مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۲، شماره ۳ (شماره پیاپی ۴۸)، پاییز ۱۳۸۸، ۴۶-۳۹

مرگ سلولی در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش بالغ

دکترملک سلیمانی مهرنجانی[1*]، دکتر حمیدرضا مؤمنی[2]، دکتر محمد حسین آبنوسی[3]، پروا نسیمی[4]

۱- دانشیار، دکترا بافت و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- استادیار، دکترا فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۳- استادیار، دکترا بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشگاه اراک ، اراک، ایران

تاریخ دریافت ۸۸/۶/۸، تاریخ پذیرش۸۸/۷/۸

چکیده

مقدمه: کشت قطعات نخاع گرفته شده از پستانداران بالغ می‌تواند به عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب جهت ارزیابی قابلیت حیات سلولی، بررسی آسیب‌های نخاعی و مکانیسم‌های دخیل در مرگ سلولی در نظر گرفته شود. در پژوهش حاضر قطعات نخاع موش بالغ مورد استفاده قرار گرفت تا به بررسی نحوه مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده بپردازد.

روش کار: طی یک مطالعه تجربی- آزمایشگاهی حاضر ناحیه سینه‌ای نخاع ۴ موش بالغ Balb/c توسط دستگاه قطعه کننده بافت به قطعات ۴۰۰ میکرونی بریده و این قطعات برای دوره‌های زمانی متفاوت کشت و در انکوباتور دی‌اکسیدکربن دار در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) و قطعات کشت شده فیکس و توسط کرایوستت برش‌گیری شد. برای مطالعه جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مرگ سلولی، از روش‌های رنگ آمیزی فلئورسنت، تکنیک تانل و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

نتایج: در نورون‌های حرکتی قطعات تازه تهیه شده هیچ گونه آثار آپوپتوزیس مشاهده نشد، در حالی که ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از کشت، این نورون‌ها نشانه‌های آپوپتوزیس شامل چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته و کروماتین را به نمایش گذاشتند. هم‌چنین ۶ و ۱۲ ساعت پس از کشت تانل مثبت بودند. علاوه بر آن DNA استخراج شده از قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA را برروی ژل آگارز نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج موید وقوع آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش بالغ می باشد.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، قطعات نخاع، نورون حرکتی، موش Balb/c

* **نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه اراک، گروه زیست شناسی

Email: m-soleimani@araku.ac.ir

مقدمه

امروزه کشت ارگان (Organ culture) از جمله تکنیک‌های مهمی است که جهت مطالعات بافتی، بیوشیمیائی و سلولی- ملکولی مورد توجه قرار می‌گیرد. در این خصوص مطالعات مختلف بر روی کشت قطعات گرفته شده از سیستم اعصاب مرکزی پنجره‌ای را فراسوی علوم اعصاب باز نموده و در این ارتباط نتایج ارزنده ایی نیز ارائه شده است. کشت قطعات نخاع (Spinal cord slices culture) یکی از چنین سیستم‌هایی است که به عنوان یک مدل آزمایشگاهی (In Vitro) برای مطالعه آسیب‌های نخاعی(۱)، ارزیابی قابلیت حیات سلولی(۲) و مکانیسم‌های دخیل در مرگ سلولی(۳) به کار می‌رود. با این وجود چنین قطعاتی که از جانوران بالغ گرفته شده است به سختی در محیط کشت زنده مانده و به زودی دچار اضمحلال می‌شود(۴). دلیل این امر به خوبی معلوم نیست و مطالعات اندکی وجود دارد که در آنها به بررسی نحوه مرگ سلولی و مکانیسم‌های دخیل در این امر پرداخته باشد، به جز مطالعاتی که در آنها چنین قطعاتی ابتدا تحت تأثیر آسیب‌های مکانیکی و عوامل شیمیائی القا کننده مرگ سلولی قرار گرفته اند. به عنوان مثال کراسیوکوو و همکاران(۱) مدلی را طراحی نمودند که در آن قطعات نخاع موش‌های بالغ به وسیله‌ی تکنیک ویت دراپ (Weight Drop) در شرایط آزمایشگاهی در معرض آسیب مکانیکی قرار گرفت. هم‌چنین پیزی و همکاران(۳) قطعات کشت شده نخاع رت‌های بالغ را در معرض کاینت (Kainate) که یک آگونیست رسپتورهای گلوتامیت است قرار داده و نحوه مرگ سلولی را در نورون‌های حرکتی در اثر سمیت این آگونیست مورد بررسی قرار دادند. در چنین مطالعات آزمایشگاهی که بر روی قطعات نخاع جانوران بالغ صورت گرفته است، آپوپتوزیس عامل مرگ نورون‌ها معرفی شده است. هم‌چنین در مطالعات در شرایط داخل بدن (In Vivo) که نخاع از طریق کانتیوژن (Contusion) و کامپرژن (Compression) تحت آسیب مکانیکی قرار گرفته بود، آپوپتوزیس مسئول مرگ نورون‌ها و سلول‌های گلیا گزارش شده است(۵). تحقیقات نشان می‌دهد که آپوپتوزیس هم‌چنین یکی از روش‌های مرگ نورونی در بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون‌ها (Neurodegenerative Diseases) مثل پارکینسون (Parkinson)، آلزایمر (Alzheimer) (۶) و هم‌چنین آسیب‌های نخاعی(۷) قلمداد می‌شود.

