دانشگاه ارومیه

دانشکده دامپزشکی

سال تحصیلی: 1390-91 شماره پایان نامه:83 -1

پایان نامه

جهت اخذ درجه دکترای Ph.D در رشته ایمنی شناسی

عنوان:

ارزیابی اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان و اگزوزوم‌های مشتق از آن برپولاریزه شدن پاسخ لنفوسیت‌های T کمکی، سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک انسفالومیلیت تجربی خود ایمن در موش C57BL/6 .

نگارنده:

آرام مکاری زاده

اساتید راهنما:

دکتر نوروز دلیرژ ، استاد راهنما و رئیس هیئت داوران (استادیار)

دکتر احمد مرشدی، استاد راهنمای دوم (دانشیار)

دکتر امیر عباس فرشید، استاد مشاور(دانشیار)

دکتر قاسم مسیبی، استاد مشاور (دانشیار)

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه ارومیه

دانشکده دامپزشکی

سال تحصیلی: 91-90 شماره پایان نامه:83 -1

پایان نامه

جهت اخذ درجه دکترای Ph.D در رشته ایمنی شناسی

عنوان:

ارزیابی اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان و اگزوزوم‌های مشتق از آن برپولاریزه شدن پاسخ لنفوسیت‌های T کمکی، سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک انسفالومیلیت تجربی خود ایمن در موش C57BL/6 .

نگارنده:

آرام مکاری زاده

اعضای هیات داوران :

دکتر نوروز دلیرژ ، استاد راهنما و رئیس هیئت داوران، استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

دکتر احمد مرشدی، استاد راهنمای دوم ، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

دکتر امیر عباس فرشید، استاد مشاور ، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

دکتر قاسم مسیبی، استاد مشاور، دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک

دکتر جمشید حاجتی، داور خارجی، استاد دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر شهرام شهابی، داور خارجی، دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

دکتر ملاحت احمدی، داور داخلی، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

دکتر رحیم حب نقی، داور داخلی، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

ستايش شايسته عالماني است كه

عمر خويش را خالصانه و خاضعانه

در راستاي آموختن دو مفهوم آسماني

عشق

و

علم

وقف تشنگان خاكي مي نمايند.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول- مقدمه و هدف	
1-1) مقدمه وهدف	1
فصل دوم- کلیات	
2-1) بیماری اسکلروز متعدد	2
2-1-1) سبب شناسی	3
2-1-2) پاتوژنز	3
2-1-3) درمان	3
2-2) انسفالومیلیت تجربی خودایمن	4
2-2-1) پاتوژنز	5
2-3) انواع زیر رده های سلول‌های **T** افکتور	6
2-4) سلول‌های **T** افکتور دخیل در پاتوژنز بیماری **EAE**	7
2-4-1) سلول‌های زیر رده **TH1**	8
2-4-2) سلول‌های زیر رده **TH17**	8
2-5) سلول‌های **T** تنظیمی	9
2-5-1) تعامل بین سلول‌های **T** افکتور و نتظیمی	10
2-6) نقش سلول‌های **Tδ/γ**	11
2-7) نقش سلول‌های **T CD8**	11
2-8) نقش سیستم ایمنی هومورال	12
2-9) نقش رسپتورهای کموکاین	13
2-10) سلول‌های بنیادی	13
2-11) استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی	14
2-11-1) سلول‌های پیش ساز عصبی	15
2-11-2) سلول‌های بنیادی جنینی	15
2-11-3) سلول‌های بنیادی مزانشیمال	16
2-11-3-1) منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمال	16
2-11-3-2) جداسازی‌سلول های بنیادی مزانشیمال	17

2-12) اگزوزوم 24
2-12-1) فرایند تشکیل اگزوزوم‌ها 25
2-12-2) ترکیب اگزوزوم‌ها 25
2-12-3) مکانیسم عملکردی اگزوزوم‌ها 26

