# تاثیر میدان مغناطیسی ایستا بر القای آپوپتوزیس و تغییر در چرخه سلولی T-لنفوبلاست‌ها

**محمدرضا احمدیان‌پور PhD**
گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
**پرویز عبدالمالکی* PhD**
گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
**سید جواد مولا PhD**
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
**سامان حسینخانی PhD**
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

## چکیده

**اهداف:** آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول، فرآیند فیزیولوژیک سلولی است که منجر به نمو فعال و طبیعی و همچنین حفظ هوموستازی بافتی می‌شود. آپوپتوزیس تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی رخ می‌دهد. این مطالعه به‌منظور یافتن راهی کم‌خطر برای القای آپوپتوزیس در سلول‌های T-لنفوبلاست انسانی به بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا بر القای آپوپتوزیس پرداخت.

**روش‌ها:** در این پژوهش آزمایشگاهی، دودمان سلولی T-لنفوبلاست‌های انسانی کشت‌داده‌شده (E6.1 یورکَت)، به‌مدت ۶ و ۲۴ ساعت تحت تاثیر میدان مغناطیسی ایستای ۶میلی‌تسلا قرار گرفتند. از لومینومتری برای سنجش میزان کل آپوپتوزیس، فلوسایتومتری برای سنجش میزان آپوپتوزیس اولیه و وسترن‌بلات برای سنجش میزان پروتئین‌های فسفریله ATM و E2F1 استفاده شد.

**یافته‌ها:** افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های تیمارشده نسبت به سلول‌های کنترل، ۳۶ ساعت بعد از تیمار با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا به‌مدت ۶ ($p=۰/۰۱۱$) و ۲۴ ساعت ($p=۰/۰۵۵$) معنی‌داری بود. ۳۶ ساعت بعد از تابش‌دهی سلول‌ها با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا، اولین تفاوت قابل ملاحظه بین سلول‌های تابش‌دیده و کنترل مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$). ۲۴ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا، میزان جمعیت سلول‌ها در فازهای S و $G_2$ کاهش و ۳۶ ساعت بعد از تیمار، جمعیت این دو فاز رو به افزایش گذاشت و جمعیت سلولی فاز $G_1$ کاهش یافت. تیمار با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا، باعث افزایش مقدار پروتئین فسفریله ATM در ناحیه سرین ۱۹۸۱ و پروتئین فسفریله E2F1 در ناحیه سرین ۳۱ شد.

**نتیجه‌گیری:** میدان مغناطیسی ایستای ۶میلی‌تسلا با افزایش و فعال‌سازی پروتئین‌های ATM و E2F1 در سلول‌های تیمارشده، باعث القای آپوپتوزیس در آنها می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** آپوپتوزیس، لومینسانس، میدان مغناطیسی ایستا، فلوسایتومتری، سلول یورکَت

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۹
* نویسنده مسئول: parviz@modares.ac.ir

## مقدمه

آپوپتوزیس همانند تکثیر و تمایز، بخشی از فیزیولوژی سلول است و در رشد طبیعی سلول‌ها و بافت‌ها و جلوگیری از بیماری‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند [۱]. هنگامی‌که سلول تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی یا حتی درونی، مانند پرتوهای یونیزان، داروهای سایتوتوکسیک، هایپرترمیا، هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی و برخی باکتری‌های پاتوژن داخل سلولی قرار می‌گیرد، محتویات آن از جمله مولکول‌های DNA، دستخوش تغییراتی می‌شوند که در صورت ادامه حیات، می‌تواند منجر به ناهنجاری‌هایی شدید، مانند سرطانی‌شدن گردد. فرآیند آپوپتوزیس سیستم دفاعی مهمی در برابر سرطان است. اختلال در آپوپتوزیس منجر به بیماری‌های مختلفی از قبیل خودایمنی، سرطان، مقاومت تومور به دارو و ایدز می‌گردد [۲]. برای بررسی آپوپتوزیس، می‌توان از روش‌های مختلفی از جمله بررسی سایتوتوکسیسیتی، تغییرات مورفولوژی سلول، الگوی نردبانی DNA، روش TUNEL، فلوسایتومتری و لومینومتری استفاده کرد. در روش‌های بررسی آپوپتوزیس، انتخاب روش به سیستم سلولی، ماهیت ماده القاکننده آپوپتوزیس، اطلاعات مورد نظر و محدودیت‌های تکنیکی بستگی دارد [۲].

