



مطالعه اثر پروتئین Bax بر لیزوزومهای کبدی و نقش آن در مرگ برنامه ریزی شده سلول با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن (TEM) در موش

• احمد رضا راجی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
• کیکوجی یاماشیتا، بخش آناتومی و اسکند دندانبپزشکی دانشگاه توکوشیما، توکوشیما، ژاپن

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۲

چکیده

مرگ سلولهای موجودات زنده به دو طریق اتفاق می افتد که عبارتند از آپتوزیس (Necrosis) ۱- و مرگ برنامه ریزی شده سلول (Apoptosis). نکروز مرگ سلول از نوع تصادفی است که در اثر آن گروهی از سلولها در یک بافت از بین می روند و در مقابل در مرگ برنامه ریزی شده، سلول در اثر عوامل محرک (ویروسها و مواد شیمیایی و غیره) و یا به صورت برنامه ریزی شده (در سلولهای پیر و در سلولهای رویانی در حین مراحل طبیعی تکامل) از بین می رود (۹). مطالعه اخیر نشان داده است که مرگ برنامه ریزی شده سلول از دو راه صورت می گیرد: ۱- راه میتوکندری ۲- راه گیرنده های مرگ سلول (۱۰). در هر دو راه با ساخته شدن ترکیبات پروتئینی به نام Bax و تاثیر این مواد بر میتوکندریها و دیگر ارگانلهای داخل سلول مثل لیزوزومها، شبکه آندو پلاسمیک و دستگاه گلژی یکسری آنزیمها به نام کاسپز (Caspases) فعال و مرگ برنامه ریزی شده (AP) اتفاق می افتد (۳). هدف ما از این تحقیق بررسی دقیق تغییرات ساختمانی لیزوزومها در زمان تماس آنها با Bax در شرایط آزمایشگاهی بود. ابتدا لیزوزومها را با کمک اولتراسانتریفوژ از کبد موشهای نژاد *Spragio dawli* جدا و به دو گروه تقسیم کردیم، گروه شاهد بدون تاثیر ماده ای بر آنها و گروه بیمار که بر روی آنها Bax رادر زمانهای مختلف تاثیر دادیم. سپس نمونه های هر دو گروه فیکس شده و مرا حل آماده کردن بافت، تهیه بلوکها، برش به وسیله اولترامیکروتوم به اندازه ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر و رنگ آمیزی انجام گرفت و با کمک میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن الیمپوس مدل H-۸۰۰ با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰-۱۰۰۰۰ تمام نمونه ها مورد مطالعه قرار داده شد و به این نتیجه رسیدیم که استفاده از ترکیبات Bax می تواند تغییراتی شامل: چروکیدگی غشاء لیزوزومها و قطعه قطعه شدن ماده زمینه و نهایتاً متلاشی شدن لیزوزومها و خروج آنزیمهای داخل لیزوزومها را باعث شود که به دنبال آن آنزیمهای آزاد شده می توانند باعث تخریب سلول شده و پدیده مرگ برنامه ریزی شده سلول (AP) را تسریع کنند.

کلمات کلیدی: پروتئین Bax، لیزوزوم، سلول کبد، آپوپتوزیس، TEM، موش

A transimtion electron microscopic study of the effects of Bax protein on hepatic lysosome and its role in apoptosis

By: Raji A.R. Dept of Sciences ,Faculty of Veterinary ,Ferdowsi University, Mashhad. Iran and Yamachita, K. Dept. of Anatomy, Faculty of Dentistry, Tokushima University, Tokushima, Japan.

Living cell die in two ways: Necrosis and programmed cell death (apoptosis). Necrosis is considered as an accidental death of a group of cells in a tissue. However, apoptosis is induced by a variety of stimulating agents (viruses, chemicals, etc.) or is programmed in old or embryonic cells. Apoptosis develops as the result of two intracellular pathways: Mitochondria and death receptors. In both pathways a group of protein compounds Bax proteins affect mitochondria, lysosome, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus to induce the release of caspases which in their active form induce apoptosis. This study was performed to examine the ultrastructural changes of lysosomes invitro at the time of apoptosis. At first lysosomes were isolated from liver using ultracentrifugation, then these agent were exposed to Bax proteins at different time points. After fixation, processing, bloking and ultrathin section, the samples were imaged by a h-800 Olympus transimtion electron microscope. The ultrastructural changes in lysosome, induced by Bax proteins were membrane shrinkage, granulation of the matrix and disruption of membrane. This study defines the morphological feature of the changes in the ultra structure of lysosome during apoptosis.

Key Words: Bax Protein, Lysosome, Hepatic cell, Apoptosis, TEM

مقدمه

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول از دوران جنینی به صورت یک روند طبیعی تا دوره بلوغ که تحت تاثیر عوامل محرک (شیمیائی، ویروسها ۱۰۰۰) می باشد اتفاق می افتد که به علت اهمیت این پدیده از سالیان پیش، بررسی به روی مکانیسم مرگ برنامه‌ریزی شده سلول مورد توجه محققین قرار گرفته است.

Kerr در سال ۱۹۷۱ با بستن ورید باب در موش به مطالعه تغییرات ساختمانی سلولهای کبدی پرداخت (۶). او کوچک شدن اندازه سلولها و چین خوردگی غشاء سلول و همچنین متراکم شدن هسته و پدید آمدن تکه تکه شدن هسته را مشاهده کرد و سپس Wyllie در سال ۱۹۸۰ و Horvits در سال ۱۹۸۶ این تحقیقات را کامل کردند (۵، ۴).

سلول در طی فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده دچار تغییرات ساختمانی می شود که به ترتیب عبارتند از: ۱- خروج آب از داخل سلول (Cell dehydration) ۲- متراکم شدن کروماتین chromatin condensation ۳- متراکم گشتن و چروکیده شدن هسته Pycnosis ۴- تکه تکه شدن هسته Karyorrhexis ۵- متلاشی شدن سلول و تبدیل آن به اجسام آپوپتوتیک (Apoptotic bodies) که به وسیله ماکروفازهای بافتی و فیبروبلاستها این اجسام از بین می‌روند (۱۲).

تحقیقات نشان می‌دهد که عوامل شروع کننده آپوپتوزیس با آزاد کردن ترکیبات پروتئینی به نام Bax به‌طور غیر مستقیم از طریق تاثیر بر میتوکندریها و آزاد شدن سیتوکروم C (از فضای بین دو لایه غشاء آنها) و یا به‌وسیله مستقیم باعث تغییر کاتپسین‌ها (سیستئین پروتئاز لیزوزومها) و تبدیل آنها به آنزیمهای کاسپیز (Caspase) می‌شوند و این کاسپیزها با تاثیر بر غشاء سلول و هسته و ارگانل‌های داخل سلول باعث بروز تغییرات ساختمانی و فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شوند (۲، ۱).

تحقیقات Ferri در سال ۲۰۰۱ نشان داد که ارگانل‌های داخل سلول مثل لیزوزومها، شبکه اندوپلاسمیک و دستگاه گلژی در سطح داخل خود دارای گیرنده‌های اختصاصی هستند که در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده پاسخ‌های خاصی از خود نشان می‌دهند (۳). لذا در این تحقیق ما بر آن شدیم که تغییرات ساختمانی لیزوزومهای کبد موش را که تحت تاثیر Bax قرار گرفته‌اند به وسیله TEM مورد بررسی قرار دهیم.



مواد و روش کار

ابتدا ۵ عدد موش خانگی نژاد *S. dawli* بالغ را انتخاب و آنها را با کلروفورم کشته و بلافاصله کبد آنها را خارج و در لوله‌های مخصوص به همراه سرم فیزیولوژی ریخته شد و سپس آنها را به آرامی به وسیله هاونهای مخصوص له کردیم تا دیواره سلولهای کبدی از بین برود (همو

ژنیزاسیون). بعد از ۲۰ دقیقه که لوله را در شرایط یخچال و ثابت نگه داشتیم، مایع روی لوله را در دو مرحله سانتریفوژ کردیم ابتدا با ۱۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه (برای جدا کردن هسته سپس مایع روی لوله را دوباره با ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم در این مرحله لیزوزومها در انتهای لوله آزمایش جدا شدند سپس لیزوزومها را به ۲ گروه