اگر چه مطالعاتی در خصوص بررسی مرگ نورونی پس از اعمال عوامل القا کننده مرگ سلولی بر روی قطعات کشت شده نخاع جانوران بالغ انجام گرفته است، با این وجود مطالعه‌ای که در آن به بررسی نحوه مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع در شرایط طبیعی و بدون تأثیر هرگونه عامل خارجی پرداخته باشد وجود ندارد. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی نحوه مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات نخاع موش بالغ که در شرایط طبیعی و بدون معرض آسیب‌های مکانیکی و شیمیایی کشت شده بودند طراحی شده است.

روش کار

در تحقیق تجربی- آزمایشگاهی حاضر موش‌های ماده بالغ نژاد Balb/c با میانگین وزنی ۳±۲۲ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در قفس‌های پلاستیکی در اتاق حیوانات با درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد و نور کنترل شده با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی-۱۲ ساعت روشنایی نگهداری و توسط غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی تغذیه و آب کافی در اختیار آنها قرار داده شد. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

۴ حیوان توسط تزریق سدیم پنتوباربیتال (۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) کاملاً بی هوش و سرانجام توسط شکافتگی قلب کشته شدند. ناحیه سینه‌ای نخاع(۱) توسط دستگاه قطعه کننده بافت Tissue choppes (استولتینگ، آمریکا) به طور عرضی به قطعات ۴۰۰ میکرونی بریده شد و سپس این قطعات در درون پلیت‌های پلاستیکی استریل چهارخانه محتوی ۴۵۰ میکرولیتر محیط کشت شامل: ۵۰

درصد MEM (Minimum Essential Medium)، ۲۵ درصد محلول نمکی هنک (Hanks Balanced Salt Solution-HBSS)، ۲۵ درصد سرم اسب، ۲۵ میلی‌مولار HEPES(N-2-hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid) ، ۶ گرم در لیتر گلوکز و یک درصد پنی سیلین-استرپتومایسین قرار گرفت. سپس این قطعات در یک انکوباتور دی اکسید کربن دار در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای زمان‌های مختلف انکوبه شد.

قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) و قطعات کشت شده پس از ۶، ۱۲و ۲۴ ساعت (برای هر لحظه زمانی) در ثابت کننده استفانینی(Stefanini's Fixative) شامل۲ درصد پارافرمالدئید،۰/۲ درصد اسیدپیکریک در۰/۱ مولار بافر فسفات با pH برابر ۷/۲ برای حداقل ۲ ساعت ثابت شد. قطعات ثابت شده توسط PBS (Phosphate Bulfer Saline) شستشو (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و سپس برای مدت یک شب در محلول ساکاروز ۲۰ درصد در PBS، در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. قطعات با استفاده از دستگاه کرایوستت (لایکا، آلمان) با ضخامت ۱۰ میکرون برش گیری و برش‌ها سپس بر روی لام‌های آغشته به پلی-ال-لایزین(Poly-L-lysine) ۱:۹ در آب مقطر جمع‌آوری و در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد تا هنگام استفاده نگهداری شد.

