مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، ۷۱-۷۹

تاثیر هم‌زمان اکسید نیتریک و میدان الکترومغناطیسی بر میزان تکثیر و تغییر مورفولوژی سلول‌های بنیادی استرومایی

نازنین حقیقت .Ph.D. Student [۱]، پرویز عبدالمالکی .Ph.D [۲*]

۱- دانشجوی دکتری گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۱۷۵/۱۴۱۱۵، تهران.
۲- دانشیار گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۱۷۵/۱۴۱۱۵، تهران.
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: parviz@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷

چکیده

هدف: میدان الکترومغناطیسی به‌عنوان یک عامل محرک فیزیکی خواه و ناخواه فرآیندهای سلولی را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد. در مطالعه‌ی حاضر تغییر مورفولوژی و سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی در حضور میدان الکترومغناطیسی (EMF) و مولکول پیامبر اکسید نیتریک (NO) بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بعد از جداسازی سلول‌های بنیادی استرومایی از مغز استخوان موش صحرایی و تکثیر و واکشت سلول‌ها، به محیط کشت آن‌ها Deta-NO اضافه شد و سلول‌ها با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۲۰ میلی تسلا تیمار شدند. برای تخمین میزان رشد سلول‌ها از روش سنجش MTT استفاده شد. برای تخمین درصد سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی و تاثیرپذیری توسط اکسید نیتریک و EMF، محتویات DNA سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری محاسبه شد.

نتایج: نتایج نشان داد که میدان الکترومغناطیسی در حضور مولکول سیگنالینگ NO میزان رشد سلول‌ها را کاهش می‌دهد که این کاهش رشد به غلظت بالا و پایین NO وابسته است و باعث توقف چرخه سلولی در فاز G2 می‌شود. همچنین EMF و NO تاثیر مهمی را روی تغییر شکل و تحرک سلول‌های بنیادی می‌گذارد.

نتیجه‌گیری: کاهش رشد و تغییر شکل سلول‌ها می‌تواند مقدمه‌ای برای رفتن سلول‌ها به سمت تمایز باشد.

واژگان کلیدی: میدان الکترومغناطیسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اکسید نیتریک، فلوسایتومتری

مقدمه

سلول‌های استرومایی مغز استخوان که همچنین به‌عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان شناخته شده‌اند شامل جمعیتی از سلول‌های بنیادی بالغ (چندتوان) می‌باشند که قابلیت تمایز به چندین رده‌ی سلولی از جمله چربی، استخوان و غضروف را دارند (۱). این سلول‌ها به‌دلیل داشتن قدرت تکثیر گسترده در محیط کشت و در عین حال دارا بودن پتانسیل تمایزی انتخاب‌های جذابی در تولید دوباره‌ی بافت‌ها می‌باشند و در ترمیم بافت، رگ‌زایی و درمان بیماری‌هایی نظیر پارکینسون و هانتینگتون کاربرد دارند (۲). فاکتورهای بیوشیمیایی ویژه شامل عوامل رونویسی، مولکول‌های پیامبر (۳)، فاکتورهای رشد، نوروتروفین‌ها، سیتوکین‌ها یا ترکیبات شیمیایی ویژه مثل مرکاپتواتانول (۴) قادر به تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌سمت سلول‌های عصبی هستند. میدان الکتریکی و مغناطیسی به‌عنوان یک ابزار فیزیکی مناسب برای تحریک تمایز سلول‌های بنیادی به‌سمت سلول‌های عصبی پیشنهاد شده است. تیمار سلول‌ها با میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی با افزایش نرخ گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (oxygen/ nitrogen species Reactive) می‌تواند فرآیندهای سلولی را تغییر دهد (۵).

فاکتورهای فیزیکی مثل میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی ممکن است سطح تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی را کنترل کنند. در موافقت با این ادعا مطالعات اخیر نشان داده است که میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس فوق العاده پایین ۰ تا ۱۰۰ هرتز روی تعداد زیادی از عملکردهای زیستی ازجمله تمایز سلول (۶)، بیان ژن (۷) و سرنوشت سلول تاثیر می‌گذارند و رها سازی فاکتورهای موردنیاز برای رشد را تنظیم و فرآیندهای تمایز را تحریک می‌کنند (۸). در طی فرآیند رشد و نمو، میدان‌های الکتریکی در شکل‌گیری جریان‌های یونی بین سلولی و درون سلولی نقش دارند. با اینکه میدان‌های الکتریکی درونی در تمایز و شکل‌گیری همه بافت‌های حیوانی نقش دارند، وجود آن‌ها و اثر پتانسیلی آن‌ها روی شکل‌گیری و ترمیم بافت کاملا نادیده گرفته شده است. سیستم‌های زنده به صورت مداوم در حرکت هستند و تغییر در میدان الکتریکی باعث تولید میدان مغناطیسی درونی می‌شود. تیمار سلول‌ها با میدان الکترومغناطیسی همچنین می‌تواند باعث تغییر در نفوذپذیری غشای سلول شود. پروتئین‌های کانال‌های دریچه‌دار ولتاژی (voltage-gate) تحرکاتی دارند که می‌توانند باز یا بسته شوند و عبور یون‌ها را از میان کانال تنظیم کنند. کنفورماسیون این پروتئین‌ها در پاسخ به فاکتورهای خارجی نظیر میدان الکترومغناطیسی دستخوش تغییر می‌شود که این تغییر می‌تواند روی عملکرد کانال‌ها و عبور یون‌ها از کانال و درنتیجه تغییر اختلاف پتانسیل غشا تاثیرگذار باشد (۹).

اکسید نیتریک یک رادیکال آزاد دو اتمی و یکی از مهم‌ترین مولکول‌های پیامبر در فیزیولوژی پستانداران است که بسیاری از فرآیندهای سلولی نظیر فشار خون، پاسخ ایمنی، انتقال نوروترانسمیترها و مکانیسم‌های حساس به اکسیداسیون را تنظیم می‌کند (۱۰). این مولکول پیامبر همچنین در تنظیم رشد سلول، بقا، آپوپتوزیس، تکثیر و تمایز سلول نقش دارد (۱۱). اکسید نیتریک (NO) توسط گروهی از آنزیم‌ها به‌نام نیتریک اکسید سنتاز (NOS) ساخته می‌شود که آرژنین را به سیترولین تبدیل و NO را تولید می‌کند (۱۲). همچنین NO با مولکول‌هایی مثل اکسیژن، سوپراکسید، فلزات، نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها واکنش می‌دهد. برهم‌کنش NO با گونه‌های فعال اکسیژن منجر به تغییرات پس از ترجمه روی پروتئین‌ها نظیر نیتروزیشن و نیتریشن و اثر روی فعالیت پروتئین می‌شود (۱۳). اثر NO روی فرآیندهای سلولی به غلظت آن و حضور رادیکال‌های آزاد دیگر وابسته است. غلظت پایین NO روی فرآیندهایی مثل تکثیر سلولی و بقا تاثیر مستقیمی می‌گذارد، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر NO از طریق استرس‌های اکسیداتیو و نیتروزاتیو اثرات غیرمستقیمی روی سلول اعمال می‌کند (۱۴).

اکسید نیتریک نقش مهمی را در نورون‌زایی جنین بازی می‌کند. عملکرد NO در نورون‌زایی و تشکیل سیستم عصبی مرکزی ممکن است به نقش آن در مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول یا کنترل تکثیر سلولی وابسته باشد (۱۵). در بعضی از مطالعات نشان داده شده که عملکرد ضد تکثیری NO پیش نیازی برای تمایز است (۱۶).

در این مطالعه اثر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین ۵۰ هرتز و شدت ۲۰ میلی‌تسلا (۱۷ و ۱۸) روی مورفولوژی، میزان تکثیر و چرخه‌ی سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف اکسید نیتریک بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

موش صحرایی نژاد ویستار (Wistar rat) با وزن ۲۴۰ تا ۲۶۰ گرم از آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس خریداری شد. از مغز دو استخوان ساق و ران موش صحرایی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌همراه سلول‌های پیش‌ساز خونی استخراج شد. این سلول‌ها در محیط کشت alpha-Mem دارای ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS-Gibco)، ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین استرپتومایسین و ۱ درصد فونجیزون (عامل ضد قارچ) در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و گاز دی‌اکسیدکربن

(CO_2) ۵ درصد و رطوبت نرمال به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت کشت داده شدند. بعد از این مدت زمان محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. با هر بار تعویض محیط کشت و شستشوی سلول‌ها با بافر سالین (PBS) سلول‌های خونی که غیر چسبان بودند و در محیط کشت شناور می‌ماندند از محیط کشت حذف می‌شدند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبان در محیط کشت باقی می‌ماندند. بعد از هر بار پر شدن سلول در کف فلاسک، سلول‌ها واکشت داده می‌شدند. بعد از ۴ تا ۵ بار واکشت و مطمئن شدن حذف سلول‌های پیش‌ساز خونی، بررسی‌های لازم روی سلول‌های بنیادی انجام گرفت. برای تعیین مارکرهای مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی تست فلوسایتومتری انجام شد (۱۹). از میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز استفاده شد و همچنین اثر اکسید نیتریک در غلظت پایین ۱۰ میکرومولار و غلظت بالای ۱ میلی‌مولار روی درصد زنده ماندن سلول‌های بنیادی بررسی گردید. Deta-NO به‌عنوان یک ترکیب شیمیایی آزادکننده‌ی اکسید نیتریک از شرکت Abcam آمریکا خریداری و به محیط کشت اضافه شد. رتینوئیک‌اسید به‌عنوان ترکیب القاکننده تمایز سلول‌های بنیادی به‌سمت سلول‌های شبه عصب از شرکت Sigma آمریکا خریداری شد و از غلظت ۱۰ میکرو مولار این ماده در انجام آزمایشات استفاده شد (۲۰).

از تست MTT برای سنجش درصد بقای سلول‌های بنیادی تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی و اکسید نیتریک در ۵ بازه‌ی زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت استفاده شد. در هر خانه پلیت ۹۶ خانه، ۵۰۰۰ سلول بنیادی برده شد. بعد از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، سلول‌ها با غلظت بالا و پایین اکسید نیتریک و رتینوئیک اسید تیمار شدند و سلول‌ها در میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۲۰ میلی تسلا برده شدند. گروه‌های انتخابی عبارتند از: ۱. گروهی که هیچ تیماری نمی‌دید (شاهد)، ۲. گروهی که در حضور اکسید نیتریک با غلظت بالا بود (NO mac)، ۳. گروهی که با نیتریک اکسید با غلظت پایین تیمار داده می‌شد (NO mic)، ۴. گروهی که با رتینوئیک اسید تیمار داده می‌شد (Ret)، ۵. گروهی که در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار داده شد (EMF)، ۶. گروهی که در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار گرفت و با غلظت بالا و یا پایین NO تیمار داده شد. ۷. گروهی که در معرض میدان قرار گرفت و با رتینوئیک اسید تیمار داده شد. و ۸. گروهی که با رتینوئیک اسید و NO با غلظت بالا یا پایین تیمار داده شد و همزمان در معرض میدان الکترومغناطیسی قرار گرفت.

بعد از تیمار ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت حاوی نمک تترازولیوم تعویض گردید و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور در حضور نمک تترازولیوم (خریداری شده از شرکت Sigma) انکوبه شدند. نمک تترازولیوم به منظور سنجش میزان مرگ سلول‌ها استفاده شد. بعد از ۳ ساعت محیط کشت حاوی نمک خالی و روی سلول‌ها دی متیل سولفاکساید (DMSO) ریخته و جذب سلول‌ها در دو طول موج ۵۴۰ و ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

بعد از تیمار سلول‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت با اکسید نیتریک، رتینوئیک‌اسید و میدان الکترومغناطیسی درصد چرخه‌ی سلولی به کمک دستگاه فلوسایتومتری تعیین شد. به‌منظور انجام این آزمایش، سلول‌های تیمار شده تریپسینه و سانتریفیوژ شدند و سپس با بافر سالین شسته و با رنگ پروپیدیوم یدید (PI) انکوبه شدند و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری درصد هر یک از فازهای چرخه سلولی تعیین شد و با نرم‌افزار flowing software تحلیل شد.

آنالیز آماری

کلیه‌ی آزمایش‌ها با سه بار تکرار صورت گرفت. با کمک نرم‌افزار excel 2013 برای تمام داده‌ها میانگین و انحراف معیار محاسبه شد. معنی‌دار بودن یافته‌های حاصل با استفاده از t.Test در سطح $p \leq ۰/۰۵$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه تاثیر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۲۰ میلی تسلا در حضور و عدم حضور اکسید نیتریک روی درصد زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی و تعیین درصد چرخه‌ی سلولی بررسی شد.

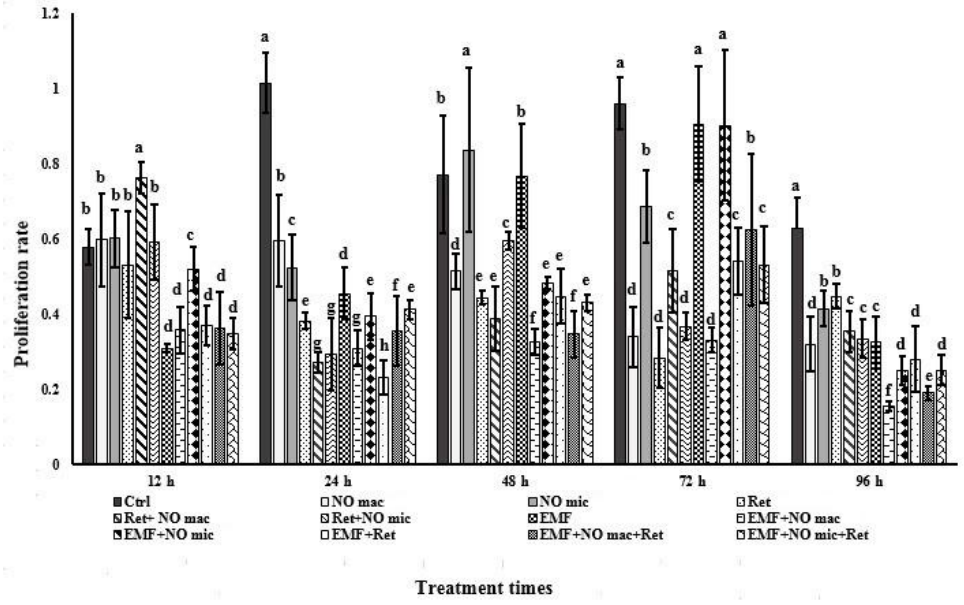
در اکثر گروه‌ها نسبت به گروه شاهد میدان الکترومغناطیسی در حضور اکسید نیتریک باعث افزایش درصد مرگ و میر سلول‌های بنیادی مزانشیمی شد که این تاثیر در حضور NO با غلظت پایین کمتر و در حضور NO با غلظت بالا بیشتر است.

بعد از ۱۲ ساعت تیمار با میدان الکترومغناطیسی و اکسید نیتریک درصد زنده ماندن سلول‌ها در اکثر گروه‌ها روند کاهشی داشته است. در گروه‌های تیمار شده با اکسید نیتریک با غلظت بالا و پایین و گروه تیمار شده با رتینوئیک اسید و نیتریک اکسید به‌صورت هم‌زمان، رشد سلول‌ها بعد از ۱۲ ساعت تیمار افزایش یافته است (نمودار ۱).

بعد از ۲۴ ساعت تیمار در گروه‌هایی که فقط اکسید نیتریک یا رتینوئیک‌اسید دریافت کرده بودند یا در حضور هر دو قرار داشتند درصد زنده ماندن سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش

معنی‌داری را از خود نشان داد (نمودار ۱).

بعد از ۲۴ ساعت تیمار، میدان الکترومغناطیسی به تنهایی باعث کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها به‌صورت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل شد (نمودار ۱).



نمودار۱: نرخ تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از تیمار با میدان الکترومغناطیسی، اکسید نیتریک و رتینوئیک‌اسید در بازه‌های زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت. حروف غیریکسان نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

در سایر گروه‌هایی که میدان الکترومغناطیسی را دریافت می‌کردند و با اکسید نیتریک یا رتینوئیک اسید یا هر دو تیمار می‌شدند بعد از ۲۴ ساعت تیمار درصد زنده ماندن سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش یافت که این کاهش در گروهی که رتینوئیک اسید را به‌همراه میدان الکترومغناطیسی دریافت می‌کرد و گروهی که با NO با غلظت بالا به همراه EMF تیمار می‌شد نسبت به سایر گروه‌ها شدیدتر بود (نمودار ۱).

بعد از ۴۸ ساعت تیمار با اکسید نیتریک و رتینوئیک اسید نتایج نشان داد که در گروهی که اکسید نیتریک با غلظت پایین را دریافت می‌کرد نسبت به گروه کنترل درصد زنده ماندن سلول‌ها افزایش یافته است در واقع غلظت پایین اکسید نیتریک بعد از ۴۸ ساعت باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها شده است. اما در سایر گروه‌هایی که اکسید نیتریک با غلظت بالا یا رتینوئیک اسید یا هر دو را دریافت می‌کردند درصد زنده ماندن سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (نمودار ۱).

بعد از ۴۸ ساعت تیمار با میدان الکترومغناطیسی درصد زنده ماندن سلول‌ها در همه‌ی گروه‌هایی که EMF را دریافت می‌کردند کاهش یافت که این کاهش در گروه‌های ترکیبی نمود بیشتری داشته است (نمودار ۱).

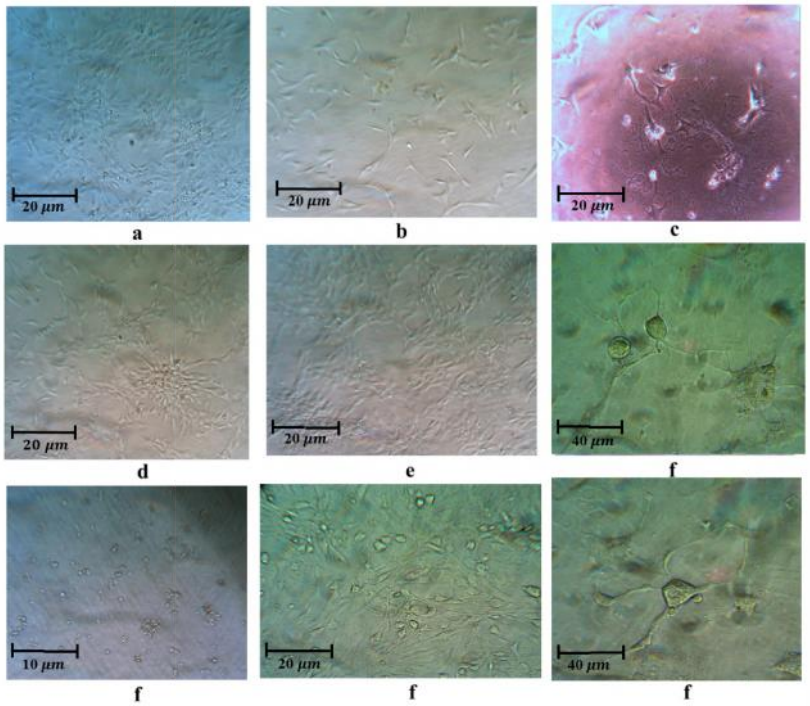
بعد از ۷۲ ساعت تیمار در حضور نیتریک اکسید و رتینوئیک اسید یا هر دو درصد مرگ و میر سلول‌های بنیادی نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش در گروهی که NO با غلظت پایین را دریافت کرده است کمتر و در گروهی که NO با غلظت بالا و رتینوئیک اسید را دریافت کرده است شدیدتر است (نمودار ۱).

بعد از ۷۲ ساعت تیمار با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز درصد زنده ماندن سلول‌ها در همه‌ی گروه‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش یافت که در گروهی که NO با غلظت بالا یا رتینوئیک اسید یا هر دو را در حضور EMF دریافت کرده‌اند این کاهش معنی‌دار بود (نمودار ۱).

تیمار ۹۶ ساعت با میدان الکترومغناطیسی و اکسید نیتریک نیز باعث کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها در اکثر گروه‌ها شده است (نمودار ۱).

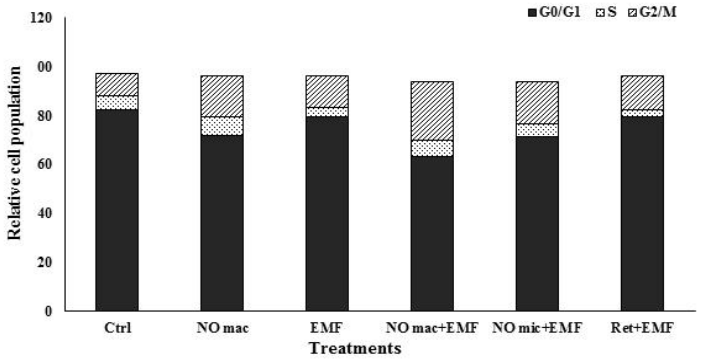
میدان الکترومغناطیسی و اکسید نیتریک با غلظت بالا بعد از ۴۸

ساعت تیمار باعث افزایش تحرک و مهاجرت سلول‌های بنیادی شده است و همچنین باعث شد که شکل سلول‌ها نسبت به گروه کنترل تغییر کند و سلول دارای زائده‌های شبه دندریتی شود (شکل ۱).

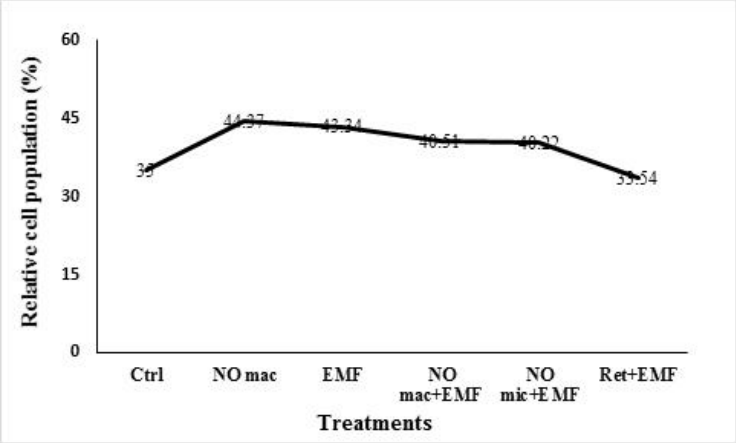


شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از قرارگیری در میدان الکترومغناطیسی و تیمار با اکسید نیتریک و رتینوئیک اسید. a) گروه شاهد، b) گروه تیمار شده با Ret +EMF، c) گروه تیمار شده با غلظت بالای NO، d) گروه تیمار شده با EMF، e) گروه تیمار شده با EMF و غلظت پایین اکسید نیتریک ، f) گروه تیمار شده با EMF و غلظت بالای اکسید نیتریک

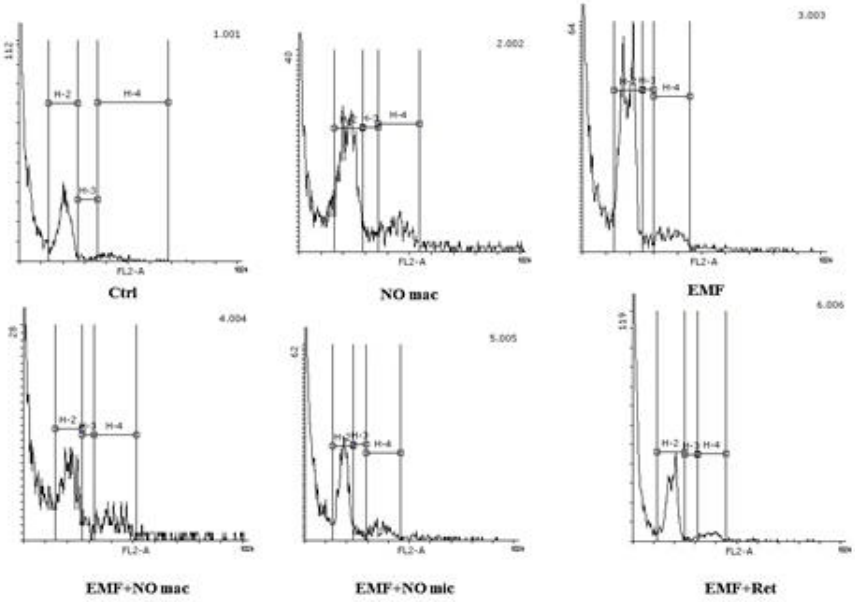
بعد از ۴۸ ساعت تیمار با میدان الکترومغناطیسی و اکسید نیتریک، ۶ گروه کلیدی برای تعیین درصد چرخه‌ی سلولی انتخاب شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که در همه‌ی گروه‌ها درصد سلول‌های موجود در فاز G0/G1 نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. درصد سلول‌های موجود در فاز S در همه‌ی گروه‌ها به جز گروه تیمار داده شده با غلظت بالای NO و گروه تیمار داده شده با غلظت بالای NO و EMF نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. درصد سلول‌های موجود در فاز G2 نیز در همه‌ی گروه‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. همچنین درصد سلول‌های موجود در فاز sub G1 در همه‌ی گروه‌ها به‌جز گروه تیمار داده شده با رتینوئیک اسید و EMF نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (نمودار۲، ۳، ۴).



نمودار ۲: درصد سلول‌های موجود در هرکدام از فازهای چرخه‌ی سلولی بعد از اعمال تیمارهای مختلف



نمودار ۳: درصد سلول‌های موجود در فاز sub G1 بعد از اعمال تیمارهای مختلف



نمودار ۴: درصد چرخه‌ی سلولی گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار flowing software

بحث

پاسخ‌های سلولی در غلظت‌های مختلف اکسید نیتریک به‌صورت متفاوتی تنظیم می‌شوند، NO در غلظت پیکو تا نانومولار در محیط درون تنی (in vivo) معمولا تکثیر و بقای سلولی را تحریک می‌کند. در حالی‌که در سطح میلی‌مولار به توقف چرخه‌ی سلولی، آپوپتوزیس و پیری منجر می‌شود (۲۱). در یک مطالعه نشان داده شد که SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-D, L-Penicillamine) به‌عنوان یک مولکول‌دهنده‌ی NO در دامنه‌ی غلظتی ۱۰ تا ۵۰ میکرومولار، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را علیه آپوپتوزیس خودبخودی از طریق تحریک فعالیت پروتئین کیناز G وابسته به cGMP حفاظت می‌کند (۲۲). با رهاسازی NO در غلظت‌های پایین، پروتئین کیناز G فعال می‌شود و درصد زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش می‌دهد. کمبود فعالیت پروتئین کیناز G میزان تکثیر سلولی را کاهش می دهد (۲۲).

در این مطالعه نشان داده شد که غلظت بالای NO تکثیر سلول‌ها را به‌صورت معنی‌داری کاهش اما غلظت پایین NO تکثیر سلولی را به‌ویژه در زمان ۴۸ ساعت افزایش می‌دهد .

اکسید نیتریک با نقش آپوپتوزیس خود، رشد سلول را مهار می‌کند. گزارش‌های پیشین نشان داده‌اند که NO روی بسیاری از پروتئین‌های چرخه سلولی شامل سیکلین‌ها، کیناز ۲ وابسته به سیکلین (CDK2)، مهارکننده ۱ کینازی وابسته به سیکلین (p21) و پروتئین رتینوبلاستوما اثر می‌گذارد که NO می‌تواند از هر دو مسیر وابسته به cGMP و مستقل از آن این تاثیر را اعمال کند (۲۳). میانجی‌گرهای توقف تکثیر سلولی در مسیر وابسته به cGMP، نیتروزیشن، تیروزین نیتریشن و بعضی از واکنش‌های اکسیداتیو/نیتروزاتیو هستند (۲۳).

در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که بعد از تیمار با SNAP، تغییرات میتوکندریایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش با القای آپوپتوزیس از طریق فعالیت کاسپاز ایجاد می‌شود (۲۴).

همچنینNO مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را از طریق افزایش بیان فاکتور ۱ آلفا تحریک‌کننده تسهیل می‌کند (۲۵). در یک بررسی مهاجرت سلول‌های بنیادی در حضور SNAP دیده شد. رهاسازی NO باعث افزایش پروتئین دسمین اسکلت سلولی می‌شود درحالی‌که سطح اکتین شبکه اسکلتی را کاهش می‌دهد. NO با اثر روی پروتئین‌کیناز G (PKG) فسفوپروتئین تحریک‌کننده‌ی گشادکننده عروق (VASP5) را فسفوریله می‌کند. این پروتئین یک تنظیم کننده کلیدی در چندین فرآیند وابسته به اکتین شبکه اسکلتی مثل اندازه سلول، چسبندگی و پهن شدن سلول است. زمانی‌که سرین ۲۳۹ VASP توسط PKG فسفوریله می‌شود اتصال آن به فیبرهای اکتین کاهش می‌یابد و اتصال سلولی و گسترش آن مهار می‌شود (۲۶ و ۲۷). تحت موقعیت‌های استرس‌اکسیداتیو NO و پراکسی نیتریت با تغییر شکل ساختار پروتئین‌های شبکه اسکلتی از طریق S-نیتروزیلیشن گروه‌های تیول آن‌ها می‌توانند روی تحرک سلولی اثر بگذارند (۲۸). کاهش در اندازه سلول و توزیع مجدد پروتئین‌های شبکه اسکلتی ممکن است همچنین یک تغییر اولیه برای تمایز سلول‌های بنیادی باشد (۲۹).

در این مطالعه نشان داده شد که غلظت بالای NO هم باعث تغییر شکل سلول‌ها و هم باعث جدا شدن سلول ها از کف فلاسک و از این طریق افزایش تحرک و مهاجرت سلول‌ها می‌شود.

اثرات میدان الکترومغناطیسی به پارامترها و پروتکل‌های مختلف تیمار مانند زمان تیمار، شدت و فرکانس میدان وابسته است. در یک مطالعه نشان داده شد که تیمار با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس فوق‌العاده پایین با اثر روی بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها سرعت تکثیر سلول‌ها را افزایش داد (۳۰). در بررسی دیگر دینیز و همکاران (۳۱) نشان دادند که EMF با فرکانس ۱۵ هرتز و شدت ۰/۶ میلی تسلا رشد سلول‌ها را به واسطه‌ی افزایش سنتز اکسید نیتریک افزایش می‌دهد. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که EMF می‌تواند پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را افزایش و رشد سلول‌ها را کاهش دهد (۳۲). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که تیمار با میدان الکترومغناطیسی با شدت ۲ میلی‌تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز cAMP درون سلولی را افزایش می‌دهد و تکثیر سلولی را مهار می‌کند (۳۳).

