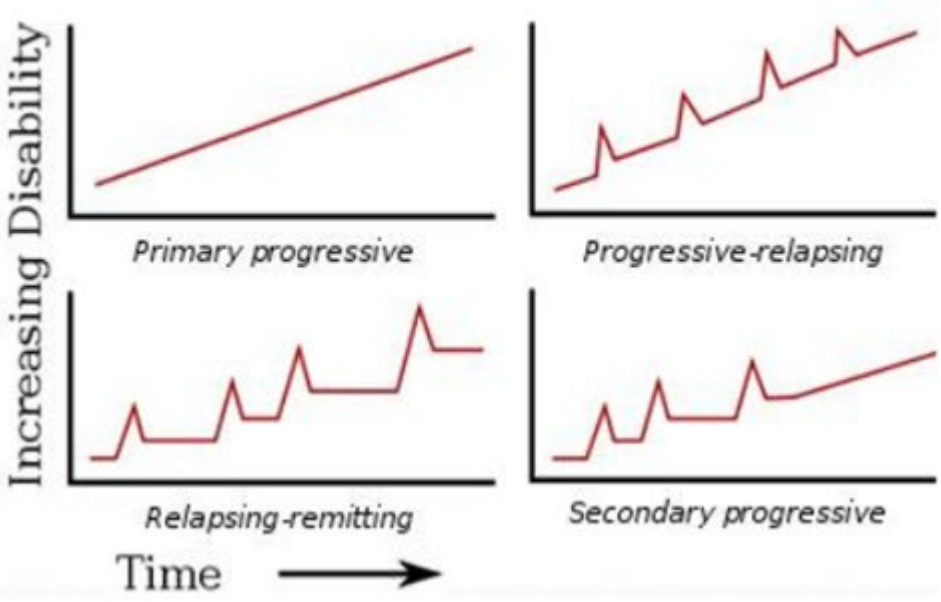
فرم پیشرونده اولیه (PP): در این فرم، بیماری از ابتدا به صورت پیشرونده ظاهر می شود و پیشرفت تدریجی ناتوانی از زمان وقوع بیماری وجود دارد.

---

[1] Remyelination
[2] Oligodendrocytes
[3] Primary progressive (PP-MS)
[4] Secondary progressive (SP-MS)
[5] Relapsing remitting (RR-MS)
[6] Progressive relapsing (PR-MS)

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

فرم پیشرونده عودکننده (PR): بیماری به صورت پیشرونده آغاز می شود. در این فرم حملات عودکننده وجود دارد، این حملات ممکن است با بهبودی همراه باشد یا اینکه بهبودی واضحی رخ ندهد. در فاصله زمانی بین حملات حالت پیشرونده بیماری دیده می شود (Pugliatti et al., 2006).



شکل ۱-۱ انواع مختلف سیر کلینیکی دربیماری مولتیپل اسکلروزیس

(http://en.wikipedia.org/wiki/Multiple_Sclerosis)

برای اندازه گیری میزان ناتوانی در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس چندین مقیاس مختلف وجود دارد. معمولی ترین مقیاس برای بیان میزان درجه ناتوانی بیماری[1]، مقیاس کورتزکه است (Kurtzke, 1983). در این مقیاس به میزان ناتوانی حاصل از هر کدام از قسمت های عملکردی دستگاه عصبی درجه خاصی تعلق می گیرد و به این ترتیب میزان ناتوانی کلی در بیماری به ۱۰ درجه مختلف (۱۰، . . . . ، ۲، ۱/۵، ۱، ۰) تقسیم می شود. به عنوان مثال میزان درجه ناتوانی ۹/۵- ۷ به بیمارانی تعلق می گیرد که نیاز به صندلی چرخ دار دارند یا بستری هستند و میزان درجه ناتوانی ۱۰ به افرادی تعلق می گیرد که به علت بیماری مولتیپل اسکلروزیس جان خود را از دست می دهند (Pugliatti et al., 2006).

