Original Article

Investigation of Apoptosis Induction in Differentiated PC-12 Cells after Exposure to Hydrostatic Pressure

S. Sadri, M.Sc.[1], M. Davary Zanjani, M.Sc.[1], M. Azadbakht, Ph.D.[1]*, A. Amini, Ph.D.[1], M. Hil, Ph.D.[2]

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Razi University
2. Cell Biology Laboratory, School of Anatomy, University of New South Wales, NSW

** Corresponding Address: P.O.Box: 67149-67346, Biology Department, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran*
Email: azadbakhtm@razi.ac.ir

Abstract

Received: 4/Feb/2008, Accepted: 19/Apr/2008

Objective: Hydrostatic pressure is crucial component of cell environment and fundamental physical quantity, also it is the main factor of both cell integrity and function. Pressure variation disorder, beyond physiological limits, may lead to pathological states. In this study, we examined the effect of hydrostatic pressure on apoptosis induction, viability, morphology, adhesion potency to substrate and migration of differentiated PC-12 cells.

Materials and Methods: PC-12 as a neuronal cell line maintained in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Staurosporine was used for differentiating of mitotic PC-12 cells to post mitotic and differentiated neuronal cells. Exclusion Dye was used for viability assay, total neurite length of each cell as well as morphometry. TUNEL staining was also performed for apoptosis detection, adhesion potency of cells to substrate and evaluation of cell migration.

Results: Hydrostatic pressure, over physiological limits, induced apoptosis in differentiated PC-12 cells. It changed cell viability gradually and reduction happened significantly after 24 hours ($p<0.05$). In compare to the control group, hydrostatic pressure reduced total neurite length, adhesion potency to substrate and migration of cells in the examined group ($p<0.05$).

Conclusion: Hydrostatic pressure induced apoptosis in differentiated PC-12 cells as a result of inappropriate interaction between cells and substrate. We propose that apoptosis in differentiated PC-12 cells may be an anoikis causing to lose the attachment to the substrate.

Keywords: Hydrostatic Pressure, Apoptosis, Anoikis, Neuronal Differentiation, PC-12 Cells

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 129-136

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی بروز آپوپتوز در سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 پس از اعمال فشار هیدروستاتیک

سهیل صدری .M.Sc[1]، مریم داوری زنجانی .M.Sc[1]، مهری آزادبخت .Ph.D[1]*، علی امینی .Ph.D[1]
مارک هیل .Ph.D[2]

۱. دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
۲. دانشگاه نیوساوت ولز، گروه آناتومی

* آدرس نویسنده مسئول: کرمانشاه، صندوق پستی: ۶۷۳۴۶-۶۷۱۴۹، دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
پست الکترونیک: Email: azadbakhtm@razi.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۱۵، پذیرش مقاله: ۸۷/۱/۳۱

* **هدف:** بررسی بروز آپوپتوز در سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 در اثر اعمال فشار هیدروستاتیک
* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه سلول‌های رده PC-12 در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ همراه با ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند. سلول‌ها پس از تیمار با غلظت تمایزی مناسب استئورسپورین به سلول‌های عصبی (نورون) تمایز یافتند. سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند. سلول‌های گروه آزمایش به محفظه اعمال فشار منتقل شدند و به مدت ۲ ساعت در معرض ۱۰۰میلی‌متر جیوه فشار هیدروستاتیک قرار گرفتند. سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی و رنگ‌آمیزی TUNEL به ترتیب میزان بقای سلول‌ها و شاخص آپوپتوز آنها سنجیده شد. با اندازه‌گیری طول نوریت‌ها، مورفولوژی سلول‌ها بررسی و توانایی چسبندگی به بستر و مهاجرت سلول‌ها نیز ارزیابی شد.
* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد میزان بقای سلول‌ها در دو گروه مشابه بود اما پس از ۲۴ ساعت، بقای سلول‌ها در گروه آزمایش کاهش یافت ($p<0/05$). شاخص آپوپتوز در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود ($p<0/05$). همچنین طول نوریت‌ها، توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر و توانایی مهاجرت سلول‌ها در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($p<0/05$).
* **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد اعمال فشار هیدروستاتیک وارده به سلول‌ها با کاهش طول نوریت‌ها، کاهش توانایی چسبندگی سلول به بستر و کاهش توانایی مهاجرت سلول‌ها که از رفتارهای حیاتی سلولی تلقی می‌شود، سبب وقوع آپوپتوز در سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 شده است. با توجه به اختلالی که فشارهیدروستاتیک در چسبندگی سلول‌ها به بستر پدید آورده، به نظر می‌رسد آپوپتوز ایجاد شده در سلول‌ها از نوع آنویکیز باشد.

کلیدواژگان: فشار هیدروستاتیک ،آپوپتوز، آنویکیز، تمایز عصبی ، رده سلولی PC-12
فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۱۳۶-۱۲۹

مقدمه

سلول‌ها چه در حالت منفرد وچه زمانی که در بافت قرار دارند تحت تاثیر نیروهایی مکانیکی هستند و باید خود را با این نیروها سازگار کنند. اگر چنین نیروهایی بیش از اندازه معمول شوند، به طوری که در حد پاسخ طبیعی سلول نباشند، عامل استرس‌زا محسوب می‌شوند و به سلول‌ها آسیب می‌رسانند. در اغلب موارد، آسیب وارده به صورت ایجاد بیماری یا حتی از بین رفتن موجود زنده بروز می‌کند (۱).

فشار هیدرواستاتیک یکی از اجزای مکانیکی حیاتی محیط سلولی به شمار می‌آید و میزان آن در قسمت‌های مختلف بدن متفاوت است. سلول‌های عصبی مغز، در معرض فشاری حدودا ۱۵ میلی‌متر جیوه هستند که از طرف مایع مغزی-نخاعی به آنها وارد می‌شود (۲). دستگاه عصبی و سلول‌های آن به علت تماس مداوم با فشار هیدرواستاتیک و بیماری‌هایی که در اثرافزایش بیش از حد فشار هیدرواستاتیک در این دستگاه به وجود می‌آید، مورد توجه محققان بسیاری قرار گرفته است.

آگار و همکارانش با طراحی یک محفظه فشار به بررسی مرگ سلولی در رده‌های مختلف سلول‌های عصبی پرداخته‌اند و مرگ سلولی ایجاد شده در آنها را از نوع آپوپتوز و ناشی از افزایش میزان فشار هیدرواستاتیک دانسته‌اند (۳). سپس مطالعات دیگری در زمینه افزایش میزان فشار هیدرواستاتیک در سلول‌های عصبی با بررسی روند ایجاد آسیب سلولی در جریان بیماری گلوکوما، که نوعی بیماری مرتبط با افزایش فشار داخل اتاقک چشم است، انجام شد (۴، ۵).

نیروهای مکانیکی از جمله فشار هیدرواستاتیک با اثر بر کانال‌های یونی دریچه مکانیکی سطح سلول‌ها و همچنین ماتریکس خارج سلولی سبب تغییر در رفتارهای ساختاری و عملکردی سلول‌ها می‌شوند (۱). ماتریکس خارج سلولی علاوه بر آن که به عنوان داربست فیزیکی در محیط اطراف سلول‌ها عمل می‌کند (۶)، واسطه انتقال بسیاری از پیام‌های حیاتی مانند القای تکثیر، تمایز و مرگ سلولی در سلول‌ها به شمار می‌آید (۷، ۸).اهمیت ماتریکس خارج سلولی تا آن اندازه است که فقدان بر هم کنش مناسب سلول و ماتریکس خارج سلولی که توسط اتصالات نقطه‌ای رخ می‌دهد منجر به بروز آپوپتوز می‌شود. به این نوع آپوپتوز که در پاسخ به بر هم‌کنش نامناسب سلول و ماتریکس خارج سلولی رخ می‌دهد آنویکیز گفته می‌شود (۹).

با وجود مطالعات ذکر شده در زمینه اثرات ا فزایش میزان فشار هیدرواستاتیک بر سیستم‌های بیولوژیک هنوز پرسش‌های زیادی در مورد چگونگی ایجاد مرگ و آسیب‌های سلولی ناشی از آن وجود دارد که تحقیقات و مطالعات بیشتری را طلب می‌کند. تحقیق حاضر با بررسی تاثیر میزان آسیب‌رسان فشار هیدرو استاتیک بر سلول‌های

Archive of SID
www.SID.ir

عصبی تمایز یافته در محیط کشت و بررسی تغییرات درتوانایی‌های حیاتی سلول‌ها مانند مورفولوژی، چسبندگی سلول به بستر و مهاجرت سلول‌ها سعی در یافتن پاسخ مناسب به نکات مبهمی که در نتیجه اعمال فشار هیدرواستاتیک، در سلول‌های عصبی روی می‌دهد، دارد.

مواد و روش‌ها

کشت و تمایز سلول های رده PC-12

در این مطالعه از رده سلولیPC-12 مشتق شده از مدولای غده فوق کلیه که ماهیت عصبی دارد استفاده شد. این رده سلولی توسط گرین و تیچلر استخراج شده و از آن پس به طور متداول در تحقیقات نوروشیمیایی و نوروفیزیولوژی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰). سلول‌های تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco,UK) همراه با افزودنی‌هایی شامل ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum(Gibco,UK)، ۲میلی‌مولار L-Glutamine (Sigma,USA) و ۱ درصد اسیدهای آمینه غیرضروری (Sigma, USA) کشت داده و در فلاسک‌های کشت ۴۰ میلی‌لیتری در انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 به میزان ۵ درصد نگهداری شدند.

تمایز سلول‌های رده PC-12 براساس مطالعات رسولی و همکارانش با اندکی تغییرات انجام شد. بدین منظور سلول‌های رده PC-12 به مدت ۵ ساعت تحت تیمار با غلظت ۲۱۴ نانومولار (۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) استئورسپورین (Alexis,USA) قرار گرفته و پس از ایجاد زواید نوریتی بلند به عنوان نورون‌های بالغ و سلول‌های عصبی تمایز یافته در نظر گرفته شدند (۱۱). سپس سلول‌های تمایز یافته PC-12 در دو گروه کنترل (بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک) و آزمایش (در معرض فشار هیدرواستاتیک) مورد مطالعه قرار گرفتند .

سیستم اعمال فشار هیدرواستاتیک

سیستم اعمال فشار هیدرواستاتیک مورد استفاده در این تحقیق یک مدل تایید شده در بین سیستم‌های متعدد اعمال فشار هیدرواستاتیک بر سلول‌هاست که پیش از این توسط آگار و همکارانش مورد استفاده قرار گرفته است (۳). این سیستم، شامل محفظه‌ای است که از طریق یک دریچه ورودی هوا به یک پمپ دمنده فشار متصل می‌شود. ظروف کشت حاوی سلول‌های گروه آزمایش در داخل محفظه قرارداده شدند و فشار هیدرواستاتیک به میزان ۱۰۰ میلی‌متر جیوه و به مدت ۲ ساعت داخل محفظه، پمپ شد. در گروه کنترل، ظروف کشت حاوی سلول‌ها در محفظه دیگری بدون آنکه به آنها فشار اعمال شود در انکوباتور قرارداده شدند. سپس سلول‌ها از نظر میزان بقا، وقوع آپوپتوز، مورفولوژی، چسبیدن به بستر و مهاجرت مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر ارزیابی، آزمایش‌ها چهار بار در گروه‌های غیروابسته تکرار شد.

ارزیابی میزان بقای سلول‌ها

به منظور تعیین اثر افزایش فشار هیدرواستاتیک بر درصد بقای سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12، سلول‌ها با تراکم ۵×۱۰^۵ سلول در هر خانه ظروف کشت ۲۴ خانه، کشت شده و به محفظه اعمال فشار منتقل شدند و تنها در گروه آزمایش فشار هیدرواستاتیک اعمال شد. سپس سلول‌های هر دو گروه در چهار زمان ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت از نظر میزان بقای سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا جداسازی سلول‌ها از کف ظرف با آنزیم تریپسین-EDTA ۰/۲۵درصد (Sigma, USA) انجام شد سپس۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی با۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۴درصد تریپان‌بلو مخلوط شد و پس از ۲ دقیقه سلول‌ها روی لام نئوبار شمارش شدند و درصد بقای سلول‌ها از تقسیم تعداد سلول‌های رنگ نگرفته بر تعداد کل سلول‌ها ضربدر عدد ۱۰۰ محاسبه شد (۱۲). نتایج به دست آمده از تعیین میزان بقای سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی حیاتی با پروپیدیوم‌یدیدکه پیش از این توسط تاس و همکارانش پیشنهاد شده است، مورد تایید قرار گرفت (۱۳). بدین منظور سلول‌ها پس از تثبیت با محلول پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در محلول پروپیدیوم یدید (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)رنگ‌آمیزی شده و پس از سه بار شست‌وشو با PBS (Phosphate Baffer Salin) با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus AX-70; Japan) مطالعه شدند. با توجه به سمّی بودن این رنگ، در کلیه مراحل رنگ‌آمیزی اصول حفاظتی به خوبی رعایت شد.

بررسی وقوع آپوپتوز در اثر اعمال فشار هیدرواستاتیک

برای بررسی میزان وقوع آپوپتوز در اثر اعمال فشار هیدرواستاتیک از رنگ‌آمیزی تونل (Terminal Uridine Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) TUNEL استفاده شد. این نوع رنگ‌آمیزی روشی برای مشخص کردن قطعه قطعه شدن منظم DNA در جریان مرگ سلولی از نوع آپوپتوز محسوب می‌شود (۱۴). سلول‌های عصبی تمایز یافته با تراکم $۱۰^۳$ سلول در هر خانه ظرف کشت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از انجام آزمایش، سلول‌ها در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت یک ساعت تثبیت شدند. نفوذپذیری غشای سلول‌ها با استفاده از محلول ۰/۲ درصد Triton X-100 (Sigma, USA) به مدت دو دقیقه برروی یخ انجام شد. سپس سلول‌ها به مدت ۱ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی با محلول ترکیبی TUNEL (Roche,Denmark) انکوبه شدند. سرانجام رنگ‌آمیزی سلول‌ها در محلول ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروپیدیوم یدید انجام شد و سلول‌ها پس از سه بار شست‌وشو با PBS با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus AX-70; Japan) مطالعه شدند. سلول‌های با هسته رنگ زرد درخشان به عنوان سلول‌های آپوپتوتیک شمارش شده و در نهایت، شاخص آپوپتوز از تقسیم تعداد سلول‌های آپوپتوتیک بر تعداد کل سلول‌ها ضربدر عدد ۱۰۰ محاسبه شد. در این آزمایش از هر خانه ظرف کشت، ۴۰ زمینه میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی x۱۰۰) به طور تصادفی بررسی شد. سلول‌های PC-12 که در محیط کشت همراه با اتانول ۵ درصد، به عنوان القاگر قوی آپوپتوز، به مدت ۲ ساعت قرار گرفته بودند به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

ارزیابی مورفولوژی سلول ها

ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها به منظور تعیین اثر افزایش فشار هیدرواستاتیک بر طول نوریت‌های سلول‌های تمایز یافته PC-12 در چهار زمان ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک انجام شد. بدین منظور سلول‌های هر دو گروه کنترل و آزمایش که با تراکم $۱۰^۴$ سلول در هر خانه ظرف کشت ۲۴ خانه کشت شده بودند پس از تثبیت در پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت یک ساعت و رنگ‌آمیزی با محلول کریستال ویولت ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه و سه بار شست‌وشو با PBS، مورد ارزیابی مورفولوژیک قرار گرفتند. یکی از بهترین روش‌ها برای ارزیابی مورفولوژی سلول‌های عصبی تمایز یافته اندازه‌گیری طول کل

Archive of SID
www.SID.ir

نوریت‌های هر سلول است (۱۵). در این روش که توسط رون معرفی شد از سلول‌ها به صورت نقاط تصادفی در ظرف کشت با میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus IX-71; Japan) عکس‌برداری شد (بزرگ‌نمایی x۱۰۰)، عکس‌ها در یک پس‌زمینه تعریف شده با خطوط افقی با فاصله‌های مشخص (d) قرار گرفتند، تعداد نقاطی که نوریت‌ها خطوط افقی را قطع می‌کنند تحت عنوان Intersection شمارش و پس از قرار دادن در فرمول زیر، مقدار حاصل به عنوان طول کل نوریت‌های یک نورون (TNL) محاسبه شد (۱۳). در هر گروه تعداد ۱۰۰ سلول ارزیابی شدند.

$$TNL = \frac{\pi . d}{2} \times I$$

(Total Neurite Length: TNL)=طول تمام نوریت‌های یک نورون

d= فاصله بین دو خط افقی

I= تعداد intersection

π=3.14

ارزیابی توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر

این آزمون به منظور تعیین اثر افزایش فشار هیدرواستاتیک بر توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر انجام شد. بدین منظور سلول‌ها به دنبال بازگرداندن ازمحفظه اعمال فشار با آنزیم تریپسین -EDTA ۰/۲۵ درصد از کف ظروف کشت جدا شدند. سپس سوسپانسیون سلولی به دست آمده از هر دو گروه با تراکم 10^4 سلول در هر خانه ظرف کشت ۲۴ خانه پوشیده شده با کلاژن مجددا پلیت شدند و در انکوباتور قرار گرفتند. در زمان‌های ۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه پس از پلیت مجدد و فرصت دادن به سلول ها برای چسبیدن به بستر، محلول رویی، حاوی سلول‌های نچسبیده برداشته و سلول‌های چسبیده توسط پارافرمالدئید ۴درصد به مدت یک ساعت تثبیت شدند (۱۶). سپس سلول‌ها با رنگ کریستال ویولت ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و پس از سه بار شست‌وشو با PBS شمارش شدند. شمارش سلول‌های چسبیده به کف ظرف کشت توسط عکس‌برداری از تمام نقاط ظرف کشت (بزرگ‌نمایی x۴۰) در هریک از فواصل زمانی مورد مطالعه در هر دو گروه انجام شد. در هر گروه ۱۰۰ زمینه میکروسکوپی بررسی شد.

ارزیابی توانایی مهاجرت سلول‌ها

در این آزمون به سلول‌های رده PC-12 اجازه داده شد آن قدر تقسیم شوند تا کاملا کف ظرف کشت را پر کرده و به صورت تک لایه سلولی درآیند. پس از تمایز، انتقال به محفظه اعمال فشار و خارج کردن ظروف کشت از محفظه، بخش مشخصی از تک لایه سلولی از کف ظرف کشت، توسط یک تیغ تمیز و استریل، تراشیده شد تا یک سطح عاری از سلول و علامت‌گذاری شده در کف ظرف ایجادشود. تک لایه تراشیده شده، به آرامی از ظرف کشت شسته شد و در ادامه، محیط کشت تازه جایگزین شد. سپس ظروف کشت به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفته و پس از گذشت این زمان سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند. سپس سلول‌ها با رنگ کریستال ویولت ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و پس از سه بار شست‌وشو با PBS مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی‌ها که با عکس‌برداری (بزرگ‌نمایی x۲۰۰) از مناطق علامت‌گذاری شده صورت گرفت، تعداد سلول‌های مهاجرت کرده از خط نشانه شمارش شدند (۱۷). در هر گروه ۳۰ زمینه میکروسکوپی واجد خط نشانه بررسی شد.

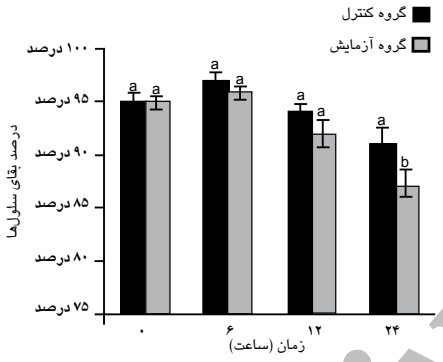
بررسی‌های آماری

داده‌های مربوط به درصد بقای سلول‌ها، شاخص آپوپتوز، طول نوریت‌ها، تعداد سلول‌های چسبیده به بستر و تعداد سلول‌های مهاجرت کرده در دو گروه کنترل و آزمایش به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین محاسبه و از آزمون t-test (12.Ver,software SPSS) برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد و تفاوت‌های با p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

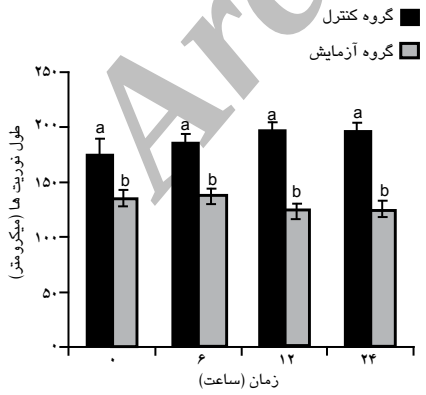
یافته‌ها

اثر فشار هیدرواستاتیک بر درصد بقای سلول‌ها

نتایج به دست آمده از ارزیابی میزان بقای سلول‌ها نشان داد اعمال فشار هیدرواستاتیک در زمان‌های ۰، ۶ و ۱۲ ساعت پس از اعمال فشار، اختلاف معنی‌داری را در دو گروه کنترل و آزمایش ایجاد نکرده بود. درحالی‌که پس از گذشت ۲۴ ساعت درصد بقای سلول‌ها از ۱/۴±۹۱ درصد در گروه کنترل به ۱/۶±۸۷ درصد در گروه آزمایش کاهش یافته بود که این کاهش از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان داد (t test, p<۰/۰۵) (نمودار ۱).



نمودار ۱: اثر فشار هیدرواستاتیک بر در صد بقای سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 در زمان‌های مختلف
a/b: ستون‌های با حروف مختلف دارای اختلاف معنی‌دار هستند (t test, p< ۰/۰۵).
گروه کنترل: سلول‌ها بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک
گروه آزمایش: سلول‌ها در معرض فشار هیدرواستاتیک



نمودار ۲: اثر فشار هیدرواستاتیک بر مورفولوژی سلول های عصبی تمایز یافته PC-12 در زمان های مختلف
a/b: ستون های با حروف مختلف دارای اختلاف معنی دار هستند (t test, p< ۰/۰۵).
گروه کنترل: سلول‌ها بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک
گروه آزمایش: سلول‌ها در معرض فشار هیدرواستاتیک

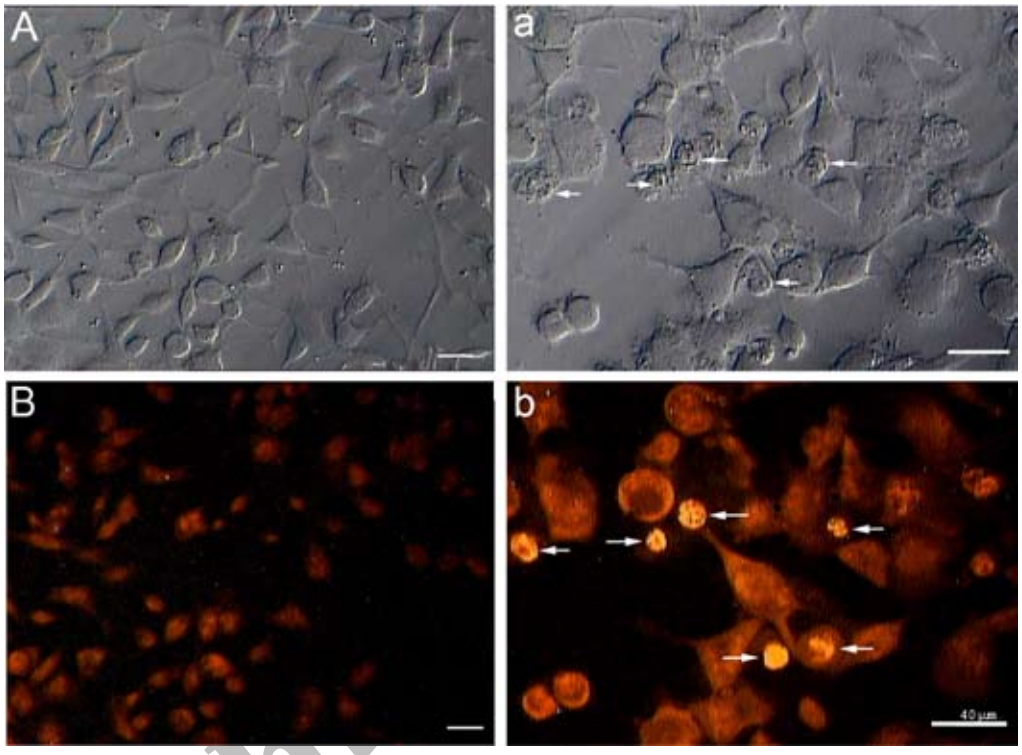
Archive of SID
www.SID.ir

اثر فشار هیدرواستاتیک بر شاخص آپوپتوز در سلول‌ها

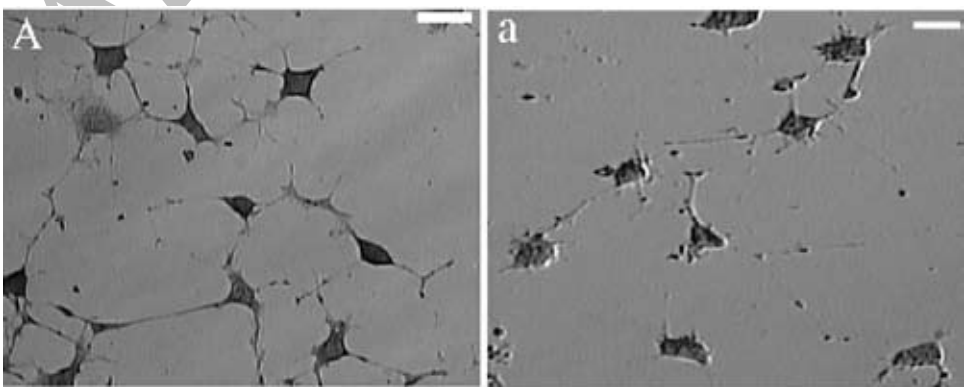
بررسی نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه شاخص آپوپتوز که بلافاصله پس از خارج کردن سلول‌ها از محفظه فشار انجام شد، حاکی از آن بود که شاخص آپوپتوز از ۰/۵±۳ در گروه کنترل به ۰/ ۸±۱۵ در گروه آزمایش افزایش معنی‌داری یافته بود (t test, p<۰/۰۵) (شکل ۱). این امر نشان داد که اعمال فشار هیدرواستاتیک سبب ایجاد مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در سلول‌های گروه آزمایش شده است.

اثر فشار هیدرواستاتیک بر مورفولوژی سلول‌ها

اندازه‌گیری طول نوریت‌های سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 در چهار فاصله زمانی ۰، ۶، ۱۲ و۲۴ ساعت پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک انجام شد. میانگین طول نوریت‌های سلول‌ها در چهار فاصله زمانی اندازه‌گیری شده در گروه کنترل به ترتیب ۱۳/۲±۱۷۶، ۷/۸±۱۸۵، ۷/۵±۱۹۶، ۷/۸±۱۹۶ میکرومتر و در گروه آزمایش ۷/۷±۱۳۴، ۵/۷±۱۳۸، ۶/۷±۱۲۴، ۹/۰±۱۲۳ میکرومتر بود (شکل ۲، نمودار ۲). این نتایج، کاهش معنی‌داری بین طول نوریت‌های گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (t test, p<۰/۰۵).

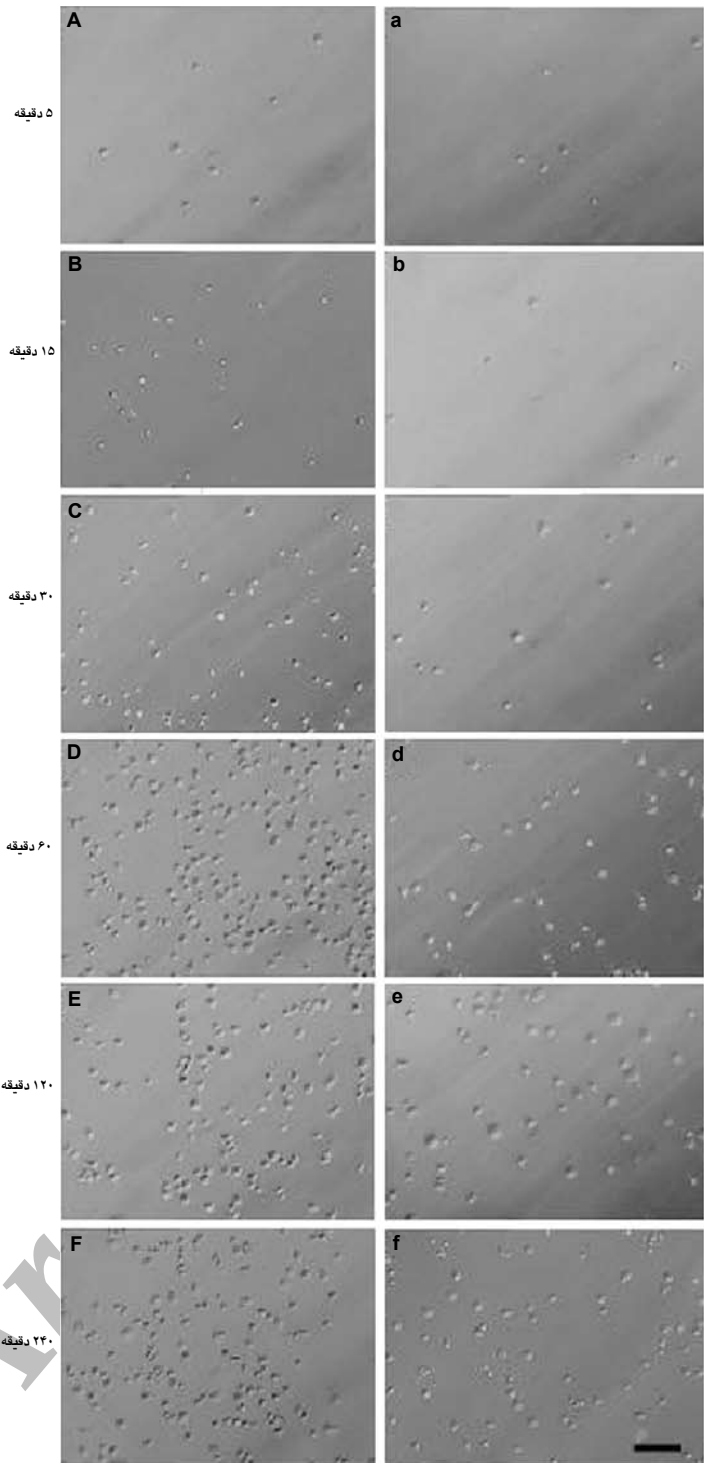


شکل ۱: اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان وقوع آپوپتوز در سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12.
سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 در گروه‌های کنترل (بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک) (B, A) و آزمایش (در معرض فشار هیدرواستاتیک) (b, a). ظاهر آسیب دیده سلول‌هایی که با پیکان مشخص شده در تصاویر میکروسکوپ معکوس (A, a) و سلول‌های به رنگ زرد درخشان در تصاویر رنگ‌آمیزی TUNEL (B, b)، نشان دهنده ایجاد آپوپتوز در آنهاست.
(Scale Bar=40µm).
(A و B بزرگ‌نمایی a)، (۲۰۰ X و b بزرگ‌نمایی ۳۲۰ X)



شکل۲: اثر فشار هیدرواستاتیک بر مورفولوژی سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12. جمع شدن زواید نورونی و کاهش طول آنها در سلول‌ها پس از تاثیر فشار هیدرواستاتیک مشهود است. گروه کنترل (بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک) (A)، گروه آزمایش (در معرض فشار هیدرواستاتیک) (a).
(Scale Bar=20µm) (بزرگ‌نمایی ۱۰۰ X)

www.SID.ir



شکل ۳: اثر فشار هیدرواستاتیک بر چسبندگی به بستردر سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 در زمان‌های مختلف.
کاهش تعداد سلول‌های چسبیده شده به بستر در گروه کنترل (A, B, C, D, E, F) در مقایسه با گروه آزمایش (a, b, c, d, e, f) پس از گذشت ۱۵ دقیقه کاملا مشهود است. گروه کنترل (بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک)، گروه آزمایش (در معرض فشار هیدرواستاتیک). (Scale Bar=150µm). (بزرگ نمایی x۴۰)

اثر فشار هیدرواستاتیک بر توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر

شمارش تعداد سلول‌های چسبیده به بستر در ۶ فاصله زمانی مختلف پس از پلیت مجدد سلول‌ها انجام شد. براساس این مشاهدات میانگین تعداد سلول‌های چسبیده به بستر در شش زمان مورد بررسی در گروه کنترل به ترتیب ۱۰۰±۷/۱، ۲۲/۸±۱۵، ۳۹/۳±۶/۰، ۱۰۳/۳±۱۱/۴، ۱۱۲±۱۲/۳، ۱۱۲±۶/۴ و در گروه آزمایش ۰/۷±۵/۲، ۰/۴±۶/۸، ۰/۰±۱۴/۲، ۳۶/۹±۲/۱، ۳/۸±۴۷/۷ و ۵/۰±۵۷ بود (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد تا ۵ دقیقه پس از پلیت مجدد سلول‌ها که تعداد سلول‌های چسبیده به بستر در دوگروه اختلاف معنی‌داری نداشت، در سایر زمان‌ها کاهش قابل ملاحظه و معنی‌داری در تعداد سلول‌های چسبیده به بستر در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (t test, p<۰/۰۵).

www.SID.ir

اثر فشار هیدرواستاتیک بر توانایی مهاجرت سلول‌ها

شمارش تعداد سلول‌های مهاجرت کرده از خط نشانه، ۲۴ ساعت پس از نشانه گذاری ظروف کشت انجام شد. میانگین تعداد سلول‌های مهاجرت کرده ازخط نشانه در گروه کنترل ۱/۲±۱۴/۳ و در گروه آزمایش ۰/۶±۶/۴ بود (t test, p<۰/۰۵). این نتایج نشان داد که اعمال فشار هیدرواستاتیک سبب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های مهاجرت کرده در گروه آزمایش درمقایسه با گروه کنترل شده است.

بحث

فشار هیدرواستاتیک یکی از عوامل مکانیکی اصلی محیط اطراف سلول‌ها است که نقش بسیار مهمی در عملکرد و حیات آنها دارد. تحقیقات اندکی در زمینه بررسی اثر فشار هیدرواستاتیک و نحوه مرگ سلولی و ایجاد بیماری در نورون‌ها به صورت آزمایشگاهی انجام شده است. همین مسئله سبب شده تا پاتوفیزیولوژی آسیب‌های به وجود آمده و چگونگی بروز مرگ سلولی در اثر افزایش میزان فشار هیدرو استاتیک تا سال‌ها ناشناخته بماند.

در تحقیق حاضر برای دست‌یابی به مدلی مناسب از نورون‌های دستگاه عصبی و تاثیر فشار هیدرواستاتیک بر آن، از سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 که توسط استئورسپورین تمایز یافته بودند، استفاده شد (۱۱، ۱۸). سپس مطالعه اثرات فشار هیدرواستاتیک روی این سلول‌ها با یک دید مورفولوژیکی- عملکردی انجام شد. به طوری که پس از بررسی درصد بقا و مورفولوژی سلول‌ها و مقایسه آنها در دو گروه کنترل و در معرض فشار، توانایی اتصال سلول‌ها به بستر و مهاجرت آنها در جهت بررسی بروزآپوپتوز در سلول‌های عصبی در اثر افزایش میزان فشار هیدرواستاتیک مورد مطالعه قرار گرفت.

تا سال ۲۰۰۰ مطالعه‌ای مبنی بر تاثیر مستقیم فشار هیدرواستاتیک بر سلول‌های عصبی انجام نشده بود تا اینکه آگار و همکارانش سلول‌های عصبی را در معرض فشارهیدرواستاتیک به میزان ۱۰۰ میلی‌متر جیوه قرار دادند و تغییرات به وجود آمده را بررسی کردند. بررسی‌های مورفولوژیکی و کمّی این محققان مشخص کرد که فشار هیدرواستاتیک به تنهایی عامل بروز آپوپتوز در این سلول‌هاست. اما چگونگی ایجاد آپوپتوز و دلایل افزایش وقوع آن در اثر فشار هیدرواستاتیک همچنان ناشناخته است (۳). در تحقیق دیگری تزل و واکس، اثر فشار هیدرواستاتیک به میزان ۵۰ میلی‌متر جیوه را به طور مداوم بر سلول‌های عصبی گانگلیونی شبکیه چشم در کشت هم‌زمان با سلول‌های گلیال بررسی کردند. آنها TNF-α مترشحه از سلول های گلیال را مسئول ایجاد آپوپتوز در سلول‌های عصبی گانگلیونی معرفی کردند (۴). در تحقیق حاضر نیز ایجاد آپوپتوز، پس از اعمال ۱۰۰ میلی‌متر جیوه فشار هیدرواستاتیک به مدت ۲ ساعت، توسط رنگ‌آمیزی TUNEL و مقایسه شاخص آپوپتوز بین دو گروه کنترل و در معرض فشار تایید شد.

در آزمایش ارزیابی میزان بقای سلول‌ها، درصد بقای سلول‌های هر دو گروه پس از گذشت ۱۲ ساعت از اعمال فشار هیدرواستاتیک بیش از ۹۵ درصد بود که این مسئله نشان دهنده درصد بقای طبیعی در هر دو گروه کنترل و در معرض فشار است. اما پس از گذشت ۲۴ ساعت، درصد بقای سلول‌هایی که در معرض فشار هیدرواستاتیک قرار گرفته بودند کاهش یافت. یکی از دلایل این کاهش درصد بقا می‌تواند تشدید اثر فشار هیدرواستاتیک با گذشت زمان و ناتوانی برخی از سلول‌ها در بازیابی توان زیستی خود پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک باشد که حتی باعث اختلال در سازماندهی غشا و در نهایت مرگ سلول، پارگی غشا و نفوذپذیری آن به تریپان‌بلو و پروپیدیوم یدید شده است.

از آنجایی که اعمال فشار هیدرواستاتیک بر سلول‌ها همواره به عنوان یکی از ابزارهای مفید برای تحلیل ساختار، معماری و در نهایت عملکرد سلول‌ها است (۲۱-۱۹) برآن شدیم تا جهت بررسی آپوپتوز در سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12، تغییرات مورفولوژیکی ایجاد شده در این سلول‌ها را پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک مورد بررسی قرار دهیم. برای بررسی مورفولوژیکی سلول‌های عصبی تمایز یافته بهترین راه ممکن اندازه گیری طول کل نوریت‌ها و زواید سلولی است (۱۵). بررسی‌ها نشان داد که فشار هیدرواستاتیک سبب کاهش معنی دار طول نوریت‌ها در تمام فواصل زمانی می‌شود بود لذا می‌توان نتیجه گرفت سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12 در اثر اعمال فشار هیدرواستاتیک شروع به جمع کردن نوریت‌ها می کنند که این امر یکی ازنشانه‌های مورفولوژیکی شروع پدیده آپوپتوز در سلول‌ها، تحت عنوان Pseudo Retraction است (۲۲) . سلول‌های تمایز یافته عصبی برای نوریت‌زایی و افزایش طول نوریت‌ها به برهم‌کنش مناسب با ماتریکس خارج سلولی و بستر احتیاج دارند (۲۳).کاهش طول نوریت‌ها درا ثر فشار هیدرواستاتیک که در بررسی‌های مورفولوژیکی مشاهده شد، می‌تواند ناشی از اثر مستقیم فشار هیدرو استاتیک بر سلول و کم کردن برهم‌کنش مناسب سلول-بستر در سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12، به عنوان یک سلول وابسته به اتصال، باشد. ارتباطات سلول با ماتریکس خارج سلولی و بستر نقش بسیار مهمی در فرایندهای اساسی بیولوژیکی از جمله حرکات سلولی، رشد، تمایز، مهاجرت، تنظیم تظاهرات ژنی و در نهایت حیات سلول بازی می‌کند (۷، ۸). سیگنال‌هایی که از ماتریکس خارج سلولی به سلول القا می‌شود حتی سبب سرکوب مرگ سلولی در آنها می گردد (۲۴). اهمیت سیگنال‌های مخابره شده از ماتریکس خارج سلولی که توسط اینتگرین‌ها و نقاط اتصالی صورت می‌گیرد به حدی است که دسته‌ای ازاین سیگنال‌ها در پاسخ به کاهش یا فقدان برهم‌کنش سلول با ماتریکس خارج سلولی سبب القای آنویکیز می‌شوند. آنویکیز واکنش‌هایی است که سلول در پاسخ به برهم‌کنش نامناسب با ماتریکس خارج سلولی و بستر در قالب مرگ سلول بروز می‌دهد (۲۵، ۲۶).نتایج مطالعات گی‌یو و همکارانش که به بررسی بافت شبکیه چشم موش‌های صحرایی مبتلا به بیماری گلوکوما پرداخته بودند، نشان داد افزایش میزان فشار هیدرواستاتیک سبب تخریب لامینین، یکی از پروتئین‌های اصلی ماتریکس خارج سلولی اطراف سلول‌های گانگلیونی شبکیه چشم، شده بود که همین تغییرات سبب بروز آپوپتوز در بافت عصبی شبکیه و در نهایت ایجاد بیماری گلوکوما شده است (۲۷). در تحقیق حاضر نیز همانند مطالعات گی یو و همکارانش اثر افزایش میزان فشار هیدرواستاتیک بر برهم‌کنش سلول‌های عصبی با بستر اطراف بررسی شد .با این تفاوت که مطالعه حاضر روی یک سیستم سلولی انجام شده و فشار هیدرواستاتیک مستقیما و بدون واسطه بر سلول‌ها اعمال شده است. بررسی تعداد سلول‌های چسبیده به کف ظرف که پس از پلیت مجدد سلول‌ها انجام گرفت، نشان داد که توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر خارج سلولی کاهش بسیار محسوس و معنی‌داری یافته است. به طوری که مثلا در فاصله‌های زمانی ۱تا۲ ساعت پس از پلیت مجدد سلول‌ها، توانایی چسبندگی سلول‌های در معرض فشار در مقایسه با گروه کنترل از نصف هم کمتر شده بود. از سوی دیگر توانایی مهاجرت سلول‌ها، که خود نمودی از برهم‌کنش مناسب سلول با بستر است (۲۸)، پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال فشار هیدرواستاتیک در سلول‌های گروه فشار

Archive of SID

www.SID.ir

نسبت به گروه کنترل افت محسوس و معنی‌داری را نشان داد.با توجه به این که سلول‌های عصبی به تنهایی و بدون هم‌کشتی با سلول‌های پشتیبان به سیستم اعمال فشار هیدرواستاتیک منتقل شده بودند می‌توان استنباط کرد که فشار هیدرواستاتیک مستقیما روی خود سلول و واسطه‌های غشایی سلول و ماتریکس خارج سلولی اثر گذاشته و سبب اختلال در برهم‌کنش مناسب سلول‌ها به بستر و در نهایت ایجاد آپوپتوز در سلول‌های تحت فشار هیدرواستاتیک شده است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه آپوپتوز ناشی از اثر فشار هیدرواستاتیک در سلول‌های عصبی تمایز یافته PC-12، تایید شدند. نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی و عملکردی سلول‌ها نشان داد فشار هیدرواستاتیک علاوه بر تاثیری که بر مورفولوژی این سلول‌ها دارد و سبب جمع کردن نوریت‌ها می‌شود، با ایجاد اختلال در برهمکنش مناسب سلول با بستر اطرافش ممکن است زمینه ایجاد مرگ سلولی در آنها را فراهم کند. اهمیت این مسئله تا آن اندازه است که در آینده می‌توانیم با استفاده از بررسی ایمونوسیتوشیمی پروتئین‌هایی که در اتصالات سلول-بستر نقش دارند و بررسی ژن‌های موثر در بروز مرگ سلولی ناشی از اختلال در برهم‌کنش سلول-بستر، مرگ سلولی ایجاد شده در اثر فشار هیدرو استاتیک در سلول‌های عصبی تمایز یافته را مورد بررسی دقیق‌تری قرار دهیم.

References

1. Tan J, Kalapesi F, Coroneo M. Mechanosensitivity and the eye: cells coping with the pressure. J Ophthalmol, 2006; 90: 383-388
2. Guyton A, Hall J. Textbook of Medical Physiology. Sanders, 10nd ed.New York: Oryx Press 2000; 879
3. Agar A, Yip S, Hill M, Coroneo M. Pressure related apoptosis in neuronal cell lines. J Neurosci Res, 2000; 60: 495-503
4. Tezel G, Wax M. Increased production of tumor necrosis factor-α by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induced apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. J Neurosci, 2000; 23: 8693-8700
5. Agar A, Li Sh, Agarwal N, Coroneo M, Hill M. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. Brain Res, 2006; 1086: 191-200
6. Geiger B, Bershadsky A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. Cell, 2002; 110: 139-142
7. Giancotti F. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. Curr Opin Cell Biol, 1997; 9: 691-700
8. Darlene G, Ross A, Desai. A characterization of PC-12 cell proliferation and differentiation-stimulated by ECM adhesion proteins and neurotrophic factors. J Materials Sci, 2003; 14: 1005-1009
9. Gilmore A. Anoikis. Cell Death Differ, 2005; 12: 1473-1477
10. Greene L, Tischler A. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Nat Acid Sci, 1976; 73: 2424-2428
11. Rasouly D, Rahamim E, Lester D, Matsuda Y, Lazarovici P. Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC-12 cells is independent of protein kinase C inhibition. Mol Pharmaco, 1992; 42: 35-43
12. Freshney R. Animal cell culture: a practical approach. 3rd ed.London: Oxford University Press 1992. P: 150
13. Tas J, Westerneng G. Reagent for the fluorescent staining of nucleic acids .Histochem Cytochem, 981; 29: 929-930
14. Gold R. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. Lab Invest, 1994; 71: 219-228
15. Ronn L , Ralets I, Hartz B, Bech M , Berezin A, Berezin V, et al. A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. J Neurosci Method, 2000; 100: 25-32
16. Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Iwashita, M. Characterization of morphological and cytoskeletal changes in trophoblast cells induced by insulin-like growth factor-I. J Clinical Endocrin & Metabolism, 2002; 12: 5751-5759
17. Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Hasan-nejed H, Sakai K, Hosseini A, et al. The role of alpha (5) beta (1)-integrin in the IGF-I-induced migration of extra villous trophoblast cells during the process of implantation. Mol Hum Reprod, 2004; 1091-1097
18. Hashimoto S, Hagino A. Staurosporine induced neurite outgrowth in PC-12 cells. Exp Cell Res, 1983; 184: 351-359
19. Rosin M, Zimermann A. High pressure studies in cell biology. J Cell Sci, 1997; 26: 373-385
20. Masson P. Action of hydrostatic pressure on proteins: emergence of high-pressure biotechnology, potential pharmaceutical and medical applications. Annu Pharmaceutiques, 1999; 57: 49-55
21. Ronald G, Wilson J, Judy E, Zimmerman S, Zimmerman A. Hydrostatic pressure induced changes in the cytoarchitechture of PC-12 cells, Cell Biol Int, 2001;25: 7, 649–665
22. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide – ranging implications in tissue kinetics, Br J Cancer, 1972; 26: 239-257
23. Seidenfaden R, Krauter A, Hildebrandt H. The neural cell adhesion molecule regulates neuritogenesis by multiple mechanisms of interaction.Nourochem int, 2006; 49: 1-11
24. Frisch S, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J Cell Biol, 124: 619-626
25. Frisch S, Screaton R. Anoikis mechanisms. Curr Opin Cell Biol, 2001; 13: 555-562
26. Kroemer G, El-Deiry W, Golstein P, Peter M, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. Cell Death Differ, 2005; 12: 1463-1467
27. Guo l, Moss S, Alexander R, Ali R, Fitzke F, Cordeiro M. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix.Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005; 46: 175-182
28. Lauffenburger D, Horwitz A. Cell migration: A physically integrated molecular process. Cell, 1996; 84: 359-369

Archive of SID

www.SID.ir