فصل سوم – مواد و روش کار

3-1) القاء بیماری انسفالومیلیت تجربی خود ایمن 29
3-2) تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمال 30
3-2-1) تهیه محیط کشت استریل 31
3-2-2) تهیه رنگ تریپان بلو 32
3-2-3) نحوه شمارش و تعیین درصد سلول‌های زنده 32
3-2-4) جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان 32
3-3) بررسی فنوتیپ سلول‌های بنیادی مزانشیمال 34
3-4) جداسازی و خالص سازی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال 35
3-5) بررسی خصوصیات اگزوزوم‌ها 36
3-5-1) بررسی مورفولوژی و اندازه اگزوزوم‌ها با میکروسکوپ الکترونی 36
3-5-2) پوشش دادن اگزوزوم‌ها بر روی بید لاتکس-آلدئید 37
3-5-3) بررسی شاخص‌های سطحی اگزوزم‌ها **به روش فلوسایتومتری** 37
3-6) جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای طحالی 39
3-7) بررسی های *In vitro* ، بررسی فعالیت اگزوزوم‌ها در سیستم‌های هم کشت لنفوسیت-اگزوزوم 40
3-7-1) آزمون MTT 40
3-7-2) بررسی تغییرات مقادیر سایتوکاین‌های IL-10 وTGF-β در مایع رویی کشت لنفوسیت- اگزوزوم 41
3-7-3) بررسی تغییرات فراوانی سلول‌های T آپوپتوز شده در سیستم هم کشت لنفوسیت- اگزوزوم 42
3-8) بررسی های *In vivo*، جامعه مورد مطالعه و پروتوکل درمان گروه های آزمایش و شاهد 43 44

3-8-1) بررسی تغییرات علائم درمانگاهی بیماری 44
3-8-1 1) ارزیابی روزانه تغییرات وزن 44
3-8-1- 2)ارزیابی روزانه تغییرات شدت اختلالات حرکتی
3-8-2) اندازه‌گیری تغییرات سایتوکاین‌های IL-17، IFN-γ،IL-10 و 45
TGF-β به روش الایزا
45
3-8-2-1) اندازه‌گیری مقادیر سایتوکاین‌ها در سرم
3-8-2-2) اندازه‌گیری مقادیر سایتوکاین‌های در مایع رویی کشت سه 46
روزه لنفوسیت‌های طحالی مجاور شده با پپتید MOG
3-8-3) بررسی تغییرات فراوانی سلول‌های T تنظیمی CD4+ CD25+ 46
Foxp3 در لنفوسیت‌های طحالی
47
3-8-4) بررسی تغییرات دژنراتیو به وقوع پیوسته در بافت‌های مغز و طناب
نخاعی 48
3-9) بررسی آماری

فصل چهارم - نتایج

4-1) مورفولوژی و فنوتیپ سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمال 50
4-2) مورفولوژی، اندازه و فنوتیپ سطحی اگزوزوم ها 51
4-3) تاثیر اگزوزوم‌ها بر مهار تکثیر لنفوسیت‌های تحریک شده با آنتی ژن MOG و میتوژن 51
PHA
4-4) تغییرات خصوصیات سایتوکاینی لنفوسیت‌هایT خود واکنشگر در سیستم هم کشت
لنفوسیت – اگزوزوم 51
4-5) تاثیر اگزوزوم‌ها بر القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده 52
4-6) تغییرات وزن و شدت علائم درمانگاهی بیماری 52
4-7) تغییرات خصوصیات سایتوکاینی لنفوسیت‌های سرمی و طحالی 53
4-8) تغییرات فراوانی سلول های T تنظیمیCD4+ CD25+ Foxp3+ در لنفوسیت های
طحالی 54

4-9)تغییرات هیستوپاتولوژیک 54

فصل پنجم – بحثونتیجه گیری

5-1) بحث 56
5-2) نتیجه‌گیری 64
5-3) پیشنهادات 65

فصل ششم - منابع

منابع 66

ضمائم 74

خلاصه فارسی

ارزیابی اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان و اگزوزوم‌های مشتق از آن بر روند بیماری، پولاریزه شدن پاسخ لنفوسیت‌های T کمکی، سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک انسفالومیلیت تجربی خودایمن در موش C57BL/6

شماره پایان نامه: ۸۳-۱

سال تحصیلی: ۹۱-۹۰

نگارنده: آرام مکاری زاده

انسفالومیلیت تجربی خودایمن (EAE) به عنوان مدل حیوانی بیماریاسکلروز متعدد (Multiple Sclerosis)، محور بسیاری از تحقیقات مربوط یه این بیماری قرار گرفته است. در هر دو بیماری EAE و MS، پاسخ‌های التهابی سلول‌های TCD4 خود واکنشگر اختصاصی به آنتی ژن‌های میلینی (زیررده های TH1 و TH17) به عنوانعمده‌ترین مسبب دمیلیناسیون سیستم اعصاب مرکزی و بروز علائم عصبی شناخته می شوند. از این رو هدف قرار دادن اختصاصی پیام رسان های تحمل زا در لنفوسیت‌های T خود واکنشگر با استفاده از لیگاندهای قرار گرفته بر روی اگزوزوم‌های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمال می تواند به عنوان یک رهیافت درمانی بالقوه مورد توجه قرار گیرد. هدف از مطالعه حاضر بررسی کارایی درمانی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال در تعدیل پاسخ‌های التهابی لنفوسیت‌های T خود واکنشگر فعال شده در طی انسفالومیلیت تجربی خودایمن می باشد.

