

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



دانشکده علوم  
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی  
گرایش سلولی - مولکولی

عنوان پایان نامه

مطالعه اثر غلظت یون کلسیم خارج سلولی و مورفین بر بیان ژن های

*bax* و *bcl-2* در رده سلولی PC12

اساتید راهنما:

دکتر علی بیدمشکی پور

دکتر مهتری آزادبخت

استاد مشاور :

دکتر حسن اکرمی

نگارش :

آرزو ربزیا

اسفندماه ۱۳۸۹

## چکیده:

آپوپتوز، یک شکل تنظیم شده ژنتیکی مرگ سلولی است که وقتی سلول در معرض تحریکات فیزیولوژیکی، آسیب زا یا سیتوتوکسیک قرار می‌گیرد، رخ می‌دهد. داروهای اپیوئیدی مانند مورفین، با اتصال به گیرنده های خود و تحریک این گیرنده ها وابسته به دوز مصرفی و مدت زمان استفاده، اثرات متفاوتی را القاء می‌نمایند. به طوری که مقایسه دوزهای پایین و بالای مورفین در محیط آزمایشگاه، اثرات دوگانه وابسته به غلظت، یعنی اثرات میتوژنی در غلظت های پایین و مهار رشد یا آپوپتوز را در غلظت های بالاتر تأیید کرده اند. شواهد متعدد نشان داده اند که اپیوئیدها، می‌توانند آپوپتوز را در سلول های عصبی و سایر سلول ها، مانند سلول های ایمنی، سلول های سرطانی و رده های سلولی کشت داده شده نوروئیدی مانند رده سلولی PC12 القاء نمایند.  $Ca^{2+}$  یکی از تنظیم کننده های کلیدی بقای سلولی است، که در پاسخ به طیف وسیعی از شرایط آسیب زا، قادر به القای آپوپتوز می‌باشد. در این مطالعه، تغییر در میزان بقای سلولی، آپوپتوز و بیان ژن پیش آپوپتوزی *bax* و ژن ضد آپوپتوزی *bcl-2* به دنبال تیمار حاد با غلظت های مختلف مورفین همراه با غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی در رده سلولی PC12 بررسی شد. سلول های PC12 در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو و غلظت های مختلف مورفین (۱ و ۱۰۰ میکرومولار) همراه با غلظت های مختلف  $Ca^{2+}$  خارج سلولی (۰/۷، ۰/۶، ۰/۵، ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲ و ۰/۱ میلی مولار) به مدت ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت کشت داده شدند. در این مطالعه، میزان بقای سلولی توسط روش رنگ آمیزی حیاتی نوترال رد مورد بررسی قرار گرفت. رنگ آمیزی افتراقی بیس بنزآمید و پروپیدیوم یدید و میکروسکوپی فلورسنس برای نشان دادن مرگ سلولی استفاده شد. با به کار بردن واکنش *real time RT-PCR* کمی، میزان بیان ژن های *bax* و *bcl-2* مورد تحقیق قرار گرفت. نتایج آزمون رنگ آمیزی حیاتی توسط نوترال رد نشان داد که میزان بقای سلول های PC12 در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار مورفین همراه با بالاترین غلظت یون کلسیم خارج سلولی یعنی ۰/۷ میلی مولار در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). رنگ آمیزی هسته ای بیس بنزآمید و پروپیدیوم یدید نشان داد غلظت ۱۰۰ میکرومولار مورفین همراه با بالاترین غلظت یون کلسیم خارج سلولی یعنی ۰/۷ میلی مولار توکسیک بوده و درصد سلول های آپوپتوزی را افزایش می‌دهد ( $P < 0/05$ ). در این مطالعه، نتایج *real time RT-PCR* کمی نشان داد که غلظت مورفین ۱۰۰ میکرومولار در حضور ۰/۷ میلی مولار یون کلسیم خارج سلولی بیان ژن پیش آپوپتوزی *bax* را افزایش و بیان ژن ضد آپوپتوزی *bcl-2* را کاهش می‌دهد ( $P < 0/05$ ). می‌توان نتیجه گرفت که، آپوپتوز القاء شده توسط مورفین وابسته به حضور یون کلسیم است.

