بررسی میزان انرژی درون سلولی در سلول های آپوپتوتیک

علیرضا خلعتبری[1]، تقی طریحی[2]، حسین نادری منش[3]
1- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
2- استاد، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
3- استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس تهران

یافته / دوره نهم / شماره 3 / پاییز 86 / مسلسل 33

چکیده

دریافت مقاله: 86/1/23، ***پذیرش مقاله***: 86/4/9

Ø مقدمه: آپوپتوسیس فرآیندی فعال می باشد بطوری که فعالیت آنزیمها،تراکم کروماتین و تشکیل اجسام آپوپتوتیک نیازمند صرف انرژی است و لذا این احتمال وجود دارد که کاهش قابل توجهی درمیزان انرژی موجود در سلول های آپوپتوتیک صورت نگیرد.هدف از این تحقیق بررسی میزان**ATP** در سلول های آپوپتوتیک می باشد.

Ø مواد و روشها: این تحقیق یک مطالعه تجربی است که در آن از 50 سر موش نژاد**BALB/c** در دو گروه استفاده شد. در گروه آزمون میزان**mg/kg** 20دگزامتازون ودر گروه شاهد نیز بافر سدیم فسفات بصورت داخل صفاقی تزریق صورت گرفت.16 ساعت پس از تزریق،غدد تیموس خارج گردید. یک لب هر غده جهت مطالعه میکروسکوپی ولب دیگر به منظور بررسی میزان **ATP** درون سلولی با استفاده از تکنیک رزونانس مغناطیس هسته مورد استفاده قرار گرفت.

Ø یافته ها: بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق،میزان **ATP** در سلول های آپوپتوتیک حدود86 % سلو ل های سالم بوده است

Ø بحث و نتیجه گیری: این مطالعه بیانگر فعال بودن روند مرگ سلولی آپوپتوسیس و نیز عدم کاهش شدید میزان**ATP** این سلول ها در طی مرگ سلولی می باشد

Ø کلید واژه ها: آپوپتوسیس،ادنوزین تری فسفات،رزونانس مغناطیس هسته

آدرس مکاتبه: خرم آباد، کمالوند، مجتمع آموزشی پردیس دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

پست الکترونیک: khalat90@yahoo.com

مقدمه

بطور کلی سلول های یک ارگانیسم بر اساس طرح و برنامه، و یا یک حادثه متحمل مرگ سلولی می شود.مرگ سلولی ای که بواسطه بیماری و یا سایر نیرو های خارجی کشنده رخ دهد را اصطلاحا نکروسیس[1]گویند، در مقابل مرگ سلولی براساس طرح و برنامه ای که در واقع بخشی از یک برنامه تکاملی تنظیم شده ژنتیکی است را اصطلاحا مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتو سیس[2] می نامند (1). امروزه آپوپتوسیس به عنوان یک مرگ سولی کاملا فعال مطرح می باشد (2).

فرضیه کنترل آپوپتوز به واسطه میزانATP[3] درون سلولی توسط Richter و همکارانش در سال1996 مطرح گردید (3)، مبنی بر آنکه آپوپتوز فرایندی کاملا فعال و وابسته به انرژی است و فرایند هایی نظیر فعالیت آنزیمها، تراکم کروماتین وتشکیل وزیکول های آپوپتوتیک کاملا تنظیم شده و نیازمند صرف انرژی است. همچنین محققین عنوان می کنند که میزانATP درون سلولی،عامل مهم و تعیین کننده نوع مرگ سلولی می باشد به طوری که در آپوپتوز گرچه میزان ATP کاهش می یابد ولیکن انرژی مورد نیاز فرایند هایی که فعالانه در طی آن رخ می دهد کماکان در سلول موجود است و در صورتی که کاهش شدید انرژی صورت گیرد،سلول علایم مرگ سلولی نکروز را نشان خواهد داد(3).در این زمینه گروهی از محققین میزان ATP را به روش لومینومتری[4] بررسی نموده(4) و به این نتیجه رسیدند که چنانچه میزان ATPدرون سلولی کوچکتر و یا مساوی 20% گروه کنترل(سلول سالم) باشد سلول علایم نکروز را نشان خواهد داد و در صورتی که این مقدار بین20 تا 50% باشد علایم بینابینی مرگ سلولی (حد واسط نکروز و آپوپتوز)مشاهده خواهد شد ودر پی افزایش آن(بیش از50 %)علایم آپوپتوز دیده میشود. به همین ترتیب گروه دیگری از محققین(5) نیز به روش لومینومتری نتایج نسبتا مشابهی را گزارش نمودند.

