





دانشگاه اراک

دانشکده علوم پایه

کارشناسی ارشد زیست شناسی (فیزیولوژی جانوری)

بررسی اثر کلیت کننده های کلسیم و بلاکر کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر

آپوپتوزیس نوروں های حسی عقده های ریشه پشتی کشت شده نخاع رت بالغ

پژوهشگر:

مریم میرفخرایی

اساتید راهنما:

دکتر حمیدرضا مومنی

دکتر سید محمدعلی شریعت زاده

استاد مشاور:

دکتر احمد همتا

پاییز ۱۳۹۱

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بررسی اثر کلیت کننده های کلسیم و بلاگر کافال های
کلسیمی وابسته به ولتاژ بر آپتوزیس نورون های حسی
عقدده های ریشه پشتی کشت شده نخاع رت بالغ

توسط:

مریم میرفخرایی

پایان نامه

ارائه شده به مدیریت تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیت های

تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی (فیزبولوژی جانوری)

از

دانشگاه اراک

اراک-ایران

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: (کلی).....

دکتر حمیدرضا مومنی (استاد راهنما)..... استادیار

دکتر سید محمدعلی شریعت زاده (استاد راهنما)..... استاد

دکتر احمد همتا (استاد مشاور)..... استادیار

دکتر نیلوفر دربندی (مدعو داخلی)..... استادیار

پاییز ۱۳۹۶

تقدیم بہ آنانکہ ہرگز ذہ ای از خوبی ہایشان را پاس تو انم گفت

پدر و مادرم؛

بزرگ آموزگار زندگی ام کہ مسیر سربلندی را بہ سواترین روش آموخت و بیش از ہر چیز فروتنی و خلوص مرا بہ احترام واداشت.

پاسکزاری

حمد و ثنا مخصوص خداوندی است که عطش علم و دانش را در وجودمان به ودیعه نهاد تا ظلمت جهل و نادانی را به روشنایی فہم و کمال بیاریم
شایسته ترین مراتب پاس و قدردانی خود را به استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر مومنی و جناب آقای دکتر شریعت زاده تقدیم می نمایم
که در تمام مراحل مرایاری نمودند. بی شک موفقیت در طی مسیر تحقیقاتی و به انجام رسیدن این پایان نامه مرہون تکیہ بر علم و درایت
خاص ایشان می باشد. با آرزوی سلامتی و توفیق روز افزون از دگاہ باری تعالی برای استاد فرزانه ام.

با سپاس فراوان از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر بہتاکہ مشاورہ این پایان نامه را بہ عمدہ گرفتند، و درس های فراوانی در عرصہ علم و
اخلاق از ایشان آموختم کہ انشاء اللہ توشہ راہ آیندہ من خواهد بود.

واللہ اعلم
واللاترین مراتب پاس را بہ خانوادہ ام تقدیم می کنم کہ بہوارہ پشتیبان و پناہ من در روزهای سخت و شیرین زندگی ام بوده اند.

از خانم اسکندری و آقای فراہانی کہ در تمام مراحل تحقیق مرایاری کردند سپاسگزارم

از آقای نہ و آقای احمدی کہ ہمیشہ یاری رسان من بودند شکر می کنم

از تمام دوستان و ہم کلاسی هایم کہ ہمیشہ یاری کر من بودند و در تمام روزهای سخت بیچ وقت من را تنها نگذاشتند سپاسگزارم

چکیده

کلسیم به عنوان پیامبر ثانویه نقش مهمی در پدیده های زیستی ایفا می نماید. بنابراین همئوستازی کلسیم بعنوان یک روند کاملاً تنظیم شده در مایع خارج و داخل سلولی مهم است. در شرایط طبیعی غلظت کلسیم داخل سلولی کم در حالیکه تحت شرایط پاتولوژیک، غلظت داخل سلولی کلسیم افزایش می یابد. افزایش غیر طبیعی این یون در داخل سلول منجر به مرگ سلولی می شود. بنابراین هدف از این پژوهش این بود که آیا افزایش کلسیم داخل سلولی می توانست دلیلی برای آپوپتوزیس نورون های حسی گانگلیون های کشت شده ریشه پستی نخاع رت بالغ باشد.

در این پژوهش، پس از باز نمودن ناحیه پستی رت های بالغ، یک جفت گانگلیون L5 از گانگلیون های ریشه پستی نخاع خارج و به ۵ گروه تقسیم شدند: ۱- گانگلیون های لحظه زمانی صفر که بلافاصله فیکس شدند. ۲- گانگلیون های کشت شده برای ۷۲ و ۹۶ ساعت (گروه کنترل) ۳- گانگلیون های کشت شده برای ۷۲ و ۹۶ ساعت در حضور EGTA (۵ میلی مولار) ۴- گانگلیون های کشت شده برای ۷۲ و ۹۶ ساعت در حضور EDTA (۵ میلی مولار) ۵- گانگلیون های کشت شده برای ۷۲ و ۹۶ ساعت در حضور لوپرامید هیدروکلراید (۲۰۰ میکرومولار).

گانگلیون های تازه تهیه شده و کشت شده پس از فیکس توسط دستگاه Cryostat برش گیری شدند. برای مطالعه مورفولوژیکی آپوپتوزیس نورون های حسی گانگلیون های ریشه پستی نخاع از رنگ آمیزی فلئورسنت شامل Hoechst33342 و Propidium Iodide و از تکنیک تانل برای مطالعه بیوشیمیایی آپوپتوزیس استفاده شد. نورون های حسی گانگلیون های کشت شده برای ۷۲ و ۹۶ ساعت مشخصات مورفولوژیکی آپوپتوزیس شامل چروکیدگی سیتوپلاسم، تراکم هسته و متراکم شدن کروماتین را نمایان ساختند. علاوه بر آن، در این

زمان‌ها تانل مثبت بودن نوروں‌های حسی وقوع آپوتوزیس را در این نوروں‌ها تایید کرد. در زمان‌های ذکر شده، کاربرد جداگانه کلیت‌کننده‌های کلسیم (EDTA و EGTA) و بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید) توانست به طور معنی‌داری (0/05 < P) کاهش قطر هسته نوروں‌های آپوتوتیک را نسبت به گروه کنترل مهار نماید. بعنوان نتیجه‌گیری، کاربرد کلیت‌کننده‌های کلسیمی و بلاکر کانال کلسیمی وابسته به ولتاژ توانست آپوتوزیس را در نوروں‌های حسی مهار نماید.

کلمات کلیدی: گانگلیون‌های ریشه پستی نخاع، نوروں حسی، آپوتوزیس، لوپرامید، EDTA، EGTA، هیدروکلراید،

فهرست عناوین

صفحه	عنوان
۱	فصل اول (مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته)
۲	۱-۱- دستگاه عصبی
۲	۱-۱-۱- بافت عصبی
۴	۱-۱-۱-۱- سلول عصبی یا نورون
۷	۱-۱-۱-۲- رشته عصبی
۷	۱-۱-۱-۱-۱- غلاف میلین
۸	۱-۱-۱-۲-۲- غلاف شوان یا نورولما
۹	۱-۱-۱-۳- بافت پشتیبان عصبی یا نوروگلی
۱۰	۱-۱-۲- دستگاه عصبی مرکزی
۱۰	۱-۱-۲-۱- مغز
۱۰	۱-۱-۲-۱-۱- ماده خاکستری مغز
۱۱	۱-۱-۲-۲- ماده سفید مغز
۱۱	۱-۱-۲-۲-۱- طناب نخاعی

۱۲	۱-۲-۲-۱-۱- ساختمان بافت شناسی ماده خاکستری نخاع
۱۴	۱-۲-۲-۲-۱-۱- ساختمان بافت شناسی ماده سفید نخاع
۱۴	۱-۳-۱-۱- دستگاه عصبی محیطی
۱۴	۱-۳-۱-۱- اعصاب
۱۶	۱-۳-۲-۱-۱- عقده های عصبی یا گانگلیون ها
۱۷	۱-۳-۲-۱-۱- عقده های مجمله ای نخاعی
۱۷	۱-۳-۲-۱-۱- عقده های ریشه پشتی نخاع
۲۰	۱-۲-۱- مرگ سلولی
۲۱	۱-۲-۱- نکروزیس
۲۲	۱-۲-۲-۱- آپوپتوزیس
۲۳	۱-۲-۲-۱- تغییرات سلول های آپوپتوتیک و نکروتیک
۲۳	الف) تغییرات مورفولوژیک
۲۴	ب) تغییرات بیوشیمیایی
۲۵	ج) تغییرات فیزیولوژیک
۲۵	۱-۲-۲-۲-۱- مسیرهای وقوع آپوپتوزیس
۲۶	۱-۲-۲-۲-۱- مسیر خارجی یا آپوپتوزیس القا شده توسط گیرنده های مرگ

۲۷	۱-۲-۲-۲-۲- مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی
۲۹	۱-۲-۲-۳- خلاصه ای از تفاوت‌های آپوپتوزیس و نکروزیس
۳۰	۱-۲-۲-۴- القا آپوپتوزیس در سیستم عصبی
۳۱	۱-۳- کلسیم
۳۱	۱-۳-۱- نقش فیزیولوژیک کلسیم
۳۱	۱-۳-۲- هومئوستازی کلسیم
۳۳	۱-۳-۳- پمپ کلسیم
۳۴	۱-۳-۴- انواع کانال‌های کلسیمی
۳۴	۱-۳-۴-۱- کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ
۳۵	الف) L type calcium channel
۳۶	ب) N type calcium channel
۳۶	ج) P type calcium channel
۳۶	د) Q type calcium channel
۳۷	ه) R type calcium channel
۳۷	و) T type calcium channel
۳۸	۱-۳-۵- کلسیم و آپوپتوزیس

۳۹	۱-۳-۶- کالپین ها
۴۰	۱-۳-۷- اندونوکلئازهای وابسته به کلسیم
۴۱	۱-۴-۴- مروری بر مواد و روش های به کار گرفته شده
۴۱	۱-۴-۱- مواد
۴۱	۱-۴-۱-۱- کلیت کننده های کلسیم
۴۱	الف) EDTA
۴۲	ب) EGTA
۴۳	۱-۴-۲-۱- بلاکر کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید)
۴۴	۱-۴-۲- تکنیک ها و روش های تشخیص آپوپتوزیس
۴۴	۱-۴-۲-۱- مطالعه مورفولوژیکی آپوپتوزیس
۴۴	۱-۴-۲-۱- میکروسکوپ فلئورسانس و رنگ آمیزی فلئورسنت
۴۷	۱-۴-۲-۲- مطالعه بیوشیمیایی آپوپتوزیس
۴۷	۱-۴-۲-۲-۱- تانل
۴۸	۱-۵- مروری بر مطالعات گذشته
۵۳	۱-۶- اهداف

۵۴	فصل دوم (روش تحقیق)
۵۵	۱-۲- حیوانات
۵۵	۲-۲- تشریح حیوان و برداشتن گانگلیون های ریشه پشتی نخاع
۵۶	۳-۲- محیط کشت
۵۷	۴-۲- مراحل فیکس و برش گیری گانگلیون های ریشه پشتی نخاع
۵۷	۵-۲- کلیت کننده های کلسیمی
۵۷	EDTA -۱-۵-۲
۵۸	EGTA -۲-۵-۲
۵۸	۶-۲- بلاکر کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید)
۵۹	۷-۲- رنگ آمیزی فلئورسنت
۶۰	۸-۲- تکنیک تانل
۶۲	۹-۲- اندازه گیری قطر هسته
۶۲	۱۰-۲- آنالیز آماری داده ها
۶۳	فصل سوم (نتایج)
۶۴	۱-۳- نتایج

- ۳-۱-۱- مطالعه مورفولوژیکی مرگ سلولی در نورون های حسی گانگلیون های ریشه
پشتی نخاع
۶۴
- ۳-۱-۲- مطالعه بیوشیمیایی مرگ سلولی در نورون های حسی گانگلیون های ریشه
پشتی نخاع
۶۵
- ۳-۱-۳- مطالعه کمی مرگ سلولی در نورون های حسی گانگلیون های ریشه پشتی نخاع
(اندازه گیری قطر هسته نورون ها)
۶۶
- ۳-۱-۴- بررسی نقش کلیت کننده های کلسیمی بر مهار آپوپتوزیس نورون های حسی
گانگلیون های کشت شده ریشه پشتی نخاع
۶۷
- ۳-۱-۴-۱- مطالعه مورفولوژیکی
۶۷
- ۳-۱-۴-۲- مطالعه بیوشیمیایی
۶۹
- ۳-۱-۴-۳- مطالعه کمی (اندازه گیری قطر هسته نورون های حسی)
۷۰
- ۳-۱-۵- بررسی نقش بلاکر کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر مهار آپوپتوزیس نورون
های حسی گانگلیون های کشت شده ریشه پشتی نخاع
۷۲
- ۳-۱-۵-۱- مطالعه مورفولوژیکی
۷۲

