دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته علوم تشریح

عنوان

درمان مرکب ضایعات نخاعی از نوع کانتیوژن به وسیله سلول های استرومایی مغز استخوان ترانسفکت شده با ژن نوروتروفین ۳ و سلول های عصبی شبه گابارژیک

نگارش
شهرام دارابی

استاد راهنما
دکتر تقی طریحی

اساتید مشاور
دکتر مجید صادقی زاده
دکتر علیرضا عزیززاده دلشاد

۱۳۹۱

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای شهرام دارابی رشته **علوم تشریح** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **درمان مرکب ضایعات نخاعی از نوع contusion به وسیله سلولهای استرومایی مغز استخوان ترانسفکت شده با ژن نوروتروفین ۳ و سلولهای عصبی شبه گابا ارژیک** » در تاریخ **۱۳۹۱/۱۱/۱۴** 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 راهنما	دکتر تقی طریحی	
استاد مشاور	دکترمجید صادقی زاده	
استاد مشاور	دکترعلیرضا عزیز زاده دلشاد	
استاد ناظر	دکترمجتبی رضا زاده	
استاد ناظر	دکترمژده صالح نیا	
استاد ناظر	دکترمهرداد روغنی	
استاد ناظر	دکترعلیقلی سبحانی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترمنصوره موحدین	

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 انسآن ها 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 آن ها 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 **شهرام دارابی** دانشجوی رشته **علوم تشریحی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** 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 ».

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 **علوم تشریح** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر تقی طریحی**، مشاوره **جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده** و **جناب آقای دکتر علیرضا عزیززاده** دلشاد 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 **شهرام دارابی** دانشجوی رشته **علوم تشریحی** مقطع **دکترا** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به :

استاد ارجمند جناب آقای دکتر تقی طریحی که با برخورداری از دید علمی و پژوهشی وسیع، از انجام هیچ کمکی در انجام این تحقیق دریغ نکردند.

و

خانواده عزیزم

تشکر و قدردانی

زبان برای گفتن و قلم برای نوشتن کلامی را زیباتر از تشکر نمی‌شناسد که تشکر نهایت بندگی در برابر خالق و اوج تواضع در برابر مخلوق است. با خالصانه‌ترین مراتب تقدیر و تشکر از :

استاد ارجمند و عزیز جناب آقای دکتر تقی طریحی که برایم راهنمایی فرزانه و معلمی دلسوز بوده و همواره از رهنمودهای استادانه و حمایت‌های بی‌شائبه ایشان در مراحل مختلف انجام، تهیه و تنظیم این رساله بهره‌مند بودم.

اساتید محترم جناب آقای دکترمجید صادقی زاده و جناب آقای دکتر علیرضا عزیززاده دلشاد که از مساعدت ایشان در امر مشاوره این رساله برخوردار بوده‌ام.

استاد گرانقدر جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده که در طول مدت زمان تحصیل همیشه از راهنمایی های ایشان استفاده نمودم.

استاد بزرگوار سرکار خانم دکتر منصوره موحدین که الگوی بزرگواری و بزرگ منشی من در طول زندگی ام بوده و خواهند بود.

استاد بزرگوار سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا که با راهنمایی های بی‌دریغ و مساعدت همیشگی‌شان مرا در طول تحصیل یاری نمودند.

همکلاسی‌های عزیز و سایر عزیزانی که در دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا مرا یاری نموده اند.

این پایان نامه دکترای تخصصی در سال۱۳۹۱ با حمایت دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا بیمارستان خاتم الانبیاء تهران به طور مشترک اجرا شده است و حاصل از طرح تحقیقاتی مربوط به قرار داد دکتر تقی طریحی با مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا بیمارستان خاتم الانبیاء تهران است.

چکیده

مقدمه: سلول های استرومایی مغز استخوان منبع مناسبی برای ژن درمانی و سلول درمانی است. دراین مطالعه سلول های استرومایی مغز استخوان به نوروسفر و سپس سلول های عصبی شبه گابارژیکی تبدیل شدند. همچنین سلول های استرومایی مغز استخوان به وسیله ژن NT3 ترانسفکت شدند. سلول های استرومایی مغز استخوان ترانسفکت شده با ژن NT3 و سلول های شبه گابارژیک در نخاع موش صحرائی مدل آسیب نخاعی، به عنوان استراتژی جدید درمان ضایعات نخاعی پیوند شدند.

مواد و روش ها: سلول های استرومایی مغز استخوان از موش صحرائی جداشده و در محیط کشت DMEM/F12 حاویEGF،B27 وbFGF قرار گرفت تا نوروسفر ایجاد شود. سپس سلول های بنیادین عصبی حاصل از نوروسفر جهت ایجاد سلول های عصبی شبه گابارژیک به وسیله Retinoic acid، creatine وCNTF تحت القا قرار گرفتند. سلول های استرومایی مغز استخوان، سلول های بنیادین عصبی و سلول های شبه گابارژیک به وسیله مارکرهای اختصاصی ارزیابی شدند. از سوی دیگر سلول های استرومایی مغز استخوان به وسیله ژن NT-3 ترانسفکت شدند. سپس سلول های استرومایی مغز استخوان ترانسفکت شده با ژن NT-3 و سلول های شبه گابارژیک به درون نخاع موش صحرائی آسیب دیده پیوند شدند. در تمام گروه ها تست رفتاری BBB و EMG قبل و بعد از آسیب نخاعی تا هفته دوازدهم صورت گرفت و در پایان نخاع جهت مطالعات بافتی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در بررسی به وسیله RT-PCR ژنهای Neuro D1، GAD1، GAD2، VGAT و SOX2 در سلول های شبه گابارژیک بیان شدند در حالیکه در سلول های استرومایی مغز استخوان فقط Oct4 و fibronectin بیان گردید. در طی روند القا افزایش بیان گابا مشاهده گردید. ترانسفکشن سلول های استرومایی مغز استخوان با ژن NT-3، نشان دهنده افزایش ۲ برابری در بیانNT3 در سلول های ترانسفکت شده بود. پس ازپیوند سلول های استرومایی مغز استخوان ترانسفکت شده با ژنNT3 به همراه سلول های شبه گابارژیک در موش های صحرائی ضایعه دیده، اندازه کیست در نخاع کوچک تر و عملکرد حرکتی و تست BBB، بهبودی بیشتری در گروه های درمانی مرکب نسبت به گروه های درمانی دیگر نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که درمان مرکب نخاع آسیب دیده با سلول های شبه گابارژیک به همراه سلول های استرومایی مغزاستخوان ترانسفکت شده با ژن NT3 نتایج بهتری نسبت به سایر گروه های درمانی داشتند. بنابراین استفاده از این سلول ها می تواند استراتژی امیدوارکننده ای برای درمان آسیب نخاعی باشد.

کلید واژگان: سلول های استرومایی مغز استخوان، نورون های گابارژیک، نوروتروفین ۳، آسیب نخاعی، ساب کلونینگ.

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته..... ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. اپیدمیولوژی آسیب نخاعی ۲

۱-۳. درمان مرکب ۵

۱-۴. اهداف ۷

۱-۴-۱. هدف اصلی ۷

۱-۴-۲. اهداف فرعی ۷

۱-۵. تاریخچه و ضرورت انجام تحقیق ۸

۱-۵-۱. پاتوفیزیولوژی آسیب نخاعی حاد ۸

۱-۵-۱-۱. آسیب اولیه ۸

۱-۵-۱-۲. آسیب ثانویه ۸

۱-۵-۲. پیشگیری از آسیب نخاعی ۱۰

۱-۵-۳. درمان آسیب نخاعی ۱۰

۱-۵-۳-۱. محافظت نورونی ۱۰

۱-۵-۳-۲. ترمیم با استفاده از عوامل دارویی ۱۲

۱-۵-۳-۳. ترمیم با استفاده از سلول ۱۲

۱-۵-۴. مکانیسم های موثر در بهبود عملکرد عصبی به وسیله سلول های مزانشیمی ۱۴

۱-۵-۴-۱. تمایز سلول های BMSCs ۱۴

۱-۵-۴-۲. ادغام سلولی ۱۶

۱-۵-۴-۳. ترشح فاکتورهای رشد به وسیله BMSCs ۱۶

۱-۵-۵. سلول های گابارژیک ۱۸

۱-۵-۵-۱. تولید گابا ۱۹
۱-۵-۵-۲. اثر گابا بر مهاجرت سلولی ۲۰
۱-۵-۵-۳. اثرات گابا بر رشد زوائد عصبی ۲۰
۱-۵-۵-۴. تنظیم عملکرد سلول های گابارژیک ۲۰
۱-۵-۶. کریاتین ۲۵
۱-۵-۷. CNTF ۲۶
۱-۵-۸. NT3 ..... ۲۶
۱-۵-۹. ژن درمانی ۲۸
۱-۵-۱۰. استفاده از وکتورهای غیرویروسی برای ترانسفکشن ۲۹
۱-۵-۱۱. بررسی عملکرد در سلول های عصبی به وسیله FM1-43 ..... ۳۱
۱-۵-۱۲. مدل های ضایعه نخاعی ۳۲
۱-۵-۱۳. آزمون رفتاری BBB test ۳۳
۱-۵-۱۴. رفلکس H ۳۴
۱-۵-۱۴-۱. نحوه به دست آوردن رفلکس H ۳۵
۱-۵-۱۴-۲. نحوه به دست آوردن موج M ۳۶
۱-۵-۱۴-۳. نسبت H_{max}/M_{max} ۳۶
فصل دوم: مواد و روشها ۳۷
۲-۱. آماده سازی سلول ها جهت سلول درمانی ۳۸
۲-۱-۱. جداسازی وآماده سازی سلول های BMSCs ۳۸
۲-۱-۲. بررسی تمایز مزودرمی در سلول های BMSCs ۳۹
۲-۱-۲-۱. تمایز به چربی ۳۹
۲-۱-۲-۲. تمایز به استخوان ۳۹
۲-۱-۳. بررسی زنده بودن سلول ها ۳۹

۲-۱-۴. ارزیابی ایمنوسیتوشیمی سلول های BMSCs ۴۰
۲-۱-۵. مراحل تمایز سلول ها و بررسی ایمونوسیتوشیمی ۴۲
۲-۱-۶. روش ایجاد نوروسفر و بررسی ایمونوسیتوشیمی ۴۲
۲-۱-۷. روش القا سلول های شبه گابارژیک از نوروسفر و بررسی ایمونوسیتوشیمی ۴۳
۲-۱-۸. آنالیز آماری ۴۴
۲-۱-۹. بررسی وزیکول های سیناپسی در نورون های شبه گابارژیکی ۴۴
۲-۱-۱۰. بررسی بیان ژن به وسیله واکنش پلیمراز معکوس(RT-PCR) ۴۷
۲-۱-۱۰-۱. استخراج RNA ۴۸
۲-۱-۱۰-۲. حذف آلودگی احتمالی با DNA ۵۰
۲-۱-۱۰-۳. واکنش پلی مراز معکوس ۵۱
۲-۱-۱۰-۴. انجام PCR بر روی cDNA تهیه شده ۵۲
۲-۱-۱۰-۵. بررسی DNA استخراج شده در ژل آگاروز ۵۳
۲-۲. ساب کلونینگ و ترانسفکشن سلول ها جهت ژن درمانی ۵۵
۲-۲-۱. وکتور pSecTag2/Hygro ۵۵
۲-۲-۲. وکتور pExpress1 ..... ۵۶
۲-۲-۳. مستعد کردن باکتری ۵۷
۲-۲-۴. انتقال پلاسمیدهای pSecTag2/Hygro و pExpress1 به درون باکتری ۵۹
۲-۲-۵. استخراج پلاسمیدهای pSecTag2/Hygro و pExpress1 ..... ۶۰
۲-۲-۶. انجام Sequencing برای پلاسمید pExpress1 ..... ۶۲
۲-۲-۷. نگهداری باکتری ترانسفورم شده ۶۳
۲-۲-۸. تکثیر NT3 با استفاده از PCR و طراحی پرایمر ۶۳
۲-۲-۹. تایید برداشت با انجام PCR ۶۳
۲-۲-۱۰. خالص سازی محصول PCR ۶۴

۲-۲-۱۱. هضم آنزیمی محصول PCR خالص شده ۶۵
۲-۲-۱۲. تخلیص محصول PCR هضم شده آنزیمی ۶۵
۲-۲-۱۳. هضم آنزیمی وکتورpSecTag2/HygroB ۶۵
۲-۲-۱۴. فرایند اتصال توسط آنزیم لیگاز ۶۶
۲-۲-۱۵. ترانسفورم کردن باکتری DH5α مستعد با محصول الحاق ۶۷
۲-۲-۱۶. Colony-PCR ۶۷
۲-۲-۱۷. استخراج پلاسمید و ارزیابی کمی میزان پلاسمید ۶۸
۲-۲-۱۸. تأیید وجود قطعه در باکتریهای ترانسفورم شده ۶۸
۲-۲-۱۹. انجام هضم آنزیمی برای پلاسمید pSecTag2/HygroB-NT3 ..... ۶۸
۲-۲-۲۰. انجام PCR برای پلاسمید pSecTag2/HygroB-NT3 ..... ۶۹
۲-۲-۲۱. انجام Sequencing برای پلاسمید pSecTag2/HygroB-NT3 ..... ۶۹
۲-۲-۲۲. تهیه وکتور pEGFP-N1 ..... ۷۰
۲-۲-۲۳. انتقال ژن ها به سلول های BMSCs و بررسی تولید پروتئین نوترکیب ۷۱
۲-۲-۲۴. تعیین غلظت مناسب آنتی بیوتیک برای پایدار کردن سلول ها ۷۲
۲-۲-۲۵. مواد و وسایل لازم ترانسفکشن ۷۲
۲-۲-۲۶. بررسی بیان ژن NT3 در سلولهای ترانسفکت شده بوسیله RT-PCR ۷۴
۲-۲-۲۷. استخراج پروتئین از سلول ها ۷۴
۲-۲-۲۸. الکتروفورز پروتئین ها در ژل پلی آکریل‌آمید به وسیله SDS ۷۵
۲-۲-۲۹. روش تهیه محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای SDS-PAGE ۷۶
۲-۲-۳۰. رنگ آمیزی ژل پلی‌آکریل آمید با نیترات نقره ۷۹
۲-۲-۳۱. وسترن بلاتینگ بر روی سلول های ترانسفکت شده ۸۰
۲-۲-۳۲. تست ELISA برای مقایسه میزان پروتئین NT3 ..... ۸۳
۲-۳. تهیه موش صحرایی بالغ و گروه‌بندی In vivo ۸۵

۲-۳-۱. روش انجام جراحی و ایجاد مدل آسیب نخاعی در حیوانات ۸۶
۲-۳-۲. مراقبت از حیوان بعد از جراحی و ایجاد مدل ضایعه نخاعی ۸۷
۲-۳-۳. بررسی حرکتی بر اساس تست BBB ۸۷
۲-۳-۳-۱. نحوه انجام بررسی حرکتی ۸۸
۲-۳-۳-۲. معیارهای بررسی حرکتی ۸۸
۲-۳-۴. الکترو میوگرافی ۹۱
۲-۳-۵. نشان دار کردن سلول ها ۹۱
۲-۳-۶. آماده کردن سلول ها و پیوند آن ها ۹۲
۲-۳-۷. نمونه برداری از نخاع ۹۲
۲-۳-۸. مراحل آماده سازی نمونه ۹۳
۲-۳-۹. ردیابی و شمارش سلول های نشان دار در نخاع ۹۵
۲-۳-۱۰. تعیین تمایز سلول های نشان دار شده به سلول های گابارژیک ۹۵
۲-۳-۱۱. تجزیه تحلیل آماری ۹۷
فصل سوم : نتایج ۹۸
۳-۱. تمایز سلولهای BMSCs به GLNs جهت سلول درمانی ۹۹
۳-۱-۱. جدا سازی و کشت سلول های BMSCs ۹۹
۳-۱-۲. نتایج بررسی منشا مزودرمی سلول های BMSCs ۱۰۰
۳-۱-۳. تولید نوروسفر از سلول های BMSCs ۱۰۲
۳-۱-۴. نتایج بررسی ایمنوسیتوشیمی نوروسفرها ۱۰۳
۳-۱-۵. نتایج بررسی تمایز در مرحله القا به روش ایمونوسیتوشیمی ۱۰۴
۳-۱-۶. نتایج بررسی آنتی بادی های مختلف در مرحله تمایز با روش ایمونوسیتوشیمی ۱۰۵
۳-۱-۷. بررسی تمایز با روش ایمونوسیتوشیمی ۱۰۸
۳-۱-۸. نتایج تعیین میزان حیات سلول ها با تریپان بلو ۱۱۰

۳-۱-۹. نتایج بررسی سلول های BMSCs با روش RT-PCR ۱۱۱
۳-۱-۱۰. نتایج بررسی سلول های تمایز یافته GLNs با روش RT-PCR ۱۱۲
۳-۱-۱۱. بررسی سلول های تمایز یافته GLNs با روشRealtime-PCR ۱۱۳
۳-۱-۱۲. نتایج بررسی عملکرد سلول های تمایز یافته GLNs با FM1-43 ..... ۱۱۴
۳-۲. نتایج ترانسفکت کردن سلول های BMSCs جهت ژن درمانی ۱۱۶
۳-۲-۱. نتایج حاصل از تکثیر وکتورpExpress1 ..... ۱۱۶
۳-۲-۲. نتایج ایجاد انتهای چسبان ۱۱۷
۳-۲-۳. نتیجه Clony-PCR بر روی وکتور نوترکیب pSecTag2/HygroB/NT3 ..... ۱۱۸
۳-۲-۴. تایید وجود ژن NT3 بر روی وکتور نوترکیب pSecTag2/HygroB/NT3 ..... ۱۱۹
۳-۲-۵. نتایج ترانسفکشن سلول های BMSCs با وکتور pSecTag2/HygroB-NT3 ..... ۱۲۱
۳-۲-۵-۱. نتایج RT-PCR بر روی سلول های ترانسفکت شده ۱۲۲
۳-۲-۵-۲. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات بر روی سلول های ترانسفکت شده ۱۲۳
۳-۲-۵-۳. نتایج آزمون Elisa برای بررسی میزان بیان پروتئینNT3 ..... ۱۲۵
۳-۲-۶. نشان دار کردن سلول ها با Hoechst و BrdU در محیط کشت ۱۲۶
۳-۳. یافته های In vivo ۱۲۷
۳-۳-۱. تست رفتاری ۱۲۷
۳-۳-۲. نتایج حاصل از EMG ۱۲۹
۳-۳-۳. نتایج بررسی بافت نخاع به وسیله رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین ۱۳۲
۳-۳-۴. نتایج بررسی اندازه حفره در نخاع ۱۳۴
۳-۳-۵. ردیابی سلول های تزریق شده ۱۳۵
۳-۳-۶. نتایج بررسی تمایز در سلول های تزریق شده ۱۳۷
فصل چهارم : بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادها ۱۳۹
۴-۱. تمایز سلول های BMSCs به سمت سلول های شبه گابارژیک ۱۴۰

۴-۲. سلول های BMSCs ترانسفکت شده با ژن NT3 ..... ۱۴۷
۴-۳. پیوند سلول های GLNs و BMSCs ترانسفکت شده با ژن NT3 به درون ضایعه نخاعی ۱۴۹
۴-۴. نتیجه‌گیری ۱۵۵
۴-۵. پیشنهادها ۱۵۵
فهرست منابع ۱۵۶
چکیده انگلیسی ۱۷۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱. مراحل تمایز که طی آن سلول های BMSCs پاساژ سوم توسط القا کننده‌های مختلف به نوروسفر و سپس به سلول های شبه گابارژیک(GLNs) تمایز می یابند. ۴۳
جدول ۲-۲. پرایمرهای Forward (F) و Reverse (R) ژن های استفاده شده در RT-PCR..... ۴۸
جدول ۲-۲. پرایمرجهت RT-PCR بر روی سلول های ترانسفکت شده ۷۴

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱. دیاگرام مکانیسم کنترل گابا پس از آسیب نخاعی. ۲۲

شکل ۲-۱. وکتور pSecTag2/Hygro (شرکت invitrogen با شماره V910-20). ۵۶

شکل ۲-۲. وکتور pExpress1 (شرکت Open biosystem با شماره MRN1768-9510296) ۵۷

شکل ۲-۳. وکتور pEGFP-N1 (شرکت CLONTE CH Laboratories, Inc با شماره Ca talog#6085-1) ۷۱

شکل ۳-۱. نمای ظاهری سلول های BMSCs. ۹۹

شکل ۳-۲. تصاویر مشخصات سلول های BMSCs. ۱۰۱

شکل ۳-۳. تصاویر مراحل ایجاد نوروسفر از سلول های BMSCs. ۱۰۲

شکل ۳-۴. تصاویر ایمنوسیتوشیمی نوروسفرها. ۱۰۳

شکل ۳-۵. بررسی میزان بیان آنتی بادی گابا به وسیله عوامل القایی متفاوت در روزهای اول تا پنجم القا. ۱۰۵

شکل ۳-۶. درصد واکنش سلول ها به آنتی بادی های مختلف در طی مرحله القا. ۱۰۸

شکل ۳-۷. تصاویر مشخصات ایمنوسیتوشیمیایی سلول ها. ۱۰۹

شکل ۳-۸. viability test سلول ها در روزهای مختلف روند تمایز. ۱۱۱

شکل ۳-۹. الکتروفوروگرام سلولهای BMSCs و GLNs. ۱۱۲

شکل ۳-۱۰. بررسی کمی ژن های GAD2, GAD1, VGAT با روش Real Time PCR. ۱۱۴

شکل ۳-۱۱. تصاویر بررسی عملکرد سلول های تمایز یافته GLNs با رنگ آمیزیFM1-43. ۱۱۵

شکل ۳-۱۲. الکتروفوروگرام PCR بر روی وکتورpExpress1 برای جداسازی ژن NT3. ۱۱۶

شکل ۳-۱۳. الکتروفوروگرام Double Digestion بر روی وکتور pSecTag2/HygroB و ژن NT3. ۱۱۷

شکل ۳-۱۴. الکتروفوروگرام از محصولات حاصل از Clony-PCR. ۱۱۸

شکل ۳-۱۵. تایید وجود ژن NT3 بر روی وکتور نوترکیب pSecTag2/HygroB/NT3. ۱۲۰

شکل ۳-۱۶. سلول های BMSCs پس از ترانسفکشن. ۱۲۲
شکل ۳-۱۷. الکتروفوروگرام RT-PCR برای بررسی ترانسفکشن. ۱۲۳
شکل ۳-۱۸. آزمون های SDS-PAGE و وسترن بلات برای بررسی ترانسفکشن. ۱۲۴
شکل ۳-۱۹. نتایج آزمونElisa برای بررسی میزان بیان پروتئین NT3. ..... ۱۲۵
شکل ۳-۲۰. تصاویر نشان دار کردن سلول ها قبل از تزریق به وسیله Hoechst وBrdU. ۱۲۶
شکل ۳-۲۱. نمودار تست BBB در گروه های مختلف. ۱۲۸
شکل ۳-۲۲. منحنی های رفلکس H و M. ۱۲۹
شکل ۳-۲۳. نمودار تغییرات رفلکس Hmax/Mmax در گروه های مختلف. ۱۳۱
شکل ۳-۲۴. تصاویر رنگ امیزی هماتوکسیلین و ائوزین از نخاع در گروه های مختلف. ۱۳۳
شکل ۳-۲۵. مقایسه اندازه حفره در نخاع در گروه های مختلف. ۱۳۴
شکل ۳-۲۶. ردیابی سلول های پیوندی نشان دار شده با Hoechst و BrdU در گروه E3 را نشان می دهد. ۱۳۶
شکل ۳-۲۷. ایمونوهیستوشیمی در منطقه مرکزی نخاع در گروه E2 را نشان می دهد. ۱۳۸

فصل اول

مقدمه و
مروري بر مطالعات
گذشته

۱-۱. مقدمه

ضایعه نخاعی باعث آسیب حسی، حرکتی، ایجاد دردهای عصبی، اسپاستیسیتی، آسیب مسیرهای تنفسی، ادراری و سایر عوارض فیزیولوژیکی می شود. پس از آسیب نخاع در واقع فقط حدود ۲۱/۶٪ بیماران فعالیت عادی خود را دوباره باز می یابند.

۱-۲. اپیدمیولوژی آسیب نخاعی

میزان آسیب نخاعی در کشورها متفاوت است. بیشترین دلیل آسیب نخاعی در ۸۰٪ موارد مربوط به تصادفات، افتادن از ارتفاع و صدمات ورزشی می باشد. علت ۲۰٪ دیگر آسیب به نخاع بیماری های نخاعی مانند آمیوتروفیک لترال اسلکروزیس، التهاب نخاع، عفونت ها، ایسکمی، خونریزی های اطراف نخاع، تومورهای بدخیم و ... است. شیوع آسیب نخاعی به دلیل صدمات در ایالات متحده آمریکا حدود ۲۵۰ هزار نفر می باشد که هر سال یازده هزار مورد جدید اضافه می شود [۱]. در فرانسه گزارش شده که هر ساله ۱۵۰۰ مورد جدید ایجاد می شود. اغلب بیماران بین ۱۶ تا ۳۰ سال سن دارند اما میانگین سن بیماران ۳۲ تا ۳۳ سال است. در سنین پایین تر، دلیل اصلی تصادفات است اما در سنین حدود ۶۰ سال، بیشترین دلیل آسیب به نخاع، میلوپاتی بعد از ترومای خفیف است. در جنس مذکر میزان شیوع آن ۳/۵ برابر مؤنث است. اطلاعات جمع آوری شده از مرکز بین المللی آسیب نخاعی حاد در ۲۴۳۳۲ بیمار نشان دهنده این است که حدود ۳۴/۱٪ تتراپلژی ناقص، ۱۸/۳٪ تتراپلژی کامل، ۱۸/۵٪ پاراپلژی خفیف و ۲۳٪ دچار پاراپلژی کامل شده اند [۲]. علاوه بر درمان های رایج برای آسیب نخاعی در سال های اخیر سلول درمانی با استفاده از سلول های بنیادی مورد توجه قرار گرفته است. سلول