بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ دریافت درجه دکتری عمومی

عنوان:

جداسازی و کشت اولیه سلولهای ستیغ عصبی جنین جوجه

استاد راهنما:

دکتر محسن سقا

استاد مشاور:

دکتر محمد قاسم گل محمدی

نگارش:

مریم متین

تابستان ۱۳۹۴

شماره پایان نامه

پنجه مریم

رسته در شکاف هسته ای

این همه رنج از کجا آورده ای تا بشکوفی

قطره قطره شکوفه از سر صخره گرد آورده ام

از گلبرگ های سرخ دستمالی بافته ام

تا آفتاب هدیه کنم

تقدیم به پدر و مادر عزیزم که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم.
امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما .

تقدیم به برادران عزیزم مهدی و علی

که با هم آغاز کردیم، در کنار هم آموختیم و به امید هم به آینده چشم می دوزیم ، قلبم لبریز از عشق به شماست و خوشبختی تان منتهای آرزویم.

و این پایان نامه را به استاد گرامیم جناب آقای دکتر سقا که در کمال سعه ی صدر، با حسن خلق و فروتنی از هیچ کمکی در این عرصه دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند تقدیم می کنم.

سپاس

خداوند متعال را شاکرم که با لطف و کرمش در مسیر علم و دانش قدم نهادم . با پایان هفت سال تـلاش و هفت سال تلاطم باید که گفت : ما در اول وصف تو مانده ایم.

از استاد گرامیم جناب آقای دکتر سقا بسیار سپاسگزارم چرا که بدون راهنماییهای ایشان تامین این پایـان نامه بسیار مشکل مینمود. و محبت های بی دریغ ایشان انجام این کار را برایم آسان گردانید.

از زحمات استاد مشاورم جناب آقای دکتر گلمحمدی صمیمانه سپاسگزارم و از خداوند متعال سـلامتی و سربلندی برایشان خواستارم.

بر خود واجب می دانم از اساتید محترم جناب آقای دکتر ماذنی ،جناب آقای دکتـر نجـف زاده و جنـاب آقای دکتر نیاپور که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند کمال تشکر را داشته باشم.

مریم متین

پاییز ۹۴

چکیده

جداسازی و کشت اولیه سلولهای ستیغ عصبی جنین جوجه

سابقه و هدف: دسترسی به سلولهای ستیغ عصبی در محیط آزمایشگاهی می تواند مدلی برای بررسی نحوه مهاجرت و تمایز این سلولها در محیط In Vivo باشد.همچنین فرصتی فراهم می کند تا تعاملات سلولی و نحوه تاثیر ترکیبات دارویی و مورفوژنی را در آن بهتر بررسی کنیم. لذا در این بررسی برآنیم تا با توجه به در دسترس بودن وآسانی جداسازی بافت های جنین جوجه و مناسب بودن آن برای بررسی فرآیندهای تکوینی از این مدل آزمایشگاهی برای جداسازی و تعیین خصوصیت سلول های ستیغ عصبی استفاده کنیم.

مواد و روش: تخم مرغ های نطفه دار حدود ۴۰ساعت در دمای ۳۸درجه و رطوبت نسبی ۵۵-۶۰ درصد در داخل انکوباتور قرار داده شدند تا جنین ها به مرحله ۱۲-۱۴بر طبق جدول تکاملی Hamburger-Hamilton برسند. سپس جنین های روی سطح زرده تخم مرغ جداسازی شده و بخش لوله عصبی از آنها جدا شد. سپس این لوله عصبی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد تا سلولهای ستیغ عصبی را آزاد کند. پس از ۲۴ ساعت لوله عصبی از محیط کشت جدا شد و سلولهای ستیغ عصبی موجود در کف ظروف کشت به مدت ۵ روز کشت داده شدند تا تکثیر یابند. سپس سلولها جمع آوری شده به داخل محلول ترایزول انتقال یافتند و پس از استخراجTotal RNA سنتز cDNA صورت گرفت و با انجام PCR تکثیر ژن های موردنظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی شد.

نتایج:نتایج ما نشان داد که لوله عصبی قادر به آزاد سازی سلولهای ستیغ عصبی در محیط کشت می باشد که با تعدیل این محیط کشت سلولها تواتایی تکثیر در محیط آزمایشگاهی را دارند.همچنین سلولهای ستیغ عصبی نشانگر های نشان دهنده هویت این سلولها از جمله *Sox9,Sox10,Slug* را بیان کردند که از طریق RT-PCRبیان ژن های ذکرشده اثبات شد.

نتیجه گیری:لوله عصبی توانایی آزادسازی سلولهای ستیغ عصبی را دارند و در صورت وجود محیط کشت غنی سلولهای ذکرشده قابلیت تکثیر در محیط را خواهند داشت.

واژگان کلیدی:سلول های ستیغ عصبی-جنین جوجه-Slug- لوله عصبی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و بیان مسئله

۱-۱.مقدمه و بیان مسئله ۲

۱-۲.اهداف کلی و جزئی ۵

۱-۳. فرضیات ۵

فصل دوم: بررسی متون

۲-۱.تکوین اولیه جنین ۷

۲-۲.گاسترولاسیون و شکل گیری اولیه لایه های زاینده جنینی ۷

۲-۳.تکوین اولیه صفحه عصبی ۹

۲-۴.شکل گیری مزودرم جنینی ۱۰

۲-۵.نوتوکورد ۱۲

۲-۶.روند القا و تشکیل اعضا در جنین ۱۲

۲-۷مولکولهای ریخت زا ۱۳

۲-۷-۱.FGF ۱۳

۲-۷-۲.WNT ۱۴

۲-۷-۳.TGF ۱۴

۲-۷-۳-۱.BMP ۱۵

۴-۷-۲.SHH ۱۵

۵-۷-۲.RA ۱۵

۸-۲.تنظیم ملکولی تمایز عصبی در لوله عصبی ۱۶

۹-۲.سلولهای ستیغ عصبی ۱۷

۱۰-۲.انواع سلولهای ستیغ عصبی ۲۰

۱-۱۰-۲.انواع سلولهای ستیغ عصبی سری ۲۰

۲-۱۰-۲. سلول های ستیغ عصبی واگال ۲۰

۱-۲-۱۰-۲. سلول های ستیغ عصبی قلبی ۲۰

۳-۱۰-۲. انواع سلولهای ستیغ عصبی تنه ای ۲۰

۴-۱۰-۲. انواع سلولهای ستیغ عصبی لومبوساکرال ۲۱

۱۱-۲.تنظیم ملکولی القای ستیغ عصبی ۲۲

۱۲-۲.ناهنجاری های بالینی مرتبط با سلولهای ستیغ عصبی ۲۵

۱۳-۲.جداسازی سلولهای ستیغ عصبی از شلولهای بنیادی جنینی انسانی ۲۶

فصل سوم: شیوه اجرای تحقیق

۱-۳.نوع پژوهش ۲۸

۲-۳.جمعیت مورد مطالعه ۲۸

۳-۳.نمونه برداری و روش نمونه گیری ۲۸

۱-۳-۳.فهرست تجهیزات و مواد مصرفی ۲۸

۲-۳-۳.روشها ۳۱

۱-۲-۳-۳.انکوباسیون تخم مرغ و جداسازی جنین جوجه از تخم مرغ ۳۱

۳-۳-۳.نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلیمراز ۳۳

۱-۳-۳-۳.استخراج RNA..... ۳۴

۲-۳-۳-۳تعیین غلظت RNAاستخراج شده..... ۳۵

۳-۳-۳-۳.استخراج cDNA..... ۳۵

۱-۳-۳-۳-۳.مراحل انجام کار..... ۳۵

۴-۳-۳-۳.PCR..... ۳۶

۵-۳-۳-۳.تهیه ژل آگارز..... ۳۸

۱-۵-۳-۳-۳.طرز تهیه بافر TBE..... ۳۸

۲-۵-۳-۳-۳.طرز تهیه بافر EDTA..... ۳۸

۴-۳-۳.الکتروفورز محصول PCR..... ۳۹

فصل چهارم: نتایج و یافته ها

۱-۴.یافته های کشت سلولی..... ۴۱

۱-۱-۴.کشت اولیه لوله عصبی جداشده از جنین جوجه..... ۴۱

۲-۱-۴.تکثیر سلولهای ستیغ عصبی..... ۴۲

۳-۱-۴.تولید سلولهای شبه ملانوسیت از سلولهای ستیغ عصبی در محیط کشت..... ۴۳

۲-۴.نتایج RT-PCR..... ۴۳

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۱-۵. بحث ۴۶

۲-۵. نتیجه گیری ۵۲

۳-۵. پیشنهادات ۵۲

منابع ۵۴

چکیده انگلیسی ۵۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۳.فهرست مواد مصرفی ۲۸

جدول۲-۳.فهرست تجهیزات مصرفی..... ۲۹

جدول۳-۳.مراحل تکوین جنین جوجه بر اساس مدل هامبورگر-هامیلتون ۳۲

جدول۴-۳.فهرست پرایمرهای مورد استفاده همراه با تعداد جفت بازها(Base pair;bp)،

دمای Annealing..... ۳۷

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۲.تشکیل سه لایه زایا طی گاسترولاسیون..... ۸

شکل۲-۲.تصویر شماتیک از سومایت و بافت های اطراف آن ۱۱

شکل ۳-۲تصویر شماتیک تشکیل سلولهای ستیغ عصبی..... ۱۸

شکل ۴-۲.تصویر شماتیک مهاجرت سلولهای ستیغ عصبی..... ۱۹

شکل ۵-۲.محدوده تشکیل سلولهای ستیغ عصبی..... ۲۱

شکل۶-۲.پیوند سلولهای ناحیه واگال به تنه ای و بالعکس..... ۲۲

شکل۷-۲.تصویر شماتیک پیام رسانی تمایزی سلولهای ستیغ عصبی ۲۴

شکل۱-۳.انکوبه کردن تخم مرغ ها..... ۳۱

شکل۲-۳.جنین جوجه و لوله عصبی جداشده ۳۳

شکل۱-۴.کشت اولیه لوله عصبی ۴۱

شکل ۲-۴.مورفولوژی چندوجهی سلولهای ستیغ عصبی..... ۴۲

شکل ۳-۴.کشت سلولهای شبه ملانوسیت..... ۴۳

شکل ۴-۴.RT-PCR..... ۴۴

فهرست اختصارات

SHH	Sonic hedgehog
FGF	Fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
RA	Retinoic acid
TGF-β	Transforming growth factor β
PSM	Presomitic mesoderm
PBS	Phosphate buffer sulfate
L15	Leibovit'z 15
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal Bovine Serum
Pen/Strep	Penicillin / streptomycin
RT-PCR	Reveres transcription- polymerase chain reaction
TBE	Tris borate EDTA
NT	Neural Tube
Sox	SRY-related HMG-box