

بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا بر آپوپتوزیس القایی در یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

امیر ثابت^۱، پرویز عبدالمالکی^{۱*}، سید جواد مولا^۲،
فائزه قناتی^۳
۱. تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم
زیستی، گروه بیوفیزیک
۲. تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم
زیستی، گروه ژنتیک
۳. تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم
زیستی، گروه علوم گیاهی

چکیده

امروزه جهان غرق در گونه‌های کمتر شناخته شده‌ای از پیام‌ها و سیگنال‌هایی است که ما آدمیان را به هم پیوند می‌دهد. از این رو آدمی همواره در تیررس میدان‌های الکتریکی، مغناطیسی و الکترومغناطیسی قرار دارد. برای بررسی اثرات میدان‌های مغناطیسی بر بقای سلول، یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، در حضور و نبود نیم‌گری از پرتو ایکس، در معرض میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلا قرار گرفتند. هنگامی که سلول‌ها تنها با میدان مغناطیسی ایستا تیمار شدند، تفاوت معنی‌داری در میزان یاخته‌های مرده دیده نشد. اما پس از تابش حاد با پرتو یونیزان، میدان در صد بقای سلولی را به طور معنی‌داری افزایش داد و مانع از آپوپتوزیس القایی حاصل از پرتو ایکس، در بخشی از یاخته‌ها شد. این داده‌ها نشان می‌دهند که تیمار با میدان مغناطیسی ایستا، آپوپتوزیس را سرکوب کرده و بقای سلول را در یاخته‌های مغز استخوان موش صحرایی ارتقا می‌بخشد. از این رو، میدان‌های مغناطیسی ممکن است با افزایش خطر گسترش تومور و جلوگیری از آپوپتوزیس، به عنوان یک عامل کمکی در جهش‌زایی و سرطان‌زایی عمل کنند.

واژگان کلیدی: میدان مغناطیسی ایستا؛ پرتو یونیزان؛ مرگ سلولی؛ فلوسایتومتری

نویسنده مسئول: پرویز عبدالمالکی

parviz@modares.ac.ir

Studying the effect of static magnetic field on induced apoptosis in mesenchymal bone marrow stem cells of rat

Amir Sabet¹, Parviz Abdolmaleki^{1*}, Seyyed Javad Mowla²,
Faezeh Ghanati³

1. Department of Biophysics, Faculty of Bioscience, Tarbiat Modares University, Tehran
2. Department of Genetics, Faculty of Bioscience, Tarbiat Modares University, Tehran
3. Department of Plant Biology, Faculty of Bioscience, Tarbiat Modares University, Tehran

Nowadays the world is full of some less known species of signals which connect us together. So human beings are continually exposed to electric, magnetic and electromagnetic fields. In order to investigate the effects of magnetic fields on cell survival, bone marrow mesenchymal stem cells were exposed to 15 mT static magnetic field in the presence and the absence of 0.5 gray X-ray. The rate of dead cells didn't show a significant difference when the cells were treated with static magnetic field alone. But after an acute exposure with the ionizing radiation, the field increased the percentage of survived cells significantly and rescued a part of X-ray induced apoptotic cells. These data show that static magnetic field treatment, suppresses apoptosis and promotes survival in bone marrow stem cells of rat. Thus, magnetic fields might act as a co-mutagenic and co-carcinogenic agent with increasing the risk of tumor development by inhibiting apoptosis.

Key words: Static magnetic field; Ionizing radiation, cell death; Flow cytometry.

مقدمه

آدمی سال‌هاست که پرتوهای الکترومغناطیسی را از سرچشمه‌های طبیعی زمینی و کیهانی دریافت می‌کند؛ اما آنچه در این دوران بیش از هر چیز به چشم می‌آید، بنیان نهاده شدن جهان نوین بر فیزیک امواج الکترومغناطیس است که دریایی از موج‌ها و میدان‌های مصنوعی را روانه پیرامون ما کرده است و از این رو شناخت کامل این پدیده تازه، که خود خواسته بشر نوین را فرا گرفته است، بسیار راه‌گشا خواهد بود. دامنه اثرگذاری این‌گونه امواج و میدان‌های مغناطیسی و الکترومغناطیسی، چه بسا گسترده‌تر از دانش کنونی ماست. امروزه جهان غرق در گونه‌های کمتر شناخته شده‌ای از پیام‌ها و سیگنال‌هایی است که ما آدمیان را به هم پیوند می‌دهد. فرستنده‌های رادیویی، تلویزیونی، تلفن‌های همراه و ابزارهایی از این دست، دستگاه‌های الکتریکی، سیم‌های فشار

