بسم الله
الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسي ارشد در رشته علوم تشریح

عنوان

ترانسفکت سلول هاي استرومايي مغز استخوان بوسيله وکتور ترشحي pSecTag2 حاوي ژن BDNF و ارزيابي سلول هاي شبه عصبي توليد شده

نگارش

بهمن جلالي کندري

استاد راهنما

دکتر تقي طريحي

زمستان 89

تقديم به :

روان پاک پدرم، دستان پر مهر مادرم

و

همسر عزيز و مهربانم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

آقای بهمن جلالی کندری رشته علوم تشریح پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان : ترانسفکت سلولهای استرومایی مغز استخوان به وسیله وکتور ترشحی pSecTag2 حاوی ژن BDNF و ارزیابی سلولهای شبه عصبی تولید شده در تاریخ ۸۹/۱۲/۱۷ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر تقی طریحی (استاد راهنما)

دکتر مژده صالح نیا (استاد ناظر)

دکتر مجید صادقی زاده (استاد ناظر)

دکتر منصوره موحدین (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

آئين‌نامه پايان‌نامه (رساله)هاي دانشجويان دانشگاه تربيت مدرس

نظر به اينكه چاپ و انتشار پايان‌نامه (رساله)هاي تحصيلي دانشجويان دانشگاه تربيت مدرس، مبين بخشي از فعاليت‌هاي علمي پژوهشي دانشگاه است. بنابراين به منظور آگاهي و رعايت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان اين دانشگاه نسبت به رعايت موارد ذيل متعهد مي‌شوند:

ماده 1 : در صورت اقدام به چاپ پايان‌نامه (رساله)ي خود، مراتب را قبلاً به‌طور كتبي به دفتر "دفتر نشر آثار علمي" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2 : در صفحه سوم كتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذيل را چاپ كند:

" كتاب حاضر، حاصل **پايان‌نامه كارشناسي ارشد** نگارنده در رشته **علوم تشريح** است كه در سال **1389** در دانشكده علوم پزشكي دانشگاه تربيت مدرس به راهنمايي **آقای دکتر تقی طریحی** از آن دفاع شده است.

ماده 3 : به منظور جبران بخشي از هزينه‌هاي انتشارات دانشگاه، تعداد يك درصد شمارگان كتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمي" دانشگاه اهداء كند. دانشگاه مي‌تواند مازاد نياز خود را به نفع مركز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده 4 : در صورت عدم رعايت ماده 3، 50% بهاي شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربيت مدرس، تاديه كند.

ماده 5 : دانشجو تعهد و قبول مي‌كند در صورت خودداري از پرداخت‌هاي بهاي خسارت، دانشگاه مذكور را از طريق مراجع قضايي مطالبه و وصول كند، به علاوه به دانشگاه حق مي‌دهد به منظور استيفاي حقوق خود، از طريق دادگاه، معادل وجه مذكور در ماده 4 را از محل توقيف كتابهاي عرضه شده نگارنده براي فروش، تامين نمايد.

ماده 6 : اينجانب **بهمن جلالی کندری** دانشجوي رشته **علوم تشريح** مقطع **كارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرايي آن را قبول كرده، به آن ملتزم مي‌شوم.

نام و نام خانوادگي
تاريخ و امضا

آيين‌نامه حق مالكيت مادي و معنوي در مورد نتايج پژوهشهاي علمي

دانشگاه تربيت مدرس

مقدمه: با عنايت به سياست‌هاي پژوهشي و فناوري دانشگاه در راستاي تحقق عدالت و كرامت انسانها كه لازمه شكوفايي علمي و فني است و رعايت حقوق مادي و معنوي دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضاي هيأت علمي، دانشجويان، دانش‌آموختگان و ديگر همكاران طرح، در مورد نتايج پژوهشهاي علمي كه تحت عناوين پايان‌نامه، رساله و طرحهاي تحقيقاتي با هماهنگي دانشگاه انجام شده است، موارد زير را رعايت نمايند:

ماده 1- حق نشر و تكثير پايان نامه/ رساله و درآمدهاي حاصل از آنها متعلق به دانشگاه مي باشد ولي حقوق معنوي پديد آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله يا مقالات مستخرج از پايان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشريات علمي و يا ارائه در مجامع علمي بايد به نام دانشگاه بوده و با تاييد استاد راهنماي اصلي، يكي از اساتيد راهنما، مشاور و يا دانشجو مسئول مكاتبات مقاله باشد. ولي مسئوليت علمي مقاله مستخرج از پايان نامه و رساله به عهده اساتيد راهنما و دانشجو مي باشد.

تبصره: در مقالاتي كه پس از دانش‌آموختگي بصورت تركيبي از اطلاعات جديد و نتايج حاصل از پايان‌نامه/ رساله نيز منتشر مي‌شود نيز بايد نام دانشگاه درج شود.

ماده 3- انتشار كتاب، نرم افزار و يا آثار ويژه (اثري هنري مانند فيلم، عكس، نقاشي و نمايشنامه) حاصل از نتايج پايان‌نامه/ رساله و تمامي طرحهاي تحقيقاتي كليه واحدهاي دانشگاه اعم از دانشكده ها، مراكز تحقيقاتي،

پژوهشکده ها، پارك علم و فناوري و ديگر واحدها بايد با مجوز كتبي صادره از معاونت پژوهشي دانشگاه و براساس آئين نامه هاي مصوب انجام شود.
ماده 4- ثبت اختراع و تدوين دانش فني و يا ارائه يافته ها در جشنواره‌هاي ملي، منطقه‌اي و بين‌المللي كه حاصل نتايج مستخرج از پايان‌نامه/ رساله و تمامي طرح‌هاي تحقيقاتي دانشگاه بايد با هماهنگي استاد راهنما يا مجري طرح از طريق معاونت پژوهشي دانشگاه انجام گيرد.
ماده 5- اين آيين‌نامه در 5 ماده و يك تبصره در تاريخ87/4/1 در شوراي پژوهشي و در تاريخ 87/4/23 در هيأت رئيسه دانشگاه به تاييد رسيد و در جلسه مورخ 87/7/15 شوراي دانشگاه به تصويب رسيده و از تاريخ تصويب در شوراي دانشگاه لازم الاجرا است.
«اينجانب **بهمن جلالي كندري** دانشجوي رشته **علوم تشريحی** ورودي سال تحصيلي **1387**
مقطع **كارشناسي ارشد** دانشكده علوم پزشكي متعهد مي شوم كلِيه نكات مندرج در آئين نامه حق مالكيت مادي و معنوي در مورد نتايج پژوهش هاي علمي دانشگاه تربيت مدرس را در انتشار يافته هاي علمي مستخرج از پايان نامه / رساله تحصيلي خود رعايت نمايم. در صورت تخلف از مفاد آئين نامه فوق الاشعار به دانشگاه وكالت و نمايندگي مي دهم كه از طرف اينجانب نسبت به لغو امتياز اختراع بنام بنده و يا هر گونه امتياز ديگر و تغيير آن به نام دانشگاه اقدام نمايد. ضمناً نسبت به جبران فوري ضرر و زيان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدينوسيله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:

.....

تاريخ:

.....

تشکر و قدرداني

این تحقیق بخشی از پروژه تحقیقاتی تحت عنوان درمان سلولی ضایعات نخاعی به شماره 86-N-105 که در مرکز علوم اعصاب شفاء واقع در بیمارستان خاتم الانبیاء (ص) انجام می شود، بوده و با حمایت مالی این مرکز و دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفته است.

از زحمات مدیر محترم گروه علوم تشریحی دانشگاه تربیت مدرس، استاد ارجمند سرکار خانم دکتر موحدین و همچنین از کلیه اساتید گروه ، نهایت تشکر و قدردانی را می نمایم.

چکیده

هدف: در طي سال هاي اخير، درمان ضايعات نخاعي با استفاده از سلول درماني گام هاي مهمي را برداشته است. اما محدوديت اين روش، در درمان بلند مدت اين ضايعات مي باشد. ژن درماني بر پايه سلولي روش جديدي است كه اميد تازه اي براي درمان موثر تر ضايعات نخاعي ايجاد كرده است. ايجاد سلول هاي شبه عصبي از طريق وارد نمودن ژن نوروتروفين ها به داخل سلول هاي استرومايي مغز استخوان، اولين گام در اين زمينه مي باشد.

مواد و روش ها: ژن BDNF از روی وکتور حامل بريده شده و بر روی وکتور ترشحی pSecTag2 hygro C ساب کلون شد. درستی فرآيند ساب کلون کردن، مورد ارزيابی قرار گرفته و سپس وکتور ساب کلون شده تکثير شد. سلول های استرومايي مغز استخوان از استخوان ران موش های صحرايی بالغ استخراج شد. اين سلول ها در محيط کشت مناسب تا چهار پاساژ کشت داده شد. وکتور ترشحي ساب کلون شده كه محتوي ژن BDNF است به داخل سلول ها انتقال يافت. سلول های ترانسفکت شده با افزودن دوز کشنده Hygromycin به محيط کشت، از سلول های ترانسفکت نشده جدا شدند. بيان ژن BDNF در اين سلول ها بوسيله روش RT-PCR مورد ارزيابی قرار گرفت. توليد پروتئين BDNF بوسيله روش الکتروفورز پروتئين ها و در ادامه روش Western blot بررسی شد. ترشح اين پروتئين در محيط خارج سلولی، با استفاده از روش Elisa مورد ارزيابی قرار گرفت. به منظور تائيد تبديل شدن سلول های استرومايی

ترانسفکت شده به سلول های شبه عصبی، این سلول ها مورد ارزیابی ایمنوسیتوشیمی هم قرار گرفتند.
نتایج: نتیجه تعیین توالی پلاسمید ساب کلون شده، درستی مراحل ساب کلون کردن ژن BDNF بر روی وکتور ترشحی را تائید کرد. بررسی بیان ژن BDNF در سلول های ترانسفکت شده بوسیله روش RT-PCR نشان داد که این ژن در سلول ها بیان شده است. تولید پروتئین BDNF در این سلول ها از طریق روش SDS- page و ایمنوبلاتینگ، به اثبات رسید. آزمون ELISA بر روی سوپرناتانت سلول های ترانسفکت شده و سلول های گروه کنترل منفی که شامل سلول های BMSC بود، انجام شد و نتایج حاصل نشان داد که وکتور ترشحی بکار رفته در این تحقیق قادر به ترشح پروتئین در محیط خارج سلولی می باشد. در روش ایمنوسایتوشیمی، بیان Nestin، فیبرونکتین، 68 NF، 200NF و BDNF در سلول های ترانسفکت شده با ترشح پایدار، مورد بررسی قرار گرفت.
بحث: داده های به دست آمده نشان داد که ترشح پروتئین BDNF در سلول های ترانسفکت شده دارای سطح بالاتری (4 برابر) می باشد. این موضوع بر موفقیت فرآیند ترانسفکت کردن دلالت دارد.
کلید واژه ها: سلول هاي استرومايي مغز استخوان ، وکتور ترشحی pSecTag 2 ، ترانسفکت با لیپوفکتامین و سلول های شبه عصبی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته 1
1-1. تعریف طناب نخاعی 2
1-2. ضایعات طناب نخاعي 2
1-2-1. انواع ضایعات طناب نخاعي 3
1-3. ایجاد ضایعات نخاعی بر اثر عوامل پاتوفیزیولوژیک 4
1-3-1. ایسکمي 4
1-3-2. ادم 4
1-3-3. تغییرات ترکیب یونی در منطقه آسیب دیده 4
1-4. درمان ضایعه نخاعی 5
1-5. درمان ضایعه نخاعی با استفاده از سلول هاي بنیادي 5
1-6. انواع سلول هاي بنیادي 6

1-6-1. سلول هاي بنيادي جنيني 6
1-6-2. سلول هاي بنيادي رويانی 6
1-6-3. سلول هاي بنيادی زايا ي 6
1-6-4. سلول های بنيادي بالغ 6
1-6-4-1. سلول های BMSC 7
1-6-4-2. دلايل انتخاب سلول های BMSC 8
1-6-4-3. مطالعات انجام شده با استفاده از سلول های BMSC در درمان ضايعات نخاعی 9
1-7. درمان ضايعات نخاعی با استفاده از ژن درمانی بر پايه سلولی 10
1-8. خانواده نوروتروفين ها 11
1-8-1. نوروتروفين BDNF 11
1-8-2. ساير نوروتروفين ها 12
1-9. وکتور ترشحی pSecTag2 hygro C 13
1-10. تعريف ساب کلون کردن 15
1-11. تعريف ترانسفکت کردن 15
1-11-1. روش های ترانسفکت کردن 15
1-1-11-1. ترانسفکت کردن بوسيله مواد شيميايی 16
1-1-11-2. ترانسفکت کردن با استفاده از ليپوزوم 16
1-1-11-3. ترانسفکت کردن با استفاده از روش های مکانيکی 17
1-12. الکتروفورز دو بعدی پروتئين ها SDS- Page 17
1-13. اهداف تحقيق 20

فصل دوم: مواد و روش ها 21

2-1. مراحل ساب کلون کردن 22
2-1-2. ترانسفورم کردن باکتری بوسيله وکتور pCMV-SPORT6 و PsecTag 2 hygro 22
2-1-3. استخراج پلاسميد 24
2-1-3-1. تعيين غلظت پلاسميد 25

2-1-3-2. الکتروفورز پلاسمید 25
2-1-4. برش آنزیمی پلاسمید ها 26
2-1-5. استخراج DNA از ژل الکتروفورز 27
2-1-6. اتصال ژن BDNF به وکتور ترشحی 28
2-1-7. تغلیظ پلاسمید استخراج شده 29
2-2. آماده سازی سلول های استرومایی مغز استخوان 28
2-2-1 طرز تهیه محیط کشت α-MEM 29
2-2-2. طرز تهیه PBS برای محیط کشت 30
2-2-3.جداسازی و کشت سلول های استرومایی مغز استخوان 30
2-2-4. بررسی زنده بودن سلول ها 31
2-2-5. شناسایی سلول‌های استرومایی مغز استخوان 31
2-3. ترانسفکت نمودن سلول های استرومایی مغز استخوان 33
2-4. جداسازی سلول های ترانسفکت شده از سلول های ترانسفت نشده 34
2-4-1. تعیین دوز کشنده Hygromycin B 35
2-4-2. جداسازی سلول های ترانسفکت شده 35
2-5. بررسی بیان ژن BDNF با استفاده از تکنیک RT-PCR .. 35
2-5-1. استخراج RNA 35
2-5-2. بررسی RNA استخراج شده 37
2-5-2-1. تعیین غلظت با اسپکتروفتومتری 37
2-5-2-2. الکتروفورز بر روی ژل آگارز برای بررسی خلوص RNA 38
2-5-3. مرحله سنتز cDNA 40
2-5-4. طراحی پرایمر اختصاصی برای واکنش PCR 42
2-5-5. واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR 42
2-6. بررسی سنتز پروتئین BDNF بوسیله تکنیک SDS-page و Western blot 44
2-6-1. استخراج پروتئین از سلول های ترانسفکت شده 44
2-6-2. انجام الکتروفورز عمودی پروتئین SDS-page 45
2-6-2-1. تهیه بافر های مورد نیاز 46
2-6-2-2. ساخت ژل های الکتروفورز 48
2-6-3. آماده سازی نمونه پروتئین 49
2-6-3. انجام Western Blot 50
2-6-3-1. انتقال نیمه خشک 50
2-6-3-2. رنگ آمیزی قابل برگشت با پانسو- اس 52

2-6-3-3. تشخیص باند پروتئین BDNF بوسیله آنتی بادی اختصاصی 52
2-6-3-3-1. مرحله مسدود سازی 52
2-6-3-3-2. افزودن آنتی بادی اولیه و ثانویه 53
2-6-3-3-3. افزودن بافر سوبسترا و مشاهده باند ها 54
2-6-4. بررسی ایمنوسایتوشیمی تمایز به سلول های شبه عصبی 54
2-7. بررسی ترشح پروتئین BDNF در محیط خارج سلولی بوسیله ELISA 55
2-7-1. جمع آوری نمونه 55
2-7-2. سنجش غلظت پروتئین BDNF 56

فصل سوم: نتایج و یافته ها 58

3-1. نتایج مرحله ساب کلون کردن 59
3-1-1. نتایج استخراج پلاسمید 59
3-1-2. نتایج بررسی الکتروفورز پلاسمید ها 59
3-1-3. نتایج مرحله برش آنزیمی پلاسمید ها 59
3-1-4. نتایج مرحله اتصال ژن BDNF به وکتور ترشحی 60
3-1-5. نتایج بررسی پلاسمید ساب کلون شده 60
3-2. نتایج مربوط به مرحله کشت سلولی 61
3-2-1. جداسازی و کشت سلول های استرومایی مغز استخوان 61
3-2-2. نتایج بررسی میزان حیات سلول ها با تریپان بلو 61
3-2-3. نتایج شناسایی سلول‌های استرومایی مغز استخوان 61
3-3. نتایج مرحله ترانسفکت کردن سلول ها 61
3-4. نتایج مرحله بررسی بیان ژن BDNF با استفاده از تکنیک RT-PCR 62
3-5. نتایج بررسی سنتز پروتئین BDNF بوسیله تکنیک SDS-page و Western blot 62
3-6. نتایج بررسی ایمونوسایتوشیمی تمایز به سلول های شبه عصبی 62
3-7. نتایج بررسی ترشح پروتئین BDNF در محیط خارج سلولی بوسیله ELISA 63

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها 73

4-1. بحث 74
4-2. نتیجه گیری 79
4-3. پیشنهاد ها 79

فهرست منابع 80
چکیده انگلیسی 88

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل1-1. تصویر شماتیک از نحوه تکثیر پلاسمید در باکتری میزبان 13
شکل 1-2. نقشه پلاسمید ترشحی pSecTag2 Hygro به همراه سایت های برش آنزیم ها 14
شکل 1-3. ساختار عمومی لیپید های کاتیونی سنتز شده . 17
شکل 3-1. الکتروفوروگرام پلاسمید pCMV-SPORT6 بعد از ترانسفورم و تکثیر در باکتری 63
شکل 3-2. الکتروگرام از محصول هضم آنزیمی پلاسمید SPORT6 pCMV- 64

شکل 3-3. الکتروگرام مربوط به محصول هضم آنزیمی پلاسمید pSecTag 2 64
شکل 3-4. الکتروگرام از پلاسمید pSecTag 2-BDNF ساب کلون شده 65
شکل 3-5. الکتروگرام از محصول هضم آنزیمی پلاسمید ساب کلون شده 66
شکل 3-6. نتیجه تعیین توالی پلاسمید ساب کلون شده 66
شکل 3-7.بررسی مورفولوژی سلول های BMSC 67
شکل 3-8. بررسی ایمنوسیتوشیمی سلول های تمایز نیافته BMSCs در پایان پاساژ چهارم 68
شکل 3-9. تصاویر میکروسکوپ نوری اینورت از جزایر سلول های ترانسفکت شده بعد از افزودن Hygromycin 69
شکل 3-10. الکتروفورگرام از محصول RT-PCR حاصل از استخراجmRNA جهت بیان ژن های BDNF و β2M در سلول های BMSC ترانسفکت شده 70
شکل 3-11. تصویر محصول ایمنوبلاتینگ لایزیت سلول های BMSC ترانسفکت شده 70
شکل 3-12. بررسی ایمنوسیتوشیمی سلول های شبه عصبی حاصل از ترانسفکت سلول های BMSC با وکتور حاوی ژن BDNF 71
شکل 3-13. نمودار مقایسه میانگین غلظت پروتئین BDNF در سوپرناتانت سلول های کشت داده شده بعد از 24 ساعت، بوسیله روش ELISA 72

فصل اول

مقدمه و
مروری بر مطالعات گذشته

1-1. تعریف طناب نخاعی

سيستم عصبي پيچيده ترين دستگاه بدن انسان است كه از شبكه اي مشتمل بر 100 ميليارد سلول عصبي و چندين برابر آن سلول هاي بافت گليال كه نقش محافظتي، تغذيه اى و كمک به عملكرد دارند تشكيل شده است. هر سلول عصبي دست كم يك هزار نقطه متقابل[1] با ساير نورون ها دارد و اين ارتباطها موجب پيچيده شدن دستگاه عصبي مي‌شود [1].

سيستم اعصاب مركزي (CNS)[2] را به قسمت‌هاي مختلفي تقسيم مي‌كنند كه نخاع يک پل ارتباطي بين مراكز حسي و حركتي مى باشد. نخاع عمدتاً شامل سلول ها و الياف عصبي و سلول هاي بافت گليال است كه الياف نقش ارتباطى بين قسمت‌هاي صادر كننده و اجرا كننده فرمان و يا ارتباط بين بخش حسي و مراكز تصميم گيري و يا بين قسمت‌هاي مختلف نخاع را برقرار مي‌سازد. سلول هاي نخاعي نقش صدور فرمان حركت و يا نقش ارتباطي دارند، البته حركات صادر شده از نخاع به شدت تحت كنترل مراكز بالاتر مي‌باشد [2].

1-2. ضايعات طناب نخاعي

طناب نخاعى بر اثر فشارهاي مستقيم و غير مستقيم دچار آسيب ديدگي مى شود. وسعت ضايعات نخاعي متفاوت بوده هر ضايعه ى جدى كه به ستون مهره‌اي وارد شود

1 - Interconnection point
2- Centeral nervous system

مي‌تواند منجر به آسيب نخاعي گردد. آسيب‌هاي وارده بر اين سيستم مي‌تواند تاثيرات شديدي در زندگي فرد صدمه ديده بگذارد. در مورد اعمال حركتی، ممكن است ضعف اندام يا فلج يك اندام و آسيب نورون حركتی فوقانی (UMN) يا نورون حركتی تحتانی (LMN) وجود داشته باشد و در مورد اعمال حسی ممكن است فقدان حس، كاهش حس، افزايش حساسيت يا احساسهای غير طبيعی نظير احساس سوزش يا كرختی بروز كند. ضايعات طناب نخاعي تقريباً 10 درصد آسيب‌هاي وارده بر سيستم عصبي را تشكيل مي‌دهد. با آن كه اين آسيب‌ها معمولاً شديد نيست ولي اثرات مخربي داشته براي مدت طولاني و يا تا پايان عمر در زندگي فرد مشكلات فراوانی در ابعاد مختلف زندگی ايجاد مي‌كند [3].

حوادث و تصادفات از مهمترين علل ضايعات نخاعي مي‌باشد. طبق آمار اعلام شده از سوي NSCISC[1] بيشترين آمار ضايعه نخاعي مربوط به سن 30- 16 سالگي با شيوع 55/3 درصد گزارش شده است [4].

1-2-1. انواع ضايعات طناب نخاعي

الف - ضربه[2]

ضربه باعث به وجود آمدن علايم عصبي خفيفي شده پس از چند روز بهبود يا كاهش مي‌يابد [3].

ب - كوفتگي نخاع[1]

[1] - National Spinal Cord Injury Statistical Center
[2] - Concussion

اين نوع آسيب منجر به خونريزي در طناب نخاعي مي‌شود كه علائم آن در برخی موارد پايدار است [3].

ج - فشردگي نخاع[2]

اين نوع آسيب همراه با ادم و ايسكمي شديد بوده و منجر به نكروز مي‌شود. در اين ضايعه ممكن است پس از مدتي بعضي از علائم ضايعه نخاعي كاهش يابد [3].

د - قطع كامل نخاع

از علائم آن از بين رفتن كليه اعمال فيزيولوژيک نخاع در زير محل ضايعه به صورت دائمي مي‌باشد [3].

1-3. ايجاد ضايعات نخاعی بر اثر عوامل پاتوفيزيولوژيک

1-3-1. ايسكمي

كاهش پرفيوژن در ماده خاكستري منجر به آزاد شدن متابوليت‌هايي از قبيل سروتونين[3]، ترومبوكسان‌ها[4]، فاكتور فعال كننده پلاكتي[5]، پپتيدولوكوترين‌ها[6] و اوپيوييد پپتيد[7] مي‌شود. اين عوامل منجر به انقباض عروق[8] تغذيه كننده نخاع شده و در نهايت ايجاد ايسكمي مي‌كند.

---

[1] - Contusion
[2] - Compression
[3] - Serotonin
[4] - Thromboxanes
[5] - Platelet activation factor
[6] - Peptidoleukotrienes
[7] - Opioid- peptide
[8] - Vasoconstriction

اين كاهش جريان خون منجر به كاهش ميزان اكسيژن در ناحيه ضايعه و به تبع آن آسيب سلولي مي‌گردد [5].

1-3-2. ادم

بررسي مدل آزمايشگاهي نشان داد كه ادم ابتدا در قسمت مركز نخاع ايجاد مي‌شود و سپس به بخش‌هاي محيطي گسترش مي‌يابد .[5].

1-3-3. تغييرات تركيب يوني در منطقه آسيب ديده

افزايش ميزان كلسيم يوني Ca^{2+} در اكسون‌ها[1] در منطقه ضايعه از چند دقيقه بعد از آسيب گزارش شده است كه طي 8 ساعت اين مقدار به حداكثر مقدار خود مي‌رسد و تا يک هفته ادامه مي‌يابد [6].

افزايش غلظت يون كلسيم موجب فعال شدن آنزيم هاي فسفوليپاز C و فسفوليپاز A_2 مي‌شود. فعاليت آنزيم‌هاي فوق الذكر با توليد متابوليت‌هاي اسيد آراشيدونيك از قبيل: راديكال آزاد، ترمبوكسان ها و پتيدولوكوترين‌ها موجب آسيب مي‌شوند. يكي ديگر از يون هايي كه در روند آسيب نخاعي نقش دارد يون پتاسيم (K^+)مي‌باشد، بلافاصله بعد از آسيب ميزان پتاسيم خارج سلولي افزايش مي‌يابد كه ناشي

[1] - Intra-axonal