**کلمات کلیدی:** آپوپتوز، یون کلسیم، مورفین، رده سلولی PC12

۲	۱-۱- مرگ سلولی.....
۲	۲-۱- مرگ سلولی آپوپتوزی.....
۳	۳-۱- ویژگی های مرگ سلولی آپوپتوزی.....
۳	۲-۳-۱- ویژگی های مورفولوژیکی آپوپتوز.....
۵	۲-۳-۱- ویژگی های بیوشیمیایی آپوپتوز.....
۶	۳-۳-۱- ویژگی های مولکولی آپوپتوز.....
۸	۴-۱- مسیرهای سلولی- مولکولی آپوپتوز.....
۹	۱-۴-۱- مسیر خارجی آپوپتوز.....
۱۰	۱-۴-۱- لیگاندها و گیرنده های مرگ.....
۱۰	۲-۴-۱- مسیر داخلی آپوپتوز.....
۱۱	۱-۲-۴-۱- نقش کاسپازها در آپوپتوز.....
۱۲	۱-۲-۴-۱- انواع کاسپازها.....
۱۲	۲-۱-۲-۴-۱- فعال شدن پروکاسپاز.....
۱۴	۳-۱-۲-۴-۱- فعال شدن با واسطه میتوکندری کاسپازها.....
۱۵	۴-۱-۲-۴-۱- سوبستراهای پایین دست کاسپازها.....
۱۶	۲-۲-۴-۱- خانواده BCL-2 و نقش آن در آپوپتوز.....
۱۶	۱-۲-۲-۴-۱- انواع پروتئین های خانواده Bcl-2.....
۲۰	۱-۱-۲-۲-۴-۱- پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2.....
۲۱	۲-۱-۲-۲-۴-۱- پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-X.....
۲۲	۱-۲-۱-۲-۲-۴-۱- عملکرد IGF-I و پیام رسانی گیرنده IGF-I در آپوپتوز.....
۲۳	۳-۱-۲-۲-۴-۱- پروتئین پیش آپوپتوز Bax.....
۲۳	۴-۱-۲-۲-۴-۱- پروتئین پیش آپوپتوز Bak.....
۲۴	۵-۱-۲-۲-۴-۱- پروتئین پیش آپوپتوز Bad.....
۲۴	۶-۱-۲-۲-۴-۱- پروتئین پیش آپوپتوز Bik.....
۲۵	۲-۲-۲-۴-۱- برهمکنش های پروتئینی در میان اعضای خانواده BCL-2.....
۲۶	۵-۱- نقش p53 در آپوپتوز.....
۲۸	۶-۱- سایر عوامل دخیل در آپوپتوز.....

- ۲۸-۱-۶-۱- نقش پروتئین کینازها در آپوپتوز.....
- ۲۸-۱-۶-۱- فسفاتیدیل ۳-کیناز (PI-3K).....
- ۲۸-۱-۶-۲- پروتئین کیناز C (PKC).....
- ۲۹-۲-۶-۱- نقش کانال های یونی در آپوپتوز.....
- ۳۰-۱-۲-۶-۱- کانال های نفوذپذیر به یون کلسیم روی غشای پلاسمایی.....
- ۳۰-۱-۲-۶-۱- کانال های نفوذپذیر به یون کلسیم روی غشای پلاسمایی.....
- ۳۱-۳-۶-۱- پیام رسانی نورونی یون کلسیم.....
- ۳۲-۴-۶-۱- نقش  $Ca^{2+}$  در بیان ژن های مختلف در سلول های عصبی.....
- ۳۴-۵-۶-۱- پیام دهی  $Ca^{2+}$  و آپوپتوز.....
- ۳۵-۱-۵-۶-۱- کانال های داخل سلولی  $Ca^{2+}$  روی غشای شبکه اندوپلاسمی و میتو کندری.....
- ۳۶-۶-۶-۱- توزیع کلسیم داخل سلولی: بقاء و مرگ سلولی.....
- ۳۷-۷-۶-۱- کنترل انتقال داخل سلولی  $Ca^{2+}$  توسط پروتئین های خانواده Bcl-2.....
- ۳۸-۱-۷-۶-۱- Bcl-2/ Bcl-XL.....
- ۳۸-۲-۷-۶-۱- Bax/Bak.....
- ۳۸-۱-۲-۷-۶-۱- نقش Bax در پیام دهی  $Ca^{2+}$ .....
- ۴۰-۷-۱- اپوئیدها.....
- ۴۱-۸-۱- ساختار اپوئیدی.....
- ۴۲-۹-۱- طبقه بندی اپوئیدها.....
- ۴۴-۱۰-۱- مکانیسم عمل پیوئیدها.....
- ۴۵-۱۱-۱- گیرنده های اپوئیدی.....
- ۴۵-۱۱-۱- انواع G پروتئین ها.....
- ۴۵-۱۱-۲- انواع گیرنده های اپوئیدی.....
- ۴۸-۱۲-۱- تحمل اپوئیدی.....
- ۴۸-۱۳-۱- وابستگی اپوئیدی.....
- ۴۹-۱۴-۱- اثرات حفاظتی و آغاز کنندگی رشد.....
- ۵۰-۱۵-۱- مورفین و مسیر کالمودولین-EGFR.....
- ۵۱-۱۶-۱- اپیات ها و آپوپتوز.....
- ۵۲-۱۶-۱- مرگ سلولی القاء شده توسط مورفین.....
- ۵۸-۱۸-۱- مورفین، پیام دهی  $Ca^{2+}$  و آپوپتوز.....
- ۵۸-اهداف تحقیق.....

