شهرزاد قدیریان، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی
دکتر طاهره ناجی، دانشیار و مدیر گروه علوم پایه داروسازی

آپوپتوز و فلوسایتومتری

در سال ۱۹۷۲دانشمندی به نام کر برای اولین بار واژه آپوپتوز را به معنای ریزش برگ برای توصیف مرگ فیزیولوژی سلول معرفی کرد(۱,۲). آپوپتوزیس یک فرایند فیزیولوژیکی حیاتی برای رشد طبیعی و همچنین حفظ هموستازی است. زمانی که سلول تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی و یا حتی درونی همانند اشعه های یونیزان، دارو های سیتوتوکسیک، هورمون های گلوکوکورتیکوئیدی و عوامل دیگر قرار می گیرند، محتویات آن از جمله DNAدستخوش تغییراتی می شود که در صورت ادامه حیات آن منجر به ناهنجاری هایی در سلول می شود(۳).

تفاوت های آپوپتوز و نکروز

در آپوپتوزیس غشا بدون اینکه انسجام خود را از دست بدهد به صورت حفره حفره در می آید اما در نکروز غشا انسجام و یکپارچگی خود را از دست می دهد. آپوپتوزیس با چروکیدگی سیتوپلاسم و تراکم هسته آغاز می شود اما نکروز با متورم شدن سیتو پلاسم و میتوکندری همراه است.

آپوپتوزیس باتشکیل حفرات غشایی به نام اجسام آپوپتوتیک همراه است اما نکروز بدون تشکیل این حفرات و تا لیز کامل سلول پیش می رود. در نکروز تعادل یونی محیط در داخل و خارج سلول از بین می رود اما در آپوپتوزیس طی واکنش های آنزیمی فعال این تعادل حفظ می شود. نکروز به انرژی نیاز ندارد اما آپوپتوزیس با مصرف انرژی به ATP وابسته است. در نکروز DNA به صورت تصادفی در جایگاه های غیر اختصاصی شکسته می شود اما درآپوپتوزیس این شکستگی ها تصادفی نیست و در فواصل بین نوکلئوزوم ها رخ می دهد. در آپوپتوزیس فاکتور هایی مثل سیتوکروم‌C، اندونوکلئازSMAC،G و AIF از میتوکندری به سیتوپلاسم آزاد می شود. ترکیب فسفولیپید های غشا طی آپوپتوزیس تغییر می کند مثلاً فسفاتیدیل سرین که در لایه سیتوزول غشا حضور دارد به لایه اگزوپلاسمیک می رود که این یک پیام برای ماکروفاژهاست تا سلول مورد نظر را فاگوسیتوز کنند. سلول های آپوپتوتیک فاقد التهاب در بافت اند یا التهاب کمی دارند اما در نکروز سلول های مجاور تحت تاثیر قرار می گیرند و در بافت پاسخ التهابی ایجاد می کنند. آپوپتوزیس توسط محرک هایی از جمله نبودن فاکتور رشد،تغییرات هورمونی القا می شوند اما نکروز توسط ویروس ها، تغییرات دمایی ناگهانی، کمبود اکسیژن و سموم متابولیکی در سلول پدید می آید (٤, ٥, ٦, ٧).

کاسپازها

کاسپازها گروهی از پروتئاز های اختصاصی سیستئینی هستند(۸) که از عوامل اصلی آپوپتوزیس محسوب می شود و به صورت گروهی در اغلب سلول ها به فرم غیرفعال وجود دارند. این آنزیم ها در روندی به فرم فعال تبدیل می شود. القا آپوپتوزیس توسط رسپتورهای مرگ سلولی منجر به فعال شدن کاسپاز های آغازگر مثل کاسپاز۸ و۱۰ می شود و این کاسپاز ها منجر به فعال شدن کاسپازهای دیگری مثل ۳ یا٦ وسایر کاسپاز ها می شوند(۹). کاسپازها ۳ دمین دارند و منجر به تجزیه پروتئین بعد از ریشه آسپارتیت می شود. توالی ۳ اسید آمینه قبل از آسپارتیت تعیین کننده سوبسترای اختصاصی آنهاست. کاسپازها به عنوان کلید های مرگ سلولی محسوب می شود(۱۱و۱۰). ساختمان کاسپازها دارای پرودمین هایی است که یک دمین اختصاصی برای اتصال پروتئین – پروتئین است ونقش مهمی در فعال سازی کاسپاز ها دارد(۱۲و۱۳).کاسپاز ها به صورت غیر فعال یا پروکاسپازسنتز می شوند و در پاسخ به پیام های پیش آپوپتیک فعال می شوند که این فعال سازی معمولاً با ایجاد یک برش در اسید آمینه آسپارتیک اسید

انجام می شود. طی آپوپتوزیس به خاطر شکستگی و جدا شدن پرودمین از زیر واحد های کوچک و بزرگ، پروکاسپاز به کاسپاز فعال تبدیل می شود. در این هنگام کاسپاز فعال روی جایگاه های اختصاصی کاسپاز های دیگر اثر می گذارد و می توانند کاسپاز های پایین دست خود را فعال کند و سبب ایجاد یک آبشار پروتئولیتیکی شوند سپس کاسپاز های فعال شده، پروتئین های دیگرکلیدی را در سلول می شکنند.گروه دیگر از کاسپاز ها پروتئین هایی را می شکنند که آنزیم های تجزیه کننده DNAرا مهار می کنند وبا آزاد شدن DNase ها، DNA در هسته سلول می شکند.

کاسپازها مبنای متفاوتی برای تقسیم بندی دارند که می توان انها را بر اساس ساختار، ویژگی نسبت به سوبسترا، فعالیت فیزیولوژیک و اندازه پرودمین تقسیم بندی کرد اما چیزی که در اپوپتوزیس اهمیت دارد تقسیم بندی بر اساس پرودمین آنهاست که شامل کاسپاز های آغازگر که پرودمین طویلی دارد و شامل کاسپازهای ۸،۹،۱۰،۱۲ وکاسپازهای اجرایی که پرودمین کوتاهی دارند و شامل کاسپاز های۳،٦،۷ هستند (١٤و١٥و١٦).

مسیر های آپوپتوزیس

مسیر خارجی یا مسیر رسپتور های مرگ سلولی Extrin-sic pathway شناخته ترین گیرنده های مرگ عبارتنداز: Fas/Apo۱/CD۹۵ وTNF که در غشای پلاسمایی اغلب سلول ها وجود ندارد(١٦). زمانیکه یک لیگاند گیرنده مربوط به خود را تحریک می کند و به آن متصل می شود این تحریک باعث به کار گیری پروتئین های آداپتور می شود. در نتیجه پروتئین آداپتورFADD ازناحیه C ترمینال خود به گیرنده مرگ متصل می شود، همچنین این پروتئین از ناحیه Nترمینال خود که دارای ناحیه موثر مرگ است به ناحیه مشابه درپرودمین پروکاسپاز ۸یا۱۰ متصل می شود و تشکیل کمپلکس علامت دهنده القا مرگ(DISC)را می دهد(۱۷). بدین ترتیب پروکاسپازها فعال شده وبه ترتیب کاسپاز های اجرائی را فعال می کنند و آپوپتوزیس رخ می دهد.

♦ مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی Intrinsic pathway

در این مسیر سیتوکرومC از فضای بین دو غشای میتوکندری به داخل سلول رها می شود. در حالت عادی Apf۱ به صورت بی اثر و غیرفعال است که در حضور سیتوکرومc فعال می شود. در ناحیه انتهای آمینی دارای دمین CARD و در انتهای کربوکسیلی دارای موتیف WD-٤٠ است.سیتوکرومC مسیر بعد از میتوکندری را تحریک می کند و توالی CARD پروکاسپاز ۹ به ناحیه CARDدر Apf-۱ متصل شده و آپوپتوزوم تشکیل می شود و می تواند هفت مولکول کاسپاز ۹ را فعال و سپس کاسپازهای اجرایی ۳ و ۷ فعال میشوندو آپوپتوزیس رخ می دهد(۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۲۲).

خانواده Bcl-2

اعضای این خانواده در تنظیم فعال سازی پروکاسپاز ها کمک می کنند وبعضی از این اجزا مثل Bcl-۲ و Bcl-xl با ممانعت از رها سازی سیتوکرومc از میتوکندری، آپوپتوزیس را مهار می کنند.

بعد از فعال شدن کاسپاز ۸ این پروتئاز Bid را شکسته و tBid ایجاد می کند که به طرف غشای میتوکندری رفته و به پروتئین Bax میتوکندری متصل می شود و باعث آزاد سازی سیتوکروم c می شود. tBid می تواند به Bcl-xl نیز متصل شود. در روش دیگر Bid شکسته نمی شود و در مسیر مستقل از کاسپاز از سیتوزول به میتوکندری می رود و به Bax متصل می شود و یک هترودایمر ایجاد می کند و سیتوکروم cآزاد می شود. همچنین Bad که از پروتئین های پرو آپوپتوتیک است، طی آپوپتوزیس از سیتوپلاسم به میتوکندری منتقل می شود ودر سلول هایی که فاکتور رشد ندارند و نیزدر صورت بالا بودن غلظت کلسیم(۲۳،۲٤) در سیتوپلاسم یک فسفاتاز فعال شده با کلسیم به نام کلسی تونین، Bad را دفسفریله می کند و باعث انتقال Bad به میتوکندری می شود Bad با Bcl-xl هترودایمر تشکیل می دهد و باعث پیشرفت آپوپتوزیس می شود و فعالیت Bcl-۲وBcl-xl را خنثی می کند(۲۵).

آپوپتوزیس مونومر های Baxرا از سیتوزول به غشای میتوکندریای منتقل می کند در آنجا همودایمر تشکیل می دهند و باعث رها سازی سیتوکروم c می شود.

از دیگر خانواده مهم تنظیم کننده داخل سلولی آپوپتوزیس،IAPها هستند که آپوپتوزیس را مهار می کنند(۲٦،۲۷،۲۸).

بررسی آپوپتوز با فلوسایتومتری

➤فلوسایتومتری

فلوسیتومتری به طور کلی روشی برای شمارش و بررسی میکروسکوپی ذرات، مانند سلول ها و کروموزوم ها است. در این حالت ذرات و یا سلول های مورد آزمایش به صورت معلق در مایع تک تک با سرعتی حدود ۵ تا ۵۰ متر در ثانیه از مقابل پرتوی باریک از نور لیزر عبور می کنند تا اطلاعات در ارتباط با اندازه و ویژگی های مختلف تک تک سلول ها، با سرعت و دقت بالا فراهم شود. در این روش، ویژگی های فیزیکی ذره ها ی خاص اندازه گیری و سپس تجزیه و تحلیل شود. مزیت منحصر به فرد فلوسایتومتری این است که می تواند بر روی تک تک سلول ها، پارامترهای چندگانه ای را به طور همزمان به سرعت و به صورت کمی اندازه گیری کند. این دستگاه امکان جمع آوری اطلاعات مربوط به ۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ سلول در هر ثانیه را فراهم می کند. به طور معمول در این تکنیک، حجم مورد نیاز از نمونه مورد آزمایش خیلی کم و حدود ۱۰۰ میکرولیتر است.

با این تکنیک نه تنها می توان چندین پارامتر سلولی را به صورت همزمان و سریع آنالیز کرد، بلکه می توان جمعیت های مختلف سلولی را در یک مخلوط هتروژن با کارای بالا به صورت زنده جداسازی (sorting) و جمع آوری کرد، به طوری که ذرات یا سلول های منفرد به طور فیزیکی از جمعیت های مخلوط جدامی شود. لذا، سلول های خاص می توانند برای کارهای بعدی در درون یک لوله جمع آوری شوند. استفاده از فلوسایتومتری یکی از متداول ترین تکنیک ها برای شناسایی و تمایز سلولهای مختلف در بافتهای گوناگون بوده و در بیولوژی سرطان کاربرد فراوان دارد.

➤ساختمان فلوسایتومتر

به طور کلی این دستگاه از ٤ قسمت تشکیل می شود:

- **سیستم مایع(fluidic):** در این سیستم ذرات به صورت تک تک از مقابل نور منتقل می کند.
- **سیستم نوری:** در این سیستم معمولا از لامپ های جیوه–زنون استفاده می شود. سایر لیزر ها (دیودی– آرگون– کریپتون – UV و ..) هم بنا به نیاز و یا سیستم دستگاه استفاده می شود. بنابراین، این سیستم شامل نور لیزر برای تابش به ذرات موجود در جریان مایع است.
- **سیستم الکترونیک:** این سیستم سیگنال های نوری جمع آوری شده را به سیگنال های الکترونیک (ولتاژ) تبدیل می کند که این کار توسط آشکاسازهای نور(photo detectors) انجام می گیرد. هنگامی که سیگنال های نور به آشکارسازهای نور برخورد می کنند، این سیگنال ها به یک تعداد مناسب الکترون تبدیل می شود تا جریان الکتریکی بزرگتری را تولید کنند.
- **سیستم کامپیوتر:** این سیستم تجزیه و تحلیل سیگنال های الکترونیکی را انجام می دهد. فرایند جمع آوری داده ها توسط فلوسایتومتر Acquisition نامیده می شود. Acquisition با اتصال یک کامپیوتر به دستگاه و نرم افزار مربوطه آن انجام می شود.

اساس دستگاه فلوسایتومتری

در روش فلوسایتومتری سلول ها به وسیله آنتی بادی منوکلونال متصل به فلورسنت و فلوروکروم های متصل شونده به اجزاء سلولی رنگ آمیزی می شود، سپس سلول ها در یک جریان سیال قرار می گیرد و به صورت تک تک معمولااز مقابل پرتوی نوری لیزر در طول موج ٤٤٨ نانومتر عبور می کنند. اساس فلوسایتومتری بر خصوصیات پراکنده سازی نور توسط ذرات، تحریک شدن (excitation) توسط نوری با طول موج خاص و نشر (emission) فلورسانس استوار است. متعاقب آن، نور پراکنده شده و نور فلورسانس جانبی توسط آشکار سازها جمع آوری می شوند. این آشکارسازها، سیگنال های نوری را به سیگنال های الکتریکی متناسب با نور جمع آوری شده تبدیل می کنند.

نحوه جداسازی سلول ها در دستگاه فلوسایتومتر

میزان پراکندگی نور در اثر برخورد نور لیزر هیچ ارتباطی به مقدار فلورسانس سلول ندارد و بستگی به خصوصیات فیزیکی سلول دارد که شامل اندازه و میزان گرانولیتی داخلی سلول است. لذا، شکل سلول، غشای سلول و هر نوع ماده گرانولار داخل سلول مانند هسته در پراگندگی نور موثر است. پراکندگی نور در زاویه های مختلف می تواند سلول ها را براساس تفاوت در اندازه و پیچیدگی درونی از یکدیگرمتمایزکند. لذا، از دستگاه فلوسایتومتر برای بررسی خواص فیزیکی سلول های که

با ماده فلورسنت رنگ آمیزی نشده اند می توان استفاده کرد. پس از برخورد نور به سلول و محتویات داخلی آن، به طور کلی می توان نورهای پراکنده شده(Scattered light) از سلول را به دو دسته نور پراکنده شده به جلو (FSC) ونور پراکنده شده به اطراف (SSD) پراکنده می شود. بنابراین نور پراکنده شده متناسب با گرانولیتی داخل سلول خواهد بود. یکی از نمودارهای مورد استفاده در فلوسایتومتری، نمودار هیستوگرام است که اطلاعات تعداد سلول ها و میزان فلورسنت آنها را نشان می دهد. مقدار سیگنال فلورسنت تشخیص داده شده متناسب با تعداد مولکول های فلوروکروم است که بر روی ذرات است. در فلوسایتومتری از نمودار سه بعدی(D plot–۳) برای ارزیابی اطلاعاتات نیر استفاده می شودکه هر بعد آن یک پارامتر را نشان می دهد.

مراحل ابتدایی و انتهایی آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول توسط فلوسایتومتری قابل بررسی می باشد. آپوپتوز تغییرات بسیاری را در غشای سیتوپلاسمی ایجاد می کند که شامل تغییرات در قابلیت نفوذپذیری و تغییرات در لیپیدهای غشای است. در اوایل آپوپتوز، فسفاتدیل سرین از سمت سیتوزولی غشای سلولی به سمت خارج غشاء انتقال می یابد. آنکسین Annexin v ۵ یک پروتئین با تمایل بالا برای اتصال به فسفاتدیل سرین است، اگر این پروتئین توسط FITC نشان دار شود، مراحل اولیه آپوپتوز قابل تشخیص خواهد بود. در حین آپوپتوز نفوذپذیری غشا تغییر می کند و برخی رنگ ها قابلیت نفوذ به سلول های آپوپتوز را پیدا می کنند، در صورتی که رنگ ها قابلیت نفوذ به سلول زنده را ندارند بنابراین با رنگ PI (پروپیدیوم یدید) می توان سلول زنده از مرده و مراحل آپوپتوز را شناسایی کرد .

منابع

1- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with

Wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26:239-57.

2- Amin F, Bowden ID, Szegedi Z, Mihalik R, Szende B. Apoptotic and non-apoptotic modes of programmed cell death in MCF-7 human breast carcinoma cells. Cell Biol Int 2004; 24:253-60.

3. Mustafa A. Correlation between levels of apoptosis, levels of infection and

hemaglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: does the viral neuraminidase have role in this associations. Virus Res 2002 May 10; 85 (2):123-31

4. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR.The machinery of programmed cell death.Pharmacol Ther 2001 Oct; 92 (1): 57-70

5. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995 Mar 10; 276

(5203): 1445-9

6. Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, Fisher PB. Rrestoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: Focus on P53 and mda-7. Semin Cancer Biol 2003 Apr; 13 (2): 169

7. Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. Pharmacol Ther 2004 Jan; 101 (1):1-15

8- Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, Hashemi M, et al. Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. J Leukoc Biol. (in press)

9. Steller H. Artifical death switchesinduction of apoptosis by chemically induced caspase multimerization. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 May 12; 95 (10): 5421-2

10. Rajaei F, Rad JS, Niknafs B, et al. Effect of vitrification on apoptosis in mouse

blastocysts. J Reprod Infertil 2004; 7: 14-22

-11 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science267:1456-62 ;1995 .

-12 Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced proximity model. Proc Natl Acad Sci 1996; 96:10964-7.

-13 Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, et al. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. J Exp Med 1998; 187:587- 600.

-14 Sjostrom J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. BM J 2001; 322:1538-9.

-15 Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. Herz 1999; 24:189-95.

-16 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 1998; 281:1305-8.

17- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-activated apoptosis. Exp Cell Res 2000; 256:27-33.

18. Rajaei F, Karja NW, Agung B, et al.Analysis of DNA fragmentation of porcine

embryos exposed to cryoprotectants. Reprod Domest Anim 2005 Oct; 40 (5): 429-32

19. Cory S, Strasser A, Jacks T, et al.Enhanced cell survival and tumorigenesis.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1994; 59: 365-75