برای این منظور، متعاقب القاء بیماری انسفالومیلیت تجربی خودایمن در موش‌های C57BL/6 ماده و ظهور علائم بیماری، موش‌ها با احتساب شرایط فیزیکی و شدت بیماری یکسان در سه گروه مجزا (7 سر موش در هرگروه)، تحت سه تزریق داخل وریدی به فاصله یک هفته با بافر فسفات سالین، سلول‌های بنیادی مزانشیمال (5×10^5 سلول) و اگزوزوم‌های مشتق از آن (50µg) قرار گرفتند. تغییرات علائم بالینی بیماری بصورت روزانه ثبت گردید. سه هفته پس از بروز علائم بیماری، سرم و لنفوسیت‌های طحالی موش های درمان شده جهت بررسی تغییرات خصوصیات سایتوکاینی(IL-10, IFN-γ IL-17، TGF-β1) و تغییرات فراوانی سلول‌های T تنظیمی به روش الایزا و فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که اگزوزوم‌ها از طریق پیشبرد شکل‌گیری سلول‌های T تنظیمی ($p<0.01$)، اثرات مشابهی با سلول‌های بنیادی مزانشیمال در کاهش مقادیر سایتوکاین‌های التهابی IL-17, IFN-γ، افزایش ترشح سایتوکاین‌های ضدالتهابی IL-10، TGF-β ($p<0.001$) و تخفیف شدت علائم درمانگاهی بیماری دارند.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد درمانی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های مزانشیمال می تواند به عنوان یک روش درمان غیر سلولی در درمان بیماری‌های خودایمن مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی : انسفالومیلیت تجربی‌خودایمن، لنفوسیت Tخودواکنشگر، TH17،TH1، سلول بنیادی مزانشیمال، اگزوزوم

فصل اول

مقدمه

Introduction

1-1) مقدمه و هدف

اسکلروز متعدد به عنوان یک بیماری نرودژنراتیو مزمن و پیشرونده سیستم اعصاب مرکزی توصیف می شود که در آن پاسخ‌های التهابی لنفوسیت‌های T خود واکنشگر منجر به تخریب غلاف میلینی اعصاب و بروز ناتوانی‌های فیزیکی – عصبی در افراد مبتلا می شود. این بیماری به عنوان دومین عامل مسبب ناتوانی‌های نرولوژیک در بالغین جوان محسوب می شود(Gold et al., 2006 ; Frohman et al., 2006).

درمان‌های رایج این بیماری عمدتاً شامل یکسری داروهای سرکوب یا تعدیل ایمنی می باشد که علاوه بر عوارض جانبی ناخواسته در دراز مدت با پیشرفت بیماری کارایی درمانی خود را تا حدود زیادی از دست می دهند. از این رو درمان این بیماری به عنوان یک چالش بزرگ در تحقیقات ایمونولوژی باقی مانده است. از میان استراتژی‌های درمانی آینده نگری که تا به حال برای بیماری MS معرفی شده‌اند راهکار پیوند سلول های بنیادی مزانشیمال جایگاه بزرگی را به خود اختصاص داده است. این رهیافت درمانی می تواند به عنوان ابزاری کارآمد جهت فائق آمدن بر ناتوانی‌های موجود در پیشبرد همزمان بازسازی میلین و سرکوب پاسخ های التهابی آسیب‌زا به کار گرفته شود (Payne et al., 2008).

با پیشرفت تحقیقات سلول‌های بنیادی، بروز برخی مشکلات مرتبط با سلول درمانی نظیر خطر بروز ناپایداری‌های ژنتیکی، احتمال وقوع رد ایمنی آلوژنیک یا واکنش‌های ازدیاد حساسیت محققین را به سمت نوعی استفاده غیرمستقیم و سالم‌تر از سلول‌های بنیادی مزانشیمال سوق داده است که بر پایه استفاده درمانی از میکرووزیکل‌های مشتق از سلول شکل گرفته است (Lai et al., 2010).

اگزوزوم‌ها به عنوان میکرووزیکل‌های مشتق از سلول، واسطه‌های بالقوه سلول برای اعمال تاثیرات پاراکرین می باشند(Thery et al., 2009). مطالعات قبلی نشان داده است که اگزوزوم‌ها قادر به القاء بسیاری از تاثیرات بازسازندگی و ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمال در مدل‌های تجربی آسیب بافتی می باشند (Bruno et al., 2009; Lai et al., 2010; Herrara et al 2010). با توجه به اینکه کارایی اگزوزوم‌ها در درمان بیماری‌های خودایمن نظیر MS منوط به دارا بودن دو ویژگی تعدیل پاسخ های التهابی و پیشبرد روند ترمیم آسیب‌های بافتی خواهد بود مطالعه حاضر با هدف ارزیابی کارایی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال در تعدیل پاسخ التهابی لنفوسیت‌های T خود واکنشگر در مدل حیوانی بیماری MS (انسفالومیلیت تجربی خود ایمن) شکل گرفته است.

فصل دوم

کلیات

Review of literature

2-1) بیماری اسکلروز متعدد

بیماری Multiple Sclerosis (MS) به عنوان یک بیماری نرودژنراتیو مزمن و پیش رونده سیستم اعصاب مرکزی (مغز و نخاع) شناخته می شود که در نتیجه پاسخ‌های التهابی نابجای سلول‌های سیستم ایمنی به آنتی ژن های میلینی و تخریب میلین اعصاب ایجاد می شود. اطلاق اصطلاح اسکلروز متعدد در این بیماری مربوط به اسکلروزها یا پلاک‌های متعددی می باشد که عمدتا در قسمت ماده سفید مغز ایجاد می شود جایی که بیشتر آن از میلین ساخته شده است. در این بیماری در نتیجه تخریب غلاف میلینی اعصاب و انتقال کند یا ضعیف پیام های عصبی ارتباط سلول‌های عصبی واقع در مغز و نخاع با یکدیگر دچار اختلال می شود.

بروز بیماری به صورت تیپیک در افراد با محدوده سنی 20 تا 40 سال بوده و بعد از تروما به عنوان دومین عامل ایجاد ناتوانی نورولوژیک در بالغین جوان محسوب می شود. این بیماری در حال حاضر بیش از دو میلیون نفر را در سراسر جهان با یک گرایش جنسیتی به جنس مونث (جنس مونث 2 تا 3 برابر جنس مذکر) درگیر خود نموده است (Payne et al., 2008).

علائم بالینی بیماری ممکن است خفیف مثل کرختی و بی حسی در اعضاء و یا شدید مثل فلجی یا از دست دادن بینایی باشد که نتیجه تخریب در غلاف میلینی اعصاب و انتقال کند یا عدم انتقال سیگنال های عصبی می باشد. در بیشتر موارد ظهور یا بروز بیماری بصورت یک حالت عود کننده - بهبود یابنده[1] می باشد که با اپی زودهایی از عملکردهای بد سیستم عصبی متعاقب پریودهای متناوب از بهبودی کامل یا نسبی مشخص می شود. در ادامه روند بیماری می تواند وارد فاز پیشرونده ثانویه[2] شود که با افزایش آسیب‌های سیستم اعصاب مرکزی منجر به پیشرفت آرام و یکنواخت آهنگ ناتوانی های عصبی- فیزیکی می شود. درصد کمی از بیماران مبتلا به MS سیر پیشرونده اولیه بیماری[3] را تجربه می کنند (20%-15%) که در این حالت پیشرفت بیماری فاقد پریود های بهبود می باشد (Frohman et al., 2006; Payne et al., 2008).

[1] -Relapse - Remitting
[2] -Secondary progressive phase
[3] -Primitive progressive

2-1-1) سبب شناسی

در حال حاضر عامل اصلی ایجاد بیماری به خوبی معلوم نمی باشد، هر چند که پاسخ ایمنی نابجا به پادگن - های موجود در غشاء میلین در افراد مستعد به عنوان یک نظریه مطرح می باشد. با این حال عوامل متعددی نظیر دخالت عوامل ژنتیکی، عفونت‌های ویروسی، استرس‌های اکسیداتیو، فاکتورهای محیطی، آسیب‌های DNA، هسته و میتوکندری در بافت عصبی به عنوان عوامل مستعد کننده و پیش برنده بیماری در نظر گرفته می شود (Hemmer et al., 2006 ; Gold et al., 2006) .

