دانشکده علوم طبیعی

گروه زیست شناسی جانوری

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (MSc) در رشته ژنتیک

عنوان

مطالعه‌ی بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی ΔEx3 و 2B آن به عنوان مارکر مولکولی جدید در سرطان پستان

استاد راهنما

دکتر محمدعلی حسینپورفیضی

استاد مشاور

اسماعیل بابائی

پژوهشگر

سولماز منیری‌جوادحصاری

شهریور ۱۳۸۷

تقدیم به:

مادر عزیزم

که با مهربانی و گذشت مقدس ترین واژه ی زندگیم را معنا نمود.

و

روان پاک پدر بزرگوارم

اولین و بهترین معلم زندگانیم

تقدیم به:

برادر و خواهران عزیزم

به پاس عاطفه‌ی سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان

الهی ای که بخشنده عطایی و ای حکیمی که پوشنده خطایی و ای احدی که در ذات و صفات بی همتایی و ای خالقی که رهنمایی و ای قادری که خدایی را سزایی. جان ما را صفای خود ده، دل ما

را هوای خود ده، چشم ما را ضیاء خود ده و ما را آن ده که آن به.

الهی دلی ده که در کار تو جان بازیم و جانی ده که کار جهانی سازیم!

الهی دانایی ده که در راه نیفتیم و بینایی ده که در چاه نیفتیم.

عمیق ترین سپاس ها بر آنانکه کاستی ها را هنرمندانه بیاکاهند و لغزش ها را صمیمانه درگذشتند:

وظیفه ی شاگردی خود می دانم تا مراتب سپاس و قدردانی خویش را با خلوص و صمیمیت هرچه تمام تر به محضر استاد فرزانه جناب آقای دکتر محمد علی حسینپور فیضی تقدیم دارم که همچون

پدری مهربان و کوهی استوار، با سعه ی صدر در تمام مراحل این پایان نامه پشتیبان من بودند و مرا از راهنمایی های ارزنده شان در عرصه ی علم و اخلاق بهره مند نمودند.

از استاد مشاور پایان نامه جناب آقای اسماعیل بابایی که در امر انجام و تدوین این پایان نامه از هیچ مساعدتی فروگذار ننمودند بی نهایت متشکرم و برای تمام آنچه از ایشان آموختم

سپاسگزارم.

از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر وحید منظری که با گشاده دستی و بدون چشم داشت در امر تهیه ی نمونه های مورد مطالعه ما را یاری و زحمت داوری رساله حاضر را قبول فرمودند کمال

تشکر را می نمایم. از معاونت تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر مؤذن تشکر می نمایم.

خداوند متعال را شاکرم که نعمت درک محضر اساتید عالیقدر آقایان پرفسور خسروشاهلی، دکتر ولیزاده، امین بخش، جاربور بنیادی، شیخ زاده، موسوی، زرینی و سرکار خانم دکتر مریم شجاعی و سایر اساتید دوره ی کارشناسی را نصیبم فرمود تا از محضرشان بهره مند گردم، مراتب سپاس و قدردانی خود را تقدیم ایشان می کنم.

از همراهی همیشگی و دوستی خالصانه سرکار خانم فاطمه خدایی که در تمام مراحل این پایان نامه در کنار من بودند تشکر می نمایم.

از همراهی و مساعدت اساتید و دوستان عزیزم در آزمایشگاه رادیوبیولوژی خانم ها مهندس آذرفام، خانی، آئین، نیکخواه، زینال زاده، کیانی، وندقانونی، خورشیدی، ساعد، نیک نیازی، سید طراح، سعادت فر، علیپور، حکمت شمار و آقایان مهندس پولادی، حقی، عمرانی و احمدی بی نهایت متشکرم.

و تمامی دوستان عزیزم در خوابگاه که همواره و قدمی از دوستان و هم کلاسی های عزیزم خانم ها بارگاهی و ولایی و آقایان کریمی و جلالی، هم اتاقی های بی نظیرم خانم ها قربانپور، نگین تاجی در لحظات شادی و غم در کنار هم بودیم و بهترین و شیرین ترین خاطراتمان با هم رقم خورد، کمال تشکر را می نمایم.

در پایان از دانشجویان ورودی ۸۴ و ۸۵ ژنتیک، جناب آقای اکبرپور، جناب آقای عابد، کارمندان کتابخانه، آموزش، امور دانشجویی و خدمات دانشکده تشکر می نمایم.

و بوسه می زنم بر دستان خداوندگاران مهر و مهربانی، پدر و مادر عزیزم و بعد از خدا ستایش می کنم وجود مقدسشان را و تشکر می نمایم از سایر اعضای خانواده ام برادر و خواهران عزیزم به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان من بودند.

نام خانوادگی دانشجو: منیری جوادحصاری نام: سولماز

عنوان پایان نامه: مطالعه‌ی بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی ΔEx3 و 2B آن به عنوان مارکر مولکولی جدید در سرطان پستان

استاد راهنما: دکتر محمدعلی حسینپور فیضی

استاد مشاور: اسماعیل بابائی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته: زیست شناسی گرایش: ژنتیک دانشگاه: تبریز

دانشکده: علوم طبیعی تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۸ شهریور ۱۳۸۷ تعداد صفحه: ۱۳۳

واژه های کلیدی: سرطان پستان، Survivin، واریانت‌های پیرایشی، RT-PCR نیمه‌کمی، مارکر مولکولی

چکیده

Survivin عضو جدیدی از خانواده‌ی پروتئین‌های مهارکننده‌ی آپوپتوز(IAP) می‌باشد که نقش مهمی را در تنظیم چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز ایفا می‌کند. بیان متمایز این ژن در سلول‌های توموری بر خلاف سلول‌های نرمال آن را به عنوان چهارمین ترانس کریپتوم بیان شونده در تومورها معرفی کرده است که مورد توجه بسیاری از تحقیقات مربوط به سرطان می‌باشد. سرطان پستان، شایع‌ترین بدخیمی و دومین عامل پیشروی مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان می‌باشد. بدلیل شیوع روزافزون تومورهای پستان در سالهای اخیر و کمبود مارکر های مولکولی مناسب جهت تشخیص سریع و پیش‌آگهی آنها، تلاش‌های گسترده ای در راستای شناسایی مارکرهای مولکولی اختصاصی که بتواند غده‌های توموری را از انواع غیرتوموری متمایز سازد آغاز شده است.

در این تحقیق صلاحیت بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی ΔEx3 و 2B آن به عنوان مارکر مولکولی در سرطان

پستان مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مجموع ۳۵ نمونه‌ی توموری و ۱۷ نمونه‌ی نرمال مربوط به حاشیه‌ی تومـور بـا استفاده از تکنیک RT-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند و ژن ß2m بعنوان کنترل داخلی بکار رفت. با استفاده از نرم‌افـزار SPSS و تست‌های آماری One-Way ANOVA و Mann-Whitney U، نتایج بدست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان دادند که: ۱) ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در اکثر نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های حاشیه‌ی تومور بیان مجدد دارند. ۲) سطوح بیان ژن(بجز واریانت ۲B) بطور معنـی‌داری($p< ۰/۰۵$) با ماهیت توموری نمونه‌ها در ارتباط است. ۳) بیان واریانت ۲B در تعداد کمی از نمونه‌ها مـشاهده شـد. ٤) واریانـت پیرایشی ΔEx3 در اکثریت نمونه‌های توموری بدخیم بیان یافته و به عنوان واریانت غالب در سرطان پستان معرفی می-شود. ٥) بیشترین میزان بیان Survivin در تومورهای خوش‌خیم و بیشترین میزان بیان Survivin-ΔEx3 در تومورهـای بدخیم می‌باشد. ٦) بیان Survivin با مراحل اولیه‌ی تومورها و Survivin-ΔEx3 با مراحل پیـشرفته‌ی تومـوری ارتبـاط دارد. همچنین علاوه بر واریانت‌های مورد بررسی بیان واریانت ۳B نیز در این تحقیق در تومورهای پستان آشـکار شـده و ارتباط معنی‌داری با ماهیت توموری و خصوصاً با تومورهـای بـدخیم نـشان داد. در مجمـوع نتـایج مـا ضـمن تاییـد شایستگی ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن به عنوان مارکرهای مولکولی در سرطان پستان، نقش کلیدی این ژن و واریانت‌های مذکور بویژه ΔEx3 و ۳B را در بروز تومورهای پستان نشان داده و تفکیک ناحیه‌ی توموری از حاشیه‌ی تومور را امکان‌پذیر می‌سازد. همچنین نشان می‌دهد کـه Survivin و واریانـت‌هـای پیرایـشی ΔEx3 و ۳B آن ویـژه‌ی سلول‌های سرطانی بوده و می‌توانند به عنوان مارکرهای مولکولی در تـشخیص تومورهـای پـستان مـورد اسـتفاده قـرار گیرند.

