

## مطالعه کمی بیان ژنهای دخیل در مسیرهای بقای سلولی و اتوفازی در رده سلولی T-47D با تأکید بر اعمال مقاومت سرمایی در سلولها در حضور DMSO

مهرو وهابی، شاهرخ صفریان\*، سید جلال زرگر و لعیا علی‌اصغری

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه علوم سلولی و مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۱۷

### چکیده

دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) یکی از حفاظت‌کننده‌های سرمایی است که در زمان انجماد و نگهداری طولانی مدت سلولها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، ساز و کار حفاظتی این ماده در رابطه با مسیرهای بقای سلولی و اتوفازی مد نظر قرار گرفته است. بررسی سطح بیان ژنهای دخیل در اتوفازی با استفاده از Real time RT-PCR نشان داد که در پایین‌ترین غلظت از DMSO ژنهای دخیل در مسیر اتوفازی (*dram*، *beclin1*، *lc3*، *atg5* و *p53*) افزایش بیان می‌یابند و به همین علت، با راه افتادن اتوفازی مرگ، سلولها توان حیاتی پایین‌تری را در قیاس با سلولهایی که در غلظتهای بالاتر از ماده حفاظت‌کننده سرمایی منجمد شده‌اند دارا می‌باشند. افزایش توان حیاتی سلولها در غلظتهای بالاتر DMSO (بالاتر از ۱۰ درصد) به خاطر تبدیل اتوفازی مرگ به اتوفازی بقاء روی می‌دهد که با افزایش سطح بیان ژنهای مسیر AKT/mTOR مورد تأیید قرار گرفته است. مطالعه همزمان اتوفازی و مسیر AKT/mTOR می‌تواند به عنوان یکی از روشهای تفکیک اتوفازی مرگ و بقا تلقی و استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: حفاظت سرمایی، اتوفازی، دی‌متیل‌سولفوکسید، Real time RT-PCR

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۳۳۱۲، پست الکترونیکی: safarian@khayam.ut.ac.ir

### مقدمه

انجماد می‌باشد (۲۲). به طور کلی با انجام چند راهکار، اثرات زیان‌آور ناشی از آبیگری و تشکیل بلورهای یخ کاهش می‌یابد:

- کنترل آهنگ سرمادهی: با کنترل آهنگ سرمادهی و سرمادهی بهینه در سرعتهای مناسب، آسیبهای ناشی از انجماد کاهش می‌یابد. معمولاً آهنگ سرمادهی مناسب حدود ۱ درجه سانتی‌گراد در دقیقه می‌باشد (۱۰ و ۲۶).
- استفاده از حفاظت‌کننده‌های سرمایی: موادی که برای حفاظت بافتها و سلولها از آسیبهای ناشی از انجماد استفاده می‌شوند حفاظت‌کننده سرمایی نامیده می‌شوند (۴). این مواد با افزایش غلظت تام‌حل‌شونده‌های درون سلولی از تشکیل بلورهای یخ در درجه حرارتهای پایین جلوگیری

حفاظت سرمایی فرآیندی است که طی آن تلاش می‌شود تا سلولها و بافتها در درجه حرارتهای زیر صفر (معمولاً -۱۹۶- درجه سانتی‌گراد که نقطه جوش نیتروژن مایع است) نگهداری شوند. هدف اصلی در حفاظت سرمایی، به حداقل رساندن احتمال بروز آسیب به سامانه‌های زیستی در زمانی است که منجمد و سپس ذخیره می‌شوند (۶، ۱۰، ۱۶، ۱۸، ۲۳ و ۲۶). آب ترکیب اولیه هر سلول زنده می‌باشد و در دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد تمایل به تشکیل بلورهای یخ دارد. زمانی که تمام آب داخل سلول به یخ تبدیل شود سوخت‌وساز سلولی متوقف می‌شود و به همین علت، مهم‌ترین عامل در حفظ تمامیت ساختاری و عمل‌کردی سلولهای زنده کنترل تشکیل یخ در حین فرآیند

برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوز متمرکز شده است در حالی که تاکنون گزارشی در مورد ارتباط سرما با فرآیندهای بقای سلولی و یا اتوفازی مرگ موجود نمی‌باشد. در نتیجه، هدف از این مطالعه، بررسی اثرات حفاظتی DMSO به عنوان حفاظت‌کننده سرمایی با تأکید بر امکان جلوگیری از بروز اتوفازی مرگ و یا راه‌اندازی فرآیندهای بقای سلولی در رده سرطانی اپی تلیالی مجاری سینه (T-47D) بوده است.

اتوفازی به معنی خودخواری، یک فرآیند سلولی است که محتوای سیتوپلاسمی (پروتئین‌های پیر و اندامک‌های آسیب دیده) در داخل وزیکولهای دوغشایی محصور و بعد از ملحق شدن به لیزوزوم تجزیه می‌شوند و تولید انرژی می‌کنند (۱۳، ۲۱ و ۳۳). اتوفازی اغلب به عنوان سازوکاری برای حفظ بقای سلولی می‌باشد (۲۱). اما پیشرفت اتوفازی می‌تواند منجر به مرگ سلولی شود. فرآیند اتوفازی را می‌توان به چهار مرحله تقسیم کرد: القای اتوفازی، تشکیل اتوفازوزوم‌ها، تجزیه محتویات درون اتوفازوزوم‌ها و نهایتاً رها شدن ماکرومولکولها از اتوفازولیزوزوم‌ها که در تمام این مراحل پروتئین‌های مختلفی از جمله Atg، LAMP1، LAMP2، Rab7، UVRAG و BECN1 نقش‌های مهمی را ایفاء می‌کنند. همچنین مسیرهای سلولی مختلفی در القای اتوفازی دخیل می‌باشد که از جمله آنها می‌توان به مسیرهای PI3K I/Akt/mTOR، Raf/MEK/ERK، PI3K III/BECN1، مسیر مرتبط با خانواده p53/p73 و مسیر DAPK اشاره نمود (۹ و ۳۰). قابل ذکر است که اتوفازی همواره در یک سطح پایه‌ای در بافت‌های نرمال برای حفظ هموستازی و عمل‌کرد معمول سلولها روی می‌دهد اما در شرایط تنش نقش دوگانه‌ایی را از خود ظاهر می‌سازد. در واقع، اتوفازی می‌تواند منجر به افزایش بقای سلولی و یا منجر به مرگ سلولی شود اما تاکنون هیچ‌گونه سازوکار مشخصی جهت تفکیک این دو نوع اتوفازی از هم ارائه نشده است.

می‌کنند. این مواد به دو دسته تقسیم می‌شوند. دسته اول شامل حفاظت‌کننده‌های سرمایی نفوذکننده به درون سلول می‌باشد که به دلیل داشتن وزن مولکولی کم توانایی عبور از غشای سلولی و نفوذ به درون سلول را دارند (۲۹). از جمله این مواد می‌توان گلیکولها و دی‌متیل‌سولفوکسید را نام برد (۵ و ۳۴). در این مطالعه از دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) به عنوان حفاظت‌کننده سرمایی استفاده شده است.

دسته دوم مشتمل بر حفاظت‌کننده‌های سرمایی غیرنفوذکننده به درون سلول می‌باشد که به دلیل داشتن وزن مولکولی زیاد توانایی عبور از غشای سلولی و نفوذ به درون سلول را ندارند و از آن جمله می‌توان به پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP)، هیدروکسی‌اتیل‌نشاسته (HES) و اکسید پلی‌اتیلن (PEO) اشاره نمود (۵ و ۱۷). حفاظت‌کننده‌های سرمایی زیستی دسته دیگری از حفاظت‌کننده‌های سرمایی هستند که با اتصال به یخ از رشد و گسترش آنها جلوگیری می‌کنند. این مواد همچنین قادرند با غشای سلولی در دماهای پایین میانکشی داشته باشند تا آسیب ناشی از سرما را به حداقل برسانند. انواع مختلفی از پروتئین‌های ضد انجماد وجود دارد که از آن جمله می‌توان AFP I، AFP II، AFP III را نام برد (۷، ۱۵ و ۱۹).

- نگه داشتن دماهای ذخیره‌سازی در شرایط بهینه.
- کنترل آهنگ گرم کردن (ذوب سلولها): احیا و بازیابی سلولها از حالت انجماد به دلیل احتمال بروز آسیب‌های ناشی از تشکیل دوباره بلور یخ فرآیند بسیار مهمی می‌باشد و به همین دلیل هر چه سریع‌تر انجام شود امکان بقای سلول بیشتر می‌شود (۶ و ۸).

با وجود پیشرفت‌های حاصله در زمینه حفاظت سرمایی، به دلیل بروز اثرات زیانبار سرما، هنوز هم امکان راه‌اندازی فرآیندهای منجر به مرگ سلولی وجود دارد. مرگ سلولی به طرق مختلفی بروز می‌نماید ولی مطالعات انجام شده بیشتر بر روی نقش سرما در راه‌اندازی مرگ

مسیر سیگنالی PI3K/Akt در مسیر آبشاری وابسته به گیرنده فاکتورهای رشدی فعال می‌شود. Akt دارای سوبسترهای متعددی می‌باشد و از مسیرهای مختلفی باعث مهار مرگ سلولی می‌شود و از این رو، این مسیر را به عنوان مسیر بقای سلولی نیز نامگذاری کرده‌اند. PI3K فسفواینوزیتیدهای غشای پلاسمایی را در موقعیت 3-OH (D3) از حلقه اینوزیتول فسفریله می‌کند به نحوی که از سوبسترهای فسفاتیدیل اینوزیتول-4-فسفات (PI-4-P) و فسفاتیدیل اینوزیتول-4 و 5-بیس فسفات (PI-4,5-P2) پیام‌رسانهای ثانویه فسفاتیدیل اینوزیتول-3 و 4-بیس فسفات (PI-3,4-P2) و فسفاتیدیل اینوزیتول سه فسفات (PIP<sub>3</sub>) ساخته شود. PI3K سه کلاس با چندین سوبسترا دارد. کلاس I لیپیدهای اینوزیتول را در موقعیت ۳ فسفریله می‌کند. کلاس II توسط گیرنده‌های تیروزین کیناز فعال می‌شود و کلاس III توسط گیرنده‌های جفت شده با G-protein ها فعال می‌گردد (۱۲ و ۳۱).

### روشها:

کشت سلولی و انجماد سلولی: رده سلولی T-47D، که از رده‌های سلولی سرطان سینه انسان می‌باشد از بانک سلولی ایران (NCBI) با کد C203 تهیه گردید. سلولها در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با سرم گاو (۱۰ درصد حجمی/حجمی) و محلول پنی سیلین/استرپتومایسین (۱ درصد حجمی/حجمی) تحت شرایط کنترل شده دما (۳۷ درجه سانتی گراد) و اتمسفر مرطوب حاوی CO<sub>2</sub> (۵ درصد حجمی/حجمی) کشت داده شد. این سلولها به صورت تک لایه در فلاسک رشد می‌کنند. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلولها نیز از محلول سترون تریپسین-EDTA استفاده شد. از آنجایی که هدف از انجام این مطالعه بررسی فعال شدن مسیرهای اتوفاژی و مسیر بقای سلولی در اثر فرآیند انجماد در حضور DMSO بوده است (شکل ۱) لذا سلولهای T-47D درحضور غلظتهای مختلف DMSO متشکل از غلظتهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد حجمی/حجمی منجمد شدند. برای انجماد، ابتدا محیط سلولها ۲۴ ساعت قبل از انجماد تعویض و سپس با استفاده از تریپسین سلولها از فلاسک جدا و با افزودن محیط کشت سرد حاوی ۵۰ درصد سرم جنین گاوی سوسپانسیون یکنواخت سلولی تهیه و

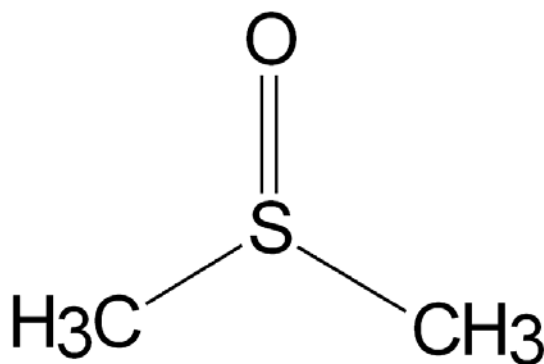
در این پژوهش، تلاش بر آن بوده است که با بررسی سطح بیان ژنهای مرتبط با مسیرهای بقای سلولی و اتوفاژی اولاً ارتباط بین ساز و کار حفاظتی DMSO با فرآیند اتوفاژی مشخص گردد و در ثانی پاسخ مناسبی برای این سؤال اساسی یافت شود که آیا القای اتوفاژی بقاء می‌تواند عاملی در بروز اثرات حفاظتی DMSO در شرایط انجماد سلولی باشد.

### مواد و روشها

مواد: محیط کشت Roswell Park Memorial 1640 (RPMI) Institute، سرم جنین گاوی، محلول پنیسیلین-استرپتومایسین و محلول تریپسین-EDTA از شرکت Gibco (انگلستان) خریداری گردید. محلول ۳-۴-دی‌متیل‌تيازول-۲-تیل [۲-۵-دی‌فنیل‌ترازولیم‌برومید (MTT) از شرکت سیگما (انگلستان) و دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) از شرکت MERCK (آلمان) خریداری شد. پرایمر رندوم هگزامر، آنزیم رونوشت بردار معکوس

قطره قطره محیط کشت حاوی ۲۰ درصد سرم به کرایوویالها تا حجم ۲ ml ذوب شدند و بعد از ذوب شدن کامل، محتویات هر کرایوویال به یک فالكون منتقل و مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه محیط رویی، سلولها در حجم مناسبی از محیط حاوی ۲۰ درصد سرم به صورت تعلیق درآورده شد. سپس محتویات فالكونها (معادل  $5 \times 10^5$  سلول به همراه ۱ ml محیط کشت) به هر خانه از پلیت ۶ خانه (SPL) منتقل شد. بعد از این مراحل آزمون MTT جهت سنجش غیرمستقیم میزان تکثیر و بقای سلولها و یافتن مدت زمانی که در آن سلولها کمترین میزان توان حیاتی را بعد از انجام فرآیند انجماد داشته باشند در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ذوب انجام شد. اساس روش MTT بر پایه توانایی آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی به منظور کاهش و تبدیل حلقه‌های نمک زرد رنگ 3-[4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] به بلورهای بنفش رنگ فورمازان که نامحلول در آب است استوار شده است. در اینجا برای هر کدام از زمانهای ذکر شده یک پلیت ۶ خانه استفاده شد. ۵ میلی گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی لیتر بافر PBS 1X حل و پس از فیلتر کردن مقداری از آن معادل با ۱۰ درصد از حجم محیط کشت (تقریباً ۲۰۰  $\mu$ l) به هر خانه از پلیتهای ۶ خانه اضافه شد. پلیتها به مدت ۳ تا ۴ ساعت (مدت زمان لازم برای فرآیند تبدیل MTT به فورمازان توسط سلولهای زنده) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از خارج کردن پلیت از انکوباتور، محیط سلولها تخلیه و سپس برای حل شدن فورمازان تولید شده به هر خانه از پلیت مقدار ۲۰۰۰  $\mu$ l DMSO افزوده شد تا پس از پیتاژ محلولی یکنواخت حاصل گردد. سپس معادل ۲۰۰  $\mu$ l از محلول یکنواخت به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه منتقل و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر، با استفاده از دستگاه Elisa Reader اندازه‌گیری شد. سپس درصد توان حیاتی سلولها محاسبه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 آنالیزهای آماری لازم انجام

سلولهای زنده موجود در آن شمارش شد. مقدار مناسبی از سوسپانسیون سلولی که دارای  $2 \times 10^6$  سلول بود به هر یک از ویالهای ویژه انجماد سلولی، منتقل و بعد از افزودن DMSO با غلظتهای مختلف ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد، حجم نهایی مورد نظر با افزودن محیط کشت سرد حاوی ۵۰ درصد سرم فراهم گردید. کرایوویالها در داخل یخ قرار گرفت و به فریزر  $-70$  درجه سانتی گراد به منظور نگهداری در این دما به مدت ۳ تا ۴ ساعت منتقل شد. بعد از گذشت این زمان، انتقال کرایوویالها به مخزن ازت مایع با دمای  $-196$  درجه سانتی گراد انجام گرفت.

