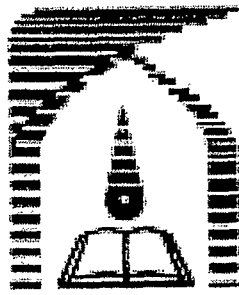


١٢٥٥٦

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

٩٩٤١٥



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده پزشکی

رساله دوره دکتری در رشته ویروس شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی تاثیر ژنهای القاء کننده آپوپتوزیس (BAX) و
آنتی آپوپتوزیس ($Bcl-X_L$) در کارآیی واکسن DNA واجد
ژن گلیکوپروتئین B ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

ارائه دهنده:

مسعود پارسانیا

استاد راهنما:

دکتر زهیر صراف

استادان مشاور:

دکتر طراوت بامداد

دکتر مریم خیر اندیش

خرداد ۱۳۸۷

۹۹۴۱۰

وزارت بهداشت و درمان
سازمان اسناد و کتابخانه ملی
جمهوری اسلامی ایران

۱۳۸۷ / ۰۵ / ۲۵

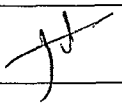
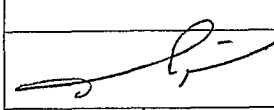
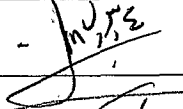
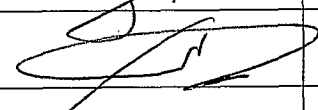
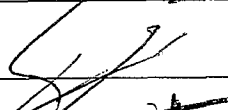
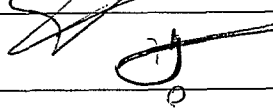
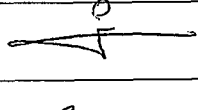
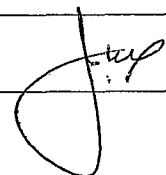


بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم / آقای مسعود پارسا نیا رساله دکتری واحدی خود را با عنوان: بررسی اثر ژنهای القاکننده آپوپتوزیس (BAX) و آنتی آپوپتوزیس (BCL-XL) در کارایی واکسن DNA واجد ژن گلیکوپروتئین B ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

در تاریخ ۸۷/۳/۴ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	دکتر زهیر صراف	استاد	
۲- استاد راهنمای دوم			
۱- استاد مشاور اول	خانم دکتر طراوت بامداد	استاد یار	
۲- استاد مشاور دوم	خانم دکتر مریم خیر اندیش	استاد یار	
۳- استاد ناظر	خانم دکتر حوریه سلیمان جاهی	استاد یار	
۴- استاد ناظر	آقای دکتر مهرداد روانشاد	استاد یار	
۵- استاد ناظر	آقای دکتر عباس برین	استاد یار	
۶- استاد ناظر	آقای دکتر عباس شفیعی	استاد	
۷- نماینده تحصیلات تکمیلی	خانم دکتر فرزانه صباحی	دانشیار	

۱۳۸۷ / ۱۵ / ۲۵

آئین نامه 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 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 ویروس شناسی پزشکی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر زهیر صراف، مشاوره سرکار خانم دکتر طراوت بامداد و سرکار خانم دکتر مریم خیر اندیش 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 اهداء 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، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد 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 مسعود پارسائیا دانشجوی رشته ویروس شناسی پزشکی مقطع دکتری تخصصی تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

مسعود پارسائیا

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضاء

۸۷/۳/۱۹

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

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی 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 هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله 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 باشند. تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آیین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 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 هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگی
تاریخ و امضاء

سردار پوریا

۱۴۳۱/۱۹

تقدیم به :

استاد عزیز و بزرگوارم جناب آقای صابر کرمانی که همیشه از نور وجودش بهره مند بوده ام.

پدر و مادر ارجمندم

به پاس سالها تلاش خستگی ناپذیر و فداکاری های بی وقفه و عاشقانه شان که از هیچ فداکاری دریغ ننمودند.