جهت بررسی مرگ در نورون‌های حرکتی، جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مرگ سلولی مورد توجه قرار گرفت. بررسی جنبه‌های مورفولوژیکی از طریق رنگ آمیزی فلئورسنت انجام شد. بدین منظور برش‌های نخاع با ترکیبی از دو رنگ فلئورسنت یعنی پروپیدیوم آیوداید (Propidium iodide) به میزان۱۰ میلی گرم در میلی لیتر در PBS به مدت ۱۵ دقیقه) و هوکست ۳۳۳۴۲ (Hoechst 33342) به میزان ۵ میلی گرم در میلی لیتر در PBS به مدت یک دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس برش‌ها با PBS شستشو ۳ بار و هر بار ۵ دقیقه و با اضافه نمودن مخلوط PBS–گلیسرول (۱:۱) توسط لامل پوشیده شدند. در برش‌های نخاع، نورون‌های حرکتی توسط مشخصات مورفولوژیکی خاص این نورون‌ها (جسم سلولی و هسته بزرگ) و موقعیت (شاخ‌های شکمی) مورد شناسائی قرار گرفت. نورون‌های حرکتی آپوپتوتیک، چروکیدگی سلولی و هم‌چنین متراکم شدن هسته و کروماتین را به نمایش گذاشت.

جهت بررسی جنبه بیوشیمیایی مرگ سلولی در نورون‌های حرکتی، تست تانل مورد استفاده قرار گرفت. این تست براساس دستورالعمل مربوط به کیت تانل(کمیکون، آمریکا) انجام شد. عکس‌های دیجیتالی با دوربین متصل به میکروسکوپ فلئورسنس (المپیوس، ژاپن) با بزرگنمائی ×۴۰۰ گرفته شد.

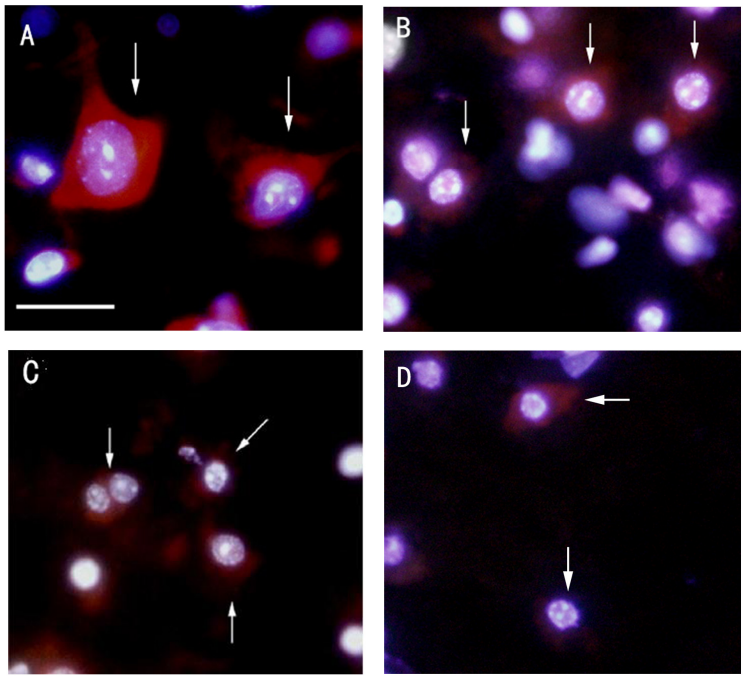
الکتروفورز ژل آگارز جهت شناسائی ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA مورد استفاده قرار گرفت. DNA از قطعات تازه تهیه شده (لحظه زمانی صفر) و کشت شده برای ۲۴ ساعت، توسط کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و براساس دستورالعمل این کیت استخراج شد. مقادیر مساوی DNA استخراج شده از هر نمونه در ژل آگارز ۲ درصد که توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود الکتروفورز و سپس تحت اشعه ماوراء بنفش توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن (سین جین، انگلستان) عکس گرفته شد.

نتایج

در قطعات تازه تهیّه شده (لحظه‌ی زمانی صفر)، نورون‌های حرکتی واجد اجسام سلولی بزرگ، توزیع طبیعی مواد هسته‌ای، هستک مشخص و بدون هیچ گونه علامت آپوپتوزیس بود(شکل ۱A).

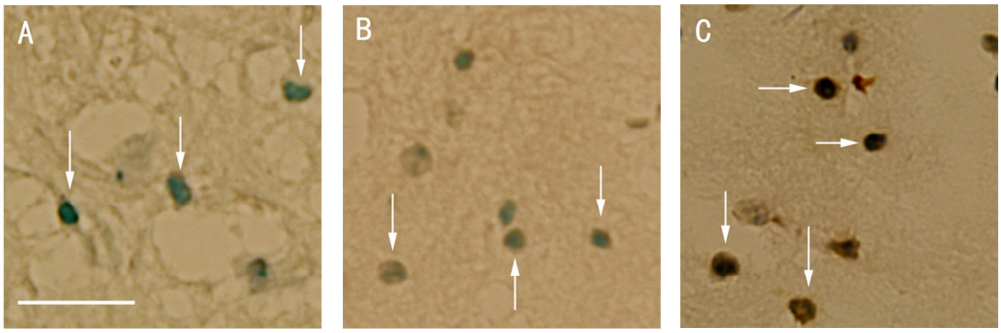
پس از گذشت ۶ ساعت در محیط کشت، اکثر نورون‌های حرکتی تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوزیس شامل چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته و تجمع کروماتین را نشان داد(شکل ۱B). در قطعات کشت شده مربوط به لحظه‌ی زمانی ۱۲ ساعت (شکل ۱C) و ۲۴ ساعت (شکل ۱D)، این تغییرات شدیدتر و علاوه بر آن تعداد نورون‌های حرکتی در شاخ‌های شکمی محدود و اکثر آنها از بین رفته بود. پس از گذشت ۲۴ ساعت در محیط کشت،

علاوه بر نورون‌های حرکتی اکثر نورون‌های واسطه و سلول‌های گلیا نیز دستخوش آپوپتوزیس شده بود (داده‌ها نشان داده نشده است).



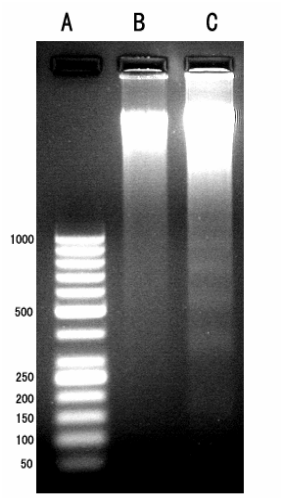
شکل ۱. خصوصیات مورفولوژیکی آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع. رنگ آمیزی فلئورسنت شامل پروپیدیوم آیوداید (قرمز) و هوکست ۳۳۳۴۲ (آبی) تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی نشان می‌دهد: (A) نورون‌های حرکتی طبیعی با جسم سلولی و هسته بزرگ از قطعات تازه تهیّه شده (لحظه‌ی زمانی صفر). نورون‌های حرکتی از قطعات کشت شده پس از ٦ ساعت (B)، ۱۲ ساعت (C) و ٢٤ ساعت (D) ، چروکیدگی سلول و متراکم شدن هسته و کروماتین را به خوبی نشان می‌دهد. [فلش‌ها نشان دهنده نورون‌های حرکتی می‌باشد. Scale bar=۲۵µm]

انجام تکنیک تانل که به منظور تأیید بیشتر آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع انجام شد، نشان داد که هسته تمام نورون‌های حرکتی در برش‌های مربوط به قطعات تازه تهیّه شده (لحظه زمانی صفر) تانل منفی بود(شکل ۲A). پس از گذشت ۶ ساعت در محیط کشت، هسته برخی از نورون‌ها(شکل ۲B) و پس از گذشت ۱۲ ساعت، تقریباً هسته تمامی این نورون‌ها (شکل ۲C) به صورت تانل مثبت ظاهر شد.