[1] Expanded Disability Status Scale (EDSS)

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

۱-۳- آسیب شناسی مولتیپل اسکلروزیس

در بافت مغزی بیماران MS، پلاک های بدون میلین در ماده سفید دستگاه عصبی مرکزی وجود دارد. در واقع این مناطق بیشتر در عصب بینایی، مناطق بطنی[1]، ساقه مغز، مخچه و نخاع دیده شده است (Lassmann et al., 2001). در مطالعات آسیب شناسی، آسیب های مولتیپل اسکلروزیس بر اساس از دست رفتن میلین، مکان و گسترش پلاک ها، تخریب الیگودندروسیت ها و فعال شدن کمپلمان طبقه بندی شدند.

۱-۳-۱- طبقه بندی آسیب های مولتیپل اسکلروزیس

آسیب های بخش I (تخریب میلین مرتبط با ماکروفاژها[2]): این آسیب ها شامل محصولات سمی ماکروفاژهای فعال شده و میکروگلیا[3] می باشد که با میلین از دست رفته ارتباط دارد. در واقع التهاب با واسطه سلول T با فعال شدن میکروگلیا/ ماکروفاژ درگیر می شود.

آسیب های بخش II (تخریب میلین با واسطه آنتی بادی[4]): این آسیب ها شامل ایمونوگلوبولین و رسوب‌های کمپلمان فعال شده در مکانهای تخریب میلین می باشد. همچنین ماکروفاژها/میکروگلیای فعال شده هم وجود دارد.

آسیب های بخش III (تخریب میلین مرتبط با الیگودندروگلیوپاتی انتهایی[5]): در این آسیب ها یک لبه میلین در اطراف رگهای خونی دارای التهاب درون پلاک های آسیب دیده باقی می ماند. خصوصیت برجسته این آسیب ها از دست رفتن گلیکو پروتئین مرتبط با میلین[6] (MAG) است در حالی که دیگر پروتئین های میلینی مثل پروتئین پروتئولیپید[7] (PLP)، پروتئین بنیانی میلین[8] (MBP) و. . . هنوز تا حدی درون غلاف های میلین آسیب دیده وجود دارند.

آسیب های بخش IV (تخریب الیگودندروسیت اولیه[9]): این آسیب ها در مولتیپل اسکلروزیس خیلی نادر

---

[1] Periventricular
[2] Macrophage-associated demyelination
[3] Microglia
[4] Antibody-mediated demyelination
[5] Distal oligodendrogliopathy-associated demyelination
[6] Myelin-associated glycoprotein (MAG)
[7] Proteolipid protein (PLP)
[8] Myelin basic protein (MBP)
[9] Primary oligodendrocyte degeneration

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

هستند. در این آسیب، تخریب میلین با از بین رفتن الیگودندروسیت در یک لبه کوچک ماده سفید پری پلاک[1] مجاور به منطقه میلین ارتباط دارد (Lucchinetti et al., 2000; Lassmann et al., 2001).

این طبقه بندی برای مولتیپل اسکلروزیس کلاسیک صحیح است، در صورتی که در بیماریهای متفاوتی مثل Devic's، آسیب هایی که به اعصاب بینایی و نخاع محدود می شود دیده می شود. (Cree et al., 2002)

از نظر بافت شناسی آسیب های مولتیپل اسکلروزیس به صورت: حاد، مزمن، فعال و آرام طبقه بندی می‌شوند.

آسیب های مولتیپل اسکلروزیس حاد، دارای سلول فراوان[2] هستند و لبه نامشخصی دارند. ادم، ماکروفاژهای شامل لیپید و آستروسیت های بیش از حد بزرگ شده در این آسیب ها دیده می شوند و نکروز بافتی و حفره سازی نیز دیده می شود. اینترلوکین ۱، ۲، ۴، ۱۰، تومورنکروزفاکتورآلفا[3] (TNF-α) و فاکتور رشد تغییر شکل داده بتا[4] (TGF-β) در مغزهای تحت تأثیر قرار گرفته بیان می شود.

