Archive of SID

● مقاله تحقیقی

بررسی اثر میدان الکترومغناطیس بر تکثیر و تمایزسلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان به نورون

لعیا قهاری[1]، *منوچهر صفری[2]، مجید جدیدی[3]

چکیده

مقدمه: امروزه شاهد گسترش روز افزون سیستم‌های الکترونیکی و میدانهای الکترومغناطیس در محیط زندگی بوده و از آن در درمان برخی اختلالات عصبی بهره مند می‌گردیم. هدف این مطالعه بررسی اثرات تکثیری و تمایزی امواج الکترومغناطیس بر روی سلولهای بنیادی بند ناف بود.

روش بررسی: بند ناف نوزاد سالم تازه متولد شده در شرایط استریل به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. سپس با استفاده از آنزیم‌های هیالورونیداز، ترپسین وکلاژنازسلولها جدا و سپس کشت داده شدند. برای خالص سازی و حذف سلولهای اضافی فلاسکها سه بار پاساژ داده شدند و سپس روزانه به مدت ۲ ساعت برای ۱۴ روز فلاسکها در داخل انکوباتور درمعرض امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدتهای ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا قرار گرفتند. سپس با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی نورون و MTT از لحاظ تکثیر و تمایزسلولها به نورون مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها : نتایج نشان داد شدتهای ۰/۵ و ۱ میلی تسلا باعث کاهش شدید سلولها گردید اما در گروه ۰/۲۵ میلی تسلا کاهش تعداد سلولها با گروه کنترل معنی‌دار نبود. اما در بررسی تمایز فقط در گروههای ۰/۲۵ و ۰/۵ تمایز مشاهده شد و در گروه ۱ میلی تسلا تمایزی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق حاکی از آن است که امواج الکترومغناطیس بر تمایز و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف اثرگذار هستند.

کلمات کلیدی: امواج الکترومغناطیس، سلولهای بنیادی مزانشیمی، بند ناف، نورون

فصلنامه علمی پژوهشی ابن‌سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهاجا (سال بیست و یکم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۸، مسلسل ۶۹)

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۹

۱. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران

۲. استاد، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولهای بنیادی عصبی، سمنان، ایران (*مؤلف مسئول) safari@semums.ac.ir

۳. استاد، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیک پزشکی، سمنان، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

به طور کلی سلولهای بنیادی دارای سه منشاء،جنینی[1]، بزرگسالان وسلولهای بنیادی حاصل از تحریک[2] هستند. سلولهای بنیادی بزرگسالان در بسیاری از بافتهای تخصص یافته بدن از جمله مغز استخوان، نخاع، پالپ دندان، اپیدرم، عضله اسکلتی، روده، پانکراس، کبد، قرنیه و شبکیه چشم یافت می‌شوند [۱]. این سلولها تحت شرایط فیزیولوژیک یا به دنبال ایجاد ضایعه، به سلولهای بافتی که در آن قرار دارند متمایز می‌شوند و بافت آسیب دیده را ترمیم می‌کنند. به عنوان مثال سلولهای بنیادی خونساز در مغز استخوان به انواع سلولهای خونی متمایز می‌شوند. علاوه بر این سلولهای بنیادی بالغ تحت شرایط پاتولوژیکی خاص مانند التهاب یا تغییر در فاکتورهای محیطی به سلولهای دیگری که مربوط به آن بافت خاص نیستند، تمایز می‌یابند. بعنوان مثال سلولهای بنیادی مشتق از مغز استخوان علاوه بر اینکه سلولهای خونی و ایمنی را می‌سازند، قادرند انواع دیگری از سلولها نظیر سلولهای ماهیچه اسکلتی، میکروگلیا، استروگلیا و هپاتوسیت‌های کبدی را نیز بسازند [۲، ۳]. سلولهای بنیادی درون محیط میکروسکوپی که «نیچ»[3] نامیده می‌شود تحت تأثیر ترکیبات بیوشیمیایی محلول (سیتوکین‌ها ، شیموکین‌ها و فاکتورهای رشد) و همچنین ترکیبات نامحلول مانند رسپتورهای خلال غشایی و ماتریکس خارج سلولی قرار می‌گیرند. ماتریکس خارج سلولی از طریق تنظیم بیواکتیویته فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها ، توقیف فاکتور رشد و اثر مستقیم بر فعالیت گیرنده‌ها می‌تواند بر روی اتصالات سلولی، تکثیر، تمایز و زنده ماندن سلول تأثیرگذار باشد؛ یعنی می‌توان گفت تقابل بین سلول و ماتریکس خارج سلولی باعث تغییر در رفتار سلول می‌شود [۴].

تاکنون چندین مولکول به عنوان فاکتورهایی که ساز و کارهای خودنوزایی، تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی را رهبری می‌کنند شناسایی شده است. به عنوان مثال ثابت شده است که لیگاند Wnt در خودنوزایی و تمایز سلولهای بنیادی به دودمانهای دیگر سلولی ایفای نقش می‌کند [۵]. این لیگاند که توسط استئوبلاست‌ها تولید می‌شود، در حفظ عملکرد و سکون سلولهای بنیادی خونی[4] و رشد و تمایز استئوبلاست‌ها اهمیت دارد [۶]. همچنین میزان سیگنال Wnt یک تنظیم کننده مهم در تکامل دستگاه عصبی پستانداران است. سیگنال Notch در تنظیم خودنوسازی سلولهای بنیادی بزرگسالان و تمایز سلولهای اجدادی در طول نسلهای خاص سلولی ایفای نقش می‌کند [۷]. علاوه بر این خودنوسازی و تمایز سلولهای بنیادی به وسیله فاکتورهای رشد (FGF-FGFR-EGF-EGFR) سیتوکین‌ها ، میکرو RNAها و فاکتورهای نسخه برداری تحت تأثیر قرار می‌گیرند [۸].

در تحقیقات جدید از میدانهای مغناطیسی فرکانس پایین جهت ایجاد تکثیر و تمایز در سلولهای بنیادی استفاده شده است. میدان مغناطیسی در محیط زندگی انسان‌ها وجود دارد، این میدانها می‌توانند منبع طبیعی داشته و یا ناشی از دستگاه‌های الکترونیکی مختلف باشند. دستگاه‌ها و تجهیزات زیادی به عنوان مولد این میدان‌ها وجود دارند که می‌توانند کاربرد درمانی برای انسان داشته باشند [۹]. نتایج مطالعاتی که در جمعیت‌های سلولی متفاوت و نیز بافت‌ها ، ارگان‌ها و میکروارگانیسم‌های مختلف در مواجهه با میدان مغناطیسی با شدت‌ها و فرکانس‌های گوناگون صورت گرفته است، بر افزایش فعالیت تکثیری سلول‌های گیرنده نور [۱۰]، افزایش سرعت ترمیم بافت در موش صحرایی، افزایش تکثیر سلول‌های آستروسیتی [۱۱]، بهبود تکثیر سلول پروتوزوآ، افزایش تکثیر باکتری ای‌کولای [۱۲]، افزایش تمایز سلول‌های FLK-1+، سلول‌های بنیادی جنینی موش به سلول‌های عضله قلب [۱۳]، تمایز بافت جنینی موش به غضروف [۱۴]، تمایز مونوسیتهای میلوئیدی رده سلولهای U937 و افزایش تعداد سلولهای

1. embryonic
2. Induced pluripotent stem cells
3. niche
4. Hematopoietic stem cell (HSC)

www.SID.ir

Archive of SID

طحال موش صحرایی دلالت دارد [۱۵].

مطالعات نشان داده که سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف قادرند به دیگر سلولهای بنیادی تمایز یابند [۱۶، ۱۷].

مطالعات انجام شده که برخی از آنها که به طور نمونه بیان شد، ثابت می‌کند که میدانهای مغناطیس با شدتها و فرکانسهای متفاوت می‌تواند بر روی سلولها تأثیر داشته باشد. بنابراین ما نیز در این مطالعه سعی کردیم تا با تمرکز بر روی سلول‌های بنیادی وکشت این سلول‌ها و قرار دادن این سلولها تحت تأثیر میدان مغناطیسی با فرکانس ثابت و شدت‌های مختلف، اثرات آنها را بر روی تکثیر و تمایز سلولها بررسی نماییم و مشخص نماییم که آیا میدان مغناطیسی قادر خواهد بود تغییری در تکثیر و سرنوشت سلولهای بنیادی استخراج شده از بند ناف ایجاد نماید.

روش بررسی

تهیه سلولهای بنیادی

بند ناف نوزاد سالم تازه متولد شده از بیمارستان امیرالمومنین در شرایط استریل در محلول کشت[1] حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml)، استرپتومایسین (۶۰ mg/ml) به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. ابتدا با استفاده از PBS آنها را کاملاً شسته سپس به آرامی عروق آنها را جدا نموده و ماتریس به جا مانده را در ظرف پتری دیش حاوی HBSS قرار دادیم. آنها به قطعات بسیار ریز حدود ۵ میلی متری تقسیم شدند. سپس به مدت یک ساعت مخلوط آنزیم‌های هیالورونیداز، ترپسین وکلاژناز به محیط کشت اضافه شد و بافتها داخل انکوباتور حاوی CO_2 قرار داده شدند. بعد از آن کاملاً پیپتاژ نموده و با سپس با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و محیط رویی کاملاً تخلیه گردید. برای خنثی نمودن آنزیم‌ها و ترپسین از سرم گوساله ۱۰٪ استفاده شد. پلت تشکیل شده را داخل فلاسک تخلیه نموده محیط کشت DMEM (sigma) همراه با سرم جنین گاوی ۱۰٪ (FBS)[2] در داخل انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰٪ و CO_2 ۵٪ انکوبه گردیدند. بعد از ۴۸ ساعت فلاسک‌ها از انکوباتور خارج شده، محیط رویی را بیرون ریخته و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل حاوی FBS ۱۵٪ به آن اضافه گردید و اجازه داده شد تا سلولها شروع به رشد نمایند. پس از آن هر ۳ روز یک بار محیط کشت سلولها تعویض شد. بعد از اینکه سلولها کف فلاسک را پر کردند فلاسکها پاساژ داده شدند. برای خالص سازی سلولها ۳ پاساژ متوالی انجام گرفت و با انجام ۳ پاساژ متوالی سلولهای اضافی مانند سلولهای چربی و فیبروبلاست از محیط کشت خارج شده و فقط سلول‌های بنیادی که قادر به چسبیدن و تکثیر بودند، باقی ماندند [۱۸].

برای شمارش سلولها از محلول تریپان بلو ۰/۴٪ استفاده می‌شود. بعد از شمارش سلولها تعداد ۵۰۰۰ سلول داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته و با همان ترکیبات قبلی داخل انکوباتور اجازه رشد و تکثیر به آنها داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲ هفته روزانه به مدت ۲ ساعت در میدان مغناطیسی با شدتهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز قرار داده شدند. و در نهایت در پایان روز ۱۴ آزمون MTT برای تکثیر سلولها انجام شد [۱۹].

آماده سازی میدان مغناطیسی

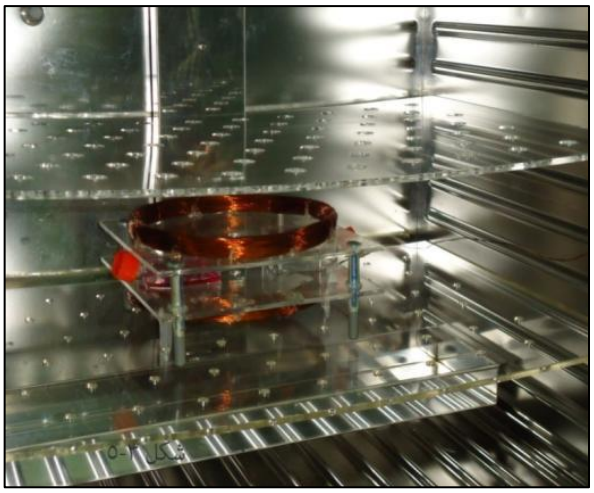
با توجه به ضعیف بودن شدت میدان‌های مغناطیسی مورد نیاز در این پروژه، هرگونه نوسان در برق شهر موجب تغییر در شدت میدان مغناطیسی مورد نیاز می‌گردید، لذا با استفاده از یک دستگاه سیگنال ژنراتور[3] فرکانس ۵۰ هرتز سینوسی مورد نیاز تأمین گردید (شکل۱). به منظور تقویت سیگنال ۵۰ هرتز ایجاد شده، خروجی دستگاه به یک آمپلی فایر صوتی[4] متصل شد. با ارتباط خروجی آمپلی فایر و سیم پیچ میدان مغناطیسی،

1. HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

2. fetal bovine serum
3 LINKU
4. NAVASAZ

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱- دستگاه تولید کننده امواج الکترومغناطیس در داخل انکوباتور

امکان تنظیم ولتاژ ورودی سیم پیچ و به دست آوردن میدان مغناطیسی متناوب با شدت‌های مورد نظر فراهم گردید. برای ایجاد میدان مغناطیسی یکنواخت از دوسیم پیچ سری با قطر داخلی ۱۶ سانتیمترکه از سیم‌های مسی با روکش لاکی به ضخامت ۰/۵ میلی‌متر و ۳۰۰ دور سیم تشکیل شده، استفاده گردید. برای تنظیم و اندازه‌گیری شدت میدان مغناطیسی (چگالی شار)، از دستگاه تسلامتر[1] استفاده شد. برای اندازه‌گیری شدت میدان، قبل از شروع هر مرحله از آزمایش، سنسور تسلامتر در مرکز میدان مغناطیسی قرار گرفته و شدت میدان مغناطیسی در سه مقدار ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی تسلا تنظیم شد.

آزمون MTT برای شناسایی تکثیر سلولی

در انتهای پاساژ سوم بعد از تریپسینه کردن سلولها با تریپسین–ادتا[2] شمارش سلولی با تریپان بلو[3] انجام گردید. در این مرحله تعداد سلولهای مورد نیاز برای کار به دست می‌آید. ابتدا محیط کشت حاوی پنی‌سیلین و اریترومایسین و ۱۰٪ FBS به هر چاهک به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر حاوی ۵۰۰۰۰ سلول اضافه می‌کنیم. سپس پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور CO_2 دار انکوبه می‌کنیم، اجازه می‌دهیم سلول‌ها به کف چسبیده و به حالت پایدار در آیند. روز بعد محیط کشت رویی پلیت‌ها را خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر MTT (سیگما) به هر چاهک اضافه می‌کنیم. به مدت ۴-۲ ساعت در انکوباتور حاوی CO_2 و در دمای ۳۷ درجه قرار می‌دهیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت رویی را دور ریخته (با دقت محلول MTT را از چاهک‌ها خارج نموده) به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO (مرک) (یا۱۰۰ میکرولیتر ایزو پروپانول اسید) اضافه می‌کنیم. پلیت‌ها را در دمای اتاق به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار می‌دهیم با دستگاه الایزا، در جذب طول موج ۵۹۰nm ثبت می‌کنیم. با استفاده از فرمول زیر درصد بقای سلولهای بنیادی سنجیده می‌شوند [۲۰]:

$$\text{درصد بقا} = \frac{OD\,(test) - OD\,(blank)}{OD(control) - OD(blank)} \times ۱۰۰$$

ایمونوسیتوشیمی

برای انجام پروسه ایمونوسیتوشیمی ابتدا سلول‌ها را در پارافرمالدئید ۴٪، در PBS به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس نموده سپس ۳ بار سلول‌ها را با PBS شستشو می‌دهیم. برای antigen retrieval به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۹۵ درجه قرار گرفتند. مجدداً ۳ بار سلول‌ها را با PBS شستشو داده، بعد از این مرحله سلول‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در Triton x-100، در PBS دمای اتاق انکوبه شدند تا دیواره سلولها برای آنتی‌بادی نفوذپذیر گردد. بعد از آن مجددا ۳ بار سلول‌ها را با PBS شستشو داده شدند. در مرحله بعد برای حذف باندینگ‌های اضافه سلول‌ها در goat serum ۱۰٪، در PBS، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردیدند. بعد از آماده شدن سلولها برای رنگ آمیزی به مدت یک شبانه روز سلولها را در آنتی‌بادی اولیه سلولهای عصبی anti FOX3 (abcam) به نسبت ۱ به ۲۰۰ در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد در PBS به مدت ۱۰ دقیقه سه بار شستشو داده شدند. در مرحله بعد سلول‌ها در آنتی‌بادی ثانویه flourophore- conjugated (abcam) Dylighy 488 به نسبت ۱ به ۲۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردیدند . بعد از آن مجددا ۳ بار سلول‌ها را با PBS شستشو

1. LUTRON/TAIWAN, EMF-827
2. Trypsin- Edta (Merck)
3. Trypan- Blue (Merck)

www.SID.ir

Archive of SID

داده شد. در مرحله بعد برای رنگ آمیزی هسته از DAPI به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی استفاده نموده و در نهایت چسباندن لامل و مشاهده با میکروسکوپ فلوروسانس انجام گردید.

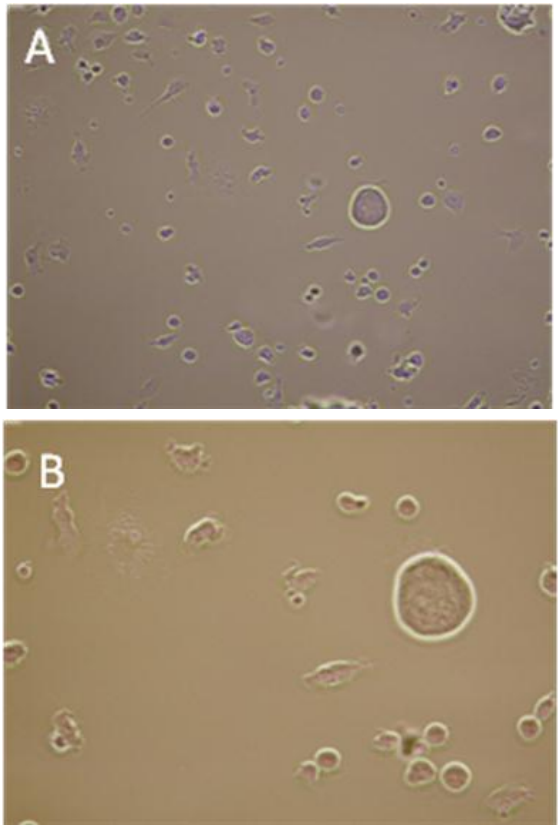
یافته‌ها

ارزیابی سلولها پس از استخراج

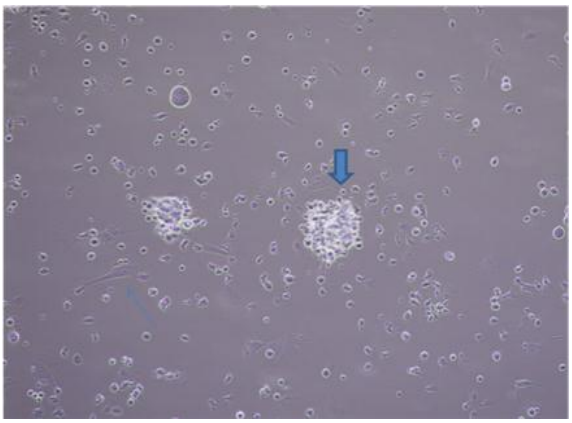
سلولها پس از استخراج از مغز استخوان کروی شکل و با اندازه‌های متفاوت دیده می‌شوند و می‌تواند شامل سلولهایی مثل گلبولهای خونی، سلولهای چربی، فیبروبلاست و غیره باشد. (تصویر ۲)

سلولها یک روز پس از استخراج: تعدادی از سلولها شروع به دوکی شدن و چسبیدن نمودهاند. تعداد سلولها بیشتر شده و کلونی هایی که نشان دهنده تکثیر سلولها است در نواحی پراکنده در داخل فلاسکها مشاهده شدند. (تصویر ۳)

سلولها سه روز پس از استخراج: همانطور که در تصویر ۴ نیز دیده می‌شود در روز سوم سلولها دوکی شکل و با زوائد بلند



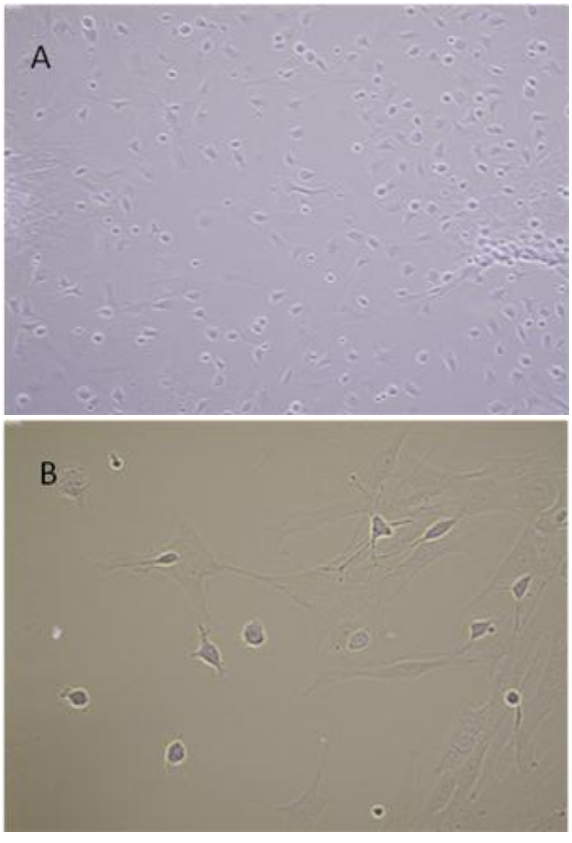
تصویر ۲- سلولها پس از استخراج
(شکل A بزرگنمائی x۱۰ و شکل B بزرگنمائی x۲۰).



تصویر ۳- سلولها یک روز پس از استخراج بزرگنمائی x۱۰.
فلش ضخیم نشان دهنده کلونی سلولی است.

یا کوتاه دیده می‌شوند. هسته و گرانولهای اطراف آن در سلولها قابل مشاهده است.

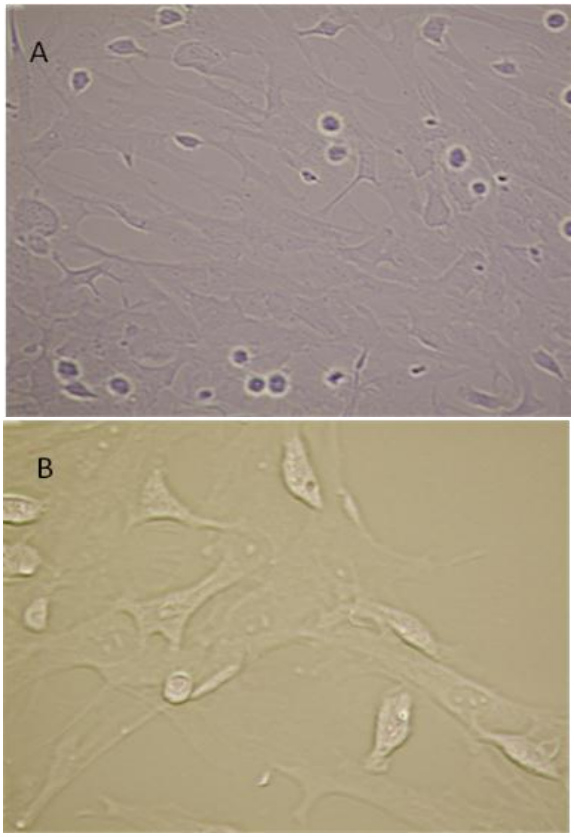
سلولها دو هفته پس از استخراج: سلولها بیش از ۸۰٪ از کف فلاسک را پر کرده‌اند. شکل سلولها از دوکی به گرد و چند وجهی تغییر یافته است. در این مرحله باید سلولها پاساژ داده شوند. (تصویر ۵)



