

بررسی میزان انرژی درون سلولی در سلول های آپوتوتیک

علیرضا خلعتبری¹، تقی طریحی²، حسین نادری منش³

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: آپوتوسیس فرآیندی فعال می باشد بطوری که فعالیت آنزیمها، تراکم کروماتین و تشکیل اجسام آپوتوتیک نیازمند صرف انرژی است و لذا این احتمال وجود دارد که کاهش قابل توجهی درمیزان انرژی موجود در سلول های آپوتوتیک صورت نگیرد. هدف از این تحقیق بررسی میزان ATP در سلول های آپوتوتیک 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 20 mg/kg دگزامتازون و در 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 و لب 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 آپوتوتیک حدود 86% سلول های سالم بوده است

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

Ø کلید واژه ها: آپوتوسیس، دنوزین تری فسفات، رزونانس مغناطیس هسته

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 اصطلاحاً نکروزیس¹ گویند، در مقابل مرگ سلولی براساس طرح و برنامه ای که در واقع بخشی از یک برنامه تکاملی تنظیم شده ژنتیکی است را اصطلاحاً مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوزیس² می نامند (1). امروزه آپوپتوزیس به عنوان یک مرگ سولی کاملاً فعال مطرح می باشد (2).

فرضیه کنترل آپوپتوز به واسطه میزان ATP³ درون سلولی توسط Richter و همکارانش در سال 1996 مطرح گردید (3)، مبنی بر آنکه آپوپتوز فرایندی کاملاً فعال و وابسته به انرژی است و فرایند هایی نظیر فعالیت آنزیمها، تراکم کروماتین و تشکیل وزیکول های آپوپتوتیک کاملاً تنظیم شده و نیازمند صرف انرژی است. همچنین محققین عنوان می کنند که میزان ATP 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 علائم مرگ سلولی نکروز را نشان خواهد داد (3). در این زمینه گروهی از محققین میزان ATP را به روش لومینومتری⁴ بررسی نموده (4) و به این نتیجه رسیدند که چنانچه میزان ATP درون سلولی کوچکتر و یا مساوی 20% گروه کنترل (سلول سالم) باشد سلول علائم نکروز را نشان خواهد داد و در صورتی که این مقدار بین 20 تا 50% باشد علائم بینابینی مرگ سلولی (حد واسط نکروز و آپوپتوز) مشاهده خواهد شد و در پی افزایش آن (بیش از 50%) علائم آپوپتوز دیده میشود. به همین ترتیب گروه دیگری از محققین (5) نیز به روش لومینومتری نتایج نسبتاً مشابهی را گزارش نمودند.

گروه دیگری از محققین (6) میزان ATP سلول های آپوپتوتیک را با استفاده از تکنیک لوسیفراز⁵ مورد بررسی

قرار دادند. این محققین حد آستانه ATP جهت آپوپتوز را حدود 15 الی 25% گروه کنترل (سلول سالم) گزارش نمودند. با توجه به مقادیر متفاوت گزارش شده در رابطه با میزان ATP 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 گیری ATP درون سلولی است (7، 8) 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

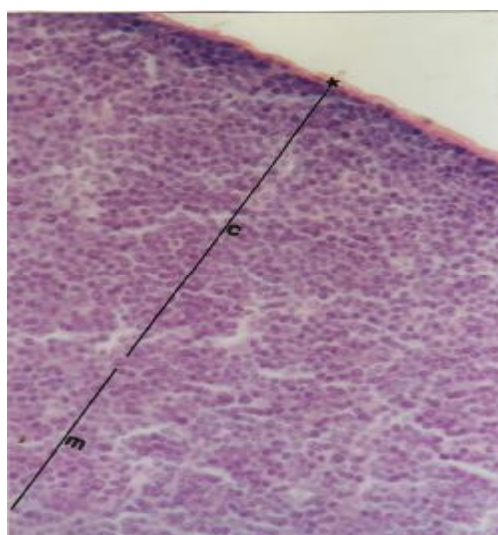
جهت بررسی میزان ATP درون سلولی در سلول های آپوپتوتیک تیموس، تعداد 50 سر موش نژاد BALB/c (چهار هفته ای به وزن تقریبی 12 گرم) به دو گروه آزمون و شاهد تقسیم گردید. به حیوانات گروه آزمون به میزان 20mg/kg (9) دگزامتازون و به حیوانات گروه شاهد بافر سدیم فسفات به صورت داخل صفاقی تزریق گردیدند. سپس حیوانات هر گروه بطور تصادفی به دسته های پنج تایی تقسیم شدند. 16 ساعت پس از تزریق (9) غدد تیموس موش ها تحت بییهوشی خارج گردید. یک لب هر غده جهت مطالعه میکروسکوپی 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 میکروسکوپی 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:

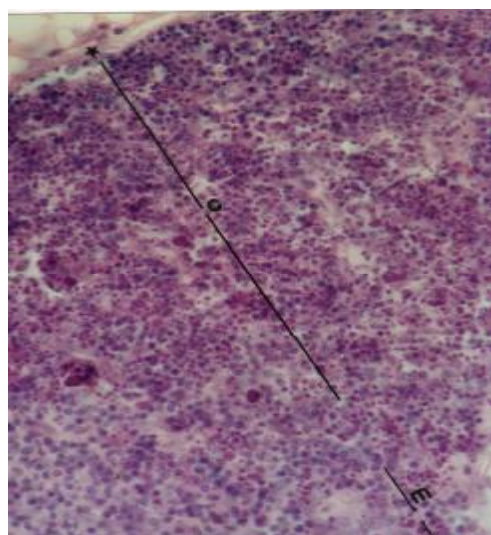
جهت تهیه نمونه از روش استخراج اسید پرکلریک استفاده شد (11) به این ترتیب که یک لب از غدد تیموس هر دسته

- | | |
|---------------------------|----------------|
| 1. Necrosis | 4. Luminometry |
| 2. Apoptosis | 5. Luciferase |
| 3. Adenosine Triphosphate | |

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



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



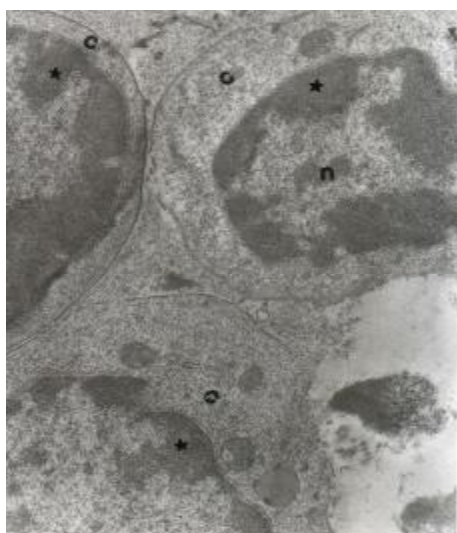
شکل شماره 2- بافت تیموس (گروه آزمون)، تیموسیت های آپوتوتیک (H&E - $\times 400$)

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

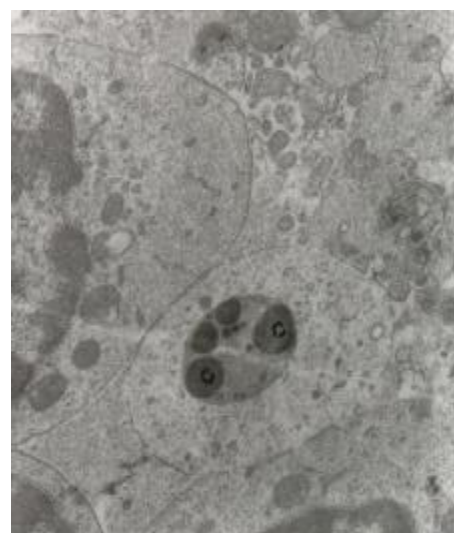
بعد از این مرحله جهت تخریب کامل سلول ها، به مدت 60 ثانیه و با شدت 100 وات عمل سونیکاسیون صورت گرفت (lab sonic L-40TL). محلول هموژنیزه بدست آمده را سانتریفیوژ کرده (دمای 4 درجه، به مدت 15 دقیقه، 2000 rpm) و سپس جهت خنثی شدن اسید به میزان 800 میکرولیتر محلول هیدروکسید پتاسیم (2 mol/l) به آن افزوده شد و مجدداً سانتریفیوژ گردید (دمای 4 درجه، به مدت 5 دقیقه، 2000 rpm). آنگاه نمونه تهیه شده Lyophilize شده و از آن پودر خشکی تهیه و در دمای -80 درجه نگهداری گردید. جهت ثبت طیف، 400 میکرولیتر محلول EDTA (2 میلی مولار) اضافه شده و حجم نمونه به $0/5$ میلی لیتر افزایش داده شد. سپس مقدار 20 میکرولیتر D_2O به اضافه 100 میکرولیتر محلول اسید ارتوفسفریک ($0/1$ % به آن افزوده و نهایتاً محلول حاصله درون لوله NMR (به قطر $0/5$ میلی متر) منتقل گردید. کلیه طیف های P-NMR در دمای 2 درجه و توسط دستگاه NMR (BRUKER 500DRX) ثبت گردید

یافته ها

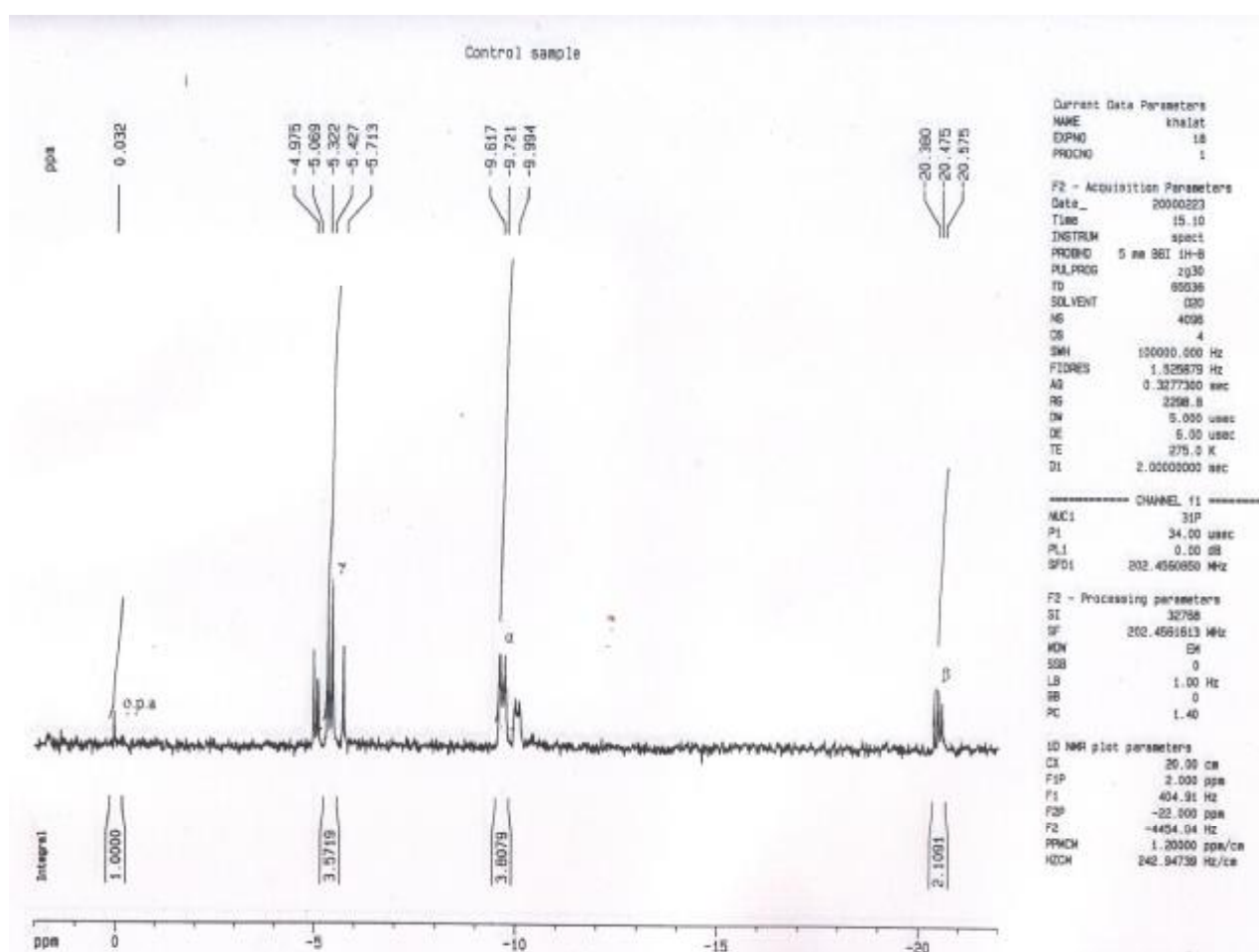
نتایج حاصل از مطالعات میکروسکوپی در بررسی میکروسکپ نوری تیموس گروه شاهد، عمده سلول های تیموسیت سالم بوده و تنها تعداد کمی سلول آپوتوتیک مشاهده گردید (شکل 1) در حالی که در گروه آزمون، تیموسیت های آپوتوتیک با هسته های متراکم و تیره (نسبت به سلول های سالم) به فراوانی مشاهده گردید (شکل 2). در بررسی میکروسکپ الکترونی، تیموسیت های آپوتوتیک با کروماتین متراکم و به شکل توده های تیره رنگ در حاشیه هسته و تشکیل اجسام آپوتوتیک (شکل 3) از سلول های سالم (با خوشه های هتروکروماتین محیطی و باریکه نازک سیتوپلاسمی در حاشیه) قابل شناسایی بودند (شکل 4).



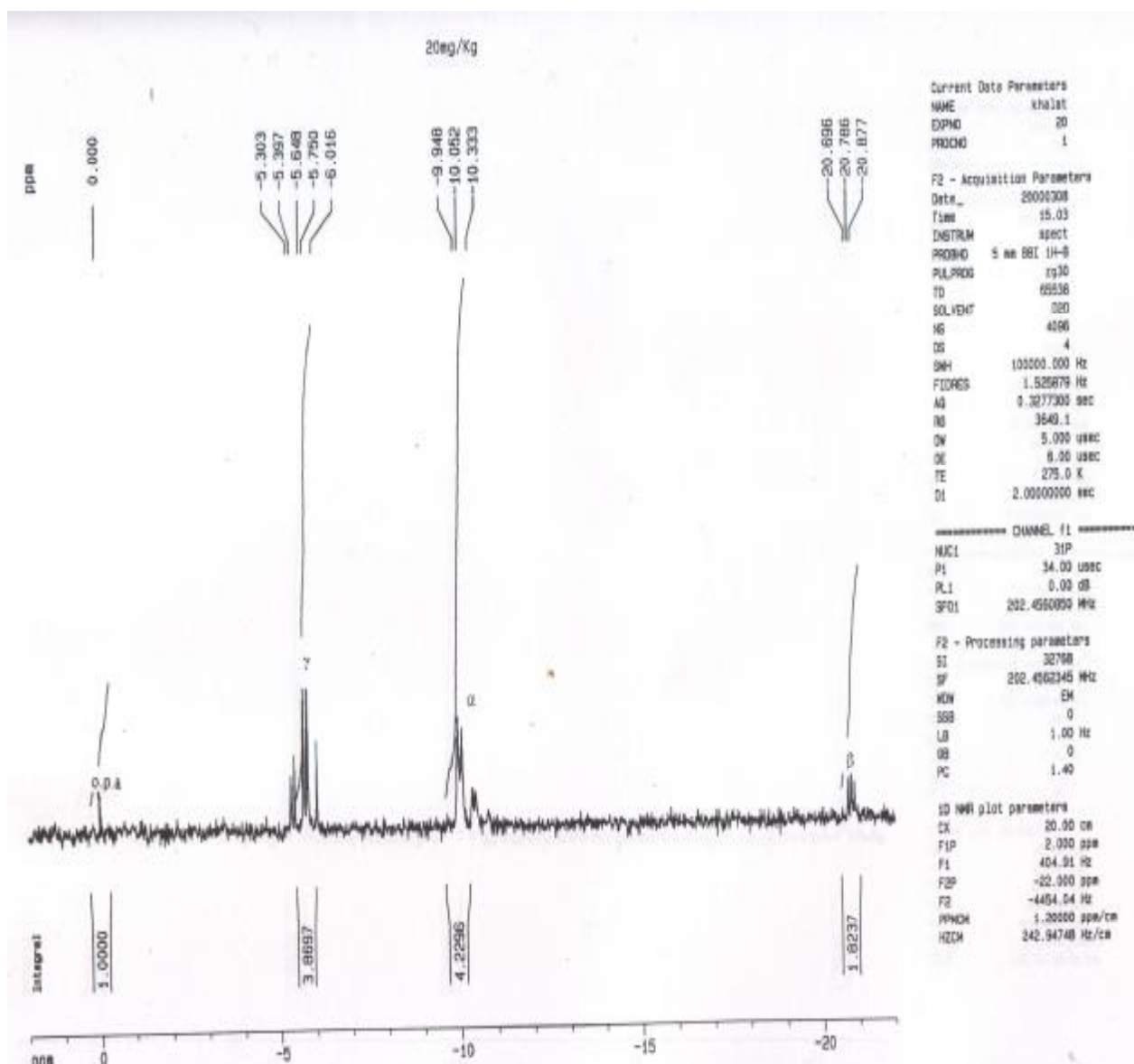
شکل شماره 4- بافت تیموس (گروه شاهد)، تیموسیت های
نرمال (EM - $\times 4500$)



شکل شماره 3- بافت تیموس (گروه آزمون)، تیموسیت های
آپتوتیک (EM - $\times 3000$)



طیف 1. میزان ATP در سلول های نرمال گروه شاهد (P-NMR)



طیف 2. میزان ATP در سلول های آپوتوتیک گروه آزمون (P-NMR)

بحث

از آنجائیکه اولاً در پی القای آپپتوز توسط دگزامتازون، کلیه سلول های موجود در بافت تیموس متحمل روند مرگ سلولی نشده و بخشی سالم باقی خواهند ماند و ثانیاً مقادیر محاسبه شده ATP در گروه های مورد مطالعه مربوط به کلیه سلول های موجود در تیموس می باشد (عم از سلول های آپوتوتیک و سالم). لذا جهت تفکیک سلول های سالم از آپوتوتیک و همچنین محاسبه مقادیر ATP ای که صرفاً مربوط

به سلول های آپوتوتیک باشد، شمارش سلولی صورت گرفت و % تیموسیت های آپوتوتیک محاسبه گردید بطوری که در گروه کنترل $1/11 \pm 0/26$ و در گروه آزمون $86/03 \pm 0/91$ % سلول ها آپوتوتیک بودند. از طرف دیگر میزان ATP در گروه کنترل $2/13068 \pm 0/031$ و در گروه آزمون $1/7864 \pm 0/106$ بوده است.

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

گروه شاهد، سالم فرض شد $A = (100\%)$ مقدار ATP در سلول های سالم گروه شاهد $B = (2/13068)$ سلول های سالم گروه آزمون $C = (100 - 86/03)$ مقدار ATP در سلول های سالم گروه آزمون $X_1 =$

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

میزان ATP سلول های آپتوتیک گروه آزمون

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

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

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

در مجموع میزان ATP سلول های آپتوتیک حدود 86% سلول های سالم گروه کنترل برآورد شده است. از آنجایی که آپتوتوز فرایندی فعال و وابسته به انرژی است و اعمالی نظیر فعالیت آنزیمها، تراکم کروماتین و تشکیل وزیکولهای آپتوتیک کاملاً تنظیم شده و نیازمند صرف انرژی است لذا انتظار می رود در طی روند مرگ سلولی آپتوتوسیس 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 آپتوتیک نسبت به سلول های سالم می باشد. در این زمینه گروهی از محققین (4،5) میزان ATP سلول های آپتوتیک را به روش لومینومتری بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که چنانچه میزان ATP درون سلولی کوچکتر و یا مساوی 20% سلول های سالم باشد، علائم نکروز و در صورتی که این مقدار بین 30 تا 50% باشد، علائم بینابینی مرگ سلولی (حد واسط نکروز و آپتوتوز) مشاهده خواهد شد و در پی افزایش بیش از 50%، علائم آپتوتوز دیده می شود.

گروه دیگری از محققین (6) میزان ATP درون سلولی سلول های آپتوتیک را با استفاده از تکنیک لوسیفرز مورد بررسی قرار دادند. این محققین حد آستانه ATP درون سلولی مورد نیاز جهت آپتوتوز را حدود 15 الی 25% سلول سالم گزارش نمودند. امروزه روش های متعددی جهت اندازه گیری ATP درون سلولی وجود دارد که می توان از PLCH (14)، UV (15)، لوسیفرز (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 میزان ATP 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 باشد. بطوری 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 گیرند. گونه ای که می توان تغییرات آن را به طور همزمان مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. از دیگر ویژگی های مهم و حائز اهمیت این تکنیک، تنظیم دما در زمان ثبت طیف می باشد چرا که در پی استخراج ATP از سلول با وجود خنثی کردن آنزیمها، فعالیت متابولیک تا حدودی وجود خواهد داشت و لذا امکان تجزیه ATP در طی مراحل اندازه گیری وجود خواهد داشت (16،17). لذا در تحقیق حاضر کلیه طیف ها در دمای 2 درجه ثبت گردید و در نتیجه مقدار ATP اندازه گیری شده به واقعیت نزدیکتر می باشد.

نتیجه گیری

براساس نتایج حاصل از این تحقیق میزان ATP سلول های آپتوتیک حدود 86% سلول های سالم گروه کنترل میباشد و بیانگر این واقعیت است که آپتوتوز 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. Klabeledz 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 Franceschi 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 triphosphate (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, Borrás 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 reversed-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-31 nuclear magnetic resonance study of phosphorylated metabolites compartmentation, intracellular and phosphorylation state during normoxia, 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