گروه دیگری از محققین(6) میزانATP سلول های آپوپتوتیک را با استفاده از تکنیک لوسیفراز[5] مورد بررسی قراردادند. این محققین حد آستانه ATP جهت آپوپتوز را حدود 15 الی25 % گروه کنترل (سلول سالم) گزارش نمودند. با توجه به مقادیر متفاوت گزارش شده در رابطه با میزانATP سلول های آپوپتوتیک(4، 5، 6) و نیز ذکر این مطلب که تکنیک رزونانس مغناطیس هسته به مراتب دقیق تر و با قدرت تفکیک بالاتر نسبت به سایر روشهای بیوشیمیای جهت اندازه گیریATPدرون سلولی است(8،7)و نیز ضرورت بررسی دقیق میزان انرژی سلول های آپوپتوتیک به منظور شناخت هرچه بهتر این نوع مرگ سلولی(که اختلال در آن خود زمینه بروز بسیاری از عوارض دوران جنینی و بیماری های متعددی را فراهم می نماید) ضرورت انجام این تحقیق احساس گردید.

مواد و روش ها

جهت بررسی میزانATP درون سلولی در سلول های آپوپتوتیک تیموس، تعداد 50 سر موش نژادBALB/c (چهار هفته ای به وزن تقریبی12گرم) به دو گروه آزمون و شاهد تقسیم گردید. به حیوانات گروه آزمون به میزان20mg/kg(9) دگزامتازون و به حیوانات گروه شاهد بافر سدیم فسفات به صورت داخل صفاقی تزریق گردیدند. سپس حیوانات هر گروه بطور تصادفی به دسته های پنج تایی تقسیم شدند. 16 ساعت پس از تزریق(9) غدد تیموس موش ها تحت بیهوشی خارج گردید.یک لب هر غده جهت مطالعه میکروسکپی در فیکساتیو قرار داده شد و لب دیگر جهت بررسی میزان ATP درون سلولی در نیتروژن مایع قرار داده شد.مراحل فیکس، پاساژ و تهیه مقاطع بافتی و رنگ آمیزی جهت بررسی و مطالعه میکروسکپی نوری و الکترونی طبق روش استاندارد(10) صورت گرفت.

روش تهیه نمونه از بافت تیموس جهت اندازه گیری میزان ATP با استفاده از تکنیک P-NMR:

جهت تهیه نمونه از روش استخراج اسید پرکلریک استفاده شد (11) به این ترتیب که یک لب از غدد تیموس هردسته

