تأثیر میدان مغناطیسی کم فرکانس بر سرعت رشد و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی

ضيه سليمی'، دکتر داريوش شهبازی گهرويی'، دکتر سعيد کرباسی"، دکتر سعيد کرمانی"،	من
دكتر شهناز رضوى	
مقائه بژوهشی	

چکیدہ

مقدمه: سلولهای بنیادی به دلیل قابلیت تکثیر و تمایز به سلولهای دیگر مدل خوبی برای بررسی اثرات میدان مغناطیسی کم فرکانس (Extremely low-frequency electromagnetic field یا ELF-EMF بر سلولهای بدن میباشند. بافت چربی به عنوان منبعی از سلولهای بنیادی مزانشیمی شناخته میشود. در این مطالعه تأثیر تابش با شدتهای مختلف بر میزان تکثیر بر سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی در زمانهای تابش ۲۰ و ۴۰ دقیقه بررسی شد.

روش ها: در این مطالعه تأثیر تابش با شدت ۰/۵ و ۱ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز بر میزان تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی با زمان های تابش ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز به مدت ۷ روز متوالی بررسی گردید. از تکنیک MTT assay برای بررسی رشد و میزان بقای سلول ها و از رنگآمیزی تریپان بلو به منظور ارزیابی میزان تکثیر سلول ها استفاده گردید. آنالیز دادهها با استفاده از آزمون One way ANOVA انجام شد.

یافتهها: میزان تکثیر و بقای سلولها در همهی گروههای تابش به طور معنیداری بیشتر از گروههای شاهد بود (P < ۰/۰۵) و تنها گروه ۱ میلیتسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز، اختلاف معنیداری با گروه شاهد نداشت.

نتیجه گیری: نتایج مطالعهی حاضر نشان داد که تابش میدان مغناطیسی با شدتهای ۰/۵ و ۱ میلی تسلا با توجه به زمان تابش می تواند باعث تحریک رشد و تکثیر سلولها شود. مکانیسم این تأثیر هنوز ناشناخته می باشد.

واژگان کلیدی: میدان مغناطیسی کم فرکانس، سلولهای بنیادی مزانشیمی، چربی، سرعت تکثیر و رشد

ارجاع: سلیمی مرضیه، شهبازی گهرویی داریوش، کرباسی سعید، کرمانی سعید، رضوی شهناز. تأثیر میدان مغناطیسی کم فرکانس بر سرعت رشد و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۲): ۴۵۵-۴۳۹

مقدمه
امروزه انسان بیش از هر زمان دیگر در معرض تـابش
میدان های الکترومغناطیسی قرار گرفته است. وسایل

الکتریکی پیرامون ما مانند کابل های فشار قوی، سیم کشی ساختمان ها، دستگاه های الکتریکی در منازل و کارخانهها و قطارهای برقی از جمله مولد

نویسندهی مسؤول: دکتر شهناز رضوی

Email: razavi@med.mui.ac.ir

439

^{*} این مقاله ماصل پایاننامهی دورهی کارشناسی ارشد به شمارهی ۱۳۹۱۹۳۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکدهی پزشکی و کمیتهی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲ – استاد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکدهی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکدهی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکدهی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مجله دانشکده پزشکی اصفهان – سال ۳۱ / شماره ۲۳۲/ هفته دوم خرداد ۱۳۹۲

میدان های الکترومغناطیسی میباشند. به این میدان ها با شدت های گوناگون و در محدوده ی فرکانس صفر تا ۳۰۰ میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس Extremely low-frequency electromagnetic field) یا ELF-EMF) گفته می شود (۲-۱).

فراگیر شدن میدان های الکترومغناطیسی ELF در محیط زندگی بشر، توجه دانشمندان و محققین را به بررسی تأثیر آن ها در بروز انواع سرطان ها جلب کرده است (۵-۳). مطالعهی Wertheimer و Leeper در سال ۱۹۷۹ نشان داد کودکانی که محل سکونت آنها سال ۱۹۷۹ نشان داد کودکانی که محل سکونت آنها در کنار خطوط انتقال برق قرار دارد، بیشتر به سرطان خون مبتلا میشوند (۶). در بررسی دیگری افزایش خطر بروز سرطان پستان و تومور مغزی به دنبال تابش با میدان های مغناطیسی دیده شد (۷) ولی سایر مطالعات چنین نتایجی را در بر نداشت (۰۱–۸).

یافته های مطالعات اپیدمیولوژیک در بسیاری از موارد متفاوت و غیر قابل تکرار می باشند، از طرفی به دلیل استفاده از نمونه های انسانی در این گونه مطالعات، مدت زمان انجام آزمایش سال های متمادی به طول می انجامد و ممکن است افراد مورد بررسی در این مدت تحت تأثیر عوامل دیگر مانند آلودگی هوا، عادات غذایی گوناگون، استرس های شغلی و بیماری های زمینه ای قرار بگیرند که نتایج حاصل را مخدوش میکند (۱۱). بنابراین، محققان جهت ارزیابی دقیق تر آثار میدان های الکترومغناطیس بر انسان به سمت نمونه های سلولی رفتند و آزمایشات خود را در شرایط In vitro و با شدت های بیشتر میدان های الکترومغناطیس آغاز نمودند.

در سلول های عصبی انسان که تحت تأثیر توموگرافی تشدید مغناطیسی با شدت ۰/۲ تسلا قرار

گرفته بودند، تغییراتی مشاهده شد که در سلولهای دیگر از جمله Hella cellها چنین تغییراتی رخ نداد (۱۲). در بررسی دیگری که بر رده های سلولی TE85 و MG63 و سلولهای استئوبلاستیک طبیعی انسان انجام گرفت، میدان مغناطیسی پالسبی باعث افزایش تكثير سلولها به خصوص سلولهاي استئوبلاستيك طبیعی انسان گردید (۱۳). در مطالعه ی دیگری مشاهده گردید که میدان مغناطیسی با ایجاد وقفه ای در مرحلـهی G1/S سـیکل سـلولی، مـانع از تکثیـر سلول های اندو تلیال عروقی و سلول های اپنی تلیال عدسمي ممي شود (١۴). ميدان مغناطيسي پالسي از طريق سنتز DNA باعث تكثير و تمايز سلول هاي استخوان ساز (Osteoblast) به سلول های استخوانی استئوسیت می شود (۱۶–۱۵). امروزه از این میدان ها به صورت گسترده جهت بهبود اختلالاتی مانند یوکی 🕥 استخوان، شکستگی استخوان ها و التهاب مفاصل استفاده می شود (۲۱–۱۷).

از میان نمونه های سلولی به کار رفته در این مطالعات، سلول های بنیادی انسانی بهترین نمونه جهت بررسی اثرات میدان های مغناطیسی ELF میباشند؛ چرا که سلول های بنیادی شبیه ساز بسیار ایده آلی برای بدن انسان هستند و اثرات میدان های مغناطیسی بر این سلول ها را می توان به سلول های بالغ تعمیم داد (۲۳–۲۲). میدان های مغناطیسی به عنوان یک عامل محرک خارجی موجب تغییر در رشد، مورفولوژی، ساختار و تمایز سلول های بنیادی می شوند که این به نوبه ی خود به طور مستقیم و یا غیر مستقیم می تواند بدن ما را به سمت برخی از سرطان ها و ناهنجاری ها سوق دهد (۲۶–۲۲، ۱).

Mesenchymal stem cells) یکی از مہے ترین رده های سلول های بنیادی در مهندسی بافت و سلول درمانی می باشند (۲۸-۲۷). در مهندسی بافت و سلول درمانی با استفاده از رشد، تکثیر و تمایز این سلول ها بافت های آسیب دیده و ناهنجاری های مختلف بدن ترميم مي شود. اين سلول ها در مغز استخوان، خون بند ناف و بافت های چربی یافت شده (۲۹، ۲۳) که در شرايط مناسب قابليت تمايز به سلول هاي استخوانساز (Osteogenic)، غضروفساز (Chondrogenic)، عضم الهسكاز (Myogenic) و سلولهای چربیساز (Adipogenic) را دارند (۳۸-۳۸). از طریق بیویسی مغز استخوان می توان به سلولهای بنیادی مزانشیمی یا استرومای مغز استخوان دست یافت که فرآیند دردناک و خطرناکی است و تعداد سلول کمی به دست میآید (۳۹). عمر سلول های حاصل نيز با افزايش سن فرد كاهش مي يابد (۴۱-۴۰). بافت های چربی نیز منابع مناسبی برای سلول های مزانشیمی چند ظرفیتی هستند که استخراج آن ها به میزان کمتری تهاجمی است و تعداد سلول بیشتری در مقايسه با مغز استخوان به دست مي آيد (۳۹).

در مطالعه ای تابش میدان مغناطیسی ۵۰ هرتز و شدت ۰/۵ تا ۱ میلی تسلا باعث افزایش تکثیر سلول های GH3 هیپوفیز موش و نورو بلاستوما IMR32 گردید (۴۲). در مطالعه ی امی تسلا همکاران میدان مغناطیسی ELF با شدت ۱ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز موجب افزایش قابل ملاحظهی تکثیر سلول های بنیادی عصبی موش های تازه به دنیا آمده، گردید (۴۳). در مطالعه ی دیگری، میدان مغناطیسی با شدت ۸۰ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز تأثیری بر قابلیت تکثیر سلول های T33 نداشت ام

تابش به سلول های مغز استخوان موش با این شدت میدان، باعث کاهش تکثیر و تمایز سلول های پیش ساز گرانولوسیت ماکروفاژی در موش ها گردید. در همین مطالعه میدان ELF تأثیر نامشخصی بر تکثیر سلول های بنیادی استرومایی داشت؛ به طوری که در موش های ماده میزان تکثیر سلول ها کاهش یافت و در موش های نر تغییری در تکثیر سلول ها کاهش یافت و در در مطالعهی مثابهی آهنگ تکثیر سلول های AMA با در مطالعهی مثابهی آهنگ تکثیر سلول های در مطالعه تابش میدان مغناطیسی با شدت ۸۰ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هر تز افزایش یافت (۴۵). در مطالعهی دیگری تابش با میدان مغناطیسی ۵۰ هرتز و شدت های ۹/۰ تا ۸/۸ میلی تسلا از رشد و تکثیر سلول های Osteoblast جلو گیری کرد (۲۶).

جهت بررسی اثر میدان،ای مغناطیسی بر ارگان های زیستی می توان از میدان های مغناطیسی ایستا (شدت ثابت نسبت به زمان تابش) یا میدان های مغناطیسی با شدت متغیر استفاده کرد. بررسی ها نشان دادهاند که سلول ها تحت میدان مغناطیسی ایستا توانایی جیات خود را حفظ میکنند و این میدان اثری بر آهنگ رشد سلولها ندارد (۲۵). در مطالعهی دیگری مشخص شد میدان مغناطیسی ایستا اثـری بـر سلول های بنیادی انسانی ندارد (۴۶). میدان های مغناطيسي متغير موجب تغيير برخي پارامتر هاي بیولـوژیکی سـلولهـا ماننـد تکثیـر، سـنتز و ترشـح فاکتور های رشد میشوند (۴۹-۴۷)، که البته این تغییرات به خصوصیات فیزیکی این میدان ها از جمله فرکانس، طول مـوج و قـدرت ميـدان بسـتگي دارنـد (۲۵)؛ به طوری که دوز میدان الکترومغناطیسی به کار رفت تتابعی از مدت زمان تابش و قدرت میدان می باشد (۴۸، ۴۶).

طیف شدت های میدان مغناطیسی به کاررفته در مطالعات بسیار وسیع میباشد؛ به طوری که شامل شدتهای از میکروتسلا تا چندین میلی تسلا میباشد. فرض بر این است که پاسخ نمونه های بیولوژیکی به میدان های مغناطیسی در محدوده ی خاصی از شدت میدان های مغناطیسی در محدوده ی خاصی از شدت بیشینه است که در اصطلاح به این حالت معناطیسی تعیین پنجره می شود. البته به دلیل ناشناخته مغناطیسی تعیین پنجره اثر برای سلول ها به درستی مغناطیسی تعیین در مدت ۵–۵/۰ میلی تسلا به وجود می آید، همچنین در شدت های بیشتر از ۲ میلی تسلا می دهد (۵۰).

مدت زمان تابش سلول ها نیز پارامتر بسیار مهمی است که در تعیین دوز تابشی و حتی پاسخ سلولی مؤثر می باشد (۵۱). این زمان با توجه به محدودیت های انجام آزمایش از جمله افزایش دمای محیط کشت در اثر تابش میدان مغناطیسی و یا مدت زمان نگهداری سلول ها باید به صورت بهینه ای انتخاب گردد. Van Den Heuvel و همکاران اثر قرار گیری طولانی مدت در معرض میدان های الکترومغناطیسی کم فرکانس را بر رشد سلول ها بسیار کم یا بدون تأثیر میدانند (۴۴).

نحوهی اعمال میدان یکی دیگر از متغیرهای مهم و اثرگذار بر نتایج مطالعات میباشد. میدان الکترومغناطیسی را میتوان به صورت پالسی (با قطع و وصل متوالی در زمان تابش) و یا به طور پیوسته اعمال کرد. در مطالعه ای مشخص شده است که تابش با میدان متناوب ۱ میلی تسلا و ۵۰ هر تز باعث افزایش

شکستگی های کروموزومی در سلول های فیبروبلاست انسانی می شود (۵۲). در حالی که میدان پیوسته ی ۵۰ هرتز و ۱ میلی تسلا تأثیری بر شکستگی DNA در سلول های نوروبلاستوما ندارد (۵۳)، بنابراین به نظر می رسد میدان های الکترومغناطیسی پیوسته جهت بررسی تکثیر سلول ها مناسب تر است و ممکن است باعث شکستگی و آسیب های احتمالی کمتری به DNA سلول ها شود (۵۳–۵۲).

مطالعات اندکی به بررسی تأثیر میدان های مغناطیسی کم فرکانس بر رشد و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی پرداخته اند. با این حال از یک سو نتایج این تحقیقات پراکنده و در مواردی متناقض است و از سوی دیگر گسترهی انجام این بررسی ها در انتخاب میدان مغناطیسی (بزرگے میدان، بسامد، پروتکل تـابشدهـی و نحـوهی تولیـد میـدان) مـورد استفاده، وسيع بوده است. از آن جا كه نتايج تحقيقات انجامشده بسيار متفاوت و در مواقعی متناقض مییاشد و از طرفی مطالعهای به بررسی تاثیر میدان های الکترومغناطیسی بر سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی نپرداخته است، مطالعهی حاضر انجـام گرفت. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر تابش میدان الکترومغناطیسی پیوسته با شدتهای ۰/۵ و ۱ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز (به مدت ۷ روز) بر میزان رشد و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی بود.

روشها میدان مغناطیسی کم فرکانس و سیستم تابش وسیلهی تولیدکنندهی میدان مغناطیسی سینوسی یک

روش جداسازی سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی

نمونههای چربی انسانی از بافت چربی دهندگان خانم و با کسب رضایت از آنها تهیه گردید. پس از عمل سزارین، بافت چربی از قسمت شکم بلافاصله در درون ظرف حاوى PBS (Phosphate buffered saline) قرار گرفت و به سرعت به آزمایشگاه گروه علوم تشريح (بخش بافت شناسی) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل شد. نمونه چندین بار در PBS به خوبی شستشو داده شد تا بافت از دبری و خون عاری گردد. چربی های خردشده به لولهی فالکن ۱۵ سی سی منتقل شدند. ۵/۰ میلی لیتر آنزیم کلاژناز IA و ۰/۰۲ گرم پودر کلاژناز در ۵ میلی لیتر آب آنالار به ازای هر یک گرم چربی اضافه گردید. درب لوله ی فالكون بسته شد و پس از تكان دادن شديد، به مـدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا محلـول یکنـواختی ایجاد گردد. سپس به میزان هم حجم آنزیم استفاده شده، (Fetal bovine serum) FBS محيط حاوى ۱۰ درصد افزوده شد تا اثرات آنزیم خنثی گردد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. مایع رویمی تخلیه شد و به طور مجدد ۵ میلیلیتر محیط به رسوب اضافه شـد و پیپت گردید و به طور مجدد به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. مایع رویی تخلیه شد و سوسپانسیون سلولی به فلاسک های حاوی محیط دارای ۱۰ FBS درصد وارد شد.

تابش سلولها

سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی در پلیت های ۹۶ چاهکی با دانسیتهی ۱۰۰۰ سلول در هر چاهک به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط

سیم پیچ (سلنویید) با هستهی استوانه ای از جنس اکریلیے و قطر داخلے ۲۰ سانتیمتر و طول ۲۴ سانتی متر بود. ۷۲۰ دور سیم مسی روکش دار به قطر ۱ میلی متر به دور هستهی سلنویید پیچیـده شـد (شکل ۱). سلنویید به صورت افقی در آزمایشگاه قرار گرفت و به طور سری به اتوترانسفورمری با مقياس درصد ولتاژ متصل شد. اتوترانسفورمر به بـرق شهر با فرکانس ۵۰ هرتز و ولتاژ ۲۲۰ ولت وصل شد. با تغذيه ي سلنوييد با جريان ۲۰۲/۱ ميلي آمير و ۳۹۵ میلی آمپر و ولتاژ ۴/۶۸ و ۹/۱۹ ولت میدان مغناطیسی سینوسی با شدت های ۰/۵ و ۲ میلی تسلا تولید گردید. برای بررسی جریان و شکل موج ورودی، سلنویید به یک Multimeter دیجیتال (Japan Digital Hitester 3256-50) ويسك اسیلوسکوپ وصل شد. کالیبراسیون سیستم و اندازه گیـری شدت میدان مغناطیسی حاصله با استفاده از یک تســلامتر (Germany Leybold Didactic GMBH 51662) انجام گرفت. یکنواختی میدان مغناطیسی در مرکز سیم پیچ ۱± درصد بود. در همه ازمایشات پلیت های سلولی تحت تابش در مرکز سلنویید (با بیشترین یکنواختی) قرار گرفتند. دمای داخل سلنویید در حین آزمایش با دماسنج اندازه گیری گردید (شکل ۱). تغییرات دمایی حاصل از میدان مغناطیسی قابل چشم پوشي بود.

