بسم الله الرحمن الرحیم

باسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

دانشکده علوم زیستی

بدینوسیله گواهی می شود خانم **حوری عدالت** در تاریخ **۹۰/۷/۱۳** از رساله دکتری **۱۸** واحدی خود با عنوان: **بیش بیان ژنهای NT3 و TrkC و مهار بیان ژن p75 در سلولهای بنیادی مغز استخوان موش صحرایی و تاثیر این تغییرات در پیوند به مدل ضایعه نخاعی Contusion موش صحرایی** دفاع کرده است. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا بررسی کرده و پذیرش آنرا برای دریافت درجه دکتری تخصصی (Ph.D) تائید می نمایند.

ردیف	اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
۱	استاد راهنما	**دکتر سید جواد مولی**	دانشیار	
۲	استاد مشاور (اول)	**دکتر منصوره موحدین**	استاد	
۳	استاد مشاور (دوم)	**دکتر محمود تولایی**	دانشیار	
۴	استاد ناظر (داخلی)	**دکتر بهرام محمد سلطانی**	استادیار	
۵	استاد ناظر (داخلی)	**دکتر مهرداد بهمنش**	دانشیار	
۶	استاد ناظر (خارجی)	**دکتر موسی گردانه**	استادیار	
۷	استاد ناظر (خارجی)	**دکتر هوشنگ صابری**	دانشیار	
۸	نماینده تحصیلات تکمیلی	**دکتر مجید صادقی زاده**	استاد	

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 دانشجو 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، 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 آئین نامه های 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 **حوری عدالت** دانشجوی رشته **زیست شناسی/ژنتیک مولکولی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۵** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم زیستی** متعهد می شوم کلِیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

نام و نام خانوادگی: **حوری عدالت**

تاریخ و امضا: ۹۰/۷/۱۳

حوری عدالت

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (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 می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» 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 **زیست شناسی/ژنتیک مولکولی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده **علوم زیستی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای **دکتر سید جواد مولی**، مشاوره سرکار خانم **دکتر منصوره موحدین** و مشاوره جناب آقای **دکتر محمود تولایی** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت 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 **حوری عدالت** دانشجوی رشته زیست **شناسی/ژنتیک مولکولی** مقطع **دکتری** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **حوری عدالت**

تاریخ و امضا: ۹۰/۷/۱۳

حوری عدالت

دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری

رشته: زیست شناسی **گرایش:** ژنتیک

عنوان رساله:

بیش بیان ژنهای NT3 و TrkC و مهار بیان ژن p75 در سلولهای بنیادی مغز استخوان و تاثیر این تغییرات در پیوند به مدل ضایعه نخاعی Contusion موش صحرایی

نگارش:

حوری عدالت

استاد راهنما:

دکتر سید جواد مولی

استاد مشاور(اول): دکتر منصوره موحدین

استاد مشاور(دوم): دکتر محمود تولایی

ماه و سال دانش اموختگی: شهریور ۹۰

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم،

همسر و برادرانم

من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق

حمد و ستایش خداوندی را که توفیق علم آموزی را در کنار نعمتهای بی شمار دیگرش به من عطا نمود و هم او بود که والدینی مهربان و فداکار و اساتیدی بزرگوار را به من ارزانی داشت.

و با تقدیر و سپاس فراوان از جناب آقای دکتر مولی، استاد راهنمای محترم که نه تنها درس دانشگاهی، بلکه درس زندگی را نیز از ایشان آموختم.

با تقدیر بسیار از استاد مشاور عزیز سرکار خانم دکتر موحدین، که هیچگاه از کمک به حل مشکلاتی که در طی رساله پیش می آمد فروگزار نمی کردند.

با تشکر فراوان از جناب آقای دکتر تولایی، استاد مشاور محترم، که همیشه با رویی باز یاریگر من در انجام این رساله بوده اند.

با تقدیر زیاد از اساتید محترم، جناب آقای دکتر بهرام محمد سلطانی، دکتر مهرداد بهمنش، و به ویژه جناب آقای دکتر صادقی زاده که همواره از راهنمایی ها و تجربیات علمی ایشان در طول تحصیل بهره جسته ام.