1. Necrosis
2. Apoptosis
3. Adenosis Triphosphate
4. Luminometry
5. Luciferase

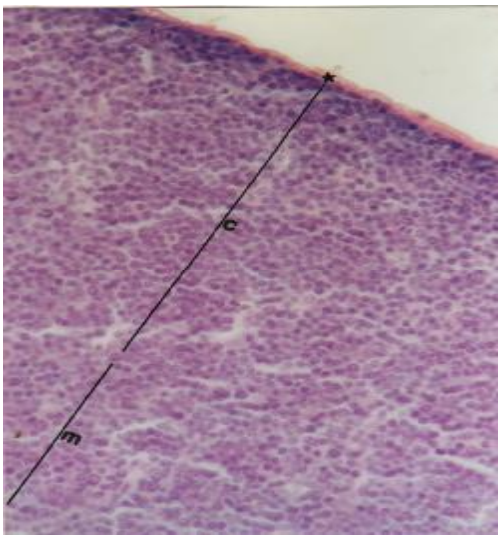
ازموشها درون یک تیوب پلاستیکی مجزا قرار داده شد و ضمن افزودن مکرر نیتروژن مایع کاملا خرد گردید. سپس محلول اسیدپرکلریک(0/9 mol/l) به آن افزوده شد (به ازای هر 2 گرم بافت، 6/5 میلی لیتر و در دمای صفر درجه).

بعد از این مرحله جهت تخریب کامل سلول ها،به مدت 60 ثانیه و با شدت 100وات عمل سونیکاسیون صورت گرفت (lab sonic L-40TL)،محلول هموژنیزه بدست آمده را سانتریفیوژ کرده (دمای4 درجه،به مدت 15 دقیقه، 2000rpm) و سپس جهت خنثی شدن اسید به میزان800میکرولیترمحلول هیدروکسید پتاسیم (2mol/l) به آن افزوده شد و مجددا سانتریفیوژ گردید (دمای 4 درجه، به مدت 5 دقیقه، 2000rpm). آنگاه نمونه تهیه شده Lyophilize شده و از آن پودر خشکی تهیه و در دمای80 – درجه نگهداری گردید.جهت ثبت طیف،400میکرولیتر محلولEDTA(2میلی مولار) اضافه شده و حجم نمونه به 0/5 میلی لیتر افزایش داده شد.سپس مقدار 20 میکرولیتر D2Oبه اضافه 100 میکرولیتر محلول اسید ارتوفسفریک(0/1 %)به آن افزوده و نهایتا محلول حاصله درون لوله NMR (به قطر 0/5 میلی متر) منتقل گردید.کلیه طیف هایP-NMR در دمای 2درجه و توسط دستگاه NMR(BRUKER500DRX) ثبت گردید

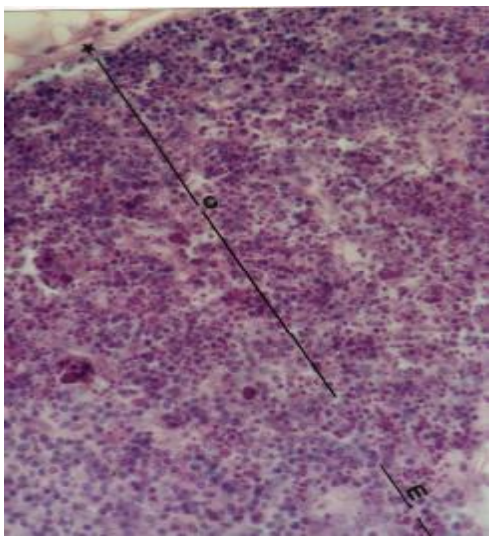
یافته ها

نتایج حاصل از مطالعات میکروسکپی:در بررسی میکروسکپ نوری تیموس گروه شاهد،عمده سلول های تیموسیت سالم بوده و تنها تعداد کمی سلول آپوپتوتیک مشاهده گردید(شکل 1) در حالی که در گروه آزمون،تیموسیت های آپوپتوتیک با هسته های متراکم و تیره(نسبت به سلول های سالم)به فراوانی مشاهده گردید(شکل2).در بررسی میکروسکپ الکترونی، تیموسیت های آپوپتوتیک با کروماتین متراکم و به شکل توده های تیره رنگ در حاشیه هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک)(شکل 3) از سلول های سالم (با خوشه های هتروکروماتین محیطی و باریکه نازک سیتوپلاسمی در حاشیه)قابل شناسایی بودند(شکل 4).

