بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان:

استفاده از سلول‌های شبه الیگودندروسیت و سلول‌های استرومایی مغز استخوان بیان کننده ژن CNTF در درمان مرکب ضایعه نخاعی درموش صحرایی آزمایشگاهی

نگارش

حجت اله عباس زاده

استاد راهنما

دکتر تقی طریحی

استادان مشاور

دکتر علیرضا عزیززاده دلشاد

دکتر مجید صادقی زاده

بهمن ۱۳۹۱

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای حجت اله عباس زاده رشته **علوم تشریح** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **استفاده از سلولهای شبه الیگودندروسایت و سلولهای استرومایی مغز استخوان بیان کننده ژن CNTF در درمان مرکب ضایعه نخاعی contusive در موش صحرایی آزمایشگاهی**» در تاریخ **۱۳۹۱/۱۱/۱۸** 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	دکتریوسف صادقی	
استاد ناظر	دکترمعصومه جرحانی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترمنصوره موحدین	

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

مقدمه: با عنایت به سیاست های 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 می‌باشد 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 می‌باشد.

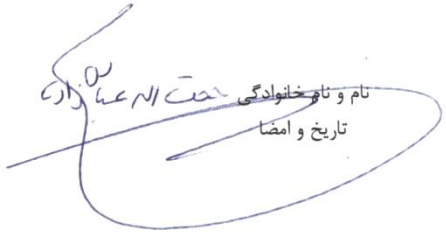
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

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 دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، 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 یافته‌ها 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 **حجت اله عباس زاده** دانشجوی رشته **علوم تشریح** ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۸ مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم 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:

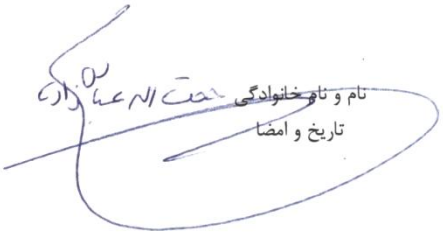
" کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **علوم تشریح** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی آقای **دکتر تقی طریحی**، مشاوره آقایان **دکتر علیرضا عزیززاده دلشاد** و **دکتر مجید صادقی زاده** از آن دفاع شده است.

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 **حجت اله عباس‌زاده** دانشجوی رشته **علوم تشریح** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.



تقدیم به:

به سقای دشت کربلا عباس (ع)

آنکه مرا عشق، چگونه زیستن و وفاداری آموخت

به همه انسانهای شریف که در کشاکش روزگار انسان ماندند....

به پدر و مادر عزیزم که چون شمع همواره می سوزند و روشنی می بخشند.....

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 دکتر مجید صادقی زاده، دکتر علیرضا 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 و تحقیقم همیشه از راهنمایی‌های ایشان استفاده نمودم.

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

❖ استاد ارجمند سرکار خانم دکتر منصوره موحدین که با راهنمایی هایشان مرا در اجرای بهینه این تحقیق و در طول تحصیل یاری نمودند.

❖ همکلاسی‌های عزیز و دوست داشتنی‌ام: سرکار خانم دکتر ماریا زهیری و آقایان دکترشهرام دارابی، دکتر روح اله فتحی

❖ دوستان و سروران محترم: آقایان و خانم‌ها علی نوری زاده، مرضیه درویش، شهرام پوربیرانوند، سعیده ابراهیمی، حمید ابوطالب، پرستو براتی، لیلا علیزاده، صدیقه قاسمی، مهدی ظفری، رحیم خلیلی، فرشاد عابدی، بهروش صادقی، فرض الله محمدلو، آقای موسویان وخانم دباغ که مرا در طول تحقیق یاری نمودند.

❖ کلیه اساتید و یا همکارانی که به انحاء مختلف مزاحم وقت با ارزششان شده‌ام ولی اسامی شریفشان از قلم افتاده است.

❖ این پایان نامه‌ی دکترای تخصصی در سال ۱۳۹۱ با حمایت دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا بیمارستان خاتم الانبیاء تهران بطور مشترک اجرا شده است و حاصل از طرح تحقیقاتی مربوط به قرار داد دکتر تقی طریحی با مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم الانبیاء تهران است.

چکیده:

هدف: سلول درمانی و ژن درمانی از روش‌های جدید درمانی هستند که می‌توانند در بهبود ضایعات نخاعی مؤثر باشند. هدف از انجام این پژوهش استفاده از سلول‌های شبه الیگودندروسایت و سلول‌های استرومایی مغز استخوان بیان کننده CNTF در درمان نخاع ضایعه دیده با روش contusive در موش صحرایی آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های BMSCs از استخوان موش‌های صحرایی استخراج شد. پس از سه مرحله پاساژ این سلول‌ها، ابتدا به نوروسفر و سپس به سلول‌های بنیادی عصبی تمایز داده شد و در مرحله القا با استفاده از bFGF، PDGF، HRG(heregulin) و (T_3) Triiodothyronine به سلول‌های شبه الیگودندروسیت متمایز شد. سپس وکتور ترشحی با استفاده از ترانسفکت وارد سلول‌های BMSCs شد و پس از پایدار شدن سلول‌ها، بیان ژن آن در سطح RNA بوسیله RT-PCR و بیان پروتئینی با استفاده از وسترن بلاتینگ و الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت و سلول‌های ترانسفکت شده به همراه سلول‌های شبه الیگودندروسیت جهت تزریق آماده شدند. در مرحله *in vivo* تعداد ۷۴ سر موش صحرایی ماده بالغ به ۸ گروه تقسیم شد. گروه اول یا Sham فقط تحت عمل جراحی لامینکتومی قرار گرفت، در حالی که در بقیه گروه‌ها پس از لامینکتومی، contusion ایجاد شد. در گروه شاهد ۱ (C1) پس از contusion هیچ درمانی صورت نگرفت. در بقیه گروه‌ها، ۷ روز پس از ضایعه تزریق صورت گرفت، به این ترتیب که در شاهد ۲ (C2) ۹µl نرمال سالین، در گروه (E1) سلول‌های BMSCs تمایز نیافته، در گروه (E2) سلول‌های NSC، در گروه (E3) سلول‌های شبه الیگودندروسیت، در گروه (E4) سلول‌های BMSCs ترانسفکت شده و در گروه (E5) سلول‌های BMSCs ترانسفکت همراه با سلول‌های شبه الیگودندروسیت، در تمام گروه‌ها تزریق به شکل داخل نخاعی انجام شد. در همه‌ی گروه‌ها یک روز قبل از SCI تا ۱۲ هفته بعد بهبودی حرکتی حیوان به‌وسیله تست BBB مورد بررسی قرار گرفت. در پایان هفته ۱۲ سگمان‌های نخاعی T12-L1با استفاده از روش‌های هیستومورفولوژی و ایمونوهیستوشیمی در محل ضایعه بررسی گردید.

یافته‌ها: مطالعات نشان داد که درصد قابل توجهی از سلول‌های کشت داده شده پس از پاساژ چهارم سلول‌های BMSCs می‌باشند. بررسی مارکرهای دیگر به خصوص O4, O1, oligo2 نشان داد که در مرحله القا ترکیب HRG، PDGF، bFGF و (T_3 (25ng/ml می‌تواند نقش مؤثری در تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های شبه الیگودندروسیت داشته باشد. سلول‌های ترانسفکت شده دارای بیان پروتئین بالاتری نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده بودند. گروه‌های تجربی سلول درمانی بهبودی حرکتی معنی‌داری را نسبت به گروه‌های کنترل داشت. این بهبودی در هفته‌های دوم تا چهارم مشخص‌تر بود اما در فاصله هفته‌های چهارم تا دوازدهم میزان بهبودی کندتر گردید. یافته‌های هیستومورفومتری نشان دهنده‌ی کاهش معنی‌دار حفره در ناحیه مرکزی پیوند در گروه‌های تجربی نسبت به گروه‌های شاهد بود.

نتیجه‌گیری: پیوند همزمان سلول‌های شبه الیگودندروسایت و سلول‌های استرومایی مغز استخوان بیان کننده ژن CNTF اثر سینرژیست داشته و باعث بهبود نسبی حرکتی در موش صحرایی دارای ضایعه نخاعی با روش contusive می‌شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، تمایز، سلول‌های شبه الیگودندروسایت، ترانسفکت، ضایعه طناب نخاعی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

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

۱-۱. مقدمه..... ۲

۱-۲. نخاع و ضایعه نخاعی..... ۸

۱-۲-۱. مراحل آسیب‌های نخاعی..... ۱۰

۱-۳. انواع ضایعات نخاعی..... ۱۱

۱-۴. پاتوفیزیولوژی ضایعه نخاعی..... ۱۳

۱-۵. فازهای مختلف تروما..... ۱۳

۱-۵-۱. فاز حاد..... ۱۳

۱-۵-۲. فاز تحت حاد..... ۱۵

۱-۵-۳. فاز تاخیری..... ۱۵

۱-۵-۴. التهاب..... ۱۶

۱-۶. مطالعات انسانی در درمان ضایعه نخاعی..... ۱۶

۱-۷. درمان ضایعه نخاعی..... ۱۷

۱-۷-۱. روش‌های جدید درمان..... ۱۷

۱-۷-۲. سلول درمانی..... ۱۷

۱-۸. انواع سلول‌های بنیادی..... ۱۸

۱-۸-۱. سلول‌های بنیادی جنینی..... ۱۸

۱-۸-۲. سلول‌های بنیادی زایا..... ۱۸

۱-۸-۳. سلول‌های بنیادی رویانی..... ۱۸

۱-۸-۴. سلول‌های بنیادی کارسینومایی..... ۱۸

۱-۸-۵. سلول‌های IPS..... ۱۸

۱-۸-۶. سلول‌های بنیادی بالغ..... ۱۹

۱-۸-۵-۱. سلول‌های BMSCs ۲۰
۱-۸-۵-۲. BMSCs یک انتخاب مناسب ۲۰
۱-۸-۵-۳. کاربرد سلول‌های BMSCs در درمان SCI ۲۱
۱-۹. سلول‌های BMSCs و میلیناسیون مجدد ۲۲
۱-۱۰. سلول‌های الیگودندروسیت ۲۳
۱-۱۰-۱. سلول‌های گلیال ۲۳
۱-۱۰-۲. الیگودندروسیت‌ها ۲۴
۱-۱۰-۲. مارکرهای اختصاصی الیگودندروسیت ۲۸
۱-۱۰-۳. سلول‌های پیش‌ساز و نابالغ الیگودندروسیت ۲۹
۱-۱۰-۷. سلول‌های الیگودندروسایت و درمان SCI ۲۹
۱-۱۱. فاکتورهای نوروتروفیک ۳۱
۱-۱۱-۱. نئورگولین‌ها ۳۱
۱-۱۱-۲. فاکتور CNTF ۳۱
۱-۱۲. مهندسی ژنتیک ۳۱
۱-۱۲-۱. ژن درمانی ۳۲
۱-۱۳. اهداف ۳۴
۱-۱۳-۱. هدف اصلی ۳۴
۱-۱۳-۲. اهداف فرعی ۳۵
۱-۱۴. فرضیه‌ها ۳۵

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۶

۲-۱. تهیه وکتور اولیه حاوی ژن CNTF ۳۷
۲-۱-۱. تهیه باکتری مستعد ۳۷
۲-۱-۲. روش فریز کردن باکتری‌های مستعد ۳۸

۲-۱-۳. انتقال وکتور pCMV-Sport6-CNTF به درون سلول باکتری (ترانسفورماسیون) و کشت آنها ۳۹
۲-۲. استخراج پلاسمید pCMV-Sport6-CNTF از باکتری ترانسفورم شده ۴۰
۲-۲-۱. بررسی کیفی DNA استخراج شده پلاسمیدها در ژل آگارز ۴۲
۲-۲-۲. ارزیابی کمی DNA استخراج شده ۴۴
۲-۲-۳. ارزیابی صحت توالی DNA استخراج شده پلاسمیدها ۴۴
۲-۳. آماده‌سازی پرایمرها ۴۵
۲-۳-۱. بافرها وآنزیم ۴۵
۲-۴. تکثیر ژن CNTF با روش PCR ۴۵
۲-۴-۱. تخلیص محصول PCR ۴۶
۲-۴-۲. انجام هضم آنزیمی محصول PCR ۴۷
۲-۵. ساب کلون کردن محصول PCR ژن CNTF درون وکتور ترشحی ۴۷
۲-۵-۱. کشت واستخراج وکتور ترشحی در مقیاس بالا ۴۷
۲-۵-۲. تکثیر و تخلیص وکتور بیانی در مقیاس زیاد ۴۷
۲-۵-۳. هضم آنزیمی وکتورها ۴۸
۲-۵-۴. روش کار جهت هضم وکتور pSecTag2/hygroA ۴۸
۲-۶. فرایند اتصال توسط آنزیم لیگاز (لایگیشن) ۴۹
۲-۶-۱. لایگیشن قطعه ژن درون وکتور بیانی ۴۹
۲-۶-۲. ترانسفورم کردن محصولات لایگیشن ۵۰
۲-۶-۳. بررسی کلونی‌های حاصل از ترانسفورماسیون جهت تأیید وجود کلون‌ها ۵۱
۲-۶-۴. کلونی – PCR ۵۱
۲-۶-۵. تأیید وجود قطعه در باکتری‌های ترانسفورم شده با هضم آنزیمی ۵۱
۲-۶-۶. تخلیص وکتور بیانی نوترکیب در مقیاس زیاد ۵۲
۲-۷. استخراج و آماده‌سازی سلول‌ها برای ترانسفکشن ۵۲

۲-۷-۱. تهیه و آماده‌سازی BMSCs جهت کشت سلول ۵۲
۲-۷-۲. طرز تهیه محیط کشت α-MEM ۵۲
۲-۷-۳. طرز تهیه PBS برای محیط کشت ۵۲
۲-۷-۴. جداسازی سلول‌های استرومای مغز استخوان ۵۳
۲-۷-۵. بررسی زنده بودن سلول‌ها ۵۳
۲-۷-۶. ارزیابی خلوص سلول‌های BMSCs ۵۳
۲-۸. انتقال ژن‌ها به سلول‌های یوکاریوت و بررسی تولید پروتئین نوترکیب ۵۵
۲-۸-۱. روش‌های انتقال ژن ۵۵
۲-۸-۲. انتخاب سلول و روش انتقال ژن ۵۶
۲-۸-۳. ذخیره سلول‌ها ۵۶
۲-۸-۴. پاساژ سلول ۵۶
۲-۹. ترانسفکشن با لیپوفکتامین ۵۷
۲-۹-۱. تعیین میزان مقاومت طبیعی سلول‌ها در برابر آنتی بیوتیک ۵۷
۲-۹-۲. ارزیابی ترانسفکشن در سلول‌ها ۵۸
۲-۱۰. بررسی بیان ژن بوسیله واکنش پلیمراز معکوس(RT-PCR) ۵۹
۲-۱۰-۱. استخراج Total RNA ۶۰
۲-۱۰-۲. بررسی RNA استخراج شده ۶۰
۲-۱۰-۳. UV اسپکتروفتومتری ۶۰
۲-۱۰-۴. الکتروفورز ژل آگارز برای بررسی خلوص RNA ۶۱
۲-۱۰-۵. استفاده از(Deoxyribonuclease I (DNase I به منظور حذف آلودگی احتمالی با DNA ۶۲
۲-۱۱. واکنش پلی مراز معکوس ۶۳
۲-۱۱-۱. طراحی و آماده‌سازی پرایمر ۶۳
۲-۱۱-۲. انجام PCR بر روی cDNAهای تهیه شده ۶۴

۲-۱۲. الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل پلی آکریل‌آمید در حضور SDS..... ۶۴
۲-۱۲-۱. روش تهیه محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای SDS-PAGE..... ۶۴
۲-۱۲-۲. رنگ آمیزی ژل پلی‌آکریل آمید با کوماسی آبی R-۲۵۰..... ۶۷
۲-۱۳. وسترن بلاتینگ..... ۶۸
۲-۱۴. آزمون الایزا به منظور بررسی بیان کمی پروتئین..... ۷۱
۲-۱۵. استخراج و آماده‌سازی BMSCs..... ۷۲
۲-۱۵-۱. طرز تهیه محیط کشتDMEM -F12..... ۷۲
۲-۱۵-۲. طرز تهیه PBS برای محیط کشت..... ۷۲
۲-۱۵-۳. جداسازی سلول‌های استرومای مغز استخوان..... ۷۲
۲-۱۶. بررسی زنده بودن سلول‌ها..... ۷۳
۲-۱۷. ارزیابی خلوص سلول‌های BMSCs..... ۷۳
۲-۱۸. تهیه نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی..... ۷۶
۲-۱۹. روش انجام مرحله اول القا و بررسی ایمونوسایتوشیمی..... ۷۷
۲-۲۰. روش انجام مرحله دوم القا و بررسی ایمونوسایتوشیمی..... ۷۷
۲-۲۰-۱. هم کشتی سلول‌های شبه الیگودندروسیت با سلول‌های موتور نورون..... ۷۸
۲-۲۱. نشان دار کردن سلول‌ها..... ۷۸
۲-۲۲. آماده کردن سلول‌ها و پیوند آنها..... ۷۹
۲-۲۳. تکنیک RT-PCR..... ۷۹
۲-۲۳-۱. طراحی و آماده‌سازی پرایمر..... ۸۰
۲-۲۳-۲. واکنش PCR..... ۸۱
۲-۲۴. واکنش Real Time PCR برای سنجش کمی بیان ژن..... ۸۲
۲-۲۵. تهیه موش صحرائی بالغ و گروه‌بندی..... ۸۳
۲-۲۶. جراحی‌ها بر روی حیوانات..... ۸۵
۲-۲۶-۱. روش انجام جراحی‌های اول، دوم و سوم..... ۸۵

۲-۲۶-۲. پرستاری از حیوان بعد از جراحی..... ۸۷
۲-۲۷. بررسی حرکتی..... ۸۷
۲-۲۷-۱. نحوه انجام بررسی حرکتی..... ۸۸
۲-۲۷-۲. نحوه امتیاز دهی به حیوان..... ۸۸
۲-۲۷-۳. معیارهای بررسی حرکتی..... ۸۸
۲-۲۸. نمونه برداری از نخاع..... ۹۰
۲-۲۸-۱. مراحل آماده‌سازی نمونه..... ۹۱
۲-۲۸-۲. ارزیابی مورفومتریک نواحی تزریق در نخاع..... ۹۳
۲-۲۹. بررسی ایمونوهیستوشیمی..... ۹۳
۲-۲۹-۱. ردیابی و شمارش سلول‌های نشان دار در نخاع..... ۹۳
۲-۲۹-۱-۱. روش شمارش سلول‌های نشان دار شده با Hoechst و BrdU..... ۹۳
۲-۲۹-۲. تعیین تمایز سلول‌های نشاندار شده به سلول‌های میلین ساز..... ۹۴
۲-۳۰. تجزیه تحلیل آماری..... ۹۶

فصل سوم: نتایج..... ۹۷

۳-۱. نتایج بخش ساب کلونینگ و ترانسفکشن..... ۹۸
۳-۱-۱. نتایج حاصل از تکثیر و تخلیص پلاسمیدpCMV-Sport6-CNTF و به میزان زیاد و بررسی خلوص آن..... ۹۸
۳-۱-۲. تکثیر ژن CNTF با روش PCR به منظور تایید حضور ژن در وکتور pCMV-Sport6-CNTF..... ۹۹
۳-۱-۳. بلاست توالی های نوکلوتیدی وکتور pCMV-Sport6-CNTF با استفاده از سایت NCBI..... ۱۰۰
۳-۱-۴. نتایج حاصل از تکثیر و تخلیص پلاسمیدpSecTag2/HygroA به میزان زیاد..... ۱۰۱

۳-۱-۵. هضم آنزیمی پلاسمید بیانی pSecTag2/HygroA با آنزیم‌های برش دهنده محدودالاثر ۱۰۲
۳-۱-۶. نتایج حاصل از تکثیر ژن CNTF با روش PCR از وکتور حامل جهت فرایند الحاق ۱۰۳
۳-۱-۷. نتایج حاصل از هضم وکتور ترشحی و محصول PCR با استفاده از آنزیم های محدود الاثر به منظور ایجاد انتهای چسبنده ۱۰۴
۳-۱-۸. نتایج کلونی-PCR برروی پلاسمید نوترکیبpsecTag2/hygroA - CNTF ۱۰۵
۳-۱-۹. نتایج حاصل از تکثیر پلاسمید نوترکیبpSecTag2/HygroA-CNTF به میزان زیاد ۱۰۶
۳-۱-۱۰. نتایج حاصل از تایید اندازه ژن در وکتور نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر ۱۰۷
۳-۱-۱۱. بلاست توالی‌های نوکلوتیدی وکتور حامل ژن CNTF با استفاده از سایت NCBI ۱۰۸
۳-۲. یافته‌های محیط کشت ۱۰۸
۳-۲-۱. جداسازی و کشت سلول‌های BMSCs ۱۰۸
۳-۲-۲. تعیین میزان خلوص BMSCs به روش ایمونوسایتوشیمی ۱۰۹
۳-۲-۳. تعیین میزان حیات سلول‌ها با تریپان بلو ۱۱۰
۳-۲-۴. نتایج تعیین میزان مقاومت طبیعی سلول‌های ترانسفکت شده در برابر آنتی بیوتیک ۱۱۰
۳-۲-۵. بررسی نتایج سلولی حاصل از ترانسفکشن با لیپوفکتامین ۱۱۱
۳-۲-۶. بررسی استخراج Total RNA ۱۱۱
۳-۲-۷. بررسی بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی با روش RT-PCR ۱۱۲
۳-۲-۸. روش برادفورد جهت بررسی تعیین غلظت پروتئین ۱۱۲
۳-۲-۹. بررسی بیان کیفی پروتئین با استفاده از SDS PAGE ۱۱۳
۳-۲-۱۰. ارزیابی اختصاصی پروتئین با تکنیک وسترن بلات ۱۱۴
۳-۲-۱۱. نتایج حاصل از بررسی کمی بیان پروتئین با استفاده از آزمون Elisa ۱۱۴
۳-۳. یافته‌های محیط کشت بخش سلولی ۱۱۵

۳-۳-۱. تعیین میزان حیات سلول‌ها با تریپان بلو..... ۱۱۵
۳-۳-۲. تعیین میزان خلوص BMSCs به روش ایمونوسایتوشیمی..... ۱۱۵
۳-۳-۳. تعیین بنیادین بودن BMSCs به روش RT-PCR..... ۱۱۶
۳-۳-۴. مورفولوژی سلول‌ها پس از تشکیل نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی..... ۱۱۷
۳-۳-۵. تعیین میزان تمایز بعد از تشکیل سلول‌های بنیادی عصبی به روش ایمونوسایتوشیمی..... ۱۱۸
۳-۳-۶. بررسی تمایز بعد از تشکیل سلول‌های بنیادی عصبی به روش RT-PCR..... ۱۱۹
۳-۳-۷. تأثیر دوزهای مختلف تری یدو تیرونین(T) بر القای سلول های بنیادی عصبی به سلول‌های شبه الیگودندروسیت..... ۱۱۹
۳-۳-۸. بررسی تمایز در پایان مرحله دوم القا به روش ایمونوسایتوشیمی..... ۱۲۰
۳-۳-۹. نتایج حاصل از هم کشتی سلول‌های شبه الیگودندروسیت با سلول‌های موتورنورون. ۱۲۱
۳-۳-۱۰. بررسی تمایز در پایان مراحل القا به روش RT-PCR..... ۱۲۳
۳-۳-۱۱. نتایج حاصل از Real Time PCR..... ۱۲۵
۳-۴. مرحله *in vivo*..... ۱۲۶
۳-۴-۱. درصد سلول‌های علامت دار شده با Hoechst و BrdU در محیط کشت..... ۱۲۷
۳-۴-۲. تست حرکتی قبل و بعد از جراحی اول (استخراج سلول‌های BMSCs)..... ۱۲۷
۳-۴-۳. تست حرکتی پس از جراحی دوم..... ۱۲۷
۳-۴-۴. بررسی میزان تخریب بافت نخاع..... ۱۲۹
۳-۴-۵. ردیابی سلول‌های تزریق شده..... ۱۳۰
۳-۴-۶. بررسی تمایز سلول‌های تزریق شده..... ۱۳۱

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها..... ۱۳۳

۴-۱. بحث..... ۱۳۴
۴-۲. نتیجه‌گیری..... ۱۴۶

۴-۳. پیشنهادها ۱۴۷

فهرست منابع و مآخذ ۱۴۸

چکیده انگلیسی ۱۶۳

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱) مقایسه بین منابع مختلف سلول های بنیادی جهت استفاده در درمان ضایعات نخاعی..... ۲۲

جدول (۱-۲) نمونه‌های از سلول درمانی در ضایعات نخاعی در طی چند سال اخیر..... ۳۰

جدول (۲-۱) برنامه PCR ژنCNTF..... ۴۶

جدول (۲-۲) پرایمرهای forward (F) و reverse (R) ژن‌های استفاده شده به همراه برخی از ویژگی‌های آنها نشان داده شده است پس از طراحی، پرایمرها از شرکت ژن فناوران تهیه و طبق دستورالعمل شرکت الیکوت (رقیق و تقسیم‌بندی) شدند..... ۶۴

جدول (۲-۳) مراحلی که طی آن سلول های BMSCs پاساژ چهارم توسط القا کننده‌های مختلف به سلول‌های نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی تمایز می‌یابند..... ۷۷

جدول (۲-۴) مراحل القا که طی آن سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های شبه الیگودندروسایت (OLCs) تمایز می‌یابند..... ۷۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) نمودار گزارش NSCISC علت ضایعه نخاعی در طی سالهای ۱۹۹۹-۱۹۹۵..... ۱۰

شکل (۱-۲) درجه‌بندی انواع مختلف ضایعه نخاعی بر حسب درگیری..... ۱۲

شکل (۱-۳) وقایع سلولی و بافتی فاز حاد و مزمن ضایعه نخاعی را نشان می‌دهد..... ۱۴

شکل (۱-۴) روش‌های مختلف انتقال ژن در ژن درمانی..... ۳۴

شکل (۲-۱) انتقال وکتور pCMV-Sport6-CNTF به درون سلول باکتری (ترانسفورماسیون) و کشت آنها..... ۳۹

شکل (۲-۲) شمایی از وکتورpCMV-Sport6-CNTF..... ۴۱

شکل (۲-۳) شمایی از وکتورpSecTag2/hygroA..... ۴۸

شکل (۲-۴) فرایند الحاق بین وکتور ترشحی و قطعه ژن CNTF را نشان می‌دهد..... ۴۹

شکل (۲-۵) شکل شماتیک پروسه ترانسفکشن را نشان می‌دهد..... ۵۶

شکل (۲-۶) پرایمرهای forward (F) و reverse (R) ژن‌های استفاده شده به همراه برخی از ویژگیهای آنها نشان داده شده است..... ۸۰

شکل (۳-۱) نتایج حاصل از تولید در مقیاس انبوه پلاسمید pCMV-Sport6-CNTF که به ترتیب در چاهک‌ها به همراه ladder نشان داده شده است..... ۹۸

شکل (۳-۲) نتایج حاصل از هضم آنزیمی double , single با استفاده از آنزیم های NotI وEcoRV برای پلاسمید pCMV-Sport6-CNTF..... ۹۹

شکل (۳-۳) نتایج حاصل از PCR ژنCNTF که در دماهای مختلفی انجام شد و دمای بهینه ۶۴° C به دست آمد و محصول در این دما بروی ژل run گردید..... ۹۹

شکل (۳-۴) نتایج حاصل از تایید توالی نوکلوتیدی بعد از سکانس و تطابق با بانک ژنی با استفاده از بلاست..... ۱۰۰

شکل (۳-۵) تولید در مقیاس انبوه pSecTag2/HygroA که بـه ترتیـب در چاهـک هـا بـه همـراه ladder نشان داده شده است..... ۱۰۱

شکل (۳-۶) نتایج حاصل از هضم پلاسمید بیانی pSecTag2/HygroA با آنزیم EcorV..... ۱۰۲

شکل (۳-۷) نتایج حاصل از PCR ژنCNTF در دماهای مختلفی که دمای بهینه ۶۵° C به دست آمد..... ۱۰۳

شکل (۳-۸) هضم آنزیمی وکتور pSecTag2/HygroA و ژن CNTFکه به ترتیب در چاهک‌هـا بـه همراه ladder داده شده است..... ۱۰۴

شکل (۳-۹) نتایج کلونی-PCR بـه منظـور تاییـد وکتـور واجـد قطعـه الحـاق یافتـه، کـه در آن نمونه‌های مثبت حاوی ژن بوده و با علامت + مشخص شده‌اند..... ۱۰۵

شکل (۳-۱۰) نتایج حاصل از تولید در مقیاس انبوهpSecTag2/HygroA-CNTF به همـراه هضـم آنزیمی نشان داده شده است..... ۱۰۶

شکل (۳-۱۱) نتـایج حاصـل از هضـم دوگانـه پلاسـمید بیـانی psecTag2/hygroA در دو نمونـه استخراجی با استفاده از دو آنزیم KpnI وEcorV که در کنار ladder نشان داده شده‌اند..... ۱۰۷

شکل (۳-۱۲) نتایج حاصل از تایید توالی نوکلوتیدی بعد از سـکانس و تطـابق بـا بانـک ژنـی بـا استفاده از بلاست..... ۱۰۸

شکل (۳-۱۳) مورفولوژی سلول های مغز استخوان پس از ۲۴ ساعت (A)، پـس از پاسـاژ اول(B)، پس از پاساژ سوم(C) و سلول‌هایBMSCs چسبیده به کف فلاسک (D)..... ۱۰۹

شکل (۳-۱۴) تصاویر (A) تا (D) به ترتیب مربوط به رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی‌هـای آنتی فیبرونکتین ,CD44,CD45,CD90 از سلول های تمایز نیافته BMSCs در پایان پاساژ چهـارم است..... ۱۱۰

شکل (۳-۱۵) تشکیل کلونی در سلول های ترانسفکت شده بـه ترتیـب در روزهـای اول (A)، دوم (B)، سوم(C) و چهارم (D) پس از پایدارسازی با آنتی بیوتیک هیگرومایسین..... ۱۱۱

شکل (۳-۱۶) استخراج RNA کل در سلول‌های ترانسفکت شده که بانـدهای ,28S 18S مشـاهده شد..... ۱۱۲