

## تأثیر تابش لیزر بر القای مرگ برنامه دار، در سلول های ماکروفاژ ریوی موش صحرایی

مریم صدری <sup>MS.c.</sup>، عذرا ربانی <sup>Ph.D.</sup> \*\*، عطاء... کوهیان <sup>Ph.D.</sup> \*

### چکیده

**هدف:** تعیین میزان و نحوه اثر پرتوی لیزر هلیوم نئون بر سلولها می باشد. به این منظور درصد بقا و القای آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفاژ ریوی موش صحرایی که در دوزهای مختلف تحت تابش قرار گرفته بودند، بررسی شد و مشخص گردید که این انرژی می تواند بر سیستم ایمنی مؤثر باشد.

**روش بررسی:** منبع انرژی مورد استفاده یک چشمه لیزر کم انرژی (هلیوم نئون با توان ۲mw و طول موج ۶۳۲nm) می باشد که در طول موج نور مرئی قرمز رنگ کار می کند. در این مطالعه ماکروفاژهای ریوی موش صحرایی به طریق لاواژ تهیه شدند. سپس در زمانهای مختلف تحت اثر تابش پرتوی لیزر قرار گرفته، تاثیر آن بر مورفولوژی سلولها و همچنین درصد بقای سلولی بلافاصله بعد از تابش و پس از طی انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. میزان شکست DNA در نمونه های تابش دیده با سلولهایی که در شرایط یکسان نسبت به آنها تهیه شده ولی تابش ندیده بودند، اندازه گیری و مقایسه گردید. زمانهای پرتو دهی سه، هفت، دوازده، بیست و سی دقیقه انتخاب شدند که به ترتیب معادل انرژی های ۳/۶، ۴/۸، ۱/۸، ۰/۴۸ و ۰/۳۶ ژول می باشند.

**یافته ها:** نتایج نشان می دهد که اثرات انرژی لیزر بر روی سلولها برحسب میزان انرژی دریافتی توسط آنها بر مبنای زمان تابش متغیر می باشد. در زمانهای پایین تر از ۷ دقیقه اثری روی مورفولوژی سلولها دیده نمی شود و درصد بقای سلولی با دریافت مقادیر کم انرژی ۳ و ۷ دقیقه معادل ۰/۴۸ و ۰/۳۶ ژول افزایش می یابد. در نمونه هایی که بیش از ۱۰ دقیقه انرژی دریافت کرده اند، بقای سلولی به نحو معنی داری کاهش و درصد قطعه قطعه شدن DNA و میزان سنتز پروتئین در آنها افزایش پیدا می کند. تابش های طولانی تر باعث کاهش چشمگیر درصد بقا و چسبندگی غشاهای سلولی می گردد.

**نتیجه گیری:** این نتایج پیشنهاد می کنند که دوزهای پایین انرژی لیزر (هلیوم-نئون) از پدیده آپوپتوزیس و افت درصد بقا در ماکروفاژها جلوگیری می نماید، ولی افزایش زمان پرتو دهی با بالا بردن میزان انرژی دریافتی سلولها، آپوپتوزیس را در آنها القاء می کند. دوزهای بالاتر سبب وقوع نکروز در این سلولها می گردد.

**واژه های کلیدی:** لیزر هلیوم-نئون، آپوپتوزیس، تخریب DNA، ماکروفاژ

### مقدمه

فرایند مرگ برنامه دار سلولی یا آپوپتوزیس این کنترل دائمی و مناسب را به طور قطع در یوکاریوتها از طریق تولید یک ماده پر قدرت در جهت P53 اعمال می کند. با توجه به اینکه

در یک ارگانیسم یوکاریوت پرسلولی در طی نمو جنین، دگرذیسی و تجدید بافت تعدادی از سلولها باید از بین بروند.

دریافت مقاله: ۸۳/۱۲/۱۰ اصلاح مقاله: ۸۵/۴/۵ پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۸

کهن نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران-ایران  
\* مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران \* \* دانشکده فیزیک، دانشگاه تهران

آدرس پست الکترونیکی: Mary\_Sadri41@yahoo.com

این فرایند روشی برای از بین بردن سلولهای تومورساز نیز می‌باشد، پروتئین عامل راه‌اندازی آپوپتوزیس سد مهم دفاعی در برابر سرطان به حساب می‌آید.

فرآیند آپوپتوزیس شامل فعال سازی مسیری است که دارای مراحل منظم و واکنش‌های متوالی از پیش برنامه‌ریزی شده بوده، اجرای آن مستلزم سنتز RNA و پروتئین می‌باشد. بعد از آن تغییراتی در سلول ایجاد می‌شود: سیتوپلاسم فشرده‌تر شده، حبابهایی در غشای پلاسمایی پدید می‌آید. کروماتین متراکم شده، DNA قطعه قطعه می‌شود. تصویر هسته به صورت خاصی (هتروویکتونیک) درمی‌آید که در آن هسته به قطعاتی تقسیم گردیده است. در نهایت سلول مرده و به تکه‌هایی تبدیل می‌شود که هر یک به بخشی از غشا متصلند. این سلول پس از مرگ به سلولهای اطراف خود می‌چسبد و یک تجمع سلولی را پدید می‌آورد. (۱-۳)

**مسیرهای مختلف القاء** . القای آپوپتوزیس با انواع مختلف تحریک می‌تواند انجام شود؛ فاکتورهای رشد ضروری، تیمار با گلوکورتیکوئیدها، عوامل شیمیایی و فیزیکی دیگر از جمله اشعه‌های یونیزه کننده نظیر اشعه ماورای بنفش و گاما، مواد سایتوتوکسیک که از لنفوسیت‌ها ترشح می‌شوند و واکنش اتصال رسپتور به لیگاند از جمله این محرکها هستند. در ادامه به اختصار به مسیرهای راه اندازی آن اشاره می‌کنیم.

**اتصال رسپتور به لیگاند**. یک رسپتور معروف به FAS و نیز لیگاند آن به نام FAS-L یک جفت پروتئین درون غشای پلاسمایی می‌باشند که تداخل عمل آنها سبب فعالیت یکی از مسیرهای مهم و اصلی آپوپتوزیس می‌گردد. سلول هدف دارای رسپتور FAS می‌باشد و وقتی به سلول دارای لیگاند خود برخورد کند با تداخل عمل میان رسپتور و لیگاند در آن القاء صورت می‌گیرد. رسپتور سطحی FAS به (Tumor Necrosis Factor) TNF مربوط می‌باشد و هر دوی آنها می‌توانند آپوپتوزیس را فعال نمایند.

