

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز

دانشکده تغذیه و علوم غذایی

پایان نامه:

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد علوم تغذیه

موضوع:

تاثیر مکمل یاری ویتامین D بر بیان ژن اینترلوکین های دخیل در مدل الاکلنگی (See-Saw) در وابستگان درجه یک به ظاهر سالم بیماران مبتلا به مالتیپل اسکروز.

نگارش:

رضا هاشمی

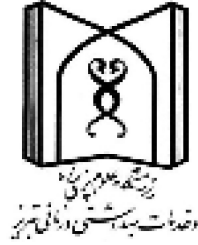
استاد راهنما:

دکتر سید رفیع عارف حسینی

دکتر سید سعید حسینی اصل

شهریور ۱۳۹۷

صلى الله عليه وسلم



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز

دانشکده تغذیه و علوم غذایی

پایان نامه: جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد علوم تغذیه

موضوع:

تاثیر مکمل یاری ویتامین D بر بیان ژن اینترلوکین های دخیل در مدل الاکلنگی (See-Saw) در وابستگان درجه یک به ظاهر سالم بیماران مبتلا به مالتیپل اسکروز.

نگارش:

رضا هاشمی

استاد راهنما:

دکتر سید رفیع عارف حسینی

دکتر سید سعید حسینی اصل

استاد مشاور:

دکتر محمد اصغری جعفرآبادی

دکتر داور الطافی

شماره پایان نامه: ۱۱۵/آ/ت

محل انجام طرح:

آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان امام خمینی اردبیل

شهریور ۱۳۹۷

بسمه تعالی

گواهی اصالت پایان نامه

بدین وسیله اعلام می نماید که این پایان نامه بر اساس نتایج بررسی ها / تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب اجرا و انشا گردیده است. همچنین موضوع اینجانب تا کنون به عنوان پایان نامه در سایر مقاطع و دوره های تحصیلی ارایه نگردیده است.

بدین وسیله اصالت (ORIGINALITY) و صحت نتایج این پایان نامه مورد تایید اینجانب، استاد راهنما / مشاور می باشد.

این مجموعه تقدیم می شود به:

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان؛

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین

روزگاران بهترین پشتیبان است؛ به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس

است و سرگردانی و ترس در پناهمان به شجاعت می گراید؛ و به پاس محبت

های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند؛

این مجموعه را به مادر عزیزم و به روح بزرگوار پدرم تقدیم می کنم.

نگارنده بر خود واجب می‌داند که از زحمات بی‌دریغ، تلاش‌های بی‌وقفه و راهنمایی‌های

ارزشمند استاد گرامی **دکتر سید رفیع عارف حسینی و دکتر سید سعید حسینی**

اصل در راستای انجام این پروژه تشکر و قدردانی نماید.

تقدیر و تشکر

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت تامین منابع مالی این طرح سپاسگزارم.

از استاد بزرگوام جناب آقای دکتر اصغری جعفرآبادی به سبب قبول مشاوره آماری و دکتر داور الطافی به عنوان متخصص مغز و اعصاب در این تحقیق بسیار سپاسگزارم.

از انجمن ام اس استان اردبیل به مدیریت آقای صادق محرم زاده که نهایت همکاری را داشتن بسیار سپاسگزارم.

از آزمایشگاه‌های ژنتیک بیمارستان امام خمینی اردبیل و مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که نهایت لطف و همکاری در این طرح را داشتن کمال تشکر دارم.

از قبول زحمت داوران محترم و اساتید بزرگوام که در طول این مدت از راهنمایی‌های آن‌ها استفاده کردم کمال تشکر را دارم.

از تمامی بیماران مبتلا به ام اس، وابستگان در جه یک آن‌ها و همچنین افراد به ظاهر سالم که با صبر و تحمل خود در این مطالعه شرکت کردند نهایت تشکر و سپاس را دارم.

از دوست و همکار عزیزم، محمد مرشدی به سبب همراهی صمیمانه، هم‌کلامی صادقانه و راهنمایی‌های مشفقانه آن عزیزان در طی این دوره درسی نهایت تشکر و سپاس را دارم.