آسیب های مولتیپل اسکلروزیس فعال مزمن یک مرکز با تعداد کم سلول[5] دارد و میلین به طور کامل از دست رفته است. تراوش های التهابی ممکن است وجود داشته باشد. وقتی مولتیپل اسکلروزیس، پیشرونده مزمن است سلولهای $CD8^+T$ به تعداد زیاد وجود دارند. IL-1، IL-2، IL-4، IL-6، IL-10 و TNF-α هم وجود دارد (Brosnan et al., 1995; Calabresi et al., 1998; Selmaj and Raine, 1988).

۱-٤- بیماریزایی مولتیپل اسکلروزیس

مولتیپل اسکلروزیس یک بیماری عصبی التهابی مزمن است که توسط نفوذ لوکوسیت ها به داخل CNS و تخریب میلین موضعی و از دست رفتن الیگودندروسیت ها و آکسونها مشخص می شود. پیشرفت بیماری به دلیل حمله ایمونولوژیکی بر ضد پروتئین های میلین است. به هر حال علت شناسی خود ایمنی برای مولتیپل اسکلروزیس ثابت نشده است. در بسیاری از موارد مورد قبول ترین فرضیه آن است که بر همکنش بین گیرنده سلول T [6] (TCR)که روی لنفوسیت های $CD4^+$ وجود دارد با آنتی ژن های میلین میزبان که به وسیله مولکول

---

[1] Periplaque
[2] Hypercellular
[3] Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)
[4] Transforming growth factor beta (TGF-β)
[5] Hypocellular
[6] Tcell receptor (TCR)

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

های آنتی ژن لوکوسیتی انسانی[1](HLA) کلاس II روی ماکروفاژها، میکروگلیا و یا آستروسیت ها عرضه می شوند کمک به تخریب میلین می کنند. چنین برهمکنشی بین سلول T و آنتی ژن های میلین باعث تحریک سلول های T کمکی[2] و یک آبشار التهابی در جهت تکثیر لنفوسیت، فعال شدن ماکروفاژ و سلولهای B و ترشح سایتوکاین‌ها می شود. این آبشار ایمنی سرانجام منجر به از دست رفتن میلین همراه با نقص در سیستم عصبی می شود (Sorensen and Ransohoff, 1998). دستگاه عصبی مرکزی یک مکان مصون ایمونولوژیکی است که پاسخ های ایمنی منظم و محدود به عوامل عفونی و آسیب بافتی را ایجاد می کند. ساختار عمده ای که التهاب CNS را محدود می کند سد خونی مغزی[3] است. لوکوسیت های فعال شده می توانند از سد خونی مغزی در مولتیپل اسکلروزیس عبور کنند. چه طور و از کجا این لنفوسیت ها منشأ گرفته اند نا شناخته است. با این وجود یک سری از حوادث ممکن است فعال شدن سلولهای T خود واکنشگر[4] دارای آنتی ژن عصبی را تحریک کنند. کنند. یک مکانیسم ممکن تقلید مولکولی است (Wucherpfennig and Strominger, 1995).

سلولهای T، پپتیدهای خطی کوتاهی (۱۰-۲۰ بنیان) را که از پروتئولیز محدود پروتئین های میلین ایجاد شده، می شناسند. وقتی چنین پپتیدهایی به سلولهای T عرضه می شوند به اضافه کمپلکس اصلی سازگاری بافتی[5] (MHC) روی سطح سلول عرضه کننده آنتی‌ژن[6] (APC)، آنها فعال می شوند. اساس تقلید مولکولی[7] این است که پپتیدهای خطی کوتاه مشتق شده از اجزاء ویروسی به قدر کافی مشابه با پپتید میلین باشند که پاسخ های خود واکنشگر را به وجود آورند.