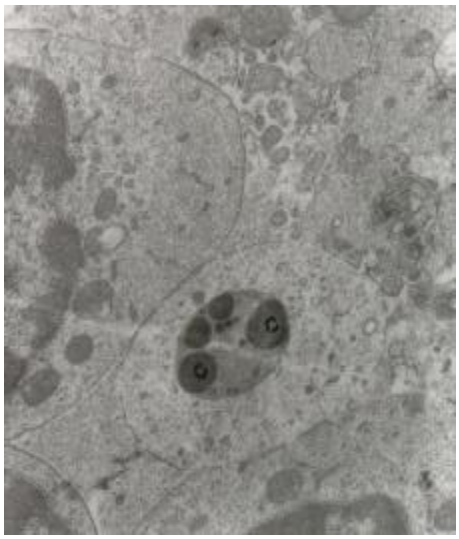
بر اساس شمارش سلولی در گروه شاهد حدود 1/11±0/26 % از سلول ها آپوپتوتیک بودند در حالی که در گروه آزمون 86/03±0/91 % سلول ها آپوپتوتیک بودند. نتایج حاصل از ثبت طیفNMR: براساس نتایج بدست آمده،میانگین طیف ثبت شده(سطح زیر طیف مربوط به گروه هایفسفات ATP)در گروه شاهد0/031± 2/13068 (طیف 1)و در گروه آزمون 0/018± 1/7864(طیف 2) می باشد



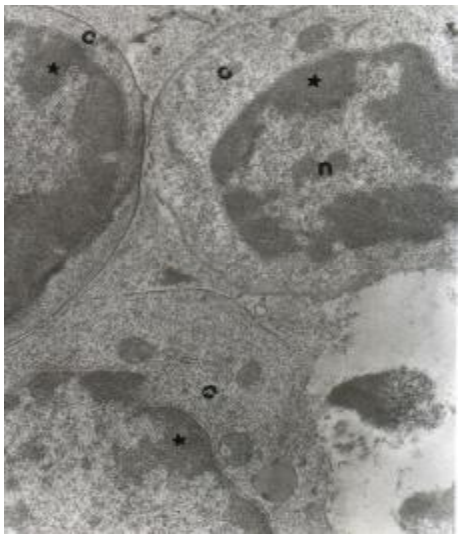
شکل شماره 1- بافت تیموس(گروه شاهد)، تیموسیت های نرمال(400× - H&E)