سلول ها در فلاسک سلولی با دانسیتهی ۱۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت های ۹۶ چاهک کاشت شدند. سلول ها را به طور تصادفی به شش گروه، دو گروه شاهد ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز و چهار گروه تحت تابش تقسیم گردیدند. گروه های شاهد در سلنویید خاموش قرار گرفتند.

کشت حاوی FBS کشت شد و به مدت یک شبانه روز انکوبه گردید.

سلول ها تحت تابش الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و با شدت های ۱ و ۵/۰ میلی تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز و برای ۷ روز متوالی قرار گرفتند. گروه های تحت تابش شامل چهار گروه بودند. تابش داده شده به گروه های ۱ تا ۴ به ترتیب تحت، ۱ میلی تسلابه مدت ۴۰ دقیقه در روز،

۱ میلی تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز، ۰/۵ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز و ۰/۵ میلی تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز، بود.

گروه های شاهد در داخل سلنویید خاموش برای ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز قرار گرفتند. شرایط برای گروه های تحت تابش و شاهد یکسان بود. در تمام آزمایشات پلیتها در مرکز کویل که یکنواختی میدان بیشینه بود، قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۱. ابزار تولید میدان مغناطیسی کم فرکانس و سیستم تابش. الف: سیمپیچ تولیدکنندی میدان مغناطیسی را نشان میدهد. نواحی با شدت مغناطیسی یکسان در مرکز سلنویید قرار دارند. ب: دماسنج دیجیتال برای بررسی تغییرات دما به همراه پروب در مرکز سیمپیچ تولیدکنندهی میدان مغناطیسی را نشان میدهد که از راست به چپ اتوترانسفورمر، مولتیمتر، سیمپیچ و تسلامتر به همراه پروب هستند.

مجله دانشکده پزشکی اصفهان – سال ۳۱ / شماره ۲۳۲/ هفته دوم خرداد ۱۳۹۲

444

اثر میدان مغناطیسی کم فرکانس بر تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیم



شکل ۲. پلیتها در مرکز کویل که یکنواختی میدان بیشینه بود، قرار گرفتند.

ارزیابی بقا و رشد سلولها توسط تکنیک MTT assay

برای ارزیابی میزان تکثیر سلول های تحت تابش و شاهد از روش MTT استفاده شد. پلیت های ۹۶ چاهک از انکوباتور خارج شدند و محیط چاهه که ها با استفاده از پیپت پاستور تخلیه گردید. هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS یک بار شستشو داده شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد FBS و ۱۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و پلیت ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از طی این زمان پلیت ها از انکوباتور خارج شدند و محلول داخل چاهکها تخلیه شد.

پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک افزوده شد و به خوبی پیپت گردید. محلول هر چاهک با پیپت پاستور به داخل یک پلیت ۹۶ چراهک دیگر منتقل شد و در دستگاه میکروریدر چاهک دیگر منتقل شد و در دستگاه میکروریدر BLISA با طول موج ۵۴۰ نانومتر گذاشته شد و میزان ELISA رودید و Optical density) OD قدرت بقای سلولها (Viability) محاسبه شد. برای رسم منحنی استاندارد MTT، تعداد ۵۰

۰۰۰، ۵۰۰، ۵۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰ سیلول درون چاهه که ای یک پلیت ۹۶ چاهکی به همراه ۶۳۵ میکرولیتری محلول MTT ریخته شد و به مدت ۱۰ میکرولیتری محلول MTT ریخته شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از ۴ ساعت، محیط هر چاهک تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به آن ها افزوده گردید. پس از چندین بار پیپت کردن، پلیت به دستگاه ELISA منتقل شد و مقادیر OD برای هر چاهک (تعداد متفاوت سلولی) خوانش شد. ارزیابی تکثیر سلولها با رنگآمیزی ترییان بلو

برای انجام آزمون تریپان بلو محیط هر چاهک تخلیه شد و دو بار با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS شستشو گردید. ۵۰ میکرولیتر محلول تریپسین/EDTA در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۴ تا ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از زمان مقرر ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی پس از زمان مقرر ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی IPSS نیز به هر چاهک افزوده شد و به خوبی با پیپت پاستور پیپت گردید تا تریپسین خنشی شود. ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو بر روی یک لام مخلوط شد. تعداد سلولهایی که رنگ آبی نداشتند به عنوان سلولهای سالم و نیز کل سلولهای مشاهده شده شمارش شدند. تعیین نسبت سلولهای زنده به کل سلولهای اولیه محاسبه شد.

بررسی کینتیک رشد (Growth kinetics)

زمان دو برابر شدن به عنوان معیاری جهت بررسی رشد سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی محاسبه شد. سلول ها در محیط کشت حاوی ۱۰ FBS درصد با دانسیتهی ۱۰۰۰ سلول در هر چاهک انکوبه شدند. پس از ۷ روز تعداد نهایی

اثر میدان مغناطیسی کم فرکانس بر تکثیر سلول های بنیادی مزانشیم

سلول ها به کمک منحنی استاندارد MTT به دست آمد و زمان دو برابر شدن (Doubling time) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

Doubling Time = T [ln2/ln (N1/N2)] در ایـن فرمـول T زمـان آزمـایش، N1 و N2 بـه ترتیب تعداد سلول های اولیه و نهایی هستند.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها توسط نرمافزار SPSS انجام شد. جهت بررسی اختلافات بین گروه ها از آزمون One way ANOVA استفاده شد. اختلاف میانگین داده ها در صورت P < ۰/۰۵ معنی دار

محسوب شد.

بررسى مورفولوژى سلولها

سلول های بنیادی جداشده از بافت چربی با تراکم ۸۰ درصد در کف فلاسک کشت، ظاهر دوکی شکل و مورفولوژی فیبروبلاستیک نشان دادند. بررسی های مورفولوژی با میکروسکوپ فاز کنتراست تفاوتی بین مورفولوژی سلول ها در گروه های تحت تابش و شاهد نشان نداد (شکل ۳).

يافتهها



شکل ۳. بین مورفولوژی سلولهای تحت تابش و شاهد تفاوتی دیده نشد. بررسیهای مورفولوژیک با میکروسکوپ فاز کنتراست انجام گرفت (بزرگنمایی ۴۰ ×).





شکل ۴. بررسی درصد قدرت بقای سلولها تحت میدان مغناطیسی. درصد زیست پذیری سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی در همهی گروههای تابش به جز گروه ۱ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز به طور معنی داری بیشتر از گروههای شاهد بود. *: ۰/۰۵ = P

> بررسی درصد قدرت بقاس سلولی (Cell viability) برای بررسی میزان حیات سلول ها پس از تابش میدانهای الکترومغناطیسی کم فرکانس پس از V روز از روش MTT استفاده شد. درصد قدرت بقا (زیستپذیری) سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی در همهی گروه های مشتق شده از بافت چربی انسانی در همهی گروه های روز به طور معنی داری بیشتر از گروه های شاهد بود (۵/۰۰ > P) (شکل ۴).

> بررسی سرعت تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی با استفاده از رنگ آمیزی ترییان بلو

> شمارش سلول های زنده پس از تابش با میدان های الکترومغناطیسی کم فرکانس در طی ۷ روز با استفاده از روش تریپان بلو نشان داد، سرعت تکثیر سلول ها در همهی گروه های تحت تابش به طور معنی داری بیشتر

بر خلاف نتایج به دست آمده از روش MTT که تکثیر در گروه ۱ میلی تسلا و ۴۰ دقیقه در روز با گروه های شاهد تفاوت معنی داری نداشت، در روش رنگ آمیزی تریپان بلو سرعت تکثیر در این گروه هم مانند سایر گروه های تحت تابش به طور معنی داری بیشتر از گروه های شاهد بود (۰/۰۵ > P) (شکل ۵). **بررسی زمان دو برابر شدن در گروه های سلولی** در همهی گروه های تابش به غیر از گروه ۱ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز زمان دو برابر شدن از کروه های شاهد بود (۵/۰۰ > P).

از سرعت تکثیر سلولها در گروههای شاهد بود.

نتایج زمان دو برابر شدن نشان داد که سلول ها در گروه های تحت تابش نسبت به گروه های شاهد نیاز به زمان کمتری برای دو برابر شدن دارند؛ که این در واقع نشان دهنده ی رشد بیشتر سلول های تابش شده

با ميدان الكترومغناطيسي كم فركانس نسبت به

سلول های گروه شاهد می باشد (شکل ۶). برای به

دست آوردن تعداد نهایی سلول ها از منحنی استاندارد MTT استفاده گردید (شکل ۷).



شکل ۵. بررسی سرعت تکثیر hADSCs با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو. شمارش سلول های زنده پس از تابش با ELF-EMF در طی ۷ روز با استفاده از روش تریپان بلو نشان داد، سرعت تکثیر سلولها در همهی گروههای تحت تابش به طور معنیداری بیشتر از $P < \cdot / \cdot \circ :*$

سرعت تکثیر سلولها در گروههای شاهد بود .



 $P < \cdot / \cdot a$:* در روز، زمان دو برابر شدن به طور معنیداری کمتر از گروههای شاهد بود.



اثر میدان مغناطیسی کم فرکانس بر تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیم



شکل ۷. منحنی استاندارد MTT. جهت بررسی تعداد سلولها پس از ۷ روز این منحنی رسم گردید. با کمک این منحنی و با اندازهگیری میزان جذب هر نمونه می توان به تعداد سلول در آن نمونه دست یافت. همان طور که مشاهده می شود رابطهی بین میزان جذب و تعداد سلولها با تقریب قابل قبولی به صورت خطی است.

نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد که تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با شدت های ۵/۰ و ۱ میلی تسلا برای ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز در طی ۷ روز متوالی می تواند سرعت تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی را به طور معنی داری افزایش دهد.

يحث

میدان های الکترومغناطیسی ELF به دلیل نداشتن انرژی کافی جهت یونیزاسیون مولکول ها در دستهی تابش های غیر یونیزان دسته بندی می شوند (۵۴، ۲۵)، که در آنها دوز تابشی تابعی از قدرت میدان و مدت زمان تابش می باشد (۵۵). در این مطالعه دو شدت (۵/۰ و ۱ میلی تسلا) و دو زمان تابش (۲۰ و ۲۰ دقیقه در روز) انتخاب شد تا تأثیر دوزهای تابشی مختلف بر روی سرعت رشد سلول ها بررسی شود. برای بررسی سرعت تکثیر و رشد از دو روش

MTT و رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده گردید. در بررسی MTT سرعت تکثیر در گروههای تحت تابش غیر از گروه ۱ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز به طور معنی داری بیشتر از سرعت تکثیر در گروه های شاهد بود؛ به طوری که در رنگ آمیزی تریپان بلو همهی گروههای تابش شده تکثیر بیشتری نسبت به گروههای شاهد داشتند.

اختلاف معنی داری بین سرعت تکثیر سلول ها در گروههای ۵/۰ میلی تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز مشاهده نشد، در حالی که سرعت تکثیر سلول ها در گروه ۱ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز کمتر از گروه ۱ میلی تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز بود.

در مقایسهی اخیر با کاهش زمان تابش و دوز تابشی سرعت تکثیر افزایش یافت؛ بنابراین به نظر میرسد سرعت تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی ارتباط مستقیمی با

دوز تابشی نداشته باشد. به دلیل قرار گرفتن کویل تولیدکننده میدان مغناطیسی در خراج از انکوباتور، این احتمال وجود داشت که کاهش آهنگ تکثیر در گروه ۱ میلی تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز به دلیل بیرون بودن از انکوباتور به مدت طولانی تر باشد. برای بررسی این فرضیه، گروهی از سلول ها در تمام مدت آزمایش در داخل انکوباتور قرار داده شدند که سرعت تکثیر در این گروه در تمام آزمایشات به طور معنی داری کمتر از گروههای در معرض تابش بود.

اختلاف بین گروه های تابش ۱ و ۰/۵ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز معنی دار بود که نشان داد با کاهش شدت میدان مغناطیسی، میزان رشد سلول ها افزایش می یابد.

به علاوه، نتایج رنگ آمیزی تریپان بلو نشان داد که آهنگ تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی تحت تأثیر میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس افزایش یافت و تفاوت معنی داری بین گروههای ۵/۰ میلی تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز و گروههای ۱ میلی تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز مشاهده نشد؛ اگر چه میزان تکثیر در گروههای تابش شده با شدت میدان ۵/۰ میلی تسلا بیشتر از ۱ میلی تسلا بود.

پاسخ سیستم های بیولوژیکی به تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس شدت ها، زمان های تابش و فرکانس های خاصی از میدان الکترومغناطیس بیشینه میباشد (اثر پنجرهای). در واقع اثر پنجرهای روزنهای است که سیستمهای زیستی بیشترین حساسیت را به تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس نشان میدهند (۵۶). به نظر میرسد در مطالعهی حاضر پنجرهی اثر میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس برای

ایـن ردهی سـلولی (سـلولهـای بنیـادی مزانشـیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی) و فرکانس ۵۰ هرتز نزدیک به ۰/۵ میلی تسلا باشد.

نتایج این مطالعه مطابق با نتایج مطالعهی Piacentini و همکاران بود که نشان داد تکثیر سلول های بنیادی عصبی تحت تابش میدان مغناطیسی ۱ میلی تسلا و ۵۰ هرتز برای مدت ۶ تا ۲۴ ساعت افزایش یافت. در مطالعهی آنها زمان تابش ۶ ساعت بیشترین تأثیر را بر میزان تکثیر سلول ها داشت و با افزایش مدت زمان تابش اختلاف بین تکثیر در گروههای تابش شده و شاهد کاهش یافت (۴۳). در با شدت ۳ تا ۲/۶ میلی تسلا به مدت ۳ دقیقه باعث افزایش میزان تکثیر سلول های استئوبلاست گردید (۵۷).

در مطالعاتی میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس دارای اثر منفی بر رشد و تکثیر سلول ها بوده است. در مطالعهای Yan و همکاران تسابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با شدت ۲۰ میلی تسالا به مدت ۱۲ ساعت در روز از رشد سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جلوگیری کرده است (۱).

مطالعه ی Sul و همکاران نشان داد که پاسخ سلول ها به مدت زمان تابش بستگی دارد. در مطالعه ی اخیر تأثیر میدان مغناطیسی ۲ میلی تسلا با فرکانس ۵۰ هر تز بر روی تکثیر چهار رده ی سلولی HCN-2 ، RPMI 7666 cells ، hFOB1.19 و HCN-2 ، RPMI 7666 cells ، hFOB1.19 و ۲، ۳ و ۶ ساعت در روز، طلی ۷ و ۱۴ روز متوالی بررسی شد. هر رده ی سلولی در یک زمان تابش

خاص بیشترین افزایش تکثیر را تحت میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس داشت؛ به طوری که در سلولهای hFOB1.19 با افزایش زمان تابش میزان تکثیر افزایش مییافت و در سه ردهی دیگر یک پاسخ غیر خطی به زمان تابش دیده شد (۵۱)

مکانیســمهـای درگیـر در واکـنش میـدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با سیستم های بیولوژیکی هنوز به خوبی مشخص نیست. یکی از فرضیات افـزایش غلظـت، میـزان فعالیـت و نیمـه عمـر رادیکال هـای آزاد محیط میباشد. در واقع میدان مغناطیسی به واسطهی رادیکال هـای آزاد بر برخی مغناطیسی به واسطهی رادیکال هـای آزاد بر برخی واکنش های ایجادشده در سلول مؤثر است (۵۸). Pacini و ممکاران معتقد هستند برخی مولکول ها مانند سیالیک اسید بر روی غشای سلول تحت تأثیر میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس قرار می گیرند و تکثیر سلولی را کنترل میکنند (۵۹).

فرضیهی دیگر بیان میکند میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس موجب تغییر سیگنال دهی و هموستاز ۲۰ Ca داخل سلولی میشود. علاوه بر آن میتواند فعالیت کانال های کلسیمی بر روی غشای سلولی را

- Aaron RK, Ciombor DM, Keeping H, Wang S, Capuano A, Polk C. "Power frequency fields promote cell differentiation coincident with an increase in transforming growth factor-b(1) expression". Bioelectromagnetics 2000; 21(1): 73.
- **5.** Kaviani Moghadam M, Firoozabadi SM, Janahmadi M. Reduction of F1 neuronal excitability by exposure to 217 Hz magnetic fields from GSM 900 mobile phone. Cell J Yakhteh 2009; 11(2): 176-83.
- **6.** Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. Am J Epidemiol 1979; 109(3): 273-84.
- 7. Feychting M, Forssen U, Floderus B. Occupational and residential magnetic field

تحریک کنـد (۶۰، ۴۳). جریـان ^{۲+}Ca از طریـق ایـن کانالها نقش اساسی را در بیان ژن های مؤثر در تکثیر و تمایز سلول بازی میکند (۶۱).

در مطالعه ای غلظت⁺ K⁺/Na خارج سلولی پس از تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس افزایش یافت که میتواند دلیل کاهش تکثیر سلول های تحت تابش باشد (۱).

نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدتهای ۵/۰ و ۱ میلی تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز می تواند باعث افزایش آهنگ تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی شود؛ اگر چه مکانیسم تأثیر به خوبی مشخص نمی باشد.

تشکر و قدردانی بدینوسیله از آقای کیانی، مدیر محترم گروه علوم تشریح، آقای دکتر اسفندیاری و کارشناس محترم آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریح سرکار خانم علی اکبری که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

- 1. Yan J, Dong L, Zhang B, Qi N. Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. Electromagn Biol Med 2010; 29(4): 165-76.
- Ahlbom IC, Cardis E, Green A, Linet M, Savitz D, Swerdlow A. Review of the epidemiologic literature on EMF and Health. Environ Health Perspect 2001; 109(Suppl 6): 911-33.
- **3.** Czyz J, Nikolova T, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50 Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells-the role of tumour suppressor p53. Mutat Res 2004; 557(1): 63-74.

401

exposure and leukemia and central nervous system tumors. Epidemiology 1997; 8(4): 384-9.

- 8. Schreiber GH, Swaen GM, Meijers JM, Slangen JJ, Sturmans F. Cancer mortality and residence near electricity transmission equipment: a retrospective cohort study. Int J Epidemiol 1993; 22(1): 9-15.
- **9.** Verkasalo PK, Pukkala E, Hongisto MY, Valjus JE, Jarvinen PJ, Heikkila KV, et al. Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. BMJ 1993; 307(6909): 895-9.
- **10.** Morandi MA, Pak CM, Caren RP, Caren LD. Lack of an EMF-induced genotoxic effect in the Ames assay. Life Sci 1996; 59(3): 263-71.
- **11.** Savitz DA. Overview of occupational exposure to electric and magnetic fields and cancer: advancements in exposure assessment. Environ Health Perspect 1995; 103(Suppl 2): 69-74.
- **12.** Pacini S, Vannelli GB, Barni T, Ruggiero M, Sardi I, Pacini P, et al. Effect of 0.2 T static magnetic field on human neurons: remodeling and inhibition of signal transduction without genome instability. Neurosci Lett 1999; 267(3): 185-8.
- **13.** De Mattei M, Caruso A, Traina GC, Pezzetti F, Baroni T, Sollazzo V. Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro. Bioelectromagnetics 1999; 20(3): 177-82.
- 14. Lixia S, Yao K, Kaijun W, Deqiang L, Huajun H, Xiangwei G, et al. Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. Mutat Res 2006; 602(1-2): 135-42.
- **15.** Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. Bioelectromagnetics 2002; 23(5): 398-405.
- **16.** Tsai MT, Chang WH, Chang K, Hou RJ, Wu TW. Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. Bioelectromagnetics 2007; 28(7): 519-28.
- **17.** Bassett CA, Mitchell SN, Gaston SR. Pulsing electromagnetic field treatment in ununited fractures and failed arthrodeses. JAMA 1982; 247(5): 623-8.
- **18.** Bassett CA, Schink-Ascani M. Long-term pulsed electromagnetic field (PEMF) results in congenital pseudarthrosis. Calcif Tissue Int 1991; 49(3): 216-20.
- 19. Mishima S. The effect of long-term pulsing

electromagnetic field stimulation on experimental osteoporosis of rats. J UOEH 1988; 10(1): 31-45.

- 20. Rubin CT, McLeod KJ, Lanyon LE. Prevention of osteoporosis by pulsed electromagnetic fields. J Bone Joint Surg Am 1989; 71(3): 411-7.
- **21.** Tabrah F, Hoffmeier M, Gilbert F, Jr., Batkin S, Bassett CA. Bone density changes in osteoporosis-prone women exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs). J Bone Miner Res 1990; 5(5): 437-42.
- **22.** Wei H, Tan G, Manasi, Qiu S, Kong G, Yong P, et al. One-step derivation of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells from human pluripotent stem cells. Stem Cell Res 2012; 9(2): 87-100.
- **23.** Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR. Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. Methods Mol Biol 2002; 185: 127-56.
- **24.** Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. Prog Biophys Mol Biol 2005; 87(2-3): 213-23.
- **25.** Noriega-Luna B, Sabanero M, Sosa M, Avila-Rodriguez M. Influence of pulsed magnetic fields on the morphology of bone cells in early stages of growth. Micron 2011; 42(6): 600-7.
- **26.** Zhou J, Ming LG, Ge BF, Wang JQ, Zhu RQ, Wei Z, et al. Effects of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentiation and mineralization potentials of rat osteoblasts. Bone 2011; 49(4): 753-61.
- **27.** Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol 2000; 164(2): 247-56.
- **28.**Lu J, Moochhala S, Moore XL, Ng KC, Tan MH, Lee LK, et al. Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury. Neurosci Lett 2006; 398(1-2): 12-7.
- **29.** Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends Biotechnol 2006; 24(4): 150-4.
- **30.** Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. Stem Cells Dev 2008; 17(4): 761-73.
- **31.** Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. Diabetes Metab 2006; 32(5 Pt 1): 393-401.

مجله دانشکده پزشکی اصفهان – سال ۳۱ / شماره ۲۳۲/ هفته دوم خرداد ۱۳۹۲

401

- **32.** Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2003; 272(1): 398-402.
- **33.** Guo Z, Yang J, Liu X, Li X, Hou C, Tang PH, et al. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. Chin Med J (Engl) 2001; 114(9): 950-3.
- **34.** Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284(5411): 143-7.
- **35.** Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. Biochem Biophys Res Commun 2005; 330(4): 1153-61.
- **36.** Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 324(2): 481-8.
- **37.** Long X, Olszewski M, Huang W, Kletzel M. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 2005; 14(1): 65-9.
- **38.** Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, Sakurai K, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, et al. Human mesenchymal stem cells in rodent wholeembryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(9): 3296-300.
- **39.** Huang T, He D, Kleiner G, Kuluz J. Neuronlike differentiation of adipose-derived stem cells from infant piglets in vitro. J Spinal Cord Med 2007; 30(Suppl 1): S35-S40.
- **40.** Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. J Bone Miner Metab 1999; 17(3): 171-7.
- **41.** Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone 2003; 33(6): 919-26.
- **42.** Rao RR, Halper J, Kisaalita WS. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on APP695 transcription levels in differentiating human neuroblastoma cells. Bioelectrochemistry 2002; 57(1): 9-15.
- **43.** Piacentini R, Ripoli C, Mezzogori D, Azzena GB, Grassi C. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Ca(v)1-

channel activity. J Cell Physiol 2008; 215(1): 129-39.

- **44.** Van Den Heuvel R, Leppens H, Nemethova G, Verschaeve L. Haemopoietic cell proliferation in murine bone marrow cells exposed to extreme low frequency (ELF) electromagnetic fields. Toxicol In Vitro 2001; 15(4-5): 351-5.
- **45.** Kwee S, Raskmark P. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 1. ELF electromagnetic fields. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 1995; 36(2): 109-14.
- **46.** Sullivan K, Balin AK, Allen RG. Effects of static magnetic fields on the growth of various types of human cells. Bioelectromagnetics 2011; 32(2): 140-7.
- 47. Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. Bioelectromagnetics 2004; 25(6): 457-65.
- **48.** Chang K, Chang WH, Huang S, Huang S, Shih C. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. J Orthop Res 2005; 23(6): 1308-14.
- **49.** Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Guerkov H, Dean DD, Simon B, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. J Orthop Res 2000; 18(4): 637-46.
- **50.** Falahati SA, Bolouri B, Norouzi J, Masjedian F. The effect of extremely low frequency magnetic fields on growth of E.Coli. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci 2000; 7(4): 47-53. [In Persian].
- **51.** Sul AR, Park SN, Suh H. Effects of sinusoidal electromagnetic field on structure and function of different kinds of cell lines. Yonsei Med J 2006; 47(6): 852-61.
- **52.** Winker R, Ivancsits S, Pilger A, Adlkofer F, Rudiger HW. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. Mutat Res 2005; 585(1-2): 43-9.
- **53.** Falone S, Grossi MR, Cinque B, D'Angelo B, Tettamanti E, Cimini A, et al. Fifty hertz extremely low-frequency electromagnetic field causes changes in redox and differentiative status in neuroblastoma cells. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(11): 2093-106.
- **54.** Mann K, Roschke J. Sleep under exposure to high-frequency electromagnetic fields. Sleep Med Rev 2004; 8(2): 95-107.
- **55.** Villa M, Mustarelli P, Caprotti M. Biological effects of magnetic fields. Life Sci 1991; 49(2): 85-92.

- **56.** Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Jahn O, Rudiger HW. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. Mutat Res 2005; 583(2): 184-8.
- **57.** Cuccurazzu B, Leone L, Podda MV, Piacentini R, Riccardi E, Ripoli C, et al. Exposure to extremely low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields enhances adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. Exp Neurol 2010; 226(1): 173-82.
- **58.** Sarvestani AS, Abdolmaleki P, Mowla SJ, Ghanati F, Heshmati E, Tavasoli Z, et al. Static magnetic fields aggravate the effects of ionizing

radiation on cell cycle progression in bone marrow stem cells. Micron 2010; 41(2): 101-4.

- **59.** Pacini S, Gulisano M, Peruzzi B, Sgambati E, Gheri G, Gheri BS, et al. Effects of 0.2 T static magnetic field on human skin fibroblasts. Cancer Detect Prev 2003; 27(5): 327-32.
- **60.** Bekhite MM, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. Static magnetic fields increase cardiomyocyte differentiation of Flk-1(+) cells derived from mouse embryonic stem cells via Ca(2+) influx and ROS production. Int J Cardiol 2012.
- **61.** Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4(7): 552-65.

مجله دانشکده پزشکی اصفهان – سال ۳۱ / شماره ۲۳۲/ هفته دوم خرداد ۱۳۹۲

404

www.mui.ac.ir

r CNV'

Vol. 31, No. 232, 2nd Week, June 2013

Effect of Extremely Low-Frequency (50 Hz) Field on Proliferation Rate of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells

Marzieh Salimi¹, Daryoush Shahbazi-Gahrouei PhD², Saeid Karbasi PhD³, Saied Kermani PhD³, <u>Shahnaz Razavi PhD</u>⁴

Original Article

Abstract

Background: The effects of non-ionizing extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) chronic exposure on human beings due to its potential health hazards has become a focus of interest since many years ago. Stem cells are useful models for assessment of effects of ELF-EMF on other cell lines and human beings. Adipose tissue has been known source of multipotent stromal cells (MSCs), which can be obtained by a less invasive method and in large amounts compared with bone marrow stromal cells (BMSCs); so this study was done on human adipose-derived stem cells (hADSCs). The effect of ELF-EMF with intensity of 0.5 and 1 mT and 50 Hz on proliferation rates of hADSCs at 20 and 40 min/day for 7 days was assessed.

Methods: MTT assay was used to determine the growth and metabolism of cells and Trypan blue test was also done for cell viability.

Findings: The proliferation rate and growth of hADSCs in all exposure groups was significantly higher than that in sham groups except in group of 1 mT, 40 min/day (P < 0.05).

Conclusion: The results showed that 0.5 and 1 mT magnetic strength fields can promote the proliferation rates of the hMSCs derived adipose tissue regarding the duration of exposure.

Keywords: Non-ionizing extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF), Human adipose-derived stem cells (hADSCs), Adipose, Proliferation rate, Growth

Citation: Salimi M, Shahbazi-Gahrouei D, Karbasi S, Kermani S, Razavi Sh. **Effect of Extremely Low-Frequency (50 Hz) Field on Proliferation Rate of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(232): 439-55

Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان – سال ۳۱ / شماره ۲۳۲/ هفته دوم خرداد ۱۳۹۲

^{*} This paper is derived from a MSc thesis No. 391231 in Isfahan University of Medical Sciences.

¹⁻ MSc Student, Department of Medical Physics and Medical Engineering, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

²⁻ Professor, Department of Medical Physics and Medical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³⁻ Associate Professor, Department of Medical Physics and Medical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴⁻ Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran