بسم الله الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای سید مهدی موسوی رشته قارچ شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان « بررسی اثر ایمنومدولاتوری پروتئین های خارج و داخل سلولی کاندیدا آلبیکنس در موشهای مبتلا به سرطان پستان در تاریخ ۱۳۹۱/۹/۲۶ 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 راهنمای اصلی	دکتر زهیر صراف	
استاد راهنمای دوم	دکترشهلا رودبار محمدی	
استاد مشاور	دکتر محمد حسین یادگاری	
استاد مشاور	دکترعلی رضا خسروی	
استاد ناظر	دکترفاطمه غفاری فر	
استاد ناظر	دکترپریوش کردبچه	
استاد ناظر	دکترمنصوربیات	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترجاوید صدرایی	

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 دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های 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 **سید مهدی موسوی** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۶ مقطع **دکتری تخصصی** 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 موسوی

تاریخ ۹۲_۳_٤

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (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 می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به دفتر «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

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

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته **قارچشناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده **علوم پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **آقای دکتر زهیر حسن صراف و خانم دکتر شهلا رودبارمحمدی** و مشاورهٔ **آقایان دکتر محمد حسین یادگاری و دکتر علیرضا خسروی** از آن دفاع شده است».

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند 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 به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیهٔ کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند 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، تأمین نماید.

ماده ۶: اینجانب **سید مهدی موسوی** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** مقطع **دکتری تخصصی** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

امضا موسوی

تاریخ ۴_۳_۹۲

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D) در رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان

بررسی اثرایمنومدولاتوری پروتئین‌های خارج و داخل سلولی کاندیدا آلبیکنس در موش‌های مبتلا به سرطان پستان

نگارش

سید مهدی موسوی

اساتید راهنما

دکتر زهیر حسن صراف

دکتر شهلا رودبار محمدی

اساتید مشاور

دکتر محمد حسین یادگاری

دکتر علیرضا خسروی

آذر ۱۳۹۱

تقدیم به :

روان پاک پدر و مادرم

همسر عزیزم

و

فرزندان دلبندم

کیمیا

علیرضا

نازنین

تشکر و سپاسگزاری:

یاد پدرم خیر که می گفت به ا ستاد فرزند مرا عشق بیآموز ودگر هیچ

حال که به یاری پروردگار سرانجام این رساله به سامان رسیده است وظیفه خود می دانم که از همکاری اساتید محترم و دوستان عزیزی که اینجانب را یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.
از اساتید بزرگوار جناب آقای دکترزهیر حسن صراف و سرکار خانم دکتر شهلا رودبار محمدی، که در طول دوران تحصیل و راهنمایی اجرای این رساله، با شکیبایی و صبر فراوان، زحمات فوق العاده ای متقبل شدند، کمال سپاسگزاری و قدردانی را دارم.
از اساتید گرانقدر و عزیز جناب آقای دکتر محمد حسین یادگاری و جناب آقای دکتر علیرضا خسروی، که از مشاوره و راهنمایی های ارزشمندشان بهره بردم، سپاسگذارم.
از استاد ارجمند، سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر به خاطر رهنمودها و الطاف بی دریغشان سپاسگزارم.
از جناب آقای دکتر اکبری بخاطر تقبل زحمت و صبر وحوصله ایشان ممنونم.
از دوستان دوران تحصیلم آقایان، اصغر سپهوندی، سید علی معلم زاده، رسول محمدی، محمدرضا شکوه امیری و همچنین همکاران محترم خانم ها، زهرا جهانشیری ، ناهید دارابی و زهرا نصراللهی سپاسگذارم و برایشان آرزوی بهترین ها را دارم.
از همکاری صادقانه و سعه صدر سرکار خانم رازقی کارشناس وظیفه شناس آزمایشگاه کمال تشکر را دارم.
از دوست و برادر عزیزم، جناب آقای دکتر محمد ا لله توکلی صمیمانه سپاسگزارم.
در پایان خود را قدر دان تمامی اساتید و دوستانی میدانم که کلامی به من آموختند.