مقاله برگرفته از پایان نامه:

Anti-inflammatory effects of dietary vitamin D₃ in patients with multiple sclerosis

Published in "*Neurology: Genetics*"

فهرست عناوین

صفحه	عنوان
VII	واژگان اختصاری
۲	چکیده فارسی
فصل اول: مقدمه	
۴	۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع
۱۰	۲-۱- اهداف پژوهش
۱۰	۱-۲-۱- هدف کلی
۱۰	۲-۲-۱- اهداف اختصاصی
۱۱	۳-۲-۱- هدف کاربردی
۱۱	۳-۱- فرضیات پژوهش
۱۲	۴-۱- تعریف واژه های اختصاصی
فصل دوم: چهارچوب پژوهش و مرور متون	
۱۵	۱-۲- مالتیپل اسکلروز
۱۵	۱-۱-۲- سیر بیماری
۱۶	۲-۱-۲- اپیدمیولوژی
۱۶	۱-۲-۱-۲- موقعیت جغرافیایی
۱۷	۲-۲-۱-۲- سن و جنس
۱۷	۳-۲-۱-۲- ژنتیک
۱۸	۴-۲-۱-۲- عوامل ویروس
۱۸	۵-۲-۱-۲- اثر سایتوکاین ها در بروز MS
۱۹	۳-۱-۲- آسیب شناسی بیماری MS
۲۰	۴-۱-۲- علائم بالینی
۲۱	۵-۱-۲- درمان
۲۱	۲-۲- ویتامین D

۲۱D-۱-۲-۲ ارزیابی سطح سرمی ویتامین
۲۲D-۲-۲-۲ سلول های ایمنی و ویتامین
۲۳D-۳-۲-۲ مالتیپل اسکروز و ویتامین
۲۳۳-۲-۲ مروری بر متون
۲۳۱-۳-۲ مطالعات انجام شده در خصوص ارتباط بین ویتامین D و بیماری MS
۲۳۱-۱-۳-۲ مطالعات انجام شده در ایران
۲۵۲-۱-۳-۲ مطالعات انجام شده در جهان
۲-۳-۲ مطالعات انجام شده در خصوص بیان ژن (Down & Up regulation)
۲۷ اینترلوکین ها در بیماران مبتلا به MS

فصل سوم: روش کار و مواد

۳۱۱-۳-۱ روش مطالعه
۳۱۱-۱-۳-۱ نوع مطالعه
۳۱۲-۱-۳-۱ جامعه آماری
۳۱۳-۱-۳-۱ روش محاسبه حجم نمونه
۳۲۴-۱-۳-۱ معیارهای ورود و خروج از مطالعه
۳۴۲-۳-۱ ابزارها و روش های جمع آوری اطلاعات
۳۶۳-۳-۱ روش جمع آوری نمونه سرم
۳۶۴-۳-۱ روش اندازه گیری سطح سرمی ۲۵-هیدروکسی ویتامین D
۳۷۵-۳-۱ روش استخراج RNA و سنتز cDNA و انجام Real Time-PCR
۴۰۶-۳-۱ ملاحظات اخلاقی
۴۰۷-۳-۱ پردازش داده ها

فصل چهارم: یافته ها

۴۳۱-۴-۱ مشخصات دموگرافیک
۴۴۲-۴-۱ میزان مواجهه با نور خورشید
۴۶۳-۴-۱ اطلاعات دریافت غذایی
۴-۴-۱ اطلاعات مربوط به سطح سرمی ویتامین D و بیان ژن اینترلوکین های 17A، 10 و 6

فصل پنجم: بحث

۵۹۱-۵-۱ بحث
----	----------------

۶۱	۵-۱-۱- تعیین و مقایسه سطح سرمی ویتامین D در بیماران MS، وابستگان درجه یک به ظاهر سالم بیماران و افراد غیروابسته به ظاهر سالم.....
۶۳	۵-۱-۲- تعیین و مقایسه تاثیر مکمل یاری ویتامین D بر میزان بیان ژن IL-17A، IL-10 و IL-6 در بیماران MS، وابستگان درجه یک به ظاهر سالم بیماران و افراد به ظاهر سالم غیر وابسته
۶۶	۵-۱-۳- تعیین و مقایسه مصرف مواد غذایی حاوی ویتامین D در بیماران MS، وابستگان درجه یک به ظاهر سالم بیماران و افراد به ظاهر سالم غیر وابسته.....
۶۹	۵-۲- نتیجه گیری
۶۹	۵-۳- نقاط قوت
۷۰	۵-۴- محدودیت های مطالعه.....
۷۰	۵-۵- پیشنهادات پژوهشی
۷۲	۵-۶- پیشنهادات اجرایی
۷۴	منابع
I	پیوست ها.....
A	خلاصه انگلیسی.....

فهرست جداول

صفحه	جداول
۲۰	جدول ۱-۲- علائم بالینی بیماران مبتلا به MS.....
۲۲	جدول ۲-۲- وضعیت ویتامین D بر اساس مقادیر سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D.....
۳۹	جدول ۱-۳- توالی پرایمر و پروب های استفاده شده برای Real Time PCR.....
۴۳	جدول ۱-۴- مشخصات دموگرافیک افراد شرکت کننده در مطالعه.....
۴۶	جدول ۲-۴- مقایسه هفتگی دریافت گروه چربی ها.....
۴۷	جدول ۳-۴- مقایسه هفتگی دریافت گروه گوشت.....
۴۹	جدول ۴-۴- مقایسه هفتگی دریافت گروه لبنیات.....
۵۱	جدول ۵-۴- مقایسه هفتگی دریافت گروه متفرقه.....
۵۲	جدول ۶-۴- میزان دریافتی ویتامین D بر اساس یادداشت غذایی ۳ روزه.....
۵۳	جدول ۷-۴- سطح سرمی ویتامین D3 و Δ CT اینترلوکین در قبل و بعد از ۸ هفته مکمل یاری با ویتامین D.....

صفحه	فهرست نمودارها	نمودارها
۴۴	نمودار ۴-۱- مقایسه مواجهه با نور خورشید در سه گروه مورد مطالعه بر حسب جنس.....	
۴۵	نمودار ۴-۲- میزان مواجهه با نور خورشید بر حسب دقیقه در روز.....	

فهرست اشکال

صفحه

اشکال

۱۰ شکل ۱-۱- مدل الاکلنگی (See-Saw)
 شکل ۱-۳- فلوجارت نامنویسی و نحوه تخصیص افراد شرکت کننده در مطالعه به هر یک از
۳۲ گروه ها
۵۶ شکل ۱-۴- مقایسه بین گروهی
۵۷ شکل ۲-۴- مقایسه درون گروهی (قبل-بعد)

واژگان اختصاری

APC: Antigen Presenting Cell
ceRNA: competitive endogenous RNAs
CNS: Central Nervous System
CSF: Cerebral Spinal Fluid
DBP: Vitamin D Binding Protein
DNMT: DNA Methyl Transferase
EAE: Experimental Allergic Encephalomyelitis
EBV: Epstein - Barr virus
ECL: Electro Chemiluminescence
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
FDRP: First Degree Relative Participants
FFQ: Food Frequency Questionnaire
HP: Healthy Participants
IBD: Inflammatory Bowel Disease
IL: Interleukin
INF: Interferon
IU: International Unit
MBP: Myelin Basic Protein
MOG: Myelin Olygodendrocyt Glycoprotein
MREs: miRNA response elements
MS: Multiple Sclerosis
NHS: Nurse Health Study
1,25(OH)2D: 1,25-dihydroxy Vitamin D
25(OH) D: 25-hydroxy Vitamin D
PPMS: Primary Progressive Multiple Sclerosis
PRMS: Progressive Relapsing Multiple Sclerosis
PTH: Parathyroid Hormone
PTM: Post Translational Modification
RA: Rheumatoid Arthritis