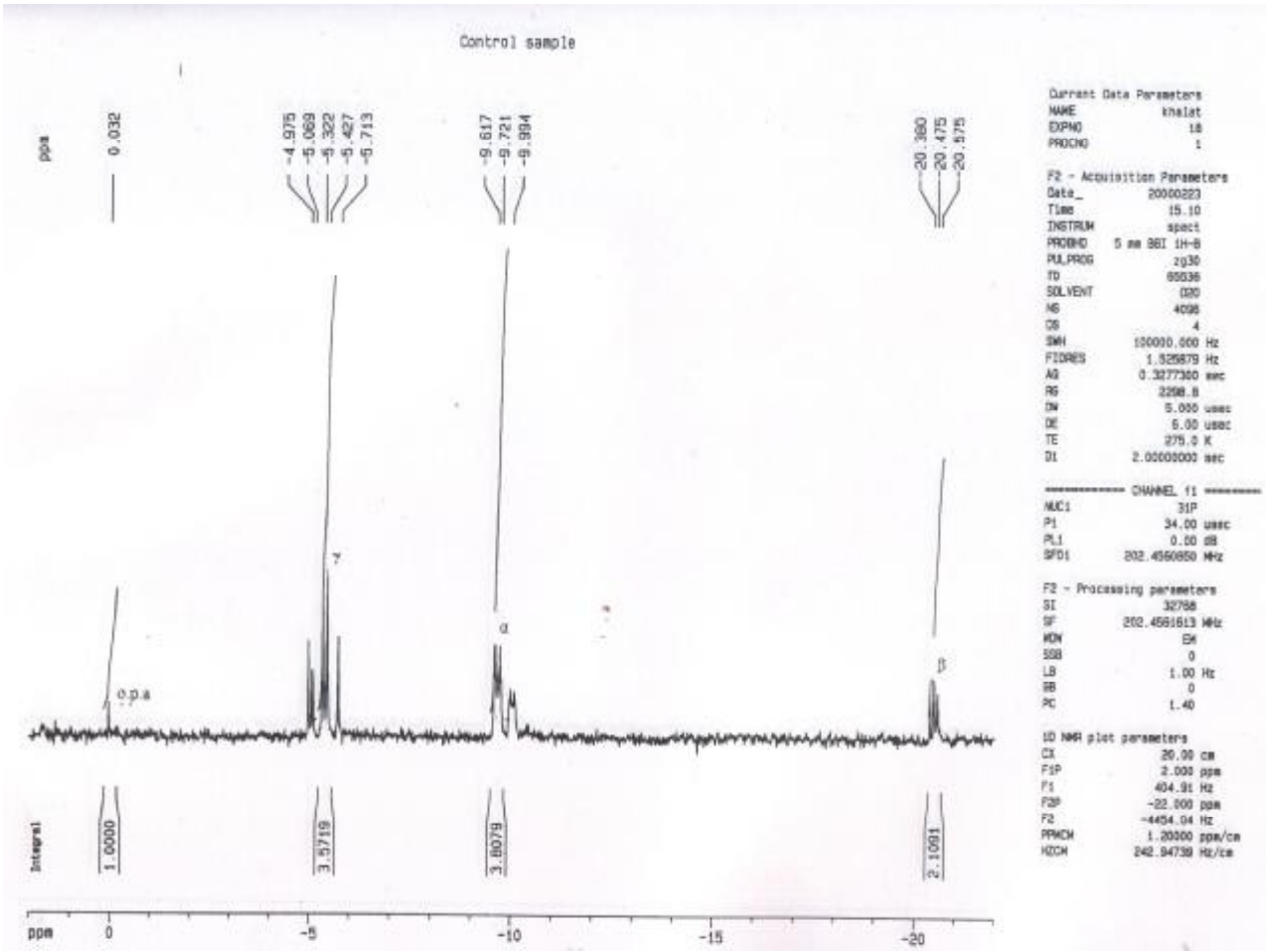
شکل شماره 2- بافت تیموس(گروه آزمون)، تیموسیت های آ پوپتوتیک(400× - H&E)



