

بررسی اثر میدان الکترومغناطیس بر تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان به نورو

لعا قهاری^۱، *منوچهر صفری^۲، مجید جدیدی^۳

چکیده

مقدمه: امروزه شاهد گسترش روز افزون سیستم‌های الکترونیکی و میدانهای الکترومغناطیس در محیط زندگی بوده و از آن در درمان برخی اختلالات عصبی بهره مند می‌گردیم. هدف این مطالعه بررسی اثرات تکثیری و تمایزی امواج الکترومغناطیس بر روی سلولهای بنیادی بند ناف بود.

روش بررسی: بند ناف نوزاد سالم تازه متولد شده در شرایط استریل به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. سپس با استفاده از آنزیم‌های هیالورونیداز، تریپسین و کلاژناز سلولها جدا و سپس کشت داده شدند. برای خالص سازی و حذف سلولهای اضافی فلاسکها سه بار پاساژ داده شدند و سپس روزانه به مدت ۲ ساعت برای ۱۴ روز فلاسکها در داخل انکوباتور در معرض امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدتهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا قرار گرفتند. سپس با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی نورو و MTT از لحاظ تکثیر و تمایز سلولها به نورو مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد شدتهای ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا باعث کاهش شدید سلولها گردید اما در گروه ۰/۲۵ میلی‌تسلا کاهش تعداد سلولها با گروه کنترل معنی‌دار نبود. اما در بررسی تمایز فقط در گروههای ۰/۲۵ و ۰/۵ تمایز مشاهده شد و در گروه ۱ میلی‌تسلا تمایزی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق حاکی از آن است که امواج الکترومغناطیس بر تمایز و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف اثرگذار هستند.

کلمات کلیدی: امواج الکترومغناطیس، سلولهای بنیادی مزانشیمی، بند ناف، نورو

مقدمه

به طور کلی سلولهای بنیادی دارای سه منشأ، جنینی^۱، بزرگسالان و سلولهای بنیادی حاصل از تحریک^۲ هستند. سلولهای بنیادی بزرگسالان در بسیاری از بافتهای تخصص یافته بدن از جمله مغز استخوان، نخاع، پالپ دندان، اپیدرم، عضله اسکلتی، روده، پانکراس، کبد، قرنیه و شبکه چشم یافت می شوند [۱]. این سلولها تحت شرایط فیزیولوژیک یا به دنبال ایجاد ضایعه، به سلولهای بافتی که در آن قرار دارند متمایز می شوند و بافت آسیب دیده را ترمیم می کنند. به عنوان مثال سلولهای بنیادی خونساز در مغز استخوان به انواع سلولهای خونی متمایز می شوند. علاوه بر این سلولهای بنیادی بالغ تحت شرایط پاتولوژیکی خاص مانند التهاب یا تغییر در فاکتورهای محیطی به سلولهای دیگری که مربوط به آن بافت خاص نیستند، تمایز می یابند. بعنوان مثال سلولهای بنیادی مشتق از مغز استخوان علاوه بر اینکه سلولهای خونی و ایمنی را می سازند، قادرند انواع دیگری از سلولها نظیر سلولهای ماهیچه اسکلتی، میکروگلیا، استروگلیا و هپاتوسیت های کبدی را نیز بسازند [۲، ۳]. سلولهای بنیادی درون محیط میکروسکوپی که «نیچ»^۳ نامیده می شود تحت تأثیر ترکیبات بیوشیمیایی محلول (سیتوکین ها، شیمو کین ها و فاکتورهای رشد) و همچنین ترکیبات نامحلول مانند رستپورهای خلال غشایی و ماتریکس خارج سلولی قرار می گیرند. ماتریکس خارج سلولی از طریق تنظیم بیواکتیویته فاکتورهای رشد و سیتوکین ها، توقیف فاکتور رشد و اثر مستقیم بر فعالیت گیرنده ها می تواند بر روی اتصالات سلولی، تکثیر، تمایز و زنده ماندن سلول تأثیرگذار باشد؛ یعنی می توان گفت تقابل بین سلول و ماتریکس خارج سلولی باعث تغییر در رفتار سلول می شود [۴].

تاکنون چندین مولکول به عنوان فاکتورهایی که ساز و کارهای خودنوزایی، تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی را

رهبری می کنند شناسایی شده است. به عنوان مثال ثابت شده است که لیگاند Wnt در خودنوزایی و تمایز سلولهای بنیادی به دودمانهای دیگر سلولی ایفای نقش می کند [۵]. این لیگاند که توسط استئوبلاست ها تولید می شود، در حفظ عملکرد و سکون سلولهای بنیادی خونی^۴ و رشد و تمایز استئوبلاست ها اهمیت دارد [۶]. همچنین میزان سیگنال Wnt یک تنظیم کننده مهم در تکامل دستگاه عصبی پستانداران است. سیگنال Notch در تنظیم خودنوسازی سلولهای بنیادی بزرگسالان و تمایز سلولهای اجدادی در طول نسلهای خاص سلولی ایفای نقش می کند [۷]. علاوه بر این خودنوسازی و تمایز سلولهای بنیادی به وسیله فاکتورهای رشد (FGF-FGFR-EGF-EGFR) سیتوکین ها، میکرو RNA ها و فاکتورهای نسخه برداری تحت تأثیر قرار می گیرند [۸].