شکل ۲. تست تانل در نورون‌های حرکتی از برش‌های قطعات کشت شده نخاع. (A) رنگ سبز هسته نورون‌های حرکتی برش‌های مربوط به قطعات تازه تهیّه شده (لحظه زمانی صفر) بیان‌گر تانل منفی بودن این نورون‌ها می‌باشد. (B) رنگ قهوه‌ای در هسته‌ی برخی نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده برای ٦ ساعت (B) و ۱۲ ساعت (C) نشان دهنده‌ی تانل مثبت بودن این نورون‌ها است. [فلش‌ها بیان‌گر نورون‌های حرکتی می‌باشد. Scale=۲۵µm]

به منظور تاکید آپوپتوزیس در قطعات کشت شده نخاع، DNA استخراج شده از این قطعات بر روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. DNA استخراج شده از قطعات تازه تهیّه شده (لحظه‌ی زمانی صفر) واجد وزن ملکولی بالا که بیان‌گر DNA کامل بود (شکل۳، ستون B)، در حالی که DNA استخراج شده از قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت، ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA را به صورت طرح نردبانی (DNA Ladder) بر روی ژل آگارز نشان داد (شکل۳، ستون C).



شکل۳. الکتروفورز DNA قطعات نخاع بر روی ژل آگارز. ستون A: مارکر DNA (اعداد بر حسب base pairs ارائه شده است). ستون B: DNA کامل و دست نخورده با وزن ملکولی بالا مربوط به قطعات نخاع تازه تهیّه شده (لحظه‌ی زمانی صفر). ستون C: ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزونی DNA (طرح نردبانی DNA) مربوط به قطعات کشت شده نخاع پس از ۲٤ ساعت.

بحث

اگرچه در مطالعات متعدد با استفاده از کشت قطعات سیستم اعصاب مرکزی گرفته شده از جنین و نوزادان تازه متولد شده پستانداران به بررسی مرگ سلولی و مکانیسم‌های دخیل در آن می‌پردازد، اما مطالعاتی در این خصوص که در آن قطعات کشت شده نخاع پستانداران بالغ مورد بررسی قرار گرفته باشد بسیار اندک است مگر آن که قطعاتی که تحت تاثیر آسیب‌های مکانیکی و یا شیمیایی قرار گرفته‌اند. بنابراین در مطالعه حاضر کشت قطعات نخاع موش بالغ در شرایط طبیعی و بدون این گونه آسیب‌ها مورد استفاده قرار گرفت تا به بررسی نحوه مرگ نورون‌های حرکتی بپردازد.

کشت قطعات نخاع گرفته شده از پستانداران بالغ می‌تواند به عنوان مدلی برای بررسی نحوه مرگ سلولی و مکانیسم‌های دخیل در آن به کار رود(۳). از آنجا که آسیب‌های نخاعی و هم‌چنین بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون‌ها غالباً در افراد بالغ اتفاق می‌افتد، در این پژوهش از قطعات کشت شده نخاع موش بالغ استفاده شد.

استفاده از رنگ آمیزی فلئورسنت و مقایسه تغییرات مورفولوژیکی از جمله چروکیدگی سلول و متراکم شدن هسته و کروماتین در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده با نورون‌های مشابه در قطعات تازه تهیّه شده پیشنهادی بر وقوع مرگ سلولی آپوپتوزیس در این نورون‌ها بود. از آنجا که چنین مشخصاتی در تحقیقات متعدد به عنوان ویژگی‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس گزارش شده است(۸، ۹)، بنابراین این طور می‌توان احتمال داد که مرگ نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده از نوع آپوپتوزیس بوده است. کسپیس‌ها (Caspases) گروهی از پروتئازهای سیتوپلاسمی می‌باشد که فعال شدن آنها در طی آپوپتوزیس به اثبات رسیده است(۱۰). طی این فرایند، فرم فعال این آنزیم‌ها قادراست سوبسترهای خود شامل پروتئین‌های اسکلت سلولی(۱۱) و پروتئین‌های هسته‌ای(۱۲) را مورد حمله قرار داده و منجر به فروپاشی ساختار سیتوپلاسمی و هسته‌ای گردد. این امر به نوبه خود موجب تغییراتی از جمله چروکیدگی سلول و هم‌چنین متراکم شدن هسته و کروماتین می‌شود(۱۳). این احتمال وجود دارد که تغییرات سیتوپلاسمی و هسته‌ای مشاهده شده در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع ناشی از فعالیت این پروتئازها باشد.

