

تأثیر میدان مغناطیسی کم فرکانس بر سرعت رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی

مرضیه سلیمی^۱، دکتر داریوش شهبازی گهرویی^۲، دکتر سعید کرباسی^۳، دکتر سعید کرمانی^۴،

دکتر شهناز رضوی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی به دلیل قابلیت تکثیر و تمایز به سلول‌های دیگر مدل خوبی برای بررسی اثرات میدان مغناطیسی کم فرکانس (Extremely low-frequency electromagnetic field یا ELF-EMF) بر سلول‌های بدن می‌باشند. بافت چربی به عنوان منبعی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناخته می‌شود. در این مطالعه تأثیر تابش با شدت‌های مختلف بر میزان تکثیر بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی در زمان‌های تابش ۲۰ و ۴۰ دقیقه بررسی شد.

روش‌ها: در این مطالعه تأثیر تابش با شدت ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز بر میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی با زمان‌های تابش ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز به مدت ۷ روز متوالی بررسی گردید. از تکنیک MTT assay برای بررسی رشد و میزان بقای سلول‌ها و از رنگ‌آمیزی تریپان بلو به منظور ارزیابی میزان تکثیر سلول‌ها استفاده گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون One way ANOVA انجام شد.

یافته‌ها: میزان تکثیر و بقای سلول‌ها در همه‌ی گروه‌های تابش به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های شاهد بود ($P < 0/05$) و تنها گروه ۱ میلی‌تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز، اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تابش میدان مغناطیسی با شدت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا با توجه به زمان تابش می‌تواند باعث تحریک رشد و تکثیر سلول‌ها شود. مکانیسم این تأثیر هنوز ناشناخته می‌باشد.

واژگان کلیدی: میدان مغناطیسی کم فرکانس، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، چربی، سرعت تکثیر و رشد

ارجاع: سلیمی مرضیه، شهبازی گهرویی داریوش، کرباسی سعید، کرمانی سعید، رضوی شهناز. تأثیر میدان مغناطیسی کم فرکانس بر سرعت

رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۲): ۴۵۵-۴۳۹

مقدمه

امروزه انسان بیش از هر زمان دیگر در معرض تابش میدان‌های الکترومغناطیسی قرار گرفته است. وسایل

الکتریکی پیرامون ما مانند کابل‌های فشار قوی، سیم‌کشی ساختمان‌ها، دستگاه‌های الکتریکی در منازل و کارخانه‌ها و قطارهای برقی از جمله مولد

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۱۳۳۱ در دانشکده علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهناز رضوی

Email: razavi@med.mui.ac.ir

میدان‌های الکترومغناطیسی می‌باشند. به این میدان‌ها با شدت‌های گوناگون و در محدوده‌ی فرکانس صفر تا ۳۰۰ میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس (Extremely low-frequency electromagnetic field) یا (ELF-EMF) گفته می‌شود (۱-۲).

فراگیر شدن میدان‌های الکترومغناطیسی ELF در محیط زندگی بشر، توجه دانشمندان و محققین را به بررسی تأثیر آن‌ها در بروز انواع سرطان‌ها جلب کرده است (۳-۵). مطالعه‌ی Wertheimer و Leeper در سال ۱۹۷۹ نشان داد کودکانی که محل سکونت آن‌ها در کنار خطوط انتقال برق قرار دارد، بیشتر به سرطان خون مبتلا می‌شوند (۶). در بررسی دیگری افزایش خطر بروز سرطان پستان و تومور مغزی به دنبال تابش با میدان‌های مغناطیسی دیده شد (۷) ولی سایر مطالعات چنین نتایجی را در بر نداشت (۸-۱۰).

یافته‌های مطالعات اپیدمیولوژیک در بسیاری از موارد متفاوت و غیر قابل تکرار می‌باشند، از طرفی به دلیل استفاده از نمونه‌های انسانی در این گونه مطالعات، مدت زمان انجام آزمایش سال‌های متمادی به طول می‌انجامد و ممکن است افراد مورد بررسی در این مدت تحت تأثیر عوامل دیگر مانند آلودگی هوا، عادات غذایی گوناگون، استرس‌های شغلی و بیماری‌های زمینه‌ای قرار بگیرند که نتایج حاصل را مخدوش می‌کند (۱۱). بنابراین، محققان جهت ارزیابی دقیق‌تر آثار میدان‌های الکترومغناطیس بر انسان به سمت نمونه‌های سلولی رفتند و آزمایشات خود را در شرایط *In vitro* و با شدت‌های بیشتر میدان‌های الکترومغناطیس آغاز نمودند.

در سلول‌های عصبی انسان که تحت تأثیر توموگرافی تشدید مغناطیسی با شدت ۰/۲ تسلا قرار

گرفته بودند، تغییراتی مشاهده شد که در سلول‌های دیگر از جمله Hella cellها چنین تغییراتی رخ نداد (۱۲). در بررسی دیگری که بر رده‌های سلولی TE85 و MG63 و سلول‌های استئوبلاستیک طبیعی انسان انجام گرفت، میدان مغناطیسی پالسی باعث افزایش تکثیر سلول‌ها به خصوص سلول‌های استئوبلاستیک طبیعی انسان گردید (۱۳). در مطالعه‌ی دیگری مشاهده گردید که میدان مغناطیسی با ایجاد وقفه‌ای در مرحله‌ی G1/S سیکل سلولی، مانع از تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروقی و سلول‌های اپی‌تلیال عدسی می‌شود (۱۴). میدان مغناطیسی پالسی از طریق سنتز DNA باعث تکثیر و تمایز سلول‌های استخوان ساز (Osteoblast) به سلول‌های استخوانی استئوسیت می‌شود (۱۵-۱۶). امروزه از این میدان‌ها به صورت گسترده جهت بهبود اختلالاتی مانند پوکی استخوان، شکستگی استخوان‌ها و التهاب مفاصل استفاده می‌شود (۱۷-۲۱).

از میان نمونه‌های سلولی به کار رفته در این مطالعات، سلول‌های بنیادی انسانی بهترین نمونه جهت بررسی اثرات میدان‌های مغناطیسی ELF می‌باشند؛ چرا که سلول‌های بنیادی شبیه‌ساز بسیار ایده‌آلی برای بدن انسان هستند و اثرات میدان‌های مغناطیسی بر این سلول‌ها را می‌توان به سلول‌های بالغ تعمیم داد (۲۲-۲۳). میدان‌های مغناطیسی به عنوان یک عامل محرک خارجی موجب تغییر در رشد، مورفولوژی، ساختار و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شوند که این به نوبه‌ی خود به طور مستقیم و یا غیر مستقیم می‌تواند بدن ما را به سمت برخی از سرطان‌ها و ناهنجاری‌ها سوق دهد (۲۴-۲۶، ۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) یا

Mesenchymal stem cells) یکی از مهم‌ترین رده‌های سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت و سلول درمانی می‌باشند (۲۸-۲۷). در مهندسی بافت و سلول درمانی با استفاده از رشد، تکثیر و تمایز این سلول‌ها بافت‌های آسیب‌دیده و ناهنجاری‌های مختلف بدن ترمیم می‌شود. این سلول‌ها در مغز استخوان، خون بند ناف و بافت‌های چربی یافت شده (۲۹، ۲۳) که در شرایط مناسب قابلیت تمایز به سلول‌های استخوان‌ساز (Osteogenic)، غضروف‌ساز (Chondrogenic)، عضله‌ساز (Myogenic) و سلول‌های چربی‌ساز (Adipogenic) را دارند (۳۸-۳۰). از طریق بیوپسی مغز استخوان می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا استرومای مغز استخوان دست یافت که فرآیند دردناک و خطرناکی است و تعداد سلول کمی به دست می‌آید (۳۹). عمر سلول‌های حاصل نیز با افزایش سن فرد کاهش می‌یابد (۴۱-۴۰). بافت‌های چربی نیز منابع مناسبی برای سلول‌های مزانشیمی چند ظرفیتی هستند که استخراج آن‌ها به میزان کمتری تهاجمی است و تعداد سلول بیشتری در مقایسه با مغز استخوان به دست می‌آید (۳۹).

در مطالعه‌ای تابش میدان مغناطیسی ۵۰ هرتز و شدت ۰/۵ تا ۱ میلی‌تسلا باعث افزایش تکثیر سلول‌های GH3 هیپوفیز موش و نورو بلاستوما IMR32 گردید (۴۲). در مطالعه‌ی Piacentini و همکاران میدان مغناطیسی ELF با شدت ۱ میلی‌تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز موجب افزایش قابل ملاحظه‌ی تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی موش‌های تازه به دنیا آمده، گردید (۴۳). در مطالعه‌ی دیگری، میدان مغناطیسی با شدت ۸۰ میلی‌تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز تأثیری بر قابلیت تکثیر سلول‌های T33 نداشت اما

