پژوهش و سازندگی
در امور دام و آبزیان
شماره ۶۲، بهار ۱۳۸۳

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

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

چکیده

مرگ سلولهای موجودات زنده به دو طریق اتفاق می افتد که عبارتند از ۱- نکروز (Necrosis) ۲- 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 شیمیائی 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). مطالعات اخیر نشان داده است که مرگ برنامه ریزی شده سلول از دو راه صورت می گیرد :۱ـ راه میتوکندری ۲ـ راه گیرنده های مرگ سلولی(۱). 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 (Caspas) فعال و مرگ برنامه ریزی شده (.AP) اتفاق می افتد(۳). هدف ما از این تحقیق بررسی دقیق تغییرات ساختمانی لیزوزمها در زمان تماس آنها با Bax در شرایط آزمایشگاهی بود. ابتدا لیزوزمها 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 برروی آنها Bax رادر زمانهای مختلف تاثیر دادیم. سپس نمونه های هر دو گروه فیکس شده ومرا 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 ۲۰۰۰۰-۱۰۰۰۰تمام نمونه ها مورد مطالعه قرار داده شد و به این نتیجه رسیدیم که استفاده از ترکیبات Bax می‌تواند 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 به‌دنبال آن آنزیمهای آزاد شده می‌توانند باعث تخریب سلول شده و پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول(.AP) را تسریع کنند .

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

Pajouhesh & Sazandegi No 62 pp: 10-13

A transmition 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, Facullty 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, chimicals, 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 ultrastractural 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 transmition electron microscope. The ultrastructural changes in lysosome, induced by Bax proteins were membrane shrinkage, granulation of the matrix and the rupture 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 شـده سـلول از دوران جنینی به صورت یک روند طبیعی تا دوره بلوغ که تحت تاثیر عوامل محرک (شیمیائی ،ویروسـها...)می باشـد اتفاق می افتدکه 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 تکه‌تکه شدن هسته را مشاهده کرد و سپس Wyllieدر سال ۱۹۸۰ وHorvits در سال ۱۹۸۶ این تحقیقات را کامل کردند(۵،۱۰).

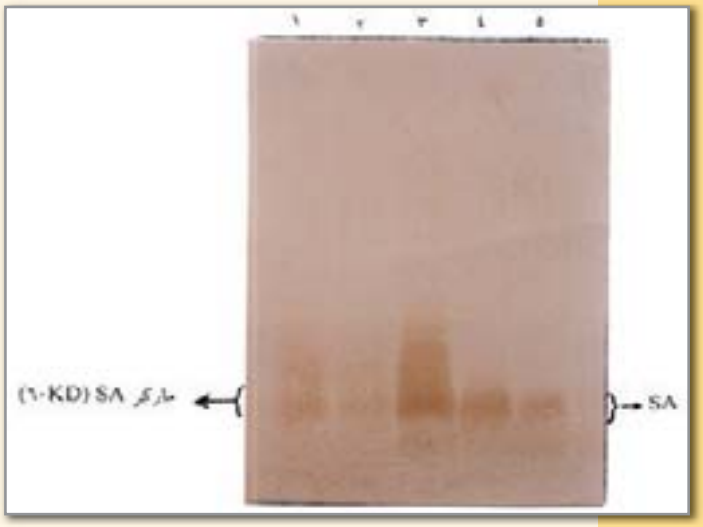
سـلول در طی فرایند مرگ برنامه ریزی شـده دچار تغییرات ساختمانی می شود که به‌ترتیب عبارتند از : ۱ـ خروج آب از داخل سلول (Cell dehydration) ۲ ـ متراکم شدن کروماتین Chromatin condensation ۳- متراکم گشتن و چروکیده شدن هسته Pycnosis ۴- تکه تکه شـدن هسـته Karyorrhexis ۵ ـ متلاشی شدن سلول و تبدیل آن به اجسام آپوپتوتیک(Apoptoti c bodis) که به‌وسیله ماکروفاژهای 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 به طور مستقیم باعث تغییر کاتپسین‌ها (سیستئین پروتئاز لیزوزومها) و تبدیل آنها به آنزیمهای کاسپز(Caspase) می‌شوند و این کاسپزها با تاثیر بر غشاء سلول و هسته و ارگانلهای داخل سلول باعث بروز تغییرات ساختمانی و فرآیند مرگ برنامه ریزی شده می‌شوند (۲، ۱۱).

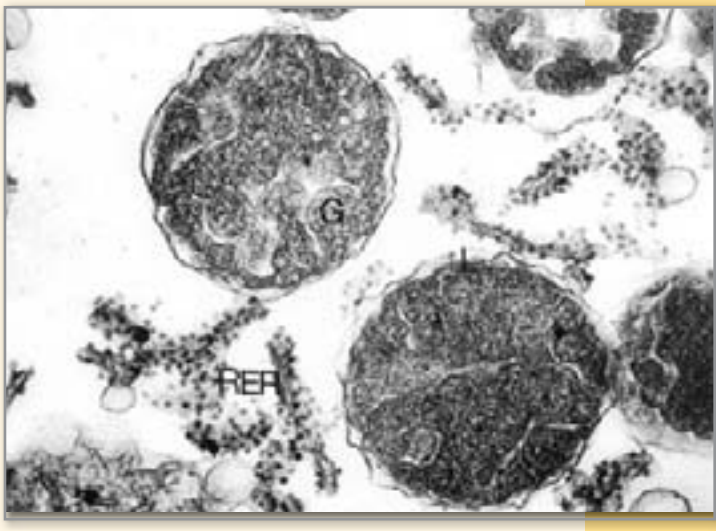
تحقیقات Ferriدر سـال ۲۰۰۱ نشـان داد که ارگانلهای داخل سـلول مثل لیزوزومها، شـبکه اندوپلاسمیک و دستگاه گلژی در سـطح داخل خود دارای گیرنده‌های اختصاصی هسـتند که در فرآیند مرگ برنامه ریزی شـده پاسـخ‌های خاص از خود نشـان می‌دهند(۳). لذا در این تحقیق ما بر آن شـدیم که تغییرات سـاختمانی لیزوزومهای کبد موش را که تحت تاثیر Bax قرار گرفته‌اند به وسیله TEM مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش کار

ابتـدا ۵ عـدد موش خانگی نـژاد *S. dawli* بالغ را انتخاب و آنها را با کلروفرم کشـته و بلافاصله کبد آنهارا خـارج و در لوله های مخصوص به همراه سـرم فیزیولوژی ریخته شـد وسپس آنرا به آرامی به وسیله هاونهای مخصوص له کردیم تا دیواره سـلولهای کبدی از بین برود (همو ژنیزاسـیون). بعـد از ۲۰ دقیقه که لوله را در شـرایط یخچال و ثابت نگه داشتیم، مایع روی لوله را در دو مرحله سانتریفوژ کردیم ابتدا با ۱۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه (برای جدا کردن هسـته سپس مایع روی لوله را دوباره بـا rpm ۱۰۰۰۰ بـه مدت ۲۰ دقیقه سـانتریفوژ کردیـم در این مرحله لیزوزمها در انتهای لوله آزمایش جدا شـدند سـپس لیزوزمها را به ۲ گروه



تصویر شماره ۱ـ لیزوزومهای طبیعی با ماده زمینه یکنواخت و غشاء صاف
(گروه شاهد) بزرگنمائی ۱۵۰۰۰
NL :لیزوزم طبیعی



تصویر شماره ۲ ـ لیزوزوم بعد از تاثیرBax (غشایٔ چروکیده و ماده زمینه
شکاف‌دار) L ۱۵۰۰۰ :لیزوزم G :گرانول
RER :شبکه اندو پلاسمیک خشن

تقسیم کردیم: گروه شاهد که هیچ ماده‌ای را بر روی لیزوزومها تاثیر ندادیم و گروه دوم کهBax را در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه بر آنها تاثیر داده و بلافاصله نمونه های 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 نمونه های لیزوزوم و تاثیر Bax بر آنها در دانشکده داروسازی دانشگاه اوزاکا انجام گرفت).

۱ـ : Fixation ثابت کردن بافت به وسیله محلول گلوتار الدئید و پارا فرمالدئید۲٪
۲ - Washing: ۴ مرتبه با فسفات بافر ۰/۱ مولار
۳ - Osmium : یک ساعت در محلول۰/۲ مولار
۴ ـ Dehydration: با استفاده از الکل به ترتیب ۵۰٪ - ۷۰٪ - ۸۰٪ - ۹۰٪ - ۹۵٪ ـ ۱۰۰٪ هر مرحله ۲ بار به فاصله ۵ دقیقه
۵ ـ ۲ Qy۱: مرتبه به فاصله ۵ دقیقه
۶ ـ تهیه Epon وقرار 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 ـ تهیه برشهای نازک به ضخامت ۱۰۰-۵۰ نانو متر(مقاطع طلائی رنگ) به وسیله اولترامیکروتوم و با استفاده از تیغه الماس
۸ ـ قرار دادن نمونه‌ها بر روی گریدهای مسی
۹ـ رنگ آمیزی نمونه با اورانیل و سرب
۱۰ ـ مشاهده و مطالعه لیزوزومها به وسیله میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن با بزرگنمائی ۲۰۰۰۰-۱۰۰۰۰ 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 نمونه های شاهد که از ترکیبات Bax استفاده نشده بود اکثر لیزوزمها ساختمان طبیعی داشتند که شامل ماده زمینه یکنواخت در وسط لیزوزم و غشاء لیزوزمها نیز به‌طور یکنواخت و صاف در اطراف آنها بود (تصویر شماره ۱).

اما با تاثیرBax در زمانهای مختلف تغییراتی در ساختمان لیزوزمها ایجاد می گردید که همانطور که در تصویر شماره ۲ دیده می شود غشاء آنها چروکیده و نامنظم شده و در ماده زمینه شکافهای بوجود آمده است که نشان دهنده تغییرات اولیه در غشاء و ماده زمینه داخل لیزوزومها می باشد .

با افزایش تاثیر Bax ، ماده زمینه قطعه قطعه (تشکیل گرانولهای داخل لیزوزوم) و دو لایه غشاء لیزوزومها کاملاً از هم جدا و مشخص شدند(تصویر شماره ۳).

در آخرین مرحله نیز که در تعدادی از نمو نه ها دیده شد گرانولهای داخل لیزووم افزایش یافته و پارگی در غشاء بسیار نازک لیزوزمها اتفاق می افتاد و گرانولهای داخل لیزوزمها از آن خارج می شدند (تصویر شماره ۴).

تغییرات در غشاء و ماده زمینه لیزوزومهای که تحت تاثیر Bax قرار گرفته بودند نشان دهنده تاثیر مستقیم Bax بر لیزوزمها در طی فرآیند مرگ برنامه ریزی شده بود (همانند تاثیراین ماده بر میتوکندریها) بدیهی است که با تاثیر Baxبر لیزوزم و پارگی آنها آنزیمهای داخل لیزوزم آزاد و باعث نابودی ارگانلها و غشاء داخل هسته می شوند.

بحث

مطالعات اخیر نشانگر این است که با تاثیر محرکهای مختلف (شیمیائی 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 کاسپز از سیستئین پروتئاز لیزوزم باعث مرگ برنامه ریزی شده سلول می شوند(۴، ۶).

مطالعات ما نشان داد که ترکیباتBax علاوه بر تاثیر بر میتوکندریها با تاثیر

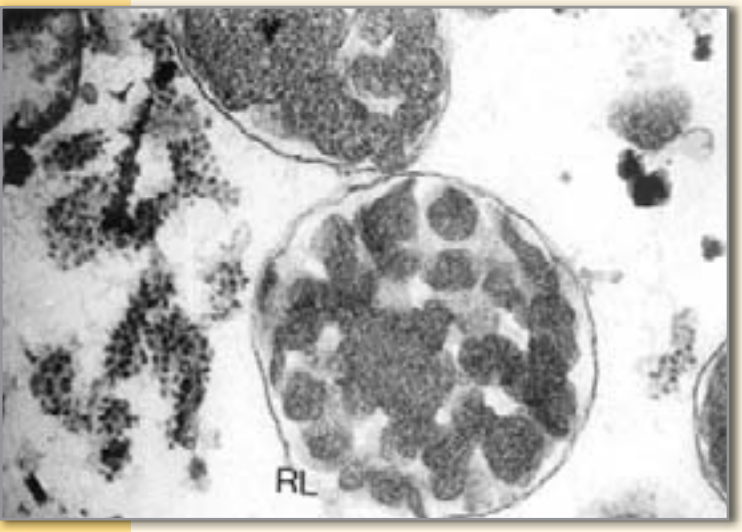
بر لیزوزمها مستقیماً باعث تغییرات در غشاء و ماده زمینه لیزوزمها شده و باعث آزادشدن آنزیمهای لیزوزمی شده و این آنزیم باعث بوجود آمدن یکسری از تغییرات ساختمانی در سلول و شروع پدیده مرگ سلولی می شود.

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 می‌شود(۷،۴).

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

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 برنامه‌ریزی شده در داخل سلول کمک می‌کند و شاید بتوان در آینده نزدیک با شناخت این مکانیسم‌ها آنها را متوقف و از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی جلوگیری کرد.

تتصویر شماره ۳ ـ لیزوزوم بعد از تاثیرBax (غشاء کاملاً دو لایه و ماده زمینه قطعه قطعه) ۱۵۰۰۰x. :لیزوزم G :گرانول
RER :شبکه اندوپلاسمیک خشن



تصویر شماره ۴ـ لیزوزوم حاوی گرانول در داخل و غشاء پاره شده
تاثیر Bax) بزرگنمائی ۱۵۰۰۰x و RL :لیزوزم پاره شده

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): 347-61

2-Bursch W., 2001, The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. Cell Death Differ. Jun;8(6): 569-81

3-Ferri, K.F., 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-Now: 52(3-5): 231-6

5- Horvitz HR. 1986, Genetic control of pragrammed cell death in The nematode *C. elegans*. Cell. Mar28: 44 (6): 817-829.

6- Kerr JFR. 1971; Shrinkage necrosis: A. Distinct mode of cell death. J. Path, 105, 13-20.

7-Reed, J.C., Juugensmeier, J.M., Matsuyama, S., 1998,Bcl-2 family proteins and mitochondria. Biochim Biophysics 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.E mbryol.31: 214-223

10- WyllieA-h, Arends M.J, 1992; The apoptosis endonucleous 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. Pharmacia Ther.Oct: 92(1): 57-70