مکانیسم دیگر برای پاسخ های سلول های T در بیماری شامل عمل کردن اجزاء ویروس به عنوان یک سوپر آنتی ژن[8] است که جمعیت سلولهای T را به وسیله اتصال عرضی زنجیره بتای گیرنده سلول T با مولکولهای MHC کلاس II روی APC تحریک می کند. فعال شدن لنفوسیت ها به این صورت می تواند منجر به خود ایمنی شود. این مکانیسم برای مولتیپل اسکلروزیس به صورت یک نظریه باقی مانده است (Brocke et al., 1993).

---

[1] Human leukocyte antigen (HLA)
[2] T helper (Th)
[3] Blood-brain barrier (BBB)
[4] Autoreactive T cells
[5] Major histocompatibility complex (MHC)
[6] Antigen-presenting cell (APC)
[7] Molecular mimicry
[8] Superantigen

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

۱-۵- علت شناسی بیماری مولتیپل اسکلروزیس

علت مولتیپل اسکلروزیس مبهم و نامعلوم است اما دخالت فاکتورهای ژنتیکی در این بیماری واضح و روشن است.

۱-۵-۱- فاکتورهای ژنتیکی

نقش فاکتورهای ژنتیکی در حساسیت اشخاص به مولتیپل اسکلروزیس پیچیده است. بیشترین شیوع مولتیپل اسکلروزیس در اروپای شمالی و شمال آمریکا می باشد. شیوع پایین آن در آسیا و آفریقا پیشنهاد می کند که عوامل ژنتیکی، زمینه نژادی و عوامل محیطی باعث می شوند که در معرض بیماری قرار بگیریم. مطالعات جمعیتی، خانوادگی و دوقلوها نشان می دهد که اساساً در اعضای خانواده بیماران مولتیپل اسکلروزیس شیوع آن افزایش می یابد. برای مثال خطر ایجاد مولتیپل اسکلروزیس در دوقلوهای یک تخمکی[1] نسبت به دوقلوهای دو تخمکی[2] خیلی بیشتر است (Dyment et al., 2004). اگر چه هیچ ژن واضح عامل بیماری شناسایی نشده است، بررسی کل ژنوم در چندین خانواده MS نشان می دهد ژنهایی که در حساسیت به مولتیپل اسکلروزیس شرکت دارند مربوط به‌آنتی ژن لوکوسیتی انسانی کلاس II (HLA) هستند (Dyment et al., 2004; Sawcer et al., 1997). مطالعات ارتباط ژنتیکی نشان می دهد که یک ارتباط مهم بین آلل های HLA کلاس II، HLA-DRB1 1501 و HLA-DQB1 0601 با مولتیپل اسکلروزیس وجود دارد (Olerup and Hillert, 1991).

تفاوت در شیوع بیماری بین مردان و زنان (نسبت ۱: ۱/۶) پیشنهاد می کند که تغییرات هورمونی فاکتورهای مخاطره آمیز هستند. این نظریه به وسیله چندین مشاهده تأیید می شود: میزان حمله های کمتر در طول بارداری، دوباره به جای اول برگشتن بعد از وضع حمل، تشدید بیماری در طول قاعدگی زنان، ارتباط استرادیول بالا و پروژسترون پایین با فعالیت بالای بیماری، تفاوت های جنس در انسفالومیلیت اتو ایمیون تجربی[3] (یک مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس)، اثر محافظتی تستوسترون و اثرات درمانی استرادیول در RR-MS.

مکانیسم های دقیق هورمونهای جنسی که حساسیت به مولتیپل اسکلروزیس را تحت تأثیر قرار می دهد ناشناخته هستند (Sospedra and Martin, 2005).

---

[1] Monozygotic twins

[2] Dizygotic twins

[3] Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/