بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای مجید فرش دوستی حق رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون رساله دکتری خود را با عنوان: « بررسی تغییرات اپی ژنتیک در ژنهای DLX5 ، OSX ، RUNX2 و BSP در تمایز استئوبلاستیک سلولهای بنیادی مزانشیمی » در تاریخ ۱۳۹۰/۳/۱۸ 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 راهنمای اصلی	دکتر مهرداد نوروزی نیا	
استاد راهنمای دوم	دکتر یوسف مرتضوی	
استاد مشاور	دکتر مسعود سلیمانی	
استاد مشاور	دکتر سعید کاویانی	
استاد ناظر	دکتر علی اکبر پور فتح اله	
استاد ناظر	دکتر سید جواد مولا	
استاد ناظر	دکتر ناصر امیری زاده	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سعید آبرون	

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 **مجید فرش دوستی** حق دانشجوی رشته **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** ورودی سال تحصیلی **۸۶** 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

۱۳۹۰/۳/۲۳

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 **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** است که در سال **۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **آقایان دکتر مهرداد نوروزی نیا و دکتر یوسف مرتضوی** ، مشاوره **آقایان دکتر مسعود سلیمانی و دکتر سعید کاویانی** 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 **مجید فرش دوستی حق** دانشجوی رشته **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

مجید فرش دوستی حق

۱۳۹۰/۳/۲۳

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

بررسی تغییرات اپی ژنتیک در ژنهای DLX5، OSX، RUNX2 و BSP در تمایز استئوبلاستیک سلولهای بنیادی مزانشیمی

نگارش

مجید فرش دوستی حق

اساتید راهنما

دکتر مهرداد نوروزی نیا

دکتر یوسف مرتضوی

اساتید مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

دکتر سعید کاویانی

بهار ۱۳۹۰

تقدیم به :

اساتید عزیزم که هر چه از خوبیشان بگویم کم گفته ام.

همسر صبور و فداکارم که همیشه حامی و پشتیبانم بوده است.

پدر و مادر عزیزم که هر چه دارم از دعای خیر آنهاست و وجود آنها مایه دلگرمی و امید است.

برادران و خواهرانم که مهربانانه یاریم کردند.

و کلیه سفید پوشان عرصه تشخیص و درمان...

تشکر و قدردانی

با تقدیر و تشکر فراوان از اساتید ارجمند که مرا برای همیشه مرهون خود گرداندند:

جناب آقای دکتر مهرداد نوروزی نیا و جناب آقای دکتر یوسف مرتضوی که با صداقتی بی شائبه در تمام مراحل به ثمر رساندن این رساله مرا راهنمایی و یاری فرمودند.

جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی و جناب آقای دکتر سعید کاویانی که با علو طبع قبول زحمت نموده و یاری رسان من بوده اند .

مدیریت محترم گروه هماتولوژی جناب آقای دکتر سعید آبرون که به حق مساعدتی بی نظیر و دلسوزانه داشتند و از ایشان بسیار آموختم.

ناظرین محترم این رساله (جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح اله ، آقای دکتر سعید آبرون، آقای دکتر سید جواد مولا و آقای دکتر ناصر امیری زاده) که قبول زحمت فرموده و مساعدتی کم نظیر داشتند.

تمامی پرسنل و کارکنان محترم دانشکده، بخصوص گره هماتولوژی (سرکار خانم رهنمایی، خانم شوکتی و سایر دوستان و همکاران).

تمامی مسئولین، محققین و کارکنان بیمارستان صارم مخصوصا جناب آقای دکتر شفقتی و سرکار خانم دکتر بهجتی، آقای باقری زاده و خانم محمودی نیا که مساعدتی کم نظیر داشتند.

و با تقدیر فراوان از دانشجویان گروه هماتولوژی بخصوص آقایان احمد بیگی، آتشی، خمیصی پور، ترفیعی، آزاد، علیزاده، مصاحبی، اله بخشیان، ساکی و سایرین.

و تمامی کسانی که به من آموختند و در پیشرفت و شکوفایی استعدادها تلاش می کنند.

چکیده

فرآیندهای کنترلی در تمایز استئوبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمی هنوز به طور کامل شناخته نشده است. مکانیسم های اپی ژنتیک مخصوصاً متیلاسیون جزایر CpG در پروموتر ژنها به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم های کنترلی در تمایز سلولهای بنیادی مطرح است. در این تحقیق وضعیت متیلاسیون و بیان ژنهای RUNX2، OSX، DLX5 و BSP و وضعیت متیلاسیون تام ژنوم و همچنین تاثیر داروی زولدرونیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت.

پس از جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی، القا تمایز استئوبلاستی با استفاده از محیط تمایزی و زولدرونیک اسید صورت گرفت. استخراج DNA و RNA در هفته اول، دوم و سوم تمایز و همچنین از سلولهای بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته صورت گرفت. وضعیت متیلاسیون اختصاصی ژن با روش MSP، بیان کمّی ژنها با روش quantitative Real Time-PCR و وضعیت متیلاسیون تام ژنوم با استفاده از آنتی بادی بر علیه ۵-متیل سیتوزین ارزیابی شد.

در طول تمایز، RUNX2 و DLX5 در متیلاسیون نسبی، BSP در دمتیلاسیون تام و OSX در وضعیت هیپومتیلاسیون تدریجی قرار داشت. بیان ژنهای RUNX2، OSX، DLX5 و BSP در طول تمایز افزایش پیدا کرد و وضعیت متیلاسیون تام ژنوم تغییر پیدا نکرد. زولدرونیک اسید بر روی متیلاسیون اختصاصی ژن و متیلاسیون تام ژنوم تاثیر نداشت و در عین حال بیان DLX5 و BSP را به طور بارز افزایش داد.

سه الگوی متیلاسیون مختلف در طول تمایز استئوبلاستی در این چهار ژن دیده شد که اهمیت متیلاسیون DNA در تمایز سلولهای بنیادی را بیان می کند. در عین حال تمایز استئوبلاستی با تغییر متیلاسیون تام ژنوم همراه نیست. افزایش بیان ژنهای RUNX2، OSX، DLX5 و BSP در طول تمایز استئوبلاستی نقش متیلاسیون DNA و سایر مکانیسم های اپی ژنتیکی و یا ژنتیکی را نشان می دهد. زولدرونیک اسید تسریع تمایز استئوبلاستی را بواسطه افزایش بیان DLX5 و BSP در مسیری مستقل از متیلاسیون ژن، القا می کند.

کلمات کلیدی: اپی ژنتیک، تمایز استئوبلاستی، سلولهای بنیادی مزانشیمی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. بافت استخوان ۴

۱-۲-۱. ساختار و سازماندهی ماکروسکوپی استخوان ها ۵

۱-۲-۲. سلولهای استخوانی ۶

۱-۲-۲-۱. استئوبلاست ها ۶

۱-۲-۲-۲. استئوسیت ها ۷

۱-۲-۲-۳. استئوکلاست ها ۷

۱-۲-۳. ماتریکس استخوانی ۸

۱-۳. سلولهای بنیادی ۹

۱-۳-۱. سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۱

۱-۳-۱-۱. مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۴

۱-۳-۱-۲. فنوتیپ پیش ساز سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۵

۱-۳-۱-۳. منابع استحصال سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۵

۱-۳-۱-۴. کاربردهای بالینی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۸

۱-۴. تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست ۲۱

۱-۵. فاکتورهای نسخه برداری دخیل در تمایز استئوبلاست ها ۲۳

۱-۵-۱. فاکتور نسخه برداری RUNX2 ..... ۲۳

۱-۵-۱-۱. ژن و پروتئین RUNX2 ..... ۲۵

۱-۵-۱-۲. تنظیم فعالیت RUNX2 ..... ۲۷

۱-۵-۱-۳. پروتئین های واکنشگر با RUNX2 ..... ۳۰

۱-۵-۲. فاکتور نسخه برداری OSTERIX ۳۱

۱-۵-۳. فاکتور نسخه برداری DLX5 ..... ۳۴

۱-۵-۴. سایر فاکتورهای نسخه برداری دخیل در تمایز استئوبلاستی ۳۶
۱-۶. ژنهای شاخص تمایز استئوبلاستی ۴۰
۱-۶-۱. سیالوپروتئین استخوانی (BSP) ۴۰
۱-۶-۲. استئوکلسین ۴۳
۱-۶-۳. استئوپونتین ۴۴
۱-۶-۴. کلاژن تیپ Iα1 ..... ۴۵
۱-۷. مکانیسم های اپی ژنتیکی ۴۷
۱-۷-۱. متیلاسیون DNA و بیان ژن ۴۹
۱-۷-۱-۱. مکانیسم های متیلاسیون در کنترل بیان ژن ها ۵۲
۱-۷-۱-۲. کنترل متیلاسیون DNA ۵۳
۱-۷-۲. وضعیت متیلاسیون DNA در سلولهای بنیادی جنینی ۵۵
۱-۷-۳. الگوی متیلاسیون DNA در تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی ۵۷
۱-۸. روش های بررسی الگوی متیلاسیون DNA ۵۸
۱-۸-۱. PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) ۶۰
۱-۹. استئوپروزیس ۶۱
۱-۱۰. داروی زولدرونیک اسید ۶۴
۱-۱۱. اهداف تحقیق ۶۶

فصل دوم: مواد و روشها ۶۷
۲-۱. مواد و روشها ۶۸
۲-۱-۱. تجهیزات و لوازم مورد استفاده ۶۸
۲-۱-۲. مواد مصرفی مورد استفاده ۷۰
۲-۱-۳. کیت های مورد استفاده ۷۲
۲-۲. آماده کردن محلول ها، بافرها و محیط های مورد استفاده ۷۳
۲-۲-۱. تهیه بافر فسفات (PBS 1X) ۷۳

۲-۲-۲. تهیه بافر تریس- EDTA (TE) ۷۳
۲-۲-۳. تهیه بافر TAE ۷۳
۲-۲-۴. تهیه EDTA نیم مولار ۷۴
۲-۲-۵. تهیه L-گلوتامین ۷۴
۲-۲-۶. تهیه محیط کشت DMEM-Low Glucose ۷۵
۲-۲-۷. تهیه محیط تمایزی استئوبلاستی ۷۵
۲-۳. مطالعات بیوانفورماتیکی ۷۵
۲-۳-۱. بررسی توالی های ژنی و انتخاب جزایر CpG ۷۵
۲-۳-۲. طراحی پرایمر ۷۸
۲-۴. جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان ۸۱
۲-۴-۱. تعیین درصد زنده بودن سلولهای بنیادی مزانشیمی ۸۲
۲-۴-۲. تریپسینه کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی ۸۲
۲-۴-۳. کشت و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی ۸۳
۲-۴-۴. نحوه فریز کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی ۸۴
۲-۴-۵. فلوسیتومتری سلولهای بنیادی مزانشیمی ۸۴
۲-۴-۶. القا تمایز استئوبلاستی در سلولهای بنیادی مزانشیمی ۸۵
۲-۴-۷. تیمار سلولهای بنیادی مزانشیمی با زولدرونیک اسید ۸۵
۲-۴-۸. رنگ آمیزی آلیزارین رد ۸۶
۲-۵. استخراج DNA ۸۶
۲-۶. استخراج RNA ۸۷
۲-۶-۱. حذف آلودگی DNA ژنومی از RNA استخراج شده ۸۸
۲-۷. سنتز cDNA ۸۸
۲-۸. متیله کردن DNA با استفاده از آنزیم Sss1 متیلاز ۹۰
۲-۹. تیمار DNA با سدیم بی سولفیت ۹۰
۲-۹-۱. روش تهیه محلول هیدروکینون ۱۰ mM ۹۱

۲-۹-۲. روش تهیه محلول سدیم بی سولفیت M ۳ ..... ۹۱
۲-۹-۳. روش تهیه محلول آمونیوم استات M ۱۰ ..... ۹۲
۲-۹-۴. روش تهیه گلیکوژن mg/ml ۱۰ ..... ۹۲
۲-۹-۵. روش تهیه سود دو مولار و سه مولار ۹۲
۲-۱۰. PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP) ۹۲
۲-۱۰-۱. MSP با پرایمرهای متیله (M) برای ژنهای RUNX2، OSX، DLX5 و BSP ۹۳
۲-۱۰-۲. MSP با پرایمرهای غیرمتیله (U) برای ژنهای RUNX2، OSX، DLX5 و BSP ۹۶
۲-۱۱. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱۰۰
۲-۱۱-۱. روش تهیه ژل آگارز ۱۰۱
۲-۱۱-۲. روش تهیه بافر TBE ۱۰۱
۲-۱۱-۳. روش الکتروفورز بر روی آگارز ۱۰۲
۲-۱۱-۴. رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و عکسبرداری از ژل ۱۰۲
۲-۱۱-۵. الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰۳
۲-۱۲. تخلیص محصولات PCR جهت توالی یابی ۱۰۴
۲-۱۳. توالی یابی مستقیم محصولات PCR ۱۰۴
۲-۱۴. Real Time-PCR ۱۰۵
۲-۱۴-۱. تعیین غلظت DNA با استفاده از رنگهای فلورسانس ۱۰۶
۲-۱۴-۲. تعیین غلظت DNA با استفاده از شاخص های الیگونوکلئوتیدی فلورسانس ۱۰۷
۲-۱۴-۳. انجام Real Time-PCR نسبی بر روی cDNA ژنهای RUNX2، OSX، DLX5 و BSP ۱۰۷
۲-۱۵. اصول سنجش متیلاسیون کل ژنوم ۱۰۹
۲-۱۵-۱. سنجش تغییرات متیلاسیون کل ژنوم در طول تمایز استئوبلاستی ۱۱۰

فصل سوم: نتایج ۱۱۳

۳-۱. نتایج کنترل کیفی DNA و RNA استخراج شده ۱۱۴

۳-۲. تایید تمایز استئوبلاستیک با رنگ آمیزی آلیزارین رد..... ۱۱۶
۳-۳. نتایج فلوسیتومتری در تایید ماهیت سلولهای بنیادی مزانشیمی..... ۱۱۷
۳-۴. نتایج MSP در تمایز استئوبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی..... ۱۲۰
۳-۴-۱. نتایج MSP ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۲۰
۳-۴-۲. نتایج MSP ژن OSX در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۲۱
۳-۴-۳. نتایج MSP ژن DLX5 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۲۲
۳-۴-۴. نتایج MSP ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۲۴
۳-۵. نتایج MSP در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۵
۳-۵-۱. نتایج MSP ژن RUNX2 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۵
۳-۵-۲. نتایج MSP ژن OSX در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۶
۳-۵-۳. نتایج MSP ژن DLX5 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۷
۳-۵-۴. نتایج MSP ژن BSP در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۸
۳-۶. نتایج توالی یابی محصول MSP با پرایمر M ژن DLX5..... ۱۲۹
۳-۷. نتایج quantitative Real Time-PCR در تمایز استئوبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی..... ۱۳۰
۳-۷-۱. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۱
۳-۷-۲. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن OSX در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۲
۳-۷-۳. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن DLX5 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۴

۳-۷-۴. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۵
۳-۸. نتایج quantitative Real Time-PCR در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۳۷
۳-۸-۱. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن RUNX2 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۳۷
۳-۸-۲. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن OSX در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۳۹
۳-۸-۳. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن DLX5 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۴۰
۳-۸-۴. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن BSP در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۴۲
۳-۹. نتایج سنجش متیلاسیون تام ژنوم در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۴۳
۳-۱۰. نتایج سنجش متیلاسیون تام ژنوم در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۴۴

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها..... ۱۴۵
۴-۱. بحث..... ۱۴۶
۴-۲. پیشنهادها..... ۱۶۱

فهرست منابع..... ۱۶۳
چکیده انگلیسی..... ۱۷۶

فهرست جداول

جدول ۲-۱. مشخصات ژن ها و جزایر CpG منتخب ۷۶

جدول ۲-۲. توالی پرایمرهای متیله و غیر متیله اختصاصی ژن هـای RUNX2 ، OSX، DLX5 و BSP در MSP ۷۹

جدول ۲-۳. توالی پرایمرهای Real Time-PCR اختصاصی ژن هـای RUNX2 ، OSX، DLX5 و BSP ۸۰

جدول ۲-۴. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر M برای ژن RUNX2 ..... ۹۳

جدول ۲-۵. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن RUNX2 ..... ۹۳

جدول ۲-۶. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر M برای ژن OSX ۹۴

جدول ۲-۷. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن OSX ۹۴

جدول ۲-۸. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر M برای ژن DLX5 ..... ۹۵

جدول ۲-۹. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن DLX5 ..... ۹۵

جدول ۲-۱۰. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر M برای ژن BSP ۹۵

جدول ۲-۱۱. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن BSP ۹۶

جدول ۲-۱۲. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر غیر متیله (U) برای ژن RUNX2 ..... ۹۷

جدول ۲-۱۳. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن RUNX2 ..... ۹۷

جدول ۲-۱۴. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر غیرمتیله (U) برای ژن OSX ۹۷

جدول ۲-۱۵. برنامه دمایی MSP با پرایمر غیر متیله (U) برای ژن OSX ۹۸

جدول ۲-۱۶. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر غیرمتیله (U) برای ژن DLX5 ..... ۹۸

جدول ۲-۱۷. برنامه دمایی MSP با پرایمر غیرمتیله (U) برای ژن DLX5 ..... ۹۹

جدول ۲-۱۸. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر غیر متیله (U) برای ژن BSP ۹۹

جدول ۲-۱۹. برنامه دمایی MSP با پرایمر غیر متیله (U) برای ژن BSP ۱۰۰

جدول ۲-۲۰. مواد و مقادیر واکنشی quantitative Real Time-PCR با پرایمرهای اختصاصـی برای ژنهای RUNX2، OSX، DLX5 و BSP ۱۰۸

جدول ۲-۲۱. برنامه دمایی quantitative Real Time-PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژنهای RUNX2، OSX، DLX5 و BSP..... ۱۰۸
جدول ۳-۱. غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن در OD (260/280) و OD (260/230).... ۱۱۵
جدول ۳-۲. غلظت RNA استخراج شده و خلوص آن در OD (260/280) و OD (260/230).... ۱۱۶
جدول ۳-۳. درصد متیلاسیون تام ژنوم در قبل و بعد از تیمار با محیط تمایزی (DM) و داروی زولدرونیک اسید (ZA)..... ۱۴۴

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۱
نمودار ۳-۲. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن OSX در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۳
نمودار ۳-۳. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن DLX5 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۴
نمودار ۳-۴. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۶
نمودار ۳-۵. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۳۸
نمودار ۳-۶. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن OSX در طول تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۳۹
نمودار ۳-۷. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن DLX5 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۴۱
نمودار ۳-۸. نتایج quantitative Real Time-PCR ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۴۲

فهرست شکل‌ها

شکل ۲-۱. موقعیت شماتیک CpG Island منتخب در ژن RUNX2..... ۷۶

شکل ۲-۲. موقعیت شماتیک CpG Island منتخب در ژن OSX..... ۷۷

شکل ۲-۳. موقعیت شماتیک CpG Island منتخب در ژن DLX5..... ۷۷

شکل ۲-۴. موقعیت شماتیک CpG Island منتخب در ژن BSP..... ۷۸

شکل ۳-۱. الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز جهت کنترل کیفیت و تمامیت (Integrity)..... ۱۱۴

شکل ۳-۲. الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز جهت کنترل کیفیت و تمامیت (Integrity) و همچنین مشاهده باندهای ۱۸S و ۲۸S..... ۱۱۵

شکل ۳-۳. رنگ آمیزی آلیزارین رد..... ۱۱۷

شکل ۳-۴. هیستوگرام اندازه و گرانولیتی و کنترل های منفی در فلوسیتومتری سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی..... ۱۱۸

شکل ۳-۵. هیستوگرام بیان مارکرهای CD۴۴، CD۱۶۶، CD۱۳ و CD۱۰۵ در سلولهای بنیادی مزانشیمی..... ۱۱۹

شکل ۳-۶. هیستوگرام عدم بیان مارکرهای CD۳۴ و CD۴۵ در سلولهای بنیادی مزانشیمی..... ۱۱۹

شکل ۳-۷. نتایج MSP با پرایمرهای متیله و غیر متیله بر روی ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۲۰

شکل ۳-۸. نتایج MSP با پرایمرهای متیله و غیر متیله بر روی ژن OSX در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۲۱

شکل ۳-۹. نتیجه MSP با پرایمر متیله ژن OSX بر روی سلولهای بنیادی مزانشیمی بعد از تمایز در روز های ۲، ۴، ۶ و ۷ تمایز..... ۱۲۲

شکل ۳-۱۰. نتیجه MSP با پرایمر متیله بر روی ژن DLX5 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۲۳

شکل ۳-۱۱. نتیجه MSP با پرایمر غیر متیله بر روی ژن DLX5 در طول تمایز استئوبلاستی

با محیط تمایزی..... ۱۲۳
شکل ۳-۱۲. نتایج MSP با پرایمرهای متیله و غیر متیله بر روی ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۲۴
شکل ۳-۱۳. نتایج MSP با پرایمرهای متیله و غیر متیله بر روی ژن RUNX2 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۶
شکل ۳-۱۴. نتایج MSP با پرایمرهای متیله و غیر متیله بر روی ژن OSX در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۷
شکل ۳-۱۵. نتایج MSP با پرایمرهای متیله و غیر متیله بر روی ژن DLX5 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۸
شکل ۳-۱۶. نتایج MSP با پرایمرهای متیله و غیر متیله بر روی ژن BSP در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۲۹
شکل ۳-۱۷. نتایج توالی یابی محصول MSP با پرایمر M ژن DLX5..... ۱۳۰
شکل ۳-۱۸. منحنی Melting و Dissociation در quantitative Real Time-PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۲
شکل ۳-۱۹. منحنی Melting و Dissociation در quantitative Real Time-PCR ژن OSX در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۳
شکل ۳-۲۰. منحنی Melting و Dissociation در quantitative Real Time-PCR ژن DLX5 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۵
شکل ۳-۲۱. منحنی Melting و Dissociation در quantitative Real Time-PCR ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۱۳۶
شکل ۳-۲۲. منحنی Melting و Dissociation در quantitative Real Time-PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۳۸
شکل ۳-۲۳. منحنی Melting و Dissociation در quantitative Real Time-PCR ژن OSX در طول تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۴۰
شکل ۳-۲۴. منحنی Melting و Dissociation در quantitative Real Time-PCR ژن DLX5 در

طول تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۴۱
شـکل ۳-۲۵. منحنـی Melting و Dissociation در quantitative Real Time-PCR ژن BSP در
طول تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید..... ۱۴۳