

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

علی محمد شریفی^{۱*}، حبیب اسلامی^۲، باقر لاریجانی^۳

چکیده

مقدمه: نوروپاتی دیابتی، یکی از شایع‌ترین عوارض دیابت است که نوروهای مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تاکنون سازوکارهای دقیق مولکولی سمیت ناشی از گلوکز برای سلول‌های عصبی مشخص نشده است. در مطالعه حاضر، نقش مسیر مرگ سلولی وابسته به میتوکندری و کاسپاز ۳ و ۹ در آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 به عنوان یک رده سلولی عصبی بررسی گردید.

روش‌ها: توان حیاتی سلول‌ها توسط روش MTT ارزیابی شد. فعالیت آنزیمی کاسپاز ۹، کاسپاز آغازگر در آپوپتوز وابسته به میتوکندری و کاسپاز ۳، کاسپاز اجرایی در این مسیر، به روش کالریتری با استفاده از سوبستراهای سنتزی اندازه‌گیری شد. جهت بررسی تغییرات بیان پروتئین کاسپازهای ۳ و ۹ از روش ایمونوبلاستینگ استفاده شد.

یافته‌ها: در روش MTT، سلول‌ها در ساعات ۴۸، ۷۲ و ۹۶ مرگ سلولی معنی‌داری را نسبت به گروه‌های کنترل نشان دادند ($P < 0/05$). فعالیت آنزیمی کاسپازهای ۹ و ۳ در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل بطور معنی‌دار افزایش پیدا کرد ($P < 0/01$). نتایج وسترن بلات نشان داد که بیان پروتئین پروکاسپازهای ۳ و ۹ بطور معنی‌دار کاهش یافته ($P < 0/01$) که بیانگر تبدیل آنها به فرم فعال کاسپاز می‌باشد.

نتیجه‌گیری: براساس مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 تا اندازه‌ای وابسته به فعال شدن مسیر مرگ سلولی میتوکندریایی وابسته به کاسپازهای ۳ و ۹ می‌باشد.

واژگان کلیدی: PC12، گلوکز، آپوپتوز، کاسپاز، میتوکندری

۱- گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دپارتمان فارماکولوژی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- دپارتمان فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

۳- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** دپارتمان فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، پست الکترونیک: sharifal@yahoo.com

مقدمه

شیوع بیماری دیابت در دنیا به سرعت در حال افزایش است و حدود یک تا دو درصد جمعیت به آن مبتلا هستند. این بیماری ارگان‌های مختلف بدن را درگیر می‌نماید که همراه با عوارض جدی و تهدید کننده حیات بیمار است [۱]. دیابت شایع‌ترین بیماری اندوکراین است و هیپرگلیسمی وجه مشخصه آن می‌باشد. هیپرگلیسمی در اثر اختلال در ترشح انسولین از پانکراس یا کاهش حساسیت گیرنده‌های انسولینی در بافت‌های مختلف بدن رخ می‌دهد [۲] و به عنوان عامل اصلی ایجاد کننده عوارض جدی دیابت مثل رتیئوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی مطرح شده است [۳]. نوروپاتی دیابتی یکی از عوارض شایع دیابت است که سیستم عصبی حسی، حرکتی و اتونومیک را تحت تاثیر قرار می‌دهد و علت اصلی قطع عضو غیر ترومایی در بیماران دیابتی می‌باشد [۴].

تحقیقات ثابت کرده است که آپوپتوز منجر به از دست رفتن نورون‌ها در اکثر بیماری‌های تحلیل رونده عصبی (نورودژنراتیو) می‌شود [۵]. مطالعات اخیر نیز نشان داده است که غلظت بالای گلوکز علت اصلی آسیب به سیستم عصبی می‌باشد [۶]. اطلاعات کمی در مورد اثر مستقیم سمی غلظت‌های بالای گلوکز بر روی سلول‌های عصبی وجود دارد. آپوپتوز به عنوان سازوکار احتمالی سمیت عصبی گلوکز مطرح شده است [۷-۱۱]. اما هنوز سازوکارهای دقیق مولکولی آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز مشخص نشده است.

آپوپتوز یک برنامه منظم مرگ سلولی است که به لحاظ فیزیولوژی و پاتولوژی اهمیت بسزایی دارد. این فرم فعال مرگ سلولی بوسیله تغییرات مورفولوژیکی مانند چروکیدگی شدن سلول، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA مشخص می‌شود [۱۲]. جزء اصلی آپوپتوز، یک سیستم لیز کننده پروتئینی بنام کاسپاز می‌باشد. کاسپازها به دو دسته تقسیم می‌شوند: کاسپازهای آغازگر مانند کاسپازهای ۸، ۹ و ۱۲ که عمل اصلی آنها فعال کردن کاسپازهای پایین دست است و کاسپازهای اجرایی مانند کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ که مسوول تخریب پروتئین‌های سلولی هستند [۱۳]. کاسپازها به صورت فرم غیر فعال

(پروآنزیم) ساخته شده که بعد از دریافت پیام مرگ سلولی به فرم فعال آنزیمی تبدیل می‌شوند [۱۴].

تاکنون چهار مسیر مرتبط با آپوپتوز که منجر به فعال شدن کاسپازها می‌شوند، پیشنهاد شده است: ۱- مسیر میتوکندریایی، ۲- مسیر وابسته به گیرنده‌های مرگ، ۳- مسیر وابسته به Granzyme B و ۴- مسیر وابسته به رتیئولوم اندوپلاسمیک [۱۵]. مسیر میتوکندریایی آپوپتوز با آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری آغاز می‌گردد که منجر به تشکیل آپوپتوزوم یا کمپلکس فعال کننده کاسپاز می‌شود. آپوپتوزوم از سیتوکروم c و پروکاسپاز ۹ تشکیل شده است و در حضور dATP می‌تواند کاسپاز ۹ را فعال کند [۱۶]. کاسپاز ۹، کاسپازهای اجرایی را فعال نموده که در نهایت منجر به قطعه قطعه شدن DNA همراه با دیگر تظاهرات مورفولوژیک آپوپتوز می‌گردد [۱۷].

رده سلولی PC12 که منشا آن فنوکروموسیتوم آدرنال رت می‌باشد، به عنوان مدل مناسب برای مطالعه نورون‌ها در تحقیقات استفاده شده است [۱۸ و ۱۹]. مطالعه قبلی ما نشان داد که غلظت بالای گلوکز می‌تواند در سلول‌های PC12 آپوپتوز ایجاد کند که با بررسی پدیده قطعه قطعه شدن DNA و افزایش نسبت پروتئین Bax به Bcl2 به اثبات رسید [۱۱]. افزایش پروتئین Bax با مسیرهای آپوپتوزی وابسته به کاسپاز و نیز غیر وابسته به کاسپاز مرتبط بوده است [۲۰-۲۲]. اما گزارش‌هایی در مورد این که آیا کاسپازها نقشی در ایجاد آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 دارند، وجود ندارد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی نقش مسیر مرگ سلولی وابسته به میتوکندری و کاسپاز ۹ و ۳ در سلول‌های PC12 در اثر غلظت بالای گلوکز می‌باشد.

روش‌ها

کشت سلول‌های PC12

این سلول‌ها از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. مواد مورد نیاز کشت سلولی از شرکت Gibco، فلاسک‌ها و میکروپلیت‌ها از شرکت Greiner خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's-Modified Eagle)

۲ ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفتند. سپس، محتوای چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر کدام اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جهت حل کردن رسوب‌های بنفش MTT، تکان داده شد. جذب نوری آن بوسیله الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و توان حیاتی سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل به صورت زیر محاسبه گردید: جذب نوری سلول‌های کنترل / جذب نوری نمونه‌های تیمار شده $\times 100 =$ درصد زنده ماندن سلول‌ها

استخراج پروتئین تام سلولی

سلول‌های کنترل و تیمار شده را با استفاده از محلول تریپسین از ته فلاسک جدا و با PBS شستشو داده شدند. سپس با محلول لیزکننده سلولی یا RIPA (1X PBS، ۱٪ NP-40، ۰/۵٪ سدیم داکسی کولات، ۰/۱٪ SDS، ۳۰ $\mu\text{l/ml}$ فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) و ۰/۱ آپروتینین) هموژنیزه شدند. مخلوط حاصل از درون سرنگ با سوزن ۲۱ G عبور داده شد و بعد از اضافه کردن PMSF (۱۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ mg/ml)، به مدت یک ساعت بر روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه (4°C) و با شتاب ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید تا پسماندهای حاصل از لیز سلولی حذف شود. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به حجم‌های کوچکتر مساوی تقسیم گردیده و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای 80°C - نگهداری شدند. غلظت پروتئین توسط روش Bradford اندازه‌گیری شد [۲۴] و [Bovine serum albumin] BSA عنوان استاندارد بکار رفت.

روش ایمونوبلاتینگ برای سنجش مقدار پروتئین

پروکاسپازهای ۹ و ۳

ابتدا نمونه‌های پروتئینی را با بافر نمونه 5X حاوی ۶۲ میلی مولار Tris-HCl ($\text{pH} = 7.8$)، ۲٪ SDS، ۲۵٪ گلیسرول، ۵٪ مرکاپتواتانول و ۰/۰۲٪ بروموفنول بلو، مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده شدند. میزان یکسانی از پروتئین‌های استخراج شده از سلول‌های

(Medium) به همراه ۰/۵٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۰/۱۰٪ سرم اسب (Bovine Serum) (Horse Serum) و ۰/۱٪ پنی سیلین - استرپتومایسین (۱۰۰ U/ml) پنی سیلین و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین) و در انکوباتور (Memert, Germany) با رطوبت ۹۰٪، 5CO_2 و دمای 37°C کشت داده شدند. غلظت گلوکز در این محیط ۲۳ mM بود که طبق دستورالعمل ساخت جهت رشد سلول‌های PC12 مناسب بود در حالی که این میزان نسبت به غلظت گلوکز سرم انسان به میزان قابل توجهی بالا بود. کشت‌ها به صورت روزانه به وسیله میکروسکوپ معکوس از نظر مورفولوژی سلول‌ها، آلودگی و تراکم رشد بررسی و در صورت نیاز کشت مجدد شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت تعویض می‌شد. با پاساژ دادن هر دو تا سه روز، سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد نگهداری شدند. جهت پاساژ دادن، سلول‌ها به آرامی با بافر نمکی فسفات (PBS) شسته شده و سپس به مدت ۳-۲ دقیقه در معرض تریپسین قرار گرفتند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی گلوکز با غلظت‌های ۲۳ mM (به عنوان گلوکز نرمال کنترل)، ۵۰ mM، ۷۵ mM و ۱۰۰ mM (بعنوان گلوکز بالا) کشت داده شدند. جهت انجام تست MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)، بعد از دو بار پاساژ دادن، سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه (در هر خانه ۵۰۰۰ سلول) منتقل شدند. جهت استخراج پروتئین تام سلولی، که برای بررسی فعالیت آنزیمی و ایمونوبلاتینگ استفاده شد، سلول‌ها در فلاسک 75 cm^2 کشت داده شدند و بعد از گذراندن زمان ۲۴ ساعت با ۱۰۰-۲۳ mM گلوکز یا ۱۰۰ mM مانیتول (به عنوان کنترل اسمولاری) به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند.

سنجش MTT

میزان حیات سلولی توسط تست MTT بررسی شد. MTT زرد رنگ هنگامی که وارد سلول‌های زنده می‌شود، بوسیله آنزیم دهیدروژناز این سلول‌ها احیا می‌شود و رسوب بنفش رنگ ایجاد می‌کند [۲۳]. به طور خلاصه، بعد از اتمام زمان تیمار سلول‌ها با گلوکز، محلول MTT (۵ mg/ml در PBS) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت

HEPES با pH برابر ۷/۴، ۰/۵ میلی مولار EDTA، ۲۰٪ گلیسرول، ۵ میلی مولار دی تیوتریتول) به همراه ۱۰۰ میکرومولار سوبسترای اختصاصی کاسپازهای ۳ و ۹ (به ترتیب Ac-DEVD-pNA و Ac-LEHD-pNA از شرکت Alexis Biochemicals) به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس جذب نوری آن محاسبه گردید. فعالیت آنزیمی کاسپاز به صورت نانومول pNA آزاد شده طی یک ساعت از یک میلی گرم پروتئین تام سلولی (nmol pNA/h/mg protein) بیان می شود که با استفاده از منحنی استاندارد pNA محاسبه می گردد.

آنالیز آماری

داده های مربوط به اندازه گیری توان حیاتی سلول ها، فعالیت آنزیمی و ایمونوبلاتینگ، حاصل ۳ تا ۸ آزمایش جداگانه بوده که به صورت میانگین \pm استاندارد خطای میانگین (mean \pm S.E.M) نشان داده شده اند. اختلاف آماری بین گروه های کنترل و تیمار شده با استفاده از Unpaired Student's Test بررسی شد. در این مطالعه، $P < 0/05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شد.

یافته ها

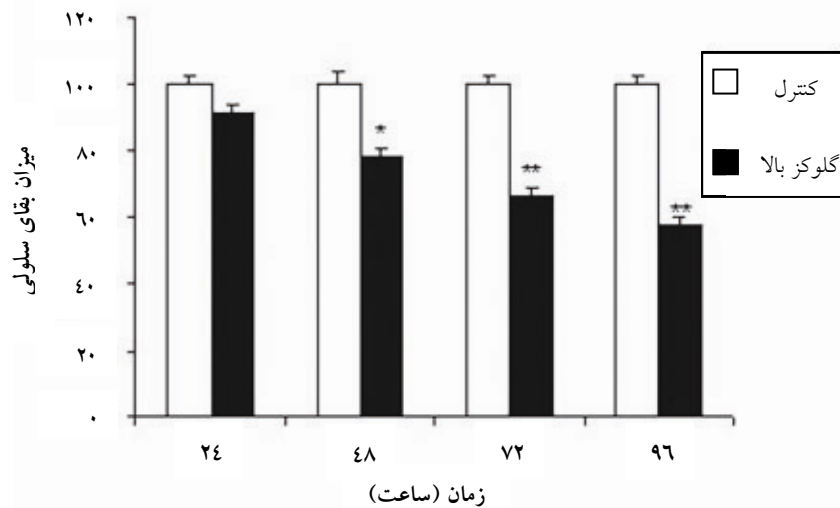
تأثیر گلوکز بر حیات سلولی

در این مطالعه، جهت سنجش مرگ سلولی، سلول ها در معرض گلوکز با غلظت ۱۰۰ mM در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت قرار داده شدند و برای هر کدام از سلول ها، یک گروه کنترل در نظر گرفته شد. طبق نمودار ۱ میزان جذب نوری در سنجش MTT در گروه ۲۴ ساعت تفاوت چندانی ندارد ولی در گروه ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت توان حیاتی سلول های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان می دهد ($P < 0/05$). سمیت گلوکز بر روی سلول های PC12 به صورت وابسته به زمان، افزایش نشان داد.

کنترل و تیمار شده با گلوکز، به روش SDS-PAGE الکتروفورز شده [۲۵] و باندهای پروتئینی به روش بلاتینگ به روی ورقه پلی وینیلیدن دی فلوراید (PVDF) منتقل شد. SDS-PAGE و بلاتینگ به ترتیب توسط دستگاه های Mini-Protean 4 Cell (الکتروفورز عمودی پروتئین) و Mini-Trans Blot (شرکت Bio-Rad) انجام گردید. محل باندهای پروتئینی و راندمان انتقال به طریق رنگ آمیزی Ponceau S بررسی شد. محل باند مورد نظر و کنترل راندمان انتقال همچنین با استفاده از مارکر وزن مولکولی از پیش رنگ شده (Prestained MW marker) (MBI Fermentas, France) نیز کنترل شد. برای شناسایی باندهای مربوط به پروتئین پروکاسپازهای ۳ و ۹، از آنتی بادی اولیه پلی کلونال بر علیه این پروتئین ها استفاده شد (BioVision, Mountain View, CA, USA). از آنتی بادی اولیه بر علیه بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. این آنتی بادی ها توسط آنتی بادی ثانویه متصل به پراکسیداز (HRP) (Roche Applied Science) شناسایی و به طریق لومینسانس (ECL detection kit) (Roche chemiluminescence) ظاهر گردید. فیلم ظاهر شده، اسکن گردیده و شدت باندهای حاصل با استفاده از آنالیز دانسیتومتری به صورت کمی بیان گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیمی کاسپاز ۳ و ۹

فعالیت آنزیمی کاسپازهای ۳ و ۹ بوسیله روش کالیمتری اندازه گیری شد که بر اساس تشخیص توالی های خاص اسیدهای آمینه در سوبسترا توسط کاسپازها می باشد. سوبستراها، تتراپپتیدهایی هستند که با ماده رنگی پارانیتروانیلین (pNA) نشان دار شده اند. pNA در اثر واکنش کاسپازها با سوبسترا، از آن جدا می شود و تولید رنگ زرد می کند که توسط دستگاه الیزا، جذب نوری آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر محاسبه می شود. میزان تولید رنگ در اثر شکسته شدن سوبسترا متناسب با فعالیت آنزیمی کاسپاز در نمونه مورد نظر است [۲۶]. بطور خلاصه، لیزات های تام سلولی در بافر اندازه گیری کاسپاز (۱۰۰ میلی مولار



برای هر دو دوره زمانی، نمونه‌های کنترل وجود داشت که تیمار نشده بودند. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ نشان داده شده‌اند. $P < 0/05$ و $P < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل.

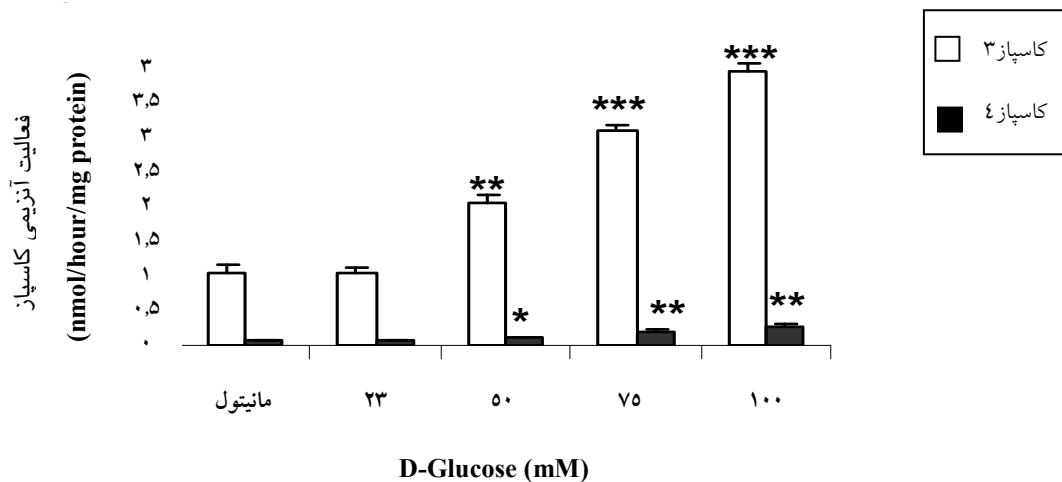
نمودار ۱- اثر گلوکز (۱۰۰ mM) بر روی توان حیاتی سلول‌های PC12 بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار کردن