از جناب آقای پیرحاجاتی که از تجربیات ایشان در انجام این رساله بهره مند شدم و سایر دوستان و همکاران عزیزم در آزمایشگاه ژنتیک و کارشناسان محترم، سرکار خانم دیداری، سرکار خانم اسماعیلی و سرکار خانم زرندی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده

غالب ضایعات نخاعی موجب از بین رفتن عملکرد اعصاب حسی و حرکتی در بخش تحتانی ناحیه آسیب دیده می گردند. نخاع یک فرد بالغ قادر است با سازماندهی مجدد اتصالات آکسونها و ایجاد سلولهای پیش ساز جدید، به ضایعات ایجاد شده در این اندام پاسخ دهد. پیوند سلولهای بنیادی/اجدادی با تولید سلولهای گلیایی و نورونها، استراتژیهای ترمیمی اندوژن را تشدید کرده و با کاهش عوارض آسیبها کیفیت زندگی بیماران مزمن مبتلا به ضایعات نخاعی را افزایش می دهند. لکن، علی رغم پیشرفتهای عمده در روشهای جراحی و فارماکولوژیکی، تا کنون درمان قطعی برای بیماران مبتلا به ضایعات نخاعی پیشنهاد نشده است. طبیعت این بیماری پیچیده بوده و از این رو درمانهای موثر در آینده می بایست ترکیبی از روشهای مختلف مانند ۱) پیوند بافت یا سلول، ۲) تامین فاکتورهای تامین کننده رشد از جمله نوروتروفینها، ۳) مسدود کردن فاکتورهای ممانعت کننده از باززایی آکسونها و ۴) تنظیم پاسخهای التهابی ایجاد شده پس از ضایعات نخاعی را به کار برند.

پیوند سلولهای بنیادی مغز استخوان، به دلیل سهل الوصول بودن و قابلیت پیوند اتولوگ، دارا بودن گرایش ذاتی به سمت محل ضایعه، سنتز نوروتروفینها و قابلیت تمایز به سمت سلولهای نورونی و گلیایی، نسبت به پیوند سایر سلولهای بنیادی ارجح می باشد. اما، نتیجه موفقیت آمیز پیوند سلولها به بقا و عملکرد طولانی مدت آنها در محیط جدیدشان بستگی دارد.

p75 که به گیرنده مرگ معروف است، به ویژه در زمانی که گیرنده های Trk بیان نمی شوند با اتصال به نوروتروفینها موجب القای آپوپتوز در سلولهای عصبی می شود. به علاوه مطابق با نتایج قبلی ما p75 با القای تمایز عصبی در سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در *in vitro* شروع به بیان می کند. از سوی دیگر، نوروتروفینها در تنظیم بقا و مرگ نورونها در سیستم عصبی مرکزی نقش اساسی دارند. بر اساس مطالعه قبلی ما، سلولهای استرومایی مغز استخوان NGF و BDNF را قبل و بعد از

تمایز عصبی بیان می کنند. در حالی که فاکتور NT-3 و گیرنده مربوط به آن، TrkC، قبل و بعد از تمایز در *in vitro* بیان نمی شوند.

از این رو، ما با بیش بیان ژنهای NT3 و TrkC و مهار بیان ژن p75 در سلولهای بنیادی مزانشیمی قصد داشتیم با ادغام روشهای پیوند سلول، تامین فاکتورهای رشد و ممانعت از آپوپتوز، میزان بقا و عملکرد سلولهای بنیادی مغز استخوان موش صحرایی را بعد از پیوند افزایش دهیم.

بدین منظور ابتدا طی بررسیهای *in vitro*، رده های سلولی بنیادی مغز استخوان موش صحرایی مهندسی شده با TrkC/NT3 و p75-siRNA تولید گردید. آنگاه بیان ترانس ژن در این رده های سلولی تایید شد. سپس با القای تمایز عصبی در سلولهای تغییر یافته ژنتیکی فوق، بیان برخی ژنهای کلیدی در آنها قبل و بعد از تمایز بررسی گردید. در نهایت تغییرات آپوپتوز در آنها مورد ارزیابی قرار داده شد. سپس در سطح *in vivo* پس از ایجاد موشهای صحرایی مدل ضایعه نخاعی و پیوند رده های سلولی حاصل شده به آنها، مطالعات بافت شناختی، رفتاری و آنالیزهای آماری در آنها صورت گرفت.

نتایج، بیش بیان و مهار بیان ژنهای مذکور و کاهش آپوپتوز را در سلولهای تغییر یافته ژنتیکی تایید نمود. هم چنین بهبودی عملکردی نیز در موشهای مدل پس از پیوند سلولها حاصل گشت. بنابراین، روش مورد استفاده در این پژوهش می تواند به عنوان یک روش درمانی ترکیبی بالقوه مناسب برای درمان ضایعات نخاعی استفاده گردد.

کلید واژه: سلولهای استرومایی مغز استخوان، سلولهای بنیادی مزانشیمی، ضایعه نخاعی contusion، پیوند، موش صحرایی، آپوپتوز، TrkC، NT-3، p75

فهرست مطالب

فصل ۱: مقدمه ۱

۱-۱ تاریخچه و عوارض بالینی ضایعات نخاعی ۲

۱-۲ عوامل ایجاد ضایعات نخاعی ۳

۱-۲-۱ آسیب مکانیکی ۳

۱-۲-۲ فرایندهای التهابی و تخریب بافت ۳

۱-۲-۳ کم خونی موضعی ۴

۱-۳ ضایعات نخاعی Contusion ۴

۱-۳-۱ مدل Contusion از نوع رها کردن وزنه ۵

۱-۴ پاتوفیزیولوژی ضایعات نخاعی و نقش التهاب ۵

۱-۵ ترمیم آکسونها ۷

۱-۵-۱ رابطه ترمیم آکسونها و ایجاد شبکه های عصبی در طی تکوین ۷

۱-۵-۲ رابطه ترمیم آکسونها و پرداخت بهای پیچیدگی مغز انسان در طی تکامل ۹

۱-۶ موانع ترمیم آکسونها ۱۰

۱-۶-۱ محدودیتهای ذاتی نورونهای بالغ ۱۰

۱-۶-۲ موانع بیرونی سیستم عصبی بالغ ۱۱

۱-۷ غلبه بر سدهای ترمیم در سیستم عصبی مرکزی ۱۲

۱-۷-۱ فراهم کردن نورونهای جدید ۱۴

۱-۷-۲ بهره برداری از ذخایر اندوژن نورونهای جدید ۱۵

۱-۷-۳ جوان سازی نورونها ۱۶

۱-۷-۴ پاکسازی مسیر برای نوریتها ۱۶

۱-۷-۵ بهینه سازی انعطاف پذیری فیبرهای یدکی ۱۸

۱-۷-۶ تغذیه نورونها ۱۸

۱-۷-۶-۱ نوروتروفینها ۱۹

۱-۷-۶-۱-۱ نوروتروفینها و ترمیم ضایعات نخاعی ۲۳

۱-۷-۶-۱-۲ تاثیر نوروتروفینها روی مولکولهای بازدارنده ۲۵

۱-۷-۶-۱-۳ نوروتروفین ۳ ۲۵

۱-۷-۶-۲ گیرنده مرگ p75 ۲۷

۱-۸ درمان ضایعات نخاعی ۲۹
۱-۸-۱ استفاده از سلولهای بنیادی در درمان ۲۹
۱-۸-۱-۱ انواع سلولهای بنیادی ۳۱
۱-۸-۱-۱ سلولهای بنیادی جنینی انسان ۳۱
۱-۸-۱-۲ سلولهای بنیادی عصبی ۳۲
۱-۸-۱-۳ سلولهای غلاف بویایی ۳۵
۱-۸-۱-۴ سلولهای بنیادی مزانشیمی ۳۶
۱-۸-۱-۲ مشکلات علمی و بالینی در درمان با سلولهای بنیادی ۳۷
۱-۸-۱-۳ نقش پیش تمایز سلولهای بنیادی در نتیجه پیوند ۳۸
۱-۹ ضرورت انجام و نحوه شکل گیری ایده در تحقیق حاضر ۳۸
۱-۹-۱ استفاده از درمانهای ترکیبی به عنوان درمانهای موثر ضایعات نخاعی در آینده ۳۸
۱-۱۰ اهداف بررسی ۴۱
۱-۱۱ فرضیه های بررسی ۴۲
فصل ۲: مواد و روشها ۴۳
۲-۱ بررسیهای in vitro ۴۴
۲-۱-۱ کار با باکتری ۴۴
۲-۱-۱-۱ پلاسمیدهای مورد استفاده در پژوهش ۴۴
۲-۱-۱-۱ پلاسمید pEGFP-N1 ۴۴
۲-۱-۱-۲ پلاسمیدهای pRNA-U6.1/Hygro و pRNA-U6.1/Hygro-p75 shRNA ۴۵
۲-۱-۱-۳ پلاسمید pDsRed1-N1-hNT-3 ۴۶
۲-۱-۱-۴ پلاسمید pCMX-rTrkC ۴۸
۲-۱-۱-۲ روش تهیه محیط کشت LB مایع ۴۸
۲-۱-۱-۳ روش تهیه محیط کشت LB جامد ۴۹
۲-۱-۱-۴ روش تهیه محلول ۰/۱ M کلرور کلسیم ۴۹
۲-۱-۱-۵ روش تهیه باکتری مستعد ۴۹
۲-۱-۱-۶ ترانسفورم کردن باکتری مستعد DH5α با پلاسمیدها ۵۰
۲-۱-۱-۷ استخراج پلاسمید از باکتری های ترانسفورم شده ۵۱
۲-۱-۱-۸ تایید پلاسمیدهای استخراج شده ۵۲
۲-۱-۱-۸-۱ روش هضم آنزیمی ۵۲
۲-۱-۱-۸-۱ پلاسمیدهای pEGFP-N1 و pDsRed1-N1-hNT-۳ ۵۲
۲-۱-۱-۸-۲ پلاسمید pCMV-rTrkC ۵۳

۲-۱-۱-۸-۱-۳ پلاسمیدهای pRNA-U6.1/Hygro و pRNA-U6.1/Hygro-p75 shRNA ۵۳
۲-۱-۱-۸-۲ روش واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ۵۴
۲-۱-۱-۸-۳ الکتروفورز ژل آگاروز ۵۵
۲-۱-۱-۸-۳-۱ روش تهیه محلول EDTA (pH=۸ و ۰/۵ M) ۵۵
۲-۱-۱-۸-۳-۲ روش تهیه بافر الکتروفورز TBE (۵X) ۵۵
۲-۱-۱-۸-۳-۳ روش تهیه محلول اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) ۵۶
۲-۱-۱-۸-۳-۴ الکتروفورز ۵۶
۲-۱-۱-۸-۳-۵ رنگ آمیزی ژل آگاروز با رنگ اتیدیوم بروماید ۵۷
۲-۱-۱-۸-۴ روش تعیین توالی ۵۸
۲-۱-۲ کار با سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۵۹
۲-۱-۲-۱ روش تهیه محیط کشت استریل α-MEM ۶۰
۲-۱-۲-۲ روش تهیه محلول PBS استریل ۶۰
۲-۱-۲-۳ روش تهیه محیط القای عصبی استریل ۶۱
۲-۱-۲-۴ روش تهیه محیط کشت استریل Opti-MEM ۶۱
۲-۱-۲-۵ استخراج و کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۶۱
۲-۱-۲-۶ پاساژ سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۶۲
۲-۱-۲-۷ انجماد سلولهای مزانشیمی ۶۸
۲-۱-۲-۸ ذوب کردن سلولهای منجمد شده ۶۳
۲-۱-۲-۹ تعیین میزان حساسیت سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به آنتی بیوتیکهای G418 (جنیتیسین یا آنالوگ آنتی بیوتیک نئومایسین) و هیگرومایسین ۶۴
الف) جنیتیسین ۶۴
ب) هیگرومایسین ۶۴
۲-۱-۲-۱۰ ترانسفکت کردن سلولهای بنیادی مغز استخوان و تولید رده های سلولی ۶۵
۲-۱-۲-۱۰-۱ ترانسفکت کردن با روش الکتروپوریشن ۶۵
۲-۱-۲-۱۰-۲ ترانسفکت کردن با روش لیپوفکشن ۶۶
الف) لیپوفکشن با اسکورت ۲ ۶۶
الف) لیپوفکشن با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ۶۷
۲-۱-۲-۱۰-۳ انتخاب سلولهای ترانسفکت شده با کمک آنتی بیوتیک ۶۷
۲-۱-۲-۱۰-۴ پایدارسازی سلولهای ترانسفکت شده ۶۸
۲-۱-۲-۱۰-۵ بهینه سازی مقدار پلاسمید در کوترانسفکشن pCMV-rTrkC و pDsRed1-N1-hNT-3 با استفاده از پلاسمیدهای pEGFP-N1 و pCMV-rTrkC ۶۸
۲-۱-۲-۱۱ تمایز عصبی سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان دست نخورده و تغییر یافته ژنتیکی ۶۹
۲-۱-۲-۱۱-۱ پوشاندن سطح پتری دیش یا لامل با کلاژن ۶۹

۲-۱-۲-۱۱-۲ القای پیش تمایز عصبی در سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۶۹
۲-۱-۲-۱۱-۳ القای تمایز عصبی در سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۷۰
۲-۱-۲-۱۲ استخراج RNAی کل از بافت مغز موش و سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۷۰
۲-۱-۲-۱۲-۱ استخراج RNA از بافت مغز موش ۷۰
۲-۱-۲-۱۲-۲ استخراج RNA از سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۷۲
۲-۱-۲-۱۲-۳ بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگاروز ۷۳
۲-۱-۲-۱۲-۳-۱ استفاده از دستگاه نانو دراپ ۷۳
۲-۱-۲-۱۲-۳-۲ الکتروفورز ژل آگاروز ۷۳
۲-۱-۲-۱۲-۴ تیمار RNA با آنزیم DNase I ۷۳
۲-۱-۲-۱۲-۵ واکنش رونویسی معکوس جهت سنتز cDNA ۷۴
۲-۱-۲-۱۲-۶ طراحی پرایمرها ۷۵
۲-۱-۲-۱۲-۷ آماده سازی پرایمرها ۷۵
۲-۱-۲-۱۲-۹ انجام واکنش Real-time PCR به روش SYBR Green ۷۸
۲-۱-۲-۱۲-۱۰ تعیین کارایی پرایمرها ۷۹
۲-۱-۲-۱۲-۱۱ آنالیز داده های به دست آمده از واکنش Real-time PCR ۸۰
۲-۱-۲-۱۳ آنالیز چرخه سلولی با کمک تکنیک فلوسیتومتری ۸۰
۲-۱-۲-۱۳-۱ روش تهیهٔ محلول ذخیره PI ۸۱
۲-۱-۲-۱۳-۱ روش تهیهٔ محلول نهایی PI ۸۱
۲-۱-۲-۱۳-۳ نحوه آماده سازی سلولها و آنالیز آنها با دستگاه فلوسیتومتر ۸۱
۲-۱-۲-۱۴ آنالیز مرگ سلولی (آپوپتوز) با کمک کیت Annexin-V و تکنیک فلوسیتومتری ۸۲
۲-۱-۲-۱۵ بررسی میزان آپوپتوز با استفاده از سنجش فعالیت اختصاصی کاسپازهای اجرایی ۳ و ۷ ۸۳
۲-۱-۲-۱۵-۱ روش تهیه محلول Caspase Glo 3/7 ۸۳
۲-۱-۲-۱۵-۲ اندازه گیری میزان فعالیت کاسپازهای ۳ و ۷ سلولها ۸۴

۲-۲ بررسیهای in vivo ۸۴

۲-۲-۱ نحوه ایجاد ضایعه نخاعی Contusion در موش صحرایی ۸۴
۲-۲-۲ رنگ آمیزی سلولها با DiI ۸۷
۲-۲-۳ رنگ آمیزی سلولها با تریپان بلو و شمارش سلولی ۸۸
۲-۲-۴ تزریق سلولها ۸۹
۲-۲-۵ ردیابی سلولها پس از پیوند ۸۹
۲-۲-۵-۱ روش تهیه پارافرمالدهید ۴٪ ۹۰
۲-۲-۵-۲ روش تهیه سوکروز ۳۰٪ ۹۰
۲-۲-۵-۳ برداشت بافت ۹۰

۲-۲-۵-۴ برش بافت ۹۱
۲-۲-۶ ارزیابی رفتاری-حرکتی حیوانات مدل ضایعه نخاعی ۹۲
۲-۳ آنالیز آماری ۹۵
فصل ۳: نتایج ۹۶
۳-۱ نتایج مربوط به بررسیهای in vitro ۹۷
۳-۱-۱ نتایج مربوط به تکثیر پلاسمیدها ۹۷
۳-۱-۱-۱ تایید با روش هضم آنزیمی و ژل آگاروز ۹۷
۳-۱-۱-۲ تایید با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ۹۹
۳-۱-۱-۳ تایید با روش تعیین توالی ۱۰۰
الف) پلاسمید pCMX-rTrkC ۱۰۰
ب) پلاسمید pDsRed1N1-hNT-3 ۱۰۰
۳-۱-۲ نتایج مربوط به سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۱۰۱
۳-۱-۲-۱ وضعیت سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استخراج شده ۱۰۱
۳-۱-۲-۲ سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پاساژ داده شده ۱۰۳
۳-۱-۲-۳ تعیین حداقل دوز کشنده آنتی بیوتیکهای جنیتیسین و هیگرومایسین برای سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان دست نخورده ۱۰۴
۳-۱-۲-۴ بررسی کارآیی ترانسفکشن سلولهای COS-7 و سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به روش الکتروپوریشن با استفاده از پلاسمید گزارشگر pEGFP-N1 ۱۰۶
۳-۱-۲-۵ بررسی کارآیی ترانسفکشن سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به روش لیپوفکشن با استفاده از پلاسمید گزارشگر pEGFP-N1 ۱۰۶
الف) لیپوفکشن با ماده اسکورت ۲ ۱۰۶
ب) لیپوفکشن با ماده لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ۱۰۸
۳-۱-۲-۶ نتیجه انتخاب سلولهای ترانسفکت شده با کمک آنتی بیوتیک ۱۰۹
۳-۱-۲-۷ ترانسفکت کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با پلاسمید pDsRed1N1-hNT-3 ۱۱۱
۳-۱-۲-۸ نتیجه بهینه سازی مقدار پلاسمید در کوترانسفکشن با استفاده از پلاسمیدهای pEGFP-N1 و pCMV-rTrkC ۱۱۲
۳-۱-۲-۹ ظهور مورفولوژی شبه عصبی پس از تیمار با محیط القائی در سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان دست نخورده و تغییر یافته ژنتیکی ۱۱۳
۳-۱-۳ بررسی بیان ژنها در نمونه های مغز موش به عنوان کنترل و سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تغییر ژنتیکی یافته در زمانهای مختلف پس از تمایز ۱۱۶
۳-۱-۳-۱ الکتروفورز نمونه های RNA بر روی ژل آگاروز ۱۱۶
۳-۱-۳-۲ نتایج انجام واکنش RT-PCR سنتی ۱۱۶

۳-۱-۳-۳ نتایج انجام واکنش Real-time PCR _____ ۱۱۷
۳-۱-۳-۴ تعیین کارایی پرایمرها _____ ۱۲۲
۳-۱-۳-۵ بررسی بیان نسبی ژنها در نمونه های تغییر یافته ژنتیکی قبل و بعد از القای تمایز عصبی _____ ۱۲۳
۳-۱-۴ مطالعهٔ تغییرات در آپوپتوز در پی مهار بیان p75 و افزایش بیان NT-3 و TrkC با بررسی مراحل چرخه سلولی _____ ۱۳۲
۳-۱-۵ بررسی میزان مرگ و میر سلولی در پی مهار بیان ژن p75 و بیش بیان ژنهای NT-3 و TrkC در سلولهای شبه عصبی حاصل از تمایز با استفاده از Annexin V و دستگاه فلوسیتومتری _____ ۱۳۵
۳-۱-۶ بررسی میزان آپوپتوز سلولهای ترانسفکت شده با p75 shRNA با استفاده از سنجش فعالیت اختصاصی کاسپازهای اجرایی ۳ و ۷ پس از مهار بیان p75 _____ ۱۳۹
۳-۱-۷ تعیین میزان سلولهای زنده قبل از پیوند با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو _____ ۱۴۱

۳-۲ نتایج مربوط به بررسیهای in vivo _____ ۱۴۱

۳-۲-۱ نتایج نشاندار کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان دست نخورده و تغییر یافته ژنتیکی با رنگ فلورسانت DiI _____ ۱۴۱
۳-۲-۲ سرنوشت سلولهای لیبل شده با DiI در مقطع عرضی نخاع ضایعه دیده _____ ۱۴۲
۳-۲-۳ ارزیابی بهبودی عملکردی موشهای ضایعه نخاعی دیده در پی تیمار با سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان دست نخورده و تغییر یافته ژنتیکی _____ ۱۴۵

فصل ۴: بحث _____ ۱۵۱

۴-۱ بررسی بیان نسبی ژنها در سلولهای مزانشیمی مغز استخوان تغییر یافته ژنتیکی در ساعات مختلف القای تمایز عصبی _____ ۱۵۲

۴-۱-۱ بررسی بیان ژنها در سلولهای ترانسفکت شده با پلاسمید کنترل pRNA-U6.1/Hygro در ساعات مختلف پس از القای تمایز _____ ۱۵۲
۴-۱-۲ بررسی بیان ژنها در سلولهای ترانسفکت شده با پلاسمید pRNA-U6.1/Hygro-p75-shRNA در ساعات مختلف پس از القای تمایز _____ ۱۵۴
۴-۱-۳ بررسی بیان ژنها در نمونه ترانسفکت شده با پلاسمیدهای pDsRed1N1-hNT3 و pCMX-rTrkC در ساعات مختلف پس از القای تمایز و در مقایسه با نمونه کنترل ترانسفکت شده با پلاسمید pRNA-U6.1/Hygro _____ ۱۵۵
۴-۱-۳-۱ رابطه فاکتورهای نوروتروفیک و بیماریهای نورودژنراتیو _____ ۱۵۹

۴-۲ بررسی میزان آپوپتوز و بقای سلولها قبل و پس از پیوند _____ ۱۶۳

۴-۳ پیوند سلول به مدلهای ضایعات نخاعی _____ ۱۶۴

۴-۳-۱ بهبود عملکردی متعاقب پیوند سلولهای ترانسفکت شده با pCMX-rTrkC/pDsRed1N1-hNT3 و pRNA-U6.1/Hygro-p75-shRNA _____ ۱۶۶

۴-۴ نتیجه گیری کلی_____۱۶۹
۴-۵ پیشنهادات _____۱۶۹

فهرست جدولها

جدول ۲-۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده به منظور تایید حضور cDNA ژنهای NT-3 و TrkC _____۵۵

جدول ۲-۲. توالی پرایمرها برای تعیین توالی pCMV-rTrkC _____۵۸

جدول ۲-۳. توالی پرایمرها برای تعیین توالی pDsRed1-N1-hNT-3 _____۵۹

جدول ۲-۴. اطلاعات مربوط به پرایمرهای طراحی شده برای واکنش Real-time PCR _____۷۸

جدول ۲-۵. شیوه نمره دادن وضعیت حرکتی حیوان در تست رفتاری BBB _____۹۴

جدول ۳-۱. کارایی های نهایی برای ژنهای مورد استفاده در این بررسی _____۱۲۲

جدول ۳-۲. میانگین نمرات تست حرکتی BBB و مقادیر مربوط به P _____۱۴۷

فهرست نمودارها

نمودار ۲-۱. بهینه سازی کوترانسفکشن _____ ۱۱۳

نمودار ۲-۲. منحنی ذوب و تکثیر هر یک از ژنهای مورد بررسی در نمونه کنترل مثبت مغز _____ ۱۲۲

نمودار ۲-۳. مقایسه بیان نسبی ژنها در نمونه های مورد بررسی _____ ۱۲۶

نمودار ۲-۴. بررسی بیان ژن p75 در در ساعات مختلف پس از تمایز در مقایسه با گروه کنترل _____ ۱۲۸

نمودار ۲-۵. بررسی بیان ژنها در نمونه ترانسفکت شده با پلاسمیدهای pDsRed1N1-hNT-3 و pCMX-rTrkC در مقایسه با گروه کنترل در ساعات مختلف پس از تمایز _____ ۱۳۱

نمودار ۲-۶. تاثیر مهار بیان ژن p75 و بیش بیان ژنهای NT-3 و TrkC بر توزیع چرخه سلولی در سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس از القای تمایز _____ ۱۳۷

نمودار ۲۰-۷. بررسی میزان مرگ و میر سلولی در سلول های شبه عصبی حاصل از تمایز با استفاده از Annexin V ___ ۱۴۰

نمودار ۲-۸. بررسی میزان آپوپتوز سلولهای ترانسفکت شده با p75 shRNA با استفاده از کیت کاسپاز ۳و ۷_____ ۱۴۲

نمودار ۲-۹. روند تدریجی بهبودی عملکردی موشها در پی تیمار با PBS، سلولهای بنیادی مغز استخوان دست نخورده، سلولهای بنیادی مغز استخوان بیان کننده p75 siRNA، سلولهای بنیادی مغز استخوان بیان کننده همزمان NT-3 و TrkC _____ ۱۴۶

فهرست شکلها

شکل ۱-۱. انواع ترمیم شبکه عصبی و انعطاف پذیری پس از قطع آکسونها _____ ۱۳

شکل ۱-۲. بلوکه کردن اثر ممانعتی Nogo-A با استفاده از آنتی بادیهای Nogo-A _____ ۱۷