۷۴	۳-۱-۵-۲- مطالعه بیوشیمیایی
۷۵	۳-۱-۵-۳- مطالعه کمی (اندازه گیری قطر هسته نوروں های حسی)
۷۷	فصل چهارم (بحث و نتیجه گیری)
۷۸	۴-۱- بحث و نتیجه گیری
۷۹	۴-۱-۱- بررسی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس
۸۱	۴-۱-۲- نقش کلسیم در آپوپتوزیس
۸۲	۴-۱-۲-۱- نقش کلیت کننده های کلسیمی
۸۳	۴-۱-۲-۲- نقش بلاکر کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ
۸۴	۴-۱-۳- مکانیسم عمل کلسیم در آپوپتوزیس
۸۹	نتایج
۸۹	پیشنهادات
۹۰	فصل پنجم (ضمیمه)

۹۱	۱-۵- محیط کشت واجد سرم
۹۱	۲-۵- PBS (phosphate buffer saline)
۹۱	۳-۵- فیکساتیو Stefanini
۹۱	۴-۵- محلول ساکارز ۲۰ درصد در PBS
	۵-۵- Poly-L-lisin
۹۱	
۹۳	فهرست منابع
	فهرست اشکال
۳	شکل ۱-۱- سیستم عصبی مرکزی و سیستم عصبی محیطی
۷	شکل ۲-۱- ساختار نورون
۹	شکل ۳-۱- تشکیل غلاف شوان در سیستم اعصاب محیطی
۱۳	شکل ۴-۱- مقطع عرضی نخاع
۱۸	شکل ۵-۱- موقعیت قرارگیری گانگلیون ریشه پشتی نسبت به نخاع
۲۴	شکل ۶-۱- نمایی شماتیک از تغییرات مورفولوژیک طی نکروزیس و آپوپتوزیس
۲۹	شکل ۷-۱- مسیرهای وقوع آپوپتوزیس

- شکل ۱-۸- تصویر شماتیک از نحوه ایجاد همئوستازی کلسیم در سلول ۳۳
- شکل ۱-۹- پمپ کلسیم ۳۴
- شکل ۱-۱۰- ساختمان یک کانال وابسته به ولتاژ نوع L ۳۶
- شکل ۱-۱۱- کانال وابسته به ولتاژ نوع T ۳۷
- شکل ۱-۱۲- ساختمان EDTA ۴۲
- شکل ۱-۱۳- ساختمان EGTA ۴۳
- شکل ۱-۱۴- ساختمان لوپرامید هیدروکلراید ۴۴
- شکل ۱-۱۵- عملکرد میکروسکوپ فلئورسنس و نمای کلی میکروسکوپ ۴۵
- شکل ۱-۱۶- ساختار شیمیایی مولکول Propidium iodide ۴۶
- شکل ۱-۱۷- ساختار شیمیایی مولکول Hoechst ۴۷
- شکل ۲-۱- رت ماده بالغ نژاد ویستار ۵۵
- شکل ۲-۲- نحوه تشریح حیوان و شکافتگی ستون مهره ها و استریومیکروسکوپ ۵۶
- شکل ۲-۳- دستگاه cryostat ۵۷
- شکل ۲-۴- میکروسکوپ فلئورسانس مجهز به دوربین ۶۰
- شکل ۳-۱- مشخصات مورفولوژیکی آپوپتوزیس در نورون‌های حسی گانگلیون‌های کشت شده ریشه پستی نخاع ۶۴

- شکل ۳-۲- بررسی قطعه قطعه شدن DNA طی مرگ سلولی آپوپتوزیس در گانگلیون‌های کشت شده‌ی ریشه پشته نخاع با استفاده از تکنیک تانل
- ۶۶
- شکل ۳-۳- نقش کلیت کننده‌های کلسیم در مهار آپوپتوزیس نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشته نخاع
- ۶۸
- شکل ۳-۴- بررسی نقش کلیت کننده‌های کلسیم در مهار آپوپتوزیس نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشته نخاع با استفاده از تکنیک تانل
- ۷۰
- شکل ۳-۵- نمودار اثر کلیت کننده‌های کلسیم بر قطر هسته نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشته نخاع
- ۷۱
- شکل ۳-۶- نقش بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید) در مهار آپوپتوزیس نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشته نخاع
- ۷۳
- شکل ۳-۷- بررسی نقش بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید) در مهار آپوپتوزیس نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشته نخاع با استفاده از تکنیک تانل
- ۷۴
- شکل ۳-۸- نمودار اثر بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر قطر هسته نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشته نخاع
- ۷۶

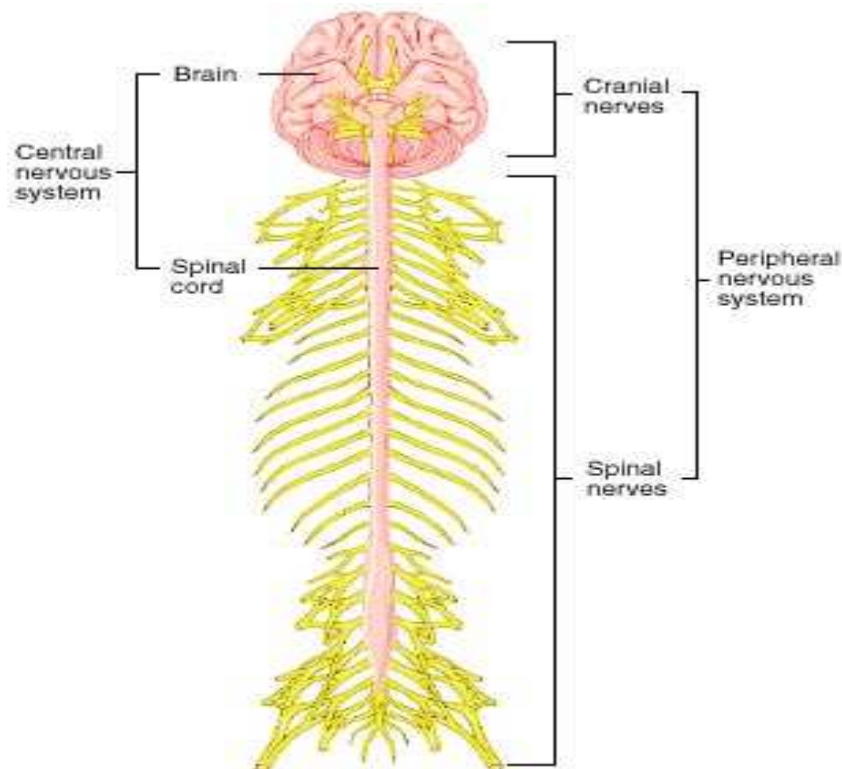
۱-۱-۱- دستگاه عصبی

دستگاه عصبی انسان به مراتب پیچیده ترین دستگاه بدن انسان بوده و توسط شبکه ای با بیش از ۱۰۰ میلیون سلول عصبی به همراه تعداد بسیار بیشتری سلول گلیال، تشکیل می شود. هر نورون به طور متوسط دست کم یک هزار نقطه تماس متقابل (interconnection) با سایر نورون ها دارد، که یک دستگاه پیچیده ارتباطی ایجاد می کند.

نورون ها در گروه هایی قرار گرفته، مدارها (circuits) را می سازند. همانند مدارهای الکترونیکی، مدارهای عصبی ترکیبات بسیار اختصاصی عناصر هستند که سیستم هایی با اندازه و پیچیدگی متفاوت تشکیل می دهند. اگرچه یک مدار عصبی ممکن است منفرد باشد، ولی در بیشتر موارد ترکیبی از دو یا تعداد بیشتری مدار است که با هم کنش متقابل دارند تا یک کارکرد ایجاد نمایند. یک کارکرد عصبی عبارت است از مجموعه ای از روند های هماهنگ که هدف مشخصی را تامین می کنند. تعدادی از مدارهای ابتدایی ممکن است با هم ترکیب شوند تا سیستم هایی با نظم بالاتر ایجاد کنند (جان کوئیرا، ۲۰۰۵).

۱-۱-۱- بافت عصبی

بافت عصبی بافتی است تحریک پذیر که امواج تحریکات را هدایت می نماید. این بافت از نظر تشریحی شامل دو قسمت می باشد. یکی دستگاه اعصاب مرکزی (Central nervous system) که عبارت از مغز و طناب نخاعی است و دیگر قسمتی از بافت عصبی که در خارج از مراکز مذکور وجود دارد و به نام دستگاه اعصاب محیطی (Peripheral nervous system) معروف می باشد که این خود شامل گانگلیون ها و رشته های عصبی است (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱. سیستم عصبی مرکزی و سیستم عصبی محیطی (www.mhhe.com)

به طور قراردادی برای دستگاه اعصاب محیطی دو بخش قائل شده اند:

الف) دستگاه اعصاب بدنی (Somatic) شامل رشته های حسی و حرکتی که به عضلات مخطط، پوست، کپسول مفاصل و تاندون ها عصب می دهد.

ب) اعصاب خودکار و یا احشایی (Autonomic) که عضلات صاف، غدد، قلب و ... را عصب می دهند.

بافت عصبی از نظر بافت شناسی از دو قسمت مهم تشکیل یافته است. یکی سلول عصبی که به نام نورون مرسوم است و دیگری ضمام آن به نام رشته عصبی. روی هم رفته این دو قسمت بر روی داربستی به نام بافت پشتیبان عصبی یا نوروگلی قرار دارد. بافت نوروگلی در عمل تغذیه عصبی، فعالیت عصبی و عمل دفاعی دخالت دارد. از مجموع تعدادی رشته عصبی یک عصب یا تنه عصبی به وجود می آید (رجحان، ۱۳۷۷).

۱-۱-۱-۱ سلول عصبی یا نورون

نورون که واحد ساختمانی و عملی دستگاه اعصاب به شمار می رود در مرحله جنینی از سلولی به نام نوروبلاست به وجود می آید که خود از اکتودرم عصبی مشتق می شود. نورون ها به وسیله تماس با یکدیگر عمل هدایت تحریکات را انجام می دهند. در بدن انسان حدود یک تریلیون نورون وجود دارد. نورون سلولی است مدور یا زاویه دار که تنه آن را پری کاریون (Perikaryon) می نامند. پری کاریون هم مرکز تغذیه و هم کانون دریافت تحریکات است. از پری کاریون دو نوع زوائد سیتوپلاسمی خارج می شود. یک زائده منفرد بلند که به نام آکسون (Axon) موسوم است و دیگری یک یا چند زائده منشعب و کوتاه به نام دندریت (Dendrites). معمولا آکسون را به انضمام غلاف هایش رشته عصبی (Nerve fibre) می نامند. در حالیکه این اصطلاح گاهی برای دندریت های طویل هم به کار می رود (شکل ۱-۲).

غشاء سلولی (Cell membrane) نقاط ویژه ای برای دریافت امواج دارد که به نام نواحی زیر سیناپسی (Subsynaptic membrane areas) موسوم است. مطالعات نشان داده است که غشاء سیتوپلاسمی نورون برای دریافت بعضی تحریکات کاملا مشخص و کددار شده است.

قطر پری کاریون سلول عصبی در انسان، بین ۴ تا ۱۳۵ میکرون گزارش شده است. شکل پری کاریون ممکن است به صورت گلابی، مدور، چندسطحی یا هرمی باشد. هسته نورون معمولا مدور و یکی است که اکثرا در وسط پری کاریون قرار دارد. هستک برجسته و درشت آن غالبا جلب توجه می کند. نورون های دوهسته ای در گانگلیون سمپاتیک و مغزی نخاعی وجود دارد. ضمنا جسم بار (کروماتین جنسی) که عبارت از کروموزوم X غیرفعال است نزد افراد مؤنث به صورت لکه ای بین هستک و غشاء هسته نورون ها دیده می شود.

سیتوپلاسم نورون را نوروپلاسم می نامند که در آن علاوه بر هسته، رنگدانه، قطره های لیپید، دستگاه گلژی، میتوکندری ها، رتیکولوم اندوپلاسمیک، اجسام نیسل و نوروفیبریل ها، لیزوزوم