مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۷۱/هفته سوم اسفند ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۵

بررسی ایجاد آنسفالیت اتوایمیون حیوانی از طریق تزریق ترکیبات مختلف از هموژنات مغز موش با ادجوانت فروند

سعید رضایی جوزدانی[۱]، دکتر شقایق حق جوی جوانمرد[۲]، عظیمه جهانیپور[۱]

چکیده

مقدمه: آنسفالیت اتوایمیون حیوانی، مدل حیوانی بیماری اسکلروز متعدد (Multiple sclerosis یا MS) است. در حال حاضر در ایران برای ایجاد آن روی موش (Rat) باید پپتیدهای سنتز شده مثل MOG،PLP و MBP را از کشورهای پیشرفته خریداری کرد. این امر بسیار اهمیت دارد که برای ایجاد آنسفالیت اتوایمیون حیوانی از روش‌های ارزان‌تر و ساده‌تر استفاده کرد.

روش‌ها: این مطالعه از نوع مداخله‌ای تجربی بود که بر روی ۳۰ موش (Rat) در ۱۰ گروه شامل ۲ گروه شاهد انجام شد. ابتدا از ماده‌ی مغز موش کشته شده، سوسپانسیون هموژن تهیه شد و سپس نصف آن مخلوط را سانتریوفوژ کرده، از رونشین آن برای تزریق به موش‌ها به همراه ادجوانت فروند استفاده گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، همه‌ی موش‌ها از نوع Rat و از نظر سن و وزن یکسان بودند. گروه‌هایی که مخلوط مغز موش چه به صورت رونشین و چه به صورت سوسپانسیون در آن‌ها استفاده شد، فلج عصبی را نشان دادند که با $P < ۰/۰۵$ نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود. از طرفی گروه‌هایی که رونشین مایع مغز موش در آن‌ها استفاده شده بود، فلج عصبی بیشتری را نشان دادند ($P < ۰/۰۵$)؛ ولی همین گروه‌های رونشین در فلج عصبی، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

نتیجه‌گیری: با تغییر بر روی زوش‌های قدیمی برای ایجاد آنسفالیت حیوانی، روش مؤثر برای ایجاد آن به دست آمد که از نظر هزینه و آسانی برتری دارد. اگرچه این روش باید بر روی گونه‌های دیگر موش و حیوانات دیگر آزمایش شود و نتایج آن با روش‌های دیگر امروزی مقایسه گردد.

واژگان کلیدی: آنسفالیت اتوایمیون حیوانی، پروتئین اساسی میلین، گلیکوپروتئین میلین، پروتئولیپوپروتئین

مقدمه

آنسفالیت اتوایمیون حیوانی (EAE یا Experimental autoimmune encephalitis) مدل حیوانی بیماری اسکلروز متعدد (Multiple sclerosis یا MS) است (۴-۱). EAE از نوع چهارم حساسیت تأخیری است که در بافت سیستم اعصاب مرکزی (CNS یا Central nervous system) موش اتفاق می‌افتد.

برای مطالعه‌ی عواملی که بر بروز و درمان MS اثر می‌گذارند، نیاز به مدل حیوانی است. امروزه در ایران برای ایجاد EAE در انواع موش نیاز به خرید پپتیدهای سنتز شده مثل پروتئین اساسی میلین (Myelin basic protein یا MBP)، گلیکوپروتئین میلین (Myelin oligodendrocyte glycoprotein یا MOG) و پروتئولیپوپروتئین (Proteo-lipoprotein یا PLP) با قیمت‌های زیاد از کشورهای توسعه یافته داریم (۶-۴). این پپتیدها، مولکول‌های غشای میلین هستند که اگر با ادجوانت به موش (Rat) تزریق شوند، بیش‌ترین حساسیت را به وجود می‌آورند که به

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دکترای حرفه‌ای به شماره‌ی ۲۸۸۲۲۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

[۱] دانشجوی پزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شقایق حق جوی جوانمرد
Email: shaghayeghhaghjoo@yahoo.com

www.mui.ac.ir

صورت آنسفالیت بروز می‌کند و منجر به فلج عصبی- عضلانی می‌گردد (۶-۴).