تصویر ۴- سلولها سه روز پس از استخراج
(شکل A بزرگنمائی x۲۰ شکل B بزرگنمائی x۴۰).

www.SID.ir

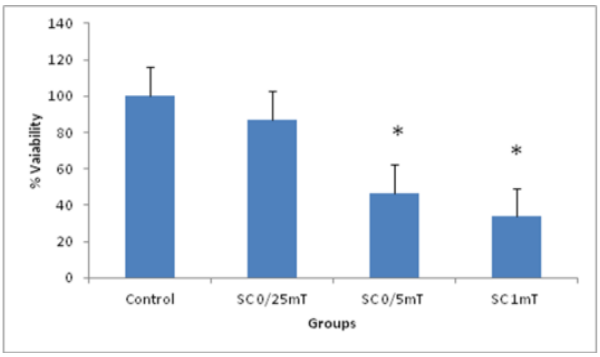
Archive of SID



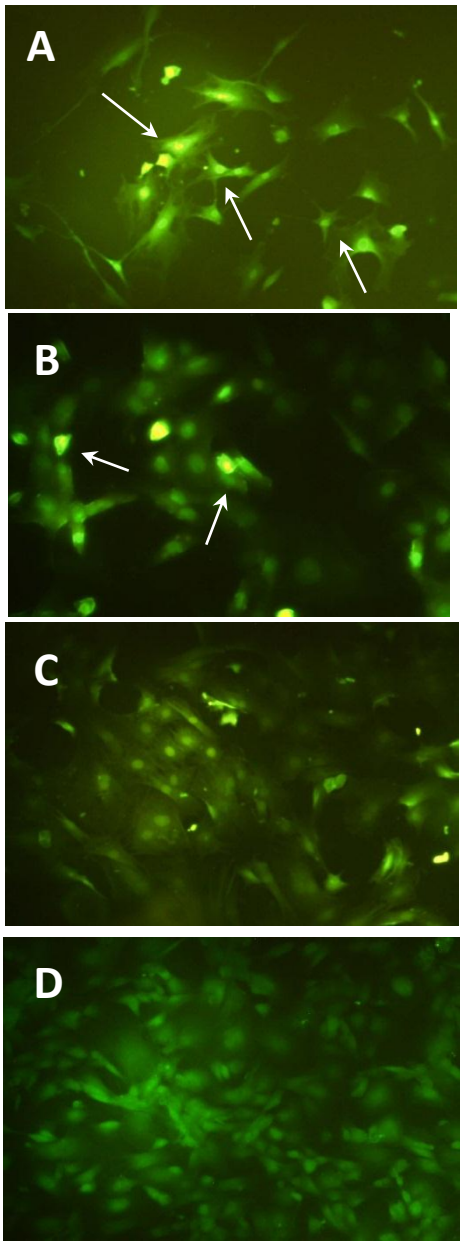
تصویر ۵- سلولها دو هفته پس از استخراج
(شکل A بزرگنمائی x۲۰ وشکل B بزرگنمائی x۴۰)

نتایج آماری نشان داد که درصد قدرت بقای سلولها با افزایش شدت جریان کاهش می‌یابد. بین شدتهای ۰/۲۵ و ۰/۵ از نظر قدرت بقا تفاوت معنی‌داری وجود داشت. اما در شدت ۱ میلی‌تسلا تعداد سلولها کاهش یافته و قدرت بقا کمتر از دیگر گروهها شده بود و این تفاوت معنی‌دار بود. با مقایسه با گروه کنترل درصد بقا در تمام گروهها که امواج دریافت کرده بودند کاهش یافته بود اما در گروه ۰/۲۵ اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار نبوده است. اما در گروههای ۰/۵ و ۱ میلی تسلا اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار بوده است. (نمودار ۱)

نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی و استفاده از آنتی بادی اختصاصی نشان داده است که در شدتهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌تسلا سلولها تمایز یافته و سلولهای تمایز یافته نورون مشاهده گردیده است. اما در شدت ۱ میلی‌تسلا هیچگونه تمایزی مشاهده نشده است. نتایج نشان داده است که در شدت ۰/۵ میلی‌تسلا تمایز به نورون بیشتر از ۰/۲۵ میلی تسلا بوده است. (تصویر ۶)



نمودار ۱- میزان بقای سلولها بعد از در معرض قرار گرفتن امواج الکترومغناطیس
(* نشان دهنده مقایسه گروههای مورد آزمایش با گروه کنترل بوده است p<۰/۰۰۱)



تصویر ۶- تصاویر میروسکوپ فلوروسانس از سلولهای تمایز یافته به نورون(A: گروه ۰/۲۵ B: گروه ۰/۵؛ C: گروه با شدت ۱ میلی تسلا؛ و D: گروه کنترل) فلشها نشان دهنده سلولهای تمایز یافته است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

میـدان الکترومغناطیسی به عنوان یک اصطلاح عمومی در برگیرنده میدان‌هـــای الکتریکی، مغناطیسی و الکترومغناطیسی است که توسط بسیاری از دستگاه‌های موجود در زندگی روزانه انسان تولید می‌شوند. امروزه با کاربرد گسترده از وسایل و ابزار پیشـــرفته‌ای که با تولید و القای میدان‌های الکترومغناطیسی در ارتباط هستند، ضرورت بررسی تأثیر این میدان‌ها بر روی سلامت انسان احساس می‌شود.

با توجه به نتایج ایـن مطالعـه امـواج الکتـرو مغنـاطیس بـا شدت‌های خاص قادر است سلولهای بنیادی مزاشیمی بند نـاف را به سلولهای دیگر تمایز دهد. اما شدت‌هـای بیشـتر از تمـایز آنها جلوگیری می‌نماید. همچنین تکثیـر ایـن گـروه از سـلولها وابسته به شدت جریان اسـت. مطالعـات آزمایشـگاهی فراوانـی نشان می‌دهند که مواجهـه بـا میـدان‌هـای مغناطیسـی حـوزه وسیعی ازپاسخ‌ها را در سیستم‌های زنده القاء می‌کند.

