



The Effect of Static Magnetic Field on the Rate of proIAPP Amyloid Structures Formation and the Toxicity of Amyloid Structures of Lysozyme

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hassanlou M.*¹ PhD

How to cite this article

Hassanlou M. The Effect of Static Magnetic Field on the Rate of proIAPP Amyloid Structures Formation and the Toxicity of Amyloid Structures of Lysozyme. Pathobiology Research. 2020;23(3):149-156.

ABSTRACT

Aims Living cells have an electrical charge created by the presence of ions and free radicals. Magnetic fields interact with ions, especially ferromagnetic materials such as iron that affect living cells. A common feature of about 20 different diseases is the aggregation of proteins in the form amyloid structure. In the current study, the effect of static magnetic field (SMF) on the formation and the toxicity of amyloid structures was investigated.

Materials & Methods CHO cells were exposed to 6mT SMF in three consecutive days, and the effect of SMF on the formation of amyloid structures in the intrinsic proteins of these cells related to the control was investigated using thioflavin T (ThT) binding assay. The formation of amyloid structures in CHO cells expressing human ProIAPP cells was analyzed by observation of proIAPP protein aggregates linked to GFP protein. The effect of SMF on the toxicity of lysozyme oligomers on CHO and Hela cells was also compared with the controls.

Findings Exposure of CHO cells to magnetic fields does not have a significant effect on the formation of amyloid structures in the intrinsic proteins of CHO cells and the amount of these structures in CHO cells expressing proIAPP protein but can increase the toxicity of lysozyme oligomers on CHO and Hela cells.

Conclusion The magnetic field does not have a significant effect on the formation of amyloid structures in the 6mT SMF strength, but it adds to the toxicity of these structures.

Keywords Static Magnetic Field; Lysozyme; Islet Amyloid Polypeptide

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Biology Faculty, Women's University of Semnan (Farzanegan), Semnan, Iran

*Correspondence

Address: Biology Faculty, Women's University of Semnan (Farzanegan), Semnan, Iran. Postal Code: 3519735117

Phone: +98 (23) 33469425

Fax: +98 (23) 33469425

hassanlou@fgusem.ac.ir

Article History

Received: March 18, 2020

Accepted: August 12, 2020

ePublished: September 20, 2020

CITATION LINKS

[1] The magnetic field of planet ... [2] Senescence delay and change of antioxidant enzyme levels in ... [3] Observational constraints on the dynamics of the interplanetary magnetic ... [4] Effect of electromagnetic field exposure on the reproductive ... [5] Biological effects of weak electromagnetic ... [6] Application of variable magnetic fields in medicine-15 years ... [7] SUB chronic effects of electromagnetic field exposure of ... [8] Effects of low-field magnetic stimulation on brain glucose ... [9] Investigating the effect of magnetic field on cortisol, blood sugar, triiodothyronine and thyroxin ... [10] Prenatal exposure to extremely low frequency magnetic field and its impact on fetal ... [11] Effects of radiofrequency radiation in the presence of gold nanoparticles ... [12] Residential magnetic fields and the risk of ... [13] Effects of static magnetic field exposure on hematological and biochemical ... [14] Antioxidant capacity of parsley cells ... [15] Possible role of iron containing proteins in physiological ... [16] Recent advances in the diagnosis, risk stratification, and management ... [17] The Pathology of Amyloidosis in ... [18] Advances in protein misfolding, amyloidosis ... [19] Systemic amyloidosis: Moving ... [20] Is type 2 diabetes an amyloidosis and does it really matter ... [21] Cloning and expression of human islet amyloid ... [22] Half a century of amyloids: Past, present ... [23] The systemic ... [24] Update on treatment of light chain ... [25] Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation ... [26] Static magnetic field exposure reproduces cellular ... [27] Electromagnetic field modulates aggregation ... [28] Alzheimer's disease, inflammation, and the role ... [29] Effect of weak combined static and extremely low-frequency alternating ... [30] Electric field as a disaggregating agent for amyloid ... [31] Static magnetic fields can diminish neuron spines through microtubule ... [32] Amyloidosis: Pathogenesis and new therapeutic ... [33] Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems ... [34] Static magnetic fields modulate the response of different oxidative ... [35] Effects of magnetic fields on the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances induced ... [36] Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: Apoptosis, necrosis and free radical ...

تأثیر میدان مغناطیسی ایستا بر میزان تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی proIAPP و میزان سمیت ساختارهای آمیلوئیدی حاصل از لیزوزیم

مریم حسنلو^{PhD}

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه خوارن سمنان (فرزانگان)، سمنان، ایران

چکیده

اهداف: سلول‌های زنده دارای بار الکتریکی هستند که به واسطه حضور یون‌ها و رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شوند. میدان‌های مغناطیسی با برهمکنش با یون‌ها و به‌ویژه مواد فرومگنتیک نظیر آهن بر سلول‌های زنده تأثیر می‌گذارند. ویژگی مشترک حدود ۲۰ بیماری مختلف، تجمع پروتئین در قالب رسوباتی با ساختار آمیلوئیدی است. در مطالعه حاضر تأثیر میدان مغناطیسی ایستا (SMF) بر میزان تشکیل و سمیت ساختارهای آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: سلول‌های CHO در مواجهه با میدانی با قدرت ۶ میلی‌تسلا در سه روز متوالی قرار گرفتند و تأثیر SMF در تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی در پروتئین‌های ذاتی این سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل به کمک آزمون اتصال تیوفلاوین T (ThT) مورد بررسی قرار گرفت. میزان تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی در سلول‌های CHO بیان‌کننده ProIAPP انسانی نیز در مواجهه با میدان به کمک مشاهده تجمعات پروتئینی حاصل از proIAPP متصل به پروتئین GFP مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر SMF بر سمیت حاصل از الیگومرهای لیزوزیم بر سلول‌های CHO و Hela نیز نسبت به نمونه کنترل بررسی شد.

یافته‌ها: قرارگرفتن سلول‌های CHO در معرض میدان مغناطیسی تأثیر معنی‌داری بر تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی در پروتئین‌های ذاتی سلول‌های CHO و میزان این ساختارها در سلول‌های CHO بیان‌کننده پروتئین proIAPP ندارد، اما می‌تواند سمیت الیگومرهای لیزوزیم را بر روی سلول‌های CHO و Hela افزایش دهد.

نتیجه‌گیری: میدان مغناطیسی با قدرت ۶ میلی‌تسلا بر تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی تأثیر معنی‌داری ندارد، اما بر سمیت این ساختارها می‌افزاید.

کلیدواژه‌ها: میدان مغناطیسی ایستا، لیزوزیم، پلی‌پپتید آمیلوئیدی جزیره‌ای

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲

نویسنده مسئول: hassanlou@fgusem.ac.ir

مقدمه

میدان‌های مغناطیسی و الکترومغناطیسی دارای اثرات متعددی بر موجودات زنده از جمله انسان‌ها هستند. این میدان‌ها هم به‌صورت طبیعی از کره زمین ساطع می‌شوند^[1] و هم به‌طور مصنوعی از لوازم متعدد ساخته دست بشر تولید می‌شوند^[2]. میدان مغناطیسی به دو صورت پایا و ایستا وجود دارد. طیف و شدت امواج مغناطیسی گستره بسیار وسیعی را شامل می‌شود. امواج بسیار ضعیف با شدت ۱۰۰ نانوتسلا تا ۰/۵ میلی‌تسلا به‌صورت طبیعی از هسته کره زمین ساطع می‌شوند. امواج بسیار قوی‌تر شامل چندین مگاتسلا نیز وجود دارند که توسط دستگاه‌های مصنوع بشر تابش می‌شوند^[3].

با گسترش روزافزون استفاده از دستگاه‌ها و تجهیزات الکتریکی و الکترونیکی، شدت امواج الکترومغناطیسی در محیط اطراف زندگی بشر به‌سرعت افزایش یافته و بحث درباره اثرات مضر احتمالی این امواج را برانگیخته است. کارکنان مجتمع‌های صنعتی به‌طور دایم تحت تابش میدان‌های مغناطیسی کم‌فرکانس حاصل از سیستم‌های الکتریکی و دستگاه‌های الکترونیکی مختلف هستند. همچنین میدان‌های مغناطیسی در علوم مختلف پزشکی کاربردهای فراوانی دارند. از جمله این کاربردها می‌توان به ابزارهای تشخیصی MRI، مگنتوانسفالوگرافی، مگنتوکاردیوگرافی و برخی روش‌های درمانی دیگر اشاره کرد^[4, 5]. برخی از مواد در بدن انسان مانند هموگلوبین، رودوپسین (رنگدانه بینایی)، رادیکال‌های آزاد و اکسیدنیتریک، مولکول‌های بیولوژیکی با خواص مغناطیسی هستند و میدان‌های مغناطیسی قدرت نفوذ بیشتری در بافت‌های حاوی این بیومولکول‌ها دارند و اثراتی ایجاد می‌کنند^[6]. برخی از این اثرات عبارتند از اثر بر فعالیت آنزیم‌ها^[7]، غدد درون‌ریز و متابولیسم^[8]، هدایت عصبی^[9]، سیکل رشد و اثرات جنینی^[10] که در مطالعات مختلف بررسی شده‌اند. برهم‌کنش میدان‌های الکترومغناطیسی با سیستم‌های زنده موضوع مطالعات بسیاری در سطح دنیا بوده است. همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک فراوانی ارتباط میان تابش با امواج الکترومغناطیسی با فرکانس پایین و برخی از انواع سرطان‌ها را بررسی کرده‌اند^[11, 12]. نتایج حاصل از این بررسی‌ها نشان داد، آلودگی‌های الکترومغناطیس سبب اختلال متابولیسم بدن، سردرد، اضطراب، مشکلات خواب، تومورهای مغزی، افسردگی، ناباروری، کاهش حافظه، تضعیف سیستم ایمنی بدن، افزایش فشار خون، اختلال عملکرد غده تیروئید و غیره می‌شود. همچنین برخی تحقیقات نشان داده است که قرارگیری موبایل در فاصله ۱۷ سانتی‌متری قلب سبب بی‌نظمی ریتم قلب می‌شود^[13]. در مطالعات متعددی افزایش فعالیت، غلظت و نیمه‌عمر رادیکال‌های آزاد، تغییر غلظت کلسیم درونی (پیام‌رسانی کلسیم)، تغییر فعالیت و محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تغییر ساختار چهارم پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی دارند آهن در مواجهه با میدان مغناطیسی ایستا (SMF) دیده شده است^[14, 15].

تجمع پروتئین به شکل رسوبات آمیلوئیدی ویژگی بارز چندین بیماری از جمله آلزایمر، پارکینسون، دیابت نوع دو و بیماری آمیلوئیدی سیستمیک است^[16]. در این اختلالات، به‌طور معمول پروتئین‌های محلول در سلول به‌صورت فیبریل‌های نامحلول در داخل یا خارج از سلول رسوب می‌کنند و باعث تخریب ساختار بافت می‌شوند و عملکرد سلول و غشای آن را مختل می‌نمایند. نشان داده شده است که بیش از ۲۰ پروتئین مختلف فیبریل‌های پایه مشترک شامل صفحات به‌شدت منظم بتا هستند^[17]. بسته به موقعیت قرارگیری رسوبات آمیلوئیدی، طیف گسترده‌ای از انواع سلول‌ها می‌تواند دچار آسیب شود. به‌عنوان مثال مرگ سلول‌های

همچنین یکسوکنده تمام موج تک فاز استفاده شد. ژنراتور SMF به گونه‌ای طراحی شده است که در دامنه ۰/۵ تا ۳۰ میلی‌تسلا باشد. برای جلوگیری از افزایش دما از یک سیستم گردش آب در اطراف سیم‌پیچ استفاده شد. نمونه‌ها بین صفحه‌های آهنی دایره‌ای قرار داشتند که دمای آن تقریباً مشابه سایر قسمت‌های اتاق $\pm 1^\circ\text{C}$ بود. یک اسیلوسکوپ ۴۰ مگاهرتز با مدل ۸۰۴۰ (لیدر؛ ژاپن) برای شناسایی وجود هر گونه پالس جریان از یکسوکنده به دستگاه‌های تولیدکننده SMF و فرکانس پالس از ۵۰ هرتز با طیف وسیعی از تغییر ولتاژ در حدود ± 1 ولت استفاده شد. یک تسلا متر (PHYWE، 13610.93؛ آلمان) با یک نوع پروب هال‌سوند برای کالیبراسیون سیستم و آزمایش صحت و یکنواختی SMF استفاده شد. دقت سیستم برابر $\pm 0.1\%$ و دامنه اندازه‌گیری‌ها ۰/۵ تا ۳۰ میلی‌تسلا بود. سلول‌های کشت شده به مدت ۴ ساعت در معرض SMF با قدرت ۶ میلی‌تسلا به ترتیب در دو و سه روز متوالی در آزمایش تشکیل آمیلوئید و آزمون MTT قرار گرفتند. نمونه‌های کنترل که فقط میدان مغناطیسی ایستای طبیعی زمین را داشتند (حدود ۵۰ میکروتسلا) به اندازه کافی دور از دستگاه مولد میدان قرار داده شدند. در هنگام قرارگرفتن سلول‌ها در معرض میدان دما توسط دماسنج در محل میدان و در ناحیه قرارگیری سلول‌های کنترل که در دمای محیط و به دور از میدان قرار داشتند اندازه‌گیری شد. به علت وجود سیستم سردکننده دمای دستگاه مولد میدان و دمای محیط آزمایشگاه یکسان بود و قراردادن ترمومتر در این مکان‌ها ثابت بودن دما در هر دو ناحیه را نشان می‌داد (داده‌ها نشان داده نشده است).

برای مشاهده فلورسانس EGFP سلول‌ها از میکروسکوپ فلورسانس IX70 (نیکون؛ ژاپن) استفاده شد. برای هر نمونه حدود ۲۰۰ سلول ترانسفکت شده شمارش شد. دو آزمایش مستقل با تکرار سه‌گانه انجام گرفت. برای زیرمکان سلولی پروتئین EGFP، سلول‌های CHO در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت و ترانسفکت شدند. پس از ۴۸ ساعت، سلول‌های ترانسفکت شده توسط پروپیدیوم پدید، مطابق دستورالعمل سازنده رنگ‌آمیزی شدند.



شکل ۱- دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا

به منظور جداسازی رسوبات نامحلول آمیلوئیدی سلول‌های CHO در فلاسک ۷۵ سانتی‌مترمربعی کشت داده شدند و در دو روز متوالی در معرض SMF قرار گرفتند. پس از آن، سلول‌ها به کمک بافر لیز (۲۰ میلی‌مولار تریس- هیدروکلراید، pH برابر با ۷/۴،

عصبی که همراه با بیماری‌های زوال عصبی از جمله آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون است^[18]، مرگ سلول‌های کبدی و نفروسیته‌ها که در بیماری آمیلوئیدی سیستمیک ناشی از تجمع پروتئین لیزوزیم مشاهده می‌شود^[19] و از بین رفتن سلول‌های β پانکراس توسط تجمع پروتئین IAPP رخ می‌دهد و در دیابت نوع دو دیده می‌شود^[20].

هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر میدان مغناطیسی ایستا در شدت‌های کم بر تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی و سمیت سلولی آن است. برای این منظور از دو نوع پروتئین با پتانسیل آمیلوئیدزایی بالا استفاده شده است: پیش‌ساز پلی‌پپتید آمیلوئیدی جزیره‌ای انسانی (proIAPP) که در دیابت نوع دو دخیل است، به‌عنوان مدل پروتئین داخل سلولی به‌شدت آمیلوئیدزا برای بررسی اثر SMF در میزان تشکیل آمیلوئید در درون سلول و لیزوزیم، که یک پروتئین همه‌جا موجود بوده و در بیماری آمیلوئیدی سیستمیک درگیر است، به‌عنوان یک پروتئین مدل خارج سلولی برای بررسی اثر SMF بر سمیت آمیلوئید استفاده شد^[11].

مواد و روش‌ها

لیزوزیم سفیده تخم مرغ و عامل ترانسفکشن ESCORTTM II (Sigma-Aldrich؛ ایالات متحده)، معرف‌های کشت سلولی (Invitrogen و Gibco؛ ایالات متحده) و معرف MTT و پروپیدیوم پدید (Roche Applied Science؛ PI؛ آلمان) خریداری شدند.

توالی hProIAPP از وکتور باکتریایی pET32-Lic (هدیه خانم دکتر Kapurniotu، دانشگاه توبینگن، آلمان) تکثیر شد و به جایگاه‌های XhoI و EcoRI در وکتور بیانی پستانداران با نام EGFP-N1 حاوی پروموتور CMV ساب‌کلون شد. همچنین از پرایمر

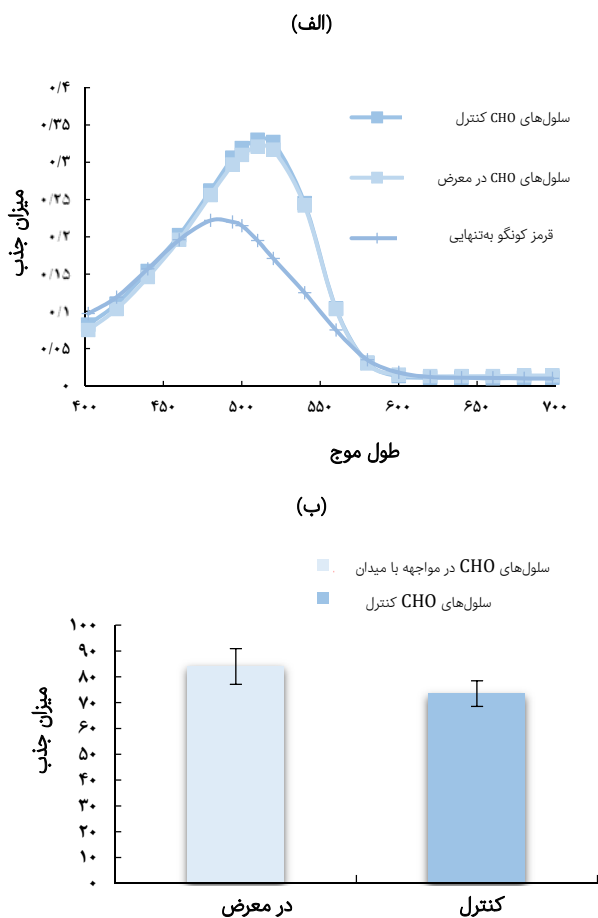
3' CCGCTCGAGATGCCCATTTGAAAGTCATCAGGTGGA-5' و 5' CCGGAATTCTAAGGGCAAGTAATTTCAGTGGCTC-3' به‌عنوان پرایمر رو به جلو و وکتور EGFP-N1 بدون توالی کلون‌شده در آن به‌عنوان پلاسמיד کنترل استفاده شده است. سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) و سلول‌های Hela در محیط اصلاح‌شده Eagle Dulbecco (DMEM) با ۱۰٪ (حجمی/حجمی) سرم جنین و آنتی‌بیوتیک در یک فضای مرطوب با ۵٪ CO₂ در ۳۷°C کشت داده شدند. کشت سلول‌ها در یک پلیت ۲۴ خانه با تراکم ۵۰ تا ۷۰٪ انجام شد. ترانسفکشن توسط ESCORT TM II (سیگما- آلدریج؛ ایالات متحده) و طبق دستورالعمل سازنده انجام گرفت.

قرارگرفتن در معرض SMF توسط یک ژنراتور به‌طور محلی طراحی شده SMF انجام شد (شکل ۱). برای تأمین نیروی الکتریکی از منبع تغذیه ۲۲۰ ولت AC مجهز به ترانسفورماتور متغیر و

سلول‌های تیمار شده با $p < 0/05$ در مقابل کنترل بدون تیمار قرار گرفت.

یافته‌ها

برای بررسی تاثیر SMF در تشکیل آمیلوئید، سلول‌های CHO به مدت ۴ ساعت در طی دو روز متوالی در معرض ۶ میلی‌تسلا SMF قرار گرفتند. محتویات آمیلوئید سلول‌های CHO با استفاده از آزمون اتصال تیوفلاوین T (ThT) و قرمز کونگو (CR) اندازه‌گیری شدند. به دلیل وجود خصوصیات رنگ‌پذیری و بیوفیزیکی مشترک، ساختارهای آمیلوئیدی را می‌توان با تکنیک‌های مختلفی از جمله تغییر در قدرت فلورسانس تیوفلاوین T یا قرمز کونگو شناسایی کرد [2]. مشخص شده است که ThT نشر فلورسانس افزایش‌یافته‌ای را در زمان اتصال به فیبریل‌های آمیلوئیدی در ۸۰ نانومتر نشان می‌دهد [16]. همچنین اتصال به آمیلوئیدها باعث تغییر ویژه‌ای در جذب نوری حداکثری CR از ۴۹۰ به ۵۴۰ نانومتر می‌شود [17]. همان‌طور که در نمودارهای ۱- الف و ب نشان داده شده است، تفاوت معنی‌داری در میزان آمیلوئید بین سلول‌های در معرض میدان مغناطیسی در مقایسه با سلول‌های کنترل وجود ندارد.



نمودار ۱ (الف) تاثیر SMT بر تشکیل آمیلوئید در سلول‌های CHO با استفاده از آزمون اتصال قرمز کونگو (الف) و به کمک آزمایش اتصال تیوفلاوین T (ب)

۱۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، ۱۰ میلی‌مولار فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید، ۱۰ میلی‌مولار Na_2NO_4 ، ۱۰ میلی‌مولار سدیم‌فلوراید، ۵٪ حجمی/حجمی نونیدت P-40، ۱۰ میلی‌مولار EDTA و مهارکننده‌های پروتئاز کامل (IX)، در معرض سه چرخه انجماد-ذوب قرار گرفتند [12]. هسته‌ها توسط سانتی‌فیوژ در ۱۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C از لیز خارج شدند. غلظت عصاره‌های حاصل با استفاده از روش TCA-Lowry اصلاح‌شده اندازه‌گیری و غلظت مساوی پروتئین در ۴°C با سرعت ۱۰۰۰۰g و به مدت یک ساعت سانتی‌فیوژ شد. رسوبات حاصل سه بار با بافر لیز شسته و سپس در ۲۰ میکرولیتر بافر لیز مجدداً تخلیق شدند.

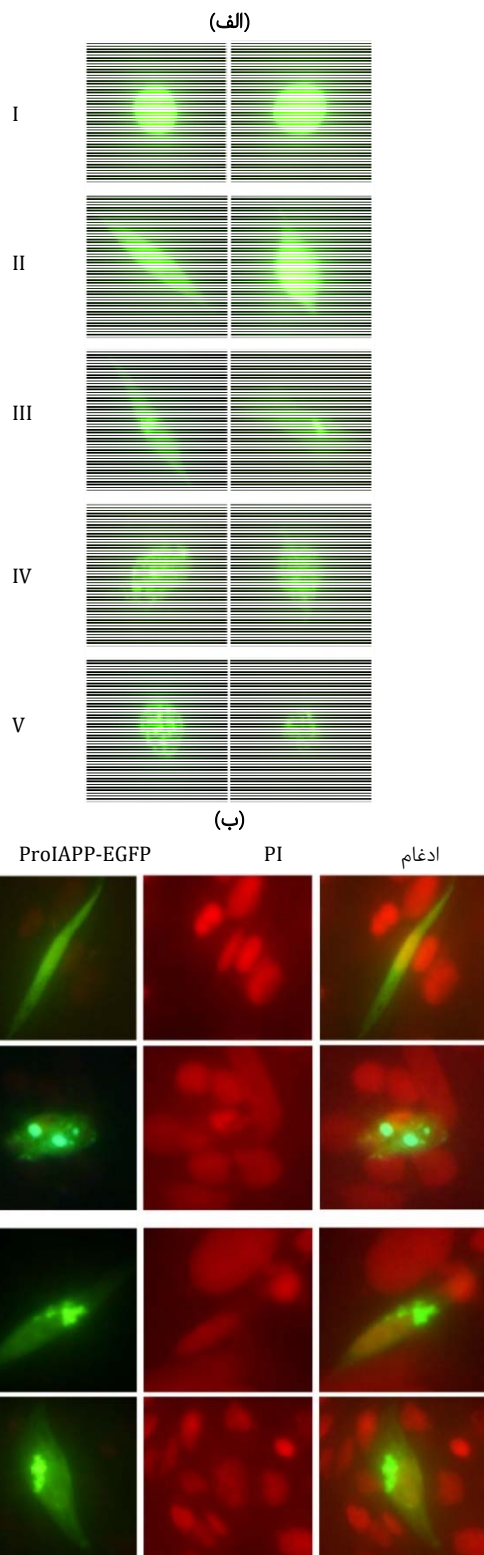
برای سنجش اتصال تیوفلاوین T، ابتدا اتصال تیوفلاوین T (ThT) انجام شد [14]. مخزن ThT با حل محلول ThT در سدیم فسفات (Na_2HPO_4 ۵۰ میلی‌مولار، NaH_2PO_4 ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۶) تهیه و محلول با استفاده از یک فیلتر ۰/۲ میکرونی فیلتر شد. حجم نهایی ۱۰ میکروگرم نمونه به ۴۹۰ میکرولیتر رسانده و سپس با ThT مخلوط شد (غلظت کل ۱۳ میکرومولار بود). اندازه‌گیری شدت فلورسانس ThT متعاقباً با طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر انجام شد. شدت نشر در ۸۵ نانومتر با استفاده از طیف‌سنج RF-5000 (Shimadzu: ژاپن) ثبت شد.

به منظور تولید ساختارهای الیگومری، لیزوزیم سفیده تخم مرغ در غلظت نهایی ۳/۳۲ میلی‌مولار در دمای ۵۷°C به مدت ۶۰ ساعت در بافر گلیسین ۲۰ میلی‌مولار با pH برابر ۲/۲ انکوبه شد [15].

به منظور ارزیابی قدرت زنده‌ماندن سلولی، سلول‌های CHO و Hela در تراکم ۳۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند و سپس محیط کشت تعویض شد و مختلف الیگومرهای لیزوزیم (۵، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در حجم نهایی ۵ میکرولیتر) ابتدا در محیط کشت رقیق و سپس برای رسیدن به غلظت نهایی مورد نیاز به سلول‌ها اضافه شدند. از سلول‌های تیمارنشده و همچنین سلول‌های تحت تیمار با بافر انکوباسیون الیگومر (۲۰ میلی‌متر گلیسین، pH برابر ۲/۲) به عنوان شاهد استفاده شد. پس از قرارگرفتن در معرض SMF در سه روز متوالی، ۱۰ میکرولیتر از MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلول اضافه شد. محیط کشت و نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. میزان جذب با یک صفحه خواننده (Labsystem Multiscan ELISA) (RC) در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. زنده‌ماندن سلول به عنوان درصدی از جذب در چاه‌های حاوی سلول‌های تحت تیمار با الیگومر نسبت به سلول‌های تیمارنشده به عنوان شاهد بیان شد. سه آزمایش مستقل هر کدام با تکرار سه‌گانه انجام شدند.

تمام آزمایش‌ها هر سری به صورت سه‌گانه یا چهارتایی انجام و هر سری حداقل دو یا سه بار تکرار شد. نتایج تجربی با آزمون تی-استیودنت جفت‌نمونه‌ای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت میانگین نشان داده شد. سطح معنی‌داری آماری در

میزان زنده ماندن سلول‌ها کاهش می‌یابد، اما این کاهش در سلول‌های قرارگرفته در معرض میدان به لحاظ آماری معنی‌دار نیست (نمودار ۳-ب).



شکل ۲ مورفولوژی سلول‌های CHO بیان‌کننده ProIAPP انسانی؛ (الف) سلول‌ها به دو صورت تجمع‌یافته و نرمال دیده می‌شوند (شماره I و II حالت نرمال و شماره‌های III، IV و V تجمع‌یافته هستند؛ ب) به کمک رنگ‌آمیزی PI، جایگاه درون سلولی تجمع‌های آمیلوئیدی در مجاورت هسته دیده شد (ردیف اول نرمال و بقیه ردیف‌ها تجمع‌یافته هستند)

پروتئین شناخته‌شده آمیلوئیدزای ProIAPP انسانی [20] در سلول‌های CHO کلون شد. سلول‌های CHO در مقابل اثرات مرگ‌بار ساختارهای آمیلوئیدی حاصل از IAPP نسبت به رده‌های سلولی دیگر پستانداران مقاومت بیشتری نشان می‌دهند [21]، به همین دلیل از این سلول‌ها برای بررسی اثرات میدان مغناطیسی بر میزان تولید ساختارهای آمیلوئیدی حاصل از IAPP استفاده شد. ProIAPP به صورت یک پروتئین متصل با EGFP در وکتور بیانی پستانداران برای بررسی مورفولوژی تولید پروتئین تجمع‌یافته در سلول‌های CHO کلون شد. به عنوان کنترل، سلول‌های CHO ترانسفکت شده با EGFP-N1 به کار برده شد. همان‌طور که در شکل ۲-الف نشان داده شده است، ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن سلول‌های CHO که ProIAPP انسانی را بیان می‌کنند دو مورفولوژی کلی شامل تجمع‌یافته و نرمال داشتند. حدود ۸۰٪ مورفولوژی‌های تجمع‌یافته، تجمع پراکنده (I و II) نشان می‌دادند و ۲۰٪ آنها تجمع ناحیه‌ای (III) داشتند. علاوه بر این، رنگ‌آمیزی هسته با رنگ پروپیدیومیدید نشان داد که مکان درون سلولی این پروتئین تجمع‌یافته در مجاورت هسته است (شکل ۲-ب). همچنین در سلول‌های تجمع‌یافته تمامیت هسته از بین رفته است و هسته‌های کوچک به وجود آمده‌اند که بیانگر وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها است، این در حالی است که پراکندگی یکنواختی از نشر فلورسنت EGFP در هسته و سیتوپلاسم در سلول‌هایی که مورفولوژی پراکنده دارند دیده می‌شود.

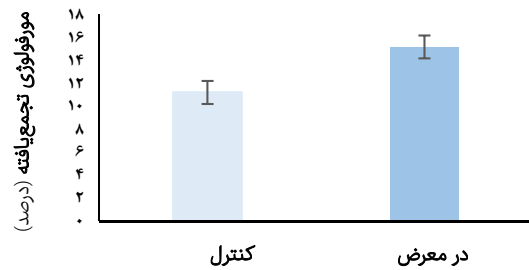
به منظور بررسی تاثیر SMF بر تجمع hProIAPP، وکتور بیان‌کننده hProIAPP-EGFP به صورت گذرا به سلول‌های CHO ترانسفکت شد. سپس سلول‌ها در معرض SMF قرار گرفتند. پس از قرارگرفتن در معرض میدان، ۲۰۰ سلول شمارش شدند. همچنین درصد مورفولوژی‌های تجمع‌یافته ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن مشخص شد.

در هر آزمایش، از دو نوع نمونه کنترل استفاده شد: سلول‌های CHO بیان‌کننده hProIAPP-EGFP در یک محیط بدون مواجهه با میدان مغناطیسی و سلول‌های CHO بیان‌کننده EGFP که در معرض میدان بودند و یا دور از میدان قرار داشتند. همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌های بیان‌کننده hProIAPP-EGFP که در معرض میدان قرار گرفته بودند افزایش مورفولوژی تجمع‌یافته را نشان می‌دادند که البته به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

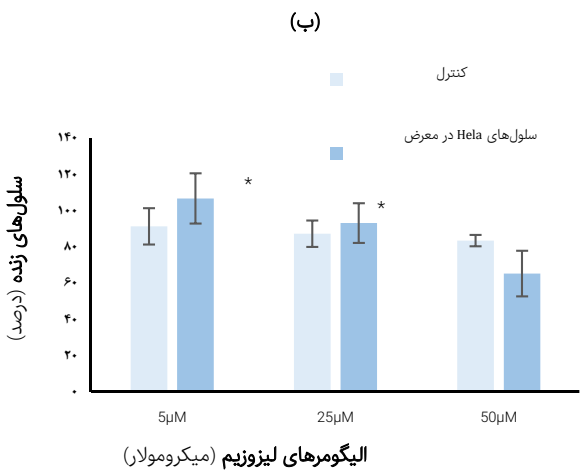
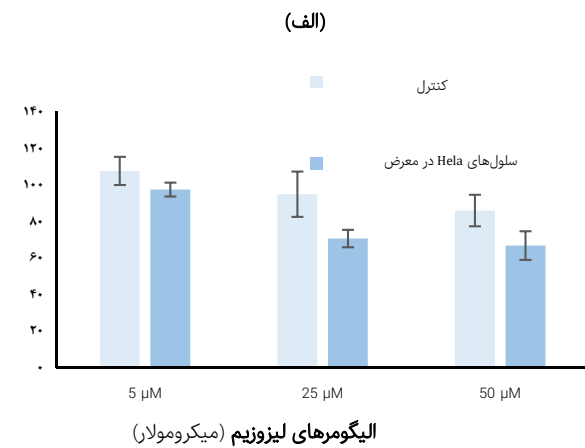
تأثیر SMF بر میزان زنده ماندن سلول‌های CHO و HeLa در حضور لیگومرهای لیزوزیم توسط روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار ۳). نتایج نشان داد که لیگومرهای لیزوزیم بقای سلول CHO و HeLa را به روش وابسته به دوز کاهش می‌دهند. علاوه بر این، در مورد سلول‌های HeLa، کاهش بقا در سلول‌های در معرض میدان به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های کنترل (نمودار ۳-الف) بود. در مورد سلول‌های CHO، با افزایش غلظت لیزوزیم

سلولی و لیزوزیم که یک پروتئین همه‌جا موجود است و در آمیلوئیدوسیزهای سیستمیک دخالت دارد، به‌عنوان یک پروتئین مدل خارج سلول استفاده شد. ۲۱ پروتئین مختلف به‌عنوان عوامل آمیلوئیدزا شناخته شده‌اند [22]. این پروتئین‌ها می‌توانند حالت‌های بدپیچیده شده‌ای را اتخاذ کنند که آنها را مستعد تجمع می‌نماید. فرآیندهای مختلفی منجر به پیش‌نادرست پروتئین‌ها می‌شود. در یک حالت، پروتئین ممکن است به همراه پیرشدن فرد ذاتاً مستعد به‌دست‌آوردن ساختار نامناسب پروتئین باشد، مانند فرم طبیعی پروتئین ترانسیتترین که در بیماران مبتلا به آمیلوئیدوز سیستمیک سالمندان دیده می‌شود. همچنین زمانی که غلظت سرمی پیش‌سازهای پروتئینی افزایش می‌یابد، مانند بیماری که به مدت طولانی همودیالیز می‌شوند و سطح بتا ۲- میکروگلوبولین خونشان افزایش می‌یابد، این پدیده می‌تواند اتفاق بیفتد. در آمیلوئیدوسیز وراثتی، جایگزینی تنها یک اسیدهای آمینه منفرد می‌تواند منجر به ایجاد پروتئین‌های بدتاخورد آمیلوئیدوزا شود که نه‌تنها عملکرد بیولوژیکی خود را از دست می‌دهد بلکه تجمع نیز می‌یابد. pH پایین، افزایش دما، پروتئولیز محدود، اسمولیت‌ها و یون‌های فلزی می‌توانند ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها را عوض کنند و تعادل را به سمت حالت آمیلوئیدزا تغییر دهند و منجر به به‌وجود آمدن فیبریل‌های آمیلوئیدی شوند [23, 24].

مطالعات محدودی بر روی اثرات میدان مغناطیسی ایستا بر تجمع پروتئین انجام شده است. در یک مطالعه اثر میدان مغناطیسی با شدت متوسط بر افراد مبتلا به بیماری پارکینسون که نوعی از بیماری‌های آمیلوئیدی است نشان داد که میدانی به شدت ۲۳۰ تا ۲۸۰ میلی‌تسلا می‌تواند اثرات درمانی مشابه داروی ZM241385 را بر بیماران مبتلا به پارکینسون داشته باشد [25]. در مطالعه دیگری نشان داده شد که میدان‌های الکترومغناطیسی در دامنه خاصی قادر به بازکردن ساختار آمیلوئیدی تجمع‌یافته هستند و از این امر می‌توان برای درمان و پیشگیری از ایجاد ساختارهای آمیلوئیدی استفاده کرد [27]. در مطالعه‌ای که بر روی موش‌های تراریخته دارای پروتئین آمیلوئید بتای انسانی که تجمع آن عامل ایجاد آلزایمر در انسان است انجام شد نشان داده شد که مواجهه با میدان ترکیبی ایستا و متناوب با شدت کم (۴۲٪ میلی‌تسلا) به مدت ۴ ساعت در روز و به مدت ۱۰ روز می‌تواند سطح آمیلوئید بتا و پلاک‌های ناشی از آن را کاهش دهد [28, 29]. در مطالعه دیگری تاثیر میدان ایستا بر جلوگیری از تجمع ساختارهای بتا در یک پلی‌پپتید ساختگی دیده شد [30]. همچنین نشان داده شد که میدان مغناطیسی ایستایی با شدت ۳۰۰ میلی‌تسلا می‌تواند منجر به تغییر ساختار و پلیمریزاسیون میکروتوبول‌های مغز شود و مورفولوژی سلول‌های شبه نورونی را تغییر دهد [31]. در مطالعه کنونی مواجهه سلول‌های CHO و CHO بیان‌کننده پروتئین آمیلوئیدزای IAPP با میدان مغناطیسی به شدت ۶ میلی‌تسلا به مدت ۴ ساعت در روز و در سه روز متوالی تاثیری بر تولید و محتوای آمیلوئیدی این سلول‌ها نسبت به نمونه



نمودار ۲) تاثیر SMF بر میزان تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی در سلول‌های CHO بیان‌کننده hProIAPP-EGFP



نمودار ۳) تاثیر SMF بر سمیت سلولی الیگومرهای لیزوزیم در سلول‌های HeLa (الف) و CHO (ب); * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تاثیر میدان مغناطیسی ایستا بر میزان بقای سلول‌های تیمار شده با الیگومرهای لیزوزیم است ($p < 0.05$).

بحث

در مطالعه حاضر، تاثیر SMF بر تشکیل آمیلوئید و سمیت سلولی آن بررسی شده است. به این منظور، سلول‌های CHO با پروتئین‌های طبیعی خود در معرض SMF با شدت ۶ میلی‌تسلا قرار گرفتند که تفاوت معنی‌داری در محتوای آمیلوئیدی آنها مشاهده نشد. برای تقویت حساسیت آزمایش و بزرگنمایی تاثیر SMF در تشکیل آمیلوئید و سمیت سلولی، از دو نوع پروتئین آمیلوئیدزا استفاده شد. در واقع از پیش‌ساز پلی‌پپتید آمیلوئیدی جزیره‌ای proIAPP انسانی، به‌عنوان یک پروتئین مدل درون

منابع مالی: این تحقیق با حمایت مالی وزارت علوم و تحقیقات و فناوری انجام شده است.

منابع

- Hulot G, Finlay CC, Constable CG, Olsen N, Manda M. The magnetic field of planet earth. *Space Sci Rev*. 2010;152(1):159-222.
- Piacentini MP, Fraternali D, Piatti E, Ricci D, Vetrano F, Dachà M, et al. Senescence delay and change of antioxidant enzyme levels in *Cucumis sativus* L. etiolated seedlings by ELF magnetic fields. *Plant Sci*. 2001;161(1):45-53.
- Leamon RJ, Smith CW, Ness NF, Matthaues WH, Wong HK. Observational constraints on the dynamics of the interplanetary magnetic field dissipation range. *J Geophys Res Space Phys*. 1998;103(A3):4775-87.
- Gye MC, Park CJ. Effect of electromagnetic field exposure on the reproductive system. *Clin Exp Reprod Med*. 2012;39(1):1-9.
- Smith CW. Biological effects of weak electromagnetic fields. In: Ho MW, Popp FA, Warnke U. *Bioelectrodynamics and Biocommunication*. Singapore: World Scientific; 1994. pp. 81-107.
- Sieroń A, Cieślak G. Application of variable magnetic fields in medicine-15 years experience. *Wiadomości Lekarskie*. 2003;56(9-10):434-41. [Polish]
- Hassan BF. SUB chronic effects of electromagnetic field exposure of adult female rats on some hormonal, biochemical and hematological parameters. *Diyala J Agric Sci*. 2011;3(1):47-53.
- Volkow ND, Tomasi D, Wang GJ, Fowler JS, Telang F, Wang R, et al. Effects of low-field magnetic stimulation on brain glucose metabolism. *Neuroimage*. 2010;51(2):623-8.
- Jabbari Vesal N, Rostampour N, Abbasali Pourkabar R, Nikzad S. Investigating the effect of magnetic field on cortisol, blood sugar, triiodothyronine and thyroxine hormones in rat. *Pajouhan Sci J*. 2018;16(3):67-74.
- Ren Y, Chen J, Miao M, Li DK, Liang H, Wang Z, et al. Prenatal exposure to extremely low frequency magnetic field and its impact on fetal growth. *Environ Health*. 2019;18(1):6.
- Nikzad S, Mahmoudi G, Amini P, Baradaran-Ghahfarokhi M, Vahdat-Moaddab A, Sharafi SM, et al. Effects of radiofrequency radiation in the presence of gold nanoparticles for the treatment of renal cell carcinoma. *J Ren Inj Prev*. 2017;6(2):103-8.
- Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Residential magnetic fields and the risk of breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2002;155(5):446-54.
- Amara S, Abdelmelek H, Salem MB, Abidi R, Sakly M. Effects of static magnetic field exposure on hematological and biochemical parameters in rats. *Braz Arch Biol Technol*. 2006;49(6):889-95.
- Rajabbeigi E, Ghanati F, Abdolmaleki P, Payez A. Antioxidant capacity of parsley cells (*Petroselinum crispum* L.) in relation to iron-induced ferritin levels and static magnetic field. *Electromagn Biol Med*. 2013;32(4):430-41.
- Shokrollahi S, Ghanati F, Sajedi RH, Sharifi M. Possible role of iron containing proteins in physiological responses of soybean to static magnetic field. *J Plant Physiol*. 2018;226:163-71.

کنترل نشان نداد. ممکن است این تاثیر در شدت‌ها و زمان‌های مواجهه دیگر با میدان و در مواجهه با عوامل دیگر از جمله یون‌های آهن دیده شود.

فیبریل‌های آمیلوئیدی برای سلول سمی هستند و می‌توانند در عملکرد مناسب سلول اختلال ایجاد کنند. مکانیزم ایجاد اختلال در بیماری‌های آمیلوئیدی شامل تغییر ساختار بافت، برهمکنش با گیرنده‌های سطح سلول، التهاب ناشی از رسوب پروتئین‌های آمیلوئیدی، فعال‌سازی آپوپتوز و به‌ویژه استرس اکسیداتیو است [32]. مطالعه‌ای نشان داده است که مهار میدان مغناطیسی ایستای زمین که شدت آن در دامنه ۲ تا ۲ میکروتسلا است می‌تواند تولید پراکسید هیدروژن را که به‌طور طبیعی در سلول‌های سرطانی رخ می‌دهد کاهش دهد [33]. همچنین مطالعه دیگری نشان داد که میدان‌های مغناطیسی با شدت کم ۰/۸ میلی‌تسلا باعث کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌ها می‌شود [34]. این پدیده در شدت‌های ۲ تا ۴ میلی‌تسلا نیز دیده شده است [35]. با این حال در مطالعه بر روی لنفوسیت موش نشان داده شد که تعداد سلول‌های لنفوسیتی با DNA آسیب‌دیده در مواجهه با میدان مغناطیسی به شدت ۷ میلی‌تسلا همراه با یون آهن نسبت به نمونه کنترل افزایش می‌یابد. مکانیزم ایجاد آسیب در این سلول‌ها افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بروز واکنش‌های اکسیداتیو گزارش شده است [36]. این امر نشان می‌دهد که میدان مغناطیسی ایستا در شدت‌های کم منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و در شدت‌های بالاتر منجر به افزایش آن می‌شود. در مطالعه حاضر مواجهه سلول‌های CHO و Hela با میدان مغناطیسی با شدت ۶ میلی‌تسلا و ساختارهای الیگومری آمیلوئیدی لیزوزیم به مدت ۴ ساعت در روز و در سه روز متوالی منجر به افزایش آپوپتوز در این سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل شد. این امر می‌تواند به‌علت بروز استرس اکسیداتیو ناشی از میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۶ میلی‌تسلا باشد که بر سمیت حاصل از وجود ساختارهای آمیلوئیدی لیزوزیم افزوده و منجر به آپوپتوز در این سلول‌ها شده است. آزمایشات بیشتری برای اطمینان از مسیر پیام‌دهی و وجود آمدن آپوپتوز در این سلول‌ها در مواجهه با میدان لازم است.

نتیجه‌گیری

میدان مغناطیسی با شدت ۶ میلی‌تسلا تاثیر واضحی بر تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی در سلول‌های CHO ندارد، اما می‌تواند بر سمیت این ساختارها در سلول‌های Hela بیفزاید.

تشکر و قدردانی: از خانم دکتر فائزه قناتی به دلیل در اختیار قراردادن دستگاه میدان مغناطیسی ایستا نهایت تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مریم حسنلو، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۱۰۰٪)

- Electromagnetic field modulates aggregation propensity of amyloid peptides. *J Chem Phys.* 2020;152(3):035104.
- 28- Sinyor B, Mineo J, Ochner Ch. Alzheimer's disease, inflammation, and the role of antioxidants. *J Alzheimer's Dis Rep.* 2020;4(1):175-83.
- 29- Bobkova N, Novikov V, Medvinskaya N, Aleksandrova I, Nesterova I, Fesenko E. Effect of weak combined static and extremely low-frequency alternating magnetic fields on spatial memory and brain amyloid- β in two animal models of Alzheimer's disease. *Electromagn Biol Med.* 2018;37(3):127-37.
- 30- Baumketner A. Electric field as a disaggregating agent for amyloid fibrils. *J Phys Chem B.* 2014;118(50):14578-89.
- 31- Dadras A, Naghshineh A, Atarod D, Liaghi A, Riazi GH, Afrasiabi A. Static magnetic fields can diminish neuron spines through microtubule dynamicity disruption. 6th International Conference of Cognitive Science (ICCS) 2015 April 27-29, Tehran, Iran. Piscataway: IEEE; 2015.
- 32- Merlini G, Seldin DC, Gertz MA. Amyloidosis: Pathogenesis and new therapeutic options. *J Clin Oncol.* 2011;29(14):1924-33.
- 33- Martino CF, Castello PR. Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. *PLoS One.* 2011;6(8):e22753.
- 34- Coballase-Urrutia E, Navarro L, Ortiz JL, Verdugo-Díaz L, Gallardo JM, Hernández ME, et al. Static magnetic fields modulate the response of different oxidative stress markers in a restraint stress model animal. *Biomed Res Int.* 2018;2018:3960408.
- 35- Kabuto H, Yokoi I, Ogawa N, Mori A, Liburdy RP. Effects of magnetic fields on the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances induced by iron salt and H₂O₂ in mouse brain homogenates or phosphotidylcholine. *Pathophysiology.* 2001;7(4):283-8.
- 36- Jajte J, Grzegorzczak J, Zmysłony M, Rajkowska E. Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: Apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry.* 2002;57(2):107-11.
- 16- Vaxman I, Gertz M. Recent advances in the diagnosis, risk stratification, and management of systemic light-chain amyloidosis. *Acta Haematol.* 2019;141(2):93-106.
- 17- Picken MM. The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematol.* 2020;143(4):322-34.
- 18- Kundu D, Prerna K, Chaurasia R, Bharty MK, Dubey VK. Advances in protein misfolding, amyloidosis and its correlation with human diseases. *3 Biotech.* 2020;10(5):193.
- 19- Cohen OC, Wechalekar AD. Systemic amyloidosis: Moving into the spotlight. *Leukemia.* 2020;34(5):1215-28.
- 20- Cooper GJ, Aitken JF, Zhang S. Is type 2 diabetes an amyloidosis and does it really matter (to patients)? *Diabetologia.* 2010;53(6):1011-6.
- 21- Bhattacharya S, Latha JN, Kumresan R, Singh Sh. Cloning and expression of human islet amyloid polypeptide in cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356(3):622-8.
- 22- Ke PC, Zhou R, Serpell LC, Riek R, Knowles TP, Lashuel HA, et al. Half a century of amyloids: Past, present and future. *Chem Soc Rev.* 2020;49(15):5473-509.
- 23- Buxbaum JN. The systemic amyloidoses. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(1):67-75.
- 24- Mahmood S, Palladini G, Sanchowala V, Wechalekar A. Update on treatment of light chain amyloidosis. *Haematologica.* 2014;99(2):209-21.
- 25- Picca A, Calvani R, Coelho-Júnior HJ, Landi F, Bernabei R, Marzetti E. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation: Intertwined roads to neurodegeneration. *Antioxidants.* 2020;9(8):647.
- 26- Wang Z, Che PL, Du J, Ha B, Yarema KJ. Static magnetic field exposure reproduces cellular effects of the Parkinson's disease drug candidate ZM241385. *PLoS One.* 2010;5(11):e13883.
- 27- Todorova N, Bentvelzen A, Yarovsky I.