ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):459-464

Effect of Electromagnetic Field and Nitric Oxide on the Neural Differentiation Proteins Marker and Viability of the Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Haghighat N.[1] *PhD*,
Abdolmaleki P.*[1] *PhD*,
Behmanesh M.[2] *PhD*,
Parnian J.[3] *MD*

How to cite this article
Haghighat N, Abdolmaleki P, Behmanesh M, Parnian J. Effect of Electromagnetic Field and Nitric Oxide on the Neural Differentiation Proteins Marker and Viability of the Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):459-464.

ABSTRACT

Aims Nitric oxide (NO) plays an important role in maintaining cellular stem status, and the range of electromagnetic fields (EMF) is very deep in contrast to the electric field. The aim of this study was to investigate the effect of electromagnetic field and nitric oxide on the neural differentiation proteins marker and viability of the rat bone marrow mesenchymal stem cells.

Materials & Methods The present experimental research was conducted on bone marrow mesenchymal stem cells of Vistar rats. For treatments of the cells, high (1mM) and low (10micromolar Deta-NO) concentrations were used as a nitric oxide donor molecule and 50Hz low-frequency electromagnetic field and they were compared with the control group. The cell viability was recorded by MTT assay test, the neural differentiation pathway gene expression was investigated by RT-PCR technique, and the neural differentiation marker protein expression was evaluated by Immunocytochemistry technique. The data were analyzed by one-way ANOVA, using SPSS 13 software.

Findings After 24 hours of treatment with nitric oxide and EMF, the rate of viability in all groups was significantly decreased compared to the control group. After 48 hours, EMF alone, as well as with low concentration of nitric oxide did not decrease the rate of viability and cell growth increased compared to the control group. In the group treated with high nitric oxide concentration along with EMF, MAP2 protein was expressed in the number of cells more than the control group and the one treated with EMF.

Conclusion The electromagnetic field, along with its high concentration of nitric oxide, decreases the number of rat bone marrow mesenchymal stem cells and, by increasing cell size, gene expression and neural differentiation proteins marker facilitates their differentiation to nerve-like cells.

Keywords Nitric Oxide; Electromagnetic Field; Mesenchymal Stem Cells; MTT; Immunocytochemistry

[1]Biophysics Department, Biology Science Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Genetics Department, Biology Science Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Biotechnology Institute, Iranian Research Organization For Science & Technology, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Biophysics Department, Biology Science Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82883404
Fax: +98 (21) 82884717
parviz@modares.ac.ir

Article History
Received: September 26, 2016
Accepted: September 3, 2017
ePublished: September 22, 2018

CITATION LINKS

[1] Non-ionizing radiation, part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) electric and magnetic fields [2] The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation [3] Peroxynitrite - an ugly biofactor?[4] Role of nitric oxide in the maintenance of pluripotency and regulation of the hypoxia response in stem cells [5] Nitric oxide regulates multiple functions and [6] Neural differentiation from embryonic stem cells in vitro: An overview of the signaling pathways [7] Electromagnetic fields instantaneously modulate nitric oxide signaling in challenged biological systems [8] Therapeutic effect of enhancing endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling [9] NOAD, a novel nitric oxide donor, induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells [10] Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival [11] Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation [12] Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator [13] Role of nitric oxide signaling in endothelial differentiation of embryonic stem cells [14] Nitric oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons [15] Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells [16] Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

Archive

www.SID.ir

تاثیر میدان الکترومغناطیسی و نیتریک‌اکسید بر بیان مارکر پروتئینی تمایز عصبی و درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

نازنین حقیقت PhD
گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
پرویز عبدالمالکی* PhD
گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
مهرداد بهمنش PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
جواد پرنیان MD
گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های ملی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده
اهداف: نیتریک‌اکسید (NO) در حفظ حالت بنیادی سلول نقش مهمی دارد و دامنه تاثیرگذاری میدان الکترومغناطیسی (EMF) برخلاف میدان الکتریکی بسیار عمیق است. هدف این پژوهش، بررسی تاثیر میدان الکترومغناطیسی و نیتریک‌اکسید بر بیان مارکر پروتئینی تمایز عصبی و درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی بود.
مواد و روش‌ها: پژوهش تجربی حاضر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار اجرا شد. به‌منظور تیمار سلول‌ها از دو غلظت بالا (یک‌میلی‌مولار) و پایین (۱۰میکرومولار Deta-NO) به‌عنوان مولکول آزادکننده نیتریک‌اکسید و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰هرتز استفاده و با گروه بدون تیمار (کنترل) مقایسه شد. درصد زنده‌زمانی سلول‌ها با آزمایش MTT، بیان ژن مسیر تمایز عصبی با روش RT-PCR و بیان پروتئین مارکر تمایز عصبی با ایمنوسیتوشیمی بررسی شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 13 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه تحلیل شدند.
یافته‌ها: بعد از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها با نیتریک‌اکسید و EMF، درصد زنده‌مانی سلول‌ها در گروه‌ها نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. بعد از ۴۸ ساعت، EMF به‌تنهایی و همچنین با غلظت پایین نیتریک‌اکسید، کاهشی در درصد زنده‌مانی سلول‌ها ایجاد نکرد و رشد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. در گروه تیمارشده با غلظت بالای نیتریک‌اکسید به‌همراه EMF، پروتئین MAP2 در سلول‌های بیشتری نسبت به گروه کنترل و تیمارشده با EMF بیان شد.
نتیجه‌گیری: میدان الکترومغناطیسی به‌همراه غلظت بالای نیتریک‌اکسید از تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی می‌کاهد و با افزایش اندازه سلول، بیان ژن و پروتئین مارکر تمایز عصبی، تمایز آنها را به سمت سلول‌های شبه عصب تسهیل می‌کند.
کلیدواژه‌ها: نیتریک‌اکسید، میدان الکترومغناطیسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سنجش MTT، ایمنوسیتوشیمی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۲
*نویسنده مسئول: parviz@modares.ac.ir

مقدمه

بار الکتریکی متحرک و در نتیجه سیم لوله حاوی جریان الکتریکی در فضای اطراف خود میدان مغناطیسی تولید می‌کند. اگر جهت جریان الکتریکی در سیم لوله در واحد زمان تغییر کند، میدان مغناطیسی تولیدشده متغیر می‌شود که تغییر میدان مغناطیسی، میدان الکتریکی را به‌همراه خواهد داشت و میدان الکترومغناطیسی نامیده می‌شود. انرژی میدان الکترومغناطیسی بسیار کمتر از انرژی مورد نیاز برای شکست پیوندهای شیمیایی است[1]، بنابراین میدان الکترومغناطیسی، آسیب مستقیمی روی DNA و سایر مولکول‌های زیستی نخواهد گذاشت و با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن، اثر روی زاویه پیوندهای شیمیایی، انتقال نیرو به یون‌های الکتریکی و لیگاندهای کوچک و تغییر کنفورماسیون پروتئین‌های غشایی، انتقال یون‌ها را به درون سلول تنظیم می‌کند و با تغییر مقدار غلظت یون‌ها و مولکول‌های کوچک از جمله نیتریک‌اکسید، بیان ژن‌ها و در نتیجه تمایز سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد[2].

نیتریک‌اکسید یک رادیکال آزاد دواتمی گازی‌شکل است که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژی بدن از جمله تنظیم فشار خون در سیستم قلبی- عروقی به‌عنوان نوروترانسمیتر در سیستم عصبی و آزادشونده از ماکروفاژها علیه پاتوژن‌ها در سیستم ایمنی نقش دارد. این مولکول توسط آنزیم نیتریک‌اکسیدسنتاز از L- آرژنین سنتز می‌شود[3]. غلظت نیتریک‌اکسید در سلول برای انجام فرآیندهای طبیعی در حدود پیکو تا نانومولار است. اگر غلظت نیتریک‌اکسید در سلول به میکرومولار برسد، با تغییرات پس از ترجمه روی پروتئین و اثر روی تاخوردگی کروماتین بیان ژن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد[4].