RDA: Recommended Dietary Allowance

RRMS: Relapsing Remitting Multiple Sclerosis

SLE: Systemic Lupus Erythematosus

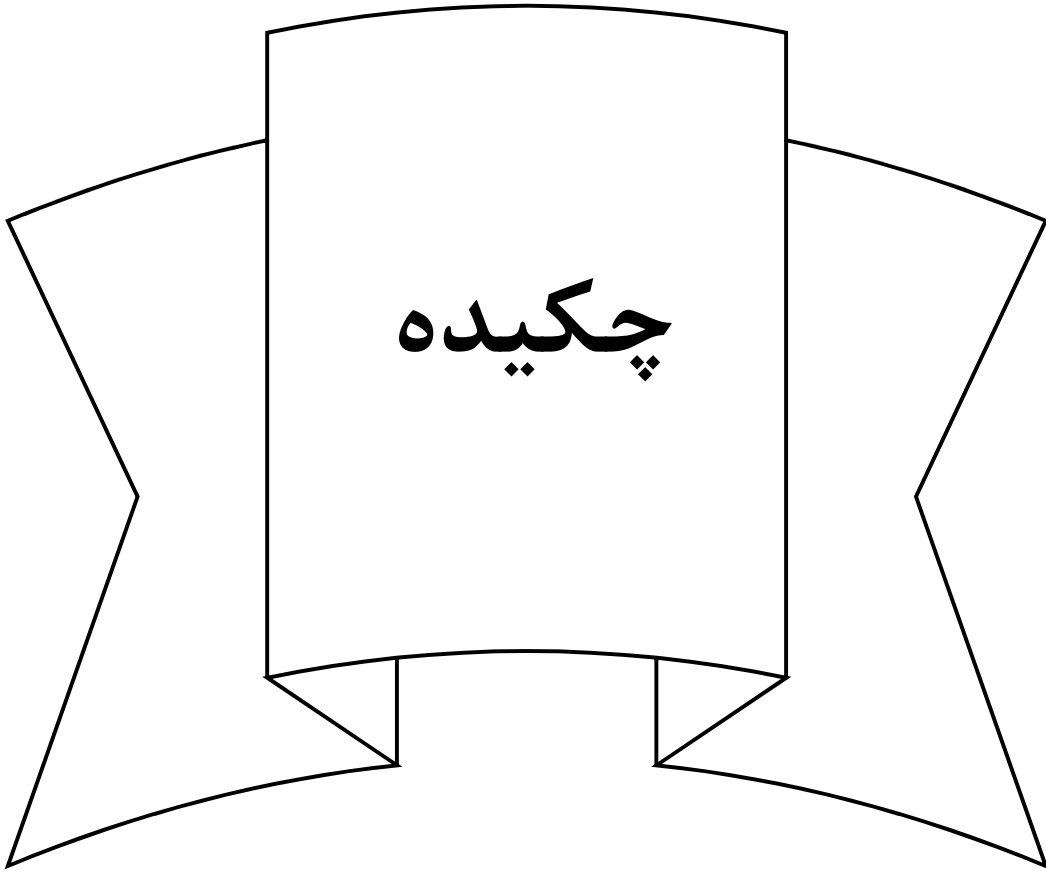
Th: T-helper

TNF: Tumor Necrosis Factor

UV: Ultraviolet

VDR: Vitamin D Receptor

VDRE: Vitamin D Response Elements



زمینه و هدف: هدف اصلی ما در این مطالعه، بررسی اثر مکمل یاری ویتامین D₃ بر میزان بیان سیتوکین های پیش برنده التهاب (IL-6 و IL-17A¹) و ضد التهابی (IL-10) بود. برای اولین بار در این مطالعه، مدلی تحت عنوان مدل الاکلنگی (See-Saw) طراحی گردید که در این مدل سطح سرمی اینترلوکین های پیش برنده التهاب و ضد التهاب بعد از مکمل یاری با ویتامین D مورد ارزیابی قرار گرفت، درحقیقت تعادل و پایداری این مدل در بیماران MS، و دو گروه کنترل بررسی گردید.

مواد و روش ها: مطالعه کارآزمایی بالینی حاضر بر روی ۷۵ نفر که در محدوده سنی ۱۰±۳۰ بودند و با استفاده از نمونه برداری تصادفی ساده در سه گروه تقسیم شدند، صورت گرفت: MSP² (تعداد کل: ۲۵ نفر، مرد=۴ نفر، زن=۲۱ نفر) FDRP³ (تعداد کل: ۲۵ نفر، مرد=۸ نفر، زن=۱۷ نفر) و HP⁴ (تعداد کل: ۲۵ نفر، مرد=۵ نفر، زن=۲۰ نفر). تمامی افراد شرکت کننده در مطالعه IU ۵۰۰۰۰ ویتامین D₃ در هر هفته به مدت ۸ هفته دریافت نمودند. سطح سرمی ۲۵-هیدروکسی ویتامین D₃ و سطح بیان اینترلوکین ها، به ترتیب، با استفاده از روش الکتروکمی لومینسانس (ECL) و Real Time-PCR اندازه گیری گردید. مقایسه درون گروهی با استفاده از آزمون t زوجی و بین گروهی با استفاده از آزمون One-way ANOVA در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ انجام گردید.