تابش به سلول‌های مغز استخوان موش با این شدت میدان، باعث کاهش تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز گرانولوسیت ماکروفاژی در موش‌ها گردید. در همین مطالعه میدان ELF تأثیر نامشخصی بر تکثیر سلول‌های بنیادی استرومایی داشت؛ به طوری که در موش‌های ماده میزان تکثیر سلول‌ها کاهش یافت و در موش‌های نر تغییری در تکثیر سلول‌ها رخ نداد (۴۴). در مطالعه‌ی مشابهی آهنگ تکثیر سلول‌های AMA با تابش میدان مغناطیسی با شدت ۸۰ میلی‌تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز افزایش یافت (۴۵). در مطالعه‌ی دیگری تابش با میدان مغناطیسی ۵۰ هرتز و شدت‌های ۰/۹ تا ۴/۸ میلی‌تسلا از رشد و تکثیر سلول‌های Osteoblast جلوگیری کرد (۲۶).

جهت بررسی اثر میدان‌های مغناطیسی بر ارگان‌های زیستی می‌توان از میدان‌های مغناطیسی ایستا (شدت ثابت نسبت به زمان تابش) یا میدان‌های مغناطیسی با شدت متغیر استفاده کرد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که سلول‌ها تحت میدان مغناطیسی ایستا توانایی حیات خود را حفظ می‌کنند و این میدان اثری بر آهنگ رشد سلول‌ها ندارد (۲۵). در مطالعه‌ی دیگری مشخص شد میدان مغناطیسی ایستا اثری بر سلول‌های بنیادی انسانی ندارد (۴۶). میدان‌های مغناطیسی متغیر موجب تغییر برخی پارامترهای بیولوژیکی سلول‌ها مانند تکثیر، سنتز و ترشح فاکتورهای رشد می‌شوند (۴۹-۴۷)، که البته این تغییرات به خصوصیات فیزیکی این میدان‌ها از جمله فرکانس، طول موج و قدرت میدان بستگی دارند (۲۵)؛ به طوری که دوز میدان الکترومغناطیسی به کار رفته تابعی از مدت زمان تابش و قدرت میدان می‌باشد (۴۸، ۴۶).

شکستگی‌های کروموزومی در سلول‌های فیبروبلاست انسانی می‌شود (۵۲). در حالی که میدان پیوسته‌ی ۵۰ هرتز و ۱ میلی‌تسلا تأثیری بر شکستگی DNA در سلول‌های نوروبلاستوما ندارد (۵۳)، بنابراین به نظر می‌رسد میدان‌های الکترومغناطیسی پیوسته جهت بررسی تکثیر سلول‌ها مناسب‌تر است و ممکن است باعث شکستگی و آسیب‌های احتمالی کمتری به DNA سلول‌ها شود (۵۳-۵۲).

مطالعات اندکی به بررسی تأثیر میدان‌های مغناطیسی کم فرکانس بر رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرداخته‌اند. با این حال از یک سو نتایج این تحقیقات پراکنده و در مواردی متناقض است و از سوی دیگر گستره‌ی انجام این بررسی‌ها در انتخاب میدان مغناطیسی (بزرگی میدان، بسامد، پروتکل تابش دهی و نحوه‌ی تولید میدان) مورد استفاده، وسیع بوده است. از آن جا که نتایج تحقیقات انجام‌شده بسیار متفاوت و در مواقعی متناقض می‌باشد و از طرفی مطالعه‌ای به بررسی تأثیر میدان‌های الکترومغناطیسی بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نپرداخته است، مطالعه‌ی حاضر انجام گرفت. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر تابش میدان الکترومغناطیسی پیوسته با شدت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز (به مدت ۷ روز) بر میزان رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی انسانی بود.

روش‌ها

میدان مغناطیسی کم فرکانس و سیستم تابش

وسیله‌ی تولیدکننده‌ی میدان مغناطیسی سینوسی یک

طیف شدت‌های میدان مغناطیسی به کاررفته در مطالعات بسیار وسیع می‌باشد؛ به طوری که شامل شدت‌های از میکروتسلا تا چندین میلی‌تسلا می‌باشد. فرض بر این است که پاسخ نمونه‌های بیولوژیکی به میدان‌های مغناطیسی در محدوده‌ی خاصی از شدت پیشینه است که در اصطلاح به این حالت Window effect گفته می‌شود. البته به دلیل ناشناخته بودن مکانیسم‌های سلولی حاصل از میدان‌های مغناطیسی تعیین پنجره‌ی اثر برای سلول‌ها به درستی امکان‌پذیر نمی‌باشد. به نظر می‌رسد اثرات بیولوژیکی در محدوده‌های شدت ۵-۵/۰ میلی‌تسلا به وجود می‌آید، همچنین در شدت‌های بیشتر از ۲ میلی‌تسلا افزایش اندکی در دمای محیط کشت سلول‌ها رخ می‌دهد (۵۰).