گلوکز (۱۰۰-۲۳ mM) به مدت ۷۲ ساعت، به صورت وابسته به دوز افزایش پیدا کرد که نشان دهنده دخالت کاسپاز ۳ و ۹ در آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 می‌باشد. مانیتول (۱۰۰ mM) که به عنوان کنترل اسمزی استفاده شد، هیچگونه تأثیری بر فعالیت کاسپازی نداشت و بنابر این آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز، مستقل از افزایش فشار اسمزی می‌باشد (نمودار ۲).

تأثیر گلوکز بر روی فعالیت آنزیمی کاسپازهای

۳ و ۹ در سلول‌های PC12

کاسپازهای ۳ و ۹ نقش اساسی در آپوپتوز وابسته به میتوکندری ایفا می‌کنند. فعالیت کاسپازی با استفاده از سوبستراهای کروموزنیک اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی کاسپازهای ۳ و ۹ بعد از تیمار کردن سلول‌های PC12 با



نمودار ۲- تأثیر گلوکز بر روی فعالیت آنزیمی کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های PC12. سلول‌ها بمدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های افزایش یابنده گلوکز (۱۰۰-۲۳ mM) تیمار شدند.

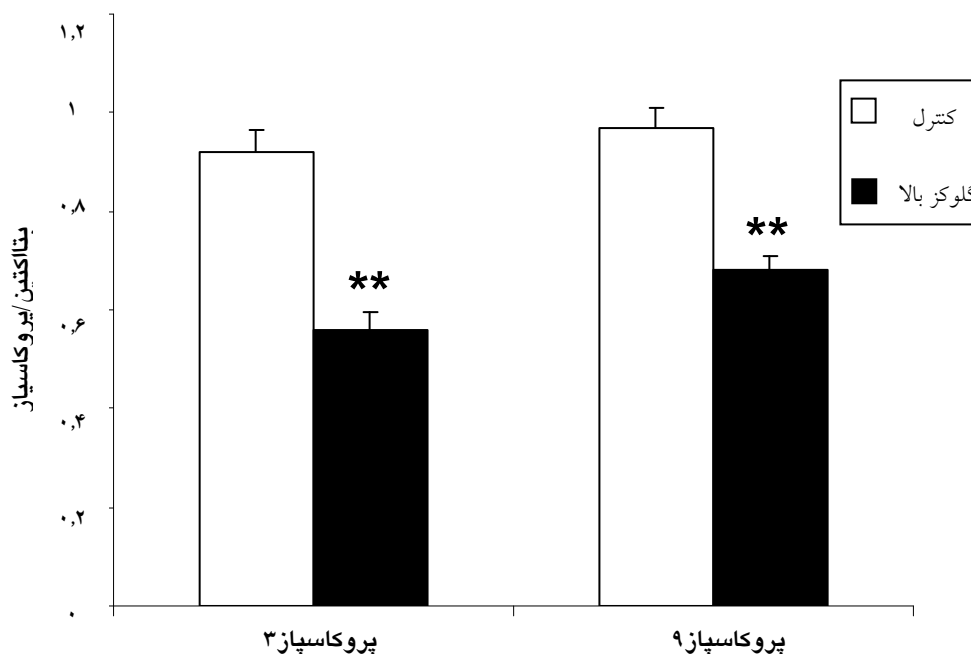
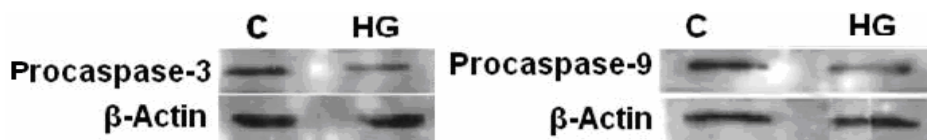
نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ نشان داده شده‌اند. مانیتول (۱۰۰ میلی مولار) بعنوان کنترل اسمزی بکار رفت. $P < 0/01$ ، $P < 0/001$ و $P < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل (۲۳ میلی مولار گلوکز).

تأثیر گلوکز بر روی میزان پروتئین

پروکاسپازهای ۳ و ۹ در سلول‌های PC12

کاسپازها به صورت پروآنزیم ساخته می‌شوند که بعد از دریافت پیام مرگ سلولی، به فرم فعال آنزیمی تبدیل می‌شوند [۲۷]. بنابراین برای نشان دادن ارتباط بین فعالیت آنزیمی کاسپازهای ۳ و ۹ با میزان پروتئین، پیشسازهای این

آنزیم‌ها توسط ایمونوبلات مورد بررسی قرار گرفت. تیمار کردن سلول‌ها با گلوکز (۱۰۰ mM) به مدت ۷۲ ساعت منجر به کاهش معنی‌دار در میزان پروکاسپاز ۳ و پروکاسپاز ۹ نسبت به کنترل شد (نمودار ۳) که با داده‌های حاصل از بررسی فعالیت آنزیمی همخوانی دارد و نشان دهنده فعال شدن هر دو کاسپاز مورد نظر می‌باشد.



آنالیز دانسیتومتری باندها بعد از نرمال کردن در برابر بتااكتين به عنوان کنترل داخلی، انجام شده است. نتایج به صورت \pm mean S.E.M نشان داده شده‌اند. $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل.

نمودار ۳- بررسی میزان پروتئین پروکاسپازهای ۳ و ۹ توسط روش ایمونوبلاتینگ در سلول‌های تیمار شده با گلوکز (۱۰۰ mM) بمدت ۷۲ ساعت (HG) و سلول‌های کنترل (C). تصاویر ایمونوبلات بر روی هر گراف مربوطه نشان داده شده است.

بحث

اگر چه نوروپاتی دیابتی یکی از شایع‌ترین عوارض مزمن و ناتوان کننده بیماری دیابت است، اما سازوکارهای مولکولی دخیل در ایجاد آن هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند [۲۸]. از بین سازوکارهایی که برای توضیح پاتوژنز نوروپاتی دیابتی

پیشنهاد شده، آپوپتوز نورون‌ها است که در اثر غلظت بالای گلوکز ایجاد می‌شود و توجه زیادی در سال‌های اخیر به خود جلب کرده است [۲۹]. در واقع، مطالعات زیادی وجود دارند که نشان می‌دهند نورون‌ها در اثر غلظت بالای گلوکز دچار آپوپتوز می‌شوند [۱۰-۷]. مطالعه قبلی ما نیز نشان داد که غلظت بالای گلوکز می‌تواند در سلول‌های PC12 که یک

افزایش فعالیت آنزیمی هر دو کاسپاز مورد نظر شد که به موازات کاهش میزان پروتئینی پروکاسپازهای ۹ و ۳ می‌باشد. این مشاهده با نتایج قبلی که بیانگر شروع آپوپتوز بعد از ۷۲ ساعت تیمار کردن با گلوکز بود و توسط افزایش نسبت بیان پروتئین Bax به Bcl2 و قطعه قطعه شدن DNA به اثبات رسید، همخوانی دارد. این مطالعه برای اولین بار در یک سیستم *in vitro* نشان داد که آپوپتوز ناشی از گلوکز در سلول‌های PC12، با فعال شدن کاسپازهای ۹ و ۳ همراه می‌باشد.

سازوکارهای آپوپتوزی که گلوکز به واسطه آنها موجب القای مرگ سولی می‌شود، بسته به نوع سلول و بافت مورد مطالعه متفاوت می‌باشد [۳۳]. به عنوان مثال، غلظت بالای گلوکز موجب مرگ سلول‌های مزانشیال کلیه انسان و نوروهای اولیه شاخه پشتی گانگلیون از طریق فعال کردن مسیر داخلی آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۹ می‌شود [۳۴ و ۳۵] که با داده‌های مطالعه حاضر در توافق می‌باشد. اما در سلول‌های نوروئی رتینال، آپوپتوز ناشی از گلوکز غیر وابسته به کاسپاز است و از طریق فاکتور القا کننده آپوپتوز (AIF) اعمال می‌شود [۳۶].

فعال شدن کاسپاز ۹ در نتیجه اختلال در غشای خارجی میتوکندری است که موجب تغییر پتانسیل غشا و نفوذپذیری آن می‌شود [۳۷]. مطالعه قبلی ما نشان داد که آپوپتوز القا شده در سلول‌های PC12، توسط گلوکز با افزایش بیان پروتئین Bax ارتباط دارد. Bax، پروتئین پروآپوپتوزی با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون از خانواده Bcl2 از تنظیم کننده‌های آپوپتوز می‌باشد که موجب افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری می‌شود. در نتیجه سیتوکروم C از میتوکندری رها شده و با Apaf1 تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم می‌دهد. این کمپلکس موجب فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۳ می‌شود [۲۰]. Bax همچنین می‌تواند موجب آپوپتوز غیر وابسته به کاسپاز شود [۲۱ و ۲۲]. در این حالت پیشنهاد شده است که AIF می‌تواند در غیاب کاسپاز، فرآیند آپوپتوز را پیش برد [۳۸]. قابل ذکر است که در مورد سلول‌های PC12، شروع آپوپتوز وابسته به فعال شدن همزمان MAP کینازهایی مانند JNK و p38 است که موجب الگومر شدن Bax و

رده سلولی عصبی می‌باشند، آپوپتوز ایجاد کند [۱۱]. اما با این حال هنوز جزئیات سازوکار آپوپتوزی در نوروها در اثر گلوکز مشخص نشده است [۳۰]. هدف این مطالعه بررسی مسیر مرگ سلولی وابسته به میتوکندری و کاسپاز ۳ و ۹ در آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 می‌باشد.