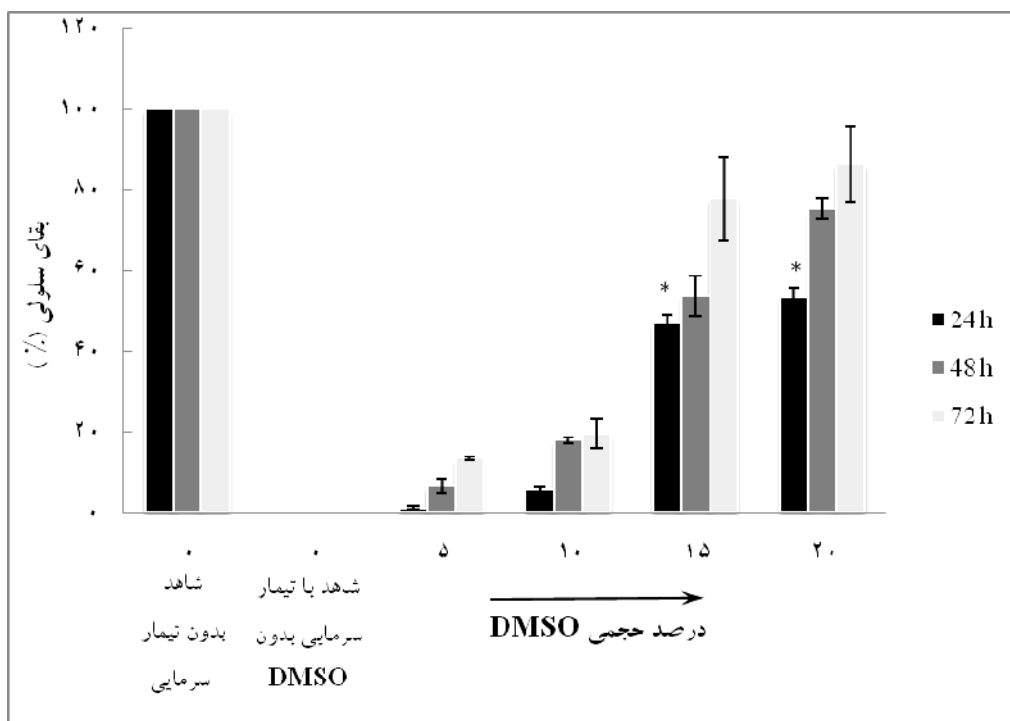


شکل ۱ - ساختار شیمیایی دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO).

**سنجش MTT:** آزمون MTT، آزمونی کمی و رنگی است که بر پایه کاهش شدن نمک زرد رنگ محلول در آب [۳-۴-دی‌متیل‌تيازول-۲-تیل]-۲-۵-دی‌فنیل‌تترازولیم‌برومید (MTT) و تشکیل کریستالهای آبی رنگ تیره و نامحلول فورمازان در آب استوار شده است. کاهش شدن MTT، به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز و در سلولهای زنده رخ می‌دهد (۲، ۱۴ و ۳۲). بلورهای فورمازان در حلالهای آلی همچون ایزوپروپانول قابل حل می‌باشد که با سنجش میزان جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر می‌توان تعداد سلولهای زنده را که فعالیت سوخت و سازی دارند تعیین نمود. روش کار به این صورت است که ابتدا یک سری از سلولهای فریز شده در غلظتهای مختلف ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد با اضافه کردن

سلولهای منجمد شده و پس از فرآیند ذوب ملاک کار قرار گیرد.

شد. پس از انجام آزمون MTT، زمان ۲۴ ساعت به عنوان زمان مناسب آزمایش انتخاب شد تا در کشت مجدد



شکل ۲- نمودار ستونی مربوط به چگونگی بروز تغییرات در توان حیاتی سلولهای T-47D. این نمودار در حضور سرما و در غلظتهای مختلف از DMSO در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ذوب نشان داده شده است. کاهش شدت تیرگی رنگ ستونها از چپ به راست، افزایش مدت زمان پس از ذوب سلولها را نشان می‌دهد. نماد \* معنادار بودن آماری را در سطح ( $p < 0.05$ ) نشان می‌دهد. مقایسه بین توان حیاتی سلولها در درصدهای حجمی بالاتر از ۱۰٪ DMSO با درصدهای پایین‌تر از ۱۰٪ انجام شده است. اختلاف آماری معنادار فقط برای زمان ۲۴ ساعت پس از ذوب که در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته نشان داده شده است.

سلولها با شرایط جدید و فراموش کردن شرایط تنش سرمایی دارد. در چنین حالتی سطح بیان ژنها به سطح بیان در سلولهای شاهد که فاقد تنش سرمایی بوده‌اند نزدیک می‌شود و اختلاف معنادار بین آنها از میان می‌رود. لذا برای ثبت تغییرات ژنی به ویژه در غلظتهای بالای DMSO می‌بایست تا حد امکان زمان انکوباسیون پس از ذوب را کاهش داد. از سوی دیگر، مطالعات انجام شده در این تحقیق نشان داد که در زمانهای کمتر از ۲۴ ساعت (مانند زمان ۱۲ ساعت پس از ذوب) سلولها به اندازه کافی افزایش تعداد نداشته‌اند و به همین علت شرایط مناسبی را برای استخراج مقادیر کافی از RNA فراهم نمی‌سازند. بنابراین، با توجه به توضیحات ارائه شده، زمان انکوباسیون

استخراج RNA و سنتز cDNA : RNA هر مجموعه سلولی کشت داده شده، ۲۴ ساعت پس از ذوب استخراج گردید. در واقع می‌بایست زمانی برای مطالعه ژنها انتخاب می‌گردید که اولاً سلولها پس از یخ‌گشایی به تعداد مناسب در محیط کشت وجود داشته باشند تا مقادیر مناسبی از RNA را برای مطالعات Real time RT-PCR در اختیار بگذارند و در ثانی اختلاف بین بیان ژنها در حالت تنش سرمایی و شرایط فاقد تنش (سلولهای منجمد نشده) از میان نرفته باشد. همان گونه که در آزمون MTT مشاهده می‌شود (شکل ۲) در غلظتهای بالای DMSO و زمان ۷۲ ساعت پس از ذوب، درصد زیستایی سلولی بسیار به شاهد منجمد نشده نزدیک شده است که حکایت از تطابق

۲۴ ساعت پس از ذوب به عنوان بهترین زمان جهت انجام مطالعات ژنی انتخاب گردید.

برای استخراج ابتدا  $500 \mu\text{l}$  از محلول RNX-Plus سرد به داخل ویال  $2 \text{ ml}$  حاوی سلولهای برداشت شده از فلاسکهای مورد نظر اضافه شد. پس از ورتکس کردن به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه، محلول حاصله به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس  $200 \mu\text{l}$  کلروفرم به آن افزوده گردید. مخلوط نهایی به مدت ۱۵ ثانیه بدون استفاده از ورتکس لرزانده شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ یا در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد قرار گرفت و در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد و دور  $12000 \text{ rpm}$  به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس فاز آبی جدا و  $200 \mu\text{l}$  از آن به داخل ویال  $1/5 \text{ ml}$  جدید منتقل و به حجم مساوی بر روی آن ایزوپروپانول اضافه گردید. در این حالت، مواد به آرامی با هم مخلوط شدند و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفتند. مخلوط حاصل، در دور  $12000 \text{ rpm}$  و در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته و به رسوب به دست آمده  $1 \text{ ml}$  اتانل  $75\%$  درصد اضافه گردید تا رسوب به دست آمده کنده شود. فرآیند رسوب‌گیری مجدداً با انجام سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد و  $10000 \text{ rpm}$  انجام گرفت. در این مرحله محلول رویی دور ریخته شد و رسوب به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. رسوب RNA در  $30 \mu\text{l}$  آب میلی کیو (ساخت شرکت بن‌یاخته با شماره خرید Bon 1002) حل شد. برای بهتر حل شدن RNA در آب، ویال به مدت ۵ دقیقه در دمای  $65^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ارزیابی کمی و بررسی خلوص rRNA استخراج شده که توسط دستگاه نانودراپ انجام گرفت، ارزیابی کیفی RNA که در واقع راندن آن بر روی ژل آگارز می‌باشد نیز صورت پذیرفت.

cDNA مربوط به هر نمونه که در غلظت مشخصی از DMSO قرار گرفته بود، با استفاده از RNA استخراج شده ساخته شد. برای سنتز cDNA، ابتدا دریک ویال  $0/2 \text{ ml}$  معادل  $2 \mu\text{g}$  از RNA استخراج شده همراه با  $1 \mu\text{l}$  از پرایمر رندوم هگزامر مخلوط و سپس حجم آن با آب میلی کیو (DNase & RNase free) به  $13 \mu\text{l}$  رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای  $65^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد انکوبه گردید تا پرایمرها راحت‌تر به داخل RNA نفوذ کنند. در این مرحله بلافاصله نمونه‌ها بر روی یخ قرار گرفتند تا اتصال پرایمر به RNA صورت بگیرد. بافر واکنش (5X)، مهارکننده RNase، dNTP Mix و آنزیم رونوشت بردار معکوس به همراه آب میلی کیو به ترتیب با مقادیر  $4 \mu\text{l}$ ،  $0/5 \mu\text{l}$ ،  $1 \mu\text{l}$  و  $1 \mu\text{l}$  و  $0/5 \mu\text{l}$  به محلول واکنش افزوده شد تا حجم نهایی به  $20 \mu\text{l}$  برسد. قرار دادن مخلوط نهایی در دمای  $25^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس انکوبه کردن آن در دمای  $42^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه شرایط ساخت cDNA را فراهم نمود. حرارت دادن نمونه با دمای  $70^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه اختتام واکنش را در پی داشت. محصول واکنش در فریزر  $-20^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد نگهداری شد.

**آزمایش Real time RT-PCR:** رنگهای سایبر در گروه رنگهای اتصال‌یابنده به DNA و RNA قرار دارند. این رنگها نسبت به اتیدیوم برماید اثر جهش‌زایی کمتر و در عوض، حساسیت بیشتری دارند. سه نوع رنگ SYBR در پژوهش‌های مولکولی استفاده می‌شود که در اینجا از سایبرگرین ۱ استفاده شده است. پس از طراحی پرایمرهای مربوط به ژنهای مورد نظر که توسط نرم‌افزار الیگوانالایزر نسخه ۳/۱ انجام گرفت پرایمرها توسط شرکت سیناکلون ساخته و در آزمون Real time RT-PCR در حجم نهایی  $10 \mu\text{l}$  استفاده گردید. در هر میکروویال ستونی با حجم  $0/1 \text{ ml}$  مقدار  $5 \mu\text{l}$  از محلول ماستر موجود در کیت به همراه  $1 \mu\text{l}$  از cDNA و  $1 \mu\text{l}$  از مجموع پرایمرهای پیشرو و پسرو مخلوط و با آب به حجم نهایی  $10 \mu\text{l}$  رسانده شد.

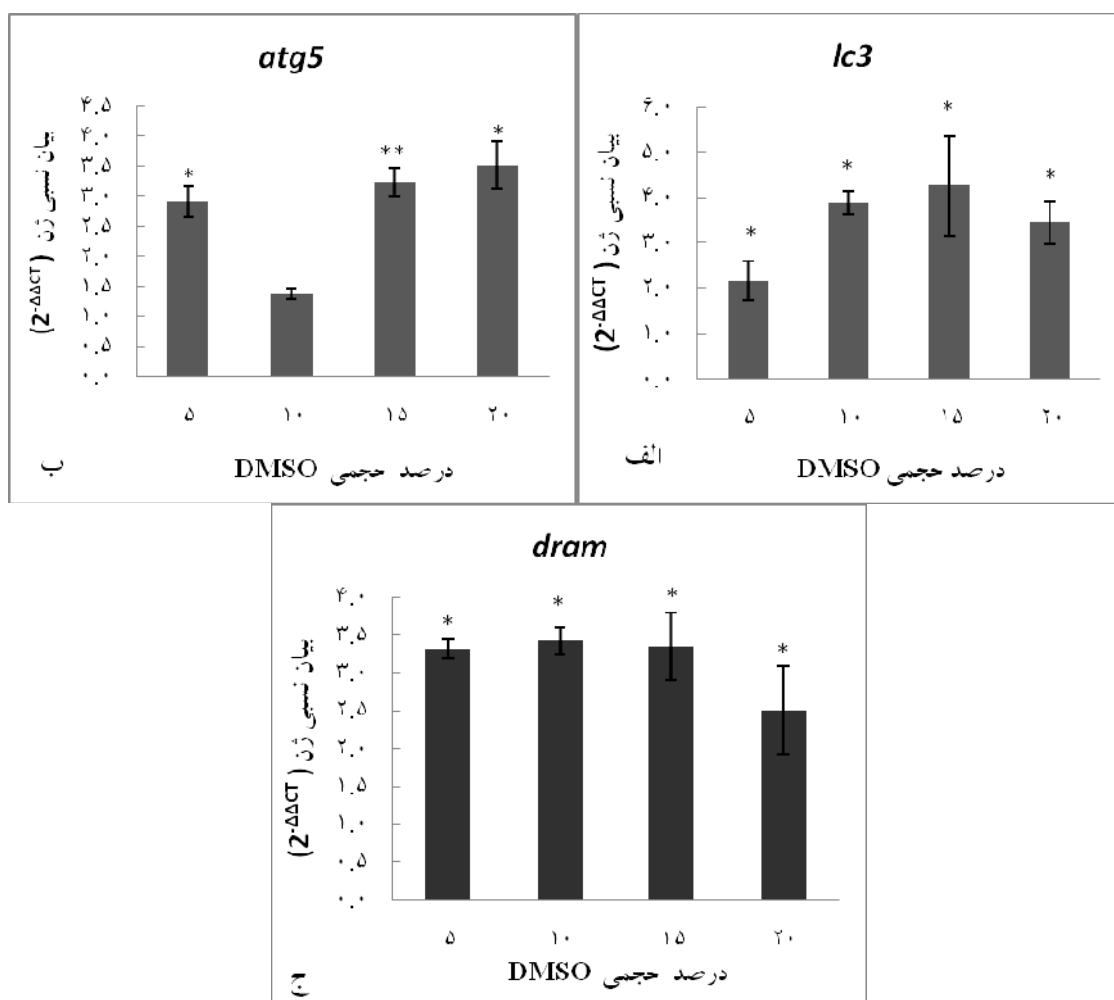
از نرم افزار 6 rotor-gene نسخه ۱، ۶ استفاده شد.

## نتایج و بحث

به منظور بررسی اثر DMSO بر افزایش بقاء و کاهش مرگ و میر سلولی، زمان ۲۴ ساعت بعد از ذوب که در آن سلولها کمترین میزان توان حیاتی را در قیاس با زمانهای بالاتر و در حضور غلظتهای مختلف DMSO داشته‌اند، جهت انجام آزمونهای Real time RT-PCR انتخاب شد تا بتوان به طریقی میزان راه‌افتادن فرآیندهای مرگ سلولی را در غلظتهای مختلف DMSO مورد بررسی قرار داد.

سپس میکروویالها در دستگاه Rotogene Corbett 6000 قرار داده شدند و برنامه real time به شرح زیر برای دستگاه تعریف شد: ۱۰ دقیقه توقف در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه تزیادی مشتمل بر ۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۵ ثانیه در دمای ذوب هر پرایمر و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۲۸).

نرم‌افزارهای رایانه‌ای و تجزیه و تحلیلهای آماری: آنالیزهای آماری آزمون MTT با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و Excel 2007 انجام شد. همچنین برای انجام محاسبات و آنالیزهای آماری آزمون Real time RT-PCR.



شکل ۳ - نمودار ستونی مربوط به چگونگی بروز تغییرات در بیان ژنهای atg5 (الف)، lc3 (ب) و dram (ج) بر حسب افزایش غلظت DMSO. نماد \* و \*\* معنادار بودن آماری را به ترتیب در سطح آماری (p<۰/۰۵) و (p<۰/۰۰۱) در زمان مقایسه هر ستون با ستون شاهد نشان می‌دهد. شاهد در اینجا نمونه بدون تیمار سرمایی با ارتفاع ستون معادل ۱ است که برای ساده‌تر شدن، در شکل نشان داده نشده است.

در شکل ۲ در یک روند وابسته به غلظت و زمان، اختلاف معنادار آماری در سطح ۰/۰۵ بین درصدهای حجمی بالاتر از ۱۰ درصد DMSO با درصدهای حجمی پایین‌تر مشاهده می‌گردد که با گذاردن علامت \* در بالای نمودار ستونی مربوط به مهم‌ترین زمان یعنی ۲۴ ساعت پس از ذوب نشان داده شده است.