مدت زمان تابش سلول‌ها نیز پارامتر بسیار مهمی است که در تعیین دوز تابشی و حتی پاسخ سلولی مؤثر می‌باشد (۵۱). این زمان با توجه به محدودیت‌های انجام آزمایش از جمله افزایش دمای محیط کشت در اثر تابش میدان مغناطیسی و یا مدت زمان نگه‌داری سلول‌ها باید به صورت بهینه‌ای انتخاب گردد. Van Den Heuvel و همکاران اثر قرارگیری طولانی مدت در معرض میدان‌های الکترومغناطیسی کم فرکانس را بر رشد سلول‌ها بسیار کم یا بدون تأثیر می‌دانند (۴۴).

نحوه‌ی اعمال میدان یکی دیگر از متغیرهای مهم و اثرگذار بر نتایج مطالعات می‌باشد. میدان الکترومغناطیسی را می‌توان به صورت پالسی (با قطع و وصل متوالی در زمان تابش) و یا به طور پیوسته اعمال کرد. در مطالعه‌ی مشخص شده است که تابش با میدان متناوب ۱ میلی‌تسلا و ۵۰ هرتز باعث افزایش

روش جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت

چربی

نمونه‌های چربی انسانی از بافت چربی دهندگان خانم و با کسب رضایت از آن‌ها تهیه گردید. پس از عمل سزارین، بافت چربی از قسمت شکم بلافاصله در درون ظرف حاوی PBS (Phosphate buffered saline) قرار گرفت و به سرعت به آزمایشگاه گروه علوم تشریح (بخش بافت شناسی) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل شد. نمونه چندین بار در PBS به خوبی شستشو داده شد تا بافت از دبری و خون عاری گردد. چربی‌های خردشده به لوله‌ی فالکن ۱۵ سی سی منتقل شدند. ۰/۵ میلی لیتر آنزیم کلاژناز IA و ۰/۰۲ گرم پودر کلاژناز در ۵ میلی لیتر آب آنالار به ازای هر یک گرم چربی اضافه گردید. درب لوله‌ی فالکون بسته شد و پس از تکان دادن شدید، به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا محلول یکنواختی ایجاد گردد. سپس به میزان هم حجم آنزیم استفاده شده، محیط حاوی FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد افزوده شد تا اثرات آنزیم خنثی گردد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. مایع رویی تخلیه شد و به طور مجدد ۵ میلی لیتر محیط به رسوب اضافه شد و پیست گردید و به طور مجدد به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. مایع رویی تخلیه شد و سوسپانسیون سلولی به فلاسک‌های حاوی محیط دارای FBS ۱۰ درصد وارد شد.

تابش سلول‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی در پلیت‌های ۹۶ چاهکی با دانسیته‌ی ۱۰۰۰ سلول در هر چاهک به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط

سیم پیچ (سلنویید) با هسته‌ی استوانه‌ای از جنس اکریلیک و قطر داخلی ۲۰ سانتی‌متر و طول ۲۴ سانتی‌متر بود. ۷۲۰ دور سیم مسی روکش دار به قطر ۱ میلی‌متر به دور هسته‌ی سلنویید پیچیده شد (شکل ۱). سلنویید به صورت افقی در آزمایشگاه قرار گرفت و به طور سری به اتوترانسفورمری با مقیاس درصد ولتاژ متصل شد. اتوترانسفورمر به برق شهر با فرکانس ۵۰ هرتز و ولتاژ ۲۲۰ ولت وصل شد. با تغذیه‌ی سلنویید با جریان ۲۰۲/۱ میلی‌آمپر و ۳۹۵ میلی‌آمپر و ولتاژ ۴/۶۸ و ۹/۱۹ ولت میدان مغناطیسی سینوسی با شدت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا تولید گردید. برای بررسی جریان و شکل موج ورودی، سلنویید به یک Multimeter دیجیتال (Japan, Digital Hitester 3256-50) و یک اسیلوسکوپ وصل شد. کالیبراسیون سیستم و اندازه‌گیری شدت میدان مغناطیسی حاصله با استفاده از یک تسلامتر (Germany, Leybold Didactic GMBH 51662) انجام گرفت. یکنواختی میدان مغناطیسی در مرکز سیم‌پیچ ± 1 درصد بود. در همه‌ی آزمایشات پلیت‌های سلولی تحت تابش در مرکز سلنویید (با بیشترین یکنواختی) قرار گرفتند. دمای داخل سلنویید در حین آزمایش با دماسنج اندازه‌گیری گردید (شکل ۱). تغییرات دمایی حاصل از میدان مغناطیسی قابل چشم پوشی بود.

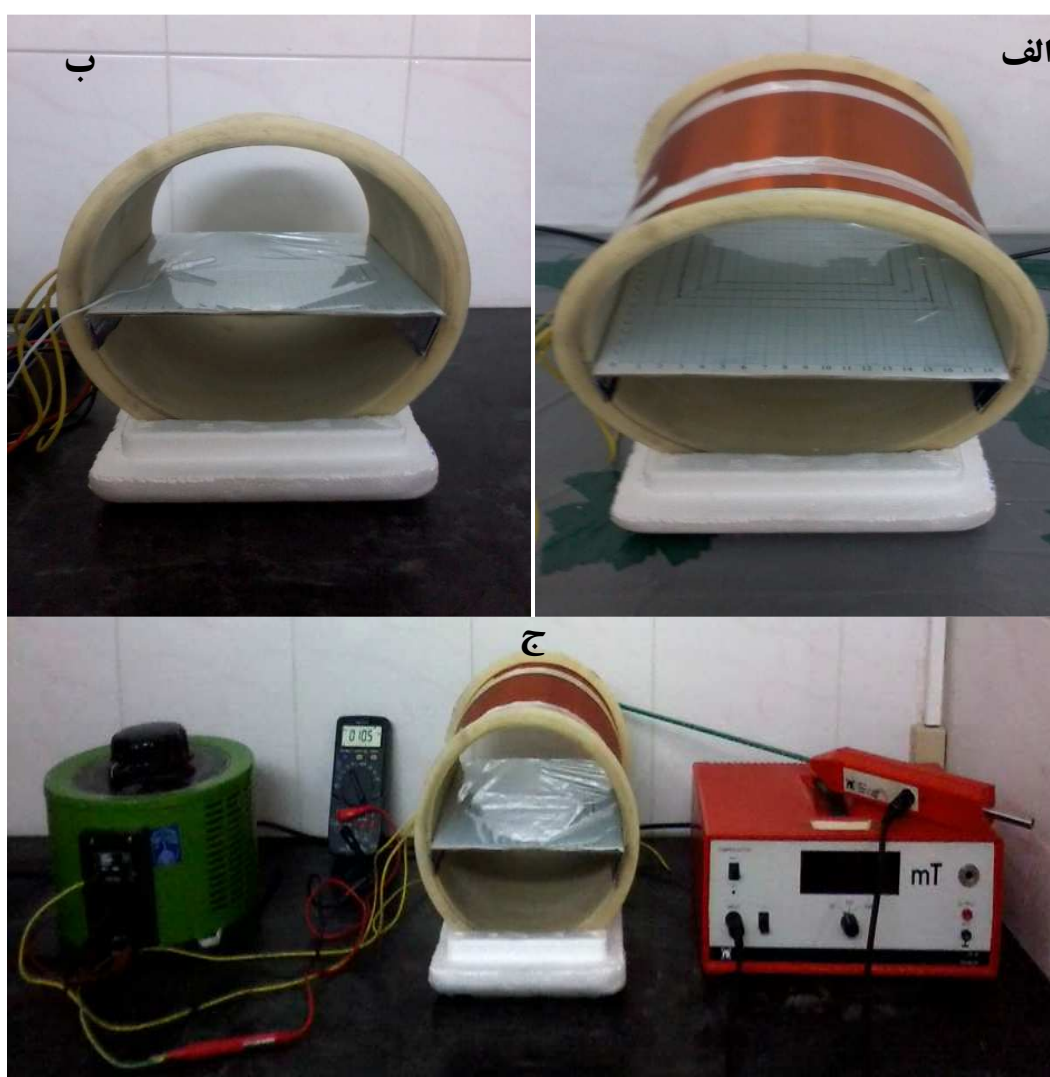
سلول‌ها در فلاسک سلولی با دانسیته‌ی ۱۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ چاهک کاشت شدند. سلول‌ها را به طور تصادفی به شش گروه، دو گروه شاهد ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز و چهار گروه تحت تابش تقسیم گردیدند. گروه‌های شاهد در سلنویید خاموش قرار گرفتند.

۱ میلی تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز، ۰/۵ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز و ۰/۵ میلی تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز، بود.