Surname: Moniri javadhesari Name: Solmaz

Thesis title: Evaluating the expression of survivin an its splice variants; ΔEx3 and 2B as new molecular markers in breast cancer

Supervisors: Dr. M.A. Hosseinpour Feizi
Advisore: E. Babaei

Degree: M.Sc Major: Biology Field: Genetics
University: Tabriz university Faculty: Natural Science Graduation date: 9 / 2008
Pages: 133

Key words: Breast cancer, Survivin, Splice variants, Semiquantitative RT-PCR, Molecular marker

Abstract

Survivin is a new member of the Inhibitor of Apotosis Protein family(IAP) wich plays an important role in the regulation of both cell cycle and apoptosis. Distinct expression of survivin in tumoral cells versus normal adult cells introduces this gene as fourth expressed transcriptom in tumors. Breast cancer is the most common malignancy among women and the second leading cause of cancer death. Scientist`s effort to classify its subtypes has lead to various molecular subgroups and controversial results. Because of the lack of suitable molecular markers for diagnosis and prognosis of breast carcinomas, the aim of this study was to evaluate the potential usefulness of *Survivin* and its splice variants; ΔEx3 and 2B as potential molecular markers in breast cancer. In current study, 35 tumoral and 17 non tumoral adjacent tissues were evaluated in this research. Transcription levels were measured by Semiquantitative Reverse Transciptase-Polymerase Chain Reaction and normalized by the *ß2m* as an endogenous PCR control. Statistical analysis were performed using SPSS software and One-Way ANOVA and Mann-Whitney U tests. The results showed that: 1) Survivin and its splice variants are differentially expressed in tumors rather than adjacent normal tissues. 2) The expression levels of Survivin and Survivin-ΔEx_3 were significantly ($p<0.05$) correlated with tumors. 3) Survivin-2B was expressed in a few samples. 4) Survivin-ΔEx_3 was detected in most of the tumoral tissues and introduced as dominant expressed variant in breast tumors. 5) The highest expression level of Survivin was in benign tumors versus Survivin-ΔEx3 in malignant tumors. 6) The expression of Survivin was correlated with the early stages of tumors as

well as Survivin ΔEx3 with advanced stages of breast tumors. Also the expression of Survivin-3B was detected in our results and showed a correlation with malignant nature of specimens. In conclusion, our data indicated that the expression of Survivin, Survivin ΔEx3 and specially Survivin-3B were correlated with tumors. Therefore, evaluating Survivin gene expression and its new splice variants might be used as markers to stratify breast cancer patients for more optimal treatment modalities as well as a promising new target for therapy.

مقدمه

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- مرگ سلولی ۱

۱-۱-۱- تاریخچه ۱

۱-۱-۲- انواع مرگ سلولی از نظر مورفولوژیکی ۲

۱-۱-۲-۱- آپوپتوز ۲

۱-۱-۲-۲- نکروز ٤

۱-۱-۲-۳- مرگ سلولی به طریق خودخواری ٥

۱-۱-۲-۳-۱- مسیر خودخواری ٦

۱-۱-۳- مکانیسم‌های سلولی و مولکولی آپوپتوز ۷

۱-۱-۳-۱- ویژگی مولکولی کاسپازها ۷

۱-۱-۳-۱-۱- فعال شدن کاسپازها ۹

۱-۱-۳-۲- مسیر خارجی یا مسیر گیرنده‌های مرگ ۱۰

۱-۱-۳-۳- مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی ۱۱

۱-۱-۳-٤- پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl-2 و نقش آنها در آپوپتوز ۱۲

۱-۱-۳-٥- تنظیم پروتئین‌های آپوپتوتیک ۱٤

۱-۱-۳-٥-۱-p53 ۱٤

۱-۱-۳-٥-۲- NFkB ۱٥

۱-۱-۳-٥-۳- سیستم یوبی‌کوئیتین/ پروتئازوم ۱٥

۱-۱-۳-٥-٤- PI3K ۱٦

۱-۱-۳-٦- مهارکنندگان آپوپتوز(IAPs) ۱۷

۱-۱-٤- آپوپتوز و سرطان ۱۹

۱-۲- Survivin ۲۱

۱-۲-۱- کشف Survivin ۲۱

۱-۲-۲- ساختار و سازمان یابی مولکول Survivin ۲۱

۱-۲-۳- مکانیسم عمل Survivin ۲۲

۱-۲-۳-۱- Survivin وکنترل آپوپتوز ۲۳

۱-۲-۳-۲- Survivin و چرخه‌ی سلولی ۲٤

۱-۲-٤- تنظیم بیان ژن Survivin ۲۵

۱-۲-۵- واریانت‌های پیرایشی Survivin ۲٦

۱-۲-٦- Survivin و سرطان ۳۰

۱-۲-٦-۱- مکانیسم‌های بیش بیان Survivin در سرطان ۳۰

۱-۲-٦-۲- نقش Survivin در تهاجم و متاستاز تومورها ۳۱

۱-۲-٦-۳- بیان واریانت‌های پیرایشی 2B و ΔEx_3 در سرطان ۳۲

۱-۲-٦-٤- Survivin به عنوان یک تومورمارکر در تشخیص و پیش‌آگهی سرطان ۳۲

۱-۲-٦-۵- Survivin و درمان سرطان ۳٤

۱-۲-۷- استفاده از Survivin به عنوان یک تومور مارکر مولکولی در سرطان پستان ۳۵

۱-۳- آشکارسازی تومورهای پستان با استفاده از Survivin ۳٦

۱-۳-۱- پستان و بیماری‌های مربوط به آن ۳٦

۱-۳-۲- سیر طبیعی ۳۸

۱-۳-۳- اختلالات التهابی و عفونی پستان ۳۹

۱-۳-٤- تقسیم بندی پاتولوژیک ٤۰

۱-۳-٤-۱- اختلالات و بیماری‌های خوش‌خیم شایع پستان ٤۰

۱-۳-٤-۲- تومورهای بدخیم و طبقه‌بندی نشده ٤٤

۱-۳-۵- فاکتورهای ریسک ٤٥

۱-۳-٦- مشکلات تشخیصی سرطان پستان ٤٩

۱-۳-٦-۱- روش‌های تشخیصی عمده در سرطان پستان ٤٩

۱-۳-۷- تومور مارکرها و نقش آنها ٥٠

۱-۳-۷-۱- بیومارکرهای سرطان پستان ٥٢

۱-۳- طرحی کلی از روش‌های انجام شده و اهمیت آنها ٥٤

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- نمونه‌گیری از انسان ٥٦

۲-۲- بررسی بیان Survivin در سطح RNA ٥٦

۲-۲-۱- استخراج RNAی کل از بافت ٥٦

۲-۲-۲- بررسی کمی و کیفی RNAی استخراج شده ٥٩

۲-۲-۲-۱- اسپکتروفتومتری UV ٥٩

۲-۲-۲-۲- الکتروفورز ژل آگارز ٦٠

۲-۲-۲-۲-۱- محلول EDTA (pH=۸ و ۰/٥M) ٦١

۲-۲-۲-۲-۲- بافر الکتروفورز TBE (۱۰X) ٦٢

۲-۲-۲-۲-۳- محلول اتیدیوم برماید (۱۰ mg/ml) ٦٢

۲-۲-۲-۲-٤- بافر سنگین کننده مخصوص RNA ٦٣

۲-۲-۲-۲-٥- بافر سنگین کننده (type III-٦X) مخصوص DNA ٦٣

۲-۳-تیمار با آنزیم Dnase I ٦٥

۲-٤- واکنش رونویسی معکوس ٦٦

۲-٥- واکنش PCR ٦٧

۲-۵-۱- طراحی پرایمر ٦٧

۲-۵-۲- آماده سازی پرایمرهای PCR ۷۰

۲-۵-۳- واکنش PCR ۷۰

۲-۵-٤- عکسبرداری از ژل آگارز ۷۲

۲-۵-۵- بهینه سازی تعداد سیکل PCR ۷۳

۲-٦- بررسی بیان ژن به صورت نیمه کمی ۷۳

۲-۷- آنالیز آماری ۷٤

۲-۸- تعیین توالی محصولات PCR ۷٤

۲-۸-۱- استخراج DNA از ژل آگارز ۷٤

۲-۸-۲- تعیین توالی DNA استخراج شده ۷٤

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- نتایج ۷۵

۳-۱-۱- توصیف نمونه های انسانی ۸۳

۳-۱-۲- تعیین کیفیت و کمیت RNAی استخراج شده ۸۵

۳-۱-۳- تعیین تعداد سیکل مناسب PCR ۸۳

۳-۱-٤- بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در نمونه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور بافت پستان ۸۷

۳-۱-۵- آنالیز آماری بیان ژن Survivin و واریانت ΔEx3 در گروه‌های مختلف ۹٦

۳-۱-٦- نتایج تعیین توالی محصولات PCR ۱۰٤

۳-۲- بحث ۱۰۷

۳-۲-۱- اهمیت مطالعه‌ی سرطان پستان و انتخاب Survivin ۱۰۷
۳-۲-۲- تفسیر نتایج حاصله و اهمیت آنها ۱۱۱
۳-۳- نتیجه‌گیری ۱۲۲
۳-٤- پیشنهادها ۱۲٤
فهرست منابع ۱۲۵
ضمائم
چکیده‌ی انگلیسی

فهرست جداول و نمودارها

فصل اول: بررسی منابع

جدول ۱-۱- مهمترین فاکتورهای ریسک سرطان پستان ٤۸

فصل سوم: نتایج و بحث

جدول ۳-۱- مشخصات و ویژگی‌های پاتولوژیکی بیمارانی که از آنها نمونه‌های توموری بدخیم جمع‌آوری شده است ۷۷
جدول ۳-۲- مشخصات و ویژگی‌های پاتولوژیکی بیمارانی که از آنها نمونه‌های توموری خوش‌خیم جمع‌آوری شده است. ۸۲
نمودار ۳-۱- مقایسه‌ی درصد بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در گروه‌های توموری (Tumoral) و حاشیه‌ی تومور (Margin) ۹۰
نمودار ۳-۲- مقایسه‌ی درصد بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در گروه‌های توموری خوش‌خیم (Benign)، بدخیم (Malignant) و حاشیه‌ی تومور (Margin) ۹۱

نمودار ۳-۳- مقایسه‌ی درصد بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در گروه‌های توموری مرحله پیشرفته (Advanced stage)، اولیه (Low stage)، تومورهای با درگیری غدد لنفاوی(+LN)، بدون درگیری غدد لنفاوی (-LN) و خوش‌خیم (Benign) ۹۲
نمودار ۳-٤- الف: مقایسه‌ی بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در دو گروه توموری و حاشیه‌ی تومور ۹۸
نمودار ۳-٤- ب: مقایسه‌ی بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در دو گروه توموری و حاشیه-ی تومور ۹۹
نمودار ۳-۵- الف: مقایسه‌ی بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در سه گروه توموری بدخیم، خوش‌خیم و حاشیه‌ی تومور ۱۰۰
نمودار ۳-۵- ب: مقایسه‌ی بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در سه گروه توموری بدخیم، خوش‌خیم و حاشیه‌ی تومور ۱۰۱
نمودار ۳-٦- الف: مقایسه‌ی بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در گروه‌های توموری بدخیم، خوش‌خیم ، حاشیه‌ی تومور، تومورهای مرحله‌ی پیشرفته، مرحله‌ی اولیه، تومورهای با و بدون درگیری غدد لنفاوی ۱۰۲
نمودار ۳-٦- ب: مقایسه‌ی بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در گروه‌های توموری بدخیم، خوش‌خیم ، حاشیه‌ی تومور، تومورهای مرحله‌ی پیشرفته، مرحله‌ی اولیه، تومورهای با و بدون درگیری غدد لنفاوی ۱۰۳

فهرست شکل‌ها

فصل اول: بررسی منابع

شکل ۱-۱- mRNA اولیه‌ی ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن ۲۹

فصل سوم: نتایج و بحث

شکل ۳-۱- مقایسه کیفیت RNAهای استخراجی بر روی ژل آگارز ۸٤
شکل۳-۲- تعیین تعداد سیکل مناسب PCR ۸٦

شکل ۳-۳- الگوی الکتروفورز محصولات PCR ژن Survivin، واریانت‌های پیرایشی آن و β2m در نمونه‌های توموری ۹۳
شکل ۳-٤- الگوی الکتروفورز محصولات PCR ژن Survivin، واریانت‌های پیرایشی آن و β2m در نمونه‌های حاشیه‌ی تومور ۹٤
شکل۳-۵- الگوی باندینگ واریانت Survivin-2B ۹۵
شکل۳-٦- الگوی باندینگ واریانت Survivin-3B ۹۳
شکل ۳-۷ : قسمتی از توالی تعیین شده برای باندهای Survivin و Survivin-ΔEx3 و مقایسه‌ی آنها با توالی گزارش شده برای ژن Survivin نشان داده شده است ۱۰٦

۱-۱- مرگ سلولی

۱-۱-۱- تاریخچه

مرگ سلولی قسمتی از چرخه‌ی تکوین و بلوغ نرمال و جزئی از پاسخ‌های بافت‌های زنده به مواد خارج زیستی[1] (مثل میکروارگانیسم‌ها و مواد شیمیایی) و تغییرات درونی (نظیر التهاب و فرآورده‌های نامناسب خونی) می‌باشد[۱]. در سال‌های اخیر، پیشرفت در زمینه‌ی ژنتیک مولکولی و بیولوژی سلولی همراه با انجام تحقیقات قابل توجه در زمینه‌ی مرگ سلولی بوده است. هر چند که اشاره به مرگ سلولی در متون علمی اولین بار توسط Galen در سال ۲۰۰ میلادی صورت گرفت ولی تحقیقات وسیع درزمینه‌ی مرگ سلولی در سال‌های ۱۸۰۰ و بعد از آن انجام پذیرفت. درسال ۱۸۵۸، Virchow برای اولین بار پدیده‌ی نکروز را به عنوان یک فرایند غیر فعال[2] مرگ سلولی توضیح داد. فلمینگ در سال ۱۸۸۵ به معرفی یک نوع مرگ سلولی پرداخت که درآن سلول‌ها به طور خود به خود متحمل مرگ می‌شدند. او شکسته شدن هسته‌ی سلول‌های اپی‌تلیالی را در جریان این پدیده مشاهده و آن را کروماتولیز[3] نام نهاد. مفهوم خودکشی سلولی نیز برای نخستین بار توسط De Dure در سال ۱۹۵۰ توضیح داده شد تا اینکه Kerr درسال ۱۹۷۱ نوعی از مرگ سلولی درجریان آتروفی کبد را به عنوان کوچک‌شدگی[4] نکروزی مطرح نمود که این عنوان یک سال بعد به آپوپتوز[5] تغییر پیدا کرد[۲].

---

[1]- Xenobiotic
[2]- Passive
[3]- Chromatolysis
[4]- Shrinkage necrosis
[5]- Apoptosis

۱-۱-۲- انواع مرگ سلولی از تظر مورفولوژ یکی

مرگ سلولی تحت شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی توسط الگوهای مورفولوژیکی متنوعی رخ می‌دهد که مکانیسم‌های پیچیده‌ای را برای مرگ سلول پیشنهاد می‌کند. آپوپتوز بدون دخالت اولیه‌ی لیزوزوم‌های درونی بوده و منجر به تشکیل اجسام آپوپتوزی و بیگانه‌خواری این اجسام توسط ماکروفاژهای بافتی می-شود. در مرگ سلول به طریقه‌ی خودخواری، واکوئل‌های خودخواری با منشأ لیزوزومی شکل می‌گیرند. نوع دیگری از مرگ سلول، مرگ تصادفی سلول یا نکروز[1] می‌باشد که غیرفعال بوده و به صورت مستقل از انرژی رخ می‌دهد [۳]. همچنین فرم‌ها ی دیگری از مرگ سلولی شامل پاراپتوزیس[2]، نکروپتوزیس[3] و انکوزیس[4] در سال‌های اخیر توصیف شده‌اند که درباره‌ی تنظیم مولکولی و اهمیت این اشکال مرگ سلولی دانش کمی وجود دارد[٤].

۱-۱-۲-۱- آپوپتوز

آپوپتوز شکل حفاظت شده ای از مرگ سلولی است که فرایندی مهم در سیستم‌های بیولوژیکی مختلف شامل تکوین جنینی، تغییر وتبدیل سلول‌ها و پاسخ ایمنی در مقابل سلول‌های تومورزا یا آلوده با ویروس به شمار می روذ[۵]. البته باید توجه داشت که تمام سلول‌ها در پاسخ به محرک یکسان، الزاماً واکنش مشابهی نشان نمی‌دهند. آپوپتوز یک فرایند هماهنگ و اغلب وابسته به انرژی است که شامل فعال شدن گروهی از سیستئین‌پروتئازها یا کاسپازها بوده و پس از تحریک اولیه توسط آبشار پیچیده‌ای از وقایع به مرگ سلول منجر می‌شود.

---

[1]- Necrosis
[2]- Paraptosis
[3]- Necroptosis
[4]- Oncoptosis

در ابتدای این فرایند، انقباض سلولی[۱] و پیکنوز[۲] مشهود است. با انقباض سلولی، اندازه‌ی سلول‌ها کوچکتر، سیتوپلاسم متراکم و ارگانل‌ها به طور محکم بسته‌بندی می‌شوند. پیکنوز پیامد تراکم کروماتین بوده و ویژگی بارز آپوپتوز می‌باشد. شکستن DNA بوسیله‌ی اندونوکلئازهای وابسته به Ca^{++} و Mg^{++} نیز منجر به قطعات ۱۸۰-۲۰۰ جفت‌بازی DNA می‌شود. آپوپتوز می‌تواند هم سلول‌های منفرد و هم خوشه‌ای از سلول‌ها را در برگیرد. این سلول‌ها در نمای میکروسکوپی به صورت یک توده‌ی گرد یا کروی دیده می‌شوند.

در طی این فرایند غشای پلاسمایی به طور پیوسته جوانه می‌زند که با خرد شدن هسته[۳] و توزیع قطعات سلولی در اجسام آپوپتوتیک[۴] همراه است. اجسام آپوپتوتیک از سیتوپلاسم و ارگانل‌های کاملاً بسته‌بندی شده (با یا بدون قطعات هسته‌ای) تشکیل می‌شوند که تمامیت ارگانل‌ها هنوز دست‌نخورده می‌باشد. این اجسام بوسیله‌ی ماکروفاژها، سلول‌های پارانشیمی یا سلول‌های نئوپلاستی بیگانه‌خواری شده و در درون فاگولیزوزوم‌ها تجزیه می‌شوند. حرکت فسفاتیدیل‌سرین سمت درونی غشا به سطح خارجی سلول در شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک توسط فاگوسیت‌ها نقش دارد. هیچ واکنش التهابی در نتیجه‌ی آپوپتوز و یا برداشته‌شدن سلول‌های آپوپتوتیک بوجود نمی‌آید زیرا: (۱) سلول‌های آپوپتوتیک محتویات خود را به بافت‌های اطراف رها نمی‌کنند؛ (۲) آنها سریعاً بوسیله‌ی سلول‌های اطراف خود بیگانه‌خواری می‌شوند بنابراین از نکروز احتمالی بعدی جلوگیری می‌شود؛ و (۳) سلول‌های فروبرنده[۵] سیتوکین‌های التهابی تولید نمی‌کنند [٦].

---

[1]- Cell shrinkage
[2]- Pyknosis
[3]- Karyorrhexis
[4]- Apoptotic bodies
[5]- Engulfing cells

۱-۱-۲-۲- نکروز

تعیین مرگ یک سلول بوسیله‌ی آپوپتوز یا نکروز، تا حدی به ماهیت سیگنال مرگ، نوع سلول، مرحله‌ی تکوینی بافت و محیط فیزیولوژیکی بستگی دارد. نکروز یک فرایند غیر کنترل شده و غیر فعال (مستقل ازانرژی) می‌باشد که معمولاً دسته‌ی وسیعی از سلول‌ها را متأثر می‌سازد. دو فاکتور که یک فرایند پیشرونده‌ی آپوپتوز را به نکروز تبدیل می‌کنند، کاهش دسترسی به کاسپازها و ATP درون‌سلولی می-باشند. آسیب سلولی نکروزی بوسیله‌ی دو مکانیسم عمده ایجاد می‌شود؛ که در ارتباط با ذخیره‌ی انرژی سلول و آسیب مستقیم به غشاهای سلولی می‌باشند. تغییرات مورفولوژیکی عمده در نکروز شامل تورم سلول[1]، تشکیل واکوئل‌های سیتوپلاسمی، میتوکندری متراکم، متورم و یا متلاشی شده، لیزوزوم‌های باد کرده و نهایتاً فروپاشی غشای پلاسمایی[2] می‌باشند. از دست رفتن تمامیت غشای سلولی، منجر به رها شدن سریع محتویات سیتوپلاسمی سلول (مانند پروتئین هسته‌ای HMGB-1[3]) به محیط، فرستادن سیگنال‌های کموتاکسی و نهایتاً فراخوانده شدن سلول‌های التهابی می‌شود. لازم به ذکر است که پیکنوز و خرد شدن هسته محدود به آپوپتوز نبوده و می‌توانند بخشی از تغییرات سیتومورفولوژیکی همراه با نکروز باشند. بعلاوه گزارش شده است که مرگ نکروزی سلول، احتمال جهش‌های پروتوانکوژنی[4] را افزایش می‌دهد و در شرایط مختلف پاتولوژیکی مانند شوک، ایسکمی و چندین بیماری تحلیل برنده‌ی عصبی دخالت دارد. نکروز به عنوان یک فاکتور عامل پیشرفت تومور نیز درنظر گرفته می‌شود، چون پاسخ‌های التهابی پیوسته و طولانی ارتباط زیادی با پیشرفت رشد تومور، رگ‌زایی و تهاجم دارند [٦و٧].

---

[1]- Cellular swelling
[2]- Disruption of plasma membrane
[3]- High Mobility Group Box 1
[4]- Protooncogenic mutations