دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش تکوینی

بررسی اثر فشار هیدروستاتیک بر اینتراکشن ماتریکس خارج سلولی–سلول های PC12

استاد راهنما:

دکترمهری آزاد بخت

نگارش:

موسی کهتری

مهر ماه ۱۳۹۰

Abstract

Hydrostatic pressure as a mechanical stress alters cellular phenotype and function Hydrostatic pressure is a crucial in a variety of physiological and pathological situation. extracellular matrix component of the cell's environment, which effects on cells through (ECM) and can alter many morphological aspects of neuronal differentiation. In this study, We attempt to develop the link between cell death that induced by hydrostatic pressure in relation to disruption of cell- substrate adhesion.

PC12 Cells were cultured in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% FBS and pressurized with 100 mmHg for 4 hours. Neutral red uptake assay was used for viability, attachment assay was used to test cell ability to adhere to substrate and total neurite length was investigated ,matrix metalloproteinase activity were evaluated by gelatin zymography and focal adhesion kinase expression evaluated by immunocytochemistry. Controls were treated identically except for the application of pressure. Mixed MANOVA and t-test was used for evaluating differences between control and experimental cells cultured on different substrate ($p<0.05$).

Our results implies cells pressurized by hydrostatic pressure showed a significantly decrease in survival after 12 and 24h relative to the unpressurized cells ($p<0.05$).After pressure treatment, adhesion potency and total neurite length decrease relative to the control group in different substrate ($p<0.05$). Gelatin zymography result showed that two gelatinolytic bands (92 and 72 kDa) in the media but the intensity of these bands increased at 12 and 24h after pressure treatment and p-FAK positive focal adhesions present on the membrane of control cells were spindle shaped and distributed almost along all membrane while on stressed cells focal contact have a round-spindle shaped and distributed on defined spot.

our experiments provide evidence that elevated hydrostatic pressure itself can induce cell death in PC12 cells as a result of increasing matrix metalloproteinase activity and disruption in focal adhesion structures.

Key words: Hydrostatic pressure, Cell adhesion, Matrix metalloproteinase, Focal adhesion, PC12

فصل اول

مقدمه

۱-۱- نیروهای مکانیکی در سیستم های بیولوژیک

درحال حاضراطلاعات بسیاری در مورد ژن ها، مورفوژن ها و مولکول های سیگنالینگ که تشکیل بافت ها را کنترل می کنند در دست است. اگر چه ما به طور کامل نمی دانیم که چگونه این عوامل شیمیایی تشکیل بافت ها و اندام های زنده با شکل های خاص و ویژگی های فیزیکی منحصر به فردشان (سختی، بازگشت الاستیک یا ویسکوالاستیسیتی) که برای پمپ خون، حرکات تکراری ایستا یا بلند کردن بدن بر خلاف نیروی جاذبه مورد نیاز هستند را هدایت می کنند. یک قرن پیش، بسیاری از فرایندهای تکوینی به کمک اصطلاحات مکانیکی توضیح داده می شد و گفته می شد که این فرایندهای تکوینی به دلیل تغییر در شکل سه بعدی ساختارهای دارای سلول های زنده و بافت است که در سطوح مختلف و در نتیجه اعمال نیرو بر روی آن ها اتفاق می افتد. اگرچه این دیدگاه به وسیله پیشرفت هایی که در زیست شناسی مولکولی حاصل شد کنار گذاشته شد اما رابطه بین نیروهای فیزیکی و تکوین مجددا به عنوان یک موضوع مشترک بین زیست شناسان، ژنتیک دانان، مهندسین و فیزیک دانان مطرح شده است. این موضوع مشترک بین رشته ها منجر به کشف رابطه های اساسی بین نیروهای مکانیکی، بیوشیمی مولکولی، بیان ژن و الگوهای بافتی که در امبریوژنز نقش دارند شده است و نقش مرکزی در مورفوژنز و حفظ بافت در سراسر عمر یک ارگانیزم ایفا می کند(Mammoto and Ingber,2010).

در دو دهه گذشته، به خوبی نشان داده شده است که بسیاری از سلول ها به نیروهای مکانیکی حساس هستند و می توانند فنوتیپ و ماتریکس خارج سلولی پیرامونی شان را در پاسخ به تغییرات محیط مکانیکی شان، تغییر دهند(Swartz *et al.*,2003) . سلول های زنده در بدن انسان به طور مداوم و در تمام طول عمر در معرض نیروهای مکانیکی هستند. این استرس ها و کشش ها می تواند هم ناشی از محیط پیرامونی و هم از شرایط فیزیولوژیکی درونی منشاء می گیرد. بسته به بزرگی، جهت و پراکنش این نیروهای مکانیکی سلول ها می توانند به طرق مختلف به آنها پاسخ دهند(Lim *et al.*,2006). همین طور درک چگونگی پاسخ مکانیکی سلول به نیروهای مکانیکی اولین مرحله مهم در بررسی چگونگی انتقال و گسترش این سیگنال های مکانیکی است که درنهایت به پاسخ های شیمیایی و بیولوژیکی در سلول تبدیل می شود (Wang *et al.*,1993; Ingbar,2003).

همان طور که گفته شد سلول های ارگانیزم به طور مرتب در معرض مجموعه ای از نیروهای مکانیکی هستندکه به صورت انواع استرس ها، کشش ها، فشار و جریان ها دریافت می شوند. در بسیاری از موارد، ویژگی های مکانیکی سلول ها نقشی کلیدی در توانایی آنها در مقاومت در برابر بار مکانیکی در حالی که اعمال فیزیولوژیکی شان را انجام می دهند، ایفا می کنند. در موارد دیگر، سیگنال مکانیکی نقش مهمی را به عنوان تنظیم کننده رفتار سلولی هم در زمان سلامتی و هم بیماری ایفا می کند (Starodubtseva *et al.*,2009). مطالعات اخیر نشان داده است که مورفولوژی و ساختار سلول شدیدا به تحریک مکانیکی حساس است. تحریک مکانیکی اغلب همراه با اینتراکشن سلول- ماتریکس خارج سلولی(ECM) است که آن هم به نوبه خود پاسخ مولکولی را تحت تاثیر قرار می دهد وسرنوشت سلول را که شامل آپوپتوز، تکثیر و تمایز است، تعیین می کند(Cheng *et al.*,2008). سلول ها توانایی احساس کردن و پاسخ دادن به انواع نیروهای خارجی را دارند.یکی از این پاسخ ها تحت عنوان هدایت مکانیکی شناخته شده است و زمانی رخ می دهد که مکانیزم ها نیروی مکانیکی ورودی را به یک پاسخ بیومکانیکی تبدیل می کنندکه آن هم به انواع پاسخ ها از قبیل جهت گیری مجدد شکل سلول (Buck, 1980; Wang *et al.*, 1995) ، بازآرایی اکتین اسکلت سلولی (Wang, 2000) و سنتز پروتئین های ماتریکس خارج سلولی (Carver *et al.*, 1991) وابسته است. این پاسخ های سازشی القا شده به طور مکانیکی از موضوع های مورد توجه در بسیاری بیماری ها مانند بیماری های قلبی، سرطان و استئوپورزیز هستند(leDuc and Bellin, 2006) . نیروهایی که سلول ها از طریق تحریکات مختلف مانندکشش، فشار و استرس برش[1] تجربه می کنند به سلول، محیط فیزیولوژیکی و جایگاه سلول در بدن بستگی دارد. امروزه، مطالعات فراوانی صورت گرفته است (Carano and Siciliani, 1996; Kubicek *et al.*, 2004; Owatverot *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004) که پاسخ سلول ها به انواع مختلف تحریکات مکانیکی را مورد ارزیابی قرار داده اند.

نیروهای مکانیکی در بسیاری از اعمال سلولی از قبیل تغییرات در بیان ژن ها، تکثیر وتمایز شرکت می کنند(Chen *et al.*,2004). به عنوان مثال، به کار بردن استرس های برش و کشش بر روی سلول در محیط کشت می تواند تغییراتی را در تنظیم چسبندگی، سیگنالینگ درون سلولی و عملکرد سلول القاء کند (Sniadecki *et al.*,2007). علاوه بر نیروهای خارجی، سلول ها نیروهای انقباضی درونی به واسطه اسکلت سلولی ایجاد می کنند که می توانند نقشی حیاتی در تنظیم سلولی ایفا کنند. (Mcbeath *et al.*,2004; Pirone *et al.*,2006)تشابهات موجود در پاسخ های سلولی داده شده به نیروهای اعمال شده خارجی ونیروهای تولید شده داخلی منجر به این نظریه شده است که هر دو نوع نیرو ممکن است مسیرهای هدایت مکانیکی مشترکی را در تبدیل تحریک مکانیکی به سیگنال های بیومکانیکی استفاده کنند (Vogel and

[1] . Shear stress

sheetz,2006; Balaban *et al.*,2001). این نیروهای بیومکانیکی در سطوح فیزیولوژیک برای تکوین وحفظ ساختار و عملکرد سلول ضروری هستند اما افزایش آن ها تحت عنوان استرس مکانیکی نتیجه اش مرگ سلولی است که منجر به شرایط پاتولوژیک می شود (Wernig and Xu,2002).

استرس های مکانیکی بر روی شکل سلول و ساختار اسکلت سلولی اثر می گذارند و به موجب آن بر بسیاری از رفتارهای سلولی که برای تکوین بافت ضروری هستند مثل مهاجرت، رشد، تمایز، آپوپتوز و جابه جایی رده های سلولی بنیادی اثر گذار هستند(Moore *et al.*,2005; Matthews *et al.*,2006). بسیاری از این استرس ها یا از طریق ماتریکس خارج سلولی به سلول منتقل می شوند یا اینکه درون اسکلت سلولی قابل انقباض هر کدام از سلول ها تولید شده و بر روی چسبندگی شان بهECM تاثیر می گذارند(Ingber,1997; Bershadsky,2001). هر دو نوع این نیروهای مکانیکی به طور مشترک بر روی گیرنده های اینتگرین ترا غشایی اثر می گذارند و باعث تجمع آنها در جایگاه های ویژه ای به نام فوکال ادهیژن ها[1] می شوند و به طور فیزیکی ECM را به اسکلت سلولی متصل می کنند(Geiger *et al.*,2001).

سلول ها به طور مکانیکی در برابر نیروهای اعمال شده بر اینتگرین سازش پیدا می کنند یا اینکه سختی ECM را به وسیله ایجاد پیام های تشدید شونده به وسیله القاء استرس افزایش می دهند و هر چه سختی مکانیکی سلول ها به صورت خطی افزایش می یابد سطح استرس اعمال شده هم بالا می رود و این مطلب توانایی سلول در مقاومت مقابل آسیب های مکانیکی (به عنوان مثال، جلوگیری از پارگی غشاء[2]) و هم چنین تحرک سلولی را به وسیله بالا بردن سطح نیروهای انقباضی که سلول می تواند بر چسبندگی به ECM اعمال کند، افزایش می دهد. مطالعات انجام شده نشان داده است که توانایی سلول ها در تقویت خودشان در پاسخ به نیروهای پایدار اعمال شده به تشکیل فوکال ادهیژن در مکانی است که این نیروها اعمال شده اند، این تغییرات در اندازه، ترکیب و جایگاه های فوکال ادهیژن ها همگی در اولین ثانیه ها یا دقایقی پس از اعمال استرس های بیرونی به سلول رخ می دهد. تشکیل فوکال ادهیژن القاء شده به وسیله نیروهای مکانیکی از طریق فعال سازی GTPase کوچک Rho و اهداف پایین دست آن یعنی کیناز همراه Rho (ROCK) و mDia وساطت می شود(Reveline *et al.*,2001). ROCK تشکیل فوکال ادهیژن را به وسیله فسفریلاسیون زنجیره سبک میوزین(MLC) و از طریق ممانعت از عمل MLC فسفاتاز پیش می برد(Kimura *et al.*, 1996) و قابلیت انقباضی سلول را افزایش می دهد وmDia پلی مریزاسیون را تسریع می کند(Watanabe *et al.*,1999 ; Matthews *et al.*,2005)، پاسخ سلولی تشدید شونده که به وسیله اعمال نیرو در مورد اینتگرین ها القاء می شود مشابه تجمع فوکال ادهیژن ها توسط فعال شدن تیروزین

---

[1] . Focal adhesions
[2] . Membrane tearing

فسفاتاز SHP2 وساطت می شود که آن هم به نوبه خود تیروزین کیناز Src را فعال می کند (Felsenfeld *et al.*, 1999; von Wichert *et al.*, 2003). علاوه بر این در صورت اعمال نیرو به اینتگرین ها، کانال های یونی حساس به نیروهای مکانیکی فعال می شوند ودر نتیجه ورود کلسیم به سیتوپلاسم می تواند قابلیت انقباضی سلول را از طریق اینتراکشن کالمودولین/کالدسمون تعدیل کند ودر نتیجه فعالانه سازماندهی اسکلت سلولی(Sokabe *et al.*,1997) و رفتار سلولی را تحت تاثیر قرار می دهند(Halfman *et al.*,1999). در تایید این مشاهدات می توان گفت مورفولوژی، ترکیب، پراکنش ساب سلولار، قابلیت تحرک و خصوصیات مکانیکی فوکال ادهیژن ها به صورت هتروژن و دینامیک می باشد(Matthew *et al.*,2005). بنابراین نشان دادن این مطلب که چگونه سلول ها به نیروهای دینامیک به خوبی نیروهای مکانیکی استاتیک در ECM که از طریق گیرنده های اینتگرین هدایت می شوند پاسخ می دهند امری ضروری است.

۱-۱-۱- مبانی مولکولی هدایت مکانیکی سلول

در زمان ارگانوژنز، هرسلول تغییرات نیروهای مکانیکی را حس می کنند و آن ها را به سیگنال های داخل سلولی تبدیل می کنند که نتیجه آن تغییراتی در شکل، قطبیت، رشد، مهاجرت و تمایز سلولی است که برای تکوین بافت ضروری است. مکانیسم های مولکولی که به موجب آن ها نیروهای اعمال شده بر سلول های زنده، بیوشیمی سلول و بیان ژن را تغییر می دهند و برای کنترل فرایند تکوین ضروری هستند هنوز به طور کامل شناخته نشده اند اگرچه در این زمینه در دو دهه گذشته پیشرفت های زیادی صورت گرفته است (Ingber,2006; Orr *et al.*,2006). مطالعات نشان داده است که گیرنده های چسبندگی سطح سلول که اسکلت داخل سلولی را به ماتریکس خارج سلولی و سلول های مجاور متصل می کنند، مسیرهای مولکولی مقدمی را جهت انتقال سیگنال های مکانیکی از طریق سطح سلول ارائه می دهند. از آن جا که سلول ها و بافت ها از نظر کششی محکم هستند نیروهای منتقل شده بین سلول ها از طریق ECM و ارتباطات بین سلولی به چندین جایگاه در اتصالات اسکلت سلولی در سراسر سلول منتقل می شوند و راندمان این انتقال سیگنال به سطح استحکام کششی سلول حساس است و پاسخ سلولی را به همان اندازه کشش مکانیکی تنظیم می کند(Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2009). نیروهای مکانیکی اعمال شده بر گیرنده های چسبندگی سطح سلول و کانال ها، در امتداد فیلامنت های اسکلت سلولی می توانند از طریق تغییرات شکل سلولی به تغییرات بیوشیمیایی مولکولی در سطح سلول یا کمپلکس های تقاطعی[1](مانند فوکال ادهیژن ها، کمپلکس های چسبندگی سلول- سلول) تبدیل شوند که این عمل را با اثر بر جایگاه های اتصالی جدید به عنوان مثال

[1] . Junctional complexes

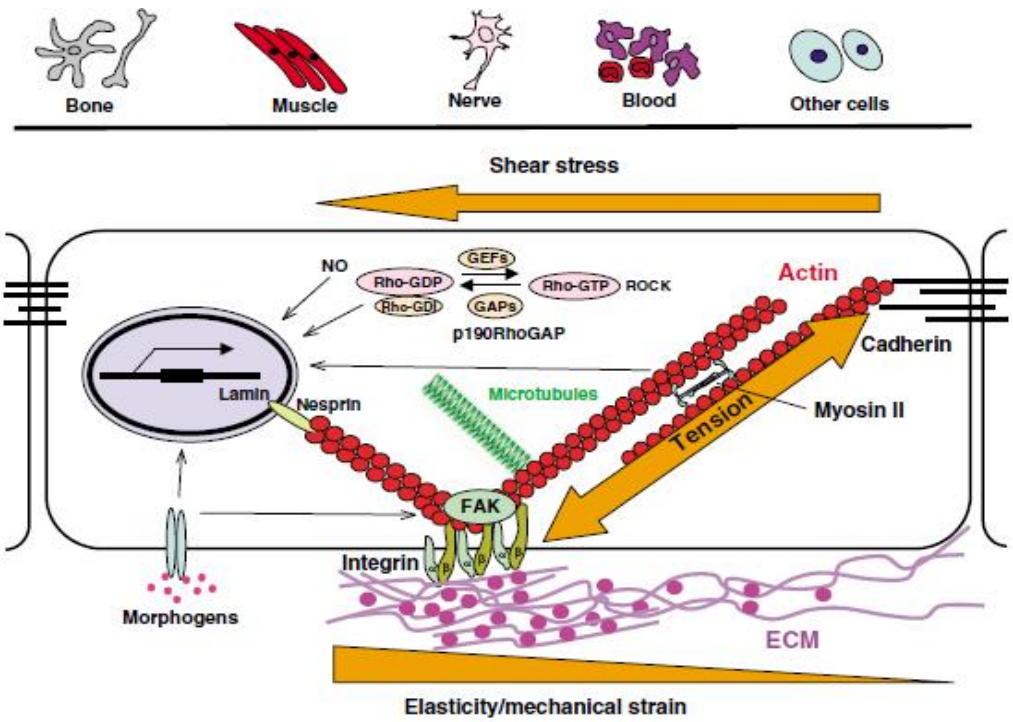
در p130Cas، تالین و فیبرونکتین انجام می دهند (Brown and Discher, 2009; Gee *et al.*, 2008; del Rio *et al.*, 2009) و مولکول های اتصالی یا کینتیک های غیر اتصالی را تغییر می دهند یا نفوذ یون ها را از طریق کانال های غشایی تغییر می دهند(Thodeti *et al.*,2009).

این نیروها هم چنین ممکن است در جایگاه های دور دست در هسته متمرکز شوند یعنی جایی که آن ها می توانند فعالیت ژن ها و سرنوشت بنیادینگی سلول ها[1] را از طریق تعدیل کانال های یونی هسته ای (Itano *et al.*,2003) یا انتقال هسته ای مولکول های کلیدی سیگنالینگ مانند β-catenin (Kahn *et al.*,2009)یا فاکتورهای رونویسی مانند TFII-I یا Gata2 (Mammoto *et al.*,2009) به منظور تعیین سرنوشت سلولی و تکوین بافت تغییر دهند. از طرف دیگر، کارایی انتقال نیروها مستقیما به سطح کشش ایزومتریک اسکلت سلولی بستگی دارد.

۱-۱-۲-کشش اسکلت سلولی به عنوان یک تنظیم کننده زیستی پایه نیروهای مکانیکی

همان طور که در بالا گفته شد به نظر می رسد که شکل سلول و ساختار اسکلت سلولی ممکن است با تغییر سطح انقباضی سلول، قابلیت مکانیکی ماتریکس خارج سلولی(از طریق بازآرایی بیومکانیکی)، شدت چسبندگی های سلول- سلول و سلول- ECM و تعداد و اندازه سلول های قرار گرفته در یک حجم از بافت که به وسیله یک ECM نسبتا سخت به هم متصل هستند، تغییر یابد(شکل۱-۱). مطالعات صورت گرفته به کمک سلول های چسبنده که برای بقا به چسبیدن به ECM احتیاج دارند مانند سلول های بنیادی اندوتلیالی و مزانشیمی نشان داده است که تغییرات در سرنوشت سلولی مانند رشد، تمایز و آپوپتوز می تواند به وسیله تغییر پارامترهای مشابه مانند شکل سلول، اکتین یا میکروتوبول های اسکلت سلولی، الاستیسیتی ECM، الگوهای بافتی یا Rho/ROCK سیگنالینگ کنترل شود.به عنوان مثال، وقتی سلول های منفرد اندوتلیالی روی قطعات ECM چسبنده ساخته شده بزرگ ($>1500\ mm^2$)گسترش می یابند، تکثیر می یابند در حالی که زمانی که روی قطعات کوچک تر($<500\ mm^2$) که از گسترش سلول ها جلوگیری می کنند کشت داده می شوند دچار آپوپتوز می شوند و هنگامی که روی قطعات متوسط تر کشت داده می شوند سریع تر وارد فرایند تمایز می شوند(Mammoto and Ingber, 2010).

[1] . Stem cell fate



شکل ۱-۱-کنترل مکانیکی سرنوشت سلولی- تغییرات در نیروهای مکانیکی که بین ECM و سلول های همسایه و عناصر اسکلت سلولی مخالف در تعادل می باشند بیوشیمی درون سلولی و بیان ژن را تغییر می دهند، هم چنین استرس های مکانیکی پاسخ های بیوشیمیایی نهایی را مدیریت می کنند و سرنوشت سلولی را تعیین می کنند و این نیروهای فیزیکی اعمال شده بر روی گیرنده های چسبندگی سطحی مستقیما از طریق فیلامنت های اسکلت سلولی و مولکول های متصل کننده اسکلت سلولی و هسته، مانند نسپرین، به هسته منتقل می شوند(Mammoto and Ingber,2010).

سلول های عصبی نیروهای مکانیکی روی چسبندگی های بستر اعمال می کنند که برای هدایت عصبی حیاتی هستند و پراکنش این نیروها و مقدار ناحیه ECM در دسترس برای گسترش سلول ها شکل گیری و عملکرد شبکه های عصبی بالغ را مدیریت می کنند (Anava *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2007). کشش مکانیکی درون اکسون های دروزوفیلا برای شکل گیری و تجمع وزیکول های ترانسمیتر ضروری است و پیشنهاد می کند که محیط میکرومکانیکی برای نگهداری و عملکرد پردازش اطلاعات عصبی دارای نقشی مرکزی است(Siechen *et al.*,2009). به نظر می رسد کنترل مکانیکی تعویض دودمان نقشی کلیدی در تمایز سلول های بنیادی ایفا می کند به عنوان مثال سلول های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده روی ژل های پلی اکریلامید مصنوعی و با سختی های مختلف که با پروتئین های ECM پوشیده شده اند سرنوشت خود را با توجه به الاستیسیته بسترشان تعیین می کنند حتی زمانی که در حضور

فاکتورهای القایی محلول کشت داده می شوند و این مکانیزم کنترل مکانیکی به ایجاد کشش اسکلت سلولی وابسته به Rho بستگی دارد(Mcbeath *et al.*,2004). به طور قابل توجه، سلول ها زمانی که بر روی ECM هایی با سختی مکانیکی مشابه با آن چه در شرایط *in vivo* برای سلول اتفاق می افتدکشت داده می شوند، ترجیحا به انواع سلول های مجزا تمایز می یابند(به عنوان مثال نورون برخلاف ماهیچه و استخوان). سلول های بنیادی جنینی تمایز نیافته موش به نظر می رسد به میزان زیادی به نیروهای مکانیکی حساس هستند به نحوی که زمانی که در معرض نیروهای مکانیکی قرار می گیرند سریعا قابلیت مکانیکی شان را تغییر می دهند وچند توانی شان[1] کاهش می یابند(مثلا هنگامی که سرکوب بیان ژن Oct3/4 اندازه گیری شد) (Chowdhury *et al.*,2009). این یافته ها پیشنهاد می کند که سلول های بنیادی به طور ظریفی به میکرومحیط فیزیکی اطرافشان حساس هستند و سیگنال های مکانیکی برای کنترل رشد سلول بنیادی و عمل آن ها به عنوان فاکتورهای محلول بسیار مهم هستند.

یافته های بی شمار که در بالا به آن ها اشاره شد نشان دهنده این نکته است که نیروهای مکانیکی نقشی کلیدی در مورفوژنز و الگوبرداری بافتی بازی می کنند واهمیت این عوامل فیزیکی در کنترل تکوینی تمام مراحل امبریوژنز به اندازه عوامل شیمیایی است. اگرچه شرکت نیروهای فیزیکی در تغییر شکل سلول و بافت در جنین بیش از یک قرن است که مشخص شده است، اما فقط تحقیقات اخیر بوده که نشان داده استرس های مکانیکی به عنوان سیگنال های حاوی اطلاعات عمل می کنند و تغییرات ویژه ای را در بیوشیمی مولکولی و بیان ژن از طریق فرایند هدایت مکانیکی ایجاد می کنند. علاوه براین، اگرچه در برخی سطوح تکوین جنین، نیروهای فیزیکی از عمل سلول های تشکیل دهنده ایجاد می شوند اما امروزه مشخص شده است که کشش اسکلت سلولی نیروی حاصله ای است که در پشت بسیاری از این فرایندهای مکانیکی کلیدی و هدایت مکانیکی- شیمیایی قرار دارد. سلول ها تغییرات سیگنال های مکانیکی را بر مبنای توانایی شان در تغییر بیوشیمی و القا بازآرایی اسکلت سلولی و ECM در سطح مولکولی حس می کنند اما گسترش این پاسخ و انتقال کارایی سیگنال مکانیکی در سراسر سلول و هسته بسته به سطح کشش ایزومتریک یا قابلیت انقباض اسکلت سلولی انتقال می یابد. به طور هم زمان، نیروی کششی تولید شده سلول سیگنال های شیمیایی که به وسیله سلول ها هدایت می شوند را تغییر می دهند، و علاوه بر آن ایجاد یک بی نظمی در سلول های مجاور و مولکول های ECM که سیگنال های مکانوشیمیایی را در فواصل طولانی هدایت می کنند ایجاد می کنند، در نتیجه الگوبرداری بافتی و شکل گیری اندام را در تمام جنین تحت تاثیر قرار می دهند(Mammoto and Ingber,2010).

[1] . Pluripotency

۱-۱-۳ - فشار هیدروستاتیک:

استفاده از فشار هیدروستاتیک به عنوان یک پارامتر ترمودینامیکی در زمینه بیولوژی اولین بار در اواخر قرن نوزدهم بوسیله رگنارد(Regnard,1884)، رویر(Royer,1895) وهیت(Hite,1899) مرسوم شد. سپس در بین سال های ۱۹۵۵-۱۹۱۰ دو تیم عمده یکی در آمریکا به سرپرستی بریجمن(Bridgman,1914,1949) و دیگری در فرانسه به سرپرستی باست(Basset,1927) در کارهایشان بر فشار وارتباطش با تکوین فوکوس کردند و در بیست سال گذشته توجه محققین زیست شناسی در زمینه فشار هیدروستاتیک موجب طیف وسیعی از کاربردها برای آن در زمینه زیستی و پزشکی گردیده است(Revalian *et al.*,2010).

در واقع اولین مطالعات آزمایشگاهی در مورد اثر فشار هیدروستاتیک بالا بر روی جمعیت میکروارگانیسم های باروفیل ساکن در عمق آب صورت گرفت و چگونگی سازش آنها با فشار بالا و نقش ویژه فشار در پیدایش حیات مورد مطالعه قرار گرفت ; Hazen *et al.*,2002 ; Daniel *et al.*,2006) (Pradillon and Gaill,2007. مطالعات بعدی در مورد اثر استرس های مکانیکی به خصوص فشار هیدروستاتیک، بر روی باکتری هایی نظیر اشرشیا کلی و کانال های یونی انجام گرفت (Martinac *et al.*,1987) و رفته رفته این مطالعات به سمت ساختارهای سلولی و مولکولی پیش رفت. تحقیقاتی مانند مطالعه اثر فشار در تحریک تقسیم و تغییرات مورفولوژیکی در سلول های اندوتلیالی (Soumpio *et al.*,1994) و اثر افزایش فشار هیدروستاتیک در ایجاد آپوپتوز در لنفوبلاست انسانی از این قبیل است(Takano *et al.*,1997). تحقیقات کنونی در زمینه اثرهای فشار هیدروستاتیک بر سیستم های زیستی بیشتر با رویکرد آسیب شناسی ناشی از افزایش غیر طبیعی فشار بر سلول ها به عنوان یک استرس مکانیکی دنبال می شود. دستگاه عصبی و سلول های آن به دلیل تماس مداوم با فشار هیدروستاتیک و بیماری هایی که در اثر افزایش بیش از اندازه معمول میزان فشار در دستگاه عصبی بوجود می آیند بسیار مورد توجه هستند. مطالعات آگار و همکارانش در زمینه اثر فشار هیدروستاتیک بر سلول هایی با فنوتیپ عصبی از جمله این تحقیقات می باشد(Agar *et al.*,2000,2006).

فشار هیدروستاتیک به عنوان یکی از انواع نیروهای مکانیکی، در سطوح فیزیولوژیک، در سیالیت و هموستازی بافت ها نقش دارد(Moller *et al.*, 2002). میزان فشار هیدروستاتیک در قسمت های مختلف بدن متفاوت است. سلول های عصبی مغز، در معرض فشاری در حدود ۱۵ میلی متر جیوه هستند که از طرف مایع مغزی – نخاعی به آنها وارد می شود و سلول های اندوتلیال آئورت فشاری بین ۱۲۰-۸۰ میلی متر جیوه را تحمل می کنند. در هر کدام از این موارد سلول ها با فشار سازگارند و افزایش فشار موجب ایجاد حالت

های آسیب رسان(پاتولوژیک) می شود مثلا به دنبال بیماری آرترواسکلروزیس به دنبال افزایش فشار وارد شده بر سلول های اندوتلیال، فشار خون افزایش می یابد و در بیماری گلوکوما(آب سیاه) افزایش فشار داخل کره چشم از ۳۰ تا۷۰ میلی متر جیوه میتواند ظرف مدت کوتاهی موجب کوری فرد شود (Guyton *et al.*,2000).

تغییر در گرادیان فشار هیدروستاتیک بر روی اتصالات محکم سلولی، اکتین اسکلت سلولی، طول سلول، انتقال یونی بین سلول ها(Takada *et al.*,2009) سطح توبولین(Zimmerman *et al.*,2000) و همچنین بیان وسنتز NCAM ها (llic *et al.*,2000)تاثیر گذار است. نیروهای مکانیکی از جمله فشار هیدروستاتیک با اثر بر کانال های یونی دریچه مکانیکی سطح سلول ها و همچنین ماتریکس خارج سلولی سبب تغییر در رفتارهای ساختاری و عملکردی سلول ها می شوند(Tan *et al.*,2006). فشار هیدروستاتیک و نیروهای مکانیکی ملایم تر که در دامنه فیزیولوژیک بدن هستند بیشتر از طریق ماتریکس خارج سلولی بر رفتارهای حیاتی سلول اثر می گذارند، ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک داربست فیزیکی در اطراف سلول ها (Geiger *et al.*,2002) واسطه انتقال بسیاری از پیام های حیاتی مانند تکثیر،تمایز و مرگ سلولی در سلول ها به شمار می آید(Giancotti,1997; Darlne *et al.*,2003). اهمیت ماتریکس خارج سلولی به اندازه ای است که فقدان بر هم کنش مناسب سلول و ماتریکس خارج سلولی که توسط فوکال ادهیژن ها رخ می دهد منجر به بروز نوعی آپوپتوز به نام آنویکیز می شود(Gilmore,2005).

تیمار کردن سلول های پستانداران با فشار بالا منجر به مرگ سلولی می شود که مکانیسم این مرگ سلولی عمدتا به سطح فشار بستگی دارد(Revalain *et al.*,2010):

برای فشار حدود ۲۰۰MPa مرگ سلولی از نوع آپوپتوز و در فشار بالاتر از۳۰۰MPa مرگ سلولی به دلیل یک عامل شبه نکروتیک اتفاق می افتد (Aertsenet *et al.*,2009; Frey *et al.*,2008; Yamaguchi *et al.*,2008). آپوپتوز معمولا بعد از تیمار کردن با یک فشار ۱۰۰MPa اتفاق می افتد واین فرایند در بسیاری از لاین های سلولی مثل MEL Cells، لنفوبلاست انسانی، B35، PC12 و لاین های سلولی گانگلیون شبکیه(RGCs) مشاهده شده است (Agar *et al.*,2006; Takano *et al.*,1997; Yamaguchi *et al.*,2008). آپوپتوز القا شده به وسیله فشار بالا به دلیل فعال شدن caspase-3 از طریق مسیرهای داخلی و خارجی است. مسیر خارجی بوسیله اتصال لیگاند Fas به رسپتور Fas مرگ سلولی سطح سلول مشخص می شود در حالی که مسیر داخلی زمانی فعال می شود که سیتوکروم c از میتوکندری درون سیتوزول آزاد میشود وبنابراین محرک آپوپتوز هنوز ناشناخته است(Yamaguchi *et al.*,2008). نتیجه

آپوپتوز جمع شدن سلول[1]، متراکم شدن کروماتین[2]، ازدست دادن میکروویلی ودر نهایت مرگ سلولی است(Takano *et al.*,1997; Yamaguchi *et al.*,2008).

در سلول های پستانداران در صورت در معرض فشار بالاتر از ۳۰۰MPa قرار گرفتن نکروزه شدن اتفاق می افتد(Takano *et al.*,1997; Frey *et al.*,2008). نکروز بستگی به فعال شدن کاسپاز ندارد ومنجر به متورم شدن سلول[3]، تحلیل ارگانل ها[4]، آسیب غیر قابل برگشت میتوکندری و تغییر غلظت یون های درون سلول می شود و در نهایت این آثار موجب از هم گسستن غشا و آزاد شدن محتویات سلول می شود که باعث تحریک التهاب می شود(Takano *et al.*,1997; Yamaguchi *et al.*,2008).

[1] . Cell shrinkage
[2] . Condensation of chromatin
[3] .Cellular swelling
[4] . Organelle degradation

۱-۲- مرگ سلولی

سلول های در حال مرگ در فرایندی درگیر هستند که تا زمانی که از اولین فاز غیر قابل برگشت[1] عبور نکرده اند قابل برگشت است. تصور می شود که این مرحله به وسیله فعال سازی بالای کاسپاز(Cohen,1997)، فقدان$\Delta\Psi m$ (Green and Kroemer,1998) ، نفوذپذیری کامل غشای خارجی میتوکندری(Green and Kroemer,2004) یا آشکار شدن باقی مانده های فسفاتیدیل سرین (PS) که سیگنال های سلول های نرمال همسایه را حذف می کنند، مشخص می شود. اگرچه مثال های متعددی وجود دارند که کاسپازها در متن فرایندهای غیر کشنده و مسیرهای تمایزی نیز فعال هستند (Galluzzi *et al.*,2008; Garrido and Kroemer *et al.*,2004). در غیاب وقایع بیوشیمیایی ویژه ای که در نقطه بدون بازگشت مرگ سلولی می تواند مشاهده شود، NCCD پیشنهاد می کند که زمانی باید یک سلول را مرده نامید که یکی از معیار های مورفولوژیکی و مولکولی زیر مشاده شود:

۱)غشای سلولی دچار اختلال می شود به طوری که با رنگ های حیاتی (مانندPI) در شرایط آزمایشگاهی مشخص است.

۲)هسته سلول ها به طور کامل قطعه قطعه شده و به اجسام مجزایی (اجسام آپوپتوزی[2]) تبدیل می شود. یا

۳)در شرایط *in vivo* این قطعات به وسیله سلول های مجاور در بر گرفته می شود.

۱-۲-۱-آپوپتوز[3]

بیان واژه آپوپتوز اولین بار به وسیله Kerr و همکاران (Kerr *et al.*,1972) برای توصیف جنبه مورفولوژیک مرگ سلولی به کار برده شد.آپوپتوز با کروی شدن سلول، انقباض پاهای کاذب[4]، کاهش حجم سلولی[5] ، متراکم شدن کروماتین[1]، قطعه قطعه شدن هسته[2]، تغییرات جزیی در عناصر پروتوپلاسمیک

---

[1] . Point of no return
[2] . Apoptotic bodies
[3] . Apoptosis
[4] . Psuedopodes
[5] . Pyknosis

اندامک های سیتوپلاسمی، برآمده شدن غشای پلاسمایی[3] و بلعیده شدن به وسیله فاگوسیت ها (*in vivo*) همراه است. بنابراین اصطلاح آپوپتوز باید منحصرا در مورد وقایعی از مرگ سلولی به کار رود که تعدادی از ویژگی های مورفولوژیکی گفته شده را دارا هستند. بیان این مطلب ارزشمند است که به کار بردن آپوپتوز و مرگ برنامه ریزی شده سلول(PCD) به یک معنی درست نیست زیرا مرگ سلولی به نحوی که در تکوین فیزیولوژیک اتفاق می افتد می تواند ویژگی های غیر آپوپتوزی دیگری را هم نشان دهد(Baehreke,2002; Barkla and Gibson,1999).

قطعه قطعه شدن DNA و/ یا فعال شدن کاسپاز ممکن است در تشخیص آپوپتوز مفید باشد. هم چنین ممکن است استفاده از فعال شدن کاسپاز نه تنها برای تشخیص آپوپتوز بلکه در تعریف بهتر نوع مرگ سلولی مفید باشد (البته با استفاده از دیگر معیارها).

باید این نکته را یادآور شویم که بیان آپوپتوز به میزان زیادی ناهماهنگی های عملکردی و بیوشیمیایی را پنهان می کند. چندین زیرنوع (subtype) مجزا از آپوپتوز وجود دارد که اگرچه از لحاظ مورفولوژیک مشابه هستند اما می توانند به طرق مختلف بیوشیمیایی آغاز شوند (به عنوان مثال مسیرهای داخلی وخارجی، با یا بدون دخالت میتوکندری و...) (Danial and Korsmeyer,2004; Kroemer *et al*,2007)

۱-۲-۲-اتوفاژی[4] و مرگ سلولی اتوفاژیک[5]

ویژگی بارز ماکرواتوفاژی انباشته شدن مواد سیتوپلاسمی درون اتوفاگوزوم ها به منظور تجزیه توده ای به وسیله لیزوزوم هاست. طبق تعریف اتوفاگوزوم ها دارای غشایی دو لایه و محتوی اندامک های تجزیه کننده وسیتوزول هستند (Levine and Klionsky,2004; Levine and Kroemer,2008) که به ما اجازه می دهد در تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی[6] آن ها را از اندوزوم ها، لیزوزوم ها یا برآمده شدن سلولی آپوپتوتیک متمایز کنیم (Tasdemir *et al.*,2008). ادغام اتوفاگوزوم ها و لیزوزوم ها، اتولیزوزوم ها را ایجاد می کند که در آن ها غشای داخلی اتوفاگوزوم و محتویات لومینال آن به وسیله هیدرولازهای

---

[1] . Chromatin condensation
[2] . Karyorrhexis
[3] . Blebing
[4] . Autophagy
[5] . Autophagic cell death
[6] . Transmission electron microscopy(TEM)

اسیدی لیزوزوم تجزیه می شوند که این فرایند کاتابولیک کامل شدن مسیر اتوفاژیک را نشان می دهد. زمانی که ترکیب شدن اتوفاگوزوم و لیزوزوم بلوکه می شود، برخلاف مهار اتوفاژی باز هم تجمع مواد را خواهیم داشت (Levine and Kroemer,2008; Gonzalez *et al.*,2005). بنابراین افزایش شمار اتوفاگوزوم ها به این معنی نیست که مسیر اتوفاژیک القا شده است و برای بررسی اتوفاژی به تست های کاربردی نیاز داریم. مرگ سلولی اتوفاژیک از نظر مورفولوژیک (به ویژه به وسیله میکروسکوپ الکترونی انتقالی) نوعی از مرگ سلولی تلقی می شود که در غیاب متراکم شدن کروماتین رخ می دهد اما همراه با واکوئله شدن[1] وسیع سیتوپلاسم است(Kroemer *et al.*,2009).

برخلاف سلول های آپوپتوتیک(که وضوح آن ها به وسیله بلعیده شدن وتجزیه لیزوزومی تضمین می شود)، سلول های که با مورفولوژی اتوفاژیک می میرند اصلا یا به میزان کمی همراه با فاگوسیت ها هستند (Baehrecke,2005 ; Clarke,1990). اگرچه بیان " مرگ سلولی اتوفاژیک" یک اصطلاح زبان شناسی برای باور مرگ سلولی است که به وسیله اتوفاژی اتفاق افتاده است اما این اصطلاح به سادگی مرگ سلولی به وسیله اتوفاژی را توصیف می کند (Kroemer et al,2009).

۱-۲-۳- نکروز[2]

مرگ سلولی نکروتیک یا نکروزیس از نظر مورفولوژیک به وسیله افزایش حجم سلول[3]، متورم شدن اندامک ها، گسسته شدن غشای پلاسمایی و در نهایت از دست دادن محتویات داخل سلولی مشخص می شود. مدت زمان طولانی تصور می شد که نکروز تنها یک مرگ سلولی تصادفی و کنترل نشده است اما مطالعات نشان داد که مرگ سلولی نکروتیک ممکن است با ظرافت خاصی به وسیله مجموعه ای از مسیرهای هدایت سیگنال و مکانیزم های کاتابولیک کنترل شود (Golstein and Kroemer,2007 ; Festjens *et al.*,2006). به عنوان مثال نشان داده شده است گیرنده هایی با دومین مرگ (مانند TNFR1،Fas/CD95 و TRAIL-R) و گیرنده های Toll-like (مانند TLR3 و TLR4) به ویژه در حضور مهار کننده های کاسپاز، نکروز را نشان می دهند. به نظر می رسد مرگ سلولی به واسطه TNFR1، Fas/CD95، TRAILR وTLR3 بستگی به RIP1کیناز دارد (Holler *et al.*,2000) به طوری که این مسئله به وسیله ناک دان/ ناک اوت کردن آن ویا مهار به وسیله نکروستاتین-۱ نشان داده شده است . اگر چه در

---

[1] . Vacuolization
[2] . Necrosis
[3] . Oncosis

این مورد یک توافق کلی وجود ندارد اما برخی پیشنهاد کرده اند از اصطلاح نکروپتوزیس[1] استفاده شود که بیان کننده نکروز تنظیم شده است (بر خلاف واژه تصادفی). در سطح بیوشیمیایی ممکن است نکروپتوزیس به عنوان نوعی از مرگ سلولی تعریف شود که می توان به وسیله مهار RIP1 از وقوع آن جلوگیری کرد(با روش های ژنتیکی و دارویی)(Degterev *et al.*,2005,2008) و ممکن است یک وجه تمایز متقاعد کننده بین اشکال برنامه ریزی شده و تصادفی نکروز ارائه دهد.

چندین واسطه، اندامک و فرایند سلولی در مرگ سلولی نکروتیک دخیل هستند اما هنوز مشخص نیست این ها چگونه با هم کار می کنند. این واقعه شامل تغییرات میتوکندریایی (مانند باز شدن[2]، تولید گونه های اکسیژن انفعالی یعنی ROS، استرس نیترواکسیداتیو به وسیله اکسید نیتریک یا ترکیبات مشابه (Nicotera *et al.*,1999) و نفوذپذیری غشای میتوکندریایی یعنی MMP، که اغلب به وسیله سیکلوفیلین Dکنترل می شود)، تغییرات لیزوزومی(تولید ROS به وسیله واکنش فنتون و نفوذپذیری غشای لیزوزومی)، تغییرات هسته ای (هایپراکتیواسیون PARP-1 و هیدرولیز پیوسته ^{+}NAD)، تجزیه لیپیدها (به دنبال فعال شدن فسفولیپازها، لیپواکسیژنازها و اسفینگومیلینازها)، افزایش غلظت یون کلسیم درون سیتوزول(ca^{2+}) که نتیجه آن افزایش بار میتوکندری و فعال شدن پروتئاز های غیر کاسپازی (مانند کالپین ها و کاتپسین ها) است (Golstein and Kroemer,2007; Nicotera *et al.*,1999). در مثال های متعددی از مرگ سلولی نکروتیک، نقشی حیاتی برای سرین/ترئونین کیناز RIP1 در نظر گرفته شده است (Festjens *et al.*,2007). بنابراین تا اینجای کار یک توافق کلی روی تغییرات بیوشیمیایی که ممکن است به منظور شناسایی صریح نکروز صورت گیرد وجود ندارد. در غیاب یک مخرج بیوشیمیایی عمومی، مرگ سلولی نکروتیک هنوز هم عمدتا به عنوان یک اصطلاح در مورد مرگ سلولی به کار می رود که فاقد مارکرهای آپوپتوزی و اتوفاژی است به ویژه زمانی که سلول ها یک نفوذپذیری غشای پلاسمایی را متحمل می شوند. بنا به این دلایل، باید در طبقه بندی ویژه انواع مرگ سلولی روتین به عنوان نکروز محتاط بود (Kroemer *et al.*,2009)

[1] . Necroptosis
[2] . Uncoupling

۱-۲-۴- شاخی شدن [1]

شاخی شدن نوعی از مرگ برنامه ریزی شده سلول است که در اپیدرم رخ می دهد و از لحاظ مورفولوژیک و بیوشیمیایی از آپوپتوز متفاوت است. این مسئله منجر به شکل گیری کورنئوسیت ها می شود که در واقع کراتینوسیت های مرده هستند که شامل ترکیبی از پروتئین های ویژه (مانند کراتین، لوریکرین،SPR و اینوولوکرین) و لیپیدها (اسیدهای چربی و سرآمیدها) که برای عمل لایه شاخی پوست (مقاومت مکانیکی، الاستیسیته، دفع آب و تثبیت ساختار) ضروری می باشد. شاخی شدن را در موارد محدودی تحت عنوان کراتینیزه شدن یا تشکیل پوشش شاخی می نامند (Candi *et al.*,2005; Lippens *et al.*,2005) و عموما مشاهده شده است که از آن به عنوان یک برنامه تمایز نهایی مشابه آن چه در مورد بافت های فاقد هسته(مانند اپیتلیوم عدسی و گلبول های قرمز بالغ خون) اتفاق می افتد تعبیر می شود (Counis *et al.*,1998; Testa *et al.*,2004).

در سطح مولکولی،شاخی شدن مکانیسم مشخصی از تمایز اپی تلیالی را دنبال می کند که طی آن سلول همه آنزیم ها و سوبستراهای لازم برای ساختن سد اپی تلیالی جدا کننده بدن از محیط خارجی را می سازد و این مسئله از اتصال عرضی آنزیم های عمل کننده (مانند ترانس گلوتامیناز نوع ۳،۱ و۵) بر روی چندین سوبسترا (مانند لورکرین،SPR، اینولوکرین و SP100) مانند آن چه طی سنتز لیپیدهای خاصی که به فضای خارج سلولی آزاد می شوند و پروتئازهایی که برای نفوذ ناپذیری و فلس فلس شدن لازم هستند، ناشی می شود (Melino *et al.*,2000).

۱-۲-۵- فاجعه میتوزی [2]

فاجعه میتوزی نوعی از مرگ سلولی است که یا در طی یک میتوز ناموفق یا تنظیم نشده یا مدت کوتاهی پس از آن رخ می دهد و می تواند همراه با تغییرات مورفولوژیک مانند میکرو نوکلاسیون [3] (که اغلب نتیجه تقسیم نابرابر کروموزوم ها یا قطعات کروموزومی بین هسته های دختر است) و مولتی نوکلاسیون [4] (وجود دو یا تعداد بیشتری هسته مشابه یا با اندازه های هتروژن که نتیجه جدایی ناقص طی سیتوکینز است)باشد. البته اتفاق نظر وسیعی در مورد استفاده از این اصطلاح وجود ندارد (Kroemer *et*

---

[1] . Cornification
[2] . Mitotic catastrophe
[3] . Micronucleation
[4] . Multinucleation

(*al.*,2009) و این فاجعه میتوزی می تواند منجر به یک مورفولوژی آپوپتوزی یا نکروزی شود(Vakifahmetoglu *et al.*,2008).NCCD توصیه می کند که استفاده از بیان های مانند"مرگ سلولی مقدم با مولتی نوکلاسیون" یا " مرگ سلولی که در طی متافاز رخ می دهد" بهتر است زیرا این ها دقیق تر هستند واطلاعات بیشتری به ما می دهند.

۱-۲-٦-آنویکیز[1]

آنویکیز یک لغت یونانی به معنی بی خانمان (homelessness) است که در واقع یک آپوپتوز القا شده به دلیل فقدان چسبندگی سلولی یا چسبندگی غیر اختصاصی سلول است(Frisch *et al.*,1994). چسبیدن به ماتریکس خارج سلولی امری مهم است و تعیین می کند که آیا سلول در جایگاه مناسبی قرار دارد یا نه، و سلول هایی با چسبندگی نا به جا به وسیله فرایند آپوپتوز برداشته می شوند، آنویکیز که در پی از دست دادن اتصالات سلول به بستر است فرایندی فیزیولوژیکی است که در تکوین، هموستازی بافت ها و بیماری ها نقش دارد(Denial and Korsmeyer,2004; Gilmore,2005). در بدن موجود زنده آنویکیز ممکن است از چسبیدن سلول های جدا شده به یک ماتریکس جدید و رشد ناموزون سلول ها جلوگیری کند و این یک ضریب امنیت برای موجود زنده است(Chiarugi and Giannoni,2008). اینتگرین ها بقای سلول را از طریق اینتراکشن با ماتریکس خارج سلولی تنظیم می کنند و می توانند نیروهای مکانیکی ناشی از ماتریکس را حس کنند و این تحریک را به یک سیگنال شیمیایی تبدیل کنند که قادر به تعدیل انتقال سیگنال درون سلولی است (Giancotti,2000). آنویکیز در انواع مختلف سلول ها توصیف شده است اگرچه به نظر می رسد منشا فعال شدن مسیرهای منجر به آنویکیز در آن ها متفاوت است. ارتباط فیزیولوژیکی آنویکیز به وسیله این حقیقت که رده های سلولی سرطانی نسبت به سلولهای اپی تلیالی نرمال معمولا به آنویکیز حساس نیستند، ثابت شده است . به این معنی که آن ها برای تکثیر و بقا احتیاج به چسبیدن به ECM ندارند (Chiarugi and Giannoni,2008). بنابراین توانایی چیره شدن به این نیاز یک امر ضروری برای متاستازی سرطان است. در واقع در سلول های نئوپلازیک، تغییر در مولکول های چسبندگی سلول-سلول، پروتئین کینازها و فسفاتازها، مولکول های سیگنالینگ همراه اینتگرین یا تنظیم کننده های آپوپتوز موجب مقاومت به تغییرات فیزیولوژیکی می شود که طی آنویکیز رخ می دهد. با توجه به آن چه گفته شد یک سیگنال ترکیبی بقا اجازه انتشار سلول های سرطانی متاستازیک را می دهد (Reddig and Juliano,2005; Chiarugi,2005).

---

[1] . Anoikis