مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال اول، شماره دوم، پاییز ۱۳۹۱ (۲۳-۱۷)

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

امیر ثابت[۱]، پرویز عبدالمالکی[۲]*، سید جواد مولا[۳]، فائزه قناتی[۴]

۱ و۲. دانشجوی دکتری گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳. عضو هیئت علمی گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۴، عضو هیئت علمی گروه علوم گیاهی، تهران دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۲۹، تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۹/۲۵)

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 آدمی‌همواره 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 نیم گری از پرتو ایکس، در معرض میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلایی 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 درصد 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.

واژه‌های کلیدی: میدان مغناطیسی ایستا، پرتو یونیزان، مرگ سلولی، فلوسایتومتری.

Studying the Effect of Static Magnetic Field on Induced Apoptosis in Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells of Rat

A. Sabet[1], P. Abdolmaleki[2]*, S. J. Mowla[3], F. Ghanati[4]

1, 2, Department of Biophysics, Faculty of Bioscience, Tarbiat Modares University, Tehran, 3, Department of Genetics, Faculty of Bioscience, Tarbiat Modares University, Tehran, 4, Department of Plant Biology, Faculty of Bioscience, Tarbiat Modares University, Tehran

(Received: Jul. 20, 2013; Accepted: Dec. 16, 2013)

Abstract

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.

Keywords: Static magnetic field, Ionizing radiation, cell death, Flow cytometry.

* نویسنده مسئول: پرویز عبدالمالکی E-mail: parviz@modares.ac.ir

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. پراکندگی و 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 آدمی‌همواره در تیررس میدان‌های الکتریکی، مغناطیسی و الکترومغناطیسی قرار دارد (Barnes *et 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 سال‌ها است که بر هم کنش این میدان‌ها با جانداران و بافت‌های زنده در دست بررسی است اما تاکنون سازوکارهای فیزیکی و بیوفیزیکی پذیرفتنی و فراگیری که توجیه‌کننده 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 متقاعدکننده علمی در دست نیست که روشن کند که میدان‌های مغناطیسی به ما زیان می‌رسانند یا نه (Tenuzzo *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 *et al*., 1993). اما به دلایل فنی و اخلاقی بیشتر بررسی‌های انجام شده در زمینه اثربخشی 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[1] و پراکندگی چرخه یاخته‌ای[2]، جهش‌زایی[3]، جابه‌جایی کروماتیدهای خواهری[4]، شکل‌گیری ریزهسته‌ها[5] و اثر بر بیان ژن[6]، 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 اثربخشی زیستی میدان‌ها، مورد توجه بوده است. مرگ و میر یاخته‌ها، از دو راه اصلی رخ می‌دهد. یکی نکروزیس[7] و دیگری آپوپتوزیس[8]. این دو مکانیسم، تفاوت‌هایی با هم دارند. آپوپتوزیس مرگ فیزیولوژیک سلولی است و طی تحریکات خاصی اتفاق می‌افتد، در حالی که نکروزیس مرگ پاتولوژیک سلول بوده و طی آسیب‌های شدید وارد شده به سلول از قبیل هیپوکسی، هیپوترمی و مواد سمی خارجی، رخ می‌دهد. همچنین نکروزیس فرایندی است غیرفعال که در نبود ATP انجام شدنی است اما آپوپتوزیس وابسته به صرف انرژی است. از دیدگاه ریخت‌شناختی نیز در آپوپتوزیس، سلول متراکم شده و کاهش حجم پیدا می‌کند، در حالی که در نکروزیس سلول 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 بافتی می‌ریزند. از این‌ها گذشته، وقوع نکروزیس در بافت‌ها به علت بیرون ریختن محتویات سیتوپلاسمی سلول منجر به پاسخ التهابی می‌شود، در حالی که در آپوپتوزیس هیچ پاسخ التهابی رخ نمی‌دهد (Lodish *et al*., 2007).

Flipo *et al*. (1998) دریافتند که میدان‌های مغناطیسی ایستای با شدّت‌های پایین در حدود سانتی‌تسلا، باعث افزایش غلظت کلسیم درون سلولی و کاهش پاسخ 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 *et al*., 1998). یک سال بعد فانلی و همکارانش از کاهش آپوپتوزیس القایی

[1] Cell proliferation
[2] Cell cycle distribution
[3] Mutation
[4] Sister chromatid exchanges
[5] Micronucleus formation
[6] Gene expression
[7] Necrosis
[8] Apoptosis

در یاخته‌های انسانی رده U937 و CEM در میدان‌های مغناطیسی ایستای با شدت کمتر و در حدود میلی‌تسلا خبر دادند (Fanelli *et al*., 1999).

در ادامه پژوهش‌ها، Jajte (2002) دریافت که اگرچه میدان مغناطیسی ایستای ۷ میلی‌تسلایی اثری بر میزان آپوپتوزیس در یاخته‌های لنفوسیت موش ندارد، اما همین میدان در حضور کلرید آهن، باعث افزایش شکست DNA شده و مرگ سلولی را چه از راه آپوپتوزیس و چه نکروزیس افزایش می‌دهد (Jajte, 2002). در همین سال تئودوری، تبدیل آپوپتوزیس به نکروزیس ثانویه را در یاخته‌های HL-60 که در آن‌ها آپوپتوزیس القایی با کامپتوتسین[1] رخ داده در میدان مغناطیسی ایستای ۶ میلی‌تسلایی گزارش کرد. اگرچه این شدت از میدان، به تنهایی و در بازه زمانی ۵ ساعته اثری بر میزان آپوپتوزیس در این سلول‌ها نداشت (Teodori *et al*., 2002).

گرچه تاکنون مکانیسم‌های بسیاری در اثربخشی 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 آپوپتوزیس یاخته‌ها به طور خاص اشاره کرد که هر دو می‌توانند نقش مهمی‌در حرکت سلول به سوی سرطانی شدن بازی کنند. در این تحقیق، اثر میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلایی بر مرگ و میر یاخته‌ها در بازه زمانی ۲۴ ساعته سنجیده شده است. در همین راستا برای القای آپوپتوزیس و بالا رفتن آمار سلول‌های مرده و سنجیدن اثر میدان بر این فرایند، آپوپتوزیس با تاباندن پرتو یونیزان بر یاخته‌ها القاء شده است.

مواد و روش‌ها

کشت یاخته‌های بنیادی

برای جداسازی یاخته‌های بنیادی از مغز استخوان، موش‌های صحرائی 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[2] سرد گذاشته شد. دو سر سر استخوان‌ها با کمک قیچی استخوان بر بریده شده و سرسرنگ در یکی از دو سوی استخوان فروبرده شد. سپس با تزریق ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آلفامم[3] (گیبکو، اینویتروژن، آمریکا) به فضای درونی استخوان، محتویات داخلی در فلاسک کشت یاخته (ارنج، بلژیک) تخلیه شد (Yaghoobi *et al*., 2005). در ادامه محیط کشت با غلظت ۲۰٪ سرم جنین گاوی (گیبکو، اینویتروژن، آمریکا) به فلاسک کشت افزوده شده، فلاسک به انکوباتور کشت یاخته با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و هوای نمناک دارای ۵٪ CO_2 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 *et al*., 2010).

دستگاه زاینده میدان مغناطیسی ایستا

دستگاه زاینده میدان مغناطیسی ایستا، طرّاحی 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 میلی تسلا (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 بازوهایی 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 شده اند، به کار رفته است. این لایه‌های دیامغناطیسی برای جلوگیری از پدید آمدن جریان‌های گردابی است که از کارایی دستگاه می‌کاهد. پیش از تیمار نمونه‌ها بهتر است دستگاه را با تسلامتر کالیبره کرد. از آن جا که جریان بالای الکتریسیته با گرمازایی 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 *et al*., 2007).

[1] Camptothecin
[2] Phosphate Buffered Saline (PBS)
[3] Alpha-MEM (Minimum Essential Medium)

تیمار یاخته‌های کشت شده با میدان مغناطیسی

یاخته‌های 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 به‌کارگیری در آزمون‌های گوناگون سلولی مناسب‌تر بود (Sabet *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 میدان‌مغناطیسی. 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 شدّت 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 آلومینیومی۲/۵ میلی‌متری، تابش نیم گری از پرتو ایکس سخت به نمونه‌ها را در پی داشت.

تثبیت و رنگ‌آمیزی یاخته‌ها

فلاسک‌های سلولی که هر کدام در حدود یک میلیون سلول داشتند پس از تیمار، بی درنگ 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 به‌کارگیری 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, 2001). برای آنالیز یاخته‌ها با روش فلوسایتومتری لازم است تعداد سلول‌ها دست کم یک میلیون و کاملاً به صورت تک تک باشند؛ به این معنی که هیچکدام به هم نچسبیده باشند. در صورت وجود سلول‌های دوتایی یا سه تایی و یا اجتماعات بزرگ‌تر از سلول‌ها 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 سلول‌هایی که دچار آپوپتوزیس شده‌اند خللی ایجاد کند.

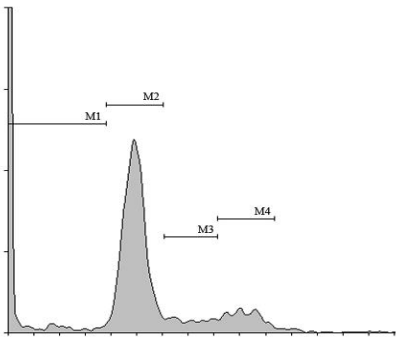
یاخته‌های استرومای مغز استخوان از دید کشت یاخته‌ای، در رده یاخته‌های چسبان قرار می‌گیرند. برای به‌کارگیری روش فلوسایتومتری در این گونه یاخته‌ها، نخست می‌بایست آن‌ها را از کف فلاسک دارای محیط کشت جدا کرد و آنگاه با پیپتاژ شدید با کمترین آسیب به یاخته‌ها آنها را به صورت تک در آورد. یاخته‌های رنگ آمیزی شده برای آنالیز به درون کووت‌های ویژه‌ای ریخته شده، درون دستگاه جای می‌گیرند.

آپوپتوزیس یک فرایند 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[1] (PI) با اتصال به DNA می‌تواند طول آن را نشان دهد، از این رو فلوسایتومتری معیار مناسبی برای پی بردن به درصد سلول‌های 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 سلول‌هایی را که دچار آپوپتوزیس شده‌اند و بالطبع دارای DNAهای کوتاه‌تری هستند را شمارش

[1] Propidium Iodide

می‌کند. داده‌های به‌دست آمده از دستگاه فلوسایتومتر خام بوده و برای بازیابی داده‌ها، نرم‌افزارهای ویژه‌ای همچون نرم‌افزار WIN-MDI به کار می‌رود (Sabet *et al*., 2010).

در این تحقیق، با به‌کارگیری PI و دستگاه فلوسایتومتر بکتون–دیکینسون (فرانکلین، آمریکا) محتوای DNA سلولی سنجیده شد و از روی این محتوا، شمار یاخته‌های آپوپتوتیک از جمع ۱۰۰۰۰ سلول شمارش شده به دست آمد. برای این کار همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، به کمک نمودار هیستوگرامی‌که محتوای DNA سلول‌ها را نمایش می‌دهد، می‌توان یاخته‌های با DNA کوتاه‌تر را جدا کرد و آن را معیاری از سلول‌های مرده در نظر گرفت. افزون بر این، شمار یاخته‌های موجود در هر یک از فازهای چرخه سلول نیز با به کار گرفتن این هیستوگرام، به دست می‌آید؛ بدین ترتیب که سطحی از نمودار که در ناحیه M1 قرار گرفته است، نشان‌دهنده یاخته‌های با DNA رده رده 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 سلولی علیه مؤلفه FL2-A نشان‌دهنده درصد آپوپتوزیس و فازهای چرخه سلولی

آنالیز آماری

همه آزمون‌ها با سه بار تکرار به انجام رسید و داده‌های گزارش شده، نشان‌دهنده میانگین این سه با افزایش و کاهش انحراف معیار است. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار 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 باارزش انگاشته شدند.

نتایج

در این بررسی شمار یاخته‌هایی که دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوزیس شده بودند، سنجیده شد. به منظور بررسی اثر میدان مغناطیسی بر میزان آپوپتوزیس و آپوپتوزیس القایی، فلاسک‌های محتوی یاخته، به چهار دسته دوتایی مطابق جدول ۱ 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 نیم گری پرتو یونیزان و فلاسک‌های دسته چهارم نخست در یک ثانیه تایش حاد نیم گری 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 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 ۲ آمده است.

جدول ۱. دسته‌بندی سلول‌های بنیادی برای تیمار با میدان مغناطیسی ایستا و پرتو یونیزان در بازه‌های زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعته

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

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

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

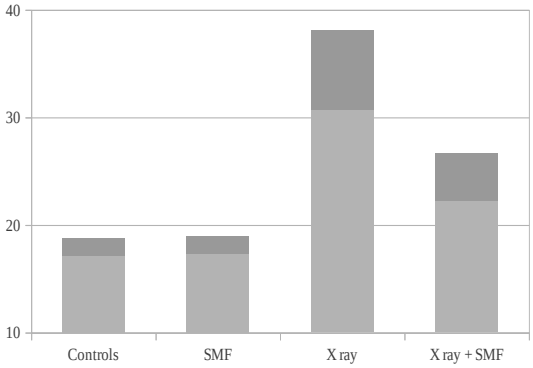
سطح معنی‌داری بسیار پایین و غیرمعنی‌دار بود. از سوی دیگر، پرتو یونیزان آشکارا و به طور معنی‌دار در هر دو بازه ۱۲ و ۲۴ ساعته، به افزایش آپوپتوزیس در یاخته‌ها انجامید که البته قابل پیش‌بینی بود. آنچه در این میان از مقایسه دسته‌های سوم و چهارم فلاسک‌ها دیده می‌شود، اثر میدان مغناطیسی در کاهش درصد آپوپتوزیس القایی از پرتو ایکس می‌باشد. این اثر کاهندگی یا توقف فرایند 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

سلول‌های بنیادی سرچشمه بسیاری از رده‌های سلولی از جمله یاخته‌های خونی و بسیاری از سلول‌های 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 سلول‌ها و توانایی آنها در تبدیل به دیگر رده‌ها و تقسیم‌های بی‌شمار و پی در پی، بررسی روند سرطان‌زایی در چنین یاخته‌هایی می‌تواند در پیشگیری و درمان برخی دیگر از سرطان‌ها سودمند باشد. همچنین به دلیل تقسیم‌های متوالی، این‌گونه از سلول‌ها نسبت به عوامل جهش‌زا و سمی، حساسیت بالایی دارند و با توجه به آسانی جداسازی آن‌ها از بافت مغز استخوان، هدف مناسبی برای پژوهش‌های سلولی به شمار می‌آیند.

در این تحقیق، اثرمیدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلایی بر فرایند آپوپتوزیس بررسی شد. همان‌گونه که آسیب به ژنوم می‌تواند منجر به سرطانی شدن یاخته شود، هرگونه تغییر در میزان آپوپتوزیس 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 تعدیل آپوپتوزیس، دارای نقش‌های کلیدی هستند (Ermak and Davies, 2001).

چنان‌که در شکل ۲ دیده می‌شود، میدان مغناطیسی ایستا اگرچه بر میزان آپوپتوزیس یاخته‌ها اثر معنی‌داری نداشت اما پس از القای آپوپتوزیس به سلول‌ها با تابش حاد پرتو یونیزان، به‌طور معنی‌داری از میزان آپوپتوزیس در ۲۴ ساعت نخست، کاست. در نمودار داده شده، 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. 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 *et al.*, 2010) که همین شدت از میدان مغناطیسی ایستا به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان وارد شد، دیده شده بود که میدان می‌تواند با اثر بر چرخه سلولی، به طور معنی‌داری منجر به افزایش سلول‌های 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 وجود دارد این داده‌ها پیشنهاد می‌کنند که میدان با نگه‌داشتن یاخته در فاز ترمیم از میزان سلول‌های آپوپتوتیک می‌کاهد.



شکل ۲. نمودار درصد یاخته‌های آپوپتوتیک 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.

از این رو افزون بر سازوکارهای پیشنهادی پیش‌تر گفته شده در سرطان‌زایی میدان، یک مکانیسم پیشنهادی دیگر، می‌تواند کمک به بقای سلول‌های 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[1] را تشدید کرده و از سوی دیگر با اخلال 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[2] عمل کند اما نقش‌های کمک جهش‌زایی[3] و کمک سرطان‌زایی[4] برای میدان‌های مغناطیسی دور از ذهن نیست.

[1] Genotoxic
[2] Mutagen
[3] Co-mutagenic
[4] Co-carcinogenic

REFERENCES

Abdolmaleki P, Ghanati F, Sahebjamei H, Sabet A (2007) Peroxidase activity, lignification and promotion of cell death in tobacco cells exposed to static magnetic field. The Environmentalist [Internet]. 2007 Jun 28 [cited 2013 Jun 9]; 27(4): 435–40. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10669-007-9080-1

Barnes FS, Greenebaum B (2006) Bioengineering and biophysical aspects of electromagnetic fields. Taylor & Francis Group.

Ermak G, Davies KJA (2002) Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. Molecular immunology, 38(2001): 713–21.

Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, et al. (1999) Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca^{2+} influx. The FASEB Journal, 13:95–102.

Flipo D, Fournier M, Benquet C, Roux P, Le Boulaire C, Pinsky C, et al. (1998) Increased apoptosis, changes in intracellular Ca^{2+}, and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. Journal of Toxicology & Environmental Health, (54): 63–76.

Givan AL (2001) Flow cytometry; First principles. 2nd ed. New Jersey: John Willy & Sons, inc.

Goodman R, Chizmadzhev Y, Shirley-henderson A (1993) Electromagnetic fields and cells. Journal of cellular biochemistry, 441: 436–41.

Jajte J, Grzegorczyk J, Zmys M (2002) Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes. Bioelectrochemistry, 57:107–11.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscer A, et al. (2007) Molecular cell biology. W. H. Freeman.

Miyakoshi J (2005) Effects of static magnetic fields at the cellular level. Progress in biophysics and molecular biology, 87: 213–23.

Sabet A, Abdolmaleki P, Mowla SJ, Ghanati F, Heshmati E, Tavasoli Z, et al. (2010) Static magnetic fields aggravate the effects of ionizing radiation on cell cycle progression in bone marrow stem cells. Micron [Internet]. 2010 Feb [cited 2013 Jun 9]; 41(2): 101–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926297

Tenuzzo B, Chionna A, Panzarini E, Lanubile R, Tarantino P, Jeso B Di, et al. (2006) Biological effects of 6 mT static magnetic fields: A comparative study in different cell types. Bioelectromagnetics, 27(May): 560–77.

Teodori L, Grabarek J, Smolewski P, Ghibelli L, Bergamaschi A, De Nicola M, et al. (2002) Exposure of cells to static magnetic field accelerated loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. Cytometry, (49): 113–8.

Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tarihi T (2005) Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. Neuroscience Letters, 81–6.