همسر عزیزم

یاوری مهربان و دلسوز و یاری دهنده همیشگی من در مسیر علم و زندگی، موفقیت های خود را مدیون ایثار ایشان میدانم.

فرزندان دلبندم

سرمایه های هستی و زندگی ام که با صبر و شکیبایی خود همیشه مرا یاری نمودند.

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس خداوند رحمان و رحیم که لطف و احسانش قدیم است، خدایی که دریای رحمتش بر بندگان بی پایان است و بر تمام عالم هستی علیم و حکیم است.

اکنون که به لطف ایزد منان و یگانه هستی بخش جهان، مراحل انجام رساله فوق به پایان رسیده است، مراتب سپاس و تشکر خود را از افراد ذیل ابراز می دارم:

خالصانه ترین سپاس نثار استاد فرزانه، جناب آقای صابر کرمانی که در تمام مراحل زندگی خود از حمایت‌های معنوی و نور وجود ایشان بهره مند گردیده ام، علو درجات معنوی و شادی روحشان را از درگاه خداوند سبحان مسئلت دارم.

استاد عزیز و ارجمند جناب آقای دکتر زهیر صراف که با وسعت نظر علمی بالا و در کمال فروتنی مرا در انجام این رساله هدایت نمودند. من در کنار ایشان علاوه بر بهره گیری علمی، درس تواضع و فروتنی آموختم.

استاد گرامی و بزرگوار سرکار خانم دکتر طراوت بامداد که در تمام مراحل انجام رساله از نقطه نظرات ظریف علمی ایشان استفاده کردم و در تمام مراحل کار از پشتیبانی های بی شائبه ایشان برخوردار بودم.

استاد محترم و گرانقدر سرکار خانم دکتر مریم خیراندیش که با دقت نظر علمی بالای خود در تمام مراحل انجام رساله، مرا یاری کرده و همواره از حمایت‌های علمی ایشان بهره گرفتم.

استاد عزیز و گرامی سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی که بدون یاری و همراهی خالصانه و بی دریغ ایشان انجام این تحقیق غیر ممکن می بود و در تمام دوران تحصیل از حمایت ایشان برخوردار بودم.

استاد ارجمند و گرامی جناب آقای دکتر محمد حسن روستایی که در طول تحصیل از تجارب علمی و عملی والای ایشان بهره مند گردیدم. از اساتید محترم جناب آقایان دکتر عباس شفیع، دکتر عباس برین، دکتر مهرداد روانشاد و سرکار خانم دکتر حوریه سلیمان جاهی، که علاوه بر اینکه در طول دوران تحصیل از علم و تجربه ایشان استفاده کردم، مسئولیت نظارت و داوری رساله را بر عهده داشتند.

برادران بزرگوار و عزیزم جناب آقایان روح اله درستکار ساری و محمد حسن پوریای ولی که در انجام این رساله زحمات زیادی متقبل شدند و مرا در انجام مراحل مختلف کار یاری دادند، همیشه خود را مدیون محبت و ایثار خالصانه آنان میدانم.

برادران گرامی و ارجمندم جناب آقایان دکتر عباس جمالی، دکتر مهدی مهدوی، دکتر محمد جزایری که با در اختیار قرار دادن علم و تجربیات عملی خود در پیشبرد انجام کار مرا یاری نمودند.

همکار گرامی سرکار خانم حیات کارشناس مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی ایران که با رویی باز همیشه تقبل زحمت کردند و در مراحل از انجام این رساله کمک‌های ارزنده ای مبذول داشتند.

همکاران محترم و عزیزم جناب آقای دکتر سعید عامل و سرکار خانمها دکتر فاطمه رودباری، دکتر کیانا شاه زمانی، دکتر زهرا مشکات، که در تمام مراحل تحصیل مرا مورد لطف و عنایت خویش قرار داده و همیشه از تجارب علمی خود مرا بهره مند ساختند.

برادر عزیزم جناب آقای سید کیوان قاضی میر سعید، کارشناس محترم بخش ویروس شناسی که با کمک‌های بی دریغ خود مرا یاری نمودند. از کلیه دانشجویان محترم گروه ویروس شناسی و ایمنی شناسی دانشگاه تربیت مدرس که در تمام مراحل انجام رساله از مساعدت ها و حمایت‌های آنان استفاده کردم.

چکیده:

استفاده از واکسنهای DNA ، یکی از شیوه های ارائه شده برای واکسیناسیون می باشد.. از استراتژیهای مختلفی جهت ارتقاء خاصیت ایمنونژنسیته واکسنهای DNA، استفاده شده است. از جمله این استراتژیها می توان به بکار گیری عوامل القاء کننده آپوپتوزیس و یا آنتی آپوپتوزیس به همراه واکسنهای DNA، اشاره نمود. استفاده از پروتئینهای پروآپوپتوتیک مثل Bax به همراه واکسنهای DNA منجر به القاء آپوپتوزیس در سلولهای ترانس فکت شده گردیده و سلولهای فوق توسط سلولهای عرضه کننده آنتی ژن شناخته شده و از طریق سلولهای فوق آنتی ژن مربوطه را به سلولهای سیستم ایمنی ارائه نموده و بدین ترتیب منجر به افزایش پاسخهای ایمنی می شوند. استفاده از پروتئینهای آنتی آپوپتوتیک مثل Bcl-xl به همراه واکسنهای DNA، می تواند منجر به طولانی تر شدن مدت زمان زندگی سلولهای دندریتیک ترانسفکت شده گردد و بدین ترتیب سلولهای فوق در زمان طولانی آنتی ژن مربوطه را به سلولهای سیستم ایمنی عرضه می نمایند. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک از جمله ویروسهای شایع در جمعیت های انسانی بوده و عامل بسیاری از ضایعات مخاطی در دهان و صورت و یا عفونتهای شدید و منتشر در کودکان می باشد. گلیکوپروتئین (gB)B ، یکی از مناسب ترین پروتئینهای این ویروس می باشد که منجر القاء پاسخهای ایمنی می گردد.

در تحقیق حاضر اثر دو ژن القاء کننده آپوپتوزیس (Bax) و آنتی آپوپتوزیس (Bcl-xl) به همراه واکسن DNA واجد ژن gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک به روش جلدی در موشهای C57BL/6 مورد بررسی قرار گرفت، در این تحقیق ۳ دوز از پلاسمید کد کننده Bax شامل مقادیر ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم و نیز ۵۰ میکروگرم از پلاسمید کد کننده Bcl-xl به طور جداگانه، به همراه ۵۰ میکروگرم واکسن DNA به موشها تزریق شد، پاسخهای ایمنی نسبت به آنتی ژن فوق با آزمایشات پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتی به روش MTT ، بررسی واکنش سیتوتوکسیسیته CTLها به روش فلوسایتومتری و اندازه گیری سایتوکاینهای INF- γ و IL-4 ، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان می دهد موشهایی که ۲۵ میکروگرم پلاسمید کد کننده Bax را به همراه واکسن DNA دریافت کرده بودند پاسخهای ایمنی قویتری را نسبت به سایر گروهها نشان داده و در مورد گروهی که پلاسمید کد کننده Bcl-xl را به همراه واکسن DNA دریافت کرده بودند افزایش معنی داری در پاسخهای ایمنی ایجاد شده نسبت به گروهی که واکسن DNA را به تنهایی دریافت کرده بودند، دیده نشد.

کلمات کلیدی: آپوپتوزیس، آنتی آپوپتوزیس، واکسن DNA ، ویروس هرپس سیمپلکس.

فهرست مطالب

۱	فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته.....
۲	۱-۱. مقدمه.....
۵	۲-۱. طبقه بندی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک.....
۵	۳-۱. ساختار ویروس.....
۶	۴-۱. پروتئینهای ویروس.....
۶	۱-۴-۱. ویژگی گلیکوپروتئین B (gB) ویروس.....
۷	۲-۴-۱. ویژگی سایر گلیکوپروتئینهای ویروس.....
۸	۵-۱. نحوه تکثیر ویروس.....
۹	۶-۱. نهفتگی ویروس.....
۹	۷-۱. بیماریزایی.....
۱۰	۸-۱. اپیدمیولوژی.....
۱۱	۹-۱. تشخیص آزمایشگاهی.....
۱۲	۱۰-۱. پاسخ ایمنی میزبان در عفونتهای ناشی از HSV.....
۱۴	۱۱-۱. کنترل عفونتهای HSV.....
۱۴	۱-۱۱-۱. پیشگیری.....
۱۵	۲-۱۱-۱. درمان.....
۱۵	۳-۱۱-۱. واکسیناسیون.....
۱۶	۱-۳-۱۱-۱. واکسنهای ویریون غیر فعال شده.....
۱۷	۲-۳-۱۱-۱. واکسنهای ساب یونیت.....

۱۸ ۱۱-۳-۳. واکسنهای ژنتیک تخفیف حدت یافته
۱۸ ۱۱-۳-۴. واکسنهای متشکل از وکتورهای زنده بیان کننده ژنهای ویروسی
۱۹ ۱۱-۳-۵. واکسنهای DNA
۲۱ ۱۲-۱. اصول واکسنهای DNA
۲۲ ۱۲-۱-۱. مزایای واکسنهای DNA
۲۴ ۱۲-۱-۲. معایب واکسنهای DNA
۲۴ ۱۲-۱-۳. مکانیسم های القاء پاسخهای ایمنی در واکسنهای DNA
۲۶ ۱۳-۱. روشهای افزایش کارایی واکسنهای DNA
۲۷ ۱۳-۱-۱. استفاده از روشهایی که منجر به بیان بیشتر آنتی ژن می گردد
۲۷ ۱۳-۱-۲. بهینه سازی نحوه تزریق واکسنهای DNA
۳۰ ۱۳-۱-۲-۱. لیپوزوم
۳۱ ۱۳-۱-۲-۲. دندروزوم
۳۲ ۱۳-۱-۳. استفاده از روشهایی که منجر به افزایش ایمونوژنسیته واکسنهای DNA می شوند
۳۲ ۱۳-۱-۳-۱. استفاده از پروتئینهای ادغام شده
۳۳ ۱۳-۱-۳-۲. اضافه نمودن مولکولهای محرک سیستم ایمنی
۳۳ ۱۳-۱-۳-۳. استفاده از پلاسمیدهای کد کننده سایتوکاینها
۳۴ ۱۳-۱-۳-۴. استفاده از سیستم های القاء کننده آپوپتوزیس
۴۱ ۱۳-۱-۳-۵. استفاده از سیستم های القاء کننده آنتی آپوپتوزیس
۴۴ فصل دوم : مواد و روشها
۴۶ ۲-۱. تهیه باکتری مستعد
۴۶ ۲-۱-۱. مواد و وسایل لازم

۴۷ روش کار ۲-۱-۲
۴۸ ترانس فورمیشن و انتخاب باکتریهای واجد پلاسمید ۲-۲
۴۸ مواد و وسایل لازم ۱-۲-۲
۴۸ روش کار ۲-۲-۲
۴۹ استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی در مقیاس کم ۳-۲
۴۹ مواد و محلولهای لازم ۱-۳-۲
۵۰ روش کار ۲-۳-۲
۵۱ الکتروفورز DNA استخراج شده در ژل آگارز ۴-۲
۵۱ مواد و محلولهای لازم ۱-۴-۲
۵۲ روش کار ۲-۴-۲
۵۲ استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی در مقیاس زیاد ۵-۲
۵۲ مواد و محلولهای لازم ۱-۵-۲
۵۳ روش کار ۲-۵-۲
۵۴ تعیین غلظت DNA استخراج شده ۶-۲
۵۴ تهیه کشت سلولی Vero ۷-۲
۵۵ مواد و محلولهای لازم ۱-۷-۲
۵۷ روش کار ۲-۷-۲
۵۷ تکثیر HSV-1 در سلول Vero ۸-۲
۵۸ تعیین عیار ویروس به روش TCID50 ۹-۲
۵۹ تزریق HSV-1 به موش C57BL/6 جهت راه اندازی و بهینه سازی تستهای ایمونولوژی... ۱۰-۲
۶۰ راه اندازی و بهینه سازی تست پرولیفراسیون لنوسیتی به روش MTT ۱۱-۲

۶۰	۱-۱۱-۲. اساس تست
۶۲	۲-۱۱-۲. مواد و محلولهای مورد نیاز
۶۴	۳-۱۱-۲. روش برداشت طحال و استخراج سلولهای طحالی موش
۶۵	۴-۱۱-۲. روش انجام آزمایش پروليفراسيون لنفوسیتی به روش MTT
۶۷	۱۲-۲. راه اندازی و بهینه سازی تست CTL assay به روش فلوسایتومتری
۶۷	۱-۱۲-۲. اساس روش فلوسایتومتری
۶۹	۲-۱۲-۲. اساس واکنش سیتوتوکسی سیتی
		۳-۱۲-۲. استفاده از روش فلوسایتومتری بر پایه دو رنگ AAD, AnnexinV-FITC 7- برای سنجش
۷۲	فعالیت سلول کشی CTL ها
۷۳	۴-۱۲-۲. آماده سازی سلولهای هدف برای سنجش میزان فعالیت سلول کشی CTL ها
۷۴	۱-۴-۱۲-۲. کشت سلولهای EL4
۷۴	۲-۴-۱۲-۲. آلوده سازی سلولهای EL4 با مقادیر مختلف از HSV-1
۷۵	۵-۱۲-۲. آماده سازی سلولهای عامل
۷۵	۶-۱۲-۲. مجاور سازی سلولهای هدف و عامل به نسبتهای مختلف
۷۶	۷-۱۲-۲. رنگ آمیزی سلولهای هدف و عامل با رنگهای AXV-FICT و 7-AAD
۷۶	۱-۷-۱۲-۲. مواد و محلولهای لازم
۷۶	۲-۷-۱۲-۲. روش کار رنگ آمیزی سلولهای هدف و عامل
۷۷	۸-۱۲-۲. تنظیم دستگاه فلوسایتومتر و آنالیز نمونه ها
۷۷	۱-۸-۱۲-۲. تنظیم پروتکل جهت شناسایی سلولهای هدف و عامل
7-		۲-۸-۱۲-۲. تنظیم پروتکل جهت سنجش فعالیت سیتوتوکسی سیتها CTL ها با استفاده از
۷۸	ADD,AXV-FICT

- ۱۳-۲. راه اندازی تست ELISA جهت اندازه گیری γ -INF و IL-4 بعد از تحریک آنتی ژنیک... ۷۹
- ۱-۱۳-۲. کشت اولیه سلولهای طحالی و تحریک آنتی ژنیک ۷۹
- ۲-۱۳-۲. مراحل انجام تست ELISA به منظور اندازه گیری γ -INF و IL-4 ۸۰
- ۱-۲-۱۳-۲. محلولها و وسایل لازم ۸۰
- ۲-۲-۱۳-۲. مراحل انجام کار جهت آماده سازی پلیت الایزا ۸۱
- ۳-۲-۱۳-۲. روش کار تست الایزا ۸۲
- ۱۴-۲. گروهبندی موشهای C57BL/6 به گروههای مختلف ۸۳
- ۱۵-۲. آماده سازی ترکیبات مورد تزریق به حیوانات مورد مطالعه ۸۴
- ۱-۱۵-۲. آماده سازی پلاسمیدها ۸۴
- ۲-۱۵-۲. آماده سازی دندروزوم و مخلوط سازی با پلاسمیدها ۸۴
- ۱۶-۲. تزریق ترکیبات مورد آزمایش به حیوانات موجود در گروههای مورد مطالعه ۸۷
- ۱۷-۲. بررسی پاسخهای ایمنولوژیک در حیوانات مورد مطالعه ۸۷
- ۱۸-۲. آنالیز آماری ۸۸
- ۸۹ فصل سوم: نتایج.....
- ۱-۳. تکثیر پلاسمیدهای حاوی ژنهای مختلف و نتایج حاصل از غلظت سنجی محصولات پلاسمیدی استخراج شده در مقیاس انبوه ۹۰
- ۲-۳. نتیجه حاصل از کشت سلول Vero ۹۱
- ۳-۳. نتیجه حاصل از تکثیر HSV-1 سویه KOS در کشت سلولی Vero ۹۲
- ۴-۳. نتیجه حاصل از اندازه گیری تیتراژ HSV-1 سویه KOS به روش تعیین TCID50 ۹۲
- ۵-۳. نتیجه بهینه سازی تست پرولیفراسیون لنفوسیتی ۹۳
- ۶-۳. نتیجه بهینه سازی تست CTL assay به روش فلوسایتومتری ۹۵

- ۹۵ نتیجه حاصل از کشت سلول EL4 ۱-۶-۳
- ۹۶ نتیجه ارزیابی فعالیت سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی با روش فلوسایتومتری ۲-۶-۳
- ۹۳-۶-۳ نتیجه واکنش سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی موشهای کنترل مثبت و منفی با نسبتهای مختلف بر سلولهای هدف ۹۹
- ۱۰۰ نتیجه واکنش سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی در مراحل ابتدایی آپوتوزیس ۱-۳-۶-۳
- ۱۰۰ نتیجه واکنش سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی در مراحل انتهایی آپوتوزیس ۲-۳-۶-۳
- ۱۰۱ نتیجه واکنش سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی در حالت توتال آپوتوزیس ۳-۳-۶-۳
- ۱۰۲ نتیجه واکنش سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی در مراحل نکروزیس ۴-۳-۶-۳
- ۱۰۶ نتیجه اندازه گیری مقادیر $IL-4, INF-\gamma$ به روش الایزا در گروههای کنترل مثبت و منفی. ۷-۳
- ۱۰۷ نتایج بررسی پاسخهای ایمنی در تمام گروههای مورد مطالعه به روشهای مختلف ۸-۳
- ۱۰۷ نتایج تست پرولیفراسیون لنفوسیتی در تمام گروههای مورد مطالعه ۱-۸-۳
- ۱۰۹ نتایج تست CTL assay به روش فلوسایتومتری در تمام گروههای مورد مطالعه ۲-۸-۳
- ۱-۲-۸-۳ نتایج واکنش سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی موشهای مربوط به تمام گروههای مورد مطالعه، در مراحل ابتدایی آپوتوزیس ۱۰۹
- ۲-۲-۸-۳ نتایج واکنش سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی موشهای مربوط به تمام گروههای مورد مطالعه، در مراحل انتهایی آپوتوزیس و نکروزیس ۱۱۰
- ۳-۲-۸-۳ نتایج واکنش سیتوتوکسی سیت سلولهای طحالی موشهای مربوط به تمام گروههای مورد مطالعه، در حالت توتال آپوتوزیس ۱۱۲
- ۳-۸-۳ نتایج اندازه گیری مقدار $IL-4$ و $INF-\gamma$ تولید شده بدنبال تحریک آنتی ژنیک به روش الایزا در تمام گروههای مورد مطالعه ۱۱۴
- ۱۱۹ فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها ۱۱۹

۱-۴. بررسی خصوصیات ایمن زایی واکسن DNA کد کننده ژن gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ

یک..... ۱۲۰

۲-۴. بررسی استفاده از دندروزوم به همراه واکسن DNA، بعنوان عامل تسهیل کننده ترانسفکشن در

vivo..... ۱۲۲

۳-۴. بررسی استفاده از ژن کد کننده Bax به همراه واکسن DNA کد کننده gB ویروس هرپس

سیمپلکس تیپ یک به عنوان عامل القاء کننده آپوپتوزیس..... ۱۲۴

۱-۳-۴. بررسی تزریق توام واکسن DNA و ژن القاء کننده آپوپتوزیس به روش داخل پوستی .. ۱۲۸

۲-۳-۴. بررسی دوزهای مختلف ژن القاء کننده آپوپتوزیس به همراه واکسن DNA ۱۳۰

۴-۴. بررسی بکارگیری ژن bcl-xl بعنوان عامل القاء کننده آنتی آپوپتوزیس به همراه واکسن DNA

کد کننده gB ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک..... ۱۳۳

فهرست منابع..... ۱۴۰

چکیده لاتین..... ۱۵۶

فهرست جداول

- جدول ۱-۳. نتایج مربوط به ظهور CPE در روز سوم بعد از تلقیح ویروس به سلولهای Vero..... ۹۳
- جدول ۲-۳. میانگین نتایج آزمایش پرولیفراسیون لنفوسیتی به روش MTT در موشهای کنترل مثبت و منفی (تعداد ۵ موش) در حالات مختلف..... ۹۵
- جدول ۳-۳. میانگین در صد سیتوتوکسی سیتة سلولهای طحالی موشهای کنترل مثبت و منفی (تعداد ۵ موش) در مراحل ابتدای آپوتوزیس بر سلولهای هدف (EL4) آلوده شده با مقادیر مختلف ویروس (moi ۱۰، moi ۵)..... ۱۰۰
- جدول ۴-۳. میانگین در صد سیتوتوکسی سیتة سلولهای طحالی موشهای کنترل مثبت و منفی (تعداد ۵ موش) در مراحل انتهای آپوتوزیس و نکروزیس بر سلولهای هدف (EL4) آلوده شده با مقادیر مختلف ویروس (moi ۱۰، moi ۵)..... ۱۰۱
- جدول ۵-۳. میانگین در صد سیتوتوکسی سیتة سلولهای طحالی موشهای کنترل مثبت و منفی (تعداد ۵ موش) در حالت توتال آپوتوزیس بر سلولهای هدف (EL4) آلوده شده با مقادیر مختلف ویروس (moi ۱۰، moi ۵)..... ۱۰۲
- جدول ۶-۳. میانگین در صد سیتوتوکسی سیتة سلولهای طحالی موشهای کنترل مثبت و منفی (تعداد ۵ موش) در مراحل نکروزیس بر سلولهای هدف (EL4) آلوده شده با مقادیر مختلف ویروس (moi ۱۰، moi ۵)..... ۱۰۳
- جدول ۷-۳. میانگین میزان IL-4, INF- γ (بر حسب pg/ml) در مایع رویی کشت سلولهای طحالی موشهای کنترل مثبت و منفی (تعداد ۵ موش) بعد از تحریک با ویروس غیر فعال شده HSV-1.. ۱۰۶

- جدول ۳-۸. میانگین شاخص تحریک (SI) در آزمایش پرولیفراسیون لنفوسیتی به روش MTT مربوط به گروههای مختلف مورد مطالعه ۱۰۷
- جدول ۳-۹. میانگین در صد سلولهای هدف که در اثر واکنش سیتوتوکسی سیته ناشی از سلولهای طحالی در مرحله ابتدایی آپوپتوزیس قرار گرفته‌اند..... ۱۰۹
- جدول ۳-۱۰. میانگین درصد سلولهای هدف که در اثر واکنش سیتوتوکسی سیته ناشی از سلولهای طحالی در مرحله انتهای آپوپتوزیس و نکروزیس قرار گرفته‌اند..... ۱۱۱
- جدول ۳-۱۱. میانگین درصد سلولهای هدفی که در اثر واکنش سیتوتوکسی سیته ناشی از سلولهای طحالی، رفتار سلول آپوپتوز شده را نشان می‌دهند..... ۱۱۲
- جدول ۳-۱۲. میانگین مقادیر $INF-\gamma$ آزاد شده در مایع رویی کشت سلولهای طحالی موشهای مورد مطالعه در تمام گروهها، به دنبال تحریک آنتی ژنیک ۱۱۴
- جدول ۳-۱۳. میانگین نسبت $INF-\gamma/IL-4$ در گروه (KOS) HSV-1 و گروههایی که پلاسمید کد کننده gB را دریافت کرده اند..... ۱۱۸

فهرست شکلها

- شکل ۱-۱. مدل شماتیک همکاری بین سلولهای سیستم ایمنی بدنبال واکسیناسیون با واکسنهای DNA ۲۶
- شکل ۲-۱. مدل شماتیک پروتئینهای خانواده Bcl-2 ۳۶
- شکل ۳-۱. مدل شماتیک مسیرهای مختلف آپوپتوزیس ۳۸
- شکل ۴-۱. مدل شماتیک مکانیسم ارتقاء بخشی واکسنهای DNA بواسطه القاء آپوپتوزیس ۳۹
- شکل ۵-۱. مدل شماتیک مکانیسم ارتقاء بخشی واکسنهای DNA بواسطه القاء آنتی آپوپتوزیس .. ۴۱
- شکل ۱-۲. نقشه پلاسمید pcDNA3 ۴۶
- شکل ۱-۳. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات استخراج شده پلاسمیدی در مقیاس زیاد از چپ به راست مارکر DNA, pcDNA3-gB, pcDNA3-bax, pcDNA3-bcl-xl بر روی ژل آگارز ۱ درصد ۹۱
- شکل ۲-۳. تک لایه سلولی Vero ۹۲
- شکل ۳-۳. نتیجه حاصل از تکثیر HSV-1 سویه KOS در تک لایه سلولی Vero ۹۲
- شکل ۴-۳. دستجات کریستالی فورمازان حاصل از تست MTT ۹۴
- شکل ۵-۳. نمایی از سلول EL4 ۹۶

فهرست نمودارها

- نمودار ۱-۳. جداسازی کادر سلولهای هدف (R2) از سلولهای عامل (R1) بر اساس FSC ، SSC. ۹۷
- نمودار ۲-۳. ارزیابی وضعیت سلولهای هدف با استفاده از AXV-FITC/7-AAD ۹۸
- نمودار ۳-۳. واکنش سیتوتوکسی سیتو سلولهای طحالی موشهای کنترل منفی و مثبت بر سلولهای هدف ۹۹
- نمودار ۴-۳. میانگین شاخص تحریک (SI) در آزمایش پرولیفراسیون لنفوسیتی به روش MTT مربوط به گروههای مختلف مورد مطالعه ۱۰۸
- نمودار ۵-۳. میانگین در صد سلولهای هدف که در اثر واکنش سیتوتوکسی سیتو ناشی از سلولهای طحالی در مرحله ابتدایی آپوپتوزیس قرار گرفته اند ۱۱۰
- نمودار ۶-۳. میانگین درصد سلولهای هدف که در اثر واکنش سیتوتوکسی سیتو ناشی از سلولهای طحالی در مرحله انتهای آپوپتوزیس و نکروزیس قرار گرفته اند ۱۱۱
- نمودار ۷-۳. میانگین درصد سلولهای هدفی که در اثر واکنش سیتوتوکسی سیتو ناشی از سلولهای طحالی، رفتار سلول آپوپتوز شده را نشان می دهند ۱۱۳
- نمودار ۸-۳. میانگین مقادیر $INF-\gamma$ آزاد شده در مایع رویی کشت سلولهای طحالی موشهای مورد مطالعه در تمام گروهها، بدنبال تحریک آنتی ژنیک ۱۱۵
- نمودار ۹-۳. میانگین مقادیر $IL-4$ آزاد شده در مایع رویی کشت سلولهای طحالی موشهای مورد مطالعه در تمام گروهها، به بدنبال تحریک آنتی ژنیک ۱۱۶

فصل اول

مقدمه و مروری بر

مطالعات گذشته