

The inhibitory effect of calcium chelators on the apoptosis of motor neurons in cultured adult mouse spinal cord slices

Momeni HR, Ph.D^{1*}, Soliemani Mehranjani M, Ph.D¹, Shariatzadeh SMA, Ph.D¹,
Jarahzadeh M, M.Sc²

1- Biology Department, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2- M.Sc in Developmental Biology, Biology Department, Faculty of Science, Arak University

* Email corresponding author: h-momeni@araku.ac.ir

Received: 10 Jan. 2011

Accepted: 13 Mar. 2011

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of calcium chelators on apoptosis of motor neurons in adult spinal cord slices.

Materials and Methods: The thoracic region of adult mouse spinal cord was sliced by a tissue chopper into 400 μm sections and divided into four groups: 1- freshly dissected slices (0 hour), 2- control slices, 3- slices treated by ethylene deamin tetra acetic acid (EDTA) and 4- slices treated by ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA). The control and treated slices were incubated in a culture medium for 6 hours. MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay was used to evaluate the viability of the slices. To study motor neurons morphology, propidium iodide and Hoechst 33342 were used. Data were analyzed using one- way ANOVA and Tukey test, and means difference was considered significant at $p < 0.05$.

Results: Motor neurons from slices cultured for 6 hours displayed morphological features of apoptosis. The application of calcium chelators (EDTA and EGTA) not only increased the viability of the cultured slices, but also inhibited apoptosis in the motor neurons and increased the percentage of viable motor neurons.

Conclusion: It could be concluded that apoptosis in motor neurons of cultured spinal cord slices might be due to increased level of intracellular calcium.

Key words: Apoptosis, Spinal cord, Motor neuron, EDTA, EGTA

تأثیر کلیت کننده های کلسیمی بر مهار اپوپتوزیس نوروں های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش بالغ

حمید رضامومنی^۱ Ph.D.*، ملک سلیمانی مهرنجانی^۲ Ph.D.، سید محمد علی شریعت زاده^۳ Ph.D.، مهسا جراح زاده^۴ M.Sc.

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: h-momeni@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۲۰

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق بررسی نقش کلیت کننده های کلسیم بر مهار اپوپتوزیس نوروں های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش بالغ بود.

مواد و روش ها: ناحیه سینه‌ای نخاع موش بالغ توسط دستگاه قطعه کننده بافت به قطعات ۴۰۰ میکرونی بریده و به چهار گروه تقسیم شدند: ۱- قطعات لحظه زمانی صفر ۲- قطعات کنترل ۳- قطعات تیمار با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۴- قطعات تیمار با اتیلن گلیکول تترا استیک اسید (EGTA). قطعات کنترل و تیمار به مدت ۶ ساعت در محیط کشت انکوبه شدند. سنجش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] جهت ارزیابی قابلیت حیات قطعات نخاع مورد استفاده قرار گرفت. جهت مطالعه مورفولوژیکی نوروں های حرکتی از رنگ آمیزی پروپیدیوم آیوداید و هوخست ۳۳۳۴۲ استفاده شد. داده‌ها با روش آنالیز واریانس یکطرفه و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی دار لحاظ شد.

نتایج: نوروں های حرکتی قطعات کشت شده نخاع پس از ۶ ساعت نشانه های مورفولوژیک اپوپتوزیس را نشان دادند. کاربرد جداگانه کلیت کننده های کلسیمی (EDTA و EGTA) نه تنها توانست قابلیت حیات قطعات کشت شده به مدت ۶ ساعت را افزایش دهد بلکه توانست مرگ سلولی اپوپتوزیس را در نوروں های حرکتی این قطعات مهار و همچنین درصد تعداد نوروں های حرکتی زنده را افزایش دهد.

نتیجه گیری: از آنجا که کاربرد کلیت کننده های کلسیمی در محیط کشت قطعات نخاع توانست قابلیت حیات این قطعات را افزایش، نشانه های اپوپتوزیس را در نوروں های حرکتی مهار و درصد تعداد نوروں های حرکتی زنده را در این قطعات افزایش دهند، بیانگر آن است که افزایش کلسیم داخل سلولی احتمالاً یکی از دلایل اپوپتوزیس نوروں های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع می باشد.

واژگان کلیدی: اپوپتوزیس، نخاع، نوروں حرکتی، EDTA و EGTA

مقدمه

کلسیم به عنوان پیامبر ثانویه نقش مهمی در پدیده‌های زیستی از بقا تا مرگ سلول‌ها ایفا می‌نماید. به عنوان مثال نقش کلسیم در لقاح و تشکیل سلول تخم تا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (اپوپتوزیس) به اثبات رسیده است (۱). تحت شرایط فیزیولوژیکی غلظت کلسیم خارج سلولی ۱/۳ میلی مولار و غلظت سیتوپلاسمی آن در حدود ۱۰۰ نانو مولار می‌باشد (۲)، در حالیکه تحت شرایط پاتولوژیک غلظت داخل سلولی کلسیم افزایش می‌یابد (۳). افزایش غیر طبیعی کلسیم داخل سلولی نه تنها موجب فعال شدن پروتئازها و اندونوکلیتازهای وابسته به کلسیم می‌شود (۴)، بلکه این امر موجب اختلال در عملکرد ارگانل‌هایی همچون میتوکندری‌ها می‌گردد (۵). بدین ترتیب اگر چه غلظت طبیعی یون کلسیم در پدیده‌های حیاتی سلول مهم است، افزایش غیر طبیعی داخل سلولی این یون منجر به مرگ سلولی می‌شود.

مطالعات نشان می‌دهد که در برخی بیماری‌های کبدی افزایش کلسیم داخل سلولی منجر به اپوپتوزیس هیپاتوسیت‌ها می‌شود (۶). همچنین گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد تیمار سلول‌ها با یونفورهای کلسیم (Calcium ionophores) (۷) و یا مهار کننده‌های پمپ‌های کلسیم موجود بر روی غشا سیتوپلاسمی (۸) موجب مرگ سلول‌ها می‌گردد. در مورد سیستم عصبی نیز می‌توان به مرگ نورونی ناشی از افزایش کلسیم داخل سلولی در بیماری‌هایی مثل ایسکمی (Ischemia)، تروما (Trauma) (۹) و بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون‌ها (۱۰) اشاره کرد.

مرگ نورون‌های حرکتی یکی از وقایع بحرانی است که در بیماری Amyotrophic Lateral Sclerosis، بیماری که طی آن نورون‌های حرکتی در نخاع، ساقه مغز و قشر حرکتی می‌میرند و موجب آتروفیه شدن عضلات می‌گردد (۱۱)، اتفاق می‌افتد که تا کنون درمان قطعی برای آن ارائه نشده است. بنابراین طراحی مدل‌های مناسب که بتواند بر روی مطالعه مکانیسم‌های دخیل در مرگ این نورون‌ها متمرکز گردد احتمالاً می‌تواند با افزایش دانش پایه‌ای در این خصوص پنجره‌ای را فراسوی درمان این بیماران در آینده فراهم نماید. از اینرو، کشت قطعات نخاع جانور بالغ بعنوان یک مدل *in vitro* می‌تواند برای بررسی مکانیسم‌های دخیل در مرگ نورون‌های حرکتی مفید باشد. گزارشات معدودی وجود دارد که به مطالعه‌ی مکانیسم‌های

دخیل در مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات نخاع حیوانات بالغ در شرایط طبیعی و بدون تأثیر هر گونه عامل خارجی پرداخته باشد. در تحقیق قبلی (۱۲) ما نشان دادیم که اپوپتوزیس عامل اصلی مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع موش بالغ می‌باشد. در مطالعه دیگر کلپین (پروتئاز وابسته به کلسیم) به عنوان یک مکانیسم احتمالی برای اپوپتوزیس نورون‌های حرکتی موش بالغ گزارش شده است (۴).

با توجه به اینکه افزایش کلسیم درون سلولی می‌تواند عاملی برای القا اپوپتوزیس سلولی باشد، این احتمال وجود دارد که این عامل نیز بتواند بعنوان یکی از دلایل اپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات نخاع در نظر گرفته شود. در صورتی که این احتمال درست باشد می‌توان با جلوگیری از افزایش کلسیم داخل سلولی، مرگ این نورون‌ها را به تأخیر انداخت. یکی از این روش‌ها می‌تواند استفاده از کلیت کننده‌های کلسیمی باشد که قادر است کلسیم را در خارج سلول کلیت نماید. بنابراین پژوهش حاضر با این هدف طراحی شد تا با کاربرد کلیت کننده‌های کلسیمی به بررسی نقش آنها در مهار اپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع موش بپردازد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی از موش‌های ماده‌ی بالغ نژاد Balb/c با میانگین وزنی 22 ± 3 گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند استفاده شد. حیوانات و در خانه‌ی حیوانات در شرایط استاندارد با دسترسی کامل به آب و غذا نگهداری شدند.

