

گزارش کوتاه (Brief Report)

تهیه سیناپتوزوم مخچه موش بزرگ آزمایشگاهی
و کاربرد پژوهشی آن در بررسی پروتئین‌های غشای پیش‌سیناپسی

چکیده

زمینه و هدف: سیناپتوزوم به عنوان مدلی *In Vitro* واجد خواص منحصر به فردی است. لذا روش کلی تهیه و کاربرد آن در مطالعه پروتئین‌های غشای پیش‌سیناپسی معرفی می‌گردد. روش بررسی: این مطالعه با استفاده از ۵ سر موش انجام و در هر آزمایش سیناپتوزوم‌ها از مخچه یک موش تهیه شد. تایید سلامت نمونه‌ها به کمک شاخص‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیک و فعالیت فیزیولوژیک آنها براساس پاسخ ترشحی به دیپولاریزاسیون غشاء مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) بعد از تخریب غشاء نسبت به نمونه‌های سالم افزایش داشت ($9 \pm 1/8$ ، $n=5$). دیپولاریزاسیون غشاء با غلظت ۱۵ میلی‌مولار یون پتاسیم رهاش سیناپتوزومی میانجی عصبی آگزوژن را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($3 \pm 0/76$ برابر نسبت به حالت پایه، $n=5$). در میکروگراف‌های تهیه شده، غشای پلاسمایی، میتوکندری و وزیکول‌های سیناپسی مشاهده شدند.

نتیجه‌گیری: رفتار ترشحی سیناپتوزوم به غلظت پتاسیم محیط وابسته بوده و بررسی مستقیم رهاش پایه و تحریک شده میانجی عصبی را فراهم می‌نماید. استفاده از سیناپتوزوم به دلیل سهولت، کارایی بالا و امکان تهیه از نمونه‌های انسانی رو به گسترش است.

کلید واژه‌ها: سیناپتوزوم - نمونه‌های انسانی - مدل‌های بافتی *In Vitro*

دکتر سیدمهران حسینی

استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

دکتر علیرضا عسگری

استاد گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... الاعظم (عج)

دکتر حسینعلی مهرانی

استاد گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... الاعظم (عج)

دکتر علی خوش باطن

استاد گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... الاعظم (عج)

نویسنده مسؤول: دکتر سیدمهران حسینی

پست الکترونیکی: hosseini@goums.ac.ir

نشانی: گرگان، ابتدای جاده شصتکلا، دانشگاه علوم پزشکی

گلستان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

تلفن: ۴۴۲۱۶۵۳-۰۱۷۱

نمبر: ۴۴۲۵۱۷۱

وصول مقاله: ۸۵/۶/۱۴

اصلاح نهایی: ۸۵/۱۲/۱۶

پذیرش مقاله: ۸۶/۱/۲۸

مقدمه

سیناپتوزوم اولین بار در سال ۱۹۵۷ به وسیله Whittaker و Hebb تهیه گردید. سیناپتوزومها در جریان هموژن کردن بافت تشکیل می شوند. باریکی محل اتصال پایانه عصبی با آکسون این نقطه را بسیار آسیب پذیر ساخته است. وجود نیروهای جاذبه فیزیکی و شیمیایی بین فسفولیپیدهای غشاء و مجاورت نزدیک دو انتهای پاره شده غشاء موجب اتصال مجدد آنها و تولید سیناپتوزوم می شود. سیناپتوزوم از تمام بافت های عصبی و شبکه های عصبی بافت های دیگر نظیر قلب و روده قابل استخراج است (۱). شناسایی سیناپتوزوم براساس وجود میتو کندری، وزیکول های سیناپسی و غشای پلاسمایی محصور کننده بوده و عدم پارگی و آسیب غشاء نیز از طریق بررسی فعالیت آنزیم LDH ارزیابی می گردد. سیناپتوزومها معمولاً از رسوب P2 یا فرکشن میتو کندریایی به دست می آیند (۲). در مخچه با روشی نسبتاً ساده و سریع می توان از رسوب P1 یا فرکشن هسته ای نیز سیناپتوزوم استخراج نمود (۳). به منظور آشنایی بیشتر با این مدل بافتی روش استخراج، کاربرد آن در مطالعه پروتئین های غشای پیش سیناپسی و معیارهای ساختمانی و عملکردی ارزیابی سلامت سیناپتوزوم های تهیه شده از فرکشن هسته ای مخچه بررسی می گردد.

روش بررسی مواد

$[^3\text{H}]\text{GABA}$ و کوکتل سنتیلاسیون ASCII از شرکت آمرشام (انگلستان)، آمینواکسی استیک، نیکوتیک اسید و سایر مواد بافرهای هموژناسیون، استاندارد و تحریک از شرکت سیگما خریداری شد.

حیوانات

در این مطالعه از ۵ سر موش نر بالغ نژاد Sprague-dawely با وزن بین ۲۴۰-۱۸۰ گرم استفاده و هر ست آزمایش با مخچه یک موش انجام شد. حیوانات تا زمان آزمایش در شرایط حرارت 22 ± 1 درجه سانتی گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به آب و غذا (پارس دام) نگهداری می شدند. در تمامی مراحل، کار روی حیوانات طبق موازین دانشگاه علوم پزشکی بقیه.. (عج) انجام شد.

تهیه سیناپتوزوم استاندارد مخچه

بعد از بیهوش نمودن حیوان با اتر و جدا کردن سر، به سرعت مخچه را خارج و در محلول هموژناسیون سرد قرار داده و پس از توزین هموژن کردیم. به منظور اجتناب از تغییرات ناشی از متابولیسم تمام مراحل بعدی تا زمان انکوباسیون نمونه ها، روی یخ و در حرارت $4-0$ درجه سانتی گراد انجام شد. در این روش مخچه با نسبت حجمی ۱۰ برابر در بافر هموژن یعنی سوکرز ۰/۳۲ مولار به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۹۰ دور در دقیقه و ۲۵ ضربه عمودی هموژن شد. نمونه حاصل به مدت پنج دقیقه با شتاب $1000 \times g$ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دوباره به مدت ۲۵ دقیقه با شتاب $10000 \times g$ سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده در یک میلی لیتر بافر استاندارد سرد، هواگیری شده و حاوی آمینواکسی استیک اسید (۰/۱ میلی مولار) حل شد. ماده اخیر یک مهارکننده آنزیم گابا ترانس آمیناز است و از متابولیزه شدن و تبدیل گابا به متابولیت های دیگر ممانعت می کند. ترکیب بافر استاندارد به شرح زیر بود:

کلرید سدیم ۱۲۵ میلی مولار، کلرید پتاسیم ۳ میلی مولار، سولفات منیزیم ۱/۲ میلی مولار، کلرید کلسیم ۱/۲ میلی مولار، فسفات هیدروژن سدیم ۱ میلی مولار، کربنات هیدروژن سدیم ۲۲ میلی مولار و گلوکز ۱۰ میلی مولار

تهیه سیناپتوزوم غول پیکر مخچه

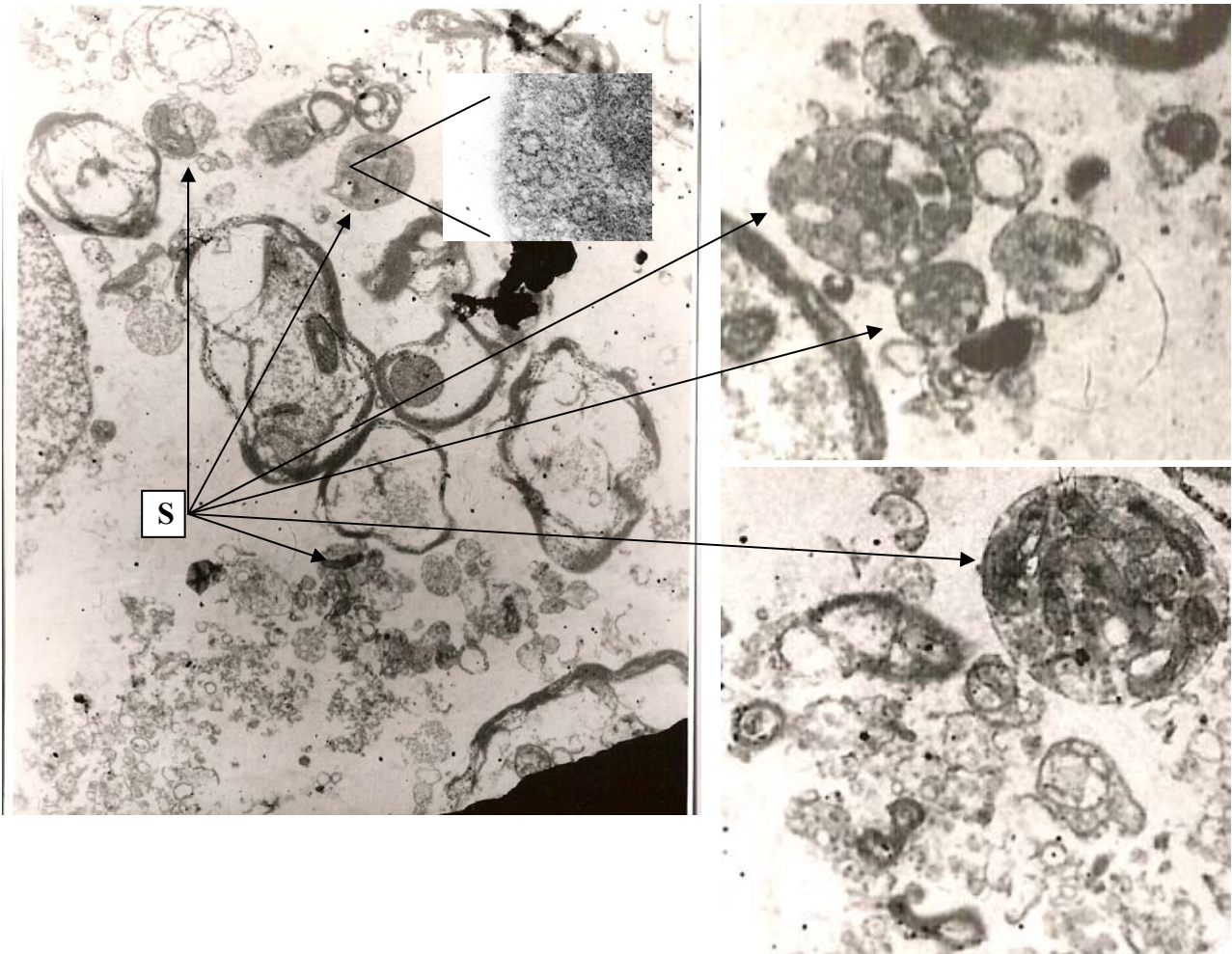
تهیه هموژن مخچه و مرحله اول جداسازی بقایای هسته و اجزای سلولی از آن مشابه روش اول انجام شد. بعد از تخلیه مایع رویی، رسوب دوباره در بافر هموژن سرد و هواگیری شده و با همان نسبت حجمی به آرامی حل و به مدت ۵ دقیقه با شتاب $1000 \times g$ سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل را در حجم مناسبی از بافر استاندارد سرد به آرامی حل نمودیم (۳).

قراردهی گابای اگزوژن در سیناپتوزوم

بعد از تبادل حرارتی نمونه ها به محیط گابای نشاندار با غلظت نهایی ۰/۰۴ میکرومول اضافه شد. این مرحله به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گردید (۴).

سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز

تغییر فعالیت آنزیم LDH قبل و بعد از مواجه سیناپتوزومها



شکل ۱ میکروگراف های تهیه شده از نمونه سیناپتوزوم های مخچه (S) در بزرگ‌نمایی بیشتر میتوکندری و واکوئل‌های آکسوپلاسمی (سمت راست) و حتی وزیکول‌های سیناپسی (بخش فوقانی تصویر سمت چپ) نیز قابل مشاهده هستند.

قرار گرفتند. ترکیب این محلول مشابه بافر استاندارد بود، با این تفاوت که به منظور اجتناب از افزایش فشار اسمزی به همان مقدار افزایش یون پتاسیم از غلظت یون سدیم کاسته شد. به منظور مهار جذب مجدد میانجی رها شده به محلول‌ها اسید نیپکوتیک (مهارکننده پروتئین ناقل گابا) نیز اضافه شد (۷). رهایش تحریک شده به دو صورت استاتیک و دینامیک مورد آزمایش قرار گرفت. در روش اول بعد از اتمام انکوباسیون و شستشوی نمونه‌ها به حجم مشخصی از سوسپانسیون سیناپتوزومی در ویال‌های جداگانه بافر استاندارد یا محلول تحریک اضافه شد. ۹۰ ثانیه بعد نمونه‌ها با شتاب $12000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. پس از جداسازی مایع رویی و افزودن

با Triton X-100 به روش Moss and Henderson اندازه‌گیری شد (۵).

تهیه میکروگراف

به منظور تایید مورفولوژیک از برخی نمونه‌ها میکروگراف تهیه شد. به‌طور خلاصه بعد از ثابت کردن سوسپانسیون سیناپتوزومی در گلوتارآلدید یک درصد و قالب‌گیری با آگار و قرار دادن در تترااکسیداسیم برش‌های تهیه شده با اورانیل استات و سترات سرب رنگ‌آمیزی و به وسیله میکروسکوپ الکترونی Siezz EM900 بررسی شدند (۶).

دپولاریزاسیون و رهایش میانجی از سیناپتوزوم

برای ایجاد دپولاریزاسیون نمونه‌ها به مدت ۹۰ ثانیه در معرض محلول تحریک با غلظت ۱۵ میلی‌مولار یون پتاسیم

LDH باید نشانه آسیب و نشستی بودن نمونه‌ها تلقی گردد. با افزایش یون پتاسیم محیط و دپولاریزه کردن غشاء می‌توان آگزوستیوز تحریک شده و رهایش خودبه‌خودی نمونه را از هم متمایز و اثر عوامل مختلف بر روند ترشح را در هر مورد به صورت مستقیم بررسی نمود (افزایش ۳ برابری رهایش نمونه‌ها). در واقع سیناپتوزوم با حفظ خواص عملکردی سیناپس‌های شیمیایی ساده‌ترین سیستمی است که با آن می‌توان زنجیره کامل پدیده‌ها از دپولاریزه شدن غشاء تا رهایش میانجی و حتی برداشت مجدد آن را ارزیابی نمود. در مقالات بررسی شده بیشترین کاربرد سیناپتوزوم در مطالعه پروتئین‌های غشای سیناپسی نظیر کانال‌ها، حاملین و گیرنده‌ها بود. بررسی اثرات ایسکمی بر بافت عصبی، استرس‌های اکسیداتیو، سیالیت غشاء، مکانیزم‌های پسنورد تنظیمی همو و هترو سیناپسی، تاثیر سموم و داروها بر سیناپس‌های شیمیایی و امکان تهیه و بررسی آثار بیماری بر سیناپتوزوم‌های تهیه شده از نمونه‌های انسانی، مثال‌های دیگر کارآیی این مدل هستند. سیناپتوزوم‌های انسانی عمدتاً از نمونه‌های جراحی، بیوپسی یا نکروپسی مغز، قلب و روده تهیه می‌شوند (۱۶-۱۱).

نتیجه‌گیری

رفتار ترشحی سیناپتوزوم به غلظت پتاسیم محیط وابسته بوده و امکان بررسی مستقیم رهایش پایه و تحریک شده میانجی عصبی را فراهم می‌نماید. استفاده از سیناپتوزوم به دلیل سهولت، کارآیی بالا و امکان تهیه از نمونه‌های انسانی رو به گسترش است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا. (عج) به خاطر تامین هزینه‌های طرح و سرکار خانم سلیمانی و سایر همکاران آزمایشگاه فیزیولوژی تشکر می‌گردد.

References

- 1) Whittaker VP. *Thirty years of synaptosome research*. J Neurocytol. 1993;22(9):735-42.
- 2) Bradford HF. *Chemical neurobiology: An introduction to neurochemistry*. London: Freeman. 1991; pp: 311-352.
- 3) Marcoli M, Rosu C, Bonfanti A, Raiteri M, Maura G. *Inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine(2A) receptors regulate evoked glutamate release from rat cerebellar mossy fibers*. J Pharmacol

کوکتل به نسبت حجمی ۵ برابر فعالیت رادیواکتیو هر نمونه با دستگاه بتاکاوتر تعیین گردید. روش دینامیک به کمک دستگاه سوپرفیوژن انجام شد. در این روش مقدار مشخصی سیناپتوزوم روی فیلترهای دستگاه لایه گذاری شده و محلول‌ها (تحریک و استاندارد) به صورت جریان قابل کنترل با نمونه مواجه و خروجی سیستم بعد از عبور از فیلترها در فواصل زمانی ثابت جمع‌آوری شد (۸). سایر مراحل آماده‌سازی برای شمارش رادیواکتیویته مشابه روش اول بود.

یافته‌ها

میانگین وزن مخچه 0.29 ± 0.05 گرم (تعداد=۵ سر) بود. سه معیار غشای پلاسمایی، میتوکنندری و وزیکول‌های سیناپسی در تصویر الکترونی مشاهده شدند (شکل ۱). فعالیت آنزیم LDH در سوسپانسیون نمونه‌های سالم بعد از مواجه آنها با تریتون در حدود ۹ برابر $(9 \pm 1/8)$ ، تعداد (۵) و فعالیت رادیواکتیو نمونه‌ها بعد از تحریک نسبت به شرایط پایه (بدون تحریک) $2/3$ تا $3/7$ برابر افزایش داشت.

بحث

آنزیم LDH یکی از شاخص‌های خوب سلامت سلول و غشای آن است. کم‌بودن فعالیت این شاخص در سوسپانسیون سیناپتوزومی و افزایش آن به دنبال مواجه با مواد تخریب کننده غشاء یکی از بهترین روش‌های تایید سلامت غشای سلولی محصور کننده سیناپتوزوم است (۹). در صورت عدم سلامت غشاء، میانجی عصبی به صورت غیراختصاصی به محیط بیرون راه می‌یابد و در پاسخ به دپولاریزاسیون غشاء، پاسخ‌های ترشحی تغییر بارزی ندارد. البته حتی با وجود غشایی سالم، مقادیر اندکی از میانجی‌های عصبی از سلول خارج می‌شود. این حالت در پتانسیل استراحت و بدون افزایش غلظت یون کلسیم داخل سلولی رخ می‌دهد (۱۰). بنابراین تشدید این روند و همراهی آن با عدم افزایش متناسب فعالیت

Exp Ther. 2001;299(3):1106-11.

4) Cunha RA, Constantino MD, Ribeiro JA. *Inhibition of [³H] gamma-aminobutyric acid release by kainate receptor activation in rat hippocampal synaptosomes*. Eur J Pharmacol. 1997; 323(2-3): 167-72.

5) Moss DW, Henderson AR. *Enzymes*. In: CA Burtis, ER Ashwood. Tiet's Text book of clinical chemistry. Philadelphia:

Saunders Company. 1994; pp: 812-818.

6) Maura G, Carbone R, Guido M, Pestarino M, Raiteri M. *5-HT₂ presynaptic receptors mediate inhibition of glutamate release from cerebellar mossy fibre terminals*. Eur J Pharmacol. 1991; 202(2):185-90.

7) Hosseini SM, Asgari A, Mehrani HA, Khoshbaten A. *Cerebellar giant synaptosomes: a model to study basal and stimulated release of [³H]gamma-aminobutyric acid*. IJMS 2005; 30(1): 16-20.

۸) حسینی، س. م.، عسگری، ع.، مهران، ح.، خوش باطن، ع. مطالعه اثرات کولینرژیک و غیرکولینرژیک ارگانوفسفاتها بر رهايش خود به خود و تحريك شده میانجی های عصبی: کارایی روش سوپرفیوژن. طب نظامی. ۱۳۸۴. شماره ۷. صفحات ۱۵ تا ۲۰.

9) Nagy A, Delgado-Escueta AV. *Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll)*. J Neurochem. 1984; 43(4):1114-23.

10) Stanford SC. Neurotransmitter release. In: Webster RA. Neurotransmitter, drugs and brain function. Chichester: John Wiley & Sons. 2001; pp: 80-91.

11) Raiteri L, Raiteri M. *Synaptosomes still viable after 25 years of*

superfusion. Neurochem Res. 2000;25(9-10):1265-74.

12) Gleitz J, Beile A, Wilffert B, Tegmeier F. *Cryopreservation of freshly isolated synaptosomes prepared from the cerebral cortex of rats*. J Neurosci Methods. 1993;47(3):191-7.

13) Sesti C, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Marcus AJ, Levi R. *EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release*. J Pharmacol Exp Ther. 2002;300(2):605-11.

14) Smogorzewski MJ. *Central nervous dysfunction in uremia*. Am J Kidney Dis. 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S122-8.

15) Moe MC, Berg-Johnsen J, Røste GK, Vinje ML. *Stimulated increase in free cytosolic Ca(2+) and protein kinase C activity in human cerebrocortical synaptosomes*. Brain Res. 2002; 924(1):116-9.

16) Garcia-Sanz A, Badia A, Clos MV. *Superfusion of synaptosomes to study presynaptic mechanisms involved in neurotransmitter release from rat brain*. Brain Res Brain Res Protoc. 2001;7(2):94-102.