بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت معلم

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد سلولی تکوین جانوری

اثر زهر زنبور عسل و فاکتور رشد عصبی(NGF) روی القاء تمایز عصبی رده سلولی فئوکروماسیتومای PC12

اساتید راهنما

دکتر کاظم پریور و دکتر مهناز آذرنیا

استاد مشاور

دکتر محمد نبیونی

دانشجو

الهام حویزی

شهریور ماه ۱۳۸۷

تقدیم به

مادر مهربان

و

پدر فداکارم

که لحظه لحظه وجودم مدیون وجود سبز آنهاست.

تشکر و قدردانی

خداوند بزرگ را شاکرم که توفیق انجام این تحقیق را بر من میسر گردانید و از زحمات تمامی اساتیدی که در این تحقیق راهنماییم کردند سپاسگزارم، با سپاس فراوان از

۱- استاد فرزانه جناب آقای دکتر کاظم پریور که خداوند توفیق استفاده از راهنمایی های مدبرانه و دلسوزانه، ایشان را برای انجام این پروژه به من ارزانی داشت.

۲- استاد فرزانه سرکار خانم دکتر مهناز آذرنیا که خدادند توفیق شاگردی ایشان را در دوره کارشناسی ارشد و نیز توفیق استفاده از راهنمایی های مدبرانه و دلسوزانه، ایشان را برای انجام این پروژه به من ارزانی داشت.

۳- استاد مهربان و ارجمند جناب آقای دکتر محمد نبیونی که افتخار شاگردی ایشان را در دوره کارشناسی ارشد داشته و در طول انجام پژوهش حاضر از تعالیم و رهنمودهای سازنده خویش به بهترین نحو ممکن مرا بهره مند ساخته اند.

٤- سرکار خانم دکتر هما محسنی کوچصفهانی به عنوان داور داخلی که افتخار شاگردی ایشان در دوره کارشناسی ارشد را داشتم و همواره از محبت های بی دریغ ایشان بهره مند شده و بنده را با رهنمود های خود یاری رساندند.

۵- مدیر گروه محترم زیست شناسی سرکار خانم دکتر شهربانو عریان که افتخار شاگردی ایشان در دوره کارشناسی ارشد را داشتم.

٦- جناب آقای دکتر بهمن زینلی که زحمت داوری پایان نامه بنده را به عهده داشتند.

۷- جناب آقای دکتر هادی خدادادی که صمیمانه در انجام این پروژه به من یاری رساندند.

۸- کادر محترم گروه آناتومی دانشگاه تربیت مدرس که همکاری لازم را با بنده داشتند.

۹- دوست عزیزم سرکار خانم سمیه ابراهیمی که در تمام مراحل کار با من همراه و همدل بودند.

۱۰- دوست عزیز و مهربانم سرکار خانم ساره رجبی که همواره در کنارم بوده و بعلاوه در کارهای آماری صمیمانه یاری دهنده من بودند.

۱۱- سپاس فراوان دارم از تمامی دوستان عزیزی که در تمام مراحل انجام کار مشوق و یاریگر من بودند:آقایان دکتر محمد طهماسب، سهیل صدری، علی طوسی، محمد ناجی، حامد ادهم، مریم رحیمی، هانیه جلالی، اعظم آقا رحیمی و همچنین آقای غلامرضا عسگر تهرانی، آقای کیوان حاجی آقا پور، آقای شریعت پناه و ...

چکیده:

اثر زهر زنبور عسل و فاکتور رشد عصبی(NGF) روی القاء تمایز عصبی رده سلولی فئوکروماسیتومای PC12

رده سلولی فئوکروموسایتوما یا PC12 ازتومور غده جنینی آدرنال رت بدست آمده است که در محیط کشت مناسب و تحت تاثیر عوامل القا کننده تمایز عصبی براحتی تبدیل به سلول هایی با فنوتیپ عصبی می شوند. تحقیقات نشان داده که زهر زنبور عسل و یا ترکیبات آن در تکثیر، بقا، تمایز و رشد سلول ها اثرات متفاوتی دارد. زهر زنبور عسل ترکیبات متنوعی دارد که مهمترین آنها میلیتین، فسفولیپاز A2، آپامین و...می باشند. مهمترین ترکیبی که در تمایز عصبی رده سلولی PC12 نقش دارد فسفولیپاز A2 در غلظت های معین است که سبب افزایش رشد به بیرون نوریت(Neuriteoutgrowth) می گردد و ثابت شده که فسفولیپاز A2 مرگ سلولی را به تعویق می اندازد.

سلول های PC12 با غلظت 5×10^{3} cell / well در پلیت های بیست و چهار خانه ای کوت شده با پلی دی لایزین ۰/۰۵ mg/ml، با محیط کشت RPMI 1640 برای ۲٤ ساعت کشت داده شدند و سپس تحت تاثیر زهر با غلظت های متنوع شامل غلظت های۵،۷،۱۰،۱،۲،۳ میکرو گرم بر میلی لیتر و NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر به مدت ۷ روز قرار گرفتند.

نتایج اولیه از آزمایشات ما نشان می دهد که زهر زنبور در غلظت های بین ۱ تا ۳ mg/ml از روز اول تا سوم تعداد سلول ها مشابه نمونه کنترل افزایش می یابد سپس بعد از روز سوم

بتدریج جسم سلولی سلول های PC12 طویل تر شده و زوائد سلولی ایجاد شده گسترش می یابند سپس سلول ها توده های فشرده ای با زوائد بلند تشکیل می دهند و به سلول هایی مشابه نورون تبدیل می شوند. بقا سلول ها تا روز پنجم ادامه می یابد و بعد از آن مرگ سلولی به طور فزاینده ای افزایش می یابد. در این تجربیات در **سلول های** PC12 **تحت تاثیر** NGF **با غلظت** ۵۰ng/ml تکثیر سلولی کاهش یافته و از روز چهارم شروع به تمایز کرده و در روز ششم تقریبا ۹۵٪ سلول ها به نورون تمایز یافتند. ارزیابی میزان بقا سلولی نیز با روش MTT انجام شد. در این آزمایش از روش آماری ANOVA و برای مقایسه نمونه های چند تایی از تست Tukey استفاده شد. داده ها در $P < 0.05$ معنی دار بود.

کلمات کلیدی : زهر زنبور عسل، رده سلولی PC12، تمایز،فاکتور رشد عصبی یا NGF

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

ساختار نورون ۲

سیناپس ۳

دسته بندی انواع سیناپس ۳

تکثیر و تمایز در دستگاه عصبی..... ٤

تمایز..... ٦

فاکتور رشد عصبی(NGF) به عنوان فاکتور تمایزی سلول های عصبی ٦

پروتئین های مختلف با خاصیت نروتروفیک.....۹

GDNF ۱۰

تحقیقات اخیر نشان داده فاکتور هایی نوروتروفیک محسوب می شوند..... ۱۱

فاکتور رشد عصبی ..... ۱۱.

نقش NGF در رشد نورون های حسی و سمپاتیکی ۱۲

بیوسنتز فاکتور رشد عصبی.....۱۲

مکانیسم عمل NGF..... ۱۲

سلول های هدف NGF..... ۱۳

مدل مکانیکی برای NGF ۱٤
مکانیسم عمل برای NGF ۱٤
اثر NGF بر تمایز سلول های عصبی ۱٥
انتقال پیام توسط NGF ۱٥
اثرات متابولیکی و عمومی NGF ۱٦
منابع تولید کننده NGF ۱٦
رسپتورهای نوروتروفین ها ۱۷
ترکیبات زهر زنبور عسل ۱۹
خواص پروتئین های سم زنبور ۲۰
هیالورونیداز(Hyaluronidase) **۲۰**
فسفولیپاز A2 (phospholipase) ۲۱
ملیتین (Melittin) ۲۱
آپامین (Apamine) ۲۲
پپتید MCD (mast cell degranulating peptid) ۲۲
سکاپین (Secapin) ۲۳
ترتیاپین (Tertiapin) ۲۳
خواص فارموکولوژیکی آمین های فعال سم زنبور عسل ۲۳
فرمون ها (Pheromones) ۲۴

موارد استعمال زهر زنبور عسل **٢٤**

کشت سلول ٢٤

اختلافات مهم سلول در بافت زنده و محیط کشت آزمایشگاه ٢٥

اهداف پروژه **٢٧**

فصل دوم

مواد و روش ها ٢٩

مواد مورد نیاز ٣٠

طرز تهیه محلول کشت سلول RPMI -1640 ..... **٣٢**

فاکتور رشد عصبی (NGF ٢,٥ S) **٣٣**

طرز تهیه محلول زهر زنبور عسل **٣٣**

محلول کریزل ویوله (٠/١ درصد) **٣٣**

محلول فیکساتیو پارافرمالدهید ٤ ٪ (W/V) **٣٤**

بافر PBS ٣٤

FBS ٣٥

محلول Trypsine/EDTA(1X) ٣٥

آنتی بیوتیک Pen / Strep **٣٥**

محلول DMSO **٣٥**

محلول تریپان بلو0.4% **٣٥**

تهیه محلول Poly-D-Lysine ٣٦

تقسیم بندی مراحل تحقیق..... ٣٦

رده سلولی PC-12 ..... ٣٧

کشت سلول های رده PC-12 ..... ٣٨

تحویل سلول به صورت زنده ٣٩

مراقبت روزمره و تعویض محیط کشت ٣٩

پاساژ و حفظ ذخیره سلولی..... ٣٩

ذخیره سلول ها به صورت منجمد ٤٠

شمارش سلولی ٤٠

تمایز سلول های رده pc12..... ٤١

تاثیر زهر زنبور عسل..... ٤٢

تاثیر NGF..... ٤٣

تاثیر هم زمان زهر زنبور عسل باNGF ٤٤

روش رنگ آمیزی آنزیمی ٤٤

تهیه محلول بافر ٤٥

طرز تهیه محلولACThI..... ٤٥

طرز تهیه محلول DTNB..... ٤٦

ارزیابی میزان بقا سلول ها (viability assay) با روش MTT ٤٨

فصل سوم

نتایج ۵۰

نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده به قرار زیر است ۵۱

تعیین دوز مناسب زهر زنبور عسل برای تمایز رده سلولی pc12 به سمت نورون.....۵۱

تمایز رده سلولی PC12 به نورون های تمایز یافته ۵۱

بررسی درصد تمایز رده سلولی رده PC12 به نورون های تمایز یافته با استفاده از NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر.....۵۲

بررسی تمایز رده سلولی PC12 به نورون های تمایز یافته با استفاده از زهر زنبور با غلظت های مناسب ۵۳

بررسی تمایز رده سلولی PC12 به نورون های تمایز یافته با استفاده از زهر زنبور عسل و NGF به صورت همزمان ٥٤

بررسی درصد تمایز رده سلولی PC12 در حالت کنترل ٥٥

نتایج حاصل از شمارش با تریپان بلو ٦٥

نتایج بررسی Viabilityرده سلولی PC12 با استفاده از روش MTT.....٦٩

بررسی Viability سلول های PC12 تیمار شده با NGF با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر ٦٩

بررسی Viability سلول های PC12 تیمار شده با زهر زنبور عسل با غلظت های مختلف ٦٩

بررسی Viabilityسلول های PC12 تیمار شده با NGF و زهر به صورت توام .. ۷۰

نتایج حاصل از بررسی واکنش آنزیمی(AChE)..... ۷۳

فصل چهارم

بحث وتفسیر..... ۷۷

پیشنهادات..... ۸۸

فصل پنجم

منابع ۸۹

منابع فارسی..... ۹۰

منابع انگلیسی ۹۰

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

فصل اول

مقدمه

ساختار نورون:

سلول های عصبی یا نورون ها، شبکه ای از ارتباط ویژه ای را در بین سلول ها تشکیل می دهند و از طریق گیرنده های حسی اطلاعات را جمع آوری می کنند. سپس این اطلاعات را پردازش و پیامی مناسب برای سلول های عامل ایجاد می کنند. نورون از قسمت های زیر تشکیل شده است:

۱. جسم سلولی یا soma: شامل هسته و سیتو پلاسم اطراف آن که Perikaryon نامیده می شود.

۲. دندریت ها: انشعابات شاخه ای شکل چند تایی است که بر روی جسم سلولی قرار می گیرد.

۳. آکسون: بلندترین انشعاب نورون را می نامند. نورون هایی که یک آکسون دارند از منطقه سوما در hillock بوجود آمده و در انتها به telodendron ختم می شوند. هر ناحیه انتهایی telodendron منشعب شده که در نهایت ناحیه سیناپس نامیده می شود (Pavilis et al., 2006).سطح غشایی سوما و دندریت ها به عنوان رسپتور عمل کرده و ناحیه آکسون، برای انتقال در نظر گرفته شده است. از روی تعداد وبلندی وانشعاب خارج شده از سوما چندین حالت برای نورون در نظر گرفته می شود:

۱. نورون های چند قطبی که در آنها انشعاب متعددی از سوما خارج می شود. یک انشعاب آن از بقیه بلند تر است که آکسون نامیده می شود. بیشتر نورون های سیستم عصبی از این نوعند. برای مثال سلول های پیرامیدال کورتکس مغز و سلول های پورکینژ کورتکس مخچه، از این نوعند. روی هر آکسون، پوششی از میلین تشکیل می شود که، این پوشش متناوب بوده و به قسمت هایی که فاقد پوشش می باشند گره رانویه گویند. نورون های چند قطبی به انواع زیر تقسیم می شوند:

الف: تیپI گلژی: آکسون در زیر محدوده دندریت قرار دارد. مثل سلول های پریمیدال و پورکینژ.

ب : تیپII گلژی: آکسون در زیر محدوده دندریت نیست بلکه، در امتداد دندریت می باشد. مثل سلول کورتکس مغز (Pavilis et al., 2006).

۲ . نورون های دو قطبی: دو انشعاب دارد که در شبکیه و ساختمان شنوایی و بویایی وجود دارد.

۳ . نورون های یک قطبی کاذب: تنها یک انشعاب کوتاه دارند که از جسم سلولی خارج شده و در گانگلیون های حسی مغز و نخاع دیده می شود. از لحاظ جنینی نورون های یک قطبی کاذب از نوروبلاست های دو قطبی منشا می گیرند.

سیناپس:

مکانی برای انتقال پیام شیمیایی در پاسخ به تحریک می باشد. سیناپس، ارتباط بین ترمینال پیش سیناپسی از آکسون و رسپتورهای غشایی پس سیناپسی که معمولا غشای دندریت است، می باشد. غشای پیش و پس سیناپسی توسط فضایی بنام شکاف سیناپسی جدا می شود. مواد متراکمی میان این دو سطح را می پوشاند.

غشای پیش سیناپسی دارای تعداد زیادی وزیکول سیناپسی می باشد که، هر وزیکول سیناپسی حاوی نوروترنسمیتر می باشد. ترمینال پیش سیناپسی شامل میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی صاف، میکروتوبول و کمی نوروفیلامان می باشد(Rossi et al., 2007).

دسته بندی انواع سیناپس ها از روی طرز استقرار بر روی نورون پس سیناپسی به قرار زیر است:

۱ . سیناپس Axospinous (دگمه آکسونی): پایانه آکسونی، روی دگمه دندریتی را می پو شاند.

۲ . سیناپس Axodendritic: پایانه آکسونی روی ساقه دندریتی است.

۳ . سیناپس Axosomatic: پایانه آکسونی روی سومای نورون است.

٤ . سیناپس Axoaxonic: انتهای پایانه آکسونی روی ترمینال آکسونی است (Pavilis et al., 2006).

تکثیر و تمایز در دستگاه عصبی:

تکثیر: تکثیر، تمایز و مرگ سلولی در بافت های بالغ و جمعیت های سلولی تعیین می شود. افزایش تعداد سلول ها می تواند در نتیجه افزایش تکثیر یا کاهش مرگ سلول باشد. تکثیر سلول عمدتا تحت کنترل پیام های (محلول یا وابسته به تماس) حاصل از ریزمحیط ها است که آن را تحریک یا مهار می کنند. افزایش محرک ها یا کمبود مهارکننده ها، منجر به رشد خالص و کنترل نشده سلول ها در سرطان می شود. اگرچه تشدید رشد ممکن است به علت کوتاه شدن چرخه سلولی روی دهد، اما مهمترین سازو کار رشد، تبدیل سلول های خاموش یا در حال استراحت به سلول های در حال تکثیر، با وادار نمودن سلول به ورود به چرخه سلولی می باشد. هم فراخوانی سلول های خاموش به ورود به چرخه و هم پیشرفت چرخه سلولی نیازمند پیام های تحریکی برای فائق آمدن بر مهار فیزیولوژیک تکثیر سلول ها هستند. بافت ها ممکن است عمدتا از سلول های خاموش تشکیل شده باشند، اما اکثر بافت های بالغ حاوی ترکیبی از سلول های دائما در حال تقسیم، سلول هایی با تمایز نهایی، سلول های بنیادی وسلول های خاموش هستند که گاهی وارد چرخه سلولی می شوند. بافت های بدن بر اساس فعالیت تکثیری خود به سه گروه تقسیم می شوند:

بافت های در حال تقسیم (ناپایدار): که در آنها سلول ها در سراسر طول عمر خود تکثیر می یابند و جایگزین سلول های تخریب شده می گردند. اپیتلیوم های سطحی مانند سطوح سنگفرشی مطبق پوست، حفره دهان، مهبل و گردن رحم از این نوعند.

بافت های خاموش (پایدار): که بطور طبیعی سطح تکثیری پائینی دارند. با این حال سلول های این بافت ها در پاسخ به محرک ها می توانند متحمل تقسیمات سریع شوند و لذا قادر به ترمیم بافت منشا هستند. آنها در مرحله G0 چرخه سلول در نظر گرفته می شوند اما می توانند برای ورود به G1 تحریک شوند. سلول های پارانشیمی کبد، کلیه ها وسلول های مزانشیمی از این نوعند.

بافت های غیر تقسیم شونده (دائمی): شامل سلول هایی هستند که در زندگی پس از تولد، چرخه سلول را ترک کرده وقادر به تقسیم میتوزی نیستند. نورون ها وسلول های ماهیچه قلبی ومخطط در این گروه قرار دارند. در صورتی که نورون های دستگاه عصبی مرکزی تخریب شوند، جایگزینی بافت عموما توسط تکثیر اجزا حمایتی دستگاه عصبی مرکزی یعنی سلول های گلیال و نورون سازی از سلول های بنیادی صورت می گیرد(Yan and Ziff, 1995).

چرخه سلولی به فازهای متفاوتی تقسیم می شود : فاز G1 که بین فاز M (تقسیم میتوز) وS (همانند سازی و سنتز DNA)قرار می گیرد، این فاز زمانی است که سلول به میتوژن ها پاسخ می دهد. فاز G2، زمانی است که بین S وM قرار دارد. DNA مضاعف شده در فاز S قبل از انتقال به سلول های دختری در نقاط کنترل کننده واقع در اواخر فازهایG2, M, G1 برای تامین ژنوم سالم چک می شود. ماشین چرخه سلولی توسط کمپلکس سیکلین – Cdk تنظیم می شود. این کمپلکس از یک زیر واحد کاتالیتیکی به نام Cdk و یک ترکیب تنظیمی به نام cyclin تشکیل شده است. تنظیم فعالیت کمپلکس سیکلین – Cdk بوسیله سنتز و عدم سنتز سیکلین و در نهایت افزایش و تنزل غلظت آن انجام می شود. هنگامی که کمپلکس سیکلین –cdk فعال می شود این کمپلکس انواع پروتئین های تنظیم کننده چرخه سلولی را فسفریله می کند وچرخه را به پیش می برد. از سوی دیگر پروتئین های دیگری از خانواده پروتئین های کنترل کننده تقسیم سلولی (cdc) با دفسفریله کردن یکسری پروتئین ها باعث پیشروی چرخه می شوند.