- ۱- Fixation ثابت کردن بافت به وسیله محلول گلو تارالدئید و پارا فرمالدئید ۲٪
- ۲- Washing: مرتبه با فسفات بافر ۰/۱ مولار
- ۳- Osmium: یک ساعت در محلول ۰/۲ مولار
- ۴- Dehydration: با استفاده از الکل به ترتیب ۵۰٪ - ۷۰٪ - ۸۰٪ - ۹۰٪
- ۵- ۹۵٪ - ۱۰۰٪ هر مرحله ۲ بار به فاصله ۵ دقیقه
- ۶- Epon: تهیه و قرار دادن نمونه‌ها در آن به مدت ۳ روز در داخل انکوباتور ۶۰ درجه سانتیگراد تا بلوکهای Epon کاملاً سفت و آماده برش دادن شود.
- ۷- تهیه برشهای نازک به ضخامت ۵۰-۱۰۰ نانومتر (مقاطع طلائی رنگ) به وسیله اولترامیکروتوم و با استفاده از تیغه الماس
- ۸- قرار دادن نمونه‌ها بر روی گریدهای مسی
- ۹- رنگ آمیزی نمونه با اورانیل و سرب
- ۱۰- مشاهده و مطالعه لیزوزومها به وسیله میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن با بزرگنمایی ۲۰۰۰-۱۰۰۰۰ و تهیه تصاویر از نمونه‌های لیزوزوم

مشاهدات و نتایج

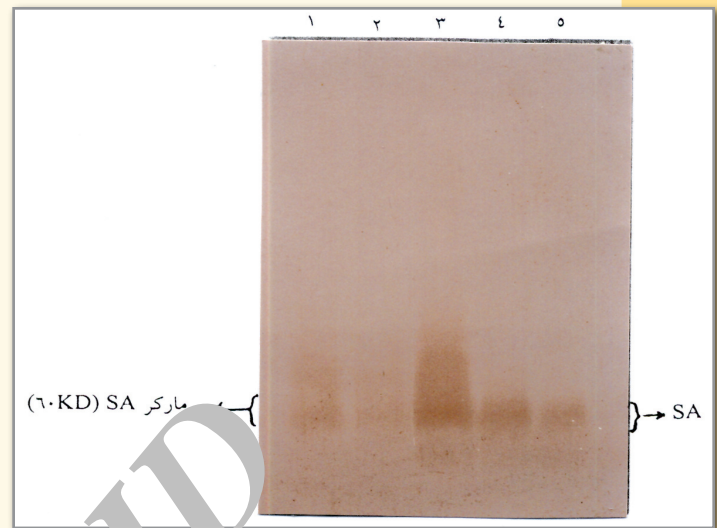
پس از انجام آزمایشات تصاویر میکروسکوپ الکترونی از دو گروه تهیه گردید و مشاهدات حاصله نشان داد که در نمونه‌های شاهد که از ترکیبات Bax استفاده نشده بود اکثر لیزوزومها ساختمان طبیعی داشتند که شامل ماده زمینه یکپارخت در وسط لیزوزوم و غشاء لیزوزومها نیز به‌طور یکنواخت و صاف در اطراف آنها بود (تصویر شماره ۱).

اما با در Bax در زمانهای مختلف تغییراتی در ساختمان لیزوزومها ایجاد می‌گردید که به‌این‌طور که در تصویر شماره ۲ دیده می‌شود غشاء آنها چروکیده و نامنظم شد، و در ماده زمینه شکافهای بوجود آمده است که نشان دهنده تغییرات اولیه در غشاء و ماده زمینه داخل لیزوزومها می‌باشد. با افزایش تاثیر Bax، ماده زمینه قطعه‌قطعه (تشکیل گرانولهای داخل لیزوزوم) و دو لایه غشاء لیزوزومها کاملاً از هم جدا و مشخص شدند (تصویر شماره ۳).

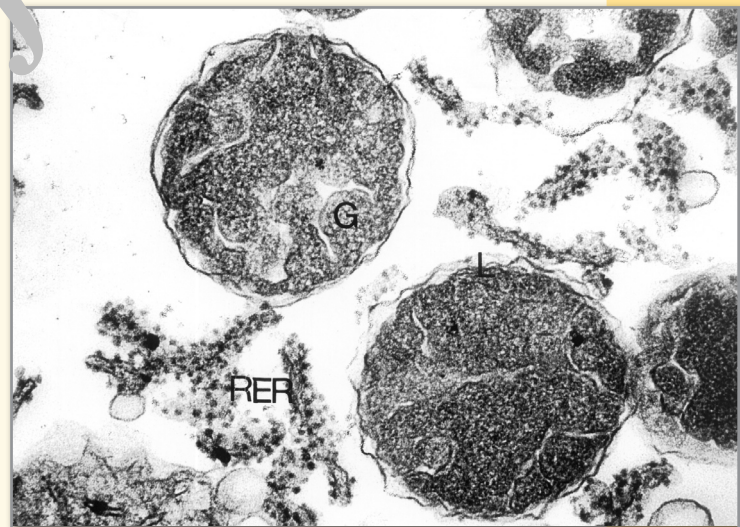
در آخرین مرحله نیز به در تعدادی از نمونه‌ها دیده شد گرانولهای داخل لیزوزوم افزایش یافته و پارگی در غشاء بسیار نازک لیزوزومها اتفاق می‌افتاد و گرانولهای داخل لیزوزومها از آن خارج می‌شدند (تصویر شماره ۴). تغییرات در غشاء و ماده زمینه لیزوزومها تحت تاثیر Bax قرار گرفته بودند نشان دهنده تاثیر مستقیم Bax بر لیزوزومها در طی فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده بود (همانند تاثیر این ماده بر میتوکندریها) بدیهی است که با تاثیر Bax بر لیزوزوم و پارگی آنها آنزیمهای داخل لیزوزوم آزاد و باعث نابودی ارگانلها و غشاء داخل هسته می‌شوند.

