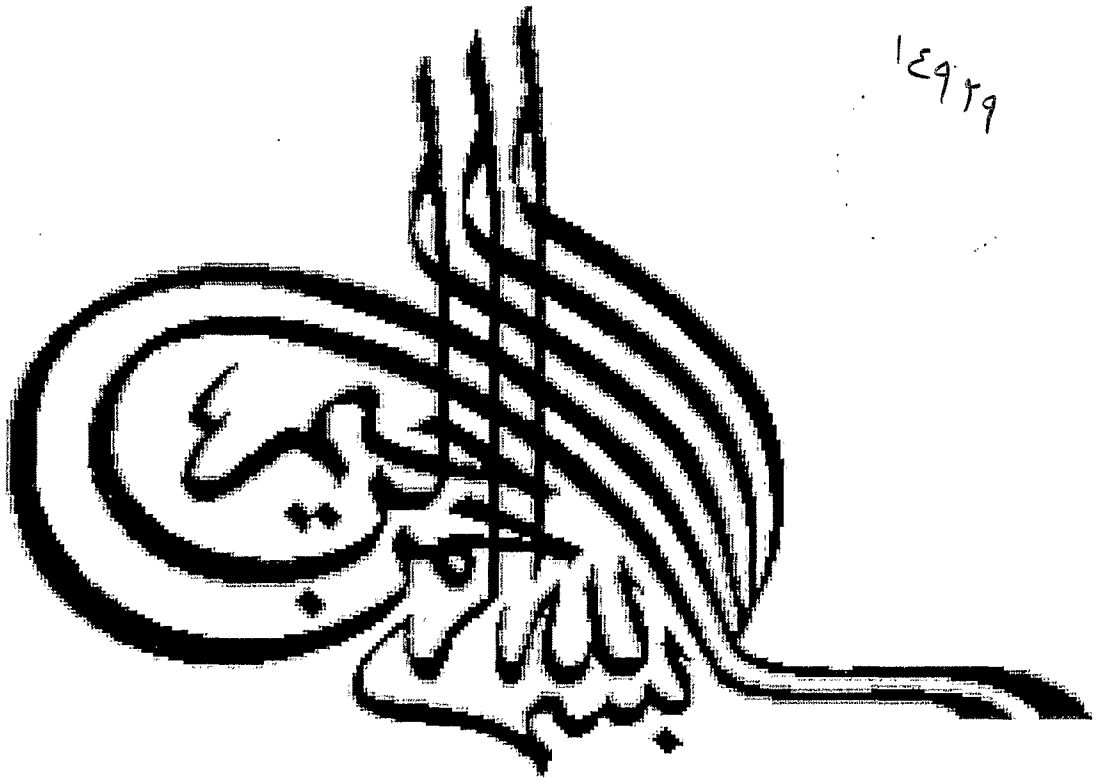
٤٩٠٢٩



٩٧٣٦٨

T.M.U.
دانشگاه تربیت مدرس
دانشکدهٔ پزشکی

رسالهٔ دورهٔ دکتری (PhD) در رشتهٔ ایمنی‌شناسی

موضوع:

بررسی اثر سلول‌های دندریتیک تیمار شده با IL-10 و IFN-β قبل و بعد از ایجاد EAE در موش

نگارش

ناصر اقدمی

استاد راهنما

دکتر سید محمد مؤذنی

استاد مشاور

دکتر فرهاد غریب‌دوست

پاییز ۱۳۸۶

۱۳۸۷/۲/۵

۹۶۳۶۸

خدایا!

مرا به آنچه آموخته‌ای، بهره‌مند گردان

و آنچه مرا بهره‌مند گردانَد

به من بیاموز

و همواره بر دانشم بیفزا

سپاس و تقدیم به:

درگاه یگانه معبودی که توانم داد تا بتوانم، فکرم داد تا بیاموزم و قلمم داد تا بنگارم

تقدیم به دو ستارهٔ بزرگ آسمان کوچک زندگی‌ام:

پدر عزیزم؛ مفهوم بی‌دریغ مهربانی و صداقت

مادر مهربانم؛ آیینهٔ افتادگی، عاطفه و پارسایی

تقدیم به:

همسرم صبورم؛ همراهی همیشگی و یاوری مهربان

و

تقدیم به:

همهٔ سبز اندیشانی که شور دانستن، طعم حیاتشان است.

تشکر و قدردانی

قبل از هر چیز خداوند متعال را سپاس می‌گویم که توفیق نوشتن این پایان نامه را به من ارزانی داشته و جلوه‌های بیشتری از خلقت خویش را بر ما نمایان ساخت.

زحمات و راهنمایی‌های بیدریغ استاد ارجمند جناب آقای دکتر سید محمد موذنی سرمایهٔ اصلی و توان بخش راستین من بوده و به حقیقت آن مساعی مشکور را مدار اساسی این تحقیق می‌دانم و شکر نعمت و مرحمت استاد را همیشه بر خود لازم و فریضه می‌دانم که خود ثواب باقی خواهد بود.

با سپاس فراوان از استاد ارجمند جناب آقای دکتر فرهاد غریب‌دوست که نه تنها مسئولیت مشاورهٔ این رساله را بر عهده داشتند که آموزگاری صادق در پیمودن این راه دشوار بودند.

با سپاس فراوان از اساتید ارجمند جناب آقای دکتر حسن، جناب آقای دکتر پورفتح‌الله، جناب آقای دکتر وجگانی، جناب آقای دکتر زواران، سرکار خانم دکتر ابتکار و سرکار خانم دکتر مصفا که در طول تحصیل مطالب ارزشمندی از محضرشان آموخته‌ام و همچنین داروی این رساله را تقبل فرمودند.

برخود لازم می‌دانم که از زحمات جناب آقای مهدی مهدوی در انجام این رساله تشکر نمایم.

با تقدیر و تشکر از همکلاسی‌های گرامی و کلیهٔ دوستانی که در طول تحصیل همواره سبب دلگرمی و یاری‌رسان اینجانب بودند.

و قدردانی ویژهٔ خود را نسبت به همسرم که در تمام لحظات، مشوق و حامی من بوده، ابراز می‌دارم.

آئین‌نامهٔ پایان‌نامه (رسالهٔ)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه، چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادهٔ ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رسالهٔ) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آقار علمی" دانشگاه اطلاع دهند.

مادهٔ۲: در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل چاپ کند:

"کتاب حاضر، حاصل رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ ایمنی‌شناسی است که در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر سید محمد مؤذنی، مشاورهٔ دکتر فرهاد غریب‌دوست از آن دفاع شده است."

مادهٔ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد از شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادهٔ۴: درصورت عدم رعایت مادهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

مادهٔ۵: دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادهٔ ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

مادهٔ ۶: اینجانب ناصر اقدمی دانشجوی رشتهٔ ایمنی‌شناسی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضاء

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان‌ها که لازمهٔ شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش‌های علمی تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

مادهٔ۱- حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها/رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

مادهٔ۲- انتشار مقاله و یا مقالات مستخرج از پایان نامه/رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

مادهٔ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه/رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزهٔ پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

مادهٔ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزهٔ پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

مادهٔ ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طرق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضاء

خلاصه

سلول‌های دندریتیک (DC)، سلول‌های ویژهٔ عرضهٔ کننده آنتی‌ژن می‌باشند که در شروع و تنظیم پاسخهای ایمنی وابسته به سلول‌های T نقش حیاتی ایفا می‌کنند. با توجه به نقش ریزمحیط در تغییر عملکرد DC، در این پژوهش به منظور افزایش عملکرد تولروژنیک DC، تاثیر اینترلوکین ۱۰، اینترفرون بتا و یا ترکیب آنها بر فنوتیپ، میزان بلوغ و پتانسیل عملکردی DC مشتق از مغز استخوان موش در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با TNF-α، مورد بررسی قرار گرفت همچنین از بیماری انسفالیت تجربی خودایمن (EAE) به عنوان مدل حیوانی بیماری مولتیپل اسکلروزیس(MS) برای مطالعهٔ عملکرد DC تیمار شده در شرایط داخل بدن استفاده شد.

سلول‌های دندریتیک نابالغ با کشت شش روزهٔ سلول‌های مغزاستخوان موش گونهٔ C57BL/6 در محیط حاوی GM-CSF و IL-4 تولید و سپس با هریک از سایتوکینهای TNF-α, IL-10, IFN-β و یا IL-10 به همراه IFN-β به مدت دو روز تیمار و مورد مطالعه قرار گرفتند. بیان آنتی‌ژنهای سطحی سلول‌های تولید شده با استفاده از آنتی‌بادیهای کونژوگه بر علیه شاخص CD11c (شاخص سلول‌های دندریتیک) در ترکیب با شاخصهای MHC class II, CD11b, CD86, CD40 و یا CD8α مورد ارزیابی قرار گرفت. توانایی DC در تحریک لنفوسیتهای T دست‌نخورده، با استفاده از آزمون و اکنش مختلط لنفوسیتی (کشت سلول‌های دندریتیک به همراه سلول‌های T آلوژنیک) سنجیده شد. برای ارزیابی توانایی DC تیمار شده در ایجاد پاسخهای اختصاصی، ابتدا DC با پپتید میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین (MOG) پالس و سپس در کف دست موش تزریق گردید تا بعد از گذشت ۵ روز سلول‌های گره لنفاوی موضعی (براکیال) در حضور پپتید در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شوند و همانند آزمون MLR میزان تکثیر با استفاده از جذب تایمیدین نشاندار مورد سنجش قرار گیرد. از مایع رویی کشت سلول‌ها (بعد ۴۸ ساعت) برای سنجش سایتوکینهای IFN-γ, IL-4, IL-10 و TNF-α با استفاده از روش ELISA، استفاده گردید. برای بررسی توانایی DC تیمار شده در ایجاد بیماری EAE از یک، دو یا ۳ بار تزریق DC پالس شده با آنتی ژن (MOG) در موشهای سالم ماده از مسیرهای متفاوت(زیرجلدی، داخل صفاقی و داخل رگی) استفاده گردید. اثربخشی DC تیمار شده در ایجاد تحمل ایمنی در موش، با تزریق DC پالس شده در زمانهای ۲۸، ۱۴ و ۷ روز قبل از ایجاد EAE به روش معمول و توانایی آنها در درمان بیماری EAE با تزریق DC تیمار شده ۳، ۵ و ۹ روز بعد از القاء بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج نشان می‌دهد که کشت شش روزهٔ سلول‌های مغز استخوان در حضور IL-4 و GM-CSF منجر به تولید مقادیر متنابهی DC نابالغ می‌گردد و تیمار آنها با TNF-α منجر به بلوغ بیشتر می‌گردد که با افزایش بیان شاخصهای MHC class II, CD86و CD40 به همراه افزایش توانایی DC در تکثیر سلول‌های T آلوژن، در آزمون MLR، مشخص می‌شود. درحالیکه به گواهی فنوتیپ و عملکرد DC، تیمار با IL-10 از بلوغ بیشتر سلول‌ها پیشگیری می‌کند. تیمار با اینترفرون بتا اثرات متفاوتی بر افزایش شاخصهای بلوغ دارد بگونه‌ای که باعث افزایش بیان MHC class II و CD86 و کاهش بیان CD40 می‌گردد. این تفاوت در نتایج آزمون MLR و LTT سلول‌های تیمار شده با IFN-β نیز مشهود بود و در حالی که تیمار با IFN-β موجب افزایش تکثیر در آزمون MLR می‌گردد در آزمون LTT باعث کاهش تکثیر سلول‌های T پرایم شده گردید. تیمار همزمان DC نابالغ با IL-10 و IFN-β توانایی این سلول‌ها در عرضهٔ آنتی‌ژن به سلول‌های T در آزمون LTT را به همراه بیان شاخصهای بلوغ بر سطح این سلول‌ها مهار می‌نماید. بررسی

سایتوکینهای تولید شده نشان می‌دهد که چنین تیماری توانایی DC در تولید سایتوکینهای Th1 نسبت به Th2 که با اندازه‌گیری نسبت‌های TNF-α/IL-4, TNF-α/IL-10, IFN-γ/IL-10 and IFN-γ/IL-4 مورد ارزیابی قرار گرفت، را کاهش می‌دهد. مطالعات در شرایط داخل بدن (in vivo) نشان می‌داد که یک یا دو بار تزریق DC تیمار شده و پالس شده با MOG در همهٔ گروه‌های مورد آزمایش، قادر به ایجاد علائم بیماری EAE در موش نبوده و علائم بالینی را تنها بعد از سه بار تزریق DC تیمار شده با TNF-α از طریق زیر جلدی می‌توان مشاهده نمود. در روش مورد استفاده برای پیشگیری از ایجاد بیماری EAE، سلول‌های تیمار شده با TNF-α و پالس شده با پپتید، باعث بروز سریعتر بیماری و تشدید علائم در مقایسه با گروه کنترل گردید در مقابل سلول‌های تیمار شده با IL-10 و IFN-β بطور همزمان توانست بطور کامل از بروز بیماری پیشگیری کند. در عین حال تزریق DC تیمار شده با IL-10 و یا IFN-β به تنهائی می‌توانست علائم بیماری را کاهش دهد و زمان بروز بیماری را تا یک هفته به تاخیر اندازد. اگرچه تزریق DC که بطور همزمان با IL-10 و IFN-β تیمار شده و با پپتید پالس شده بودند نتوانست علائم بیماری را در روش درمانی کاملاً بهبود ببخشد ولی بطور موثری آنرا کاهش داد.

بنابراین مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که سیتوکین‌های متفاوت می‌توانند با تغییر فنوتیپ و عملکرد DC با مکانیسم‌ها مختلف موجب اثرات درمانی متفاوتی در DC گردند. این مطالعه همچنین مدل جدیدی را برای ایجاد EAE با استفاده از DC ارائه نمود. در نهایت مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که استفاده از DC تیمار شده با IFN-β و IL-10 می‌تواند یک روش جدید و احتمالا موثر و مفید در درمان بیماریهای خود ایمن بخصوص بیماری مولتیپل اسکلروزیس باشد.

کلمات کلیدی: سلول‌های دندریتیک، اینترلوکین -۱۰، اینترفرون بتا، آنسفالیت خود ایمن

عنوان | فهرست مطالب | صفحه

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱ پیشگفتار ۲

۱-۲ عوامل ایجاد کننده خودایمنی ۳

۱-۲-۱ عوامل ژنتیکی ۳

۱-۲-۲ عوامل غیرژنتیکی ٤

۱-۳ مکانیسم ایجاد بیماریهای خودایمن ٦

۱-۳-۱ تحمل مرکزی و مکانیسم‌های از دست رفتن آن ٦

۱-۳-۲ تحمل محیطی و مکانیسم‌های از دست رفتن آن ۱۰

۱-۴ سلول‌های دندریتیک و نقش آنها در خودایمنی ۱۳

۱-۵ بیولوژی سلول‌های دندریتیک ۱۳

۱-۵-۱ تاریخچه ۱۳

۱-۵-۲ پیش‌سازهای سلول‌های دندریتیک ۱٤

۱-۵-۳ اشتقاق سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای میلوئیدی ۱۵

۱-۵-٤ اشتقاق سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای لنفوئیدی ۱۵

۱-۵-۵ اشتقاق سلول‌های دندریتیک پلاسموسیتوئید ۱٦

۱-۵-٦ اشتقاق سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای دوگانهٔ میلوئیدی/لنفوئیدی ۱٦

۱-۵-۷ فنوتیپ زیرگروههای مختلف سلول‌های دندریتیک ۱٦

۱-۵-۸ زیرگروههای مختلف سلول‌های دندریتیک در موش ۱۷

۱-۵-۹ مهاجرت و جایگزینی سلول‌های دندریتیک ۱۹

۱-۵-۱۰ جذب و عرضهٔ آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک ۲۱

۱-۶ نقش سلول‌های دندریتیک در فعال شدن لنفوسیتها ۲۳

۱-۶-۱ سلول‌های T ۲۳

۱-۶-۲ سلول‌های B ۲٤

۱-۷ سلول‌های دندریتیک در واکنش مختلط لنفوسیتی ۲٤

۱-۸ نقش سلول‌های دندریتیک در ایجاد تحمل ۲۵

۱-۸-۱ ایجاد تحمل مرکزی توسط سلول‌های دندریتیک ۲۵

۱-۸-۲ ایجاد تحمل محیطی توسط سلول‌های دندریتیک ۲٦

۱-۹ ایجاد سلول‌های T تنظیمی توسط سلول‌های دندریتیک ۲۷

۱-۱۰ ایجاد و درمان خودایمنی توسط سلول‌های دندریتیک ۲۸
۱-۱۱ بیماری مولتیپل اسکلروزیس ۳۱
۱-۱۱-۱ نقش سلول‌های $CD4^+$ T ۳۲
۱-۱۱-۲ نقش سلول‌های $CD8^+$ T ۳۷
۱-۱۱-۳ نقش سلول‌های B در بیماری MS ۳۸
۱-۱۱-۴ نقش سایتوکینها در بیماری MS ۳۹
۱-۱۲ مراحل مختلف آسیب‌زایی در بیماری MS ٤۰
۱-۱۳ شواهد وجود DC در سیستم عصبی مرکزی ٤۱
۱-۱۴ تاثیر سلول‌های دندریتیک در ایجاد EAE ٤٤
۱-۱۵ سایتوکینها و سلول‌های دندریتیک ٤٦
۱-۱۵-۱ سایتوکائین IL-10 ..... ٤۷
۱-۱۵-۲ سایتوکائین اینترفرون بتا ٤۹
۲ فصل دوم: مواد و روش کار ۵۱
۲-۱ کشت سلول‌های دندریتیک ۵۲
۲-۲ جداسازی سلول‌های مغز استخوان موش ۵۲
۲-۲-۱ مواد و وسایل مورد نیاز ۵۲
۲-۲-۲ روش کار ۵۲
۲-۳ کشت سلول‌های مغز استخوان برای تولید DC ۵٤
۲-۳-۱ مواد و وسایل مورد نیاز: ۵٤
۲-۳-۲ روش کار در کشت سلول‌های مغز استخوان با mrGM-CSF تنها: ۵٤
۲-۳-۳ روش کار در کشت سلول‌های مغز استخوان با mrGM-CSF و mrIL-4 ..... ۵۵
۲-۳-۴ روش کار در کشت سلول‌های مغز استخوان در پلیت کشت میکروبی: ۵۵
۲-۴ تیمار DCs با استفاده از فاکتورهای متفاوت ۵۵
۲-۴-۱ مواد و وسایل مورد نیاز: ۵۵
۲-۴-۲ روش کار: ۵٦
۲-۵ پالس کردن DCs با آنتی‌ژن ۵۷
۲-۵-۱ مواد و وسایل مورد نیاز: ۵۷
۲-۵-۲ روش کار: ۵۷
۲-۶ بررسی فلوسایتومتری ۵۷
۲-۶-۱ مواد و وسایل مورد نیاز: ۵۷

۲-۶-۲ روش کار: ۵۸
۲-۷ آزمون واکنش لنفوسیتی مختلط (MLR) ۵۹
۲-۸ جداسازی سلول‌های T از گره لنفاوی موش ۵۹
۲-۸-۱ مواد و وسایل مورد نیاز: ۵۹
۲-۸-۲ روش کار: ۶۰
۲-۹ تخلیص سلول‌های T غدد لنفاوی با استفاده از نایلون ول ۶۱
۲-۹-۱ مواد و وسایل مورد نیاز: ۶۱
۲-۹-۲ روش کار: ۶۱
۲-۱۰ سنجش پاسخ تکثیری در آزمون MLR ۶۲
۲-۱۰-۱ وسایل و مواد مورد نیاز: ۶۲
۲-۱۰-۲ روش کار: ۶۲
۲-۱۱ آزمون پاسخ تکثیری لنفوسیتهای پرایم شده ۶۳
۲-۱۲ تزریق سلول‌های دندریتیک پالس شده ۶۴
۲-۱۲-۱ وسایل و مواد مورد نیاز: ۶۴
۲-۱۲-۲ روش کار: ۶۴
۲-۱۳ جداسازی لنفوسیتها از غدد لنفاوی حیوان ایمونیزه شده ۶۴
۲-۱۳-۱ مواد و وسایل مورد نیاز : ۶۴
۲-۱۳-۲ روش کار: ۶۵
۲-۱۴ سنجش پاسخ تکثیری در آزمون LTT ۶۵
۲-۱۴-۱ وسایل و مواد مورد نیاز: ۶۵
۲-۱۴-۲ روش کار: ۶۵
۲-۱۵ سنجش سایتوکینی ۶۶
۲-۱۵-۱ تعیین سطح سایتوکین *IL-10* ۶۶
۲-۱۵-۲ سنجش میزان سیتوکین *IL-4* ۶۹
۲-۱۵-۳ سنجش میزان سیتوکین *IFN-γ* ۶۹
۲-۱۵-۴ سنجش میزان سیتوکین *TNF-α* ۶۹
۲-۱۶ القاء بیماری آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) ۷۰
۲-۱۷ القاء بیماری EAE توسط پپتید MOG_{35-55} ۷۰
۲-۱۷-۱ وسایل و مواد مورد نیاز: ۷۰
۲-۱۷-۲ روش کار: ۷۰

۲-۱۸ تعیین درجهٔ بیماری EAE در موش ۷۱
۲-۱۹ القاء بیماری EAE توسط DCs تیمار شده و پالس شده ۷۲
۲-۱۹-۱ مواد و وسایل مورد نیاز ۷۲
۲-۱۹-۲ روش کار: ۷۲
۲-۲۰ مقایسهٔ اثرات DCs تیمار شده در القاء تولرانس به بیماری EAE ۷۳
۲-۲۰-۱ مواد و وسایل مورد نیاز: ۷۴
۲-۲۰-۲ روش کار: ۷۴
۲-۲۱ مقایسهٔ اثرات DCs تیمار شده در درمان بیماری EAE ۷۵
۲-۲۱-۱ روش کار: ۷۶
۲-۲۲ آنالیز آماری ۷۷
۲-۲۲-۱ جمعیت مورد مطالعه: ۷۷
۲-۲۲-۲ حجم نمونه: ۷۷
۲-۲۲-۳ نرم‌افزارهای مورد استفاده: ۷۷
۲-۲۲-۴ توصیف داده‌ها: ۷۷
۲-۲۲-۵ تحلیل داده‌ها: ۷۸
۳ فصل سوم: نتایج ۷۹
۳-۱ جداسازی سلول‌های مغز استخوان موش ۸۰
۳-۲ مقایسهٔ روشهای کشت سلول‌های مغز استخوان برای تولید DC ۸۰
۳-۲-۱ کشت سلول‌های مغز استخوان با mrGM-CSF تنها ۸۱
۳-۲-۲ کشت سلول‌های مغز استخوان با GM-CSF و IL-4 ..... ۸۱
۳-۲-۳ کشت سلول‌های مغز استخوان در پلیت کشت میکروبی ۸۲
۳-۳ بالغ کردن سلول‌های دندریتیک ۸۳
۳-۴ زیر گروه سلول‌های دندریتیک تولید شده از مغز استخوان ۸۴
۳-۵ افزایش تکثیر در گروه GM-CSF + IL-4 نسبت به سایر روشهای مورد مطالعه در آزمون MLR ۸۵
۳-۶ انتخاب روش کشت برای مطالعهٔ اثر سایتوکینها ۸۵
۳-۷ مقایسهٔ تیمار DCs با استفاده از فاکتورهای متفاوت ۸۶
۳-۷-۱ بررسی میزان بلوغ در سلول‌های دندریتیک تیمار نشده ۸۶
۳-۷-۲ بررسی اثر IFN-β در بلوغ سلول‌های دندریتیک ۸۷
۳-۷-۳ بررسی اثر همزمان IL-10 و IFN-β در بلوغ سلول‌های دندریتیک ۸۸
۳-۸ بررسی اثر تیمار بر زیر گروه سلول‌های دندریتیک ۸۹

۳-۹ آزمون پاسخ تکثیری لنفوسیتهای پرایم شده ۹۰
۳-۱۰ سنجش سایتوکینی ۹۱
۳-۱۱ تزریق سلول‌های دندریتیک برای ایجاد EAE در موش ۹۲
۳-۱۲ مقایسهٔ اثرات DCs تیمار شده در القاء تولرانس به بیماری EAE ۹۳
۳-۱۳ مقایسهٔ اثرات DCs تیمار شده در درمان بیماری EAE..... ۹٤
۳-۱۴ نمودارها ۹٦
۴ فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۱۱۲
۴-۱ تولید سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان ۱۱۳
۴-۲ تیمار سلول‌های دندریتیک با سایتوکینهای متفاوت ۱۱٦
۴-۳ تیمار سلول‌های دندریتیک با IL-10 ..... ۱۱۷
۴-۴ تیمار سلول‌های دندریتیک با IFN-B ۱۲٦
۴-۵ تیمار سلول‌های دندریتیک با IFN-B به همراه IL-10 ..... ۱۳۲
۴-۶ ایجاد EAE بوسیلهٔ سلول‌های دندریتیک پالس شده و تاثیر روش و محل تزریق..... ۱۳٦
۴-۷ القاء EAE در موش ۱٤۱
۴-۸ پیشگیری از بروز بیماری EAE و درمان آن توسط سلول‌های دندریتیک تیمار شده..... ۱٤۳
۴-۹ نتیجه‌گیری: ۱٤٥
۴-۱۰ پیشنهادات: ۱٤۷
منابع ۱۴۸

جداول

جدول ۱-۱ توزیع بافتی زیرگروههای مختلف سلول‌های دندریتیک در موش ۱۸
جدول ۲-۱. مشخصات آنتی‌بادیهای مونوکلونال کونژوگه علیه شاخصهای سطحی سلول‌های دندریتیک ۵۸
جدول شمارهٔ ۲-۲. انواع روشهای درجه‌بندی شدت بیماری EAE در موش ۷۱
جدول ۴-۱. مقایسهٔ نتایج حاصل از سه روش متفاوت تولید سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان موش ۱۱۶

شکل‌ها:

شکل شمارهٔ ۱-۱. جهار راهکار مورد استفاده برای تنظیم گیرنده‌های خودی در مسیر تمایز سلول‌های B و T ۷
شکل شمارهٔ ۱-۲. نقشهٔ سلولی نقاط بازبینی سیستم تنظیم گیرنده‌های خودواکنشگر ۸
شکل شمارهٔ ۱-۳. مکانیسم‌های ایجاد تحمل مرکزی ۹
شکل شمارهٔ ۱-٤. مکانیسم القاء تحمل محیطی ۱۱
شکل شمارهٔ ۱-۵. ارتباط بین تولید سلول‌های دندریتیک و میلوئیدی یا لنفوئیدی بودن آن در موش و انسان ۱۷
شکل شمارهٔ۱ -٦. روشهای القاء تحمل توسط سلول‌های دندریتیک ۲۹
شکل شمارهٔ ۱-۷. نقش سلولهای دندریتیک در ایجاد پاسخها و بیماریهای خود ایمنی ۱
شکل شمارهٔ ۱-۸. وقایع و علائم بیماری MS ۳٤
شکل شمارهٔ ۱-۹. مدل فرضی برای توپولوژی پروتئین غشایی MOG ۳٦
شکل شمارهٔ ۱-۱۰. نمودار شماتیک پاتوژنز و عوامل موثر در ایجاد ضایعات بافتی در بیماری MS ٤۲
شکل شمارهٔ ۲-۱. محل قرار گیری غدد لنفاوی موش ٦۱
شکل شمارهٔ۲-۲. نحوهٔ رقیق کردن استانداردها در آزمون ELISA ٦۸
شکل شمارهٔ ۲-۲: نحوهٔ قرار دادن موش در مقید کننده و محل تزریق دمی ۷۳
شکل شمارهٔ ۲-۳. فلوچارت زمان تزریقات برای پیشگیری از ایجاد EAE در موش ۷٤
شکل شمارهٔ ۲-۴ مقایسهٔ مراحل مختلف ایجاد بیماری MS در انسان و حیوانات آزمایشگاهی ۷٦
شکل شمارهٔ ۲-۵. زمان تزریق سلول در روش درمانی ۷٦
شکل شمارهٔ ٤-۱.تصویر شماتیک از تاثیر IFN-B در تنظیم ترشح IL-12 و IL10 ..... ۱۳۲

نمودارها

نمودار شمارهٔ ۱-۱. تعداد مقالات منتشر شده با عنوان سلول‌های دندریتیک در مقایسه با کل مقالات ۱٤

نمودار ۳-۱. میزان بیان هر یک از شاخصهای سطحی سلول‌های دندریتیک بر سطح سلول‌های مغز استخوان ۹٦

نمودار ۳-۲. منحنی رشد سلول‌های کشت داده شده در روشهای متفاوت تولید سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان ۹٦

نمودار ۳-۳ مقایسهٔ میزان بیان شاخصهای سلول‌های دندریتیک در هر یک از روشهای مورد استفاده ۹۷

نمودار ۳-٤. مقایسه میزان بیان شاخصهای سطحی بر سطح سلول‌های دندریتیک تولید شده از مغز استخوان ۹۷

نمودار ۳-۵. مقایسهٔ شدت بروز ملکولهای MHC CLASS II و CD86 در سلول‌های دندریتیک ۹۸

نمودار ۳-٦. نتایج آزمون MLR بر اساس نسبتهای مختلف سلول‌های تحریک کننده (DCs) به سلول‌های پاسخ دهنده (T) ۹۸

نمودار ۳-۷ مقایسهٔ نتایج آزمون MLR در هریک از روشهای تولید سلول‌های دندریتیک از سلول‌های مغز استخوان ۹۹

نمودار ۳-۸. میزان بیان MHC CLASS II در مقادیر متفاوت سایتوکینهای IL-10 و IFN-B ۹۹

نمودار ۳-۹. مقایسهٔ شاخصهای سلول‌های دندریتیک تولید شده از مغز استخوان بعد از تیمار با فاکتورهای متفاوت ۱۰۰

نمودار ۳-۱۰. فلوسایتومتری سلول‌های تیمار نشده بعد از ۸ روز کشت ۱۰۱

نمودار ۳-۱۱. فلوسایتومتری سلول‌های تیمار شده با IL-10 ..... ۱۰۲

نمودار ۳-۱۲. فلوسایتومتری سلول‌های تیمار شده با IFN-B ۱۰۳

نمودار ۳-۱۳. فلوسایتومتری سلول‌های تیمار شده با TNF-A ۱۰٤

نمودار ۳-۱٤. فلوسایتومتری سلول‌های تیمار شده با IL-10 و IFN-B ۱۰۵

نمودار ۳-۱۵. ارتباط بین میزان بیان MHC CLASS II و SI در آزمون MLR ۱۰٦

نمودار ۳-۱۷. ارتباط بین میزان بیان CD40 و SI در آزمون MLR بعد از خارج نمودن مقادیر مربوط به گروه IFN-B ۱۰۷

نمودار ۳-۱۸. میانگین SI در آزمون MLR بر اساس هریک از فاکتورهای تیمار ۱۰۷

نمودار ۳-۱۹. ارتباط دز آنتی‌ژن با پاسخ تکثیری در آزمون LTT ۱۰۸

نمودار ۳-۲۰. مقایسهٔ نتایج آزمون LTT در گروههای مختلف درمانی ۱۰۸

نمودار ۳-۲۱. پروفایل سایتوکینی در دو گروه TNF-A و IFN-B به همراه IL-10 ..... ۱۰۹

نمودار ۳-۲۲. علائم بیماری EAE در موشهای گروه کنترل ۱۰۹

نمودار ۳-۲۳. تغییرات وزنی در گروه کنترل ۱۱۰

نمودار ۳-۲٤. مقایسهٔ علائم بالینی بر اساس روش تزریق ۱۱۰

نمودار ۳-۲۵. علائم بالینی در موشهایی که سلول‌های دندریتیک تیمار شده را برای پیشگیری دریافت نموده بودند ۱۱۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱ پیشگفتار

سیستم ایمنی، حس ششم بدن بوده و قادر است با هر ساختار شیمیایی بیگانه واکنش نشان دهد. سیستم ایمنی این قدرت را مدیون گیرنده‌های سلول‌های B (آنتی‌بادیهای بیان شده بر روی این سلول‌ها) و گیرنده‌های بیان شده بر روی سلول‌های T می‌باشد. انواع بسیار متفاوتی از گیرنده‌های مختلف با استفاده از روند دو مرحله‌ای تغییر ژنومی که بصورت انتخابی در لنفوسیتهای مهره‌داران رخ می‌دهد، بوجود می‌آید. ابتدا ترکیب‌های متفاوتی از سه جایگاه ژنی V (variable)، D (diversity) و J (joining) در هنگام تمایز سلول‌های T و B در بافتهای مرکزی لنفوئیدی، ایجاد می‌شود. در مرحله بعدی وقوع موتاسیونهای تک نوکلوئیدی را در ژنهای مربوط به گیرنده‌های سلول‌های B عمدتاً در اعضای لنفاوی محیطی خواهیم داشت. قسمت عمدهٔ گیرنده‌هایی که بدین ترتیب ایجاد می‌شوند به دلیل تصادفی بودن روش، می‌تواند با آنتی‌ژنهای خودی واکنش نشان دهند. بین ۲۰ تا ۵۰ درصد TCR و BCR ایجاد شده از ترکیب V(D)J با تمایل ترکیبی خطرناکی قادر به اتصال با آنتی‌ژنهای خودی می‌باشند. از آنجایی که تنها ۳ تا ۸ درصد جمعیت به بیماریهای باالقوه خود ایمنی مبتلا می‌شوند بنابراین سیستم تنظیمی بسیار کارآمدی برای کنترل گیرنده‌های خودی در بدن وجود دارد[۱].

به رغم وجود مکانیسم‌های کنترلی برای جلوگیری از واکنش لنفوسیتها علیه سلول‌های خودی، فرار سلول‌های لنفوسیتی خودواکنشگر از این مکانیسم‌ها می‌تواند منجربه بیماری‌های خودایمن گردد. امروزه شیوع بیماریهای خود ایمن در کشورهای غربی بالغ بر ۶-۷ درصد است [۲]. با اینکه بیماریهای خود ایمن می‌توانند اعضای مختلفی را در بدن درگیر نمایند ولی نقطهٔ مشترک همه این بیماریها وجود آسیب‌های بافتی و عضوی ناشی از پاسخ به آنتی‌ژنهای خودی می‌باشد. با وجود شیوع پایین هریک از بیماریهای خودایمن، میزان مرگ و میر ناشی از آنها نسبتاً بالا است[۳]. بیماریهای خودایمن از جمله عوامل مهم مرگ و میر در بین زنان جوان و میانسال آمریکایی است. ماهیت مزمن این بیماریها باعث تاثیرگذاری قابل توجه آنها بر هزینه‌های اقتصادی و کیفیت زندگی جامعه می‌شود. برآورد کلی میزان بروز و شیوع بیماریهای خودایمن در مردم آمریکا نشان می‌دهد که میزان بروز (موارد جدید در طی یکسال) این بیماریها حدود ۹۰ مورد در هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر و میزان بروز آنها حدود ۳ درصد می‌باشد.

تقریباً همه بیماریهای خودایمن بیشتر زنها را گرفتار می‌نمایند به گونه‌ای که در بعضی از بیماریها همانند تیروئیدیت، اسکلرودرمیا، لوپوس اریتماتوزیس سیستمیک و بیماری شوگرن زنان ۸۵٪ مبتلایان را تشکیل می‌دهند و همچنین ۶۰ تا ۷۵ درصد بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و آرتریت روماتوئید زن هستند. اگرچه بیماری خودایمن

می‌تواند در هر سنی شخص را گرفتار نماید ولی به نظر می‌رسد که بروز بعضی از بیماریهای خودایمن وابسته به سن نیز باشد[۳].

۱-۲ عوامل ایجاد کننده خودایمنی

۱-۲-۱ *عوامل ژنتیکی*

یافته‌های بدست آمده از مطالعات نشان می‌دهد که ایجاد خودایمنی در افراد به ترکیبی از عوامل محیطی و ژنتیکی وابسته است[۱, ۴]. تاریخچه خانوادگی بعضی از بیماریهای خودایمنی می‌تواند نشان دهندهٔ دخالت عوامل ژنتیکی در بروز این بیماریها باشد. به عنوان مثال معمولا در تاریخچهٔ خانوادگی بیماران مبتلا به بیماریهای خودایمن تیروئید می‌توان وجود یک یا چند بیمار را مشاهده نمود. بعلاوه حتی درصورت عدم وجود علائم بالینی، می‌توان افرادی را در فامیل این بیماران یافت که دارای تیتر بالایی از آنتی‌بادیی علیه آنتی‌ژنهای خودی تیروئید باشند[۵, ۶]. وضعیت مشابهی را می‌توان در وجود آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژنهای خودی موکوس معده، سلول‌های بتای لانگرهانس و کورتکس آدرنال مشاهده نمود. البته امکان وجود این آنتی‌بادیها به وجود هاپلوتایپهای مشترک HLA بین این افراد بستگی دارد و این میزان با افزایش تعداد هاپلوتایپهای مشترک افزایش می‌یابد بگونه‌ای که امروزه وجود هاپلوتایپهای خاصی از HLA می‌تواند عامل مهمی در پیشگویی احتمال ابتلا افراد به بیماری خود ایمن باشد[۷-۹].

تعیین نوع HLA در بسیاری از بیماران مبتلا به انواع مختلف بیماریهای خود ایمن، نشان داده است که در مقایسه با افراد عادی، برخی از الل‌های HLA در این بیماران با فراوانی بیشتری بروز می‌کنند [۱۰]. قویترین ارتباط از این دست، بین اسپوندلیت آنکیلوزان که یک بیماری التهابی و احتمالاً خودایمن مفاصل مهره‌ای می‌باشد و الل B27 از HLA کلاس I برقرار است. احتمال بروز اسپوندلیت آنکلوزان در افراد واجد HLA-B27، ۹۰ تا ۱۰۰ برابر بیش از افراد فاقد این الل است[۱۰].

از آنجایی که مولکولهای MHC کلاس II درگزینش و فعال شدن سلول‌های CD4+ T به عنوان سلول‌های تنظیم کنندهٔ پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی نقش دارند می‌توانند، نقش مهمی در ایجاد بیماریهای خودایمن داشته باشند[۱۱]. ساختار مولکول‌های MHC می‌تواند تعیین کند که کدامیک از رده‌های لنفوسیت درجریان تمایز گزینش منفی شود. بعنوان مثال اگر مولکول‌های MHC موجود در تیموس فردی، نتوانند با میل پیوندی بالا به یک پروتئین خودی متصل شوند، سلول‌های T نابالغ پاسخگو به این آنتی‌ژن، می‌توانند از فرایند گزینش منفی گریخته، به مرحلهٔ بلوغ عملکردی رسیده و متعهد شوند[۱۲]. از طرفی مولکول‌های MHC کلاس II ممکن است بر فعال شدن سلول‌های T تنظیم کننده که نقش طبیعی آنها جلوگیری از خود ایمنی می‌باشد، تاثیر داشته باشند. بعنوان مثال در

IDDM سلول‌های T ایجاد کنندهٔ بیماری، مختص یک پپتید خودی هستند که با مولکولهای HLA-DQ "فاقد" اسیدآمینهٔ ASP در جایگاه ۵۷ زنجیرهٔ β همراه شده است درحالیکه سلول‌های T تنظیمی واجد آن است[۱۳, ۱۴]. علاوه بر MHC ژنهای خارج از آن نیز می‌توانند بگونهٔ موثری بر روی خطر بروز بیماریهای خودایمن تاثیرگذار باشند[۱۵]. مطالعه بر روی دیابت ملیتوس نوع یک و یا مدلهای حیوانی آن در موشهای NOD جایگاه برخی از این لکوسهای غیر MHC را آشکار ساخته است. مولکول CTLA-4 بطور چشمگیری می‌تواند در مستعد ساختن افراد در ابتلا به بیماریهای خودایمن اندوکرین موثر باشد. اگر بدانیم که بیش از صدها ژن متفاوت همانند ژنهای AIRE, BIM, ZAP70, CBLB, FAS و ROQUIN در نقاط کنترلی (checkpoint) در گزینش منفی و مثبت لنفوسیتها دخالت دارند (به مقاله مروری [۱] مراجعه شود) می‌توانیم تصور بهتری از دخالت مکانیسم‌های ژنتیکی در ایجاد بیماریهای خود ایمن داشته باشیم.

۱-۲-۲ *عوامل غیرژنتیکی*

با وجود اهمیت عوامل ژنتیکی در ایجاد بیماریهای خودایمن، این عوامل تنها یک سوم عوامل موثر را تشکیل می‌دهند[۱۶]. این برآورد از مطالعهٔ دوقلوهای همسان در مقایسه با دوقلوهای غیرهمسان بدست آمده است. بنابراین عوامل غیرژنتیکی ۷۰ درصد عوامل خطر ایجاد بیماریهای خودایمن را تشکیل می‌دهند. قسمتی از این خطر می‌تواند بدلیل ماهیت تصادفی بودن سیستم ایمنی در ایجاد گیرنده‌های متفاوت باشد. ترکیب تصادفی و متفاوت V(D)J در دوقلوهای یکسان می‌تواند توجیح کننده قسمت عمده‌ای از اختلاف در میزان بروز بیماریهایی خودایمن در دوقلوهای یکسان باشد.

داروها و مواد شیمیایی از جمله شناخته شده‌ترین عوامل محیطی در ایجاد بیماریهای خودایمن می‌باشند. به عنوان مثال Procainamide و Hyrolazine می‌توانند ایجاد سندرم شبیه لوپوس نمایند. داروی Penicillinamine در ارتباط با بیماری میاستنی‌گریوز و α-methyldopa در ایجاد بیماری کم‌خونی خودایمن همولیتیک جزو داروهای شناخته شده در این خصوص است[۱۷].

تاریخچهٔ ابتلا به عفونت را می‌توان از دیگر عوامل محیطی موثر در ایجاد بیمارهای خودایمن دانست[۱۸]. درحقیقت اولین بیماری خودایمن، هموگلوبینوریای سرد پروگزیمال در ابتدا به عنوان عارضهٔ ثانویهٔ بیماری عفونی سیفلیس شناخته شد. شواهد اپیدمیولوژیک نشان دهندهٔ ارتباط ایجاد تب‌روماتیسمی و بیماری روماتیسم قلبی با عفونت استرپتوکوک همولیتیک بتا می‌باشد، هرچند که مکانیسم آن هنوز ناشناخته می‌باشد. هر دو عفونت تریپانوزوم کروزی و کوکساکی ویروس B3، در ایجاد بیماری میوکاردیت دخالت دارند. همچنین مطالعات فراوانی وجود دارند که ارتباط بین ایجاد دیابت نوع یک و مولتیپل اسکلروزیس را با عفونتهای خاص تایید می‌نمایند. با این

وجود بدلیل وقوع عفونت مدتها قبل از ابتلا به هر یک از بیماریهای خود ایمن اثبات این رابطه علت و معلولی تا حدودی مشکل است[۱۸].

مکانیسم مشترک در همهٔ بیماری‌های خودایمن مرتبط با عفونتها تقلید مولکولی بین آنتی‌ژن‌های میکروارگانیسم عامل عفونت و بافت مبتلا است[۱۹, ۲۰]. پاسخ ایمنی ایجاد شده برعلیه آنتی‌ژن عفونی منجر به واکنش متقاطع بر علیه آنتی‌ژن خودی شده و ایجاد بیماری خودایمن می‌نماید. هرچند این مکانیسم در مدلهای حیوانی به اثبات رسیده ولی شواهد آن در بیماریهای خودایمن انسانی بسیار نادر است[۲۱, ۲۲]. نظریه قابل طرح دیگر درخصوص ارتباط بین عفونت و بیماری خودایمن تئوری اثر شاهدی است و در آن اثر میکروارگانیزم در تحریک سیستم ایمنی بر علیه آنتی‌ژن خودی و یا در معرض قراردادن آنتی‌ژنهای خودی مطرح است. تاثیر عفونتها در کاهش آستانه تحریکی سلول‌های T و B خودواکنشگر با ایجاد سیگنالهای کمک تحریکی از مکانیسم‌های دیگر مطرح در این زمینه است[۲۲].

فعال‌کننده‌های پلی‌کلونال بسیاری از رده‌های لنفوسیتی B و یا T را بدون توجه به ویژگی آنها نسبت به آنتی‌ژن تحریک می‌نمایند که این عمل بر اثر واکنش با مولکول‌های سطحی دیگری غیر از پذیرنده‌های آنتی‌ژنی، انجام می‌گیرد. لیپوپلی‌ساکارید (LPS) باکتریها نمونه مناسبی از این مواد می‌باشد که در موشها ولی نه در انسان به عنوان یک فعال کنندهٔ پلی‌کلونال سلول‌های B محسوب می‌گردد. واکنش با LPS می‌تواند منجربه تحریک رده‌های زیادی از لنفوسیتهای B گردد که سلول‌های B خودواکنشگری که آنرژیک هستند نیز از آن جمله هستند این پدیده نوبهٔ خود می‌تواند در ایجاد بیماری خودایمن موثر باشد[۲۲]. فعال شدن پلی‌کلونال سلول‌های T به وسیله ابرآنتی‌ژنهای باکتریال نیز به عنوان مکانیسم فرضی دیگری در ارتباط با بیماریهای خودایمنی مطرح می‌باشد. ولی تاکنون هیچ شاهد مناسبی که مبین ارتباط علت و معلولی ابرآنتی‌ژنها با بیماریهای خودایمنی باشد شناخته نشده است[۲۰].

از جمله عوامل محیطی موثر در ایجاد بیماری خودایمن می‌توان به رژیم غذایی افراد نیز اشاره نمود. ید از جمله عوامل تغذیه‌ای است که به خوبی در بیماری‌های خودایمن تیروئید مورد مطالعه قرار گرفته است[۲۳, ۲۴]. عرضه نمک یددار برای کاهش گواتر اندمیک ناشی از کمبود ید با افزایش شیوع بیماری تیروئیدیت و گریوز همراه بوده است. ازنظر تجربی به نظر می‌رسد که تیروگلوبولین یددار بیشتر از نوع غیریددار آن در معرض عرضه به عنوان آنتی‌ژن خودی است. درحقیقت رژیم پَر ید باعث تشدید بیماری تیروئیدیت در مدل موشی آن می‌شود[۲۵, ۲۶].

عوامل محیطی دیگری نیز در ایجاد بیماری خودایمن مطرح هستند هرچند که شواهد مستدلی برای دخالت آنها وجود ندارد. ایجاد آنتی‌ژنهای خودی مرتبط با هستهٔ سلولی با نمکهای جیوه و طلا در حیوانات حساس موید اثر فلزات سنگین در ایجاد بیماری خودایمن می‌باشد. تاثیر هیدروکربن‌های هالوژنه در تنظیم سیستم ایمنی، آنها را به