مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۲: از ۵۱-۶۱
تابستان ۱۳۸۶

بررسی تغییرات بیان ژن سوروایوین پس از آسیب‌دیدگی عصب سیاتیک در موش بالغ

سارا امیری[۱]، منصوره موحدین[۲]، سید جواد مولی[۳*]، زهرا حاج ابراهیمی[۴]

۱ـ کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲ـ دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳ـ دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴ـ کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۶/۸/۲۳ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۱/۲۹

چکیده

هدف: به دلیل ضرورت درمان آسیب‌های سیستم عصبی و همچنین نقش ژن سوروایوین در تکثیر سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، تغییرات بیان این ژن در طول دوره ترمیم در اعصاب سیاتیک آسیب‌دیده و همچنین قطعات نخاعی مرتبط با عصب سیاتیک بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های نر بالغ نژاد «ان ماری» به‌عنوان مدل مورد استفاده قرار گرفتند که پس از بیهوش کردن آن‌ها، عصب سیاتیک پای راست موش‌ها برش عرضی داده شد و سپس در زمان‌های مشخص (۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت) پس از آسیب، موش‌ها کشته شده و قطعات انتهایی و ابتدایی عصب قطع شده، عصب دست نخورده پای چپ و قطعات L4- L6 نخاعی که مربوط به عصب سیاتیک هستند، نمونه‌گیری شدند. RNA کل هر نمونه استخراج و سپس واکنش RT-PCR نیمه کمی با آغازگرهای اختصاصی برای ژن سوروایوین و ژن β2m، به‌عنوان کنترل داخلی، گذاشته شد. برای تعیین توزیع سلولی پروتئین سوروایوین، ۶ روز (۱۴۴ ساعت) پس از قطع عصب، بیان این پروتئین با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی با روش ایمونوهیستوشیمی ارزیابی شد.

نتایج: نتایج این تحقیق نشانگر بیان دو واریانت سوروایوین ۱۴۰ و سوروایوین ۴۰ در قطعه انتهایی و ابتدایی عصب آسیب‌دیده با شدت‌های مختلف بود به گونه‌ای که میزان بیان سوروایوین ۱۴۰ بیشتر از بیان سوروایوین ۴۰ بود و در قطعات نخاعی، تنها بیان واریانت سوروایوین ۱۴۰ شناسایی شد. همچنین در بررسی ایمونوهیستوشیمی قطعات نخاعی، هم توزیع هسته‌ای و هم توزیع سیتوپلاسمی پروتئین سوروایوین مشاهده شد در حالی که بیان این پروتئین در هیچ‌کدام از قطعات انتهایی یا ابتدایی عصب سیاتیک تشخیص داده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر آن است که ژن سوروایوین به‌طور متمایزی در طول دوره ترمیم در عصب و نخاع آسیب‌دیده بیان و پردازش می‌شود. همچنین نتایج نشان دادند که دستکاری در بیان یا پردازش رونوشت اولیه سوروایوین می‌تواند تأثیر بالقوه‌ای در فرآیند ترمیم در آسیب‌های اعصاب یا نخاع داشته باشد.

کلیدواژگان: سوروایوین، عصب سیاتیک، مهارکننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، نخاع، ایمونوهیستوشیمی.

۱ـ مقدمه

سوروایوین (Survivin) عضوی از خانواده پروتئینی مهارکننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Inhibitor of apoptosis protein family :IAP) است که در طول تکوین جنینی بیان می‌شود. اما در اکثر بافت‌های طبیعی با تمایز نهایی، قابل تشخیص نیست. IAPها با دو خصوصیت مشخص می‌شوند که یکی دارا بودن دامین (Domain) تاخوردگی متصل به روی (Zinc binding fold) بوده که همان تکرارهای IAP باکولوویروسی (Baculoviral) است و خصوصیت دیگر، توانایی مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Programmed Cell Death :PCD) است [۱]. از پردازش

* نشانی مکاتبه: تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی: ۱۷۵- ۱۴۱۱۵
E-mail: sjmowla@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

mRNA اولیه سوروایوین انسانی حداقل پنج نوع مختلف سوروایوین به نام‌های سوروایوین، سوروایوین-2B، سوروایوین-ΔEx3، سوروایوین-3B و سوروایوین-2α تولید می‌شود [۲]. در موش نیز سه نوع پروتئین متمایز به نام‌های سوروایوین۱٤۰، سوروایوین ۱۲۱ و سوروایوین ٤۰ با نقش‌های فیزیولوژیک منحصر به فرد تولید می‌شود [۳]. بیان سوروایوین در سلول‌های تمایز یافته خاموش یا شدیداً کاهش می‌یابد ولی بیان آن در رده‌های سلولی انسانی و بسیاری از بافت‌های سرطانی افزایش می‌یابد. سوروایوین برای انجام صحیح میتوز و تقسیم سلولی نیز مورد نیاز است و نقص در آن می‌تواند به فعال شدن یک نقطه کنترل(Check point) در چرخه سلولی منجر شده و در نهایت به القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) بیانجامد [٤-۷].

مطالعه در زمینه مرگ سلولی نشان داده است که طی دوران شکل‌زایی اندام‌ها (Morphogenesis)، در کنار تکثیر و تزاید سلولی، تعدادی از سلول‌ها در روندی به نام مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده خودکشی می‌کنند [۸]. در سیستم عصبی نیز این روند فعال است با این تفاوت که نورون‌هایی که دچار مرگ سلولی می‌شوند برخلاف دیگر سلول‌ها جایگزین نمی‌شوند، بنابراین مرگ سلول‌های عصبی در دوران پس از تولد ضایعات جبران‌ناپذیری را به دنبال دارد.

در سیستم عصبی، مرگ سلولی ممکن است طی ۳ مرحله روی دهد. اولین مرحله مربوط به دوران جنینی و مراحل اولیه پس از تولد است که درصد زیادی از نورون‌ها در هر ناحیه از سیستم عصبی طی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌میرند. مرحله دوم طی ناهنجاری‌های تحلیل برنده نورونی (Neurodegenerative) همچون آلزایمر (Alzheimer)، پارکینسون (Parkinson) و ... رخ می‌دهد و مرحله سوم در حالاتی مانند آسیب اعصاب محیطی، کاهش اکسیژن خون (Hypoxia) و شوک ایجاد می‌شود [۹،۱۰].

هم‌اکنون برای بررسی تغییرات نورون‌ها در هنگام مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، قطع عصب (Axotomy) به‌عنوان مدلی استاندارد برای القای مرگ سلولی استفاده می‌شود. قطع عصب باعث وارد آمدن ضایعاتی به نخاع که جزئی از سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System :CNS) است می‌شود. پاسخ موجود زنده به قطع عصب به عوامل متعددی از جمله سن حیوان بستگی دارد، چنانچه طی دوران جنینی و در مراحل اولیه پس از تولد قطع آکسون‌های (Axons) حرکتی منجر به مرگ تعداد زیادی از نورون‌های حرکتی می‌شود [۱۱] در حالی که روند در قطع اعصاب محیطی موش‌های بالغ، این‌گونه نیست و معمولاً ترمیم (Regeneration) رخ می‌دهد.

با توجه به اینکه برقراری یک تعادل موزون بین تکثیر سلولی، بقای سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش مهمی در تکوین سیستم عصبی و ایجاد اتصالات نورونی دارد و علی‌رغم میانجیگری ژن سوروایوین در هومئوستازی (Homeostasis) بافت‌ها و نقش برجسته آن در مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، تاکنون بر روی بیان این ژن و نیز نسبت بیان واریانت‌های (Variants) آن در آسیب‌های عصب سیاتیک (Sciatic nerve)، هیچ‌گونه تحقیقی صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت فرآیند ترمیم آسیب‌های نخاعی و عصبی در بیماران قطع نخاعی- عصبی، بررسی بیان واریانت‌های مختلف این ژن در سلول‌های آسیب‌دیده عصبی، می‌تواند در رسیدن به روش‌های درمانی مناسب مفید واقع شود و سهم درخور توجهی در بهبود احتمالی این بیماران ایفا کند.

۲ـ مواد و روش‌ها

۲ـ۱ـ حیوانات

موش‌های نر بالغ نژاد ان ماری (NMRI) (۸ تا ۱۲ هفته‌ای) از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه سرم‌سازی رازی واقع در حصارک کرج خریداری و تحت شرایط استاندارد از نظر آب و غذا و دیگر شرایط محیطی برای سازگار شدن با محیط جدید به مدت یک هفته در حیوانخانه نگهداری شدند. گروه‌های مورد بررسی عبارت بودند از ۷ گروه زمانی ۳، ٦، ۱۲، ۲٤، ٤۸، ۹٦ و ۱٤٤ ساعت پس از آسیب که در هر گروه از ۳ سر موش استفاده شد.

۲ـ۲ـ جراحی و نمونه‌گیری

موش‌ها به وسیله تزریق داخل صفاقی ترکیبی از دو داروی کتامین (Ketamine) ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین (Xylazine) ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند و سپس شکافی به موازات بخش خارجی استخوان فمور (Femur bone) در عصب سیاتیک پای راست موش ایجاد شد، پوست کنار زده شد و عضلات ناحیه نیز به یک طرف کشانده شدند. پس از پیدا شدن عصب سیاتیک در عمق برش، عصب قطع شد و برای جلوگیری از رشد مجدد عصب حدود ۵-۷ میلی‌متر از

Archive of SID
www.SID.ir

آن در محل قطع برداشته شد. پوست ناحیه با نخ بخیه ۰-۵ دوخته و برای هر گروه زمانی ۳ موش جراحی شد. در زمان‌های ذکر شده پس از آسیب عصب، موش‌ها به روش دررفتگی مهره‌های گردن (Cervical dislocation) کشته و سپس قطعات انتهایی (Distal) و ابتدایی (Proximal) عصب قطع شده، عصب بدون آسیب پای چپ به‌عنوان گروه کنترل و قطعات L6-L4 نخاعی که منشأ عصب سیاتیک هستند، نمونه‌گیری شدند. نمونه‌ها پس از قرار گرفتن در میکرولوله‌های (Microtubes) عاری از RNase و نیتروژن مایع، تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲ـ ۳ـ استخراج RNA کل (Total RNA) از نمونه‌های عصب سیاتیک و نخاع

با استفاده از محلول RNX plus (Cinnagen) و با کمی تغییرات نسبت به دستورالعمل شرکت سازنده برای مقادیر کم بافتی، RNA کل استخراج شد. به‌طور خلاصه بعد از یکنواخت نمودن بافت و افزودن ۸۰۰ میکرولیتر از محلول RNX به هر میکرولوله، ۱۶۰ میکرولیتر کلروفرم به میکرولوله افزوده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، فاز رویی به یک میکرولوله عاری از RNase دیگر منتقل و RNA توسط ۰/٤ میلی‌لیتر ایزوپروپانل سرد برای مدت حداقل ٤٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد و سپس رسوب حاصل توسط اتانل ۷۵ درصد شستشو و در نهایت در آب تیمار شده با دی اتیل پیرو کربونات (Diethylpyrocarbonate :DEPC) حل شد.

۲ـ٤ـ بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با روش UV اسپکتروفتومتری (UV spectrophotometry) و الکتروفورز ژل آگارز (Agarose gel electrophoresis) بررسی شد. بدین منظور غلظت یک درصد از RNA تهیه شد و جذب نوری آن در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌دست آمد.

ژل آگارز یک درصد با بافر TBE (Tris-borate-EDTA) تهیه شد و سپس ۷ میکرولیتر از نمونه به‌علاوه بافر همراه (Loading buffer) در چاهک ریخته و نمونه به مدت ۱ ساعت و با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شد و سپس توسط دستگاه UV-tec بررسی و عکس‌برداری صورت گرفت.

۲ـ۵ـ واکنش RT-PCR

میزان ۱ میکروگرم از RNA به‌دست آمده از نمونه‌های عصب سیاتیک و نخاع با ۰/۵ میکروگرم آغازگر الیگومر تیمیدین (Oligo-dT) و آب به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمو سایکلر (Thermocycler) (Techne) انکوبه شد و پس از انتقال روی یخ، ٤ میکرولیتر بافر تکثیر ۵X (Fermentas)، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار (Cinnagen) ، ۰/۵ میکرولیتر آرناسین (RNasin) ۲۰ واحد (Fermentas) و ۰/۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC به میکرولوله افزوده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مدت ۱ میکرولیتر از آنزیم RT [Reverse Transcriptase (MMuLV)] ۲۰۰ واحد بر میکرولیتر (Fermentas) افزوده و حجم نهایی میکرولوله به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس به مدت یک ساعت در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت نمونه برای مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد که این دما موجب غیرفعال شدن آنزیم RT و واسرشت شدن کمپلکس RNA-cDNA می‌شود. محصول واکنش تا زمان استفاده، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲ـ٦ـ آغازگرها

در این تحقیق، ژن β2m (β2 microglobolin) به‌عنوان کنترل داخلی (Internal control) انتخاب و از آغازگرهایی که توسط عمادی و همکاران برای ژن β2m موشی طراحی شده بود، استفاده شد [۱۲]. برای ژن سوروایوین نیز آغازگرهایی که توسط کونوی (Conway) و همکاران طراحی شده بودند، استفاده شد [۳].

آغازگرهای ذکر شده و نیز آغازگر الیگومر تیمیدین با طول ۱۸ نوکلئوتید توسط شرکت (MWG) آلمان و با درجه خلوص HPSF (High Purified Salt Free) ساخته شدند. در مورد کلیه آغازگرها، جستجو با نرم افزار کاوش (Blast) با ژنوم موش انجام شد [۱۳] تا از یکتا بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل شود. نتایج جستجو در ژنوم، نشان داد که کلیه آغازگرها دارای محل باند شدن منحصر به فردی هستند.

توالی آغازگرهای مورد استفاده به شرح زیر است:

β2m-Mouse-Forward (BMF): 5'-TGA CCG GCT TGT ATG CTA TC-3'

β2m-Mouse-Reverse (BMR): 5'-CAC ATG TCT CGA

Archive of SID

www.SID.ir

TCC CAG TAG-3'
Srvas 86 (Forward): 5'-TCG CCA CCT TCA AGA ACT GGC CCT TCC TGG A-3'
Srvas 311 (Reverse 1): 5'-GTT TCA AGA ATT CAC TGA CGG TTA GTT CTT-3'
Srvas 6380 (Reverse 2): 5'-GGC TTC TGA CAA TGC TTG-3'

۲ـ۷ـ واکنش PCR

به ۲ میکرولیتر از محصول واکنش RT، ۲/۵ میکرولیتر بافر تکثیر ۱۰X (Cinnagen)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۵۰ میلی‌مولار (Cinnagen)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار (Cinnagen)، ۰/٤پیکومول از هریک از آغازگرهای بالا دست (Forward)و پایین دست (Reverse)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ DNA پلیمراز (Taq DNA Polymerase) ۵ واحد بر میکرولیتر (Cinnagen) و آب تا حجم ۲۵ میکرولیتر اضافه شد.

۳۵ چرخه به صورت واسرشت سازی (Denaturation) (۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه)، اتصال (Annealing) (۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه) و طویل‌سازی (Extension) (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ٤۰ ثانیه) در دستگاه ترمال سایکلر اجرا شد. در انتهای واکنش، یک چرخه طویل‌سازی نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۰ دقیقه اجرا و محصول PCR با ژل الکتروفورز یک درصد بررسی شد.

۲ـ۸ـ هضم محصول PCR

به‌منظور اطمینان از هویت قطعات تکثیر شده با PCR و تأیید واریانت‌های مشاهده شده، الگوی هضم محصولات PCR بررسی شد. برای دو واریانت سوروایوین ۱٤۰ و سوروایوین ٤۰ از آنزیم محدودکننده EcoRI (Fermentas) استفاده شد که طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی در خصوص سوروایوین ۱٤۰، ۲٤۲ و ۱۲ جفت باز و در خصوص سوروایوین ٤۰، ۱۳۲ و ۱۲ جفت باز بودند. در نهایت و پس از انجام واکنش، برای بررسی قطعات حاصل از هضم آنزیمی، به دلیل کوچک بودن قطعات از ژل آکریل آمید ۸ درصد استفاده شد.

۲ـ۹ـ آنالیز آماری

محصول PCR تحت تابش نور ماورای بنفش و به‌واسطه حضور اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) در ژل آگارز مشاهده و از آن عکس‌برداری شد. شدت علایم هر باند به کمک نرم افزار UV-tec سنجیده شد و نتایج حاصل از ۳ تکرار برای هر گروه زمانی با آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون توکی (Tukey) آنالیز آماری شد.

۲ـ۱۰ـ بهینه‌سازی واکنش PCR

برای بهینه‌سازی واکنش PCR و به‌منظور تعیین تعداد چرخه مناسب (وجود باند قابل رویت قبل از وارد شدن واکنش PCR به مرحله کفه (Plateau)) که امکان بررسی نیمه کمی (Semi-quantitative) نتایج PCR را فراهم می‌آورد از نمونه‌های عصب و نخاع طبیعی موش بالغ استفاده شد. در این نمونه‌ها برای ژن β2m، تعداد ۸ میکرولوله (۰/۵میلی‌لیتر) همسان حاوی مخلوط PCR تهیه شد که از چرخه ۲۰ تا ۳۵، هر ۲ چرخه یک لوله از دستگاه خارج و محصول آن با ژل آگارز یک درصد بررسی شد. باند حاصل متناسب با اندازه قطعه طراحی شده برای این ژن (۳۱٦ جفت باز) بود و شدت علامت به‌دست آمده یک افزایش نسبتاً خطی را به موازات افزایش تعداد چرخه PCR نشان داد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، تعداد چرخه ۲٦ برای نمونه‌های نخاعی و تعداد چرخه ۳۰ برای نمونه‌های عصب سیاتیک درنظر گرفته شد و در ادامه تحقیق این چرخه‌های تعیین شده استفاده شدند.

در خصوص ژن سوروایوین با توجه به اینکه بیان این ژن در نمونه‌های طبیعی مربوط به عصب سیاتیک مشاهده نشد، بنابراین تعداد ۳۵ چرخه برای تمام زمان‌های مورد بررسی پس از آسیب در نظر گرفته شد.

۲-۱۱- تهیه نمونه کنترل مثبت و بررسی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده

به دلیل اینکه بیان ژن سوروایوین در دوران جنینی بسیار بالاست، برای تأیید اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده و همچنین تهیه نمونه کنترل مثبت برای واکنش PCR، از نمونه مغز جنین موش استفاده شد. دمای اتصال و غلظت $MgCl_2$ مناسب به کمک PCR گرادیانت بررسی شد. دماهای مورد آزمایش ۵۱، ۵۳، ۵۵، ۵۷ و ۵۹ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های $MgCl_2$ ، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار بودند که در نهایت هم برای سوروایوین ۱٤۰ و سوروایوین ٤۰ و هم برای سوروایوین ۱۲۱، بهترین دمای اتصال، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بهترین غلظت $MgCl_2$ برابر با ۱/۵ میلی‌مولار انتخاب شد.

Archive of SID
www.SID.ir

۳ـ نتایج

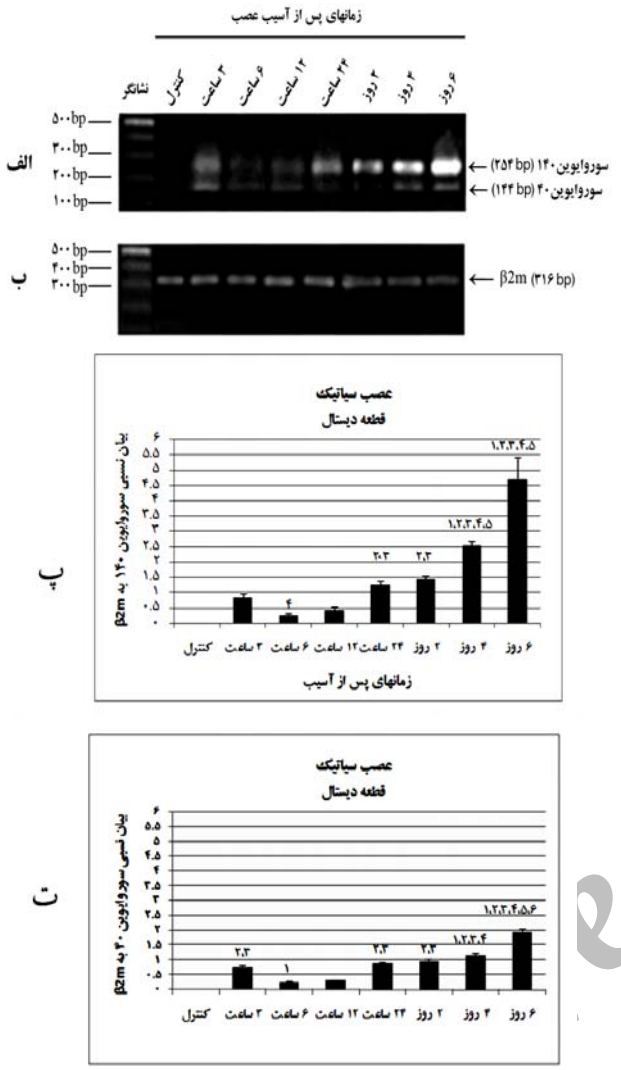
۳-۱- تعیین الگوی بیان ژن سوروایوین پس از آسیب عصب سیاتیک

برای بررسی الگوی تغییرات بیان ژن سوروایوین موشی پس از آسیب عصب سیاتیک، از قطعه انتهایی و ابتدایی، عصب سیاتیک در پای دیگر موش (بدون آسیب) و همچنین قطعات L4- L6 نخاع در زمان‌های ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت و روزهای ۲، ٤ و ٦ پس از آسیب نمونه‌برداری شد و بیان ژن سوروایوین در آن‌ها به کمک روش RT-PCR نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان از اینکه در هر واکنش میزان یکسانی از RNA به کار رفته و تفاوت احتمالی در شدت علامت باند مشاهده شده در هر گروه به دلیل اختلاف در میزان RNA اولیه به‌کار رفته نبوده است، از ژنβ2m به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

در کلیه گروه‌بندی‌های زمانی، واکنش PCR با شرایط یکسان (به جز تعداد چرخه مربوط به β2m در عصب و نخاع که متفاوت بود) برای دو ژن سوروایوین و β2m انجام شد و نتایج به‌طور مقایسه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. الکتروفورز محصولات PCR در مورد ژن β2m یک باند و در مورد ژن سوروایوین در قطعات دو طرف عصب آسیب‌دیده، دو باند با اندازه‌های مختلف نشان داد که اندازه‌های به‌دست آمده معادل با اندازه قطعه طراحی شده برای β2m (۳۱٦ جفت باز) و سوروایوین (۲٥٤ و ۱٤٤ جفت باز) بود (الف و ب از شکل ۱و۲).

در نخاع تنها بیان سوروایوین ۱٤۰ و کنترل داخلی مشاهده شد (الف و ب از شکل ۳) و بیان سوروایوین ۱۲۱ نه در عصب و نه در نخاع مشاهده نشد. لازم به ذکر است که در بار اول PCR مربوط به ژن سوروایوین، هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد و باندهای به‌دست آمده محصول بار دوم واکنش PCR بودند ضمن اینکه در نمونه مربوط به عصب پای دیگر که بدون آسیب نمونه‌برداری شده بود حتی پس از بار دوم بیان هیچ‌کدام از واریانت‌های ژن سوروایوین مشاهده نشد.

واکنش PCR برای دو ژن فوق در دو میکرولوله جداگانه انجام شد و محصول دو واکنش نیز در هنگام الکتروفورز به میزان مساوی ولی در دو ژل مجزا ریخته شد و هویت باندهای مشاهده شده با هضم آنزیمی توسط آنزیم EcoRI بررسی و تأیید شد (شکل ٤).



شکل ۱ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های β2m و سوروایوین در عصب سیاتیک آسیب ندیده (کنترل) و همچنین پس از آسیب وارده به عصب در قطعه دیستال ضایعه به‌علاوه نمودار میانگین شدت بیان نسبی دو واریانت سوروایوین در این قطعه.

الف: ستون اول نشانگر وزن مولکولی DNA، ستون دوم عصب آسیب ندیده (کنترل) و ستون‌های دیگر به ترتیب بیان دو واریانت سوروایوین ۱٤۰ و سوروایوین ٤۰ در زمان‌های ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت و روزهای ۲، ٤ و ٦ پس از آسیب در قطعه دیستال را نشان می‌دهد.

ب: ستون اول نشانگر وزن مولکولی DNA، ستون دوم عصب آسیب ندیده (کنترل) و ستون‌های دیگر به ترتیب بیان ژن β2m در زمان‌های ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت و روزهای ۲، ٤ و ٦ پس از آسیب در قطعه دیستال را نشان می‌دهد.

پ: نمودار میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ۱٤۰ به β2m در قطعه دیستال

ت: نمودار میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ٤۰ به β2m در قطعه دیستال

در مورد بندهای پ و ت، اندازه‌گیری در هر گروه زمانی به صورت نسبت شدت باند سوروایوین به باند β2m می‌باشد و نتایج به صورت Mean±S.D. نشان داده شده است.

۱= اختلاف معنی دار (significant difference) با ۳ ساعت، ۲= اختلاف معنی دار با ٦ ساعت، ۳= اختلاف معنی دار با ۱۲ ساعت، ٤= اختلاف معنی دار با ۲٤ ساعت، ٥= اختلاف معنی دار با ۲ روز، ٦= اختلاف معنی دار با ٤ روز، ۷= اختلاف معنی دار با ٦ روز.

Archive of SID

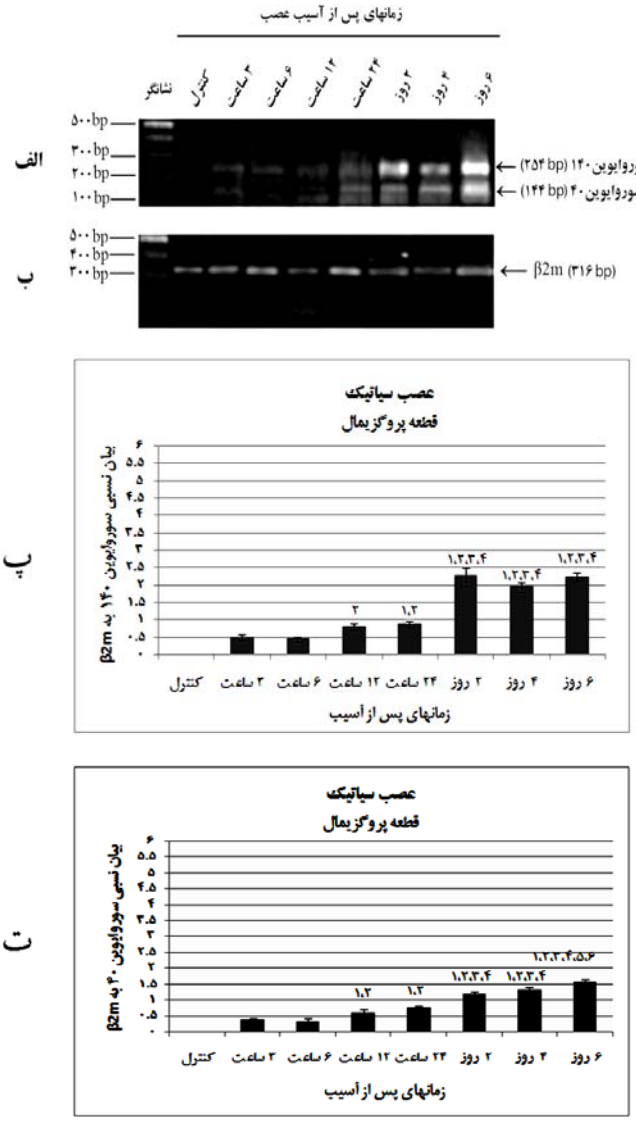
www.SID.ir

۳-۲- بررسی مقایسه‌ای بیان نیمه کمی ژن سوروایوین در عصب سیاتیک و نخاع موش

برای هر گروه زمانی، آزمایش RT-PCR روی قطعه انتهایی، قطعه ابتدایی و قطعات L6 -L4 نخاع که مربوط به عصب سیاتیک هستند در سه سری تکرار شد و شدت علامت برای کلیه باندها به کمک نرم‌افزار UVI-tec سنجیده شد. در هر گروه زمانی، پس از حذف اثر زمینه، شدت دو باند مربوط به واریانت‌های سوروایوین به‌دست آمد. شکل‌های ۱ تا ۳ به ترتیب میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ۱٤۰ به β2m در قطعه انتهایی(شکل ۱- پ)، میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ٤۰ به β2m در قطعه انتهایی (شکل ۱- ت)، میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ۱٤۰ به β2m در قطعه ابتدایی (شکل ۲- پ)، میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ٤۰ به β2m در قطعه ابتدایی (شکل ۲- ت) و میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ۱٤۰ به β2m در قطعات L6 -L4 نخاع (شکل ۳- پ) را نشان می‌دهند که در قطعه انتهایی و ابتدایی واریانت غالب سوروایوین ۱٤۰ بود و در قطعات نخاعی نیز تنها بیان این واریانت مشاهده شد. نتایج در هر نمودار به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± Standard deviation: Mean±S.D.) نشان داده شده است که برای آنالیز نتایج به‌دست آمده از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون توکی استفاده شد.

۳-۳- بررسی توزیع سلولی پروتئین سوروایوین با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی

برای انجام روش ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry)، پس از تهیه بلوک‌های پارافینه و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر، برای بهینه‌سازی آزمایش نیاز به نمونه کنترل مثبتی بود که بیان ژن سوروایوین روی آن قابل تشخیص باشد و در ابتدا روش روی این نمونه بهینه شود. به دلیل اینکه در بررسی‌های حاصل از RT-PCR، بیان ژن سوروایوین در نمونه نخاع طبیعی (بدون وارد کردن آسیب) مشاهده شده بود، بنابراین از این نمونه طبیعی به‌عنوان کنترل مثبت آزمایش استفاده شد و روش ایمونوهیستوشیمی روی آن بهینه‌سازی شد که نتایج نشان داده نشده است.



شکل ۲ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های β2m و سوروایوین در عصب سیاتیک آسیب ندیده (کنترل) و همچنین پس از آسیب وارده به عصب در قطعه پروگزیمال ضایعه به‌علاوه نمودار میانگین شدت بیان نسبی دو واریانت سوروایوین در این قطعه.

الف: ستون اول نشانگر وزن مولکولی DNA، ستون دوم عصب آسیب ندیده (کنترل) و ستون‌های دیگر به ترتیب بیان دو واریانت سوروایوین ۱٤۰ و سوروایوین ٤۰ در زمان‌های ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت و روزهای ۲، ٤ و ٦ پس از آسیب در قطعه پروگزیمال را نشان می‌دهد.

ب: ستون اول نشانگر وزن مولکولی DNA، ستون دوم عصب آسیب ندیده (کنترل) و ستون‌های دیگر به ترتیب بیان ژن β2m در زمان‌های ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت و روزهای ۲، ٤ و ٦ پس از آسیب در قطعه پروگزیمال را نشان می‌دهد.

پ: نمودار میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ۱٤۰ به β2m در قطعه پروگزیمال

ت: نمودار میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ٤۰ به β2m در قطعه پروگزیمال

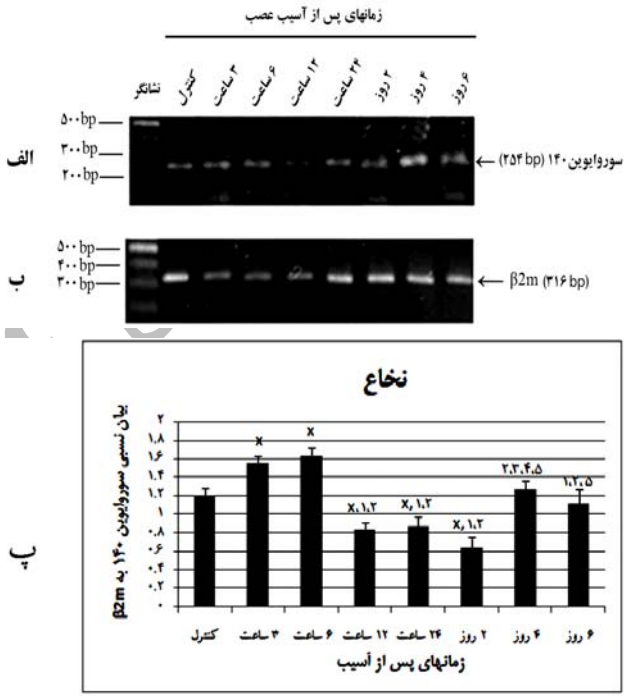
در مورد بندهای پ و ت، اندازه‌گیری در هر گروه زمانی به صورت نسبت شدت باند سوروایوین به باند β2m می‌باشد و نتایج به صورت Mean±S.D. نشان داده شده است.

۱= اختلاف معنی دار (significant difference) با ۳ ساعت، ۲= اختلاف معنی دار با ٦ ساعت، ۳= اختلاف معنی دار با ۱۲ ساعت، ٤= اختلاف معنی دار با ۲٤ ساعت، ٥= اختلاف معنی دار با ۲ روز، ٦= اختلاف معنی دار با ٤ روز، ۷= اختلاف معنی دار با ٦ روز.

Archive of SID

www.SID.ir

به‌منظور بررسی حساسیت و دقت آنتی‌بادی، از هر نمونه یک لام نیز به‌عنوان کنترل منفی تهیه شد. در این نمونه‌ها در مرحله انکوبه کردن (Incubation)، به جای آنتی‌بادی اولیه از بافر مسدود کننده (Blocking buffer) استفاده شده است. نبود علامت قهوه‌ای در رنگ آمیزی بدون آنتی‌بادی اولیه، نشان دهنده اختصاصی بودن واکنش آنتی‌بادی اولیه با پروتئین سوروایوین است.



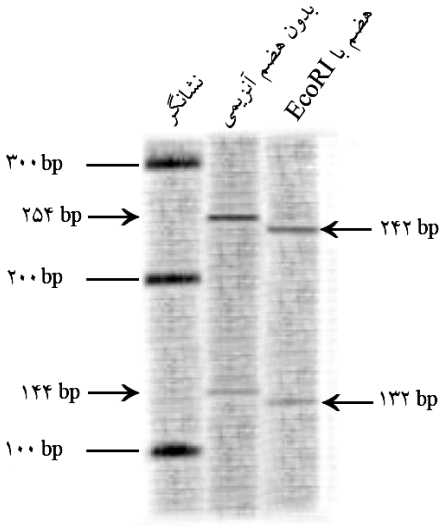
شکل ۳ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های β2m و سوروایوین در نخاع آسیب ندیده (کنترل) و همچنین پس از آسیب وارده به عصب سیاتیک در قطعات L4-L6 نخاع به‌علاوه نمودار میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ۱۴۰ در این قطعات.

الف: ستون اول نشانگر وزن مولکولی DNA، ستون دوم نخاع آسیب ندیده (کنترل) و ستون‌های دیگر به ترتیب بیان سوروایوین ۱۴۰ در زمان‌های ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت و روزهای ۲، ٤ و ٦ پس از آسیب عصب سیاتیک در قطعات L4-L6 نخاع را نشان می‌دهد.

ب: ستون اول نشانگر وزن مولکولی DNA، ستون دوم نخاع آسیب ندیده (کنترل) و ستون‌های دیگر به ترتیب بیان ژن β2m در زمان‌های ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت و روزهای ۲، ٤ و ٦ پس از آسیب عصب سیاتیک در قطعات L4-L6 نخاع را نشان می‌دهد.

پ: نمودار میانگین شدت بیان نسبی سوروایوین ۱٤۰ به β2m در قطعات L4-L6 نخاع. در بند پ اندازه‌گیری در هر گروه زمانی به صورت نسبت شدت باند سوروایوین به باند β2m است و نتایج به صورت Mean±S.D. نشان داده شده است.

x= اختلاف معنی دار (significant difference) با نمونه کنترل (آسیب ندیده)
۱= اختلاف معنی دار با ۳ ساعت، ۲= اختلاف معنی دار با ٦ ساعت، ۳= اختلاف معنی دار با ۱۲ ساعت، ٤= اختلاف معنی دار با ۲٤ ساعت، ٥= اختلاف معنی دار با ۲ روز، ٦= اختلاف معنی دار با ٤ روز، ۷= اختلاف معنی دار با ٦ روز.



شکل ٤ طرح الکتروفورزی هضم محصول PCR با آنزیم *Eco*RI روی ژل آکریل آمید ۸ درصد
ستون اول نشانگر وزن مولکولی DNA، **ستون دوم** محصول PCR بدون هضم آنزیمی و **ستون سوم** محصول PCR هضم شده با آنزیم *Eco*RI را نشان می‌دهد.

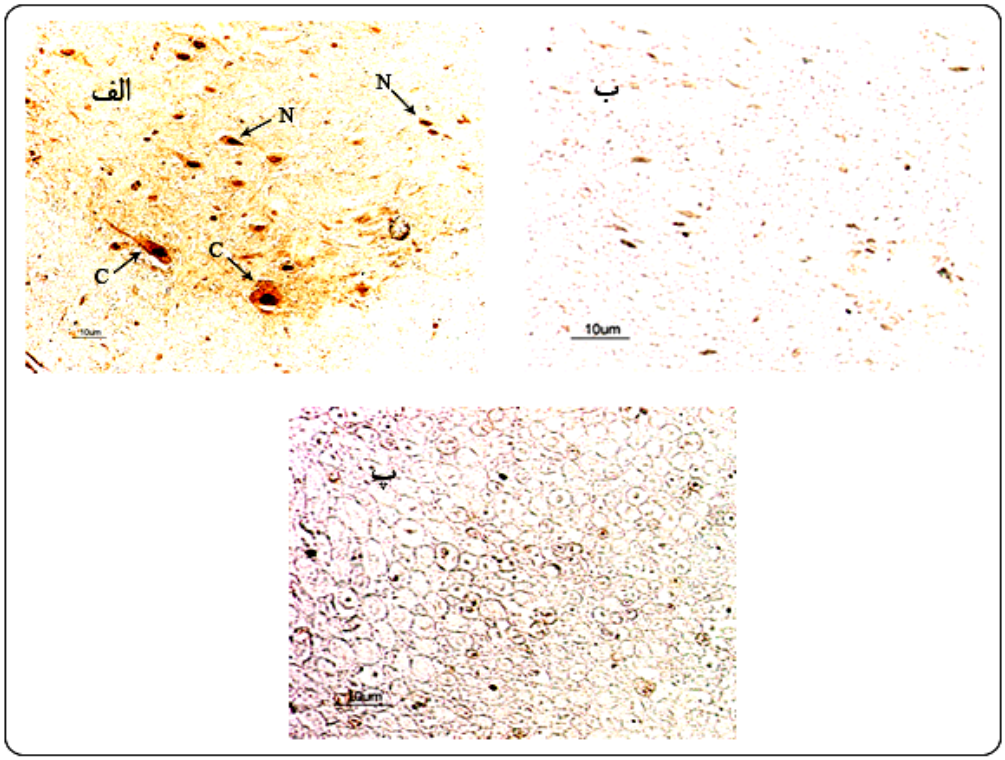
پس از بهینه‌سازی واکنش روی نمونه کنترل مثبت، بررسی پروتئین سوروایوین در نمونه‌های عصبی و همچنین قطعات L4-L6 نخاعی پس از گذشت ٦ روز (۱٤٤ ساعت) از آسیب وارده به عصب سیاتیک، صورت گرفت. توزیع پروتئین سوروایوین در قطعات نخاعی هم به صورت سیتوپلاسمی و هم به صورت هسته‌ای مشاهده شد که این موضوع می‌تواند به دلیل وجود واریانت‌های مختلف سوروایوین باشد. در لام‌های کنترل منفی هیچ‌گونه واکنش غیر اختصاصی دیده نشد. لازم به ذکر است که در بررسی‌های صورت گرفته در عصب سیاتیک، هیچ‌گونه علامتی که نشان دهنده بیان پروتئین سوروایوین در این بافت باشد، مشاهده نشد (شکل ٥).

٤ـ بحث

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول فرآیندی فیزیولوژیک بوده که طی آن برنامه‌های ذاتی مولکولی در سلول فعال شده و موجب تخریب و انهدام سلول می شوند. فرآیند مرگ سلولی یکی از خصوصیات اساسی تمامی ارگانیزم‌های (Organisms) چند سلولی است که برای تکوین، شکل‌زایی اندام‌ها، هومئوستاز بافت‌ها و دفاع در مقابل سلول‌های عفونی یا آسیب‌دیده بسیار ضروری و حیاتی است [۱٤]. در صورتی که مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بیش از اندازه اتفاق بیفتد می‌تواند منجر به بیماری‌هایی مختلفی از جمله بیماری‌های

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵ بررسی بیان پروتئین سوروایوین به دنبال آسیب عصب سیاتیک در قطعات نخاعی مرتبط با عصب و همچنین در عصب سیاتیک **الف:** توزیع هسته‌ای و سیتوپلاسمی سوروایوین، ٦ روز (١٤٤ ساعت) پس از آسیب وارده به عصب سیاتیک در قطعات نخاعی مرتبط با عصب سیاتیک؛ **ب:** لام کنترل منفی واکنش ایمونوهیستوشیمی روی قطعات نخاعی ٦ روز (١٤٤ ساعت) پس از آسیب وارده به عصب سیاتیک؛ **پ:** واکنش ایمونوهیستوشیمی روی عصب سیاتیک آسیب دیده. در بررسی‌های صورت گرفته در عصب سیاتیک، هیچ گونه سیگنالی که نشان‌دهنده قاطع بیان پروتئین سوروایوین در این بافت باشد، مشاهده نشد.

تحلیل برنده نورونی و نقص ایمنی شود [١٤].

پروتئین‌های مختلفی در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی سلولی نقش دارند که عده‌ای از آن‌ها پیش‌برنده و عده‌ای دیگر مهارکننده آن هستند. سوروایوین یکی از پروتئین‌های مهارکننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است که علاوه بر مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، در پایدار ساختن ریزلوله‌های (Microtubule) دوک مرکزی در اواخر میتوز و تفکیک یکسان کروموزوم‌های خواهری در چرخه سلولی نقش مهمی را ایفا می‌نماید [١].

تاکنون نحوه بیان ژن‌های مختلفی پس از آسیب‌های وارده به سیستم عصبی بررسی و مطالعه شده است. این ژن‌ها شامل ژن‌های دخیل در فرآیندهای مختلف سلولی از جمله پروتوانکوژن‌ها (Proto-oncogenes) [١٦،١٥] ژن‌های مرتبط با تکثیر و حیات سلولی (Cell Survival) [١٧-١٥] ژن‌های مرتبط با نوروتروفین‌ها (Neurotrophins) [٢٠-١٨] و ... هستند. تحقیقات نشان داده است که میزان بیان، در برخی ژن‌ها با کاهش (Down regulation)، در برخی با افزایش (Up-regulation) و در سایرین ثابت مانده است.

برای مثال برخی از ژن‌هایی که به دنبال قطع عصب گانگلیون سمپاتیک (Sympathetic ganglion) با کاهش بیان مواجه بودند عبارتند از CD24/nectradin (مهارکننده) و گیرنده ١ فعال شده با پروتئیناز/ترومبین (مهارکننده) [Proteinase activated receptor 1/Thrombin (inhibitor)] که از تنظیم‌کننده‌های زایده‌های نورونی (Neurite outgrowth) هستند [١٧] یا سیناپسین ٢ (Synapsin 2)، گیرنده سکرتین (Secretin receptor) و دکربوکسیلاز ال- آمینواسید حلقوی (Aromatic L-amino acid decarboxylase) که از مولکول‌های انتقال نورونی هستند [١٨]. همچنین مولکول‌هایی مانند فسفولیپاز C-β1 (Phospholipase C-β1) [١٧] و پروتئین متصل‌شونده به اینوزیتول ١، ٤، ٥ تری فسفات (Inositol 1, 4, 5 triphosphate binding protein) [١٧،١٦] نیز که از مولکول‌های انتقال پیام هستند به دنبال قطع عصب گانگلیون (٤٨ ساعت پس از آسیب) با کاهش بیان مواجه بوده‌اند. در مقابل بیان برخی از ژن‌ها در بررسی‌های صورت گرفته به دنبال آسیب‌های وارده به سیستم عصبی با افزایش بیان مواجه هستند

Archive of SID
www.SID.ir

که از این میان می‌توان به پروتئین‌هایی چون پروتئین ۷۰ شوک حرارتی (Heat-shock protein 70 :HSP 70) [۱۷]، مهارکننده Bax ۱ (Bax inhibitor-1) [۱۷،۱۵] و سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase) [۱۷]، که از پروتئین‌های مرتبط با حیات سلولی هستند و همچنین سایکلین B1 (Cyclin B1) و پروتئین ۲ کنترل کننده چرخه تقسیم سلول (Cell division cycle control protein 2)، که از پروتئین‌های مرتبط با تکثیر سلولی هستند، اشاره نمود [۱۷].

با توجه به اینکه برقراری تعادل موزون بین تکثیر سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، نقش مهمی در تکوین سیستم عصبی و ایجاد اتصالات نورونی داشته و به هم خوردن این تنظیمات پیامدهای متعددی را به همراه دارد و با توجه به نقش ژن سوروایوین در هومئوستازی بافت‌ها و مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، بررسی بیان واریانت‌های مختلف این ژن در سلول‌های آسیب‌دیده عصبی می‌تواند کمک به سزایی در شناخت بهتر وقایع مولکولی حاکم بر ضایعات تحلیل برنده مغزی- نخاعی نموده و سهم بالقوه‌ای در بهبود احتمالی این بیماران ایفا کند.

به‌طور کلی می‌توان گفت که مطالعاتی که تا کنون در خصوص ژن سوروایوین صورت گرفته است، بیشتر در ارتباط با تغییرات بیان آن در سرطان‌های مختلف بوده و اینکه آیا می‌توان از این ژن به‌عنوان یک نشانگر تومور در پیش‌آگهی این سرطان‌ها استفاده نمود یا خیر [٤-۷،۲۱-۲۵]. همچنین در سیستم عصبی نیز بیان این ژن در تعداد محدودی از مطالعات از جمله طی تکوین مغز موش و آسیب‌های مغزی تروماتیک (Traumatic Brain Injury :TBI) مطالعه شده است که در ادامه به آن‌ها اشاره می‌شود. در تحقیق حاضر برای اولین بار به بررسی بیان این ژن به دنبال اثر آسیب وارده به عصب سیاتیک پرداخته شده است. عمادی و همکاران به بررسی بیان ژن سوروایوین در سیستم عصبی طی تکوین مغز موش پرداختند [٢٦] و گزارش کردند که دو واریانت سوروایوین ۱٤۰ و سوروایوین ٤۰ در مغز موش بیان می‌شود که از این میان شدت بیان سوروایوین ۱٤۰ بیشتر از واریانت دوم است، همچنین بیان این دو واریانت در دوران قبل از تولد بیشتر از دوران بعد از آن است که این یافته در راستای مطالعات پیشین است که کاهش یا خاموشی بیان این ژن را در بافت‌های بالغ گزارش کرده است [۷]. در نتایج حاصل از این تحقیق، بیان سوروایوین ۱۲۱ تشخیص داده نشد که این گزارش متضاد با گزارش کونوی و همکاران بود [۳] که بیان این واریانت را در اکثر بافت‌های موش گزارش کرده بود. همچنین بیان ژن سوروایوین پس از TBI نیز بررسی شده است [۲۷]. TBI منجر به فعال شدن انواعی از آبشارهای بیوشیمیایی می‌شود که باعث القای آسیب بافت‌های نورونی و مرگ سلولی می‌شود. در مقابل انواعی از پروتئین‌ها به دنبال TBI در سلول‌های نورونی بیان می‌شوند که مرتبط با مهار مرگ سلولی و پیشبرد بهبود در سیستم عصبی مرکزی هستند. در بررسی صورت گرفته توسط جانسون (Johnson) و همکاران در سال ۲۰۰٤، بیان سوروایوین وابسته به زمان(Time dependent) و ویژه سلولی (Cell specific) بوده [۲۷] و در سلول‌های ستاره‌ای شکل (Astrocytes) به میزان بیشتر و در نورون‌ها به میزان کمتر بیان شده است.

نتایج حاصل از RT-PCR در تحقیق حاضر نیز مطابق نتایج عمادی و همکاران، به تکثیر قطعه ۳۲۲ جفت بازی مربوط به سوروایوین ۱۲۱ نیانجامید [٢٦] و بنابراین وجود این واریانت در قطعات انتهایی و ابتدایی عصب سیاتیک آسیب‌دیده و همچنین قطعات نخاعی L4- L6 موش‌های ان ماری تشخیص داده نشد. همچنین در بررسی دو واریانت سوروایوین ۱٤۰ و سوروایوین ٤۰، واریانت غالب در قطعات انتهایی، ابتدایی و همچنین قطعات نخاعی مربوط به عصب سیاتیک سوروایوین ۱٤۰ بود که در قطعه انتهایی پس از ایجاد ضایعه و با قطع ارتباط عصب با پریکاریون (Pericarion)، در بیان ژن کاهش مشاهده شد که پس از گذشت یک روز مجدداً افزایش بیان ژن دیده شد که احتمالاً این افزایش نشان دهنده شروع مرحله ترمیم است در حالی که در قطعه ابتدایی در مجموع افزایش بیان مشاهده شد. در قطعات نخاعی برخلاف قطعات انتهایی و ابتدایی عصب، تأثیر آسیب وارده در بیان ژن دیرتر مشاهده شد، به گونه‌ای که در ٦ ساعت آغازین افزایش و پس از گذشت ٦ ساعت از آسیب کاهش بیان مشاهده شد و افزایش پس از این کاهش پس از گذشت ۹٦ ساعت از آسیب آشکار شد.

برای بررسی بیان پروتئین سوروایوین در عصب سیاتیک آسیب‌دیده و قطعات نخاعی مرتبط با عصب سیاتیک از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد که مطابق این روش بیان این پروتئین پس از گذشت یک هفته از آسیب در قطعات نخاعی، هم در سیتوپلاسم و هم در هسته مشاهده شد که این نتیجه می‌تواند مرتبط با وجود واریانت‌های متفاوت سوروایوین باشد که در مناطق مختلف سلول بیان آن مشاهده شده است [۲۸]. در بررسی قطعات دو طرف عصب آسیب‌دیده، بیان این پروتئین مشاهده نشد که با توجه به نتایج حاصل از بررسی ژن سوروایوین و انجام آزمایش‌ها RT-PCR، عدم مشاهده علامت مرتبط با این پروتئین در قطعات مربوط به

Archive of SID
www.SID.ir

عصب سیاتیک را می‌توان مرتبط به پراکنش و عدم تمرکز علایم در سطح سلولی یا نیمه عمر کم پروتئین سنتز شده در عصب دانست.

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر آن است که سوروایوین به‌طور متمایزی طی دوره ترمیم در عصب و نخاع آسیب‌دیده بیان و پردازش می‌شود. همچنین نتایج به‌دست آمده پیشنهاد می‌نماید که دستکاری در بیان و یا پردازش رونوشت اولیه سوروایوین می‌تواند تأثیر بالقوه‌ای در فرآیند ترمیم در آسیب‌های اعصاب یا نخاع داشته باشد. هرچند که نتیجه‌گیری نهایی با بررسی بیان این ژن و پروتئین آن در زمان‌های طولانی‌تر مقدور خواهد بود.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیقات دیگر، می‌توان این‌گونه پیشنهاد نمود که احتمالاً بالا رفتن بیان ژن سوروایوین در این آسیب‌ها می‌تواند با به تأخیر انداختن مرگ سلولی از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، فرصت مناسب را برای ترمیم و بازسازی سلول‌های آسیب‌دیده فراهم آورد.

۵ـ منابع

[1] Earnshaw WC. Keeping survivin nimble at centromeres in mitosis. Science 2005; 310 (5753): 1443–4.

[2] Li F, Ling X. Survivin Study: An Update of ‘What is the Next Wave?’’. J cell physiol 2006; 208: 476–86.

[3] Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, DeBaere I, Steiner-Mosonyi M, Ong K, Baens M, Collen D, Schuh AC. Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. Blood 2000; 95: 1435–42.

[4] Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. Am J Path 1998; 152: 43-9.

[5] Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri DC, Dombret H. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2000; 111: 196–203.

[6] Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. Trends Mol Med 2001; 7: 542–7.

[7] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med 1997; 3: 917–21.

[8] Kashihara Y, Kuno M, Miyata Y. Cell death of axotomized motoneurones in neonatal rats, and its prevention by peripheral reinnervation. J Physiol (Lond) 1987; 386: 135-48.

[9] Pollin MM, McHanwell S, Slater CR. The effect of age on motor neurone death following axotomy in the mouse. Development 1991; 112: 83-9.

[10] Snider WD, Elliott JL, Yan Q. Axotomy-induced neuronal death during development. J Neurobiol 1992; 23:1231-46.

[11] Li L, Openheim RW, Lei M, Houenou LJ. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. J Neurobiology 1994; 25:759-66.

[۱۲] عمادی بایگی مجتبی. بررسی بیان ژن survivin (یک مهارکننده جدید آپوپتوز) در حین تکوین، ترمیم و تومورزایی. به راهنمایی دکتر سید جواد مولی. دانشگاه تربیت مدرس، پایان‌نامه کارشناسی ارشد. سال ۱۳۸۲.

[13] Blast the Mouse genome. Available from: http://www.ncbi.nlm.nil.gov/ genome/seq/MmBlast.html

[14] Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci 2003; 4: 1-11.

[15] Fan M, Mi R, Yew DT, Yee Chan W. Analysis of gene expression following sciatic nerve crush and spinal cord hemisection in the mouse by microarray expression profiling. Cell Mol Neurobiol 2001; 21(5): 497-508.

[16] Yang Y, Xie Y, Chai H, Fan M, Liu Sh, Liu H, Bruce I, Wu W. Microarray analysis of gene expression patterns in adult spinal motoneurons

Archive of SID

www.SID.ir

after different types of injuries. Brain Res 2005; 1075: 1-12.

[17] Boeshore KL, Schreiber RC, Vaccariello SA, Hyatt Sachs H, Salazar R, Lee J, Ratan RR, Leahy P, Zigmond RE. Novel changes in gene expression following axotomy of a sympathetic ganglion: a microarray analysis. J Neurobiol 2004; 59(2): 216-35.

[18] Brown AG, Fyffe RE. Direct observations on the contacts made between Ia afferent fibres and alpha-motoneurones in the cat's lumbosacral spinal cord. J Physiol (Lond) 1981; 313: 121-40.

[19] Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VMK, Persson H. Differential Expression of mRNAs for Neurotrophins and Their Receptors after Axotomy of the Sciatic Nerve. J Cell Biol 1993; 123: 455-65.

[20] Narazaki DK, Pessoa de Barros Filho TE, Mendes de Oliveira CRGC, Cristante AF, Iutaka AS, Marcon RM, Oliveira RP. Spinal cord regeneration: The action of neurotrophin-3 in spinal cord injury in rats. CLINICS 2006; 61(5): 453-60.

[21] Andersen MH, Pedersen LO, Becker JC, Straten PT. Identification of a cytotoxic T. lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. Cancer Res 2001; 61: 869–72.

[22] Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin – an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. Med Sci Monit 2003; 9(4): 125-9.

[23] Mesri M, Wall NR, Li F, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. J Clin Invest 2001; 108: 981–90.

[24] O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC. A p34 (cdc2) survival checkpoint in cancer. Cancer Cell 2002; 2: 43–54.

[25] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. J Cell Mol Med 2005; 9(2): 360-72.

[26] Emadi Baygi M, Mowla SJ, Nikpoor P, Tiraihi T. Differential expression of two different variants of survivin during mouse brain development. Yakhteh Medical Journal 2004; 6(22): 85-90.

[27] Johnson EA, Svetlov SI, Pike BR, Tolentino PJ, Shaw G, Wang KKW, Hayes RL, Pineda JA. Cell-specific upregulation of survivin after experimental traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma 2004; 21: 1183-95.

[28] M ahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. Cell Death Differ 2002; 9: 1334–42.

Archive of SID

www.SID.ir