¹ Interleukin

² Multiple Sclerosis Participant

³ First Degree Relative Participant

⁴ Healthy Participant

یافته ها: میزان کمبود ویتامین D₃ در قبل از مکمل یاری در MSP، FDRP و HP، به ترتیب، ۶۸٪، ۸۰٪ و ۸۰٪ بود که این میزان بعد از مکمل یاری در هر سه گروه، به ترتیب، به ۱۲٪، ۱۶٪ و ۲۰٪ کاهش یافت. مکمل یاری با ویتامین D₃ سطح بیان IL-17A، IL-10 و IL-6 را در هر سه گروه تحت تاثیر قرار داد (P<0.001). بعد از ۸ هفته مکمل یاری با ویتامین D₃ سطح بیان IL-17A (MSP): تغییر در سطح بیان: ۵/۹ برابر، P=۰/۰۱۴؛ FDRP: تغییر در سطح بیان: ۵/۲ برابر، P=۰/۰۰۶؛ HP: تغییر در سطح بیان: ۴/۲ برابر، P=۰/۰۱۲ و IL-6 (MSP): تغییر در سطح بیان: ۵/۶ برابر، P=۰/۰۰۳؛ FDRP: تغییر در سطح بیان: ۵/۵ برابر، P=۰/۰۰۲؛ HP: تغییر در سطح بیان: ۵/۱ برابر، P<۰/۰۰۱) کاهش و سطح بیان IL-10 (MSP): تغییر در سطح بیان: ۶/۲ برابر، P=۰/۰۰۵؛ FDRP: تغییر در سطح بیان: ۴/۶ برابر، P<۰/۰۰۱؛ HP: تغییر در سطح بیان: ۵/۲ (P<۰/۰۰۱) افزایش یافت.

نتیجه گیری: در حالت کمبود ویتامین D₃ افزایش بیان IL-17A اثر فیدبک مثبت بر روی افزایش بیان IL-6 دارد، در حالیکه در سطوح کافی از ویتامین D₃ افزایش بیان IL-10 می تواند اثر فیدبک منفی بر روی افزایش IL-17A و IL-6 داشته باشد.

واژگان کلیدی: اینترلوکین، مدل See-Saw، مالتیپل اسکلروز، مارکرهای التهابی.

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع

مالتیپل اسکلروز یا اسکلروز منتشره (MS^۱) بیماری خودایمنی است که در آن غلاف میلین احاطه کننده آکسون های اعصاب محیطی و مرکزی از بین می روند. در واقع MS بیماری التهابی و نورودژنراتیو است که به وسیله آسیب های سیستم عصبی مرکزی (CNS^۲) شناخته می شود (۱). این بیماری شرایط خودایمنی ناتوان کننده ای می باشد که معمولاً زمان شروع آن بین ۲۰ الی ۴۰ سالگی اتفاق می افتد (۲) و معمولاً زنان بیشتر از (حدود ۳ برابر) مردان تحت تاثیر قرار می گیرند (۳). علائم این بیماری متغییر بوده و شامل: خستگی، احساس سوزن سوزن شدن در اندام های انتهایی، احساس درد، تاری دید و دوبینی، ضعف عضلانی، اختلال در تعادل، سفتی عضلات، لرزش اندام ها، اختلال در سیستم دفع ادراری و گوارشی، تغییرات شناختی مثل: فراموشی، عدم تمرکز مناسب، مشکل در صحبت کردن و غیره است که برخی از بیماران تعداد کمی از این علائم را تجربه کرده و برخی بیشتر (۴).

اگرچه سبب شناسی و آسیب شناسی دقیق بیماری هنوز به طور کامل مشخص نیست اما اغلب فرضیه اصلی ایجاد بیماری یک سابقه ژنتیکی در بیماران است که به وسیله عوامل محیطی خود را نشان می دهد (۵). سیگار کشیدن، ویروس اپشتین بار و کمبود ویتامین D به عنوان مهمترین عوامل محیطی افزایش دهنده خطر ابتلا به MS مرتبط هستند. شواهد بسیاری در دسترس است

¹ Multiple Sclerosis

² Central Nervous System