## فصل دوم

### مواد و روش ها

- ۶۰..... ۱-۲-۱- مراحل انجام کار به طور خلاصه.....
- ۶۱..... ۲-۲- کشت سلول های رده PC12.....
- ۶۱..... ۱-۲-۲- رده سلولی PC12.....
- ۶۱..... ۲-۲-۲- مراحل کشت سلول های رده PC12.....
- ۶۱..... ۱-۲-۲-۲- تحویل سلول به صورت زنده.....
- ۶۲..... ۱-۱-۲-۲-۲- روش تهیه محیط کشت RPMI 1640.....
- ۶۳..... ۲-۱-۲-۲-۲- آنتی بیوتیک Penicillin G / Streptomycin Sulfate.....
- ۶۳..... ۳-۱-۲-۲-۲- FBS.....
- ۶۳..... ۴-۱-۲-۲-۲- محلول NEAA (۱۰۰X).....
- ۶۳..... ۵-۱-۲-۲-۲- محلول L-Glutamin (۲۰۰ mM) (۱۰۰ X).....
- ۶۴..... ۲-۲-۲-۲- پاساژ و حفظ ذخیره سلولی.....
- ۶۴..... ۱-۲-۲-۲-۲- PBS (بدون  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$ ).....
- ۶۵..... ۲-۲-۲-۲-۲- محلول EDTA ۰/۰۴ / Trypsin/ ۰/۲۵.....
- ۶۵..... ۳-۲-۲-۲-۲- ذخیره سلول ها به صورت منجمد.....
- ۶۵..... ۱-۳-۲-۲-۲- محلول DMSO.....
- ۶۶..... ۳-۲- طرح آزمایش.....
- ۶۶..... ۱-۳-۲- بخش اول.....
- ۶۷..... ۲-۳-۲- بخش دوم.....
- ۶۷..... ۴-۲- تهیه محلول های حاوی غلظت های مختلف خارج سلولی  $Ca^{2+}$ .....
- ۶۸..... ۱-۴-۲- EGTA.....
- ۶۹..... ۵-۲- مورفین سولفات.....
- ۶۹..... ۶-۲- شمارش سلولی.....
- ۷۰..... ۱-۶-۲- محلول تریپان بلو ۰/۴.....
- ۷۰..... ۷-۲- بررسی میزان زنده ماندن سلول ها با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی نوترال رد (NR).....
- ۷۰..... ۱-۷-۲- روش رنگ آمیزی حیاتی نوترال رد (NR).....
- ۷۲..... ۱-۱-۷-۲- محلول نوترال رد ۱۰۰ X.....
- ۷۲..... ۲-۱-۷-۲- محلول نوترال رد ۱X.....
- ۷۳..... ۳-۱-۷-۲- محلول رنگ.....
- ۷۳..... ۸-۲- بررسی مرگ سلولی با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی هسته ای Hoechst/ PI.....
- ۷۴..... ۱-۸-۲- روش رنگ آمیزی هسته ای Hoechst/ PI.....

- ۷۵..... ۲-۸-۱-۱-رنگ بیس بنز آمید (Hoechst 33258)
- ۷۶..... ۲-۸-۱-۲-رنگ پروپیدیوم یدید (PI)
- ۷۶..... ۲-۹-۱- بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 در سلول های رده PC12
- ۷۷..... ۲-۹-۱- استخراج RNA کل از سلول های PC12
- ۷۷..... ۲-۹-۱-۱- محتویات کیت
- ۷۸..... ۲-۹-۱-۲- مراحل انجام کار
- ۸۲..... ۲-۹-۱-۳- بررسی کمی RNA
- ۸۲..... ۲-۹-۱-۴- بررسی کیفی RNA استخراج شده
- ۸۲..... ۲-۹-۱-۴-۱- روش تهیه ژل FA (۱/۲٪ آگارز)
- ۸۳..... ۲-۹-۱-۴-۱-۱- بافر ژل FA (X ۱۰)
- ۸۴..... ۲-۹-۱-۴-۱-۲- بافر ژل FA (X ۱)
- ۸۴..... ۲-۹-۱-۴-۱-۳- محلول ذخیره اتیدیوم برماید
- ۸۴..... ۲-۹-۱-۲- نسخه برداری معکوس (RT)
- ۸۵..... ۲-۹-۱-۲- فعالیت های آنزیمی Reverse Transcriptase
- ۸۶..... ۲-۹-۱-۲-۲- محتویات کیت
- ۸۶..... ۲-۹-۱-۳-۲- مراحل نسخه برداری معکوس
- ۸۷..... ۲-۹-۱-۳- تکثیر رشته cDNA (PCR)
- ۸۸..... ۲-۹-۱-۳- پرایمرها
- ۸۸..... ۲-۹-۱-۳-۱- تایید پرایمرها
- ۸۹..... ۲-۹-۱-۳-۲- آماده سازی پرایمرها جهت انجام PCR
- ۸۹..... ۲-۹-۱-۳-۲- آماده سازی پرایمرها جهت انجام PCR
- ۸۹..... ۲-۹-۱-۳-۲- مراحل تکثیر رشته cDNA
- ۹۰..... ۲-۹-۱-۳-۲- آماده سازی مخلوط dNTP (۱۰mM)
- ۹۱..... ۲-۹-۱-۳-۳- برنامه زمانی و دمایی انجام PCR
- ۹۲..... ۲-۹-۱-۳-۳-۱- یافتن دمای بهینه اتصال پرایمرها به توالی الگو
- ۹۲..... ۲-۹-۱-۳-۳-۲- ژل الکتروفورز محصولات حاصل از PCR
- ۹۳..... ۲-۹-۱-۳-۳-۱- بافر TAE (۱۰x)
- ۹۳..... ۲-۹-۱-۳-۳-۲- بافر TAE (1x)
- ۹۳..... ۲-۹-۱-۴- بررسی کمی بیان رونوشت ژن ها با استفاده از واکنش real-time RT-PCR کمی
- ۹۳..... ۲-۹-۱-۴- Real-Time PCR
- ۹۳..... ۲-۹-۱-۴-۱- تعریف و مفهوم Real-Time
- ۹۴..... ۲-۹-۱-۴-۲- مزایای روش Real-Time PCR

- ۹۶..... Real-Time PCR با سنجش های انواع روش های سنجش با ۳-۱-۴-۹-۲
- ۹۵..... Real-Time PCR اساس تکنیک ۴-۱-۴-۹-۲
- ۹۵..... PCR مختلف نمودار یک واکنش ۱-۴-۱-۴-۹-۲
- ۹۷..... Real-Time واکنش کمی کردن واکنش ۲-۱-۴-۹-۲
- ۹۷..... Ct و Threshold تعیین ۱-۲-۱-۴-۹-۲
- ۹۸..... بررسی منحنی ذوب ۳-۱-۴-۹-۲
- ۹۹..... نرمال کردن ۴-۱-۴-۹-۲
- ۱۰۰..... رسم منحنی استاندارد ۵-۱-۴-۹-۲
- ۱۰۱..... بررسی کمی بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 با استفاده از واکنش real-time PCR کمی.
- ۱۰۲.....
- ۱۰۳..... محتویات کیت ۱-۲-۴-۹-۲
- ۱۰۳..... مراحل انجام کار ۲-۲-۴-۹-۲
- ۱۰۴..... کارایی واکنش تکثیر و محاسبه رسم منحنی استاندارد ۳-۲-۴-۹-۲
- ۱۰۴..... Real-Time PCR آنالیز نتایج ۴-۲-۴-۹-۲

## فصل سوم

### روش های آماری

- ۱-۳-۱- ارزیابی میزان زنده ماندن سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف خارج سلولی یون کلسیم و دوزهای مختلف مورفین ۱۰۸.....
- ۱-۳-۱- میزان زنده ماندن سلول ها در گروه I ۱۰۸.....
- ۲-۱-۳- میزان زنده ماندن سلول ها در گروه های II و III ۱۰۹.....
- ۲-۳-۱- مرگ سلولی در سلول های رده PC12 ۱۱۲.....
- ۱-۲-۳- میزان مرگ سلولی در سلول های گروه I ۱۱۲.....
- ۲-۲-۳- میزان مرگ سلولی در سلول های گروه های II و III ۱۱۳.....
- ۳-۳- بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 در سلول های رده PC12 ۱۱۹.....
- ۱-۳-۳- استخراج RNA کل ۱۱۹.....
- ۱-۱-۳-۳- بررسی کمی RNA کل استخراج شده ۱۱۹.....
- ۲-۱-۳-۳- بررسی کیفی RNA کل استخراج شده ۱۱۹.....
- ۲-۳-۳- تکثیر رشته cDNA (PCR) ۱۲۰.....
- ۱-۲-۳-۳- نتایج حاصل از بررسی بیان ژن های  $\beta$ -*actin* و *bcl-2* در سلول های PC12 توسط RT-PCR ۱۲۱.....
- ۳-۴-۳- بررسی کمی بیان رونوشت ژن ها با استفاده از واکنش real-time RT-PCR کمی ۱۲۲.....



۱۲۲.....	۱-۳-۴-۳- نتایج حاصل از بررسی منحنی ذوب برای هر سه ژن $\beta$ -actin، bax و bcl-2
۱۲۳....	۲-۳-۴-۳- نتایج حاصل از رسم منحنی استاندارد برای هر سه ژن $\beta$ -actin، bax و bcl-2
۱۲۸.....	۴-۴-۳- بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 در سلول های رده PC12
۱۲۸.....	۱-۴-۴-۳- بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 در گروه I سلول های PC12
۱۲۸.....	۲-۴-۴-۳- بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 در گروه II سلول های PC12
۱۳۰.....	۳-۴-۴-۳- مقایسه نسبت بیان رونوشت Bax به Bcl-2 در گروه های I و II سلول رده PC12
PC12 رده های سلول	۱-۳-۴-۴-۳- مقایسه نسبت بیان رونوشت Bax به Bcl-2 در گروه I سلول های رده PC12
۱۳۱.....	.....
۱۳۱.....	۲-۳-۴-۴-۳- مقایسه نسبت بیان رونوشت Bax به Bcl-2 در گروه II سلول های رده PC12
۱۳۱.....	.....PC12

## فصل چهارم

### بحث و نتیجه گیری

۱۳۴.....	۱-۴- بحث
۱۴۵.....	۲-۴- نتیجه گیری و پیشنهادات
۱۴۸.....	منابع

## فهرست شکل ها

صفحه	عنوان
۵.....	شکل ۱-۱. ویژگی های مرگ سلولی آپوپتوزی و نکروزی.....
۷.....	شکل ۱-۲. به عنوان مدلی حاوی اجزای اساسی ماشین مرگ سلولی. آنالوگ های <i>C.elegans</i> .....
۸.....	شکل ۱-۳. سیگنال های مرگ.....
۱۱.....	شکل ۱-۴. دو مسیر اصلی آپوپتوز در سلول های پستانداران.....
۱۳.....	شکل ۱-۵. مکانیسم های فعال شدن کاسپازها.....
۱۵.....	شکل ۱-۶. فعال شدن با واسطه میتوکندری کاسپاز در آپوپتوزوم.....
۱۹.....	شکل ۱-۷. خانواده پروتئین های <b>Bcl-2</b> .....
۲۰.....	شکل ۱-۸. تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم.....
۲۷.....	شکل ۱-۹. شبکه p53. تنظیم بقاء و مرگ سلول.....
۳۱.....	شکل ۱-۱۰. پیام دهی نوروئی $Ca^{2+}$ .....
۳۲.....	شکل ۱-۱۱. مسیرهای متفاوت تنظیم بیان ژن ها توسط یون کلسیم.....
۳۴.....	شکل ۱-۱۲. مسیرهای خارجی و داخلی آپوپتوز.....
۳۵.....	شکل ۱-۱۳. توزیع $Ca^{2+}$ در سلول.....
۳۹.....	شکل ۱-۱۴. همئوستازی $Ca^{2+}$ و تنظیم Bax.....
۴۱.....	شکل ۱-۱۵. ساختار مورفین.....
۴۲.....	شکل ۱-۱۶. ساختمان مولکولی انواع اپیوئیدها.....
۴۳.....	شکل ۱-۱۷. محل گیرنده های اپیوئیدی.....
۴۶.....	شکل ۱-۱۸. ساختار گیرنده های اپیوئیدی.....
۴۹.....	شکل ۱-۱۹. مسیرهای پیام رسانی متفاوت مورفین در سلول ها.....
۵۰.....	شکل ۱-۲۰. میانکنش بین اپیوئیدها و.....
۵۳.....	شکل ۱-۲۱. مکانیسم احتمالی آپوپتوز نوروئی القاء شده توسط اپیوئید.....
۵۶.....	شکل ۱-۲۲. مکانیسم احتمالی برای اثرات آغازکنندگی مرگ و ضد تکثیر مورفین.....
۶۱.....	شکل ۲-۱. رده سلولی PC12.....
۶۹.....	شکل ۲-۲. نحوه شمارش سلولی بر روی لام نئوبار.....
۸۱.....	شکل ۲-۳. مراحل استخراج RNA کل از سلول های PC12.....
۸۵.....	شکل ۲-۴. سنتز cDNA. Quantiscript Reverse Transcriptase در سنتز اولین رشته cDNA.....
۹۷.....	شکل ۲-۵. مراحل مختلف نمودار خام یک واکنش PCR.....

- شکل ۲-۶. منحنی ذوب یک واکنش Real-time PCR ..... ۹۹
- شکل ۲-۷. منحنی استاندارد رسم شده توسط دستگاه REAL-TIME ..... ۱۰۱
- شکل ۳-۱. میزان زنده ماندن سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین ..... ۱۱۱
- شکل ۳-۲. میزان مرگ سلولی آپوپتوزی سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین ..... ۱۱۵
- شکل ۳-۳. میزان مرگ سلولی نکروزی سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین ..... ۱۱۷
- شکل ۳-۴. میزان مرگ سلولی سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین ..... ۱۱۸
- شکل ۳-۵. الکتروفورز ژل آگارز برای نمونه RNA کل تخلیص شده از سلول های PC12 ..... ۱۲۱
- شکل ۳-۶. تائید بیان ژن های  $\beta$ -actin، bax و bcl-2 مورد نظر با استفاده از واکنش RT-PCR ..... ۱۲۲
- شکل ۳-۷. آنالیز منحنی ذوب برای ژن  $\beta$ -actin ..... ۱۲۳
- شکل ۳-۸. منحنی تکثیر ژن  $\beta$ -actin ..... ۱۲۴
- شکل ۳-۹. نمودار منحنی استاندارد ژن  $\beta$ -actin ..... ۱۲۴
- شکل ۳-۱۰. آنالیز منحنی ذوب برای ژن bax ..... ۱۲۵
- شکل ۳-۱۱. نمودار منحنی تکثیر ژن bax ..... ۱۲۵
- شکل ۳-۱۲. نمودار منحنی استاندارد ژن bax ..... ۱۲۶
- شکل ۳-۱۳. آنالیز منحنی ذوب برای ژن bcl-2 ..... ۱۲۶
- شکل ۳-۱۴. نمودارهای منحنی تکثیر ژن bcl-2 ..... ۱۲۷
- شکل ۳-۱۵. نمودار منحنی استاندارد ژن bcl-2 ..... ۱۲۷
- شکل ۳-۱۶. بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین ..... ۱۳۰
- شکل ۳-۱۷. شکل ۳-۱۷. نسبت بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین در زمان ۲۴ ساعت ..... ۱۳۲

## فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱. کاسپازهایمی که در آپوپتوز در پستانداران دخیل هستند.....	۱۲
جدول ۱-۲. خانواده پروتئین های BCL-2 در موجودات مختلف.....	۱۸
جدول ۱-۲. غلظت EGTA و یون کلسیم محیط کشت.....	۶۸
جدول ۲-۲. ویژگی های پرایمرهای به کار برده شده .....	۸۸
جدول ۱-۳. میزان زنده ماندن سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین.....	۱۱۰
جدول ۲-۳. میزان مرگ سلولی آپوپتوزی سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین.....	۱۱۴
جدول ۳-۳. میزان مرگ سلولی نکروزی سلول های رده PC12 در حضور غلظت های مختلف یون کلسیم خارج سلولی به تنهایی و همراه با مورفین.....	۱۱۶
جدول ۳-۴. بیان رونوشت های Bax و Bcl-2 در گروه کنترل و آزمون در زمان ۲۴ ساعت.....	۱۲۹
جدول ۳-۵. نسبت بیان رونوشت Bax به Bcl-2 در گروه کنترل و آزمون در زمان ۲۴ ساعت.....	۱۳۱

## مخفف ها

AIDS: Autoimmuno Deficiency Syndrome

AIF: Apoptosis Inducing Factor

Apaf -1: Fas Associated Death Domain

Ask: Apoptosis Signal-Regulating Kinase

Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer

BCL-2: B-cell CLL/Lymphoma

BH: BCL-2 Homology Domain

CAD: Caspase-activated DNAase

CaM: Calmoduline /Ca<sup>2+</sup>

CaM kinase: Ca<sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Protein Kinase

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate

Caspase: Cystein Aspartic Acid Proteases

CD95L: CD95 Ligand

CHO: Chines Hamster Ovary

CREB: cAMP-responsive element binding protein

DIABLO: Direct IAP Binding Protein with Low pI

DISC: Death Inducing Signaling Complex

DOR: Delta Opioid Receptors

ERK: Extracellular-signal-regulated kinase

FADD: Apoptotic Protease-Activating Factor-1

FBS: Fetal Bovine Serum

GPCR: G-protein coupled receptor

GRK: G-protein coupled receptor Kinase

IAP: Inhibitors of Apoptosis Proteins

ICAD: Inhibitor of Caspase-Activated DNAase

IGFBP: Insulin-Like Growth Factor Binding Protein

IGF-I: Insulin-Like Growth Factor-I

IMM: Inner Mitochondrial Membrane

IMS: Mitochondrial Intermembrane Space

InsP<sub>3</sub>Rs: Inositol 1,4,5-triphosphate Receptors

JNK: C-Jun N-terminal Kinase

KOR: Kappa Opioid Receptors

MAP: Mitogen-activated protein

MMP: Matrix Metaloproteinases

MOR: Mu Opioid Receptors

NMDAR: N- Metye D-Aspartate Receptors

OMM: Outer Mitochondrial Membrane

PARPI : Poly(ADP-ribose) Polymerase I

PC12: Pheochromocytoma

PCD: Programmed Cell Death

PI: Propidium Iodide

PI3-K: Phosphoinositide 3-Kinase

PI-PLC: Phosphoinositide-Specific Phospholipases

PKA: cAMP-dependent protein kinase

PKB: Protein Kinase B

PKC: Protein kinase C

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog

ROS: Reactive Oxygen Species

RYRs: Ryanodine Receptors

Smac: Second Mitochondria- Derived Activator of Caspases

TM : Transmembrane Domain

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor

TUNEL: Terminal Uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling  
Phosphate Buffer Slain

# فصل اول

مقدمه



## ۱-۱- مرگ سلولی<sup>۱</sup>

مرگ سلولی نتیجه نهایی آسیب سلول و یکی از وخیم‌ترین رویدادها در روند آسیب هر بافت یا عضو است. این حالت در نتیجه عواملی چون ایسکمی<sup>۲</sup> (فقدان جریان خون)، عفونت، استرس، سموم و واکنش‌های ایمنی به وجود می‌آید. به علاوه، مرگ سلولی، جزء اساسی و طبیعی در رویان زایی، شکل‌گیری اعضا و حفظ هموستازی است (Sadoul *et al.*, 1994).

از نظر بیوشیمیایی و مورفولوژیکی دو شکل اساسی مرگ سلولی شامل آپوپتوز<sup>۳</sup> و نکروز<sup>۴</sup>، معرفی شده است (Lockshin *et al.*, 2001). از اواسط قرن نوزدهم بسیاری از مطالعات نشان دادند که مرگ سلولی نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی موجودات چند سلولی مانند جنین زایی و دگرذیسی ایفا می‌نماید (Gluecksmann *et al.*, 1951). واژه مرگ سلولی برنامه ریزی شده (PCD)<sup>۵</sup> در سال ۱۹۶۴ ارائه شد و پیشنهاد می‌کند که مرگ سلولی طی تکوین، تصادفی نبوده و مجموعه‌ای از مراحل کنترل شده را شامل می‌شود که منجر به نوعی خودکشی سلولی<sup>۶</sup> می‌گردد (Lockshin *et al.*, 1964).

## ۱-۲- مرگ سلولی آپوپتوزی

در سال ۱۹۷۲، Kerr، Wyllie و Currie، واژه آپوپتوز را به منظور شرح فرآیندهای فیزیولوژیکی که منجر به خودکشی کنترل شده سلولی می‌گردند و شکل متفاوتی از مرگ سلولی هستند را مورد استفاده قرار دادند (Kerr *et al.*, 1972).

---

<sup>1</sup>. Cell Death

<sup>2</sup>. Ischemia

<sup>3</sup>. Apoptosis

<sup>4</sup>. Necrosis

<sup>5</sup>. Programmed Cell Death ؛ ( PCD)

<sup>6</sup>. Cell Suicide

آپوتوز، واژه ای یونانی به معنای افتادن یا سقوط کردن، مانند افتادن برگ از درختان یا افتادن گلبرگ ها از گل ها است. این تشابه بر این نکته تاکید می نماید که مرگ ماده زنده، بخشی ضروری در چرخه زندگی موجودات است. حالت آپوتوزی مرگ سلولی، فرآیندی فعال و مشخص است که تحت شرایط فیزیولوژیکی و آسیب زا در تکامل موجودات پرسلولی در تنظیم و بقای جمعیت های سلولی بافت ها نقش مهمی را ایفا می نماید (Leist *et al.*, 2001).

### ۱-۳- ویژگی های مرگ سلولی آپوتوزی

آپوتوز، مرگ سلولی تنظیم شده، فرآیند پیچیده ای است. تصمیم برای مردن نمی تواند به سادگی اتخاذ شود و بسیاری از ژن ها، با ایفای نقش در برنامه خودکشی سلولی، سرنوشت سلول را تحت تاثیر قرار می دهند. موجودات چند سلولی، اغلب نیاز به حذف نمودن سلول های اضافی دارند و به منظور دست یابی به این هدف، از یک برنامه مولکولی سازمان یافته شده بهره می برند. مرگ سلولی تنظیم شده مشابه تقسیم و مهاجرت سلولی، به موجود اجازه می دهد که تعداد سلول ها و اندازه بافت را به شدت تنظیم نموده و هموستازی را حفظ نماید (Hengartner 2000).

در بدن انسان در هر ثانیه ۱۰۰۰۰۰ سلول از طریق میتوز تولید می شوند و تعداد مشابهی از طریق آپوتوز می میرن (Vaux *et al.*, 1988). کاهش میزان آپوتوز می تواند منجر به سرطان، بیماری های خود ایمنی و گسترش عفونت های ویروسی گردد، در حالی که افزایش میزان آپوتوز اختلالات تخریب کننده نورونی، نقص اکتسابی سیستم ایمنی (AIDS)<sup>۱</sup> و ایسکمی را سبب می گردد (Fadeel *et al.*, 1999). در حال حاضر، آپوتوز در سه سطح مورفولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی بررسی می شود.

---

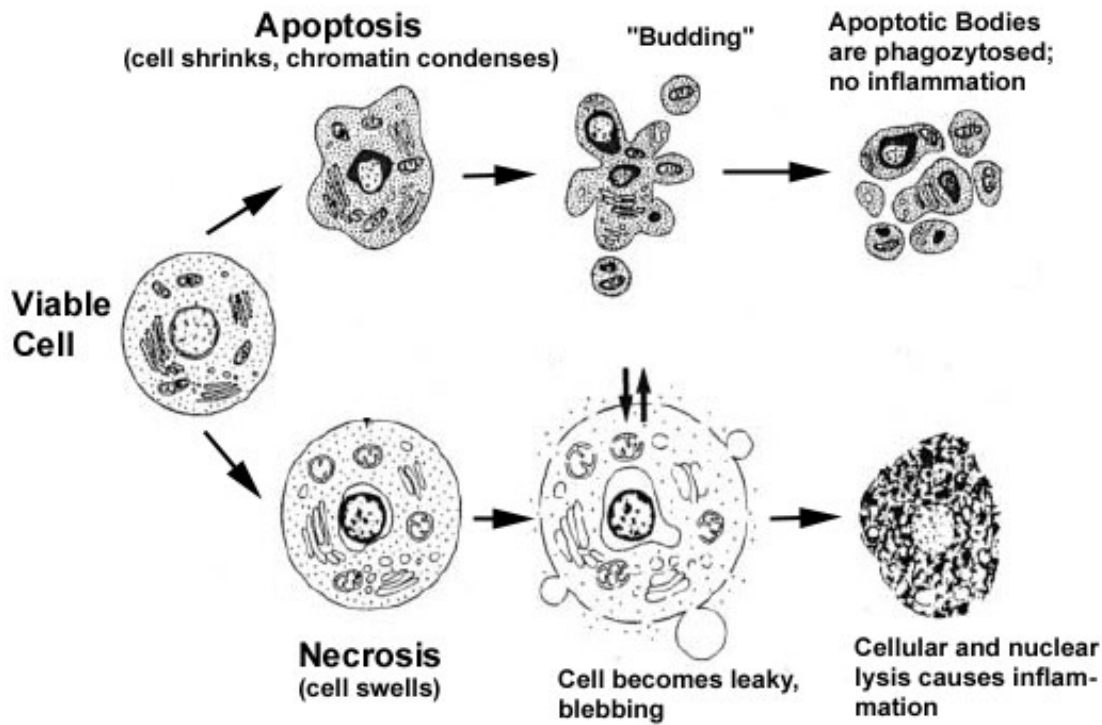
<sup>۱</sup>. Autoimmuno Deficiency Syndrome ؛ (AIDS)

