مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و نهم (۱۳۸۲) شماره ۲ (۳۶۱-۳۵۳)

تشخیص اجسام آپوپتوزی در سلولهای تیمار شده با نیکل در رأس ریشه پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.)

لیلی صمدی [۱و۲] و بهروز شاهسون بهبودی [۱]*

۱. *گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
۲. *گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران*

(دریافت: ۸۱/۱۰/۲۲ ؛ پذیرش:۸۲/۲/۱۳)

چکیده

نیکل (Ni) فلزی سنگین است که تحت شرایط خاصی از خاک ، فیتوتوکسیک می‌باشد. این فلز به آسانی توسط ریشهٔ گیاهان جذب و در فضای دور سیتوپلاسم و واکوئلهای سلولی مستقر می‌شود. غلظتهای بیش ازحد نیکل می‌تواند در سلولهای ریشه باعث القای مرگ سلولی گردد. در این تحقیق از روشهای هیستوشیمیایی و سیتوشیمیایی و همچنین تکنیک TUNEL برای بررسی مورفولوژی مرگ سلولی استفاده نموده‌ایم. در ریشه‌های شاهد، مرگ برنامه‌ریزی شده در سه منطقه مشاهده می‌شود: سلولهای کلاهک، اپیدرم و سلولهای استوانهٔ مرکزی. ویژگیهای مختص این مرگ سلولی عبارتند از: متراکم بودن هسته و سیتوپلاسم و قطعه قطعه بودنDNA. ما از روش TUNEL برای آشکارسازی انتهای 3´-OH قطعات شکسته شدهٔ DNA استفاده نمودیم. در ریشه‌های شاهد، فقط سلولهای اپیدرم، کلاهک و استوانه مرکزی به تست TUNEL پاسخ مثبت می‌دهند که نشانهٔ قطعه قطعه بودن DNA در این سلولهاست. در غلظتهای میانی نیکل (10-25 µg/ml) علاوه بر سلولهای کلاهک، اپیدرم و استوانه مرکزی، سلولهای پوست و مریستم هم به تست TUNEL پاسخ مثبت می دهند که نشان دهندهٔ القای مرگ سلولی توسط نیکل در این سلولهاست. مورفولوژی این نوع مرگ سلولی القا شده توسط نیکل با مورفولوژی مرگ سلولی طبیعی در ریشه، از نظر مشاهدهٔ اجسام آپوپتوزی متفاوت است. در مرگ سلولی طبیعی که در سلولهای کلاهک، اپیدرم و استوانه مرکزی مشاهده می‌شود، اجسام آپوپتوزی وجود ندارند اما پس از القای مرگ سلولی توسط نیکل این اجسام دیده می‌شوند. سرنوشت اجسام آپوپتوزی در گیاهان هنوز مشخص نشده و تحقیقات بیشتر را می‌طلبد.

واژه های کلیدی: *Allium cepa* L.، آپوپتوزیس، اجسام آپوپتوزی، نکروز، نیکل.

---

* *corresponding Author, behboodi@khayam.ut.ac.ir,.*

مقدمه

مرگ برنامه‌ریزی شده فرایند مرگ فعال و انرژی‌خواه سلولهاست که در شرایط فیزیولوژیکی، حین تکوین موجودات و تحت شرایط تنشی محیط در سلولها ایجاد می‌شود (Kasslak *et al.,* 1997; Mittler & Lam, 1995). وقتی مرگ برنامه‌ریزی شده مورفولوژی خاصی را از خود نشان می‌دهد واژهٔ آپوپتوزیس برای آن به کار می‌رود. متراکم شدن کروماتین و کناری شدن آن یکی از ویژگیهای اصلی آپوپتوزیس است که نتیجه آن ایجاد اشکالی مشابه با هلال ماه یا اشکال نعل اسبی در هسته می‌باشد. از ویژگیهای دیگر آپوپتوزیس تغییر در مورفولوژی میتوکندری، تغییر در اسکلت سلولی، متراکم شدن سیتوپلاسم و قطعه قطعه شدن DNA ژنومی است (Kerr *et al.,* 1972; Wyllie *et al.,* 1980). در مرحلهٔ بعدی، قطعه قطعه شدن هسته و تشکیل اجسام آپوپتوزی در سلولهای در حال مرگ مشاهده می‌شوند. مرگ سلولی در گیاهان پدیده‌ای متنوع است که گاهی مشابه با فرایند آپوپتوزیس در جانوران بوده و گاهی با آن شباهتی ندارد. تا سال ۱۹۹۶ تنها ویژگی مشترک بین مرگ سلولی در گیاهان و آپوپتوزیس در جانوران قطعه قطعه شدن DNA بود. امروزه شواهدی برای وجود آپوپتوزیس در گیاهان حین تکوین و در مقابله با تنشهای محیطی ارائه شده است (Drew *et al.*, 2000; Liljeroth & Bryngelsson, 2001). با این وجود ویژگیهای مشترک آپوپتوزیس و مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ گیاهان هنوز معدودند و شامل متراکم شدن کروماتین و فعال‌سازی پروتئازهای خاص می‌باشد (Ryerson & Heath, 2000).