در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد که حضور میدان الکترومغناطیسی تاثیر به‌سزایی روی افزایش درصد مرگ و میر سلول‌های تیمار شده با رتینوئیک‌اسید و NO با غلظت بالا گذاشت.

بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که میدان الکترومغناطیسی روی سیالیت و اختلاف پتانسیل غشای سلول تاثیر می‌گذارد و باز و بسته شدن کانال‌های کلسیمی دریچه دار ولتاژی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به افزایش یون کلسیم درون سلولی می‌شود، افزایش غلظت یون کلسیم درون سلولی می‌تواند فعالیت نیتریک اکسید سنتاز وابسته به کلسیم /کالمودولین را تشدید و میزان اکسید نیتریک درون سلولی را افزایش دهد (۳۴).

با توجه به نتایج فلوسایتومتری می‌توان نتیجه گرفت که افزایش درصد سلول‌ها در فاز S یا G2/M با افزایش درصد سلول‌ها در فاز sub G1 همراه است. اکسید نیتریک به‌همراه میدان الکترومغناطیسی و رتینوئیک اسید باعث توقف چرخه‌ی سلولی در فاز S و G2/M شده است. (۳۵). اما در گروه تیمار داده شده با Ret +EMF افزایش درصد سلول‌ها در فاز S و G2/M با کاهش فاز sub G1 همراه است که نشانگر این است که سلول به‌سمت فرآیند ترمیم رفته است.

کاهش رشد سلول‌ها همراه با تغییر مورفولوژی سلول‌ها در حضور اکسید نیتریک با غلظت بالا و میدان الکترومغناطیسی و توقف چرخه‌ی سلولی می‌تواند مقدمه‌ای برای رفتن سلول به‌سمت فرآیند تمایز باشد.

نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که میدان الکترومغناطیسی درصد مرگ و میر سلول‌ها را به‌صورت معنی‌دار افزایش می‌دهد که این اثر در حضور NO تشدید می‌شود. حضور میدان الکترومغناطیسی با افزایش بیشتر سیالیت و نفوذپذیری غشا باعث ورود و اثرگذاری بیشتر NO در محیط درون سلولی، اثر روی رشد سلول، شکل سلول و آپوپتوزیس و درنهایت هدایت سلول به سمت فرآیند تمایز شده است.

تشکر و قدردانی

مطالعه ی حاضر توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به شماره طرح۹۵۸۱۵۶۶۵از نظر مالی پشتیبانی شد.

منابع

1. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, etal. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell. 2007; 131(2): 324–336.
2. Lindvall O, Barker RA, Brustle O, Isacson O, et al. Clinical translation of stem cells in neurodegenerative disorders. Cell Stem Cell. 2012; 10: 151– 155.
3. Ceccarelli G, Bloise N, Mantelli M, Gastalki G, et al. A comparative analysis of the in vitro effects of pulsed electromagnetic field treatment on osteogenic differentiation of two different mesenchymal cell lineages. Biores. 2013; 2(4): 283–294.
4. Park J, Seo Y, Yoon H, Kim C, et al. Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation. Neurochemistry International. 2013; 62: 418–424.
5. Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, et al. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. Bone Marrow Res. 2011; 10: 207-326.
6. Funk RH, Monsees TK, Ozkucur N. Electromagnetic effects — from cell biology to medicine. Prog Histochem Cytochem. 2009; 43(4): 177–246.
7. Mousavi M, Baharar J, Shahrokhabadi K. The synergic effects of Crocus sativus L. and low frequency electromagnetic field on VEGFR2 gene expression in human breast cancer cells. Avicenna J Med Biotechnol. 2014; 6(2): 123–127.
8. Funk RH, Monsees TK. Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. Cells Tissues Organs. 2006; 182(2): 59–78.
9. Sherwood L, Klandorf H, Yancey P. Animal Physiology: From Genes to Organisms. Thomson Brooks/Cole Ch. 2005; 2: 95–100.
10. Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO)-biogeneration, regulation, and relevance to human diseases. Front Biosci. 2003; 8: 264–78.
11. Wimalawansa SJ, Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. Skeletal effects of nitric oxide: novel agent of osteoporosis. Principles of Bone Biology. 2008; 3: 1275–1310.
12. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 2001; 357(3): 593–615.
13. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. Free Radic Biol Med. 2008; 45(1):18–31.
14. Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. Arch Pharm Res. 2009; 32: 1119–1126.
15. Bicker G. Stop and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. Bioessays. 2005; 27(5): 495–505.
16. Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, et al. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. Dev Biol. 2003; 258(2): 319–333.
17. Di Loreto S, Falone S, Caracciolo V, Sebastiani P, et al. Fifty hertz extremely low-frequency magnetic field exposure elicits redox and trophic response in rat-cortical neurons. Cell Physiol. 2009; 219(2): 334-343.
18. Falone S, Mirabilio A, Carbone MC, Zimmitti V, et al. Exposure to 50 Hz magnetic fields causes a significant weakening of antioxidant defence systems in aged rat brain. Biochem Cell Biol. 2008; 40: 2762-2770.
19. Javani Jouni F, Abdolmaleki P, Movahedin M. Investigation on the effect of static magnetic field up to 15 mT on the viability and proliferation rate of rat bone marrow stem cells. In Vitro Cell. 2013; 49: 212–219.
20. Jin W, Xing YQ, Yang AH, Yang YN, et al. Differentiation and apoptosis effects of all-trans retinoic acid on inducing umbilical cord mesenchymal stem cells into neuron-like cells. Zhonghua Yan Ke Za Zhi. 2010; 46: 542-549.
21. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. Carcinogenesis. 2013; 34(3): 503–512.
22. Wong JC, Fiscus RR. Essential roles of the nitric oxide (NO)/cGMP/protein kinase G type-I (PKG-I) signaling pathway and the atrial natriuretic peptide (ANP)/cGMP/ PKG-I autocrine loop in promoting proliferation and cell survival of OP9 bone marrow stromal cells. J Cell Biochem. 2011; 112(3): 829–839.
23. Martinez Ruiz A, Cadenas S, Lamas S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and non-classical mechanisms. Free Radic Biol Med. 2011; 51(1): 17–29.
24. Taylor EL, Li JT, Tupper JC, Rossi AG, et al.

GEA 3162, a peroxy nitrite donor, induces Bcl-2-sensitive, p53-independent apoptosis in murine bone marrow cells. Biochem Pharmacol. 2007; 74: 1039–1049.
25. Li N, Lu X, Zhao X, Xiang FL, et al. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via up regulation of stromal cell-derived factor-1alpha.Stem Cells. 2009; 27: 961–970.
26. Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, et al. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. Annu Rev Cell Dev Biol. 2003; 19: 541–564.
27. Defawe OD, Kim S, Chen L, Huang D, et al. VASP phosphorylation at serine239 regulates the effects of NO on smooth muscle cell invasion and contraction of collagen. J Cell Physiol. 2010; 222(1): 230–237.
28. Ascenzi P, Masi A, Sciorati C, Clementi E. Peroxynitrite—an ugly biofactor? Biofactors. 2010; 36: 264-273.
29. Hofner M, Höllrigl A, Puz S, Stary M, et al. Desmin stimulates differentiation of cardiomyocytes and upregulation of brachyury and nkx2.5. Differentiation. 2007; 75: 605–615.
30. Sun LY, Hsieh DK, Lin PC, Chiu HT, et al. Pulsed electromagnetic fields accelerate proliferation and osteogenic gene expression in human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation. Bio electromagnetics. 2010; 31: 209-219.
31. Diniz P, Soejima K, Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. Nitric Oxide. 2002; 7:18–23.
32. Esposito M, Lucariello A, Riccio I, Riccio V, et al. Differentiation of human osteoprogenitors cells increases after treatment with pulsed electromagnetic fields. In Vivo. 2012; 26(2): 299-304.
33. Schimmelpfeng J, Stein CJ, Dertinger H. The action of 50Hz magnetic and electric fields on cyclic AMP and intercellular communication in monolayers and spheroids of mammalian cells. Bio electromagnetics. 1995; 16: 381-386.
34. Pall ML. Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects. J. Cell. Mol. Med. 2013; 17(8): 958-965.
35. Liu L, Wang D, Wanga J, Ji H, et al. NOAD, a novel nitric oxide donor, induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells. Toxicology in Vitro. 2015; 29: 1289-1297.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2016; 7(1): 71-79

Original Article

Simultaneous effect of nitric oxide and electromagnetic field on the proliferation rate and morphology of stromal stem cells

Nazanin Haghighat N, Ph.D. student[1], Abdolmaleki P, Ph.D.[2*]

1. Ph.D. student at Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, P.O. Box 14115/175
2. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, P.O. Box 14115/175

* Email corresponding author: parviz@modares.ac.ir

Received: 7 Sep. 2015 Accepted: 16 Feb. 2016

Abstract

Aim: Electromagnetic field as a physical stimulus, willingly or unwillingly are affected cellular processes. In this study morphology changing and proliferation rate of mesenchymal stem cells were investigated in presence of electromagnetic field (EMF) and nitric oxide (NO).

Material and methods: The stromal stem cells were isolated from the Rat bone marrow and incubated. After several passages of the harvested cells, Deta-NO as a donor of nitric oxide was then added to cell culture. These cells were also treated by EMF (50 Hz and 20 mT). The MTT test was used for estimating proliferation rate of the cells. To estimate the proportion of the cell line in different phases of cell cycle due to treatment with NO and EMF, cellular DNA contents were measured by flow cytometry.

Result: The results demonstrated decreasing proliferation rate of the stem cells exposed with EMF and NO compared with the control group. We found that the rate of decrease is highly related to the concentration of NO. The double treatment of EMF and nitric oxide was yielded to an obvious arrest in the cell cycle at G2/M phase. Nitric oxide associated with EMF also changed the cell morphology and increased the cell motilities.

Conclusion: The changing of cell morphology and reduction of proliferation rate of the stem cell can be considered as a symptom showing the beginning of cell differentiation.

Key words: Electromagnetic field, Nitric oxide, mesenchymal stem cells, MTT test, flow cytometry.