دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی

گرایش سلولی و مولکولی

بررسی بیان ژنی نوروتروفین ۳(NT3) در موش‌های صحرایی(rat) نخاعی شده

استادان راهنما:

دکتر ابولقاسم اسماعیلی

دکتر کامران قائدی

استاد مشاور:

دکتر مهران میراولیایی

پژوهشگر:

صباحیدرزاده

اسفند ماه ۱۳۸۹

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش سلولی و مولکولی

خانم صبا حیدرزاده تحت عنوان

بررسی بیان ژن نوروتروفین ۳ (NT3) در موش‌های صحرایی(رات) نخاعی شده

در تاریخ ۱۳۸۹/۱۲/۱۶ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول پایان نامه دکتر ابولقاسم اسماعیلی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۲- استاد راهنمای دوم پایان‌نامه دکتر کامران قائدی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۳- استاد مشاور پایان‌نامه دکتر مهران میراولیایی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۴- استاد داور داخل گروه دکتر سیّد جمال مشتاقیان با مرتبه علمی استادیار امضاء

۵- استاد داور خارج گروه دکتر اردشیر طالبی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

امضای مدیرگروه

گروه زیست شناسی Department Of Biology 1965

ستایش کنم ایزد پاک را که گوید و بیناکند خاک را

سپاس میگویم پروردگارم را که مرا در انجام این پژوهش یاری نمود.

از همه مرعزیزم بی نهایت سپاسگزارم که صبورانه در کنارم بوده و وجودش انگیزه‌ای برای زیستن.

با تشکر فراوان از اساتید محترم راهنما جناب دکتر ابوالقاسم جناب دکتر کامران قائدی که با دقت نظر و راهنمایی های شایسته

شان در تمامی مراحل این پژوهش مرا یاری رساندند.

جناب آقای دکتر شکرالله خاکی و جناب دکتر مهدی رضایی که در این مرحله از تحصیل افتخار شاگردیشان را داشتم و از ایشان

بسیار آموختم تشکر را دارم.

همچنین از همکلاسیها و دوستانم به ویژه خانم زینب غلامی که از محبتها و کمکهای بی دریغشان بی نصیب نبوده ام قدردانی مینمایم.

تقدیم به

پدر عزیز و مهربانم

مادر دلسوز و فداکارم

و

همگی آنهایی که دوستم دارند

چکیده :

ضایعه نخاعی حادثه‌ای غیرقابل پیش‌بینی است که منجر به از دست رفتن اعمال حسی و حرکتی مناطق پایین‌تر از آسیب می‌گردد. در حال حاضر ۹۰ میلیون نفر در سراسر جهان از آسیب نخاعی رنج می‌برند. در طی آسیب نخاعی مسیرهای حسی و حرکتی تخریب شده و منجر به ناتوانی شخص مصدوم می‌گردند.

بازگشت اعمال حسی وحرکتی و رفلکسی ازدست‌رفته به بازیابی نورونی و ترمیم آکسونی یک‌سری از ژن‌های ترمیمی موجود در محل آسیب بستگی دارد. ازجمله این ژن‌ها می‌توان به اعضای خانواده نوروتروفین‌ها اشاره‌کرد که فاکتورهای رشد پیچیده‌ای هستند و در بقاء ، تکثیر و ترمیم نورون‌ها و رشد آکسونی در سیستم عصبی مرکزی دخالت دارند. NT3 یکی از اعضای خانواده‌ی نوروتروفینی است که مسئول ماندگاری و بقاء نورون‌ها و گلیاها در دستگاه عصبی و فاکتور شناخته شده برای تمایز سلول‌های عصبی طی تکوین در دوران جنینی و همچنین به‌دنبال جراحت می‌باشد.

در این مطالعه، ۵۴ رات نر از نژاد ویستار، در ۶ گروه ۹تایی قرار گرفتند. یکی از گروه‌ها به عنوان شاهد و مابقی به ترتیب به عنوان گروه‌های آزمایشی ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعته و همچنین ۷ و ۱۰ روزه مشخص شدند. همه‌ی گروه‌های آزمایشی تحت عمل جراحی از نوع برش عرضی برروی مهره T9 قرار گرفتند. سپس سر جانور در زمان‌های موردنظر جداگردید و نمونه بافت نخاع از محل برش و نواحی بالا و پایین آن برداشته شد. در مرحله‌ی بعد، از نمونه‌های بدست‌آمده RNA کلی استخراج گردید. RNA استخراج‌شده به cDNA تبدیل شد و نهایتا" میزان بیان ژن مذکور توسط روش کمّی Real time PCR بررسی گشت.

نتایج بدست‌آمده از Real time PCR و پروفایل بیان ژن NT3 حاکی از آن بود که ژن NT3 در قسمت بالای برش، محل برش و نواحی پایین‌تر از آن باتوجه به زمان‌های مختلف پس از اطجاد ضایعه ابتدا افزایش بیان نشان داد و سپس این افزاطش بطان تعدیل شد. در بالای محل برش، میزان بیان ژن مربوطه در زمان ۶ ساعت افزایش یافته و در ۷۲ ساعت به اوج خود می رسد و سپس کاهش می‌یابد و به سطح نرمال می‌رسد. در محل برش این افزایش میزان mRNA از ۶ ساعت تا ۲۴ ساعت ادامه داشته و سپس کاهش می‌یابد ولی به سطح نرمال نمی‌رسد. در پایین محل برش الگوی بطان ژن متفاوت بود. بدین‌گونه که در زمان ۶ ساعت افزایش یافته سپس در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت کاهش می‌یابد و دوباره افزایش بیان در زمان‌های ۷ و ۱۰ روز مشاهده شد.

به‌طور کلی افزایش بیان مشاهده شده پس از آسیب می‌تواند به علت افزایش ناگهانی در فرایند تخریب نورونی و دمیلینه شدن آکسون‌ها، افزایش فعالیت میکروگلیاها، کاهش مولکول‌های مهارکننده ناشی از آن، افزایش واکنش‌های التهابی و هجوم ماکروفاژها به محل آسیب و درنهایت ایجاد شرایطی مطلوب جهت افزایش بیان ژن‌های تحریک کننده رشد آکسونی و دخیل در بقاء نورونی باشد. این افزایش ناگهانی پس از اینکه عوامل تحریک کننده کاهش می‌یابد و تخریب نورونی متوقف می‌گردد، سیر نزولی پیدا می‌کند. تفاوت الگوهای بیانی در پایین محل برش می‌تواند به علت قطع ارتباط با قسمت‌های بالایی دستگاه عصبی مرکزی و تفاوت در دریافت سیگنال‌ها از آن نواحی باشد.

واژه‌های کلیدی: ضایعه نخاعی، نوروتروفین۳ ، بیان ژنی، موش صحرایی(رات)، Real time PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱نخاع ۱

۱-۲ضایعات نخاعی ۳

۱-۳ آسیب شناسی پس از آسیب نخاعی ۴

۱-۴ تغییرات مولکولی پس از آسیب نخاعی ۵

۱-۵ مرگ سلولی و آسیب نخاعی ۶

۱-۶بازسازی عصبی پس از ضایعات نخاعی ۷

۱-۶-۱ مولکول‌های مهارکننده رشد آکسونی ۸

۱-۶-۱-۱ OMgp ۸

۱-۶-۱-۲ Nogo ۸

۱-۶-۱-۳ CSPGs ۹

۱-۶-۱-۴ MAG ۹

۱-۶-۱-۵ افرین‌ها ۹

۱-۶-۱-۶ اسلیت و نترین‌ها ۱۰

۱-۶-۱-۷ سمافورین‌ها ۱۰

۱-۶-۲ مولکول‌های تحریک کننده رشد آکسونی ۱۰

۱-۶-۲-۱ GAP ۱۰

۱-۶-۲-۲ نوروتروفین‌ها ۱۱

۱-۷ معرفی نوروتروفین‌ها ۱۱

۱-۷-۱ ساختار ژنی و تنظیم بیان ژنی نوروتروفین ها ۱۲

۱-۷-۲ گیرنده‌های نوروتروفینی ۱۳

۱-۷-۲-۱ گیرنده Trk ۱۴

۱-۷-۲-۲ گیرنده P75 ..... ۱۶

۱-۷-۳ مسیرهای پیام رسانی نوروتروفین‌ها ۱۷

۱-۷-۳-۱ مسیرهای پیام رسانی نوروتروفین‌ها از طریق گیرنده Trk ۱۸

۱-۷-۳-۱-۱مسیر Ras-MAPK ۲۰

عنوان **صفحه**

۱-۷-۳-۱-۲ مسیر RAP-MAPK ۲۰
۱-۷-۳-۱-۳ مسیر PI3-Akt ۲۰
۱-۷-۳-۱-۴ مسیر PLC-γ ۲۱
۱-۷-۳-۲ مسیرهای پیام رسانی نوروتروفین‌ها از طریق گیرنده p75 ..... ۲۱
۱-۸ NT3 ..... ۲۳
۱-۸-۱ ساختار ژنی NT3 ..... ۲۵
۱-۹ آشنایی با تکنیک Real time PCR ۲۶
۱-۹-۱ اصول پایه Real time PCR ۲۶
۱-۹-۱-۱ تکنیک رنگ های DNA دورشته ای ۲۹
۱-۹-۱-۲ تکنیک کاوشگر گزارشگر فلورسنت ۳۰
۱-۹-۲ تعیین کمی در Real time PCR ۳۱
۱-۹-۳ کاربردهای واکنش Real time PCR ۳۲
۱-۱۰ اهدافی که در این تحقیق دنبال می‌شوند ۳۳
۱-۱۱ اهمیت و کاربرد نتایج تحقیق ۳۳

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ تجهیزات و دستگاه‌ها ۳۴
۲-۲ وسایل مورد نیاز جهت جراحی ۳۵
۲-۳ مواد مورد نیاز و نحوه ساخت ۳۶
۲-۳-۱ مواد مورد نیاز جهت جراحی ۳۶
۲-۳-۲ مواد مورد نیاز جهت استخراج RNA ۳۶
۲-۳-۳ مواد مورد نیاز جهت ژل الکتروفورز ۳۶
۲-۳-۳-۱ بافر Tris-HCl ۳۷
۲-۳-۳-۲ بافر Tris-HCl ۳۷
۲-۳-۳-۳ اتیدیوم بروماید ۳۸
۲-۳-۳-۴ لودینگ بافر ۳۸
۲-۳-۳-۵ شناساگرهای اندازه DNA ۳۸

عنوان **صفحه**

۲-۳-۴ مواد مورد نیاز جهت سنتز cDNA ۳۹
۲-۳-۵ مواد مورد نیاز جهت تکنیک Real time PCR ۳۹
۲-۳-۵-۱ پرایمرهای اختصاصی ۳۹
۲-۳-۵-۲ SYBR Green ۴۰
۲-۳-۵-۳ تیوب ویژه Real time PCR ۴۱
۲-۴ حیوانات آزمایشگاهی، رژیم غذائی و شرایط نگهداری ۴۱
۲-۵ گروهبندی ۴۲
۲-۶ جراحی ۴۲
۲-۷ برداشت نمونه نخاع ۴۴
۲-۸ استخراج RNA ۴۵
۲-۸-۱ شرح مراحل استخراج RNA ۴۶
۲-۸-۲ بررسی میزان RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۴۷
۲-۹ روش الکتروفورز ۴۷
۲-۱۰ آماده سازی RNA ۴۷
۲-۱۱ سنتز cDNA ۴۸
۲-۱۲ Real time PCR ۴۸
۲-۱۳ آزمون‌های آماری ۵۰

فصل سوم: نتایج

۳-۱ نتایج استخراج RNA ۵۱
۳-۲ نتایج Real time PCR ۵۳
۳-۲-۱ منحنی ذوب ۵۳
۳-۲-۲تعیین غلظت cDNA ۵۵
۳-۳تجزیه و تحلیل نتایج ۵۵
۳-۳-۱نتایج تغییرات بیان ژن NT3 در بالای محل برش ۵۶
۳-۳-۲ نتایج تغییرات بیان ژن NT3 در محل برش ۵۷
۳-۳-۳ نتایج تغییرات بیان ژن NT3 در پایین محل برش ۵۸

عنوان **صفحه**

فصل چهارم:بحث و نتیجه گیری

۴-۱ بحث ۵۹

۴-۱-۱ تغییرات مولکولی مختلف پس از آسیب نخاعی ۵۹

۴-۱-۲نقش نوروتروفین ها در ترمیم و آپوپتوز نخاع ۶۲

۴-۱-۳ تغییرات بیان ژنی نوروتروفین ها و گیرنده های آنها پس از آسیب نخاعی ۶۳

۴-۲ نتیجه‌گیری ۶۵

۴-۳ خلاصه نتایج ۶۶

۴-۴ پیشنهادها ۶۶

منابع و مآخذ ۶۷

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱ ساختار نخاع، مقطع نخاع و اعصاب نخاعی ۲
شکل۱-۲ علل ایجاد ضایعات نخاعی ۴
شکل۱-۳ گیرنده‌های نوروتروفینی ۱۴
شکل۱-۴ ساختار گیرنده Trk ۱۵
شکل ۱-۵ ساختار گیرنده P75 ..... ۱۶
شکل۱-۶ عملکرد اختصاصی گیرنده Trk در حضور گیرنده P75 ..... ۱۷
شکل۱-۷ مسیرهای پیام رسانی نوروتروفین‌ها ۱۸
شکل۱-۸ مسیرهای پیام رسانی نوروتروفین‌ها از طریق گیرنده Trk ۱۹
شکل۱-۹ مسیرهای پیام رسانی نوروتروفین‌ها از طریق گیرنده P75 ..... ۲۳
شکل۱-۱۰ میل ترکیبی NT3 با گیرنده های Trk ۲۴
شکل۱-۱۱ جایگاه ژن NT3 در انسان ۲۵
شکل۱-۱۲ جایگاه ژن NT3 در رات ۲۶
شکل۱-۱۳ مراحل تکثیر در Real time PCR ۲۷
شکل۱-۱۴ SYBR Green در real time PCR ۳۰
شکل۱-۱۵ کاوشگر در Real time PCR ۳۱
شکل۲-۱ شناساگر DNA ۳۹
شکل۲-۲ ساختمان مولکولی SYBR Green ۴۰
شکل ۲-۳ تیوب مخصوص Real time PCR ۴۱
شکل۲-۴ اتاق نگهداری از حیوانات ۴۲
شکل۲-۵ مراحل جراحی ۴۴
شکل۲-۶ جدا شدن سر جانور ۴۵
شکل۲-۷ دستگاه ترموسایکلر ۵۰
شکل۳-۱ تایید استخراج RNA با استفاده از ژل الکتروفورز ۵۲
شکل۳-۲منحنی ذوب مربوط به ژن NT3 ..... ۵۴
شکل۳-۳ منحنی ذوب مربوط به ژن خانه گردان β-actin ۵۴

عنوان **صفحه**

شکل۳-۴ پروفایل ژن NT3 مربوط به ناحیه بالای محل برش ۵۶
شکل۳-۵ پروفایل ژن NT3 مربوط به محل برش ۵۷
شکل۳-۶ پروفایل ژن NT3 مربوط به ناحیه پایین محل برش ۵۸

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱ دستگاه‌های مورد نیاز..... ۳۴
جدول ۲-۲ غلظت های مختلف آگارز با توانایی جداسازی مختلف ۳۷
جدول۲-۳ پرایمرهای استفاده شده جهت Real time PCR ۴۰
جدول۳-۲میزان RNA استخراج شده مربوط به بالای برش بر اساس دستگاه اسپکتروفتومتر..... ۵۲
جدول۳-۲ میزان RNA استخراج شده مربوط به محل برش بر اساس دستگاه اسپکتروفتومتر ۵۲
جدول۳-۳ میزان RNA استخراج شده مربوط به پایین برش بر اساس دستگاه اسپکتروفتومتر..... ۵۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱ نخاع

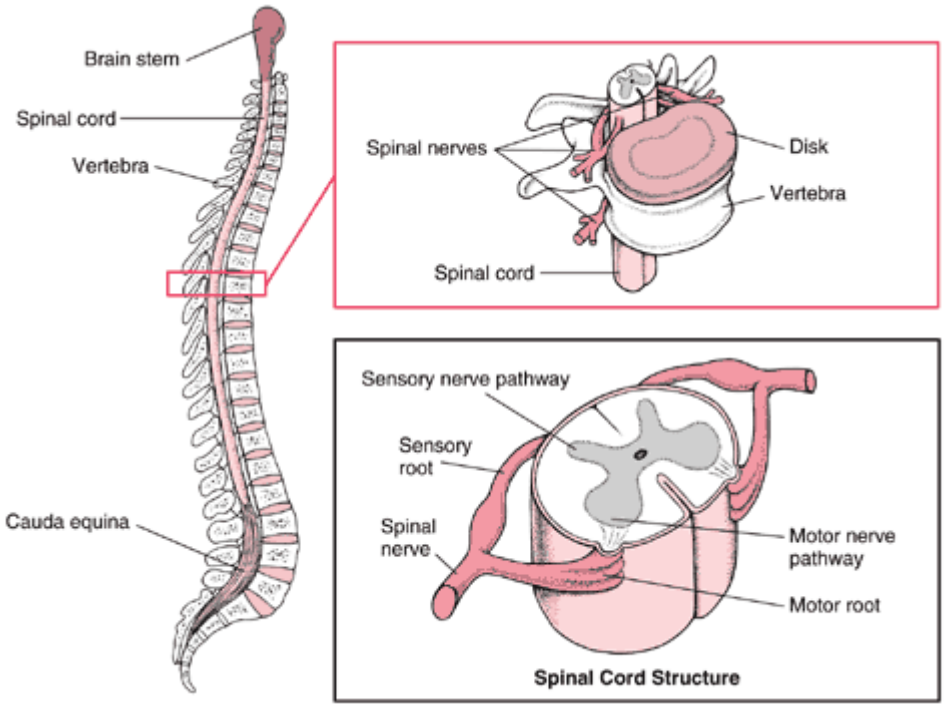
نخاع قسمتی از دستگاه عصبی مرکزی است که متشکل از رشته های لوله ای و کشیده ای شامل بافت عصبی و سلولهای محافظ است و توسط ستون مهره ها محافظت می‌شود. طول نخاع در مردان ۴۵ سانتیمتر و در زنان ۴۳ سانتیمتر بوده و از سوراخ مگنوم تا فضایی بین اولین و دومین مهره کمری کشیده شده است . نخاع مسیر اصلی برای اطلاعاتی است که مغز به دستگاه عصبی محیطی منتقل می‌کند. طول طناب نخاعی بسیار کوتاهتر از طول مجرای نخاعی است . در انسان نخاع بعد از بصل النخاع[1] آغاز شده و در مجرای مخروطی[2] مجاور اولین و دومین مهره کمری ادامه می‌یابد و در امتداد نخ مانند[3] پایان می‌یابد. در برش عرضی نخاع ، بخش محیطی نخاع ماده سفید نام دارد که شامل نورونهای حسی و حرکتی است .بخش مرکزی آن ماده خاکستری است که پروانه شکل بوده و از جسم سلولی عصب ساخته شده است . این ناحیه مرکزی ، کانال مرکزی را احاطه می‌کند که از نظر آناتومی ادامه فضاهایی در مغز به نام بطن[4] می‌باشد و مانند بطن ها حاوی مایع مغزی نخاعی است.

نخاع توسط سه لایه به نام مننژهای نخاعی محافظت می‌شود که طناب نخاعی را احاطه می‌کنند و به ترتیب سخت شامه ، عنکبوتیه و نرم شامه نام دارند.(Maton, A et al 1993)

---

1 Medulla oblongata
2 Conus medullaris
3 Filum terminale
4 Ventricle

در انسان نخاع به ۳۱ قطعه مختلف تقسیم می شود که نورومر[1] نامیده می شوند. از هر قطعه یک جفت اعصاب نخاعی چپ و راست که شامل فیبرهای حسی و حرکتی می‌باشند، خارج می‌شود و به قسمتهای مختلف بدن ارسال می‌گردند (شکل۱-۱). فیبرهای حرکتی از طریق شاخ قدامی نخاع خارج شده و اطلاعات حرکتی را به قسمتهای مختلف منتقل می‌کنند . (Durrant and True, 2001). فیبرهای حسی از طریق ریشه پشتی وارد شاخ خلفی نخاع می‌شوند و اطلاعات حسی را وارد نخاع می‌کنند . عملکرد نخاع در درجه اول انتقال پیام های عصبی بین مغز و سایر قسمتهای بدن است. با این حال نخاع شامل مدارهای عصبی است که می تواند به طور مستقل رفلکس های متعددی را کنترل و هماهنگ کند. اطلاعات حسی که از پوست، ماهیچه و مفاصل دریافت می‌شوند، به نخاع انتقال یافته و از طریق مسیرهای صعودی و رفلکسی به نخاع یا مغز مخابره می‌شوند. پس از پردازش اطلاعات در دستگاه عصبی مرکزی حرکات و اعمال رفلکسی اندام‌ها و تنه کنترل می‌شود (saladin,2009) .



شکل ۱-۱ ساختار نخاع، مقطع نخاع، اعصاب نخاعی[2]

1 Neuromer
2 http://www.home .planet.nl

۱-۲ ضایعات نخاعی

ضایعه نخاعی (SCI) یکی از علل منجر به معلولیت جسمی در جوانان است که موجب ناتوانی می‌شود و اثرات جسمی و روحی آن تنها محدود به فرد نمی‌شود، بلکه گریبان‌گیر خانواده و جامعه نیز می‌شود (Lim,P and Tow,A.M., 2007). به دلیل ساختار و سازماندهی نخاع که اطلاعات حسی را به مغز مخابره می‌کند و اطلاعات حرکتی را به بدن می‌فرستد ،آسیب در نخاع نتایج مخربی در پیش داشته و اغلب به نقص عملکردهای حسی و حرکتی در مناطق پایین تر از ناحیه آسیب منجر می‌شود.

آسیب های نخاعی بر اساس شدت ، نوع و میزان آسیب به دو دسته کلی طبقه بندی می‌شوند :

۱) آسیب نخاعی کامل : در این نوع آسیب ، هیچگونه عملکرد حسی و حرکتی در مناطق پایین تر از ناحیه ضایعه دیده نمی‌شود. اخیرا نشان داده شده است که کمتر از ۵ درصد افرادی که دچار این نوع آسیب شده اند تاحدودی نیروی حرکتی خود را بدست می‌آورند (Bareyre, F. M., 2007).

۲) آسیب نخاعی ناقص: درجاتی از عملکردهای حسی و حرکتی دست نخورده باقی می‌مانند و ممکن است بهبودی خودبخودی نیز صورت بگیرد. ۹۵ درصد از افراد با آسیب های نخاعی ناقص قادرند از نظر حرکتی مقداری از توانایی های خود را بازیابند (Bareyre, F. M., 2007).

طبق آخرین گزارش مرکزآماری بین المللی آسیب نخاعی[1] در حال حاضر ۹۰ میلیون نفر در سراسر جهان دچار آسیب های نخاعی هستند که تنها در آمریکا سالانه ۱۲ هزار مورد جدید به این جمعیت افزوده می‌شود.

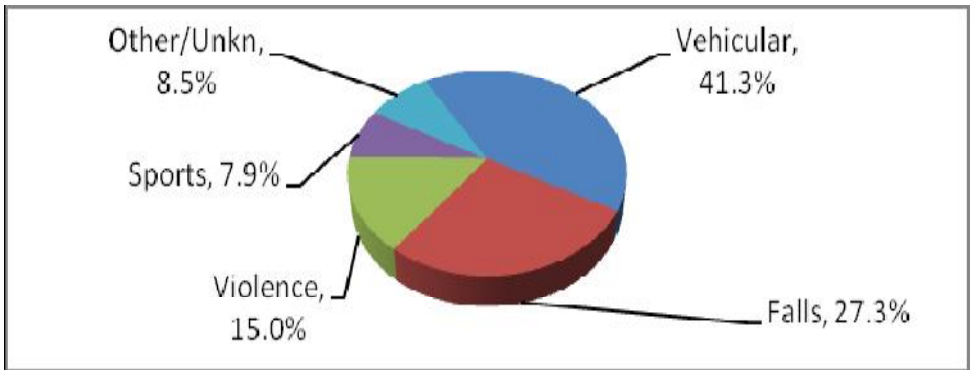
از نظر آماری ۸۰/۸ درصد آسیب دیدگان، مردان در سنین بین ۱۶ تا ۳۰ سال می‌باشند. از لحاظ علل ایجاد ضایعه (شکل۱-۲)، تصادفات با وسایل نقلیه۴۱/۳ درصد، سقوط از ارتفاعات ۲۷/۳ درصد، ایجاد ضایعه در اثر خشونت ۱۵ درصد، حوادث ورزشی ۷/۹ درصد وسایر علل ۸/۵ درصد از میزان علل ایجاد آسیب های نخاعی را به خود اختصاص داده‌اند. از نظر شدت ضایعه تتراپلژی[2] ناقص فراوان ترین (۳۰/۱ درصد) میزان وقوع را دارا است و پس از آن پارا پلژی[3] کامل (۲۵/۶ درصد)، تتراپلژی کامل (۲۰/۴) درصد و پاراپلژی ناقص (۱۸/۵ درصد) قرار دارند.

---

1 NSCISC

2 Tetraplegia= فلج کامل از گردن به پایین شامل دست‌ها و پاها

3 Paraplegia= فلج ناقص که دستها قادر به ایجاد حرکت می‌باشند



شکل ۱-۲ علل ایجاد ضایعات نخاعی[1]

۱-۳ آسیب شناسی پس از آسیب نخاعی

در ابتدا آسیب هایی که به نخاع و جسم مهره وارد می‌آیند و آسیب های اولیه خوانده می‌شوند، سبب قطع شدگی عرضی کامل[2] و یا یکطرفه[3] یاکوفتگی و له شدگی نخاع می‌شوند. در قطع شدگی کامل تمام عملکردهای حسی و حرکتی از بین می‌روند ولی در نوع یکطرفه ، عملکردهای حرکتی مربوط به سمت محل آسیب دیدگی و نیز احساس درد و حرارت در سمت مقابل مختل می‌شوند. پس از آسیب های اولیه تغییرات پاتولوژیکی ایجاد می‌شوند که آسیب های ثانویه نامیده می‌شوند(Taoka and Okajima , 1998). از جمله این تغییرات، خونریزی در ماده خاکستری طناب نخاعی پس از وارد شدن آسیب اولیه است، درحالیکه در ساعت‌های اولیه ماده سفید از نظر ظاهری دست نخورده وسالم به نظر می‌رسد (Rosenberg and Wrathall, 1997). آسیب‌های مکانیکی وارد شده به رگ‌های کوچک موجب اسپاسم رگی و ترمبوز در محل ضایعه می‌شود (Tator and Fehling, 1991). این عمل موجب کاهش اکسیژن رسانی تا چندین ساعت پس از آسیب به این بافت می‌گردد که نهایتا به نکروز و ایسکمی در محل ضایعه می‌انجامد (Stokes and Garwood, 1982).

افرادی که دچار ضایعات نخاعی شده اند، علاوه بر ناتوانی حسی و حرکتی،عوارض دیگری را نیز متحمل می‌شوند: مختل شدن عملکرد مثانه و روده از نظر دفع که توسط ناحیه کمری نخاع تنظیم می‌شوند. اختلالات تنفسی، در صورتی که مهره های اول و دوم دچار آسیب دیدگی شوند.ناتوانی یا کاهش توانایی تنظیمات ضربان-

1The 2010 statistical report for the model spinal cord injury care systems. 2010. National spinal cord injury statistical center.Birmingham. Alabama
2 Transection
3 Hemisection

قلب، فشارخون،تعریق و دمای بدن،اسپاستیسیته[1]، دردهای نوروپاتیک،اختلال رفلکسی خودمختار (افزایش غیر طبیعی فشار خون ، تعریق و سایر پاسخ های خود مختار به درد یا اختلالات حسی)،تحلیل ماهیچه ها، پوکی استخوان ،سنگ کلیه و سنگ صفرا از جمله این عوارض می‌باشند.

علل ریشه ای این مشکلات، تخریب مسیرهای مغزی است که نورونهای خودمختار نخاعی را در موقعیت خلفی ضایعه کنترل می‌کنند(Liewellyn-Smith,I.J et al , 2006) . ضایعه نخاعی همچنین می‌تواند موجب میلوپاتی یا آسیب به ریشه های عصبی[2]و فیبرهای میلینه شده‌ای شود که سیگنالهای عصبی را به سوی مغز هدایت می کنند یا از مغز می‌آورند. بسته به شدت آن، این نوع از آسیب می تواند همچنین به ماده خاکستری در بخش مرکزی نخاع آسیب برساند و موجب کاهش قطعه ای نورون های بینابینی [3]و نورونهای حرکتی شود.

۱-۴ تغییرات مولکولی پس از آسیب نخاعی

کوفتگی بافت نخاع به تخریب سلولها در محل آسیب ، پاسخ های التهابی شدید، مرگ سلولی آپوپتوتیک و نکروتیک ثانویه و پاسخ های جبرانی منجر می‌شود. این پاسخ ها به آسیب ، نشان دهنده و متاثر از تغییرات غلظت های mRNA است . البته این تغییرات ممکن است به علت تنظیم بیان ژن، یا در اثر تغییر جمعیت سلولی باشد (Carmel. JB., et al , 2001).

ضایعه نخاعی موجب القاء و مهار ژنهای مختلفی می‌شود . تاثیر متقابل هر کدام از این ژنها مرگ عصب و در نتیجه از دست رفتن عملکرد حرکتی را موجب می‌شود . فاکتورهای مختلف نسخه برداری،[4]IEGs، پروتئینهای شوک گرمایی و ژنهای پیش التهابی ، پس از آسیب نخاعی افزایش بیان نشان می‌دهند. از طرفی دیگر، بعضی گیرنده های نوروترانسمیترها و ترانسپورترها، کانالهای یونی، کینازها و پروتئینهای ساختاری، ۳ ساعت پس از آسیب نخاعی ، کاهش بیان نشان داده‌اند. بسیاری از ژنهایی که در رشد و تمایز، بقاء و حفاظت عصبی نقش دارند ، ۲۴ ساعت پس از آسیب، افزایش بیان داشته‌اند. مطالعات نشان داده است ترمیم و بازسازی برای ثبات بخشیدن به نخاع آسیب دیده، پس از ۲۴ ساعت آغاز می‌شود و التهاب ، اختلال عملکرد نوروترانسمیترها، عدم تعادل یونی و آسیب اسکلت سلولی ۳ ساعت پس از ایجاد ضایعه شروع می‌شود.

1Spasticity: افزایش رفلکس ها و سفت شدن عضلات
2 Nerve root
3Interneuron: نورون هایی که بین نورون حسی اولیه و نورون حرکتی نهایی قرار دارند
4 Immediate early genes

مولکول‌های چسبنده بین سلولی (ICAM) در طی ۳ ساعت پس از آسیب افزایش می‌یابد که این پدیده چسبیدن نوتروفیل‌ها به یکدیگر و مهاجرت آن‌ها به محل آسیب به خوبی توضیح می‌دهد (Song .G et al , 2001).

ژنهای دیگری‌که تحت تاثیر ضایعه نخاعی افزایش بیان نشان داده‌اند عبارتند از: فسفو دی استراز۴، نستین، فاکتور تقویت‌کننده عصب برگرفته از گلیا(Carmel. JB., et al , 2001)، c-fos، نوروتروفین ها وگیرنده-های نوروتروفین‌ها (Hayashi .M et al , 2000).

۱-۵ مرگ سلولی و آسیب نخاعی

دقایقی پس از ایجاد آسیب، واکنش هایی اتفاق می افتند که به سرعت گسترش یافته و موجب نکروز یا مرگ سلولی می‌شوند. رها شدن نوروترانسمیترهای تحریک کننده، واکنش های التهابی و تولید رادیکالهای آزاد از جمله مواردی هستند که بلافاصله پس از ضربه صورت می‌گیرند. رادیکالهای آزاد ، اسیدهای چرب غشاء سلولی را اکسید می‌کنند. استرس های اکسیداتیو موجب ناتوانی آنزیم‌های کلیدی زنجیره تنفسی می‌شوند و همچنین دارای اثر بازدارنده بر روی پمپ سدیم– پتاسیم هستند که همراه با هم موجب از بین رفتن فعالیت‌های متابولیکی و در نتیجه مرگ سلولی خواهند شد (Cuzzocrea et al., 2001).

آزادسازی نوروترانسمیتر تحریکی گلوتامات به میزان زیاد، موجب ایجاد یک سطح سمی از این ماده طی دقایقی پس از ایجاد آسیب می‌گردد(Liu et al, 1991). فعـال شدن گیـــرنده‌های NMDA[1] باعث تجمع کلسیم بین سلولی می‌شود که با شـــروع این مرحله متابولیسم سلولی می‌تواند بطـــور مرگباری تغییر یابد (Choi, 1987; Choi, 1988). این مراحل موجب فعال شدن فسفولیپازA،کال پین‌ها[2]و لیپواکسیژنازها شده و می‌تواند از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در تنظیم چرخه فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری موجب مرگ سلولی گردد. گلوتامات مازاد همچنین باعث ورود سدیم از طریق گیرنده‌های AMPA[3]، NMDA و کاینات‌ها[4] می‌گردد و از این طریق ادم سلولی رخ می‌دهد. سمیت بیش از حد گلوتامات با وجود فاکتورهای TNF[5] شدت می‌یابد (Hermann et al., 2001). ایسکمی، استرس‌های اکسیداتیو و سمیت بیش از حد گلوتامات منجر به از دست رفتن سلول‌ها در محل آسیب از طریق نکروز و آپوپتوز می‌گردد.

---

1 N-methyl d-aspartate
2 Calpains
3 Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazole Propionic Acid
4 Kainate
5 Tumor necrosis factors