بسم الله
الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم سارا صعودی رشته ایمنی شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان « مطالعه اثر ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور بر القا و عملکرد سلولهای Treg القایی $FOXP3^+$» در تاریخ ۱۳۹۱/۱۰/۱۱ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر احمد زواران حسینی	
استاد مشاور	دکترزهیر صراف	
استاد ناظر	دکترفاطمه غفاری فر	
استاد ناظر	دکترطوبی غضنفری	
استاد ناظر	دکتربهرام کاظمی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترمعصومه ابتکار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

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

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

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

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **سارا صعودی** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۶** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۲/۱۱/۸

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)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، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **ایمنی شناسی** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **آقای دکتر احمد زواران حسینی** ، مشاوره **آقای دکتر زهیر محمد حسن** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه 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 ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **سارا صعودی** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی‌مقطع دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی سارا صعودی

تاریخ و امضا

۹۲/۱۱/۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته ایمنی شناسی

عنوان

مطالعه اثر ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور بر القا و عملکرد سلولهای Treg القایی FOXP3+

نگارش

سارا صعودی

استاد راهنما

دکتر احمد زواران حسینی

استاد مشاور

دکتر زهیر محمد حسن

دی ۱۳۹۱

تقدیم به :

پدر عزیزم و مادر مهربانم

به پاس فداکاریها، حمایت ها و تشویق ها یشان

تشکر و قدردانی

خدا را سپاس می گویم که توفیق کسب دانش را در محضر آموزگارانی دلسوز ، صاحب اندیشه و اخلاق و دوستانی صادق و یاری رسان نصیبم نمود.

بدینوسیله از زحمات استادان گرامی و عزیزانی که مرا در انجام مراحل مختلف این پایان نامه یاری کرده اند تشکر و قدردانی می کنم.

استاد گرامی، جناب آقای دکتر احمد زواران حسینی که راهنمایی این پایان نامه را به عهده داشتند و باحسن اخلاق و بزرگوارانه مرا از رهنمود های علمی خود، بهره مند ساختند و در تمام مراحل،حامی و مشوق من بودند.

استاد گرامی، جناب آقای دکتر زهیر محمد حسن که مشاوره این پایان نامه را به عهده داشتند و در طول انجام پایان نامه مشوق و یاریگر من بودند.

اساتید محترم گروه ایمنی شناسی، سرکار خانم دکتر ابتکار، جناب آقای دکتر پور فتح الله و جناب آقای دکتر موذنی که درسهای زیادی در محضر ایشان اموخته ام.

مدیریت محترم مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته و استاد گرامی جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی که همواره از حمایت ایشان بهره مند بودم.

همکاران خوبم در مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته که در طول تحصیلم، هیچ گونه کمک فکری و عملی را از من دریغ نداشتند.

دانشجویان و کارشناسان محترم گروه ایمنی شناسی

خانواده ام ، به ویژه همسر م که در طول مدت تحصیل علاوه بر کمک های فکری و عملی در انجام پایان نامه ، همواره از همدلی و همیاری ایشان بهره مند بوده ام.

چکیده

بروز لیشمانیوز جلدی که در پی انتقال لیشمانیا ماژور به پوست توسط پشه ناقل صورت می گیرد، متاثر از عملکرد همکارانه سلولهای T تنظیمی +CD25+FOXP3 ساکن پوست است. بلافاصله پس از ورود لیشمانیا به پوست، لیشمانیا توسط ماکروفاژها و سلولهای دندریتیک به دام میافتند و مانع القای پاسخهای ایمنی نوع یک توسط این سلولها می شوند. یکی از مکانیسمهای مهاری لیشمانیا ، می تواند القای سلولهای T تنظیمی توسط ماکروفاژها باشد. مطالعات متعددی شکل گیری سلولهای T تنظیمی اختصاصی آنتی ژن و مولد IL-10 را حین عفونت لیشمانیا نشان می دهد، اما درباره چگونگی القا و میزان القای آن گزارشی منتشر نشده است.