تهیه قطعات نخاع: حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی سدیم پنتوباریتال (60 mg/kg) کاملاً بی‌هوش و توسط شکافتگی قلب کشته شدند. سپس نخاع خارج و به پتری حاوی سالیین فسفات سد (phosphate buffer saline, PBS) (pH=7.4) منتقل گردید. پس از جدا نمودن ناحیه سینه‌ای نخاع (۴)، این بخش با استفاده از دستگاه قطعه کننده بافت (Tissue chopper، استولتینگ، آمریکا) به صورت برش‌های عرضی به قطعاتی با ضخامت 400 میکرون بریده شد. این قطعات سپس به چهار گروه تقسیم شدند: ۱- قطعات لحظه زمانی صفر ۲- قطعات کنترل ۳- قطعات تیمار با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) با غلظت نهایی 5 میلی مولار ۴- قطعات تیمار با اتیلن گلیکول تترا استیک اسید (EGTA) با غلظت نهایی 5 میلی

وسيله‌ی PBS شستشو شدند (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه). سپس رنگ آمیزی توسط پروپیدیوم آیداید (۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) به مدت ۱۲ دقیقه انجام شد. لام‌ها مجدداً به وسیله‌ی PBS شستشو (۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه) توسط هوست ۳۳۳۴۲ (۵ میکرو گرم بر میلی لیتر) به مدت ۳۰ ثانیه رنگ آمیزی شدند. پس از آن لام‌ها به وسیله‌ی PBS شستشو (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه)، به برش‌ها محلول گلیسرول/PBS (۱:۱) اضافه و سرانجام توسط لامل پوشیده شدند. لام‌ها توسط میکروسکوپ فلئورسنس (المپیوس، ژاپن) مجهز به دوربین، با استفاده از فیلتر مناسب مشاهده و از آنها عکس تهیه شد.

شمارش نوروں‌های حرکتی: تعداد نوروں‌های حرکتی از هر نمونه، از طریق شمارش حداقل ۱۲ شاخ شکمی از برش‌های مربوط به قطعات متفاوت نخاع که بطور تصادفی انتخاب شده بودند انجام شد و سپس درصد تعداد نوروں‌های حرکتی زنده بر اساس تعداد کل نوروں‌های حرکتی برای هر نمونه محاسبه گردید (۱۴).

آنالیز آماری داده‌ها: داده‌های حاصل توسط نرم افزار SPSS با استفاده از آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

سنجش MTT در قطعات نخاع

جهت بررسی قابلیت حیات قطعات نخاع، قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) و قطعات کشت شده برای ۶ ساعت (کنترل) و تیمار با EDTA و EGTA) از روش MTT استفاده شد. نتایج نشان داد که توزیع رنگ بنفش MTT فورمازان (که بیانگر قابلیت حیات می‌باشد) در قطعات تازه تهیه شده در ماده‌ی خاکستری و سفید زیاد و قابل توجه بود (شکل A-۱). بر عکس در ماده خاکستری و سفید قابلیت حیات در قطعات کشت شده برای ۶ ساعت نسبت به قطعات تازه تهیه شده به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (شکل B-۱). کاربرد جداگانه EDTA با غلظت ۵ میلی مولار (شکل C-۱) و EGTA با غلظت ۵ میلی مولار (D-۱)، توانست بطور قابل ملاحظه‌ای قابلیت حیات قطعات نخاع کشت شده برای ۶ ساعت را نسبت به گروه کنترل افزایش دهد.

مولار. سپس قطعات تیمار و کنترل به پلیت‌های چهار خانه حاوی ۴۵۰ میکرو لیتر محیط کشت شامل ۵۰ درصد MEM (Minimum Essential Medium، ۲۵ درصد سرم اسب، ۲۵ مولار HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-))، ۲۵ درصد Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)، یک درصد پنی سیلین - استرپتومايسين و ۶ گرم در لیتر D-گلوکز با $pH=7.3-7.4$ انتقال (هر چهار قطعه در یک خانه) و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

فیکس و برش‌گیری: قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) بلافاصله پس از تهیه و قطعات کشت شده برای ۶ ساعت (کنترل و تیمار) برای مدت زمان حداقل ۲ ساعت در فیکساتور Steffanini (۲/۰ درصد پارافمالدهید، ۲/۰ درصد اسید پیکریک، ۱/۰ مولار فسفات بافر $pH=7.2$) قرار گرفتند. سپس قطعات توسط PBS شستشو شد (۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه) و برای مدت یک شب در محلول ساکاروز ۲۰ درصد در PBS، در یخچال قرار گرفتند. سرانجام قطعات با استفاده از دستگاه کرایوستت (لایکا، آلمان) با ضخامت ۱۰ میکرون برش‌گیری و بر روی لام‌های آغشته به پلی-ال-لازین (۱:۹ در آب مقطر) قرار گرفته و سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند.

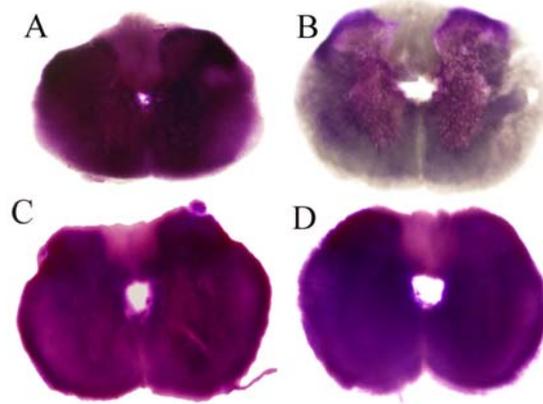
سنجش قابلیت حیات: سنجش MTT (3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide] (سیگما، آمریکا) جهت ارزیابی قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع به کار گرفته شد (۱۳). قطعات تازه تهیه شده نخاع (لحظه زمانی صفر) و قطعات کشت شده برای ۶ ساعت (کنترل و تیمار) به پلیت‌های چهارخانه حاوی ۴۵۰ میکرو لیتر محیط کشت انتقال یافتند. به هر کدام از خانه‌های پلیت ۵۰ میکرو لیتر از محلول غلیظ MTT (۵ mg/ml) اضافه شد. سپس پلیت‌ها برای ۲۰ دقیقه در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. قطعات نخاع با استفاده از میکروسکوپ معمولی بررسی و از آنها عکس تهیه گردید.

سنجش اپوپتوزیس با استفاده از رنگ آمیزی فلئورسنس:

در این تحقیق با تأکید بر بررسی جنبه‌های مورفولوژیکی اپوپتوزیس در نوروں‌های حرکتی از رنگ‌های فلئورسنس شامل پروپیدیوم آیداید (سیگما، آمریکا) و هوست ۳۳۳۴۲ (سیگما، آمریکا) استفاده شد (۴). ابتدا لام‌های حاوی برش‌های نخاع به

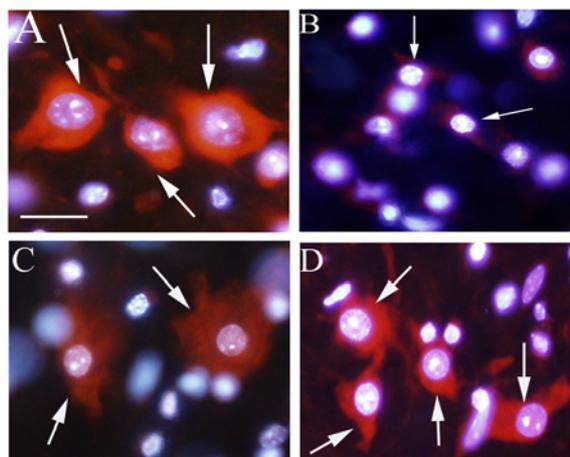


شکل ۱: سنجش MTT در قطعات نخاع در حضور و عدم حضور کلیت کننده های کلسیمی. (A) قطعه ی نخاع تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر). (B) قطعه ی نخاع پس از گذشت مدت زمان ۶ ساعت در محیط کشت (کنترل). (C) قطعه ی نخاع تیمار شده با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA، ۵ میلی مولار) پس از گذشت ۶ ساعت. (D) قطعه ی نخاع در حضور اتیلن گلیکول تترا استیک اسید (EGTA، ۵ میلی مولار) پس از گذشت ۶ ساعت. توزیع رنگ بنفش فورمازان در ماده سفید و خاکستری قطعات نخاع که نمایانگر قابلیت حیات سلولی است در قطعات کشت شده با EDTA و EGTA به طور قابل ملاحظه ای نسبت به گروه کنترل بیشتر بود.

سیتوپلاسم و غشاء سلول (کوچک شدن سلول)، متراکم شدن هسته (کوچک شدن هسته) و تراکم کروماتین را نشان دادند (شکل B-۲). پس از گذشت مدت زمان ۶ ساعت در محیط کشت، کاربرد جداگانه EDTA با غلظت ۵ میلی مولار (شکل C-۲) و EGTA با غلظت ۵ میلی مولار (شکل D-۲) توانست نشانه های مورفولوژیک اپوپتوزیس را در نورون های حرکتی نسبت به گروه کنترل به طور قابل ملاحظه ای مهار نمایند. در این زمان، استفاده از غلظت های پائین تر این کلیت کننده تأثیر قابل ملاحظه ای در مهار اپوپتوزیس این نورون ها نداشت (داده ها نشان داده نشده است)

مطالعه مورفولوژیکی نورون های حرکتی توسط رنگ آمیزی فلئورسنت

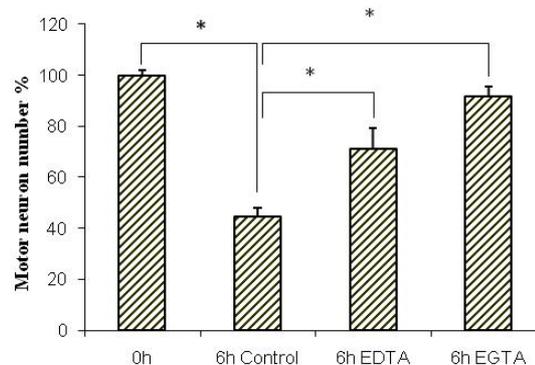
نورون های حرکتی به واسطه دارا بودن جسم سلولی و هسته بزرگ و محل قرار گیری آن ها در شاخ های شکمی از سایر نورون ها قابل تشخیص می باشند. نورون های حرکتی در برش های مربوط به قطعات تازه تهیه شده (لحظه ی زمانی صفر)، دارای جسم سلولی و هسته بزرگ، هستک مشخص و بدون هیچ گونه علامت اپوپتوزیس بودند (شکل A-۲). در حالیکه نورون های حرکتی در برش های قطعات کشت شده برای زمان ۶ ساعت (کنترل)، تغییرات مورفولوژیکی اپوپتوزیس از قبیل چروکیدگی



شکل ۲: نقش کلیت کننده های کلسیم در مهار اپوپتوزیس نورون های حرکتی نخاع. (A) نورون های حرکتی طبیعی و بدون علائم اپوپتوزیس از قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر). (B) نورون های حرکتی قطعات کشت شده پس از گذشت زمان ۶ ساعت (کنترل) نشانه های مورفولوژیک اپوپتوزیس را نمایان ساختند. کاربرد اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA، ۵ میلی مولار)، و اتیلن گلیکول تترا استیک اسید (EGTA، ۵ میلی مولار) (C)، بطور جداگانه توانست نشانه های مورفولوژیک اپوپتوزیس را در نورون های حرکتی از قطعات کشت شده برای ۶ ساعت به طور قابل ملاحظه ای نسبت به گروه کنترل مهار نماید. فلش ها نمایانگر نورون های حرکتی می باشند. رنگ آمیزی فلئورسنت: پروپیدیوم آیویداید (قرمز) و هوخست (آبی). : Scale bar ۲۵ میکرون

مطالعه کمی (شمارش نورون های حرکتی)

همانطور که نمودار ۱ نشان می دهد درصد تعداد نورون های حرکتی در قطعات تازه تهیه شده نخاع (لحظه زمانی صفر) صد درصد بود که بیانگر زنده بودن تمام نورون های حرکتی می باشد. بعد از گذشت مدت زمان ۶ ساعت، درصد تعداد نورون های حرکتی زنده قطعات کشت شده به طور معنی داری ($P < 0/001$) نسبت به لحظه زمانی صفر به ۴۵ درصد کاهش یافت. در حالیکه درصد تعداد نورون های حرکتی زنده در حضور EDTA (۵ میلی مولار) ۷۲ درصد و در حضور EGTA (۵ میلی مولار) ۹۲ درصد بوده که این افزایش ها نسبت به گروه کنترل معنی دار ($P < 0/001$) بودند.



نمودار ۱: تأثیر کلیت کننده های کلسیمی بر تعداد نورون های حرکتی زنده. درصد تعداد نورون های حرکتی زنده در قطعات تازه تهیه شده نخاع (لحظه زمانی صفر) صد درصد بود. در حالیکه درصد تعداد نورون های حرکتی زنده در قطعات کشت شده برای ۶ ساعت (گروه کنترل) در مقایسه با لحظه زمانی صفر به طور معنی داری کاهش یافت. کاربرد جداگانه اتیلن دی آمین تترا استیک اسید EDTA (۵ میلی مولار) و اتیلن گلیکول تترا استیک اسید EGTA (۵ میلی مولار) در محیط کشت به طور معنی داری درصد تعداد نورون های حرکتی زنده را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. ($P < 0/001, Mean \pm SD, n = 12$)

بحث

کشت قطعات نخاع گرفته شده از جانور بالغ بعنوان یک مدل *in vitro*، از جمله تکنیک های پر اهمیتی است که برای مطالعه آسیب های نخاعی، ارزیابی قابلیت حیات سلولی و مکانیسم های دخیل در مرگ نورونی بکار می رود (۱۳). در پژوهش حاضر کشت قطعات نخاع موش بالغ مورد استفاده قرار گرفت تا تأثیر کلیت کننده های کلسیمی در مهار اپوپتوزیس نورون های حرکتی این قطعات مورد مطالعه قرار گیرد.

نظر به اینکه سنجش MTT برای ارزیابی قابلیت حیات سلول ها و قطعات گرفته شده از سیستم اعصاب مرکزی یک روش سریع

و معتبر محسوب می شود (۱۳ و ۱۵)، برای سنجش قابلیت حیات قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) و قطعات کشت شده مورد استفاده قرار گرفت. در این روش نمک زرد رنگ MTT توسط دهیدروژنازهای میتوکندری های فعال در سلول های زنده احیا و به بنفش فورمازان (MTT فورمازان) تبدیل می شود (۱۶). بنابراین میزان رنگ بنفش تولید شده با تعداد سلول های زنده و بنابراین قابلیت حیات سلولی مرتبط می باشد. در سایر روش های بررسی قابلیت حیات که از تریپان بلو و پروپیدیوم آبیواید استفاده می گردد، تنها تمامیت غشاء سلول ها سنجش می شود (۱۷) و اطلاعاتی در خصوص فعالیت متابولیکی و میتوکندری های سلول در اختیار نمی گذارند. اگرچه در این روش عمل احیا MTT بر اساس میتوکندری های فعال سلولی صورت می گیرد، اما باید توجه داشت که احیاء MTT همچنین می تواند به وسیلهی دهیدروژنازهای متعلق به دیگر ارگانل های سلولی مانند لیزوزوم ها نیز انجام شود (۱۸). صرف نظر از این موضوع، سلول هایی که از نظر متابولیکی فعال می باشند می توانند این احیا را انجام دهند و بدین ترتیب این روش می تواند برای سنجش قابلیت حیات سلولی مفید باشد.

جهت مشخص شدن نوع مرگ نورون های حرکتی، از رنگ آمیزی فلئورسنت استفاده شد. در مطالعات متعدد این رنگ ها برای بررسی مورفولوژیک هسته سلول ها مورد استفاده قرار می گیرند (۱۹ و ۲۰). رنگ هوخست با اتصال به DNA توانایی رنگ آمیزی هسته را داشته و متراکم شدن هسته و کروماتین را در سلول های اپوپتوتیک مشخص می نماید (۲۱). در پژوهش حاضر نورون های حرکتی قطعات کشت شده برای مدت زمان ۶ ساعت، مشخصات مورفولوژیک مانند چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته و کروماتین را از خود نشان دادند. از آنجا که در مطالعات متعدد این مشخصات به عنوان ویژگی های مرگ سلولی اپوپتوزیس معرفی شده اند (۱۲، ۲۲ و ۲۳)، اینطور می توان نتیجه گرفت که مرگ این نورون ها در قطعات کشت شده از نوع اپوپتوزیس بوده است.

نشان داده شده است که در طی آسیب های نخاعی، یکی از علل مرگ نورون ها افزایش بیش از اندازه غلظت کلسیم داخل سلولی می باشد (۲۴). این طور می توان فرض کرد که این عامل نیز ممکن است دلیلی بر اپوپتوزیس نورون های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع باشد. در صورتی که این احتمال درست باشد، جلوگیری از ورود بیش از اندازه کلسیم از محیط کشت به درون

(۲۹) نقش دارد. کلپین ها به نوبه خود با فعال نمودن کاسپاز ها می توانند در القای اپوپتوزیس نقش داشته باشند (۳۰) کلپین ها و کاسپازهای فعال شده درون سلول می توانند با حمله به سوبستراهای پروتئینی خود در سیتوپلاسم (بعنوان مثال فودرین و اکتین) و یا هسته‌ای (مثل لامین ها)، آن ها را تجزیه نموده و موجب فروپاشی ساختار سلولی و سرانجام اپوپتوزیس گردند (۳۱). بنابراین این احتمال وجود دارد که افزایش کلسیم داخل سلولی در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده موجب فعال شدن پروتئازها و اندونوکلیتازهای داخل سلولی شده باشد و بدین ترتیب موجب اپوپتوزیس در این نورون ها گردد. عدم افزایش بیش از اندازه کلسیم داخل سلولی از طریق کلیت شدن کلسیم توسط EDTA و EGTA و مهار اپوپتوزیس در این نورون‌ها احتمالاً می تواند تأییدی بر این مطلب باشد.

نتیجه گیری

کاربرد کلیت کننده‌های کلسیمی نه تنها توانست قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع را افزایش دهد بلکه موجب مهار اپوپتوزیس در نورون های حرکتی شده و درصد تعداد نورون‌های حرکتی زنده را به طور معنی داری افزایش داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از کمک‌های ارزشمند خانم منیره محمودی و آقای مهدی نوده فراهانی تشکر و سپاسگزاری نمایند.

منابع

1. Clapham DE. Calcium signaling. Cell. 2007; 131(6): 1047-58.
2. Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, et al. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. Braz J Med Biol Res. 2003; 36(2): 183-90.
3. Bennett MR, Huxlin KR. Neuronal cell death in the mammalian nervous system: the calmodulin hypothesis. Gen Pharmacol. 1996; 27(3): 407-19.
4. Momeni HR, Kanje M. The calpain inhibitor VI prevents apoptosis of adult motor neurons. Neuroreport. 2005; 16(10): 1065-8.
5. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. BMB Rep. 2008; 41(1): 11-22.
6. Chan SO, Runko E, Anyane-Yeboa K, Ko L, et al. Calcium ionophore-induced degradation of

سلول و نهایتاً جلوگیری از افزایش بیش از اندازه کلسیم داخل سلولی به عنوان مثال با استفاده از کلیت کننده‌های کلسیمی مثل EDTA و EGTA می‌توانست اپوپتوزیس را در این نورون‌ها مهار نماید. Liu و همکارانش نشان دادند که با استفاده از EGTA، مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو کاهش می‌یابد (۲۵). علاوه بر آن Zhang و همکارانش (۲۶) شکسته شدن DNA و تراکم کروماتین هسته را با استفاده از کلیت کننده کلسیم مهار کردند. در مطالعه حاضر کاربرد EDTA و EGTA پس از ۶ ساعت توانست به طور قابل ملاحظه‌ای قابلیت حیات قطعات کشت شده نخاع را افزایش دهد. علاوه بر آن این کلیت کننده‌ها توانستند اپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی مهار و درصد تعداد نورون‌های زنده را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش دهند. این نتایج می‌توانست موید این مطلب باشند که EDTA و EGTA در طی ساعت‌های کشت، کلسیم را در محیط خارج سلولی کلیت و از افزایش بیش از اندازه کلسیم داخل سلولی جلوگیری نموده‌اند. بنابراین نتایج حاصله احتمالاً می‌توانست تأیید کننده فرضیه افزایش کلسیم داخل سلولی در اپوپتوزیس نورون‌های حرکتی باشد. نتایج حاضر نشان داد که درصد تعداد نورون‌های حرکتی زنده در قطعات تیمار شده با EGTA نسبت به EDTA بیشتر بود. دلیل این امر احتمالاً مربوط به اختصاصی تر بودن EGTA برای کلیت نمودن کاتیون‌های دو ظرفیتی از جمله کلسیم می باشد.

مکانیسمی که از طریق آن کلسیم توانسته است اپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی القا نماید قابل بحث می‌باشد. این احتمال وجود دارد که افزایش بیش از اندازه کلسیم داخل سلولی باعث ورود سلول به مرحله آغازی اپوپتوزیس شده باشد (۲۷). در این صورت افزایش کلسیم داخل سلولی از طرق مختلف می‌تواند اپوپتوزیس را در سلول‌ها آغاز نماید. اختلال در عملکرد اندامک‌های سلولی از جمله میتوکندری‌ها و شبکه اندوپلاسمی و همچنین فعال نمودن برخی از آنزیم ها از آن جمله اند. افزایش کلسیم داخل سلولی باعث تغییر در آرایش سه بعدی اجزای پروآپوپتوتیک خانواده Bcl₂ شده و موجب تشکیل منافذی بر روی غشای میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی را می‌دهد. این امر به نوبه خود باعث ورود هر چه بیشتر کلسیم به درون سیتوزول و به هم خوردن تعادل پتانسیل غشا میتوکندری ($\Delta\Psi$) می‌گردد (۲۸). کلسیم همچنین در فعال کردن کلپین‌ها بعنوان پروتئازهای وابسته به کلسیم و اندونوکلیتازهای وابسته به کلسیم

- neurofilament and cell death in MSN neuroblastoma cells. *Neurochem Res.* 1998; 23(3): 393-400.
7. Kajitani N, Kobuchi H, Fujita H, Yano H, et al. Mechanism of A23187-induced apoptosis in HL-60 cells: dependency on mitochondrial permeability transition but not on NADPH oxidase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; 71(11): 2701-11.
 8. Sasamura S, Furukawa K, Shiratori M, Motomura S, et al. Antisense-inhibition of plasma membrane Ca²⁺ pump induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 90(2): 164-72.
 9. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol.* 2001; 24(1-3): 107-29.
 10. Vosler PS, Brennan CS, Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2008; 38(1): 78-100.
 11. Martin LJ, Price AC, Kaiser A, Shaikh AY, et al. Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death (Review). *Int J Mol Med.* 2000; 5(1): 3-13.
 12. Soleimani Mehranjani M, Momeni HR, Abnosi MH, Nasimi P. Cell death in motor neurons of cultured spinal cord slices in adult mouse. *Arak Medical University Journal.* 2009; 12(3): 39-46.
 13. Connelly CA, Chen LC, Colquhoun SD. Metabolic activity of cultured rat brainstem, hippocampal and spinal cord slices. *J Neurosci Methods.* 2000; 99(1-2): 1-7.
 14. Pizzi M, Benarese M, Boroni F, Goffi F, et al. Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonists on kainate-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. *Neuropharmacology.* 2000; 39(5): 903-10.
 15. Momeni HR, Soleimani Mehranjani M, Abnosi MH, Nasimi P. Evaluation of viability in adult mouse spinal cord slices by MTT assay. *Iranian Journal of Biology.* 2010; 23(2): 267-274.
 16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
 17. Rennie S, Lotto RB, Price DJ. Growth-promoting interactions between the murine neocortex and thalamus in organotypic co-cultures. *Neuroscience.* 1994; 61(3): 547-64.
 18. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem.* 1997; 69(2): 581-93.
 19. Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol.* 1998; 33(6): 525-33.
 20. Zhang QL, Niu Q, Ji XL, Conti P, et al. Is necroptosis a death pathway in aluminum-induced neuroblastoma cell demise? *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008; 21(4): 787-96.
 21. Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ. Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(2): 460-4.
 22. Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P. Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol Med.* 2001; 7(1): 36-48.
 23. Li W, Galey D, Mattson MP, Nath A. Molecular and cellular mechanisms of neuronal cell death in HIV dementia. *Neurotox Res.* 2005; 8(1-2): 119-34.
 24. Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Rev.* 2003; 42(2): 169-85.
 25. Liu Z, Martin LJ. Motor neurons rapidly accumulate DNA single-strand breaks after in vitro exposure to nitric oxide and peroxynitrite and in vivo axotomy. *J Comp Neurol.* 2001; 432(1): 35-60.
 26. Mason RP, Leeds PR, Jacob RF, Hough CJ, et al. Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 1999; 72(4): 1448-56.
 27. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1(2): 120-9.
 28. Hajnoczky G, Csordas G, Krishnamurthy R, Szalai G. Mitochondrial calcium signaling driven by the IP₃ receptor. *J Bioenerg Biomembr.* 2000; 32(1): 15-25.
 29. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005; 73(4): 1907-16.
 30. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(7): 552-65.
 31. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73: 87-106.