در تحقیقات جدید از میدانهای مغناطیسی فرکانس پایین جهت ایجاد تکثیر و تمایز در سلولهای بنیادی استفاده شده است. میدان مغناطیسی در محیط زندگی انسان ها وجود دارد، این میدانها می توانند منبع طبیعی داشته و یا ناشی از دستگاه های الکترونیکی مختلف باشند. دستگاه ها و تجهیزات زیادی به عنوان مولد این میدان ها وجود دارند که می توانند کاربرد درمانی برای انسان داشته باشند [۹]. نتایج مطالعاتی که در جمعیت های سلولی متفاوت و نیز بافت ها، ارگان ها و میکروارگانیسم های مختلف در مواجهه با میدان مغناطیسی با شدت ها و فرکانس های گوناگون صورت گرفته است، بر افزایش فعالیت تکثیری سلول های گیرنده نور [۱۰]، افزایش سرعت ترمیم بافت در موش صحرایی، افزایش تکثیر سلول های آستروسیتی [۱۱]، بهبود تکثیر سلول پروتوزوا، افزایش تکثیر باکتری ای کولای [۱۲]، افزایش تمایز سلول های FLK-1+، سلول های بنیادی جنینی موش به سلول های عضله قلب [۱۳]، تمایز بافت جنینی موش به غضروف [۱۴]، تمایز مونوسیت های میلوئیدی رده سلولهای U937 و افزایش تعداد سلولهای

1. embryonic
2. Induced pluripotent stem cells
3. niche

4. Hematopoietic stem cell (HSC)

طحال موش صحرایی دلالت دارد [۱۵].

مطالعات نشان داده که سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف قادرند به دیگر سلولهای بنیادی تمایز یابند [۱۶، ۱۷]. مطالعات انجام شده که برخی از آنها که به طور نمونه بیان شد، ثابت می‌کند که میدانهای مغناطیس با شدتها و فرکانسهای متفاوت می‌تواند بر روی سلولها تأثیر داشته باشد. بنابراین ما نیز در این مطالعه سعی کردیم تا با تمرکز بر روی سلولهای بنیادی و کشت این سلولها و قرار دادن این سلولها تحت تأثیر میدان مغناطیسی با فرکانس ثابت و شدتهای مختلف، اثرات آنها را بر روی تکثیر و تمایز سلولها بررسی نماییم و مشخص نماییم که آیا میدان مغناطیسی قادر خواهد بود تغییری در تکثیر و سرنوشت سلولهای بنیادی استخراج شده از بند ناف ایجاد نماید.

روش بررسی

تهیه سلولهای بنیادی

بند ناف نوزاد سالم تازه متولد شده از بیمارستان امیرالمومنین در شرایط استریل در محلول کشت^۱ حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml)، استرپتومایسین (۶۰ mg/ml) به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. ابتدا با استفاده از PBS آنها را کاملاً شسته سپس به آرامی عروق آنها را جدا نموده و ماتریس به جا مانده را در ظرف پتری دیش حاوی HBSS قرار دادیم. آنها به قطعات بسیار ریز حدود ۵ میلی متری تقسیم شدند. سپس به مدت یک ساعت مخلوط آنزیمهای هیالورونیداز، تریپسین و کلاژناز به محیط کشت اضافه شد و بافتها داخل انکوباتور حاوی CO₂ قرار داده شدند. بعد از آن کاملاً پیپتاژ نموده و با سپس با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه ساترifiوژ گردیدند و محیط رویی کاملاً تخلیه گردید. برای خنثی نمودن آنزیمها و تریپسین از سرم گوساله ۱۰٪ استفاده شد. پلت تشکیل شده را داخل فلاسک

تخلیه نموده محیط کشت (sigma) DMEM همراه با سرم جنین گاوی ۱۰٪ (FBS)^۲ در داخل انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰٪ و CO₂ ۵٪ انکوبه گردیدند. بعد از ۴۸ ساعت فلاسکها از انکوباتور خارج شده، محیط رویی را بیرون ریخته و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل حاوی FBS ۱۵٪ به آن اضافه گردید و اجازه داده شد تا سلولها شروع به رشد نمایند. پس از آن هر ۳ روز یک بار محیط کشت سلولها تعویض شد. بعد از اینکه سلولها کف فلاسک را پر کردند فلاسکها پاساژ داده شدند. برای خالص سازی سلولها ۳ پاساژ متوالی انجام گرفت و با انجام ۳ پاساژ متوالی سلولهای اضافی مانند سلولهای چربی و فیبروبلاست از محیط کشت خارج شده و فقط سلولهای بنیادی که قادر به چسبیدن و تکثیر بودند، باقی ماندند [۱۸].

برای شمارش سلولها از محلول تریپان بلو ۰/۴٪ استفاده می‌شود. بعد از شمارش سلولها تعداد ۵۰۰۰ سلول داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته و با همان ترکیبات قبلی داخل انکوباتور اجازه رشد و تکثیر به آنها داده شد. پلیتها به مدت ۲ هفته روزانه به مدت ۲ ساعت در میدان مغناطیسی با شدتهای ۰/۲۵، ۰/۵، و ۱ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز قرار داده شدند. و در نهایت در پایان روز ۱۴ آزمون MTT برای تکثیر سلولها انجام شد [۱۹].

آماده سازی میدان مغناطیسی

با توجه به ضعیف بودن شدت میدانهای مغناطیسی مورد نیاز در این پروژه، هرگونه نوسان در برق شهر موجب تغییر در شدت میدان مغناطیسی مورد نیاز می‌گردد، لذا با استفاده از یک دستگاه سیگنال ژنراتور^۳ فرکانس ۵۰ هرتز سینوسی مورد نیاز تأمین گردید (شکل ۱). به منظور تقویت سیگنال ۵۰ هرتز ایجاد شده، خروجی دستگاه به یک آمپلی فایر صوتی^۴ متصل شد. با ارتباط خروجی آمپلی فایر و سیم پیچ میدان مغناطیسی،

2. fetal bovine serum

3 LINKU

4. NAVASAZ

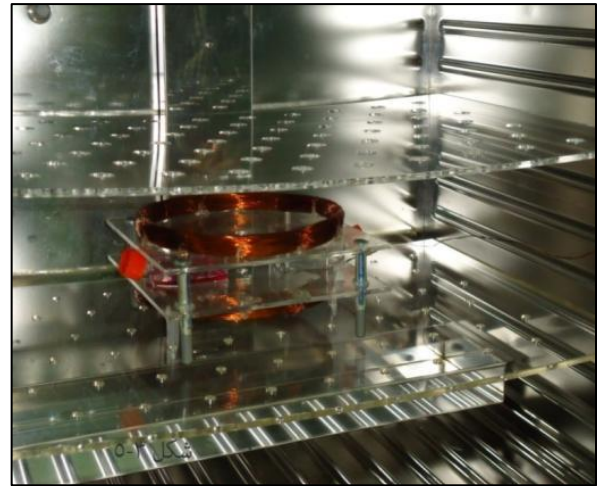
1. HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