بدیهی است اولین حدس در مورد دلیل کاهش توان حیاتی سلولها در زمان ۲۴ ساعت پس از ذوب می‌تواند کاهش توان زیستی سلولها به واسطه بروز مرگ سلولی ناشی از سرما باشد. به دنبال یافتن فرآیند سلولی و مسیرهای مولکولی منطبق با این ایده، اتوفازای به عنوان یک فرآیند سلولی دوکاره که می‌تواند موجب مرگ و یا بقای سلولها گردد، یکی از بهترین مسیرهای انتخابی برای بررسی فرضیه مورد نظر محسوب می‌شد. لذا به منظور بررسی امکان راه‌افتادن مسیر اتوفازای در سلولها، سطح بیان ژنهای مرتبط با این فرآیند مورد بررسی قرار گرفت.

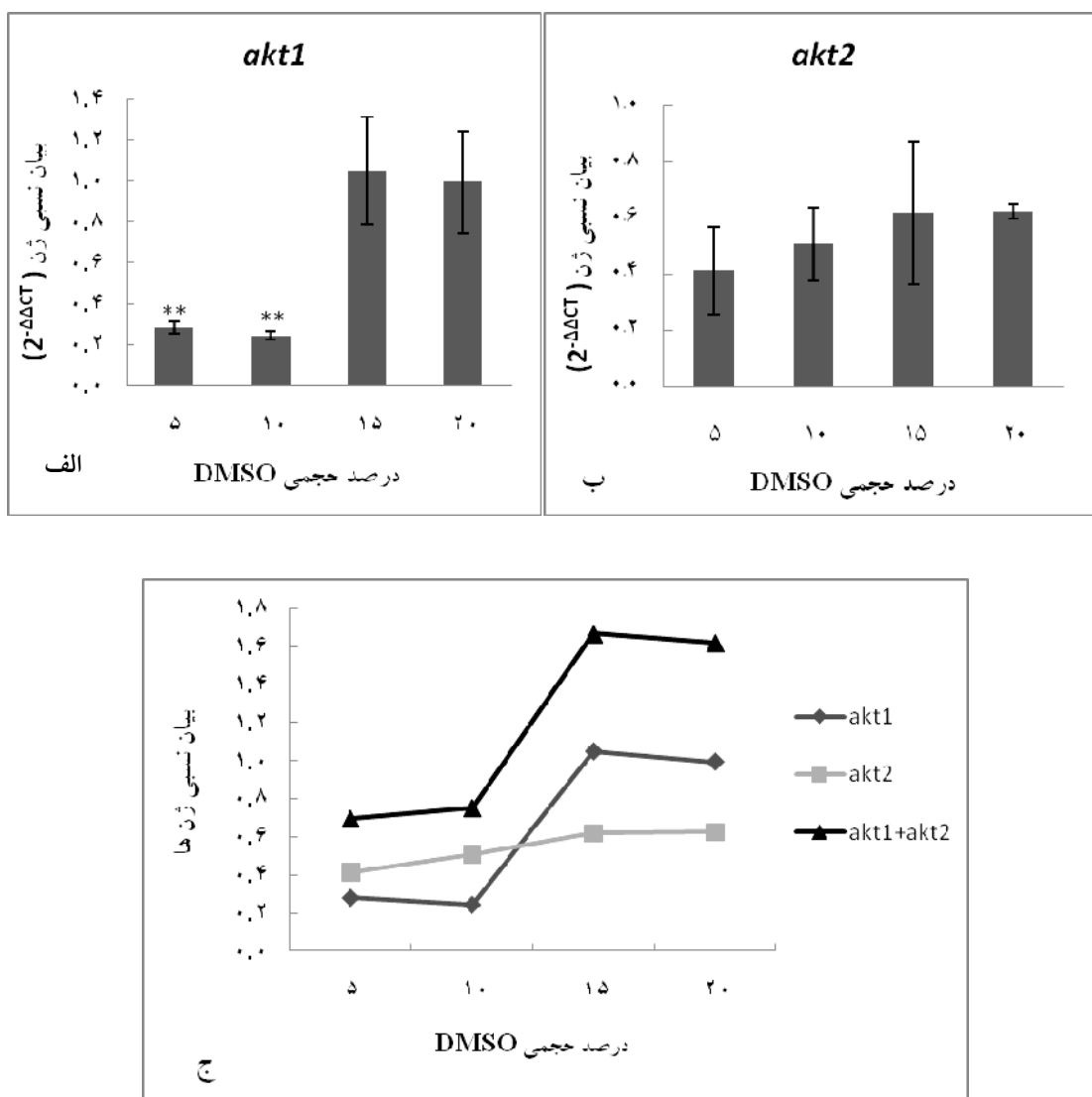
در شکل ۳، محور عمودی نشان‌دهنده میزان بیان ژنهای محاسبه شده با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  و محور افقی نمایانگر غلظت DMSO می‌باشد. Atg5 و LC3 از پروتئینهای ضروری در تشکیل و بلوغ اتوفازوزومها می‌باشند (۹، ۲۴، ۲۵ و ۲۷). همان‌طور که در شکل ۳- الف و ۳- ب دیده می‌شود افزایش بیان ژن *lc3* و *atg5* در غلظتهای ۵ تا ۲۰ درصد (صرف نظر از غلظت ۱۰ درصد که افزایش معناداری را در قیاس با شاهد منجمد نشده نشان نمی‌دهد) نشان‌دهنده افزایش تمایل سلولها در تشکیل اتوفازوزومها و در نتیجه القای اتوفازای بعد از ذوب سلولهای تیمار شده با سرما می‌باشد. از سوی دیگر، پروتئینی با ۶ ناحیه درون غشایی است که در غشای لیزوزوم واقع شده است. DRAM هدف مستقیم p53 است و احتمالاً با عملکرد بر روی لیزوزومها و یا با ارسال علائم فیدبک منفی بر روی پروتئینهای مهارکننده اتوفازای، الحاق لیزوزومها به اتوفازوزومها را راه‌اندازی می‌نماید و از این طریق می‌تواند

تجمع اتوفازوزومها را باعث شود (۸، ۱۱ و ۲۰). افزایش بیان *dram* همانند *atg5* و *lc3* در تمامی نمونه‌های تیماری مؤید راه افتادن مسیر اتوفازای در شرایط تنش سرمایی می‌باشد (شکل ۳- ج). از آنجایی که اتوفازای فرآیندی با سرشت دوگانه است که از سویی به سلولها کمک می‌کند تا در شرایط تنش اعمال شده ضعیف، زنده بمانند (اتوفازای بقا) و از سوی دیگر با افزایش شدت تنش، سبب نابودی و مرگ سلولها می‌گردد (اتوفازای مرگ)، در اینجا تفکیک سرشت دوگانه این فرآیند، از طریق مطالعه بر روی مسیر Akt صورت گرفت. بدین منظور، بررسی کمی RNAهای نسخه‌برداری شده از ژنهای *akt1*، *akt2* و *pten* به عنوان ژنهای مهم در مسیر بقای سلولی مد نظر قرار گرفت تا افتراقی بین اتوفازای بقا و مرگ امکان‌پذیر گردد (شکلهای ۴ و ۵). همانگونه که در شکل ۴- ب مشاهده می‌شود با افزایش غلظت DMSO و در نتیجه کاهش اثرات تنش سرمایی به روی سلولها، میزان بیان *akt2* در قیاس با شاهد تغییر معناداری را ندارد که عدم پاسخ دهی این ژن را در برابر DMSO و تنش سرمایی نشان می‌دهد. اما بالا رفتن غلظت DMSO (بالاتر رفتن آن از سطح ۱۰ درصد) باعث می‌شود تا بیان به شدت کاهش یافته *akt1* (که در غلظتهای کم DMSO حادث شده است) به سمت مقادیر مشابه با شاهد افزایش مقدار یابد. این موضوع نمایانگر بروز اثرات حفاظتی DMSO در غلظتهای بالا (غلظتهای ۱۵ و ۲۰ درصد) و افزایش تمایل سلولها به بقا همانند سلولهای شاهد می‌باشد. در واقع، روند افزایشی مشاهده شده برای *akt1* که به دنبال افزایش غلظت DMSO روی داده است در کنار افزایش بیان ژنهای اتوفازای (شکل ۳- الف)، موجب کاهش اثرات تنش سرمایی به روی سلولها از طریق وقوع اتوفازای بقا در غلظتهای بالاتر از ۱۵ درصد از DMSO شده است. در نمودار نقطه‌ای ارائه شده در شکل ۴- ج روند تغییرات نامحسوس *akt2* در برابر تغییرات صعودی *akt1* و نیز مجموع تغییرات ثبت شده برای هر دو ژن (*akt1+akt2*) آورده شده است به شکلی که برآیند کلی

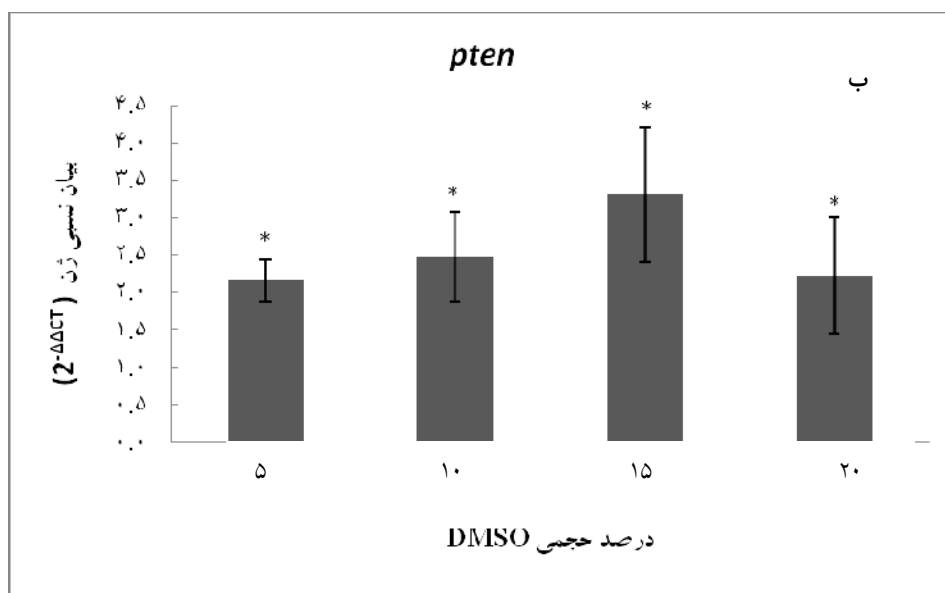
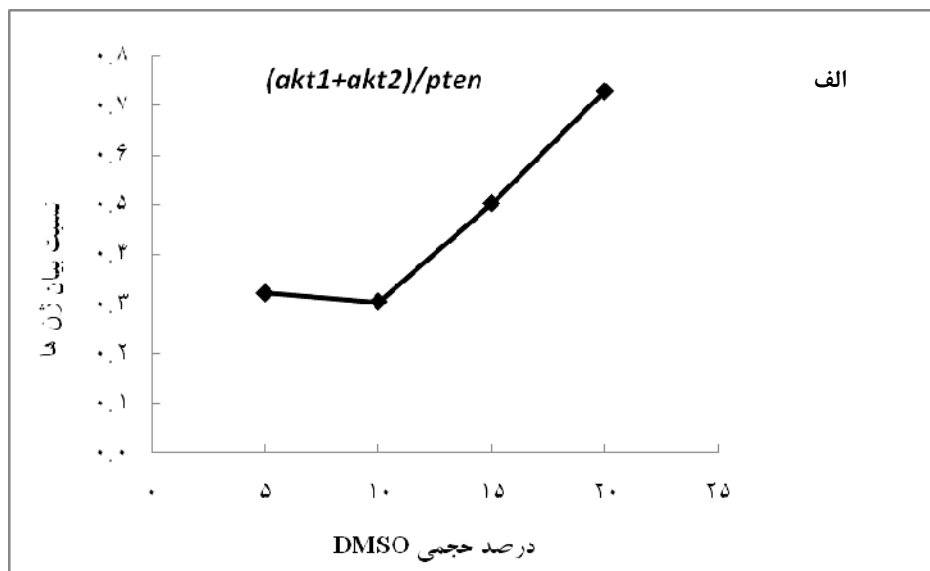


نمایانگر وقوع همزمان اتوفازای و بقاء در غلظت‌های بالای DMSO و تنش سرمایی کمتر می‌باشد که این موضوع نشان‌دهنده وقوع اتوفازای بقاء در سلولها می‌باشد. همانگونه که ملاحظه می‌گردد بررسی همزمان مسیر بقای سلولی و اتوفازای می‌تواند راهکار مناسبی را در مورد تفکیک دو نوع اتوفازای در اختیار قرار دهد.

تغییرات *akt* به صورت تام در زمان افزایش غلظت DMSO به تصویر کشیده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود برآیند تغییرات بیان در دو ژن *akt1* و *akt2* (بالا تر روندی صعودی را به ازای افزایش غلظت DMSO) (بالا تر از ۱۰ درصد) نشان می‌دهد که مؤید راه‌افتادن مسیر بقای سلولی است. راه‌اندازی مسیر بقای سلولی در کنار اتوفازای



شکل ۴ - نمودارهای ستونی و نقطه‌ای مربوط به چگونگی بروز تغییرات بیان ژنهای *akt1* (الف)، *akt2* (ب) بر حسب افزایش غلظت DMSO. نماد \*\* معنادار بودن آماری در سطح ( $p < 0.001$ ) را در زمان مقایسه هر ستون با ستون شاهد نشان می‌دهد. شاهد در اینجا نمونه بدون تیمار سرمایی با ارتفاع ستون معادل ۱ است که برای ساده‌تر شدن، در شکل نشان داده نشده است.



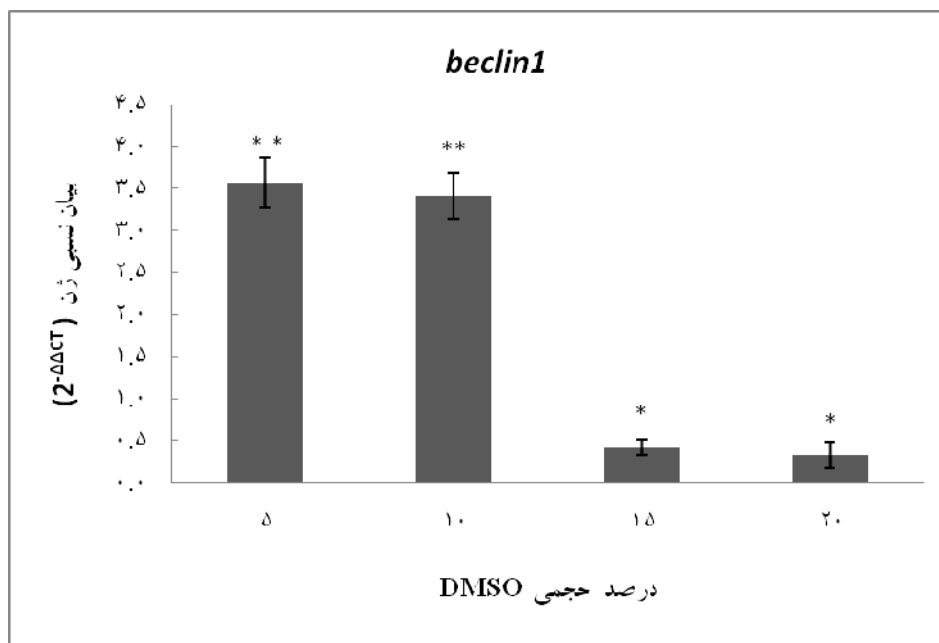
شکل ۵ - نمودار نقطه‌ای میزان فعالیت  $akt$  در مقایسه با  $pten$  (الف) و نمودار ستونی مربوط به چگونگی تغییرات بیان ژن  $pten$  بر حسب افزایش غلظت DMSO (ب). نماد \* معنادار بودن آماری در سطح  $(p < 0.05)$  را در زمان مقایسه هر ستون با ستون شاهد نشان می‌دهد. شاهد در اینجا نمونه بدون تیمار سرمایی با ارتفاع ستون معادل ۱ است که برای ساده‌تر شدن، در شکل نشان داده نشده است.

ارتباط با افزایش بیان  $akt$  به ویژه در غلظتهای بالای DMSO گفته شد (شکل ۵-ب). اما باید دقت نمود این امکان نیز وجود دارد که افزایش میزان RNAهای  $akt$  در سلول بتواند به نحوی پاسخگویی افزایش بیان  $pten$  باشد و به شکلی مسیر بقای سلولی را روشن نگه دارند تا میزان مرگ و میر سلولی همان گونه که در شکل ۲ نشان داده

شکل ۵-الف میزان بیان  $akt1$  و  $akt2$  را در قیاس با  $pten$  را نشان می‌دهد. PTEN فسفاتازی است که با افزایش فعالیت خود مانع از وقوع مسیر بقای سلولی می‌شود. افزایش بیان  $pten$  در تمامی غلظتهای DMSO نشان می‌دهد که مسیر بقای سلولی می‌بایست به نحوی سرکوب شده باشد و این به ظاهر، خلاف آن چیزی است که در

دهنده از کار افتادن مسیر Akt/mTOR است که این می‌تواند مؤید طبیعت اتوفازای راه‌افتاده در این شرایط باشد که از نوع اتوفازای مرگ است (شکل‌های ۳ و ۴). به عبارت دیگر ضعف عامل حفاظت‌کننده سرمایی در غلظت ۵ درصد نشان می‌دهد که سازوکارهای حفاظت سرمایی به منظور افزایش توان زیستی سلولها اعمال نشده و به همین علت تعداد سلولها در مقایسه با شاهد کاهش مشخصی را به واسطه‌ی راه افتادن مسیر اتوفازای مرگ داشته است.

شد، روندی کاهشی داشته باشد. در شکل ۵- الف نسبت بیان *akt1+akt2* به *pten* در برابر افزایش غلظت DMSO آورده شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود میزان بیان *akt* در مقایسه با *pten* در غلظتهای بالاتر DMSO روندی صعودی را دارد که نشان‌دهنده افزایش توان *akt* در راه‌اندازی مسیر بقای سلولی و جبران اثرات *pten* می‌باشد. از سوی دیگر، کاهش شدید بیان ژن *akt1* در راستای افزایش بیان ژن *pten* در غلظتهای ۵ و ۱۰ درصد، نشان

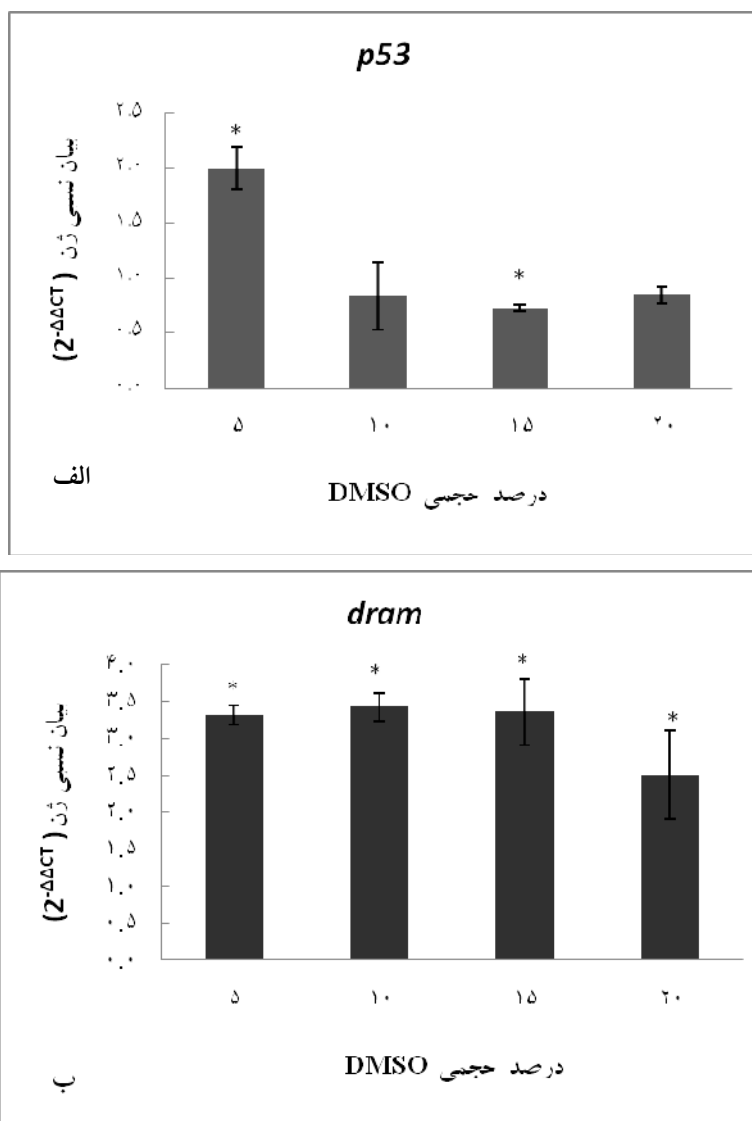


شکل ۶ - نمودار ستونی چگونگی بروز تغییرات بیان ژن *beclin1* بر حسب افزایش غلظت DMSO. نماد \* و \*\* معنادار بودن آماری را به ترتیب در سطح آماری ( $p < 0.05$ ) و ( $p < 0.001$ ) در زمان مقایسه هر ستون با ستون شاهد نشان می‌دهد. شاهد در اینجا نمونه بدون تیمار سرمایی با ارتفاع ستون معادل ۱ است که برای ساده‌تر شدن، در شکل نشان داده نشده است.

جالب است که در نقطه مقابل، بالا بودن میزان بیان ژنهای *p53* و *beclin1* ارتباط این دو ژن را با راه‌اندازی اتوفازای مرگ به ویژه در نمونه ۵ درصد نشان می‌دهد. به نظر می‌آید میزان بیان *p53* و *beclin1* تعیین‌کننده سرنوشت سلول از لحاظ انتخاب مسیر خود در اتوفازای مرگ و یا بقاء می‌باشد. بالا بودن سطح بیان *dram* در تمامی نمونه‌ها مشاهده شده (شکل ۷- ب) و لذا این ژن تنها در راه‌اندازی اتوفازای، خواه اتوفازای مرگ و خواه اتوفازای بقاء، نقش خود را ظاهر می‌سازد. این در حالی است که پایین بودن

*beclin1* اورتولوگ پستانداران از ژن مخمر است که محصول پروتئینی آن تشکیل اتوفگوزوم‌ها را تنظیم می‌کند. کاهش معنادار بیان ژن *beclin1* که به میزان چشمگیری در نمونه‌های تیمار شده با غلظتهای ۱۵ و ۲۰ درصد نسبت به نمونه‌های ۵ و ۱۰ درصد روی داده است، احتمالاً نشان از دخالت کلیدی این ژن در راه‌اندازی اتوفازای بقاء دارد (شکل ۶). روند مشابهی نیز در مورد *p53* وجود دارد که به نحو دیگری ارتباط پایین بودن سطح بیان آن را با اتوفازای بقاء نشان می‌دهد (شکل ۷- الف).

بیان *p53* و *beclin1* در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ درصد DMSO باعث انتخاب مسیر اتوفاژی بقاء و بالا بودن سطح است (شکلهای ۶ و ۷).



شکل ۷ - نمودار ستونی مربوط به چگونگی بروز تغییرات بیان ژن های *p53* (الف) و *dram* (ب) بر حسب افزایش غلظت DMSO. نماد \* معنادار بودن آماری در سطح ( $p < 0.05$ ) را در زمان مقایسه هر ستون با ستون شاهد نشان می‌دهد. شاهد در اینجا نمونه بدون تیمار سرمایی با ارتفاع ستون معادل ۱ است که برای ساده‌تر شدن، در شکل نشان داده نشده است.

DMSO)، این پروتئین تمایل حضور بیشتری در هسته دارد تا ژنهای مؤثر در بقاء و اتوفاژی را همزمان روشن نماید اما در مقادیر بالا، علاوه بر حضور در هسته، حضور سیتوپلاسمی نیز محتمل خواهد بود که با اثرگذاری به روی اندامک‌هایی چون میتوکندری توان راه‌اندازی فرآیندهای منجر به مرگ سلولی مانند آپوپتوز را دارد و

پروتئین *p53* به دو فرم سیتوپلاسمی و هسته‌ای وجود دارد که خواستگاه اصلی آن به عنوان پروتئین کنترل بیان ژن در هسته می‌باشد. بنابراین شاید بتوان ارتباط سطح بیان آن را در تفکیک اتوفاژی مرگ و بقاء به میزان بیان اشکال هسته‌ای و یا سیتوپلاسمی آن نسبت داد به شکلی که در مقادیر پایین از *p53* (ایجاد شده در غلظت‌های بالا از

مرگ را همنشین اتوفازی می‌سازد. آپوپتوز اصلی‌ترین شکل مرگ سلولی در سلولها می‌باشد (۱). نحوه اثر گذاری اشکال سیتوپلاسمی p53 به روی میتوکندری و راه‌اندازی آپوپتوز قبلاً نیز گزارش شده است (۳).

بنابراین به طور خلاصه، بر اساس نتایج حاصل از آزمون MTT و تحلیل‌های آماری مرتبط با آن، می‌توان گفت که افزایش معناداری در توان حیاتی نمونه‌های تیمار شده با سرما در غلظت‌های مختلف DMSO (در زمان قیاس غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ درصد با غلظت‌های بالاتر از ۱۰ درصد) مشاهده می‌شود که این افزایش روند مشخصی را در یک رفتار وابسته به زمان و غلظت از حفاظت‌کننده سرمایی نشان می‌دهد. ماده حفاظت‌کننده سرمایی دی‌متیل‌سولفوکسید در غلظت ۵ درصد توانایی حفاظت سلولها را در برابر تنش اعمال شده توسط فرآیند انجماد را نداشته و به همین جهت سلولها توان حیاتی پایین‌تری را نسبت به سلولهایی که در غلظت‌های بالاتر ماده حفاظت‌کننده سرمایی دی‌متیل‌سولفوکسید منجمد شده‌اند از خود نشان می‌دهند که علت آن راه‌اندازی مسیر اتوفازی مرگ می‌باشد. با افزایش غلظت DMSO (از ۵ به ۲۰ درصد) و نیز افزایش مدت زمان پس از ذوب (از ۲۴ تا ۷۲

ساعت) توان حیاتی سلولها افزایش می‌یابد؛ به طوری که اثر حفاظت سرمایی DMSO می‌تواند در غلظت‌های حجمی ۱۵ و ۲۰ درصد، بعد از گذشت سه روز از ذوب، توان حیاتی سلولها را به میزان ۸۰ درصد (نزدیک به توان حیاتی سلولها در نمونه شاهد) افزایش دهد. به عبارت دیگر، با افزایش غلظت DMSO تنش سرمایی اعمال شده به روی سلولها به واسطه بروز اثرات حفاظت‌کننده DMSO کاهش می‌یابد و به همین علت توان زیستی سلولها افزایش می‌یابد. این افزایش، با تغییر نوع اتوفازی از مرگ به بقاء حاصل می‌گردد که باعث نگهداری بیشتر سلولها در برابر اثرات مخرب سرما می‌گردد. بدیهی است که استفاده از روشهای آزمایشگاهی دیگر مانند لکه‌گذاری وسترن می‌توانست اطلاعات دقیق‌تری را در اختیار قرار دهد اما با توجه به منطق محکم و شفافیتی که در نحوه رفتار ژنهای دخیل در اتوفازی در سلولهای تیمار شده با سرما وجود داشت و نیز انطباق بسیار مناسبی که بین یافته‌های این تحقیق با گزارشهای قبلی مشاهده می‌شد لذا حصول نتیجه نهایی چندان وابستگی اساسی نسبت به انجام بررسیهای بیشتر در سطح پروتئین‌سازی را نشان نمی‌داد.

## منابع

- ۱- علومی مانا، شریعتی الهه سادات، بوذری سعید (۱۳۸۸) مطالعه فعالیت آپوپتوزیس پروتئین هیبرید (A1-GMCSF) بر روی رده های مختلف سلولی دارای گیرنده GMCSF. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۲(۱): ۸۵.
- ۲- مومنی حمید رضا، سلیمانی مهرنجانلی ملک، آبنوسی محمد حسین، نسیمی پروا (۱۳۸۹) ارزیابی قابلیت حیات قطعات نخاع موش بالغ به وسیله سنجش MTT. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۳(۲): ۲۶۷.
- 3- Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*. 9(45):145-152.
- 4- Armand M, Karow JR. 1969. Cryoprotectants- a new class of drugs. *J Pharm. Pharmac*. 21: 209-223.
- 5- Barry JF. 2004. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo-letters*. 25: 375-388.
- 6- Brockbank KGM, Carpenter JF, Dawson PE. 1992. Effects of storage temperature on viable bioprosthetic heart valves. *Cryobiology*. 29: 537-542.
- 7- Chapsky L, Rubinsky B. 1997. Kinetics of antifreeze protein-induced ice growth inhibition. *FEBS Lett*. 412: 241-244.
- 8- Chen N, Debnath J. 2010. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett*. 584: 1427-1435.
- 9- Codogno P, Meijer AJ. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*. 12: 1509-1518.

- 10- Coger R, Toner M. 1995. Preservation techniques for biomaterials. *The Biomedical Engineering Handbook*; Chapter 105: 1567-1578.
- 11- Crighton D, Wilkinson S, Ryan K. 2007. DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy*. 3: 72-74.
- 12- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*, 13: 2905-2927.
- 13- De duve C, Wattiaux R. 1966. Functions of lysosomes, *Annu. Rev. Physiol.* 28: 435-492.
- 14- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*. 89: 271-277.
- 15- Devries AL, Wohlschlag DE. 1969. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*. 163: 1074-1075.
- 16- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchororuy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool*. 265: 432-437.
- 17- Fahy GM. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*. 23: 1-23.
- 18- Farrant J, 1977. Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Phil Trans R Soc Lond*. 278: 191-205.
- 19- Jia Z, Davies PL. 2002. Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 27(2): 101-106.
- 20- Lim LY, Vidnovic N, Ellisen LW, Leong CO. 2009. Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. *Br J Cancer*. 3: 1606-1612.
- 21- Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao JK, Yang JM. 2010. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacologica Sinica*. 31: 1154-1164.
- 22- Mazur P, Leibo SP, Chu EH. 1972. A two factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cell Research*. 71: 345-355.
- 23- Mazur P. 1984. Freezing and Low Temperature Storage of Freezing of Living Cells: Mechanisms and implications. *Amer. J. Physiol.* 247: 125-142.
- 24- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. 2010. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res*. 20: 748-762.
- 25- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. 2010. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. 140: 311-326.
- 26- Pegg DE. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*. 368: 39-57.
- 27- Roy S, Debnath J. 2010. Autophagy and tumorigenesis. *Semin Immunopathol*. 32: 383-396.
- 28- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning (A Laboratory Manual). 3<sup>th</sup> ed. p:5.
- 29- Shepard ML, Goldstone CS, Cocks FH. 1976. The H<sub>2</sub>O-NaCl-glycerol phase diagram and its application in cryobiology. *Cryobiology*. 13 : 9-23.
- 30- Turcotte S, Chan DA, Sutphin PD, Hay MP, Denny WA, Giaccia AJ. 2008. A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell*. 14: 90-102.
- 31- Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2: 489-501.
- 32- Wu B, Zhu JS, Zhang Y, Shen WM, Zhang Q. 2008. Predictive value of MTT assay as an in vitro chemosensitivity testing for gastric cancer: One institution's experience. *World J Gastroenterol*. 14: 3064-3068.
- 33- Yang Z, Klionsky DJ. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol*. 12: 814-822.
- 34- Zeron Y, Sklan D, Arav A. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol Reprod Dev*. 61: 271-278.

## **Quantitative Study of the Genes Involved in Cell Survival and Autophagy Pathways in T-47D Cell Line with Emphasis on Upgrading Cold Resistance of the Cells in the Presence of DMSO**

**Vahabi M., Safarian Sh., Zargar S.J. and Aliasghari L.**

**Cell & Molecular Biology Dept., School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran**

### **Abstract**

Dimethylsulfoxide (DMSO) is one of the cryoprotectants utilizing in freezing and long term maintenance of the cells. In this study, the mechanism of protection of this mater in relation with cell death and autophagy is envisaged. Study of the expression level of autophagic genes (*atg5*, *lc3*, *beclin1*, *dram* و *p53*), using real time RT-PCR, indicated that at the lowest concentration of DMSO the genes involved in autophagy are over-expressed, thus regarding to death autophagy induction, the cells have lower viability relative to those cells which are freezed at the higher concentrations of cryoprotectant. Increasing cell viability, at the greater concentrations of DMSO (over than 10%), occurs because of the converting of death autophagy to cytoprotective one which is supported by means of over-expression of the genes involved in the survival pathway. Simultaneous study of autophagy and AKT/mTOR pathway can be utilized as a separating method for death and survival autophagy.

**Key words:** Cryopreservation, Autophagy, Dimethylsulfoxide, Real time RT-PCR