

بررسی نقش استرس اکسیداتیو و کاسپاز ۸ در آپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلولهای PC12

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

چکیده

مقدمه: استرس اکسیداتیو با دیابت و عوارض آن مانند نوروپاتی در ارتباط می‌باشد. تاکنون سازوکارهای دقیق مولکولی سمیت ناشی از گلوکز بر روی سلول‌های عصبی مشخص نشده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط استرس اکسیداتیو با فعال شدن کاسپاز ۸، در مرگ سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 بود.

روش‌ها: آپتوز و استرس اکسیداتیو در سلول‌ها بترتیب توسط سنجش قطعه قطعه شدن DNA (DNA Ladder) و تست MDA ارزیابی شده است. جهت مهار کاسپازها، Z-VAD-FMK بکار برده شد و سپس میزان حیات سلولی توسط روش MTT بررسی شد. فعالیت آنزیمی کاسپاز ۸، به روش کالریمتری با استفاده از سوبستراهای سنتزی و تغییرات بیان پروتئین پروکاسپاز ۸ به روش ایمونوبلاتینگ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: الگوی قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های تیمار شده با غلظت بالای گلوکز مشاهده گردید. میزان تولید MDA در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد. مهار کننده عمومی کاسپازها توانست بصورت وابسته به دوز موجب افزایش توان حیاتی سلول‌های تیمار شده گردد. فعالیت آنزیمی کاسپاز ۸ در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل بطور معنی‌داری افزایش و میزان پروتئین پروکاسپاز ۸ بطور معنی‌داری کاهش یافت که بیانگر تبدیل آن به فرم فعال کاسپاز می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 تا اندازه‌ای وابسته به فعال شدن کاسپاز ۸ و مرتبط با استرس اکسیداتیو باشد.

واژگان کلیدی: PC12، گلوکز، استرس اکسیداتیو، آپتوز، کاسپاز ۸

۱- مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی و دپارتمان فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

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

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

* **نشانی:** تهران، اتوبان همت، جنب بیمارستان میلاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، دپارتمان فارماکولوژی و مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳ تلفن: ۰۰۲۱-۸۸۰۵۸۶۹۶، پست الکترونیک: sharifal@yahoo.com

مقدمه

هیپرگلیسمی ناشی از بیماری دیابت باعث تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن (استرس اکسیداتیو) می‌شود. این امر نقش اساسی در پاتوژنز نوروپاتی دیابتی ایفا می‌کند [۲،۱]. نوروپاتی‌های دیابتی، گروهی هتروژن از اختلالاتی هستند که سیستم عصبی حرکتی، حسی و اتونومیک را تحت تاثیر قرار می‌دهند و علت اصلی قطع عضو غیر ترومایی در بیماران دیابتی می‌باشند [۳]. استرس اکسیداتیو زمانی در یک سیستم سلولی اتفاق می‌افتد که میزان تشکیل رادیکال‌های آزاد در آن فراتر از توانایی آنتی‌اکسیدانی آن باشد. رادیکال‌های آزاد اثرات تخریبی بر روی DNA و پروتئین در سلول‌ها دارند و می‌توانند باعث فعال شدن سازوکارهای مرگ سلولی از جمله آپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده) شوند [۴،۵]. ثابت شده است که آپتوز منجر به از دست رفتن نورون‌ها در اکثر بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی (نورودژنراتیو) می‌شوند [۶]. مطالعات اخیر نیز نشان داده است که غلظت بالای گلوکز علت اصلی آسیب به سیستم عصبی می‌باشد [۷]. اطلاعات کمی در مورد اثر مستقیم سمی غلظت‌های بالای گلوکز بر روی سلول‌های عصبی وجود دارد. آپتوز به عنوان سازوکار احتمالی سمیت عصبی گلوکز مطرح شده است [۸-۱۲]. اما هنوز سازوکارهای دقیق مولکولی آپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز مشخص نشده است.

آپتوز نقش اساسی در تکامل نرمال و هموستاز بافت‌ها دارد و چنانچه در تنظیم آن اختلالی رخ دهد، می‌تواند در ایجاد بیماری‌های مختلف مانند سرطان، خودایمنی و اختلالات تحلیل‌برنده عصبی نقش داشته باشد. این فرم فعال مرگ سلولی بوسیله تغییرات مورفولوژیکی مانند متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه شدن DNA مشخص می‌شود [۱۳]. فرایند آپتوز توسط یک خانواده از سیستمین پروتئین‌ها بنام کاسپازها انجام می‌شود. 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 مسؤول تخریب پروتئین‌های سلولی هستند [۱۴]. کاسپازها

بصورت پروآنزیم (فرم غیر فعال) ساخته شده و بعد از دریافت پیام مرگ سلولی، به فرم فعال آنزیمی تبدیل می‌شوند [۱۵]. دو مسیر اصلی برای آپتوز شناسایی شده است: ۱- مسیر خارجی (مسیر وابسته به گیرنده‌های مرگ) ۲- مسیر داخلی (مسیر میتوکندریایی). مسیر خارجی آپتوز از طریق گیرنده‌های مرگ آغاز گردیده و منجر به فعال شدن کاسپاز ۸ می‌شود. کاسپاز ۸ فعال شده می‌تواند بطور مستقیم کاسپازهای اجرایی را فعال کند یا اینکه از طریق پروتئین Bid عمل کند [۱۶]. در مسیر داخلی، آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری، باعث فعال شدن کاسپاز ۹ با دخالت پروتئین Apaf-1 می‌شود و در نهایت کاسپازهای اجرایی فعال می‌شوند [۱۷]. بین این دو مسیر ارتباط تنگاتنگی وجود دارد بطوری که پروتئین Bid (سوبسترای کاسپاز ۸) پس از انتقال به میتوکندری، موجب رهاسازی سیتوکروم c می‌شود [۱۸].

رده سلولی PC12 که منشا آن فنوکروموسیتوم آدرنال رت می‌باشد، به عنوان مدل مناسب برای مطالعه نورون‌ها در تحقیقات استفاده شده است [۱۹،۲۰]. مطالعه قبلی ما نشان داد که غلظت بالای گلوکز می‌تواند در سلول‌های PC12 آپتوز ایجاد کند که با بررسی پدیده قطعه‌قطعه شدن DNA و افزایش نسبت پروتئین Bax به Bcl2، به اثبات رسید [۱۲]. استرس اکسیداتیو ممکن است از طریق میانجی‌هایی مانند p53 و NF- κ B در تنظیم بیان Bax و در فعال شدن کاسپازها نقش داشته باشد [۲۱،۲۲]. از طرف دیگر افزایش پروتئین Bax با مسیرهای آپتوزی وابسته به کاسپاز و نیز غیر وابسته به کاسپاز مرتبط بوده است [۲۵-۲۳]. اما گزارش‌هایی در مورد اینکه آیا کاسپاز ۸ نقشی در ایجاد آپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 دارد، موجود نیست. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی ارتباط استرس اکسیداتیو با فعال شدن کاسپاز ۸ (کاسپاز آغازگر در مسیر خارجی آپتوز)، در مرگ ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 به عنوان یک رده سلولی عصبی می‌باشد.

روش‌ها

سنجش قطعه قطعه شدن DNA (DNA Ladder)

در اثر آپیتوز، هسته سلول قطعه قطعه شده و بعد از الکتروفورز، به صورت نردبان (Ladder) ظاهر می‌شود. این پدیده یکی از راه‌های تشخیص آپیتوز می‌باشد. بطور خلاصه بعد از اتمام زمان تیمار، سلول‌ها در اتانول ۷۰٪ به مدت ۲۴ ساعت در 20°C - فیکس شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در 1000 g سانتریفیوژ گردید. رسوب سلول در 40 mL میکرولیتر بافر فسفات سیتریک اسید حل شد و در حرارت اتاق برای ۳۰ دقیقه نگاهداری شد. بعد از سانتریفیوژ در 1500 g به مدت ۵ دقیقه، در دستگاه Concentrator خشک گردیده و سپس 3 mL میکرولیتر از 0.25% NP40 و RNase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت 37°C درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس 10 mL میکرولیتر پروتیناز K اضافه شده و مجدداً در 37°C درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ 100 V ولت بر روی ژل آگاروز 1.5% الکتروفورز گردید [۲۵].

سنجش MDA

جهت اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد که مسبب واکنش استرس اکسیداتیو در سلول‌ها هستند، از تست MDA استفاده شد. این روش، بر پایه واکنش بین MDA (محصول بدست آمده از واکنش ROS با دزوکسی ریبوز) و معرفی به نام تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric Acid=TBA) استوار است [۲۶]. بطور خلاصه، بعد از اتمام زمان تیمار سلول‌ها با 100 mM گلوکز به مدت 72 ساعت ، محتوی چاهک‌ها را پیناژ کرده و 100 mL میکرولیتر از آن به همراه 100 mL میکرولیتر 8% SDS به مدت ۵ دقیقه در در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از اضافه کردن 200 mL میکرو لیتر از معرف (TBA + استیک اسید 20%) به آن، به مدت یکساعت در بن ماری 100°C قرار داده و بعد از سانتریفیوژ (به مدت 15 rpm با 3000)، میزان جذب مایع رویی حاصل در طول موج 532 nm نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از منحنی استاندارد MDA جهت محاسبه غلظت MDA در نمونه‌ها استفاده شد و نتایج به صورت میکرومولار MDA به ازای 3×10^4 سلول ($\mu\text{M MDA}/3 \times 10^4\text{ cells}$) بیان گردید.