برای تأیید بیشتر وقوع آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی، تکنیک تانل که توانایی تشخیص قطعه قطعه شدن

DNA را دارد(۱۴) مورد استفاده قرار گرفت. لیبل شدن یا تانل مثبت بودن نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع می‌توانست حاکی از قطعه قطعه شدن وسیع کروماتین و وقوع مرگ سلولی آپوپتوزیس در آنها باشد. اگرچه این تکنیک جهت بررسی جنبه بیوشیمیایی آپوپتوزیس در مقالات متعددی مورد استفاده قرار گرفته است(۷، ۱۴، ۱۵) و می‌توان به کمک آن سلول‌هایی که در مراحل ابتدایی این فرایند می‌باشد را تشخیص داد(۱۶)، با این وجود برخی مطالعات بیان‌گر آن است که تانل نمی‌تواند بین سلول‌های آپوپتونیک و نکروتیک (که در آن نیز قطعه قطعه شدن وسیع DNA اتفاق می‌افتد) تمیز قائل شود(۱۷، ۱۸). بنابراین این تکنیک باید همراه با سایر تکنیک‌های رایج شناسایی آپوپتوزیس مورد استفاده قرار گیرد(۱۹، ۲۰). صرف نظر از این ضعف، نتایج حاصل از کاربرد این تکنیک توانست تأییدی بر نتایج حاصل از رنگ آمیزی فلئورسنت باشد.

ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA (طرح نردبانی DNA)، به عنوان یکی دیگر از مشخصه‌های بیوشیمیائی مهم آپوپتوزیس مطرح است(۲۱) و در مدل‌های مختلفی که دستخوش این فرایند شده‌اند چنین مشخصه‌ای را بر روی ژل آگارز نشان داده‌اند(۸، ۲۲). نتایج حاصل از تحقیق حاضر و ظهور این فراگمنت‌ها در قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت می‌توانست خود تأییدی بر وقوع آپوپتوزیس در قطعات کشت شده نخاع باشد.

با توجه به این که فعالیت نوکلئازهای داخلی (Endonucleases) وابسته به کلسیم و منیزیم در شکسته شدن DNA در سلول‌های آپوپتوتیک به اثبات رسیده است(۲۳، ۲۴)، این احتمال وجود دارد که تانل مثبت بودن نورون‌های حرکتی و هم‌چنین ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA بر روی ژل آگارز در قطعات کشت شده نخاع ناشی از عملکرد این آنزیم‌ها باشد.

بررسی احتمال نقش پروتئازها و نوکلئازهای داخلی در آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع با هدف شناسائی مکانیسم‌های دخیل در مرگ این نورون‌ها می‌تواند در تحقیقات آتی مورد توجه قرار گیرد و در حال حاضر توسط این گروه تحقیق تحت بررسی می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر وقوع آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع موش بالغ را نشان داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات ارزشمند خانم منیره محمودی کارشناس ارشد آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست شناسی دانشگاه اراک و آقای محمد قاسم حاجی آبادی کارشناس پژوهش تشکر و سپاسگزاری به عمل می‌آید. پژوهش حاضر مستخرج از پایان‌نامه خانم پروا نسیمی دانش آموخته دوره کارشناسی ارشد رشته سلولی تکوینی گروه زیست شناسی این دانشگاه می‌باشد.

منابع

1. Krassioukov AV, Ackery A, Schwartz G, Adamchik Y, Liu Y, Fehlings MG. An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. Brain Res Protoc 2002; 10(2):60-8.

2. 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.

3. Pizzi M, Benarese M, Boroni F, Goffi F, Valerio A, Spano PF. Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonists on kainate-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. Neuropharmaco 2000; 39(5):903-10.

