Archive of SID

**مقاله مروری**
**مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان**
**دوره هفتم، شماره اول، بهار ۱۳۸۷، ۷۸-۷۱**

# روش‌های بررسی آپوپتوز

**دکتر محمد هاشمی[۱]، دکتر سعید قوامی[۲]**

**دریافت مقاله: ۸۶/۳/۱۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۶/۷/۱۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۶/۸/۱۴ پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۴**

**چکیده**

**زمینه و هدف:** آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، مکانیسم مهم هوموستاز سلولی است. محرک‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک سبب ایجاد آپوپتوز می‌شوند. اختلال در آپوپتوز منجر به بیماری‌های مختلف از قبیل بیماری خود ایمنی، سرطان، مقاومت تومور به دارو و ایدز می‌گردد. برای بررسی آپوپتوز از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. روش‌های متداول بررسی آپوپتوز عبارتند از: بررسی سیتوتوکسیسیتی، تغییرات مورفولوژی، الگوی نردبانی DNA، روش TUNEL و فلوسیتومتری. در روش‌های بررسی آپوپتوز، انتخاب روش به سیستم سلولی، ماهیت ماده القاء کننده آپوپتوز و اطلاعاتی مورد نظر و محدودیت‌های تکنیکی بستگی دارد. در این مقاله مروری روش‌های بررسی آپوپتوز مورد بحث قرار گرفته است.

**واژه‌های کلیدی**: آپوپتوز، مرگ سلولی، فلوسیتومتری، فراگمنتاسیونDNA

## مقدمه

واژه آپوپتوز برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی توسط محققی بنام کر (Kerr) جهت توصیف مرگ فیزیولوژیک سلولی بر اساس تغییرات مورفولوژیکی و تمایز آن از نکروز معرفی شد [۱]. آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هوموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های T خود واکنش‌گر نقش دارد [۲]. هرگونه اختلال در این روند، منجر به بیماری می‌شود [۳] که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی بوده و (موجب) ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی گردد [۴]. بالعکس افزایش غیرطبیعی مرگ سلولی در بیماری‌هایی نظیر اختلالات نرودژنراتیو و ایدز دیده می‌شود [۵]. در این مقاله مروری، به تکنیک‌های رایج بررسی آپوپتوز پرداخته می‌شود.

**۱- مسیرهای آپوپتوزی:** مولکول‌های متعددی در فرآیند آپوپتوز درگیر هستند. تحریک مولکول‌های پروآپوپتوزی و یا مهار فاکتورهای آنتی‌آپوپتوزی بستگی به نوع سلول و محرک دارد. دو مسیر اصلی آپوپتوز، مسیر خارجی یا مسیر وابسته به گیرنده‌های مرگ و مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی می‌باشد [۴،۶].

**۱-۱- مسیر خارجی آپوپتوز یا آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده‌های مرگ:** در غشاء پلاسمایی اغلب سلول‌ها گیرنده‌های مرگ وجود دارد. گیرنده‌های مرگ، اعضاء ابرخانوادهٔ گیرندهٔ فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor Necrosis Factor) (TNF) می‌باشند. زمانی که این گیرنده‌ها توسط لیگاندهای مربوطه، تحریک شوند سبب فعال شدن کاسپازها و القاء آپوپتوز می‌گردند. ویژگی این ابرخانواده وجود توالی غنی از سیستئین در بخش خارج سلولی است. این گیرنده‌ها در بخش سیتوپلاسمی خود دارای توالی به نام ناحیه مرگ [Death Domain (DD)] بوده و از این رو در انتقال پیام

۱- (نویسنده مسؤول) دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی‌بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
تلفن: ۲۴۴۲۸۸۱-۰۵۴۱، فاکس: ۲۴۲۰۹۶۸-۰۵۴۱، پست الکترونیکی: hashemim@zdmu.ac.ir
۲- عضو هیأت علمی گروه آموزشی بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه مانیتوبا، کانادا

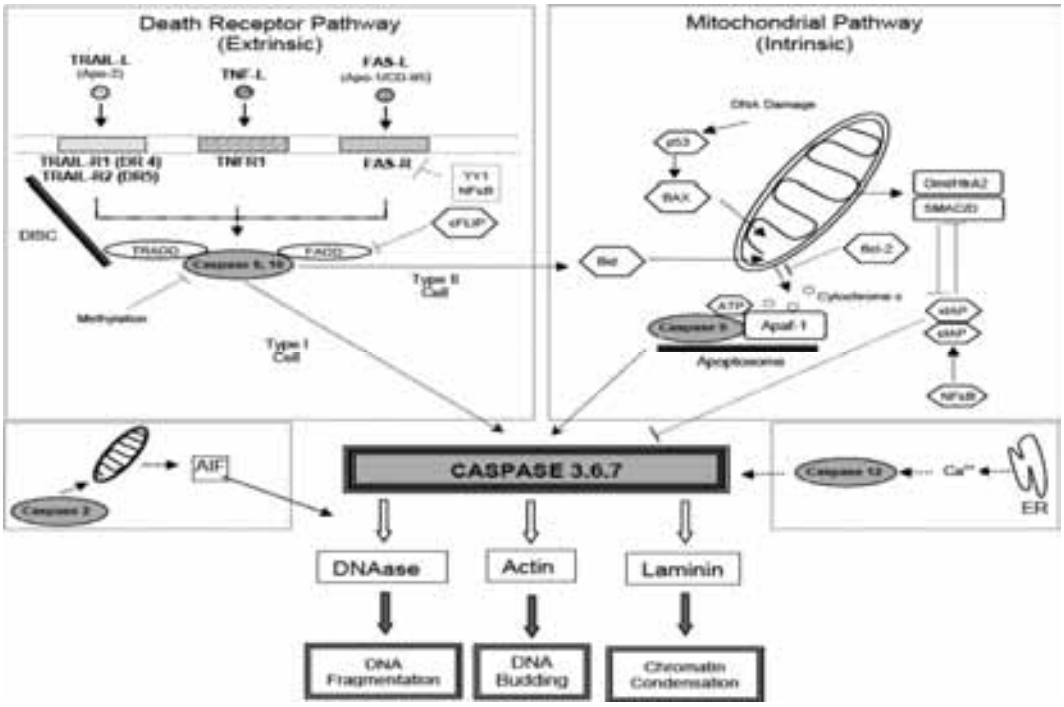
www.SID.ir

Archive of SID



آپوپتوزی به درون سلول شرکت می‌نمایند [۷]. تحریک گیرنده‌های مرگ توسط لیگاندهای مربوط، منجر به تریمریزاسیون گیرنده و بکارگیری پروتئین‌های آداپتور می‌گردد. پروتئین‌های آداپتور از قبیل FADD/Mort1 (Fas-Associated Death Domain) دارای ناحیه مرگ (DD) درC ترمینال است که این پروتئین را قادر می‌سازد تا به دومین گیرنده سیتوپلاسمی از طریق میان‌کنش ناحیهٔ مرگ-ناحیهٔ مرگ متصل گردد. هم‌چنین این پروتئین در ناحیهٔ N-ترمینال دارای «ناحیهٔ مؤثرمرگ» (DED) Death Effector Domain می‌باشد که با ناحیهٔ DED مشابه در پرودمین کاسپاز-۸ و ۱۰میان کنش می‌کند. به این طریق پروکاسپاز-۸ و ۱۰ به کاسپاز-۸ و ۱۰ فعال تبدیل می‌شود. کاسپازهای آغازگر (کاسپازهای-۸ و ۱۰)، سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی (کاسپازهای – ۳، ۶ و ۷) می‌شوند [۹-۸].

**۱-۲-مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوز:** در مسیر میتوکندریایی یا مسیر داخلی آپوپتوز، سیتوکروم c از فضای بین دو غشاء میتوکندری به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شود. سیتوکروم c با Apaf-1، ATP و پروکاسپاز-۹ تعامل کرده و آپوپتوزوم ایجاد می‌شود [۱۰]. آپوپتوزوم سبب فعال شدن کاسپاز-۹ می‌شود و کاسپاز- ۹ فعال سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی از قبیل کاسپاز-۳، ۶ و ۷ می‌شود. نفوذپذیری غشاء میتوکندری به سیتوکروم c توسط نسبت نسبی واسطه‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک تعیین می‌شود. مولکول‌های پروآپوپتوتیک از قبیلBax یا Bak سبب افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندری می‌شوند. یک فرضیه این است که این پروتئین‌ها سبب ایجاد کانال در غشاء میتوکندری شده و باعث می‌شوند که محتویات ماتریکس میتوکندری به بیرون نشت کند. فرضیه دیگر این است که پروتئین‌های پروآپوپتوتیک سبب تغییر کنفورماسیون کانال‌های آنیونی وابسته به ولتاژ (Voltage Dependent Anion Channel) (VDAC) می‌شوند که سبب می‌شود پروتئین‌های درشت از آن‌ها عبور کنند [۱۱]. جفت شدن مولکول‌های پروآپوپتوتیک با فاکتورهای آنتی‌آپوپتوتیک (Bax, Bcl-2, Bcl-xl) اثر آنتی‌آپوپتوتیک آن‌ها را خنثی می‌کند. بنابراین میزان نسبی واسطه‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک، میزان سیتوکروم c در دسترس را برای تشکیل آپوپتوزوم تعیین می‌کند. در مسیر میتوکندریایی، تحریک روند آپوپتوز با آزاد شدن SMAC/DIABLO و Omi/HTRA-2 از میتوکندری نیز صورت می‌گیرد. نقش این فاکتورها خنثی کردن اعمال مهارکننده‌های آپوپتوز (IAP) از قبیل cIAP2T،cIAP1 و XIAP می‌باشد [۱۲]. در شکل-۱ به طور شماتیک مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز نشان داده شده است.




*شکل ۱- مسیرهای داخلی و داخلی آپوپتوز* [۲۲]



www.SID.ir

Archive of SID


بین مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز ارتباطی وجود دارد. فعال شدن کاسپاز-۸ در مسیر داخلی سبب شکسته شدن Bid شده که در نهایت باعث آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری و تشکیل آپوپتوزوم می‌شود [۱۳]. کاسپاز-۶ که یک کاسپاز اجرایی است سبب فعال شدن کاسپاز-۸ می‌شود [۱۴].

مکانیسم‌های القاء آپوپتوز مستقل از کاسپاز نیز گزارش شده است. این مکانیسم به واسطه فاکتور القاء کننده آپوپتوز (AIF)، اندونوکلئاز G، کالپین‌ها و کاتپسین‌ها می‌باشد [۷،۱۵].

**۲- روش‌های بررسی آپوپتوز:** جهت سنجش آپوپتوز و بررسی مکانیسم آن روش‌های متعددی بر مبنای تغییرات مورفولوژیک و بیوشیمیایی سلول‌های آپوپتوزی طراحی و معرفی شده‌اند. مهم‌ترین نکته‌ای که می‌بایست در نظر گرفته شود انتخاب درست تکنیک سنجش آپوپتوز بر مبنای نوع مطالعه (روی سلول یا بافت)، القا کننده مورد نظر، مکانیسم مورد بررسی و سازگاری حساسیت و اختصاصی بودن نتایج بر مبنای تعداد سلول یا غلظت آنالیت مورد سنجش است.

**۲-۱-بررسی سیتوتوکسیسیتی:** بررسی سیتوتوکسیسیتی اولین گام در بررسی آپوپتوز است. با این روش میزان مرگ سلولی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. این روش قادر به تمایز آپوپتوز از نکروز نیست. با بررسی سیتوتوکسیسیتی درصد سلول‌های زنده یا مرده نسبت به گروه شاهد به دست می‌آید. دو روش متداول بررسی سیتوتوکسیسیتی، روش MTT و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو است.

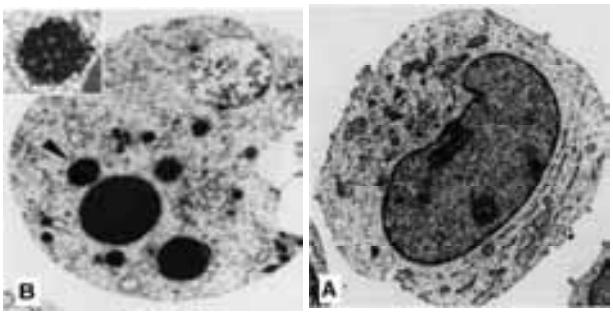
**۲-۱-۱- بررسی سیتوتوکسیسیتی با استفاده از روش MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H):**

MTT نمک زرد رنگ تترازولیم محلول در آب است که توسط سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری‌های سلول‌های زنده و فعال، احیاء و به ترکیب رنگی فورمازان نامحلول تبدیل می‌شود که این رنگ با حلال آلی حل گشته و شدت رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر متناسب با میزان سلول‌های زنده است [۱۹-۱۶]. این روش سریع، ارزان و برای نمونه‌های زیاد مناسب است.

**۲-۱-۲-بررسی سیتوتوکسیسیتی با تریپان‌بلو:** غشای سلول‌های مرده به رنگ‌ها نفوذپذیر است در حالی که در سلول‌های زنده غشاء سلولی به رنگ نفوذناپذیر است. تریپان‌بلو از جمله رنگ‌هایی است که برای تمایز سلول‌های زنده از مرده توسط میکروسکوپ نوری به کار می‌رود. سلول‌های مرده در زیر میکروسکوپ به رنگ آبی هستند. درصد سلول‌های مرده با استفاده از لام نئوبار محاسبه می‌شود. این روش گرچه مقرون به صرفه است اما وقت‌گیر بوده و برای نمونه‌های زیاد مناسب نیست.

**۲-۲-تغییرات مورفولوژی:** تغییرات مورفولوژیکی در روند آپوپتوز عبارتند از: چروک شدن سلول، تراکم کروماتین، قطعه قطعه شدن هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک (Apoptotiv body) [۲۰]. ارزیابی مورفولوژیکی نقش کلیدی در مطالعات مرگ سلولی دارد. برای بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های آپوپتوزی نیاز به میکروسکوپ است (میکروسکوپ الکترونی، نوری یا فلورسانس). علاوه براین ارزیابی مورفولوژی سلول‌های آپوپتوزی نیاز به مهارت دارد.

**۲-۲-۱-میکروسکوپ الکترونی:** تغییرات مورفولوژیکی که در سلول‌های آپوپتوتیک ایجاد می‌شود با نکروز متفاوت است. اولین بار تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های آپوپتوتیک با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد. این روش تست استاندارد طلایی برای تمایز آپوپتوز از نکروز است. تغییرات مورفولوژیکی اختصاصی در سلول‌های آپوپتوزی زودرس و دیررس اتفاق می‌افتد که با میکروسکوپ الکترونی می‌توان مشاهده کرد (شکل ۲).




***شکل ۲- تغییرات مورفولوژیک سلول آپوپتوزی مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی. A. سلول طبیعی B. سلول آپوپتوزی که فراگمنتاسیون DNA در آن مشاهده می‌شود [۳۶].***


www.SID.ir

Archive of SID



میکروسکوپ الکترونی روش اختصاصی و حساس برای تشخیص آپوپتوز است و چنانچه رنگ‌آمیزیDNA فراگمنته با روش TUNEL صورت گیرد، حساسیت آن بیشتر می‌شود (EM-TUNEL). در این روش سلول‌ها فیکس، رنگ‌آمیزی و دهیدراته شده و سپس با میکروتوم برش‌های نازک داده می‌شود. روش میکروسکوپ الکترونی به تجهیرات گران‌قیمت و متخصص آموزش دیده ماهر نیازمند است [۲۱]. بنابراین، این روش به عنوان یک روش متداول برای بررسی آپوپتوز مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. این روش وقت‌گیر بوده و بررسی نمونه‌های زیاد مشکل است [۲۲].

**۲-۲-۲-میکروسکوپ نوری و فلورسانس:** با میکروسکوپ نوری می‌توان تراکم کروماتین و اجسام آپوپتوتیک در سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین ائوزین (H&E) را مشاهده کرد. میکروسکوپ نوری توانایی کمی برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک دارد، ولی اگر هسته با پروپیدیوم آیودید (PI) رنگ‌آمیزی شود می‌توان آپوپتوز را از نکروز تمایز داد. میکروسکوپ فلورسانس دقت بیشتری دارد. از رنگ‌های هسته‌ای فلورسانس از قبیل هوخست-۳۳۲۵۸ و DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) می‌توان برای تغییرات هسته‌ای استفاده کرد. این رنگ‌ها به دلیل خاصیت فلورسانس، در مطالعات میکروسکوپ فلورسنت جهت تشخیص مورفولوژی هسته سلول‌های آپوپتوزی (تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن آن) استفاده می‌شود [۲۳-۲۲].

