بسم الله الرحمن الرحیم

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

بعد از دفاع از حوزه پژوهشی دانشکده دریافت و بعد اسکن نمایید.

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 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 آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.**

ماده ٤- **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 ٥- **این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ 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.**

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 **۱۳۸۸** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر زهیر محمدحسن**، مشاوره **دکتر علی مصطفائی، دکتر سید محمد مؤذنی** 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 ٤ : 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 ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **عقیل تبار ملاحسن** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D)

در رشته ایمنی شناسی

عنوان

بررسی اثر سینرژیزم
واکسن غنی از پروتئین شوک حرارتی
واریانتی از gp96 (variant of gp96 rich lyset) و نالوکسان
جهت ایمونوتراپی تومور فیبروسارکوما در موش‌های BALB/c

نگارش

عقیل تبار ملاحسن

استاد راهنما

دکتر زهیرمحمد حسن

اساتید مشاور

دکتر علـــی مصطفـــائی دکتر سید محمد مـؤذنی

پاییز ۱۳۸۸

تقدیم به:

فرشته های آسمانیِ آسمانِ زندگیم یعنی پدر بزرگوار و مادر گرانقدرم؛

که همیشه محتاج دعای خیرشان بوده‌ام و امیدوارم روزی بتوانم ذره‌ای
از محبت‌هایشان را جبران نمایم.

همسر مهربانم فلورا:

که در دوران سخت تحصیل همواره یار و همدم من بوده است.

دختر دلبندم یاس:

که تنها گل باغ زندگی‌ام می‌باشد

خواهران گرامیم:

مهری ، فریده ، ناهید ،اکرم ، فاطمه و مهناز

که همیشه یار و دلسوزم بوده‌اند.

تشکر و قدردانی

اکنون که در سایه الطاف بیکران الهی این تحقیق پایان پذیرفت، وظیفهٔ خود می‌دانم، از عزیزانی که مرا در این خصوص یاری کرده‌اند، سپاسگزاری نمایم.

صمیمانه‌ترین تشکرم را به مشوق اصلی و اولین استاد ایمونولوژی‌ام، جناب آقای دکتر امرالله مصطفی زاده که ایمونولوژی را در محضر ایشان فرا گرفته‌ام، تقدیم می‌دارم.

- از استاد گرامی جناب آقای دکتر زهیر محمد حسن که راهنمایی این پایان‌نامه بر عهده ایشان بوده و در این راه از هیچ کوششی دریغ نکردند، کمال تشکر را دارم.
- از جناب آقای دکتر علی مصطفائی، آقای دکتر سید محمد مؤذنی و خانم دکتر معصومه ابتکار که قبول زحمت فرموده و با علاقمندی، مشاورت این پایان‌نامه را تقبل کرده‌اند، تشکر می‌نمایم.
- از جناب آقای رسول سلیمانی که زحمت مشاوره آماری را تقبل کردند تشکر می‌کنم.
- از جناب آقای دکتر مسیح هاشمی که اینجانب را در نگارش پایان نامه راهنمایی نموده اند تشکر می‌کنم.
- از جناب آقای شهرام پروانه، آقای دکتر شکیبا، آقای حمید محمدی که قبول زحمت فرموده در مراحل انجام این تحقیق به اینجانب کمک کردند بی‌نهایت سپاسگزارم و برای ایشان آرزوی موفقیت می‌نمایم.
- از جناب آقای دکتر شهرام شهابی که در کلیه مراحل این تحقیق به اینجانب کمک نموده‌اند کمال تشکر را دارم.
- از دیگر اساتیدی که در طول مدت تحصیل، افتخار شاگردی آنها را داشته‌ام کمال تشکر را دارم.