بحث

مطالعات اخیر نشانگر این است که با تاثیر محرکهای مختلف (شیمیایی و ویروسها و ...) بر سلولها و با آزاد شدن ترکیبات پروتئینی Bax در داخل سلول این مواد بر روی میتوکندریها اثر گذاشته و باعث آزاد شدن سایتوکروم C و فاکتور ایجاد کننده مرگ سلولی (Apoptotic Inducing Factor) از میتوکندریها شده و این مواد با فعال کردن آنزیم کاسپاز از سیستمین پروتئاز لیزوزوم باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شوند (۴، ۶). مطالعات ما نشان داد که ترکیبات Bax علاوه بر تاثیر بر میتوکندریها با تاثیر

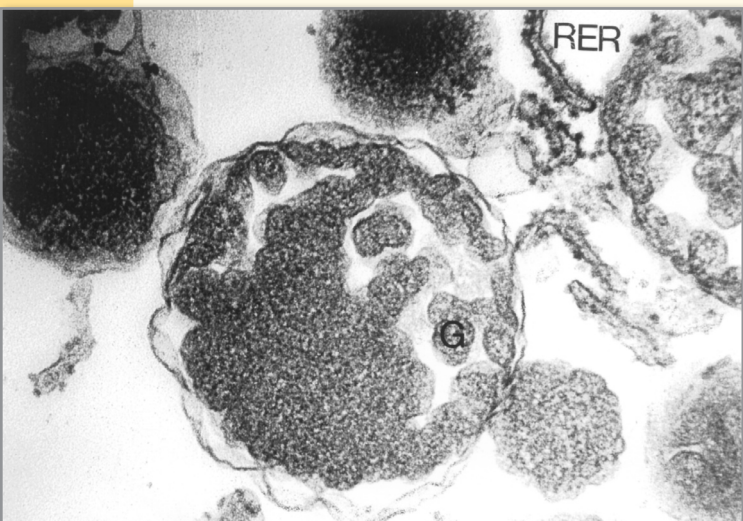


تصویر شماره ۱- لیزوزومهای طبیعی با ماده زمینه یکنواخت و غشاء صاف (گروه شاهد) بزرگنمایی ۱۵۰۰۰
L: لیزوزوم طبیعی

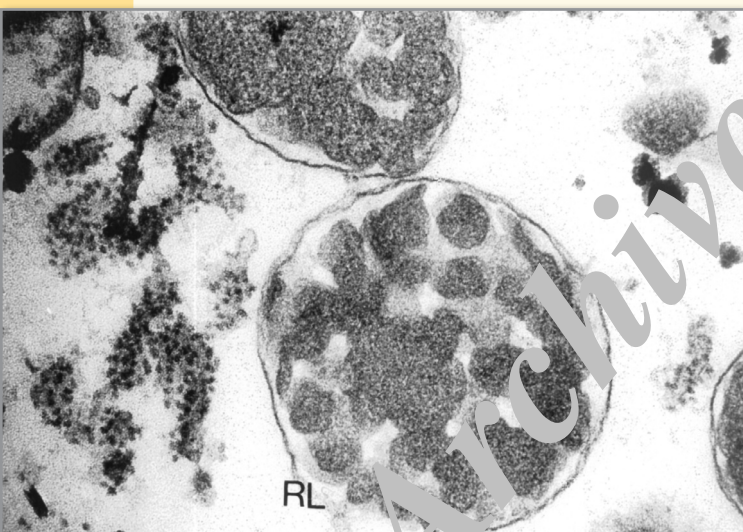


تصویر شماره ۲- لیزوزوم بعد از تاثیر Bax (غشاء چروکیده و ماده زمینه شکافدار) ۱۵۰۰۰L: لیزوزوم G: گرانول
RER: شبکه اندو پلاسمیک خشن

تقسیم کردیم: گروه شاهد که هیچ ماده‌ای را بر روی لیزوزومها تاثیر ندادیم و گروه دوم که Bax را در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه بر آنها تاثیر داده و بلافاصله نمونه‌های گروه اول و دوم را طی مراحل زیر جهت بررسی به وسیله میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن آماده کردیم (تمام مراحل مربوط به تهیه و جدا سازی نمونه‌های لیزوزوم و تاثیر Bax بر آنها در دانشکده داروسازی دانشگاه اوزاکا انجام گرفت).



تصویر شماره ۳ - لیزوزوم بعد از تاثیر Bax (غشاء کاملاً دو لایه و ماده زمینه قطعه قطعه). $15000\times$ و L: لیزوزوم G: گرانول
شبكة اندوپلاسمیک خشن: RER



تصویر شماره ۴ - لیزوزوم حاوی گرانول در داخل و غشاء پاره شده
تاثیر Bax بزرگنمایی $15000\times$ و RL: لیزوزوم پاره شده

بر لیزوزومها مستقیماً باعث تغییرات در غشاء و ماده زمینه لیزوزومها شده و باعث آزاد شدن آنزیمهای لیزوزومی شده و این آنزیم باعث بوجود آمدن یکسری از تغییرات ساختمانی در سلول و شروع پدیده مرگ سلولی می شود.

مطالعات در رابطه با تاثیرات Bax در میتوکندریها نشان داده که این ماده با ایجاد تغییراتی در غشاء میتوکندری توانائی ایجاد کانالهای یونی و سوراخهای را در این غشاء دارد که از آن طریق باعث آزاد شدن سایتوکروم C و AIF می شود (۷،۴).

در تحقیق انجام شده تغییرات ایجاد شده در جدار لیزوزومها و ماده زمینه تحت تاثیر Bax مشابه تاثیر Ca^{2+} بر روی لیزوزوم می باشد .

در آخر پیشنهاد می شود که تاثیر Bax بر دیگر ارگانلهای داخل سلول مثل هسته، دستگاه گلژی و شبکه اندوپلاسمیک نیز بررسی شود که نتایج این تحقیق به شناختن مکانیسمهای مرگ برنامه ریزی شده در داخل سلول کمک می کند و شاید بتوان در آینده نزدیک با شناخت بین مکانیسمها آنها را متوقف و از مرگ برنامه ریزی شده سلولی جلوگیری کرد.

منابع مورد استفاده

- 1- Anttonsson, B., 2001, Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer proteins" and their victim mitochondrion. *Cell Tissue Res. Dec*; 306(3): 347-6
- 2- Parsch, V., 2001, The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ. Jun*; 8(6): 569-81
- 3- Mori, K., Kroemer, G., 2001, Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol. Nov*; 3(11): E253-63
- 4- Gross, A., 2001, Bcl-2 protein: Regulation of the mitochondria apoptotic program. *IUBMB life. Sep-Nov*; 52(3-5): 231-6
- 5- Horvitz HR. 1986, Genetic control of programmed cell death in The nematode *C. elegans*. *Cell. Mar 28*; 44 (6): 817-829.
- 6- Kerr JFR. 1971; Shrinkage necrosis: A. Distinct mode of cell death. *J. Pathol*, 105, 13-20.
- 7- Reed, J.C., Juugensmeier, J.M., Matsuyama, S., 1998, Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta. Aug 10*; 1366(1-20): 127-37
- 8- Tsujimoto, Y., 1998, Role of Bcl-2 family protein in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria. *Genes Cells. Nov*; 3(11): 697-707.
- 9- Van cruchten, S., Van Den Broeck, W., 2002, Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, oncosis and Necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31: 214-223
- 10- Wyllie A-h, Arends M.J, 1992; The apoptosis endonucleosis and its regulation, *Seminar Immunology*, 4, 389-398.
- 11- Zimmermann, K.C., Green, D.R., 2001, How cell die. *Apoptosis pathways. Allergy Immuno. Oct*: 99-103
- 12- Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R., 2001, The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther. Oct*: 92(1): 57-70