از طرفی در سال‌های اخیر تعداد زیادی مقاله به دست آمده است که افزایش همین پپتیدها و انواع آن‌ها را در مایع مغزی- نخاعی (Cerebrospinal fluid یا CSF) در افراد پس از ضربه‌ی مغزی نشان داده‌اند (۱۱-۷). بنابراین این ایده را به وجود می‌آورد که از مایع CSF شبیه سازی شده‌ی افراد ضربه‌ی مغزی برای ایجاد EAE استفاده شود. هدف این مطالعه این بود که با تخریب فیزیکی بافت مغز موش یک سوسپانسیون هموژن به دست آورد و با سانتریفیوژ کردن آن میزان اثر حساسیت‌زایی ترکیبات مختلف آن را به همراه تزریق با ادجوانت در ایجاد فلج عصبی- عضلانی بررسی کرد.

روش‌ها

این مطالعه از نوع مداخله‌ای تجربی بود. معیارهای ورود به آن موش‌های از نوع Rat با وزن ۱۰ ± ۵۹۰ گرم از جنس مؤنث و بدون هیچ گونه شواهد کلینیکی از فلج عصبی- عضلانی بود. معیارهای خروج آن وجود شواهدی کلینیکی مبنی بر فلج عصبی- عضلانی یا هرگونه عدم تطابق با جنس و وزن و گونه‌ی موش بود.

این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأیید شد و موازین اخلاقی در نگه‌داری و انجام آزمایش مطابق آن رعایت گردید.

ابتدا پس از تزریق ۵ سی‌سی کتامین ۱۰ درصد به صفاق یک موش (Rat) و بیهوش کردن آن با کاتتر Scalp، بافت مغز موش استخراج گردید و در نرمال سالین قرار داده شد. مخلوط حاصل با هموژنایزر به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. سوسپانسیون یک دست به دست آمده دو قسمت گردید. مخلوط اول سوسپانسیون خام مغز موش بود. بخش دیگر به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا رونشین آن به دست آید و سپس از رونشین آن به عنوان مخلوط دوم استفاده شد.

۳۰ موش Rat به ۱۰ گروه مشابه تقسیم شدند. در هر گروه ۳ موش مشابه وجود داشت که تزریقات یکسان دریافت کردند. دو گروه اول که A و B نام داشتند، شاهد بودند. گروه A تنها ۰/۱ میلی‌لیتر نرمال سالین و گروه B ۰/۱ میلی‌لیتر ادجوانت فروند دریافت کردند. تزریقات پس از یک هفته دوباره تکرار شد و به صورت زیرجلدی در محل خروج دم موش صورت گرفت.

برای چهار گروه بعدی از مخلوط سوسپانسیون خام استفاده شد. سوسپانسیون خام به ترتیب با ترکیب ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌لیتر و به همراه ۰/۱ میلی‌لیتر ادجوانت فروند تزریق شد. این چهار گروه گروه‌های سوسپانسیون نامیده شدند.

برای چهار گروه دیگر از محلول رونشین و ادجوانت فروند استفاده شد. در این ۴ گروه به ترتیب ترکیب ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌لیتر محلول رونشین هر کدام به همراه ۰/۱ میلی‌لیتر ادجوانت فروند تزریق گردید.

همه‌ی تزریق‌ها یک هفته بعد دوباره به صورت زیرجلدی در محل خروج دم موش دوباره انجام گرفت.

به مدت یک ماه هر هفته موش‌ها از نظر فلج عصبی- عضلانی معاینه‌ی کلینیکی شدند و مطابق نمره‌دهی زیر نمره دریافت کردند:

۰ = طبیعی، ۱ = فلج دم موش، ۲ = فلج اندام عقبی و راه رفتن با لنگش، ۳ = فلج اندام عقبی بدون راه رفتن، ۴ = فلج کامل اندام عقبی و فلج خفیف اندام جلویی، ۵ = فلج کامل همه‌ی اندام‌ها، ۶ = مرگ.

www.mui.ac.ir

سپس نمره‌ی همه‌ی گروه‌های مورد، در هر هفته با گروه شاهد مقایسه شد.

پس از جمع‌آوری اطلاعات، داده‌ها توسط آزمون آماری Kruskal-Wallis برای مقایسه‌ی گروه‌ها در هر هفته و آزمون t برای مقایسه‌ی نمرات همه‌ی هفته‌ها در هر گروه با گروه دیگر و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

حین انجام مطالعه یکی از موش‌ها فوت شد. یک هفته بعد از تزریق اول، تزریقات دو مرتبه در همه‌ی گروه‌ها تکرار شد. در هر گروه ۳ موش مشابه، تزریقات مشابه دریافت کردند. اطلاعات مربوط به میانگین نمرات و انحراف معیار در جدول ۱، آورده شده است.

جدول ۲ مقایسه میان نمره‌های گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

همان طور که مشاهده می‌شود اختلاف نمره‌ی فلج عصبی- عضلانی سوسپانسیون و رونشین با گروه‌های شاهد در زمان‌های مورد مطالعه از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

در گروه‌هایی که محلول رونشین استفاده شد، نمرات بالاتری نسبت به گروه‌های سوسپانسیون کسب شد (جدول ۳).

در چهار گروهی که محلول‌های رونشین استفاده شد، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴).

جدول ۱. آمار توصیفی گروه‌های کنترل و مورد

	نمره‌ی هفته‌ی اول انحراف معیار ± میانگین	نمره‌ی هفته‌ی دوم انحراف معیار ± میانگین	نمره‌ی هفته‌ی سوم انحراف معیار ± میانگین	نمره‌ی هفته‌ی چهارم انحراف معیار ± میانگین
گروه شاهد A	۰	۰	۰	۰
گروه شاهد B	۰	۰	۰	۰
گروه سوسپانسیون ۱	۲ ± ۳/۴۶	۲/۳۳ ± ۳/۲۱	۲/۳۳ ± ۳/۲۱	۲/۶۷ ± ۳/۰۵
گروه سوسپانسیون ۲	۰	۱/۳۳ ± ۰/۵۷	۰/۶۷ ± ۰/۵۷	۱/۳۳ ± ۱/۱۵
گروه سوسپانسیون ۳	۰/۶۷ ± ۱/۱۵	۱/۳۳ ± ۱/۵۲	۱/۳۳ ± ۰/۵۷	۰/۶۷ ± ۰/۵۷
گروه سوسپانسیون ۴	۱	۲ ± ۰	۰/۳۳ ± ۰/۵۷	۱/۳۳ ± ۰/۵۷
گروه رونشین ۱	۱/۶۷ ± ۰/۵۷	۱/۳۳ ± ۱/۱۵	۲ ± ۰	۱/۳۳ ± ۰/۵۷
گروه رونشین ۲	۳ ۰	۲/۳۳ ± ۰/۵۷	۲ ± ۰	۲ ± ۰
گروه رونشین ۳	۴ ± ۲	۲/۶۷ ± ۱/۱۵	۰/۶۷ ± ۱/۱۵	۱/۳۳ ± ۰/۵۷
گروه رونشین ۴	۲/۶۷ ± ۰/۵۷	۲ ± ۰	۰	۲ ± ۰

جدول ۲. آزمون kruskal-Wallis بین گروه‌های شاهد و مورد

	مقدار آماره	مقدار P
گروه‌های سوسپانسیون و رونشین (هفته‌ی اول) و گروه شاهد	۱۰/۴۸	< ۰/۰۰۱
گروه‌های سوسپانسیون و رونشین (هفته‌ی دوم) و گروه شاهد	۸/۰۲	< ۰/۰۱۶
گروه‌های سوسپانسیون و رونشین (هفته‌ی سوم) و گروه شاهد	۷/۵۳	< ۰/۰۲۲
گروه‌های سوسپانسیون و رونشین (هفته‌ی چهارم) و گروه شاهد	۷/۵۹	< ۰/۰۲۱

جدول ۳. مقایسه‌ی تفاوت میانگین در گروه‌های مورد

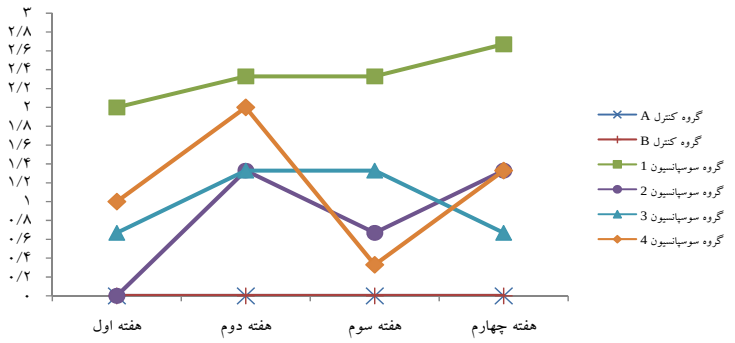
	مقدار آماره	مقدار P
سوسپانسیون و رونشین	-۱/۹۹۹	< ۰/۰۴

جدول۴: مقایسه‌ی تفاوت میانگین در چهار گروه رونشین

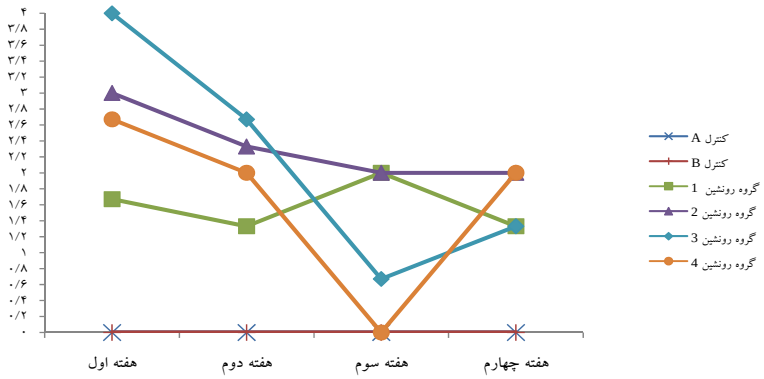
	مقدار آماره	مقدار P
رونشین	-۱/۳۸	۰/۱۹

علاوه بر این محلول رونشین حاصل از سانتریفیوژ مخلوط هموژن مغز موش با ادجوانت فروند، اثر حساسیت‌زایی بیشتری نسبت به سوسپانسیون خام مخلوط داشت (نمودار ۱).

نمودار ۲ مقایسه‌ی چهار گروه رونشین و گروه‌های شاهد با یکدیگر را نشان داده است.



نمودار ۱. نمودار خطی مقایسه‌ی چهار گروه سوسپانسیون و گروه‌های شاهد با یکدیگر



نمودار ۲. نمودار خطی مقایسه‌ی چهار گروه رونشین و گروه‌های شاهد با یکدیگر

www.mui.ac.ir

بحث

با توجه به اهمیت مدل آنسفالیت حیوانی در فهم مکانیسم MS، روش‌های گوناگونی برای ایجاد آن روی حیوانات وجود دارد (۶-۴، ۲-۱).

در دهه‌های ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ آنسفالیت حیوانی از طریق مخلوط هموژنات مغز و طناب نخاعی حیوانات ایجاد می‌شد و در خوکچه‌ی هندی، موش‌های Rat و میمون با مشکلات فراوانی همراه بود (۴، ۱). امروزه در ایران از پپتیدهای سنتزی غشای میلین برای ایجاد آنسفالیت استفاده می‌شود که هزینه‌ی فراوان به همراه دارد. بنابراین این مطالعه، روش‌های قدیمی را با استفاده از روش جدید برای ایجاد آنسفالیت آزمود.

نتایج این مطالعه نشان داد که محلول رونشین حاصل از سانتریفیوژ مخلوط هموژن مغز موش با ادجوانت فروند، اثر حساسیت‌زایی بیشتری نسبت به سوسپانسیون خام مخلوط داشت، اگر چه تفاوت عمده‌ای در میزان حساسیت‌زایی آن در ترکیب‌های مختلف این محلول مشاهده نشد.

این مطالعه میزان حساسیت به ماده‌ی مغز موش را با فلج عصبی- عضلانی اندازه گرفت. توصیه می‌شود در مطالعات جداگانه اثر آن محلول بر روی مقاطع پاتولوژی نخاع موش‌ها نیز بررسی شود.

از محدودیت‌های این مطالعه تعداد موش‌ها و محدودیت در نوع موش مورد استفاده بود که توصیه می‌شود روش مورد نظر در ایجاد آنسفالیت حیوانی برای انواع موش‌ها استفاده شود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که استفاده از محلول رونشین سوسپانسیون هموژنات مغز موش همراه با ادجوانت فروند اثر بیشتری نسبت به سوسپانسیون خام در ایجاد فلج عصبی- عضلانی بر موش‌ها داشت. پیشنهاد می‌شود برای ایجاد آنسفالیت حیوانی از این محلول استفاده شود و این روش در مطالعات بیشتری با روش‌های موجود مقایسه گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، از دکتر مینو ادیب، دکتر پورآذر و دکتر دشتی برای راهنمایی و همیاری در تکنیک‌های آزمایشگاهی سپاسگزاری فراوان دارند و همچنین از آقای صادقی مسؤول لانه‌ی حیوانات برای نگهداری موش‌ها قدردانی می‌کنند.

References

1. Guo L, Li Y, Lin H, Ji X, Li J, Que L, et al. Evaluation of a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis with human MBP as antigen. Cell Mol Immunol 2004; 1(5): 387-91.
2. Racke MK, Critchfield JM, Quigley L, Cannella B, Raine CS, McFarland HF, et al. Intravenous antigen administration as a therapy for autoimmune demyelinating disease. Ann Neurol 1996; 39(1): 46-56.
3. Abbas A, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 422.
4. Tafreshi AP, Mostafavi H, Zeynali B. Induction of experimental allergic encephalomyelitis in C57/BL6 Mice: an animal model for multiple sclerosis. Iran J Allergy Asthma Immunol 2005; 4(3): 113-7.
5. Pietropaolo M, Olson CD, Reiseter BS, Kasaian MT, Happ MP. Intratracheal administration to the lung enhances therapeutic benefit of an MBP peptide in the treatment of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Immunol 2000; 95(2): 104-16.
6. Jones RE, Bourdette D, Moes N, Vandenbark A, Zamora A, Offner H. Epitope spreading is not required for relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2003; 170(4): 1690-8.
7. Longatti PL, Canova G, Guida F, Carniato A, Moro M, Carteri A. The CSF myelin basic

www.mui.ac.ir

protein: a reliable marker of actual cerebral damage in hydrocephalus. J Neurosurg Sci 1993; 37(2): 87-90.

8. Longatti PL, Guida F, Agostini S, Carniato B, Carteri A. The CSF myelin basic protein in pediatric hydrocephalus. Childs Nerv Syst 1994; 10(2): 96-8.

9. Harling-Berg CJ, Knopf PM, Cserr HF. Myelin basic protein infused into cerebrospinal fluid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol 1991; 35 (1-3): 45-51.

10. Takahashi T. [Monoamines, monoamine metabolites, neuron specific enolase and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid of resuscitated patients]. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi 1997; 17(1): 7-16.

11. Berger RP, Dulani T, Adelson PD, Leventhal JM, Richichi R, Kochanek PM. Identification of inflicted traumatic brain injury in well-appearing infants using serum and cerebrospinal markers: a possible screening tool. Pediatrics 2006; 117(2): 325-32.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 171, 3rd week, March 2012 Received: 22.10.2011 Accepted: 15.1.2012

Establishment of Experimental Autoimmune Encephalitis Model by Injection of Different Combination of Homogenized Brain Tissue of Rat with Complete Freund's Adjuvant

Saeid Rezaei Jouzdani[1], Shaghayegh Haghjooy Jvanmard PhD[2], Azimeh Jahanipoor[1]

Abstract

Background: Experimental autoimmune encephalitis (EAE) is an animal model of multiple sclerosis (MS). Today in Iran for induction of EAE on rats we need to buy specific encephalitogen such as myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glyco protein (MOG), Proteo lipo protein (PLP) from developed countries. It is very essential for us to find a way for induction of EAE which is cheaper and more rapid that make us independent. It is a fundamental technique.because if we want to study MS, we will need animal model. If we get proper result, we can over come many obstacles and difficulties in future for further investigations on MS and its etiology and its pathophysiological mechanism.

Methods: In this study after one of rats exsanguinations the brain tissue was put in a saline solution and then was homogenized with a hemogenizer of Silent Crusher S model. It brought a suspension. A constant amount of Complete Freund's adjuvant (CFA) with different amounts of quantity of this prepared suspension then was combined and was injected subcutaneously to a series of similar rats n = 10. In this investigation all were rats and 590 ± 10 gr and 3 month old. The administration was repeated with a week interval for some of the rats and the results were compared. Also different combinations were administered and the results were compared. Finally neurological deficit was looked for which was our aim.

Findings: This study illustrated that supernatant solution was more encephalitogen than Suspension solution, and this was usable in an applicable technique for induction of Neurological paralysis in rats ($P < 0.05$) but dose not show any optimum combination of supernatant and CFA for that aim.

Conclusion: With modifying old method for induction of EAE we could find preferable one rather than high costly methods which are used today. Also this method should be assessed with further investigations on different mice and rats strains and compared with each other and also with further investigations this method should be compared with other methods in literature.

Keywords: Experimental autoimmune encephalitis (EAE), Myelin basic protein (MBP), Myelin oligodendrocyte glyco protein (MOG), Proteo lipo protein (PLP)

* This paper is derived from a medical thesis No. 288229 in Isfahan University of Medical Sciences.

[1] Student of Medicine, Student Research Committee, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Assistant Professor, Physiology Research Center and Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Corresponding Author: Shaghayegh Haghjooy Jvanmard PhD, Email: shaghayeghhaghjoo@yahoo.com