بررسی نقش مسیر داخلی آپیپتوز در مرگ سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12

علی محمد شریفی

چکیده
مقدمه: نوروباتی دیابتی، یکی از شایع‌ترین عوارض دیابت است که نورون‌های مختلفی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ناکامی سازوکارهای دیفکت مولکولی سبب ناشی از گلوکز بالای سلول‌های عصبی مشخص نشده است. در مطالعه حاضر، نقش مسیر مرگ سلولی وابسته به میتکندری و کاسپاز 3 و 9 در آپیپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 به عنوان یک رده سلولی عصبی برسی گردید.

روش‌ها: توان حیاتی سلول‌ها و توزیع آنزیم کاسپاز 9، کاسپاز آغازگر در آپیپتوز وابسته به MTT ارزیابی شد. فعالیت آنزیم کاسپاز 9 کاسپاز آغازگر در آپیپتوز وابسته به MTT افزایش یافت. فعالیت آنزیم کاسپاز 9 در سلوک‌های نیازمند به میتکندری 9 در میتکندری‌های نیازمند به یک پیشرفت در افزایش کاسپاز 9 در سلول‌های نیازمند به میتکندری 9 یافت. توان حیاتی سلول‌ها در درصد 20٪ میتکندری 9 می‌باشد.

نتایج گیری: براساس مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که آپیپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 اندام‌های وابسته به فعال حیاتی سلولی میتکندری 9 می‌باشد.

واژگان کلیدی: گلوکز، آپیپتوز، کاسپاز، میتکندری

 references

1- گروه فارامکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشمند فارماکولوژی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران
2- دانشکده دارویی و داروی دانشگاه علوم پزشکی ایران
3- موسسه تحقیقات علوم دارویی و میتکندری دانشگاه ایران

sharifal@yahoo.com

شروع به یادداشت‌نگاری در دنیای بدزن، طرح افزایش احتمال وحدتی و کاهش در عملکرد بدن را در گام‌های مبهم که همراه با خرابی جدی و تهدید کننده حیات بیمار می‌باشد. به‌طور کلی، به‌طور نمایش داده شده است که از ترسخ انسونیت یا تانکرس با دانشت حساسیت بیماری کلینیکی در بدن مختلف رخ داده‌اند که نمودارهای های های مربوط به علائم چنین هنگامی دارد.

روش‌ها

کشت سلول‌های PC12

این سلول‌ها از استیتیو پاسیور نهان تهیه شدند. مواد زیر

<table>
<thead>
<tr>
<th>تیتر</th>
<th>توضیح</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>کشت سلول‌های PC12</td>
<td>این سلول‌ها از استیتیو پاسیور نهان تهیه شدند. مواد مورد نیاز کشت سلول‌های PC12 از شرکت Gibco و میکروپلیمرها از شرکت Greiner خریداری شدند. سلول‌ها Dulbecco's-MODIFIED EAGLE (DMEM) در محیط کشت در مقدار است.</td>
</tr>
</tbody>
</table>
استخراج پروتئین نام سولو
سولو های کنترل و ایمونزیر شده را با استفاده از PBS PBS 1X RIPA (0.1 mg/ml SDS, 0.5% نسبت دی‌اکسی‌کول های 0.5% و 5% یک درصدی گلوکوز) 150000 گردی نموده و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد 3 ساعت طی این جایگاه توسط روش (Bovine serum albumin) BSA [24] و یک رفت.
شیمی و منکران پروتئن. نشان دهنده آپوپتوز در میکروسکوپ تصویری از... 329

SDS-PAGE
کترول و تیمار شده با گلکوز، به روش الکتروفورز شده (37) و پس از اضافه کردن روش
پلاستیکی به روی ورق پلی میلیدن در فلوراید (PVDF) منتقل شد. و پلاستیکی به ترتیب ساختار الکتروفورز عضوی
استفاده شده است. تیز کترول. شد. بایش شناسایی
باندهای مربوط به پروتئین پروپاژازهای 9 و 3 از
آنتی بادی اولی بایل کلون دعیه این پروتئینها استفاده
در (Bio-Rad Mini-Trans Blot) انجام گردید. محل
باندهای پروتئین و راندمان اندازه‌گیری به طریق
پرمعادل را به وسیله HRP detection kit (Roche Applied Science)
راه‌پیمایی مشاهده کرد. به روش ECL
ظاهر گردید. قلم ظاهر
شده، اسکن گردیده و شدت باندهای حاصل با استفاده از
آنالیز دیاتیو متری به صورت کمی بین گردید.

یافته‌ها
تاثیر گلکوز بر حیات سلولی
در این مطالعه، جهت سنجش مراکز سلولی، سلولها در
معرض گلکوز با غلظت 100 mM در 6 ساعت قرار دادند و برای هر کدام از
سالوس نخست گروه کنترل در نظر گرفته شد. طبق نمودار 1
میزان گلکوز در سلول در مربع از MTX 24 ساعت
یافته‌ها نشان دهنده کنترل تیمار است. با گروه کنترل
کشش منغوشی را نشان می‌دهد (50/60 درصد). نشان دادن
گلکوز بر روی سلولهای 12 به صورت 50/60
زمان. افزایش نشان داد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی کاسپاز 3 و 9
فعالیت آنزیمی کاسپازهای 3 و 9 بوسیله روش کالریمتری
اندازه‌گیری شده که بر اساس تخیل‌تامانی توانایی خاص
اسیدهای اورجینال در سیستم توسط کاسپازهای می‌باشد. سوپراسرتا و تئوری‌پذیری آن به ماده رنگی
پارانیترولین (pNA) نشان داده می‌شود. در اثر واکنش
پارانیترولین (pNA) به رنگ سوپراسرتا، از آن جدا می‌شود و میزان رنگ رنگ که خیزه توسط سیستم تشخیصی جذب می‌شود. میزان رنگ
میکرو تولید رنگ در پرکسید رنگ در سیستم شکسته شده سوپراسرتا مانند با فعالیت آنزیمی کاسپاز در
نمودار نورهای نفر است (17) بطور خلاصه، لیزه‌های نام
سلامی در بین اندازه‌گیری کاسپاز 180 الی می‌می‌باشد.

SDS-PAGE
کترول و تیمار شده با گلکوز، به روش الکتروفورز شده (37) و پس از اضافه کردن روش
پلاستیکی به روی ورق پلی میلیدن در فلوراید (PVDF) منتقل شد. و پلاستیکی به ترتیب ساختار الکتروفورز عضوی
استفاده شده است. تیز کترول. شد. بایش شناسایی
باندهای مربوط به پروتئین پروپاژازهای 9 و 3 از
آنتی بادی اولی بایل کلون دعیه این پروتئینها استفاده
در (Bio-Rad Mini-Trans Blot) انجام گردید. محل
باندهای پروتئین و راندمان اندازه‌گیری به طریق
پرمعادل را به وسیله HRP detection kit (Roche Applied Science)
راه‌پیمایی مشاهده کرد. به روش ECL
ظاهر گردید. قلم ظاهر
شده، اسکن گردیده و شدت باندهای حاصل با استفاده از
آنالیز دیاتیو متری به صورت کمی بین گردید.

یافته‌ها
تاثیر گلکوز بر حیات سلولی
در این مطالعه، جهت سنجش مراکز سلولی، سلولها در
معرض گلکوز با غلظت 100 mM در 6 ساعت قرار دادند و برای هر کدام از
سالوس نخست گروه کنترل در نظر گرفته شد. طبق نمودار 1
میزان گلکوز در سلول در مربع از MTX 24 ساعت
یافته‌ها نشان دهنده کنترل تیمار است. با گروه کنترل
کشش منغوشی را نشان می‌دهد (50/60 درصد). نشان دادن
گلکوز بر روی سلولهای 12 به صورت 50/60
زمان. افزایش نشان داد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی کاسپاز 3 و 9
فعالیت آنزیمی کاسپازهای 3 و 9 بوسیله روش کالریمتری
اندازه‌گیری شده که بر اساس تخیل‌تامانی توانایی خاص
اسیدهای اورجینال در سیستم توسط کاسپازهای می‌باشد. سوپراسرتا و تئوری‌پذیری آن به ماده رنگی
پارانیترولین (pNA) نشان داده می‌شود. در اثر واکنش
پارانیترولین (pNA) به رنگ سوپراسرتا، از آن جدا می‌شود و میزان رنگ رنگ که خیزه توسط سیستم تشخیصی جذب می‌شود. میزان رنگ
میکرو تولید رنگ در پرکسید رنگ در پرکسید شکسته شده سیستم شکسته شده سوپراسرتا مانند با فعالیت آنزیمی کاسپاز در
نمودار نورهای نفر است (17) بطور خلاصه، لیزه‌های نام
سلامی در بین اندازه‌گیری کاسپاز 180 الی می‌می‌باشد.
نمودار 1- اثر کلولز (100 mM) بر روی دما نبیان سلول‌های PC12 بعد از 24، 48، 72 و 96 ساعت تیمار کردن.

تأثیر کلولز بر روی فعالیت آنزیمی کاسپازهای PC12 و 9 در سلول‌های کاسپازهای 3 و 9 نقطه اساسی در اپیپترین وابسته به میوتکندری ایفا می‌کند. فعالیت کاسپاز 3 با استفاده از سویستراها در کروموزئین اندوزگیری شد. فعالیت آنزیمی کاسپازهای 3 و 9 بعد از تیمار کردن سلول‌های PC12 با کلولز (100 mM) به مدت 24 ساعت، به صورت وابسته به دوز افزایش پیدا کرد که نشان دهنده دخالت کاسپاز 3 و 9 در اپیپترین ناشی از غلظت بالای گلولز در سلول‌های PC12 می‌باشد. مانیتول (100 mM) که به عنوان کنترل اسکی استفاده شده، هیچگونه تأثیری بر فعالیت کاسپاز نداشت و نتیجه این اپیپترین ناشی از غلظت بالای گلولز مستقل از افزایش فشار اسکر می‌باشد (نمودار 2).

نمودار 2- تأثیر کلولز بر روی فعالیت آنزیمی کاسپازهای 3 و 9 در سلول‌های PC12 سلول‌ها به دمای ۷۲ ساعت با غلظت های افزایش یافته و کاسپازهای 1 (100-100 mM) تیمار شدند. نتایج به صورت mean ± S.E.M نشان داده شده. مانیتول (100 mM) باعث کاهش کاسپاز 3 و 9 در سلول‌های PC12 می‌شود. (نمودار 3)
تأثر گلوبازک بر روی میزان پروتئین ProCaspase‌های ۳ و ۹ در سلول‌های PC12 کاسپازه‌ها به صورت پروآنزیم ساخته می‌شوند که بعد از دریافت پیام مرم سلولی به‌فرم عامل آنزیمی تبدیل می‌شوند [۲۷]. بنابراین برای تایید ارتباط بین فعالیت آنزیمی کاسپازه‌های ۹ و ۳ با میزان پروتئین پیش‌سازه‌های این

![Chart](chart.png)

mean ± S.E.M

**P < 0.01

بحث

بیش‌اندازه شده، آپوپتوز نورون‌ها است که در اثر غلظت بالای گلوبازک ایجاد می‌شود و توجه زیادی در سال‌های اخیر به خود جلب کرده است [۲۹]. در واقع، مطالعات زیادی وجود دارند که نشان می‌دهد نورون‌ها در اثر غلظت بالای گلوبازک پیش‌سازه‌های کاسپازه‌های ۹ و ۳ را باعث آپوپتوز می‌شوند [۱۰-۸۴]. مطالعه تحقیقی می‌تواند نشان دهد که غلظت بالای گلوبازک می‌تواند در سلول‌های PC12 که یک...
افراز فعالیت آنزیمی در هر کاسپاز مورد نظر شد که به موارد کاسپاز-کاهش میزان بروکسله‌های بک‌‌کشی که می‌باشد این مشاهده نتایج قبیل که یک‌گروه آپوپتوز بعد از 72 ساعت نیم‌کردن یا گلوکز بود و توسط آنتی‌سایکلینهای Bax و CII 2 نسبت بین پترینیتین و DNA به‌وسیله رنگ‌مکانی فرعی oligonucleosomes نشان داد که آپوپتوز in vitro NCI2 بنا فعال شد کاسپازهای آپوپتوز که گلوکز به‌وسیله آن در مواد امیزی است تا راه‌حلین مشابه آپوپتوز که در جریان بیماری دیابت اتفاق می‌افتد. فرایند شد و [18]، 19 و 31. یک جهت بروز این که سیستم آپوپتوز به دلیل آنتی‌سایکلینهای سمت و حاصل اثر مستقیم گلوکز بر روی سلول‌ها می‌باشد. از مانیتور و 100 mM) عنوان گزارش امروزی استفاده شد. تحت شرایط فوق، آزمایش‌ها نشان داد که آپوپتوز با PC12 فعال شدن کاسپازهای 9 و 3 در نتیجه میکوندروباکس‌های آپوپتوز، ارتباط دارد. مانیتور هیچگونه نمی‌تواند در مقایسه با یک بنابراین ایده نکرد که بنابرگر عدم دخالت افزایش فشار اسپری در آپوپتوز ناشی از گلوکز می‌باشد.

کاسپازهای دسته از پروکاسپازهای سه‌تایی هستند که نقش اساسی در فرآیند آپوپتوز ایفا می‌کند [32] که کاسپاز ۹، ۷ و ۶ کاسپاز آن‌ها در دسته میکوندروباکس‌های آپوپتوز می‌باشد و مواد امیزی است. فعال شدن کاسپاز ۳ یعنی کاسپاز ارجاع یافتنی است. مانیتور آپوپتوز به صورت پیش‌باز شده غیر فعال ساخته می‌شود. در هر پیش‌باز ۵۴ کیلوتالوئین کاسپاز ۹ و پیش‌باز ۲۳ کیلوتالوئین کاسپاز ۳ در فعال شدن آپوپتوز بود در سلول‌های دسته. از ترکیب این دسته از نشانات کاسپازهای آپوپتوز در مطالعه حاضر، جهت بررسی فعال شدن کاسپازهای ۹ و ۳ از در دو سلول‌های PC12 انتقال فعالیت آنزیمی با استفاده از سوپرسپراتور استریز و آنتی‌بیوتیک پروکاسپاز در به روش ایمونوپاتنگ. تیمار کردن سلول‌ها این گلوکوز به‌مت می‌باشد ۲۲ ساعت موجب....
آزمادزایی سیتوکروم C از میوتکندری می‌شوند [39]. بنابراین نمکشان این دو MAP که با افزایش آپیتوکین جزء انفاعات آپیتوکین قبل از نمکشان آپیتوکین شدن ۹۳ در جراین آپیتوکین سیتوکروم C12 در اثر نمکشان آپیتوکین به حساب می‌آید. از طرف دیگر، مطالعات نشان داده است که نمکشان آپیتوکین سیتوکروم C12 در سلول‌های NO و ROS استرس آپتوداین ممکن است به آسیب哪 وارد کند و موجب تولید نمکشان باعث افزایش میشود [18]. از دخالت apoptosis-associated speck-like (ASC) فاکتوری نیام و موجب آزمادزایی سیتوکروم C و فعال‌کننده Bax (protein Shdn کامپاسه‌ها) و می‌شود [40].

**مأخذ**