### ۱-۳-۱- ویژگی های مورفولوژیکی آپوپتوز

مرگ سلولی آپوپتوزی، شامل سه مرحله آغاز<sup>۱</sup>، اجرا<sup>۲</sup> و خاتمه<sup>۳</sup> است. طی مراحل مختلف آپوپتوز، تغییرات مورفولوژیکی متعددی روی می‌دهد. در مرحله آغاز آپوپتوز، سلول چروکیده می‌شود که نشان دهنده از دست رفتن تماس سلول با سلول های همسایه و در نتیجه از دست رفتن شکل سلول است. در این مرحله، سیتوپلاسم و اندامک ها متراکم شده و سلول ها از نظر اندازه کوچکتر می‌شوند و پیکنوز<sup>۴</sup> که نتیجه متراکم شدن میتوکنندری و ویژگی مشخص آپوپتوز است توسط میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است. طی مرحله اجرا، جابه جایی فسفولیپیدهای غشاء و قرارگیری فسفاتیدیل سرین در رویه خارجی آن، قطعه قطعه شدن هسته<sup>۵</sup>، متراکم شدن کروماتین<sup>۶</sup> و تجزیه DNA<sup>۷</sup> روی می‌دهد. این مرحله با حباب دار شدن<sup>۸</sup> غشای پلاسمایی و جدا شدن قطعات سلولی به شکل اجسام آپوپتوزی<sup>۹</sup> طی فرآیندی تحت نام جوانه زدن<sup>۱۰</sup> رخ می‌دهد. اجسام آپوپتوزی، شامل سیتوپلاسم، اندامک های کاملاً<sup>۱۱</sup> فشرده شده با یا بدون قطعات هسته ای هستند (Saraste et al., 2000).

سلول های آپوپتوزی محتویات خود را در محیط اطراف رها نمی‌کنند. در ابتدای مرحله خاتمه، اجسام آپوپتوزی توسط ماکروفاژها دربر گرفته می‌شوند و بدون بروز پاسخ های التهابی، از بافت حذف می‌گردند (Leist et al., 2001). از این رو، آپوپتوز در تضاد با حالت نکروز<sup>۱۱</sup>ی مرگ سلولی قرار می‌گیرد. نکروز نوعی مرگ سلولی است که منجر به از هم گسیختگی غشاء، تورم و گسیختگی سلول ها می‌گردد. طی نکروز، محتویات سلولی به شکل کنترل نشده ای به محیط اطراف سلول آزاد می‌شوند که این امر منجر به آسیب سلول های مجاور و بروز پاسخ های التهابی شدید در بافت مربوطه می‌گردد (Saraste et al., 2000) (شکل ۱-۱).

1. Initiation
2. Progression
3. Termination
4. Pyknosis
5. Nuclear Fragmentation
6. Chromatin Condensation
7. DNA Degredation
8. Blebbing
9. Apoptotic Bodies
10. Budding
11. Necrosis



شکل ۱-۱. ویژگی های مرگ سلولی آپوپتوزی و نکروزی (Van Cruchten *et al.*, 2002).

بسیاری از محرک های آسیب زا مانند گرما، پرتوها، کمبود اکسیژن و داروهای سیتوتوکسیک ضد سرطان در مقادیر کم آپوپتوز را القاء می کنند، اما همان محرک ها در مقادیر بالاتر می توانند منجر به بروز نکروز گردند (Zeiss *et al.*, 2003).

تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوز، ناشی از رویدادهای مولکولی و بیوشیمیایی مختلف به دنبال فعال شدن آنزیم های پروتئولیتیک در یک سلول آپوپتوزی هستند. فعال شدن این آنزیم ها، منجر به شکسته شدن DNA به قطعات الیگونوکلئوتیدی و سوبستراهای پروتئینی ویژه ای که به طور معمول در حفظ یکپارچگی سیتوپلاسم درگیر هستند، می گردد (Leist *et al.*, 2001).

### ۱-۳-۲- ویژگی های بیوشیمیایی آپوپتوز

مرگ سلولی برنامه ریزی شده به مسیرهای بیوشیمیایی درون سلولی به شدت کنترل شده ای ارجاع داده می شود که منجر به بروز ویژگی های مورفولوژیکی می گردند. این تغییرات مورفولوژیکی وابسته به مسیرهای