از آنجایی که هیپرگلیسمی به عنوان عامل خطر ساز اصلی برای نوروپاتی دیابتی در انسان شناخته شده است [۴]، در این مطالعه از یک مدل *in vitro* (کشت سلول‌های PC12 در محیط حاوی ۱۰۰mM گلوکز) استفاده شده است تا شرایطی مشابه هیپرگلیسمی که در جریان بیماری دیابت اتفاق می‌افتد، فراهم شود [۱۸، ۱۹ و ۳۱]. جهت اثبات این که سمیت عصبی گلوکز به دلیل افزایش اسمولاریته نیست و حاصل اثر مستقیم گلوکز بر روی سلول‌ها می‌باشد، از مانیتول (۱۰۰mM) به عنوان کنترل اسمزی استفاده شد. تحت شرایط فوق، آزمایش‌ها نشان داد که آپوپتوز ایجاد شده توسط غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 با فعال شدن کاسپازهای ۹ و ۳ و در نتیجه مسیر میتوکندریایی آپوپتوز، ارتباط دارد. در مقابل، مانیتول هیچگونه تغییر معنی داری در مقایسه با کنترل ایجاد نکرد که بیانگر عدم دخالت افزایش فشار اسمزی در آپوپتوز ناشی از گلوکز می‌باشد.

کاسپازها دسته‌ای از پروتئین‌های سیستئینی هستند که نقشی اساسی در فرآیند آپوپتوز ایفا می‌کنند [۳۲]. کاسپاز ۹، یک کاسپاز آغازگر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز می‌باشد و موجب فعال شدن کاسپاز ۳ یعنی کاسپاز اجرایی پایین دست می‌شود. کاسپازها به صورت پیش‌سازهای غیر فعال ساخته می‌شوند. در اثر پروتولیز پیش‌ساز ۵۱ کیلودالتونی کاسپاز ۹ و پیش‌ساز ۳۲ کیلودالتونی کاسپاز ۳، فرم فعال این دو کاسپاز ایجاد می‌شود [۱۴]. بنابراین کاهش میزان پروکاسپازها می‌تواند نشان دهنده فعال شدن کاسپازها باشد.

در مطالعه حاضر، جهت بررسی فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۹ در سلول‌های PC12، از دو روش مختلف استفاده شد: آنالیز فعالیت آنزیمی با استفاده از سوبستراهای سنتزی و آنالیز بیان پروتئینی پروکاسپاز به روش ایمونوبلاستینگ. تیمار کردن سلول‌ها با گلوکز بمدت ۷۲ ساعت موجب

بطور خلاصه داده‌های این تحقیق نشان داد که غلظت بالای گلوکز می‌تواند موجب مرگ سلول‌های PC12 از طریق مسیر داخلی آپوپتوز همراه با فعال شدن کاسپازهای ۹ و ۳ بشود. مطالعات بیشتری لازم است تا سازوکارهای دیگری که ممکن است در ایجاد مرگ سلولی ناشی از گلوکز بالا دخالت داشته باشند مشخص شود.

سپاسگزاری

از گروه رادیولوژی دانشکده پیراپزشکی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران صمیمانه قدردانی می‌شود. این مطالعه تحت حمایت مالی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است.

آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری می‌شوند [۳۹]. بنابراین فعال شدن این دو MAP کیناز، جزء اتفاقات آپپتوتیک قبل از فعال شدن آبشار کاسپازهای ۹ و ۳ در جریان آپوپتوز سلول‌های PC12 در اثر غلظت بالای گلوکز به حساب می‌آیند. از طرف دیگر، مطالعات نشان داده است که غلظت بالای گلوکز می‌تواند باعث افزایش میزان تولید ROS و NO در سلول‌های PC12 شود [۱۸ و ۳۱]. این استرس اکسیداتیو ممکن است به DNA آسیب وارد کند و موجب القا آپوپتوز وابسته به p53 شود. p53 با دخالت فاکتوری بنام ASC (apoptosis-associated speck-like protein) و Bax، موجب آزادسازی سیتوکروم C و فعال شدن کاسپازهای ۹ و ۳ می‌شود [۴۰].

مآخذ

1. Titus, T., Badet L. Gray D. W. Islet cell transplantation for insulin-dependant diabetes mellitus: perspectives from the present and prospects for the future. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2: 1-28.
2. King, H., Aubert R. E., Herman W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-31.
3. Sheetz, M. J. King G. L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *Jama* 2002; 288: 2579-88.
4. Dyck, P. J., Kratz K. M., Karnes J. L., Litchy W. J., Klein R., Pach J. M. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993; 43: 817-24.
5. Waldmeier, P. C., Tatton W. G. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? *Drug Discov Today* 2004; 9: 210-8.
6. Holder, M., Holl R. W., Bartz J., Hecker W., Heinze E., Leichter H. E., Teller W. Influence of long-term glycemic control on the development of cardiac autonomic neuropathy in pediatric patients with type I diabetes. *Diabetes Care* 1997; 20: 1042-3.
7. Sasaki, H., Schmelzer J. D., Zollman P. J., Low P. A. Neuropathology and blood flow of nerve, spinal roots and dorsal root ganglia in longstanding diabetic rats. *Acta Neuropathol* 1997; 93: 118-28.
8. Russell, J. W., Sullivan K. A., Windebank A. J., Herrmann D. N. Feldman E. L. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 347-63.
9. Srinivasan, S., Stevens M. J., Sheng H., Hall K. E., Wiley J. W. Serum from patients with type 2 diabetes with neuropathy induces complement-independent, calcium-dependent apoptosis in cultured neuronal cells. *J Clin Invest* 1998; 102: 1454-62.
10. Strasser, A., O'Connor L., Dixit V. M. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-45.
11. Sharifi, A. M., Mousavi S. H., Farhadi M., Larijani B. Study of high glucose-induced apoptosis in PC12 cells: role of bax protein. *J Pharmacol Sci* 2007; 104: 258-62.
12. Jiang, X. Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 87-106.
13. Talanian, R. V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M. C., Mankovich J. A., Banach D. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 1997; 272: 9677-82.
14. Creagh, E. M., Martin S. J. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 696-702.
15. Wang, Z. B., Liu Y. Q., Cui Y. F. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 2005; 29: 489-96.
16. Li, P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S., Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-89.
17. Nicholson, D. W., Thornberry N. A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 299-306.
18. Lelkes, E., Unsworth B. R., Lelkes P. I. Reactive oxygen species, apoptosis and altered NGF-induced signaling in PC12 pheochromocytoma cells cultured in elevated glucose: an in vitro cellular model for diabetic neuropathy. *Neurotox Res* 2001; 3: 189-203.

19. Martin, T. F., Grishanin R. N. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol* 2003; 71: 267-86.
20. Scorrano, L. Korsmeyer S. J. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 437-44.
21. Selznick, L. A., Zheng T. S., Flavell R. A., Rakic P., Roth K. A. Amyloid beta-induced neuronal death is bax-dependent but caspase-independent. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 271-9.
22. Xiang, J., Chao D. T., Korsmeyer S. J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 14559-63.
23. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
24. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
25. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
26. Thornberry, N. A. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol* 1994; 244: 615-31.
27. Boatright, K. M., Salvesen G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 725-31.
28. Yasuda, H., Terada M., Maeda K., Kogawa S., Sanada M., Haneda M. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 2003; 69: 229-85.
29. Kowluru, R. A. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1581-87.
30. Okouchi, M., Okayama N., Aw T. Y. Hyperglycemia potentiates carbonyl stress-induced apoptosis in naive PC-12 cells: relationship to cellular redox and activator protease factor-1 expression. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2: 375-86.
31. Koshimura, K., Tanaka J., Murakami Y., Kato Y. Involvement of nitric oxide in glucose toxicity on differentiated PC12 cells: prevention of glucose toxicity by tetrahydrobiopterin, a cofactor for nitric oxide synthase. *Neurosci Res* 2002; 43: 31-8.
32. Thornberry, N. A., Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
33. Allen, D. A., Yaqoob M. M., Harwood S. M. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 705-13.
34. Mishra, R., Emancipator S. N., Kern T., Simonson M. S. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int* 2005; 67: 82-93.
35. Russell, J. W., Golovoy D., Vincent A. M., Mahendru P., Olzmann J. A., Mentzer A., Feldman E. L. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J* 2002; 16: 1738-48.
36. Santiago, A. R., Cristovao A. J., Santos P. F., Carvalho C. M., Ambrosio A. F. High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiol Dis* 2007; 25: 464-72.
37. Danial, N. N., Korsmeyer S. J. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-19.
38. Cregan, S. P., Fortin A., MacLaurin J. G., Callaghan S. M., Cecconi F., Yu, T. M. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 2002; 158: 507-17.
39. Xia, Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R. J., Greenberg M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270: 1326-31.
40. Ohtsuka, T., Ryu H., Minamishima Y. A., Macip S., Sagara J., Nakayama K. I. ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 121-8.