در یک مطالعه نشان داده شده است که غلظت بالای نیتریک‌اکسید برخلاف غلظت پایین آن منجر به آپوپتوزیس و مرگ سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود و سلول‌هایی که مقابل فرآیند آپوپتوزیس مقاومت می‌کنند، تمایز می‌یابند[5]. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده‌اند که حین تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سمت سلول‌های عصبی، غلظت نیتریک‌اکسید در زمان‌هایی افزایش و در زمان‌هایی کاهش می‌یابد که این امر نشان‌دهنده نقش این مولکول پیام‌بر در روند تمایز عصبی بوده است[6]. با توجه به نقش دوگانه نیتریک‌اکسید که از یک طرف به حفظ حالت بنیادی سلول کمک می‌کند و از طرف دیگر منجر به القای آپوپتوزیس و گرایش سلول به سمت تمایز می‌شود و همچنین میدان الکترومغناطیسی که دامنه تاثیرگذاری آن برخلاف میدان الکتریکی بسیار عمیق بوده و با عبور از غشای پلاسمایی به‌طور مستقیم تا سطح اندامک تاثیرگذار است[2]، هدف پژوهش حاضر، بررسی تاثیر میدان الکترومغناطیسی (EMF) و نیتریک‌اکسید (NO) بر بیان مارکر پروتئینی تمایز عصبی و درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، موش صحرایی نژاد ویستار و جنس نر با وزن ۲۵۰گرم (دانشگاه تربیت مدرس؛ تهران) تهیه شد. از مغز دو استخوان ران و ساق موش، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌همراه سلول‌های پیش‌ساز خونی گرفته و در "محیط کشت حداقل ضروری- آلفا" (α-Mem؛ گیبکو؛ ایالات متحده) حاوی ۱۰% سرم جنین گاوی (FBS؛ گیبکو؛ ایالات متحده) و ۱% استرپتومایسین (گیبکو؛ ایالات متحده) در انکوباتور با رطوبت نرمال، دمای ۳۷°C و فشار کربن‌دی‌اکسید (CO_2) ۵% انکوبه شدند. بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از بافر فسفات (PBS) با pH برابر با ۷/۵ سلول‌ها شسته شدند و محیط کشت آنها تعویض شد. با هر بار شست‌وشوی سلول‌ها و تعویض محیط کشت، سلول‌های پیش‌ساز خونی که غیرچسبان بودند، حذف می‌شدند و میزان خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومایی که چسبان بودند، افزایش می‌یافت. بعد از پُرشدن کف فلاسک، سلول‌ها پاساژ داده شدند و از پاساژ ۴ و ۵ برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

آماده‌سازی تیمارها: تاثیر دو فاکتور شیمیایی NO و فیزیکی EMF به‌طور همزمان برای القای تغییرات پایدار در سلول از جمله اثر روی بیان ژن و بیان پروتئین مسیر تمایز عصبی در مقایسه با

Archive of SID
www.SID.ir

گروه بدون تیمار بررسی شد. دی‌اتیلن‌تری‌آمین‌نیتریت (DETA-NO) به‌عنوان یک ترکیب آزادکننده نیتریک‌اکسید (Abcam؛ آلمان) تهیه و با توجه به وزن مولکولی DETA-NO، از این ترکیب غلظت‌های بالای یک‌میلی‌مولار و پایین ۱۰میکرومولار تهیه و به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد.

دستگاه مولد میدان مغناطیسی حاصل از دو سیم‌پیچ است که ۱۸۰ دور سیم مسی روکش‌دار به قطر ۲/۵میلی‌متر دارد و با اتصال به منبع تامین، انرژی الکتریکی (صفر تا ۵۰ولت با توان حداکثر یک‌کیلووات) در فضای بین آنها پدید می‌آید. این دستگاه قدرت تولید میدان مغناطیسی با شدت ۰/۵ تا ۳۰میلی‌تسلا را دارد. با اتصال دوشاخه میدان به برق شهری، میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰هرتز تولید می‌شود که برخلاف میدان مغناطیسی ایستا دارای خاصیت آهنربایی مستقیم نیست و با نزدیک‌کردن یک آهنربا به آن شروع به نوسان می‌کند تا این که در فاصله‌ای بسیار نزدیک باعث رباییش آهنربا می‌شود. یک دستگاه نگهدارنده دست‌ساز به ارتفاع ۴۰سانتی‌متر که به دستگاه تنظیم حرارت و فشار گازکربنیک شرایط استاندارد متصل بود، به‌منظور کشت سلول زنده در مرکز آن تعبیه شده بود. بخش نگهدارنده، سلول‌ها را در شرایط استاندارد (دمای ۳۷°C، فشار گازکربنیک ۵% و رطوبت مناسب) برای کشت قرار می‌دهد. جنس بدنه این بخش از دستگاه از سطوح پلاستیکی بدون خلل و فرج تهیه شد که به‌راحتی ضدعفونی می‌شد (شکل ۱).

به‌منظور تنظیم دستگاه و بررسی یکنواختی میدان مغناطیسی ایجادشده توسط آن، از تسلامتر مدل ۹۳۶۱۰- (PHYWE Gottingen؛ آلمان) با دقت ۱۰% استفاده شد. برای کنترل حرارت، دیواره‌های جانبی نگهدارنده از داخل مجهز به شبکه سیمی گرم‌کننده بوده که به ترموستات متصل است و دما را در ۳۷°C ثابت نگه می‌دارد. برای تنظیم فشار گاز CO_2 نیز از حسگر ویژه در داخل محفظه استفاده شده است که فشار گاز را روی مانیتور مخصوص نشان می‌دهد. محفظه دستگاه توسط شیلنگ گاز به کپسول گازکربنیک متصل است و فشار گاز ورودی با شیرهای تنظیم‌کننده روی آن کنترل می‌شود. میدان الکترومغناطیسی جزء موج‌های الکترومغناطیس است که می‌تواند از خلا، هوا و محیط مادی از جمله فلاسک حاوی سلول عبور کند. دامنه تاثیرگذاری میدان مغناطیسی برخلاف میدان الکتریکی بسیار عمیق است، به‌گونه‌ای که از غشای سلولی عبور می‌کند و تا سطح اندامک را پوشش می‌دهد[2].

شکل ۱) دستگاه تولیدکننده میدان الکترومغناطیسی

تست سنجش درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MTT): سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ ۴ با استفاده از تریپسین ۱% از کف فلاسک کنده شدند، به هر خانه پلیت ۹۶خانه‌ای، ۷۰۰۰ سلول منتقل شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور به‌منظور اتصال سلول‌ها به کف فلاسک انکوبه شدند. بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت بالا و پایین نیتریک‌اکسید و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰هرتز و شدت ۲۰میلی‌تسلا، محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی نمک تترازولیوم (سیگما؛ ایالات متحده) تعویض شد و به‌منظور تشکیل بلورهای فورمازون سلول‌ها به‌مدت ۳ ساعت در انکوباتور تعبیه شدند. بعد از ۳ ساعت محیط کشت سلول‌ها دور ریخته شد و محلول دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO؛ مرک؛ آلمان) به سلول‌ها اضافه و جذب سلول‌ها در دو طول موج ۴۹۰ و ۵۷۰نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر مدل µQuant (BioTek؛ ایالات متحده) قرائت شد.

بررسی بیان ژن *Dcx* با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس (RT-PCR): بعد از تیمار یک‌هفته‌ای سلول‌ها با غلظت بالای نیتریک‌اکسید و میدان الکترومغناطیسی، RNA کل سلول با محلول RNAsol (نویافن؛ ایران) استخراج شد. برای تعیین غلظت، اطمینان از کیفیت RNA استخراج‌شده و نبود آلودگی‌های پروتئینی و فنولی جذب RNA استخراج‌شده با دستگاه الایزاریدر در سه طول موج ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰نانومتر خوانده شد. همچنین مقداری از RNA روی ژل آگاروز برده شده و با انجام الکتروفورز افقی سه باند ۲۸s، ۱۸s و ۵s مشاهده شد. با استفاده از آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس از روی RNA، cDNA ساخته شد. توالی ژن *Gapdh* به‌عنوان ژن مرجع و ژن *Dcx* از سایت NCBI انتخاب و با استفاده از برنامه Idt quest primer طراحی و آنالیز شد (جدول ۱). ژن *Dcx* پروتئین Doublecortin را بیان می‌کند که یک پروتئین ارتباط‌دهنده میکروتوبول‌ها است و بیان این پروتئین در نورون‌های نابالغ و زمانی که سلول به سمت تمایز عصبی پیش می‌رود، افزایش می‌یابد. در نهایت با روش PCR و با کمک آنزیم DNA پلیمراز بیان ژن *Dcx* بررسی و با گروه بدون تیمار مقایسه شد.

جدول ۱) توالی پرایمر و شرایط PCR ژن‌های *Gapdh* و *Dcx*

نام ژن	کد دسترسی	توالی پرایمر	شرایط PCR (۳۵ چرخه) واسرشت	اتصال	گسترش
Gapdh					
پرایمر رفت	NM_017008.4	5'CCCATTCTTCC ACCTTTGATG3'	۹۴°C	۹۴°C	۶۲°C
پرایمر برگشت		5'CCTGTTGCTG TAGCCATATTC3'	۴دقیقه	۳۰ثانیه	۳۰ثانیه
Dcx					
پرایمر رفت	NM_053379.3	5'CTCCTATCTCTA CACCCACAAG3'	۹۴°C	۹۴°C	۶۱°C
پرایمر برگشت		5'GGAATCGCCA AGTGAATCAG3'	۴دقیقه	۳۰ثانیه	۳۰ثانیه

