

بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا بر پیشبرد چرخه سلولی در یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

امیر ثابت سروستانی^۱، پرویز عبدالمالکی^{۲*}، سیدجواد مولی^۳، فائزه قناتی^۴، زینب توسلی^۱، عمران حشمتی^۱

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۲۲

چکیده

هدف: میدان‌های مغناطیسی از پدیده‌هایی است که امروزه همه جا در محیط پیرامون ما یافت می‌شود. سیم‌های فشار قوی، دستگاه‌های الکتریکی که در خانه‌ها و محیط کار فراوان یافت می‌شوند، وسایل ترابری مانند قطارهای شهری و همچنین دستگاه‌های گوناگون تشخیصی و درمانی همچون MRI زاینده میدان‌های مغناطیسی پیرامون ما هستند. میدان‌های مغناطیسی می‌توانند اثرهای گوناگونی بر جانداران از سطح سلول تا پیکره گیاهان، جانوران و آدمی بگذارند. در بررسی‌های اپیدمیولوژیک اثر این میدان‌ها در بالا رفتن میزان بروز برخی از سرطان‌ها همچون سرطان خون به‌خوبی نشان داده شده است. در آزمایش‌های گوناگون دانشمندان کوشیده‌اند تا به ساز و کار این اثرهای زیستی پی ببرند؛ اما داده‌های به‌دست آمده بسیار ناهماهنگ و گستره انجام این بررسی‌ها چه از دیدگاه فیزیکی (بزرگی میدان، بسامد، زمان میدان‌دهی و ...) و چه از دیدگاه زیستی (گونه یاخته، میزان تمایز و ...) پراکنده است. گرچه این پژوهش‌ها در یاخته‌های کشت شده در بیرون از بدن جاندار به انجام رسیده است، می‌تواند شاهدی بر فرایندهای طبیعی یاخته در بدن نیز باشد. در این تحقیق هدف دستیابی به نتایجی است که بر پایه آن‌ها بتوان به درک بهتری از ساز و کار تأثیر میدان بر جانداران در سطح سلولی دست یافت.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، اثرهای زیستی میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلا روی یاخته‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان موش صحرایی سنجیده شد. برای این کار روش فلوسایتومتری با فلوروکروم پرویدیم دید به‌کار گرفته شد که با تشخیص محتوای DNA یاخته‌ها معیاری برای پی بردن به مرحله‌ای که سلول در آن به سر می‌برد را به‌دست می‌دهد. میدان مغناطیسی به‌کار گرفته شده حاصل از عبور جریان ۱۲ آمپری از سیم‌پیچ‌ها با بزرگی ۱۵ میلی‌تسلا اعمال شد.

نتایج: با آنالیز چرخه یاخته‌ای دگرگونی‌هایی در مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای دیده شد؛ به‌گونه‌ای که شمار یاخته‌هایی که در مرحله G0/G1 بودند افزایش معنی‌داری نشان داد. این افزایش شمار یاخته‌ای به دلیل افزایش در طول مرحله G0/G1 چرخه بوده است. همچنین این اثر در یاخته‌هایی که پیش از تیمار مغناطیسی در معرض پراکسید هیدروژن که از دسته مواد شیمیایی اکسنده است، قرار گرفته بودند اثر مشابهی را نشان داد. در مرحله S از چرخه نیز در شمار یاخته‌های دو گروه از تیمار کاهش مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این پدیده می‌تواند در اثر آسیب ماده ژنتیکی یاخته یا اختلال در کارکرد پروتئین‌های چرخه یاخته‌ای باشد که هر دو فرایند می‌تواند آغازی بر ناهنجاری در فرایندهای طبیعی یاخته باشد. از آن‌جا که انرژی این

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه بیوفیزیک، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵

میدان‌ها در حدی نیست که بتواند به‌طور مستقیم بر مولکول‌ها اثر گذار باشد، فرایندهای غیرمستقیم با واسطه‌های رادیکالی محتمل‌ترین مکانیسم به‌شمار می‌آید.

کلیدواژگان: یاخته‌های بنیادی مزانشیمی، میدان مغناطیسی ایستا، چرخه یاخته‌ای

۱- مقدمه

نخستین نشانه از واکنش مستقیم میان میدان‌های مغناطیسی و جهان زنده در سال ۱۹۸۰، با شناسایی باکتری‌های مگنتوتاکتیک (Magnetotactic bacteria) به‌دست آمد. این تک یاخته‌های بی‌هوازی دارای زنجیره‌ای از بلورهای مگنتیت (Magnetite crystal) (Fe_3O_4) هستند [۱-۳]. مگنتیت در یاخته‌های گوناگون از خزّه گرفته تا زنبورها و پرنده‌ها دیده می‌شود. پاسخ به میدان‌های الکترومغناطیسی در مغز انسان و دیگر ریزاندام‌ها نیز دیده شده است [۴].

در فرایندهای سوخت و ساز یاخته‌ها، همواره رادیکال‌های آزاد به‌میان می‌آیند که گرچه دارای نیمه عمر کوتاهی هستند، نقش بزرگی در این فرایندها بازی می‌کنند. این رادیکال‌ها با حمله به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به آن‌ها آسیب می‌رسانند. بر پایه بررسی‌های گذشته میدان‌های مغناطیسی بیش از یک میلی‌تسلا بر واکنش‌های شیمیایی که میانجی‌های رادیکالی دارند اثرگذار هستند. میدان‌های مغناطیسی با شکافت زیمان (Zeeman effect)، دگرگونی‌هایی در ترازهای انرژی الکترون‌ها پدید می‌آورند؛ پس با پیدایش حالت سه‌گانه (Triplet) (جفت رادیکالی که در میدان مغناطیسی بیرونی ترازهای انرژی به سه زیرتراز انرژی تفکیک می‌شود) در میدان مغناطیسی بیرونی بیشتر رادیکال‌ها از هم دور می‌شوند و بیش از پیش با مولکول‌های زیستی واکنش می‌دهند. از آن‌جا که برای پیدایش پیوند به یک جفت رادیکال یگانه (Singlet) (جفت رادیکالی که در میدان مغناطیسی بیرونی ترازهای انرژی تفکیک نمی‌شود) نیاز است، بزرگ‌ترین اثر میدان مغناطیسی، برداشتن هم‌ترازی میان جفت رادیکال‌های سه‌گانه است [۳]. گفتنی است از آن‌جا که انرژی میدان‌های مغناطیسی آزموده شده در این بررسی نمی‌تواند پیوندهای شیمیایی را بشکند، بنابراین هیچ همانندی میان آسیب‌های

زیستی پرتوهای یون‌ساز و این گونه میدان‌ها نیست [۳]. پیامدهای زیستی میدان‌های مغناطیسی از دیدگاه‌های گوناگونی بررسی شده است؛ با این حال تاکنون هیچ سند متقاعد کننده علمی در دست نیست که روشن کند که میدان‌های مغناطیسی به ما زیان می‌رسانند یا نه. هدف از انجام این تحقیق مطالعه اثر میدان مغناطیسی ایستا (Static magnetic field) بر تغییر طول مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای است، چرا که هر گونه اثر استرسی وارد بر سلول یا تغییر در سینتیک واکنش‌های ساخت و ترمیم یاخته‌ای می‌تواند در چرخه یاخته‌ای نمود پیدا کند.

بوئمی (Buemi) و همکارانش (۲۰۰۱) اثرهای میدان مغناطیسی ایستای ۰/۵ میلی‌تسلا را بر رشد و مرگ و میر یاخته‌های کلیوی (VERO) و بافت ستاره‌ای قشری موش صحرایی بررسی کرده و نشان دادند که اثرهای میدان مغناطیسی در رده‌های گوناگون یاخته‌ای یکسان نیست [۵].

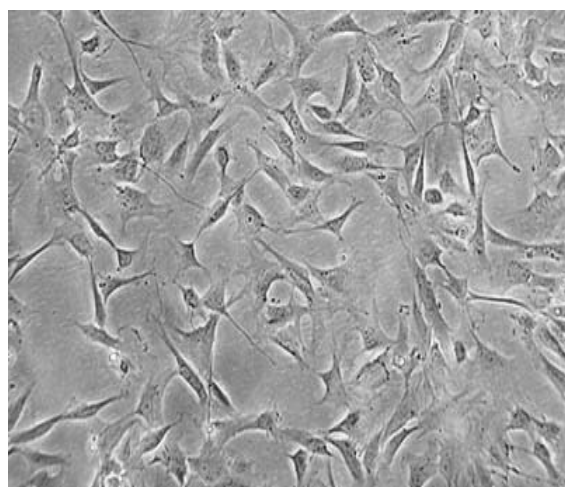
ژانگ (Zhang) و همکارانش (۲۰۰۳) اثرهای جهش‌زایی میدان‌های مغناطیسی ایستای قوی را بر یاخته‌های اشرشیاکلی سنجیدند. جهش‌یافته‌های گوناگون اشرشیاکلی به‌مدت ۲۴ ساعت در میدان‌های ۹ تسلا قرار گرفتند. میزان جهش در جهش‌یافته‌های sodAsodB و soxR که در مکانیسم‌های دفاعی در برابر فشار اکسیداتیو کاستی داشتند به‌طور قابل توجهی افزایش یافت [۶].

ناکاهارا (Nakahara) و همکارانش (۲۰۰۲) در یاخته‌های تخمدان همستر چینی CHO-K1 که برای بیش از ۴ روز در میدان ۱۰ تسلا قرار داشتند تغییری در میزان رشد یاخته و توزیع چرخه یاخته‌ای نیافتند؛ ولی میدان ۱۰ تسلا افزایش معنی‌داری را در تعداد ریزهسته‌های یاخته‌های پرتو گرفته نشان داد [۷].

زمیسولونی (Zmyslony) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با به‌کارگیری روش سنجش کامت، دریافتند هنگامی که یاخته‌های در محیط کشت دارای $FeCl_2$ همزمان در میدان مغناطیسی ۷

موش‌ها را با کلروفرم (Merck، آلمان) بی‌هوش کرده، اندام‌های پایینی را تشریح و استخوان‌های ران و ساق را بیرون آورده در پتری‌دیش دارای PBS (Phosphate Buffered Saline) سرد گذاشته شد. دو سر استخوان‌ها با کمک قیچی استخوان‌بر برش و سر سرنگ در یکی از دو سوی استخوان فرورده شده همراه با فشار، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت α -MEM (Invitrogen، آمریکا) به داخل مغز استخوان، در فلاسک کشت یاخته (Orange، بلژیک) تخلیه شد. سپس محیط کشت با غلظت ۲۰٪ سرم جنین گاوی (Invitrogen، آمریکا) به فلاسک کشت افزوده شده، فلاسک به انکوباتور کشت یاخته با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای نمناک دارای ۵ درصد CO_2 برده شد.

یاخته‌های جدا شده، در همین شرایط کشت نگهداری شده و هر روز برای بررسی رشد و بررسی آلودگی احتمالی در زیر میکروسکوپ وارون (Invert microscope) دیده شدند (شکل ۱).



شکل ۱. یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

محیط کشت یاخته‌ها نیز در هر دو تا سه روز با محیط تازه دارای ۲۰ درصد سرم جنین گاوی جایگزین شد. یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در واکنش‌های (Subculture) نخستین، رشد بسیار خوبی دارند و در محیط کشت دارای ۲۰ درصد سرم، هر چهار تا پنج روز یک‌بار نیاز به واکنش دارند.

۲-۲- دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا

دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا، طراحی و ساخته شده در گروه بیوفیزیک دانشگاه تربیت مدرس، با توان یک کیلووات و

میلی‌تسلاپی قرار گرفتند، تعداد یاخته‌های آسیب‌دیده بیش از ۲۰ درصد افزایش یافت [۸].

هیروس (Hirose) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ افزایش معنی‌داری را در بیان ژن پروتئین c-Jun در یاخته‌های HL-60 که برای ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت در میدان ۶ تسلا با گرادیان ۴۱/۷ تسلا بر متر بودند، یافتند. این یافته‌ها به ما پیشنهاد می‌کند که اثر این میدان‌های قوی بر یاخته از مسیرهایی است که بیان پروتئین c-Jun در آن بالا است [۹].

تودوری (Teodori) و همکارانش در سال ۲۰۰۲، یاخته‌های HL-60 را برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ۶ میلی‌تسلاپی گذاشتند. این میدان مغناطیسی ایستا هیچ‌گونه اثری بر مرگ برنامه‌ریزی شده یاخته (Apoptosis) و نکروزیس (Necrosis) نداشت اما در کنار کمپوتوسین (Camptothecin)، تندی رفتن یاخته از نکروز پسین به مرگ برنامه‌ریزی شده، افزایش داشت [۱۰].

جاجته (Jajte) و همکارانش افزایشی را در شمار آسیب‌های DNA یاخته‌های لنفوسیت خونی که همزمان در کلرید آهن II و میدان مغناطیسی ایستای ۷ میلی‌تسلاپی بودند، یافتند که این آسیب شاید به مرگ برنامه‌ریزی شده یا نکروزیس این یاخته‌ها بینجامد. در حالی که هیچ‌کدام از این دو تیمار به‌تنهایی بر یاخته‌های خونی اثرگذار نبوده است [۱۱]. فلیپو (Flipo) [۱۲] و فانلی (Fanelli) نیز آثار مشابهی بر تغییر میزان مرگ برنامه‌ریزی شده یاخته، یافتند [۱۳].

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا در چرخه سلولی است و برای این منظور سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به‌عنوان هدف بیولوژیک در نظر گرفته شده است. مطالعه چگونگی تغییرات ایجاد شده کمک مؤثری به ما در شناخت خصوصیات فیزیکی سلول‌های بنیادی می‌نماید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت یاخته‌های بنیادی

موش‌های صحرایی جوان (۱-۳ ماه) از مؤسسه تحقیقاتی رازی (karaj، ایران) خریداری و در شرایط مناسب نگهداری شدند. برای جداسازی یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، ابتدا

از آخرین جایگزینی محیط کشت آن‌ها گذشته بود تا همه در یک مرحله رشد باشند. فلاسک‌ها در هنگام تیمار نزدیک به یک میلیون یاخته داشتند و این اندازه یاخته برای آزمون‌های گوناگون چرخه یاخته‌ای بسیار مناسب است.

فلاسک‌ها برای تیمار با میدان به دو دسته تقسیم شدند. یک دسته فلاسک‌هایی که تنها دارای یاخته بود و دسته دیگر فلاسک‌هایی که در هنگام تیمار با میدان دارای ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن بودند. همان‌گونه که در بخش آنالیز آماری گفته شد، هر یک از تیمارها دارای سه تکرار بود. از آن‌جا که یاخته‌های بنیادی بایستی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد CO₂ نگهداری شوند، محدودیت زمانی در زمان میدان‌دهی وجود داشت. از این رو تیمار یاخته‌ها با میدان مغناطیسی ایستایی با بزرگی ۱۵ میلی‌تسلا برای مدت ۵ ساعت پیوسته انجام شد چرا که میزان تغییرات CO₂ در این بازه زمانی و بازه‌های زمانی کوتاه‌تر، قابل چشم‌پوشی است.

بیشینه جریان‌گذری ۵۰ آمپر، می‌تواند میدان مغناطیسی تا ۵۰ میلی‌تسلا (با شدت بهینه ۲۵ میلی‌تسلا) را پدید آورد. یک ترانس که چشمه جریان الکتریسیته است نیز در کنار این دستگاه به‌کار 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 (شکل ۲).



شکل ۲ دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا

۲-۴- آنالیز یاخته‌های رنگ‌آمیزی شده به کمک

دستگاه فلوسایتومتر (Flocytometry)

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 به‌دست آمده در این روش نشان‌دهنده اندازه نسبی یاخته‌ها، گرانولیتی نسبی یا میزان پیچیدگی درونی یاخته‌ها و میزان نسبی فلورسانس است [۱۴].

یاخته‌های خونی از بهترین نمونه‌ها برای به‌کارگیری در فلوسایتومتری است؛ چرا که آن‌ها خود یاخته‌هایی تک تک بوده و به آسانی سوسپانسیون می‌دهند؛ اما یاخته‌های استرومای مغز استخوان از دید کشت یاخته‌ای، در رده یاخته‌های چسبان قرار می‌گیرند. برای به‌کارگیری روش فلوسایتومتری در این گونه یاخته‌ها، نخست باید آن‌ها را از کف فلاسک دارای محیط کشت جدا کرد و آن‌گاه با پیپتاژ شدید با کمترین آسیب به یاخته‌ها آن‌ها را به‌صورت تک در آورد. با این همه باز هم یاخته‌های به‌هم چسبیده و همچنین یاخته‌هایی که در طول

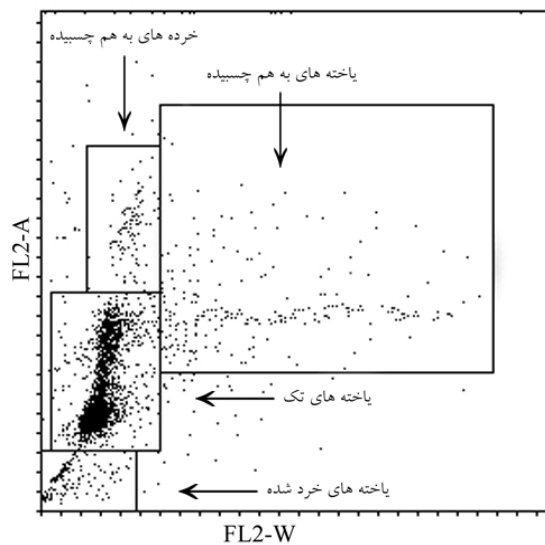
برای بهبود میدان برگه‌های فرومغناطیسی آهنی که با لایه‌های دیامغناطیسی جدا شده‌اند، به‌کار رفته است. این لایه‌های دیامغناطیسی برای جلوگیری از پدید آمدن جریان‌های گردابی است که از کارایی دستگاه می‌کاهد. بهتر است پیش از تیمار نمونه‌ها، دستگاه با تسلا متر کالیبره شود.

از آن‌جا که جریان بالای الکتریسیته با گرمایی دما را در دستگاه بالا می‌برد، لوله‌هایی مسی پیرامون سیم پیچ‌ها پیچانده شده است تا با گذشتن آب از درون آن‌ها از افزایش دما جلوگیری شود.

۲-۳- تیمار یاخته‌های کشت شده با میدان مغناطیسی

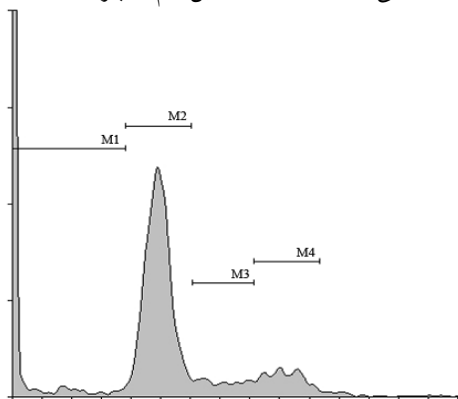
یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، پس از چندبار واکشت و به‌دست آمدن فلاسک‌های پر از یاخته برای تیمار با میدان مغناطیسی آماده‌اند. محیط کشت تازه ۴۸ ساعت پس از هر واکشت جایگزین محیط پیشین و دوباره ۴۸ ساعت پس از جایگزینی محیط تازه، واکشت دوباره انجام شد. برای تیمار یاخته‌ها فلاسک‌هایی به‌کار رفت که ۲۴ ساعت

سطح علامت نمایش دهد، دور ریخت (شکل ۳) [۱۶].



شکل ۳ جدا کردن یاخته های تک از دیگر یاخته ها و اجزا یاخته ای

برای نمایش شمار یاخته ها در مراحل گوناگون چرخه یاخته ای باید هیستوگرام علامت FL2-A نسبت به شمار یاخته ها را کشید (شکل ۴). در این نمودار دو قله دارد. از آنجا که بیشتر یاخته ها در مراحل G0 و G1 هستند پس قله نخست که بیشینه ای را در شمار یاخته ها نشان می دهد، نشان دهنده همین گام از چرخه است.



شکل ۴ تعیین مراحل گوناگون یاخته ای با کمک هیستوگرام محتوای DNA

قله دوم که کوتاه تر از قله پیشین است، یاخته هایی را که در مراحل G2 و M هستند نمایش می دهد. بازه ای از نمودار که در میان این دو جای می گیرد نشان دهنده مرحله S و بازه ای که پیش از قله نخست جای دارد، نشان دهنده یاخته هایی است که دچار مرگ برنامه ریزی شده یا نکروزیس شده اند [۱۵]. گفتنی است در بسیاری از کارهای پیشین که از این روش بهره برده اند، نامی از نکروزیس در این جا برده

مراحل گوناگون تیمار خرد شده اند، در نمونه موجود است که باید پیش از تفسیر هیستوگرام های محتوای DNA یاخته ای، از دیگر یاخته ها جدا شده و کنار گذاشته شوند [۱۵]. یاخته های رنگ آمیزی شده برای آنالیز به درون کووت های ویژه ای ریخته شده، درون دستگاه جای می گیرند. دستگاه فلوسایتومتر بر پایه اندازه نور فلورسانسی که از هر یاخته بازتاب می شود، با سنجش DNA یاخته که نمایان کننده هر کدام از مراحل چرخه سلولی است، یاخته هایی را که در هر یک از گام های گوناگون چرخه هستند، شمارش می کند. داده های به دست آمده از دستگاه فلوسایتومتر خام بوده و برای بازیابی داده ها، نرم افزارهای ویژه ای همچون نرم افزار WIN-MDI به کار می رود که می تواند داده هایی همچون شمار یاخته ها در مراحل گوناگون را از دل داده های خام نخستین دستگاه بیرون آورد.

با دانستن طول چرخه یاخته ای یا همان بازه زمانی میان دو میتوز و نسبت یاخته هایی که در مرحله ای از این چرخه هستند به همه یاخته ها، می توان طول هر یک از این مراحل را به دست آورد. برای نمونه، معادله روبه رو طول مرحله S را به دست می دهد:

$$T_s = \frac{T_c \times \ln(f_s + 1)}{\ln 2}$$

که در آن T_c طول چرخه یاخته ای و f_c نسبت شمار یاخته هایی

که در مرحله S از این چرخه هستند به همه یاخته ها است [۱۵].

در این تحقیق، با به کارگیری فلوروکروم پروپیدیوم یدید (fluorocromes Propidium Iodide: PI) و دستگاه فلوسایتومتر بکتون- دیکینسون (Becton-Dickinson) (Franklin، آمریکا) محتوای DNA سلولی سنجیده شد و از روی این محتوا شمار یاخته ها در مراحل گوناگون به دست آمد که معیاری برای پی بردن به طول چرخه یاخته ای و تغییرات آن است.

در نمونه ای که برای آنالیز درون کووت دستگاه ریخته می شود، انواع یاخته ها یافت می شود؛ یاخته های تک تک، به هم چسبیده، خرد شده و همچنین یاخته های خرد شده ای که اکنون به هم چسبیده اند و ما را در گردآوری داده های پایانی گمراه می کنند. این یاخته های نامطلوب را نمی توان از یاخته های تک تک درون کووت سوا کرد؛ اما پس از گرفتن داده ها، می توان پیش از بررسی هیستوگرام ها، آن ها را از داده های خام به کمک نموداری در بخش Dot plot نرم افزار که پهنای فلورسانس FL2 را نسبت به

جدول ۱ دسته‌بندی یاخته‌های بنیادی برای تیمار با پراکسید هیدروژن و میدان مغناطیسی

زمان	میدان مغناطیسی	پراکسید هیدروژن	گروه‌های آزمایشی
۵ ساعت	-	-	C
۵ ساعت	۱۵ میلی‌تسلا	-	CB
۵ ساعت	-	۱۰۰ میکرومولار	H
۵ ساعت	۱۵ میلی‌تسلا	۱۰۰ میکرومولار	HB

فلاسک‌های یاخته‌ای که هر کدام بیش از یک میلیون یاخته داشتند، برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلائی جای گرفتند. این یاخته‌ها پس از میدان‌گیری، بی‌درنگ از فلاسک‌ها جدا و پس از سانتریفوژ در یک بخش محلول بافر فسفات و چهار بخش الکل ۷۰ درجه تثبیت و پس از ۲۴ ساعت رنگ‌آمیزی و در دستگاه فلوسایتومتر بکتون-دیکنسون ارزیابی شدند. از هر کووت درست ۱۰۰۰۰ یاخته شمرده می‌شود که اندکی از آن‌ها، یاخته‌های به‌هم چسبیده و اندکی یاخته‌های خرد شده و گاه خرده یاخته‌های به‌هم چسبیده هستند. در ارزیابی داده‌ها تنها یاخته‌هایی که تک‌تک هستند جدا شدند. براساس هیستوگرام‌هایی حاصل از یاخته‌های جدا شده تکی، شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون به‌دست می‌آید. پس از به انجام رسیدن کارهای گفته شده روی یکایک فلاسک‌ها و تیمار یاخته‌ها با سه تکرار، شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون به‌دست آمد. جدول ۲ داده‌هایی که نشان‌دهنده درصد یاخته‌ها در این مراحل است را نشان می‌دهد.

جدول ۲ درصد یاخته‌های بنیادی مغز استخوان در مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای پس از تیمار با پراکسید هیدروژن و میدان مغناطیسی؛ حروف گوناگون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در داده‌های مربوطه است.

G2/M	S	G0/G1	گروه‌های آزمایشی
۱۲/۸۸ ± ۰/۰۶ ^a	۹/۰۶ ± ۰/۸۵ ^a	۷۶/۹۰ ± ۰/۸۵ ^a	C
۱۱/۰۴ ± ۰/۹۵ ^b	۸/۵۹ ± ۱/۰۷ ^a	۷۹/۱۲ ± ۱/۵۱ ^b	CB
۱۲/۳۸ ± ۰/۱۵ ^c	۱۰/۳۹ ± ۰/۵۹ ^b	۷۵/۹۶ ± ۰/۲۳ ^c	H
۱۲/۴۱ ± ۰/۸۰ ^{ac}	۸/۷۳ ± ۰/۶۷ ^{ac}	۷۷/۹۵ ± ۱/۱۸ ^{ab}	HB

در شکل ۵ برای هر هیستوگرام دو قله دیده می‌شود. از

نشده و این شمار از یاخته‌ها، همه مرگ برنامه‌ریزی شده به‌شمار آمده‌اند. در این نمودار M1 نشان‌دهنده بخش پیش از G0 و G1 است که درباره آن گفته شد؛ M2 نشان‌دهنده مراحل G0 و G1، M3 نشان‌دهنده مرحله S و M4 نشان‌دهنده مراحل G2 و M است.

۲-۵- آنالیز آماری

همه آزمون‌ها با سه‌بار 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 به آن‌ها، آزمون T-test برای نمونه‌های مستقل از هم به‌کار گرفته شد که داده‌های با مقادیر احتمال (P-value) کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

در بررسی دگرگونی چرخه یاخته‌ای که با کمک روش فلوسایتومتری به انجام رسید، چرخه یاخته‌ای یاخته‌های ناهماهنگ در رشد، پس از این‌که برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلائی بودند، سنجیده شد. همان‌گونه که پیش از این گفته شد طول هر یک از مراحل از روی تعداد یاخته‌هایی که در آن مرحله شمرده شده‌اند به‌دست آمد.

همان‌گونه که در جدول دیده می‌شود یاخته‌هایی که درون فلاسک‌ها بودند نخست به دو دسته بخش شدند. یک دسته دارای محیط کشت تنها و دسته دیگر دارای ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن در محیط کشت بود. پس در هر آزمون چهار فلاسک به این شرح بود: یک فلاسک C دارای محیط کشت که فلاسک کنترل نامیده می‌شود؛ یک فلاسک CB دارای محیط کشت که در میدان مغناطیسی ۱۵ میلی‌تسلائی جای گرفت؛ یک فلاسک H دارای ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن بیرون از میدان و یک فلاسک HB دارای ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن در میدان مغناطیسی ایستا تیمار شد (جدول ۱).

نباشد، آن‌گاه نزدیک‌ترین گذرگاه، چرخه یاخته‌ای را کند می‌کند تا شاید یاخته با بازسازی و زدودن آن ناهنجاری برای پیشروی در چرخه آمادگی پیدا کند. با این کار، یاخته از پیش آمدن پیچیدگی‌هایی که ژنوم‌های ناهنجر در باز شدن رشته‌ها و رونویسی و کارهایی از این دست دارند، جلوگیری کرده و یاخته‌ها با کمترین آسیب به میتوز خواهند رسید [۱].

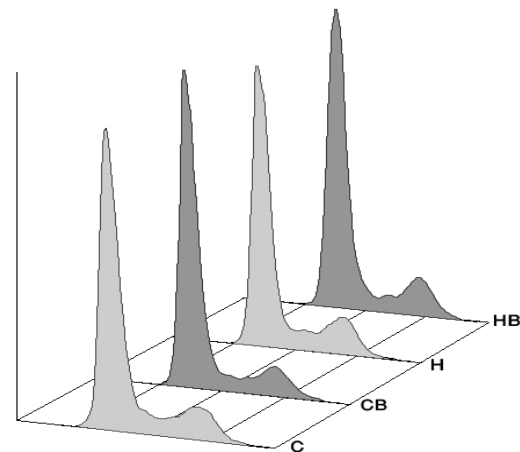
به عبارت دیگر، جایگاه‌های بازرسی یاخته‌ای را می‌توان سه دسته کرد. جایگاه‌هایی در پایان G1 و در سرتاسر S، DNA را از گزند آسیب نگهداری می‌کنند. جایگاه دیگری در G2 درستی همانندسازی و نبود آسیب‌های کروموزومی را برای رفتن یاخته به میتوز و جایگاه پایانی در میتوز، درستی فرایندهای میتوزی را پاسبانی می‌کند میدان‌های مغناطیسی نیز همچون جهش‌زاهای شیمیایی و پرتوهای یون‌زا، شاید جایگاه‌های بازرسی چرخه‌ای را راه‌اندازی کنند [۱۷]. این جایگاه‌های بازرسی می‌توانند برای مدتی جلوی پیشرفت چرخه را بگیرند؛ اما تنها جایگاهی که در پایان G1 است می‌تواند یاخته را از رشد بازدارد. از این رو هرگونه آسیب در ماده ژنتیکی یاخته می‌تواند باعث تجمع یاخته‌ها در مراحل پیش از این جایگاه‌های بازرسی شود.

جایگاه G1 بزرگ‌ترین نقش را در فرایندهای چرخه یاخته‌ای بازی می‌کند. در همین جاست که یاخته از راه‌های گوناگونی بسته به آسیب یاخته و برانگیزنده بیرونی یا درونی به پیرامون خود پاسخ می‌دهد. یک پاسخ، بردن یاخته به مرحله‌ای است که در آن چرخه از پیشروی بازداشته شود، همانند آن‌چه در G1 دیده می‌شود [۱۷].

در تحقیق حاضر میدان مغناطیسی ایستا با اثر خود بر جمعیت یاخته‌ای، باعث افزایش شمار یاخته‌ها در مرحله G1 شده است. از آن‌جا که طبق بررسی‌های متعدد پیشین پرتوهای یون‌ساز نیز با آسیب‌رسانی به DNA سلولی از راه مستقیم و غیرمستقیم باعث تأخیر در فرایند رشد سلولی می‌شوند [۱، ۱۸] میدان‌ها نیز ممکن است با طولانی کردن چرخه مکانیسم مشابهی را تداعی کنند؛ اما از آن‌جا که انرژی این میدان‌ها در حدی نیست که بتواند به‌طور مستقیم بر مولکول‌ها اثرگذار باشد، فرایندهای غیرمستقیم با واسطه‌های رادیکالی محتمل‌ترین مکانیسم به‌شمار می‌آید.

یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی در طولانی شدن مرحله

آن‌جا که بیشتر یاخته‌ها در مراحل G0/G1 هستند، قله نخست نشان‌دهنده این مراحل است و قله دوم نشان‌دهنده یاخته‌هایی است که در مراحل G2/M هستند. میان این دو یاخته‌هایی جای می‌گیرند که در مرحله S هستند.



شکل ۵ هیستوگرام‌های مقایسه‌ای میانگین شمار مراحل گوناگون یاخته‌ای

همان‌گونه که در نمودار دیده می‌شود، پس از این‌که یاخته‌ها در میدان مغناطیسی جای گرفته‌اند در هر دو تیمار با پراکسید هیدروژن و بدون پراکسید هیدروژن، درصد یاخته‌ها در مرحله G0/G1 افزایش معنی‌داری داشته است. همچنین درصد یاخته‌ها در مرحله S نیز کاهش معنی‌داری یافته است.

۴- بحث

همان‌گونه که می‌دانیم تنها هدف یاخته از میتوز، پدید آوردن دو یاخته زنده است که هر کدام دارای ژنومی همانند یاخته نخست باشد. پس جای شگفتی نیست که یاخته‌ها برای پیشبرد این کار، درستی فرایندهای درونی همچون همانندسازی DNA را در گذرگاه‌ها یا جایگاه‌های بازرسی ویژه‌ای بازنگری کنند. گذرگاه‌های گفته شده با پاسخ دادن به نشانه‌های برون یاخته‌ای فرایند زایش یاخته‌ای را کندتر کرده و بدین‌گونه یاخته را با پیرامون خود سازگارتر می‌کنند [۱].

در کنار این پدیده، اگر ناهنجاری‌ها در ساختار DNA به‌گونه‌ای باشد که نشان‌دهنده درستی فرایند همانندسازی

همچنین در مرحله S از چرخه یاخته‌ای نیز، کاهش در شمار یاخته‌های دو گروه از تیمار دیده شده است. از آنجا که بعید به نظر می‌رسد که میدان مغناطیسی با افزایش سرعت سنتز DNA باعث کوتاه شدن مرحله S شده باشد، این تغییر مختصر را می‌توان به طولانی شدن مرحله G0/G1 چرخه و کوچک شدن کسر یاخته‌های مرحله S به کل دانست. با توجه به این که یاخته‌ها همگام یا همزمان نبوده‌اند نمی‌توان به درستی در این باره سخنی به میان آورد. مطالعات دیگر با یاخته‌های همگام می‌تواند در درک بهتر اثر میدان بر تک‌تک مراحل یاخته‌ای راهگشا باشد.

از آنجا که حساسیت مراحل گوناگون چرخه به عوامل جهش‌زا متفاوت است، می‌توان از میدان‌های مغناطیسی به عنوان یک تیمار همراه ثانویه در کنترل زمان مراحل بهره برد و از این راه بر حساسیت یا عدم حساسیت بافت هدف و بافت‌های اطراف آن اثر گذاشت. از این رو مطالعات این چنینی می‌تواند در فراهم کردن بستری برای اثربخشی فرایندهای درمانی در بیماری‌هایی همچون سرطان و بالا بردن نسبت مرگ و میر یاخته‌های سرطانی به یاخته‌های سالم مؤثر باشد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی دانشگاه تربیت مدرس که انجام این مطالعه را ممکن ساخته‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند. ضمناً از همکاری بی‌دریغ سرکار خانم مرضیه فدایی کارشناس محترم آزمایشگاه بیوالکترومغناطیس قدردانی می‌شود.

G1 می‌تواند درگیر شدن پروتئینی به نام p53 باشد [۱۹]. این پروتئین، یک پروتئین راه‌انداز است به گونه‌ای که آغازگر رونویسی دیگر ژن‌ها است. برای نمونه در فرایند بازسازی در G1، p53 برانگیزنده تولید تنظیم‌کنندگان منفی است که کمپلکس G1-cyclin-Cdk را ناکارآمد می‌کنند [۲۰]. همان‌طور که می‌دانیم این گونه کمپلکس‌ها در پیشروی چرخه یاخته‌ای نقش بزرگی بازی می‌کنند و ناکارآمدی آن‌ها، از گذر یاخته به مرحله دیگر جلوگیری می‌کند.

آسیب به DNA در G1، یاخته را از پیشروی در چرخه باز می‌دارد و پروتئین p53 را پایدار می‌کند. p53 خود پیوسته به هنگام چرخه یاخته‌ای ساخته می‌شود و تغییر این پروتئین، باعث تثبیت غلظت آن در یاخته است [۱۹]. به هنگام آسیب DNA پروتئین در برابر این کاهش پایداری می‌شود که پیامد آن افزایش غلظت این پروتئین است و این افزایش غلظت آغازی بر رونویسی دیگر ژن‌های درگیر در ایست چرخه یاخته‌ای در G1 است.

۶- منابع

- [1] Reynolds RJ, Schecker JA. Radiation, Cell Cycle, and Cancer. Los Alamos Science 1995; 23: 51-89.
- [2] Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. Prog Biophys Mol Biol 2005; 87: 213-23.
- [3] Barnes FS, Greenebaum B. Bioengineering and Biophysical Aspects of Electromagnetic Fields. 3th Edition, Taylor & Francis Group, New York, 2006; p: 106-230.
- [4] Kobayashi A, Kirschvink JL. Magnetoreception and electromagnetic field effects: Sensory perception of the geomagnetic field in animals and humans. Adv Chem Ser 1995; 250: 367-94.
- [5] Buemi M, Marino D, Di Pasquale G, Floccari F, Senatore M, Aloisi C, Grasso F, Mondio G,

- Perillo P, Frisina N, Corica F. Cell proliferation/cell death balance in renal cell cultures after exposure to a static magnetic field. *Nephron* 2001; 87(3): 269-73.
- [6] Zhang QM, Tokiwa M, Doi T, Nakahara T, Chang PW, Nakamura N, Hori M, Miyakoshi J, Yonei S. Strong static magnetic field and the induction of mutations through elevated production of reactive oxygen species in *E. coli* *soxR*. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 281-6.
- [7] Nakahara T, Yaguchi H, Yoshida M, Miyakoshi J. Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field. *Radiology* 2002; 224: 817-22.
- [8] Zmysłony M, Palus J, Jajte J, Dziubaltowska E, Rajkowska E. DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7mT magnetic fields (static or 50 Hz). *Mutat Res* 2000; 453(1): 89-96.
- [9] Hirose H, Nakahara T, Zhang QM, Yonei S, Miyakoshi J. Static magnetic field with a strong magnetic field gradient (41.7 T/m) induces C-Jun expression in HL-60 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; 39(8-9): 348-52.
- [10] Teodori L, Grabarek J, Smolewski P, Ghibelli L, Bergamaschi A, De Nicola M, Darzynkiewicz Z. Exposure of cells to static magnetic field accelerated loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. *Cytometry* 2002; 49(3): 113-8.
- [11] Jajte J, Grzegorzczak J, Zmysłony M, Rajkowska E. Effect of 7mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry* 2002; 57(2): 107-111.
- [12] Flipo D, Fournier M, Benquet C, Roux P, Le Boulaire C, Pinsky C, LaBella FS, Krzystyniak K. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca²⁺, and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 54: 63-76.
- [13] Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, Ghibelli L. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx. *FASEB J* 1999; 13(1): 95-102.
- [14] Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4th Edition, John Willy & Sons. Inc., 2003; p: 101-214.
- [15] Celis JE. *Cell Biology*. 3th Edition, Vol.3, Academic Press, New York, 2004; 279-89.
- [16] Teresa S. & Hawley RG. *Flow Cytometry Protocols*. 2nd Edition, Humana Press, 2004; p: 345-54.
- [17] Padfield D, Rittscher J, Thomas N, Roysam B. Spatio-temporal cell cycle phase analysis using level sets and fast marching methods. *Med Image Anal* 2009; 13(1): 143-55.
- [18] Yata K, Esashi F. Dual role of CDKs in DNA repair: to be, or not to be. *DNA Repair (Amst)* 2009; 8(1): 6-18.
- [19] Lantto TA, Damien Dorman HJ, Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Tikhonov VP, Hiltunen R, Raasmaja A. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry* 2009; 112(4): 936-43.
- [20] Tkaczyk C, Huk OL, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Petit A, Tabrizian M. The molecular structure of complexes formed by chromium or cobalt ions in simulated physiological fluids. *Biomaterials* 2009; 30(4): 460-7.

