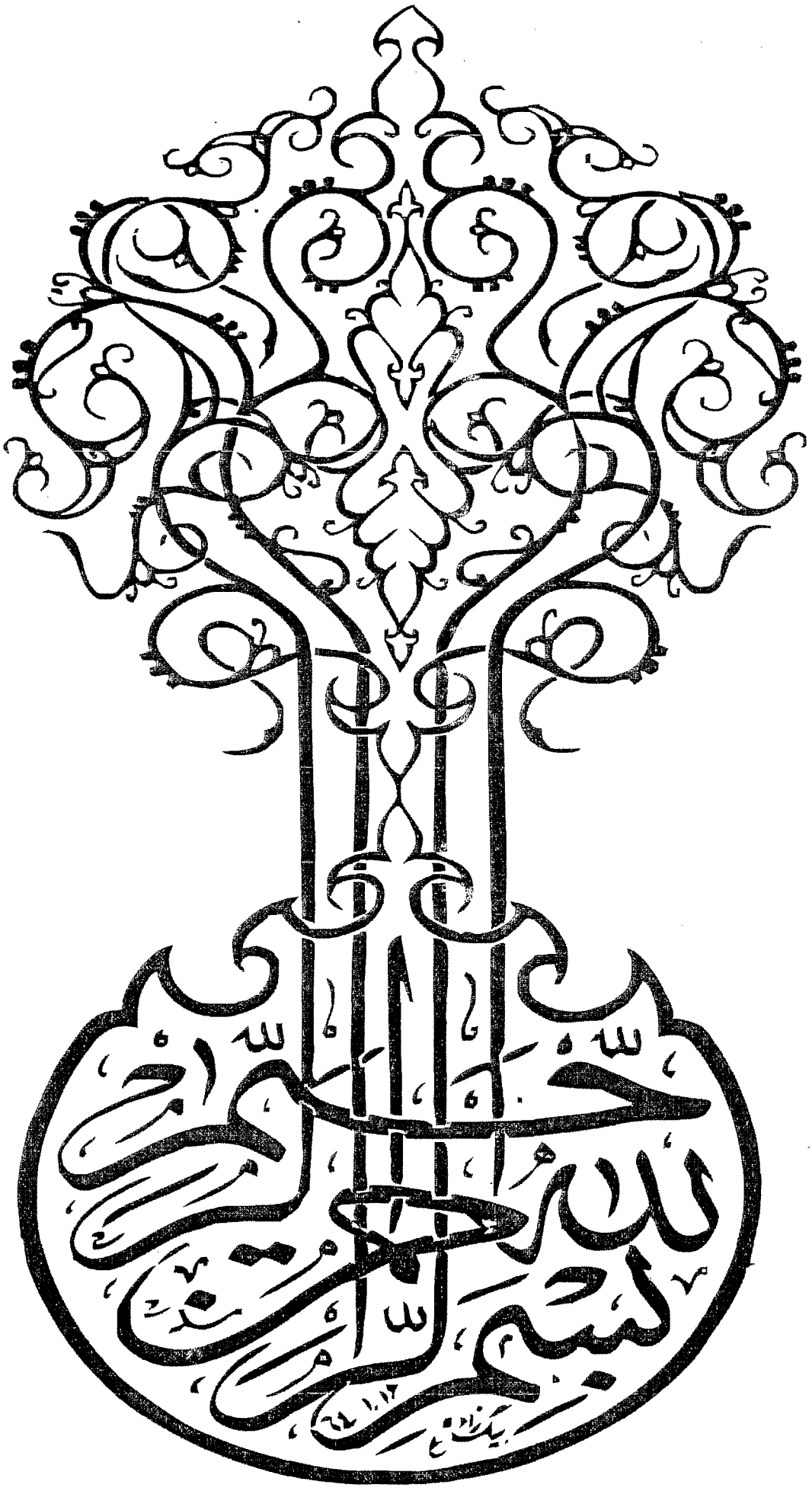

١١٣٤٨

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مرکز تحقیقات علوم اعصاب
دانشکده پزشکی مهندس افضلی پور

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم تشریح

عنوان :