4. Mouveroux JM, Lakke EA, Marani E. Lumbar spinal cord explants from neonatal rat display age-related decrease of outgrowth in culture. Neurosci Lett 2001; 311:69-72.

5. Lu J, Ashwell KW, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. Spine 2000; 25(14):1859-66.
6. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. Nat Rev Mol Cell Biol 2000; 1(2):120-9.
7. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. J Neurosci 1997; 17(14):5395-406.
8. 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.
9. Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P. Apoptosis in caspase-inhibited neurons. Mol Med 2001; 7(1):36-48.
10. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. Oncogene 2003; 22(53):8543-67.
11. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem 1999; 68:383-424.
12. Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: nuclear events in apoptosis. J Struct Biol 2000; 129(2-3):346-58.
13. Taimen P, Kallajoki M. NuMA and nuclear lamins behave differently in Fas-Mediated apoptosis. J Cell Sci 2003; 116(Pt 3):571-83.
14. Lesauskaite V, Ivanoviene L. Programmed cell death: molecular mechanisms and detection. Medicina (Kaunas) 2002; 38(91):869-75.
15. Lee VM, Smiley GG, Nishi R. Cell death and neuronal replacement during formation of the avian ciliary ganglion. Dev Biol 2001; 233(2):437-48.
16. Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. Cell Res 2000; 10(3):205-11.
17. Martin LJ, Kaiser A, Price AC. Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. J Neurobiol 1999; 40(2):185-201.
18. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. Neuroscience 2001; 103(1):203-18.
19. Kok YJ, Swe M, Sit KH. Necrosis has orderly DNA fragmentations. Biochem Biophys Res Commun 2002; 294(5):934-9.
20. Whiteside G, Munglani R. TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections--an update. Brain Res Brain Res Protoc 1998; 3(1):52-3.
21. Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. Cancer Metastasis Rev 1992; 11(2):105-19.
22. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature 2001; 412(6842):95-9.
23. Oliveri M, Daga A, Cantoni C, Lunardi C, Millo R, Puccetti A. DNase mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. Eur J Immunol 2001; 31(3):743-51.
24. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. Am J Pathol 1990; 136:593-608.

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
Autumn 2009; 12(3): 39-46

Cell death in motor neurons of cultured spinal cord slices in adult mouse

Soleimani Mehranjani M[1*], Momeni HR[2], Abnosi MH[2], Nasimi P[3]

1- Associate Professor, PhD of Embriology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran
2- Assistant Professor, PhD of Animal Physiology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran
3- Assistant Professor, PhD of Biochemistry, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran
4- MSc in Developmental Biology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran

Received 30 Aug, 2009 Accepted 30 Sep, 2009

Abstract

Background: Spinal cord slices culturing from adult mammals could be considered as a suitable in-vitro model for evaluating cellular viability, spinal cord injury and cell death mechanisms. In present study, determining of cell death in motor neurons of cultured spinal cord slices in adult mouse was done.

Materials and Methods: In a experimental- laboratory study, thoracic regions of spinal cords from 4 Balb/c mice were cut into 400-µm slices using tissue chopper and incubated in a Co_2 incubator at 37˚C for different periods of time. Freshly prepared slices (0h) and cultured slices were fixed and sectioned using cryostat. To study morphological and biochemical features of cell death, fluorescent staining, TUNEL method and agarose gel electrophoresis were used.

Results: In freshly prepared slices of motor neurons showed no apoptotic changes. While, 6, 12 and 24h after culturing, this neurons displayed morphological features of apoptosis including cell shrinkage as well as nuclear and chromatin condensation. Also, 6 and 12h after culturing were TUNEL positive. In addition, extracted DNA from cultured slices for 24h were indicated the nucleosomal DNA fragmentation on agarose gel electrophoresis.

Conclusion: Results were showed the occurrence of apoptosis in motor neurons of cultured adult mouse spinal cord slices.

Keywords: Apoptosis, Spinal cord, Motor neuron, Balb/c mouse

*Corresponding author;
Email: m-soleimani@araku.ac.ir
Address: Department of biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran.