

Effect of Hydrostatic Pressure on PC12 Cell Line

***Davari Zanjani M., M.Sc., Sadri S., M.Sc., Azadbakht M., Ph.D.*,
Amini A., Ph.D., Hill M.A., Ph.D.***

** Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah 6714967346, Iran.*

Abstract

Purpose: The present study was designed to investigate the effect of hydrostatic pressure on cell viability, apoptosis induction, morphology and cell-substrate interactions of PC12 cells.

Materials and Methods: PC12 as a neuronal cell line maintained in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. PC12 cells were subjected to hydrostatic pressure. Experimental pressure condition was 100mmHg set above atmospheric pressure for 2 h. Controls were treated identically except for the application of pressure. Dye exclusion was used for viability assay, TUNEL staining was used for apoptosis detection. Cell area was assessed as morphometry and then cell adhesion, extension and migration were investigated.

Results: Hydrostatic pressure had not changed viability of cells. It induced apoptosis in PC12 cells. In addition, hydrostatic pressure reduced cell area, adhesion, extension and migration ability of these cells ($P < 0.05$).

Conclusion: Hydrostatic pressure may induce apoptosis in PC12 cells as a result of inappropriate cell to substrate adhesion. Thus it is suggest that occurring apoptosis in these cells be an anoikis cell death induced by loss of attachment to the substrate.

Keywords: Hydrostatic pressure, Apoptosis, Anoikis, PC12 cell line.

بررسی اثر فشار هیدروستاتیک بر سلول‌های عصبی رده PC12

مریم داوری زنجانی M.Sc.*، سهیل صدری M.Sc.*، مه‌ری آزادبخت Ph.D.*، علی امینی Ph.D.*، مارک هیل Ph.D.**

* گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

** گروه آناتومی دانشگاه نیو ساوت ولز، سیدنی، استرالیا

تاریخ وصول: شهریورماه ۸۷، تاریخ پذیرش: آبان ماه ۸۷

چکیده

هدف: بررسی اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان بقا سلولی، وقوع آپوپتوز، ویژگی‌های مورفولوژیکی و برهمکنش سلول - بستر در رده سلولی PC12.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به روش تجربی انجام شد. در این مطالعه سلول‌های عصبی رده PC12 به عنوان مدلی از سلول‌های عصبی در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند. برای انجام آزمایش‌ها سلول‌ها به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند. سلول‌های گروه آزمایش به محفظه اعمال فشار منتقل شده و در معرض ۱۰۰ میلی‌متر جیوه فشار هیدروستاتیک به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی و رنگ‌آمیزی TUNEL به ترتیب میزان بقای سلول‌ها و شاخص آپوپتوز آن‌ها سنجیده شد. مورفولوژی سلول‌ها با اندازه‌گیری مساحت آنها بررسی شد. همچنین توانایی چسبندگی به بستر، گسترش و مهاجرت سلولی به عنوان آزمایش‌هایی برای ارزیابی اثر فشار هیدرواستاتیک در برهمکنش سلول‌های رده PC12 با بستر انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان بقای سلول‌ها در دو گروه مشابه بود. شاخص آپوپتوز در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود ($p < 0.05$). همچنین مساحت سلول‌ها، توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر، میزان گسترش سلولی و توانایی مهاجرت سلول‌ها در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد فشار هیدرواستاتیک اعمال شده بر سلول‌های عصبی رده PC12 سبب القای آپوپتوز در این سلول‌ها شده است. می‌توان پیشنهاد کرد که با توجه به تاثیر فشار هیدرواستاتیک بر مورفولوژی و همچنین توانایی اتصال، گسترش و مهاجرت سلول‌ها و در نهایت اختلال در برهمکنش مناسب سلول - بستر در این رده عصبی آپوپتوز ایجاد شده در سلول‌ها از نوع آنوکیز باشد.

کلید واژه‌ها: فشار هیدرواستاتیک، آپوپتوز، آنوکیز، رده سلولی PC12

مقدمه

محیط اطرافشان انتقال می‌دهند. فشار هیدرواستاتیک یکی از این نیروهای مکانیکی است که نقشی انکارناپذیر در عملکرد و حیات اغلب سلول‌ها دارد. در حالت طبیعی سلول‌های بدن

نیروهای مکانیکی از عناصر اصلی محیط اطراف سلول‌ها هستند که به عنوان واسطه، اطلاعات حیاتی را بین سلول‌ها و

مورد توجه محققان قرار گرفته است. مطالعات آگار (Agar) و همکارانش از جمله این تحقیقات است. نتایج این مطالعات که با هدف شناخت بیشتر پاتوفیزیولوژی بیماری گلوکوما صورت گرفت نشان داد که افزایش حاد و مزمن میزان فشار هیدرواستاتیک بر رده سلولی RGC-5 (به عنوان مدلی از سلولهای عصبی گانگلیونی شبکیه چشم) سبب ایجاد آپوپتوز در این سلولها و در نهایت آسیب شبکیه چشم شده است. در این مطالعات روند ایجاد آپوپتوز در اثر افزایش غیرطبیعی میزان فشار هیدرواستاتیک همچنان ناشناخته عنوان شد [۷، ۸]. در مطالعه حاضر برای پی بردن به چگونگی ایجاد آپوپتوز در اثر اعمال فشار هیدرواستاتیک در سلولهای عصبی، براساس شناخت مسیرهای مخابره نیروهای مکانیکی به داخل سلول و همچنین نقش اساسی برهمکنش سلول - بستر در حیات و عملکرد سلول، تأثیر مستقیم فشار هیدرواستاتیک بر برهمکنش و اتصال سلولهای عصبی رده PC12 با بستر مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه با استفاده از یک اتافک اعمال فشار هیدرواستاتیک سلولهای عصبی رده PC12 (به عنوان مدلی رایج در مطالعه سلولهای عصبی) در معرض فشار هیدرواستاتیک قرار گرفته سپس از نظر میزان بقاء، وقوع آپوپتوز، مورفولوژی و برهمکنش سلول - بستر مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روشها

کشت سلولهای رده PC12

در این مطالعه رده سلولی PC12 تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (NCBI)^۱ مورد استفاده قرار گرفت. این سلولها در محیط کشت (Gibco, UK) RPMI 1640 همراه با

خود را با میزان خاصی از فشار هیدرواستاتیک موجود در محیط سلول تطبیق می دهند. هرگونه افزایش غیرطبیعی فشار هیدرواستاتیک وارده بر سلولها با افزایش فشار مایعات محیط پیرامونی سلولها می تواند سبب ایجاد حالت های آسیب رسان شود که بروز این حالتها در واقع پاسخ سلول به تغییر در محیط فیزیکی اطراف است [۱].

نیروهای مکانیکی بادو روش اثر بر کانالهای یونی دریچه مکانیکی سطح سلولها و همچنین ماتریکس خارج سلولی به داخل سلول مخابره شده و سبب تغییر در ویژگیهای ساختاری و عملکردی سلول مانند تقسیم، تمایز و مرگ سلولی می شوند [۱]. فشار هیدرواستاتیک و نیروهای مکانیکی ملایم تر که در دامنه فیزیولوژیک بدن هستند بیشتر از طریق ماتریکس خارج سلولی بر رفتارهای حیاتی سلول تأثیر می گذارند [۲]. ماتریکس خارج سلولی علاوه بر آن که به عنوان داربست فیزیکی در محیط اطراف سلولها عمل می کند، واسطه انتقال بسیاری از پیامهای حیاتی مانند تکثیر [۳]، تمایز [۴] و مرگ در سلولها به شمار می آید [۵]. اهمیت ماتریکس خارج سلولی تا آن اندازه است که فقدان برهمکنش مناسب سلول و ماتریکس خارج سلولی که توسط اتصالات نقطه ای رخ می دهد منجر به وقوع آپوپتوز می شود. به این نوع آپوپتوز که در پاسخ به برهمکنش نامناسب سلول و ماتریکس خارج سلولی رخ می دهد آنوبیکز گفته می شود [۶].

تحقیقات کنونی در زمینه اثرهای فشار هیدرواستاتیک بر سیستمهای زیستی بیشتر با رویکرد آسیب شناسی ناشی از افزایش غیرطبیعی میزان فشار هیدرواستاتیک بر سلولها به عنوان یک استرس مکانیکی دنبال می شود. دستگاه عصبی و سلولهای آن به علت تماس مداوم با فشار هیدرواستاتیک و بیماریهایی که در اثر افزایش بیش از اندازه معمول میزان فشار هیدرواستاتیک در دستگاه عصبی به وجود می آید، بسیار

1- National Cell Bank of Iran (NCBI)

افزودنی‌هایی شامل ۱۰ درصد FBS(Gibco,UK)^۱ دو میلی‌مولار L-Glutamine (Sigma,USA) و یک درصد اسیدهای آمینه غیرضروری (Sigma, USA) کشت شده و در فلاسک‌های کشت ۴۰ میلی‌لیتری و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ به میزان ۵ درصد نگهداری شدند.

سلول‌های رده PC12 در دو گروه کنترل و آزمایش مطالعه شدند. ظروف کشت حاوی سلول‌های گروه آزمایش در داخل محفظه قرارداده شدند و فشار هیدرواستاتیک به میزان ۱۰۰ میلی‌متر جیوه و به مدت ۲ ساعت به داخل محفظه، پمپ شد. در گروه کنترل ظروف کشت حاوی سلول‌ها در محفظه دیگری بدون آن‌که به آنها فشار اعمال شود، در انکوباتور قرارداده شدند. سپس سلول‌ها از نظر میزان بقاء، وقوع آپوپتوز، مورفولوژی، چسبیدن به بستر، گسترش و مهاجرت سلولی ارزیابی شدند. در هر ارزیابی، آزمایش‌ها ۴ بار تکرار شد.

سیستم اعمال فشار هیدرواستاتیک

سیستم اعمال فشار هیدرواستاتیک مورد استفاده در این تحقیق یک مدل تأیید شده در بین سیستم‌های متعدد اعمال فشار هیدرواستاتیک بر سلول‌هاست که پیش از این توسط آگار و همکارانش مورد استفاده قرار گرفته است [۷۸]. این سیستم، شامل یک محفظه است که از طریق یک دریچه ورودی هوا به یک پمپ دمنده فشار متصل می‌شود. در این سیستم فشار هیدرواستاتیک ایجاد شده در محفظه توسط یک فشار سنج جیوه‌ای در خارج انکوباتور تنظیم می‌شود.

بررسی میزان بقای سلول‌ها

به منظور تعیین اثر افزایش فشار هیدرواستاتیک بر درصد

بقای سلول‌های رده PC12، سلول‌ها با تراکم ۵×۱۰^۵ سلول در هر خانه ظروف کشت ۲۴ خانه کشت شده و به محفظه اعمال فشار منتقل شدند. سپس سلول‌های هر دو گروه در چهار زمان ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال فشار از نظر میزان بقای سلول‌ها ارزیابی شدند. بدین منظور ابتدا جداسازی سلول‌ها از کف ظرف با آنزیم تریپسین-EDTA ۰/۲۵ درصد (Sigma,USA) انجام شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو مخلوط و پس از ۲ دقیقه سلول‌ها روی لام نئوبار شمارش شدند. درصد بقای سلول‌ها از تقسیم تعداد سلول‌های رنگ نگرفته بر تعداد کل سلول‌ها ضربدر عدد ۱۰۰ محاسبه شد [۹].

بررسی وقوع آپوپتوز در سلول‌ها

برای بررسی میزان وقوع آپوپتوز در اثر اعمال فشار هیدرواستاتیک از رنگ آمیزی TUNEL^۲ استفاده شد. این نوع رنگ آمیزی روشی برای مشخص کردن قطعه قطعه شدن منظم DNA در جریان مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است [۱۰]. سلول‌ها با تراکم ۱۰^۳ سلول در هر خانه ظروف کشت ۹۶ خانه کشت داده شدند، پس از انجام آزمایش سلول‌ها در محلول پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت یک ساعت تثبیت شدند. نفوذپذیری غشای سلول‌ها با استفاده از محلول ۰/۲ درصد Triton X-100 (Sigma, USA) به مدت دو دقیقه روی یخ انجام شد. سپس سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط تارکی با محلول ترکیبی TUNEL (Roche, Denmark) انکوبه شدند. سرانجام رنگ‌آمیزی سلول‌ها در محلول ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروپیدیوم یدید

2- Terminal Uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End

Labeling

1- Fetal Bovine Serum

مورفولوژی در هر دو گروه کنترل و آزمایش بررسی شدند [۱۱]. برای اندازه‌گیری مساحت سلول‌ها از نرم‌افزار Motic (Ver 2) استفاده شد.

بررسی توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر

این آزمون به منظور تعیین اثر افزایش فشار هیدرواستاتیک بر توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر و بر اساس مطالعات پیشین انجام شد [۱۲]. بدین منظور سلول‌ها پس از بازگرداندن از محفظه اعمال فشار با آنزیم تریپسین-EDTA ۰/۲۵ در صد از کف ظروف کشت جدا شدند. سپس سوسپانسیون سلولی به دست آمده از هر دو گروه با تراکم ۱۰۴ سلول در هر خانه ظروف کشت ۲۴ خانه پوشیده شده با کلاژن ۲ درصد مجدداً پلیت شده و در انکوباتور قرار داده شدند. در زمان‌های ۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از پلیت مجدد و فرصت دادن به سلول‌ها برای چسبیدن به بستر، محلول رویی حاوی سلول‌های نچسبیده برداشته شد و سلول‌های چسبیده توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت یک ساعت تثبیت شدند. شمارش سلول‌های چسبیده به کف ظرف کشت توسط عکسبرداری از تمام نقاط ظرف کشت (بزرگنمایی ۴۰ X) در هریک از فواصل زمانی مورد مطالعه در هر دو گروه انجام و تعداد سلول‌های چسبیده به بستر شمارش شدند.

بررسی توانایی گسترش سلول‌ها بر بستر

این آزمون به منظور تعیین اثر افزایش فشار هیدرواستاتیک بر توانایی گسترش سلول‌های رده PC12 به کف ظرف کشت پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک انجام گرفت. بدین منظور همانند آنچه در روش بررسی توانایی چسبندگی سلول‌ها به بستر انجام شد، سلول‌ها پس از تریپسینه شدن و پلیت مجدد این بار در زمان‌های ۱/۵، ۳ و ۴/۵ ساعت که به سلول‌ها

انجام شد و سلول‌ها پس از سه بار شستشو با PBS^۱ با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus AX-70; Japan) مطالعه شدند. سلول‌های با هسته دارای رنگ زرد درخشان به عنوان سلول‌های آپوپتوتیک شمارش شده و در نهایت شاخص آپپتوز از تقسیم تعداد سلول‌های آپوپتوتیک بر تعداد کل سلول‌ها ضربدر عدد ۱۰۰ محاسبه شد. در این آزمایش از هر خانه ظرف کشت، ۴۰ زمینه میکروسکوپی (بزرگنمایی ۱۰۰ X) به طور تصادفی بررسی شد. سلول‌های PC12 که در محیط کشت همراه با اتانل ۵ درصد، به عنوان القاء گر قوی آپپتوز، به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

بررسی مساحت سلول‌ها

این آزمون به منظور تعیین اثر افزایش فشار هیدرواستاتیک بر مورفولوژی سلول‌های PC12 انجام گرفت. سلول‌ها با تراکم ۵×۱۰۳ سلول در هر خانه ظروف کشت ۲۴ خانه کشت شده و به محفظه اعمال فشار منتقل شدند. سپس سلول‌های هر دو گروه در چهار زمان ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال فشار از نظر مساحت سلول‌ها ارزیابی شدند. بدین منظور سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت یک ساعت تثبیت و سپس با رنگ کریستال ویولت ۲ درصد رنگ‌آمیزی شدند. عکسبرداری از مناطق تصادفی ظرف کشت توسط میکروسکوپ معکوس (Olympus AX-71; Japan) انجام شده و در هریک از زمان‌های مورد مطالعه حداقل ۱۰۰ سلول بررسی شد. از آنجا که سلول‌های رده PC12 ناهمگون بودند، برای بررسی آنها سه شاخص مورفولوژیکی گرد، دوکی و چند وجهی در نظر گرفته شده و به تعداد برابر از هر

1- Phosphate Buffer Saline

تفاوت‌های با $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان بقای سلول‌ها

بررسی میزان بقا سلول‌ها در دو گروه کنترل و آزمایش در چهار زمان ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک نشان داد که میزان بقای سلول‌ها در هر دو گروه بیش از ۹۳ درصد بود. این بدان معناست که فشار هیدرواستاتیک، اختلاف معنی‌داری را در میزان بقای سلول‌ها بین دو گروه کنترل و آزمایش ایجاد نکرده است ($p < 0.05$).

اثر فشار هیدرواستاتیک بر شاخص آپوپتوز در سلول‌ها

بررسی نتایج به‌دست آمده از مقایسه شاخص آپوپتوز در سلول‌های رده PC12 پس از رنگ‌آمیزی TUNEL نشان داد که اعمال فشار هیدرواستاتیک سبب ایجاد مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در سلول‌های گروه آزمایش شده بود به‌طوری‌که شاخص آپوپتوز از 4 ± 0.5 در گروه کنترل به 13 ± 1 در گروه آزمایش افزایش معنی‌داری یافته بود ($p < 0.05$) (شکل ۱).

اثر فشار هیدرواستاتیک بر مساحت سلول‌ها

اندازه‌گیری مساحت سلول‌های رده PC12 در چهار فاصله زمانی ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک، کاهش معنی‌داری را بین مساحت سلول‌های گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$). به‌طوری‌که مساحت سلول‌ها در چهار فاصله زمانی اندازه‌گیری شده در گروه کنترل به ترتیب 38 ± 1050 ، 34 ± 839 ، 29 ± 805 و 33 ± 805 میکرومتر مربع و در گروه آزمایش 32 ± 817 ، 31 ± 653 ، 15 ± 708 و 28 ± 685 میکرومتر مربع بود. این کاهش در مساحت سلول‌های گروه آزمایش نشانه جمع‌شدگی و چروکیدگی سلول‌ها تحت استرس فشار هیدرواستاتیک بوده است (نمودار ۱).

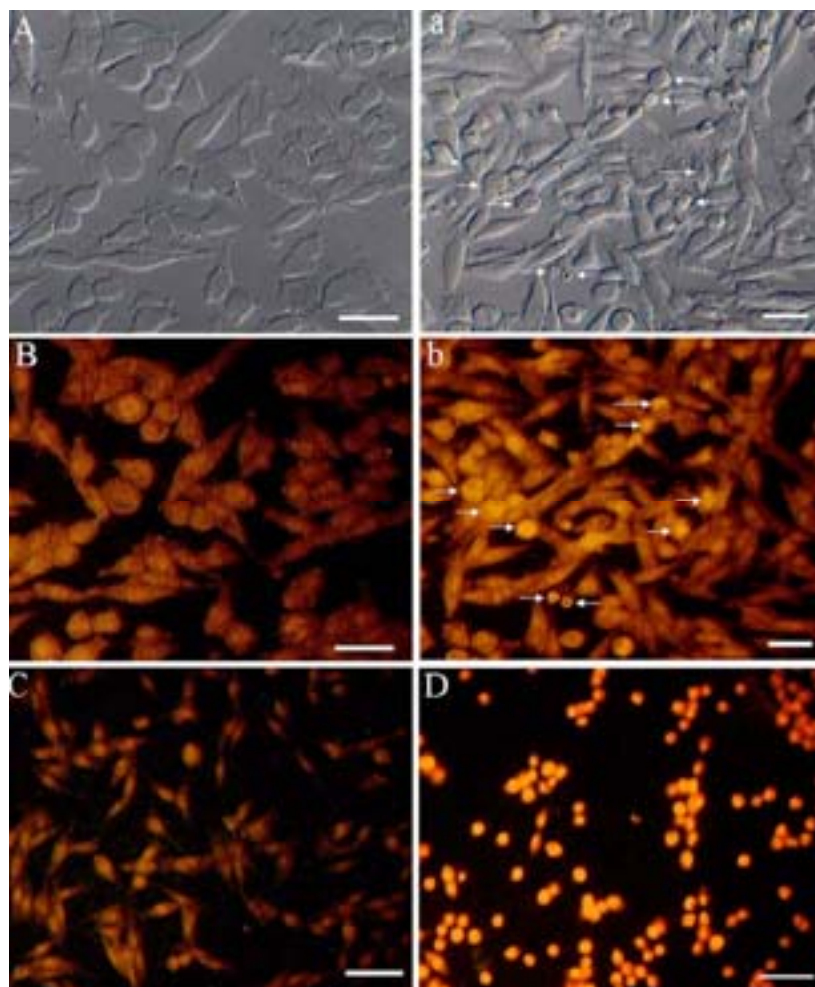
فرصت داده شد تا به کف ظرف کشت بچسبند و گسترش یابند، توسط عکسبرداری از مناطق تصادفی ظرف کشت ارزیابی شدند. برای ارزیابی توانایی گسترش سلول‌ها بر اساس مطالعات پیشین [۱۳، ۱۴] نسبت تعداد سلول‌های گسترش یافته و پهن شده به کل سلول‌ها ضربدر عدد ۱۰۰ در هر زمینه عکسبرداری محاسبه و بین دو گروه آزمایش و کنترل مقایسه شد.

ارزیابی توانایی مهاجرت سلول‌ها

در این آزمون به سلول‌های رده PC12 اجازه داده شد که آن‌قدر تقسیم شوند تا کاملاً کف ظرف کشت را پر کرده و به‌صورت تک لایه سلولی درآیند. پس از خارج کردن ظروف کشت از محفظه، بخش مشخصی از تک لایه سلولی از کف ظرف کشت با استفاده از یک تیغ تمیز و استریل تراشیده شده تا یک سطح عاری از سلول و علامت‌گذاری شده در کف ظرف ایجاد شد. تک لایه تراشیده شده به آرامی از ظرف کشت شسته شد و در ادامه محیط کشت تازه جایگزین شد. ظرف کشت را به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده و پس از گذشت این زمان سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت یک ساعت تثبیت شدند و در نهایت با عکسبرداری (بزرگنمایی $200 \times$) از مناطق علامت‌گذاری شده، تعداد سلول‌های مهاجرت کرده از خط نشانه شمارش شدند [۱۵].

بررسی‌های آماری

داده‌های مربوط به درصد بقای سلول‌ها، شاخص آپوپتوز، مساحت، درصد سلول‌های گسترش یافته، تعداد سلول‌های چسبیده به بستر و تعداد سلول‌های مهاجرت کرده در دو گروه کنترل و آزمایش به‌صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین محاسبه شد و از آزمون T-test (SPSS, Ver.12) برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد و



شکل ۱. اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان وقوع آپوپتوز در سلولهای عصبی رده PC12.

سلولهای عصبی رده PC12 در گروه کنترل (A) و (a) (میکروسکوپ معکوس)؛ سلولهای عصبی رده PC12 در گروههای کنترل (B) و آزمایش (b) (رنگ آمیزی: TUNEL)؛

سلولهای به رنگ زرد درخشان دچار آپوپتوز شده اند. C: سلولهای گروه کنترل منفی، D: سلولهای گروه کنترل مثبت (تیمار با اتانول) ← سلولهایی که دچار آپوپتوز شده اند.

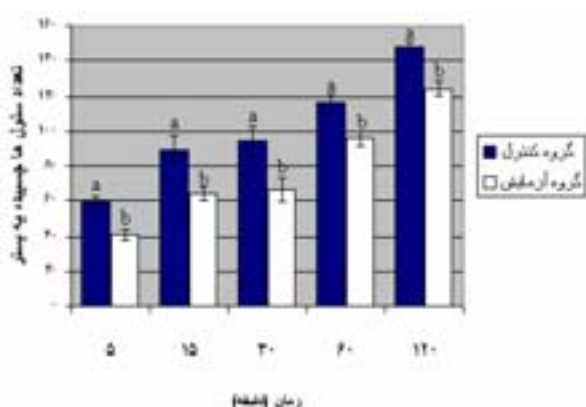
گروه کنترل: بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک، گروه آزمایش: با اعمال فشار هیدرواستاتیک. (بار: ۴۰ میکرومتر).

اثر فشار هیدرواستاتیک بر توانایی چسبندگی به

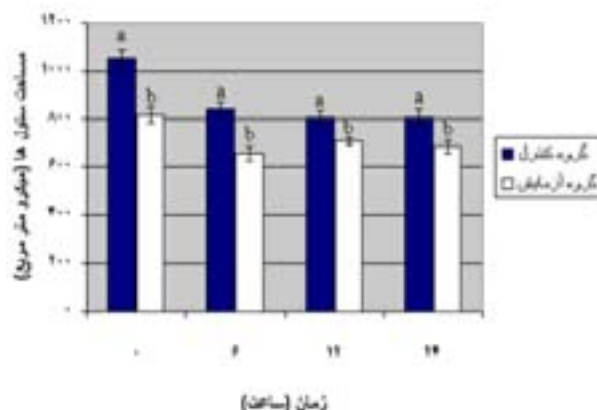
بستر سلولها

سلولهای رده PC12، ۵ دقیقه پس از پلیت مجدد شروع به چسبیدن به بستر کردند. نتایج به دست آمده از شمارش تعداد سلولهای چسبیده به بستر در زمانهای مختلف نشان داد که در زمانهای مورد مطالعه کاهش قابل ملاحظه و معنی داری در تعداد سلولهای چسبیده به بستر در گروه

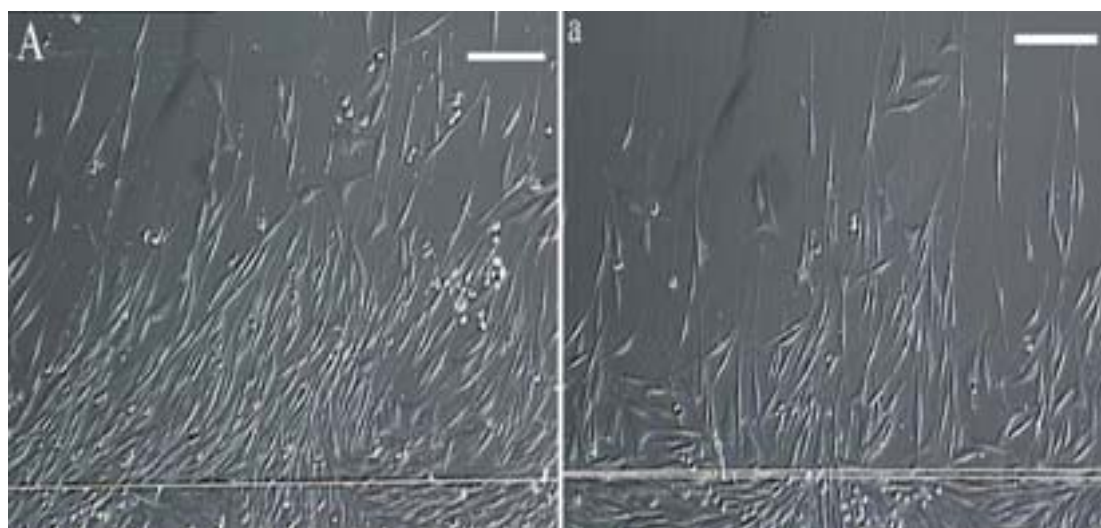
آزمایش در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$). براساس این مشاهدات میانگین تعداد سلولهای چسبیده به بستر در پنج زمان مورد بررسی در گروه کنترل به ترتیب 59 ± 1 ، 89 ± 8 ، 94 ± 9 ، 116 ± 5 ، و 147 ± 3 و در گروه آزمایش 41 ± 3 ، 64 ± 4 ، 66 ± 7 ، 95 ± 4 و 124 ± 4 بود (شکل ۲، نمودار ۲).



نمودار ۲. مقایسه اثر فشار هیدرواستاتیک بر توانایی چسبیدن به بستر در سلول‌های رده PC12. a و b: ستون‌های با حروف مختلف دارای اختلاف معنی‌دار هستند (T-test, $p < 0.05$); گروه کنترل: سلول‌ها بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک، گروه آزمایش: سلول‌ها در معرض فشار هیدرواستاتیک



نمودار ۱. اثر فشار هیدرواستاتیک بر مورفولوژی سلول‌های رده PC12 در زمان‌های مختلف. a و b: ستون‌های با حروف مختلف دارای اختلاف معنی‌دار هستند (T-test, $p < 0.05$); گروه کنترل: سلول‌ها بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک، گروه آزمایش: سلول‌ها در معرض فشار هیدرواستاتیک

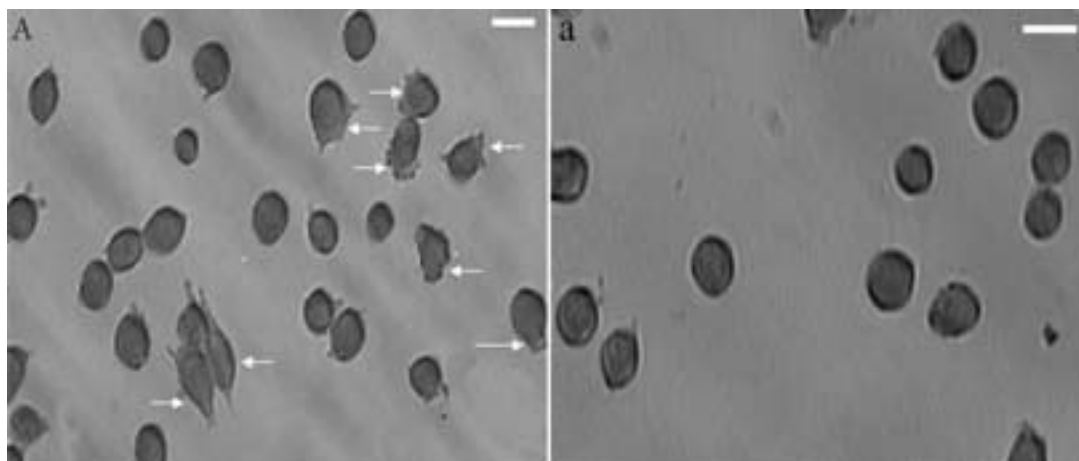


شکل ۲. اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان مهاجرت سلولی در سلول‌های عصبی رده PC12. کاهش تعداد سلول‌های مهاجرت یافته در گروه آزمایش (a) در مقایسه با گروه کنترل (A) مشهود است؛ گروه کنترل (بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک) (A) و آزمایش (با اعمال فشار هیدرواستاتیک) (a)، (بار: ۱۰۰ میکرومتر).

سلولی در سلول‌های گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل شده است ($p < 0.05$). به‌طوری‌که میزان گسترش سلول‌ها در زمان‌های ۱/۵، ۳ و ۴/۵ ساعت پس از پلیت مجدد به ترتیب از ۴، ۵۱ و ۵۲ درصد در گروه کنترل به ۲۸، ۲۳ و ۲۸ درصد در گروه آزمایش کاهش یافته است (شکل ۳، نمودار ۳).

اثر فشار هیدرواستاتیک بر میزان گسترش سلول‌ها

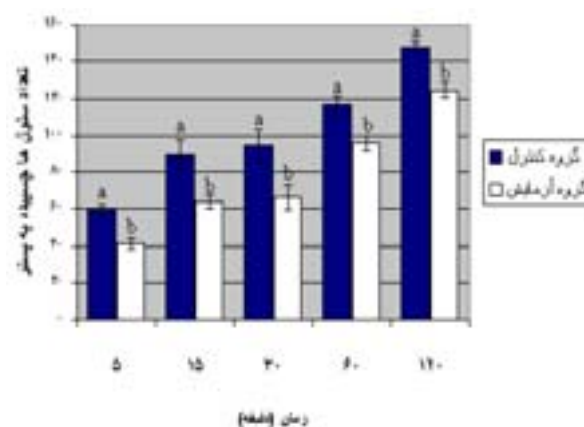
بررسی میزان گسترش سلول‌ها پس از ۱/۵ ساعت از پلیت مجدد آغاز شده و تا ۴/۵ ساعت ادامه یافت. نتایج به‌دست آمده از ارزیابی نسبت تعداد سلول‌های گسترش یافته به کل سلول‌ها نمایانگر آن بود که اعمال فشار هیدرواستاتیک سبب کاهش معنی‌دار میزان گسترش



شکل ۳. اثر فشار هیدرواستاتیک بر مورفولوژی سلولهای عصبی رده PC12. میزان گسترش سلولها در گروه آزمایش (a) در مقایسه با گروه کنترل (A) کاهش یافته است. ←: سلولهای گسترش یافته روی بستر؛ گروه کنترل: بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک، گروه آزمایش: با اعمال فشار هیدرواستاتیک، (بار: ۳۰ میکرومتر).

بحث

فشار هیدرواستاتیک یکی از اجزای حیاتی محیط اطراف سلولهاست که در صورت تغییر از میزان معمول حتی به صورت جزئی می تواند منجر به بروز حالت های آسیب رسان در سلولها شود. سلولهای دستگاه عصبی از جمله سلولهایی هستند که تحت تاثیر مقادیر مختلف فشار هیدرواستاتیک قرار دارند. اغلب مطالعات پیشین که در زمینه بررسی اثر فشار هیدرواستاتیک بر تغییرات حیاتی سلولهای عصبی انجام شده یا به صورت *in vivo* بوده [۱۶] یا از سلولهای عصبی همراه با سلولهای دیگری به صورت همگشتی استفاده شده است [۱۷]. از محدود مطالعاتی که سلولهای عصبی را به تنهایی و به طور مستقیم در معرض فشار هیدرواستاتیک قرار داده و تغییرات حیاتی و عملکردی سلولها را مورد بررسی قرار داده است، تحقیقات رونالد و یلسون (Ronad & Wilson) بود [۱۸، ۱۹]. آنان پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک به میزان 5×10^4 کیلوپاسکال، تغییرات اسکلت سلولی و بیان ژنهای مرتبط با آن را در سلولهای



نمودار ۲ مقایسه اثر فشار هیدرواستاتیک بر توانایی چسبیدن به بستر در سلولهای رده PC12. a و b: ستونهای با حروف مختلف دارای اختلاف معنی دار هستند (T-test, $p < 0.05$). گروه کنترل: سلولها بدون اعمال فشار هیدرواستاتیک، گروه آزمایش: سلولها در معرض فشار هیدرواستاتیک

اثر فشار هیدرواستاتیک بر توانایی مهاجرت سلولها

نتایج به دست آمده از شمارش تعداد سلولهای مهاجرت کرده نشان داد که اعمال فشار هیدرواستاتیک سبب کاهش معنی دار تعداد سلولهای مهاجرت کرده از 4 ± 65 در گروه کنترل به 1 ± 14 در گروه آزمایش شده بود ($p < 0.05$) (شکل ۴).

نزد محققان به عنوان یک مدل بسیار مناسب برای مطالعات نورویولوژیک و نوروشیمیایی سالیان سال است که مورد استفاده قرار می گیرد [۱۸، ۱۹].

در این مطالعه میزان بالای بقای سلول‌ها درصد بقای سلولهای هر دو گروه می‌تواند به این دلیل باشد که ملایم بودن فشار هیدرواستاتیک اعمال شده در دامنه فیزیولوژیک بود.

پس از اثبات وقوع آپوپتوز در اثر فشار هیدرواستاتیک آزمایش‌ها با ارزیابی‌های مورفولوژیکی دنبال شد. براساس مقالات گذشته بررسی‌های مورفولوژیکی سلول‌های رده PC12 با اندازه‌گیری مساحت این سلول‌ها انجام شد [۲۱، ۱۱]. نکته قابل توجه در مشاهدات مورفولوژیکی، عدم وجود تقریباً حتی یک سلول دوکی شکل یا چند وجهی در میان سلول‌های آپوپتوتیک بود که نشان‌دهنده اثر فشار هیدرواستاتیک در جمع شدن این سلول‌ها است. از سوی دیگر مقایسه میزان گسترش سلولی بین دو گروه و کاهش معنی‌دار درصد سلول‌های گسترش یافته در گروه آزمایش نشان داد که احتمالاً سلول‌ها در حین آپوپتوز اتصالاتشان را با سوبسترا کم می‌کنند که در واقع این مسئله علت اصلی گرد شدن سلول‌ها است.

نیاز به اتصال سلولی برای رشد در سلول‌های طبیعی اولین بار توسط استوکر (Stoker) و همکارانش مطرح شد [۲۲]. این محققین نشان دادند که سلول‌های طبیعی در صورت عدم اتصال در فاز G1 سیکل سلولی متوقف و در نهایت دچار آپوپتوز می‌شوند. این نوع آپوپتوز که در پاسخ به برهمکنش نامناسب سلول-بستر رخ می‌دهد، آنوکیز نام دارد [۶]. این نتایج محققان حاضر را بر آن داشت که توانایی سلول‌ها برای اتصال به سوبسترا را بررسی کنند. فشار هیدرواستاتیک سبب کاهش معنی‌دار توانایی سلول‌ها برای اتصال مجدد بعد از کنده شدن از بستر شده بود. در این آزمایش شروع اتصال

عصبی بررسی کرده و نشان دادند که فشار هیدرواستاتیک سبب قطع ارتباطات اجزای اسکلت سلولی، کاهش میزان mRNA توبولین و اکتین می‌شود.

مطالعات در مورد آثار مستقیم فشار هیدرواستاتیک روی سلول‌های عصبی با تحقیقات آگار و همکارانش ادامه یافت [۸، ۷]. اهمیت مطالعات ایشان به دلیل محدوده فیزیولوژیک فشار اعمال شده بر سلول بود زیرا فشار ۱۰۰ میلی‌متر جیوه که در مطالعه آنها بررسی شد، فشاری است که در حالت پرفشاری اتاقک داخلی چشم در بیماری گلوکوما اتفاق می‌افتد. بنابراین افزایش فشار هیدرواستاتیک در این محدوده می‌تواند در بررسی پیامدهای واقعی افزایش فشار هیدرواستاتیک در عملکرد سلول مورد توجه قرار گیرد. آگار و همکارانش به این نتیجه رسیدند که افزایش فشار هیدرواستاتیک به میزان ۱۰۰ میلی‌متر جیوه و به مدت ۲ ساعت سبب القای آپوپتوز در رده‌های سلولی مختلف عصبی می‌شود. این تحقیق احتمال ارتباط مستقیم بین افزایش فشار و بروز آسیب در نوروها را قوت بخشید [۸].

تحقیق حاضر براساس تحقیقات آگار و همکارانش و با این پیش فرض که فشار هیدرواستاتیک در سلول‌های عصبی سبب ایجاد آپوپتوز می‌شود، سعی در شناخت مکانیسم‌های سلولی مؤثر در ایجاد آپوپتوز ناشی از استرس فشار هیدرواستاتیک که هنوز هم ناشناخته مانده دارد. در این مطالعه از رده سلولی PC12 استفاده شد. رده سلولی PC12 در سال ۱۹۷۶ توسط گرین و تیچلر (Greene & Tischler) از تومور فئوکروموسیتوما واقع درمدولای غده فوق کلیوی رت (قسمتی از غده فوق کلیه که ماهیت عصبی دارد) استخراج شده است [۲۰]. این سلول‌های کلونال، مانند سایر سلول‌های سمپاتیکی بالغ نوروترانسمیترهای کاتکول آمین، دوپامین و نوراپی نفرین را سنتز و ترشح می‌کنند و برای ادامه حیات وابسته به اتصال مناسب با بستر هستند. سلولهای رده PC12

سبب کاهش میزان مهاجرت سلول‌ها شده بود. کاهش مهاجرت سلولی بیانگر، تغییرات ایجاد شده در غشای سلولهای تحت استرس فشار هیدرواستاتیک است.

به‌طور کلی در این مطالعه در کنار تشخیص آپوپتوز در سلول‌های رده PC12 روندهای مورفولوژیکی و عملکردی منجر به این نوع مرگ سلولی هم مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها بیانگر آن بود که افزایش فشار هیدرواستاتیک می‌تواند بر برهمکنش سلول-بستر تأثیر داشته باشد. بررسی عملکرد سلول در چسبندگی، گسترش و مهاجرت نشان داد که همگی آنها تحت تأثیر فشار هیدرواستاتیک دچار تغییرات عمده می‌شوند و می‌توان چنین گفت که آپوپتوز ایجاد شده در سلول‌ها به دنبال کم شدن برهمکنش‌های سلول - بستر و به عبارتی دیگر آنوئیکیز (مرگ سلولی ناشی از اختلال در برهمکنش مناسب سلول - بستر) است.

سلول‌ها به کف پلیت در حدود ۱۰ دقیقه بود که در این حالت همه سلول‌ها هنوز گرد بودند. دوکی شدن سلول‌ها بعد از گذشت حدود ۳۰ دقیقه شروع می‌شد که می‌تواند در نتیجه شروع گسترش سلولی و به‌کارگیری مولکول‌های اتصالی و ایجاد کمپلکس‌های اتصالی بیشتر باشد. براساس نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد که سلول‌ها پس از اعمال فشار هیدرواستاتیک، کمپلکس‌های اتصالی کمتری را ایجاد می‌کنند. یکی دیگر از خصوصیات سلولهای وابسته به اتصال که نشان‌دهنده برهمکنش سلول با بستر است مهاجرت سلولی است. مهاجرت سلولی فرایندی است که به واکنش‌های اتصالی وابسته به اینتگرین احتیاج دارد. سیکل‌های تکراری تجزیه و ترکیب کمپلکس‌های اتصالی و پلیمریزه شدن اکتین برآمدگی‌هایی در غشای سلول ایجاد می‌کند که منجر به پیشروی سلول به جلو و در نهایت مهاجرت سلولی می‌شود [۲۳]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فشار هیدرواستاتیک

References

1. Tan J, Kalapesi F, Coroneo M. Mechanosensitivity and the eye: cells coping with the pressure. J Ophthalmol 2006; 90: 383-8.
2. Geiger B, Bershadsky A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. Cell 2002; 110: 139-42.
3. Giancotti, F. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. Curr. Opin. Cell Biol 1997; 9 691-700.
4. Darlene G, Ross A, Desai A. Characterization of PC12 cell proliferation and differentiation-stimulated by ECM adhesion proteins and neurotrophic factors. J Materials Sci 2003; 14: 1005-9.
5. Ruoslahti E, Reed J. Anchorage dependence, integrins and apoptosis. Cell 1994; 77: 477-8.
6. Gilmore A. Anoikis. Cell Death Differ 2005; 12: 1473- 7.
7. Agar A, Li Sh, Agarwal N, Coroneo M, Hill M. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. Brain Res 2006; 1086: 191-200.
8. Agar A, Yip S, Hill M, Coroneo M. Pressure related apoptosis in neuronal cell lines. J Neurosci Res 2000; 60: 495-503.
9. Freshney R. Animal cell culture: a practical approach. London: Oxford university press, 1992, pp 287-307.
10. Gold R. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. Lab Invest 1994; 71: 219-28.
11. Edwards J, Campbell M, Carr M, Edwards C. Shapes and cells spreading on fibronectin: measurement of the stellation of BHK21 cells induced by raising cyclic AMP, and of its reversal serum and lysophosphatidic acid. J Cell Sci 1993;

- 104: 399–407.
12. **Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Iwashita, M.** Characterization of Morphological and Cytoskeletal Changes in Trophoblast Cells Induced by Insulin-Like Growth Factor-I. *J Clin Endocrin. Metab* 2002; 12: 5751–59.
 13. **Raucher D, Sheetz M.** Cell spreading and lamelliopodial rate is regulated by membrane tension. *Cell Biol* 2000; 148: 127-36.
 14. **Felsenfeld D, Schwartzberg P, Venegas A, Tse R, Sheetz M.** Selective regulation of integrin—cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat. Cell. Biol* 1999; 1: 200–6.
 15. **Jones J, Prevette T, Gockerman A, Clemmons D.** Ligand occupancy of the $\alpha_v \beta_3$ integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to IGF-I. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 2482-7.
 16. **Guo I, Moss S, Alexander R, Ali R, Fitzke F, Cordeiro M.** Retinal Ganglion Cell Apoptosis in Glaucoma is Related to Intraocular Pressure and IOP-Induced Effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 175–82.
 17. **Tezel G, Wax M.** Increased production of tumor necrosis factor- α by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induced apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2000; 23: 8693-700.
 18. **Ronald G, Wilson J, Judy E, Zimmerman S, Zimmerman A.** Hydrostatic pressure induced changes in the cytoarchitecture of PC12 cells. *Cell Biol Int* 2001; 25(7): 667-77.
 19. **Wilson R, Trogardis J, Zimmerman S, Zimmerman A.** the effects of hydrostatic pressure induced changes on the cytoskeleton and on the regulation of gene expression in PC12 Cells. *Cell Biol Int* 2001; 7: 649–65.
 20. **Greene L, Tischler A.** Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Nat. Acad. Sci* 1976; 73: 2424-8.
 21. **Dunn G, Brown F.** Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation. *J Cell Sci* 1986; 83: 313-40.
 22. **Stoker M, O'Neill S, Waxman V.** Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int. J Cancer* 1968; 3: 683-93.
 23. **Lauffenburger D, Horwitz A.** Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84: 359-69.