نوع دیگری از مرگ سلولی که تحت اثر شرایط نامساعد محیطی یا حملهٔ شدید پاتوژنها به وجود می‌آید مرگ سلولی تصادفی یا نکروز نامیده می‌شود که ویژگیهای آن عبارتند از، متورم شدن سلول، از بین رفتن تمامیت غشاء و نشت محتویات سلولی.

اخیراً نشان داده شده که تحت اثر فلزات سنگین نیز فرایند آپوپتوزیس در گیاهان به وجود می‌آید. اولین بار این نوع مرگ سلولی تحت تأثیر فلز کادمیوم در سلولهای گیاه توتون و سلولهای راسی ریشهٔ پیاز گزارش داده شده است (Behboodi & Samadi, 2002; Fojtova & Kovarik, 2000). نیکل هم یکی از فلزات سنگین است که به آسانی توسط ریشهٔ گیاهان جذب می‌شود (Assche & Clijsters, 1990). تیمار سلول‌ها با نیکل باعث ایجاد ناهنجاریهای کروموزومی و افزایش تعداد کروموزوم‌ها می‌شود. در این تحقیق هدف ما القای مرگ در سلولهای رأس ریشهٔ پیاز توسط فلز سنگین نیکل و بررسی نوع مرگ القا شده و تبیین ویژگیهای این مرگ می‌باشد.

روشها

پیازهای گیاه *Allium cepa* L. در غلظتهای صعودی نمک (0,5,10,25,50µg/ml) $Ni(SO4)_2$ قرار داده شدند و پس از تثبیت با گلوتارآلدئید و FAA و آماده سازی برای میکروسکوپی، به ضخامت 7µm برش‌گیری و به روشهای زیر رنگ‌آمیزی شدند.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین

نمونه‌های تثبیت شده در FAA، پارافین‌زدائی شدند و بوسیله محلول آلن دوفر ۵٪ (سولفات مضاعف آهن و آلومینیوم) دندانه‌دار و به مدت ۱۲ ساعت در هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی وبا میکروسکوپ نوری مشاهده و عکاسی شدند.

تکنیک فولگن

برشهای بافتی تثبیت شده توسط FAA، پس از پارافین‌زدائی، در محلول کلریدریک اسید نرمال هیدرولیز شده و سپس ۲ ساعت در محلول شیف قرار داده شدند. در نهایت توسط اسید سولفورویک تازه تهیه شده، شستشو و زیر میکروسکوپ نوری مطالعه گردیدند.

تکنیک TUNEL

یکی از ویژگیهای مرگ سلولی آپتوزی قطعه قطعه شدن DNA است. برای مشاهدهٔ انتهای 3´-OH این قطعات DNA از تکنیک TUNEL استفاده می‌شود. بدین ترتیب که نوکلئوتیدهای نشاندار بوسیلهٔ رنگ فلورسئین از طریق آنزیم ترمینال ترانسفراز به انتهای قطعات DNA اضافه می‌شوند. در صورت وجود DNA قطعه قطعه شده، سلولها نسبت به تست TUNEL پاسخ مثبت می‌دهند و هسته‌ها زیر میکروسکوپ فلوئورسان به رنگ سبز دیده می‌شوند (Gaverieli *et al.*,1992). این تکنیک بر روی ریشه های تثبیت شده با گلوتار آلدئید انجام شد.

اندازه‌گیری ابعاد سلولها و بررسی آماری

پس از عکس‌برداری از مناطق مختلف سلولی، ابعاد سلولها و هسته اندازه‌گیری شد و نسبت نوکلئوپلاسمی (NPR) از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\mathrm{NPR} = \frac{\text{Nucleus area}}{\text{Cytoplasmic area}}$$

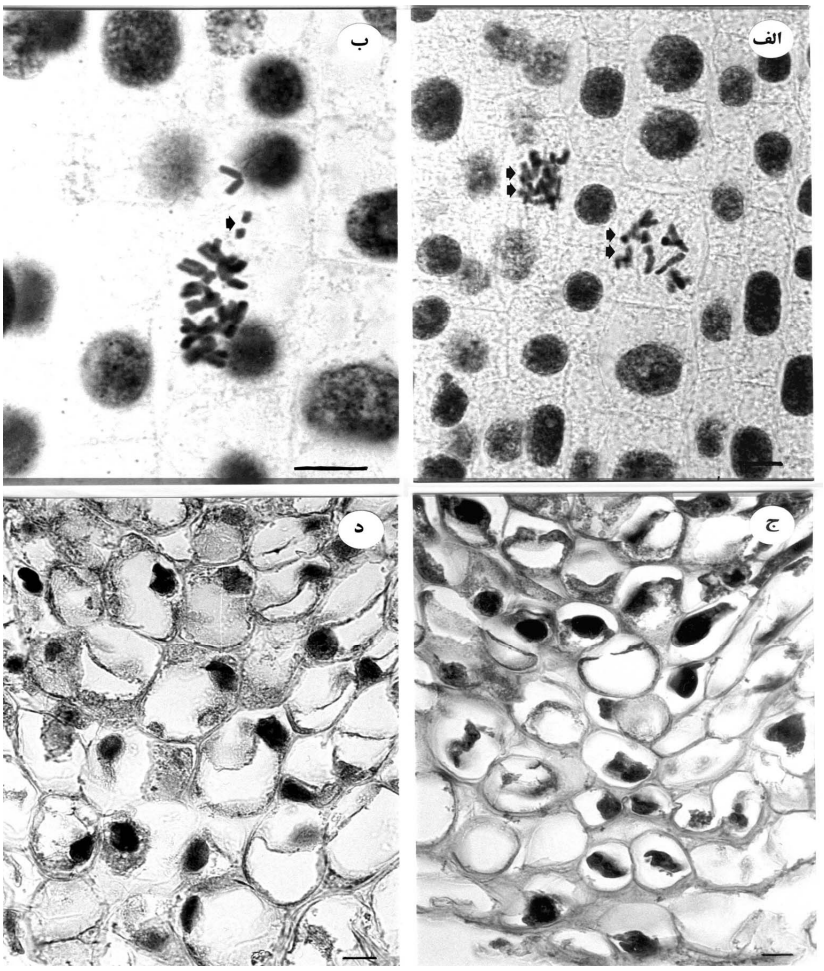
هدف از این محاسبه بررسی میزان متراکم شدن هسته است که از ویژگیهای مرگ سلولی می‌باشد. پس از محاسبهٔ نسبت نوکلئوپلاسمی، انحراف معیار در هر منطقهٔ سلولی محاسبه و آزمون آماری آنالیز واریانس انجام شد.

نتایج

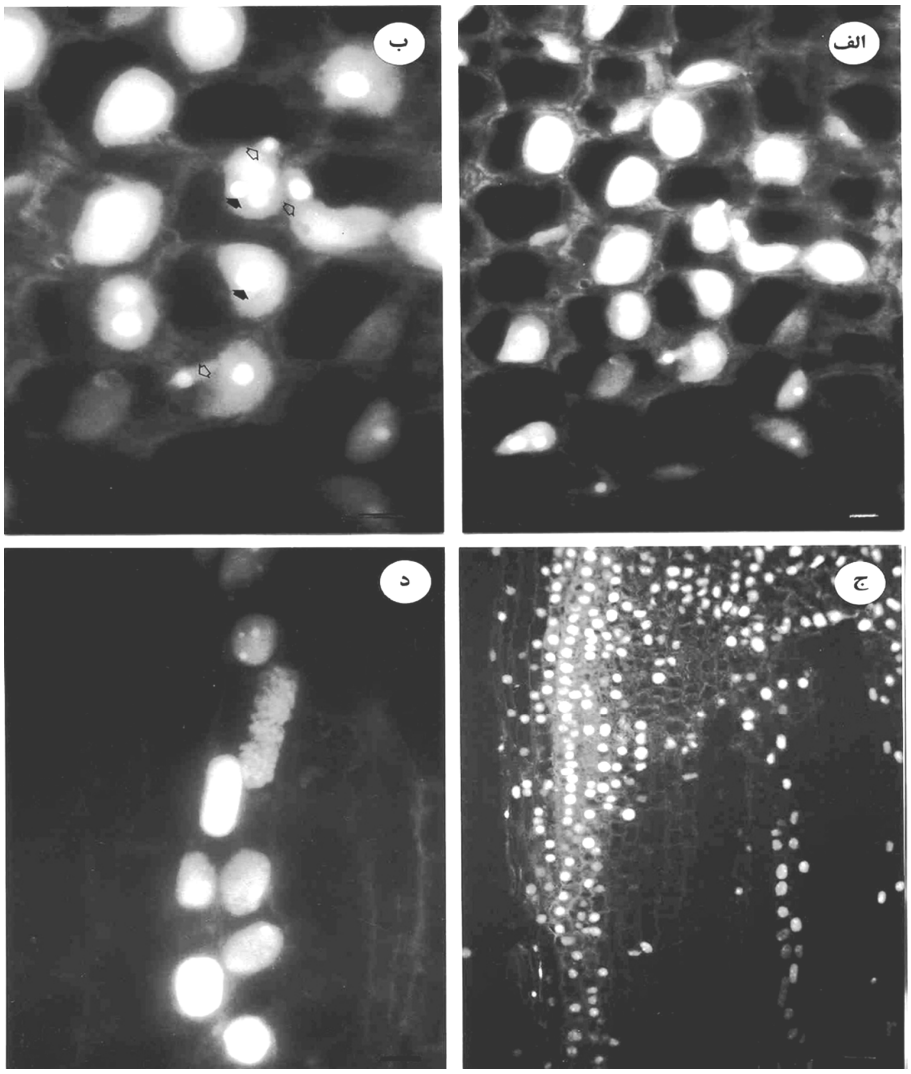
در شرایط طبیعی، در سلولهای رأس ریشهٔ پیاز در سه ناحیه مرگ برنامه‌ریزی شده مشاهده می‌شود: سلول‌های کلاهک، سلولهای اپیدرم و سلولهای منشأ استوانهٔ مرکزی. ویژگی‌مورفولوژی این سلول‌ها عبارتند از: متراکم و کناری بودن هسته، واکوئولی شدن سلولها و ضخیم‌بودن دیوارهٔ سلولی. این سلولها بتدریج مرده و از سطح ریشه جدا می‌شوند (شکل ۱ج) یا سلولهای استوانهٔ مرکزی بتدریج تمایز یافته می‌شوند. بررسی با روش TUNEL نشان می‌دهد که این سلولها نسبت به تست TUNEL پاسخ مثبت می‌دهند، پس DNA در این سلولها قطعه قطعه است (شکل ۲ ج ود).

پس از تیمار با نیکل تغییراتی که در سلولها ایجاد می‌شوند عبارتند از: ناهنجاریهای میتوزی (شکل۱ الف)، قطعه قطعه شدن کروموزومها و ناهنجاریهای کروموزومی (شکل۱ ب). این تغییرات بیشتر در نواحی مریستمی مشاهده می‌شوند. سلولهای کلاهک، اپیدرم و استوانه مرکزی که قبلاً دچار مرگ برنامه‌ریزی شده بودند تمامیت خود را از دست می‌دهند، محتویات سلول به خارج تخلیه می‌شود و ویژگیهای نکروز را از خود نشان می‌دهند (شکل ۱ ج و د). سلولهای ناحیهٔ پوست و مریستم در حالت عادی به تست TUNEL پاسخ منفی می‌دهند. پس از تیمار با نیکل در غلظتهای میانی نیکل (10-25µg/ml) این سلولها به این تست پاسخ مثبت می‌دهند؛ یعنی قطعه قطعه شدن DNA در این سلولها صورت گرفته است.

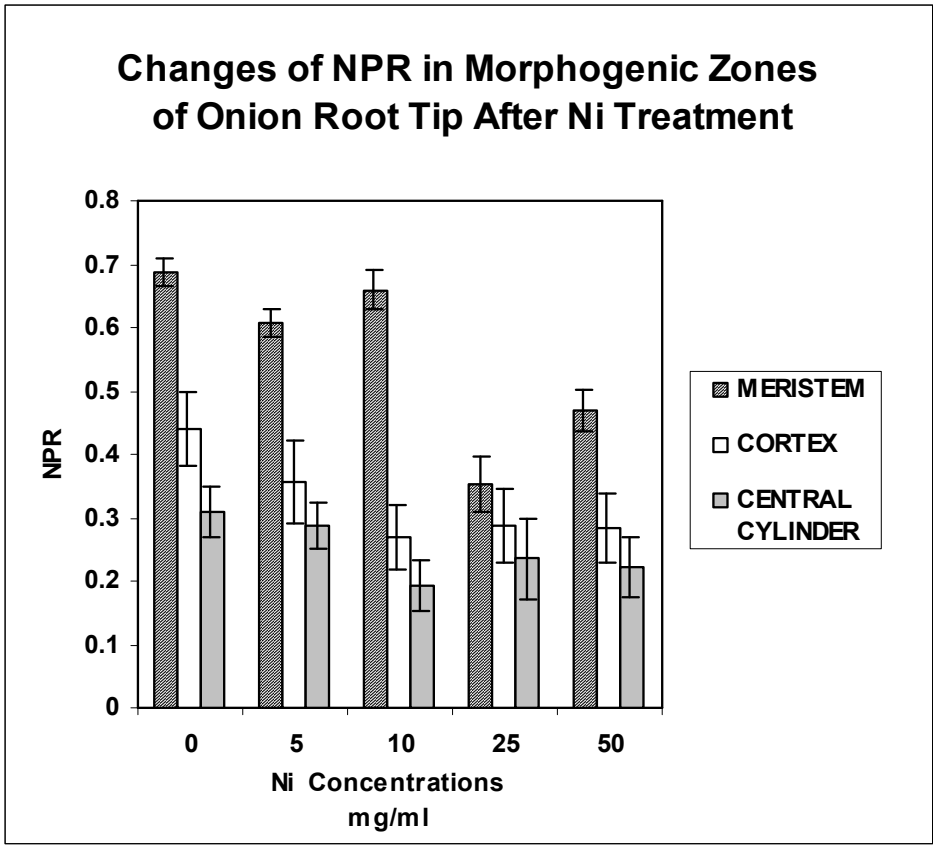
نتایج تغییر در نسبت نوکلئوپلاسمی نشان می‌دهد که در تیمار نیکل این نسبت کاهش می‌یابد یعنی هسته‌ها متراکم شده‌اند (شکل ۳). یکی از ویژگیهای مختص آپوپتوز وجود اجسام آپوپتوزی است که پس از تیمار با نیکل در سلولهای مریستمی و پوست دیده می‌شوند. این اجسام حاوی کره‌هائی متراکم از کروماتین فشرده هستند که توسط بخشی از کروماتین احاطه شده و از هسته جدا گردیده است(شکل ۲ الف وب). در غلظتهای بالاتر(>50 µg/ml) سلولهای دچار نکروز می‌شوند.



شکل ۱- الف -تقسیمات سلولی ناهنجار پس از تیمار با نیکل (Ni 100µg/ml)، رنگ‌آمیزی فولگن(پیکان های دوتایی). ب- قطعه قطعه شدن کروموزومها و ناهنجاری کروموزومی پس از تیمار با نیکل (Ni 100µg/ml)، رنگ‌آمیزی فولگن(پیکان های منفرد).ج - سلولهای کلاهک، این سلولها در حالت طبیعی بر اثر مرگ برنامه‌ریزی شده مرده‌اند. هسته‌ها کناری و متراکم شده و سلول واکوئوله می‌باشد. د- سلولهای کلاهک پس از تیمار با نیکل (Ni 50 µg/ml)، سلولهای مردهٔ کلاهک تمامیت خود را از دست داده و از هم گسیخته‌اند(مقیاس: 10µm).



شکل ۲-الف- سلولهای ناحیهٔ پوست که در حالت طبیعی به تست TUNEL پاسخ منفی می‌دهند پس از تیمار با نیکل به این تست پاسخ مثبت می‌دهند. ب- همان سلولهای بخش Cالف با بزرگنمایی بیشتر کره‌هایی که کروماتین متراکم شده هستند (پیکان‌های توپر) و اجسام آپوپتوزی (پیکان های توخالی) قابل مشاهده‌اند. ج-تستTUNEL سلولهای اپیدرم و چند لایهٔ ریز آن و سلولهای استوانهٔ مرکزی در حالت طبیعی به تست TUNEL پاسخ مثبت می‌دهند. د- سلولهای استوانه مرکزی در بزرگنمایی بیشتر. در این سلولها، DNA قطعه قطعه شده است اما اجسام آپوپتوزی مشاهده نمی‌شود (مقیاس : 10µm).



شکل ۳- تغییرات نسبت نوکلئوپلاسمی در سلولهای ناحیهٔ مریستم، پوست و استوانهٔ مرکزی پس از تیمار با نیکل.

بحث

به نظر می‌رسد نوع مرگ سلولی که توسط نیکل در سلول‌ها القا می‌شود وابسته به غلظت نیکل می‌باشد و دارای یک حد آستانه است. در غلظتهای پائین نیکل (5µg/ml) مرگ سلولی ایجاد نمی‌شود. در غلظتهای میانی (10-25 µg/ml) مرگ سلولی از نوع آپوپتوزی و در غلظتهای بالاتر از نوع نکروزی است.

با وجود اینکه قطعات DNA حاصل از هضم اندونوکلئازی در سلولهای کلاهک و پوست قبلاً گزارش داده شده (Liljeroth & Bryngelsson, 2001; Wang *et al.*, 1996)؛ بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، کره‌های کروماتین متراکم شده و اجسام آپوپتوزی

در این سلولها مشاهده نمی شوند. بنابراین با وجود اینکه این نوع مرگ سلولی برنامه ریزی شده است؛ به مرگ آپوپتوزی شباهت کمتری دارد. در مرگ سلولی طبیعی که در کلاهک، پوست و سلولهای استوانه مرکزی مشاهده می‌شود اجسام آپوپتوزی رؤیت نمی‌شوند؛ اما پس از تیمار با نیکل ویژگیهای مرگ سلولی شباهت بیشتری به مرگ آپوپتوزی دارد از این نظر که اجسام آپوپتوزی قابل مشاهده‌اند.

قطعه قطعه شدنDNA ، متراکم شدن کروماتین و فعال‌سازی پروتئازهای خاص از ویژگی‌های مشترک شناخته شده آپوپتوز درجانوران و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در گیاهان می‌باشند (Ryerson & Heath, 2000). در این تحقیق یکی از ویژگیهای مهم آپوپتوزیس که وجود اجسام آپوپتوزی می‌باشد درمرگ سلولی القا شده در سلولهای گیاهی گزارش شده است که انطباق مرگ سلولی گیاهان را با مرگ آپوپتوزی تایید می کند.

سرنوشت اجسام آپوپتوزی هنوز در گیاهان مشخص نشده است. اجسام آپوپتوزی در جانوران توسط سلولهای فاگوسیتوزی بلعیده و هضم می‌شوند (Cohen, 1993) اما در سیستمهای گیاهی چنین مکانیسمی وجود ندارد. به نظر می‌رسد اجسام آپوپتوزی در گیاهان به سمت واکوئل مهاجرت کرده در آنجا هضم می‌شوند. بررسیهای بیشتر بیوشیمیایی و مولکولی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

Reference

Assche, F.V., Clijester H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants, Plant Cell Environ. **13,** 195-206.

Behboodi, B.S., Samadi L. (2002). Morphological study of cadmium-induced changes on root apex of *Allium cepa*, Iranian Int. J. Sci. **3 (1),** 11-22.

Cohen, J.J. (1993). Apoptosis, Immunology Today **14(3),** 126-130.

Drew, M.C., He C.J., Morgan P.W. (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots, Plant Sci. **5 (3),** 123-127.

Fojtova, M., Kovarik A. (2000). Genotoxic effects of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells, Plant Cell Environ. **23,** 531-537.

Gaverieli, Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labelling nuclear DNA fragmentation, J. Cell Biol. **119(3),** 493-501.

Kasslak, R.M., Chamberlin M.A., Palmer R.G., Bowen B.A. (1997). Programmed cell death in the root cortex of soybean root necrosis mutant. Plant J. **11(4),** 729-745.

Kerr, JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon wide-ranging implications in tissue kinetics, British J. Cancer **26,** 239-257.

Liljeroth, E., Bryngelsson T. (2001). DNA fragmentation in cereal roots indicative of programmed root cortical cell death, Physiol. plant **111(3),** 365-372.

Mittler, R., Lam E. (1995). Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death, Plant Cell **7,** 1951-1962.

Ryerson, D.E., Heath M.C. (2000). Cleavage of nuclear DNA into oligoncleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatment, Plant Cell **8,** 393-402.

Wang, H., Li J., Bostock R.M., Gilchrist D.G. (1996). Apoptosis a functional paradigm for programmed cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development, Plant Cell **8,** 375-391.

Wyllie, A.H., Kerr J.F., Currie A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis, Int. Review Cytol. **85,** 251-306.