چکیده:

امروزه تعداد بیماران مبتلا به سرطان سینه رو به افزایش است. تومورها، توده مستقلی از سلولها نیستند بلکه بیشتر عملکردی شبه ارگانی دارند وتحت تاثیر محیط اطراف خود و بویژه Microenvirnoment پیرامونشان میباشند. این تاثیرات متقابل پدیده‌ای دینامیک است که هم در آغاز و هم در پیشرفت تومورنقش دارد. در این مطالعه اثرات ایمنومدولاتوری پروتئین‌های خارج و داخل سلولی کاندیدا آلبیکنس در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بررسی شد. همچنیین اثرات کاندیدا آلبیکنس (سلول کامل - whole protein)، زایموزان مستخرج ازدیواره سلولی کاندیدا البیکنس وفراکشن ۱۴ کیلو دالتونی سیرکهنه در موش‌های توموری، مورد ارزیابی گرفت.

بطور خلا صه به هفت گروه از موشهایBalb/C بالغ، تومور سرطان سینه به صورت زیر جلدی پیوند زده شد. بعد از بالا آمدن تومور، فراکشن‌های تهیه شده (پروتئین کاندیدا، پروتئین ۱۴کیلو دالتونی سیر کهنه، زایموزان)و همچنین سلول کامل کاندیدا آلبیکنس بطور داخل پریتونال داده شد. موشهای توموری گروه اول، کاندیدا آلبیکنس گروه دوم، پروتئین، گروه سوم زایموزان، گروه چهارم پروتئین ۱۴کیلو دالتونی سیر دریافت کردند در گروه پنجم فراکشن‌های زایموزان وسیر تواماتزریق شد. ودر نهایت گروه‌های ششم وهفتم به ترتیب لیونازول وPBS گرفتند. اندازه تومورها استفاده از کولیس ورنیه (با دقت ۰.۰۱) اندازه‌گیری شد. در نهایت موشها کشته شده ودر صد سلولهای T-regsارتشاح یافته به تومور با تکنیک فلوسایتومتری(BD, USA) بدست آمد.برای سنجشIFNγ ، IL-4 وماتریکس متالوپروتئیناز ها(MMP-3، MMP-9) از تست الیزا استفاده گردید. [عصاره ابی سیر کهنه به روشی که ماینس وهمکاران شرح داده بودند تهیه شد.سپس پروتئین‌های موجود در این عصاره با استفاده از سولفات آمونیوم رسوب داده شد. و پروتئین 14 kDا استفاده از تکنیک ژل فیلتراسیون و سفادکس G 50 تخلیص گردید.برای تخلیص زایموزاان، مخمر کاندیدا آلبیکنس پس از کشت، جمع آوری گر دید.دیواره سلولی مخمر بعد از شکستن، سانتریفیوژو شستشوی مکرردرNa2Po4بصورت سوسپانسیون ۵درصددر آمد. سوسپانسیون حاصل بمدت ۳ ساعت در آب جوش قرار گرفت وبا آب و الکل مطلق شسته شد. ودر انتها محصول بدست آمده بصورت پودر لیوفیلیزه درآمد].

نتایج حاصل نشان داد که فراکشن زایموزان حدودا معادل ۱/۸ درصدوزن خشک مخمراولیه بود.این فراکشن توانایی توقف کمپلمان را داشت. نتایج تست L.A.Lموید وجود بخش پلی ساکاریدی گلوکان بود.نتایج فلو سیتومتری نشان داد که زایموزان و پروتئین‌های کاندیدا می‌توانند درصدسلولهایT-regرادر استرومای بافت توموری کاهش دهند(Pvalue≤0.05) در حالیکه کاندیدا البیکنس درصد CD4+ CD25+ FoxP3 را افزایش داد(Pvalue≤0.05). کاندیدا در مقایسه با تمامی گروه‌ها میزان MMP-3 (Pvalue≤0.05) و MMP-9 (Pvalue≤0.001) را افزایش داد. در گروه اول یعنی موش‌های توموری گیرنده کاندیدا آلبکنس حجم تومور بطورمعنی‌داری نسبت به تمامی گروه‌ها افزایش یافت در حالیکه در گروه سوم یعنی موش‌های توموری گیرنده زایموزان حجم تومورکاهش یافت(Pvalue≤0.05) . علاوه براین زایموزان و پروتئین میزان تولید اینترفرون گاما را در کشت سلول‌های صحالی بطور معنی‌داری افزایش دادند (Pvalue≤0.001)در حالیکه کاندیداآلبیکنس این میزان را کاهش داد.(Pvalue≤0.001).پس از سایتو کاین اسی مشاهده شد که درگروه سوم یعنی موشهای گیرنده زایموزان میزان تولیدIL-4 بطور معنی‌داری کاهش یافته است(Pvalue≤0.05) در صورتیکه میزان آن درموشهای دریافت کننده کاندیدا آلبیکنس افزایش یافته است(Pvalue≤0.05).در نهایت میزان بقائ موشهای توموری نیز در گروه اول (گیرنده کاندیدا)در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی‌داری کاهش یافت (Pvalue≤0.05).