اثراتی از شدت مواجهه بـر تکثیـر و تمـایز سـلولی، تکـرار چرخه سلولی، آپوپتوز گزارش شـده اسـت. قـرار دادن بافتهـای تمایز نیافته از بافت پیوندی مزانشـیمی جنـین‌هـای مـوش ۱۴ روزه در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکـانس ۵۰ هرتـز و شدت ۸ میلی تسلا به مـدت ۸ سـاعت باعـث القـای تمـایز در بافتهای تمایز نیافته جنین می‌گردد [۲۱]. میدان مغناطیسـی بـا فرکانس پایین ۳۰۰-۲۰۰ هرتز به صـورت In vitro بـر روی سلولهای آدیپوسیت ترجمه و همانندسازی ژنـی را تغییـر داده و سرعت تمـایز سـلولی و فعالیـت آنزیمـی را تحـت تـأثیر قـرار می‌دهند [۲۲]. میدانهای مغناطیسی با فرکانس ۶۰-۵۰ هرتز و شدت ۳ میلی تسلا به مدت ۴ هفته و روزانـه ۵ سـاعت باعـث افزایش فعالیت تکثیری سلولهای گیرنده نور (شـبکیه) خواهنـد شـد [۱۰]. نتـایج دیگـری نشـان داده اسـت کـه میـدان الکترومغناطیس برتکثیر و تمایز سلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی مغزاسـتخوان مـوش درمحـیط کشـت، میـدان ۵۰ هرتـز و ۲ میلی تسلا مؤثر بوده است. همچنـین نتـایج نشـان داده کـه میدان الکترومغناطیس با این اندازه و شدت سبب مهار تکثیـر و افزایش تمایز به استئوبلاست در سلول‌هـای بنیـادی مـی‌شـود [۱۴]. نتایج تحقیق فوق مشابه نتایج این پروژه بوده اسـت کـه شدت ۱ میلی تسلا تکثیر سـلولها را کـاهش داده اسـت امـا در مورد تمایز متفاوت بوده است. شاید علت تفاوت در تمـایز نـوع تمایز بوده است. در تحقیق فوق تمایز به استئوبلاست افـزایش یافته، در این پروژه تمایز به سلول عصبی در شدت بالا کـاهش یافته است. درمطالعه چنگ جی[1] نتایج مشخص کرد که میـدان ۱/۸ میلـی تسـلا بـه شـدت باعـث تمـایز سـلولهای بنیـادی مزانشیمی به استئوبلاست می‌شود. همچنین مشخص شـد کـه میدان بافرکانس ۵۰ هرتز و شدت‌های ۱/۴ تا ۲/۲ میلـی تسـلا تمایز سلول‌ها را افزایش داده و تکثیر سلول‌ها را کاهش می‌دهد [۲۳]. در این تحقیق نیز نتایج تکثیر با تحقیق فوق یکسان بوده است اما نتایج تمایز متفـاوت بـوده اسـت. گـومرال[2] نشـان داد میدان الکترومغنـاطیس در القـای تبـدیل سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی مغزاستخوان به شـبه کاردیومیوسـیت‌هـا نقـش دارد [۲۴]. بارانوفسـکا[3] نشـان داد میـدان ۱۵ هرتـز بـا شـدت ۱ میلی تسلا تمایز استئوژنیک را افزایش و به صورت همزمـان از تشکیل سلول‌های چربی ممانعت می‌کند [۲۵]. دیگـر نتـایج محققین نشـان داد میـدان مغناطیسـی ۶۰ هرتـز باشـدت ۰/۱ میلی تسلاها باعث افزایش تکثیرسلول‌های آستروسیتی خواهـد شد[۱۱]. محققین جهت ارائه یـک فرمـول ریاضـی بـرای اثـر تمایزی میدان مغناطیسی بـر سـلولهای بنیـادی، مقـالات بـین سـالهای ۲۰۰۴ تـا ۲۰۱۰ را مـورد بررسـی قـرار دادنـد. نتـایج مطالعات آنها نشان داد کـه شـدت میـدانهای بـین ۱۰ تـا ۶۰۰ میکروتسلا بیشترین اثر تکثیری رادارند و شدتهای بین ۹/۴ تـا ۱۲ تسلا باعث مرگ سلولهی بنیادی می‌شوند [۲۶]. نتایج ایـن تحقیق نیز نشان داد که شدت ۰/۲۵ میلی تسلا کـاهش تکثیـر را ایجاد می‌کند اما تفاوت معنی‌دار نبود و از شـدت ۰/۵ تفـاوت تکثیر معنی‌دار بوده است. در حال حاضر به طور کلـی پذیرفتـه

1. Cheng G
2. Gumral
3. Baranowska

www.SID.ir

Archive of SID

شده است که امواج الکترومغناطیس در محدوده فرکانس‌های پایین می‌تواند DNA را جهت سنتز پروتئین‌ها تحریک نماید و یکی از توالی‌های DNA که در اثر امواج الکترومغناطیس تحت تأثیر قرار می‌گیرد نیز شناسایی شده است. ساز و کارهای اینتراکشن امواج الکترومغناطیس با سلول جهت سنتز پروتئین به طور دقیق مشخص نیست. ولی مطالعات نشان می‌دهد که اثرات امواج الکترومغناطیس با سلول می‌تواند به صورت اینتراکشن مستقیم با DNA و یا به صورت اینتراکشن با مسیرهای سیگنالینگ اتفاق بیفتد. پاسخ به استرس در سطح سلولی به گونه دیگری است به طوری که در اثر استرس ساختارهایی مثل DNA و پروتئین‌ها فعال شده و افزایش بیان ژنها پاسخ دهنده به استرس منجر به سنتز پروتئین‌های استرس شده و این پروتئین‌ها ساز و کارهای دفاعی را برای سلول فراهم می‌آورند. شاید بتوان گفت که میدانهای مغناطیسی توالی‌های خاصی از DNA که باعث بیان پروتئین‌های دخیل در تکثیر می‌شود را فعال می‌کند [۲۷]. استفاده از روش غیر تهاجمی و اعمال میدان مغناطیسی فرکانس پایین نشان داد که رشد بافت عصبی تحت تأثیر این میدانها مشابه با زمانی که از فاکتور رشد عصب (NGF) استفاده می‌شود افزایش می‌یابد و اندازه‌گیری سطح کاته‌کول‌آمین‌ها در محیط کشت با آنالیز HPLC حاکی از افزایش سطح دوپامین است. با توجه به دامنه بسیار وسیع شدتها و فرکانسهای میدانهای مغناطیسی و همچنین پیچیدگی‌های ساختار سلول، ساز و کار اینتراکشن بین میدان مغناطیسی و سلول به طور دقیق مشخص نیست.اما مطالعات تأثیر میدانهای مغناطیسی را بر تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی ثابت کرده است. محققین سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی را تحت تأثیر میدان ۱۰۰ میکروتسلا قرار دادند وسپس محیط کشت را از نظر مقدار DNA و فعالیت آلکالاین فسفاتها مورد ارزیابی قرار دادند . نتایج ارزیابی نشان دهنده تحریک تمایزی این سلولها به سلولهای استئوژنیک بود [۲۳]. همچنین در مطالعه دیگری سلولهای بنیادی مغز استخوان انسانی را به مدت ۷-۱۰ روز و هر روز ۲ ساعت تحت تأثیر میدان با شدت ۱۳۰ میکروتسلا قرار دادند. نتایج نشان داد که میدان با این شدت باعث تکثیر سلولها می‌شود. ثابت شده است که میدانهای مغناطیسی ضعیف نسخه برداری DNA را تحریک می‌کنند اینتراکشن میدان مغناطیسی با الکترونهای موجود در مولکول DNA می‌تواند پایه و اساس شروع نسخه‌برداری باشد. بررسی ساختار مولکولی DNA نشان می‌دهد که دو رشته تشکیل دهنده آن از طریق پیوند هیدروژنی به هم متصل می‌شوند. این پیوند از اشتراک الکترونها بین نیتروژن و یا اکسیژن با هیدروژن (پروتون) تشکیل می‌شود. میدانهای مغناطیسی ضعیف با تحت تأثیر گذاشتن این پیوند باعث جدا شدن دو رشته DNA از هم می‌شوند [۲۷]. این عمل میدان مغناطیسی شبیه به عمل آنزیمهای توپو ایزومراز و پلی‌مرازها است. پیوند هیدروژنی که بین نوکلئوتیدها قرار دارد از پیوند کوالانسی ضعیف‌تر است و در حدود ۵ کیلوکالری بر مول انرژی دارد. میدانهای مغناطیسی ضعیف در حد ۱۰ میکروتسلا می‌توانند باعث گسستن این پیوندها شوند اما طول و زاویه پیوند در اینتراکشن با میدان مغناطیسی و یا آشفتگیهای دیگر نقش بسیار مهمی در پاسخ مولکول دارد. بنابراین امواج الکترومغناطیس قادر است با تأثیر بر روی DNA موجب تکثیر سلولی و یا تمایز آنها گردد [۲۷]. مورگادو[1] بیان کرد که نفوذ Ca^{++} از طریق کانالهای کلسیمی نوع L ممکن است در پاسخ‌های درون سلولی به میدان‌های مغناطیسی فرکانس پایین باعث القای رشد عصبی شود. از طرف دیگر پروسه‌های تمایزی توسط کانالهای کلسیمی نوع L متوقف می‌شود و در حضور میدان‌های مغناطیسی فرکانس پایین تمایز افزایش پیدا می‌کند. تحقیقاتی که بعضی از آنها بیان شد، ثابت می‌کند که میدان‌های مغناطیسی فرکانس پایین تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی را تحریک می‌کند [۲۸]. در این تحقیق نیز ما جهت تحریک سلولهای بنیادی و افزایش پتانسیل تکثیری و تمایزی این سلولها از میدان مغناطیسی با شدتهای متفاوت استفاده کردیم و نتایج بسیار با ارزشی را به

1. Morgado

www.SID.ir

Archive of SID

دست آوردیم که یکی از این نتایج تمایز سلولها به نورون بود. از آنجایی که استفاده از میدان مغناطیسی بسیار کم هزینه و آسان‌تر از روشهای القائی دیگر است، می‌توان از این میدان‌ها در بسیاری از مطالعات بالینی جهت تحریک رشد و تمایز سلولها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی سمنان در سال ۱۳۹۲ با کد ۹۲/۲۹۹۵۱۸ بوده است.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارضی در منافع انتشار این مقاله وجود ندارد.

References

1. Jadidi M, Biat SM, Sameni HR, Safari M, Vafaei AA, Ghahari L. Mesenchymal stem cells that located in the electromagnetic fields improves rat model of Parkinson's disease. Iranian journal of basic medical sciences. 2016; 19(7):741-748.
2. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annual review of cell and developmental biology. 2001; 17:435-462.
3. Wang Y, Peng D, Yang X, Huang P, Ye H, Hui Y, et al. Study on umbilical cord-matrix stem cells transplantation for treatment of acute traumatic brain injury in rats. Turkish neurosurgery. 2019; 29(5):750-758.
4. Cakouros D, Gronthos S. Epigenetic regulation of bone marrow stem cell aging: revealing epigenetic signatures associated with hematopoietic and mesenchymal stem cell aging. Aging and disease. 2019; 10(1):174-189.
5. Sanchez-Ferras O, Coutaud B, Djavanbakht Samani T, Tremblay I, Souchkova O, Pilon N. Caudal-related homeobox (Cdx) protein-dependent integration of canonical Wnt signaling on paired-box 3 (Pax3) neural crest enhancer. The journal of biological chemistry. 2012; 287(20):16623-16635.
6. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. Nature reviews. Molecular cell biology. 2009; 10(7):468-477.
7. Tauriello DV, Haegebarth A, Kuper I, Edelmann MJ, Henraat M, Canninga-van Dijk MR, et al. Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl. Molecular cell. 2010; 37(5):607-619.
8. Inoue M, Uchida Y, Edagawa M, Hirata M, Mitamura J, Miyamoto D, et al. The stress response gene ATF3 is a direct target of the Wnt/β-catenin pathway and inhibits the invasion and migration of HCT116 human colorectal cancer cells. PloS one. 2018; 13(7):1–21.
9. Safari M, Jadidi M, Baghian A, Hasanzadeh H. Proliferation and differentiation of rat bone marrow stem cells by 400μT electromagnetic field. Neuroscience letters. 2016; 612:1-6.
10. Niederer P, Fankhauser F. Theoretical and practical aspects relating to the photothermal therapy of tumors of the retina and choroid: a review. Technology and health care. 2016; 24(5):607-626.
11. Clarke D, Penrose MA, Penstone T, Fuller-Carter PI, Hool LC, Harvey AR, et al. Frequency-specific effects of repetitive magnetic stimulation on primary astrocyte cultures. Restorative neurology and neuroscience. 2017; 35(6):557-569.
12. Azeemi ST, Shaukat SF, Azeemi KS, Khan I, Mahmood K, Naz F. Effect of visible range electromagnetic radiations on Escherichia Coli. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines. 2017; 14(1):24-31.
13. Ma F, Li W, Li X, Tran BH, Suguro R, Guan R, et al. Novel protective effects of pulsed electromagnetic field ischemia/reperfusion injury rats. Bioscience reports. 2016; 36:1-12.
14. Redeker JI, Schmitt B, Grigull NP, Braun C, Büttner A, Jansson V, et al. Effect of electromagnetic fields on human osteoarthritic and non-osteoarthritic chondrocytes. BMC complementary and alternative medicine. 2017; 17(1):1-8.
15. Duan Y, Wang Z, Zhang H, He Y, Lu R, Zhang R, et al. The preventive effect of lotus seedpod procyanidins on cognitive impairment and oxidative damage induced by extremely low frequency electromagnetic field exposure. Food & function. 2013; 4(8):1252-1262.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Fan C, Wang D, Zhang Q, Zhou J. Migration capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells towards glioma in vivo. Neural regeneration research. 2013; 8(22):2093-2102.
17. Doan CC, Le TL, Hoang NS, Doan NT, van Le D, Do MS. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. Iranian biomedical journal. 2014; 18(2):67-75.
18. Liu G, Wang L, Pang T, Zhu D, Xu Y, Wang H, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells regulate thymic epithelial cell development and function in Foxn1(-/-) mice. Cellular & molecular immunology. 2014; 11(3):275-284.
19. Ameredes BT, Hellmich MR, Cestone CM, Wooten KC, Ottenbacher KJ, Chonmaitree T, et al. The Multidisciplinary Translational Team (MTT) model for training and development of translational research investigators. Clinical and translational science. 2015; 8(5):533-541.
20. Lim S-W, Loh H-S, Ting K-N, Bradshaw TD, Allaudin ZN. Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. Tropical life sciences research. 2015; 26(1):111-120.
21. Cossarizza A, Monti D, Bersani F, Cantini M, Cadossi R, Sacchi A, et al. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1989; 160(2):692-698.
22. Zwirska-Korczala K, Jochem J, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Polaniak R, Birkner E, et al. Effect of extremely low frequency of electromagnetic fields on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes--an in vitro study. Journal of physiology and pharmacology. 2005; 56 Suppl 6:101-108.
23. Cheng G, Chen K, Li Z, Zhou J, Wei Z, Bai M, et al. Enhancement of osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats by sinusoidal electromagnetic fields. Journal of biomedical engineering. 2011; 28(4):683-688.
24. Gumral N, Saygin M, Asci H, Uguz AC, Celik O, Doguc DK, et al. The effects of electromagnetic radiation (2450 MHz wireless devices) on the heart and blood tissue: role of melatonin. Bratislavske lekarske listy. 2016; 117(11):665-671.
25. Baranowska A, Skowron B, Nowak B, Ciesielczyk K, Guzdek P, Gil K, et al. Changes in viability of rat adipose-derived stem cells isolated from abdominal/perinuclear adipose tissue stimulated with pulsed electromagnetic field. Journal of physiology and pharmacology. 2017; 68(2):253-264.
26. Viganò M, Sansone V, d'Agostino MC, Romeo P, Perucca Orfei C, Girolamo L de. Mesenchymal stem cells as therapeutic target of biophysical stimulation for the treatment of musculoskeletal disorders. Journal of orthopaedic surgery and research. 2016; 11(1):1-8.
27. Bergues-Pupo AE, Bergues JM, Falo F. Modeling the interaction of DNA with alternating fields. Physical review. 2013; 87(2).
28. Rosen BQ, Krishnan GP, Sanda P, Komarov M, Sejnowski T, Rulkov N, et al. Simulating human sleep spindle MEG and EEG from ion channel and circuit level dynamics. Journal of neuroscience methods. 2019; 316:46-57.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of electromagnetic field on proliferation and differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem-cells to neurons

Laya Ghahari[1], *Manouchehr Safari[2], Majid Jadidi[3]

Abstract

Background: Today, due to ever-expanding of using electronic systems and electromagnetic fields in the living environment and it can be used in treatment of some neurological disorders. The aim of this study was to investigate the effects of electromagnetic waves on cord blood stem cells.

Materials and methods: The newborn's umbilical cord was transferred to a cell culture laboratory under sterile conditions. Then, using hyaluronidase, trypsin and collagenase enzymes, the cells were separated and cultured. For purification and removal of additional cells, the flasks were passaged three times. Then, flasks were incubated in the incubator with electromagnetic waves at a frequency of 50 Hz and intensity 0.25, 0.5, and 1 millitesla, two hours per day for a consecutive 14 days. Then, neuronal specific antibodies and MTT assay were tested for neuronal proliferation and differentiation of the cells.

Results: The results showed that the intensity of 0.5 and 1 significantly decreased the number of cells, but in the 0.25 millitesla, there was no significant decrease in the number of cells in comparison with the control group. In addition, differentiation was observed only in 0.25 and 0.5 millitesla groups, but not in group 1 millitesla.

Conclusion: The results of this study indicate that electromagnetic waves can differentiate and expand the umbilical mesenchymal stem cells.

Keywords: Electromagnetic Waves, Mesenchymal Stem Cells, Umbilical Cord, Neurons

1. Assistant professor, Department of Anatomy, School of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Professor, Neuronal Stem cell Research Center, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran (*Corresponding author)

safari@semums.ac.ir

3. Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

www.SID.ir