پژوهش حاضر به بررسی اثر مستقیم ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور بر سلولهای Tnaive و القای سلولهای T تنظیمی +FOXP3 پرداخته است. موشهای BALB/c و C57BL/6 به صورت داخل صفاقی با لیشمانیا ماژور آلوده شدند. دو ماه پس از تزریق داخل صفاقی لیشمانیا، موشها با تیوگلیکولات تحریک شده و ماکروفاژهای صفاقی جدا شدند. بخشی از ماکروفاژها با لنتی ویروسهای حامل ShRNA TGF-β1 تیمار شدند و بخش دیگر تیماری دریافت نکردند. سلولهای Tnaive (CD4+CD25-CD62L+) از سلولهای طحال جدا شدندو با دکتور حاوی پروموتر FOXP3 ترانسداکت شدند. ماکروفاژها و سلولهای Tnaive به مدت ۷۲ ساعت در مجاور هم کشت داده شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون ، سوپرناتانت سلولها جمع آوری شد و سایتوکاین های IL-10، IL-17، IL-4، TGF-β1 و IFN-γ به روش الایزا بررسی شدند. سلولهای Tnaive از نظر بیان مارکرهای CD4، CD25 و FOXP3 به روش فلوسایتومتری بررسی شدند. میزان تولید نیتریک اکساید و توان فاگوسیتی ماکروفاژها پس از۷۲ ساعت هم کشتی با لنفوسیت T بررسی شد. همه نتایج بین گروههای موش BALB/c و C57BL/6 ، و بین تیمارهای مختلف در هر گروه مقایسه شدند. بررسیهای آماری با نرم افزار SPSS انجام شد و سطح معنی داری $P\leq0.05$ در نظر گرفته شد.

بر اساس نتایج به دست آمده ماکروفاژهای آلوده می توانند سلولهای Tتنظیمی +CD25+FOXP3 را از سلولهای Tnaive القا کنند، درصد این القا به طور معنی داری$P\leq0.05$ در گروه C57BL/6 بیشتر است. بررسی الگوی سایتوکاینی نشان داد که در سوپرناتانت ۷۲ ساعته کشت توام، تولید IL-17 و IL-10 قبل از تولید IL-4 و IFN-γ به طور معنی داری القا می شود. گروه C57BL/6 به طور معنی داری مقادیر بیشتری IL-10 و IL-17 تولید می کنند. نتایج نشان داد که مهار TGF-β1 با ShRNA سبب کاهش معنی دار میزان mRNA TGF-β1 می شود، اما اثری بر میزان کل TGF-β1 ترشحی در سوپرناتانت گروههای کشت توام ندارد. نتایج نشان دادند که مهار یا افزایش TGF-β1، اثر چشمگیری بر میزان IL-10 و IL-17 در گروههای موش BALB/c و C57BL/6 دارد. تولید نیتریک اکساید در گروههای کشت توام ماکروفاژ- سلولهای Tnaive القا شد و میزان این تولید در گروه C57BL/6 بیشتر از گروه BALB/c بود. نتایج نشان داد که میزان TGF-β1، اثر عکس با میزان تولید نیتریک اکساید دارد. نتایج نشان داد که میزان اندیکس فاگوسیتی در ماکروفاژهای گروه کشت توام ماکروفاژهای آلوده با سلولهای Tnaive ، به طور معنی داری کاهش می یابد و می تواند تحت تاثیر TGF-β1 قرار گیرد.یافته ها نشان می دهند که ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور می توانند سبب القای سلولهای T تنظیمی +FOXP3 از سلولهای Tnaive در کشت توام ۷۲ ساعته شوند. سلولهای Tتنظیمی القا شده، الگوی سایتوکاینی Th10/Th17 را نشان می دهند که می تواند توسط TGF-β1 تحت تاثیر قرار گیرد. گروههای کشت همزمان BALB/c و C57BL/6، پاسخهای متفاوتی به تغییر TGF-β1 در محیط کشت همزمان ماکروفاژ-Tnaive نشان می دهند.

کلید واژه ها: سلولهای T تنظیمی، ماکروفاژ، لیشمانیا ماژور، FOXP3، TGF-β1

فهرست مطالب

قصل۱- مقدمه ومروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱ ضرورت بررسی میانکنش لیشمانیا و سیستم ایمنی ۲

۱-۲ ماکروفاژ میزبان لیشمانیا ۳

۱-۳ نقش سلولهای Treg در عفونت لیشمانیا ماژور ۵

۱-۴ تکوین natural regulatory T cells ۷

۱-۵ سلولهایT تنظیمی القایی ۱۰

۱-۵-۱ القای سلولهای T تنظیمی در vitro ۱۰

۱-۵-۲ القای سلولهای T تنظیمی در vivo ۱۱

۱-۵-۳ عوامل موثر در القای پایدار iTreg ۱۲

۱-۶ پایداری سلول های Tتنظیمی ۱۴

۱- ۷ کاربرد سلول های Tتنظیمی ۱۶

۱-۸ عوامل موثر در تمایز لنفوسیت های T naive ۱۹

۱-۹ BALB/c و C57BL/6 دو مدل موشی با پاسخ متفاوت به عفونت لیشمانیا ماژور ۲۲

۱-۱۰مروری برمطالعات انجام شده در زمینه نقش سلولهای Treg در عفونت لیشمانیا ماژور ۲۴

۱-۱۱ ضرورت و هدف انجام مطالعه ۲۶

فصل ۲- مواد و روش‌ها ۲۸

۲-۱ طراحی آزمایش ۲۹

۲-۲ کلون کردن پروموتر FOXP3 در وکتور گزارشگر pTRH1 ..... ۲۹

۲-۲-۱ تکثیر پروموتر FOXP3 ..... ۲۹

۲-۲-۲ آماده سازی پروموتر FOXP3 برای کلونینگ ۳۴

۲-۲-۳ تکثیر وکتور گزارشگرpTRH1 ..... ۳۴

۲-۲-۳-۱ تهیه باکتری Competent ۳۴
۲-۲-۳-۲ انتقال وکتور از کاغذ و ترانسفورماسیون باکتری ۳۵
۲-۲-۳-۳ استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی ۳۶
۲-۲-۴ آماده سازی pTRH1-m CMV-dsc GFP برای کلونینگ ۳۷
۲-۲-۵ استخراج از ژل ۳۷
۲-۲-۶ Ligation ۳۹
۲-۲-۷ ترانسفورماسیون Stbl4 با pTRH1-foxp3 ..... ۳۹
۲-۲-۸ تایید نهایی کلون شدن پروموتر FOXP3 در pTRH1 ..... ۴۰
۲-۲-۹ الکتروفورز قطعات DNA در ژل آگارز ۴۰
۲-۳ تکثیر لیشمانیا ماژور ۴۱
۲-۳-۱ آلوده سازی موشها با لیشمانیا ماژور ۴۱
۲-۳-۲ آلوده سازی in vitro ماکروفاژها با لیشمانیا ماژور ۴۱
۲-۴ جداسازی ماکروفاژ و تعیین خلوص آن ۴۲
۲-۵ مهار TGF-β1 در ماکروفاژ ۴۲
۲-۵-۱تهیه ذرات ویروسی حامل shRNA TGF-β1 ..... ۴۲
۲-۵-۲ تیتراسیون ذرات ویروسی ۴۳
۲-۵-۳ ترانسداکشن ماکروفاژها با ذرات ویروسی حامل shRNA TGF-β1 ..... ۴۵
۲-۵-۴ تعیین زمان بهینه مهار TGF-β1 در ماکروفاژها ۴۵
۲-۵-۴-۱ Real Time PCR ۴۶
۲-۵-۵ اثر ترانسداکشن و مهار TGF-β1 بر عملکرد ماکروفاژها ۴۷
۲-۶ جداسازی سلولهای Tnaive ۴۸
۲-۶-۱ تعیین خلوص سلولهای Tnaive ۴۹
۲-۶-۲ فعالسازی سلولهای Tnaive ۵۰

۲-۷ تهیه ذرات ویروسی حامل پروموتر FOXP3 ..... ۵۰
۲-۸ ترانسداکشن سلولهای Tnaive با ذرات ویروسی حامل پروموتر FOXP3 ..... ۵۱
۲-۸-۱ تعیین درصد سلولهای Tnaive ترانسداکت شده ۵۱
۲-۹ هم کشتی سلولهای Tnaive با ماکروفاژ ۵۲
۲-۱۰ سنجش نیتریک اکساید ۵۲
۲-۱۱ سنجش سایتوکاین ۵۳
۲-۱۲ فاگوسیتوز ۵۴
۲-۱۳ فلوسایتومتری ۵۴
۲-۱۴ اثر جمعیت های لنفوسیتی القایی بر تکثیر سلولهای طحال ۵۵
۲-۱۵ آنالیز آماری ۵۶
فصل۳- نتایج و یافته‌ها ۵۷
۳-۱ آماده سازی پروموتر FOXP3 برای کلونینگ ۵۸
۳-۲ آماده سازی پلاسمید pTRH1 برای کلونینگ ۶۰
۳-۳ Ligation پلاسمید pTRH1 و پروموتر FOXP3 و تایید نهایی باکتریهای ترانسفرم شده ۶۱
۳-۴ نتایج کلونینگ پروموتر CMV در پلاسمید pTRH1 ..... ۶۴
۳-۵ آلوده سازی موشها با لیشمانیا ماژور ۶۶
۳-۶ تعیین خلوص ماکروفاژ ۶۷
۳-۷ تیتراسیون ذرات ویروسی ۶۸
۳-۸ تعیین زمان بهینه مهار TGF-β1 در ماکروفاژ ۶۹
۳-۸-۱ بررسی اثر ترانسداکشن و مهار TGF-β1 بر عملکرد ماکروفاژها ۷۳
۳-۸-۲ بررسی اثر ترانسداکشن و تیمار با لیشمانیا ماژور بر مورفولوژی ماکروفاژها ۸۱
۳-۹ تعیین خلوص سلولهای Tnaive ۸۳
۳-۱۰ تعیین درصد ترانسداکشن سلولهای Tnaive ۸۴

۳-۱۱ هم کشتی ماکروفاژ با سلولهای Tnaive ۸۶
۳-۱۲ تعیین درصد بیان GFP در لنفوسیت های T ۸۷
۳-۱۳ بیان مارکرهای FOXP3/CD25/CD4 در لنفوسیت های T ۸۹
۳-۱۴ بررسی سایتوکاین های IL-10/IL-17/IL-4/IFN-γ/TGF-β1 ..... ۹۵
۳-۱۵ بررسی میزان تولید نیتریک اکساید ۱۰۲
۳-۱۶ بررسی اثر لنفوسیت های T القا شده بر پاسخ تکثیری سلولهای طحال ۱۰۴
۳-۱۷ بررسی فاگوسیتوز در ماکروفاژها ۱۰۶
فصل۴- بحث، نتیجه‌گیری وپیشنهاد ها ۱۰۹
۴-۱ اثر ترانسداکشن بر عملکرد ماکروفاژ ۱۱۰
۴-۲ استفاده از ShRNA TGF-β1 تا چه حد در کاهش TGF-β1 موثر است؟ ۱۱۳
۴-۳ اثر مهار TGF-β1 بر عملکرد ماکروفاژ ۱۱۴
۴-۳-۱ اثر مهار TGF-β1 بر تولید سایتوکاین های دیگر در گروههای مختلف ماکروفاژ: ۱۱۴
۴-۳-۲ اتر مهار TGF-β1 بر تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژ: ۱۱۵
۴- ۴بررسی بیان مارکر +CD25 در جمعیت لنفوسیت های Tnaive تمایز یافته ۱۱۶
۴-۴-۱نقش اینترلوکین ۲ در عملکرد سلولهای T اجرایی: ۱۱۸
۴-۴-۳. نقش اینترلوکین ۲ در ایجاد جمعیت های مختلف لنفوسیت T: ۱۱۹
۴-۵ در مطالعه ما چه عواملی سبب القای CD25 و فعال شدن لنفوسیت های T، شده اند؟ ۱۱۹
۴-۵-۱تحریک با anti-CD28 و anti-CD3 ..... ۱۱۹
۴-۵-۲تحریک لنفوسیت های T با ماکروفاژها: ۱۲۰
۴-۶ بررسی بیان پروموتر+FOXP3 ..... ۱۲۲
۴-۷ مقایسه جمعیت لنفوسیت های +CD4+FOXP3 با +CD4+CD25+FOXP3 ..... ۱۲۴
۴-۸ بررسی سایتوکاین های تولید شده در سوپرناتانت کشت توام لنفوسیت با ماکروفاژ ۱۲۵
۴-۸-۱ اینترلوکین ۱۷ ..... ۱۲۵

۴-۸-۲ اینترلوکین ۱۰.....۱۲۶
۴-۸-۳ اینترفرون گاما.....۱۲۶
۴-۸-۴ اینترلوکین ۴.....۱۲۷
۴-۹ بررسی جمعیت های القا شده از لنفوسیت های Tnaive در موش BALB/c و C57BL/6.....۱۲۷
۴-۱۰ تعادل IL-17/IL-10 و اثر TGF-β1 بر آن ،در کشت توام Tnaive با ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا ماژور..۱۲۹
۴-۱۱ نتیجه گیری.....۱۳۱
۴-۱۲پیشنهادها.....۱۳۴
فهرست منابع.....۱۳۵
چکیده انگلیسی.....۱۴۴

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. لنفوسیت های T درگیر در محل عفونت لیشمانیا ماژور..... ۸

شکل ۱-۲. مسیرهای مولکولی تکوین و پایداری Treg..... ۱۰

شکل ۱-۳. تفاوت سلولهای nTreg و iTreg ۱۵

شکل ۲-۱. طراحی آزمایش..... ۳۰

شکل ۲-۲. گروههای آزمون..... ۳۱

شکل ۲-۳. وکتور حاوی تراد فهای پروموتر FOXP3..... ۳۳

شکل ۲-۴. اجزای تشکیل دهنده پلاسمید گزارشگر..... ۳۵

شکل ۲-۵. مراحل استخراج پلاسمید از باکتری ۳۷

شکل ۲-۶. اجزای تشکیل دهنده وکتور pGIPZ ۴۴

شکل ۳-۱. تصویر الکتروفورز محصول PCR از پلاسمید های حاوی پروموتر FOXP3 ..... ۵۸

شکل ۳-۲. تصویر الکتروفورز هشت تکرار PCR برای پروموتر ۳۴۸-/۱۷۶+ ۵۹

شکل ۳-۳. محصول استخراج از ژل ۳۴۸-/۱۷۶+ پس از هضم آنزیمی با SpeI و ClaI ۵۹

شکل ۳-۴. محصول استخراج پلاسمید pTRH1 پس از هضم آنزیمی..... ۶۰

شکل ۳-۵. محصول استخراج از ژل پلاسمید pTRH1..... ۶۱

شکل ۳-۶. پلیت LB جامد حاوی کلنی های ترانسفرم شده ۶۲

شکل ۳-۷. نتیجه کلنی PCR کلنی های ترانسفرم شده با پروموتر FOXP3 ..... ۶۳

شکل ۳-۸. نتیجه هضم آنزیمی پلاسمیدهای جدا شده از کلنی های ترانسفرم شده..... ۶۳

شکل ۳-۹. نتیجه الکتروفورز ۱۵ تکرار PCR برای پروموتر CMV ۶۴

شکل ۳-۱۰. الکتروفورز محصول PCR پروموتر CMV..... ۶۵

شکل ۳-۱۱. محصول هضم آنزیمی پلاسمید های استخراج شده ازکلنی های ترانسفرم شده با پلاسمید pTRH1/CMV..... ۶۵

شکل ۳-۱۲. محل تزریق داخل صفاقی لیشمانیا ماژور و زخم تشکیل شده..... ۶۶
شکل ۳-۱۳. نتیجه فلوسایتومتری ماکروفاژهای جدا شده از صفاق..... ۶۷
شکل ۳-۱۴. نتیجه فلوسایتومتری تیتراسیون ویروس..... ۶۸
شکل ۳-۱۵. بررسی بیان TGF-β1 microRNA توسط میکروسکوپ فلورسنت..... ۷۰
شکل ۳-۱۶. نتیجه بررسی فلوسایتومتری ماکروفاژها پس از ترانسداکشن با TGF-β1 microRNA..... ۷۱
شکل ۳-۱۷. سنجش بیان TGF-β1 در ماکروفاژها پس از ترانسداکشن با TGF-β1 microRNA..... ۷۲
شکل ۳-۱۸. سنجش سایتوکاین TGF-β1 در سوپرناتانت ماکروفاژها..... ۷۵
شکل ۳-۱۹. سنجش سایتوکاین IL-10 در سوپرناتانت ماکروفاژها..... ۷۶
شکل ۳-۲۰. سنجش سایتوکاین IL-17 در سوپرناتانت ماکروفاژها..... ۷۸
شکل ۳-۲۱. سنجش نیتریک اکساید در سوپرناتانت ماکروفاژها..... ۸۰
شکل ۳-۲۲. مورفولوژی ماکروفاژهای تیمار نشده و تیمار شده با ویروس..... ۸۲
شکل ۳-۲۳. درصد سلولهای +CD4 و +CD25 پس از جداسازی از ستون..... ۸۳
شکل ۳-۲۴. تصویر میکروسکوپ اینورت لنفوسیت های Tnaive فعال شده با anti-CD3/CD28..... ۸۴
شکل ۳-۲۵. تعیین درصد ترانسداکشن سلولهای Tnaive با پروموتر CMV..... ۸۵
شکل ۳-۲۶. تصویر میکروسکوپ اینورت هم کشتی سلولهای Tnaive فعال شده با ماکروفاژها..... ۸۶
شکل ۳-۲۷. مرزبندی ناحیه لنفوسیت وسلولهای FOXP3 (GFP)..... ۸۷
شکل ۳-۲۸. نتیجه فلوسایتومتری لنفوسیت های Tnaive ترانسداکت شده با پروموتر FOXP3..... ۸۸
شکل ۳-۲۹. نمودار نقطه ای فلوسایتومتری ایزوتیپ کنترل..... ۸۹
شکل ۳-۳۰. نمودار نقطه ای بررسی فلوسایتومتری هم کشتی لنفوسیت های Tnaive با ماکروفاژها..... ۹۰
شکل ۳-۳۱. میانگین درصد سلولهای +TCD4+CD25 در گروههای مختلف..... ۹۲
شکل ۳-۳۲. میانگین درصد سلولهای TCD4+CD25+ در گروههای مختلف..... ۹۳
شکل ۳-۳۳.میانگین درصد سلولهای TCD4+CD25+FOXP3+ در گروههای مختلف..... ۹۴
شکل ۳-۳۴. نمودار میانگین ± انحراف معیار تولید سایتوکاین IL-17..... ۹۷

شکل ۳-۳۵. نمودار میانگین ± انحراف معیار تولید سایتوکاین اینترفرون گاما..... ۹۸
شکل ۳-۳۶. نمودار میانگین ± انحراف معیار تولید سایتوکاین IL-10..... ۹۹
شکل ۳-۳۷. نمودار میانگین ± انحراف معیار تولید سایتوکاین TGF-β1..... ۱۰۰
شکل ۳-۳۸. نمودار میانگین ± انحراف معیار تولید سایتوکاین اینترلوکین ۴..... ۱۰۱
شکل ۳-۳۹. نمودار میانگین ± انحراف معیار نیتریک اکساید در گروههای مختلف ۱۰۳
شکل ۳-۴۰. نمودار میانگین ± انحراف معیار اندیکس تکثیری سلولهای طحال ۱۰۵
شکل ۳-۴۱. تصویر ماکروفاژها را پس از بلع ذرات مخمر ۱۰۷
شکل ۳-۴۲. اندیکس فاگوسیتی گروههای مختلف ماکروفاژها ۱۰۸
شکل ۴-۱. جمیعت های لنفوسیتی و الگوی سایتوکاینی در سلولهای Tnaive فعال شده ۱۳۲
شکل ۴-۲. اثر TGF-β1 بر تولید سایتوکاین های IL-10 و IL-17..... ۱۳۳

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. ضرورت بررسی میانکنش لیشمانیا و سیستم ایمنی

لیشمانیوز طیف وسیعی از بیماریهایی است که توسط گونه های مختلف لیشمانیا در ۸۸ کشور اندمیک ایجاد می شود. بر اساس آمار ارائه شده ۱۲ میلیون نفر در دنیا مبتلا به لیشمانیوزهستند و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطرند. هر ساله ۲میلیون مورد جدید گزارش می شود که ۱,۵ میلیون نفر مربوط به لیشمانیوز جلدی و ۵۰۰۰۰۰ نفر مربوط به لیشمانیوز احشایی است[۱]. پژوهشهای زیادی سالانه به ویژه در مناطق اندمیک برای ایجاد روشهای موثردرپیشگیری و درمان لیشمانیوز صورت می گیرد. واکسیناسیون از موثرترین روشهای مقابله با لیشمانیاست. از دهه ۱۹۷۰ که مردم خاورمیانه برای جلوگیری از ابتلا به زخمهای لیشمانیا، فرزندانشان را با گزش پشه ناقل ایمن می کردند تا امروز که دانش بیولوژی پیشرفت زیادی داشته است، امید های زیادی برای طراحی واکسن کارامد در مهار لیشمانیوز وجود دارد[۱, ۲]. واکسن های طراحی شده را می توان بر اساس شکل آنتی ژن به دو گروه تقسیم بندی کرد .گروه اول واکسن های لیشمانیای زنده هستند که به صورت اشکالی با ویرولانس کم یا تغییر زنتیکی یافته مورد استفاده قرار می گیرند. واکسنهای نسل اول ، لیشمانیاهای کشته یا اتوکلاو شده همراه یا بدون ادجوانت هستند که امروزه به همراه طیف وسیعی از ادجوانتها مورد بررسی قرار دارند. نسل دوم را واکسنهایی تشکیل می دهند که از اجزای لیشمانیا مثل پروتئین ها یا ژنهای آن در طراحی واکسن استفاده شده است. انواع پروتئین های نوترکیب و DNA واکسن ها از این جمله اند. دستاوردها و مشکلات موجود در این زمینه در مقالات مروری به چاپ رسیده است[۱, ۲]. با توجه به تلاش زیادی که صورت گرفته ، هنوز واکسنی با حفاظت بخشی عمومی طراحی نشده است. از یکسو شیوه های نوین به کار گرفته شده در طراحی واکسن پرهزینه و وقت گیرند. از سوی دیگراساس ارزیابی ما از یک واکسن ، پاسخهای اولیه ایست که در آزمایشگاه از سلولهای ایمنی و حیوانات مدل مشاهده می کنیم که به دلیل پیچیدگی واکنشها در بسیاری موارد تکرار پذیر نبوده و قابل تعمیم به انسان نیستند. از اینرو به نظر می رسد با وجود استفاده از تکنیک های قوی در طراحی مولکولهای ترانسژنیک، خلق پروتئین های کنژوگه و نوترکیب ، طراحی DNA واکسنهایی با ترادف برنامه ریزی شده ، هنوز نمی دانیم که کجا و چه هنگام و به چه شکلی باید این

مولکولها را بکار بریم تا نتیجه مطلوب حاصل شود. به نظر می رسد که با افزایش آگاهی خود ازرابطه بین سلولهای ایمنی و لیشمانیا و آشنایی با مکانیسم های حاکم بر آن بتوانیم شرایط اثربخشی عمومی واکسیناسیون را فراهم کنیم.

۱-۲. ماکروفاژ میزبان لیشمانیا

گونه های مختلف لیشمانیا، انگل های درون سلولی اجباری ماکروفاژها و سلولهای دندریتیک هستند.پس از مکیدن خون میزبان آلوده، اشکال آماستیگوت لیشمانیا در روده پشه به پروماستیگوت های پروسایکلیک تبدیل می شوند تا به سرعت تکثیر یابند. در این مرحله مقادیر زیادی لیپوفسفوگلیکان و متالوپروتئاز gp63 بیان می کنند تا از اثر آنزیمهای هیدرولیتیکی روده بگریزند. با افزایش تعداد انگل، لیشمانیا ها به اپیتلیوم روده متصل شده و به پروماستیگوت های متاسایکلیک تبدیل می شوند. در این مرحله لیشمانیا ها تقسیم نمی شوند بلکه با تغییر ساختار لیپوفسفوگلیکان، افزایش بیان gp63 و تغییر گنجینه آنزیمی خود، آماده ورود به ماکروفاژ میزبان جدید می گردند. لیپوفسفوگلیکان به پروتئینهای متصل شونده به مانان در سرم متصل شده و با فعال شدن c1q، مسیر کلاسیک کمپلمان فعال می شود. به دلیل ضخامت زیاد لایه لیپوفسفوگلیکان، کمپلکس حمله به غشا تشکیل می شود اما پایدار نبوده و از سطح لیشمانیا جدا می شود. آنزیم gp63 نیز با شکستن C3b به C3bi از یک سو مانع لیز لیشمانیا با کمپلمان شده و از سوی دیگر لیگاندهای بیشتری برای اتصال به پذیرنده های کمپلمان در سطح ماکروفاژها فراهم می کند. به این ترتیب لیشمانیاها بدون آنکه لیز شوند با کارایی بالایی به وسیله پذیرنده های کمپلمان به ویژه CR1 و CR3 وارد ماکروفاژ می شوند[۳, ۴]. ورود به واسطه پذیرنده های کمپلمان مانع فعال شدن مسیرهای انفجار تنفسی در ماکروفاژ می شود. لیپوفسفوگلیکان مانع پیوستن فاگوزوم به اندوزوم می شود، تشکیل رادیکالهای آزاد را مهار می کند و با مهار فعالیت پروتئین کیناز C، از فعال شدن آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز۲ و تشکیل نیتریک اکساید جلوگیری می کند. آنزیم gp63 نیز با عملکرد پروتئازی خود فعالیت آنزیم های سایتولیزی پیرامون لیشمانیا را مهار می کند. در این فرصت، لیشمانیا بیان LPG و gp63 را کاهش می دهد و با افزودن بر

پوشش گلیکواینوزیتول فسفولیپیدی و گلیکواسفنگولیپیدی خود تغییر مورفولوژی و ساختاری می دهد تا بتواند ضمن فرار از عملکرد کشندگی ماکروفاژ، وارد جایگاه هدف خود در ماکروفاژ شود. در این مرحله لیشمانیا وارد فاز آماستیگوت می شود. فاگوزوم به لیزوزوم می پیوندد و آماستیگوت های لیشمانیا از فاگولیزوزوم تشکیل یافته برای تغذیه و تکثیر خود استفاده می کنند. لیشمانیا ها برای تامین منبع کربن و انرژی خود بیشتر از اسید های آمینه استفاده می کنند. از اینرو در فاگولیزوزوم های بالغ اسیدی با Ph برابر ۴,۷ تا ۵,۲ که غنی از اسید های آمینه هستند جا می گیرند. این فاگولیزوزومها اصطلاحا" واکوئول های پارازیتوفور نام دارند.در غشای این واکوئول ها انتقال دهنده های فعال وجود دارند که مولکولهای آنیونی را به داخل واکوئول می فرستند. همچنین واکوئول های اتوفاژی و بسیاری از اندوزوم های اولیه به این واکوئول می پیوندند.به این ترتیب مواد غذای و محتوای سیتوزولی ماکروفاژ در اختیار لیشمانیا قرار می گیرد و لیشمانیا ها برای تامین مولکولهایی که خود قادر به ساخت آن نیستند از این محیط بهره می برند[۳, ۴].

تکامل همزمان پاتوژن و میزبان، هردوی آنها را در فشار قرار می دهد تا برای مقاومت در برابر یکدیگر دائما" تغییر کنند و از بین این تغییرات بهترین را حفظ کنند.بررسیها نشان میدهد که با ورود لیشمانیا به ماکروفاژ بیان بسیاری از ژنهای ماکروفاژ تغییر می کند. تغییربیان ژن ماکروفاژها در فاز پروماستیگوت با آماستیگوت متفاوت است [۵]. برخی از این تغییرات با کاهش بیان ژنهایی همراه است که به حفظ و تکثیر لیشمانیا در ماکروفاژ کمک می کند[۶]. برخی از این تغییرات زمینه فعال شدن پاسخ ایمنی و حذف لیشمانیا را فراهم می آورد. در نتیجه این تغییرات، ماکروفاژها به پردازش و عرضه آنتی ژن از مسیر MHC-II می پردازند. ترشح پروستاگلاندین E2 افزایش می یابد مولکولهای کمک تحریکی CD-40 و B7-1/2 در سطح ماکروفاژ افزایش می یابد و بامیانکنش با CD28 و CD-40L به فعال شدن لنفوسیت ها و القای آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز۲ در ماکروفاژها می انجامد.ماکروفاژها با ترشح اینترلوکین ۱۲ لنفوسیت های Tو سلولهای NK را فعال می کنند. با ترشح TNF-α ، monocyte chemotactic and activating factor، migration inhibitory factor فعالیت های کشنده لیشمانیا را تشدید می کنند. ماکروفاژها با ترشح اینترلوکین ۶، IL-10، TGF-β1،