سرطان یک بیماری مولتی فاکتوریال است بنا براین نیاز به رویکردهای درمانی متعدد دارد.تجمع اولیه سلول هایT-reg در بافت توموری در ارتباط با پیشرفت بیماری است و به عنوان یکی از شاخص‌های پیش آگهی وخیم بیماری تلقی می‌شود. ار آنجائیکه براساس نتایج حاصل زایمو زان وwhole protein می توانند درصد سلول‌های T-reg را کاهش دهند مصرف زایموزان در سرطان سینه توصیه می‌شود. زایموزان وwhole protein بطور موثری حجم تومور را کاهش داده وبا تاثیر در کاهش تولیدIL-4 و افزایشIFN-γ می‌تواند سیستم ایمنی را تقویت نماید. افزایش قابل ملاحظه حجم تومور، تاثیردرافزایش تولیدماتریکس متالوپروتئینازهای ۳و۹و کاهش میزان بقائ موش‌های توموری به وسیله کاندیدا آلبیکنس موید توانایی سرکوب پاسخ ایمنی توسط این مخمر است که می‌تواند در افزایش حجم تومور و پیشرفت و وخامت آن موثر باشد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، MMP-3، MMP-3، T-reg، سایتو کاین اسی، زایموزان، whole protein

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. سرطان ۲

۱-۳. ایجاد تومور ۳

۱-۳-۱. مرحله آغاز ۳

۱-۳-۲. مرحله پیشروی ۳

۱-۳-۳. رشد تصاعدی ۳

۱-۴. آدنو کار سینوما ۴

۱-۵. عوامل موثر در ایجاد سرطان پستان ۵

۱-۶. راه‌های تشخیص سرطان پستان ۷

۱-۶-۱. ماموگرافی ۷

۱-۶-۲. آزمایشات کلینیکی ۷

۱-۷. راه‌های درمان ۷

۱-۸. ریزمحیط سرطان ۸

۱-۹. آنتی ژنهای توموری ۹

۱-۱۰. مکانیسم‌های موثر سیستم ایمنی بر ضد تومورها ۱۰

۱-۱۰-۱. آنتی بادی‌ها ۱۰

۱-۱۰-۲. سلولهای کشنده طبیعی ۱۰

۱-۱۰-۳. ماکروفاژها ۱۱

۱-۱۰-۴. لنفوسیتهای T ۱۱

۱-۱۱. لنفوسیتهای T تنظیمی(T-reg) ۱۲

۱-۱۱-۱. زیر گروه‌های سلول Treg ۱۳

۱-۱۲. مکانیسم عملکرد انواع سلول هایTreg ۱۴
۱-۱۲. مکانیسم‌های فرار از سیستم ایمنی ۱۷
۱-۱۳. مکانیسم سرطان زایی ۱۸
۱-۱۴. درمان‌های رایج سرطان پستان ۱۸
۱-۱۵. ایمنوتراپی سرطان ۱۹
۱-۱۶. ماتریکس متالوپروتئینازها ۲۱
۱-۱۶-۱. ساختار پایه متالوپروتئینازها ۲۱
۱-۱۶-۲. تقسیم بندی متالوپروتئینازها ۲۱
۱-۱۶-۳. مهارکننده‌های متالوپروتئینازها ۲۳
۱-۱۶-۳-۱. مولکول α۲- ماکروگلبولین ۲۳
۱-۱۶-۳-۲. خانواده TIMPs (مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازها) ۲۴
۱-۱۷. بیان MMPs ۲۵
۱-۱۸. نقش‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک MMPs ۲۶
۱-۱۸-۱. نقش‌های فیزیولوژیک ۲۶
۱-۱۸-۲. نقش‌های پاتولوژیک ۲۶
۱-۱۹. ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ ۲۷
۱-۱۹-۱. ژلاتیناز B یا MMP-9 ۲۷
۱-۲۰. ماتریکس متالو پروتئیناز۳ ۲۹
۱-۲۱. کاندیداآلبیکنس ۳۰
۱-۲۱-۱. تاریخچه کاندیدا ۳۱
۱-۲۱-۱. کاندیدیازیس ۳۲
۱-۲۱-۳. راه‌های انتشار ۳۲
۱-۲۱-۴. اپیدمیولوژی کاندیدا ۳۲
۱-۲۱-۵. بیماریهای سیستمیک ناشی از کاندیدا آلبیکنس ۳۳

۱-۲۲. دیواره سلولی کاندیداآلبیکنس ۳۴
۱-۲۲-۱. ترکیب ساختمان دیواره سلولی کاندیدا ۳۴
۱-۲۲-۲. گلوکان ۳۵
۱-۲۲-۲-۱. بتاگلوکان و سیستم ایمنی ۳۶
۱-۲۲-۲-۲. زنجیره جانبی بتاگلوکان ۳۶
۱-۲۲-۲-۳. وزن مولکولی ۳۷
۱-۲۲-۲-۴. شکل فضائی مولکول ۳۷
۱-۲۲-۲-۵. اندازه ذرات مولکول ۳۸
۱-۲۲-۲-۶. شارژ پلیمری مولکول ۳۸
۱-۲۲-۲-۷. رسپتورهای بتاگلوکان ۳۸
۱-۲۲-۳. مانوپروتئین ۴۰
۱-۲۲.۴. کیتین ۴۱
۱-۲۲-۵. پروتئینهای ترشحی کاندیدا ۴۱
۱-۲۲-۵-۱. فسفولیپاز ۴۲
۱-۲۲-۵-۲. انولاز ۴۳
۱-۲۲-۵-۳. استراز ۴۳
۱-۲۲-۶. پروتئینهای شوک حرارتی ۴۳
۱-۲۳. ترکیبات موجود در سیر ۴۴
۱-۲۳-۱. لکتین‌های موجود در سیر ۴۶
۱-۲۳-۲. پپتیدها و پروتئین‌های موجود در سیر ۴۶
۱-۲۴. اثرات مختلف سیر کهنه ۴۷
۱-۲۵. آپوپتوزیس ۴۸
۱-۲۵-۱. مرگ بر نامه ریزی شده سلولPCD ۴۹
۱-۲۵-۲. ویژگیهای ریخت شناسی آپوپتوزیس ۴۹

۱-۲۵-۳. پروتئینهای دخیل در آپوپتوزیس(کاسپازها) ۵۰
۱-۲۶. نکروزیس ۵۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۵۱
۲-۱. ساخت محیطها و معرفهای موردنیاز ۵۲
۲-۱-۱. محیط کورن میل آگار(CMA) ۵۲
۲-۱-۲. تهیه کشت تازه از کاندیدا آلبیکنس ۵۲
۲-۱-۳. کشت انبوه کاندیدا آلبیکنس: (محیط GYEP) ۵۳
۲-۱-۴. بافر PBS ۵۳
۲-۲. تهیه عصاره پروتئینی کاندیدا آلبیکنس ۵۴
۲-۲-۱. دیالیز عصاره پروتئینی کاندیدا آلبیکنس ۵۵
۲-۲-۲. تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد ۵۶
۲-۳. تهیه زایموزان از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس ۵۷
۲-۳-۱. جدا سازی دیواره سلولی ۵۷
۲-۳-۲. تعیین وزن ملکولی محصول بدست آمده ۵۷
۲-۳-۳. تست توقف کمپلمان ۵۷
۲-۳-۴.تستLAL ۵۸
۲-۴. تهیه عصاره آبی سیر ۵۸
۲-۴-۱. رسوب گیری پروتئین به کمک نمک سولفات آلومینیوم ۵۹
۲-۴-۲.دیالیز ۶۰
۲-۴-۳. ژل فیلتراسیون ۶۰
۲-۴-۴. الکتروفورز به روش: SDS-PAGE ۶۱
۲-۵. توموری نمودن موشها ۶۳
۲-۵-۱. اندازه گیری سیر رشد تومور در موشهای توموری ۶۵

۲-۵-۲. برررسی طول عمر موشها..... ۶۶
۲-۶. تهیه لام پاتولوژیک جهت بررسی پاتولوژی و تعیین میزان نکروزیس و آپوپتوزیس در بافت توموری موشهای موردمطالعه..... ۶۶
۲-۷. خونگیری و تهیه سرم..... ۶۹
۲-۸.تستهای ایمنواسی ۷۰
۲-۸-۱. تهیه محیط کشتRPMI1640 ناقص (فاقدFCS) ۷۰
۲-۹. آماده سازی FBS: ۷۱
۲-۱۰. بافر لیز گلبول‌های قرمز..... ۷۱
۲-۱۱. تهیه کشت سلولی طحال..... ۷۲
۲-۱۲. بررسیIFN-γ، IL-4 در سوپ رویی کشت طحال..... ۷۲
۲-۱۳. انجام تست الایزا روی سرم‌های موشی جهت سنجش ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP3وMMP9) ۷۲
۲-۱۴. آزمون فلوسایتومتری..... ۷۴

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها..... ۷۶
۳-۱. نتایج حاصل از تهیه فراکشن ۱۴ کیلو دالتونی عصاره سیر..... ۷۷
۳-۲. نتایج حاصل از توموری نمودن موش‌های ماده Balb/c..... ۷۸
۳-۳. نتایج حاصل از تخلیص زایموزان از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس..... ۷۹
۳-۴. نتایج حاصل از تهیه سرم و تست الایزا..... ۸۰
۳-۴-۱. نتایج حاصل از تست الایزا بر میزان MMP-3..... ۸۰
۳-۴-۲. نتایج حاصل از تکنیک الایزا بر میزان سرمی MMP-9..... ۸۱
۳-۵. مقایسه حجم نهایی تومور در گروههای مورد مطالعه و کنترل..... ۸۱
۳-۶. مقایسه درصد سلول‌های CD4+ CD25+ FoxP3طحالی (سلولهای T تنظیمی)در گروههای مختلف مورد مطالعه..... ۸۳
۳-۷. نتایج الگوی سایتوکاینی لنفوسیت‌های طحالی گروههای مختلف مورد مطالعه..... ۸۴

۳-۸. نتایج بررسی میزان نکروزیس و آ پوپتوزیس در گروههای مختلف مورد مطالعه..... ۸۵
۳-۸. نتایج بقاء موش‌ها..... ۸۷

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها..... ۸۸
۴-۱. بحث و نتیجه‌گیری..... ۸۹
۴-۲. پیشنهادها..... ۹۶

فهرست منابع و مآخذ..... ۹۸
چکیده انگلیسی..... ۱۱۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱) ترکیبات محلول در آب و ترکیبات محلول در روغن موجود در سیر:..... ۴۴

جدول (۲-۱) مقادیر آمونیوم سولفات مورد نیاز برای تهیه درصدهای مختلف..... ۶۰

جدول (۳-۱) جدول نتایج میزان نکروزیس وآپوپتوزیس..... ۸۶

جدول (۳-۲) نتایج بقاء موشهای توموری..... ۸۷

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار (۳-۱) نتایج حاصل از تست الایزا بر میزان MMP-3 در گروه‌های مختلف ۸۰

نمودار (۳-۲) نتایج حاصل از تکنیک الایزا بر میزان سرمی MMP-9در گروه‌های مختلف ۸۱

نمودار (۳-۳) مقایسه حجم نهایی تومور در گروههای مورد مطالعه و کنترل..... ۸۲

نمودار (۳-۴) مقا یسه درصد سلول‌های CD4+ CD25+ FoxP3طحالی..... ۸۳

نمودار (۳-۵) نتایج میزانIL-4 در گروه‌های مختلف..... ۸۴

نمودار (۳-۶) میزان IFN-γ در گروه‌های مختلف مورد مطالعه..... ۸۵

نمودار (۳-۷) میزان بقاء در موش‌های توموری..... ۸۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) تصویر MMP-9 ..... ۲۸

شکل (۱-۲) تصویر MMP-3 ..... ۳۰

شکل (۱-۳) بتا ۱-۳گلوکان ۳۵

شکل (۲-۱) پیوند بافت توموری به موش سالم ۶۴

شکل (۲-۲) اندازه‌گیری حجم تومور ۶۶

شکل (۲-۲) خونگیری از چشم موش ۷۰

شکل (۳-۱) باند فراکشن ۱۴کیلو دالتونی عصاره سیر ۷۷

شکل (۳-۲) تصویر باند فراکشن ۱۴کیلو دالتونی عصاره سیر ۷۸

شکل (۳-۳) الکتروفورزSDS-PAGE باند پروتئینی کاندیدا آلبیکنس ۷۸

شکل (۳-۴) لامهای پاتولوژیک مختلف تهیه شده از بافت توموری جهت تشخیص پاتولوژیک آدنوکارسینومای سینه ۷۹

شکل (۳-۵) باند زایموزان در مقایسه با مارکر ۷۹

شکل (۳-۶) سلولهای هسته پیکنوتیک(آپوپتوزیس) ۸۶

شکل (۳-۷) سلولهای لیز شده (نکروزیس) ۸۶

فصل اول

مقدمه و مروری
بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

۱-۲. سرطان

امروزه سرطان یکی از عوامل مرگ زودرس انسان است. این بیماری زیان‌های جبران ناپذیری به جامعه وارد می‌نماید. سرطان پستان اکنون شایع‌ترین و دومین سرطان کشنده زنان است. طبق گزارش انجمن سرطان آمریکا، سالیانه در حدود ۱۳۰۰۰۰۰نفر در دنیا به این بیماری مبتلا می‌شوند که حدود ۴۶۵۰۰۰ نفر از آنان در اثر این بیماری می‌میرند. در ایران سرطان پستان در زنان جوانتر (حداقل یک دهه زودتر از زنان در کشورهای پیشرفته) دیده می‌شود. متاسفانه بیماران در مراحل پیشرفته بیماری مراجعه می‌کنند که در ۷۰ درصد موارد اقدامات درمانی موفقیت آمیز نیست [۱]

سرطان ناشی از رشد غیر قابل کنترل سلولها، نفوذ به بافتهای سالم و غالباً متاستاز[1] به بافتهای دورتر می‌باشد و به طور کلی سرطانها ناشی ازترانسفورماسیون [2]یا تغییرشکل سلولهای طبیعی بدن می‌باشند و تقریباً تمام بافتهای بدن قابلیت سرطانی شدن را دارا می‌باشند.[۲] با رشد روز افزون علم و تکنولوژی توانایی انسانها در کنترل بیماری‌های عفونی بیشتر شده است، و از این جهت میزان امید به زندگی افزایش یافته، ولذا میزان شیوع سرطان نیز افزایش یافته است [۳].سلولهای سرطانی باآسیب به DNAسلول به رشد وپیشرفت خود ادامه می‌دهند، بیشتر مواقع هنگامی کهDNA آسیب ببیند سلولهای بدن قادر به تعمیر آن خواهند بود اما در سلولهای سرطانی DNAآسیب دیده قا بل تعمیر نخواهد بود و رشد سلولها به صورت غیر قابل کنترل و لجام گسیخته خواهد شد [۵، ۴] .سلولهای سرطانی می‌توانند از یک نقطه بدن به بافتهای دیگر رفته و در آن بافتهای سالم جایگزین شوند و به عبارتی متاستاز

1- Metastasis
2- Transformation

می‌یابند، در واقع اصطلاح متاستاز به معنای جدا شدن سلولها از تومواولیه والقائ ثانویه آن در بافتهای دور دست می‌باشد که این ویژگی تهاجم و متاستاز صریح تر از هریک از خصایص دیگر نئوپلاستیک مشخص کننده یک نئوپلاسم به عنوان بدخیم می‌باشد [۶].

۱-۳. ایجاد تومور

ایجاد تومور فرآیند پیچیده‌ای است که چندین مرحله دارد و اغلب به سه مرحله آغاز، . پیشروی و رشد تصاعدی طبقه بندی می‌شود [۶].

۱-۳-۱. مرحله آغاز[1]

این مرحله موتاسیون اولیه درDNAاست که به تکثیر ختم می‌شود البته هنوز به تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی بیشتری نیاز است تا ترانسفورماسیون کامل شود این مرحله توسط کارسینوژن‌هایی القا می‌شود، که مستقیماً بهDNAآسیب می‌زنند [۶].

۱-۳-۲. مرحله پیشروی[2]

در این مرحله تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی سلولهای مرحله اول گسترش می‌یابد [۶].

۱-۳-۳. رشد تصاعدی[3]

سلولهای سرطانی در این مرحله به فاکتورهای رشد نیاز دارند و به عوامل تنظیم رشدسلولهای نرمال پاسخ نمی‌دهند، درنتیجه باعث رشد غیر قابل کنترل این سلولها می‌شود.ازخصوصیات سلولهای سرطانی این است که همه این سلولهاتغییرثابتی درDNAدارند به طوری که فنوتیپ آنها را تغییر میدهد، این تغییر فنوتیپ در همه سلولهای حاصل از سلول ترانسفورم شده به ارث می‌رسد، در شرایط معمول موتاسیون در ژنهای حساس و یا بحرانی باعث از دست رفتن تعادل سلول و در نهایت مرگ می‌شود .در نتیجه سلولی که باید از بین برود، زنده می‌ماند، تا تغییرات ثانویه در آن ایجاد شود در نتیجه در شرایطی

1- initiation
2- promotion
3- progression