[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۳ و ٤: از ۹-۱۸
پاییز و زمستان ۱۳۸۷

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

امیر ثابت‌سروستانی[۱]، پرویز عبدالمالکی[۲*]، سیدجواد مولی[۳]، فائزه قناتی[٤]، 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
٤- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۲۲ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

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 میلی‌تسلایی روی یاخته‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان موش صحرایی سنجیده شد. برای این کار روش فلوسایتومتری با فلوروکروم پروپیدیوم یدید 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 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: ۱۷۵-۱٤۱۱۵
Email: parviz@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

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 خزه گرفته تا زنبورها و پرنده‌ها دیده می‌شود. پاسخ به میدان‌های الکترومغناطیسی در مغز انسان و دیگر ریزاندام‌ها نیز دیده شده است [٤].

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 انرژیش 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 انرژیش تفکیک نمی‌شود) نیاز است، بزرگ‌ترین اثر میدان مغناطیسی، برداشتن هم‌ترازی انرژی 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 میلی‌تسلایی 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 ٢٤ ساعت در میدان‌های ۹ تسلایی قرار گرفتند. میزان جهش در جهش‌یافته‌های soxR و sodAsodB که در مکانیسم‌های دفاعی در برابر فشار اکسیداتیو کاستی داشتند به‌طور قابل توجهی افزایش یافت [٦].

ناکاهارا (Nakahara) و همکارانش (۲۰۰۲) در یاخته‌های تخمدان همستر چینی CHO-K1 که برای بیش از ٤ روز در میدان ۱۰ تسلایی قرار داشتند تغییری در میزان رشد یاخته و توزیع چرخه یاخته‌ای نیافتند؛ ولی میدان ۱۰ تسلایی افزایش معنی‌داری را در تعداد ریزهسته‌های یاخته‌های پرتو گرفته نشان داد [۷].

زمیسلونی (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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

میلی‌تسلایی 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 ۲٤، ۳٦، ٤۸ و ۷۲ ساعت در میدان ٦ تسلا با گرادیان ٤۱/۷ 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].

تئودوری (Teodori) و همکارانش در سال ۲۰۰۲، یاخته‌های HL-60 را برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ٦ میلی‌تسلایی گذاشتند. این میدان مغناطیسی ایستا هیچ‌گونه اثری بر مرگ برنامه‌ریزی شده یاخته (Apoptosis) و نکروزیس (Necrosis) نداشت اما در کنار کمپتوتسین (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 میلی‌تسلایی بودند، یافتند که این آسیب شاید به مرگ برنامه‌ریزی شده یا نکروزیس این یاخته‌ها بینجامد. در حالی‌که 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].

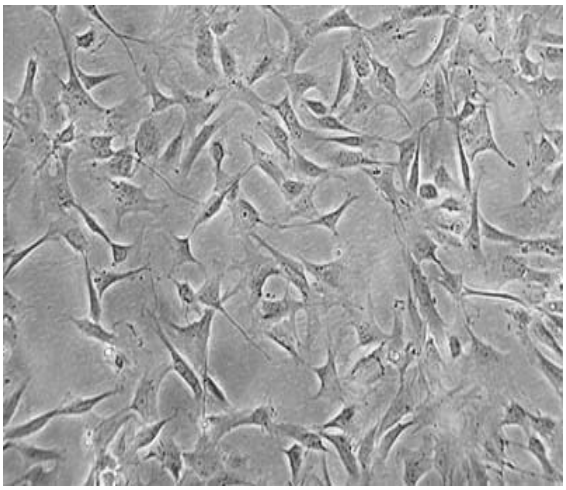
هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا در چرخه سلولی است و برای این منظور سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به‌عنوان هدف بیولوژیک در نظر گرفته شده است. مطالعه چگونگی تغییرات ایجاد شده کمک مؤثری به ما در شناخت خصوصیات فیزیکی سلول‌های بنیادی می‌نماید.

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 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 فروبرده 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 واکشت‌های (Subculture) نخستین، رشد بسیار خوبی دارند و در محیط کشت دارای ۲۰ درصد سرم، هر چهار تا پنج روز یک‌بار نیاز به واکشت 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

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 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 (شکل ۲).

شکل ۲ دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا

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 تسلامتر کالیبره شود.

از آن‌جا که جریان بالای الکتریسیته با گرمازایی 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 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 CO_2 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 CO_2 در این بازه زمانی و بازه‌های زمانی کوتاه‌تر، قابل چشم‌پوشی است.

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

مراحل گوناگون تیمار خرد شده‌اند، در نمونه موجود است که باید پیش از تفسیر هیستوگرام‌های محتوای DNA یاخته‌ای، از دیگر یاخته‌ها جدا شده و کنار گذاشته شوند [۱۵]. یاخته‌های رنگ‌آمیزی شده برای آنالیز به درون کووت‌های ویژه‌ای ریخته شده، درون دستگاه جای می‌گیرند. دستگاه فلوسایتومتر بر پایه اندازه نور فلورسانسی که از هر یاخته بازتاب می‌شود، با سنجش DNA یاخته که نمایانکننده هر کدام از مراحل چرخه سلولی است، یاخته‌هایی را که در هریک از گام‌های گوناگون چرخه هستند، شمارش می‌کند. داده‌های به‌دست آمده از دستگاه فلوسایتومتر خام بوده و برای بازیابی داده‌ها، نرم‌افزارهای ویژه‌ای همچون نرم‌افزار WIN-MDI به‌کار می‌رود که می‌تواند داده‌هایی همچون شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون را از دل داده‌های خام نخستین دستگاه بیرون آورد.

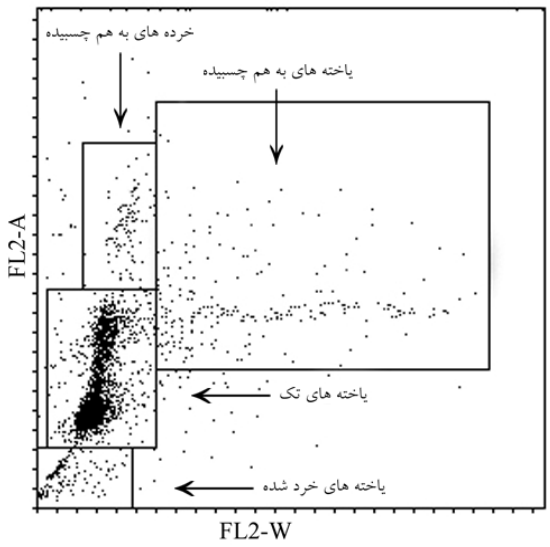
با دانستن طول چرخه یاخته‌ای یا همان بازه زمانی میان دو میتوز و نسبت یاخته‌هایی که در مرحله‌ای از این چرخه هستند به همه یاخته‌ها، می‌توان طول هریک از این مراحل را به‌دست آورد. برای نمونه، معادله روبه‌رو طول مرحله S را به‌دست می‌دهد:

$$T_S = \frac{T_C \times \ln(f_S + 1)}{\ln 2}$$

که در آن T_C طول چرخه یاخته‌ای و f_C نسبت شمار یاخته‌هایی که در مرحله S از این چرخه هستند به همه یاخته‌ها است [۱۵].

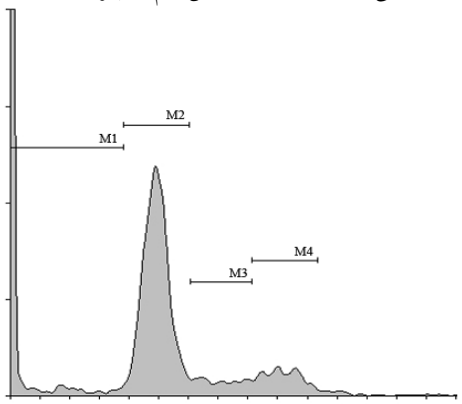
در این تحقیق، با به‌کارگیری فلوروکروم پروپیدیوم یدید (fluorocromes Propidum Iodide: PI) و دستگاه فلوسایتومتر بکتون- دیکینسون (Becton-Dickinson) (Franklin، آمریکا) محتوای DNA سلولی سنجیده شد و از روی این محتوا شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون به‌دست آمد که معیاری برای پی بردن به طول چرخه یاخته‌ای و تغییرات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

در نمونه‌ای که برای آنالیز درون کووت دستگاه ریخته می‌شود، انواع یاخته‌ها یافت می‌شود؛ یاخته‌های تک تک، به‌هم چسبیده، خرد شده و همچنین یاخته‌های خرد شده‌ای که اکنون به‌هم چسبیده‌اند و ما را در گردآوری داده‌های پایانی گمراه می‌کنند. این یاخته‌های نامطلوب را نمی‌توان از یاخته‌های تک‌تک درون کووت سوا کرد؛ اما پس از گرفتن داده‌ها، می‌توان پیش از بررسی هیستوگرام‌ها، آن‌ها را از داده‌های خام به کمک نموداری در بخش Dot plot نرم‌افزار که پهنای فلورسانس FL2 را نسبت به سطح علامت نمایش دهد، دور ریخت (شکل ۳) [۱۶].



شکل ۳ جدا کردن یاخته‌های تک از دیگر یاخته‌ها و اجزا یاخته‌ای

برای نمایش شمار یاخته‌ها در مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای باید هیستوگرام علامت FL2-A نسبت به شمار یاخته‌ها را کشید (شکل ٤). در این نمودار دو قله دارد. از آن‌جا که بیشتر یاخته‌ها در مراحل G0 و G1 هستند پس قله نخست که بیشینه‌ای را در شمار یاخته‌ها نشان می‌دهد، نشان‌دهنده همین گام از چرخه است.



شکل ٤ تعیین مراحل گوناگون یاخته‌ای با کمک هیستوگرام محتوای DNA

قله دوم که کوتاه‌تر از قله پیشین است، یاخته‌هایی را که در مراحل G2 و M هستند نمایش می‌دهد. بازه‌ای از نمودار که در میان این‌دو جای می‌گیرد نشان‌دهنده مرحله S و بازه‌ای که پیش از قله نخست جای دارد، نشان‌دهنده یاخته‌هایی است که دچار مرگ برنامه‌ریزی شده یا نکروزیس شده‌اند [۱۵]. گفتنی است در بسیاری از کارهای پیشین که از این روش بهره برده‌اند، نامی از نکروزیس در این‌جا برده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

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 میلی‌تسلایی بودند، سنجیده شد. همان‌گونه که پیش از این گفته شد طول هریک 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 میلی‌تسلایی 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).

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

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

فلاسک‌های یاخته‌ای که هر کدام بیش از یک میلیون یاخته داشتند، برای ۵ ساعت در میدان مغناطیسی ایستای ۱۵ میلی‌تسلایی 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- دیکینسون 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.

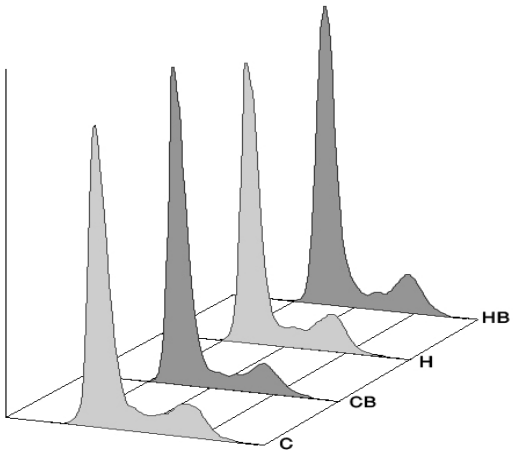
جدول ۲ درصد یاخته‌های بنیادی مغز استخوان در مراحل گوناگون چرخه یاخته‌ای پس از تیمار با پراکسید هیدروژن و میدان مغناطیسی؛ حروف گوناگون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در داده‌های مربوطه است.

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

در شکل۵ برای هر هیستوگرام دو قله دیده می‌شود. از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

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.

٤- 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 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 ناهنجار 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

G1 می‌تواند درگیر شدن پروتئینی به‌نام p53 باشد [۱۹]. این پروتئین، یک پروتئین راه‌انداز است به‌گونه‌ای که آغازگر رونویسی دیگر ژن‌ها است. برای نمونه در فرایند بازداری در G1، p53 برانگیزنده تولید تنظیم‌کنندگان منفی است که کمپلکس G1-cyclin-Cdk را ناکارامد می‌کنند [۲۰]. همان‌طور که می‌دانیم این گونه کمپلکس‌ها در پیشروی چرخه یاخته‌ای نقش بزرگی بازی می‌کنند و ناکارامدی 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 به‌هنگام چرخه یاخته‌ای ساخته می‌شود و تغییر این پروتئین، باعث تثبیت غلظت آن در یاخته است [۱۹]. به‌هنگام آسیب DNA پروتئین در برابر این کاهش پایدارتر 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.

همچنین در مرحله S از چرخه یاخته‌ای نیز، کاهشی در شمار یاخته‌های دو گروه از تیمار دیده شده است. از آن‌جا که بعید به‌نظر 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 این‌که یاخته‌ها همگام یا همزمان نبوده‌اند نمی‌توان به‌درستی در این‌باره سخنی به‌میان 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 به‌عنوان 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 این‌چنینی 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.

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,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

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] Zmyślony 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, Grzegorczyk J, Zmyslony M, Rajkowska E. Effect of 7mT static magnetic field and iron ions on ratlymphocytes: apoptosis, necrosis and free radiacal 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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-15]