آپوپتوزیس خودبه‌خودی یا القایی، می‌تواند تحت تاثیر میدان‌های مغناطیسی قرار گیرد [۳]. میزان این تاثیر بستگی به نوع سلول، شدت میدان، مدت تابش میدان، میزان نفوذپذیری بافت ها و سایر شرایط آزمایشگاهی دارد [۵-۳]. مطالعاتی که تاکنون انجام شده، نتایج ضد و نقیضی داشته و پاسخ دقیقی در مورد اثر میدان مغناطیسی نمی‌دهد. یون کلسیم که نقش واسطه را برای پیام‌رسانی در درون سلول به عهده دارد، در ایجاد آپوپتوزیس نقش مهمی ایفا می‌کند [۶]. احتمالاً میدان‌های مغناطیسی با ایجاد چرخش در فسفولیپیدها و توزیع پروتئین‌های غشا، ویژگی‌های دیامغناطیسی غشای پلاسمایی را تحت تأثیر قرار داده و از این طریق، موجب تغییر در عمل کانال‌های دریچه‌دار غشا، به‌ویژه کانال یون کلسیم می‌شوند [۴، ۷، ۸]. همچنین، غلظت یون کلسیم می‌تواند در سلول‌هایی که دچار آپوپتوزیس می‌شوند، مستقل از عامل القاکننده آپوپتوزیس از طریق منابع خارج سلولی یا تخلیه ذخایر درون‌سلولی افزایش یابد [۹، ۱۰]. نقش افزایش درون‌سلولی یون کلسیم در فرآیند آپوپتوزیس هنوز نامشخص است. چون غلظت این یون اثرات متفاوتی در سلول‌های مختلف ایجاد می‌کند [۱۱]. در بعضی از سلول‌ها، مانند تیموسیت‌های موش صحرایی، افزایش یون کلسیم باعث آپوپتوزیس [۱۲]، اما در سلول‌های عصبی، موجب مهار یا کاهش آپوپتوزیس می‌شود [۱۳، ۱۴].

تاکنون مطالعات کمی در زمینه اثرات میدان مغناطیسی ایستا بر بیان ژن‌ها، به‌خصوص ژن‌های درگیر در فرآیند آپوپتوزیس انتشار یافته است [۱۵]. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۳۰۰میلی‌تسلا باعث تغییر در بیان ژن و بروز اختلال


Archive of SID
www.SID.ir

در رشد باکتری *E. coli* می‌شود [۱۶]. میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا بر بیان ژن‌های bcl-2، bax، p53 و hsp70 در لنفوسیت‌ها تاثیر می‌گذارد [۱۵]. پروتئین‌های خانواده bcl-2 از تنظیم‌کننده‌های مهم فرآیند آپوپتوزیس هستند که بعضی از آنها، مانند bax، به‌عنوان تقویت‌کننده و بعضی دیگر، مانند bcl-2، به‌عنوان مهارکننده فرآیند آپوپتوزیس عمل می‌کنند [۱۷]. پروتئین‌های تقویت‌کننده و مهارکننده این خانواده برای تنظیم فرآیند آپوپتوزیس به‌طور هماهنگ عمل می‌کنند و غلظت نسبی آنها در سلول نقش مهمی در سرنوشت سلول دارد [۱۸]. افزایش و پایداری پروتئین p53 نقش بارزی در ایجاد تاخیر در چرخه سلولی، ترمیم DNA، پیری سلول، تمایز و آپوپتوزیس دارد. این پروتئین موجب تسهیل در فرآیند ترمیم DNA شده و از این طریق، باعث بقای سلول‌های آسیب‌دیده یا موجب حذف شدید سلول‌های آسیب‌دیده می‌شود [۱۹]. در سلول‌هایی که در معرض عوامل تنش‌زای متفاوت (به‌ویژه عواملی که سبب دناتوره‌شدن پروتئین‌ها می‌شود) قرار می‌گیرند، بیان پروتئین‌های شوک حرارتی افزایش می‌یابد [۲۰]. بیان بیش از اندازه پروتئین hsp70، موجب کاهش آپوپتوزیس القاشده توسط Fas در سلول‌ها می‌شود [۲۱].

این مطالعه به‌منظور یافتن راهی کم‌خطر برای القای آپوپتوزیس در سلول‌های T-لنفوبلاست انسانی به بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا بر القای آپوپتوزیس پرداخت.

## روش‌ها

### کشت سلول

در این پژوهش آزمایشگاهی، از دودمان سلولی T-لنفوبلاست انسانی (Jurkat E6.1) استفاده شد. (انستیتو پاستور C121؛ ایران). ازآنجایی‌که سلول‌های یورکَت در محیط کشت شناور هستند، در فلاسک‌های ۲۵سانتی‌مترمربعی (حاوی محیط کشت RPMI-1640 که به آن ۱۰٪ سرم آلبومین گاوی، ۱۵۰واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین اضافه شده بود) کشت و در انکوباتور دارای دی‌اکسیدکربن ۵٪ و دمای ۳۷°C نگهداری شدند. تقریباً هر دو روز یک‌بار فلاسک محتوی سلول‌ها واکشت شده و در غلظت $۲\times۱۰^{۵}$سلول در میلی‌لیتر ثابت نگاه داشته شدند. شمارش سلول‌ها به کمک لام نئوبار انجام شد.

### تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی

دستگاه مولد میدان مغناطیسی مورد استفاده در این پژوهش به شکل سیم‌لوله و دارای انکوباتور دی‌اکسیدکربن بود. منبع تغذیه این دستگاه می‌توانست صفر تا ۵۰ولت اختلاف پتانسیل و صفر تا ۲۰آمپر جریان ایجاد کند. حداکثر توان منبع تغذیه یک کیلووات بود. بخش سیم‌لوله دستگاه، ۴۰سانتی‌متر طول و ۲۰سانتی‌متر عرض داشت و از ۱۸۰۰ حلقه سیم مسی به قطر ۲/۵میلی‌متر تشکیل شده بود. درون این سیم‌لوله، انکوباتوری لوله‌ای‌شکل از جنس آلیاژ برنج به قطر ۸سانتی‌متر و طول ۴۰سانتی‌متر قرار گرفته و مجهز به حسگرهای دمایی مدل pt100 با حساسیت ۰/۱°C ( Pico Technology؛ انگلستان)، حسگرهای رطوبت با حساسیت ۰/۱٪ (مدل HiH-3610 شرکت Honeywell؛ ایالات متحده) و حسگرهای دی‌اکسیدکربن (مدل NAP21A شرکت NEMOTO؛ ژاپن) بود. سیستم خنک‌کننده این دستگاه دارای یک کندانسور (مدل 1/3HP شرکت Grainger؛ ایالات متحده)، یک موتور یخچال (مدل 104Li شرکت Danfus؛ آلمان) و گاز تترافلورواتان (HFC-134a) بود و توسط لوله‌های مسی به قطر ۸میلی‌متر که در سطح زیرین سیم‌لوله و بالای انکوباتور قرار داشت، حرارت ایجادشده در دستگاه را با محیط مبادله می‌کرد. این دستگاه می‌توانست میدان مغناطیسی ایستایی با دامنه ۰/۵میکروتسلا تا ۹۰میلی‌تسلا ایجاد نماید. همچنین، مدار الکتریکی به‌منظور یکنواخت‌نگه‌داشتن میدان مغناطیسی در هنگام تابش‌دهی به‌کار رفت. به‌منظور کالیبراسیون دستگاه و بررسی یکنواختی میدان مغناطیسی ایجادشده توسط آن، از تسلامتر با دقت ۰/۱٪ (مدل 13610.93 Gottingen شرکت PHYWE؛ آلمان) و برای سنجش تغییر در جریان ورودی دستگاه، از اسیلوسکوپ ۴۰MHz (مدل 18040 شرکت Leader؛ ژاپن) استفاده شد.

به‌منظور تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی، هر بار ۷ فلاسک محتوی سلول‌های یورکَت شمارش و درون انکوباتور دستگاه به‌مدت ۶ و ۲۴ ساعت با ۶میلی‌تسلا تابش داده شد. سپس فلاسک‌های تیمارشده به انکوباتور منتقل و در زمان‌های معین به‌منظور سنجش میزان آپوپتوزیس القاشده به روش لومینومتری، فلوسایتومتری و وسترن‌بلات استفاده شد.

### آماده‌سازی سلول‌ها برای لومینومتری

از کیت کاسپاز ۳ و ۷ (G8090 شرکت Promega؛ ایالات متحده) و دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل LS 50B شرکت PerkinElmer؛ ایالات متحده) استفاده شد. این کیت میزان لومینسانس ایجادشده در اثر فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ را اندازه‌گیری می‌کرد. کاسپازها از پروتئازهای سیستئین-آسپارتیک‌اسید هستند و نقش اساسی در آپوپتوزیس سلول‌های پستانداران دارند [۲۱]. کیت کاسپاز ۳ و ۷ حاوی پروتئین آمینولوسیفرین متصل‌شده به تتراپپتید DEVD (آسپارتیک‌اسید-گلوتامین- والین- آسپارتیک‌اسید) بود که به‌عنوان پیش‌ماده اختصاصی برای کاسپازهای ۳ و ۷ عمل می‌کرد. همچنین، این کیت دارای بافری مناسب برای فعالیت کاسپاز و لوسیفراز و تجزیه سلول‌ها بود. افزودن این بافر به سلول‌ها موجب تجزیه آنها و سپس جداشدن تتراپپتید از آمینولوسیفرین، در اثر فعالیت کاسپازها می‌شد. به دنبال آن، آمینولوسیفرین به‌عنوان پیش‌ماده لوسیفراز عمل کرده و این آنزیم باعث تجزیه آن شده و لومینسانس تولید می‌کرد. پرتو



Archive of SID
www.SID.ir

نوری تولیدشده متناسب با میزان فعالیت کاسپازهای تولیدشده در سلول‌های در حال آپوپتوزیس بود و توسط دستگاه لومینومتر در دامنه ۴۰۰ تا ۷۰۰نانومتر آشکارسازی شد.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان کل آپوپتوزیس، چند ساعت قبل از تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی، سلول‌ها شمارش و در ۹۶ چاهک میکروپلیت کشت شد (تعداد سلول‌های موجود در هر چاهک کمتر از $۲\times۱۰^{۴}$ بود). سپس، میکروپلیت‌های حاوی سلول به‌مدت ۶ و ۲۴ ساعت با ۶میلی‌تسلا تابش داده شدند. در زمان های ۱، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۵۴، ۶۰، ۶۶ و ۷۲ ساعت بعد از تابش‌دهی، مقدار ۱۰۰میکرولیتر از محلول کیت کاسپاز ۳ و ۷ به‌ترتیب روی ۱۰۰میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول‌های تیمارشده، ۱۰۰میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول‌های کنترل و ۱۰۰میکرولیتر از محیط کشت فاقد سلول، ریخته و به‌خوبی پیپتاژ شد. محلول‌های فوق در حدود یک ساعت در دمای ۲۲°C نگهداری و سپس میزان لومینسانس تولیدشده خوانده شد.

### آماده‌سازی سلول‌ها برای فلوسایتومتری

از دستگاه فلوسایتومتر (مدل LSR II شرکت Becton Dickinson؛ ایالات متحده) دانشکده پیراپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. در زمان‌های ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا، سلول‌های تیمارشده به همراه سلول‌های کنترل از انکوباتور خارج و با سرعت ۱۳۰۰دور در دقیقه در دمای اتاق به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی آنها دور ریخته و با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی پیپتاژ شده و دوباره سانتریفوژ شدند. بعد از دور ریختن محلول رویی، به‌منظور تثبیت سلول‌ها، نخست آنها در ۰/۵میلی‌لیتر PBS حل و سپس ۴/۵میلی‌لیتر اتانل ۷۰٪ به آنها اضافه و به‌خوبی پیپتاژ شد. نمونه‌ها به‌منظور تثبیت، به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C نگهداری شدند. به‌منظور آماده‌سازی سلول‌ها برای فلوسایتومتری، محلول تثبیت‌کننده به‌وسیله سانتریفوژ با شرایط فوق از سلول‌ها جدا شد و به آنها، کوکتل پروپیدیم‌یدید که حاوی ۲۰میکرولیتر ریبونوکلئازA، ۲۰میکرولیتر معرف رنگی پروپیدیم‌یدید ۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱میکرولیتر تریتون X100 حل‌شده در ۱میلی‌لیتر بافر PBS بود، اضافه گردید. محلول آماده‌شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C نگهداری شد و توسط دستگاه فلوسایتومتر، میزان DNA سلول‌های آن مورد سنجش قرار گرفت.

### وسترن‌بلات

۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی، سلول‌ها به کمک سانتریفوژ از محیط کشت خود جدا و با کمک بافر تجزیه‌کننده سلولی RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay) که به آن کوکتل آنتی‌پروتئازهای لازم اضافه شده بود، در دمای ۴°C تجزیه شدند. پروتئین‌های کل سلول که در حجم معینی از بافر RIPA محلول بودند، غلظت‌سنجی شده و با ژل پلی‌اکریل‌آمید در دمای اتاق الکتروفورز شدند. پروتئین‌های موجود در ژل به غشای پلی‌وینیلیدین‌دی‌فلورید (PVDF) انتقال یافته و در بافر تریس نمکی محتوی توئین‌بیست (TBST) و آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت ۵٪ به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. غشای PVDF بلوکه‌شده، در طول شب و در دمای ۴°C درون محلول رقیق‌شده آنتی‌بادی اولیه به نسبت ۱:۲۰۰ قرار داده شد (از بافر TBST دارای ۲٪ BSA به‌عنوان محلول رقیق‌کننده آنتی‌بادی‌ها استفاده شد). از آنتی‌بادی‌های اولیه Anti-p-ATM (Ser-1981)، Anti-E2F1 (Ser-31) و Anti-Actin (MM2/193) استفاده شد (Sunta Cruz Biotechnology؛ ایالات متحده). غشای انکوبه‌شده با آنتی‌بادی اولیه، سه بار و هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه با بافر TBST در دمای اتاق شست‌وشو داده شد. بعد از آن به‌مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت، غشا در دمای اتاق درون محلول محتوی آنتی‌بادی ثانویه رقیق‌شده به نسبت ۱:۵۰۰۰ قرار گرفت. از آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti-mouse IgG-HRP ( Sunta Cruz Biotechnology؛ ایالات متحده) استفاده شد. غشای انکوبه‌شده با آنتی‌بادی ثانویه، سه بار و هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه با بافر TBST در دمای اتاق شست‌وشو داده شد. در نهایت، از معرف دی‌آمینوبنزیدین‌تتراهیدروکلرید هیدراته (D-5637 شرکت Sigma؛ آلمان) مخلوط در بافر فسفات نمکی، برای آشکارسازی باندهای پروتئین‌ها روی غشای PVDF استفاده شد [۲۳]. این عمل در اتاق تاریک و در دمای اتاق انجام شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

تمامی نتایج گزارش‌شده، میانگین داده‌های ۴ آزمایش مستقل برای هر نمونه تیمارشده و کنترل بود. تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 15 و Minitab 16 به روش آنالیز واریانس دوطرفه انجام شد.

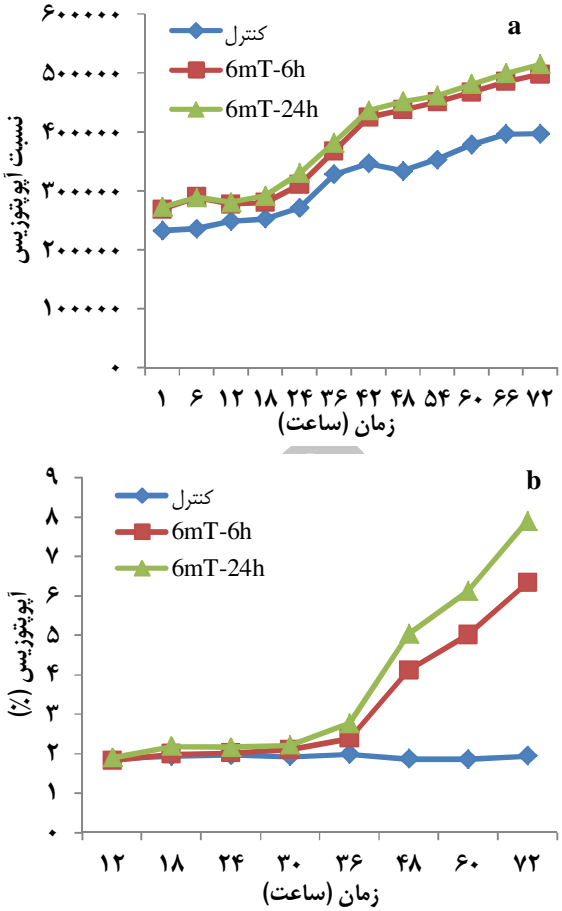
## نتایج

### لومینومتری

افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های تیمارشده نسبت به سلول‌های کنترل، ۳۶ ساعت بعد از تیمار با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا به‌مدت ۶ (p=۰/۰۱۱) و ۲۴ ساعت (p=۰/۰۵۵) معنی‌داری بود. میزان آپوپتوزیس در سلول‌های تیمارشده نسبت به سلول‌های کنترل، ۴۸ ساعت بعد از تیمار با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا به حداکثر مقدار خود رسید؛ به‌طوری‌که میزان آپوپتوزیس در سلول‌های ۶ ساعت تابش‌دیده، ۳۱/۲٪ (p=۰/۰۲۷) و در سلول‌های ۲۴ ساعت تابش‌دیده، ۳۵/۵٪ (p =۰/۰۰۴) نسبت به سلول‌های کنترل افزایش یافت (نمودار a۱).



Archive of SID
www.SID.ir

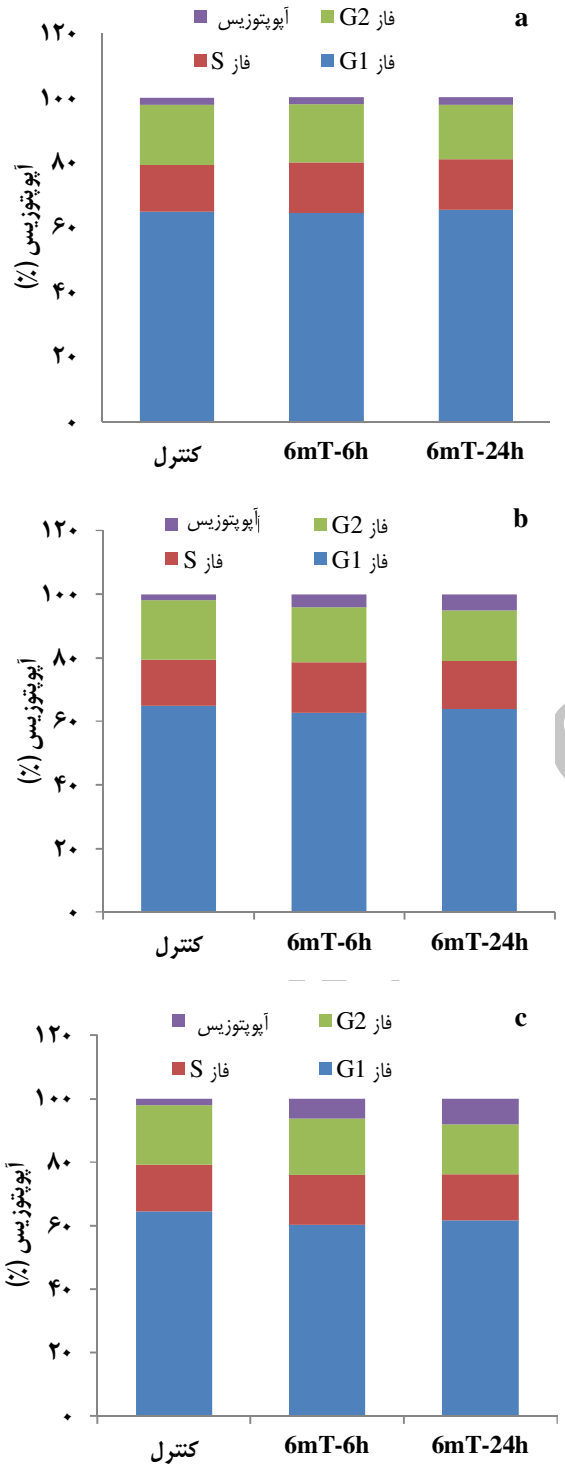



**نمودار ۱)** آپوپتوزیس القاشده توسط میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا در سلول‌های یورکَت؛ (a) سنجش آپوپتوزیس به روش لومینومتری؛ (b) سنجش آپوپتوزیس اولیه به روش فلوسایتومتری

## فلوسایتومتری

بررسی میزان آپوپتوزیس: ۳۶ ساعت بعد از تابش‌دهی سلول‌ها با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا، اولین تفاوت قابل ملاحظه بین سلول‌های تابش‌دیده و کنترل مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$). ۷۲ ساعت بعد از تابش‌دهی سلول‌ها، میزان آپوپتوزیس در سلول‌های ۲۴ ساعت تابش‌دیده ۸٪ ($p<۰/۰۰۱$) و در سلول‌های ۶ ساعت تابش‌دیده بیش از ۶٪ افزایش یافت ($p<۰/۰۰۱$؛ نمودار ۱b).

بررسی چرخه سلولی: جمعیت سلول‌های فاز S و فاز $G_2$ سلول‌های تیمارشده با میدان هم در سلول‌های ۲۴ ساعت تیمارشده و هم ۶ ساعت تیمارشده در دوره‌های ۲۴ساعته دچار تغییر شد. به این ترتیب که، ۲۴ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا، میزان جمعیت سلول‌ها در فازهای S و $G_2$ کاهش یافت ($p=۰/۰۴۶$)، اما ۳۰ و ۳۶ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها، جمعیت این دو فاز رو به افزایش گذاشت و جمعیت سلولی فاز $G_1$ کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). با این وجود، ۴۸ ساعت بعد از تیمار، جمعیت سلولی فازهای S و $G_2$ دوباره کاهش و جمعیت فاز $G_1$ افزایش یافت ($p=۰/۰۴۱$). تعدادی از سلول‌ها نیز در اثر آپوپتوزیس مرده و از چرخه سلولی خارج شدند. این روند در دوره ۲۴ ساعته بعدی (۴۸ تا ۷۲ ساعت) نیز تکرار شد (نمودار ۲).



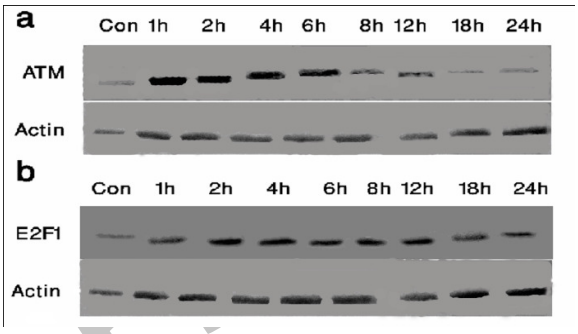

**نمودار ۲)** فازهای چرخه سلولی یورکَت در زمان‌های مختلف بعد از تیمار با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا؛ (a) پس از ۲۴ ساعت؛ (b) پس از ۴۸ ساعت؛ (c) پس از ۷۲ ساعت



www.SID.ir

## وسترن‌بلات

یک ساعت بعد از تیمار با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا، مقدار پروتئین فسفریله ATM در ناحیه سرین ۱۹۸۱ به حداکثر مقدار خود رسید و این مقدار در سلول‌های ۲، ۴ و ۶ ساعت تابش‌دیده نیز ثابت ماند و سپس شروع به کاهش نمود. غلظت پروتئین فسفریله E2F1 در ناحیه سرین ۳۱ در سلول‌های یک ساعت تابش‌دیده افزایش یافت، ولی در سلول‌های ۲ و ۴ ساعت تابش‌دیده به حداکثر مقدار خود رسید و در سلول‌های ۱۲ ساعت تابش‌دیده نیز تقریباً ثابت ماند و سپس کاهش یافت (شکل ۱).




**شکل ۱)** نتایج آزمایش وسترن‌بلات؛ (a) فسفریلاسیون پروتئین ATM در ناحیه آمینواسید سرین ۱۹۸۱ در زمان‌های تابش‌دهی مختلف؛ (b) فسفریلاسیون پروتئین E2F1 در ناحیه آمینواسید سرین ۳۱ در زمان‌های تابش‌دهی مختلف

## بحث

دودمان سلولی T–لنفوبلاست انسانی یورکَت سرطانی و فاقد ژن طبیعی p53 است. ژن p53 نقش بسیار مهمی در روند ترمیم و آپوپتوزیس سلول‌های مختلف دارد [۲۴]. از این رو، سلول‌های یورکَت برای بررسی نحوه ترمیم و آپوپتوزیس مستقل از ژن طبیعی p53 مناسب هستند. این دودمان سلولی، به‌علت فقدان ژن طبیعی p53، در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی که موجب شکست تک‌رشته‌ای یا دورشته‌ای مولکول DNA شده و از این طریق، موجب تحریک فرآیند آپوپتوزیس می‌گردند، مقاوم‌تر از سلول‌های دارای ژن طبیعی p53 است.

براساس نتایج این پژوهش، میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۶میلی‌تسلا می‌تواند موجب افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های یورکَت شود. با توجه به مطالعات گذشته، احتمالاً میدان مغناطیسی با تاثیری که بر خاصیت دیامغناطیسی غشای پلاسمایی می‌گذارد، موجب کاهش غلظت یون کلسیم درون‌سلولی شده و از این طریق، موجب افزایش آپوپتوزیس در دودمان سلولی یورکَت می‌گردد [۲۵]. علاوه بر این، میدان مغناطیسی ممکن است هوموستازی آهن در درون بعضی از سلول‌ها را تحت تاثیر قرار داده و موجب افزایش آهن آزاد در سیتوپلاسم و هسته سلول شود. افزایش آهن نیز می‌تواند از طریق واکنش فِنتون باعث افزایش رادیکال‌های هیدروکسیل گردد. حضور رادیکال‌های هیدروکسیل در درون سلول، موجب آسیب‌رسانی به مولکول‌های DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها می‌شود. آسیب لیپیدهای غشای سلولی باعث افزایش خروج یون کلسیم از ذخایر درون‌سلولی می‌گردد و از این طریق، ممکن است موجب کاهش یون کلسیم در سلول‌های تابش‌دیده شود [۲۶]. نتایج این پژوهش در مورد القای آپوپتوزیس و کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های تیمارشده با میدان مغناطیسی، با نتایج *آلدینوچی* و همکاران [۲۵]، *سین و لای* [۲۶] و همچنین *کیم* و همکاران [۲۷] مطابقت دارد.

میدان مغناطیسی ممکن است با تغییراتی که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در سلول‌های یورکَت ایجاد می‌کند، باعث تاخیر در چرخه سلولی آنها شده و باعث توقف موقتی چرخه سلولی در فاز $G_2$ شود. این نتیجه با گزارش *چیونا* و همکاران همخوانی دارد [۲۸]. این امر ممکن است منجر به افزایش جمعیت سلول‌ها در فاز S و $G_2$ و کاهش جمعیت سلول‌ها در فاز $G_1$ شود. در پایان فاز $G_2$ هر چرخه سلولی، سلول‌های آسیب‌دیده‌ای که موفق به ترمیم آسیب‌های خود شده‌اند یا آسیب‌های آنها تحریک‌کننده فرآیند آپوپتوزیس نیست، تقسیم شده و چرخه جدیدی را آغاز می‌کنند. به این ترتیب، جمعیت کاهش‌یافته فاز $G_1$ رو به افزایش می‌گذارد؛ اما سلول‌هایی که دچار آسیب‌های مرگبار، مانند شکست‌های دورشته‌ای DNA ترمیم‌نیافته شده‌اند، از طریق فرآیند آپوپتوزیس از بین می‌روند.

فرآیند آپوپتوزیس همچون سایر فعالیت‌های سلولی توسط تعدادی از ژن‌ها و پروتئین‌ها برنامه‌ریزی و آغاز می‌شود. ATM، p53، Chk2 و E2F1 از مهم‌ترین ژن‌ها و پروتئین‌هایی هستند که در راه‌اندازی فرآیند ترمیم یا آپوپتوزیس سلول نقش ایفا می‌کنند [۲۷، ۳۱–۲۹]. در این پژوهش، تغییرات غلظت پروتئین‌های فسفریله ATM و E2F1 با وسترن‌بلات در سلول‌های تیمارشده و کنترل سنجیده شد. غلظت حالت فسفریله ATM در ناحیه سرین ۱۹۸۱ که در اثر شکست‌های دورشته‌ای مولکول DNA ایجاد می‌شود، در سلول‌های یک ساعت تابش‌دیده افزایش می‌یابد. حالت فسفریله و فعال پروتئین ATM موجب فسفریلاسیون پروتئین‌هایی می‌شود که در روند ترمیم سلولی یا آپوپتوزیس نقش دارند [۳۲]. یکی از پروتئین‌هایی که توسط ATM فسفریله و فعال می‌شود، پروتئین E2F1 است. این پروتئین بر خلاف سایر پروتئین‌های E2F که در پیشبری یا مهار چرخه سلولی نقش دارند، در راه‌اندازی فرآیند آپوپتوزیس نقش موثری دارد. پروتئین E2F1 فسفریله با افزایش رونویسی بعضی از ژن‌ها یا فسفریلاسیون بعضی از پروتئین‌ها، مانند p53 و هومولوگ‌های آن (p73 و p63)، می‌تواند موجب راه‌اندازی آپوپتوزیس وابسته به p53 یا آپوپتوزیس مستقل از p53 شود [۳۳، ۳۴]. به همین دلیل، یکی از احتمالاتی که می‌توان برای آغاز فرآیند آپوپتوزیس مستقل از p53 در سلول‌های یورکَت ارایه نمود، اثر


www.SID.ir

پروتئین فسفریله E2F1 در افزایش رونویسی پروتئین p73 است. زیرا پروتئین p73 می‌تواند از مسیری مستقل از p53 باعث آغاز آپوپتوزیس در سلول شود. این نتایج با گزارش *تنوزو* و همکاران در مورد تاثیر میدان مغناطیسی بر بیان ژن‌ها مطابقت دارد [۳۴].

نتایج حاصل از روش لومینومتری و فلوسایتومتری تفاوت معنی‌داری در میزان آپوپتوزیس سلول‌های ۶ و ۲۴ ساعت تابش‌دیده با میدان مغناطیسی ۶میلی‌تسلا نشان نداد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که تابش ۶ساعته میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۶میلی‌تسلا برای القای آپوپتوزیس در سلول‌های یورکَت کافی است. شناخت مسیرهای فعال‌سازی آپوپتوزیس در سلول‌های توموری، ممکن است در راه‌اندازی درمان‌های ویژه‌ای توسط ترکیب‌کردن مهارکننده‌ها و تحریک‌کننده‌های پروتئین‌های کلیدی در شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی و رادیوتراپی نقش موثری داشته باشد.

## نتیجه‌گیری

القای آپوپتوزیس با میدان مغناطیسی ایستا موجب افزایش بیان و فعال‌شدن پروتئین‌های ATM و E2F1 می‌شود و این پروتئین‌ها باعث افزایش بیان بعضی از ژن‌ها و فعال‌نمودن پروتئین‌های خاص دیگری می‌شوند که در راه‌اندازی فرآیند آپوپتوزیس نقش مهمی ایفا می‌کنند.

**تشکر و قدردانی:** این مقاله حاصل بخشی از نتایج رساله دکتری است و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران نهاد ریاست جمهوری، در قالب طرح پژوهشی شماره ۸۸۰۰۰۲۷۱ تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از خانم حیات کارشناس محترم آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه تهران برای کمک در قرائت نمونه‌های فلوسایتومتری تشکر می‌شود.

## منابع

1- Moreira ME, Barcinski MA. Apoptotic cell and phagocyte interplay: Recognition and consequences in different cell systems. An Acad Bras Cienc. 2004;76(1):93-115.
2- Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. J Immunol Methods. 2002;(265):97-110.
3- Dini L, Abbor L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. Micron. 2005;36(3):195-217.
4- Rosen AD. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. Cell Biochem Biophys. 2003;39(2):163-73.
5- Dini L. Static magnetic field interferes with the physiological removal of circulating apoptosis lymphocytes. Piers. 2010;6(3):252-6.
6- Teodori L, Gohde W, Valente MG, Tagliaferri F, Coletti D, Perniconi B, et al. Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit stress-induced apoptosis in human glioblastoma cells. Cytometry. 2002;49(4):143-9.
7- Chionna A, Dwikat M, Panzarini E, Tenuzzo B, Carla EC, Verri T, et al. Cell shape and plasmamembrane alterations after static magnetic fields exposure. Eur J Histochem. 2003;47(4):299-308.
8- Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. Prog Biophys Mol Boil. 2005;87(2-3):213-23.
9- McConkey DJ, Orrenius S, Miyakoshi J, Yamagishi N, Ohtsu S, Mohri K, et al. The role of calcium in the regulation of apoptosis. Leukoc Biol. 1996;59:775-83.
10- Bian X, Hughes FM, Huang Y, Cidlowski JA, Putney JW. Roles of cytoplasmic Ca2+ and intracellular Ca2+ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. Am J Physiol. 1997;272(4):1241-9.
11- Magnelli L, Cinelli M, Turchetti A, Chiarugi VP. Bcl-2 overexpression abolishes early calcium waving preceding apoptosis in NIH-3T3 murine fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 1994;204(1):84-90.
12- McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca2+ concentration. Arch Biochem Biophys. 1989;269(1):365-70.
13- Galli C, Meucci O, Scorziello A, Werge TM, Calissano P, Schettini G. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin and IGF-1 through distinct mechanisms of action: The involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. J Neurosci. 1995;15(2):1172-9.
14- Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, et al. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca2+ influx. FASEB J. 1999;13(1):95-102.
15- Tenuzzo B, Vergallo C, Dini L. Effect of 6 mT static magnetic field on the bcl-2, bax, p53 and hsp70 expression in freshly isolated and in vitro aged human lymphocytes. Tissue Cell. 2009;41(3):169-79.
16- Potenza L, Ubaldi L, De Sanctis R, De Bellis R, Cucchiaini L, Dacha M. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in Escherichia coli. Mutat Res. 2004;561(1-2):53-62.
17- Yokoyama T, Tanahashi M, Kobayashi Y, Yamakawa Maeda M, Inaba T, Kiriyama M, et al. The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes. Immunol Lett. 2002;81(2):107-13.
18- Nunez G, Clarke MF. The Bcl-2 family of proteins: Regulators of cell death and survival. Trends Cell Biol. 1994;4(11):399-403.
19- Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. P53: 25 years after its discovery. Trends Pharmacol Sci. 2004;25(4):177-81.
20- Evgenev MB, Garbuz D, Zatsepina OG. Heat shock proteins: Functions and role in adaptation to hyperthermia. Ontogenez. 2005;36(4):265-73.
21- Asea A. Chaperokine-induced signal transduction pathways. Exser Immunol Rev. 2003;9:25-33.
22- Nicholson Dw, Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. Trends Biochem Sci. 1997;22(8):299-306.
23- Anderson LVB. Optimized protein diagnosis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscul Disord. 1996;6(6):443-6.
24- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. Science. 1998;281(5383):1677-9.
25- Aldinucci C, Garcia JB, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, et al. The effect of strong static magnetic field on lymphocytes. Bioelectromgnetics. 2003;24(2):109-17.

Archive of SID



www.SID.ir

26- Lai H, Singh NP. Magnetic field induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. Environ Health Prespect. 2004;112(6):687-94.
27- Kim J, Ha CS, Lee HJ, Song K. Repetitive exposure to a 60-Hz time-varying magnetic field induces DNA double-strand breaks and apoptosis in human cells. Biochem Biophys Res Commun. 2010;400(4):739-44.
28- Chionna A, Tenuzzo B, Panzarini E, Dwikat M, Abbro L, Dini L. Time dependent modifications of Hep G2 cells during exposure to static magnetic fields. Bioelectromagnetics. 2005;26(4):275-86.
29- Huang HL, Fang LW, Lu SP, Chou CK, Luh TY, Lai MZ. DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. Oncogene. 2003;22(50):8168-77.
30- Bakkenist C, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimmer dissociation. Nature. 2003;421(6922):499-506.
31- Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: From cell signaling to cell death. Mol Immun. 2001;38(10):713-21.
32- Powers JT, Hong S, Mayhew CN, Rogers PM, Knudsen ES, Johson DG. E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and chk2 phosphorylation and apoptosis. Mol Cancer Res. 2004;2(4):203-14.
33- Urist M, Tanaka T, Poyurovsky MV, Prives C. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. Genes Dev. 2004;18(24):3041-54.
34- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, Mc Keon F, et al. P63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. Nature. 2002;416(6880):560-4.

Archive of SID


www.SID.ir