تاثیر مقایسه ایی ترانس پلانت داخل وریدی و داخل کانال نخاعی سلول های بنیادی عصبی به موش های صحرایی با ایسکمی مغزی کانونی

استاد راهنما:
دکتر سید سعید سید جعفری

اساتید مشاور:
دکتر سید نورالدین نعمت اللهی،دکتر وحید شیبانی
دکتر مجید اسدی

نگارش :
عباس علی آقایی شفیع آبادی

زمستان ۱۳۸۷

۱۳۸۸/۳/۱۷

مرکز اطلاعات مدارک علمی ایران
شعبه مدارک

۱۱۳۴۱۸

تاریخ:.....
شماره:.....
پیوست:.....

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

****

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای عباس علی آقائی شفیع آبادی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان تأثیر مقایسه ای ترانس پلانت داخل وریدی و داخل کانال نخاعی سلول های بنیادی عصبی بر مغز موش های صحرائی مبتلا به ایسکمی مغزی کانونی درساعت ۸ صبح روز پنج شنبه مورخ ۸۷/۱۰/۲۶ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از :

سمت	نام و نام خانوادگی	امضاء
الف: استاد(ان) راهنما	۱-جناب آقای دکترسید سعید سید جعفری ۲-.....	
ب: استاد (ان) مشاور	۱- جناب آقای دکتر وحید شیبانی ۲-.جناب آقای دکترمجید اسدی ۳-جناب آقای دکتر سید نورالدین نعمت الله ماهانی	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر محسن بصیری	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکترسعید کار آموزیان	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	خانم پروانه شریفی	

شکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه .....عالی.....و نمره.....۱۹/۹..... مورد تأیید قرار گرفت.

نوزده و نه دهم

مهر و امضاء معاون آموزشی دانشکده
دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده پزشکی افضلی پور

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

بسمه تعالی

نمره نهایی پایان نامه کارشناسی ارشد

****

همکار محترم

خواهشمند است نظر خود را در مورد پایان نامه آقای عباس علی آقایی شفیع آبادی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی تحت عنوان تأثیر مقایسه ای ترانس پلانت داخل وریدی و داخل کانال نخاعی سلول های بنیادی عصبی بر مغز موش های صحرائی مبتلا به ایسکمی مغزی کانونی به راهنمایی جناب آقای دکتر سید سعید سید جعفری اعلام نمائید.

نماینده تحصیلات تکمیلی: پروانه شریفی **تاریخ:** ۸۷/۱۰/۲۶

الف) پایان نامه بدون نیاز به اصلاحات پذیرفته می شود. ☐

ب) پایان نامه با اصلاحات جزئی پذیرفته می شود. ☐

ج) پایان نامه غیرقابل قبول تشخیص داده می شود. ☐

اصلاحاتی که باید در نسخه نهایی پایان نامه انجام گیرد

حداکثر نمره ۱۸/۵(بدون در نظر گرفتن مقالات حاصله) حاصل میانگین ۴ نمره زیر است:

۱- میانگین نمره اساتید راهنما ۲- میانگین نمره اساتید مشاور(در صورت وجود) ۳- نمره داور داخلی ۴- نمره داور خارجی

نام و نام خانوادگی هیئت داوران	نمره از ۱۸/۵	میانگین نمره	امضاء
استاد راهنمای اول جناب آقای دکتر سید سعید سید جعفری	۲۰/۱	۱۹/۹	
استاد مشاور اول جناب آقای دکتر سید نورالدین نعمت الله ماهانی	۱۹/۸		
استاد مشاور دوم جناب آقای دکتر وحید شیبانی	۲۰/۱	۲۰/۱	
استاد مشاور سوم جناب آقای دکترمجید اسدی	۲۰/۱		
داورداخلی جناب آقای دکتر محسن بصیری	۲۰/۱		
داور خارجی جناب آقای دکترسعید کار آموزیان	۱۹/۳		
جمع(حاصل از میانگین ۴ نمره فوق)	نمره دوره دکتری	۱۹/۹	

تقدیم به سبب اتصال زمین و آسمان، قلب مقدس عالم امکان . ناجی دلهای رمیده بی اشک و باران، سپیده دمیده عشق .

صاحب الزمان حضرت بقیه ا... الاعظم (عج)

م ح م د

روحی و ارواحنا فداه

تقدیم به آسمان پرکبوتر دستهای **پدرم** ، که نوازش صمیمانه اش علت من، نیایش عاشقانه اش خلقت من و گشایش طبیبانه اش حرکت من است. نغمه جاودانه ایی که هر لحظه وجودم را به سجود می خواند تا زیر این طاق کبود به آفتابی ترین راز خدا عشق ورزم.

تقدیم به آستان نورپرور چشمهای **مادرم** که سخاوت نگاهش باده عشق است بر جامم، طراوت سایه اش جاده مهر است بر بامم و از تلاوت آیه های اشک اوست که آرامم. او که آفتابگردانهای حریم دلم به سمت او باز می شوند تا باغچه تن خسته ام ، مهربانترین بوستان زمین شود.

تقدیم به آسمان پروانه گستر قلوب **خواهرانم** که بال مهربانی کلامشان مسیر کهکشان عشق، زلال بارانی سلامشان نوید آسمانی عشق و جلال آسمانی مرامشان شمیم جاودانی عشق است. آنها که در کنج تنهایی دلم ، شمعی افروخته از نورند.

تقدیم به رمز بقای علم، راز فنای جهل، باران ملکوتی سیروسلوک در مسیری از آسمانهای نامکشوف، صحیفه بلند مرتبه ایی از بنیان های مرصوص، تمامی اساتید گرانقدر این سرزمین اهورایی و بالاخص :

دکتر سید سعید سید جعفری. استاد عزیز و نورچشمم که تمام زحمات این طرح به دوش ایشان بود.

اساتید زحمت کش و بزرگوارم:

جناب آقای دکتر نعمت اللهی . دکتر شیبانی . دکتر افتخار . دکتر عزت آبادی و بزرگ ماندنی علم تشریح ایران . پروفسور امامی میبدی و به روح بلند مرحوم دکتر کاظمی آشتیانی بنیانگذار علم نوین سلولی و سلول های بنیادی در ایران .

تقدیم به هوای پاک و پراز تنفس مهربانی

شهر عشق

همه دوستان مهربانم

که پنجره بی ریای سینه شان رو به ابدیتی از

صمیمیت باز می شود

یاران باوفای سرزمین کودکی ام

دوستان باصفای دوران عزیز دانشگاه

و تمامی هم دلانی که با ایشان زیر یک

سقف

خدا را نفس کشیدیم.