قوی و انتقال قدرت، وسایل ترابری مانند قطارهای شهری و همچنین ابزارهای گوناگون پزشکی، چه تشخیصی و چه درمانی، از چنین پدیده‌ای بهره می‌گیرند. از این رو آدمی همواره در تیررس میدان‌های الکتریکی، مغناطیسی و الکترومغناطیسی قرار دارد (Barnes FS, al,2006). اما به راستی دانش ما در شناخت سازوکار این امواج و میدان‌ها تا چه اندازه است؟ بنا به اهمیت موضوع، بیش از چهل سال است که بررسی اثرات فیزیکی و بیوفیزیکی میدان‌ها مورد توجه قرار گرفته است. اگر چه سال‌هاست که بر هم کنش این میدان‌ها با جانداران و بافت‌های زنده در دست بررسی است اما تاکنون سازوکارهای فیزیکی و بیوفیزیکی پدیرفتنی و فراگیری که توجیه کننده اثرهای میدان‌های مغناطیسی باشد، به دست نیامده است. پیامدهای زیستی میدان‌های مغناطیسی تاکنون از دیدگاه‌های گوناگونی بررسی شده است؛ با این

حال هنوز هیچ سند متقاعد کننده علمی در دست نیست که روشن کند میدان‌های مغناطیسی به ما زیان می‌رسانند یا نه (Tenuzzo B, et al, 2006) تحقیقات در زمینه اثر میدان مغناطیسی بر انسان، بیشتر حول سرطان‌زایی انجام شده است و گزارش‌های متعددی در دست است که میدان‌های مغناطیسی باعث بالا رفتن میزان سرطان و به ویژه سرطان خون در افرادی که به طور مداوم در معرض این میدان‌ها قرار گرفته‌اند، شده‌اند (Goodman R, et al 1993). اما به دلایل فنی و اخلاقی بیشتر بررسی‌های انجام شده در زمینه اثر بخشی میدان‌های مغناطیسی در محیط *in-vitro* بوده است و اثر میدان بر یاخته‌های کشت شده در بیرون از بدن سنجیده شده است؛ از این رو به سختی می‌توان نتایج آن‌ها را به *in-vivo* گسترش داد. پژوهش‌های پیشین به طور عمده در چند محور دسته‌بندی می‌شود. تکثیر یاخته‌ای^۱ و پراکندگی چرخه

یاخته‌ای^۲، جهش‌زایی^۳، جابه‌جایی کروماتیدهای خواهری^۴، شکل‌گیری ریز هسته‌ها^۵ و اثر بر بیان ژن^۶، از جمله پیامدهای احتمالی ژنتیکی است که در میدان‌های مغناطیسی سنجیده شده است (Miyakoshi 2005) اثر میدان‌ها بر سازوکار مرگ و میر یاخته‌ها نیز از جمله پدیده‌هایی است که همواره به عنوان یک عامل مهم در اثر بخشی زیستی میدان‌ها، مورد توجه بوده است. مرگ و میر یاخته‌ها، از دو راه اصلی رخ می‌دهد. یکی نکروزیس^۷ و دیگری آپوپتوزیس^۸. این دو مکانیسم، تفاوت‌هایی با هم دارند. آپوپتوزیس مرگ فیزیولوژیک سلولی است و طی تحریکات خاصی اتفاق می‌افتد، در حالی که نکروزیس مرگ پاتولوژیک یاخته بوده و طی آسیب‌های شدید وارد شده به یاخته از قبیل

² Cell cycle distribution

³ Mutation

⁴ Sister chromatid exchanges

⁵ Micronucleus formation

⁶ Gene expression

⁷ Necrosis

⁸ Apoptosis

¹ Cell proliferation

میتوژنی در یاخته‌های ماکروفاژی، لنفوسیت‌های طحال و یاخته‌های تیموس موش می‌شوند. همچنین در یاخته‌های تابش دیده تیموس موش، میزان آپوپتوزیس در حضور میدان مغناطیسی روند افزایشی داشت (Flipo D, et al 1998). یک سال بعد فانلی و همکارانش از کاهش آپوپتوزیس القایی در یاخته‌های انسانی رده U937 و CEM در میدان‌های مغناطیسی ایستای با شدت کمتر و در حدود میلی‌تسلا خبر دادند (Fanelli C, et 1999). در ادامه پژوهش‌ها، جاجته در سال ۲۰۰۲ دریافت که اگرچه میدان مغناطیسی ایستای ۷ میلی‌تسلاهی اثری بر میزان آپوپتوزیس در یاخته‌های لنفوسیت موش ندارد، اما همین میدان در حضور کلرید آهن، باعث افزایش شکست DNA شده و مرگ یاخته‌ای را چه از راه آپوپتوزیس و چه نکروزیس افزایش می‌دهد (Jajte J, et al. 2002). در همین سال تئودوری، تبدیل آپوپتوزیس به نکروزیس ثانویه را در یاخته‌های HL-60 که در آن‌ها

هیپوکسی، هیپوترمی و مواد سمی خارجی، رخ می‌دهد. همچنین نکروزیس فرآیندی است غیرفعال که در نبود ATP انجام شدنی است اما آپوپتوزیس وابسته به صرف انرژی است. از دیدگاه ریخت‌شناختی نیز در آپوپتوزیس، یاخته متراکم شده و کاهش حجم پیدا می‌کند، در حالی که در نکروزیس یاخته متورم و بزرگ می‌شود. در آپوپتوزیس غشای سیتوپلاسمی به صورت اجسام آپوپتوتیک در می‌آید، در حالی که در نکروزیس، غشا تخریب شده و محتویات سلولی به فضای میان بافی می‌ریزند. از این‌ها گذشته، وقوع نکروزیس در بافت‌ها به علت بیرون ریختن محتویات سیتوپلاسمی یاخته منجر به پاسخ التهابی می‌شود، در حالی که در آپوپتوزیس هیچ پاسخ التهابی رخ نمی‌دهد (Lodish H, et 2007). در سال ۱۹۹۸ فلیپو و همکاران دریافتند که میدان‌های مغناطیسی ایستای با شدت‌های پایین در حدود سانتی‌تسلا، باعث افزایش غلظت کلسیم درون یاخته‌ای و کاهش پاسخ

آپوتوزیس القایی با کامپتوتسین^۱ رخ داده بود، در میدان مغناطیسی ایستای ۶ میلی‌تسلائی گزارش کرد؛ اگرچه این شدت از میدان، به تنهایی و در بازه زمانی ۵ ساعته اثری بر میزان آپوتوزیس در این یاخته‌ها نداشت (Teodori L, et al. 2002). تاکنون مکانیسم‌های بسیاری در اثر بخشی میدان‌های مغناطیسی بر جانداران و با رویکرد ویژه بر سرطان‌زایی پیشنهاد شده است؛ اما از میان این مکانیسم‌ها می‌توان به اثر میدان بر پایداری زوج‌های رادیکالی و تغییر در میزان آپوتوزیس یاخته‌ها به طور خاص اشاره کرد که هر دو می‌توانند نقش مهمی در حرکت یاخته به سوی سرطانی شدن بازی کنند. در این تحقیق، اثر میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلائی بر مرگ و میر یاخته‌ها در بازه زمانی ۲۴ ساعته سنجیده شده است. در همین راستا برای القای آپوتوزیس و بالا رفتن میزان یاخته‌های مرده و

سنجیدن اثر میدان بر این فرایند، پرتو یونیزان به کار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

کشت یاخته‌های بنیادی: برای جداسازی یاخته‌های بنیادی از مغز استخوان، موش‌های صحرایی جوان (۳-۱ ماه) از موسسه تحقیقاتی رازی (کرج، ایران) خریداری و در شرایط مناسب نگهداری گردیدند. بدین منظور، نخست موش با کلروفرم (مرک، آلمان) بی‌هوش شده، اندام‌های پایینی تشریح و استخوان‌های ران و ساق جدا و در پتری دیش دارای بافر نمکی فسفات^۲ سرد گذاشته شد. دو سر استخوان‌ها با کمک قیچی استخوان بر بریده شده و سرسرنگ در یکی از دو سوی استخوان فرو برده شد. سپس با تزریق ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آلفام^۳ (گیبکو، اینویتروژن، آمریکا) به فضای درونی استخوان، محتویات داخلی در فلاسک کشت یاخته

² Phosphate Buffered Saline (PBS)

³ Alpha-MEM (Minimum Essential Medium)

¹ Camptothecin

مغناطیسی ایستا، طراحی و ساخته شده در گروه بیوفیزیک دانشگاه تربیت مدرس، با توان یک کیلو وات و بیشینه جریان گذری ۵۰ آمپر، می‌تواند میدان مغناطیسی تا ۵۰ میلی‌تسلا (با شدت بهینه ۲۵ میلی‌تسلا) را پدید آورد. یک ترانس که چشمه جریان الکتریسیته می‌باشد نیز در کنار این دستگاه به کار گرفته شده است. با تنظیم جریان از سیم پیچ‌های دستگاه، میدان مغناطیسی پدید می‌آید؛ سپس این میدان از راه بازوهای به گوشی‌های آهنین می‌رسد و ما میدان یکنواختی را در میان آن دو خواهیم داشت. این گوشی‌های گرد آهنین با لایه نازکی از نیکل پوشیده شده‌اند و نمونه‌های آزمایشی در میان این دو جای خواهند گرفت.

برای بهبود میدان، برگه‌های فرومغناطیسی آهنی که با لایه‌های دیامغناطیسی جدا شده‌اند، به کار رفته است. این لایه‌های دیامغناطیسی برای جلوگیری از

(ارنج، بلژیک) تخلیه شد (Yaghoobi MM, et al. 2005). در ادامه محیط کشت با غلظت ۲۰٪ سرم جنین گاوی (گیبکو، اینویترورژن، آمریکا) به فلاسک کشت افزوده شده، فلاسک به انکوباتور کشت یاخته با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و هوای نمانک دارای ۵٪ CO₂ برده شد تا زمینه مناسب برای رشد یاخته‌ها فراهم گردد. یاخته‌های جدا شده، در همین شرایط کشت نگه‌داری شده و روزانه از دیدگاه میزان رشد و آلودگی احتمالی قارچی-باکتریایی بررسی شدند. محیط کشت یاخته‌ها نیز در هر دو تا سه روز با محیط تازه دارای ۲۰٪ سرم جنین گاوی جایگزین شد. به طور کلی، یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در واکشت‌های نخست، از رشد بسیار خوبی برخوردارند و در محیط کشت دارای ۲۰٪ سرم، هر چهار تا پنج روز یک بار نیاز به واکشت دارند (Sabet A, et al. 2010).

دستگاه زاینده میدان مغناطیسی

ایستا: دستگاه زاینده میدان

پدید آمدن جریان‌های گردابی است که از کارایی دستگاه می‌کاهد. پیش از تیمار نمونه‌ها بهتر است دستگاه را با تسلا متر کالیبره کرد. از آن جا که جریان بالای الکتریسته با گرمایی دما را در دستگاه بالا می‌برد، لوله‌هایی مسی پیرامون سیم پیچ‌ها پیچانده شده است که با گذشتن آب از درون آن‌ها از افزایش دما جلوگیری شود (Abdolmaleki P, et al 2007).

تیمار یاخته‌های کشت شده با میدان مغناطیسی:

بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، پس از چند بار واکشت و به دست آمدن فلاسک‌های پر از یاخته برای تیمار با میدان مغناطیسی آماده‌اند. محیط کشت تازه ۴۸ ساعت پس از هر واکشت جایگزین محیط پیشین شده و پس از هر ۹۶ ساعت نیز همزمان با جایگزین کردن محیط کشت، در صورت نیاز واکشت مجدد انجام می‌شود.

یاخته‌های کشت شده از واکشت پنجم تا پانزدهم از درجه خلوص بالاتر

و رشد بهتری برخوردارند و برای تیمار، مناسب‌ترند. همچنین تلاش شد که درجه واکشت تکرارهای یک تا سه از هر تیمار تا حد امکان به هم نزدیکتر باشد. به هنگام تیمار یاخته‌ها، فلاسک‌هایی به کار رفت که ۲۴ ساعت از آخرین جایگزینی محیط کشت آن‌ها گذشته بود تا همه در یک فاز رشد باشند. فلاسک‌ها در هنگام تیمار نزدیک به یک میلیون یاخته داشتند چراکه این شمار از یاخته‌ها برای به کارگیری در آزمون‌های گوناگون یاخته‌ای مناسب‌تر بود (Sabet A, et al. 2010).

فلاسک‌ها برای تیمار با میدان به چهار دسته دوتایی تقسیم شدند: یک دسته، دسته شاهد یا کنترل، یک دسته تیمار با میدان مغناطیسی، یک دسته تیمار با پرتو ایکس و دسته آخر تیمار با پرتو و میدان مغناطیسی. از هر دسته دوتایی، یک فلاسک پس از ۱۲ ساعت و فلاسک دیگر پس از ۲۴ ساعت از میدان خارج شدند. گفتنی است تیمار

پرتوی، حاصل یک تابش حاد پرتو ایکس با دوز نیم گری و در بازه زمانی یک ثانیه‌ای و تیمار میدان مغناطیسی بی‌درنگ پس از تابش پرتو با شدت ۱۵ میلی‌تسلا و به صورت پیوسته به انجام رسید.

تیمار یاخته‌های کشت شده با پرتو

یونیزان: برای تیمار یاخته‌ها با پرتو و القای آپوپتوزیس به آن‌ها، یک چشمه پرتوی رادیولوژی تشخیصی به کار گرفته شد. اختلاف پتانسیل ۱۴۰ کیلوولتی و شدت جریان ۴۰ میلی‌آمپری در بازه زمانی یک ثانیه‌ای و با احتساب فیلتر آلومینیومی ۲/۵ میلی‌متری، تابش نیم گری از پرتو ایکس سخت به نمونه‌ها را در پی داشت.

تثبیت و رنگ‌آمیزی یاخته‌ها:

یاخته‌های استرومای مغز استخوان از دید کشت یاخته‌ای، در رده یاخته‌های چسبان قرار می‌گیرند. برای به کارگیری روش فلوسایتومتری در این گونه یاخته‌ها، نخست می‌بایست آن‌ها را از کف فلاسک دارای محیط کشت جدا کرد و آنگاه

با پیپتاژ شدید با کمترین آسیب به یاخته‌ها آن‌ها را به صورت تک در آورد. یاخته‌های رنگ آمیزی شده برای آنالیز به درون کووت‌های ویژه‌ای ریخته شده، درون دستگاه جای می‌گیرند.

فلاسک‌های یاخته‌ای که هر کدام در حدود یک میلیون یاخته داشتند پس از تیمار، بی‌درنگ از فلاسک‌ها جدا و پس از سانتریفوژ، در محلول با یک پنجم نسبت حجمی بافر فسفات و چهار پنجم الکل ۷۰ درجه تثبیت گردیدند. پس از ۲۴ ساعت محلول تثبیت خارج و در ادامه و پس از تیمار با کوکتل PI و رنگ آمیزی محتوای ژنوم هسته، در دستگاه فلوسایتومتر بکتون دیکینسون ارزیابی شدند.

آنالیز یاخته‌های رنگ‌آمیزی شده

به کمک دستگاه فلوسایتومتر و

استخراج داده‌ها: فلوسایتومتری با

به کارگیری ترکیبی از سیستم‌های مایع، پرتوی و الکترونیکی، که در زیر آورده می‌شود، ویژگی‌های گوناگونی از مولکول‌های زیستی و

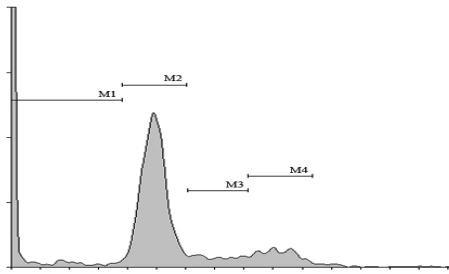
گاه یاخته را اندازه‌گیری کرده و پس از گردآوری داده‌ها به آنالیز آن‌ها می‌پردازد. داده‌های به دست آمده در این روش نشان دهنده اندازه نسبی یاخته‌ها، گرانولیتی نسبی یا میزان پیچیدگی درونی یاخته‌ها و میزان نسبی فلورسانس می‌باشد (Givan AL, 2001). برای آنالیز یاخته‌ها با روش فلوسایتومتری لازم است تعداد یاخته‌ها دست کم یک میلیون و کاملاً به صورت تک تک باشند؛ به این معنی که هیچکدام به هم نچسبیده باشند. در صورت وجود یاخته‌های دوتایی یا سه تایی و یا اجتماعات بزرگتر از یاخته‌ها می‌توان اطلاعات مربوط به آن‌ها را از نمودار دوبعدی به دست آمده از مؤلفه‌های فلورسانس FL2-A به FL2-W حذف کرد؛ گرچه حذف این دسته از اطلاعات، بیشتر برای سنجش چرخه یاخته‌ای ضروری است و وجود چنین چسبندگی‌هایی نمی‌تواند در یافتن درصد یاخته‌هایی که دچار آپتوزیس شده‌اند خللی ایجاد

کند. آپتوزیس یک فرآیند فعال است که در آن DNA به وسیله آنزیم‌های خاصی در راستای از میان برداشته شدن یاخته، به تکه‌های کوچکتری تقسیم می‌شود. از آنجا که رنگدانه پروپیدیوم یدید^۱ (PI) با اتصال به DNA می‌تواند طول آن را نشان دهد، از این رو فلوسایتومتری معیار مناسبی برای پی بردن به درصد یاخته‌های با DNA رده رده شده، به دست می‌دهد. دستگاه فلوسایتومتر بر پایه اندازه نور فلورسانسی که از هر یاخته بازتاب می‌شود، با سنجش طول DNA یاخته، آن دسته از یاخته‌هایی را که دچار آپتوزیس شده‌اند و بالطبع دارای DNA های کوتاه‌تری هستند را شمارش می‌کند. داده‌های به دست آمده از دستگاه فلوسایتومتر خام بوده و برای بازیابی داده‌ها، نرم افزارهای ویژه ای همچون نرم افزار Win-MDI به کار می‌رود (۱۱).

¹ Propidium Iodide

و بخش‌هایی که در سه ناحیه بعد قرار گرفته‌اند به ترتیب یاخته‌های موجود در فازهای G_0/G_1 و S و G_2/M را نمایش می‌دهند.

شکل ۱- نمودار هیستوگرام محتوای DNA یاخته‌ای علیه مؤلفه FL2-A نشان دهنده درصد آپوپتوزیس و فازهای چرخه سلولی



آنالیز آماری: همه آزمون‌ها با سه بار تکرار به انجام رسید و داده‌های گزارش شده، نشان دهنده میانگین این سه با افزایش و کاهش انحراف معیار است. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS و برای ارزش‌گذاری آن‌ها، آزمون T-test برای نمونه‌های مستقل از هم به کار گرفته شد که داده‌های با P-value کمتر از ۰/۰۵ با ارزش انگاشته شدند.

در این تحقیق، با به کارگیری PI و دستگاه فلوسایتومتر بکتون-دیکینسون (فرانکلین، آمریکا) محتوای DNA سلولی سنجیده شد و از روی این محتوا، شمار یاخته‌های آپوپتوتیک از جمع ۱۰۰۰۰ یاخته شمارش شده به دست آمد. برای این کار همان‌طور که در شکل شماره یک دیده می‌شود، به کمک نمودار هیستوگرامی که محتوای DNA یاخته‌ها را نمایش می‌دهد، می‌توان یاخته‌های با DNA کوتاه‌تر را جدا کرد و آن را معیاری از یاخته‌های مرده در نظر گرفت. هیستوگرام نشان داده شده با نرم افزار Win-MDI و از روی شدت مؤلفه فلورسانس FL2-A در یکی از نمونه‌های کنترل به دست آمده است. افزون بر این، شمار یاخته‌های موجود در هر یک از فازهای چرخه یاخته نیز با به کار گرفتن این هیستوگرام، به دست می‌آید؛ بدین ترتیب که سطحی از نمودار که در ناحیه M1 قرار گرفته است، نشان دهنده یاخته‌های با DNA رده رده

نتایج

در این بررسی شمار یاخته‌هایی که دچار مرگ برنامه‌ریزی شده یاخته‌ای یا آپوتوزیس شده بودند، سنجیده شد. به منظور بررسی اثر میدان مغناطیسی بر میزان آپوتوزیس و آپوتوزیس القایی، فلاسک‌های محتوی یاخته، به چهار دسته دوتایی مطابق جدول یک تقسیم شدند. همان‌گونه که در بخش پیش گفته شد، از هر دسته یک فلاسک پس از ۱۲ ساعت و فلاسک دیگر پس از ۲۴ ساعت تثبیت شد.

فلاسک‌های دسته دوم، تنها با میدان مغناطیسی ایستا، دسته سوم تنها با نیم‌گری پرتو یونیزان و فلاسک‌های دسته چهارم نخست در یک ثانیه تابش حاد نیم‌گری را دریافت کرده و سپس در معرض میدان مغناطیسی ایستا قرار گرفتند. متغیر زمانی نیز در هر دسته، در بازه زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعته

دسته چهارم		دسته سوم		دسته دوم		دسته یکم		تیمارها
فلاسک ۸ ک	فلاسک ۷ ک	فلاسک ۶ ک	فلاسک ۵ ک	فلاسک ۴ ک	فلاسک ۳ ک	فلاسک ۲ ک	فلاسک ۱ ک	
*	*			*	*			میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلا-ی
*	*	*	*					تابش حاد پرتو ایکس با دز نیم‌گری در یک ثانیه
	*		*		*		*	بازه زمانی ۱۲ ساعته
*		*		*		*		بازه زمانی ۲۴ ساعته

جدول ۱- دسته بندی یاخته‌های بنیادی برای تیمار با میدان مغناطیسی ایستا و پرتو یونیزان در بازه‌های زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعته

اعمال شده و به عبارتی نشان دهنده طول میدان‌دهی به یاخته‌ها است. فلاسک‌های دسته نخست نیز در همان شرایط و بدون هیچ تیماری، به عنوان گروه کنترل، در نظر گرفته شد. پس از شمارش یاخته‌ها و جداسازی یاخته‌های با DNA کوتاه‌تر و پس از سه تکرار مستقل از هم، نتایج زیر به دست آمده که در جدول شماره دو آمده است.

جدول ۲- میانگین درصد یاخته‌های آپوپتوتیک از جمع ده هزار یاخته بنیادی در یک دسته کنترل و سه دسته تیمار با ذکر انحراف معیار

دسته یکم	دسته دوم	دسته سوم	دسته چهارم	
۰/۲۰ ±	۰/۳۳ ±	۱/۰۲ ±	۰/۵۶ ±	درصد یاخته‌های آپوپتوتیک ۱۲ ساعت
۱۷/۰۸	۱۷/۲۸	۳۰/۷۲	۲۲/۲۶	
۰/۲۸ ±	۰/۴۷ ±	۰/۹۹ ±	۰/۲۵ ±	درصد یاخته‌های آپوپتوتیک ۲۴ ساعت
۱۸/۷۱	۱۸/۹۴	۳۸/۱۱	۲۶/۷۱	

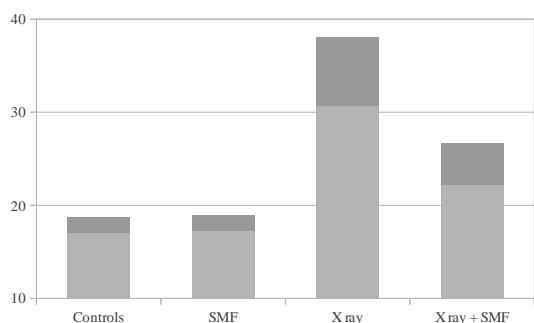
فلاسک‌ها دیده می‌شود، اثر میدان مغناطیسی در کاهش درصد آپوپتوزیس القایی از پرتو ایکس می‌باشد. این اثر کاهندگی یا توقف فرآیند آپوپتوزیس در بازه زمانی ۱۲ ساعته با سطح اطمینان ۸۰ درصد و در بازه زمانی ۲۴ ساعته با سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار بود.

بحث

یاخته‌های بنیادی سرچشمه بسیاری از رده‌های یاخته‌ای از جمله یاخته‌های خونی و بسیاری از یاخته‌های سیستم ایمنی هستند. از آنجا که یاخته‌های بنیادی در بسیاری از روندهای درمانی سرطان آسیب می‌بینند، بررسی اثر پرتو و عواملی که در این اثرگذاری نقش دارند، از اهمیت بسیاری برخوردار است. از این گذشته به دلیل حساسیت بالای این‌گونه از یاخته‌ها و توانایی آن‌ها در تبدیل به دیگر رده‌ها و تقسیم‌های بی‌شمار و پی در پی، بررسی روند سرطان‌زایی در چنین یاخته‌هایی می‌تواند در

همان‌طور که دیده می‌شود میدان مغناطیسی ایستا اثر معنی‌داری بر درصد یاخته‌های آپوپتوتیک نداشت و گرچه در ۱۲ ساعت نخست درصد این یاخته‌ها را از ۱۷/۰۸ به ۱۷/۲۸ درصد و در ۲۴ ساعت از ۱۸/۷۱ به ۱۸/۹۴ درصد رساند اما سطح معنی‌داری بسیار پایین و غیرمعنی‌دار بود. از سوی دیگر، پرتو یونیزان آشکارا و به طور معنی‌دار در هر دو بازه ۱۲ و ۲۴ ساعته، به افزایش آپوپتوزیس در یاخته‌ها انجامید که البته قابل پیش‌بینی بود. آنچه در این میان از مقایسه دسته‌های سوم و چهارم

آپوتوزیس، دارای نقش‌های کلیدی هستند (Ermak G, et al 2002).



شکل ۲- نمودار درصد یاخته‌های آپوتوتیک در در چهار دسته کنترل، میدان مغناطیسی ایستا، پرتو ایکس و پرتو و میدان بخش روشن‌تر در هر ستون درصد این یاخته‌ها در ۱۲ ساعت نخست و بخش تیره‌تر درصد یاخته‌ها را در ادامه و تا ساعت ۲۴ نمایش می‌دهد. چنان‌که در شکل شماره دو دیده می‌شود، میدان مغناطیسی ایستا اگرچه بر میزان آپوتوزیس یاخته‌ها اثر معنی‌داری نداشت اما پس از القای آپوتوزیس به یاخته‌ها با تابش حاد پرتو یونیزان، به‌طور معنی‌داری از میزان آپوتوزیس در ۲۴ ساعت نخست، کاست. در این نمودار، بخش روشن‌تر در هر ستون، درصد این یاخته‌ها در ۱۲ ساعت نخست و بخش تیره‌تر درصد یاخته‌ها را در

پیشگیری و درمان برخی دیگر از سرطان‌ها سودمند باشد. همچنین به دلیل تقسیم‌های متوالی، این‌گونه از یاخته‌ها نسبت به عوامل جهش‌زا و سمی، حساسیت بالایی دارند و با توجه به آسانی جداسازی آن‌ها از بافت مغز استخوان، هدف مناسبی برای پژوهش‌های یاخته‌ای به شمار می‌آیند.

در این تحقیق، اثر میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلا بر فرایند آپوتوزیس بررسی شد. همان‌گونه که آسیب به ژنوم می‌تواند منجر به سرطانی شدن یاخته شود، هرگونه تغییر در میزان آپوتوزیس نیز می‌تواند در پیشرفت یا مهار این فرایند، مؤثر باشد. از دیگر سازوکارهای سرطان‌زایی میدان می‌توان به ایجاد استرس اکسیداتیو، اثر بر افزایش طول عمر رادیکال‌های آزاد و همچنین اثر بر ترابری کلسیم از خلال غشا و کانال‌های یونی اشاره کرد که هر سه در تغییر میزان

ادامه و تا ساعت ۲۴ نمایش می‌دهد. کاهش آپوپتوزیس القایی تا ساعت ۱۲ در حضور میدان مغناطیسی دارای سطح معنی‌داری ۸۰ درصد و تا ساعت ۲۴ به سطح معنی‌داری ۹۵ درصد رسید. در تحقیق پیشین (Sabet A, et al. 2010). که همین شدت از میدان مغناطیسی ایستا به یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان وارد شد، دیده شده بود که میدان می‌تواند با اثر بر چرخه یاخته‌ای، به طور معنی‌داری منجر به افزایش یاخته‌های واقع در فاز G_2/M شود. از آنجا که یکی از گذرگاه‌های بازرسی DNA از دیدگاه آسیب‌های وارد شده به ژنوم، در پایان فاز G_2 قرار دارد این داده‌ها پیشنهاد می‌کنند که میدان با نگه داشتن یاخته در فاز ترمیم از میزان یاخته‌های آپوپتوتیک می‌کاهد.

از این رو افزون بر سازوکارهای پیشنهادی پیش‌تر گفته شده در سرطان‌زایی میدان، یک مکانیسم پیشنهادی دیگر، می‌تواند کمک به

بقای یاخته‌های آسیب دیده از طریق کاهش میزان آپوپتوزیس در بافت‌های آسیب دیده باشد. به بیان دیگر به نظر می‌رسد میدان مغناطیسی از طرفی با افزایش طول عمر رادیکال‌های آزاد، آسیب‌های وارد از عوامل ژنوتوکسیک^۱ را تشدید کرده و از سوی دیگر با اخلاص در روند آپوپتوزیس فرصت رشد و تکثیر را به یاخته‌های آسیب دیده می‌دهد. از این رو شاید میدان مغناطیسی نتواند در نقش یک عامل جهش‌زا^۲ عمل کند اما نقش‌های کمک جهش‌زای^۳ و کمک سرطان‌زای^۴ برای میدان‌های مغناطیسی دور از ذهن نیست.

¹ Genotoxic

² Mutagen

³ Co-mutagenic

⁴ Co-carcinogenic

REFERENCES

- Abdolmaleki P, Ghanati F, Sahebamei H, Sabet A. Peroxidase activity, lignification and promotion of cell death in tobacco cells exposed to static magnetic field. *The Environmentalist*. 2007;27:435–40.
- Barnes FS, Greenebaum B. Bioengineering and biophysical aspects of electromagnetic fields. Taylor & Francis Group. 2006.
- Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular immunology*. 2002;38:713–21.
- Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, et al. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx. *The FASEB journal*. 1999;13:95–102.
- Flipo D, Fournier M, Benquet C, Roux P, Le Boulaire C, Pinsky C, et al. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca²⁺, and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. *Journal of Toxicology & Environmental Health*. 1998;54:63–76.
- Givan AL. Flow cytometry; First principles. 2nd ed. New Jersey: John Willy & Sons, inc.; 2001.
- Goodman R, Chizmadzhev Y, Shirley-henderson A. Electromagnetic fields and cells. *Journal of cellular biochemistry*. 1993;44:436–41.
- Jajte J, Grzegorzczak J, Zmys M. Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry*. 2002;57:107–11.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al. *Molecular cell biology*. W. H. Freeman; 2007.
- Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2005;87:213–23.
- Sabet A, 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.
- Tenuzzo B, Chionna A, Panzarini E, Lanubile R, Tarantino P, Jeso B Di, et al. Biological effects of 6 mT static magnetic fields: A comparative study in different cell types. *Bioelectromagnetics*. 2006;27:560–77.
- Teodori L, Grabarek J, Smolewski P, Ghibelli L, Bergamaschi A, De Nicola M, et al. Exposure of cells to static magnetic field accelerated loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. *Cytometry*. 2002;(49):113–8.
- Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tarihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neuroscience Letters*. 2005;81–6.