گروه‌های شاهد در داخل سلنویید خاموش برای ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز قرار گرفتند. شرایط برای گروه‌های تحت تابش و شاهد یکسان بود. در تمام آزمایشات پلیت‌ها در مرکز کویل که یکنواختی میدان بیشینه بود، قرار گرفتند (شکل ۲).

کشت حاوی FBS کشت شد و به مدت یک شبانه روز انکوبه گردید.

سلول‌ها تحت تابش الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و با شدت‌های ۱ و ۰/۵ میلی تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز و برای ۷ روز متوالی قرار گرفتند. گروه‌های تحت تابش شامل چهار گروه بودند. تابش داده شده به گروه‌های ۱ تا ۴ به ترتیب تحت، ۱ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز،



شکل ۱. ابزار تولید میدان مغناطیسی کم فرکانس و سیستم تابش. الف: سیم‌پیچ تولیدکننده میدان مغناطیسی را نشان می‌دهد. نواحی با شدت مغناطیسی یکسان در مرکز سلنویید قرار دارند. ب: دماسنج دیجیتال برای بررسی تغییرات دما به همراه پروب در مرکز سیم‌پیچ قرار گرفت. ج: سیستم تولیدکننده میدان مغناطیسی را نشان می‌دهد که از راست به چپ اتوترانسفورمر، مولتی‌متر، سیم‌پیچ و تسلامتر به همراه پروب هستند.

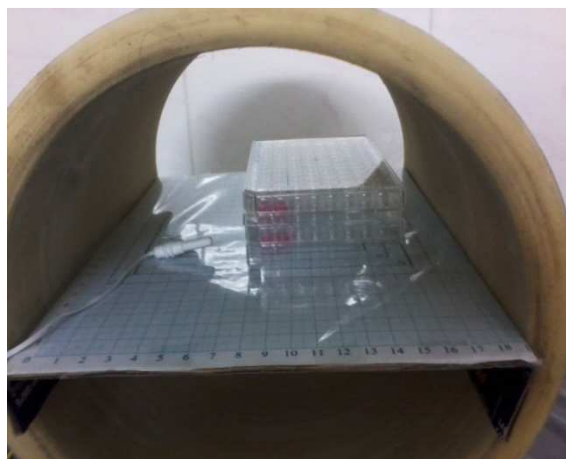
۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ سلول درون چاهک‌های یک پلیت ۹۶ چاهکی به همراه ۱۰۰ میکرولیتری محیط کشت فاقد FBS و ۱۰ میکرولیتری محلول MTT ریخته شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از ۴ ساعت، محیط هر چاهک تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به آن‌ها افزوده گردید. پس از چندین بار پیست کردن، پلیت به دستگاه ELISA منتقل شد و مقادیر OD برای هر چاهک (تعداد متفاوت سلولی) خوانش شد.

ارزیابی تکثیر سلول‌ها با رنگ‌آمیزی تریپان بلو

برای انجام آزمون تریپان بلو محیط هر چاهک تخلیه شد و دو بار با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS شستشو گردید. ۵۰ میکرولیتر محلول تریپسین/EDTA در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۴ تا ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از زمان مقرر ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی FBS نیز به هر چاهک افزوده شد و به خوبی با پیست پاستور پیست گردید تا تریپسین خنثی شود. ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو بر روی یک لام مخلوط شد. تعداد سلول‌هایی که رنگ آبی نداشتند به عنوان سلول‌های سالم و نیز کل سلول‌های مشاهده شده شمارش شدند. سرعت تکثیر (Proliferation rate) با استفاده از تعیین نسبت سلول‌های زنده به کل سلول‌های اولیه محاسبه شد.

بررسی کینتیک رشد (Growth kinetics)

زمان دو برابر شدن به عنوان معیاری جهت بررسی رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی محاسبه شد. سلول‌ها در محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد با دانسیته‌ی ۱۰۰۰ سلول در هر چاهک انکوبه شدند. پس از ۷ روز تعداد نهایی



شکل ۲. پلیت‌ها در مرکز کویل که یکنواختی میدان بیشینه بود، قرار گرفتند.

ارزیابی بقا و رشد سلول‌ها توسط تکنیک MTT assay

برای ارزیابی میزان تکثیر سلول‌های تحت تابش و شاهد از روش MTT استفاده شد. پلیت‌های ۹۶ چاهک از انکوباتور خارج شدند و محیط چاهک‌ها با استفاده از پیست پاستور تخلیه گردید. هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS یک بار شستشو داده شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد FBS و ۱۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از طی این زمان پلیت‌ها از انکوباتور خارج شدند و محلول داخل چاهک‌ها تخلیه شد.

پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک افزوده شد و به خوبی پیست گردید. محلول هر چاهک با پیست پاستور به داخل یک پلیت ۹۶ چاهک دیگر منتقل شد و در دستگاه میکروریدر ELISA با طول موج ۵۴۰ نانومتر گذاشته شد و میزان OD (Optical density) نمونه خوانش گردید و قدرت بقای سلول‌ها (Viability) محاسبه شد. برای رسم منحنی استاندارد MTT، تعداد ۵۰،

محسوب شد.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول‌ها

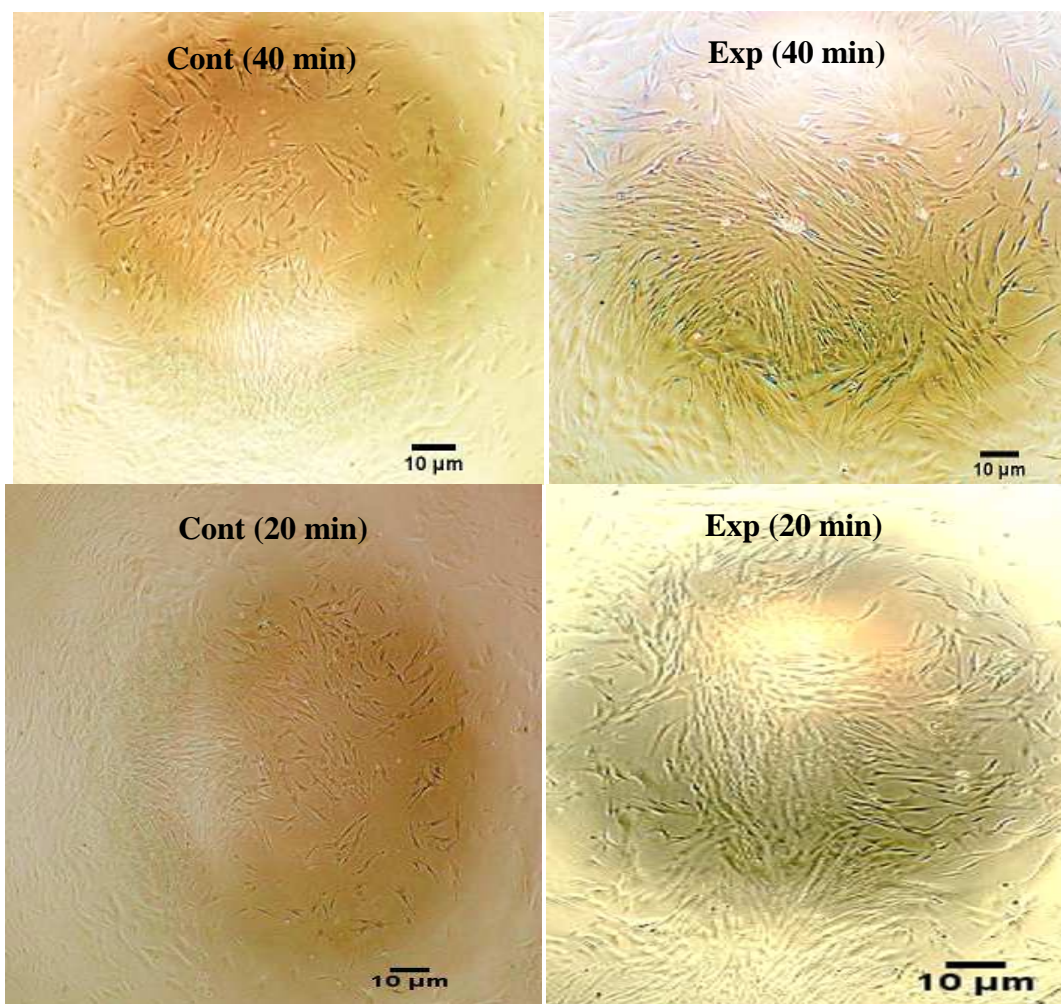
سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی با تراکم ۸۰ درصد در کف فلاسک کشت، ظاهر دوکی شکل و مورفولوژی فیروپلاستیک نشان دادند. بررسی‌های مورفولوژی با میکروسکوپ فاز کنتراست تفاوتی بین مورفولوژی سلول‌ها در گروه‌های تحت تابش و شاهد نشان نداد (شکل ۳).