فهرست مطالب

فصل اول
کلیات و مروری بر مطالعات انجام شده

۱. مقدمه ایی بر ایسکمی مغزی..... ۲

۱-۱. مکانیسم های آسیب در سطح سلول..... ۴

۱-۱-۱.کانال های پتاسیم ۵

۱-۱-۲. کانال های سدیم ۵

۱-۱-۳. کانال های کلسیمی ۶

۱-۱-۴. کانال ها/رسپتورهای دروازه دار لیگاند..... ۶

۱-۱-۴-۱. رسپتورهای یونوتروپیک گلوتامات ۶

۱-۱-۴-۲. رسپتورهای گلوتامات متابوتروپیک ۷

۱-۱-۴-۳. رسپتورهای **GABA** ۷

۱-۱-۴-۴. رسپتورهای آدنوزین ۷

۱-۲. رویدادهای آسیب داخل سلولی ۸

۱-۲-۱. هومئوستاز کلسیم داخل نورونی ۸

۱-۲-۲. کیناز ها ۱۰

۱-۳. رویدادهای سیگنال دهی بین سلولی ۱۱

۱-۳-۱. رادیکال های آزاد(**Free Radicals**) ۱۲

۲. مقدمه ایی برسلول های بنیادی(**Stem Cells**) ۱۳

۲-۱. سلول های بنیادی بالغ(**Adult Stem Cells**) ۱۴

۲-۲. سلول های بنیادی جنینی(**Embryonic Stem Cells**) ۱۵

۲-۳. سلول های بنیادی عصبی (**Neural Stem Cells**)..... ۱۶

فصل دوم
مواد و روشها

۱-۱. جدا سازی و کشت سلول های بنیادی عصبی بالغ..... ۲۷
۱-۲. تمایز سلول های بنیادی عصبی ۲۸
۱-۳.ایمونوسیتوکمستری(Immunicytochemestary)..... ۲۹
۱-۴. القای ایسکمی کانونی ۳۰
۱-۵. ترانس پلانت سلول های بنیادی عصبی ۳۲
۱-۵-۱. ترانس پلانت داخل کمری(Lumbar Punture Transplantation)..... ۳۲
۱-۵-۲. ترانس پلانت داخل وریدی(Intravenous transplantation)..... ۳۳
۱-۶. تست روتارود (Rotarod Test)..... ۳۴
۱-۷. ایمونوهیستوکمستری(Immunohistochemestary)..... ۳۵
۱-۸. آزمون آماری ۳۸

فصل سوم
نتایج

۱-۱. مورفولولوژی سلول های بنیادی عصبی ۳۹
۱-۲. تمایز سلولی در In Vitro ۴۰
۱-۳. القای ایسکمی فوکال ۴۲
۱-۴. ترانس پلانت ۴۳
۱-۴-۱. یافته های هیستولوژیک بدنبال ترانس پلانت داخل کمری ۴۳
۱-۴-۲. یافته های هیستولوژیک بدنبال تزریق داخل وریدی ۴۹
۱-۵. یافته های مربوط به داده های حرکتی ۵۱

بحث و تفسیر نتایج

۱.بحث و تفسیر نتایج ۵۴
پیشنهادات ۶۳
منابع ۶۶

چکیده

مقدمه: ایسکمی سومین عامل مرگ و میر در بسیاری از کشورهاست و بسیاری از افراد از ناتوانی های بعد از آن رنج میبرند . ایسکمی منجر به یک سری تغییر و تحولاتی در مغز می شود که در نهایت سبب مرگ سلولی می شود. سلول های بنیادی بر اساس منشا به دودسته سلولهای بنیادی جنینی و بالغ تقسیم می شوند. سلولهای بنیادی بالغ در تمام بافت های یک موجود وجود دارند و جایگزینی برای سلول های از دست رفته آن بافت می باشند..ذخیره سلول های بنیادی (NSCs)در مغز عمدتا در دو ناحیه ساب ونتریکولار از شاخ قدامی بطن های طرفی (SVZ) وجیروس دنتاتوس در ناف هیپوکمپ (SGZ) می باشد

مواد وروشها: در این مطالعه سلول های بنیادی عصبی از ناحیه SVZ مغز موشهای بالغ جدا شد و در محیط کشت DMEM/F12 حاوی مکمل N2 و فاکتورهای میتوژن FGF2 و EGF کشت داده شدند. برای القای ایسکمی فوکال نیز پس از بیهوش نمودن و تشریح حیوانات شریان مغزی میانی راست به مدت یک ساعت مسدود شد. . پس از ۳ روز از القای ایسکمی سلول های بنیادی عصبی نشان دار شده با نشانگر فلوئورسنتی PKH26 به دوروش داخل وریدی از طرق ورید ژوگولار و داخل کمری از طریق فضای میان مهره های L6-S1 تزریق شدند. حیوانات در روزهای اول ،هفتم ،چهاردهم، بیست ویک و بیست وهشتم بر روی دستگاه روتارود قرار گرفته و بهبودی حرکتی آنها برسی شد. پس از تست روتارود مغز حیوانات جهت برسی وجود یا عدم وجود سلول های بنیادی عصبی به وسیله آزمایش ایمونوهیستوکمستری و ایمونوهیستوفلوئورسنت مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها : .برسی ها نشان داد که به دنبال تزریق سلول های بنیادی به دوروش داخل وریدی و داخل کمری در حیوانات ایسکمی شده بهبودی حرکتی خوبی نسبت به گروه ایسکمی بدون دریافت سلول ایجاد شد. نتایج همچنین نشان داد در گروه داخل وریدی بهبودی حرکتی بهتری نسبت به گروه داخل کمری دیده شد. آنالیز ایمونوهیستوکمستری وجود سلول هایی با نشانگر PKH26 را در ناحیه ایسکمی شده در هردو گروه تزریق شده نشان داد . در گروه تزریق داخل کمری تست آلکالین فسفاتاز و ایمونوهیستوکمستری تجمع زیادی از سلول های تزریق شده را در ناحیه بطنی نشان داد. همچنین تعدادی از سلول ها نیز از لایه اپاندیم مهاجرت کرده و خود را به ناحیه پارانشیم مغزی رسانده بودند ونشانگرهای نورونی (β-tubulin3 و NSE) و آستروسیتی(S100 و GFAP) را بیان نمودند. آنالیز ایمونوهیستوکمستری در گروه داخل وریدی نیز تعدادی از سلول های تزریق شده را در بافت مغز نشان داد که این سلول ها نیز توانسته بودند از جدار اندوتلیوم عروق مغزی عبور نمایند و خود را به ناحیه آسیب برسانندو نشانگرهای نورونی و آستروسیتی را بیان کنند.

نتیجه: بنابراین می توان نتیجه گرفت که به دنبال تزریق سلول های بنیادی عصبی به دو روش داخل وریدی و داخل کمری این سلول ها قادر بودند خود را به ناحیه آسیب دیده برسانند و در آنجا به فنوتیپ های عصبی تمایز یافته و سبب بهبودی حرکتی در حیوانات به دنبال القای ایسکمی کانونی شوند و این بهبودی حرکتی در گروه داخل وریدی بهتر از گروه داخل کمری بود.

ABSTRACT

Introduction

Ischemia is the third cause of mortality in many countries, and many people suffer from the following disabilities. Ischemia causes a series of changes in the brain parenchyma leading to induction of cell death.

Stem cells have the ability of self renewal therefore are a good source for cell therapy in the ischemia. The stem cells, based on their origin, are classified into embryonic and adult types. Adult stem cells exist in all tissues of every creature and are a replacement for the lost cells in related tissue. The subventricular zone of anterior horn of the lateral ventricle and dentate gyrus in the hippocampus are the main areas that neural stem cell are stored in the brain.

Materials and methods

In this study the neural stem cells obtained from subventicular zone of adult rats were cultured in DMEM/F12 culture medium with N2 supplement in the presence of EFG and FGF2 mitogenic factors. To induct the ischemia, the animals were anesthetized and after dissection the middle cerebral artery was occluded for one hour. Three days after induction of the ischemia the neural stem cells which were labeled with PKH26 were injected into animals intravenously by internal jugular vein and by lumbar puncture at the level of L6-S1. The motor behavioral functional recovery in 1st, 7th, 14th, 21th, and 28th days after induction of the ischemia was examined by Rotarod test. The presence of neural stem cells in the brain tissue of the animals was examined by immunohistochemistery and immunohistofleurscent methods after Rotarod test.

Results

The results showed that the motor behavioral functional recovery in ischemic group of animals that received neural stem cells by intravenous and lumbar puncture was better than ischemic groups of animals that did not receive neural stem cells. It is also demonstrated that functional recover in the intravenous group was better than the lumbar puncture group. The labeled cells with PKH26 immunofluorescence marker were observed in the ischemic area of the brain tissue sections in both intravenous and lumbar puncture groups stained by the immunohistochemistry staining technique. Alkaline phospahatase test and immunohistochemistery staining technique demonstrated a gathering of neural stem cells in the lateral ventricle that were injected into animals by lumbar puncture method. It was also observed that a number of cells migrated from lateral ventricle through the ependymal layer to the adjacent brain parenchyma. These cells expressed neuronal markers (NSC and β-tubulin3) and astrocytic markers (GFAP and S100). The presence of a number of intravenously injected cells, in the brain parenchyma was demonstrated by the immunocytochemistery staining technique. It showed that these cells were able to pass through the endothelial layer of the cerebral blood vessels to reach the ischemic area of the brain. These cells expressed the neuronal and astrocytic markers.

Conclusions

It is concluded that the neural stem cells injected by intravenous and lumbar puncture methods were able to migrate to the injured area by the ischemia and differentiate in to neural phenotypic cells. These differentiated cells caused the recovery of the motor function after the induction ischemia. This recovery occurred better in the intravenously injected group of animals than the animals that were injected by lumbar puncture.