MTT (سیگما) به هر چاهک اضافه می‌کنیم. به مدت ۴-۲ ساعت در انکوباتور حاوی CO₂ و در دمای ۳۷ درجه قرار می‌دهیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت رویی را دور ریخته (با دقت محلول MTT را از چاهک‌ها خارج نموده) به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO (مرک) (یا ۱۰۰ میکرو لیتر ایزو پروپانول اسید) اضافه می‌کنیم. پلیت‌ها را در دمای اتاق به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار می‌دهیم با دستگاه الایزا، در جذب طول موج ۵۹۰nm ثبت می‌کنیم. با استفاده از فرمول زیر درصد بقای سلولهای بنیادی سنجیده می‌شوند [۲۰]:

$$\text{درصد بقا} = \frac{OD(\text{test}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{control}) - OD(\text{blank})} \times 100$$

ایمونوسیتوشیمی

برای انجام پروسه ایمونوسیتوشیمی ابتدا سلول‌ها را در پارافرمالدئید ۰.۴٪، در PBS به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس نموده سپس ۳ بار سلول‌ها را با PBS شستشو می‌دهیم. برای antigen retrieval به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۹۵ درجه قرار گرفتند. مجدداً ۳ بار سلول‌ها را با PBS شستشو داده، بعد از این مرحله سلول‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در Triton x-100، در PBS دمای اتاق انکوبه شدند تا دیواره سلول‌ها برای آنتی‌بادی نفوذپذیر گردد. بعد از آن مجدداً ۳ بار سلول‌ها را با PBS شستشو داده شدند. در مرحله بعد برای حذف باندینگ‌های اضافه سلول‌ها در goat serum ۱۰٪، در PBS، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردیدند. بعد از آماده شدن سلول‌ها برای رنگ آمیزی به مدت یک شبانه روز سلول‌ها را در آنتی‌بادی اولیه سلول‌های عصبی (abcam) anti FOX3 به نسبت ۱ به ۲۰۰ در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد در PBS به مدت ۱۰ دقیقه سه بار شستشو داده شدند. در مرحله بعد سلول‌ها در آنتی‌بادی ثانویه flourophore- conjugated (abcam) Dylighy 488 به نسبت ۱ به ۲۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردیدند. بعد از آن مجدداً ۳ بار سلول‌ها را با PBS شستشو



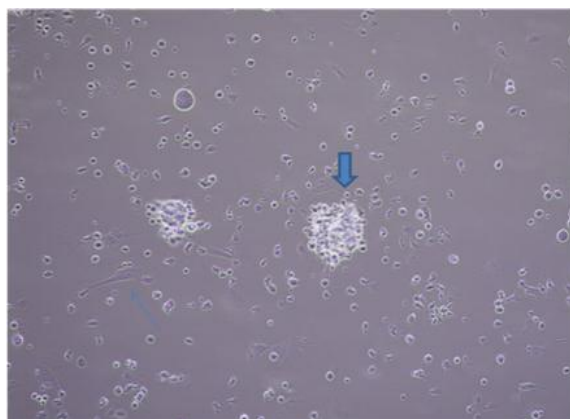
تصویر ۱- دستگاه تولید کننده امواج الکترومغناطیس در داخل انکوباتور

امکان تنظیم ولتاژ ورودی سیم پیچ و به دست آوردن میدان مغناطیسی متناوب با شدت‌های مورد نظر فراهم گردید. برای ایجاد میدان مغناطیسی یکنواخت از دوسیم پیچ سری با قطر داخلی ۱۶ سانتیمتر که از سیم‌های مسی با روکش لاک‌ی به ضخامت ۰/۵ میلی‌متر و ۳۰۰ دور سیم تشکیل شده، استفاده گردید. برای تنظیم و اندازه‌گیری شدت میدان مغناطیسی (چگالی شار)، از دستگاه تسلامتر^۱ استفاده شد. برای اندازه‌گیری شدت میدان، قبل از شروع هر مرحله از آزمایش، سنسور تسلامتر در مرکز میدان مغناطیسی قرار گرفته و شدت میدان مغناطیسی در سه مقدار ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی تسلا تنظیم شد.

آزمون MTT برای شناسایی تکثیر سلولی

در انتهای پاساژ سوم بعد از تریپسینه کردن سلول‌ها با تریپسین-ادتا^۲ شمارش سلولی با تریپان بلو^۳ انجام گردید. در این مرحله تعداد سلول‌های مورد نیاز برای کار به دست می‌آید. ابتدا محیط کشت حاوی پنی‌سیلین و اریترومایسین و ۱۰٪ FBS به هر چاهک به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر حاوی ۵۰۰۰۰ سلول اضافه می‌کنیم. سپس پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور CO₂ دار انکوبه می‌کنیم، اجازه می‌دهیم سلول‌ها به کف چسبیده و به حالت پایدار در آیند. روز بعد محیط کشت رویی پلیت‌ها را خارج کرده و ۱۰۰ میکرو لیتر

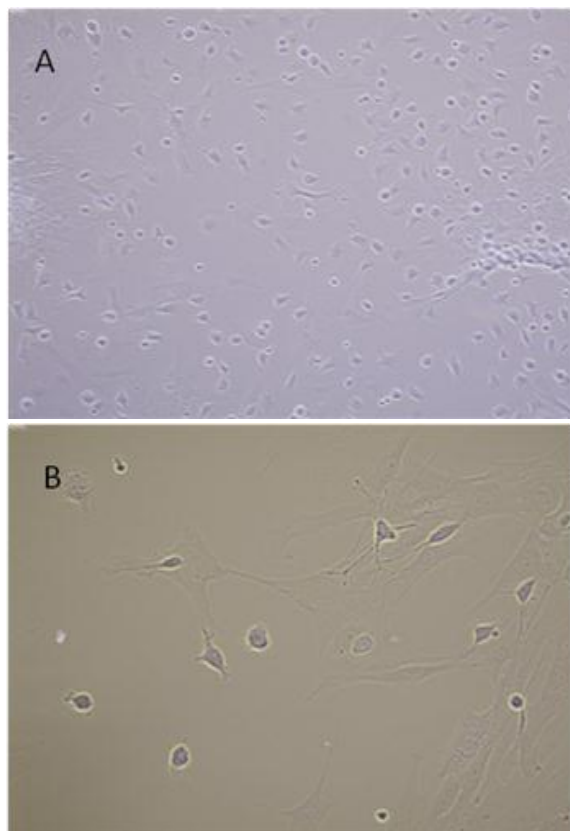
1. LUTRON/TAIWAN, EMF-827
2. Trypsin- Edta (Merck)
3. Trypan- Blue (Merck)



تصویر ۳- سلولها یک روز پس از استخراج بزرگنمایی $\times 10$.
فلش ضخیم نشان دهنده کلونی سلولی است.

یا کوتاه دیده می شوند. هسته و گرانولهای اطراف آن در سلولها قابل مشاهده است.

سلولها دو هفته پس از استخراج: سلولها بیش از ۸۰٪ از کف فلاسک را پر کرده اند. شکل سلولها از دوکی به گرد و چند وجهی تغییر یافته است. در این مرحله باید سلولها پاساژ داده شوند. (تصویر ۵)



تصویر ۴- سلولها سه روز پس از استخراج
(شکل A بزرگنمایی $\times 20$ ، شکل B بزرگنمایی $\times 40$).

داده شد. در مرحله بعد برای رنگ آمیزی هسته از DAPI به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی استفاده نموده و در نهایت چسباندن لامل و مشاهده با میکروسکوپ فلوروسانس انجام گردید.

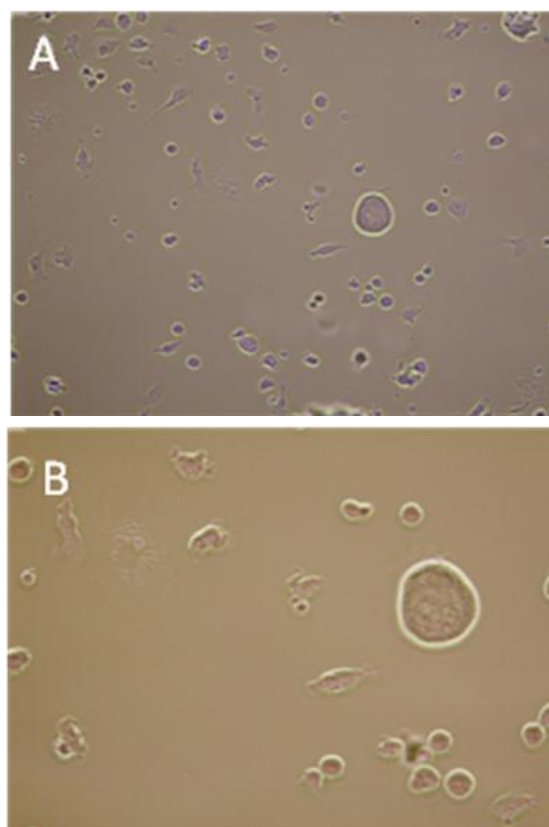
یافته ها

ارزیابی سلولها پس از استخراج

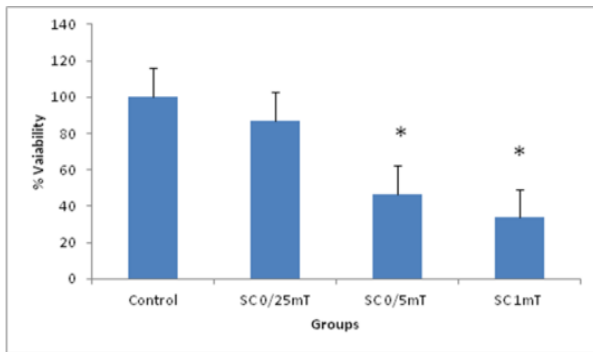
سلولها پس از استخراج از مغز استخوان کروی شکل و با اندازه های متفاوت دیده می شوند و می تواند شامل سلولهایی مثل گلبولهای خونی، سلولهای چربی، فیبروبلاست و غیره باشد. (تصویر ۲)

سلولها یک روز پس از استخراج: تعدادی از سلولها شروع به دوکی شدن و چسبیدن نموده اند. تعداد سلولها بیشتر شده و کلونی هایی که نشان دهنده تکثیر سلولها است در نواحی پراکنده در داخل فلاسکها مشاهده شدند. (تصویر ۳)

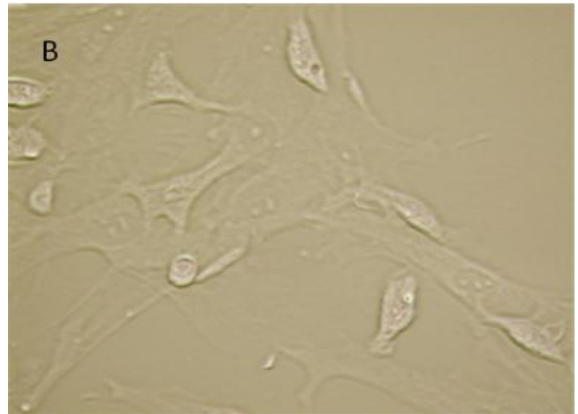
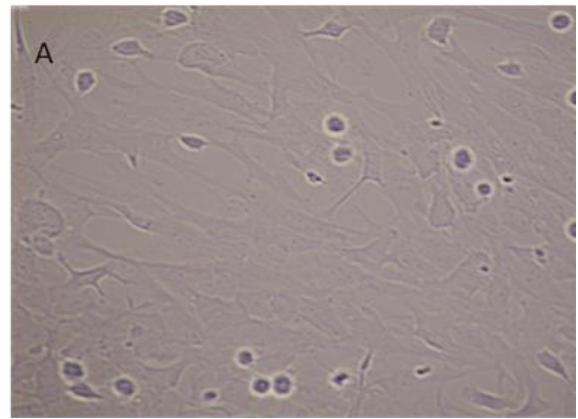
سلولها سه روز پس از استخراج: همانطور که در تصویر ۴ نیز دیده می شود در روز سوم سلولها دوکی شکل و با زوائد بلند



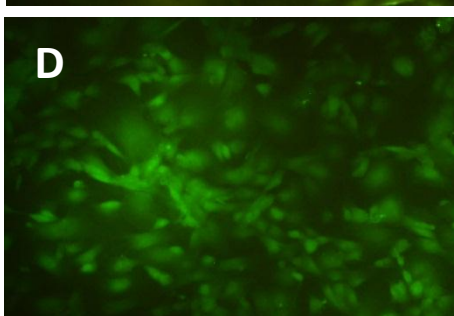
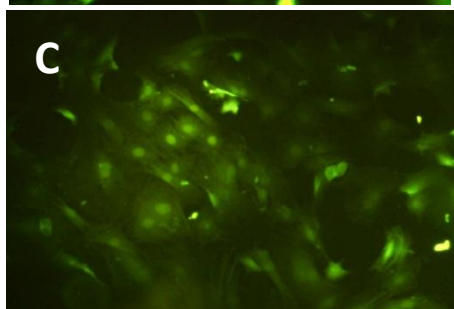
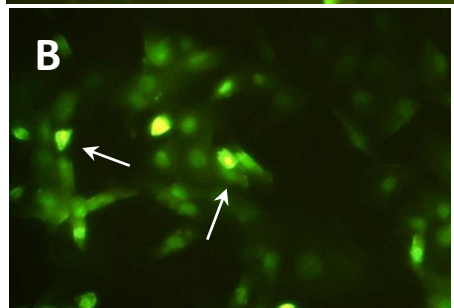
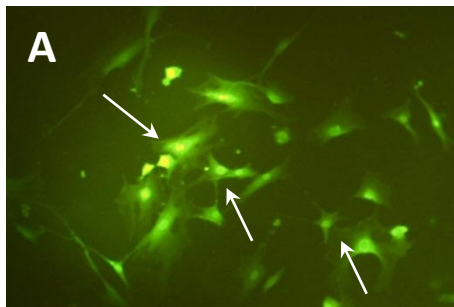
تصویر ۲- سلولها پس از استخراج
(شکل A بزرگنمایی $\times 10$ و شکل B بزرگنمایی $\times 20$).



نمودار ۱- میزان بقای سلولها بعد از در معرض قرار گرفتن امواج الکترومغناطیس (* نشان دهنده مقایسه گروههای مورد آزمایش با گروه کنترل بوده است $p < 0.01$)



تصویر ۵- سلولها دو هفته پس از استخراج (شکل A بزرگنمایی $\times 20$ و شکل B بزرگنمایی $\times 40$)



تصویر ۶- تصاویر میکروسکوپ فلوروسانس از سلولهای تمایز یافته به نورون (A): گروه ۰/۲۵؛ B: گروه ۰/۵؛ C: گروه با شدت ۱ میلی تسلا؛ و D: گروه کنترل) فلشها نشان دهنده سلولهای تمایز یافته است.

نتایج آماری نشان داد که درصد قدرت بقای سلولها با افزایش شدت جریان کاهش می‌یابد. بین شدتهای ۰/۲۵ و ۰/۵ از نظر قدرت بقا تفاوت معنی‌داری وجود داشت. اما در شدت ۱ میلی تسلا تعداد سلولها کاهش یافته و قدرت بقا کمتر از دیگر گروهها شده بود و این تفاوت معنی‌دار بود. با مقایسه با گروه کنترل درصد بقا در تمام گروهها که امواج دریافت کرده بودند کاهش یافته بود اما در گروه ۰/۲۵ اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار نبوده است. اما در گروههای ۰/۵ و ۱ میلی تسلا اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار بوده است. (نمودار ۱)

نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی و استفاده از آنتی بادی اختصاصی نشان داده است که در شدتهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی تسلا سلولها تمایز یافته و سلولهای تمایز یافته نورون مشاهده گردیده است. اما در شدت ۱ میلی تسلا هیچگونه تمایزی مشاهده نشده است. نتایج نشان داده است که در شدت ۰/۵ میلی تسلا تمایز به نورون بیشتر از ۰/۲۵ میلی تسلا بوده است. (تصویر ۶)

بحث و نتیجه گیری

میدان الکترومغناطیسی به عنوان یک اصطلاح عمومی در برگیرنده میدان‌های الکتریکی، مغناطیسی و الکترومغناطیسی است که توسط بسیاری از دستگاه‌های موجود در زندگی روزانه انسان تولید می‌شوند. امروزه با کاربرد گسترده از وسایل و ابزار پیشرفته‌ای که با تولید و القای میدان‌های الکترومغناطیسی در ارتباط هستند، ضرورت بررسی تأثیر این میدان‌ها بر روی سلامت انسان احساس می‌شود.

با توجه به نتایج این مطالعه امواج الکترو مغناطیس با شدت‌های خاص قادر است سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف را به سلول‌های دیگر تمایز دهد. اما شدت‌های بیشتر از تمایز آنها جلوگیری می‌نماید. همچنین تکثیر این گروه از سلول‌ها وابسته به شدت جریان است. مطالعات آزمایشگاهی فراوانی نشان می‌دهند که مواجهه با میدان‌های مغناطیسی حوزه وسیعی از پاسخ‌ها را در سیستم‌های زنده القاء می‌کند.

اثراتی از شدت مواجهه بر تکثیر و تمایز سلولی، تکرار چرخه سلولی، آپوپتوز گزارش شده است. قرار دادن بافتهای تمایز نیافته از بافت پیوندی مزانشیمی جنین‌های موش ۱۴ روزه در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۸ میلی تسلا به مدت ۸ ساعت باعث القای تمایز در بافتهای تمایز نیافته جنین می‌گردد [۲۱]. میدان مغناطیسی با فرکانس پایین ۳۰۰-۲۰۰ هرتز به صورت *In vitro* بر روی سلول‌های آدیپوسیت ترجمه و همانندسازی ژنی را تغییر داده و سرعت تمایز سلولی و فعالیت آنزیمی را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۲۲]. میدان‌های مغناطیسی با فرکانس ۵۰-۶۰ هرتز و شدت ۳ میلی تسلا به مدت ۴ هفته و روزانه ۵ ساعت باعث افزایش فعالیت تکثیری سلول‌های گیرنده نور (شبکیه) خواهند شد [۱۰]. نتایج دیگری نشان داده است که میدان الکترومغناطیس بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش در محیط کشت، میدان ۵۰ هرتز و ۲ میلی تسلا مؤثر بوده است. همچنین نتایج نشان داده که میدان الکترومغناطیس با این اندازه و شدت سبب مهار تکثیر و

افزایش تمایز به استئوبلاست در سلول‌های بنیادی می‌شود [۱۴]. نتایج تحقیق فوق مشابه نتایج این پروژه بوده است که شدت ۱ میلی تسلا تکثیر سلول‌ها را کاهش داده است اما در مورد تمایز متفاوت بوده است. شاید علت تفاوت در تمایز نوع تمایز بوده است. در تحقیق فوق تمایز به استئوبلاست افزایش یافته، در این پروژه تمایز به سلول عصبی در شدت بالا کاهش یافته است. در مطالعه چنگ جی^۱ نتایج مشخص کرد که میدان ۱/۸ میلی تسلا به شدت باعث تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می‌شود. همچنین مشخص شد که میدان بافرکانس ۵۰ هرتز و شدت‌های ۱/۴ تا ۲/۲ میلی تسلا تمایز سلول‌ها را افزایش داده و تکثیر سلول‌ها را کاهش می‌دهد [۲۳]. در این تحقیق نیز نتایج تکثیر با تحقیق فوق یکسان بوده است اما نتایج تمایز متفاوت بوده است. گومرال^۲ نشان داد میدان الکترومغناطیس در القای تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به شبه کاردیومیوسیت‌ها نقش دارد [۲۴]. بارانوفسکا^۳ نشان داد میدان ۱۵ هرتز با شدت ۱ میلی تسلا تمایز استئوژنیک را افزایش و به صورت همزمان از تشکیل سلول‌های چربی ممانعت می‌کند [۲۵]. دیگر نتایج محققین نشان داد میدان مغناطیسی ۶۰ هرتز با شدت ۰/۱ میلی تسلا باعث افزایش تکثیر سلول‌های آستروسیتی خواهد شد [۱۱]. محققین جهت ارائه یک فرمول ریاضی برای اثر تمایزی میدان مغناطیسی بر سلول‌های بنیادی، مقالات بین سالهای ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۰ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که شدت میدان‌های بین ۱۰ تا ۶۰۰ میکروتسلا بیشترین اثر تکثیری را دارند و شدت‌های بین ۹/۴ تا ۱۲ تسلا باعث مرگ سلول‌های بنیادی می‌شوند [۲۶]. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که شدت ۰/۲۵ میلی تسلا کاهش تکثیر را ایجاد می‌کند اما تفاوت معنی‌دار نبود و از شدت ۰/۵ تفاوت تکثیر معنی‌دار بوده است. در حال حاضر به طور کلی پذیرفته

1. Cheng G

2. Gumral

3. Baranowska

شده است که امواج الکترومغناطیس در محدوده فرکانس‌های پایین می‌تواند DNA را جهت سنتز پروتئین‌ها تحریک نماید و یکی از توالی‌های DNA که در اثر امواج الکترومغناطیس تحت تأثیر قرار می‌گیرد نیز شناسایی شده است. ساز و کارهای اینتراکشن امواج الکترومغناطیس با سلول جهت سنتز پروتئین به طور دقیق مشخص نیست. ولی مطالعات نشان می‌دهد که اثرات امواج الکترومغناطیس با سلول می‌تواند به صورت اینتراکشن مستقیم با DNA و یا به صورت اینتراکشن با مسیرهای سیگنالینگ اتفاق بیفتد. پاسخ به استرس در سطح سلولی به گونه دیگری است به طوری که در اثر استرس ساختارهایی مثل DNA و پروتئین‌ها فعال شده و افزایش بیان ژنها پاسخ دهنده به استرس منجر به سنتز پروتئین‌های استرس شده و این پروتئین‌ها ساز و کارهای دفاعی را برای سلول فراهم می‌آورند. شاید بتوان گفت که میدانهای مغناطیسی توالی‌های خاصی از DNA که باعث بیان پروتئین‌های دخیل در تکثیر می‌شود را فعال می‌کند [۲۷]. استفاده از روش غیر تهاجمی و اعمال میدان مغناطیسی فرکانس پایین نشان داد که رشد بافت عصبی تحت تأثیر این میدانها مشابه با زمانی که از فاکتور رشد عصب (NGF) استفاده می‌شود افزایش می‌یابد و اندازه‌گیری سطح کاته‌کول‌آمین‌ها در محیط کشت با آنالیز HPLC حاکی از افزایش سطح دوپامین است. با توجه به دامنه بسیار وسیع شدتها و فرکانسهای میدانهای مغناطیسی و همچنین پیچیدگی‌های ساختار سلول، ساز و کار اینتراکشن بین میدان مغناطیسی و سلول به طور دقیق مشخص نیست. اما مطالعات تأثیر میدانهای مغناطیسی را بر تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی ثابت کرده است. محققین سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی را تحت تأثیر میدان ۱۰۰ میکروتسلا قرار دادند و سپس محیط کشت را از نظر مقدار DNA و فعالیت آلکالاین فسفاتها مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج ارزیابی نشان دهنده تحریک تمایزی این سلولها به سلولهای استئوژنیک بود [۲۳]. همچنین در مطالعه دیگری سلولهای بنیادی مغز استخوان انسانی را به مدت ۷-۱۰ روز و هر روز ۲ ساعت تحت تأثیر میدان با شدت

۱۳۰ میکروتسلا قرار دادند. نتایج نشان داد که میدان با این شدت باعث تکثیر سلولها می‌شود. ثابت شده است که میدانهای مغناطیسی ضعیف نسخه برداری DNA را تحریک می‌کنند اینتراکشن میدان مغناطیسی با الکترونهای موجود در مولکول DNA می‌تواند پایه و اساس شروع نسخه‌برداری باشد. بررسی ساختار مولکولی DNA نشان می‌دهد که دو رشته تشکیل دهنده آن از طریق پیوند هیدروژنی به هم متصل می‌شوند. این پیوند از اشتراک الکترونها بین نیتروژن و یا اکسیژن با هیدروژن (پروتون) تشکیل می‌شود. میدانهای مغناطیسی ضعیف با تحت تأثیر گذاشتن این پیوند باعث جدا شدن دو رشته DNA از هم می‌شوند [۲۷]. این عمل میدان مغناطیسی شبیه به عمل آنزیمهای توپو ایزومراز و پلی‌مرازها است. پیوند هیدروژنی که بین نوکلئوتیدها قرار دارد از پیوند کوالانسی ضعیف‌تر است و در حدود ۵ کیلوکالری بر مول انرژی دارد. میدانهای مغناطیسی ضعیف در حد ۱۰ میکروتسلا می‌توانند باعث گسستن این پیوندها شوند اما طول و زاویه پیوند در اینتراکشن با میدان مغناطیسی و یا آشفتگیهای دیگر نقش بسیار مهمی در پاسخ مولکول دارد. بنابراین امواج الکترومغناطیس قادر است با تأثیر بر روی DNA موجب تکثیر سلولی و یا تمایز آنها گردد [۲۷]. مورگادو^۱ بیان کرد که نفوذ Ca^{++} از طریق کانالهای کلسیمی نوع L ممکن است در پاسخهای درون سلولی به میدانهای مغناطیسی فرکانس پایین باعث القای رشد عصبی شود. از طرف دیگر پروسه‌های تمایزی توسط کانالهای کلسیمی نوع L متوقف می‌شود و در حضور میدانهای مغناطیسی فرکانس پایین تمایز افزایش پیدا می‌کند. تحقیقاتی که بعضی از آنها بیان شد، ثابت می‌کند که میدانهای مغناطیسی فرکانس پایین تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی را تحریک می‌کند [۲۸]. در این تحقیق نیز ما جهت تحریک سلولهای بنیادی و افزایش پتانسیل تکثیری و تمایزی این سلولها از میدان مغناطیسی با شدتهای متفاوت استفاده کردیم و نتایج بسیار با ارزشی را به

1. Morgado

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی سمنان در سال ۱۳۹۲ با کد ۹۲/۲۹۹۵۱۸ بوده است.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارضی در منافع انتشار این مقاله وجود ندارد.

دست آوردیم که یکی از این نتایج تمایز سلولها به نوروں بود. از آنجایی که استفاده از میدان مغناطیسی بسیار کم هزینه و آسان تر از روشهای القائی دیگر است، می توان از این میدانها در بسیاری از مطالعات بالینی جهت تحریک رشد و تمایز سلولها استفاده نمود.

References

- Jadidi M, Biat SM, Sameni HR, Safari M, Vafaei AA, Ghahari L. Mesenchymal stem cells that located in the electromagnetic fields improves rat model of Parkinson's disease. Iranian journal of basic medical sciences. 2016; 19(7):741-748.
- Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annual review of cell and developmental biology. 2001; 17:435-462.
- Wang Y, Peng D, Yang X, Huang P, Ye H, Hui Y, et al. Study on umbilical cord-matrix stem cells transplantation for treatment of acute traumatic brain injury in rats. Turkish neurosurgery. 2019; 29(5):750-758.
- Cakouros D, Gronthos S. Epigenetic regulation of bone marrow stem cell aging: revealing epigenetic signatures associated with hematopoietic and mesenchymal stem cell aging. Aging and disease. 2019; 10(1):174-189.
- Sanchez-Ferras O, Coutaud B, Djavanbakht Samani T, Tremblay I, Souchkova O, Pilon N. Caudal-related homeobox (Cdx) protein-dependent integration of canonical Wnt signaling on paired-box 3 (Pax3) neural crest enhancer. The journal of biological chemistry. 2012; 287(20):16623-16635.
- Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. Nature reviews. Molecular cell biology. 2009; 10(7):468-477.
- Tauriello DV, Haegebarth A, Kuper I, Edelmann MJ, Henraat M, Canninga-van Dijk MR, et al. Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl. Molecular cell. 2010; 37(5):607-619.
- Inoue M, Uchida Y, Edagawa M, Hirata M, Mitamura J, Miyamoto D, et al. The stress response gene ATF3 is a direct target of the Wnt/ β -catenin pathway and inhibits the invasion and migration of HCT116 human colorectal cancer cells. PloS one. 2018; 13(7):1-21.
- Safari M, Jadidi M, Baghian A, Hasanazadeh H. Proliferation and differentiation of rat bone marrow stem cells by 400 μ T electromagnetic field. Neuroscience letters. 2016; 612:1-6.
- Niederer P, Fankhauser F. Theoretical and practical aspects relating to the photothermal therapy of tumors of the retina and choroid: a review. Technology and health care. 2016; 24(5):607-626.
- Clarke D, Penrose MA, Penstone T, Fuller-Carter PI, Hool LC, Harvey AR, et al. Frequency-specific effects of repetitive magnetic stimulation on primary astrocyte cultures. Restorative neurology and neuroscience. 2017; 35(6):557-569.
- Azeemi ST, Shaikat SF, Azeemi KS, Khan I, Mahmood K, Naz F. Effect of visible range electromagnetic radiations on Escherichia Coli. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines. 2017; 14(1):24-31.
- Ma F, Li W, Li X, Tran BH, Suguro R, Guan R, et al. Novel protective effects of pulsed electromagnetic field ischemia/reperfusion injury rats. Bioscience reports. 2016; 36:1-12.
- Redeker JI, Schmitt B, Grigull NP, Braun C, Büttner A, Jansson V, et al. Effect of electromagnetic fields on human osteoarthritic and non-osteoarthritic chondrocytes. BMC complementary and alternative medicine. 2017; 17(1):1-8.
- Duan Y, Wang Z, Zhang H, He Y, Lu R, Zhang R, et al. The preventive effect of lotus seedpod procyanidins on cognitive impairment and oxidative damage induced by extremely low frequency electromagnetic field exposure. Food & function. 2013; 4(8):1252-1262.

16. Fan C, Wang D, Zhang Q, Zhou J. Migration capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells towards glioma in vivo. *Neural regeneration research*. 2013; 8(22):2093-2102.
17. Doan CC, Le TL, Hoang NS, Doan NT, van Le D, Do MS. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Iranian biomedical journal*. 2014; 18(2):67-75.
18. Liu G, Wang L, Pang T, Zhu D, Xu Y, Wang H, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells regulate thymic epithelial cell development and function in Foxn1(-/-) mice. *Cellular & molecular immunology*. 2014; 11(3):275-284.
19. Ameredes BT, Hellmich MR, Cestone CM, Wooten KC, Ottenbacher KJ, Chonmaitree T, et al. The Multidisciplinary Translational Team (MTT) model for training and development of translational research investigators. *Clinical and translational science*. 2015; 8(5):533-541.
20. Lim S-W, Loh H-S, Ting K-N, Bradshaw TD, Allaudin ZN. Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Tropical life sciences research*. 2015; 26(1):111-120.
21. Cossarizza A, Monti D, Bersani F, Cantini M, Cadossi R, Sacchi A, et al. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989; 160(2):692-698.
22. Zwirska-Korczala K, Jochem J, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Polaniak R, Birkner E, et al. Effect of extremely low frequency of electromagnetic fields on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes--an in vitro study. *Journal of physiology and pharmacology*. 2005; 56 Suppl 6:101-108.
23. Cheng G, Chen K, Li Z, Zhou J, Wei Z, Bai M, et al. Enhancement of osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats by sinusoidal electromagnetic fields. *Journal of biomedical engineering*. 2011; 28(4):683-688.
24. Gumral N, Saygin M, Asci H, Uguz AC, Celik O, Doguc DK, et al. The effects of electromagnetic radiation (2450 MHz wireless devices) on the heart and blood tissue: role of melatonin. *Bratislavske lekarske listy*. 2016; 117(11):665-671.
25. Baranowska A, Skowron B, Nowak B, Ciesielczyk K, Guzdek P, Gil K, et al. Changes in viability of rat adipose-derived stem cells isolated from abdominal/perinuclear adipose tissue stimulated with pulsed electromagnetic field. *Journal of physiology and pharmacology*. 2017; 68(2):253-264.
26. Viganò M, Sansone V, d'Agostino MC, Romeo P, Perucca Orfei C, Girolamo L de. Mesenchymal stem cells as therapeutic target of biophysical stimulation for the treatment of musculoskeletal disorders. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2016; 11(1):1-8.
27. Bergues-Pupo AE, Bergues JM, Falo F. Modeling the interaction of DNA with alternating fields. *Physical review*. 2013; 87(2).
28. Rosen BQ, Krishnan GP, Sanda P, Komarov M, Sejnowski T, Rulkov N, et al. Simulating human sleep spindle MEG and EEG from ion channel and circuit level dynamics. *Journal of neuroscience methods*. 2019; 316:46-57.

The effect of electromagnetic field on proliferation and differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem-cells to neurons

Laya Ghahari¹, *Manouchehr Safari², Majid Jadidi³

Abstract

Background: Today, due to ever-expanding of using electronic systems and electromagnetic fields in the living environment and it can be used in treatment of some neurological disorders. The aim of this study was to investigate the effects of electromagnetic waves on cord blood stem cells.

Materials and methods: The newborn's umbilical cord was transferred to a cell culture laboratory under sterile conditions. Then, using hyaluronidase, trypsin and collagenase enzymes, the cells were separated and cultured. For purification and removal of additional cells, the flasks were passaged three times. Then, flasks were incubated in the incubator with electromagnetic waves at a frequency of 50 Hz and intensity 0.25, 0.5, and 1 millitesla, two hours per day for a consecutive 14 days. Then, neuronal specific antibodies and MTT assay were tested for neuronal proliferation and differentiation of the cells.

Results: The results showed that the intensity of 0.5 and 1 significantly decreased the number of cells, but in the 0.25 millitesla, there was no significant decrease in the number of cells in comparison with the control group. In addition, differentiation was observed only in 0.25 and 0.5 millitesla groups, but not in group 1 millitesla.

Conclusion: The results of this study indicate that electromagnetic waves can differentiate and expand the umbilical mesenchymal stem cells.

Keywords: Electromagnetic Waves, Mesenchymal Stem Cells, Umbilical Cord, Neurons

1. Assistant professor, Department of Anatomy, School of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Professor, Neuronal Stem cell Research Center, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
(*Corresponding author)
safari@semums.ac.ir

3. Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran