بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای شهاب الدین سروی رشته انگل شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان: «ارزیابی ایمونولوژیکی پلاسمید حاوی ژن کدکننده EG95 ایزوله ایرانی اکینوکوکوس گرانولوزوس در موش Balb/C » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۴ ارائه کردند.

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 راهنما	دکتر عبدالحسین دلیمی اصل	
استاد مشاور	دکتر فاطمه غفاری فر	
استاد مشاور	دکتر زهره شریفی	
استاد ناظر	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکتر بهرام کاظمی	
استاد ناظر	دکتر نایبعلی احمدی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر جاوید 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 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 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 **شهاب الدین سروی** دانشجوی رشته **انگل شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۶** مقطع **دکتری** 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

۹۰/۱۰/۱۴

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 **انگل شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی اصل** ، مشاوره **سرکار خانم دکترفاطمه غفاری فر و سرکار خانم دکتر زهره شریفی** 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 **شهاب الدین سروی** دانشجوی رشته **انگل شناسی پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی شهاب الدین سروی

تاریخ و امضا

۹۰/۱۰/۱۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

ارزیابی ایمونولوژیکی پلاسمید حاوی ژن کد کننده EG95 ایزوله ایرانی اکینوکوکوس گرانولوزوس در موش BALB/c

نگارش

شهاب الدین سروی

استاد راهنما

دکتر عبدالحسین دلیمی اصل

اساتید مشاور

دکتر فاطمه غفاری فر

دکتر زهره شریفی

زمستان ۱۳۹۰

تقدیم به :

پدر و مادر عزیزم

به پاس تمامی زحمات و دعای خیرشان

همسر عزیزم

به پاس تحمل مشکلات و مشقات فراوان در طی دوران تحصیل اینجانب

تشکر و قدردانی

وظیفه خود می دانم تا از زحمات بی دریغ جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی اصل که زحمت راهنمایی این تحقیق را بر عهده داشتند و در تمامی مراحل آن مشوق من بوده اند صمیمانه سپاسگزاری نمایم. همچنین از اساتید محترم مشاور سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فرو سرکار خانم دکتر زهره شریفی که زحمت مشاوره این پژوهش را بر عهده داشتند، بخاطر مساعدت ها و راهنمایی های ارزنده شان قدردانی نمایم. از مدیر گروه محترم گروه انگل شناسی جناب آقای دکتر جاوید صدرایی بخاطر مساعدت ها و زحمات فراوان شان در طول تحصیل اینجانب، کمال تشکر و قدردانی را دارم. از داوران محترم جناب آقای دکتر کاظمی، جناب آقای دکتر نایبعلی احمدی، جناب آقای دکتر جاوید صدرایی و جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم که با وجود مشغله های فراوان، زحمت نظارت و داوری این تحقیق را بر عهده گرفتند، تشکر می نمایم.

در پایان از همکاری صمیمانه آقای دکتر مجید پیرستانی، دکتر راضی ناصری فرو دکتر محسن اربابی و تمامی دوستان و عزیزانی که مرا در انجام این تحقیق یاری رسانده و بدون هیچ چشمداشتی مرا راهنمایی نموده اند از صمیم قلب آرزوی سلامتی و توفیق روز افزون دارم.

چکیده

اکینوکوکوس گرانولوزوس Echinococcus granulosus سستود انگلی می باشد که باعث ایجاد بیماری کیست هیداتید در انسانها در سراسر دنیا می شود. ایران یکی از مناطق اندمیک عفونت در دنیا بوده، که این مسئله بیانگر اهمیت و حضور بیماری در این کشور می باشد. واکسیناسیون به عنوان یکی از راههای پیشگیری مورد استفاده قرار می گیرد و ژن کد کننده پروتئین EG95 می تواند به عنوان یک هدف مناسب جهت ساخت واکسن DNA برای پیشگیری از این بیماری باشد. هدف از انجام این پژوهش کلونینگ ژن کد کننده پروتئین EG95 در وکتور بیانی pcDNA3 و سپس استفاده از این پلاسمید نوترکیب به عنوان واکسن DNA در موش BALB/c و ارزیابی ایمونولوژیکی این واکسن نوترکیب در موش بود.

در این تحقیق پس از استخراجRNA Total از پروتواسکولکس انگل و تبدیل آن به cDNA، در طی واکنش RT-PCR ژن کد کننده پروتئین EG95 تکثیر شده و محصول PCR در pTZ57R/T کلون گردیده و سپس تعیین توالی شد. نتایج نشان داد که که قطعه ای ۴۹۲bpدر پلاسمید مذکور کلون شده و قطعه کلون شده ژن EG95 انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس است. سپس این ژن در pcDNA3 ساب کلون گردیده و بعد از ترانسفکت کردن این پلاسمید نویرکیب در سلول یوکاریوتیک(CHO) بیان این ژن به روش SDS-PAGE و Western blot تایید شد. در این مطالعه به منظور بررسی پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی ۹۰ موش Balb/c ماده In bred با پلاسمید حاوی این ژن ایمن سازی شدند . ایمونیزاسیون ۳ بار به فواصل ۳ هفته ای انجام شد . نتایج بدست آمده نشان داد که در ایمنی هومورال با اندازه گیری IgG Total و اندازه گیری ایزوتایپ IgG_{2a} و IgG1 اختلاف معنی دار را بین گروههای مورد و کنترل وجود ندارد($P\geq0.05$). اندازه گیری IFN-γ نشان دهنده مقادیر بالایی از این سایتوکائین بوده ولی اندازه گیری IL4 نشان دهنده مقدار پایین این سایتوکائین است. در بررسی میزان رشد کیست در بدن موشها مشاهده شد گروههایی از موشها که واکسن نوترکیب pcEG95 را همراه با دو ادجوانت pcIL-12 و MMT دریافت کرده بودند، تعداد و اندازه کیست در آنها کمتر از سایر گروهها بود.

با توجه به نتایج، واکسن DNA حاوی ژن EG95 قادر به ایجاد حفاظت کامل بر علیه تشکیل کیست هیداتید نمی باشد. همچنین یافته های این مطالعه نشان داد که استفاده از آدجوانت های pcIL-12 و MMT همراه با واکسن DNA حاوی ژن EG95 تغییر معنی داری در پاسخهای ایمنی سلولی ایجاد می کند.

کلمات کلیدی: اکینوکوکوس گرانولوزوس، EG95، پروتواسکولکس، واکسن DNA

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱
۱-۱: تاریخچه بیماری ۲
۱-۲: طبقه بندی انگل ۳
۱-۳: مورفولوژی انگل ۴
۱-۳-۱: الف ـ اکینوکوکوس گرانولوزوس *(Echinococcus granulosus)* ۴
۱-۳-۱-۱: چرخه زندگی ۵
۱-۳-۱-۲: تخم انگل: ۶
۱-۳-۱-۳: ساختمان کیست هیداتید (Hydatid cyst) ۷
۱-۳-۱-۴: مایع کیست هیداتید (Hydatid fluid) ۹
۱-۳-۲: اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس (*E. multilocularis*) ۱۰
۱-۳-۳: اکینوکوکوس ووژلی (*E. vogeli*) ۱۱
۱-۳-۴: اکینوکوکوس اولیگارتروس (*E. oligarthrus*) ۱۱
۱-۴: بیولوژی اکینوکوکوس ۱۲
۱-۵: بیماریزایی انگل (Pathogenesis) ۱۴
۱-۵-۱: در میزبان نهایی یا گوشتخواران ۱۴
۱-۵-۲: در میزبانان واسط ۱۴
۱-۵-۲-۱: دامها: ۱۴
۱-۵-۲-۲: انسان: ۱۴
۱-۵-۳: اندازه کیست ۱۷
۱-۵-۴: میزان رشد کیست ها ۱۷
۱-۵-۵: تشکیل پروتواسکولکسها ۱۷
۱-۵-۶: سرانجام کیست ها وتشکیل کیست های ثانویه ۱۸
۱-۶: اپیدمیولوژی ۱۸

