



Effect of Static Magnetic Field on Apoptosis Induction and Altering the Cell Cycle of T-lymphoblastoid Cells

ARTICLE INFO

Article Type

Research Article

Authors

Ahmadianpour M. R.¹ PhD,

Abdolmaleki P.* PhD,

Moula S. J.² PhD,

Hosseinkhani S.³ PhD

ABSTRACT

Aims Apoptosis or programmed cell death is a normal physiological process of cell that leads to active and natural development and maintenance of tissue homeostasis. Apoptosis occurs due to different external factors. This study aimed to investigate a low risk method to induce apoptosis in human leukemia cells using static magnetic field (SMF).

Methods In this laboratory research, the cultured human T-lymphoblastoid cell line (Jurkat E6.1), exposed to 6mT SMF for 6 and 24 hours. Luminometry, flow cytometry and western blot were used to measure total apoptosis rate, primary apoptosis rate and phosphorylated ATM and E2F1 proteins, respectively.

Results Increasing in the rate of apoptosis in treated cells according to control cells was significant 36 hours after treatment with 6mT SMF for 6 (p=0.011) and 24 (p=0.055) hours. 36 hours after treatment with 6mT SMF, the first significant difference was seen between treated and control cells (p<0.001). 24 hours after cells exposure to 6mT SMF, cells population was decreased in G₂ and S and 36 hours after treatment, the population was increased in G₂ and S and decreased in G₁. Exposure to 6mT SMF increased the amount of phosphorylated ATM protein in 1981 Serin and E2F1 protein in 31 Serin positions.

Conclusion 6mT SMF induces apoptosis in exposed Jurkat cells by enhancing and activating ATM and E2F1 proteins.

Keywords Apoptosis, Luminescence, Magnetic Field, Flow Cytometry, Jurkat Cells

CITATION LINKS

[1] Apoptotic cell and phagocyte interplay: Recognition... [2] Evaluation of caspase activity in apoptotic... [3] Bioeffects of moderate-intensity static magnetic... [4] Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic... [5] Static magnetic field interferes with the physiological removal... [6] Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit... [7] Cell shape and plasmamembrane alterations after static... [8] Effects of static magnetic fields at the cellular... [9] The role of calcium in the regulation of ... [10] Roles of cytoplasmic Ca²⁺ and intracellular... [11] Bcl-2 overexpression abolishes early calcium waving... [12] Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through... [13] Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by... [14] Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis... [15] Effect of 6 mT static magnetic field on the bcl-2, bax, ... [16] Effects of a static magnetic field on cell growth and gene... [17] The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in... [18] The Bcl-2 family of proteins: Regulators of cell death... [19] P53: 25 years after its discovery. [20] Heat shock proteins: Functions and role in adaptation to... [21] Chaperokine-induced signal transduction pathways. [22] Caspases: Killer proteases. [23] Optimized protein diagnosis in the autosomal recessive... [24] Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation... [25] The effect of strong static magnetic field on... [26] Magnetic field induced DNA strand breaks in brain cells of... [27] Repetitive exposure to a 60-Hz time-varying magnetic field induces... [28] Time dependent modifications of Hep G2 cells during exposure to static magnetic... [29] DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen... [30] DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation... [31] Calcium and oxidative stress: From cell signaling to cell... [32] E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and... [33] p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases... [34] P63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA ...

*Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

¹Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

²Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

³Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Correspondence

Address: Post Box 175-14115, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Jalal Al-e-Ahmad Highway, Gisha Bridge, Tehran, Iran.

Phone: +982182883404

Fax: +982182884484

parviz@modares.ac.ir

Article History

Received: January 2, 2012

Accepted: October 10, 2012

ePublished: November 5, 2012

تأثیر میدان مغناطیسی ایستا بر القای آپوتوزیس و تغییر در چرخه سلولی T-لنفوبلاست‌ها

محمدرضا احمدیان پور PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

روش‌ها: در این پژوهش آزمایشگاهی، دودمان سلولی T-لنفوبلاست‌های انسانی کشت داده شده (E6.1 یورکت)، به مدت ۶ و ۲۴ ساعت تحت تأثیر میدان مغناطیسی ایستای عملی تسلا قرار گرفتند. از لومینومتری برای سنجش میزان کل آپوتوزیس، فلوسایتومتری برای سنجش میزان آپوتوزیس اولیه و وسترن بلات برای سنجش میزان پروتئین‌های فسفریله ATM و E2F1 استفاده شد.

یافته‌ها: افزایش میزان آپوتوزیس در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل، ۳۶ ساعت بعد از تیمار با میدان مغناطیسی عملی تسلا به مدت ۶ ($p=0/011$) و ۲۴ ساعت ($p=0/055$) معنی‌داری بود. ۳۶ ساعت بعد از تابش دهی سلول‌ها با میدان مغناطیسی عملی تسلا، اولین تفاوت قابل ملاحظه بین سلول‌های تابش‌دیده و کنترل مشاهده شد ($p<0/001$). ۲۴ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی عملی تسلا، میزان جمعیت سلول‌ها در فازهای S و G₂ کاهش و ۳۶ ساعت بعد از تیمار، جمعیت این دو فاز رو به افزایش گذاشت و جمعیت سلولی فاز G₁ کاهش یافت. تیمار با میدان مغناطیسی عملی تسلا، باعث افزایش مقدار پروتئین فسفریله ATM در ناحیه سرین ۱۹۸۱ و پروتئین فسفریله E2F1 در ناحیه سرین ۳۱ شد.

نتیجه‌گیری: میدان مغناطیسی ایستای عملی تسلا با افزایش و فعال‌سازی پروتئین‌های ATM و E2F1 در سلول‌های تیمار شده، باعث القای آپوتوزیس در آنها می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آپوتوزیس، لومینسانس، میدان مغناطیسی ایستا، فلوسایتومتری، سلول یورکت

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۹

* نویسنده مسئول: parviz@modares.ac.ir

مقدمه

آپوتوزیس 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]. هنگامی که 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 سرطانی شدن گردد. فرآیند آپوتوزیس سیستم دفاعی مهمی در برابر سرطان است. اختلال در آپوتوزیس منجر به بیماری‌های مختلفی از قبیل خودایمنی، سرطان، مقاومت تومور به دارو و ایدز می‌گردد [۲]. برای بررسی آپوتوزیس، می‌توان از روش‌های مختلفی از جمله بررسی سایتوتوکسیسیته، تغییرات مورفولوژی سلول، الگوی نردبانی DNA، روش TUNEL، فلوسایتومتری و لومینومتری استفاده کرد. در روش‌های بررسی آپوتوزیس، انتخاب روش به سیستم سلولی، ماهیت ماده القاکننده آپوتوزیس، اطلاعات مورد نظر و محدودیت‌های تکنیکی بستگی دارد [۲].

آپوتوزیس خودبه‌خودی یا القایی، می‌تواند تحت تأثیر میدان‌های مغناطیسی قرار گیرد [۳]. میزان این تأثیر بستگی به نوع سلول، شدت میدان، مدت تابش میدان، میزان نفوذپذیری بافت‌ها و سایر شرایط آزمایشگاهی دارد [۳-۵]. 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 آپوتوزیس 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 آپوتوزیس می‌شوند، مستقل از عامل القاکننده آپوتوزیس از طریق منابع خارج سلولی یا تخلیه ذخایر درون‌سلولی افزایش یابد [۹، ۱۰]. نقش افزایش درون‌سلولی یون کلسیم در فرآیند آپوتوزیس 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 آپوتوزیس [۱۲]، اما در سلول‌های عصبی، موجب مهار یا کاهش آپوتوزیس می‌شود [۱۳، ۱۴].

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

بود. درون این سیم‌لوله، انکوباتوری لوله‌ای شکل از جنس آلیاژ برنج به قطر ۸ سانتی‌متر و طول ۴۰ سانتی‌متر قرار گرفته و مجهز به حسگرهای دمایی مدل pt100 با حساسیت 0.1°C (Pico Technology؛ انگلستان)، حسگرهای رطوبت با حساسیت 0.1% (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 ۸ میلی‌متر 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 0.5 میکروتسلا تا 90 میلی‌تسلا 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 تسلا متر با دقت 0.1% (مدل 13610.93 Gottingen شرکت PHYWE؛ آلمان) و برای سنجش تغییر در جریان ورودی دستگاه، از اسیلوسکوپ 40MHz (مدل 18040 شرکت Leader؛ ژاپن) استفاده شد.

به‌منظور تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی، هر بار ۷ فلاسک محتوی سلول‌های یورکت شمارش و درون انکوباتور دستگاه به‌مدت ۶ و ۲۴ ساعت با عمیلی‌تسلا تابش داده شد. سپس فلاسک‌های تیمار شده به انکوباتور منتقل و در زمان‌های معین به‌منظور سنجش میزان آپوتوزیس القا شده 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 سیستمین-آسپارتیک‌اسید هستند و نقش اساسی در آپوتوزیس سلول‌های پستانداران دارند [۲۱]. کیت کاسپاز ۳ و ۷ حاوی پروتئین آمینولوسیفرین متصل‌شده به تترایپتید 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 جدا شدن تترایپتید 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

در رشد باکتری *E. coli* می‌شود [۱۶]. میدان مغناطیسی عمیلی‌تسلا بر بیان ژن‌های *bcl-2*، *bax*، *p53* و *hsp70* در نفوسیت‌ها تأثیر می‌گذارد [۱۵]. پروتئین‌های خانواده *bcl-2* از تنظیم‌کننده‌های مهم فرآیند آپوتوزیس هستند که بعضی از آنها، مانند *bax*، به‌عنوان تقویت‌کننده و بعضی دیگر، مانند *bcl-2*، به‌عنوان مهارکننده فرآیند آپوتوزیس عمل می‌کنند [۱۷]. پروتئین‌های تقویت‌کننده و مهارکننده این خانواده برای تنظیم فرآیند آپوتوزیس 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 تأخیر در چرخه سلولی، ترمیم DNA، پیری سلول، تمایز و آپوتوزیس 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 دناتورشدن پروتئین‌ها می‌شود) قرار می‌گیرند، بیان پروتئین‌های شوک حرارتی افزایش می‌یابد [۲۰]. بیان بیش از اندازه پروتئین *hsp70*، موجب کاهش آپوتوزیس القا شده توسط Fas در سلول‌ها می‌شود [۲۱].

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

روش‌ها

کشت سلول

در این پژوهش آزمایشگاهی، از دودمان سلولی T-لنفوبلاست انسانی (Jurkat E6.1) استفاده شد. (انستیتو پاستور C121؛ ایران). از آنجایی که سلول‌های یورکت در محیط کشت شناور هستند، در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌مترمربعی (حاوی محیط کشت RPMI-1640 که به آن 10% سرم آلبومین گاوی، 150 واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و 50 میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین اضافه شده بود) کشت و در انکوباتور دارای دی‌اکسیدکربن 5% و دمای 37°C نگهداری شدند. تقریباً هر دو روز یک‌بار فلاسک محتوی سلول‌ها واکتشت شده و در غلظت $10^5 \times 2$ سلول در میلی‌لیتر ثابت نگاه داشته شدند. شمارش سلول‌ها به کمک لام ثوبار 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 50 ولت اختلاف پتانسیل و صفر تا 20 آمپر جریان ایجاد کند. حداکثر توان منبع تغذیه یک کیلووات بود. بخش سیم‌لوله دستگاه، 40 سانتی‌متر طول و 20 سانتی‌متر عرض داشت و از 1800 حلقه سیم مسی به قطر $2/5$ میلی‌متر تشکیل شده

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

به منظور 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 2×10^4 بود). سپس، میکروپلیت‌های حاوی سلول به مدت ۶ و ۲۴ ساعت با ۶ میلی‌تسلا تابش داده شدند. در زمان‌های ۱، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۵۴، ۶۰، ۶۶ و ۷۲ ساعت بعد از تابش‌دهی، مقدار 100 میکرولیتر از محلول کیت کاسپاز ۳ و ۷ به ترتیب روی 100 میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول‌های تیمار شده، 100 میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول‌های کنترل و 100 میکرولیتر از محیط کشت فاقد سلول، ریخته و به خوبی پیتاژ شد. محلول‌های فوق در حدود یک ساعت در دمای 22°C نگهداری و سپس میزان لومینسانس تولیدشده خوانده شد.

آماده‌سازی سلول‌ها برای فلوسایتومتري

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 ۶ میلی‌تسلا، سلول‌های تیمار شده به همراه سلول‌های کنترل از انکوباتور خارج و با سرعت 1300 دور در دقیقه در دمای اتاق به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی آنها دور ریخته و با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی پیتاژ شده و دوباره سانتریفوژ شدند. بعد از دور ریختن محلول رویی، به منظور تثبیت سلول‌ها، نخست آنها در $4/5$ میلی‌لیتر PBS حل و سپس $4/5$ میلی‌لیتر اتانل 70% به آنها اضافه و به خوبی پیتاژ شد. نمونه‌ها به منظور تثبیت، به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C نگهداری شدند. به منظور آماده‌سازی سلول‌ها برای فلوسایتومتري، محلول تثبیت‌کننده به وسیله سانتریفوژ با شرایط فوق از سلول‌ها جدا شد و به آنها، کوکتل پرویدیمیدید که حاوی 20 میکرولیتر ریبونوکلاز A، 20 میکرولیتر معرف رنگی پرویدیمیدید 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و 1 میکرولیتر تریتون X100 حل شده در 1 میلی‌لیتر بافر PBS بود، اضافه گردید. محلول آماده‌شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37°C نگهداری شد و توسط دستگاه فلوسایتومتر، میزان DNA سلول‌های آن مورد سنجش قرار گرفت.

وسترن بلات

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 4°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 توئین بیست (TBST) و آلومین سرم گاوی (BSA) با غلظت 5% به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. غشای PVDF بلوکه‌شده، در طول شب و در دمای 4°C درون محلول رقیق‌شده آنتی‌بادی اولیه به نسبت $1:200$ قرار داده شد (از بافر TBST دارای 2% BSA به عنوان 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 به مدت ۱۰ دقیقه با بافر TBST در دمای اتاق شست‌وشو داده شد. بعد از آن به مدت ۱ تا $1/5$ ساعت، غشا در دمای اتاق درون محلول محتوی آنتی‌بادی ثانویه رقیق‌شده به نسبت $1:5000$ 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 به مدت ۱۰ دقیقه با بافر TBST در دمای اتاق شست‌وشو داده شد. در نهایت، از معرف دی‌آمینوبنزیدين تتراهیدروکلرید 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

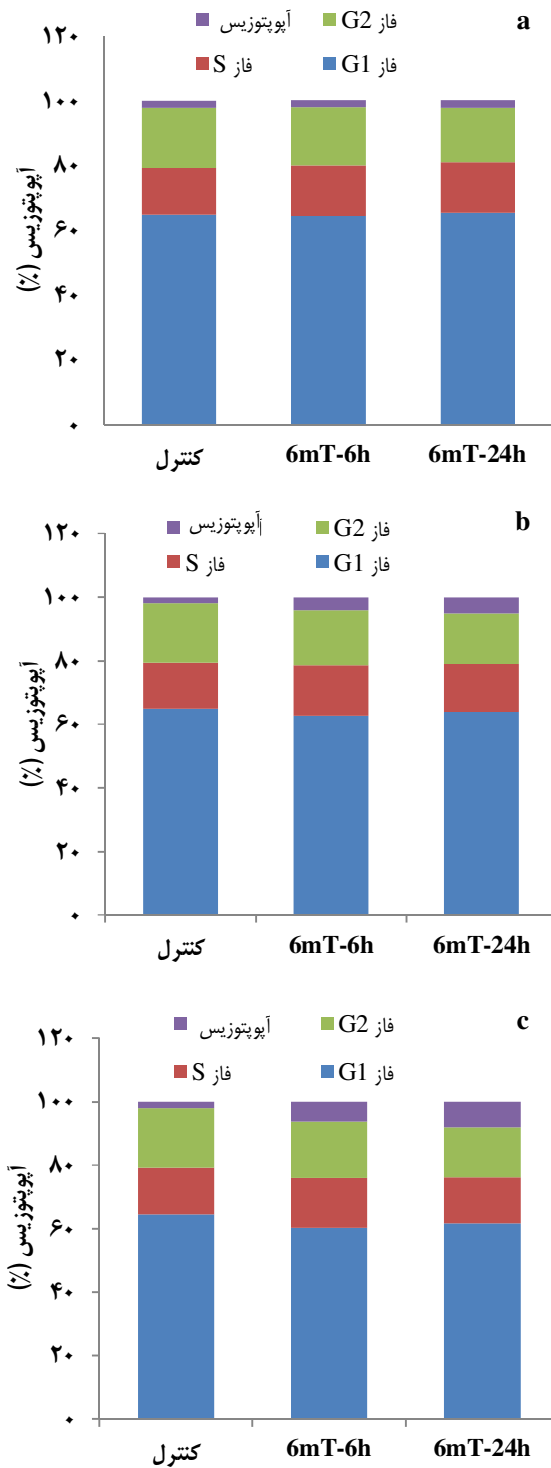
تمامی نتایج گزارش شده، میانگین داده‌های ۴ آزمایش مستقل برای هر نمونه تیمار شده و کنترل بود. تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 15 و Minitab 16 به روش آنالیز واریانس دوطرفه انجام شد.

نتایج

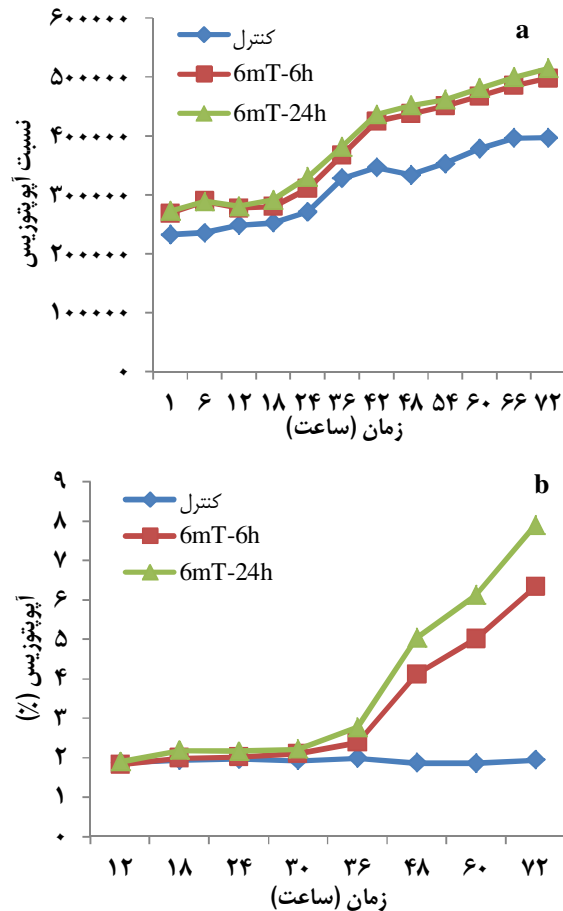
لومینومتري

افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل، ۳۶ ساعت بعد از تیمار با میدان مغناطیسی ۶ میلی‌تسلا به مدت ۶ ($p=0/011$) و ۲۴ ساعت ($p=0/055$) معنی‌داری بود. میزان آپوپتوزیس در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل، ۴۸ ساعت بعد از تیمار با میدان مغناطیسی ۶ میلی‌تسلا به حداکثر مقدار خود رسید؛ به طوری که میزان آپوپتوزیس در سلول‌های ۶ ساعت تابش‌دیده، $31/2\%$ ($p=0/027$) و در سلول‌های ۲۴ ساعت تابش‌دیده، $35/5\%$ ($p=0/004$) نسبت به سلول‌های کنترل افزایش یافت (نمودار a).

یافت ($p=0/041$). تعدادی از سلول‌ها نیز در اثر آپوتوزیس 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 یورکت در زمان‌های مختلف بعد از تیمار با میدان مغناطیسی عمیلی‌تسلا: (a) پس از ۲۴ ساعت؛ (b) پس از ۴۸ ساعت؛ (c) پس از ۷۲ ساعت



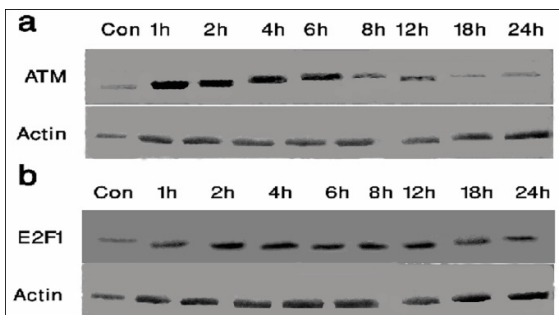
نمودار ۳ آپوتوزیس القا شده توسط میدان مغناطیسی عمیلی‌تسلا در سلول‌های یورکت: (a) سنجش آپوتوزیس به روش لومینومتری؛ (b) سنجش آپوتوزیس اولیه به روش فلوسایتومتری

فلوسایتومتری

بررسی میزان آپوتوزیس: ۳۶ ساعت بعد از تابش‌دهی سلول‌ها با میدان مغناطیسی عمیلی‌تسلا، اولین تفاوت قابل ملاحظه بین سلول‌های تابش‌دیده و کنترل مشاهده شد ($p<0/001$). ۷۲ ساعت بعد از تابش‌دهی سلول‌ها، میزان آپوتوزیس در سلول‌های ۲۴ ساعت تابش‌دیده ۸٪ ($p<0/001$) و در سلول‌های ۶ ساعت تابش‌دیده بیش از ۶٪ افزایش یافت ($p<0/001$; نمودار ۳b). بررسی چرخه سلولی: جمعیت سلول‌های فاز S و فاز G₂ سلول‌های تیمار شده با میدان هم در سلول‌های ۲۴ ساعت تیمار شده و هم ۶ ساعت تیمار شده در دوره‌های ۲۴ ساعته دچار تغییر شد. به این ترتیب که، ۲۴ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی عمیلی‌تسلا، میزان جمعیت سلول‌ها در فازهای S و G₂ کاهش یافت ($p=0/046$), اما ۳۰ و ۳۶ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها، جمعیت این دو فاز رو به افزایش گذاشت و جمعیت سلولی فاز G₁ کاهش یافت ($p<0/05$). با این وجود، ۴۸ ساعت بعد از تیمار، جمعیت سلولی فازهای S و G₂ دوباره کاهش و جمعیت فاز G₁ افزایش

وسترن بلات

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



شکل ۱) نتایج آزمایش وسترن بلات: (a) فسفریلاسیون پروتئین ATM در ناحیه آمینواسید سرین ۱۹۸۱ در زمان‌های تابش دهی مختلف؛ (b) فسفریلاسیون پروتئین E2F1 در ناحیه آمینواسید سرین ۳۱ در زمان‌های تابش دهی مختلف

بحث

دودمان سلولی T-لنفوبلاست انسانی یورکت 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 یورکت برای بررسی نحوه ترمیم و آپوپتوزیس مستقل از ژن طبیعی p53 مناسب هستند. این دودمان سلولی، به علت 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.

بر اساس نتایج این پژوهش، میدان مغناطیسی ایستا با شدت عملی تسلا می‌تواند موجب افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های یورکت شود. با توجه به مطالعات گذشته، احتمالاً میدان مغناطیسی با تاثیری که بر خاصیت دیامغناطیسی غشای پلاسمایی می‌گذارد، موجب کاهش غلظت یون کلسیم درون سلولی شده و از این طریق، موجب افزایش آپوپتوزیس در دودمان سلولی یورکت 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 فنتون 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 درون سلولی می‌گردد و از این طریق، ممکن است موجب کاهش یون کلسیم در سلول‌های تابش دیده شود [۲۶]. نتایج این پژوهش در مورد القای آپوپتوزیس و کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های تیمار شده 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 به طور مستقیم یا غیرمستقیم در سلول‌های یورکت ایجاد می‌کند، باعث تاخیر در چرخه سلولی آنها شده و باعث توقف موقتی چرخه سلولی در فاز G₂ شود. این نتیجه با گزارش چیونا و همکاران همخوانی دارد [۲۸]. این امر ممکن است منجر به افزایش جمعیت سلول‌ها در فاز S و G₂ و کاهش جمعیت سلول‌ها در فاز G₁ شود. در پایان فاز G₂ 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 کاهش یافته فاز G₁ 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 وسترن بلات در سلول‌های تیمار شده 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 تابش دیده 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 یورکت ارایه نمود، اثر

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, Kiriya 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- Evgenyev MB, Garbuz D, Zatschina OG. Heat shock proteins: Functions and role in adaptation to hyperthermia. *Ontogenez*. 2005;36(4):265-73.

21- Asea A. Chaperone-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. *Bioelectromagnetics*. 2003;24(2):109-17.

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 تأثیر 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 تابش دیده با میدان مغناطیسی عملی‌تسلا نشان نداد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که تابش ۶مساخته میدان مغناطیسی ایستا با شدت عملی‌تسلا برای القای آپوپتوزیس در سلول‌های یورکت کافی است. شناخت مسیره‌های 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

- through intermolecular autophosphorylation and dimer 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, Johnson 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.
- 26- Lai H, Singh NP. Magnetic field induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect*. 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