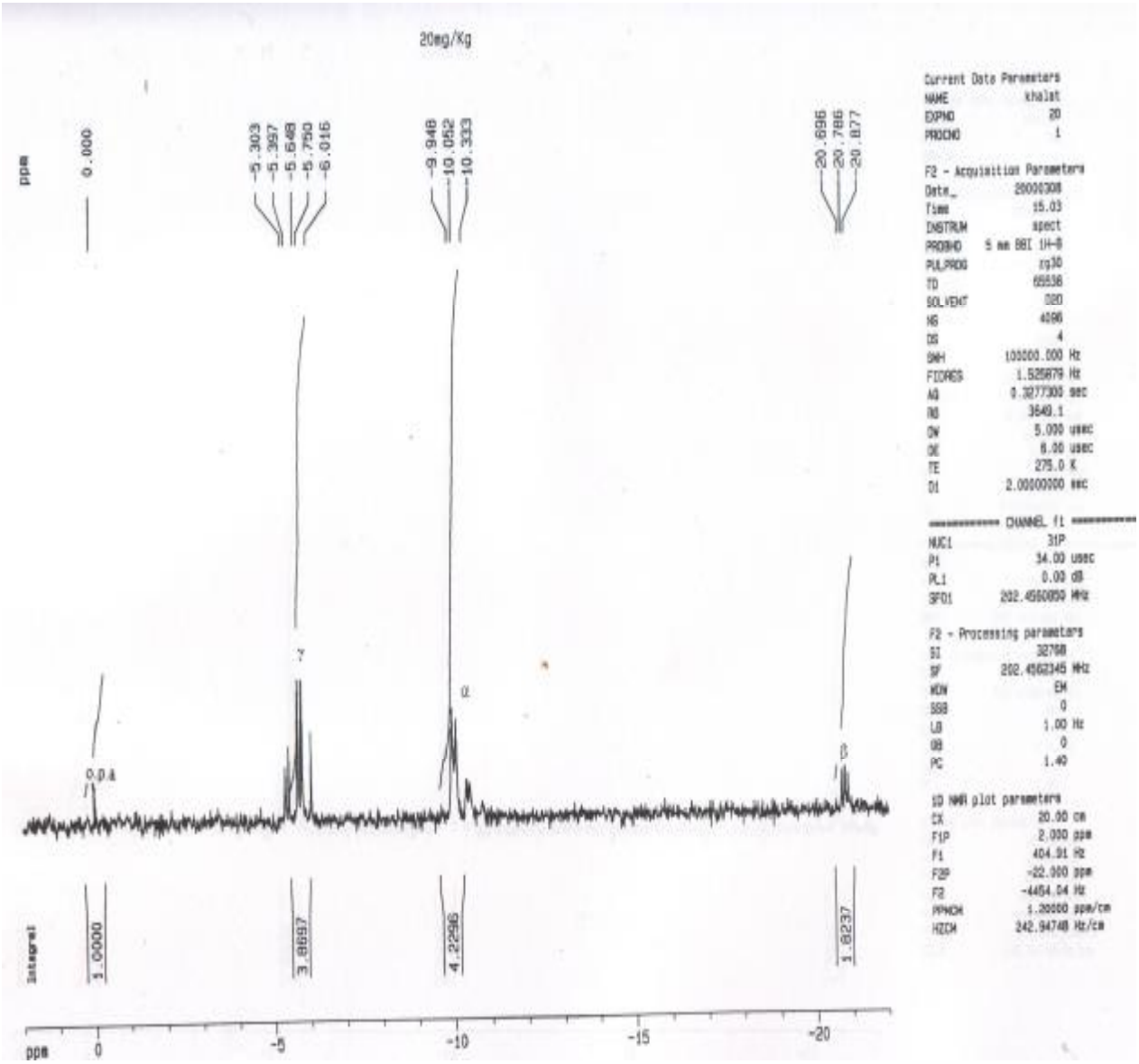
شکل شماره 3- بافت تیموس(گروه آزمون)، تیموسیت های آپوپتوتیک(EM -×3000)



شکل شماره 4- بافت تیموس(گروه شاهد)، تیموسیت های نرمال(EM -×4500)



طیف1.میزانATPدر سلول های نرمال گروه شاهد(P-NMR)



طیف2.میزان ATP در سلول های آپوپتوتیک گروه آزمون (P-NMR)

بحث

از آنجائیکه اولا در پی القای آپوپتوز توسط دگزامتازون،کلیه سلول های موجود در بافت تیموس متحمل روند مرگ سلولی نشده و بخشی سالم باقی خواهند ماند و ثانیا مقادیر محاسبه شده ATP در گروه های مورد مطالعه مربوط به کلیه سلول های موجود در تیموس می باشد(اعم از سلول های آپوپتوتیک و سالم).لذا جهت تفکیک سلول های سالم از آپوپتوتیک و همچنین محاسبه مقادیر ATP ای که صرفا مربوط به سلول های آپوپتوتیک باشد،شمارش سلولی صورت گرفت و % تیموسیت های آپوپتوتیک محاسبه گردید بطوری که در گروه کنترل 0/26± 1/11 و در گروه آزمون 0/91±86/03% سلول ها آپوپتوتیک بودند. از طرف دیگر میزان ATP در گروه کنترل 0/031±2/13068 و در گروه آزمون 0/106±1/7864 بوده است.

میزان کاهش ATP در سلول های آپوپتوتیک نسبت به سلول سالم مطابق روش زیر محاسبه گردید. کلیه سلول های

گروه شاهد، سالم فرض شد(100%)=A مقدارATPدرسلول های سالم گروه شاهد(2/13068)= B % سلول های سالم گروه آزمون(100-86/03)=C مقدار ATPدر سلول های سالم گروه آزمون =X1

$$X_1 = \frac{B \times C}{A} = \frac{2/13068 \times (100 - 86/03)}{100}$$

میزان ATP سلول های آپوپتوتیک گروه آزمون

$$X_2 = 2/13068 - 0/2976 - 1/8320$$

مقدار ATP در سلول های سالم گروه شاهد ((A=(2/13068)، میزان ATPسلول های آپوپتوتیک گروه آزمون ((B=(1/8320)، % ATP در سلول های گروه شاهد 100% در نظر گرفته شد (C)، % ATP در سلول های آپوپتوتیک نسبت به سلول سالم (X3)

$$X_3 = \frac{C \times B}{A} = \frac{100 \times 1/8320}{2/13068} = 86/0326$$

در مجموع میزانATPسلول های آپوپتوتیک حدود 86 % سلول های سالم گروه کنترل برآورد شده است.از آنجایی که آپوپتوز فرایندی فعال و وابسته به انرژی است و اعمالی نظیر فعالیت آنزیمها،تراکم کروماتین و تشکیل وزیکولهای آپوپتوتیک کاملا تنظیم شده و نیازمند صرف انرژی است لذا انتظار می رود در طی روند مرگ سلولی آپوپتوسیس کاهش شدید در میزان ATP درون سلولی مشاهده نگردد(2،12،13). یافته های تحقیق حاضر نیز موید عدم کاهش شدید ATP در سلول های آپوپتوتیک نسبت به سلول های سالم می باشد.در این زمینه گروهی از محققین(4،5)میزانATP سلول های آپوپتوتیک را به روش لومینومتری بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که چنانچه میزانATPدرون سلولی کوچکتر و یا مساوی 20% سلول های سالم باشد، علائم نکروز و در صورتی که این مقدار بین30 تا 50% باشد، علائم بینابینی مرگ سلولی(حد واسط نکروز و آپوپتوز) مشاهده خواهد شد و در پی افزایش بیش از 50%،علائم آپوپتوز دیده می شود.

گروه دیگری از محققین(6)میزانATPدرون سلولی سلول های آپوپتوتیک را با استفاده از تکنیک لوسیفراز مورد بررسی قرا دادند.این محققین حد آستانهATPدرون سلولی مورد نیاز جهت آپوپتوز را حدود15 الی 25% سلول سالم گزارش نمودند.امروزه روش های متعددی جهت اندازه گیریATP درون سلولی وجود دارد که می توان از PLCH(14)،UV(15)،لوسیفراز(6)، و لومینومتری(4،5) و روش های آنزیمی دیگر نام برد. در تحقیق حاضر از تکنیک رزونانس مغناطیس هسته با قدرت تفکیک بالا برای نخستین بار جهت اندازه گیری میزانATP درون سلولی استفاده گردید که روشی به مراتب دقیق تر و با قدرت تفکیک بالا تر نسبت به سایر تکنیک های موجود جهت اندازه گیری ملکول های درون سلولی می باشدبطوری که تمامی ترکیبات فسفردار مورد مطالعه اعم از ATP، ADD و AMP در آن واحد و در یک طیف خاص مشاهده و مورد ارزیابی قرار می گیردبه گونه ای که می توان تغییرات آن رابه طور همزمان مورد تجزیه و تحلیل قرار داد.از دیگر ویژگی ها ی مهم و حائز اهمیت این تکنیک، تنظیم دما در زمان ثبت طیف می باشد چرا که در پی استخراج ATPاز سلول با وجود خنثی کردن آنزیمها،فعالیت متابولیک تا حدودی وجود خواهد داشت و لذا امکان تجزیهATP در طی مراحل اندازه گیری وجود خواهد داشت(16،17).لذا در تحقیق حاضرکلیه طیف ها در دمای 2درجه ثبت گردید و در نتیجه مقدارATP اندازه گیری شده به واقعیت نزدیکتر می باشد.

نتیجه گیری

براساس نتایج حاصل از این تحقیق میزانATPسلول های آپوپتوتیک حدود 86% سلول های سالم گروه کنترل میباشد و بیانگر این واقعیت است که آپاپتوز فرایندی فعال و وابسته به انرژی است و لذا کاهش قابل توجه ای در میزان انرژی درون سلولی صورت نمی گیرد.

References

1. Bowen JD, Bowen SM, Jones AH. Mitosis and apoptosis, 1th ed. Chapman & Hal, 1998: 765-774
2. Klabedz K, Grzanka A, Izdebska M. Mitochondria and cell death.Postepy. Hig Med Dosw, 2006; 60: 439-46
3. Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, and Franceshi C. Hypothesis control of apoptosis by the cellular ATP level.FEBS Letter, 1996; 378: 107-110
4. Leist M,Single B,Cstoldi A,and Kuhnel S. Intracellular adenosine triphophate (ATP)concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis.J Exp Med ,1997; 185(8): 1481-1486
5. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y.Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis and necrosis.Cancer Res , 1997; 57: 1835-1842
6. Ieberthl W, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells.Am J Physiol, 1998; 274: 315-327
7. Balaban RS. The application of nuclear magnetic resonance to the study of cellular physiology.Am J Physiol , 1984; 246: 10-19
8. Aliev MK, Dorsten FA, Nederhoff MG, and Vanechted CJA. Mathematical model of compartmentalized energy transfer:Its use for analysis and interpretation of P-NMR studies of isolated heart of creatine kinase deficient mice.Mol Cell Biochem, 1998; 174: 209-229
9. Sun YM, Dinsdale D, Snowden RJ, Cohen GM. Characterization of apoptosis in thymocytes isolated from dexamethasone treated rats. Biochem Pharmacol, 1992; 44: 2131-37
10. Wjllie AH. Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis.Am J Pathol ,1981;109:78-87
11. Uhrin P,and Lipta T. P-NMR study of phosphorus metabolites in fast and slow muscles.Int J Biochem , 1990; 22(10) 1133-1138
12. Astres J, Borras C, Garcia-Sala D, Lioret A, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial damage in aging and apoptosis.Ann N Y Acad Sci ,2002; 959: 448-51
13. Hona A, Kujoth C, Seo Y. Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. Experimental Gerontology, 2006; 75: 1-10
14. Kawamoto Y, Shinozuka K, Kunitomo M, Haginaka J. Determination of ATP and its metabolites released from rat caudal artery by necrosis ion-pair revesed-phase high performance liquid chromatography. Anal Biochem ,1998; 292: 33-38
15. Trauschol Lamprecht W, Schweitzer G″ Methods of enzymatic analysis″ 3rd ed. Bergmeyer, 1985: 1764-1796
16. Desmolin F, Cozzone PJ, Canioni P. Phosphorus- 31nuclear magnetic resonance study of phosphorylated metabolistes compartmentation,intracellular and phosphorylation state during normaxia, hypoxia and ethanol perfusion,in the perfused rat liver.Eur J Biochem,1987; 162: 151-159
17. Jenson JAL, Wiseman RW,Kushmerick MJ. Non-invasive quantitative P-NMR assay of mitochondrial formation in skeletal muscle in situ.Mol Cell Biochem,1997;174:17-22