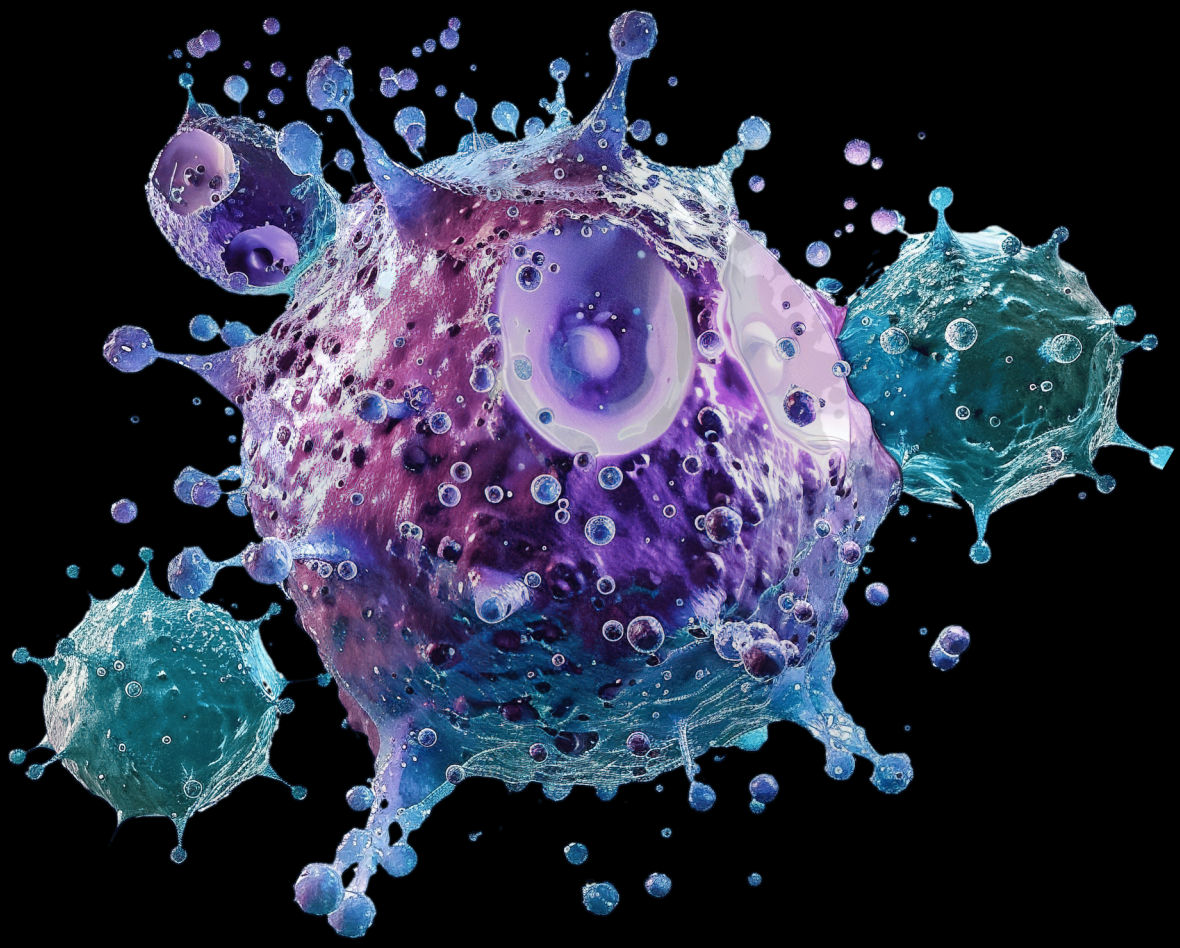
ZHIVAR

ژیوار / هفته نامهٔ انجمن علمی زیست شناسی دانشگاه شاهد / شماره ۲۸ / هفتهٔ دوم دی ۱۴۰۴

اخبار و تازه های زیست‌شناسی

روش های بررسی آپوپتوز در سلول یوکاریوتی



ژیوار

ژیوار، واژه ای ایرانی به معنای زندگی و حیات است...

صاحب امتیاز:
انجمن علمی زیست شناسی دانشگاه شاهد

مدیر مسئول و سردبیر:

سید علی حسینی

دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی دانشگاه شاهد

ناظر ارشد علمی نشریه:

خانم دکتر طوبی السادات احمدی

عضو هیئت علمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شاهد

مشاور علمی:

مهدی ادریسیان

دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی دانشگاه شاهد

مدیر فنی و صفحه آرا:

محمدصدرا محمدی

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه آزاد تهران مرکز

سرپرست کارگروه ویراستاری:

محمد ابراهیمی آشتیانی

دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی دانشگاه شاهد

شورای سردبیری:

خانم دکتر نگار سادات نادمی - سرپرست کارگروه پژوهشی پرونده ویژه

کاندیدای دکتری ژنتیک مولکولی - دانشگاه Istanbul Kültür University

الهام کندی - سرپرست خبرنامه‌ی ژیوار

دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی دانشگاه شاهد

زهرا بابایی - ویراستار

دانشجوی کارشناسی علم اطلاعات و دانش شناسی دانشگاه شاهد

سید محمد صالح طباطبایی - ویراستار

دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی دانشگاه شاهد

هیئت تحریریه:

نرگس حاجی حسینی - تحریریه‌ی خبرنامه

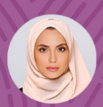
دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی دانشگاه شاهد

سارینا مسلمیان - تحریریه‌ی خبرنامه

دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی دانشگاه شاهد

محمد حسین جعفری - تحریریه‌ی خبرنامه

دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی دانشگاه علم و فرهنگ



خانم دکتر نگار سادات نادمی

کاندیدای دکتری ژنتیک مولکولی - دانشگاه Istanbul Kültür University

مریم جوان بخت

دانشجوی کارشناسی گفتار درمانی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

آناهیتا قاسمی پور

دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد مشهد

فهرست

۶ اخبار و تازه ها

۱۱ مقاله‌ی پژوهشی
روش‌های بررسی آپوپتوز در سلول‌های یوکاریوتی

محدودیت کالری طولانی‌مدت، شاخص‌های سلولی پیری مغز را به تاخیر می اندازد!

نوشته شده توسط نرگس حاجی حسینی

همزمان با پیر شدن مغز، سلول‌های سیستم عصبی مرکزی دچار اختلال در عملکرد متابولیک و افزایش آسیب اکسیداتیو می‌شوند. این مشکلات سلولی، توانایی حفظ غلاف میلین (پوشش محافظتی اطراف رشته های عصبی) را تضعیف کرده و منجر به تخریب ماده سفید مرتبط با افزایش سن می‌شود. میکروگلیاها سلول‌های ایمنی اولیه مغز هستند و فعال شدن آن‌ها پاسخی طبیعی به آسیب یا عفونت است. در شرایطی مانند پیری یا بیماری آلزایمر، میکروگلیاها می‌توانند به صورت مزمن فعال شوند که منجر به یک حالت التهابی مضر و آسیب‌زننده به نورون‌ها می‌گردد. یک مطالعه جدید از پژوهشگران نشان داده است که مصرف 30 درصد کالری کمتر از حد معمول، برای افراد بیش از 20 سال، می‌تواند نشانه‌های پیری در مغز را کُند کند. این مطالعه با استفاده از یک مدل آزمایشگاهی که شباهت زیادی با انسان دارد، انجام شده است. این پـژوهش که در دهه 1980 با همکاری مؤسسه ملی پیری آغاز شد، دو گروه از سوژه‌ها را مورد بـررسی قرار داد: یک گروه با رژیم غذایی متعادل و گروه دیگر با رژیم غذایی شامل تقریباً 30 درصد کالری کمتر مورد بررسی قرار گرفت. هدف اصلی این پژوهشِ بلندمدت، بررسی این موضوع بود که آیا کاهش دریافت کالری می‌تواند طول عمر را افزایش دهد یا خیر. پس از طی کردن دوره طبیعی زندگی سوژه‌ها، بافت مغزی آن‌ها پس از مرگ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پژوهشگران با استفاده از فناوری توالی‌یابی RNAتک‌سلولی، الگوی مولکولی سلول‌های مغزی را به صورت مجزا ارزیابی کردند. مقایسه سلول‌های مغزی گروه با رژیم معمولی و گروه تحت محدودیت کالری نشان داد که کاهش دریافت کالری چگونه بر بیان ژن‌ها و فعالیت مسیرهای مولکولی مرتبط با پیری در سلول‌های مغزی تأثیر می‌گذارد. نتایج نشان داد که سلول‌های مغزی گروه تحت محدودیت کالری، از سلامت متابولیک و عملکرد بالاتری برخوردار بودند. این سلول‌ها افزایش بیان ژن‌های مرتبط با میلین و همچنین تقویت فعالیت در مسیرهای متابولیک کلیدی، مانند مسیرهای گلیکولیز و بیـوسنتز اسیدهای چرب را نشان دادند. این مسیرها برای تولید و حفظ غلاف میلین که نقش عایق رشته‌های عصبی را دارد ضروری هستند. به گفته پژوهشگران، این یافته‌ها تأیید می‌کنند که مداخلات غذایی بلندمدت می‌توانند مسیر پیری مغز را در سطح سلولی تغییر دهند. این موضوع از ایـن جهت حائز اهمیت است که این تغییرات سلولی می‌توانند بر عملکردهای شناختی و یادگیری تأثیر بگذارند. به عبارت دیگر، عادات غذایی نقش مهمی در سلامت مغز ایفا می‌کند و کاهش دریافت کالری، در صورت تداوم در بلندمدت، ممکن است روند برخی از جنبه‌های پیری مغز را کُند نماید.

منبع خبر:

https://www.news-medical.net/news/20251125/Long-term-calorie-restriction-can-slow-cellular-markers-of-brain-aging.aspx

مایع آمنیوتیک رازهای خود را در رشد جنین فاش میکند...

نوشته شده توسط سارینا مسلمیان

در طول بارداری، مایع آمنیوتیک نقش حیاتی در رشد جنین ایفا می‌کند و علاوه بر فراهم کردن مواد مغذی، حمایت‌های لازم برای تکامل سالم جنین را تأمین می‌کند. پژوهشگران با استفاده از نخستی های غیرانسانی در حال بررسی تغییرات این مایع در طول بارداری هستند؛ مطالعاتی که می‌تواند به بهبود مراقبت‌های دوران بارداری و نوزادی، به‌ویژه بـرای نوزادان زودرس، منجر شود. تماس جنین با عوامل محیطی می‌تواند بر رشد و تکامل آن تأثیر بگذارد. پزشکانی که از مادران باردار و نوزادان مراقبت می‌کنند، تلاش دارند تا در طول بارداری و هنگام زایمان بهترین نتایج ممکن را برای هر دو فراهم کنند. با وجود پیشرفت‌های علمی قابل توجه، هنوز بخش‌هایی از بارداری مانند یک «جعبه سیاه» باقی مانده است. جیمی لو، متخصص پزشکی مادر و جنین در OHSU، می گوید: «همه ما اهمیت جفت در ایجاد محیط پیش از تولد و شکل‌دهی رشد جنین را می‌دانیم، اما نقش مایع آمنیوتیک به همان اندازه حیاتی است و کمتر به آن پرداخته شده است.» برای بـررسی دقیق‌تر این موضوع، او با همکار خود، نوزادپزشک برایان اسکاتولاین، همکاری کرد تا ترکیب مایع آمنیوتیک، تغییرات آن در طول بارداری و روش‌های مطالعه آسان‌تر آن توسط پـزشک-پژوهشگران شناسایی شود. درک اجزای مایع آمنیوتیک می‌تواند به بهبود مراقبت از مادران و جنین‌ها و همچنین ارتقای سلامت نوزادان نارس کمک کند. نمونه‌گیری از مایع آمنیوتیک معمولاً با روش آمنیوسنتز انجام می شود که اغلب فقط یک‌بار و برای آزمایش‌های ژنتیکی یا بررسی عفونت در بارداری‌های سالم انجام می‌گیرد. این محدودیت، مطالعه طولی این محیط را دشوار می‌کند. به همین دلیل، لو می گوید: «داشتن یک مدل آزمایشی که بتواند ترکیب مایع آمنیوتیک انسان را به‌طور دقیق بازسازی کند، حیاتی است.» با استفاده از این رویکرد، آن‌ها یک مدل نخستی‌های غیرانسانی ایجاد کردند. مقایسه محیط جنینی در طول بارداری نشان داد که ترکیب پروتئینی مایع آمنیوتیک در انسان و نخستی‌های غیرانسانی بسیار مشابه است. همچنین تغییرات پروتئینی در طول بارداری در هر دو گونه مشابه بود، که نشان‌دهنده نقش مایع آمنیوتیک در تأمین نیازهای رشد جنین است. این یافته‌ها اثبات کرد که نخستی‌های غیرانسانی می توانند به‌عنوان یک مدل ارزشمند برای مطالعه ایـن محیط مورد استفاده قرار گیرند. یکی از نقش های کلیدی مایع آمنیوتیک، تنظیم انعقاد خون است. در طول بارداری و زایمان، حفظ تعادل در انعقاد خون ضروری است: بافت‌های اطراف باید از خونریزی بیش از حد جلوگیری کنند تا جنین مواد مغذی لازم را دریافت کند و خطر عوارض بارداری یا سقط کاهش یابد، و همزمان از تشکیل لخته‌ها یا آمبولی مایع آمنیوتیک که می‌تواند به مادر آسیب بـرساند، جلوگیری شود. هرچند تحقیقات پیشین نشان داده بودند که مایع آمنیوتیک در این فرآیند نقش دارد، محدودیت‌ها در مطالعه آن مانع بـررسی کامل شده بود. با استفاده از مدل خود، پـژوهشگران نشان دادند که مایع آمنیوتیک انسان و نخستی‌های غیرانسانی شامل عواملی است که هم انعقاد را تقویت و هم آن را مهار می کنند. به‌ویژه، فسفولیپیدهای محیط جنینی برای فعال‌سازی پلاکت‌ها اهمیت دارند. همچنین، پروتئین‌های دخیل در تنظیم انعقاد خون در طول بارداری تغییر می‌کنند و این موضوع بار دیگر نقش مایع آمنیوتیک در حمایت از جنین را تأیید می‌کند. لو می‌گوید: «این یافته‌ها به ما کمک می کند برخی از مکانیزم‌های حفاظتی مایع آمنیوتیک را در سطحی دقیق‌تر و جزئی‌تر درک کنیم.»

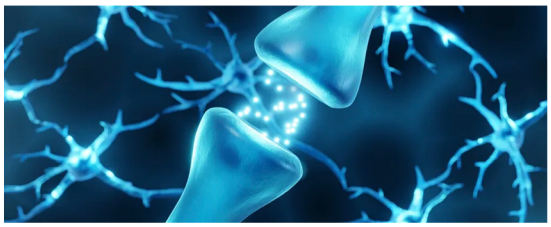
مطالعه ترکیب و عملکرد مایع آمنیوتیک می‌تواند مراقبت‌های پیش و پس از تولد را بهبود دهد، به ویـژه بـرای نوزادان زودرس. اسکاتولاین، که از نوزادان بحرانی مراقبت می‌کند، می‌گوید: «مایع آمنیوتیک منبع غنی از داروهای بالقوه و مداخلات تغذیه‌ای است که می‌تواند برای نوزادان بسیار نارس استفاده شود تا رشد خارج از رحم آن‌ها تا حد امکان شبیه رشد درون رحم باشد.» این موضوع اهمیت دارد زیرا همان‌طور که لو توضیح می‌دهد، در حال حاضر این مراقبت‌ها عمدتاً حمایتی هستند. او می‌گوید: «اگر بتوانیم به والدین چیزی ارائه دهیم که برخی از نتایج منفی را کاهش دهد، هدف ما محقق شده است.» «این یافته‌ها می‌توانند یک پنجره تشخیصی برای سلامت بارداری فراهم کنند، به شرط آنکه پـژوهشگران نشانه های زیستی کلیدی را شناسایی کنند.» پتانسیل زیادی در این حوزه وجود دارد، اما تنها راه پی‌بردن به آن، تحقیق و بـررسی مستمر است.» با استفاده از مدل نخستی های غیرانسانی برای رفع محدودیت‌ها در مطالعه این بافت حیاتی، پژوهشگران انگیزه دارند تا دقیقاً همین مسیر را ادامه دهند.

منبع خبر:
https://www.the-scientist.com/amniotic-fluid-spills-its-secrets-in-fetal-development-73790

انجماد سریع سیگنال‌های مغزی، درک تازه ای از سیناپس‌ها ارائه می‌دهد.

نوشته شده توسط محمدحسین جعفری

تصویربرداری به روش Zap-and-freeze ، سیناپس‌ها را در حال عمل با وضوح بالا به تصویر می‌کشد و ممکن است به درک بهتر شرایطی مانند بیماری پارکینسون منجر شود.



وزیکول‌های سیناپسی به عنوان پیک‌های شیمیایی مغز عمل می‌کنند و انتقال‌دهنده‌های عصبی (neurotransmitters) را بین سلول‌ها جا به‌جا می‌کنند. هنگامی که یک پیام عصبی می رسد، این وزیکول‌ها با غشای نورون ترکیب شده و انتقال‌دهنده‌های عصبی خود را به شکاف سیناپسی فضای کوچک بین نورون‌ها آزاد می کنند. در اختلالات تخریب‌کننده عصبی، مانند بیماری پارکینسون، این فرآیند ممکن است دچار اختلال شود. این مسئله توجه شیگکی واتانابه (دانشگاه جانز هاپکینز) را جلب کرد و او را مجاب کرد تا از فناوری « Zap-and-freeze » برای مطالعه دقیق‌تر سیناپس استفاده کند. پیش از این، او از این رویکرد برای درک اینکه «چگونه یک پروتئین کلیدی، وزیکول‌ها را در سلول عصبی تا زمانی که آماده شدن برای آزادسازی، در جای خود نگه می دارد» استفاده کرده بود. در یک مطالعه جدید که در نشریه Neuron منتشر شده است، واتانابه و همکارانش نشان دادند که وزیکول‌های سیناپسی می‌توانند در هر دو مغز موش و انسان با سرعت بالایی بازیافت شوند، فرایندی که تا حدی به دلیل وجود پروتئینی به نام Dynamin 1xA وابسته است. این یافته‌ها درک عمیق‌تری از فعالیت غشای سیناپسی ارائه می‌دهند و ممکن است به پیشبرد درمان اختلالات شناختی کمک کنند. رویکرد Zap-and-freeze با وارد کردن یک ضربه الکتریکی برای تحریک نورون‌ها و سپس منجمد سازی سریع بافت‌ها عمل می‌کند تا حرکت سلول را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، با وضوح میلی‌ثانیه و نانومتر فراهم می‌سازد. برای تأیید این رویکرد در برش‌های مغزی، پژوهشگران ابتدا سیگنال‌دهی کلسیم فرآیندی که منجر به آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی می‌شود را در نمونه‌های موش بررسی کردند. با تحریک برش های مغزی، نحوه بازیافت وزیکول‌های سیناپسی مصرف شده توسط نورون‌ها به تصویر کشیده شد. این بازیافت از طریق آندوسیتوز (Endocyto-sis) رخ می‌دهد؛ فرآیندی که در آن وزیکول‌های جدید، پوشش‌دار یا بدون پوشش، پس از آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی شکل می‌گیرند و غشای سلولی در مجاورت ناحیه فعال (Active zone) به داخل نورون فرو می‌رود تا برای استفاده بعدی دوباره پر شود. رایج‌ترین شکل آندوسیتوز در سلول، آندوسیتوز وابسته به کلاترین (Clath-rin-mediated endocytosis) است؛ با این حال، این مسیر یک فرآیند بازیافت نسبتا آهسته به شمار می‌رود که در آن وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین درغشای پلاسمایی تجمع می‌یابند. نکته قابل توجه آن است که بازیافتی که پژوهشگران پس از یک تحریک واحد مشاهده کردند، بسیار سریع بود و شامل وزیکول‌های بدون پوشش می‌شد که در اطراف ناحیه فعال ظاهر شدند. از آنجا که بازیافت وزیکول‌های سیناپسی از طریق آندوسیتوز فوق سریع نیازی به کلاترین ندارد، پژوهشگران پروتئین‌های دخیل در این فرآیند را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها ذخایری از پروتئین Dynamin 1xA را شناسایی کردند که در

در امتداد غشایی قرار داشت که انتظار می‌رفت آندوسیتوز سریع در آن ناحیه رخ دهد. تیم تحقیقاتی برای بررسی اینکه آیا این ویژگی در انسان نیز حفظ شده است، این تکنیک را روی نمونه‌های بافت مغز افراد مبتلا به صرع به کار بـرد. آن‌ها برش‌های تحریک شده را با نمونه‌های تحریک نشده (کنترل) مقایسه کردند. مشابه نتایج به‌دست‌آمده در موش، بافت مغز انسان نیز همان مسیر بازیافت وزیکول سیناپسی را همراه با حضور دینامین 1x-A نشان داد. واتانابه قصد دارد ایـن روش را بـرای مطالعه پویایی وزیکول‌های سیناپسی در نمونه‌های بافت مغز بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون که تحت تحریک عمیق مغزی قرار می‌گیرند، گسترش دهد. واتانابه در بیانیه‌ای اظهار داشت: «امیدواریم این تکنیک جدید برای به تصویر کشیدن پویایی غشای سیناپسی در نمونه‌های بافت مغز زنده، به ما کمک کند تا شباهت‌ها و تفاوت‌ها میان اشکال ارثی و غیرارثی این بیماری را بهتر درک کنیم.»

منبع خبر:

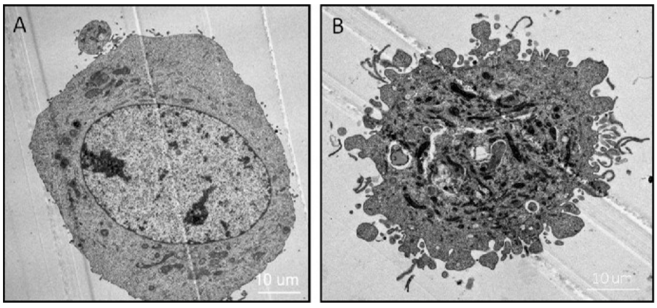
https://www.the-scientist.com/-fast-freezing-brain-signals-sheds-light-on-human-synapses-73778

روش‌های بررسی آپوپتوز در سلول‌های یوکاریوتی

اصول، تکنیک‌ها و کاربردهای پژوهشی

نوشته شده توسط نگار سادات نادمی - مریم جوان بخت و آناهیتا قاسمی پور

واژه‌ی آپــوپتوز (Apoptosis) ریشه‌ای یونانی دارد و از ترکیب دو واژه‌ی "apo" به معنای «جدا شدن» و "ptosis" به معنای «سقوط یا افتادن» گرفته شده است که در مجموع مفهوم «افتادن برگ از درخت» یا «جدا شدن طبیعی» را تداعی می‌کند. این واژه نخستین بار در ادبیات زیست‌شناسی نوین در سال 1972 توسط Kerr، Wyllie و Currie در مجله British Journal of Cancer بـرای توصیف نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده که با تغییرات مورفولوژیکی منظم همراه است، به کار رفت. اگرچه پدیده‌ی مرگ سلولی از دهه‌های قبل مورد توجه بود، مقاله‌ی Kerr و همکاران نقطه‌ی عطفی در درک نقش فیزیولوژیک این فرآیند محسوب می‌شود، زیرا آن را از نکروز (مرگ سلولی غیرقابل کنترل) متمایز ساخت. از آن زمان، مفهوم آپوپتوز به عنوان یک سازوکار زیستی بنیادین در رشد، همئوستاز و بیماری‌ها شناخته شده است و مطالعه‌ی آن به یکی از ارکان زیست‌شناسی سلولی مدرن تبدیل شده است. آپوپتوز نوعی مرگ کنترل شده‌ی سلولی است که بدن از آن برای حفظ تعادل بین سلول‌های جدید و سلول‌های پیر یا آسیب‌دیده استفاده می‌کند. این فرایند در بسیاری از عملکردهای حیاتی نقش دارد. از جمله بازسازی طبیعی بافت ها (مثل پوست و روده)، رشد جنین، تنظیم دستگاه ایمنی و حتی تحلیل بافت‌های وابسته به هورمون ها است. در سطح سلولی، آپوپتوز همانند تقسیم سلولی (میتوز) فرایندی دقیق و تنظیم‌شده است و توسط مجموعه‌ای از پروتئین‌های محافظت‌شده در طول تکامل کنترل می‌شود)مانند خانواده‌یBcl-2، کاسپازها و(p53 . هنگام وقوع آپوپتوز، سلول تغییرات مورفولوژیکی مشخصی از خود نشان می‌دهد، از جمله چروکیدن سلول، متراکم شدنDNA و در نهایت تجزیه شدن به قطعات کوچک بدون التهاب. در مقابل اپوپتوز، نکروز نوعی مرگ سلولی غیر فعال است که معمولا در اثر آسیب شدید فیزیکی یا شیمیایی رخ می‌دهد. در نکروز، غشای سلول پاره می‌شود و محتویات آن به فضای خارج سلولی نشت می‌کند که در نتیجه التهاب شدید در بافت ایجاد می‌شود. اتوفاژی یا خودخواری سلولی نیز مکانیسمی است که در آن سلول برای بقا در شرایط استرس، اجزای غیرضرروری یا آسیب دیده خود را در واکوئل های غشایی محصور و سپس در لیزوزوم ها تجزیه می‌کند اگر چه اتوفاژی در ابتدا یک مسیر محافظتی است در شرایط خاص می‌تواند به مرگ سلولی منجر شود پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که بین اتوفاژی و اپوتوز ارتباط متقابل و پیچیده ای وجود دارد و مسیرهای مولکولی مشترک نقش کلیدی در تنظیم این تعادل دارد. در نتیجه اپوپتوز بخشی از شبکه گسترده مرگ سلولی است ولی دارای ویژگی های منحصر به فرد است برای پژوهش های ازمایشگاهی تمایز این مسیر از یکدیگر مهم است .



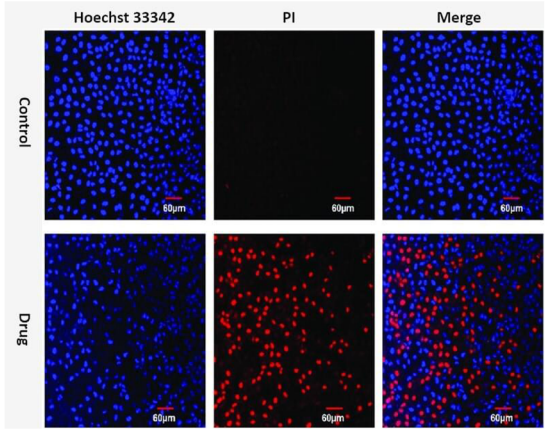
(تصویر۱) یک سلول در حال آپوپتوز

روش‌های مورفولوژیک شناسایی آپوپتوز
(Morphological Methods for Detection of Apoptosis)

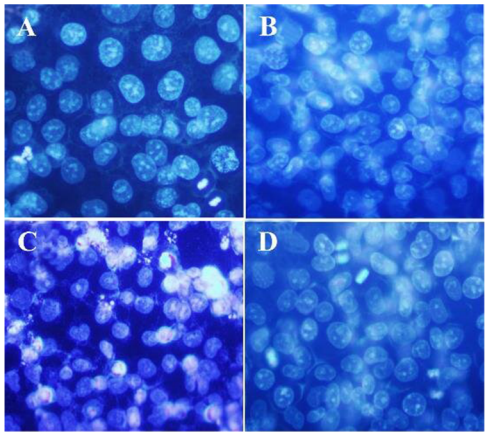
همانطور که پیشتر گفته شد آپوپتوز یک فرآیند مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی است که با تغییرات مشخص مورفولوژیکی همراه است. مشاهده‌ی این تغییرات یکی از نخستین و مستقیم‌ترین روش‌ها بـرای شناسایی سلول‌های در حال آپوپتوز محسوب می‌شود. بررسی این ویژگی‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، فلورسانس و الکترونی پایه‌ی روش‌های مورفولوژیک شناسایی آپوپتوز را تشکیل می دهد.

استفاده از میکروسکوپ نوری و فلورسانس برای تشخیص اپوپتوز

میکروسکوپ نوری، به‌ویژه در کنار رنگ‌آمیزی اختصاصیDNA، ابـزاری کلاسیک و مؤثر برای تشخیص اولیه‌ی آپوپتوز است. سلول‌های آپوپتوتیک معمولاً هسته‌های متراکم و حاشیه‌ای دارند که با رنگ آمیزی DNA به‌خوبی قابل مشاهده است. دو رنگ فلورسانسی متداول در این زمینه Hoechst 33342 و DAPI 4' ,6-diamidino-2-phenylindole هستند که هر دو به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شوند و امکان مشاهده‌ی فشردگی و قطعه‌قطعه شدن هسته را در میکروسکوپ فلورسانس فراهم می‌سازند. رنگ Hoechst به‌دلیل نفوذپذیری بالا برای سلول‌های زنده، امکان مشاهده‌ی سلول‌های در حال آپوپتوز بدون نیاز به فیکساسیون را فراهم می‌کند. در حالی کهDAPI بیشتر در سلول‌های فیکس‌شده به کار می‌رود. در هر دو حالت، سلول‌های آپوپتوتیک با فلوئورسانس قوی‌تر و هسته‌های شکسته‌شده قابل تشخیص هستند.

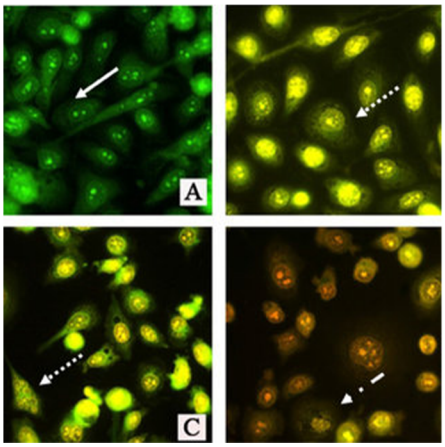


(تصویر ۲) نمونه‌ایی از یک مطالعه که در ان از رنگ Hoechst 33342 برای گروه‌های کنترل و تداوی شده استفاده شده.



(تصویر ۳) نمونه‌ایی از رنگ آمیزیDAPI در زیر میکروسکوپ فلورسانس

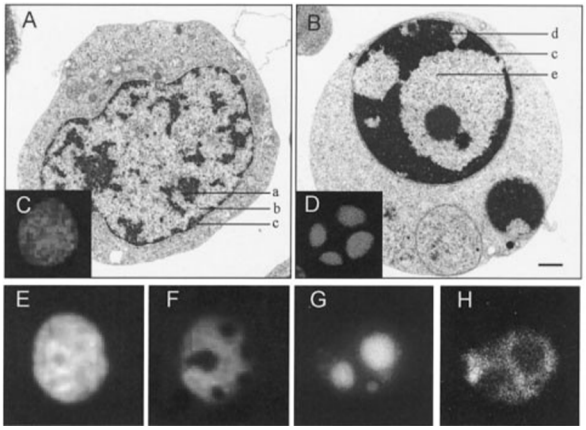
روش دیگر، استفاده از رنگ‌های دوگانه با(AO) Acridine Orange و(EtBr) Ethidium Bromide است. این رنگ‌ها بر اساس نفوذپذیری غشای سلولی عمل می‌کنند؛ AO به سلول‌های زنده و مرده نفوذ کرده و با اتصال به DNA و RNA نور سبز ساطع می‌کند، درحالی‌که EtBr تنها وارد سلول‌های با غشای آسیب دیده می‌شود و فلوئورسانس قرمز ایجاد می‌کند. به این ترتیب، سلول‌های زنده سبز، سلول‌های در حال آپوپتوز سبز-نارنجی با هسته‌های قطعه‌قطعه و سلول‌های نکروتیک قرمز مشاهده می‌شوند. این روش، به‌ویژه برای بررسی‌های سریع و نیمه‌کمی میزان آپوپتوز کاربرد دارد.



(تصویر ۴) مشاهده‌ی آپوپتوز سلولی با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه‌ی Acridine Orange (AO) و Ethidium Bromide (EtBr). سلول‌های زنده دارای هسته‌ی یکنواخت و فلورسانس سبز دیده می‌شوند، سلول‌های آپوپتوتیک با فشردگی و قطعه‌قطعه شدن هسته به رنگ سبز-نارنجی مشخص هستند و سلول‌های نکروتیک با فلوئورسانس قرمز در اثر نفوذ EtBr قابل تشخیص‌اند. این روش بر اساس نفوذپذیری غشای سلولی، امکان تمایز سریع مراحل مختلف مرگ سلولی را فراهم می‌کند.

میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM

میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopy; TEM) دقیق‌ترین ابزار برای مشاهده‌ی تغییرات ریزساختاری سلول‌های آپوپتوتیک به‌شمار می‌رود و به‌عنوان «استاندارد طلایی» در تشخیص قطعی مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی شناخته می‌شود. در تصاویر به‌دست‌آمده با TEM، سلول‌های آپوپتوتیک با ویژگی‌هایی چون چگالش کروماتین در مجاورت دیواره‌ی هسته، فشرده شدن DNA در نواحی حاشیه‌ای، کاهش حجم سیتوپلاسم، حفظ یکپارچگی غشای پلاسمایی و تشکیل اجسام آپوپتوتیک قابل شناسایی هستند. این اجسام کوچک حاوی بقایای هسته و سیتوپلاسم می‌باشند که در پایان فرآیند، بدون ایجاد واکنش التهابی، توسط ماکروفاژها فاگوسیتوز می‌شوند .در مقابل، میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy; SEM) بیشتر برای بررسی تغییرات سطحی سلول به‌کار می‌رود. با استفاده از SEM می‌توان مشاهده کرد که سلول‌های در حال آپوپتوز به تدریج شکل کروی پیدا کرده، میکروویلی‌های سطح خود را از دست می‌دهند و در مراحل نهایی به قطعات کوچکتر تقسیم می‌شوند. (10) ترکیب یافته‌های SEM با داده‌های ساختاری TEM، تصویری جامع و دقیق از دینامیک مورفولوژیکی مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی ارائه می‌دهد.



(تصویر ۵) تصاویر میکروسکوپ الکترونی (TEM و SEM) از سلول‌های آپـوپتوتیک؛ نشان‌دهنده‌ی چگالش کروماتین، حفظ غشای سلولی و تشکیل اجسام آپوپتوتیک در TEM، و بروز برآمدگی‌های غشایی (blebs) در سطح سلول در تصاویر SEM.

ویژگی‌های مورفولوژیک کلیدی آپوپتوز

در تمام این روش‌ها، چندین ویژگی به‌طور مداوم به‌عنوان شاخص‌های مورفولوژیک آپوپتوز گزارش می شوند:

- چگالش کروماتین (Chromatin condensation): یکی از اولین و بارزترین تغییرات؛ کروماتین به صورت توده‌های فشرده در نزدیکی غشای هسته دیده می‌شود .
- کوچک شدن سلول (Cell shrinkage):کاهش حجم سلول به‌دلیل خروج آب و فشرده‌شدن اجزای سیتوپلاسمی.
- تجزیه‌ی هسته (Nuclear fragmentation): شکست DNA به قطعات 180 تا 200 جفت‌بازی که با رنگ‌آمیزی فلورسانسی یا روش‌های ژل آگارز تأیید می‌شود .
- تشکیل اجسام آپوپتوتیک (Apoptotic bodies): قطعات کوچکی که از سلول جدا می‌شوند و حاوی اندامک‌ها و مواد ژنتیکی‌اند.
- حفظ غشای سلولی تا مراحل انتهایی: این ویژگی، آپوپتوز را از نکروز متمایز می‌کند و مانع از بروز التهاب می‌شود.

اگرچه روش‌های مورفولوژیک ابزار قدرتمندی برای شناسایی آپوپتوز هستند، اما به‌تنهایی نمی‌توانند نوع مرگ سلولی را به‌طور قطعی تعیین کنند، زیرا برخی از ویژگی‌های ساختاری ممکن است در سایر اشکال مرگ سلولی مانند نکروز برنامه‌ریزی‌شده (necroptosis) یا اتوفاژی نیز دیده شوند. بنابراین، معمولاً پیشنهاد می‌شود این روش‌ها با آزمون‌های بیوشیمیایی مانند TUNEL assay، Annexin V/PI staining یا بررسی فعالیت کاسپازها ترکیب شوند تا نتایج قطعی‌تر حاصل گردد. به‌طور کلی، روش‌های مورفولوژیک، نخستین گام در مطالعه‌ی مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی محسوب می‌شوند و با وجود توسعه‌ی روش‌های مولکولی، هنوز در پژوهش‌های سلولی و بافتی جایگاه مهمی دارند. ترکیب مشاهدات میکروسکوپی با داده‌های مولکولی می‌تواند تصویر کامل‌تری از دینامیک آپوپتوز ارائه دهد و به درک بهتر نقش آن در فیزیولوژی و پاتولوژی کمک کند.

روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (Biochemical and Molecular Methods)

اگرچه مشاهده‌ی تغییرات مورفولوژیک یکی از ساده‌ترین راه‌های شناسایی آپوپتوز است، اما این روش ها معمولاً نیاز به تأیید بیوشیمیایی و مولکولی دارند. در حقیقت، مرگ برنامه‌ریزی‌شده‌ی سلولی مجموعه‌ای از واکنش‌های آنزیمی و تغییرات بیوشیمیایی درون سلول است که منجر به فعال‌سازی مسیرهای خاص و تخریب کنترل‌شده‌ی ساختارهای حیاتی می‌شود. بنابراین، آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی با هدف شناسایی نشانه‌های مولکولی آپوپتوز از جمله فعال شدن کاسپازها، شکستDNA، برهم‌خوردن پتانسیل غشای میتوکندری و تغییر بیان ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی مرگ سلولی طراحی شده اند.

آزمون Annexin V/PI Staining (Flow Cytometry)

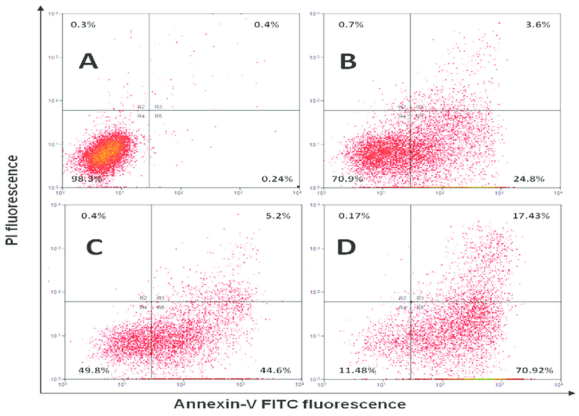
ایـن روش یکی از پایه‌ای‌ترین و پرکاربردترین آزمون‌ها برای شناسایی آپوپتوز در مراحل اولیه و نهایی است. در سلول‌های سالم، فسفاتیدیل‌سرین (Phosphatidylserine; PS) در لایه‌ی داخلی غشای پلاسمایی قرار دارد؛ اما در مراحل ابتدایی آپوپتوز، فسفاتیدیل‌سرین به سطح خارجی غشاء منتقل می شود. Annexin V، پـروتئینی با تمایل بالا به اتصال به فسفاتیدیل‌سرین، می‌تواند به این فسفولیپید متصل شود و در صورت کونژوگه شدن با رنگ فلورسانس مثل FITC یا APC، سلول‌های آپوپتوتیک را قابل شناسایی می‌سازد. برای تمایز بین سلول‌های در مراحل مختلف مرگ، از رنگ Propidium Iodide (PI) نیز استفاده می‌شود که تنها در سلول‌های دارای غشای آسیب‌دیده (آپوتوز انتهایی یا نکروز) نفوذ می‌کند.

در نتیجه:

-Annexin V-/PI: سلول‌های زنده

-Annexin V+/PI: سلول‌های آپوپتوتیک اولیه

+Annexin V+/PI: سلول‌های آپوپتوتیک نهایی یا نکروتیک

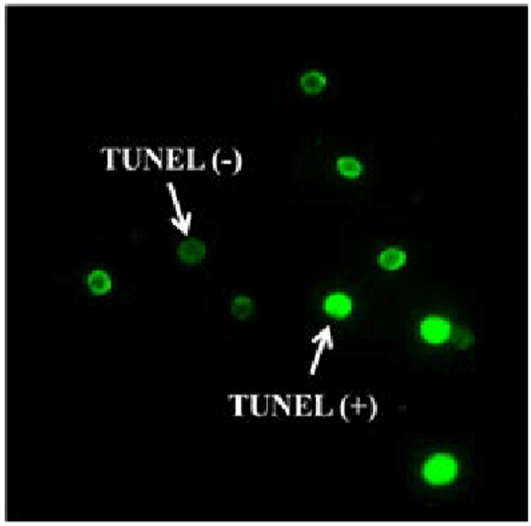


(تصویر ۶) نمونه ایی از آنالیز با روش تحلیل آپوپتوز با روش Annexin V/PI Staining توسط فلوسایتومتری؛

این آزمون با فلوسایتومتری آنالیز می‌شود و به‌صورت کمی درصد سلول‌های در هر مرحله را تعیین می کند. دقت بالا، سرعت زیاد و امکان ترکیب با نشانگرهای دیگر، این روش را به یکی از استانداردهای طلایی در مطالعات آپوپتوز تبدیل کرده است.

آزمون TUNEL Assay
(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling)

آزمون TUNEL یکی از روش‌های کلاسیک و دقیق برای شناسایی شکست DNA در سلول‌های آپوپتوتیک است. در طی آپوپتوز،DNA در نواحی بین‌نوکلئوزومی به قطعاتی با انتهای OH-3 شکسته می‌شود. در ایـن روش، آنزیم Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)، نوکلئوتیدهای فلورسانس یا بیـوتینیله‌شده را به این انتهای آزاد متصل می‌کند. سپس سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانس یا فلوسایتومتر بررسی می‌شوند. TUNEL به‌دلیل حساسیت بالا، در مطالعات هیستولوژیک و نمونه‌های بافتی (in situ) کاربرد فراوان دارد. البته باید توجه داشت که شکست DNA می‌تواند در سایر اشکال مرگ سلولی نیز رخ دهد، لذا بهتر است TUNEL همراه با آزمون‌های دیگر به کار رود تا از تفسیر اشتباه جلوگیری شود.

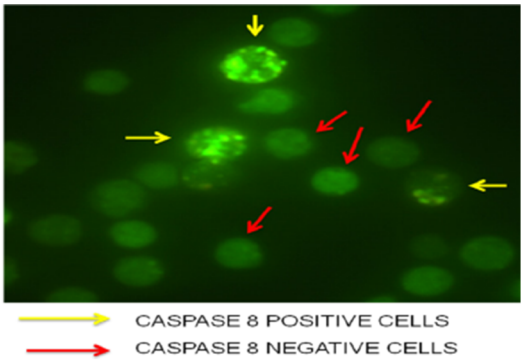


(تصویر ۷) نمونه ای از رنگ آمیزی با تست TUNEL

آزمون‌های فعالیت کاسپاز (Caspase Activity Assays)

کاسپازها (Caspases) خانواده‌ای از پروتئازهای سیستئین-آسپورات هستند که نقش مرکزی در القا و اجرای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپوپتوز) دارند. فعال‌شدن کاسپازهای آغازگر (مثل 8 و 9) و در ادامه کاسپازهای اجرایی (مثل 3 و 7) منجر به برش کنترل‌شده طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های سلولی و در نهایت، تجزیه منظم سلول می‌شود. به‌همین دلیل، اندازه‌گیری فعالیت کاسپازها یکی از رایج‌ترین و

حساس‌ترین روش‌ها برای ارزیابی آپوپتوز در مطالعات سرطان، سمّیت دارویی و زیست‌پزشکی است. تقریباً تمام آزمون‌های فعالیت کاسپاز بر یک اصل ساده استوارند: یک پپتید کوتاه (تتراپپتید) که توالی اختصاصی برای یک کاسپاز دارد مثلاً DEVD بـرای کاسپاز-7/3، IETD بـرای کاسپاز-8،LEHD بـرای کاسپاز-9، به‌صورت کووالانسی به یک «گزارشگر»(reporter) متصل می‌شود. تا زمانی که پیوند پپتیدی دست‌نخورده است، سیگنال گزارشگر خاموش یا در حد بسیار پایین است. با فعال شدن کاسپاز و برش این توالی، گزارشگر آزاد شده و سیگنال قابل‌تشخیص (جذب رنگی، فلورسانس یا لومینسانس) تولید می شود. شدت سیگنال متناسب با میزان فعالیت آن آنزیم در سلول یا لیزات است.



(تصویر ۸) گزارشگرهای کاسپاز در سلول

روش رنگ‌سنجی (Colorimetric Assays)

در این روش، سوبسترای اختصاصی هر کاسپاز (مانند DEVD برای Caspase-3) به مولکول رنگی p-nitroaniline (pNA) متصل می‌شود. کاسپاز فعال، این پیوند را می‌شکند و مولکول pNA آزاد می‌شود که در طول موج حدود 405 نانومتر جذب نوری دارد. میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectro-photometer) اندازه‌گیری می‌شود و افزایش آن بیانگر افزایش فعالیت کاسپاز است. این روش از ساده ترین و اقتصادی‌ترین روش‌هاست و نیازی به تجهیزات پیشرفته ندارد. با این حال، حساسیت آن پایین تر از روش‌های فلورومتری یا لومینومتری است، بنابراین به سلول‌های بیشتری نیاز دارد تا سیگنال قابل تشخیص تولید شود. از این روش می‌توان برای بررسی اثر داروهای القاکننده‌ی آپوپتوز، مانند استاوروسپورین (Staurosporine) یا دوکسوروبیسین (Doxorubicin) استفاده کرد. به‌عنوان مثال، افزایش جذب نوری پس از تیمار سلول‌ها با دارو، نشان‌دهنده‌ی فعال شدن Caspase-3 و آغاز فرآیند آپوپتوز است. با وجود سادگی، این روش فقط اطلاعات کلی درباره‌ی سطح آنزیم در نمونه می‌دهد و امکان اندازه‌گیری در سلول زنده را ندارد.

روش فلورومتری (Fluorometric Assays)

در این روش، از سوبسترای پپتیدی متصل به مولکول‌های فلورسانس مانند AFC (7-amino-4-trifluo-romethylcoumarin) یا AMC (7-amino-4-methylcoumarin) استفاده می‌شود. وقتی کاسپاز فعال، پیوند بین پپتید و رنگ را قطع می‌کند، مولکول فلورسانس آزاد می‌شود. این مولکول‌ها پس از تحریک نوری در طول‌موج‌های خاص (برای مثال، برانگیختگی 400 نانومتر و گسیل 505 نانومتر برای AFC)، نوری

منتشر می‌کنند که با دستگاه فلورومتر (Fluorometer) یا فلوسایتومتر (Flow Cytometer) قابل اندازه گیری است. ویژگی برجسته‌ی این روش، حساسیت بالا و امکان تشخیص مقادیر بسیار کم آنزیم است. افزون بر این، برخی از سوبستراهای فلورومتری می‌توانند از غشای سلول عبور کنند، بنابراین اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز در سلول زنده ممکن است. یکی از کاربردهای مهم این روش، بررسی دینامیک مرگ سلولی در زمان‌های مختلف (Time-course) است. مثلاً در سلول‌های تیمارشده با داروی ضدسرطان، سیگنال فلورسانس در ساعات اولیه کم و در ساعات بعدی به‌تدریج افزایش می‌یابد که نشانه‌ی فعال شدن تدریجی کاسپاز است. محدودیت این روش، نیاز به تجهیزات نوری دقیق و احتمال تداخل برخی مواد فلورسانس‌زا در محیط کشت است.

روش لومینومتری (Luminescent Assays)

در ایـن روش، که از مدرن‌ترین و حساس‌ترین روش‌هاست، از سوبسترای پپتیدی متصل به آمینولو سیفرین(Aminoluciferin) استفاده می‌شود. پس از برش سوبسترا توسط Caspase-3 یا Caspase-7، مولکول لوسیفرین آزاد می‌شود و در حضور آنزیم لوسیفراز (Luciferase) واکنش اکسیداسیون انجام می‌دهد که منجر به تولید نور می‌شود. میزان نور تولیدشده که با لومینومتر (Luminometer) اندازه گیری می‌شود، متناسب با مقدار آنزیم فعال در نمونه است. شدت نور معمولاً بر حسب واحدهای نسبی نور (Relative Light Units: RLU) گزارش می‌شود. کیت‌های تجاری مانند Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) از همین اصل استفاده می‌کنند و برای اندازه‌گیری سریع و دقیق آپوپتوز طراحی شده‌اند. مزیت بزرگ این روش، عدم نیاز به شست‌وشو یا سانتریفیوژ است؛ کافی است معرف را به سلول اضافه کرده و پس از چند دقیقه نور را بخوانید. این روش برای آزمایش‌های اسکرینینگ بالاگذر (High Throughput Screening; HTS) بسیار مناسب است و می‌تواند در پلیت‌های 96 یا 384 خانه‌ای استفاده شود. محدودیت آن هزینه‌ی نسبتاً بالا و حساسیت به زمان قرائت است، زیرا سیگنال نوری ممکن است پس از مدتی کاهش یابد.

روش‌های زنده و تصویربرداری بلادرنگ (Live-Cell and Real-Time Imaging Assays)

در این روش‌ها، از پروب‌های فلورسانس ویژه یا ژن‌های گزارشگر (Reporter Genes) استفاده می‌شود که مستقیماً در سلول زنده بیان یا وارد می‌شوند. این پروب‌ها معمولاً شامل یک توالی پپتیدی حساس به کاسپاز مانند DEVD هستند که بین دو مولکول فلورسانس قرار دارد. تا زمانی که پیوند پپتید سالم است، انتقال انرژی بین این دو مولکول رخ می‌دهد (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). وقتی کاسپاز فعال شود، پیوند بریده می‌شود و سیگنال FRET از بیـن می‌رود. این تغییر با میکروسکوپ فلورسانس یا سیستم تصویربرداری زنده (Live Imaging System) قابل مشاهده است. این روش امکان مشاهده‌ی فعال‌شدن کاسپاز در زمان واقعی و حتی در تک‌سلول را فراهم می‌کند. مثلاً پـژوهشگران می‌توانند ببینند که چه زمانی هر سلول وارد مسیر مرگ می‌شود و تفاوت‌های پاسخ بین سلول‌ها را بررسی کنند. پروب‌های تجاری مانند CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent مثال خوبی از این دسته هستند. اگرچه این روش اطلاعات بسیار دقیقی درباره‌ی زمان‌بندی آپوپتوز می‌دهد، اما هزینه‌ی بالا و نیاز به تجهیزات تخصصی از محدودیت‌های این روش محسوب می شود.

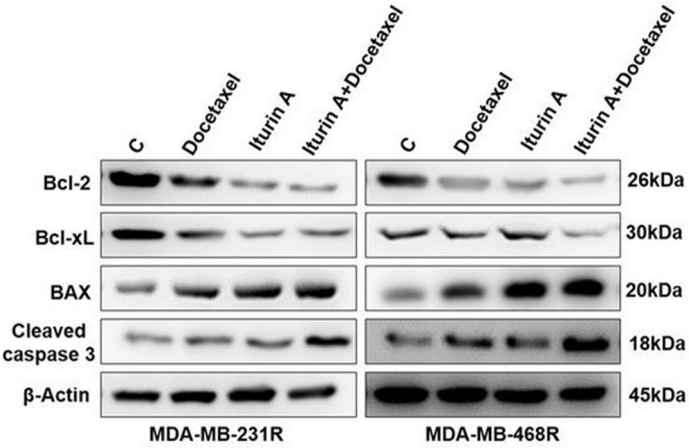
روش‌های مبتنی بر فلوسایتومتری (Flow Cytometric Caspase Assays)

در ایــن روش، از رنگ‌های فلورسانس متصل به مهارکننده‌های کاسپاز استفاده می‌شود، مانند FLICA (Fluorochrome-Labeled Inhibitor of Caspases) که به صورت اختصاصی به کاسپاز فعال متصل می‌شود. به‌طور مثال، ترکیب FAM-DEVD-FMK برای Caspase-3 و Caspase-7 استفاده می‌شود.

ایــن ترکیب وارد سلول زنده می‌شود و در صورت وجود کاسپاز فعال، به آن متصل می‌گردد. پس از شست‌وشوی سلول‌ها برای حذف رنگ آزاد، سلول‌های مثبت با دستگاه فلوسایتومتر شناسایی می شوند.

روش Western Blot

Western blot یکی از روش‌های کلاسیک و دقیق برای بررسی میزان بیان پروتئین‌ها در سلول‌هاست. در این روش، ابتدا سلول‌ها لیز (شکسته) می‌شوند تا پروتئین‌ها آزاد شوند. سپس پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-PAGE بــر اساس وزن مولکولی جدا می‌شوند. پس از آن به یک غشاء (مانند PVDF یا نیتروسلولز) منتقل شده و با آنتی‌بادی‌های اختصاصی شناسایی می‌شوند. در مطالعات آپوپتوز، آنتی‌بادی‌هایی علیه پروتئین‌های کلیدی مانند BCL-2، BAX، Caspase-9، Caspase-3 وp53 استفاده می‌شود. فعال شدن Caspase-3 معمولاً با مشاهده‌ی باند مربوط به فرم «بریده‌شده»(-cleaved form) تأیید می‌شود. افزایش نسبتBAX/BCL-2 نیز نشان‌دهنده‌ی تمایل سلول به آپوپتوز است، زیرا BAX مسیر مرگ را فعال و BCL-2 آن را مهار می‌کند. از مزایای روش Western blot می‌توان به ویژگی بالا (high specificity) و امکان تشخیص تغییرات پس‌تعدیلی (post-translational modifi-cations) مانند فسفریلاسیون اشاره کرد. با این حال، محدودیت آن در زمان‌بر بودن و نیاز به نمونه نسبتاً زیاد از پروتئین است.



(تصویر۹) نمونه ایی از انالیز پروتین های مرتبط با اپوپتوز

روش qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

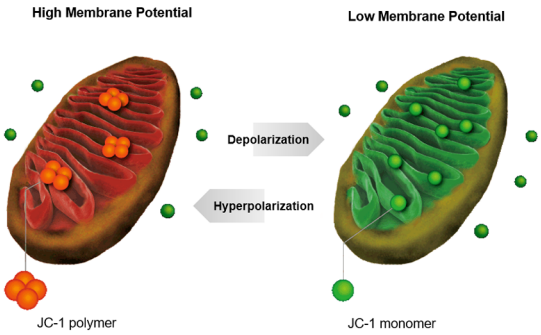
qPCR یا Real-Time PCR یکی از دقیق‌ترین روش‌ها برای سنجش بیان ژن‌ها در سطح RNA است. در ایـن روش، ابتدا RNA سلول‌ها استخراج و به cDNA تبدیل می‌شود. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر انجام می‌شود و میزان تکثیر به‌صورت زنده با رنگ‌های فلورسانس مانند SYBR Green یا پروب‌هایTaqMan اندازه‌گیری می‌شود. در مطالعات آپوپتوز، ژن‌های BAX، CASP9، CASP3، P53، BCL-2 و FAS اغلب هدف بررسی هستند. افزایش بیان P53، BAX و Caspaseها همراه با کاهش بیان BCL-2 معمولاً نشان‌دهنده‌ی فعال شدن مسیر آپوپتوز است. برای صحت نتایج، بیان ژن‌های هدف با یک ژن مرجع پایدار (مانند GAPD یا ACTB) نرمال‌سازی می‌شود. سپس داده‌ها با روش 2^(-ΔΔCt) تحلیل می‌گردند تا تغییرات نسبی بیان ژن‌ها بین نمونه‌ها محاسبه شود. ترکیب داده‌های qPCR و Western blot تصویری کامل از وضعیت آپوپتوز به‌دست می‌دهد؛ چراکه qPCR سطح بیان ژنی(mRNA) را نشان می‌دهد، درحالی‌که Western blot وضعیت نهایی پروتئین و فرم فعال آن را تأیید می‌کند. اگر در آزمایش‌ها افزایش بیان BAX و Caspase-3 و در مقابل کاهش BCL-2 مشاهده شود، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌ها وارد مسیر آپوپتوز میتوکندریایی شده اند. همچنین افزایش سطح P53 معمولاً نشانه‌ی پاسخ به آسیب DNA و آغاز آپوپتوز است. در مقابل، در سلول‌های مقاوم به دارو، کاهش بیان Caspase-3 و افزایش BCL-2 دیده می‌شود. این تغییرات مولکولی در کنار آزمایش‌های عملکردی مثل JC-1 و Annexin-V/PI شواهد محکمی از مرگ سلولی فراهم می‌آورند.

سنجش پتانسیل غشای میتوکندری (Mitochondrial Membrane Potential Assays)

یکی از اولین تغییرات در مسیر آپوپتوز، از دست رفتن پتانسیل غشای میتوکندری (ΔΨm) است. میتوکندری‌ها در حالت طبیعی دارای اختلاف ولتاژ منفی درون غشاء هستند که برای تولید ATP حیاتی است. در آغاز آپوپتوز، نفوذپذیری غشاء میتوکندری افزایش می‌یابد، ΔΨm کاهش پیدا می‌کند و در نتیجه سیگنال اولیه‌ی مرگ سلولی فعال می‌شود. برای ارزیابی این تغییر، از رنگ‌های حساس به پتانسیل مانندJC-1 وTMRE استفاده می‌شود که در پاسخ به تغییرات ولتاژ، ویژگی فلورسانس متفاوتی نشان می‌دهند.

JC-1 Assay

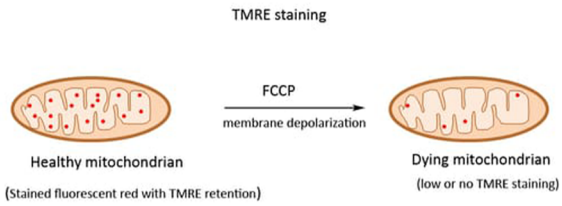
JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) یک رنگ فلورسانس دوحالتی است که به‌صورت انتخابی در میتوکندری تجمع می‌یابد. در سلول‌های سالم که پتانسیل غشایی بالا دارند، مولکول‌های JC-1 درون میتوکندری تجمع کرده و «ساختارهای تجمعی» (J-aggregates) تشکیل می‌دهند که نور قرمز (در حدود 590 نانومتر) ساطع می‌کند. در سلول‌های آپـوپتوتیک که پتانسیل غشاء از بین رفته است، JC-1 در حالت تک‌مولکولی (monomeric) باقی می ماند و نور سبز (حدود 530 نانومتر) تابش می‌کند. بنابراین، نسبت فلورسانس قرمز به سبز شاخصی از سلامت میتوکندری است. اندازه‌گیری می‌تواند با میکروسکوپ فلورسانس یا فلوسایتومتر انجام شود. کاهش نسبت قرمز/سبز نشانه‌ی از بین رفتن ΔΨm و شروع آپوپتوز است. این روش معمولاً همراه با رنگ‌آمیزیDAPI یا Annexin-V برای تأیید مراحل مختلف مرگ سلولی به کار می‌رود.



(تصویر ۱۰) نمایش شماتیک عملکرد رنگ JC-1 در سنجش پتانسیل غشای میتوکندری؛ در میتوکندری‌های سالم با پتانسیل بالا، JC-1 به‌صورت تجمعی (polymer) و با فلوئورسانس قرمز دیده می‌شود، در حالی‌که در سلول‌های آپوپتوتیک با پتانسیل پایین، رنگ به‌صورت مونومر سبز باقی می‌ماند.

TMRE Assay

TMRE (Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester) یک رنگ کاتیونی نفوذپذیر غشایی است که در میتوکندری‌های دارای پتانسیل منفی تجمع می‌یابد و نور قرمز-نارنجی منتشر می‌کند. برخلاف JC-1 که دو طیف فلورسانس دارد، TMRE فقط در یک طول‌موج خاص تابش می‌کند و شدت سیگنال آن مستقیماً با میزان پتانسیل غشایی مرتبط است. مزیت TMRE نسبت به JC-1، پایداری بیشتر و سادگی تفسیر داده‌ها است، زیرا فقط کاهش شدت فلورسانس نشان‌دهنده از دست رفتن $\Delta\Psi m$ است. این روش بـرای آزمایش‌های تک‌زمانی (end-point) و بلادرنگ (real-time) هر دو قابل استفاده است. در بسیاری از مطالعات، کاهش سیگنال TMRE همراه با افزایش بیان BAX و فعال شدن Caspase-9 به عنوان نشانه‌ی مسیر آپوپتوز میتوکندریایی گزارش شده است.



(تصویر ۱۱) نمایش شماتیک رنگ‌آمیزی TMRE برای ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری؛ در میتوکندری‌های سالم، رنگ TMRE به‌دلیل پتانسیل منفی بالا درون ماتریکس تجمع یافته و فلوئورسانس قرمز ایجاد می‌کند، در حالی‌که در میتوکندری‌های دچار دپلاریزاسیون (مانند سلول‌های در حال مرگ)، تجمع TMRE کاهش یافته و سیگنال فلورسانس ضعیف یا غایب است.

کاهش پتانسیل غشای میتوکندری یکی از اولین رویدادهای آپوپتوز است، در حالی که فعال شدن کاسپازها و تغییر بیان ژن‌ها در مراحل بعدی رخ می‌دهد. بنابراین، ترکیب آزمون‌های JC-1 یا TMRE با روش‌های مولکولی مانند qPCR و Western blot تصویری کامل از زمان‌بندی و شدت فرآیند آپوپتوز ارائه می‌دهد. به‌طور معمول، در سلول‌هایی که آپوپتوز آغاز شده است، ابتدا کاهش ΔΨm مشاهده می شود، سپس افزایش بیانBAX، کاهش BCL-2 و در نهایت فعال شدن Caspase-3 و Caspase-9 رخ می‌دهد.

ترکیب روش‌ها و چشم‌اندازهای نوین در مطالعه آپوپتوز (Integrative and Emerging Approaches)

در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های چشمگیری در فناوری‌های زیست‌تحلیلی و تصویربرداری، دیدگاه جدیدی در مطالعه آپوپتوز فراهم کرده است. آپوپتوز پدیده‌ای چندمرحله‌ای و پیچیده است که شامل تغییرات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و ژنتیکی می‌باشد؛ بنابراین، استفاده از یک آزمون منفرد معمولاً نمی تواند تمام جنبه‌های این فرآیند را نشان دهد. به همین دلیل، رویکردهای ترکیبی و چندآزمونی (multi-assay approaches) و همچنین روش‌های مبتنی بر تصویربرداری و فناوری‌های اُمیک (Omics) به عنوان چشم‌اندازهای جدید برای بررسی جامع آپوپتوز مطرح شده‌اند.

ترکیب چند آزمون برای افزایش دقت (Multi-assay Combination)

استفاده از چندین آزمون مکمل به‌صورت هم‌زمان یکی از مؤثرترین راهکارها برای افزایش دقت و اطمینان در شناسایی آپوپتوز است. هر آزمون فقط بخشی از فرآیند مرگ سلولی را پوشش می‌دهد:

- Annexin V/PI assay تغییرات در غشای پلاسمایی را نشان می‌دهد (مرحله‌ی ابتدایی آپوپتوز).
- Caspase-3 activity assay فعال شدن آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی پروتئین را مشخص می‌کند (مرحله‌ی میانی).
- TUNEL assay شکستگی DNA را آشکار می‌سازد (مرحله‌ی نهایی).

ترکیب این آزمون‌ها در یک طراحی واحد باعث می‌شود تا پژوهشگر بتواند مراحل مختلف آپوپتوز را از آغاز تا انتها دنبال کند. برای مثال، در مطالعات ضدسرطان، سلول‌های تیمارشده ابتدا با Annexin V مثبت و Caspase-3 فعال شناسایی می‌شوند و در مراحل بعدی با آزمون TUNEL، تخریب DNA آن‌ها تأیید می‌گردد.

به‌این‌ترتیب، احتمال اشتباه در تشخیص آپوپتوز از سایر اشکال مرگ سلولی مانند نکروز (Necrosis) یا اتوفاژی (Autophagy) به حداقل می‌رسد.

تصویربرداری زنده سلولی (Live-Cell Imaging)

یکی از نوآوری‌های مهم در زیست‌شناسی سلولی، استفاده از تکنیک‌های تصویربرداری زنده Live-cell imaging است که امکان مشاهده‌ی آپوپتوز در زمان واقعی (real time) را فراهم می‌کند. در این روش ها از پروب‌ها و نشانگرهای فلورسانس استفاده می‌شود که به اجزای کلیدی آپوپتوز مانند Caspase-3، ΔΨm پتانسیل غشای میتوکندری یا فسفاتیدیل‌سرین (Phosphatidylserine) متصل می‌شوند. به عنوان مثال، رنگ‌های Caspase-3/7 Green یا CellEvent™ و Annexin V-Alexa Fluor برای بررسی آپوپتوز در سلول زنده کاربرد دارند. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس یا سیستم‌های تصویربرداری

تایم‌لپس پژوهشگر می‌تواند مشاهده کند چه زمانی هر سلول وارد مسیر مرگ می‌شود و چگونه مورفولوژی آن تغییر می‌کند. این روش به‌ویژه برای بررسی اثر داروها، سموم و فاکتورهای محیطی در بازه‌های زمانی طولانی بسیار مفید است، زیرا نیاز به فیکس‌کردن یا رنگ‌آمیزی پایانی ندارد و سلول‌ها زنده باقی می‌مانند. ترکیب داده‌های زنده تصویربرداری با نتایج qPCR یا Western blot، تصویر دقیقی از تعاملات دینامیک میان بیان ژن، فعالیت آنزیمی و تغییرات عملکردی فراهم می‌کند.

غربالگری محتوای بالا (High-Content Screening; HCS)

High-content screening (HCS) یا غربالگری با محتوای بالا یکی از فناوری‌های پیشرفته در مطالعات دارویی و کشف ترکیبات ضدسرطان است. در این سیستم‌ها، سلول‌ها در پلیت‌های میکروتیتر (مانند 96 یا 384 خانه‌ای) کشت داده می‌شوند و به‌طور خودکار توسط دوربین‌های فلورسانس تصویربرداری می‌شوند. نرم‌افزارهای تحلیلی، پارامترهایی مانند شکل هسته، تراکم کروماتین، توزیع میتوکندری و فعالیت کاسپاز را به‌صورت هم‌زمان تحلیل می‌کنند. HCSترکیبی از روش‌های تصویربرداری و تحلیل داده‌های کمی است که به پژوهشگر اجازه می‌دهد تا هزاران ترکیب شیمیایی را برای بررسی القای آپوپتوز در زمان کوتاه بررسی کند. برای مثال، در غربالگری داروهای ضدسرطان، سلول‌هایی که به‌طور هم‌زمان سیگنال‌های Caspase-3 فعال و کاهش $\Delta\Psi m$ نشان می‌دهند، به‌عنوان سلول‌های در حال آپوپتوز شناسایی می‌شوند. این روش نه تنها در پژوهش‌های پایه، بلکه در توسعه‌ی داروهای شخصی سازی‌شده (Personalized Medicine) نیز کاربرد دارد، زیرا می‌تواند پاسخ دارویی سلول‌های بیمار را در سطح تک‌سلولی ارزیابی کند.

رویکردهای اُمیک (Omics-based Approaches)

پیشرفت فناوری‌های زیست‌شناسی مولکولی، امکان بررسی آپوپتوز را در سطح شبکه‌های مولکولی فراهم کرده است. رویکردهای اُمیک شامل مجموعه‌ای از فناوری‌هاست که بیان ژن‌ها، پروتئین‌ها و مسیرهای متابولیکی را در مقیاس کلان بررسی می‌کنند. مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از:

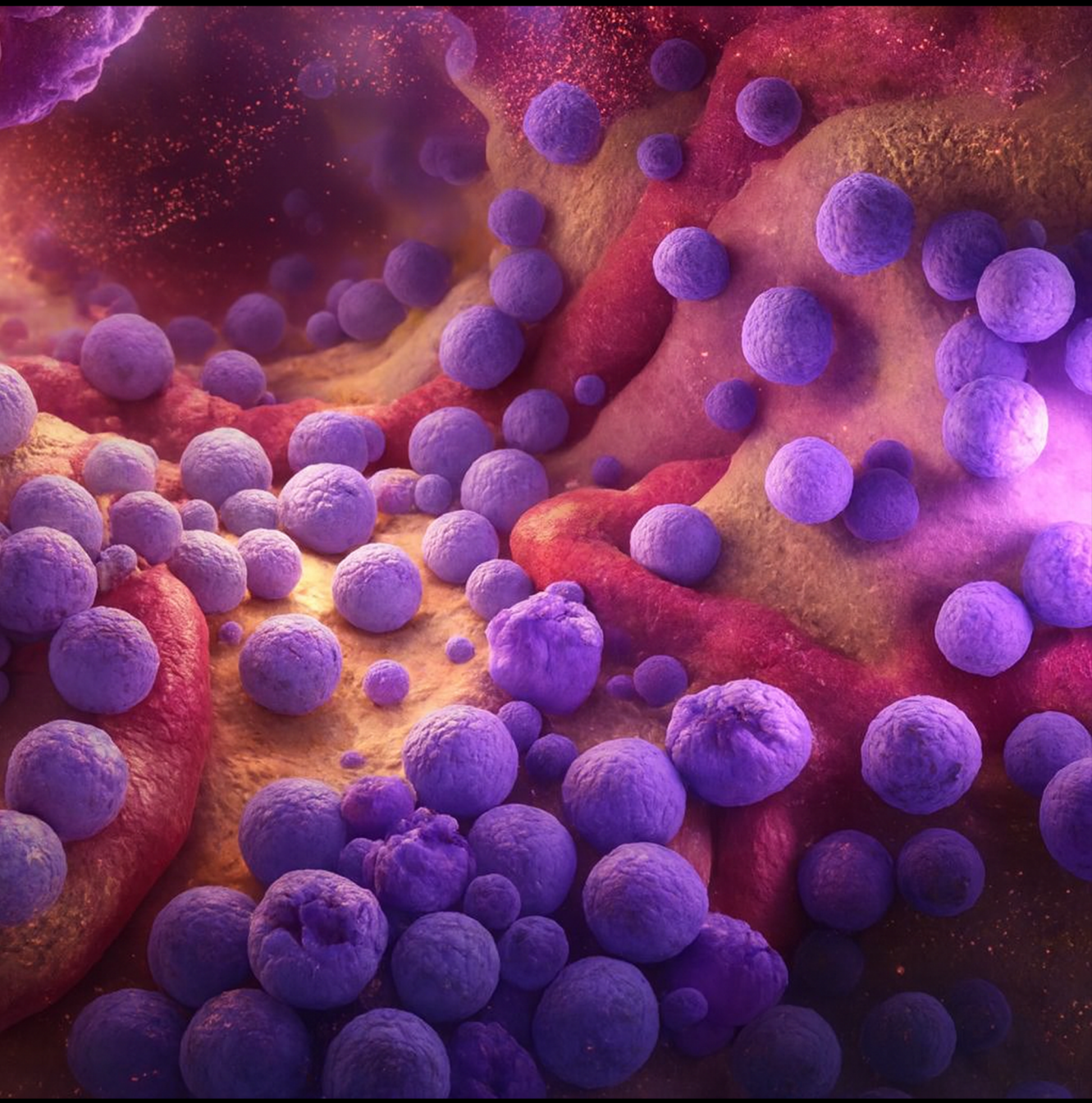
- ترنسکریپتومیکس: بررسی الگوهای بیان RNA در سلول‌های زنده. با استفاده از RNA-seq یا mi-croarray می‌توان ژن‌های فعال در مسیرهای مرگ سلولی را شناسایی کرد.
- پروتئومیکس: تحلیل کل پروتئین‌های سلول با استفاده از LC-MS/MS برای شناسایی پروتئین‌های جدید مرتبط با آپوپتوز.
- متابولومیکس: بررسی تغییرات در متابولیت‌ها و مسیرهای انرژی در سلول‌های در حال آپوپتوز.

ایــن رویکردها باعث شناسایی مسیرهای جدیدی از آپوپتوز شده‌اند که فراتر از مسیرهای کلاسیک میتوکندریایی یا گیرنده‌های مرگ (Death Receptors) هستند؛ مانند مسیرهای مرتبط با ER-stress، necroptosis، ferroptosis و autophagy-dependent apoptosis. ادغام داده‌های اُمیک با روش‌های کلاسیک مانند Caspase assay، Western blot و JC-1 تصویری جامع از تنظیم مولکولی و عملکردی مرگ سلولی ایجاد می‌کند و مسیرهای جدیدی را برای درمان سرطان و بیماری‌های دژنراتیو آشکار می سازد.

در مجموع، آپوپتوز به‌عنوان یک مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده و تنظیم‌شده، بخش جدایی‌ناپذیری از فیزیولوژی و پاتولوژی بدن به شمار می‌رود و تمایز آن از سایر اشکال مرگ سلولی، از جمله نکروز و اتوفاژی، برای تفسیر صحیح نتایج آزمایشگاهی ضروری است. روش‌های مورفولوژیک رنگ‌آمیزی‌های فلورسانسی و میکروسکوپ الکترونی عبوری و روبشی (TEM، SEM) با نمایش تغییراتی مانند چگالش کروماتین، تکه‌تکه شدن هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک، تصویری اولیه و کیفی از مرگ برنامه‌ریزی شده ارائه می‌دهند. در حالی‌که روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی نظیرAnnexin V/PI، TUNEL، سنجش فعالیت کاسپازها، Western blot و qPCR، شواهد کمی و اختصاصی‌تری از فعال‌شدن مسیرهای مولکولی آپوپتوز فراهم می‌کنند. در این میان، سنجش پتانسیل غشای میتوکندری با JC-1 و TMRE جایگاه ویژه‌ای دارد، زیرا یکی از نخستین رویدادهای مسیر میتوکندریایی را ثبت می‌کند. با این حال، هیچ‌یک از این روش‌ها به‌تنهایی کافی نیست و رویکردهای ترکیبی و نوین مانند تصویربرداری زنده سلولی، High-content screening و تحلیل‌های اُمیکی (ترنسکریپتومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکس)، افق‌های جدیدی برای درک شبکه‌ای و چندلایه‌ی مرگ سلولی گشوده‌اند. بنابراین، ادغام مشاهدات مورفولوژیک با داده‌های بیوشیمیایی، ژنتیکی و اُمیکی، نه‌تنها دقت تشخیص آپوپتوز را افزایش می‌دهد، بلکه می‌تواند به شناسایی اهداف درمانی جدید در سرطان و سایر بیماری‌های وابسته به اختلال در مرگ سلولی منجر شود.

منابع:

1. Kerr JFR, 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. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337.
3. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4.
4. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods. 1995;184(1):39-51. doi:10.1016/0022-1759(95)00072-I.
5. 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. doi:10.1083/jcb.119.3.493.
6. Kasibhatla S, Amarante-Mendes GP, Finucane D, Brunner T, Bossy-Wetzel E, Green DR. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. CSH Protoc. 2006;2006(3):pdb.prot4493. doi:10.1101/pdb.prot4493.
7. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry. 1997;27(1):1-20.
8. Gurtu V, Kain SR, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. Anal Biochem. 1997;251(1):98-102.
9. Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. Exp Cell Res. 2000;259(2):308-13.
10. Smolewski P, Bedner E, Du L, Hsieh TC, Wu JM, Darzynkiewicz Z. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: multiparameter analysis by laser scanning cytometry. Cytometry. 2001;44(1):73-82.
11. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. Cytometry A. 2011;79(6):405-25.
12. Scaduto RC Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent dyes. Biophys J. 1999;76(1 Pt 1):469-77.
13. Zock JM. Applications of high content screening (HCS) in life science research. Comb Chem High Throughput Screen. 2009;12(9):870-82.
14. Giuliano KA, DeBiasio RL, Dunlay RT, et al. High-content screening: a new approach to easing key bottlenecks in the drug discovery process. J Biomol Screen. 1997;2(4):249-59.
15. Abraham VC, Taylor DL, Haskins JR. High content screening applied to large-scale cell biology. Trends Biotechnol. 2004;22(1):15-22.
16. Arntzen MØ, Thiede B. ApoptoProteomics, an integrated database for analysis of proteomics data obtained from apoptotic cells. Mol Cell Proteomics. 2012;11(2):M111.010447. doi:10.1074/mcp.M111.010447.
17. Vinik Y, Lev S. A snapshot into the transcriptomic landscape of apoptosis and ferroptosis in cancer. Cell Death Dis. 2024;15:371.
18. Wang J, Wang Y, Wang H, et al. High content screening for drug discovery from traditional Chinese medicine. Chin Med. 2019;14:5.
19. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: a target for anticancer therapy. Int J Mol Sci. 2018;19(2):448



پـل هـای ارتباطـی :

Zhivarpr@gmail.com | Shahedbiology