بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکي وخدمات بهداشتي، درماني استان اردبيل
دانشکده پزشکی

پایان‌نامه جهت اخذ دریافت درجه دکتری عمومی

عنوان:

جداسازی و تعیین خصوصیت ناحیه دمی لوله عصبی جنین جوجه به روش RT-PCR

استاد راهنما:
دکتر محسن سقا

استاد مشاور:
دکتر محمد قاسم گل محمدی
دکتر نوروز نجف زاده

نگارش:
الناز پیرموذن

پاییز ۱۳۹۴

شماره پایان نامه

چکیده

جداسازی و تعیین هویت سلول های ناحیه دمی لوله عصبی جنین جوجه به روش RT-PCR

سابقه و هدف: در طی فرآیند نورون زایی در مهره داران، صفحه عصبی خلفی که شامل منطقه بنیادی است، بسته نمی شود. این وضعیت باعث تطابق با طویل شدن محور بدن می گردد تا نخاع در حال تکوین را بسازد. جمعیت سلولی واقع در انتهایی ترین بخش طناب نخاعی دارای ویژگی دوگانه مزودرمی/عصبی هستند. بسته به این که به بخش های قدامی صفحه عصبی خلفی جابجا شوند و یا اینکه طی گاسترولاسیون به مزودرم پیش سوماتی زیرین تبدیل شوند. به دنبال ترشح FGF از مزودرم پیش سومایتی سلول های واقع در این صفحه در حالت تکثیری باقی می مانند. زمانیکه سلول ها به نواحی قدامی تر به سمت لوله عصبی بسته جابجا می شوند تحت تاثیر اسید رتینوئیک ترشح شده از سومایت به نورون تمایز پیدا می کنند. هدف از این مطالعه تعیین هویت ناحیه خلفی صفحه عصبی و ارزیابی سلول های این منطقه بعد از جداسازی بود.

مواد و روش: تخم مرغ های نطفه دار حدود ۲۸-۳۳ ساعت در دمای ۳۵-۳۷ درجه و رطوبت نسبی ۵۰-۶۰ درصد در داخل انکوباتور قرار داده شدند تا جنین ها به مرحله ۸-۹ بر طبق جدول تکوینی Hamburger-Hamilton برسند. سپس جنین های روی سطح زرده تخم مرغ جداسازی شده و بخش خلفی صفحه عصبی از آنها جدا شد. سپس سلولها به داخل محلول ترایزول انتقال یافتند و پس از استخراج Total RNA سنتز cDNA صورت گرفت و با انجام PCR تکثیر ژن های موردنظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. بخشی از بافت های جدا شده به ظروف کشت ۲۴ خانه ای حاوی محتوی DMEM/F12$^{+Glutamax}$ +10%FBS + 1%NEAA+1%Pen/Strep انتقال داده شده و به مدت ۱۱ روز کشت داده شدند.

نتایج: نتایج ما نشان داد که سلولهای ناحیه خلفی بافت عصبی در محیط کشت تواتایی تکثیر و تبدیل به سلول هایی با ظاهر نورونی را دارند. همچنین این سلول ها نشانگر های نشان دهنده هویت منطقه خلفی عصبی از جمله *Pax3*، *Delta-*

1، *Brachyury*، *Sox2* را بیان کردند که از طریق RT-PCR بیان ژن های ذکرشده اثبات شد.
نتیجه گیری: سلولهای ناحیه دمی لوله عصبی جنین جوجه در منطقه خلفی عصبی از هویت دوگانه مزودرمی - عصبی برخوردار بوده و به دنبال جدا شدن از مزودرم زیرین توانایی تکثیری خود را از دست داده و هویت نورونی پیدا می کنند.
واژگان کلیدی: صفحه عصبی خلفی ،جنین جوجه، 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: بررسي متون

۲-۱.تکوین اولیه جنین ۸

۲-۲.گاسترولاسیون و شکل گیری اولیه لایه های زاینده جنینی ۸

۲-۳.تکوین اولیه صفحه عصبی ۱۰

۲-۴.شکل گیری مزودرم جنینی ۱۴

۲-۵.نوتوکورد ۱۵

۲-۶.نورولاسیون ثانویه ۱۶

۲-۷.روند القا و تشکیل اعضا در جنین ۱۸

۸-۲مولکولهای ریخت زا ۱۸
۱-۸-۲.FGF ۱۸
۲-۸-۲.WNT ۱۹
۳-۸-۲.TGF ۲۰
۱-۳-۸-۲.BMP ۲۰
۴-۸-۲.SHH ۲۰
۵-۸-۲.RA ۲۱
۹-۲.تنظیم مولکولی صفحه عصبی خلفی در لوله عصبی.. ۲۱
۱۰-۲ . تنظیم ملکولی در تشکیل سومایت ۳۲
۱۱-۲. ناهنجاری های بالینی مرتبط با سلول های صفحه عصبی خلفی ۳۳

فصل سوم: شیوه اجراي تحقیق

۱-۳.نوع پژوهش ۳۵
۲-۳.جمعیت مورد مطالعه ۳۵
۳-۳.نمونه برداری و روش نمونه گیری ۳۵
۱-۳-۳.فهرست تجهیزات و مواد مصرفی ۳۵
۲-۳-۳.روشها ۳۷
۱-۲-۳-۳.انکوباسیون تخم مرغ و جداسازی جنین جوجه از تخم مرغ ۳۷
۳-۳-۳.نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۰
۱-۳-۳-۳.استخراج RNA ۴۱
۲-۳-۳-۳تعیین غلظت RNAاستخراج شده ۴۲
۳-۳-۳-۳.استخراج cDNA..... ۴۲
۱-۳-۳-۳-۳.مراحل انجام کار ۴۲
۴-۳-۳-۳.PCR..... ۴۳

۵-۳-۳-۳.تهیه ژل آگارز ۴۵
۱-۵-۳-۳-۳.طرز تهیه بافر TBE..... ۴۵
۲-۵-۳-۳-۳.طرز تهیه بافر EDTA ۴۵
۴-۳-۳. الکتروفورز محصول PCR..... ۴۶
فصل چهارم: نتایج و یافته ها
۱-۴.موقعیت صفحه عصبی خلفی جنین ۴۸
۲-۴. کشت اولیه صفحه عصبی خلفی جدا شده از جنین جوجه ۵۰
۳-۴.نتایج RT-PCR ۵۲
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیري
۱-۵. بحث ۵۵
۲-۵. نتیجه گیری ۶۰
۳-۵. پیشنهادات ۶۰
منابع ۶۲
چکیده انگلیسی ۶۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۳.فهرست مواد مصرفی ۳۵

جدول۲-۳.فهرست تجهیزات مصرفی ۳۶

جدول۳-۳.مراحل تکوین جنین جوجه بر اساس مدل هامبورگر-هامیلتون ۳۸

جدول۴-۳.فهرست پرایمرهای مورد استفاده همراه با تعداد جفت بازها (Base pair;bp) ، دمای Annealing ۴۴

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۲.تشکیل سه لایه زایا طی گاسترولاسیون ۹

شکل ۲-۲.تغییر مکان سلول ها از منطقه بنیادی تا لوله عصبی در طی طویل شدن نخاع ۱۳

شکل۳-۲.تصویر شماتیک از سومایت و بافت های اطراف آن ۱۵

شکل ۴-۲.نورولاسیون ثانویه در جنین جوجه. ۱۷

شکل ۵-۲.تاثیر مسیر سیگنال دهی Delta-Notch در انتهای دمی طناب نخاعی ۲۷

شکل ۶-۲.مراحل شکل گیری و تشکیل صفحه عصبی خلفی. . ۲۸

شکل ۷-۲.محدوده بیان Pax3 در صفحه عصبی خلفی..... ۳۰

شکل۱-۳. انکوبه کردن تخم مرغ ها ۳۸

شکل۲-۳.جنین جوجه و صفحه عصبی خلفی جداشده ۴۰
شکل۱-۴.موقعیت صفحه عصبی خلفی جنین ۴۹
شکل ۲-۴.کشت اولیه منطقه بنیادی..... ۵۱
شکل ۳-۴.RT-PCR ۵۳

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
CNP	Caudal Neural Plate
TBE	Tris borate EDTA
NT	Neural Tube
Sox	SRY-related HMG-box