بررسی بیان پروتئین MAP2 (پروتئین متصل به میکروتوبول-۲) با روش ایمنوسیتوشیمی: پروتئین MAP2 یک پروتئین برهم‌کنش‌دهنده میکروتوبول‌هاست که بیان آنها در نورون‌های نابالغ و سلول‌های پیش‌ساز عصبی به‌خصوص در دندریت‌ها افزایش می‌یابد. برای بررسی بیان این پروتئین از تکنیک ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. بدین منظور بعد از ۱۰ روز تیمار سلول‌ها با غلظت بالای نیتریک‌اکسید و میدان الکترومغناطیسی، محیط کشت سلول‌ها دور ریخته شد و سلول‌ها با محلول PBS

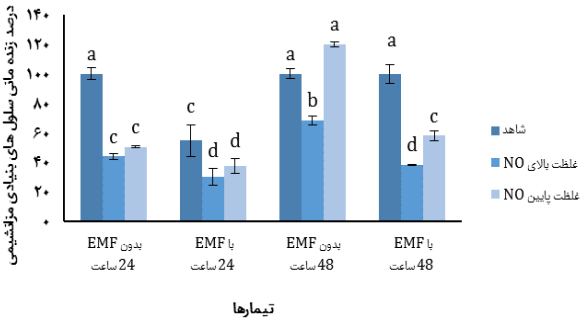
Archive of SID
www.SID.ir

سه‌بار شست‌وشو داده شدند. سپس برای تثبیت سلول‌ها از اتانول ۷۰% استفاده شد. بعد از ۴۰دقیقه، اتانول دور ریخته شد و سلول‌ها با PBS حاوی ۰/۱% تریتون X-100 شست‌وشو داده شدند. برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی اولیه، PBS به‌همراه سرم بز ۵% به سلول‌ها اضافه شد، بعد از ۲۰دقیقه، سلول‌ها دوباره با PBS شست‌وشو داده شدند و محلول آنتی‌بادی اولیه MAP2 (Abcam؛ آلمان) به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها به‌مدت یک ساعت در تاریکی در محیط مرطوب با آنتی‌بادی اولیه انکوبه شدند. بعد از یک ساعت برای حذف آنتی‌بادی اولیه، سلول‌ها دوباره با محلول PBS شسته شدند و آنتی‌بادی ثانویه (Rabbit؛ Abcam؛ آلمان) به سلول‌ها اضافه شد و بعد از تیمار سلول‌ها به‌مدت یک ساعت در محیط مرطوب و تاریک، سلول‌ها با محلول PBS شسته و بیان پروتئین MAP2 با میکروسکوپ فلورسنت مدل Nikon (Nikon؛ ژاپن) مشاهده شد. برای محاسبه تعداد سلول‌هایی که این مارکر را بیان کرده‌اند، هسته سلول‌ها با استفاده از رنگ فلورسنت پروپیدیوم‌یدید (PI) رنگ‌آمیزی شد. کلیه آزمایش‌ها با سه‌بار تکرار انجام گرفت.

تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 13 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه صورت گرفت.

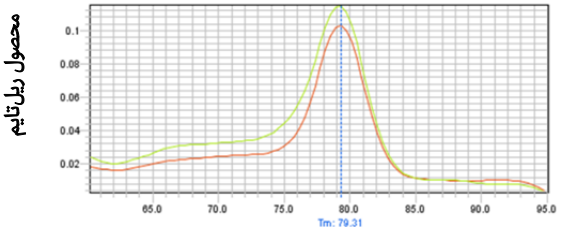
یافته‌ها

بعد از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها با نیتریک‌اکسید و EMF، درصد زنده‌مانی سلول‌ها در همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. حضور میدان، این کاهش را نسبت به عدم حضور میدان به‌صورت معنی‌داری شدت بخشید. بعد از ۴۸ ساعت، EMF به‌تنهایی و همچنین غلظت پایین نیتریک‌اکسید هیچ کاهشی را در درصد زنده‌مانی سلول‌ها ایجاد نکرد و رشد سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل افزایش داد، اما در سایر گروه‌ها درصد زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (نمودار ۱).

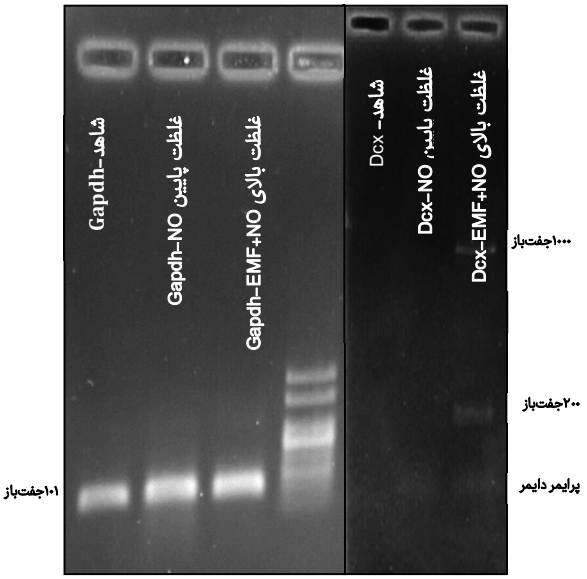


نمودار ۱) درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی در حضور میدان الکترومغناطیسی (EMF) و غلظت بالا (NO mac) و پایین (NO mic) نیتریک‌اکسید در مدت‌زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ساعته؛ حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داربودن گروه‌ها است.

بعد از یک هفته تیمار سلول‌ها با EMF و غلظت بالای نیتریک‌اکسید، ژن *DCX* در گروه تیمارشده با غلظت بالای نیتریک‌اکسید که به‌طور همزمان در معرض EMF واقع شده بود، در مقایسه با گروه‌های بدون تیمار و غلظت پایین نیتریک‌اکسید در دو توالی ۱۰۰۰جفت‌بازی و ۱۰۰جفت‌بازی بیان شد (نمودار ۲؛ شکل ۲).

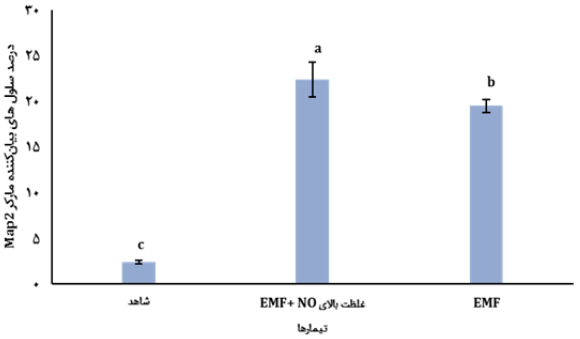


نمودار ۲) منحنی ذوب (melting curve) محصول ریل‌تایم qPCR ژن *Dcx* (دمای برابر با ۷۹/۳۱°C نشان‌دهنده بیان توالی ۱۰۰جفت‌بازی ژن *Dcx* است)



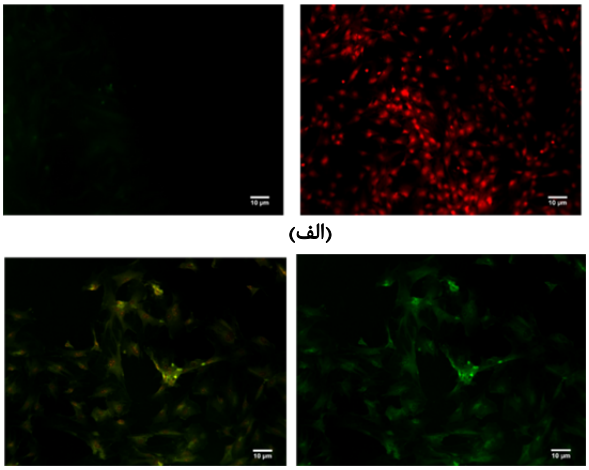
شکل ۲) تصویر ژل آگاروز محصول RT-PCR ژن *Gapdh* و ژن *Dcx*

بعد از ۱۰ روز تیمار با غلظت بالای نیتریک‌اکسید و EMF، بررسی بیان پروتئین سیتوپلاسمی MAP2 توسط تکنیک ایمنوسیتوشیمی، نشان داد که در گروه تیمارشده با غلظت بالای نیتریک‌اکسید به‌همراه EMF، پروتئین MAP2 با شدت بیشتر و در تعداد سلول‌های بیشتری نسبت به گروه بدون تیمار و گروه تیمارشده با EMF بیان شد (نمودار ۳؛ شکل ۳).



نمودار ۳) بیان پروتئین MAP2 در سلول‌های شاهد، سلول‌های تیمارشده با بیشترین غلظت نیتریک‌اکسید با میدان الکترومغناطیسی و تنها با میدان الکترومغناطیسی (نمودار، درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکر MAP2 را نسبت به تعداد کل سلول‌ها نشان می‌دهد؛ حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داربودن گروه‌ها است)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳) بیان پروتئین MAP2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی الف) سلول‌های شاهد و ب) تیمارشده در غلظت بالا (هسته سلول‌ها (رنگ قرمز) با رنگ PI رنگ‌آمیزی شد)

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر میدان الکترومغناطیسی (EMF) و نیتریک‌اکسید (NO) بر بیان مارکر پروتئینی تمایز عصبی و درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی انجام شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده میدان الکترومغناطیسی، درصد زنده‌مانی سلول‌ها را در مقایسه با شرایط بدون میدان به‌صورت معنی‌دار کاهش داد. میدان الکترومغناطیسی از یک طرف با انتقال نیرو به مولکول پارامغناطیس نیتریک‌اکسید، روی سرعت حرکت و دینامیک آن تاثیرگذار بوده است و بنابراین انتقال این رادیکال آزاد را به درون سلول افزایش و اثرات ناشی از آن را شدت می‌بخشد. از طرف دیگر میدان الکترومغناطیسی با تحت تاثیر قراردادن حرکت یون‌ها و اتصال آنها به رسپتورهای غشایی، عبور آنها را در عرض کانال‌های پروتئینی غشا کنترل می‌کند[2].

در یک مطالعه نشان داده شده که میدان الکترومغناطیسی با افزایش بیان پروتئین‌های کانال‌های دریچه‌دار کلسیمی، انتقال یون کلسیم را به درون سلول شدت بخشیده است[7]. افزایش مقدار یون کلسیم در سلول به‌خودی خود روی آبشارهای سیگنالینگ درون سلول از جمله فعال‌سازی نیتریک‌اکسیدسنتاز وابسته به کالمودولین تاثیر گذاشته است[8] و افزایش سنتز NO منجر به نیتریشن پروتئین‌ها، القای آپوپتوزیس، تغییر مورفولوژی سلول و در نهایت پیشبرد سلول به سمت فرآیند تمایز شده است[9, 10]. *پارک* و همکاران نشان داده‌اند که EMF با افزایش فعالیت آنزیم نیکوتین‌آمیدآدنین‌دی‌نوکلئوتید (NADH) اکسیداز غشایی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش داده و در پی آن با فعال‌سازی آنزیم‌های کینازی و فسفوریلاسیون فاکتورهای رونویسی از طریق مسیر PI3K/Akt بیان ژن‌های مسیر تمایز عصبی از جمله MAP2 و NeuroD1 را تحریک کرده است[11].

در مطالعه حاضر غلظت بالای نیتریک‌اکسید، درصد زنده‌مانی سلول‌ها را در مقایسه با غلظت پایین نیتریک‌اکسید با شدت بیشتری کاهش داد که این اثر در حضور EMF شدت یافت. در غلظت پایین نیتریک‌اکسید، سلول‌ها با حفظ حالت بنیادی خودی هیچ اثری از بیان ژن *Dcx* و بیان پروتئین MAP2 نشان ندادند، اما غلظت بالای نیتریک‌اکسید به‌همراه EMF منجر به بیان ژن *Dcx* و بیان پروتئین MAP2 شد و مورفولوژی سلول را نسبت به حالت نیتریک‌اکسید با غلظت پایین تغییر داد. در مطالعه‌ای تیمار با غلظت پایین نیتریک‌اکسید، بیان ژن‌های مارکر پرتوانی را (*Oct4* و *نانوگ*) را افزایش داده[12]، اما در مطالعه‌ای دیگر تیمار با غلظت بالای دهنده NO، بیان ژن‌های *نانوگ* و *Oct4* را در سلول‌های بنیادی جنینی موش کاهش داده است[13, 14]. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده که نیتریک‌اکسید در غلظت بالا باعث بیان ژن *Nestin* در سلول شده است[15]، اما سلول‌ها در غلظت پایین حالت بنیادی خود را حفظ کرده بودند. غلظت پایین نیتریک‌اکسید با فعال‌سازی آنزیم گوانیل‌سیکلاز و تولید گوانوزین‌مونوفسفات (GMP) حلقوی باعث می‌شود که سلول، فعالیت‌های فیزیولوژی طبیعی خود را حفظ کند و به رشد طبیعی خود ادامه دهد، اما غلظت بالای NO با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و اتصال به دو آمینواسید سیستئین و تیروزین، فعالیت پروتئین‌ها را تغییر می‌دهد و باعث متیلاسیون و استیلاسیون هیستون‌ها و تغییر شکل کروماتین می‌شود و با افزایش بیان ژن *p53*، فرآیند آپوپتوزیس را در سلول القا می‌کند که این امر در سلول‌های بنیادی منجر به مهاجرت سلول‌ها و تمایز آنها می‌شود[16].

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم استفاده از میدان الکترومغناطیسی در فرکانس‌های بالاتر و پایین‌تر از ۵۰هرتز و همچنین استفاده از نیتریک‌اکسید در غلظت‌هایی متفاوت از ۱۰میکرومولار و یک‌میلی‌مولار اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود که این مطالعه در شرایط "در موجود زنده" (in vivo) برای بررسی تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های شبه عصب انجام شود و همچنین این مطالعه برای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی و پیشرفت آنها به سمت تمایز و درمان سرطان پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

میدان الکترومغناطیسی به‌همراه غلظت بالای نیتریک‌اکسید از تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی می‌کاهد و با افزایش اندازه سلول، بیان ژن و پروتئین مارکر تمایز عصبی، تمایز آنها را به سمت سلول‌های شبه عصب تسهیل می‌کند.

تشکر و قدردانی: از کارشناس محترم و دانشجویان آزمایشگاه بیوفیزیک آزمایشگاه ژنتیک تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: نازنین حقیقت (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۵%)؛ پرویز عبدالمالکی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰%)؛ مهرداد بهمنش (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ جواد پرنیان (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۵%)

منابع مالی: از طریق دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران وابسته به نهاد ریاست جمهوری به شماره طرح ۹۵۸۱۵۶۶۵ تامین شده است.

منابع

1- Eichholz GG. Non-ionizing radiation, part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) electric and magnetic fields. Health Phys. 2002;83(6):920.

Archive of SID
www.SID.ir

2- Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, et al. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. Stem Cell Res. 2015;15(1):96-108.
3- Ascenzi P, Di Masi A, Sciorati C, Clementi E. Peroxynitrite - an ugly biofactor?. Biofactors. 2010;36(4):264-73.
4- Beltran-Povea A, Caballano-Infantes E, Salguero-Aranda C, Martín F, Soria B, Bedoya FJ, et al. Role of Nitric Oxide in the maintenance of pluripotency and regulation of the hypoxia response in stem cells. World J Stem Cells. 2015;7(3):605-17.
5- Bonafè F, Guarnieri C, Muscari C. Nitric Oxide regulates multiple functions and fate of adult progenitor and stem cells. J Physiol Biochem. 2015;71(1):141-53.
6- Chuang JH, Tung LC, Lin Y. Neural differentiation from embryonic stem cells in vitro: An overview of the signaling pathways. World J Stem Cells. 2015;7(2):437-47.
7- Pilla AA. Electromagnetic fields instantaneously modulate nitric oxide signaling in challenged biological systems. Biochem Biophys Res Commun. 2012;426(3):330-3.
8- Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. Br J Pharmacol. 2011;164(2):213-23.
9- Liu L, Wang D, Wang J, Ji H, Zhang Y. NOAD, a novel nitric oxide donor, induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells. Toxicol in Vitro. 2015;29(7):1289-97.
10- Tejedo JR, Tapia-Limonchi R, Mora-Castilla S, Cahuana GM, Hmadcha A, Martin F, et al. Low concentrations of Nitric Oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival. Cell Death Dis. 2010;1:e80.
11- Park JE, Seo YK, Yoon HH, Kim CW, Park JK, Jeon S. Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation. Neurochem Int. 2013;62(4):418-24.
12- Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric Oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. J Biochem Mol Biol. 2002;35(1):116-26.
13- Huang NF, Fleissner F, Sun J, Cooke JP. Role of Nitric Oxide signaling in endothelial differentiation of embryonic stem cells. Stem Cells Dev. 2010;19(10):1617-26.
14- Nott A, Riccio A. Nitric Oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons. Cell Cycle. 2009;8(5):725-30.
15- Charles N, Ozawa T, Squatrito M, Bleau AM, Brennan CW, Hambardzumyan D, et al. Perivascular Nitric Oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. Cell Stem Cell. 2010;6(2):141-52.
16- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev. 2007;87(1):315-424.

Archive of SID

www.SID.ir