



دانشگاه تهران

دانشکده زیست شناسی

بررسی بیان فاکتور $TGF-\beta 1$ در مایع مغزی نخاعی کودکان
مبتلا به هیدروسفالی و میلو مننژوسل

اساتید راهنما: دکتر علیرضا ساری
دکتر محمد نبیونی

استاد مشاور: دکتر بهمن زینلی

نگارش: میثم یزدان خواه

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی علوم
جانوری گرایش تکوینی

بهمن ۸۷

فهرست مطالب

شماره صفحه

عنوان

فصل اول - مقدمه

- ۱-۱- هیدروسفالی ۲
- ۱-۱-۱- طبقه‌بندی هیدروسفالی ۲
- ۲-۱- نقش CSF در پاتوژنز هیدروسفالی ۵
- ۳-۱- نواقص لوله عصبی ۱۰
- ۱-۳-۱- ناهنجاری آرنولدکیاری ۱۲
- ۴-۱- نقش CSF در رشد و نمو مغز ۱۴
- ۱-۴-۱- ترکیب CSF در طول رشد و نمو مغز ۱۵
- ۲-۴-۱- کشیدن CSF ۱۸
- ۳-۴-۱- مهار فاکتورهای رشد در CSF و نیز تاثیر آن بر محیط کشت ۱۹
- ۵-۱- معرفی فوق خانواده TGF- β 1 ۲۱
- ۱-۵-۱- اعضای خانواده TGF- β 1 بیان آنها در CNS ۲۱
- ۲-۵-۱- پراکنندگی رسپتورهای TGF- β 1 در CNS ۲۳
- ۳-۵-۱- مسیر انتقال سیگنال ۲۴
- ۶-۱- اهداف اصلی تحقیق ۲۷

فصل دوم- مواد و روش ها

- ۲۸ ۱-۲- نمونه گیری
- ۲۹ ۲-۲- روش برادفورد
- ۲۹ ۳-۲- مطالعه پروتئین ها به روش الکتروفورز
- ۳۰ ۱-۳-۲- الکتروفورز به روش SDS- Page در سیستم نا پیوسته
- ۳۳ ۲-۳-۲- مراحل تهیه ژل SDS- PAGE
- ۳۴ ۳-۳-۲- آماده سازی نمونه های مایع معزی-نخاعی آن ها تزریق در ژل
- ۳۵ ۴-۲- نحوه رنگ آمیزی ژل به روش رنگ آمیزی نیترات نقره
- ۳۶ ۵-۲- الایزا (ELISA)

فصل سوم: نتایج

- ۳۸ ۱-۳- بررسی محتوای غلظت کل پروتئین موجود در CSF
- ۴۱ ۲-۳- نتایج حاصل از الکتروفورز
- ۴۳ ۳-۳- بررسی میزان بیان فاکتور TGF- β 1 در CSF
- ۴۶ ۴-۳- میزان بیان فاکتور TGF- β 1 در نمونه های سرم بیمار و کنترل
- ۴۷ ۵-۳- ارتباط محتوای غلظت کل پروتئین موجود در CSF با میزان بیان TGF- β 1

فصل چهارم: بحث و تفسیر

۴-۱- تفسیر نتایج و ارتباط بین آن‌ها	۴۹
۴-۲- ارتباط بین افزایش بیان TGF- β 1 با گلیوزیس در بیماران هیدروسفالی	۵۱
۴-۳- افزایش فشار CSF، هیپوکسی و بیان TGF- β 1	۵۱
۴-۴- ارتباط بیان TGF- β 1 و فاکتورهای نوروتروفیک	۵۲
۴-۴- خاصیت آنتی آپوپتوزیس TGF- β 1 و هیدروسفالی	۵۵
۴-۵- اهمیت TGF- β 1 در القای فیبروزیس و هیدروسفالی	۵۵
۴-۶- دو نظریه در ارتباط با بیان TGF- β 1 و نازکی کورتکس در کودکان مبتلا به هیدروسفالی	۵۷
نتیجه گیری	۶۰
پیشنهادات	۶۱
منابع	۶۲

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

چکیده

هیدروسفالی در اثر تجمع مایع مغزی- نخاعی (CSF) در بطن ها ایجاد می شود. مییلومننگوسل یک نقص شایع لوله عصبی می باشد که در اثر نقص هایی در نورولاسیون در مراحل ابتدایی دوران جنینی ایجاد می شود. هیدروسفالی یکی از علائم شایعی است که با مییلومننگوسل همراه است. CSF شامل فاکتورهای رشد و سایتوکین هایی می باشد که در نوروون زایی و تمایز سلول های عصبی اهمیت دارد. الگوی بیان این فاکتورها در CSF در طی بیماری های عصبی مختلف، مثل مالتیپل اسکلروزیس، آلزایمر و پارکینسون تغییر می کند. در مورد محتویات پروتئینی CSF بیماران مبتلا به هیدروسفالی و مییلومننگوسل اطلاعات کمی در دسترس می باشد. نمونه های مایع مغزی- نخاعی از فضای بطنی و ناحیه کمری بیماران مبتلا به هیدروسفالی $n=16$ و مییلومننگوسل $n=14$ در طی عمل جراحی به دست آمدند. از CSF کودکان مشکوک به مننژیت که نتیجه کشت آنها منفی شده بود به عنوان گروه کنترل $n=20$ استفاده شد. به وسیله جداسازی الکتروفورتیک و رنگ آمیزی نیترات نقره مشخص شد که الگوی بیان یک سری از پروتئین ها در بیماران با گروه کنترل تفاوت نشان می دهد. بانندی که مربوط به وزن مولکولی فاکتور رشد $TGF - \beta_1$ بود، در الگوهای الکتروفورتیک نمونه های بیمار نسبت به نمونه های کنترل تفاوت قابل ملاحظه ای نشان داد. از طرف دیگر از آنجاییکه فاکتور $TGF - \beta_1$ به عنوان یکی از مهمترین عوامل القاء کننده هیدروسفالی شناخته شده است. میزان بیان این فاکتور در CSF با استفاده از کیت الایزا (DB100, R&D system) بررسی شد. نتایج این آزمایش نشان داد که محتوی پروتئینی مایع مغزی- نخاعی بیماران در مقایسه با کودکان سالم تفاوت معنی داری را نشان می دهد و بررسی بیشتر این تفاوت ها از طریق شناسایی پروتئین های موجود در این باندها می تواند منجر به شناسایی مکانیسم های مولکولی موثر در پاتوژنز بیماری شود. افزایش بیان فاکتور $TGF - \beta_1$ در مایع مغزی- نخاعی کودکان مبتلا به هیدروسفالی و مییلومننگوسل نتایج قبلی را در ارتباط با نقش $TGF - \beta_1$ در پاتوژنز بیماری هیدروسفالی بویژه در مدل های آزمایشگاهی تایید می کند.

کلمات کلیدی: هیدروسفالی، مییلومننگوسل، مایع مغزی- نخاعی، الگوی الکتروفورتیک،

$TGF - \beta_1$

۱-۱- هیدروسفالی

هیدروسفالی از واژه های یونانی هیدرو (hydro) به معنای آب و سفالوس (cephalus) به معنای سر مشتق شده است. هیدروسفالی هنگامی رخ می دهد که مایع مغزی- نخاعی (fluid, CSF) در بطن ها و یا فضای زیر عنکبوتیه مغز جمع شود. افزایش فشار درون جمجمه ای (cerebrospinal pressure) در این حالت می تواند ناشی از تولید بیش از حد معمول CSF (برای مثال در پاپیلوماى شبکه ی کورویید)، مسدود شدن مسیر جریان CSF و یا نقص در عملکرد ساختارهای مسئول باز جذب CSF باشد. هیدروسفالی حدودا در ۱ کودک از ۱۰۰۰ کودک متولد شده مشاهده می شود، عوامل مختلفی مانند تومورهای مغزی و ضربه مغزی نیز می تواند باعث بروز این بیماری پس از تولد شوند (Bagley, 1997).

۱-۲- طبقه بندی هیدروسفالی

اگرچه هیدروسفالی می تواند بواسطه ی تولید غیر طبیعی CSF (بعنوان مثال تومورهای شبکه کورویید) رخ دهد ولی معمولا هیدروسفالی هنگامی رخ می دهد که مسیر خروج CSF از مغز به گونه ای مسدود شود. جراحان مغز و اعصاب هیدروسفالی را براساس زمان و چگونگی رخ دادن آن به انواع مادرزادی (congenital) و اکتسابی (acquired)؛ و با توجه به این که در باز جذب CSF نقضی رخ داده باشد یا اینکه خروج CSF از بطن ها مسدود شده باشد به انواع ارتباطی (communicating) و انسدادی (non-communicating) تقسیم بندی می کنند (Pattisapu et al., 2001). نوع دیگری از هیدروسفالی موسوم به هیدروسفالی با فشار طبیعی وجود دارد که از این سیستم طبقه بندی مستثنی است. این اصطلاح برای شرایط متنوعی که در آن ها بطن ها بزرگ می شوند ولی افزایش فشار درون جمجمه ای رخ نمی دهد، استفاده می شود. شرایطی مثل آلزایمر و آتروفی بافت مغز می توانند باعث بروز این چنین حالتی شوند (Johanson et al., 2004). برخی از اصطلاحات دیگر نیز ممکن است برای توصیف حالت خاصی از هیدروسفالی بکار برده شوند مثل aqueduct stenosis (مسدود شدن کانال Sylvius) که می تواند به وسیله ی یک کیست رخ دهد ولی در کل به آن هیدروسفالی غیر ارتباطی می گویند (Harrington et al., 1996).

۱-۲-۱- هیدروسفالی مادرزادی (congenital hydrocephalus)

وقتی که منشا هیدروسفالی یک نقص پیش از تولد یا ناهنجاری مغزی باشد که مقاومت در برابر خروج CSF را افزایش دهد به آن هیدروسفالی مادرزادی می‌گویند (Pattisapu et al., 2001).

فاکتورهای مختلفی می‌توانند باعث هیدروسفالی مادرزادی شوند مانند:

۱- *Toxoplasmosis*: *T.gondii* یک انگل تک سلولی است که از طریق گوشت و خاک آلوده یا تماس مستقیم با حیوانات منتقل می‌شود.

۲- *Cytomegalovirus* (CMV): یک ویروس متعلق به خانواده هرپس ویروس‌ها است و علائمی شبیه به سرماخوردگی معمولی پس از تولد ایجاد می‌کند.

۳- *Rubella* ویروس: که باعث ایجاد سرخک می‌شود و در اثر آن ناهنجاری‌های جنینی مختلفی ایجاد می‌شود که یکی از آن‌ها هیدروسفالی است.

۴- هیدروسفالی وابسته به کروموزوم X: یک نارسایی وراثتی است که در اثر یک ژن غیر طبیعی بر روی کروموزوم X نوزادان پسر ایجاد می‌شود. بنابراین این بیماری فقط توسط مادر به نسل بعد منتقل می‌شود (Harrington and Merril., 1988).

هیدروسفالی مادرزادی معمولاً همراه با سایر نارسایی‌های دستگاه عصبی مرکزی است. پس از یک مطالعه طولانی ۱۷ ساله سه نارسایی مادرزادی نورولوژیک دیگر در ارتباط با هیدروسفالی شناسایی شد: انسفالی (anencephaly)، *spina bifida* و انسفالوسل (encephalocles) (Harrington and Merril., 1988). از ۳۷۰ نوزاد متولد شده با این نارسایی‌ها فقط ۱۰/۵ درصد (۳۹ نفر) تا سال ۱۹۹۰ زنده بودند (Wiswell et al., 1990).

اگر چه هیدروسفالی می‌تواند به دلایل متنوعی ایجاد شود، هیدروسفالی مادرزادی اغلب بخشی از سایر اختلالات نورولوژیک و ناهنجاری‌های مادرزادی است. اختلالاتی که هیدروسفالی همراه آن‌ها رخ می‌دهد به ترتیب فراوانی عبارتند از:

۱- نقص‌های لوله عصبی (Neural tube defects, NTDs) مثل *Spina bifida*

۲- ناهنجاری‌های Chiari (Chiari malformations)

۳- سندروم Dandy Walker (بزرگ شدن بطن چهارم و عدم تکوین بخش ورمیس مخچه)

۴- ناهنجاری Vein of galen

۵- هیدرانسفالی (عدم پیدایش نیمکره های مغز)

۶- *Craniosynostosis* (بسته شدن زود هنگام درزهای جمجمه)

۷- *Schizencephaly* (ایجاد شکاف های غیر طبیعی در نیمکره های مغز)

2-2-1- هیدروسفالی اکتسابی (acquired hydrocephalus)

هیدروسفالی پس از تولد نیز می‌تواند بوسیله‌ی شرایطی که مقاومت به خروج CSF را افزایش می‌دهند مثل مسدود شدن مسیر حرکت CSF ایجاد شود. البته تومورهای مغز، کیست عنکبوتیه، خونریزی درون جمجمه‌ای یا درون بطنی، ضربه‌های مغزی و عفونت‌هایی مثل مننژیت نیز در ایجاد هیدروسفالی اکتسابی دخالت دارند (Matsumoto and Tamaki., 1991; Pattisapu., 2001).

3-2-1- هیدروسفالی ارتباطی (communicating hydrocephalus)

واژه ارتباطی نشان دهنده این است که محل افزایش مقاومت به خروج CSF خارج از سیستم بطنی و جایی در فضای زیر عنکبوتیه قرار دارد. هیدروسفالی ارتباطی توسط یکی از سه عامل زیر ایجاد می‌شود:

- 1- تولید زیاد CSF (ندرتاً در ارتباط با پاپیلوما‌ی شبکه کورویید است)
 - 2- گرفتگی وریدی (یک حالت کمیاب که معمولاً به عنوان otitic hydrocephalus شناخته می‌شود)
 - 3- مقاومت به خروج CSF از فضای زیر عنکبوتیه بخاطر چسبیدن لایه عنکبوتیه یا نقص در مسیرهای خروج CSF.
- واژه ارتباطی یعنی این که بطن‌های مغز با هم ارتباط دارند و CSF می‌تواند از آنها وارد فضای زیر عنکبوتیه شود. انسداد در مسیر حرکت CSF در سیستم بطنی رخ نمی‌دهد بلکه جایی در فضای زیر عنکبوتیه یا مسیر خروج CSF رخ می‌دهد. همچنین این نوع هیدروسفالی می‌تواند نتیجه التهاب پرده‌های مننژ مثل عفونت یا حضور خون یا سلول‌های تومور در فضای زیر عنکبوتیه باشد (Matsumoto and Tamaki., 1991).

4-2-1- هیدروسفالی انسدادی (non-communicating hydrocephalus)

هیدروسفالی انسدادی یا غیر ارتباطی هنگامی که مسیر حرکت CSF جایی در سیستم بطن‌های مغز مسدود شود ایجاد می‌گردد مثل خروجی‌های بطن چهارم (منافذ لوشکا و ماژندی). معمول‌ترین نقطه برای مسدود شدن مسیر حرکت CSF aqueduct of sylvius است که به آن aqueduct stenosis می‌گویند. با وجود این مسدود شدن منفذ Monro یعنی خروجی بطن‌های جانبی به بطن سوم نیز امکان‌پذیر است (Bradley et al., 1996).

در aqueduct stenosis بعنوان فراوان‌ترین نوع هیدروسفالی انسدادی مسیر حرکت CSF از بطن سوم به چهارم مسدود می‌شود در نتیجه در اثر افزایش فشار درون جمجمه‌ای، بطن‌ها شروع به بزرگ

شدن می‌کنند، در مجموع هیدروسفالی انسدادی شایع‌ترین نوع هیدروسفالی در دوران جنینی است (Bradley et al., 1996).

۵-۲-۱- هیدروسفالی با فشار طبیعی (normal pressure hydrocephalus)

تشخیص افراد با این بیماری هنگامی صورت می‌گیرد که بطن‌ها بزرگ شده باشند ولی فشار درون جمجمه‌ای افزایش نیابد یا افزایش اندکی داشته باشد. NPH معمولاً در سنین بالا مشاهده می‌شود و در اثر مسدود شدن مسیر حرکت CSF و آتروفی غیر طبیعی مغز ایجاد می‌شود. NPH به دو دسته تقسیم می‌شود:

- ۱- آنهایی که در اثر مننژیت یا خونریزی فضای زیر عنکبوتیه دچار بیماری شده‌اند.
- ۲- نوع idiopathic، که در آن‌ها عامل NPH مشخص نیست (Kudo et al., 2000).

۳-۱- نقش CSF در پاتوژنز هیدروسفالی

Hydrocephalic Texas (H-Tx)، رت مدل هیدروسفالی مناسبی است که از یک کلنی نرمال در اثر یک جهش خودبخودی جداسازی شده است و بدن‌بال آن بوسیله آمیزش‌های برادر - خواهری حفظ شده است (Kohn et al., 1981, 1984). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که یک جهش تک ژنی باعث هیدروسفالی در این مدل می‌شود و این صفت به صورت اتوزوم مغلوب با نفوذ ناقص به نسل‌های بعد منتقل می‌شود. به همین دلیل فقط حدود ۴۰ درصد از نوزادان در یک آمیزش خالص H-Tx بیماری را نشان می‌دهند. در این رت‌ها، هیدروسفالی در پی مسدود شدن جریان CSF ایجاد می‌شود (Cai et al., 2000).

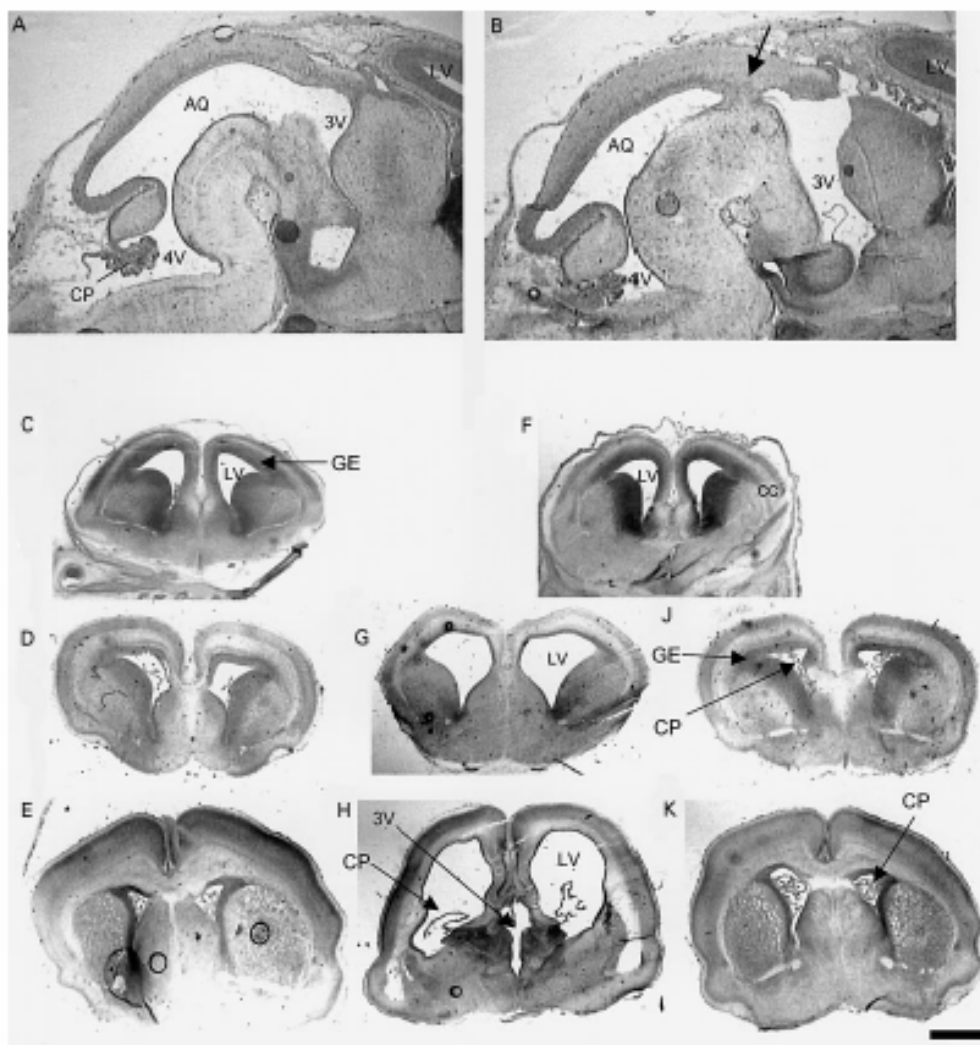
یک گرفتگی شدید در روز ۱۸ حاملگی یعنی همزمان با اوج نوروژنز و مهاجرت گسترده سلول‌ها به کورتکس در حال تکوین در aqueduct sylvius، رابط بین بطن سوم و چهارم، رخ می‌دهد و در پی آن بطن‌های مغز شروع به بزرگ شدن می‌کنند و علائم هیدروسفالی بروز می‌کند و رشد و نمو مغز نیز مختل می‌شود (Mashayekhi et al., 2000) (شکل ۱-۱).

نشان داده شده است که در حالت طبیعی از روز E18 (embryonic day) به بعد مهاجرت گسترده‌ای از GE (germinal epithelium) به سمت CP (cortical plate) رخ می‌دهد و قطر کورتکس افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند ولی این رویداد در H-Tx پس از مسدود شدن مسیر CSF رخ نمی‌دهد و کورتکس بصورت نابالغ باقی می‌ماند (شکل ۱-۲).

ابتدا به نظر می‌رسید که این نقص رشد و نمو به علت افزایش فشار درون جمجمه‌ای پس از مسدود شدن جریان CSF و تجمع آن در بطن‌ها باشد ولی بعداً مشخص شد که این فشار تا ۱۰ روز

پس از تولد یعنی زمانی که استخوان‌های جمجمه بهم می‌رسند، رخ نمی‌دهد. از طرفی بررسی فواصل بین سلولی هیچ گونه کاهشی را نشان نداد یعنی این که نازک شدن کورتکس در اثر فشردگی نبوده است (Mashayekhi et al. , 2000).

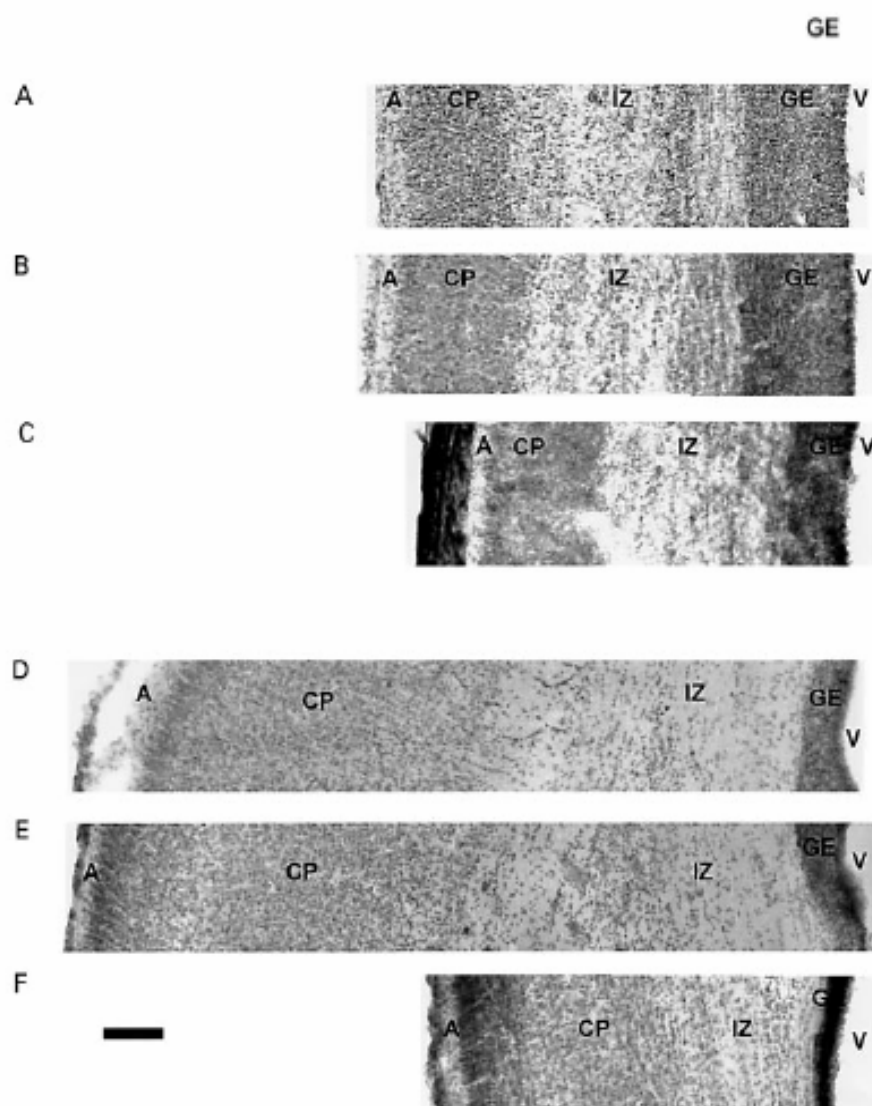
بررسی سلول‌های در حال تکثیر در سطح مغز بوسیله تزریق BrdU به رت‌های بارداری این نکته را به اثبات رساند که در GE رت H-Tx نسبت به نمونه‌های نرمال تعداد کمتری از سلول‌های در حال تکثیر وجود دارند و تراکم این سلول نیز کاهش یافته است. پس عوامل ناشناخته‌ای باعث مهار تکثیر و رشد و نمو طبیعی سلول‌های مغز شده اند (Mashayekhi et al 2000) (شکل ۳-۱).



شکل ۱-۱: برش سهمی مغز در جنین H-Tx مبتلا (B) و جنین H-Tx سالم (A)
 برش عرضی از برش رت نژاد ویستار (C-K) و H-Tx مبتلا (H-F) و H-Tx سالم (I-K)
 برش‌ها از جنین‌های روز ۱۸ (C-F) ۱۹ (D-G-J) و ۲۱ (K-H-E) به دست آمده‌اند و با رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین رنگ آمیزی شدند (Mashayekhi et al. , 2000).

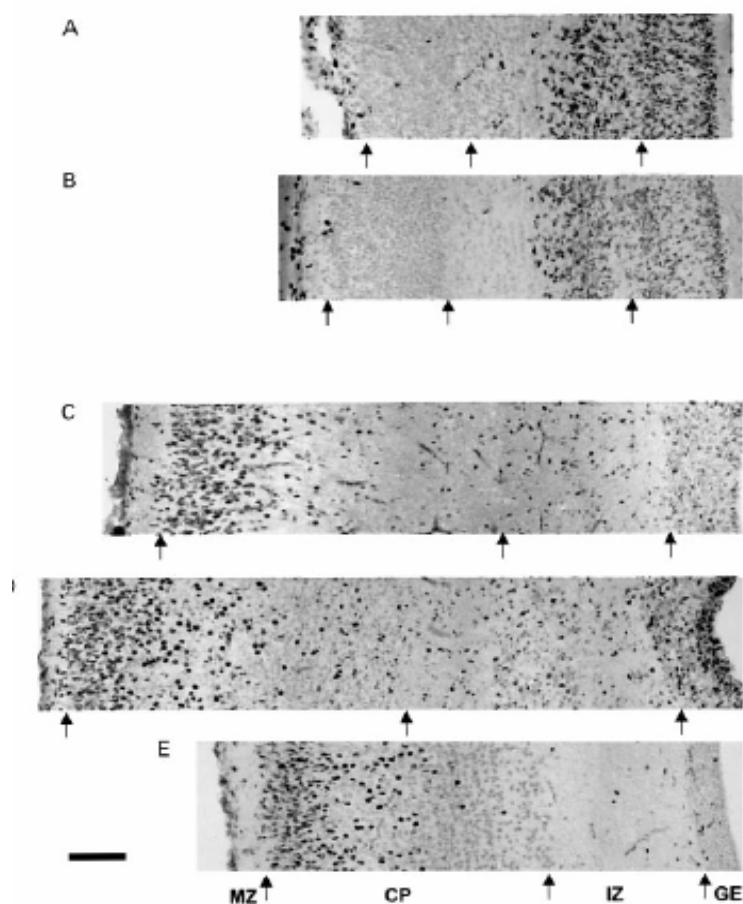
GE: اپیتلیوم ژرمینال ، CC: کورتکس مغزی ، CP: شبکه کوروئید ، 3V: بطن سوم ، 4V: بطن چهارم ، AQ: قنات سیلویوس

نشان داده شده است که در حالت طبیعی از روز E₁₈ به بعد مهاجرت گسترده‌ای از Germinal GE (epithelium) به سمت CP (Cortical plate) رخ می‌دهد و قطر کورتکس افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند ولی این رویداد در H-Tx پس از مسدود شدن مسیر CSF رخ نمی‌دهد و کورتکس بصورت نابالغ باقی می‌ماند (شکل ۲).



شکل ۱-۲: رنگ آمیزی متیل گرین پیرونین در برش هایی که از کورتکس جنین روز ۱۹ (A-C) ، دو روزه (D-F) و ویستار بالغ (D-A) ، H-Tx سالم (B,E) و H-Tx مبتلا (E,C). متیل گرین پیرونین یک رنگ مخصوص اسیدی نوکنئیک است و مناطقی که دارای سلول های تکثیری است یا نشان می دهد (Mashayekhi et al. , 2000). GE: اپیتلیوم ژرمینال ، IZ: منطقه ی میانی ، CP: صفحه ی عصبی ، A: منطقه ی مارژینال ، V: سطح بطنی

ابتدا به نظر می‌رسید که این نقص رشد و نمو به علت افزایش فشار درون جمجمه‌ای پس از مسدود شدن جریان CSF و تجمع آن در بطن‌ها باشد ولی مشخص شد که این فشارها تا ۱۰ روز پس از تولد یعنی زمانی که استخوان‌های جمجمه بهم می‌رسند، رخ نمی‌دهد. از طرفی بررسی فواصل بین سلولی هیچ گونه کاهش را بین سلول‌ها نشان نداد یعنی این که نازک شدن کورتکس در اثر فشردگی نبوده است. بررسی سلول‌های در حال تکثیر در سطح مغز این نکته را به اثبات رساند که در GE رت H-Tx نسبت به نمونه‌های نرمال تعداد کمتری از سلول‌های در حال تکثیر وجود دارند و تراکم این سلول کاهش یافته است. پس عوامل ناشناخته‌ای باعث مهار تکثیر و رشد و نمو طبیعی سلول‌های مغز شده‌اند (شکل ۳).



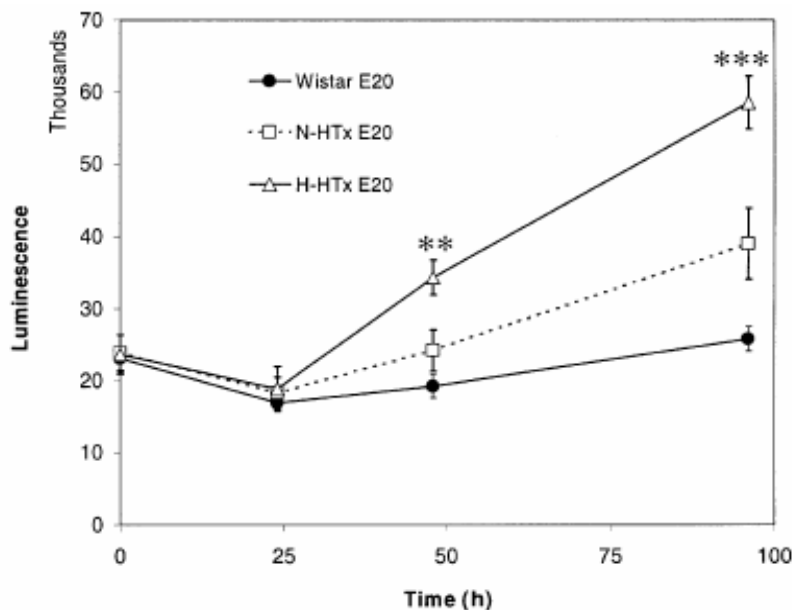
شکل ۳-۱: رنگ آمیزی BrdU برش‌هایی که از کورتکس مغز رت نژاد ویستار (A و C)، H-Tx سالم (B, D) و H-Tx سالم (E) و جنین ۱۸ روزه (A, B) و یک روزه بعد از تولد (C-E) که مادر آنها در روزهای ۱۷ (A, B) و ۱۹ (C-E) در آنها تزریق شده است. ۲۴ ساعت بعد از تزریق تمام سلول‌های اپیتلیوم زاینده و منطقه بینابینی قرار دارد (A-B). هیچ تفاوتی بین H-Tx در رت نژاد ویستار در مراحل ابتدایی دیده نمی‌شود (A, B). اما بعد از انسداد سلول‌های نشاننداری که در صفحه‌ی مغزی قرار دارد. شبیه به ویستار و H-Tx سالم است اما سلول‌های نشاندار کمتری در منطقه‌ی حاشیه‌ای و ماتریکس وجود دارد (Mashayekhi et al., 2000).
 GE: اپیتلیوم ژرمینال ، IZ: منطقه‌ی میانی ، CP: صفحه‌ی عصبی ، MZ: منطقه‌ی حاشیه‌ای

کشت سلول‌های کورتکس از رت H-Tx و رت نرمال نشان داد که سلول‌های کورتکس H Tx پس از ورود به محیط کشت توانایی تکثیر بالاتری از سلول‌های نرمال دارند در حالی که در *in vivo* میزان تکثیر سلولی آنها کاهش یافته بود. افزایش تکثیر این سلول‌ها در محیط کشت این گونه توجیه می‌شود که شاید این سلول‌ها در *in vivo* تحت اثر یک عامل مهار کننده قرار دارند (Mashayekhi et al 2000).

CSF به عنوان گزینه‌ای که می‌تواند دربردارنده‌ی این عوامل مهار کننده باشد مدنظر قرار داده شد. تاثیر CSF گرفته شده از H-Tx و رت نرمال بر سلول‌های کورتکس جنین رت ۲۰ روزه نرمال نشان داد که CSF نرمال نه تنها مانع تکثیر سلولی نمی‌شود بلکه از تکثیر سلول‌های مغزی نیز حمایت می‌کند ولی CSF H-Tx بطور کامل تکثیر سلول‌های کشت شده را مهار می‌کند (Mashayekhi et al., 2000) (شکل ۴-۱).

در اثر بسته شدن مسیر حرکت CSF، خروج CSF بطور کامل و طبیعی رخ نمی‌دهد و CSF و فاکتورهای موجود در آن در بطن‌های جانبی جمع می‌شوند. در این میان فاکتورهای نوروتروفیک که اکثراً از طریق اپی‌تلیوم شبکه کوروئید وارد CSF می‌شوند به عنوان گزینه‌های احتمالی مدنظر می‌باشند چون می‌توانند در غلظت‌های بالاتر از حد طبیعی که پس از انسداد حرکت CSF بروز می‌کند، باعث مهار رشد و نمو شوند زیرا CSF در ارتباط نزدیک با GE می‌باشد و هر گونه تغییر در ترکیبات آن می‌تواند بر رفتار سلول‌های GE مثل تکثیر و مهاجرت آن‌ها تاثیر داشته باشد (Mashayekhi et al., 2000).

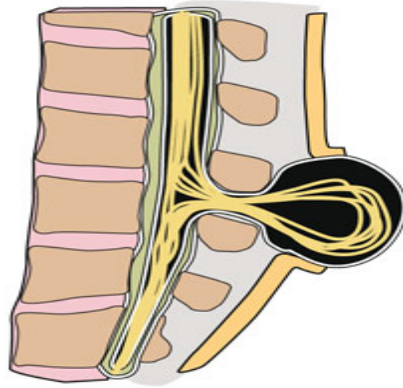
نشان داده شده است که افزایش $TGF-\beta$ و FGF-2 (Moinuddin and Tada., 2000) در CSF (Johanson et al., 1999) می‌تواند باعث القا هیدروسفالی شود. از طرفی افزایش بیان فاکتور رشد عصب (NGF) در کورتکس رت H-Tx در حین پیشروی هیدروسفالی نشان داده شده است (Miyajima et al., 1996). افزایش بیان سایر فاکتورها از قبیل NGF، NSE، MBP، GFAP، S100 (Beems et al., 2003) و NT-3 (Hochhaus et al., 2001) نیز در CSF کودکان مبتلا به هیدروسفالی نشان داده شده است.



شکل ۴-۱: سلول های کورتکسی از روز ۲۰، رت نژاد رت ویستار؛ H-Tx سالن و H-Tx مبتلا در پلیت هایی که با پلی دی لایزین پوشیده شده اند، ریخته می شوند. میزان تکثیر این سلول ها با کیت لامینسانس بررسی شد. H-Tx مبتلا با رت ویستار و H-Tx سالم در ۴۸ و ۹۶ ساعت تفاوت قابل ملاحظه ای دارند (Mashayekhi et al., 2000).

۳-۱- نواقص لوله عصبی

بیشتر نقص های نخاعی در انسان در اثر بسته شدن غیر طبیعی چین های عصبی در هفته های سوم و چهارم روی می دهند. این ناهنجاری ها که نقص های لوله ی عصبی (NTD) نام دارند، ممکن است پرده های مننژ، مهره ها، ماهیچه ها و پوست را هم درگیر کنند (Mulinare et al., 1988). در بیماران اسپینا بیفیدا لوله عصبی کاملاً بسته نمی شود. جوش نخوردن کامل کمان های مهره ای باعث می شود که شکافی در کمان مهره ای ایجاد شود (شکل ۵-۱). در این صورت پرده های مننژ و اعصاب نخاعی در آن درگیر می شوند و از این شکاف بیرون می زنند (Wamototo et al., 2004).



شکل ۵-۱: خروج مننژ و اعصاب نخاعی از کمان مهره ای (Wamototo et al., 2004)

NTDs شدید ساختمان‌های عصبی و غیر عصبی را درگیر کرده و تقریباً ۱ مورد در هر ۱۰۰۰ تولد را مبتلا می‌سازد. البته شیوع آن در جوامع مختلف متفاوت بوده و گاهی در برخی مناطق مثل شمال چین به یک در ۱۰۰ تولد زنده می‌رسد (Mulinare et al., 1988). اسپینا بیفیدا به دو گروه تقسیم بندی می‌شود:

۱- اسپینا بیفیدا مخفی: شکافی در کمان مهره‌ای است که با پوست پوشیده شده است و معمولاً بافت عصبی زیرین در آن درگیر نیست. این ناهنجاری در ناحیه‌ی کمری خاجی دیده می‌شود و عموماً یک دسته مو روی ناحیه‌ی مبتلا وجود دارد. علت این نقص، جوش نخوردن کمان‌های مهره‌ای است. این نقص حدود ۱۰٪ از افرادی که از سایر جهات کاملاً سالم‌اند را مبتلا می‌کند، یعنی ممکن است حتی فرد بیمار هم از این ناهنجاری مطلع نباشد و بعدها وقتی برای علت دیگری مثل دیسک کمر یا علت‌های دیگر، تحت MRI قرار می‌گیرد در عکس‌ها مشخص می‌شود که فرد مبتلا به اسپینا بیفیدا از نوع مخفی می‌باشد (Lemire et al., 1988).

۲- اسپینا بیفیدای کیستی: نقص شدید لوله عصبی است که در آن پرده‌های مننژ به همراه یا بدون بافت عصبی از شکافی در کمان‌های مهره‌ای و پوست بیرون می‌زند و یک کیسه‌ی کیست مانند ایجاد می‌کند که با پوست پوشیده نمی‌شود و این برخلاف اسپینا بیفیدای مخفی می‌باشد.

اسپینا بیفیدا کیستی به دو نوع مننگوسل و میلومننگوسل تقسیم می‌شود: اگر تنها پرده‌های مننژ که پر از مایع مغزی نخاعی شده‌اند از شکافی در کمان‌های مهره‌ای بیرون بزنند مننگوسل ایجاد می‌شود ولی اگر در داخل کیسه بافت عصبی هم پیدا شود میلومننگوسل تشکیل می‌شود. ناهنجاری مشاهده شده در بیماری میلومننگوسل در بیشتر موارد در ناحیه‌ی کمری خاجی وجود دارد و طبیعتاً نارسائی‌های عصبی مشاهده شده در این بیماران اندام‌های تحتانی بدن را درگیر می‌کند (Lemire et al., 1988).

۱-۴-۱- علائم و نشانه‌های اسپینا بیفیدا

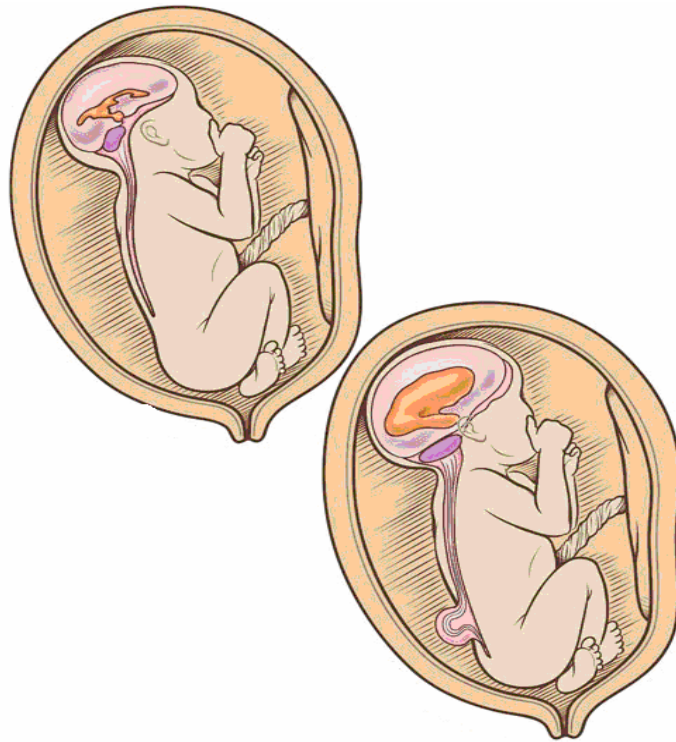
اعصاب ناحیه‌ی کمری نخاع در کنترل عضلات و حرکت زانو ها و پاها اهمیت دارند لذا آسیب نوروتهای این ناحیه باعث نقص حرکتی شدیدی در این بیماران می شود. اعصاب ناحیه‌ی خاجی در کنترل ادرار و نحوه عملکرد روده نقش دارند و تقریباً در تمام بیماران مبتلا به میلومنگوسل درجاتی از ناتوانی در این اندامها مشاهده می‌شود.

بنابراین این بیماران کنترل ادرار و مدفوع خود را از دست می دهند، علاوه بر این، این بیماران مشکلات جنسی متعددی هم دارند. کودکانی که با میلومنگوسل متولد می‌شوند معمولاً مشکلات حرکتی زیادی دارند به طوریکه اکثر آنها به ویلچر نیازمندند و نیز باید تحت فیزیوتراپی دائمی باشند. یکی از مهم‌ترین نشانه‌هایی که در این بیماران مشاهده می شود هیدروسفالی و ناهنجاری آرنولدکیاری می‌باشد (Mulinare et al., 1988).

۱-۴-۲- ناهنجاری آرنولدکیاری

در این ناهنجاری مقداری از ساقه مغز و قسمت زیرین مخچه درگیر می‌شوند. ساقه مغز منشأ بسیاری از اعصابی است که در کنترل ضربان قلب، تنظیم تنفس و فشار خون و کنترل جویدن، سرفه کردن و عطسه کردن نقش دارند.

مخچه در کنترل حرکات پا و نیز ایجاد حرکات موزون نقش دارد. این ناهنجاری زمانی ایجاد می‌شود که قسمتی از ساقه مغز و مخچه به طرف بالای گردن جابجا می‌شوند، در نتیجه‌ی این جابجایی مقداری از عملکرد این بافتها تحت تاثیر قرار می‌گیرد و باعث ایجاد علائمی مثل ضعیف بودن گریه، مشکلات تنفسی، تغییر رنگ چهره و مشکلات تغذیه‌ای در بیماران می‌شود (شکل ۶-۱). اما این جابجایی اثر مهم دیگری هم دارد که آن اختلال در جذب CSF می‌باشد، مخچه با جابجایی خود در مسیر کانال نخاعی قرار می‌گیرد و با انسدادی که ایجاد می‌کند مانع گردش طبیعی CSF می‌شود. تقریباً در ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به میلومنگوسل، هیدروسفالی دیده می‌شود (Steinberg et al., 2003).



شکل ۶-۱: خروج نورون ها از شکاف بین مهره ای منجر به آرنولد کیاری و هیدروسفالی در دوران جنینی می شود (Steinberg et al., 2003).

بر اساس اظهارات انجمن اسپینا بیفیدا در آمریکا بیشتر از ۷۳ درصد از افرادی که به این بیماری مبتلا هستند نسبت به لاتکس آلرژی دارند و علت آن را استفاده معمول از لاتکس در فعالیت‌های پزشکی می دانند. لذا سعی بر این است که برای فعالیت‌های درمانی بیماران مبتلا به اسپینا بیفیدا دستکش‌های مخصوص طراحی شود.

اسپینا بیفیدای کیستی را می‌توان پیش از تولد و با استفاده از سونوگرافی و تعیین آلفا - فیتوپروتئین (AFP) در سرم مادر و مایع آمنیوتیک تشخیص داد. مهره‌ها در هفته‌ی دوازدهم بارداری قابل مشاهده‌اند و نقص‌های بسته شدن کمان مهره‌ای در این زمان قابل شناسایی‌اند. روش جدید درمان این نقص‌ها انجام جراحی داخل رحمی در هفته‌ی بیست و هشتم بارداری است. در این روش با برش خاص سزارین، به جنین دسترسی پیدا کرده، ضایعه را ترمیم می‌کنند و جنین را به داخل رحم برمی‌گردانند. نتایج اولیه حاکی از کاهش بروز هیدروسفالی، افزایش کنترل دفع ادرار و مدفوع و پیشرفت تکامل حرکتی در اندام‌های تحتانی بوده است (Kibar et al., 2007).

والپروئیک اسید و مصرف بیش از حد ویتامین A و نیز تراژوژنهای متعدد دیگر می‌تواند منجر به NTDs شوند. NTDs بیشتر اوقات منشا چند عاملی دارند و پس از تولد یک فرزند مبتلا، احتمال ابتلای فرزند بعدی بسیار زیاد است. شواهد جدید حکایت از آن دارند که چنان چه مصرف

اسیدفولیک (فولات) به میزان ۴۰۰ میکروگرم در روز ۲ ماه پیش از بارداری شروع شود و در طول آبستنی نیز ادامه یابد، بروز NTD تا ۷۰ درصد کاهش می‌یابد (Wamototo et al., 2004).

۵-۱- تولید، گردش و باز جذب مایع مغزی - نخاعی

CSF دائماً بوسیله شبکه کورویید که در بطن های جانبی، سوم و چهارم واقع است، ترشح می شود. در ابتدا فقط اعمال مربوط به ضربه گیری را به CSF نسبت می دادند ولی امروزه مشخص شده است که این مایع در هموستازی مغز نقش مهمی ایفا می کند بعلاوه آن را تعدیل کننده فعالیت مغز نیز می دانند. البته وظایفی مانند؛ واسطه گری بین خون و مغز، رساندن مواد غذایی و دور کردن مواد زائد و سمی نیز مد نظر بوده اند (Miyan et al., 2003).

در مقالات اخیر بر اساس آنالیز ریاضی Egnor و همکاران در سال های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ پیشنهاد کردند که پالس CSF باعث بافر شدن بستر مویرگ های مغزی از اثرات پالس های سرخرگی می شود (پالس های سرخرگی می توانند مانع جریان دائم خون در مغز که درون جمجمه قرار دارد، شوند). پالس های CSF با پالس های سرخرگی مقابله می کنند و جریان دائمی را در مغز برقرار می سازند. این نیز پاسخی دیگر به حضور CSF در افراد بالغ است ولی دلیل حضور در طول رشد و نمو چیست؟ CSF از بطن های جانبی به بطن سوم جریان می یابد (از طریق foramina of Monro) و از بطن سوم بواسطه کانال سیلویوس وارد بطن چهارم می شود. در طول رشد و نمو CSF از طریق کانال مرکزی نخاع به سمت پایین جریان می یابد در حالیکه عناصر مسیر خروج آن هنوز وجود ندارند. تولید و جذب CSF در این مرحله هنوز بخوبی مطالعه نشده است. در بسیاری از گونه ها مثل انسان و رت پس از تکمیل رشد و نمو نخاع، کانال مرکزی بوسیله اجزای فیبری بسته می شود که نشان دهنده عدم نیاز به CSF در این مرحله است. اغلب در همین مرحله CSF از طریق منافذ لوشکا و ماژندی وارد بازال سیسترن می شود، این منافذ بوسیله مرگ سلولی برنامه ریزی شده حاصل می شوند. سپس CSF وارد سیسترن مگنا می شود و پس از آن وارد فضای زیر عنکبوتیه (subarachnoid space) می شود و در اطراف مغز و نخاع گردش می کند تا سر انجام از سینوس ساژیتال، لنف های ناحیه صورت و سایر جایگاه های ناشناخته براساس مکانیسم های جذبی مثل آکوآپورین و پمپ Na^+ K^+ ATPase جذب شود (Miyan et al., 2003).

۶-۱- نقش CSF در تکوین مغز

نشان داده شده است که رشد لوله ی عصبی بوسیله ی فشار هیدرواستاتیک مثبت CSF تنظیم می شود (Desmond et al., 1985, 2002). مطالعات نشان داده است که نوروآپی تلیوم به تنهایی

می‌تواند مسئول ایجاد و تنظیم چنین فشاری بوسیله‌ی ترشح مواد فعال اسموتیک از بخش فوقانی خود باشد مثل پروتئوگلیکان کندروئیتین سولفات (Gato et al., 1993; Alonso et al., 1998). مطالعات گذشته نشان داده است که غلظت بالای یون‌های معدنی بخصوص سدیم در CSF جنینی به ایجاد فشار اسمزی کمک می‌کند (Sedlacek et al., 1975). امروزه توجه محققین بیشتر به سمت پروتئین‌های موجود در CSF بخصوص فاکتورهای رشد معطوف شده است. فاکتورهای رشد و فاکتورهای نوروتروفیک این توانایی را دارند که بر رشد و فیزیولوژی سلول‌های عصبی در طی رشد و نمو و نیز بلوغ تاثیر بگذارند. منشا این فاکتورها می‌تواند متفاوت باشد و از طرق مختلف وارد CSF شوند ولی منشا بخش اعظم آن‌ها پروتئین‌های تولید شده توسط شبکه کورویید است (Gato et al., 2001). CSF در طی رشد و نمو در تماس نزدیک با GE کورتکس است یعنی بخشی که نقش اصلی را در سازمان دهی و آرایش سلول‌های عصبی برای شکل‌گیری کورتکس بالغ بر عهده دارد. نشان داده شده است که ملکول‌های موجود در CSF براحتی می‌توانند وارد پارانشیم مغز شوند. زیرا اتصالات بین سلولی در سلول‌های اپاندیمال از نوع فاصله دار بوده و ممانعت خاصی برای انتشار سلول‌ها ایجاد نمی‌کنند (Proescholdt et al., 2000).

۱-۶-۱- ترکیب CSF در طول تکوین مغز

بررسی غلظت پروتئینی CSF جوجه از مرحله ۱۸ تا ۳۰ (جدول زمانبندی هامیلتون و همبرگر، 1951) نشان داد که CSF یک مایع با ترکیب ثابت نمی‌باشد و غلظت آن در طی مراحل مختلف تغییر معنی داری نشان می‌دهد؛ این تغییرات می‌توانند در ارتباط با مراحل رشد و نموی مختلف مغز باشند (Gato et al., 2001). بررسی کیفی پروتئین‌های CSF در همین مراحل نشان داد که CSF جنینی دارای ۲۱ نوار پروتئینی مشخص (در الکتروفورز تک بعدی با ژل پلی آکریل آمید) می‌باشد که غلظت پروتئین‌ها در این نوارها در طی رشد و نمو تغییر می‌کند (شکل ۷-۱) (Gato et al., 2001).