فصل اول

کلیات و مروری بر مطالعات انجام شده

۱. مکانیسم های ایسکمی مغزی

ایسکمی سومین عامل مرگ ومیر پس از بیماریهای قلبی و سرطان و عامل اصلی در ناتوانی دراز مدت در کشورهای صنعتی است. حدود ۷۵ هزار نفر در سال در ایالات متحده از آن رنج می برند (Mohr et al., 1978; Macmanus et al 1997). بیشتر از ۸۰٪ از همه ایسکمی هاپیامدی از انسداد ثابت یا طولانی مدت در یکی از شرایین تغذیه کننده مغز است (Mohr et al., 1978). در همه وضعیت ها یک کاهش شماتیک در مقدار اکسیژن خون رخ می دهد که می تواند همه مغز را درگیر نماید (ایسکمی گلوبال) یا در نواحی معینی در مغز اتفاق افتد (ایسکمی فوکال) که وابسته به انسداد شرایین مغز است. ایسکمی سبب آسیب به بافت مغزی می شود که همراه با تغییرات مولکولی و بیوشیمیایی و علائم نورولوژیک است (Iadecola et al., 1999). ایسکمی منجر به کمبود اکسیژن، کاهش انرژی بافتی و سرانجام مرگ سلول می شود. اتیولوژی کاهش حاد اکسیژن مغزی پس از کم شدن جریان خون مغزی (CBF) وابسته به چندین عامل است. بیمارانی با یک توقف قلب قدیمی، شوک، بسته شدن شریان کاروتید و بعضی از فاکتورهای ژنتیکی می توانند ابتلا به ایسکمی مغزی را افزایش دهند (Hassan et al., 2000). چندین عامل می تواند منجر به هایپوکسی مغزی شود. این عوامل شامل محدود شدن پیشرونده اکسیژن در asphyxia ، کمبود پروتئین ناقل هموگلوبین در کم خونی ها، مسمومیت با منواکسید کربن و فشار خون کم. کم خونی/ هایپوکسی می تواند ثابت یا موقتی باشد و سبب تولید مواد سمی کم یا زیاد بنماید. ایسکمی مغزی در یک پروسه زمانی سبب ایجاد آبشاری از

رویداد های مولکولی می شود که شامل ۱- کاهش سریع ذخایر ATP داخل سلولی ۲- گلیکولیز بی هوازی، لاکتیک اسیدوز و دپلاریزاسیون غشایی۳ - سمیت ناشی از آزاد شدن گلوتامات ۴- ورود کلسیم ، سدیم و آب به درون سلول که می تواند منجر به تورم سلول شود ۵- فعال شدن آنزیم های تحریک شده ناشی از ورود کلسیم به داخل سلول، اختلال در عملکرد میتوکندری، تولید رادیکال های آزاد ۶- فعال شدن سیستم ایمنی ۷- بیان اضافی ژن های خاص ۸- القای مرگ سلولی (Lerouet et al., 2002; Lee et al.,2003) .

حجم سکته در مغز یک شاخص مهم در پیامد های طولانی مدت ناشی از ایسکمی است که منجر به گسترش صدمه نورونی در قسمت های مختلف مغز و متعاقب آن اختلالات نورولوژیک می شود. تاخیر در برقراری مجدد جریان خون (Reperfusion) سبب افزایش آسیب به جدار عروق درگیر در ایسکمی می شود و می تواند منجر به التهاب مغز شود (Broot et al., 1997; Aronowski et all., 1997; Scott et al., 2000). ایسکمی همراه با واکنش های التهابی نیز است که معمولا با بیان بالای سیتوکین ها، مولکول های چسبندگی و سایر مدیاتورهای التهابی شامل نیتریک اکسید شروع می شود (Iadecola et al., 2001).

مکانیسم های آسیب سلولی به دنبال ایسکمی مغزی در دو بخش بیان می شود: آسیب ها در سطح سلول و آسیب ها در درون سلول. علاوه بر این ، دو فرایند آپوپتوز(مرگ برنامه ریزی شده) و نکروز(مرگ کثیف)

نیز در طی فرایند ایسکمی سبب مرگ سلول های عصبی می شوند. مرگ سلولی به دنبال نکروز با علائمی چون تورم و پارگی غشا و شکستن تصادفی DNA مشخص می شود. در حالی که مرگ سلولی به دنبال آپوپتوز شامل متراکم شدن کروماتین، قطعه قطعه شدن اینترنوکلئوزوم های DNA مشخص می شود (Macmanus et al., 1997). مرگ نورونی سریع به دنبال ایسکمی در مرکز ایسکمی اتفاق می افتد و در آنجا نکروز غالب تر است در حالی که مرگ تاخیری نورون در نواحی اطراف ایسکمی رخ می دهد و در اینجا مرگ اکثرا از نوع آپوپتوز است (Li et al., 1995; Heron et al., 1993).

۱-۱. مکانیسم های آسیب در سطح سلول

برانگیختگی نورون به دنبال ایسکمی منجر به یک عدم تعادل یونی در عرض غشا می شود. در طی ایسکمی این عدم تعادل پخش می شود و منجر به تغییر هومئوستاز Ca می شود. آبشاری از رویدادها منجر به این مرگ می شود که می تواند به سه مرحله ذیل تقسیم شود (Siesjo et al., 1992) : مرحله اولیه در زمان ایسکمی است (۳۰-۵ دقیقه برای ایسکمی گلوبال و ۹۰-۶۰ دقیقه برای ایسکمی فوکال) که در نتیجه اضمحلال (collapse) شیب یونی است. مرحله دوم دوره رپرفیوژن یا برقراری مجدد جریان خون است. در طی این دوره فرایند بهبودی برای بازیافتن انرژی ازدست رفته سلول، هومئوستاز یونی و عملکردهای فیزیولوژیک پایه انجام می گیرد و سرانجام مرحله سوم شامل نقص در انرژی از دست رفته سلولی است که سرانجام منجر به مرگ سلول می شود(Siesjo et al 1992).

۱-۱-۱.کانال های پتاسیم

کانال های پتاسیم نقش مهمی در ایجاد پتانسیل استراحت غشایی دارند و این فعالیت شان کمک به نگهداری یک پتانسیل استراحت غشایی هایپر پلاریزه شده می نماید. به زودی پس از ایسکمی یک جریان خروجی (Efflux) از یون K به بیرون سلول ویک جریان ورودی(Influx) از یون های Na و Ca به درون سلول اتفاق می افتد که سطح ATP سلول به حدود ۵۰٪ خودکاهش پیدا می کند (Siesjo et al., 1992). ماهیت ایسکمی دلالت بر این دارد که کانال های K حساس به ایسکمی با کاهش ATP فعال می شوند و اولین کانالی هستند که به ایسکمی پاسخ می دهند. آستروسیت ها تلاش می کنند تا این افزایش K در خارج سلول را بافری نمایند . آنها سبب ایجاد سوئیچ به سمت گلیکولیز بی هوازی می شوند و ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از حجم نرمال خود متورم می شوند و سرانجام دیگر قادر به حفظ این وضعیت نخواهند بود و لیز می شوند (Siesjo et al., 1992). این حوادث همگی در مراحل اولیه ایسکمی رخ می دهد.

۱-۱-۲. کانال های سدیم

کانال های سدیم نیز نقش مهمی در تحریک نورون دارند. با توجه به اینکه کانال های سدیمی توجه کمی را در فرایند های ایسکمی ماده خاکستری مغز به خود معطوف داشته اند ، اما تحقیقات گسترده ایی بر روی این

کانال ها در ایسکمی ماده سفید مغز انجام شده است (Stys et al., 1991; Stys et al., 1992). این می تواند تعجب آور باشد که مکانیسم های مرگ ایسکمیک در ماده خاکستری و سفید مغز همسان است. در جریان ایسکمی مغزی جریان سدیم به داخل سلول در انتهای مرحله اولیه ایسکمی اتفاق می افتد. این فرایند همزمان با ورود یون Ca به داخل سلول و دپلاریزاسیون بدون اکسیژن مرتبط با نقص تامین انرژی می باشد. باید ذکر شود که بعضی از موادی که کانال های سدیمی را بلوکه می کنند به عنوان عوامل نوروپروتکتیو تلقی می شوند.

۳-۱-۱. کانال های کلسیمی

این کانال ها توجه زیادی را در مطالعات ایسکمی مغز به خود جلب کرده اند. ورود کلسیم به درون سلول به واسطه کانال های کلسیمی دروازه دار ولتاژ (Voltage-gated Ca channels) صورت می گیرد.

۴-۱-۱.کانال ها/رسپتورهای دروازه دار لیگاند

۱-۴-۱-۱. رسپتورهای یونوتروپیک گلوتامات

گلوتامات یک مدیاتور اصلی در آسیب نورونی به دنبال ایسکمی است. گلوتامات روی رسپتورهای یونوتروپیک و متابوتروپک اثر می کند. رسپتورهای یونوتروپیک ، کانال های یونی دروازه دار ولتاژ هستند و رسپتورهای متابوتروپیک از طریق G پروتئین به CAMP و IP3 به عنوان پیامبر های ثانویه

متصل می شوند. رسپتورهای یونوتروپیک به سه دسته تقسیم می شوند: NMDA, AMPA,KA (Benveniste et al., 1984). سطح گلوتامات اندکی پس از برقراری مجدد جریان خون به حالت نرمال خود بر می گردد(Obrenovitch et al., 1995). فعال شدن رسپتورهای گلوتامات نقش مهمی در مرگ سلولی به دنبال ایسکمی دارد. رسپتور های NMDA ممکن است عامل اصلی مرگ سلولی پس از ایسکمی باشد (Small et al., 1999).

۲-۴-۱-۱. رسپتورهای گلوتامات متابوتروپیک

این رسپتور در سه خانواده اصلی گروه بندی می شود. گروه ۱ رسپتورهایی هستند که به فسفولیپاز C متصل هستند و گروه ۲ و۳ به شکل منفی به آدنیلات سیکلاز متصلند(Conn et al., 1997).

۳-۴-۱-۱. رسپتورهای GABA

مانند گلوتامات ، ایسکمی منجر به افزایش دوبرابر در مقدار اسید گاما آمینوبوتریک (GABA) خارج سلولی می شود (Globus., et al 1988). این افزایش مانند گلوتامات خیلی زیاد نیست و در دراز مدت وجود ندارد.

۴-۴-۱-۱. رسپتورهای آدنوزین:

ایسکمی مغزی همچنین سبب خروج نورومدولاتور آدتوزین از نورون ها می شود (Fredholm et al., 1995). سطوح آدنوزین در فضای خارج سلولی پس ازایسکمی می تواند تا ۱۵۰ برابر افزایش یابد. در رت هایی با مدل ایسکمی مغزی فوکال ، پس از ایسکمی رسپتورهای A3,A2,A1 آدنوزین دستنز می شوند و سبب کاهش تعداد این رسپتورها می شود (Rudolphi et al., 1992) افزایش در سطوح آدنوزین یک نقش حفاظتی علیه ایسکمی دارد(Hsu et al., 1991) .

۲-۱. رویدادهای آسیب داخل سلولی

۱-۲-۱.هومئوستاز کلسیم داخل نورونی

نورون ها یک محتوای کلسیم داخل سلولی در حد میلی مولار دارند که شبیه به محتوای خارج سلولی است(1mM) . نورون ها این مقدار از یون کلسیم را در حال استراحت در حدود ۱۰نانومولار حفظ می کنند (Miller et al., 1991). افزایش یون کلسیم در حد بالا منجر به ایجاد یک آبشاری از رویدادهایی می شود که در نهایت سبب مرگ نورون ها در طی ایسکمی می شود. (Morley et al., 1994; Tymianski et al., 1996). چند دقیقه پس از شروع ایسکمی مقدار یون کلسیم افزایش می یابد که به علت اختلال در سیستم انتقال وابسته به انرژی غشا است و سبب آزادی یون کلسیم از ذخایر داخل نورونی می شود (Silver et al., 1990). این سبب دپلاریزاسیون غشای سلول می