۱-۶-۱: انتشار اکینوکوکوس گرنولوزوس در ایران ۲۱
۱-۶-۱-۱: آلودگی در انسان ۲۲
۱-۶-۱-۲: آلودگی در حیوانات ۲۲
۱-۶-۲: سیکل های بیولوژیکی انگل در ایران ۲۳
۱-۶-۳: انتشار جغرافیایی اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس ۲۴
۱-۶-۴: انتشار اکینوکوکوس ووژلی ۲۵
۱-۶-۵: انتشار اکینوکوکوس اولیگارتروس ۲۵
۱-۶-۶: نکات اپیدمیولوژیکی ۲۵
۱-۷: تشخیص انگل ۲۶
۱-۷-۱: در گوشتخواران : ۲۶
۱-۷-۲: در میزبان واسط انسان: ۲۷
۱-۷-۲-۱: تستهای روتین آزمایشگاهی ۲۷
۱-۷-۲-۲: تشخیص پارازیتولوژیک ۲۷
۱-۷-۲-۳: تست پوستی یا تست داخل جلدی کازونی (Casoni Intradermal Test) ۲۸
۱-۷-۲-۴: پرتونگاری ۲۹
۱-۷-۲-۵: پونکسیون اکتشافی کیست ۳۰
۱-۷-۲-۶: آزمایشات هیستوپاتولوژیک ۳۲
۱-۷-۲-۷: ائوزینوفیلی ۳۲
۱-۷-۲-۸: روشهای تشخیص ایمونولوژیک ۳۲
۱-۷-۲-۹: روش های تشخیص سلولی ۳۹
۱-۸: درمان هیداتیدوزیس ۳۹
۱-۸-۱: PAIR Theropy (Puncture-Aspiration-Injection-Reaspiration) ۴۰
۱-۹: کنترل و مبارزه ۴۱
۱-۹-۱: کنترل سگها ۴۱
۱-۹-۲: کنترل کشتار دام ۴۲
۱-۹-۳: مبارزه با تخم انگل در محیط خارج ۴۲
۱-۹-۴: آموزش بهداشت ۴۳
۱-۹-۵: واکسیناسیون ۴۳

۱-۱۰: آنتی ژنها و ایمونولوژی ۴۳
۱-۱۰-۱: آنتی ژنهای کیست هیداتید ۴۴
۱-۱۰-۲: شناسایی آنتی ژن ها ۴۵
۱-۱۰-۳: آنتی ژنهای اصلی مایع هیداتیک ۴۵
۱-۱۰-۴: طبقه بندی آنتی ژنهای اصلی مایع هیداتیک ۴۶
۱-۱۰-۵: آنتی ژن گروه خونی ۴۶
۱-۱۱: پاسخهای ایمنی به کیست هیداتید (Immunological responses to hydatid cyst) ۴۷
۱-۱۱-۱: تولید آنتی بادی در هیداتیدوزیس ۴۸
۱-۱۱-۲: ایمنی سلولی در هیداتیدوزیس: ۵۰
۱-۱۱-۲-۱: سایتوکینها ۵۰
۱-۱۱-۳:مکانیسمها و فاکتورهای دخیل درتمایز سلولهای امدادگر T1&2 و تعادل بین آنها: ۵۲
۱-۱۱-۴: نقش سایتوکینها در تنظیم ایمنی علیه عفونتهای انگلی: ۵۳
۱-۱۱-۵: نقش سایتوکینها در بیماری کیست هیداتیک ۵۴
۱-۱۱-۶: ایمنی کیست هیداتیک در میزبان واسط: ۵۷
۱-۱۱-۶-۱: مقاومت ذاتی و ایمنی اولیه ۵۷
۱-۱۱-۷: اتوایمنی و هیداتیدوز ۵۹
۱-۱۱-۸: درمان و فاکتورهای ایمونولوژیک ۶۰
۱-۱۲: مروری بر مطالعات گذشته ۶۱
۱-۱۲-۱: ادجوانت ها ۶۹
۱-۱۲-۱-۱: خواص آدجوانت ها ۶۹
فصل دوم: مواد و روشها ۷۲
۲-۱: جمع آوری نمونه: ۷۳
۲-۲: استخراج RNA: ۷۳
۲-۳: بررسی کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز ۷۵
۲-۳-۱: طرز تهیه محلول (Tris Acetate EDTA(TAE ۷۵
۲-۳-۲: طرز تهیه ژل آگاروز ۱/۵٪ درصد برای الکتروفورزRNA ۷۵
۲-۴: ساخت cDNA ۷۶
۲-۵: انجام RT-PCR بر روی cDNA ۷۷

۲-۶: استخراج DNA: ۷۸
۲-۶-۱: استخراج به روش فنل - کلروفرم..... ۷۸
۲-۶-۲: اندازه گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن..... ۷۹
۲-۶-۳: الکتروفورز DNA..... ۸۰
۲-۶-۴: انجام PCR بر روی DNA ۸۰
۲-۷: خالص سازی محصول RT-PCR: ۸۰
۲-۸: کلونینگ ژن EG95 در پلاسمید pTZ57R (T-Vector) ۸۲
۲-۹: اتصال قطعه DNA (DNA ligation) ۸۳
۲-۱۰: انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری (Transformation) ۸۳
۲-۱۰-۱: طرز تهیه محیط کشت باکتری..... ۸۴
۲-۱۰-۱-۱: محیط کشت مایع LB broth (Luria- Bertani): ۸۴
۲-۱۰-۱-۲: محیط کشت جامد LB Agar : ۸۴
۲-۱۰-۲: طرز تهیه باکتری مستعد (Competent Cell) به روش کلرید کلسیم ۸۴
۲-۱۰-۳: انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری(ترانسفورماسیون باکتری) ۸۵
۲-۱۱: روش های تاییدکننده کلونینگ قطعه EG95 در ناقل پلاسمیدی: ۸۷
۲-۱۱-۱: مقایسه پلاسمید های استخراج شده از کلنی های آبی و سفید..... ۸۷
۲-۱۱-۲: انجام Colony PCR با استفاده از کلنی های آبی و سفید به عنوان الگو:..... ۸۷
۲-۱۱-۳: برش آنزیمی DNA پلاسمیدی(Restriction mapping) ۸۸
۲-۱۱-۴: تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing)..... ۹۰
۲-۱۲: ساب کلونینگ قطعه EG95 در پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ..... ۹۱
۲-۱۲-۱: آماده سازی و استخراج پلاسمید pcDNA3 برای کلونینگ ژن هدف ۹۲
۲-۱۲-۲: برش پلاسمید نوترکیب pTZ-EG95 و پلاسمید بیانی pcDNA3 فاقد ژن هدف توسط آنزیم های EcoRI و XhoI و جداسازی قطعه EG95 ..... ۹۴
۲-۱۲-۳: اتصال قطعه EG95 به پلاسمید pcDNA3 ..... ۹۵
۲-۱۲-۴: انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری E.coli سویه TOP10 (ترانسفورم کردن در باکتری) ۹۶
۲-۱۳: روش های تاییدکننده کلونینگ قطعه ژنی EG95 در پلاسمید بیانیpcDNA3 ..... ۹۶
۲-۱۳-۱: روش Colony-PCR..... ۹۷
۲-۱۳-۲: مقایسه پلاسمید نوترکیب pcEG95 و پلاسمید pcDNA3 بعد از برش آنزیمی ۹۷

۲-۱۳-۳: تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing) ۹۷
۲-۱۴: بیان پلاسمید pcEG95 در سلول یوکاریوتیک ۹۷
۲-۱۴-۱: انتقال پلاسمید نوترکیب pcEG95 به درون سلول یوکاریوتیک (Transfection) ۹۸
۲-۱۴-۲: تعیین وزن ملکولی پروتئین ها با روش SDS-PAGE ۱۰۰
۲-۱۴-۳: وسترن بلات (Western blot) ۱۰۵
۲-۱۴-۴: تایید بیان ژن EG95 در سلول یوکاریوتیک توسط روش RT-PCR ۱۰۸
استخراج RNA ۱۰۹
۲-۱۴-۴-۱: تهیه cDNA از روی RNA ۱۱۰
۲-۱۴-۴-۲: PCR قطعه EG95 با استفاده از cDNA تهیه شده از مرحله قبل(RT-PCR) ۱۱۱
۲-۱۵: ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید نوترکیب pcEG95 درموش کوچک آزمایشگاهی ۱۱۱
۲-۱۵-۱: انتخاب حیوان آزمایشگاهی مناسب ۱۱۱
۲-۱۵-۲: گروه بندی موشها ۱۱۲
۲-۱۵-۳: ایمن سازی(Immunization) ۱۱۳
۲-۱۵-۳-۱: نحوه تزریق داخل عضلانی. ۱۱۴
۲-۱۵-۳-۲: نحوه آماده سازی نانو ادجوانت MMT: ۱۱۵
۲-۱۶: چالش با پروتواسکولکس انگل و بررسی میزان رشد کیست در بدن آنها ۱۱۶
۲-۱۷: بررسی ایمنی هومورال ۱۱۶
۲-۱۷-۱: آماده سازی آنتی ژن انگل ۱۱۶
۲-۱۷-۲: آماده سازی و استفاده از کیسه دیالیز ۱۱۷
۲-۱۷-۳: نحوه جمع آوری سرم موشها ۱۱۸
۲-۱۷-۴: چیکر بورد (Checker board) ۱۱۸
۲-۱۷-۵: آزمایش الایزا غیر مستقیم(Indirect ELISA) ۱۱۹
۲-۱۷-۶: اندازه گیری ساب تایپ آنتی بادی (Antibody Isotyping) ۱۲۰
۲-۱۸: بررسی ایمنی سلولی ۱۲۰
۲-۱۸-۱: روش استخراج لنفوسیت ها از طحال موش ها ۱۲۰
۲-۱۸-۲: روش کشت سلولهای لنفوسیت طحال موش برای سنجش سایتوکائین ها ۱۲۲
۲-۱۸-۳: سنجش سایتوکائین(cytokine assay) ۱۲۲
۲-۱۹: بررسی نتایج چالش موش ها با پروتواسکولکس انگل و بررسی تعداد و اندازه کیست در آنها ۱۲۶

۲-۲۰: ارزیابی آماری نتایج حاصل از آزمایش چالش با پروتواسکولکس انگل و ایمنی هومورال و سلولی ۱۲۶
فصل سوم: نتایج ۱۲۷
۳-۱: نتیجه استخراج RNA ۱۲۸
۳-۲: نتیجه استخراج DNA ۱۲۹
۳-۳: نتیجه انجام RT-PCR و PCR با استفاده از RNA و DNA استخراج شده از انگل ۱۲۹
۳-۴: نتیجه ترانسفورماسیون باکتریها با محصول واکنش اتصال pTZ57R/T و ژن EG95 ..... ۱۳۰
۳-۵: تایید کلونینگ ژن EG95 در وکتور کلونینگ pTZ57R/T ۱۳۱
۳-۶: نتیجه ترانسفورماسیون با محصول واکنش اتصال برای ساب کلونینگ ژن EG95 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ..... ۱۳۴
۳-۷: تایید کلونینگ ژن EG95 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ..... ۱۳۶
۳-۸: نتایج ترانسفکت پلاسمید نوترکیب pcEG95 درسلول یوکاریوت ۱۳۸
۳-۸-۱: نتایج RT-PCR با RNA استخراج شده از سلولهای ترانسفکت شده با pcEG95 ..... ۱۳۸
۳-۸-۲: نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین ها با روش SDS-PAGE ۱۳۹
۳-۸-۳: نتایج وسترن بلات (Western Blot) ۱۴۰
۳-۹: نتایج بررسی ایمنی هومورال ۱۴۱
۳-۹-۱: نتایج اندازه گیریIgG (IgG Total) ۱۴۱
۳-۹-۲: نتایج اندازه گیری ایزوتایپ های آنتی بادی ۱۴۴
۳-۹-۲-۱: اندازه گیری ایزوتایپ های آنتی بادی IgG2a ۱۴۴
۳-۹-۲-۲: اندازه گیری ایزوتایپ های آنتی بادی IgG1 ..... ۱۴۶
۳-۱۰: نتایج چالش با پروتواسکولکس انگل و بررسی تعداد و اندازه کیست در موش ها ۱۴۷
۳-۱۱: نتایج بررسی ایمنی سلولی ۱۴۹
۳-۱۱-۱:نتایج سنجش سایتوکائین ها ۱۴۹
فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات ۱۵۶
۴-۱: بحث و نتیجه گیری: ۱۵۷
۴-۲: پیشنهادات: ۱۶۵
فهرست منابع: ۱۶۶
چکیده انگلیسی: ۱۷۵

فهرست جداول

جدول ۱-۱: سیتوکین هایی که به عنوان آدجونت ژنتیکی همراه با واکسنهای DNA استفاده می شوند ۷۰

جدول ۱-۲: آدجونتهای ژنتیکی غیر از سیتوکین ها وآدجونتهای رایج ۷۱

جدول ۲-۱: مواد مورد نیاز برای ساخت cDNA ۷۷

جدول ۲-۲: مواد مورد نیاز برای اتصال قطعات ژن هدف در پلاسمید pTZ57R/T ۸۳

جدول۲-۳: مواد مورد نیاز برای انجام Colony PCR ۸۷

جدول۲-۴: مواد مورد نیاز برای برش آنزیمی پلاسمید pTZ-EG95 ..... ۹۰

جدول ۲-۵: مواد مورد نیاز برای برش پلاسمید نوترکیب pTZ-EG95 و پلاسمید بیانی pcDNA3 فاقد ژن هدف ۹۴

جدول ۲-۶: مواد مورد نیاز برای تهیه cDNA ۱۱۰

جدول ۲-۷: نحوه گروه بندی موشها بر اساس نوع ماده تزریقی و تعداد موشها در هر گروه ۱۱۳

جدول۳-۱: میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موشهای تحت مطالعه و مقایسه آنها در طی ۲ نوبت خونگیری . ۱۴۲

جدول۳-۲: مقایسه میانگین OD در آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG_{2a} در سرم موشهای تحت مطالعه ۱۴۵

جدول۳-۳: مقایسه میانگین OD در آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG1 در سرم موشهای تحت مطالعه ۱۴۶

جدول۳-۴: مقایسه گروههای مختلف موشها از نظر تعداد کیست موجود در بدن ۱۴۸

جدول۳-۵: مقایسه گروههای مختلف موشها از نظر اندازه کیست موجود در بدن ۱۴۹

جدول۳-۶: مقایسه میانگین مقدارγ-IFN و IL4 در گروههای مختلف پس از ۴۸ ساعت ۱۵۰

جدول۳-۷: مقایسه میانگین مقدارγ-IFN و IL4 در گروههای مختلف پس از ۷۲ ساعت ۱۵۳

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱: نمودار ستونی میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موشهای تحت مطالعه در نوبت اول خونگیری ۱۴۲

نمودار ۳-۲: نمودار ستونی میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موشهای تحت مطالعه در نوبت دوم خونگیری ۱۴۳

نمودار ۳-۳: نمودار ستونی میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موشهای تحت مطالعه در نوبت سوم خونگیری ۱۴۳

نمودار ۳-۴: نمودار ستونی میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موشهای تحت مطالعه در هر ۳ نوبت خونگیری ۱۴۴

نمودار۳-۵: نمودار ستونی میانگین OD در آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG2a ۱۴۵

نمودار۳-۶: نمودار ستونی میانگین OD در آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG1 ..... ۱۴۶

نمودار ۳-۷: نمودار ستونی میانگین IFN-γ و IL4 در گروههای مختلف پس از ۴۸ ساعت ۱۵۱

نمودار ۳-۸: نمودار ستونی میانگین IFN-γ و IL4 در گروههای مختلف پس از ۷۲ ساعت ۱۵۴

فهرست شکل‌ها

شکل۱-۱: شکل شماتیک یک DNA واکسن ۶۸

شکل۲-۱: نقشه ژنتیکی پلاسمید کلونینگ pTZ57R/T ۸۲

شکل ۲-۲: نقشه ژنتیکی پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ..... ۹۲

شکل ۲-۳: آناتومی ماهیچه های Quadriceps و Tibialis پای موش ۱۱۴

شکل۳-۱ نتیجه الکتروفورز محصول استخراج RNA بر روی ژل ۲٪ ۱۲۸

شکل۳-۲: نتیجه الکتروفورز محصول استخراج RNA بر روی ژل ۱٪ ۱۲۹

شکل۳-۳: الکتروفورز محصول RT-PCR و PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ۱۳۰

شکل۳-۴: تشکیل کلنی های سفید و آبی بر سطح محیط کشت LB Broth ۱۳۱

شکل۳-۵: تصویر باند های حاصل از Colony-PCR، ۱و ۳ مربوط به کلنی سفید (حاوی ژن EG95) و ۲ کلنی آبی (فاقد ژن) ۱۳۲

شکل۳-۶: هضم آنزیمی پلاسمید pTZ-EG95 ..... ۱۳۳

شکل۳-۷: توالی cDNA ژن کد کننده پروتئین EG95 در ایزوله ایرانی ا.گرانولوزوس و alignment (هم ردیفی) آن با سویه استاندارد ۱۳۴

شکل ۳-۸: تصویر برش آنزیم بر روی پلاسمیدها در کنار مارکر 1kb ۱۳۵

شکل ۳-۹: تصویر الکتروفورز پس از استخراج از ژل ژن EG95 و پلاسمید بیانی pcDNA3 در کنار مارکر 1kb ۱۳۶

شکل۳-۱۰: الکتروفورز محصول Colony PCR بکمک پلاسمید نوترکیب pcEG95 روی ژل آگاروز در کنار مارکر ۱۰۰bp ۱۳۷

شکل۳-۱۱: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pcEG95 در کنار مارکر 1kb ۱۳۸

شکل۳-۱۲: الکتروفورز محصول RT-PCR بکمک RNA استخراج شده از سلولهای CHO ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pcEG95 روی ژل آگاروز ۱/۵٪ در کنار مارکر 100bp ۱۳۹

شکل۳-۱۳: تعیین وزن مولکولی پروتئین EG95 در SDS-PAGE ۱۴۰

شکل۳-۱۴: نوارهای نیتروسلولز بدست آمده از روش وسترن بلات با پروتئین سلولهای CHO ترانسفکت شده و کنترل ۱۴۱

شکل۳-۱۵: تشکیل کیست های متعدد در بدن موشهای گروه کنترل ۱۴۷

شکل ۳-۱۶: تشکیل کیست های زیر ۱ میلی متر در بدن موشهای گروه pcEG95 + pcIL-12 ..... ۱۴۷

شکل ۳-۱۷: عدم تشکیل کیست در بدن برخی موشهای گروه pcEG95 + pcIL-12 + MMT ۱۴۸

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱: تاریخچه بیماری

هیداتیدوزیس از قدیمی ترین بیماریهای شناخته شده انسان است. این بیماری در اصل بیماری گوشتخواران مانند سگ ، گرگ و روباه بوده و علفخواران میزبان واسط اصلی آن هستند. انسان بعنوان میزبان واسط اتفاقی آن مطرح است. با توجه به یافته شدن آثار بیماری در اسکلت جانداران اولیه به نظر می رسد که قدمت بیماری به بیش از ۵۵ ـ۵۰ میلیون سال قبل بر می گردد [۱]

برای نخستین بار ردی (Redi) در سال ۱۶۸۴ تشخیص داد که این بیماری منشاء حیوانی دارد و چند سال بعد هارتمن (Hartman) کرم بالغ را در روده سگ یافت [۲]. در سال ۱۷۸۲، گوس، کرم نواری شکل و کوتاهی را که در مرحله بلوغ در سگ زندگی می کرد، تنیا اکینوکوکوس گرانولوزوس نامید. در سال ۱۸۰۱، ردولفی، انگل را اکینوکوکوس نامگذاری کرد و آن را به طور کامل توصیف نمود و کیست های ناشی از آن را کیست هیداتید نامید [۳]. اولین گزارش از کیست هیداتید انسان در مراجع پزشکی توسط برسمر (Bresmer) در سال ۱۸۲۱ به چاپ رسید [۴].

در سال ۱۸۵۵ توماس (Thomas) در استرالیا با خوراندن کیست خارج شده از انسان به سگ و تولید کرم بالغ ارتباط بین انسان و سگ در چرخه زندگی انگل را مشخص نمود و بدین ترتیب سیکل زندگی انگل در اواسط قرن ۱۹ کاملا روشن شد [۴]. در سال ۱۸۶۳ لوکارت (Loukart) گونه اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس را شناسایی کرد و دیزینگ (Desing) نیز اکینوکوکوس ـ ووژلی را شناسایی نمود. در همان سال رابین مقاله ای

مروری بر اکولوژی و انتشار گونه ای اکینوکوک را ارائه داد. بالاخره جنبه های کلینیکی بیماری در اوایل قرن ۲۰ روشن شد و تحقیقات وسیع در زمینه های پارازیتولوژیک ، ایمونولوژیک ، پاتولوژیک ، ژنتیک روی این بیماری آغاز گردید [۵-۶].

در ایران کیست هیداتید ایجاد شده به وسیله اکینوکوکوس گرانولوزوس اولین بار در سال ۱۳۳۵ هجری شمسی توسط مکاره چیان و جانبخش در سگ های ولگرد تهران شناخته شد و اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس برای اولین بار در سال ۱۳۴۸ توسط موبدی در روباه دشت مغان گزارش گردید [۳]

۱-۲: طبقه بندی انگل

طبق آخرین گزارشات انگل های جنس اکینو کوکوس به ترتیب زیر طبقه بندی شده اند:

شاخه (Phylum) ..... کرمهای پهن (Platyhelminth)

رده (Class) ..... کرمهای پهن نواری شکل (Cestoda)

زیر رده (Subclass) ..... کرمهای پهن نواری حقیقی (Eucestoda)

راسته (Order) ..... سیکلوفیلیده آ (Cyclophillidea)

خانواده (Family) ..... تنیده (Taeniidae)

جنس (Genus) ..... اکینوکوکوس (Echinococcus)

جنس اکینوکوکوس دارای گونه های (Species) زیادی است که تنها چهارگونه آن برای انسان حائز اهمیت هستند. این گونه ها عبارتند از :

۱ ـ اکینوکوکوس گرانولوزوس *E.granulosus* (Batsch. 1781)

۲ ـ مولتی لوکولاریس *E.multilocularis* (Leukart -1863)

۳ ـ ووژلی *E.vogeli* (Raush & Berstein – 1972)

۴ ـ اولیگارتروس *E.oligarthrus* (Diesing – 1863)