2-1-2) پاتوژنز

در بیماری MS سلول‌های TCD4 خود واکنشگر اختصاصی به آنتی ژن های میلینی پس از عبور از سد خونی – مغزی واسطه آسیب بر ضد نرون‌های مرکزی بویژه غلاف میلینی و آکسون‌های آنها قرار می گیرند. سیمای مرفولوژیک کلیدی بیماری به صورت اولیه شامل دمیلیناسیون آکسون‌های اعصاب می باشد که منجر به بلوکه شدن یا کند شدن انتقال سیگنال‌های عصبی در محل دمیلیناسیون می شود (شکل2-1). پیشرفت محسوس علائم عصبی زمانی است که بلوک انتقال پیام‌های عصبی به طور همزمان در تعداد زیادی از فیبر های عصبی پیام رسان یک مسیر رخ دهد. در طول دوره های بهبود بیماری، روند التهاب و ادم در سیستم اعصاب مرکزی فروکش می کند. تصور می شود که بازیابی توانایی انتقال پیام‌های عصبی سیستم اعصاب مرکزی در این مرحله می تواند در نتیجه رمیلیناسیون و بازسازی غلاف های گلیال باشد. در مقابل آسیب آکسونی برگشت ناپذیر بوده و همین مسئله احتمالا مهمترین علت عدم کارکرد عصبی درMS مزمن باشد. بطور کلاسیک سیمای پاتولوژیک بیماری MS بصورت التهاب دور عروقی، دمیلیناسیون و دژنراسیون آکسونی مشخص می گردد (Payne et al., 2008 ; Gold et al., 2006; Frohman et al., 2006).

2-1-3) درمان

داروهای رایج موجود در درمان بیماری MS به طور خلاصه در جدول2-1 آورده شده است. این داروها عمدتا شامل داروهای تنظیم ایمنی می باشند که عملکرد سلول‌های ایمنی را تعدیل نموده و تولید واسطه های التهابی را کاهش می دهند. استفاده درمانی از این داروها به طور چشمگیری می تواند تعداد موارد عود

بیماری، تعداد، اندازه جراحات و آتروفی مغز را در بیماران مبتلا به فرم عودکننده - بهبود یابنده بیماری کاهش دهد. در بیمارانی که پاسخ ضعیف به داروهای تنظیم ایمنی دارند داروی انتخابی اول Natalizumab می باشد که یک مونوکلونال آنتی بادی انسانی شده بر ضد زنجیره α4 اینتگرین α4β1 (VLA-4) می باشد که منجر به مهار باندینگ لوکوسیت‌ها به مولکول های چسبنده عروقی (VCAM-1) و فیبرونکتین شده و در نتیجه منجر به کاهش ترافیک لوکوسیتی از سد خونی – مغزی می شود. با این حال تاثیر درمان طولانی مدت با تمامی این داروها ضعیف بوده و تنها در درصد کمی از بیماران (حداکثر 30%) می تواند مفید باشد. به علاوه در بیمارانی که وارد فاز پیشرونده ثانویه بیماری می شوند عملا پاسخ به درمان‌های موجود بسیار ضعیف‌تر می‌باشد. به عبارت دیگر به محض شروع آسیب نرو آکسونی کارایی داروهای تنظیم ایمنی به پایان می رسد (Payne et al., 2008 ; Hemmer et al., 2006; Corboy et al., 2003).

2-2) انسفالومیلیت تجربی خودایمن[1](EAE)

انسفالومیلیت تجربی خودایمن (EAE) به عنوان یک بیماری دمیلینه کننده سیستم اعصاب مرکزی، سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک مشترکی با بیماری MS دارد و بعنوان یک مدل حیوانی در مطالعات و تحقیقات مربوط به این بیماری مورد استفاده قرار می گیرد. القاء این بیماری در حیوانات حساس متعاقب ایمونوزاسیون با یکی از آنتی ژن های میلینی (MOG, PLP,MBP) امولیسیفیه شده در ادجوانت فروند کامل[2] یا ناقص[3] صورت می پذیرد. پس از فعال سازی سلول‌های TCD4 اختصاصی به میلین در عقده‌های لنفاوی نزدیک به موضع تزریق ، این سلول‌ها از سد خونی- مغزی آسیب دیده به وسیله توکسین پرتوسیس عبور کرده و به داخل سیستم اعصاب مرکزی نفوذ می کنند. در سیستم اعصاب مرکزی سلول‌های T بوسیله سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه‌ای موضعی و ارتشاحی که کمپلکس MHC-Peptide را عرضه می کنند بازفعال سازی شده و منجر به شروع پروسه التهاب ، دمیلیناسیون و آسیب اکسونی می شوند. بسته به پروتوکل استفاده شده جهت ایمونوزاسیون و پیش زمینه موش‌های مورد استفاده، بیماری می تواند سیر حاد، مزمن، پیشرونده یا عودکننده - بهبود یابنده داشته باشد. القاء بیماری می تواند با انتقال سلول‌های TCD4 اختصاصی به میلین، از موش‌های درگیر EAE به موش های دست نخورده گیرنده انجام پذیرد (Fletcher et al., 2010).

[1]- Experimental autoimmune encephalomyelitis
[2]- Complete freund adjuant
[3] -Incomplete freund adjuant

از آنجایی که القاء بیماری در موش به پس زمینه ژنتیکی حیوان بستگی دارد سویه‌های خاصی از آن به عنوان استاندارد القاء بیماری پذیرفته شده است. بطور کلی به منظور القاء بیماری در موش بسته به نوع و سویه حیوان از انواع مختلف پادگن‌های عصبی مانند میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین[1] (MOG)، پروتئو لیپوپروتئین [2] (PLP) و پروتئین بازی میلین[3] (MBP) استفاده می شود. مدل بیماری القاء شده در موش‌های C57Bl/6 توسط پپتید MOG_{35-55} از نوع مزمن و پیشرونده است (Gold et al., 2006 ; Costa et al., 2003).

مدل EAE به عنوان یک ابزار مفید جهت پیشبرد درک بهتر از پروسه سیر التهاب و کارآزمایی درمان‌های جدید جهت بیماری MS مورد استفاده قرارمی گیرد. علی رغم اشتراکات بالینی و هیستوپاتولوژیک زیاد، تفاوت های جزئی بین بیماری EAE و MS وجود دارد. بدین معنی که در موارد نادر یک درمان مشخص می تواند دو پیامد کاملا متضاد را در دو بیماری به دنبال داشته باشد. برای مثال تجویز IFN-γ یا TNF-α در EAE اثرات حفاظتی اما در MS منجر به وخیم‌تر شدن بیماری می شود (Fletcher et al., 2010) .

2-2-1) پاتوژنز EAE

متعاقب ایمونوزاسیون با آنتی ژن‌های میلینی امولیسیفیه شده در ادجوانت فروند کامل و پرتوسیس توکسین[4]، سلول‌های دندرتیک در داخل عقده‌های لنفاوی بوسیله اگونیست های TLR[5] که همان ترکیب مایکوباکتریوم توبرکولوزیس موجود در ادجوانت فروند می باشد فعال شده و آنتی ژن‌های میلینی را به سلول‌های T دست نخورده عرضه می کنند در نتیجه سلول‌های T اختصاصی به میلین فعال شده و از طریق جریان خون وارد ترافیک مسیر سیستم اعصاب مرکزی می شوند. شکسته شدن سد خونی- مغزی بوسیله توکسین بردتلا پرتوسیس، اجازه ورود و بسیج سلول‌های T و دیگر سلول‌های التهابی را به سیستم اعصاب مرکزی می دهد. سلول‌های T وارد شده به سیستم اعصاب مرکزی با آنتی ژن‌های میلینی خودی مواجه شده و مجددا بوسیله سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن موضعی باز فعال سازی می شوند. در نتیجه سلول‌های T تکثیر یافته و مدیاتورهای التهابی را آزاد می کنند که به بسیج سلول‌های ایمنی به محل التهاب کمک می کند.

[1]- Myelin oligodendrocyte glycoprotein
[2]- Proteolipoprotein
[3] -Myelin basic protein
[4]- Pertosis toxim
[5]- Toll like receptor

فعال شدن سلول های گلیال موضعی و ارتشاح سلولی منجر به تولید پروتئازها، گلوتامات، واسطه های فعال اکسیژن و دیگر عوامل سایتوتوکسیک می شود که موجب پیشبرد تخریب میلین می شوند (شکل 2-2). آسیب‌های وارده به غلاف میلینی احاطه کننده آکسون‌ها منجر به آسیب آکسونی و نقص عملکردی عصب می شود (Fletcher et al., 2010).

2-3) انواع زیر رده های سلول های T افکتور

بر اساس پروفایل سایتوکاینی و فاکتور نسخه برداری، سلول‌های TCD4 افکتور به زیر رده‌های TH1 ، TH2 و اخیرا TH17 تقسیم بندی می شوند. سلول‌های زیر رده TH1 مولد IFN-γ بوده در حضور سایتوکاین IL-12 تمایز یافته و فاکتور نسخه برداری اختصاصی T-bet را بیان می کنند. این سلول‌ها در پیشبرد پاسخ های ایمنی بر ضد آنتی ژن های داخل سلولی نقش ایفاء می کنند. سلول‌های زیر رده TH2 در پاسخ به حضور IL-4 تمایزیافته و فاکتور نسخه برداری اختصاصی GATA-3 را بیان می کنند که جهت تخریب پاتوژن‌های خارج سلولی و واسطه گری پاسخ ایمنی هومورال با ترشح سایتوکاین‌های IL-4، IL-5 وIL-13 ضروری می باشد.

سلول‌های TCD4 مولد IL-17 که اصطلاحا TH17 نامیده می شوند اخیرا شناسایی شده اند و به عنوان یک زیر رده مجزا از سلول‌های TCD4 شناخته می شوند که سایتوکاین‌های IL-17A ، IL-17F ،IL-21، IL-9 ، IL-22 و TNF-α را تولید کرده موجب پیشبرد التهاب در بسیاری از ناهنجاری‌های خود ایمنی می شوند. حضور سایتوکاین‌های TGF-β و IL-6 جهت تمایز سلول‌های موشی این زیر رده و IL-23 جهت تکثیر آنها ضروری می باشد.

به طور کلی این زیر رده‌های سلولی در حالت سلامت اثر تنظیمی بر فعالیت یکدیگر دارند و عملکرد یکدیگر را کنترل می کنند. مطالعات متعدد نشان می دهد که فعالیت تشدید شده سلول‌های زیر رده TH1 وTH17 در ایمونوپاتوزنز بیماری‌های MS و EAE نقش اساسی دارند. سطح بالای سایتوکاین‌های التهابی IFN-γ وIL-17 در سرم و سیستم اعصاب مرکزی این دسته از بیماران موید همین نکته می باشد. برخلاف عملکرد پاتوژنیک زیر رده‌های TH1 و TH17 ، فعالیت زیر رده‌های T تنظیمی و TH2 در بیماری‌های خودایمن با واسطه TCD4 نظیر مالتیپل اسکلروزیس، آرتریت روماتوئید و دیابت می تواند نقش حفاظتی داشته باشد (Fletcher et al., 2010).

2-4) سلول های T افکتور دخیل در پاتوژنز بیماری EAE

سلول‌های TCD4 مولد IFN-γ (TH1) وIL-17 (TH17) عمده ترین سلول‌های ایمنی دخیل در روند پاتوژنزیس EAE وMS به شمار می آیند. مطالعات متعدد نشان دهنده مشارکت نسبی هر دو زیر رده TH17,TH1 در خود ایمنی سیستم اعصاب مرکزی می باشند که البته با مکانیسم‌های متفاوتی انجام می پذیرد.

در ارتباط با این موضوع که کدام زیر رده از سلول‌های T کمکی نقش حیاتی‌تری در پاتوژنز EAE دارند هنوز مناقشه وجود دارد. در موش هایی که نقص در RORγt یا T-bet دارند مقاومت نسبت به القاء EAE وجود دارد که نشان دهنده دخیل بودن هر دو زیر رده TH1 وTH17 در خودایمنی CNS می باشد. مطالعاتی که در مورد بررسی فنوتیپ سلول‌های T ارتشاحی به CNS در مدل EAE انجام گرفته است حضور هر دو زیر رده را مورد تایید قرار داده اند. با این حال این ویژگی در میان سویه های مختلف موشی متفاوت است در موش های B6 سلول‌های T خود واکنشگر زیر رده TH1، سلول‌های ارتشاحی غالب CNS در مرحله اوج بیماری می باشند در حالیکه در موش های SJL بیشتر این سلول‌ها زیر رده TH17 می باشند. بسته به اویدیتی سلول های T به آنتی ژن های خودی، ایمونوزاسیون موش ها با اپی توپ های مشخص MOG منجر به پاسخ سلول های T با یک نسبت متفاوت از TH1 به TH17 می شود این نتایج می تواند نشان دهنده نقش مشارکتی و نسبی پاسخ های TH1 وTH17 در التهاب CNS باشد که می تواند بسته به سویه موش ها و استراتژی ایمونوزاسیون متغیر باشد.