شکل ۱-۳. سیگنالینگ نوروتروفینها _____ ۱۹

شکل ۱-۴. مسیرهای انتقال سیگنال و اعمال زیستی احتمالی نوروتروفینها/CNTF و افزایش cAMP دربقای نورونها و ترمیم آکسونها _____ ۲۰

شکل ۱-۵. سیگنالینگ نوروتروفینها _____ ۲۰

شکل ۱-۶. سیگنالینگ نوروتروفینها _____ ۲۱

شکل ۱-۷. نوروتروفینها و گیرنده هایشان _____ ۲۳

شکل ۱-۸. مسیرهای انتقال سیگنال ارائه شده با مولکولهای ممانعت کننده از رشد _____ ۲۶

شکل ۱-۹. نمونه درمان سه فازی ضایعه نخاعی _____ ۳۰

شکل ۱-۱۰. انواع سلولهای بنیادی _____ ۳۴

شکل ۲-۱. پلاسمید pEGFP-N1 _____ ۴۵

شکل ۲-۲. پلاسمید pRNA-U6.1/Hygro به همراه توالی p75 shRNA کلون شده در آن _____ ۴۶

شکل ۲-۳. پلاسمید pDsRed1-N1-hNT-3 _____ ۴۷

شکل ۲-۴. پلاسمید pCMX-rTrkC _____ ۴۸

شکل ۳-۸. انتخاب سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با آنتی بیوتیک جنیتیسین _____ ۱۱۱

شکل ۳-۱. تایید پلاسمیدهای استخراج شده بر روی ژل آگاروز _____ ۹۹

شکل ۳-۲. بررسی وجود cDNAهای ژنهای به ترتیب NT-3 و rTrkC در پلاسمیدهای pDsRed1N1-hNT-3 و pCMX-rTrkC _____ ۱۰۰

شکل ۳-۳. نمای سلولها در پاساژ پنجم _____ ۱۰۵

شکل ۳-۴. مرگ و میر سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در زمانهای مختلف پس از شروع تیمار با غلظت µg/ml ۲۰۰ از جنیتیسین _____ ۱۰۶

شکل ۳-۵. کارایی ترانسفکشن سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با ماده اسکورت ۲ با استفاده از پلاسمید گزارشگر pEGFP-N1 _____ ۱۰۷

شکل ۳-۶. بررسی کارآیی ترانسفکشن سلولها با پلاسمید گزارشگر pEGFP-N1 به روش الکتروپوریشن _____۱۰۸
شکل ۳-۷. کارآیی ترانسفکشن سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ با استفاده از پلاسمید گزارشگر pEGFP-N1 _____۱۰۹
شکل ۳-۸. انتخاب سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با آنتی بیوتیک جنیتیسین _____۱۱۱
شکل ۳-۹. ترانسفکت کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با پلاسمید pDsRed1N1-hNT-3 _____۱۱۲
شکل ۳-۱۰. مورفولوژی سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان بیان کننده pRNA-U6.1/Hygro-p75 shRNA در زمانهای مختلف پس از افزودن محیط القای عصبی _____۱۱۴
شکل ۳-۱۱. القای تمایز عصبی در سلولهای ترانسفکت شده با pEGFP-N1 _____۱۱۶
شکل ۳-۱۲. بررسی نمونه های RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز _____۱۱۷
شکل ۳-۱۳. نتایج پرایمرهای طراحی شده برای Real-time PCR با RT-PCR سنتی بر روی ژل آگاروز ۲٪ _____۱۱۷
شکل ۳-۱۴. مثالی از رنگ آمیزی DNA با PI _____۱۳۶
شکل ۳-۱۵. سلولهای رنگ آمیزی شده با Annexin-V/PI پس از بررسی در دستگاه فلوسیتومتری_____۱۳۹
شکل ۳-۱۶. برش سوبسترای لومینوژن محتوی توالی DEVD توسط کاسپاز ۳ و ۷ _____۱۴۲
شکل ۳-۱۷. تصاویر فلورسانت و معکوس سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان لیبل شده با DiI _____۱۴۳
شکل ۳-۱۹. تصاویر سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بیان کننده p75 siRNA لیبل شده با DiI در in vivo _۱۴۴
شکل ۳-۲۰ مثالی از آنالیز تصاویر _____۱۴۵