بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از
رساله دکتری

آقای **عبدالرضا اسماعیل زاده** رشته **ایمنی شناسی پزشکی** رساله **دکتری** خود را با عنوان **« بررسی اثرات انتقال ژن IL-27 در مدل موش سینژنیک سرطان سینه،به عنوان یک کاندیدا در ژن درمانی سرطان سینه »** در تاریخ **۱۳۹۱/۷/۳۰** ارایه 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 معصومه ابتکار	
استاد راهنمای دوم	دکتر علیرضا بیگلری	
استاد مشاور	دکتر زهیر صراف	
استاد ناظر	دکتر احمد زواران حسینی	
استاد ناظر	دکتر پرویز کوخایی	
استاد ناظر	دکتر محمد وجگانی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر علی اکبر پورفتح اله	

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 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 تاریخ۸۷/۴/۱ 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 عبدالرضا اسماعیل زاده دانشجوی رشته ایمنی شناسی پزشکی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۵ 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

تاریخ ۹۱/۱۰/۱۸

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 پزشکی است که در سال ۱۳۹۱در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر معصومه ابتکار و دکتر علیرضا بیگلری** ، و مشاوره **دکتر زهیر صراف** 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 **عبدالرضا اسماعیل زاده** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی پزشکی** مقطع **دکتری تخصصی** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا ۹۱/۱۰/۱۸

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

بررسی اثرات انتقال ژن IL-27 در مدل موش سینژنیک سرطان سینه، به عنوان یک کاندیدا در ژن درمانی سرطان سینه

نگارش

عبدالرضا اسماعیل زاده

اساتید راهنما

دکتر معصومه ابتکار

دکتر علیرضا بیگلری

استاد مشاور

دکتر زهیر صراف

پاییز ۱۳۹۱

تقدیم به :

به همه انهایی که به من آموختند
اساتید معزز و گرامیم که تا ابد مدیون آنها هستم

و
پدر و مادرم که الفبای زندگی به من آموختند

به همسرصبور و فداکارم

به بزرگ فرزندانم کیمیا و کیارش که همچون فولاد ایستادند و خم به ابرو نیاوردند
و
بهانه ادامه حیات من هستند.

تشکر و قدردانی

اساتید راهنما

سر کار خانم دکتر معصومه ابتکار که با وقار تمام و با روی خوش راهنماییم کردند.

جناب آقای دکتر علیرضا بیگلری عالمانه و دوستانه راهگشایم بودند.

استاد مشاور

جناب آقای دکتر زهیر صراف که استادانه و مسئولانه در همه مواقع یاری ام کردند.

استاد ناظر

جناب آقای دکتر زواران که باارشادات خود در جریان رساله همراهی ام کردند.

اساتید گرامی جناب آقایان دکتر پورفتح الله و دکتر موذنی که از محضر شان بهره وافر بردم.

از کلیه مدیران ارشد و میانی ،کارشناسان و کارمندان دانشکده پزشکی که هریک به سهم خود در نیل به اهداف آموزشی و پژوهشی اینجانب مساعدت کردند. خصوصا جناب آقای موسویان مدیر محترم پژوهشی و جناب آقای سرمدی مدیر محترم آموزشی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از کارشناسان محترم گروه ایمونولوژی سرکار خانم محسنی و سرکار خانم ا سکافی که نهایت همکاری را در طی این دوره طولانی مدت با اینجانب انجام دادند.

از دوست خوبم جناب آقای دکتر مهدوی هیات علمی انستیتو پاستورکه در مراحل آخر تحقیق با در اختیار گذاشتن کیت های مصرفی در اتمام به موقع رساله یاری ام کردند.

از دوستان و همدوره های بسیار خوبم که همراهی ام کردند نهایت سپاس را دارم.

چکیده

مقدمه: سرطان پستان شایعترین سرطان در میان زنان ایران و جهان است که در سراسر جهان به سختی قابل درمان می باشد. بیش از چندین دهه است که پیشرفت های چشمگیری در زمینه ی ایمونوتراپی سرطان پستان و نیز ایمنوبیولوژی تومور حاصل شده است. همینطور مطالعات In vitro برای بررسی اثر سایتوکاین ها همراه با مدل های حیوانی اکیدا پیشنهاد شده و مزایای زیادی دارد. در میان اینترلوکین ها، IL-27 یک سایتوکاین با ویژگی های شاخص می باشد. IL-27 در کنار فعالیتش در القاء Th1، اعمال متنوعی از جمله فعالیت ضد توموری و نیز بعنوان پیش التهابی هم عمل میکند. در این تحقیق ما ژن IL-27 را به رده سلولی سرطان پستان منتقل کرده و پاسخهای ایمنی در برابر تومور ارزیابی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ما ژن IL-27 را در داخل پلاسمید p3xFLAG-CMV-9 به درون سلول های تومور پستان موشی 4T1 ترنسفکت کرده و توسط G418 سلول های ترانسفکت شده را شناسایی نموده ایم. بعد از تلقیح به مدل موشی سینژنیک، میزان تولید پروتئین IFN-gamma, IL-4, IL-27 و نیز گرانزیم B به روش الایزا اندازه گیری شد. میزان خواص آنتی پرولیفراتیو IL-27 بر روی سلول های سرطانی و میزان تکثیر لنفوسیتهای طحالی ارزیابی گردید.

یافته ها: نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که IL-27 توانست تکثیرسلول های 4T1 را به اندازه ی چشمگیری کاهش ($P<۰/۰۱$) داده و نیز میزان گرانزیم B ($P<۰/۰۲۸$) و IFN-γ ($P<۰/۰۱$) و تکثیر لنفوسیتهای طحالی را افزایش ($P<۰/۰۲۶$) دهد. به علاوه IL-27 به طور محسوسی ($P<۰/۰۱$) IL-4 را کاهش داد. همچنین اندازه تومور بطور معنی دار ($P<۰/۰۱$) کاهش پیدا کرد.

نتایج: نتایج حاصل نشان دهنده ی این واقعیت هستند که IL-27 اگزوژن توانایی لازم برای سرکوب نمودن سلول های سرطان پستان 4T1 و نیز کاهش رشد تومور به صورت In vivo را دارا می باشد. در واقع IL-27 توانست رشد تومور پستان را از طریق القاء سیستم ایمنی مهار کند. لذا IL-27 میتواند کاندیدا خوبی برای ژن درمانی سرطان پستان باشد.

کلمات کلیدی: IL-27، آنتی تومور، مدل سینژنیک، سرطان پستان، ژن درمانی

فهرست مطالب

فصل اول

مقدمه

عنوان صفحه

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. سرطان ۳

۱-۲-۱. مراحل بافت شناسی سرطان ۴

۱-۳. سرطان پستان ۵

۱-۳-۱. اپیدمیولوژی سرطان پستان درایران و جهان..... ۸

۱-۳-۲. سبب شناسی سرطان پستان..... ۸

۱-۳-۲-۱. عوامل ژنتیکی و اپی ژنتیک..... ۸

۱-۳-۲-۲. سن قاعدگی و یائسگی ۹

۱-۳-۲-۳. عوامل محیطی ۹

۱-۳-۳. سرطان پستان فامیلی ۹

۱-۴. ریز محیط سرطان ۱۰

۱-۵-۱. مراحل ایجاد تومور ۱۲

۱-۵-۱-۱. مرحله آغاز ۱۲

۱-۵-۱-۲. مرحله پیشروی ۱۲

۱-۵-۱-۳. مرحله رشد تصاعدی ۱۲

۱-۶-۱. انواع سرطان سینه ۱۳

۱-۶-۲. فاکتورهای مؤثر در تشخیص IDC ۱۳
۱-۷-۱. سرطان و سیستم ایمنی ۱۶
۱-۷-۲. تنظیم ایمونولوژیک سرطان ۱۷
۱-۷-۳. سلول‌های سیستم ایمنی ومراقبت ایمنی..... ۱۸
۱-۷-۴. سلول های T تنظیمی ۲۳
۱-۷-۴-۱. زیر گروه های سلول Treg ۲۳
۱-۸. سیتوکاین‌ها ۲۵
۱-۸-۱. خانواده اینترلوکین ۱۲، ساختار، گیرنده ها و عملکردآنها درایمنی، رشد و تکامل سلولی..... ۲۶
۱-۹. اثرسلول‌های سرطانی بر سیستم ایمنی ۳۱
۱-۹-۱. فرار سلول‌های توموری از سیستم ایمنی ۳۲
۱-۱۰. درمان سرطان سینه ۳۶
۱-۱۰-۱. جراحی ۳۶
۱-۱۰-۲. شیمی درمانی ۳۷
۱-۱۰-۳. هورمون درمانی ۳۷
۱-۱۰-۴. درمان‌های هدف‌دار ۳۸
۱-۱۰-۵. ایمونوتراپی سرطان ۳۸
۱-۱۰-۶. درمان های مکمل ۴۰
۱-۱۰-۷. ژن درمانی سرطان ۴۱
۱-۱۰-۷-۱. انواع مختلف حامل های انتقال ژن و خصوصیات آنها ۴۲

۱-۱۰-۷-۲. وکتورهای کلونینگ و بیانگر ۴۵

۱-۱۰-۷-۲-۱ .مراحل فرادستی ساخت یک وکتور ژنی سیتوکاین..... ۵۰

۱-۱۰-۷-۲-۲ وکتورهای یوکاریوتی و پروکاریوتی ۵۱

۱-۱۰-۷-۳ استراتژی واهداف ژن درمانی ۵۱

۱-۱۰-۸. ایمونوژنتیک و مدل موشی سینژنیک سرطان پستان ۵۲

فصل دوم

مرور منابع و اهداف مطالعه

۲-۱. مرور منابع ۵۵

۲-۲. هدف مطالعه ۵۷

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱. بخش ملکولی ۶۱

۳-۱-۱. کلونینگ در پروکاریوتها ۶۱

۳-۱-۲. تهیه باکتری مستعد..... ۶۳

۳-۱-۳. ترانسفورماسیون یا انتقال پلاسمید به باکتری مستعد E.Coli DH5α ۶۳

۳-۱-۳-۱. روش تهیه محیط کشت مایع LB..... ۶۳

۳-۱-۳-۲. روش تهیه محیط کشت جامد LB ۶۳

۳-۱-۳-۳. روش تهیه باکتری مستعد و انتقال پلاسمید به داخل باکتری ۶۴

۳-۱-۳-۴. ذخیره سازی باکتریهای حاوی پلاسمید ۶۴

۳-۱-۳-۵. انتقال پلاسمید به درون باکتری مستعد (ترانسفورمیشن) ۶۵

۳-۱-۳-۶. تهیه پلاسمید در مقیاس کم (mini-prep) ۶۷

۳-۱-۳-۷. تأئید پلاسمید حاوی ژن mIL-27 توسط آنزیم های محدودالاثر

و تعیین خلوص پلاسمید با روش اسپکتروسکوپی ۶۸

۳-۱-۳-۸. تهیه پلاسمید در حجم زیاد (Maxi Prep) پس از تأیید آن ۷۴

۳-۱-۴. کشت رده سلولی 4T1 ..... ۷۴

۳-۱-۵. تایید القاء تومور توسط رده سلولی4T1 در موش Balb/c ۷۴

۳-۱-۶. انجماد و نگهداری سلولهای 4T1 ..... ۷۵

۳-۱-۷. کلونینگ سلول های یوکاریوتیک: ترانسفکت کردن سلول های 4T1 ..... ۷۵

۳-۱-۸. نمونه گذاری روی ژل الکتروفورز ۷۵

۳-۲. آماده سازی پروتئین rIL-27 تخلیص شده ۷۶

۳-۳. ترانسفکت کردن رده ی سلولی توسط پلاسمید + mIL-27 و پلاسمیدp3xFLAG-CMV9

فاقد ژن با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ..... ۷۷

۳-۴. انتخاب سلول های 4T1 ترانسفکت شده دایمی توسط سولفات G418 ..... ۷۹

۳-۵. تأیید تولید MrIL-27 توسط لاین سلولی 4T1 به روش الایزا ۸۰

۳-۶. مواد و محلول های لازم برای کشت سلول و تزریق آن به حیوان ۸۲

۳-۶-۱. بافر فسفات سالین (PBS) ۸۲

۳-۶-۲. محلول محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ ..... ۸۲

۳-۶-۳. بافر لیز گلبول های قرمز ۸۳

۳-۶-۴. محلول رنگ آمیزی تریپان بلو ۸۳

۳-۷ . کشت و پاساژ رده ی سلولی 4T1 ..... ۸۴

۳-۷-۱. تشخیص آلودگی محیط کشت سلولی 4T1 به انواع میکوپلاسما ۸۵
۳-۸. تکنیک Bradford Assay ۸۷
۳-۹. نمونه گذاری روی ژل الکتروفورز برای تأیید بتا اکتین ۸۸
۳-۱۰. القاء تومور زیر جلدی و جداسازی سلولهای ایمنی از طحال موش ۸۹
۳-۱۰-۱. مواد و وسایل مورد نیاز برای القاء تومور زیر جلدی و جداسازی سلولها ۹۱
۳-۱۰-۲. دستگاه های مورد نیاز برای القاء تومور زیر جلدی و جداسازی سلولها ۹۱
۳-۱۱. شمارش سلولی و میزان حیات سلولها با استفاده از رنگ تریپان بلو ۹۲
۳-۱۲. بررسی الگوی سایتوکاینی لنفوسیتهای طحالی ۹۳
۳-۱۲-۱. مواد و لوازم مورد نیاز برای جداسازی و کشت سلول های طحالی ۹۳
۳-۱۲-۲. مواد و وسایل مورد نیاز برای بررسی میزان تولید سایتوکاین ها ۹۵
۳-۱۲-۲-۱. روش انداز ه گیری تولید IFN- γ ۹۶
۳-۱۲-۲-۲. روش اندازه گیری IL-4 ..... ۹۷
۳-۱۳. بررسی میزان تکثیر (پرولیفراسیون) سلولهای لنفوسیت طحالی ۹۷
۳-۱۴. اندازه گیری حجم تومور ها ۹۹
۳-۱۵. تهیه آنتی ژن توموری ۹۹
۳-۱۶. سنجش گرانزیم B موشی برای تعیین فعالیت سیتوتوکسیسیتی ۱۰۱
۳- ۱۶-۱. روش سنجش گرانزیم B ۱۰۲
۳- ۱۷. آنالیز آماری ۱۰۳

فصل چهارم

نتایج

۴-۱. نتایج کشت باکتری ۱۰۵

۴-۱-۱. نتایج کشت باکتری در محیط مایع ۱۰۵

۴-۱-۲. نتایج کشت باکتری در محیط جامد ۱۰۶

۴-۲. نتایج کلون کردن ژن اینترلوکین ۲۷ در پلاسمید p3xFLAG-CMV-9 ..... ۱۰۸

۴-۳. نتایج تأئید بیان ژن IL-27 ..... ۱۱۱

۴-۴. نتایج بررسی اثر IL-27 بر سلول های 4T1 ..... ۱۱۲

۴-۵. نتایج بررسی آلودگی مایکوپلاسماها ۱۱۵

۴-۶. نتایج مطالعه مدل حیوانی ۱۱۷

۴-۶-۱. نتایج سنجش اندازه ی تومور ۱۱۷

۴-۶-۲. نتایج سنجش میزان گرانزیم B ۱۱۸

۴-۶-۳. نتایج سنجش میزان اینترفرون گاما ۱۱۸

۴-۶-۴. نتایج سنجش میزان IL-4 ..... ۱۱۹

۴-۶-۵. نتایج سنجش میزان IL-27 ..... ۱۱۹

۴-۶-۶. نتایج سنجش اندیکس پرولیفراسیون سلولهای لنفوسیت طحالی ۱۲۱

فصل پنجم

بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها

۵-۱. درمان های نوین در سرطان پستان ۱۲۳

۵-۱-۱. ترنسفکشن رده ی سلولی 4T1 توسط IL-27 ..... ۱۲۳

۵-۱-۱-۱. اینترلوکین- ۲۷ ..... ۱۲۴
۵-۱-۲. تشخیص آلودگی خانواده ی مایکوپلاسما در کشت سلول ۱۲۴
۵-۱-۳. تعیین میزان IL-27 در سلول های 4T1..... ۱۲۵
۵-۲. بررسی خواص آنتی پرولیفراتیو IL-27 در In vitro ۱۲۶
۵-۳. رسپتور IL-27 ..... ۱۲۶
۵-۴. مکانیسم عمل IL-27 ..... ۱۲۷
۵-۵. جنبه های ایمنولوژیک سرطان پستان ۱۲۷
۵-۶. مروری بر خواص آنتی توموری IL-27 در تحقیقات گذشته ۱۲۸
۵-۶-۱. اثر اینترلوکین ۲۷ بر تولید اینترلوکین ۴ ..... ۱۲۹
۵-۶-۲. بررسی تأثیر IL-27 بر میزان IFN-gamma ۱۳۰
۵-۶-۳. اثرات غیر ایمونولوژیک IL-27 بر تومور ۱۳۱
۵-۶-۴. ارزیابی سیتوتوکسیسیتی IL-27 با استفاده از سنجش گرانزیم B ۱۳۳
۵-۶-۵. اثر آنتی پرولیفراتیو IL-27 بر روی رده ی سلولی 4T1 ..... ۱۳۴
۵-۶-۶. اثر IL-27 بر اندازه ی تومور ۱۳۴
۵-۶-۷. ایندکس تحریکی پرولیفراسیون سلولهای لنفوسیت طحالی ۱۳۵
۵-۷. نتیجه گیری ۱۳۶
۵-۸. توصیه و پیشنهادات ۱۳۶
منابع و مأخذ ۱۳۸
ضمائم..... ۱۶۱
چکیده انگلیسی ۱۷۶

فهرست جداول

جدول ۱-۱. نام گذاری TNM ۵

جدول ۱-۲. درجه بندی تومور براساس درگیری گره لنفی ۱۴

جدول ۱-۳. درجه بندی تومورها براساس اندازه ۱۵

۱ جدول -۴. درجه بندی بالینی تومور ۱۶

جدول ۱-۵. اثر مولکولی سلول‌های سرطانی بر سیستم ایمنی ۳۲

جدول ۱-۶. ویژگی ، مزایا و معایب انواع ناقلهای ژن ۳۴

جدول ۳-۱ محتوای ژنی وکتور بیانی p3xFLAG-CMV-9 و جایگاه های آنها ۷۲

جدول ۳- ۲. هضم آنزیمی دوتایی محصول کلونینگ با آنزیمهای برش دهنده ۷۳

جدول ۳-۳. مواد لازم برای تهیه بافر فسفات سالین ۸۲

جدول ۳-۴. لیست مواد سازنده ی محلول رنگ آمیزی تریپان بلو ۸۳

جدول ۳-۵. پروتکل PCR برای تشخیص آلودگی کشت سلول به انواع میکوپلاسما ۸۵

جدول ۳-۶ برنامه ماشین دماگردان ASTEGO-Japan ۸۶

جدول ۳-۷. توالی پرایمرهای اختصاصی بتااکتین موشی و محصول نهایی آن ۸۷

جدول ۳-۸. پروتکل RT-PCR ژن اکتین موش ۸۷

جدول ۳-۹. برنامه دستگاه RT-PCR برای تکثیر بتا اکتین موش ۸۸

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱ . منحنی رشد باکتری ۶۲

نمودار ۴-۱. میزان اینترلوکین ۲۷ موش در رده سلولی 4T1 ..... ۱۱۲

نمودار ۴-۲. پرولیفراسیون اثراینترلوکین۲۷ بر روی رده سلولی 4T1 ..... ۱۱۲

نمودار ۴-۳. نتایج کاهش اندازه تومور در دریافت کننده های ژن اینترلوکین ۲۷ ..... ۱۱۷

نمودار ۴-۴. میزان اینترفرون گاما در گروه دریافت کننده IL-27 در مقایسه با ۳ گروه دیگر..... ۱۱۸

نمودار ۴-۵. کاهش معنی دار میزان IL-4 در گروه دریافت کننده IL-27..... ۱۱۹

نمودار ۴-۶. سطح mIL-27 در گروه های چهار گانه ۱۲۰

نمودار ۴-۷. بررسی جز به جز گروهای ۴ گانه از نظر تمام سایتوکاینهای مورد بررسی ۱۲۰

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱. مرحله بندی سرطان پستان بر اساس معیار TNM ۷

شکل ۱-۲. ریز محیط سرطان ۱۱

شکل ۱-۳. نقش متناقض سلولهای ایمنی آداپتیو در التهاب حاد و مزمن ۱۸

شکل ۱-۴. مکانیسم های مراقبت ایمنی علیه سرطان ۲۲

شکل ۱-۵. زیر گروه های Treg ۲۴

شکل ۱-۶. سلول های تولید کننده IL-27 و سلول های دارای گیرنده برایIL-27 ..... ۲۷

شکل ۱-۷. برخی مکانیسم های مولکولی عملکرد IL-27 در القاء پاسخ های Th1 ..... ۲۸

شکل ۱-۸. برخی از سلول ها و مولکولهای دخیل در القاء خاصیت ضد سرطانی ۲۹

شکل ۱-۹. خصوصیات مولکولی فامیل سیتوکاین های IL-12 ..... ۲۹

شکل ۱-۱۰ خصوصیات بیوشیمیایی .IL-27R, IL-27 ..... ۲۹

شکل ۱-۱۱. تفاوت مکانیسمهای مولکولی القاء خواص ضد سرطانی در IL-12، IL-27 ..... ۳۰

شکل ۱-۱۲. تفاوت پاسخ های ایمنی القا شده بر علیه سرطان ۳۰

شکل ۱-۱۳. مکانیسم های گریز سلول های توموری از سیستم ایمنی ۳۵

شکل ۱-۱۴. اجزای مهم وکتور های کلونینگ ۴۵

شکل ۳-۱. خلاصه مطالعات آزمایشگاهی انجام شده (In vitro Study) ۶۰

شکل ۳-۲. (A) مراحل مختلف کشت خطی باکتری ۶۱

شکل ۳-۲. (B) نمونه ای از کشت خطی باکتری ۶۱

شکل ۳-۲. (C) مراحل مختلف کشت باکتری در محیط مایع ۶۲
شکل ۳-۲. (D) شکل شماتیک کشت باکتری در محیط مایع ۶۲
شکل ۳-۳. کشت باکتری در محیط مایع و کشت خطی در محیط جامد ۶۵
شکل ۳-۴. کشت باکتری حاوی پلاسمید با (الف) و بدون ژن اینترلوکین ۲۷ (ب) ۶۷
شکل ۳-۵. نتایج توالی کامل پلاسمید p3xFLAG-CMV-9 و اینترلوکین۲۷ موشی ۶۹
شکل ۳-۶. محل های اثر آنزیم های HindIII وXbaI ۷۳
شکل ۳-۷. پلاسمید p3XFLAG-CMV™-9 به همراه جایگاه های هضم آنزیمی ۷۷
شکل ۳-۸. خلاصه مطالعات در مدل حیوانی (Invivo Study) ۸۴
شکل ۳-۹ . ماشین دماگردان ASTEGO-Japan ۸۶
شکل ۳-۱۰. الف) تانک الکتروفورز و مولد آن. ب) رسوب رده ی سلولی 4T1 ..... ۸۹
شکل ۳-۱۱. مراحل القاء تومور و تزریق سلولهای ترانسفکت شده ۹۰
شکل ۳- ۱۲. مکانیسم عمل BrDu ۹۸
شکل ۴-۱. نتایج کشت باکتری در محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین ۱۰۵
شکل ۴-۲. نتایج کشت باکتری در محیط جامد LB فاقد آنتی بیوتیک ۱۰۶
شکل ۴- ۳. نتایج کشت باکتری در محیط جامد LB دارای پلاسمید خالی ۱۰۶
شکل ۴-۴. نتایج کشت باکتری در محیط جامد LB دارای پلاسمید واجد اینترلوکین ۱۰۷
شکل ۴-۵. کلونینگ پلاسمید فاقد ژن در باکتری DH5-Alfa ۱۰۷
شکل ۴-۶. توالی نوکلئوتیدی ناحیه ی کلونینگ .چندگانه در p3xFLAG-CMV-9 ..... ۱۰۸
شکل ۴-۷. نتایج الکتروفورز پلاسمید خالی و حاوی اینترلوکین موشی کلون شده ۱۰۹
شکل ۴-۸. نتایج تعیین توالی لینکر (Gly4Ser)3 ..... ۱۰۹
شکل ۴-۹. نتایج تعیین توالی لینکر (Gly4Ser)3 با ۴۵ نوکلئوتید به همراه ۲۷ -IL ۱۱۰

شکل ۴-۱۰. نتایج آزمایش الیزا اینترلوکین ۲۷ موشی بهمراه استانداردها ۱۱۱

شکل ۴-۱۱. اثر اینترلوکین۲۷ برروی رده سلولی 4T1..... ۱۱۳

شکل ۴-۱۲. توالی زیر واحد آلفا و بتا اینترلوکین۲۷ موشی بهمراه لینکر آن ۱۱۴

شکل ۴-۱۳. نتایج تشخیص میکوپلاسما و سایر گونه های آلوده کننده محیط کشت ۱۱۵

شکل ۴-۱۴. نتایج الکتروفورز پروتئین بتا اکتین موشی استخراج شده از 4T1 ..... ۱۱۶