**۲-۳-فراگمنتاسیون DNA**

**۲-۳-۱-روش TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick):** روش تانل (TUNEL) اولین بار در سال ۱۹۹۲ توسط Gavrieli و همکاران معرفی شد [۲۴]. این تست به طور گسترده برای بررسی آپوپتوز در *in situ* مورد استفاده قرار گرفت. اساس این روش بر مبنای اتصال اختصاصی داکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز انتهایی (TdT) به انتهای 3'-OH موجود در DNA قطعه شده است. این آنزیم سبب قرار دادن نوکلئوتیدهای نشاندار (Biotin-dUTP, DIG-dUTP, Fluorescein-dUTP) در محل شکست DNA می‌شود. با استفاده از آویدین نشاندار با پراکسیداز که به بیوتین متصل می‌شود می‌توان سلول‌های نشاندار را با میکروسکوپ نوری یا فلوئورسانس، فلوسیتومتری و یا ایمونوهیستوشیمی شناسایی کرد.

روش TUNEL محدودیت‌هایی دارد. فیکس کردن و جابجایی بافت‌ها به طور معنی‌داری نتایج این روش را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۶-۲۵]. روش TUNEL در حدود ۱۸ درصد نتایج منفی کاذب می‌دهد [۲۰]. به علاوه این روش یک روش اختصاصی آپوپتوز نیست [۲۷] زیرا بیانگر شکست DNA است، هر نوع مرگ سلولی و سلول‌های نکروتیک هم با این متد جواب مثبت می‌دهد [۲۸]. علی‌رغم این محدودیت‌ها این روش مزیت‌هایی هم دارد. با این روش می‌توان اندیکس آپوپتوزی (AI) را با تعیین نسبت سلول‌های TUNEL مثبت به کل سلول‌ها محاسبه کرد. به علاوه از این روش در محیط کشت، سلول‌های چسبنده، بافت فروزن سکشن و بافت‌های ثابت شده با فرمالین در بلوک‌های پارافینی می‌توان استفاده کرد. در مجموع روش TUNEL روش قابل قبول برای بررسی آپوپتوز در *in situ* و *in vitro* است در صورتی که با روش‌های دیگر تأیید شود.

**۲-۳-۲- روش ISEL (In Situ End-Labeling Technique):** این روش که در سال ۱۹۹۳ توسط Wijsman و همکاران ارایه شد [۲۹] در واقع روش اصلاح شده TUNEL است. در این روش به جای TdT ازDNA پلیمراز I برای نشاندارکردن 3'-OH در DNA شکسته شده استفاده می‌شود. همانند روش TUNEL در این روش نیز dUTP با بیوتین، DIG یا فلوئورسین لینک کرد که اندازه‌گیری اتوماتیک با سیتومتری در مورد نمونه‌های زیاد را امکان‌پذیر می‌سازد. این روش در مقایسه با روش TUNEL حساسیت کمتری دارد و وقت‌گیر است.

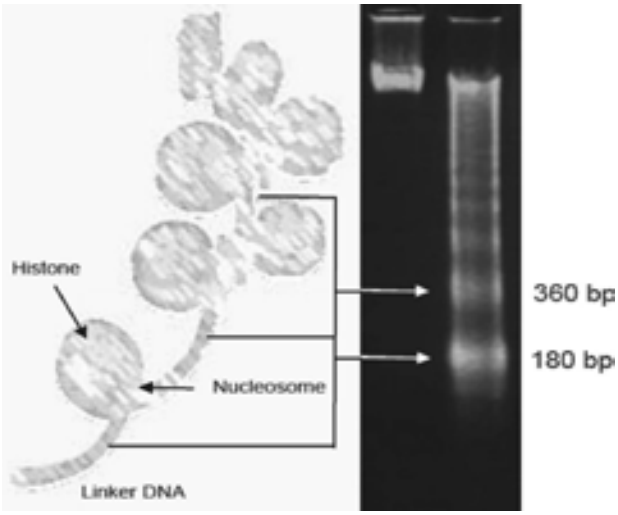
**۲-۳-۳-الگوی نردبانی DNA:** از مشخصه‌های بارز بیوشیمیایی آپوپتوز شکست بین نوکلئوزومی توسط اندونوکلئازها که منجر به ایجاد قطعات ۱۸۰ تا ۲۰۰ جفت باز می‌شود (شکل ۳). در این روشDNA از سلول یا هموژن بافتی استخراج و سپس در ژل آگاروز الکتروفورز می‌شود. الگوی نردبانی DNA در فرایند آپوپتوز مشاهده می‌شود



www.SID.ir

Archive of SID


[۲۳،۳۰]. در نکروز، شکست تصادفی DNA اتفاق می‌افتد و در ژل آگاروز به صورت اسمیر دیده می‌شود [۲۰]. محدودیت این روش این است که برای مشاهده الگوی نردبانی به میزان بالای DNA نیاز است. ولی این تکنیک وقت‌گیر پرزحمت کمی نیست [۲۲]. در برخی از رده‌های سلولی آپوپتوز بدون فراگمنتاسیون بین نوکلئوزومیDNA صورت می‌گیرد. بنابراین فقط با بررسی الگوی نردبانی DNA نمی‌توان نکروز را از آپوپتوز تمایز داد.




***شکل ۳- الگوی نردبانی DNA در روند آپوپتوز***

**۲-۴-فلوسیتومتری:** اساس این روش بر این مبنا استوار است که در طی مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین که به طور طبیعی در نیمه داخلی غشاء وجود دارد به نیمه خارجی غشاء منتقل می‌شود که این عمل به دلیل اختلال در آنزیم ترانس لوکاز وابسته به ATP و یا فعال شدن سیستم‌های آنزیمی دیگر از قبیل اسکرامبلاز (Scramblase) می‌باشد. قرار گرفتن فسفاتیدیل سرین در لایهٔ خارجی غشاء سلولی سیگنال طبیعی است که سلول‌های آپوپتوتیک توسط ماکروفاژها و سلول‌های مجاور شناسایی و فاگوسیته شوند. مشخص شده است که انکسین V که یک پروتئین ضد انعقادی و دارای وزن مولکولی ۳۵ کیلودالتون است در حضور کلسیم با تمایل بالایی به فسفاتیدیل سرین متصل می‌شود و از کونژوگهٔ این پروتئین با رنگ فلورسانس FITC به طور گسترده در بررسی آپوپتوز به وسیلهٔ فلوسیتومتری استفاده می‌شود [۲۳].

فلوسیتومتری روشی است که طی آن جریان یکنواخت و خطی از سلول‌ها در حضور مادهٔ نشاندار فلورسانس، در مجرای خوانش دستگاه قرار می‌گیرند و توسط تابش نور لیزر، تحریک می‌شوند. بر اساس نوع مادهٔ نشاندار فلورسانس، نشر ساطع می‌شود. فلوسیتومتر به طور همزمان، سه نور نشری را می‌تواند ثبت نماید، کمیت مورد بررسی در داده‌های خروجی به دنبال پردازش نرم افزاری گزارش می‌شود. پارامترهایی که مورد ارزیابی قرار می‌گیرند عبارتند از: پراش جانبی ( Side scattering )، پراش مستقیم (Forward Scattering ) و نشر فلورسانس. شدت نور پراش مستقیم، متناسب با حجم سلول است. در روند آپوپتوز، کاهش در نور پراش مستقیم دیده می‌شود که به علت چروک شدن سلول است. بررسی آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه (Annexin-V/PI) صورت می‌گیرد. فلوئوروکروم مورد استفاده فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) است که در کانال سبز یا FL1 ثبت و ارزیابی می‌شود و پروپیدیم آیداید (PI) که رنگ اختصاصی DNA است، در کانال قرمز (FL2) یا نارنجی (FL3) ثبت و ارزیابی می‌گردد. خروجی نتایج شامل منحنی پراش جانبی / پراش مستقیم جهت تعیین حدود اندازه سلولی و نحوه توزیع آن‌ها و هم‌چنین منحنی FL1 (Annexin V) / FL2 (PI) جهت تعیین مربعات (Quadrant) چهارگانه (شکل ۴) که عبارتند از:

- فوقانی چپ (Upper-left ): سلول‌های نکروزی ($PI^-$/ Annexin $V^-$)
- تحتانی چپ (lower-left): سلول‌های زنده ($PI^-$/ Annexin $V^-$)
- فوقانی راست (Upper-right ): سلول‌های آپوپتوزی دیررس یا نکروزی (Annxin $V^+$/$PI^+$)
- تحتانی راست (Lower-right): سلول‌های آپوپتوزی اولیه (Annexin $V^+$/$PI^-$)

درصد هر یک از مربع‌ها نسبت به کل محاسبه گردید.

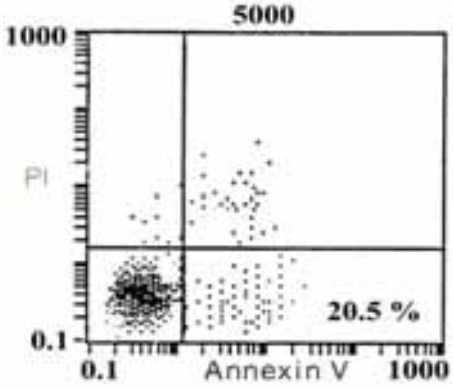
علاوه بر این، از فلوسیتومتری می‌توان برای بررسی مکانیسم آپوپتوز استفاده کرد. وضعیت پروتئین‌های Bax، Bcl-2، محتوای DNA و تعیین وضعیت سلول در چرخه سلولی، قطعه قطعه شدن DNA، وضعیت پتانسیل غشایی میتوکندری، بررسی فعال شدن کاسپازها [۳۲-۳۱]، سطح


www.SID.ir

Archive of SID



سلولی پروتئین‌های پروتوانکوژن‌ها (c-Myc و c-ras) و ژن‌های سرکوبگر تومور (p53 وpRb) بـا ایـن روش ارزیـابی مـی‌شـوند [۲۰].




***شکل ٤- خروجی داده‌های فلوسیتومتر، مربعات چهارگانه***

گرچه روش فلوسـیتومتری روش مناسـب و دقیقـی بـرای بررسی روند آپوپتوز است اما نیاز به تجهیزات گران‌قیمت دارد و در اغلب آزمایشگاه‌های تحقیقاتی این تجهیزات مهیا نیست.

**۲-۵-اندازه‌گیری فعالیت کاسپازها:** کاسپازها جزء خانوادهٔ سیستئین پروتئازها هستند و نقـش محـوری در شـروع و فـاز اجرایی آپوپتوز ایفا می‌نمایند. در روند آپوپتوز، کاسپازها فعـال شده و روی سوبستراهای خود عمـل کـرده و سـبب تغییـرات بیوشـیمیایی و مورفولوژیـک در سـلول آپوپتوتیـک مـی‌شـوند (چروک شدن سلول، متـراکم شـدن کرومـاتین، قطعـه قطعـه شدن DNA و... ). بنابراین ارزیابی فعالیت کاسپازها به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوز مطرح است [۳۳]. به عـلاوه بـا بررسی فعالیت کاسپازها مـی‌تـوان مـسیر آپوپتـوز (خـارجی و داخلی) را ارزیابی کرد. بررسی فعالیت کاسپازها بـا اسـتفاده از سوبـــسترای اختـــصاصی آن‌هـــا صـــورت مـــی‌گیـــرد [۳۵-۳۴، ۲۳، ۱۸-۱۷].

## نتیجه‌گیری

در خاتمه می‌توان این گونه نتیجـه گرفـت کـه در بررسـی آپوپتوز یک روش به تنهایی برای اثبات آپوپتوز کـافی نیـست. انتخاب روش به سیـستم سـلولی، ماهیـت مـاده القـاء کننـده آپوپتـوز و اطلاعـاتی کـه بـه دنبـال آن هـستیم و هـم‌چنـین محدودیت‌های تکنیکی بستگی دارد. سنجش آپوپتوز با ارزیابی هم زمان فسفاتیدیل سرین در سـطح سـلول، تغییـر پتانـسیل میتوکندری، فعال شدن کاسپازها و قطعه قطعـه شـدن DNA شاخص مناسـب‌تـری از بررسـی هرکـدام ازایـن پارامترهـا بـه تنهایی است.

## References


[1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer,* 1972; 26(4): 239-57.

[2] Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Oncologist*. 1999; 4(4): 332-9.

[3] Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit*, 2005; 11(11): 337-45.

[4] Hashemi M, Kroczak TJ. Apoptosis and autoimmune disease. Anti-Inflammatory and Anti-Allergy agents. *Curr Med Chem*, 2005; 4: 429-37.

[5] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267: 1456-62.

[6] Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res,* 2007; 17: 759-71.

[7] Hashemi M, Ghavami S, Karami-tehrani F. Apoptosis or programmed cell death. *Tabibe-E-Shargh, Journal of Zahedan University of Medical Sciences and Helath Services*. 2003;1(5): 71-7. [Farsi]

[8] Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000; 407(6805): 789-95.

[9] Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res*, 2000; 256(1): 58-66.

[10] Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(6): 390-7.

[11] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407(6805): 770-6.

[12] Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase




www.SID.ir

Archive of SID


activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000; 102(1): 33-42.

[13] Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med*, 2000; 192(8): 21-5.

[14] Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, 1999; 144(2): 281-92.

[15] Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, 2005; 11(9): 3155-62.

[16] Hashemi M, Karami Tehrani F, Ghavami S. Cytotoxicity effect of Cladribine on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Iranian Biomedical Journal*. 2004; 8: 7-12.

[17] Hashemi M, Ghavami S, Eshraghi M, Booy EP, Los M. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 2007; 557(1): 9-19.

[18] Hashemi M, Karami Tehrani F, Farzami B. Caspase dependent apoptosis induced by Cladribine in estrogen receptor negative breast cancer cell line, MDAMB468. *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran.* 2003; 14: 303-10.

[19] Carmichael J, Mitchell JB, DeGraff WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE, et al. Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer*, 1988; 57(6): 540-7.

[20] Studzinski GP. Apoptosis. A practical approach. Oxford University Press Inc, New York, USA. 1999.

[21] White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol* 2004; 285: 105-10.

[22] Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res*, 2007; 139(1): 143-56.

[23] Hashemi M, Karami-Tehrani F, Ghavami S, Maddika S, Los M. Adenosine and deoxyadenosine induces apoptosis in oestrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cells via the intrinsic pathway. *Cell Prolif*, 2005; 38(5): 269-85.

[24] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992; 119(3): 493-501.

[25] Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*: 1995; 7(1): 61-4.

[26] Ichimura E, Fukuda T, Oyama T, Kashiwabara K, Sakurai S, Sano T, et al. Formalin fixation by boiling: is it suitable for the TUNEL staining? *Pathol Int*, 1995; 45(12): 971-2.

[27] Clarke R, Lund E, Johnson II, Pinder A. Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-G0 DNA content. *Cytometry*. 2000; 40(3): 252.

[28] Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology*. 1995; 21(5): 1465.

[29] Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*, 1993; 41(1): 7-12.

[30] Mirakian R, Nye K, Palazzo FF, Goode AW, Hammond LJ. Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases. *J Immunol Methods,* 2002; 265(1-2): 161-75.

[31] Zunino SJ, Singh MK, Bass J, Picker LJ. Immunodetection of histone epitopes correlates with early stages of apoptosis in activated human peripheral T lymphocytes. *Am J Pathol*, 1996; 149(2): 653-63.

[32] Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*, 2001; 38(2): 179-93.

[33] Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods*, 2002; 265(1-2): 97-110.

[34] Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, Karami-Tehrani F. 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*, 2004; 76(1): 169-75.

[35] Ghavami S, Karami Tehrani F, Hashemi M, Nikoogoftar Zarif M. Possible Involvement of a specific cell surface receptor for calprotectin-induced apoptosis in colon adenocarcinoma and carcinoma cell lines (SW742 and HT 29/219). *Journal of Sciences, Islamic republic of Iran*. 2004; 15: 3-11.

[35] Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of apoptosis. *News Physiol Sci*, 2004; 19: 124-8.


www.SID.ir

Archive of SID



# Methods of Studying the Apoptosis

**M. Hashemi** PhD[1], **S. Ghavami** PhD[2]

**Received: 09/06/07** **Sent for Revision: 07/10/07** **Received Revised Manuscript: 05/11/07** **Accepted: 25/11/07**

**Background and Objective:** Apoptosis or programmed cell death is an important process for cellular homeostasis and it can be initiated by both physiologic and pathologic stimuli. Defects in the apoptosis process may lead to serious disease such as; autoimmune diseases, cancer, tumors drug resistance, and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Various methods such as cytotoxicity assay, morphological evaluation, DNA laddering, TUNEL assay and flow cytometry analysis have been used to study cellular apoptosis. The selection of particular method depends on the cell system, the nature of cell death inducer, the information that is being sought and the technical restriction. In this review, various methods to study apoptosis have been discussed.

**Key words:** Apoptosis, Cell death, Flow cytometry, DNA fragmentation

*1- Associate Prof., Dept. of Clinical Biochemistry, School of Medicine, University of Medical Sciences, Zahedan, Iran*
*(Corresponding Author) Tel:(0541)2442881, Fax: (0541)2420368, E- mail: hashemim@zdmu.ac.ir*
*2- Academic Member, Dept. of Biochemisrtry and Genetics, University of Manitoba, Canada*



www.SID.ir