لنفوسیت‌های T دارای تعداد زیادی رسپتور (از جمله FAS) در غشای خود هستند که قابل انطباق با یک خانواده از پروتئین‌های داخل غشایی به نام لیگاندها می‌باشد که اتصال هر یک از این

رسپتورها با لیگاند خود یک مسیر القای آپوپتوزیس را فعال می‌سازد. کشف یک موتاسیون که LPR نام داشت، در موش شرایط را برای یک مطالعه *in vivo* فراهم کرد. این موتاسیون مغلوب در ژن FAS که در مرگ برنامه‌دار سلولی اختلال ایجاد می‌کند، سبب تکثیر بی‌رویه سلولهای B و T و در نتیجه بیماری ایمنی پیچیده‌ای می‌شود که لنفوسیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. (۴-۱۱) موتاسیون دیگری در ژن رمز کننده لیگاند آن (FAS-L) نیز همین اثر را دارد که منجر به Generalized Lymphoproliferative Disease (GLD) می‌شود. این یافته نشان می‌دهد که مسیر آپوپتوزیس توسط اتصال میان لیگاند FAS-L (محصول GLD) و FAS (محصول LPR) فعال می‌شود. (۱۲-۱۴) غیر از مسیر وابسته به آشکار پروتئازها، مسیر دیگری که شامل پروتئین کیناز JNK می‌باشد هم می‌تواند آپوپتوزیس را آغاز نماید. FAS پس از اتصال به آداپتور رسپتور TNF نیز JNK را به وسیله پروتئین‌های آداپتور مشخصی فعال می‌کند. (۱۴) فعالیت FAS در حالت عادی احتمالاً باعث راه‌اندازی هر دو مسیر می‌شود که اهمیت هر کدام در نوعی از سلولها با نوع دیگر متفاوت است. یکی دیگر از مسیرهای القای آپوپتوزیس، آزادسازی یک مولکول سیتوکروم C از میتوکندری است که سبب فعال شدن یک سری از پروتئازها با عملکرد انهدام ساختارهای سلولی می‌گردد. این پروتئازهای آسپاراتات سیستمین (Aspartate Cysteine) یا خانواده Caspase اعضای مهم انتهایی مسیر آپوپتوزیس هستند. تمام Caspase‌ها به شکل پروتئازهای غیر فعالی سنتز می‌شوند که دارای توالی اضافی در بخش N-ترمینال خود بوده، با جدا شدن این توالی پروتئاز به نوع فعال تبدیل می‌شود. (۱۵-۱۹)

مسیر دیگر شامل تغییراتی است که در جدار میتوکندری پدید می‌آید و تراوایی آن را تغییر می‌دهد در نتیجه یک مولکول سیتوکروم C به همراه پروتئین‌های دیگری از غشای آن آزاد می‌شود. در این راستا ابتدا یک آنزیم پروتئاز به نام Caspase-8 با بریدن بخش C-ترمینال پروتئینی به نام BID آن را فعال و آزاد می‌کند تا روی غشای میتوکندری نشست، باعث آزاد شدن سیتوکروم C شود. این مولکول سیتوکروم C به همراه Apf-1 و

مرگ غیرفعال و پاتولوژیکی سلولها در اثر سموم، حرارت، ویروسها و یا به علت کمبود مواد غذایی نکرور نام دارد که در آن سلول متورم و غشای آن از هم گسیخته و سلول لیز می‌گردد و بر خلاف آپوپتوزیس در محل نکرور التهاب به وجود می‌آید. (۳۴،۳۳)

سلولهای ماکروفاژ یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی می‌باشند. ماکروفاژهای ریوی سلولهای نسبتاً بزرگی هستند که بخش مهمی از سیستم ایمنی بدن پستانداران را تشکیل می‌دهند. از این رو به عنوان زمینه‌ای برای بررسی اثر لیزر بر روی سلولهای زنده انتخاب شدند. (۳۹-۳۵)

**لیزر** . با توجه به نقش مهمی که پرتوی لیزر در سالهای اخیر در بیولوژی و پزشکی داشته است، دانشمندان اثر آن را بر روی بافتهای زنده و سلولهای مختلف بررسی نمودند که نتایج این تحقیقات فعال‌سازی برخی از روندهای حیاتی را پس از دریافت پرتوی لیزر کم انرژی در آنها نشان می‌دهد.

در این بررسی اثر پرتو لیزر هلیوم- نئون که نوعی لیزر کم‌انرژی می‌باشد، بر القای آپوپتوزیس در سلولها مورد مطالعه قرار گرفته است. انرژی لیزر به علت تمرکز زیاد، همدوسی و اتحاد فوتونها در انرژی، دارای میدان، فاز و طول موج فوق‌العاده‌ای است که در سالهای اخیر بسیار کاربرد داشته و به خصوص تأثیر آن بر سلولها موضوع بسیاری از تحقیقات بوده است. به عنوان نمونه در بعضی موارد القای آپوپتوزیس در اثر تابش امواج الکترومغناطیس گزارش شده است (۴۱،۴۰) درحالی که قرار گرفتن در معرض پرتوهای لیزر کم‌انرژی سبب بهبود فرایندهای حیاتی سلولها گردیده تا جایی که روش درمانی به نام LLLT (Low Level Energy Laser Therapy) کاربرد بسیاری پیدا نموده است. بررسی اثر پرتوی لیزر کم‌انرژی بر ضایعات ایجاد شده توسط جراحی در استخوان موش صحرایی نشان داد که استخوان تابش دیده در مقایسه با نمونه‌های شاهد بهبود بیشتری یافته است. تابش لیزر هلیوم- نئون بر صدمات استخوان درشت نی موش صحرایی نیز ترمیم سریعتر بافت را به همراه داشته است. (۴۳،۴۲)

در فیبروبلاستهای دهانی انسان تابش لیزر GaALAs با طول موج ۸۰۹ نانومتر و توان ۱۰ میلی وات به میزان 3-4 J/cm<sup>2</sup>

Caspase-9 مجموعه‌ای را تشکیل می‌دهند که آپوپتوزوم نامیده می‌شود و می‌تواند سلول را در مسیر مرگ برنامه‌دار هدایت نماید. (۲۳-۱۹)

مسیر دیگری که منتهی به شکست در درون DNA می‌شود، مستقیماً توسط آزادسازی آنزیم از میتوکندری هدایت می‌گردد. در این مسیر آنزیم اندونوکلاز G مهم است که به همراه آنزیم همانندسازی DNA در میتوکندری وجود دارد. لذا این آنزیم در مرحله‌ای از آپوپتوزیس در سلولهای آپوپتوتیک از آن آزاد شده، DNA هسته‌ای را تجزیه می‌کند و در مرگ ناگهانی سلول نقشی ندارد. (۲۴)

**مهار آپوپتوزیس** . همانطور که مولفه‌هایی فرآیند آپوپتوزیس را فعال می‌سازند، عواملی هم هستند که آن را مهار و کنترل می‌کنند. (۲۵) اولین بار در جریان تحلیل ژنتیکی مرگ برنامه‌دار سلولی در کرم C - elegans معلوم شد در بعضی جهش یافته‌ها که ژنهای Ced-3 و Ced-4 در آنها آسیب دیده، سلولهایی که باید به طور معمول می‌مردند، زنده می‌مانند. این یافته نشان می‌داد که این ژن‌ها در فرآیند مرگ سلول نقش اساسی دارند. در- C elegans ژن Ced-4 همولوگ Apaf-1 و ژن Ced-3 پروتئازها را رمز می‌کند، Ced-9 نیز آپوپتوزیس را مهار می‌نماید. جهش در Ced-9 آن را غیر فعال می‌کند و سبب مرگ سلولهایی می‌شود که باید باقی بمانند. این مسأله نشان می‌دهد که Ced-3 و Ced-4 تنها در سلولهای آپوپتیک بیان نشده، بلکه در سلولهای دیگر هم بیان می‌شوند و بطور طبیعی فعالیت آنها توسط Ced-9 مهار می‌گردد. (۲۷،۲۶) این تعادل شگفت‌انگیز میان فعال‌سازی و مهار است که کنترل مناسب آپوپتوزیس را بر حیات سلول اعمال می‌کند. تعیین این که سلول به‌طور طبیعی باید زنده بماند یا بمیرد، بستگی به مکانیسم‌های تنظیمی دارد که تعیین می‌کنند کدام مسیر باید فعال یا خاموش گردد. (۳۴-۲۸) با ترشح سایتوتوکسین‌ها نوع دیگری از مسیرهای آپوپتوزیس فعال می‌شود. لنفوسیت‌های T گرانول‌های حاوی پروتئازهای سرین و دیگر مواد کشنده (از جمله Perforin که می‌تواند در غشای سلول هدف سوراخهایی ایجاد کند) از لنفوسیت‌ها جدا شده و سبب القای صورت‌های مختلفی از آپوپتوزیس در سلولها می‌گردد. (۳۲)

از آن به ۹۴/۸ میلیلیتر آب مقطر و ۰/۲ محلول نیم مولار EDTA افزوده و  $\text{PH} = 8$  تنظیم گردید.

**بافر TBE** . از تریس اسیدی ۰/۰۶۸ مولار و اسید بوریک ۰/۰۸۸ مولار و EDTA ۰/۰۰۲۸ مولار تهیه گردید.

**بافر Loading** . پانصد میکرولیتر گلیسرول و ۰/۰۰۱ درصد برومو فنل بلو با پانصد میکرولیتر بافر TBE به خوبی مخلوط شد.

**محلول سنتیلاسیون** . ۳ گرم 2,5Diphenyloxazole (Scintillation Grade) PPO و ۰/۱ گرم POPOP 2,4Methyl 1,5Phenyloxazol-Benzen Scintillation (Grade)

**تابش** . دستگاه لیزر (هلیوم- نئون با توان ۲ mw و طول موج ۶۳۲ nm) منبع پرتو بود که به خاطر خطی و متمرکز بودن لیزر از عدسی محدب کوچکی استفاده شد، به نحوی که پرتو به محل کانون آن تابیده، به‌طور موازی خارج گردد و در نتیجه لکه‌ای به قطر یک سانتیمتر به دست آمد. لوله‌های تابش از جنس پیرکس و شفاف انتخاب شدند تا حداقل جذب را داشته، انرژی پرتو به میزان کافی به سلولها برسد.

**حیوان** . موش صحرایی از نوع Prague-Dawley با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از انیستیتو پاستور خریداری و در شرایط مناسب نگهداری شد.

**تهیه سلولهای ماکرو فاژ** . برای تهیه ماکروفاژهای آلوئولی از روش لاواژ ریه استفاده شد. با ایجاد شکاف کوچکی در نای، ریه‌ها با سرم فیزیولوژیک استریل شستشو و رسوب حاصل سانتریفیوژ گردید (در ۲۰۰۰ دور در دقیقه و ۴ درجه سانتیگراد). رسوب به دست آمده با سرم حاوی ۱۰٪ FCS سوسپانسیون گردید. پس از شمارش سلولی در هر لوله تابش، به سطح مقطع یک سانتیمتر دو میلیون سلول برای تابش قرار داده شد. در هر سری آزمایش ۶ الی ۷ موش صحرایی که به وسیله دی اتیل اتر بیهوش شده بودند، مورد عمل لاواژ ریه قرار گرفتند. پس از شمارش سلولی، شش لوله که هر یک حاوی ۲ میلیون سلول سالم (درصد بقا > ۹۷) بودند، تهیه گردید. یک لوله به عنوان کنترل در همان شرایط بقیه، ولی بدون تابش نگهداری شد. سنجش viability به وسیله رنگ‌آمیزی با تریپان بلو، تهیه لام و شمارش

باعث افزایش فعالیت و تکثیر سلولها نسبت به کنترل در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تابش گردید و این تفاوت تا ۷۲ ساعت معنی‌دار بود. (۴۴) در یک بررسی دیگر مشخص شد که لیزر هلیوم - نئون می‌تواند سلولهای رشته عضلانی و سلولهای اطراف آن را وارد چرخه سلولی و تکثیر نماید. (۴۵)

هدف از این مطالعه بررسی اثر پرتوی لیزر هلیوم- نئون با توان ۲ میلی‌وات و طول موج ۶۳۲ نانومتر بر سلولهای ماکروفاژ می‌باشد. اینکه این اثر وابسته به میزان دوز انرژی دریافتی می‌باشد و تعیین میزان انرژی که در آن آپوپتوزیس به تعویق افتاده، یا القاء می‌شود، به خوبی می‌تواند راهنمای استفاده‌های درمانی از این پرتو و نیز راهگشای تحقیقات بعدی در مورد کشف مکانیسم‌های اثر آن باشد. در این تحقیق با ایجاد دامنه‌ای از انرژی لیزر توسط تغییر دادن زمان تابش، تحولات ایجاد شده در سلولها از جمله تغییرات مورفولوژیک، درصد viability و درصد قطعه قطعه شدن DNA و میزان سنتز پروتئین در سلولها جهت امکان وقوع آپوپتوزیس در آنها بررسی گردید.

## روش بررسی

**مواد مورد استفاده** . رنگهای تریپان بلو و متیلن گرین و اتیدیوم بروماید، مارکر DNA از شرکت سیگما تهیه گردید. DNA استاندارد EcoR1 و پروتئین کیناز-کا (Protein kinas K) و سرم جنین گوساله (Fetal Calf Serum: FCS) و معرف دی‌فنیل‌آمین و دیگر ترکیبات از شرکت Merk تهیه شد. محیط کشت (Dulbcos Modified Eagle Medium: DMEM) از شرکت Gibco خریداری شد. برای تهیه محیط کشت ۳۰ میلیگرم در لیتر آسپاراژین و ۱۲۰ میلیگرم در لیتر پنی سیلین و ۲۰۰ میلیگرم در لیتر استرپتومایسین به محیط کشت افزوده شد و  $\text{PH} = 7$  تنظیم و سپس با استفاده از فیلتر میلی پور محیط کشت استریل گردید.

**بافر لیز کننده سلول** . تریس اسیدی ۱۰ میلی مولار، EDTA ۱ میلی مولار، کلرور سدیم ۰/۱ میلی مولار، SDS ۱ درصد و پروتئین کیناز K ۰/۲ mg/ml و  $\text{PH} = 8$ .

**بافر TE** . محلول یک مولار تریس اسیدی تهیه و پنج میلیلیتر

Policeman جدا و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۹۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و به رسوب هر نمونه، نیم میلی لیتر بافر لیز کننده افزوده گردید و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی در لوله «الف» و رسوب در لوله «ب» نگهداری شد. پس از جداسازی محلول رویی، به رسوب، نیم میلی لیتر بافر لیز سلولی افزوده و به محلول رویی و رسوب هر دو محلول مقدار نیم میلی لیتر TCA ۲۵ درصد اضافه و بعد از ورتکس زدن، یک شب در دمای ۴ درجه نگهداری گردید. سپس در دور ۱۵۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتریفیوژ انجام و محلول رویی جدا و دور ریخته شد؛ به رسوب هر دو لوله «الف» و «ب» ۸۰ میکرولیتر ۵٪ TCA اضافه شد و دو لوله کاملاً تمیز هم از همین محلول به عنوان شاهد نگهداری شد.

نمونه‌ها جهت هیدرولیز DNA به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۳ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس به هر چهار لوله ۱۶۰ میکرولیتر معرف دی فنیل آمین افزوده و جذب آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و درصد شکست DNA از طریق فرمول زیر محاسبه گردید .

$$۱۰۰ \times \text{دانشیته نوری لوله «الف»} + \text{«ب»} / \text{دانشیته نوری لوله «الف»} = \text{درصد شکست DNA}$$

#### اندازه گیری میزان ورود ماده رادیواکتیو در پروتئینها .

در این روش محیط کشت بون اسید آمینه لوسین به کار رفت و به هر ظرف کشت باگنجایش ۱ میلی لیتر ۶۰ میکرولیتر لوسین نشاندار با اکتیویته ۳ تا ۵ میکروکوری افزوده شد. سپس سلولها بعد از طی ۱۸ ساعت انکوباسیون در شرایط استاندارد، از سطوح ظروف کشت جدا و به لوله‌های مخصوص منتقل گردیدند. به هر نمونه یک میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ کاملاً سرد افزوده و ۲۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. به رسوب ۱ میلی لیتر TCA ۱۰ درصد سرد اضافه و چند بار شستشو گردید. در نهایت به رسوب ۲ میلی لیتر اتانول مطلق افزوده و به شدت ورتکس زده شد. هر نمونه با ۸ میلی لیتر محلول سنتیلاسیون تازه تهیه شده مخلوط شد و به لوله‌های مخصوص سنتیلاسیون منتقل گردید و توسط دستگاه سنتیلاسیون مایع (شمارنده بتا) سنجیده شد.

**محاسبات آماری.** در این مطالعه از آزمونهای *t-test* استفاده شد و نتایج با مقدار  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

سلولی انجام گرفت. پس از تهیه لام و مشاهده به وسیله میکروسکوپ، سلولهای مرده با هسته رنگ گرفته، شمارش و سپس از تعداد کل سلولها کسر گردید تا تعداد سلول زنده به دست آید. درصد بقا به این طریق محاسبه شد:

$$۱۰۰ \times \text{کل} / \text{تعداد سلولهای زنده} = \text{Viability}$$

**کشت سلولها پس از تابش .** بلافاصله بعد از تابش با زمانهای مختلف، درصد بقا برای هر نمونه تابش دیده و کنترل (سلولهای مشابه که تابش ندیده‌اند) محاسبه گردید و نمونه‌ها برای بررسی توانایی رشد و تکثیر سلولها در شرایط استاندارد (رطوبت کامل دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $\text{CO}_2=5\%$ ) در محیط DMEM کشت داده شدند.

#### استخراج DNA .

پس از جدا کردن سلولها از ظروف، کشت انجام شد. نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. با افزودن نیم میلیلیتر بافر لیز سلولی به هر نمونه و مخلوط کردن با ورتکس، نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب نگهداری و سپس با محلول فنل، کلوروفرم، ایزو آمیل الکل به نسبت ۱:۲۴:۲۵ DNA موجود در سلولها استخراج و در فاز فنلی قرار گرفت و با دو بار شستشو با کلوروفرم به دقت جدا شد. نیم میلیلیتر از حاوی محلول یک حجم کلرید سدیم ۵ مولار و دو حجم اتانول سرد مطلق به هر نمونه افزوده و یک شب در دمای ۲۰- نگهداری گردید. سپس نیم ساعت در ۱۰۰۰ دور در دقیقه میکروپیوژ گردیده، DNA با اتانول ۷۰٪ شستشو و نهایتاً در خلأ خشک گردید. سپس هر نمونه با پنج میکرولیتر بافر Loading مخلوط و به مدت دو دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس بر روی ژل قرار داده شد.

#### ژل الکتروفورز (ژل آگارز) .

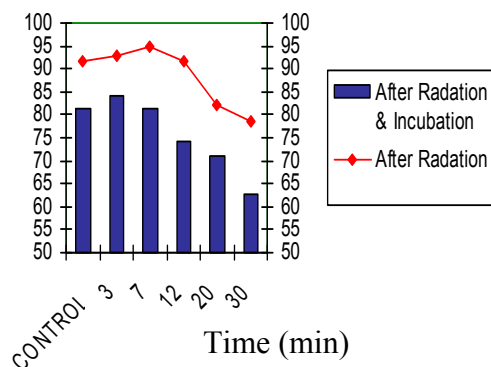
پودر آگارز به نسبت ۱/۲ درصد در بافر TBE حل و برای تهیه ژل در قالب مخصوص ریخته شد و جهت الکتروفورز افقی در ظرف مخصوص درون همان بافر TBE قرار گرفت. سپس به مدت ۱۸ ساعت با ولتاژ ۱۰ ولت الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی به وسیله رنگ اتیدیوم بروماید و سپس مشاهده و عکسبرداری با نور ماورای بنفش انجام شد.

**اندازه گیری میزان قطعه قطعه شدن DNA .** پس از طی زمان کشت، سلولهای چسبیده به کف پتری‌ها با Rubber

## یافته‌ها

نمودار خطی در قسمت بالای شکل شماره ۱ درصد بقای سلولی را بلافاصله پس از تابش نشان می‌دهد. سلولهای با زمان تابش ۳ دقیقه تغییر چندانی را در مورد درصد بقا نشان نمی‌دهند، اما در زمان پرتودهی ۷ دقیقه حداکثر درصد بقای سلولی یعنی ۹۴/۶۶ در مقایسه با نمونه‌های تابش ندیده (نمونه کنترل) به مقدار ۹۱/۸ دیده می‌شود.

%viability



شکل ۱. بررسی اثر پرتو لیزر بر درصد بقای سلولی بلافاصله پس از تابش (به صورت نقطه‌ای در بالا) و بعد از طی زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون (هیستوگرام در پایین) درصد خطای استاندارد: ۳/۰۲

با افزایش انرژی لیزر دریافتی توسط سلولها، درصد بقا مرتباً کاهش می‌یابد، به طوری که در نمونه‌های با ۳۰ دقیقه تابش این عدد به ۷۸/۷ می‌رسد. این روند در میانگین پنج سری آزمایش مستقل که نتایج مشابهی داشتند، مشاهده گردیده و هر نمونه سوسپانسیون حاوی دو میلیون سلول ماکروفاژ بوده است. در مرحله بعد سلولها پس از پرتودهی به مدت ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت کشت داده شدند. با توجه به این داده‌ها بیشترین درصد بقا مربوط به نمونه‌هایی بود که ۳ دقیقه در معرض پرتو بوده‌اند؛ ۸۹/۲۵ درصد که در مقابل نمونه‌های کنترل با ۸۱/۰۵ درصد میزان بقا افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. بالا بردن دوز انرژی دریافتی باعث مرگ و میر بیشتر سلولها می‌گردد. نتایج در نمودار ستونی قسمت پایین شکل ۱ مشخص است.

بررسی سیتولوژیکی سلولهای ماکروفاژ که از ریه موش صحرایی استخراج شده بودند نشان داد که این سلولها زنده و سالم بوده (با درصد بقای سلولی % ۹۸-۹۵) دارای سیتوپلاسم یکپارچه و غشای سلولی

کاملاً سالم می‌باشند. شکل شماره ۲ بررسی سیتولوژیکی سلولهای ماکروفاژی را که در معرض تابش قرار گرفته، با رنگ آمیزی تریپان بلو، در مقایسه با انواع مشابهی که در همان شرایط تهیه و نگهداری گردیده و فقط انرژی لیزر را دریافت نکرده‌اند، نشان می‌دهد. از این رنگ آمیزی برای تعیین درصد بقا نیز استفاده شد. در سلولهای مرده هسته رنگ می‌گیرد و انواع سالم مطابق قسمت A دیده می‌شوند. تابشهای با زمان کمتر از هفت دقیقه اثری بر مورفولوژی سلولها نمی‌گذارند؛ اما با افزایش زمان تابش علاوه بر کاهش درصد بقا تغییراتی همچون فشردگی سیتوپلاسم و دانه دار شدن آن را شاهد هستیم که از مشخصات سلولهای آپوپتیک می‌باشند. در شکل شماره ۲ قسمت A نمونه کنترل و شماره‌های بعدی به ترتیب زمانهای تابش ۱۲، ۲۰ و ۳۰ را نشان می‌دهند که بلافاصله پس از پرتودهی بررسی گردیدند. در قسمت B فشردگی سیتوپلاسم و وجود حبابها در غشا دیده می‌شود. در قسمتهای C و D هم تجمع سلولها مشخص است.

برای بررسی میزان وقوع شکست در DNA ابتدا از روش دی فنیل آمین استفاده شد. در شکل ۳ میزان شکست در سلولها بلافاصله بعد از تابش با استفاده از روش دی فنیل آمین در ستونهای تیره دیده می‌شود. در آزمایش دیگر، سلولها پس از تابش، به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شده، آن گاه با روش فوق بررسی گردیدند (ستونهای روشن). این مقدار در سلولهای تابش ندیده یا زمانهای کمتر از ۷ دقیقه ۱۴ درصد بود و در نمونه‌های ۷ دقیقه اندکی افزایش نشان می‌داد (۱۴/۹۵ درصد)، در زمان ۱۵ دقیقه میزان شکست به ۱۷ درصد و در ۳۰ دقیقه به ۲۳/۶ درصد رسید. در نمونه‌هایی که پس از دریافت پرتو، کشت داده شده بودند نیز به نظر می‌رسد که شکست DNA با همین روند ولی به میزان بیشتری انجام می‌گیرد. ژل الکتروفورز DNA استخراج شده از سلولهای ماکروفاژ پس از قرار گرفتن در معرض پرتو با انواع طبیعی بدون دریافت پرتو (سلولهای کنترل با زمان صفر) مقایسه شد. استخراج DNA بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در شرایط استاندارد و کشت سلولهای مذکور، انجام گرفت.

نتایج این بررسی که در شکل ۴ مشاهده می‌شود روند افزایش در روش دی فنیل آمین را تاثیر نمود. شماره ۱ = کنترل (۰ دقیقه)، شماره ۲ =

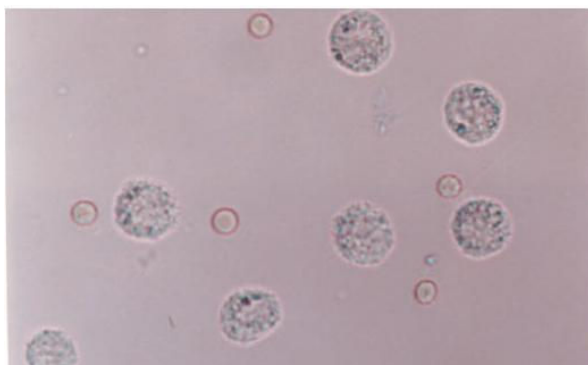
شکل ۲. بررسی مورفولوژی سلولهای ماکروفاژ ریوی در حالت طبیعی و مقایسه آن با انواع مشابهی که زمانهای ۱۲ و ۲۰ و ۳۰ دقیقه تابش لیزر را تحمل نموده‌اند.

رنگ‌آمیزی: تریپان بلو

بزرگنمایی: A-D.40

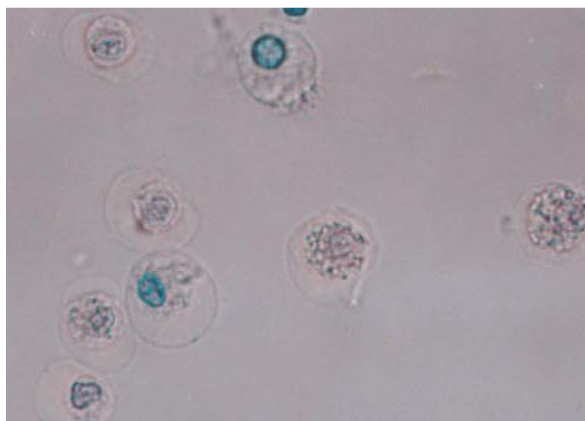
A: سلولهای کنترل که طبیعی بوده و تابش را دریافت نکرده‌اند.

A



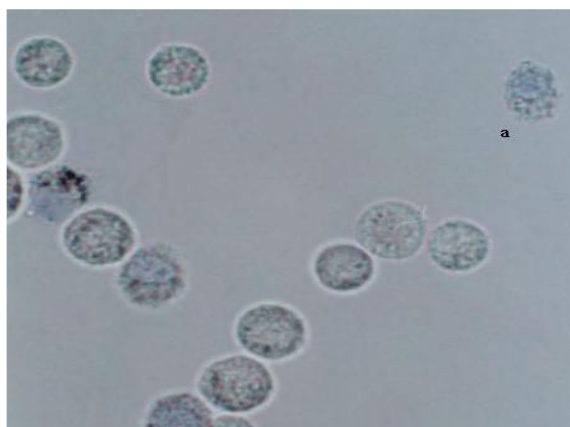
B: سلولهای ماکروفاژ که ۱۲ دقیقه تحت اثر پرتو قرار گرفته‌اند. سیتوپلاسم فشرده و دانه‌دار گردیده در این تصویر دو سلول که به طریقه مرگ برنامه‌دار از بین رفته‌اند با هسته‌های رنگ گرفته دیده می‌شوند.

B

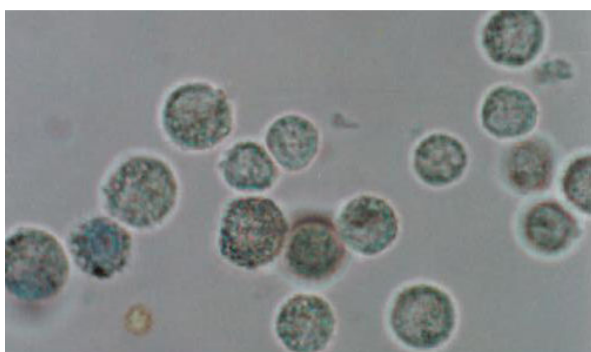


C

a

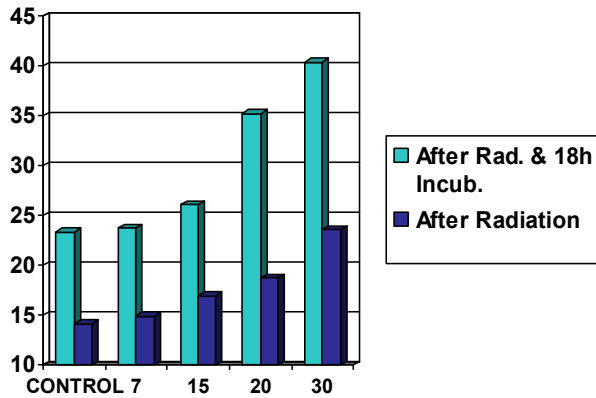


D



C و D: زمانهای ۲۰ و ۳۰ دقیقه سلولهای نکروتیک با حرف a مشخص شده‌اند.



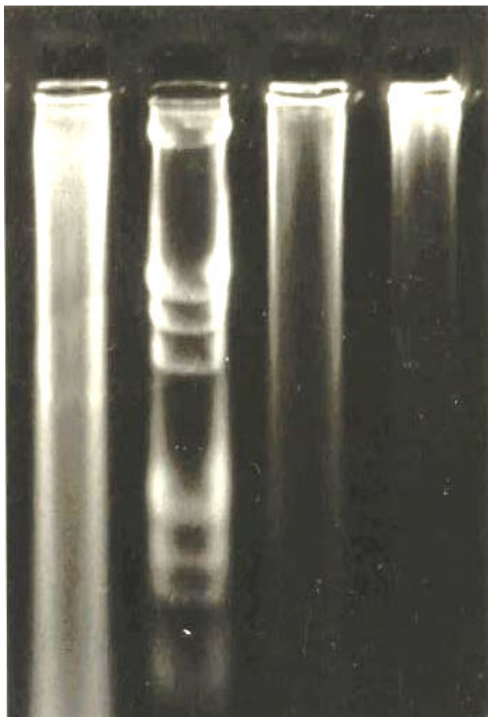


شکل ۳. بررسی میزان قیعه قطعه شدن DNA با روش دی فنیل آمین: بلافاصله پس از تابش به وسیله ستونهای تیره نشان داده شده است در مطالعه دیگری سلولها بعد از پرتو دهی ۱۸ ساعت کشت داده شده سپس مورد بررسی جهت تعیین درصد شکست DNA قرار گرفتند که نتایج آن با ستونهای روشن مشخص است.

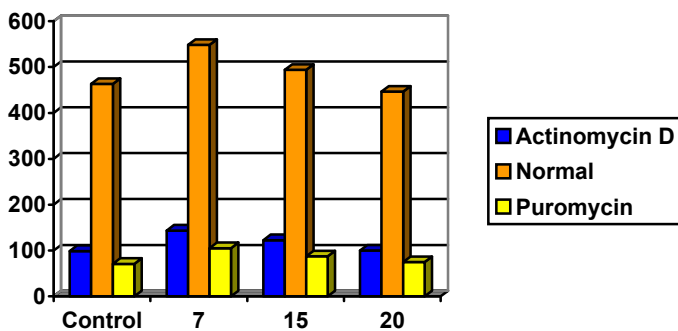
خطای استاندارد:

بلافاصله بعد از تابش: ۱،۸، ۲

پس از تابش و کشت: ۱، ۸، ۹، ۸



شکل ۴. طرح الکتروفورزی ژل آگارز ۱/۲ درصد از DNA استخراج شده از سلولهای ماکروفاژ ریوی که در معرض تابش لیزر با زمانهای مختلف قرار گرفته‌اند: شماره ۱. زمان صفر یا کنترل (بدون تابش)، شماره ۲. ۷ دقیقه شماره ۳. DNA استاندارد شماره ۴. زمان ۲۰ دقیقه را نشان می‌دهند.



شکل ۵. بررسی میزان ورود ماده رادیواکتیو در پروتئینهای ساخته شده در سلول بر اساس اندازه گیری رادیواکتیویته نمونه‌ها در دستگاه سنتیلاسیون مایع: شمارنده بتا در ستون وسط نمایان است  
ستون گذاری: همین آزمایش در حضور مهارکننده‌های سنتز پروتئین: اکتینومایسین - دی و پورومایسین



فاکتور در نمونه‌های با زمان تابش ۷ دقیقه بدون کشت نیز فعال می‌گردد، اما پس از کشت این سلولها توانایی بقا، افزایش معنی‌داری را پیدا نمی‌کنند. بنابراین دوز لازم برای فعال سازی سلولها همان ۳ دقیقه یا ۰/۳۶ ژول می‌باشد. بررسی میزان سنتز پروتئین در سلولهای تابش دیده در مقایسه با کنترل، افزایش معنی‌داری را در زمان ۷ دقیقه نشان می‌دهد که می‌توان آن را به راه‌اندازی آپوپتوزیس و سنتز پروتئینهای مربوط به آن نسبت داد که در زمان‌های تابش بیشتر باعث کاهش معنی‌دار درصد بقا می‌شود. مکانیسم اثر تابش پرتو بر القای آپوپتوزیس هنوز شناخته نشده است، هرچند مطالعاتی که روی آپوپتوزیس انجام گرفته حاکی از این است که غلظتهای کم cAMP در سلول، آپوپتوزیس را مهار نموده، ولی غلظتهای بالاتر آن باعث القای این فرایند می‌گردد. (۴۹،۵۰)

**نتیجه‌گیری:** از این یافته و تحقیقات دیگر که در بالا ذکر شد، چنین استنباط می‌شود که دوز معینی از انرژی لیزر می‌تواند بر بهبود وضعیت سلولها مؤثر باشد ولی دریافت انرژی بیشتر باعث القای آپوپتوزیس می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تابش این نوع پرتو لیزر با زمان ۳ دقیقه سبب فعال‌سازی و بهتر شدن توانایی رشد و تکثیر در محیط کشت گردیده، افزایش زمان پرتودهی بیش از ۷ دقیقه سبب راه‌اندازی آپوپتوزیس می‌شود و در زمان‌های بالاتر دانه‌دار شدن و فشردگی سیتوپلاسم، تخریب DNA و قطعه قطعه شدن آن دیده می‌شود، غشاهای چسبنده گردیده، شکست DNA افزایش می‌یابد. در دوزهای بالاتر انرژی، سلولها دچار نکروز می‌گردند و به همین دلیل ژل الکتروفورز در نمونه‌هایی که ۲۰ دقیقه یا بیشتر تابش دیده‌اند، اسمیر شدیدی را نشان می‌دهد.

**تقدیر و تشکر.** کلیه کارهای تحقیقاتی انجام شده در رابطه با این مقاله در مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران انجام گرفته است.

## References

1. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediated poptosis. *Annul Rev Physiol* 1998; 60: 535-73.
2. Wang TH, and Wang HS. Apoptosis (2)

۷ دقیقه، شماره ۳ = DNA استاندارد و شماره ۴ = ۲۰ دقیقه می‌باشند. در ۲۰ دقیقه شکستگی و اسمیر کامل دیده می‌شود. بررسی میزان دخول ماده رادیواکتیو (آمینواسیدهای نشاندار موجود در محیط کشت) در پروتئینهای استخراج شده از سلولهای تابش دیده و کنترل در شکل ۵ نشان داده شده است. این میزان در تابش ۷ دقیقه افزایش معنی‌داری دارد که دلیل بر بیان بعضی از ژن‌ها و سنتز محصولات آنها می‌باشد. برای مطالعه دقیقتر از دو مهارکننده به نامهای اکتینومیسین-دی و پورومایسین هم استفاده شد تا تغییرات بهتر بررسی شود.

## بحث

با توجه به کاربرد بسیار زیادی که اخیراً پرتوی لیزر کم‌انرژی در پزشکی پیدا کرده است، مطالعات زیادی درباره اثر آن بر سلولهای زنده انجام گرفته است. در بعضی موارد، تابش می‌تواند سبب القای آپوپتوزیس شود (۴۲،۴۱)، درحالی که سلولهای فیبروبلاست دهانی که در معرض لیزر با طول موج ۸۰۹ نانومتر و انرژی ۴/۵ ژول قرار گرفته بودند، دارای قدرت رشد و تکثیر بیشتری در محیط کشت گردیدند. (۴۶،۴۴) مطالعه دیگری نشان می‌دهد که سلولهای عضلانی در معرض لیزر قرار گرفته، در محیط کشت بهتر رشد نمودند. (۴۵) همچنین لیزر نیمه هادی با طول موج ۸۳۰ نانومتر در لاین سلولی CHO K-1 از وقوع آپوپتوزیس جلوگیری می‌کند که این خاصیت مبنای یک روش درمانی بنام درمان توسط لیزر کم انرژی (LLLT) قرار گرفته است. (۴۸،۴۳)

نتایج به دست آمده از بررسی حاضر نیز، حاکی از این است که اثر لیزر هلیم-نئون با طول موج ۶۳۲ نانومتر و انرژی ۲ میلی وات بر روی سلولهای ماکروفاژ بسته به مدت زمانی که سوسپانسیون سلولی در معرض آن قرار می‌گیرد، متفاوت خواهد بود. بلافاصله پس از تابش در زمان ۷ دقیقه، درصد بقای سلولی افزایش می‌یابد. در نمونه‌هایی که بعد از پرتودهی کشت داده شدند، افزایش درصد بقا در مورد تابش ۳ دقیقه که معادل انرژی ۰/۳۶ ژول می‌باشد، مشاهده شد و این امر نشان می‌دهد که میزان معینی انرژی سبب افزایش توانایی بقا و رشد سلولها در محیط کشت می‌گردد؛ در حالی که این نمونه‌ها پس از پرتودهی و قبل از کشت هیچ تفاوتی با کنترل ندارند. به نظر می‌رسد تابش ۳ دقیقه باعث فعال شدن عاملی در سلول می‌شود که توانایی آن را برای رشد در محیط کشت بهبود می‌بخشد و آپوپتوزیس را به تأخیر می‌اندازد. این

- Characteristic of apoptosis. *J Formos Med* 1999; 98: 531-42.
3. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Ann. Rev. Cell Biol* 1991; 7: 663-698.
  4. Nagata S. Fas ligand – induced apoptosis. *Ann. Rev. Genet* 1999; 33: 29-55.
  5. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Leonardo MJ, Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Leonardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand – independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000; 288: 2351-4.
  6. Ito N. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-43.
  7. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharies DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Leonardo MJ. Fas pre-association required for the pathogenic apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 2000; 288: 2354-7.
  8. Suda T. Molecular cloning and expression of the Fas ligand a novel member of the TNF family. 1993; *Cell* 75: 1169-78.
  9. Tartaglia LA. A novel domain within teh55 kD TNF receptor signals cell death . *Cell* 1993 ; 74: 845-853.
  10. Watanabe Fukunaga R. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356: 314-317.
  11. Budihardjo I. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Ann Rev. Cell Dev. Biol* 1999; 15: 269-290.
  12. Earnshaw WC, Martins LM, Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Ann. Rev. Biochem* 2000; 69: 217-245.
  13. Boldin MP, Goncharov TM, Golstav YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT 1/FADD – interacting protease , in Fas /APO-1 and TNF – receptor – induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803 – 815.
  14. Yang X. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997; 89: 1067-76 .
  15. Muzio M. FLICE, a novel FADD- homologues ICE/CED-3- like protease, is recruited to complex . *Cell* 1996; 85: 817 – 827 .
  16. Wang X. The role of cytochrome c in apoptosis 2002; ([www.ergito.com/lookup.jsp?expt=wang](http://www.ergito.com/lookup.jsp?expt=wang))
  17. Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl –xL regulates mitochondria. *Cell* 1998 ; 91: 627-637.
  18. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-2933 .
  19. Zhu LH, Xu H, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
  20. Vander Heiden MG. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91:637-637
  21. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147 – 157.
  22. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response

- to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481 – 490.
- 23.** Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, A mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33 – 42.
- 24.** Liu LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412: 95 – 99.
- 25.** Salvesen GS, and Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 401–410.
- 26.** Li M. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$  – converting enzyme, a mammalian homologue of the *C. elegans* death gene *ced-3*. *Cell* 1993; 75: 653-660.
- 27.** Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 2001; 412: 90-94.
- 28.** Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1. Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase -9. *J. Biol. Chem* 1999; 274: 11549-56.
- 29.** Li P. Cytochrome c and ATP-dependent formation of Apaf-1/caspase -9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489.
- 30.** Luo X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89:175-84.
- 31.** Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 1997; 102: 43-53.
- 32.** Zhang J, Liu X, Schere DC, van Kaer L, Wang X, Xu M. Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice *Acad. Sci. USA* 1998; 95: 12480-5.
- 33.** Binder C, Heinemann W. Programmed cell death-many questions still to be answered. *Ann Hematology* 1994; 69: 45-55.
- 34.** Hale AJ, Calhan AC, William GT. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. Biochem.* 1996; 236: 1-26.
- 35.** Lewis CL, Gee MC. *The Macrophage. The Natural Immune system* IRL press at Oxford University 1992; 1-58.
- 36.** Unave ER *The basis for the Immunoregulatory of Macrophages.* Allen Science 1987; 236: 551.
- 37.** Gordon S. *The macrophage.* *Bio essays* 1995; 17: 977-86.
- 38.** Docker K. Biologically active products of stimulated liver macrophage (Kupffer) cells. *Eur. J. Biochem* 1990; 192: 45-61.
- 39.** Van Furth R. *Mononuclear Phagocytes.* Kluwer Acad. Publisher 1992.
- 40.** Zhuang L, Wang B, Sauder DN. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Induced keratinocyte apoptosis. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2000; 20(5): 445-454.
- 41.** Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms involved in UV induced cell death. *J. Skin pharmacology and Applied skin physiology* 2002; 15: 342-347.
- 42.** Silva Junior A, Pin HeroA, Olivia M.

Computerized morphometric assessment of the effect of Low Level Laser Therapy on bone repair. *J. of clin. Laser Med and surg* 2002; 20(2): 83-87.

43. Hawking D, Houred N, Abrahams H. Low Level Laser Therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *J clin Laser Med and surg* 2003.

44. Kreisler M. Effect of Low – level GaALAS Laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligaments fibroblasts: an invitro studg. *J Clin Periodontal* 2003; 30: 353-358.

45. Shefer G, Partidge TA, Heslop L. Low energy Laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J. cell science* 2002; 115: 1461-9.

46. Pereira A, de paulo Eduardo C, Matson E.

Effects of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fiberblasts *Lasers Surg. Med* 2002; 31: 263-267.

47. De Castro Silva O Jr, Zulcoloto S, Menegazzo LA G, Granato R G. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2001; 29(1): 73-77

48. Nevalli CM, Pacheco Soares C, Zangaro RA. Laser light prevents apoptosis on CHO K-1 cell lines. *J laser medicine and surgery* 2003; 21(4): 193-196.

49. Berridge M, Tan A, Hilton C. cAMP promotes cell survival and retards apoptosis in a factor-dependent bone marrow-derived cell line. *EXP Hematology*, 1993; 21: 269-76.

50. Obeid M, Hannun YA. A stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis *J cellular Biochem* 1995; 58: 191-98.