هر چند هر دو نوع زیر رده TH1 وTH17 قادر به القاء EAE می باشند با این حال علائم بالینی و سیمای پاتولوژیک آنها متفاوت می باشد. به این معنی که سلول‌های پولاریزه شده با IL-12 بیان کموکاین‌های جاذب مونوسیتی را تسریع بخشیده و منجر به ارتشاح غالبا ماکروفاژی در طناب نخاعی می شوند در حالی که سلول‌های T پولاریزه شده با IL-23 باعث فعال شدن کموکاین‌های جاذب نوتروفیل شده و ارتشاح غالباً نوتروفیلی را در مفز باعث می‌شوند. از این رو به نظر می رسد که سلول‌های زیر رده TH1 وTH17 نقشی مکمل در پاتوژنز EAE داشته باشند.

هر چند سلول‌های T مولد هر دو سایتوکاین IFN-γ وIL-17 که فاکتورهای نسخه برداری T-bet و RORγt را بیان می کنند نیز در طی EAE به CNS بسیج می‌شوند. مضاف بر این سلول‌های TH17 وارد شده به CNS نیز می توانند به سلول‌های مولد IFN-γ تغییر یابند که نشان دهنده وجود پلاستیسیته در داخل این

جمعیت ها می‌باشند (Fletcher et al., 2010). هر چند هنوز مشخص نیست که آیا این سلول‌ها یک زیر مجموعه ثابت و پایدار سلولی هستند و یا اینکه یک فنوتیپ گذرا بین سلول‌های زیر رده TH1 و TH17 می‌باشند (El-Behi et al., 2010).

2-4-1) سلول‌های زیررده TH1

در اصل تصور می شود که سلول‌های زیررده TH1 عمده‌ترین سلول‌های T پاتوژنیک درگیر در بیماری MS و EAE باشند. این نتیجه گیری تا حدود زیادی از آنجا ناشی می شود که مشاهده شده است که موش های دارای نقص در IL-12p40 ($IL\text{-}12p40^{-/-}$) نسبت به القاء EAE مقاوم می باشند و IL-12 نیز جهت تمایز سلول های TH1 مورد نیاز می باشند. به علاوه درمان بیماران مبتلا به MS با IFN-γ منجر به وخیم‌تر شدن بیماری می گردد. در مورد EAE نقص در ($IFN\text{-}\gamma^{-/-}$) IFN-γ یا منتقل کننده‌های سیگنال آن و ($STAT1^{-/-}$) منجر به افزایش شدت بیماری می شود. علت این تناقضات تا حد زیادی متعاقب شناسایی IL-23 که از لحاظ ساختاری در ارتباط با IL-12 می باشد مشخص شده است بدین معنی که IL-23 در زنجیره p40 خود با IL-12 سهیم می باشد که می تواند به ترتیب در ارتباط با یک زنجیره p19 یا p35 در IL-23 و IL-12 باشد. موش های $IL\text{-}23p19^{-/-}$ همانند $IL\text{-}12p40^{-/-}$ مقاوم به EAE می باشند در حالی که موش‌های $IL\text{-}12p35^{-/-}$ حساس می باشند. اخیرا مشخص شده است که IL-23 جهت القاء یا تکثیر سلول‌های TCD4 مولد IL-17 که اصطلاحاً TH17 نامیده می‌شوند ضروری می باشد (Fletcher et al., 2010; El-Behi, et al., 2010).

2-4-2) سلول‌های زیررده TH17

اخیرا مشخص شده است که تمایز سلول‌های دست نخورده T CD4+ به سلول‌های T تولیدکننده IL-17 (TH17) در بیماری‌های خود ایمن می تواند نقش پاتوژنیک بیشتری نسبت به TH1 تولیدکننده IFN-γ داشته باشد. سلول‌های TH17 در حال حاضر به عنوان یک زیر رده مجزا از سلول‌های TCD4 شناخته می شوند که سایتوکاین‌های IL-17A ، IL-17F ،IL-21، IL-9 ،IL-22 و TNF-α را تولید کرده موجب پیشبرد التهاب در بسیاری از ناهنجاری‌های خود ایمن می شوند. علاوه بر این، حضور سایتوکاین‌های TGF-β و IL-6