کشت سلول‌های PC12

این سلول‌ها از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. مواد مورد نیاز کشت سلولی از شرکت Gibco و فلاسک‌ها و میکروپلیت‌ها از شرکت Greiner خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت (DMEM (Dulbecco's-Modified Eagle Medium) به همراه 5% سرم جنین گاوی (FBS (Fetal Bovine Serum)، 10% سرم اسب (Horse Serum) و 1% پنی سیلین - استرپتومایسین (100U/ml پنی سیلین و $100\mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین) و در انکوباتور (Memert, Germany) با رطوبت 90% ، 5% CO_2 و دمای 37°C کشت داده شدند. غلظت گلوکز در این محیط 23 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 می‌شدند. محیط کشت سلول‌ها هر 48 ساعت تعویض شد. 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 $3-2$ دقیقه در معرض تریپسین-EDTA قرار گرفتند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی گلوکز با غلظت‌های 23 mM (به عنوان گلوکز نرمال کنترل)، 50 mM ، 75 mM و 100 mM (به عنوان گلوکز بالا) کشت داده شدند. جهت انجام تست MDA و MTT، بعد از دو بار پاساژ دادن، سلول‌ها به پلیت‌های 24 و 96 خانه (در هر خانه 30000 و 50000 سلول به ترتیب) منتقل شدند. جهت استخراج پروتئین تام سلولی (که برای بررسی فعالیت آنزیمی و ایمونوبلاستینگ استفاده شد)، سلول‌ها در فلاسک 75 cm^2 کشت داده شدند و بعد از گذراندن زمان 24 ساعت با $100-23\text{ mM}$ گلوکز یا 100 مانیتول (به عنوان کنترل اسمولاری) به مدت 72 ساعت تیمار شدند.

بررسی مهار عمومی کاسپازها

سلول‌ها در حضور یا عدم حضور مهار کننده عمومی کاسپازها، Z-VAD-FMK (۱۰۰-۶/۲۵ میکرومولار) به مدت ۷۲ ساعت با mM ۱۰۰ گلوکز تیمار شده و سپس محلول MTT (۵ mg/ml در PBS) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفتند. بعد از اتمام این زمان، محتوای چاهک‌ها تخلیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر کدام اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جهت حل کردن رسوب‌های بنفش MTT، تکان داده شد. MTT زرد رنگ هنگامی که وارد سلول‌های زنده می‌شود، بوسیله آنزیم دهیدروژناز این سلول‌ها احیا می‌شود و رسوب بنفش رنگ ایجاد می‌کند [۲۷]. جذب نوری آن بوسیله الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است و توان حیاتی سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل به صورت زیر محاسبه می‌گردد: $\text{تیمار شده } 100 \times = \text{درصد زنده ماندن سلول‌ها}$

استخراج پروتئین تام سلولی

سلول‌های کنترل و تیمار شده با استفاده از محلول تریپسین-EDTA از ته فلاسک کنده و با PBS شستشو داده شدند. سپس با محلول لیز کننده سلولی یا RIPA [PBS 1X]، ۱٪ NP-40، ۰/۵٪ سدیم داکسی کولات، ۰/۱٪ SDS، ۰/۱ mg/ml، ۰/۱ فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) و ۳۰ $\mu\text{l/ml}$ 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 (در 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 [۲۸] و BSA به عنوان استاندارد بکار رفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی کاسپاز ۸

فعالیت آنزیمی کاسپاز ۸ بوسیله روش کالریمتری اندازه‌گیری شد که بر اساس تشخیص توالی‌های خاص اسیدهای آمینه در سوبسترا توسط کاسپازها می‌باشد. سوبستراها یک تتراپپتید می‌باشند که با ماده رنگی پارانیتروآنیلین (pNA) نشان دار شده‌اند. pNA در اثر واکنش کاسپازها با سوبسترا، از آن جدا می‌شود و تولید رنگ زرد می‌کند که توسط دستگاه الیزا، جذب نوری آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر محاسبه می‌شود. میزان تولید رنگ در اثر شکسته شدن سوبسترا متناسب با فعالیت آنزیمی کاسپاز در نمونه مورد نظر است [۲۹]. بطور خلاصه، لیزات‌های تام سلولی در بافر اندازه‌گیری کاسپاز (۱۰۰ میلی‌مولار HEPES با pH برابر ۷/۴، ۰/۵ میلی‌مولار EDTA، ۲۰٪ گلیسرول، ۵ میلی‌مولار دی تیوتریتول) به همراه ۱۰۰ میکرومولار سوبسترای اختصاصی کاسپاز (Ac-IETD-pNA از شرکت Alexis Biochemicals) به مدت ۴ ساعت در 37°C انکوبه شدند و سپس جذب نوری آن محاسبه گردید. فعالیت آنزیمی کاسپاز به صورت نانومول pNA آزاد شده طی یک ساعت از یک میلی‌گرم پروتئین تام سلولی (nmol pNA/h/mg protein) بیان می‌شود که با استفاده از منحنی استاندارد pNA محاسبه می‌گردد.

روش ایمونوبلاتینگ برای سنجش مقدار پروتئین پروکاسپاز ۸

ابتدا نمونه‌های پروتئینی را با بافر نمونه 5X حاوی ۶۲ میلی‌مولار Tris-HCl (pH=۶/۸)، ۲٪ SDS، ۲۵٪ گلیسرول، ۵٪ مرکاپتواتانول و ۰/۰۲٪ بروموفنول بلو، مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در 95°C جوشانده شدند. میزان یکسانی از پروتئین‌های استخراج شده از سلول‌های کنترل و تیمار شده با گلوکز، به روش SDS-PAGE الکتروفورز شده [۳۰] و باندهای پروتئینی به روش بلاتینگ به روی ورقه پلی وینیلیدن دی فلوراید (PVDF) منتقل شد. SDS-PAGE و بلاتینگ به ترتیب توسط دستگاه‌های Mini-Protean 4 Cell و Mini-Trans Blot (شرکت Bio-Rad) انجام گردید.

آنالیز آماری

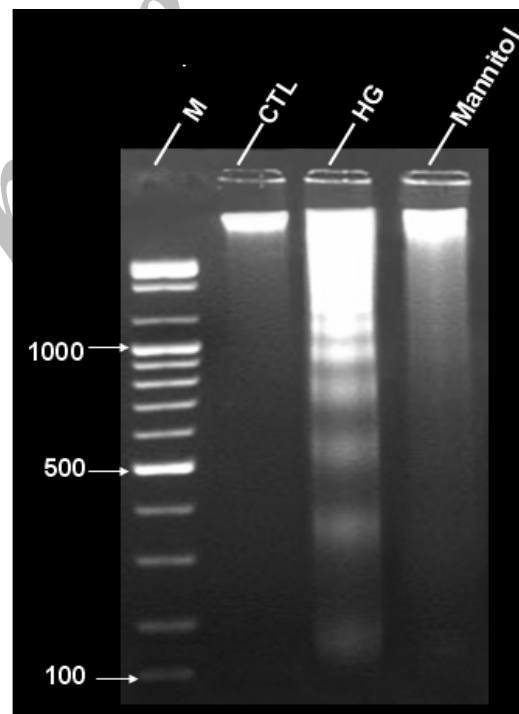
داده‌های مربوط به تست MDA، اندازه‌گیری توان حیاتی سلول‌ها، فعالیت آنزیمی و ایمونوبلاستینگ، حاصل ۳ تا ۸ آزمایش جداگانه بود که به صورت میانگین \pm استاندارد خطای میانگین (Mean \pm S.E.M) نشان داده شدند. اختلاف آماری بین گروه‌های کنترل و تیمار شده با استفاده از Unpaired Student's Test بررسی شد. در این مطالعه $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

نتایج DNA Ladder

تیمار کردن سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با ۱۰۰ mM گلوکز، باعث ایجاد الگوی نردبانی بعد از الکتروفورز DNA شد که موید آپتوز می‌باشد (شکل ۱) در حالی که چنین الگویی در سلول‌های کنترل نرمال گلوکز و سلول‌های تیمار شده با ۱۰۰ mM مانیتول (کنترل منفی) دیده نشد.

محل باندهای پروتئینی و راندمان انتقال به طریق رنگ‌آمیزی 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 پروکاسپاز ۸، از آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال بر علیه این پروتئین استفاده شد (BioVision, Mountain View, CA, USA). از آنتی‌بادی اولیه بر علیه بتا اکتین نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. این آنتی‌بادی‌ها توسط آنتی‌بادی ثانویه متصل به پراکسیداز (HRP) (Roche Applied Science) شناسایی و به طریق لومینسانس (Roche ECL chemiluminescence detection kit) ظاهر گردید. فیلم ظاهر شده، اسکن گردیده و شدت باندهای حاصل با استفاده از آنالیز دانسیتومتری بصورت کمی بیان گردید.



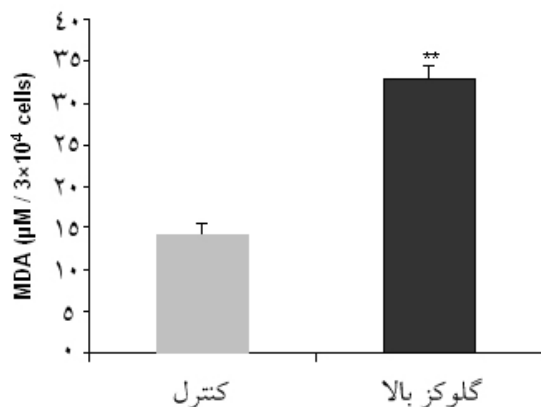
سلول‌ها با گلوکز نرمال (CTL)، گلوکز بالا (HG) و یا مانیتول (کنترل منفی) به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. M نشان دهنده مارکر می‌باشد.

شکل ۱- نمایش قطعه قطعه شدن و یا نردبان DNA سلول‌های PC12 پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز

با استفاده از معرفی به نام تیوباربتوریک اسید انجام شد. تیمار کردن سلول‌ها با ۱۰۰ mM گلوکز به مدت ۷۲ ساعت موجب افزایش معنی‌دار در تولید MDA (3×10^4 سلول M / $32/8 \pm 2/9$ μM) در مقایسه با سلول‌های کنترل (3×10^4 سلول / $14/1 \pm 1/1$ μM) گردید (نمودار ۲).

تاثیر گلوکز بر روی استرس اکسیداتیو در سلول‌های PC12

افزایش تولید MDA نشان دهنده پراکسیداسیون لیپیدها به خصوص در غشاهای سلولی می‌باشد. میزان تولید MDA (به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو) به روش کالریمتری



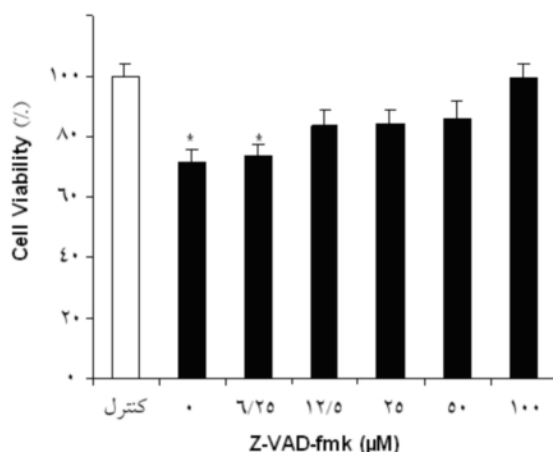
نتایج به صورت Mean ± S.E.M نشان داده شده‌اند. $P < 0.01$ ** در مقایسه با گروه کنترل.

نمودار ۲- تاثیر گلوکز بر روی میزان تولید MDA در سلول‌های PC12. سلول‌ها بمدت ۷۲ ساعت با ۱۰۰ mM گلوکز تیمار شدند.

Z-VAD-FMK (۱۰۰-۶۲۵ میکرومولار)، پیش تیمار شدند و سپس تحت تیمار با گلوکز قرار گرفتند، توان حیاتی آنها افزایش پیدا کرد بطوری که در غلظت ۱۰۰ میکرومولار Z-VAD-FMK، درصد زنده ماندن آنها (۹۹/۴٪) بسیار شبیه سلول‌های کنترل (۱۰۰٪) بود.

تاثیر مهار کننده عمومی کاسپازها بر روی حیات سلولی در حضور غلظت بالای گلوکز

تیمار کردن سلول‌ها با گلوکز (۱۰۰ mM) به مدت ۷۲ ساعت) موجب کاهش معنی‌دار توان حیاتی ($P < 0.05$) در مقایسه با سلول‌های کنترل گردید. زمانی که سلول‌های PC12 به مدت ۳ ساعت با غلظت‌های افزایش یابنده



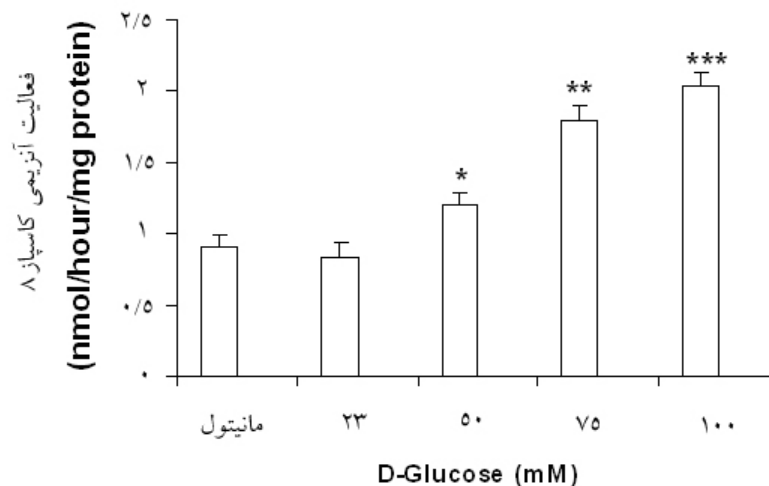
نتایج به صورت Mean ± S.E.M نشان داده شده‌اند. $P < 0.05$ ** در مقایسه با گروه کنترل.

نمودار ۳- سنجش حیات سلولی با استفاده از تست MTT. مهار کننده عمومی کاسپازها (Z-VAD-FMK) توانست به صورت وابسته به دوز موجب افزایش توان حیاتی سلول‌های PC12 تحت تیمار با گلوکز (۱۰۰ mM بمدت ۷۲ ساعت) گردد.

کرد که نشان دهنده دخالت کاسپاز ۸ در آپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 می‌باشد. مانتول (۱۰۰ mM) که به عنوان کنترل اسمزی استفاده شد، هیچگونه تاثیری بر فعالیت کاسپاز ۸ نداشت و بنابراین آپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز مستقل از افزایش فشار اسمزی می‌باشد (نمودار ۴).

تاثیر گلوکز بر روی فعالیت آنزیمی کاسپاز ۸ در سلول‌های PC12

کاسپاز ۸ نقش کاسپاز آغازگر در مسیر خارجی آپتوز ایفا می‌کند. فعالیت کاسپازی با استفاده از سوبسترای کروموزنیک اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی کاسپاز ۸ بعد از تیمار کردن سلول‌های PC12 با گلوکز (۱۰۰-۲۳ mM) به مدت ۷۲ ساعت، به صورت وابسته به دوز افزایش پیدا

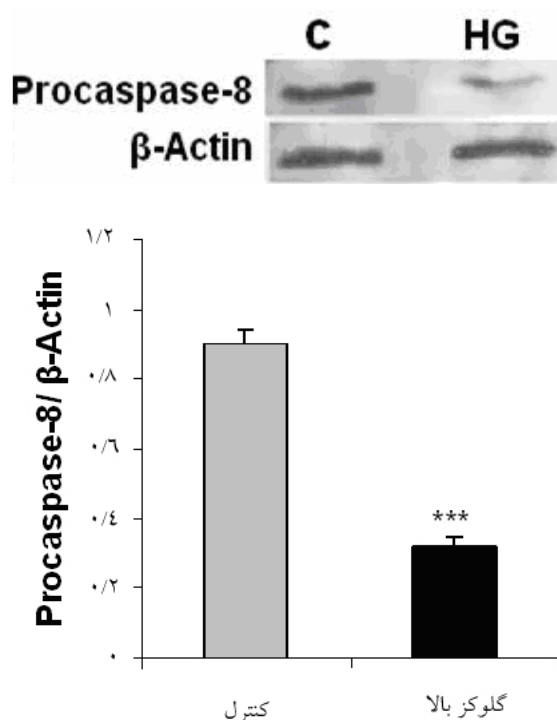


نتایج به صورت Mean \pm S.E.M نشان داده شده‌اند. $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل (۲۳ میلی‌مولار گلوکز). نمودار ۴- تاثیر گلوکز بر روی فعالیت آنزیمی کاسپاز ۸ در سلول‌های PC12. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های افزایش یابنده گلوکز (۱۰۰-۲۳ mM) تیمار شدند. مانتول (۱۰۰ میلی‌مولار) به عنوان کنترل اسمزی بکار رفت.

توسط ایمونوبلات مورد بررسی قرار گرفت. تیمار کردن سلول‌ها با گلوکز (۱۰۰ mM) به مدت ۷۲ ساعت منجر به کاهش معنی‌دار در میزان پروکاسپاز ۸ نسبت به کنترل شد (نمودار ۵) که با داده‌های حاصل از بررسی فعالیت آنزیمی همخوانی دارد و نشان دهنده فعال شدن این کاسپاز می‌باشد.

تاثیر گلوکز بر روی میزان بیان پروتئین پروکاسپاز ۸ در سلول‌های PC12

کاسپازها به صورت پروآنزیم ساخته می‌شوند که بعد از دریافت پیام مرگ سلولی، به فرم فعال آنزیمی تبدیل می‌شوند [۳۱]. بنابراین برای نشان دادن ارتباط بین فعالیت آنزیمی کاسپاز ۸ با میزان پروتئین، پیش‌ساز این آنزیم



نتایج بصورت Mean ± S.E.M نشان داده شده‌اند. $***P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل.

نمودار ۵- بررسی میزان پروتئین پروکاسپاز ۸ توسط روش ایمونوبلاتینگ در سلول‌های تیمار شده با گلوکز (۱۰۰mM) به مدت ۷۲ ساعت (HG) و سلول‌های کنترل (C). تصویر ایمونوبلات بر روی گراف نشان داده شده است. آنالیز دانسیتومتری باندها بعد از نرمال کردن در برابر بتا‌اکتین به عنوان کنترل داخلی، انجام شده است.

بحث

PC12 که یک رده سلولی عصبی می‌باشد، آپتوز ایجاد کند [۱۲]. اما با این حال هنوز جزئیات سازوکار آپتوزی در نورون‌ها در اثر گلوکز مشخص نشده است [۳۷]. هدف این مطالعه بررسی ارتباط استرس اکسیداتیو با فعال شدن کاسپاز ۸ (کاسپاز آغازگر در مسیر خارجی) در آپتوز 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 [۳]، 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 [۱۹،۲۰]. جهت اثبات این که سمیت عصبی گلوکز به دلیل افزایش اسمولاریته نیست و حاصل اثر مستقیم گلوکز بر روی سلول‌ها می‌باشد، از مانتول (۱۰۰mM) بعنوان کنترل اسمزی استفاده شد. تحت شرایط فوق، بررسی‌ها نشان داد که آپتوز ایجاد شده توسط غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12، تا اندازه‌ای وابسته به فعال

با وجود اینکه نوروپاتی دیابتی یکی از شایع‌ترین عوارض بیماری دیابت می‌باشد، هنوز سازوکارهای مولکولی دخیل در ایجاد آن به خوبی شناخته نشده است [۳۲]. استرس اکسیداتیو که عبارت از عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن است، با عوارض ناشی از دیابت مانند نوروپاتی در ارتباط می‌باشد [۱،۲]. افزایش رادیکال‌های آزاد نتیجه افزایش متابولیسم گلوکز در میتوکندری و یا سیکل پنتوز فسفات می‌باشد [۳۳]. همچنین گلوکز از طریق فعال کردن نیتریک اکسید سنتتاز میزان نیتریک اکسید را افزایش می‌دهد [۳۴]. رادیکال‌های آزاد یک عامل شناخته شده فعال کننده مسیرهای سیگنالی آپتوز در سلول‌های مختلف می‌باشند [۳۵،۳۶]؛ در واقع، مطالعات زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد نورون‌ها در اثر غلظت بالای گلوکز دچار آپتوز می‌شوند [۸-۱۱]. مطالعه قبلی ما نیز نشان داد که غلظت بالای گلوکز می‌تواند در سلول‌های

می‌شود [۴۰، ۴۱] که با داده‌های مطالعه حاضر در توافق می‌باشد. اما در سلول‌های نورونی رتینال، آپتوز ناشی از گلوکز غیر وابسته به کاسپاز است و از طریق فاکتور القا کننده آپتوز (AIF) اعمال می‌شود [۴۲].

در این مطالعه سازوکارهایی که رادیکال‌های آزاد بوسیله آن موجب فعال شدن کاسپاز ۸ در سلول‌های PC12 می‌شود، بررسی نشده است. مسیر اصلی برای فعال شدن کاسپاز ۸ از طریق گیرنده‌های مرگ و با دخالت مولکول FADD می‌باشد [۴۳]. اما شواهد مطالعات *In vivo* و *In vitro* نشان داده‌اند که فعال شدن کاسپاز ۸ انحصاراً وابسته به گیرنده‌های مرگ نیست و می‌تواند بطور مستقل توسط میانجی‌های درون سلولی مانند رادیکال‌های آزاد صورت گیرد [۴۴، ۴۵]. فعال شدن کاسپاز ۸ در سلول‌های مختلف در پاسخ به انواع استرس اکسیداتیو مشاهده گردیده و سازوکارهای متنوعی برای آن پیشنهاد شده است. مثلاً دیده شده است که استرس اکسیداتیو نفوذپذیری غشای لیزوزوم را افزایش داده و متعاقباً رها شدن کاتپسین D و E از آن، کاسپاز ۸ را فعال می‌کند [۳۵]. مسیرهای سیگنالی وابسته به پروتئین کینازهایی از خانواده MAPK مانند p38، JNK، ERK و ASK1 نیز در فعال شدن کاسپازها از جمله کاسپاز ۸ ناشی از استرس اکسیداتیو در نورون‌ها دخیل هستند [۴۶-۴۸]. استرس اکسیداتیو نیز ممکن است به DNA آسیب وارد کند و موجب فعال شدن کاسپاز ۸ بدون دخالت گیرنده‌های مرگ بشود [۴۹].

بطور خلاصه داده‌های این تحقیق نشان داد که آپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های PC12 همراه با فعال شدن کاسپاز ۸ و مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌باشد. مطالعات بیشتری لازم است تا سازوکارهای دیگری که ممکن است در ایجاد مرگ سلولی ناشی از گلوکز بالا دخالت داشته باشند مشخص شوند.

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 تهران انجام شده است.

شدن کاسپاز ۸ و مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌باشد. در مقابل، مانیتول هیچگونه تغییر معنی داری در مقایسه با کنترل ایجاد نکرد که بیانگر عدم دخالت افزایش فشار اسمزی در آپتوز ناشی از گلوکز می‌باشد.

کاسپازها دسته‌ای از پروتئازهای سیستئینی هستند که نقش اساسی در فرایند آپتوز ایفا می‌کنند [۳۸]. کاسپاز ۸ یک کاسپاز آغازگر در مسیر خارجی آپتوز می‌باشد و موجب فعال شدن کاسپاز ۳ یعنی کاسپاز اجرایی پایین دست می‌شود. کاسپازها به صورت پیش‌سازهای غیر فعال ساخته می‌شوند. در اثر پروتئولیز، پیش‌ساز ۵۵ کیلودالتونی کاسپاز ۸، فرم فعال این کاسپاز ایجاد می‌شود [۱۵]. بنابراین کاهش میزان پروکاسپازها می‌تواند نشان دهنده فعال شدن کاسپازها باشد.

در مطالعه حاضر، میزان تولید MDA (بعنوان شاخص استرس اکسیداتیو) در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد. مهار کننده عمومی کاسپازها، z-VAD-fmk، توانست بطور موثر مرگ سلولی را مهار کند که این نشان دهنده دخالت کاسپازها در مرگ سلولی ناشی از گلوکز می‌باشد. جهت بررسی فعال شدن کاسپاز ۸ 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 به مدت ۷۲ ساعت موجب افزایش فعالیت آنزیمی کاسپاز مورد نظر همراه با فراگمتاسیون DNA شد که به موازات کاهش میزان پروتئین پروکاسپاز ۸ می‌باشد. این مشاهده با نتایج قبلی که بیانگر شروع آپتوز 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 آپتوز ناشی از گلوکز در سلول‌های PC12 همراه با فعال شدن کاسپاز ۸ می‌باشد.

سازوکارهای آپتوزی که گلوکز بواسطه آنها موجب القای مرگ سولی می‌شود، بسته به نوع سلول و بافت مورد مطالعه متفاوت می‌باشد [۳۹]. به عنوان مثال غلظت بالای گلوکز، موجب مرگ سلول‌های لاکتوتروف رت و توبولی کلیه انسان با واسطه استرس اکسیداتیو و فعال کردن کاسپاز ۸

مأخذ

1. Vincent AM., Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 368-83.
2. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004; 25: 612-28.
3. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, et al. 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.
4. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 323-33.
5. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5: 415-8.
6. Waldmeier PC, Tatton WG. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? *Drug Discov Today* 2004; 9: 210-8.
7. Holder M, Holl RW, Bartz J, Hecker W, Heinze E, Leichter HE, et al. 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.
8. Sasaki H, Schmelzer JD, Zollman PJ, Low PA. Neuropathology and blood flow of nerve, spinal roots and dorsal root ganglia in longstanding diabetic rats. *Acta Neuropathol* 1997; 93: 118-28.
9. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 347-63.
10. Srinivasan S, Stevens MJ, Sheng H, Hall KE, Wiley JW. 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.
11. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-45.
12. Sharifi AM, Mousavi SH, Farhadi M, Larijani B. Study of high glucose-induced apoptosis in PC12 cells: role of bax protein. *J Pharmacol Sci* 2007; 104: 258-62.
13. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258: 479-517.
14. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, et al. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 1997; 272: 9677-82.
15. Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 696-702.
16. Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* 2006; 208: 319-26.
17. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 87-106.
18. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
19. Lelkes E, Unsworth BR, Lelkes PI. 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.
20. Martin TF, Grishanin RN. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol* 2003; 71: 267-86.
21. Kang BP, Frencher S, Reddy V, Kessler A, Malhotra A, Meggs LG. High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F455-66.
22. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 2000; 404: 892-7.
23. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 437-44.
24. Selznick LA, Zheng TS, Flavell RA, Rakic P, Roth KA. Amyloid beta-induced neuronal death is bax-dependent but caspase-independent. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 271-9.
25. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14559-63.
26. Gutteridge JM, Quinlan GJ. Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *J Appl Biochem* 1983; 5: 293-9.
27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
28. Bradford MM. 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.
29. Thornberry NA. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol* 1994; 244: 615-31.
30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
31. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 725-31.
32. Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, et al. Diabetic neuropathy

- and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 2003; 69: 229-85.
33. Wu L, Nicholson W, Knobel SM, Steffner RJ, May JM, Piston DW, et al. Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines. *J Biol Chem* 2004; 279: 12126-34.
 34. 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.
 35. Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, Ashurst LH, Barrow SL, Chvanov MA, et al. Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G296-307.
 36. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7: 153-63.
 37. Okouchi M, Okayama N, Aw TY. 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.
 38. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
 39. Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 705-13.
 40. Arroba AI, Frago LM, Argente J, Chowen JA. Activation of caspase 8 in the pituitaries of streptozotocin-induced diabetic rats: implication in increased apoptosis of lactotrophs. *Endocrinology* 2005; 146: 4417-24.
 41. Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F, et al. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 Suppl 1: S85-7.
 42. Santiago AR, Cristovao AJ, Santos PF, Carvalho CM, Ambrosio AF. High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiol Dis* 2007; 25: 464-72.
 43. Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 2003; 4: 404-9.
 44. Inman GJ, Allday MJ. Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent. *J Immunol* 2000; 165: 2500-10.
 45. Von Haefen C, Wieder T, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dorken B, Daniel PT. Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop. *Oncogene* 2003; 22: 2236-47.
 46. Sumbayev VV, Yasinska IM. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys* 2005; 436: 406-12.
 47. Choi WS, Eom DS, Han BS, Kim WK, Han BH, Choi EJ, et al. Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2004; 279: 20451-60.
 48. Sarker KP, Biswas KK, Yamakuchi M, Lee KY, Hahiguchi T, Kracht M, et al. ASK1-p38 MAPK /JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death. *J Neurochem* 2003; 85: 50-61.
 49. Vit JP, Guillouf C, Rosselli F. Futile caspase-8 activation during the apoptotic cell death induced by DNA damaging agents in human B-lymphoblasts. *Exp Cell Res* 2001; 269:2-12.