در پایان از کلیه سروران و همکارانی که از ذکر نامشان به علت طول مطلب خودداری می‌شود و به نحوی در انجام این تحقیق مرا یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

عقیل تبار ملاحسن

پاییز ۱۳۸۸

چکیده

زمینه و اهداف: خانوادهٔ گلیکوپروتئین‌های ۹۶ کیلودالتونی یا gp96، بخشی از پروتئین‌های شوک حرارتی هستند. این مولکول‌ها به‌طور ذاتی حامل پپتیدهای سلولی بوده و در مورد سلول‌های سرطانی حاوی پپتیدهای آنتی‌ژنیکِ این سلول‌ها هستند. این مولکول‌ها با موفقیت در ایمونوتراپی سرطان بکار برده شده‌اند. نالوکسان یک آنتاگونیست عمومی اپیوئیدهاست که جدیداً به عنوان آجوانت معرفی شده است. این مولکول با اتصال به گیرنده‌های اپیوئیدی در سطح سلول‌های ایمنی، اثر تنظیمی قوی بر پاسخ‌های ایمنی اعمال کرده و القاء کنندهٔ قوی پاسخ از نوع Th1 می‌باشد. هدف این مطالعه، ارزیابی اثر سینرژیزم نالوکسان با gp96 مشتق از تومور در ایمونوتراپی سرطان می‌باشد.

مواد و روش‌ها : برای تهیهٔ پروتئین gp96 توموری از روش سه مرحله‌ای استفاده گردید. برای آنالیز پروتئین‌ها از روش SDS-PAGE و وسترن بلات استفاده شد و ماهیت پروتئین با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال بر روی غشاء PVDF تایید گردید. سپس، از طریق تزریق سلول‌های WEHI-164 به موش‌ها، تومور تجربی در آنها ایجاد شد. موش‌های توموری، در چهار گروه، چهار ترکیب مختلف PBS، نالوکسان، gp96 و نالوکسان+gp96 را از طریق زیرجلدی دریافت کردند. برای ارزیابی تاثیرات واکسن، حجم تومور مرتباً اندازه‌گیری شد. تست‌های تکثیر لنفوسیتی با MTT، سایتوتوکسیسته با روش LDH و تولید IFNγ, IL-4 با روش الایزا بر روی سلول‌های طحالی انجام گردید. درصد جمعیت‌های سلولی+T CD4 ، +T CD8 و +T CD4+CD25+foxp3 در بافت طحال و تومور با روش فلوسایتومتری تعیین گردیدند.

نتایج : باند پروتئین gp96 تخلیص شده در محدوده ۶۶ کیلودالتون قرار داشت. نتایج ایمونوتراپی با gp96 و نالوکسان نشانگر آن است که میزان کاهش رشد تومور در روزهای ۲۷ و ۳۲ در این گروه به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه gp96 تنها می‌باشد. درصد سلول‌های +T CD4+CD25+foxp3 در طحال و تومور این گروه در مقایسه با گروه‌های کنترل کاهش معنی‌دار داشت. استفاده توأم این دو، موجب افزایش معنی‌دار سلول‌های +CD8 در تومور و افزایش معنی‌دار سایتوتوکسیسیتهٔ لنفوسیت‌های طحالی در مقایسه با گروه دریافت کننده gp96 تنها گردید.

نتیجه‌گیری : نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نالوکسان در ایمونوتراپی تومور اثر سینرژیزم با gp96 داشته و به عنوان یک آجوانت کارآمد می‌تواند به‌کار گرفته شود.

کلید واژه: نالوکسان، gp96، ایمونوتراپی، تومور، فیبروسارکوما، T reg

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول – مقدمه

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. مروری بر سرطان ۴

۱-۲-۱. مراحل ایجاد تومور ۴

۱-۲-۲. انواع آنتی‌ژن‌های توموری ۴

۱-۳. ایمونولوژی تومور ۷

۱-۳-۱. فاکتورهای سلولی ۷

۱-۳-۱-۱. نقش ماکروفاژها ۷

۱-۳-۱-۲. نقش دندریتیک سل‌ها ۹

۱-۳-۱-۳. نقش NK cell ها ۱۰

۱-۳-۱-۴. نقش NKT cell ها ۱۲

۱-۳-۱-۵. نقش T helper ۱۲

۱-۳-۱-۶. نقش CTL ۱۳

۱-۳-۱-۷. نقش T Regulatory ۱۴

۱-۳-۱-۸. نقش regulatory B cell ۱۵

۱-۳-۲. فاکتورهای مولکولی ۱۶

۱-۳-۲-۱. نقش آنتی‌بادی ۱۶

۱-۳-۲-۲. نقش سایتوکاین‌ها ۱۷

۱-۳-۳. مکانیزم‌های فرار تومور از پاسخ ایمنی ۱۸

۱-۳-۳-۱. کاهش بیان ملکول‌های چسبنده..... ۱۸
۱-۳-۳-۲. تغییر در بیان MHC..... ۱۹
۱-۳-۳-۳. سرکوب پاسخ‌های ایمنی..... ۱۹
۱-۳-۳-۴. ایجاد تولرانس ایمونولوژیک..... ۲۰
۱-۳-۳-۵. عدم دسترسی سیستم ایمنی..... ۲۰
۱-۴. ایمونوتراپی تومور..... ۲۱
۱-۴-۱. واکسن‌هایی که بر سلول‌های پردازش کنندهٔ آنتی‌ژن (APC) استوار می‌باشند..... ۲۱
۱-۴-۱-۱. تزریق داخل توموری BCG..... ۲۱
۱-۴-۱-۲. ترانسفکت کردن سلول‌های توموری با HLA-B7..... ۲۲
۱-۴-۱-۳. واکسن توموری سلول کامل (Whole-Cell tumor Vaccine)..... ۲۲
۱-۴-۱-۴. واکسن توموری با استفاده از انتقال ژن..... ۲۲
۱-۴-۱-۵. واکسن‌های مبتنی بر پپتید..... ۲۳
۱-۴-۱-۶. واکسن‌های DNA..... ۲۴
۱-۴-۱-۷. وکتورهای ویروسی..... ۲۴
۱-۴-۱-۸. افزایش تعداد سلول‌های پردازش کنندهٔ آنتی‌ژن در محل تومور..... ۲۴
۱-۴-۲. پروتئین‌های شوک حرارتی..... ۲۵
۱-۴-۲-۱. تعریف و طبقه‌بندی پروتئین‌های استرس..... ۲۶
۱-۴-۲-۲. Hsp90..... ۲۶
۱-۴-۲-۳. Hsp70..... ۲۷
۱-۴-۲-۴. Hsp72..... ۲۷

۱-۴-۲-۵. Glucose regulated proteins ۲۷
۱-۴-۳. مکانیزم‌های عرضه gp96 ..... ۳۰
۱-۴-۴. اتصال HSP ها به پپتیدها ۳۱
۱-۴-۵. تنظیم بیان ژن HSP ها ۳۱
۱-۴-۶. آثار ایمونولوژیک پروتئین‌های شوک حرارتی ۳۲
۱-۴-۶-۱. اثر HSP ها برسلول‌های پردازش کنندهٔ آنتی‌ژن (APC) ها ۳۲
۱-۴-۶-۲. اثر HSP بر سلول‌های دندریتیک (DC) ۳۵
۱-۴-۶-۳. HSP به عنوان اجوانت و فعال کننده ایمنی ذاتی ۳۵
۱-۵. مروری بر نروایمونولوژی ۳۷
۱-۵-۱. سیستم اوپوئیدی ۳۸
۱-۵-۱-۱. گیرنده‌های اپیوئیدی ۳۸
۱-۵-۱-۲. گیرنده‌های مختلف مو (μ) ۳۹
۱-۵-۱-۳. گیرنده‌های مختلف دلتا ۳۹
۱-۵-۱-۴. گیرنده‌های مختلف کاپا ۳۹
۱-۵-۱-۵. گیرنده‌های یتیم یا گیرنده‌های اورفان ۴۰
۱-۵-۱-۶. گیرنده‌های اپیوئیدی دیگر که احتمالاً وجود دارند ۴۰
۱-۵-۲. پپتیدهای اپیوئیدی درون‌زاد ۴۱
۱-۵-۲-۱. پپتیدهایی که از پرواپیوملانوکورتین مشتق می‌شوند ۴۲
۱-۵-۲-۲. محصولاتی که از پروانکفالین مشتق می‌شوند ۴۳
۱-۵-۲-۳. محصولات مشتق شده از پرودینورفین ۴۳

۱-۵-۳. مکانیسم‌های سلولی و ملکولی ترکیبات اپیوئیدی ۴۴
۱-۵-۴. برخی مکانیسم‌های درون سلولی اپیوئیدها ۴۵
۱-۵-۴-۱. مهار آدنیلیل سیکلاز ۴۵
۱-۵-۴-۲. افزایش فعالیت هدایت جریان پتاسیم و مهار جریان کلسیم ۴۵
۱-۵-۵. مهار آزاد شدن نروترانسمیتر ۴۶
۱-۵-۶. فعالیت PKC ۴۷
۱-۵-۷. اثرات اپیوئیدها بر سیستم ایمنی ۴۶
فصل دوم – مروری بر مطالعات انجام شده ۴۹
فصل سوم: مواد و روش‌ها ۵۶
۳-۰. چکیده فصل ۵۷
۳-۱. مواد و روش‌ها ۵۸
۳-۱-۱. تهیه، تغلیظ و تخلیص gp96 از WEHI-164 ..... ۵۸
۳-۱-۱-۱. کشت سلول توموری به منظور تهیه لایزت سلولی ۵۹
۳-۱-۱-۲. تغلیظ gp96 با سولفات آمونیوم ۵۹
۳-۱-۱-۳. تخلیص gp96 توموری ۶۰
۳-۱-۲. ردیابی پروتئین‌ها ۶۲
۳-۱-۲-۱. الکتروفورز SDS-PAGE ۶۲
۳-۱-۲-۲. روش رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو R250 ..... ۶۶
۳-۱-۲-۳. روش رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره (Silver staining) ۶۷
۳-۱-۲-۴. وسترن بلات (Western blot) ۶۷

۳-۱-۲-۵. رنگ‌آمیزی مارکرهای وزن مولکولی با کوماسی بلو (R250) ۷۰
۳-۲. توموری‌کردن و واکسیناسیون موش‌ها ۷۲
۳-۲-۱. تهیهٔ مدل موشی تومور ۷۲
۳-۲-۲. واکسیناسیون موش‌ها ۷۳
۳-۳. روش‌های ارزیابی اثر بخشی واکسن ۷۵
۳-۳-۲. ارزیابی سلول‌های طحال ۷۵
۳-۳-۲-۱. تهیهٔ سوسپانسیون لنفوسیت‌های طحال ۷۵
۳-۳-۲-۲. تهیهٔ سوسپانسیون سلولی مصرفی ۷۸
۳-۳-۳. ارزیابی میزان پرولیفراسیون لنفوسیت‌ها با به کارگیری MTT ۷۹
۳-۳-۴. ارزیابی سایتوکاین‌های IFNγ و IL-4 تولید شده در محیط کشت سلولی ۸۳
۳-۳-۵. ارزیابی سایتوتوکسیسیتهٔ سلول‌های طحالی برعلیه سلول‌های WEHI-164 ..... ۸۸
۳-۳-۵-۱. تعیین تعداد مناسب سلول هدف ۸۸
۳-۳-۵-۲. تعیین نسبت سلول افکتور به سلول هدف (E:T) ۹۲
۳-۳-۶. تعیین ٪ سلول‌های $TCD4^+$ و $TCD8^+$ و T CD4+CD25+foxp3+ T cell ۹۶
۳-۳-۶-۱. تهیه و تخلیص لنفوسیت از بافت توموری ۹۷

فصل چهارم – نتایج و یافته‌های تحقیق

۴-۱. نتایج حاصل از عمل تخلیص gp96 ..... ۱۰۲
۴-۱-۱. نتایج رنگ‌آمیزی نقره و وسترن بلات ۱۰۲
۴-۲. نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم تومور ۱۰۵
۴-۳. نتایج آزمایش پرولیفراسیون سلول‌های طحالی (MTT) ۱۰۸

۴-۴. نتایج تست الایزا (IFNγ, IL-4) ۱۱۰
۴-۴-۱. نتایج تست اینترفرون گاما ۱۱۰
۴-۴-۲. نتایج تست اینترلوکین چهار ۱۱۴
۴-۵. نتایج آزمایش سایتوتوکسیسیته به روش LDH ۱۱۶
۴-۶. آنالیز فلوسایتومتری لنفوسیت‌های طحالی و توموری ۱۲۰
۴-۶-۱. نتایج آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های +CD4+CD25+foxp3 در طحال ۱۲۰
۴-۶-۲. میانگین درصد سلول‌های +CD4+CD25+foxp3 در تومور ۱۲۲
۴-۶-۳. میانگین درصد سلول‌های +T CD4 در طحال و تومور ۱۲۳
۴-۶-۴. میانگین درصد سلول‌های +T CD8 در طحال و تومور ۱۲۴
۴-۶-۵. مقایسهٔ نسبت CD4/CD8 در طحال و تومور ۱۲۵

فصل پنجم - بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۵-۱. بحث ۱۲۸
۵-۲. نتیجه‌گیری ۱۳۷
۵-۳. پیشنهادها ۱۳۷
منابع ۱۳۸
چکیده انگلیسی ۱۵۰

فهرست جدول‌ها

عنوان | صفحه

جدول ۳-۱. فرمولاسیون برای تهیه ژل ۶۴

جدول ۳-۲. طرز تهیه محلول رنگ تریپان‌بلو (۰/۴ درصد) ۷۸

جدول ۳-۳. دانسیتهٔ سوسپانسیون سلولی مصرفی ۷۸

جدول ۳-۴. مقایسهٔ پارامترهای دو تست MTT و سایتوکاین ۸۵

جدول ۳-۵. تعیین نسبت E:T ۹۳

جدول ۴-۳. میانگینِ و انحراف معیار حجمِ تومور(میلیمتر مکعب) ۱۰۶

جدول ۴-۴. میانگین و انحراف معیار اندیس تحریکی در گروه‌های آزمایشی ۱۰۹

جدول ۴-۵. میانگین و انحراف معیار اینترفرون گاما (pg/ml) ۱۱۲

جدول ۴-۶. میانگین و انحراف معیار اینترلوکین چهار (pg/ml) ۱۱۵

جدول ۴-۷. میانگین و انحراف معیار درصد سایتوتوکسیسیته در E:T های مختلف ۱۱۸

جدول ۴-۸. میانگین و انحراف معیار CTL بر علیه سلول CT-26 ..... ۱۱۹

جدول ۴-۹. میانگین و SD سلول‌های $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ در طحال (٪) ۱۲۰

جدول ۴-۱۰. میانگین و SD سلول‌های $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ در تومور (٪) ۱۲۲

جدول ۴-۱۱. میانگین و SD سلول‌های +CD4 در طحال و تومور (٪) ۱۲۳

جدول ۴-۱۲. میانگین و SD سلول‌های +CD8 در طحال و تومور (٪) ۱۲۴

جدول ۴-۱۳. میانگین و SD نسبت +CD4+/CD8 در طحال و تومور ۱۲۵

فهرست شکل‌ها

عنوان | صفحه

شکل ۱-۱ پاسخ لنفوسیت‌های سایتوتوکسیک به سلول‌های توموری ۱۴

شکل ۱-۲ اثر HSP ها برسلول‌های پردازش کنندهٔ آنتی‌ژن ۳۳

شکل ۱-۳ مکانیزم‌های اثر HSP ها بر سلول‌های APC ۳۴

شکل ۱-۴ HSP ها به عنوان اجوانت و فعال‌کنندهٔ ایمنی ذاتی ۳۶

شکل ۳-۱ نمودار منحنی استاندارد و معادلهٔ خط رگرسیون مربوط به کیت IFNγ ۸۷

شکل ۳-۲ نمودار منحنی استاندارد و معادلهٔ خط رگرسیون مربوط به کیت IL-4 ..... ۸۷

شکل ۳-۳. نمودار تیتراسیون سلول هدف..... ۹۱

شکل ۳-۴ طرح کار برای مناسب سازی نسبت افکتور بر تارگت ۹۳

شکل ۳-۵ نمودار نسبت E:T که در حالت ۲۰:۱ حداکثر مقدار را دارد..... ۹۴

شکل ۴-۱ رنگ‌آمیزی نقره از نمونه‌های پروتئینی مراحل تخلیص gp96 توموری..... ۱۰۳

شکل ۴-۲ وسترن بلات از نمونـه‌های پروتئینیِ ۱۰۴

شکل ۴-۳ نمودار حجم تومور در گروه‌های کنترل و تست در روزهای مختلف ۱۰۷

شکل ۴-۴ نمودار مقایسهٔ میانگین و انحراف معیار نتایج تست MTT..... ۱۰۹

شکل ۴-۵ نمودار میانگین تولید اینترفرون گاما در گروه کنترل و تست..... ۱۱۳

شکل ۴-۶ نمودار میانگین تولید اینترلوکین چهار در گروه‌های تحت مطالعه ۱۱۵

شکل ۴-۷ نمودار درصد سایتوتوکسیسیته در گروه‌ها و نسبت‌های مختلف ۱۱۸

شکل ۴-۸ نمودار درصد لیز CT-26 توسط سلول‌های طحالی در گروه‌های مختلف ۱۱۹

شکل ۴-۹ نمودار سلول‌های T CD4+CD25+foxp3+ در طحال به تفکیک گروه‌ها..... ۱۲۱

شکل ۴-۱۰ نمودار میانگین درصد سلول‌های $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ در تومور ۱۲۲

شکل ۴-۱۱ نمودار مقایسهٔ میانگین T CD4+ در طحال و تومور..... ۱۲۳

شکل ۴-۱۲ نمودار مقایسهٔ میانگین درصد سلول‌های T CD8+ در طحال و تومور **۱۲۴**

شکل ۴-۱۳ نمودار مقایسهٔ میانگین نسبت CD4/CD8 در طحال و تومور **۱۲۵**

فصل اول

مقدمه

۱-۱. مقدمه

موضوع این تحقیق تجربی، ارزیابی روش واکسیناسیون برعلیه تومور فیبروسارکومای موشی با استفاده از یکی از مهمترین پروتئین‌های توموری یعنی gp96 می‌باشد و از نالوکسان، آنتاگونیست عمومی اپیوئیدها، به عنوان آجوانت، برای تقویت پاسخ ایمنیِ القاء شده و سوق دادن آن به سوی بازوی سلولی ایمنی استفاده شده است. این تحقیق بر روی موش‌های BALB/c در محدودهٔ سنی ۶ تا ۸ هفته انجام گرفته است.

سلول‌های توموری که از بافت میزبان منشاء می‌گیرند، پاسخ ایمنی قابل توجهی را در بدن فرد دارندهٔ تومور، القاء نمی‌کنند. از طرف دیگر سلول‌های توموری به محض استقرار در بافت از طریق مکانیسم‌های مختلفی فعال شدن سیستم ایمنی را برعلیه خود مهار نموده و به راحتی تکثیر نموده و در نهایت، سریعاً منجر به مرگ و نابودی میزبان خود می‌شوند. شناسایی روش‌های بقاء تومور در مقابل مکانیسم‌های نابود کنندهٔ سیستم ایمنی، راهکارهای مناسبی را پیشِ پای محققان قرار داده تا با درهم شکستن مقاومت بافت تومور، در جهت نابودی آن با استفاده از مکانیسم‌های ایمنی تقویت شدهٔ میزبان، قدم برداشت.

در تحقیق حاضر، یک تومور تجربی از طریق تزریق زیر جلدی سلول توموری WEHI-164 در موش BALB/c ایجاد می‌شود و پس از قابل رویت شدن تومور از واکسیناسیون با gp96 به همراه

نالوکسان، برای درهم شکستن مکانیسم‌های مقاومت تومور و متقابلاً، تقویت مکانیسم‌های کشندهٔ سیستم ایمنی استفاده می‌شود.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با استفاده از آجوانت‌های مناسب می‌توان مکانیسم‌های مهاری القاء شده توسط تومورها را از بین برد و حداقل تحت شرایط آزمایشی به کار گرفته شده در این تحقیق، می‌توان محیط نامناسبی را برای سلول‌های توموری فراهم کرد تا از رشد و تکثیر آنها جلوگیری کرد.

در طی بخش‌های بعدی به ترتیب، با سرطان آشنا شده و روابط متقابل سیستم ایمنی و تومور را بررسی می‌کنیم. سپس مطالبی در مورد واکسن‌های ضد تومور ارائه می‌گردد و در بخش بعدی نگاهی به کشفیات انجام شده در مورد سیستم اپیوئیدی اندوژن خواهیم کرد و سپس اثر اپیوئیدها بر عملکرد سیستم ایمنی را بررسی می‌کنیم و از این مسیر روشن خواهیم کرد که نالوکسان چگونه می‌تواند اثر تقویتی خود را بر بازوی سلولی سیستم ایمنی اعمال کند.