سلول‌ها به کمک منحنی استاندارد MTT به دست آمد و زمان دو برابر شدن (Doubling time) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

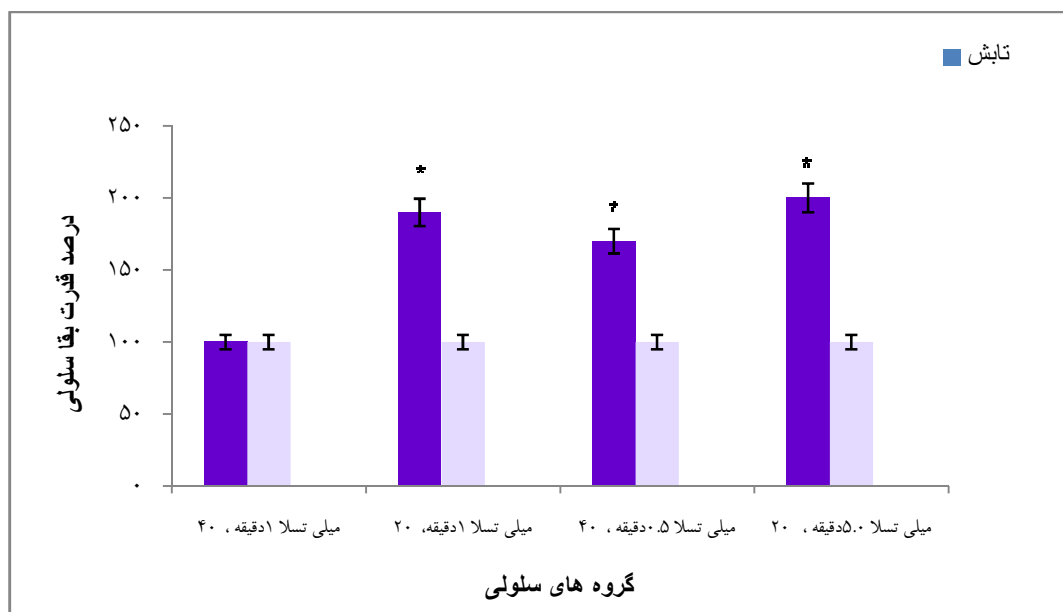
$$\text{Doubling Time} = T \left[\frac{\ln 2}{\ln (N1/N2)} \right]$$

در این فرمول T زمان آزمایش، N1 و N2 به ترتیب تعداد سلول‌های اولیه و نهایی هستند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد. جهت بررسی اختلافات بین گروه‌ها از آزمون One way ANOVA استفاده شد. اختلاف میانگین داده‌ها در صورت $P < 0/05$ معنی‌دار



شکل ۳. بین مورفولوژی سلول‌های تحت تابش و شاهد تفاوتی دیده نشد. بررسی‌های مورفولوژیک با میکروسکوپ فاز کنتراست انجام گرفت (بزرگ‌نمایی ۴۰×).



شکل ۴. بررسی درصد قدرت بقای سلول‌ها تحت میدان مغناطیسی. درصد زیست‌پذیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی انسانی در همهی گروه‌های تأبش به جز گروه ۱ میلی‌تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های شاهد بود.

※: $P < 0/05$

از سرعت تکثیر سلول‌ها در گروه‌های شاهد بود. بر خلاف نتایج به دست آمده از روش MTT که تکثیر در گروه ۱ میلی‌تسلا و ۴۰ دقیقه در روز با گروه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت، در روش رنگ آمیزی تریپان بلو سرعت تکثیر در این گروه هم مانند سایر گروه‌های تحت تأبش به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های شاهد بود ($P < 0/05$) (شکل ۵).

بررسی زمان دو برابر شدن در گروه‌های سلولی

در همهی گروه‌های تأبش به غیر از گروه ۱ میلی‌تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز زمان دو برابر شدن (Doubling time) به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های شاهد بود ($P < 0/05$).

نتایج زمان دو برابر شدن نشان داد که سلول‌ها در گروه‌های تحت تأبش نسبت به گروه‌های شاهد نیاز به زمان کمتری برای دو برابر شدن دارند؛ که این در واقع نشان‌دهنده‌ی رشد بیشتر سلول‌های تأبش‌شده

بررسی درصد قدرت بقای سلولی (Cell viability)

برای بررسی میزان حیات سلول‌ها پس از تأبش میدان‌های الکترومغناطیسی کم فرکانس پس از ۷ روز از روش MTT استفاده شد. درصد قدرت بقا (زیست‌پذیری) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی انسانی در همهی گروه‌های تأبش به جز گروه ۱ میلی‌تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های شاهد بود ($P < 0/05$) (شکل ۴).

بررسی سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی

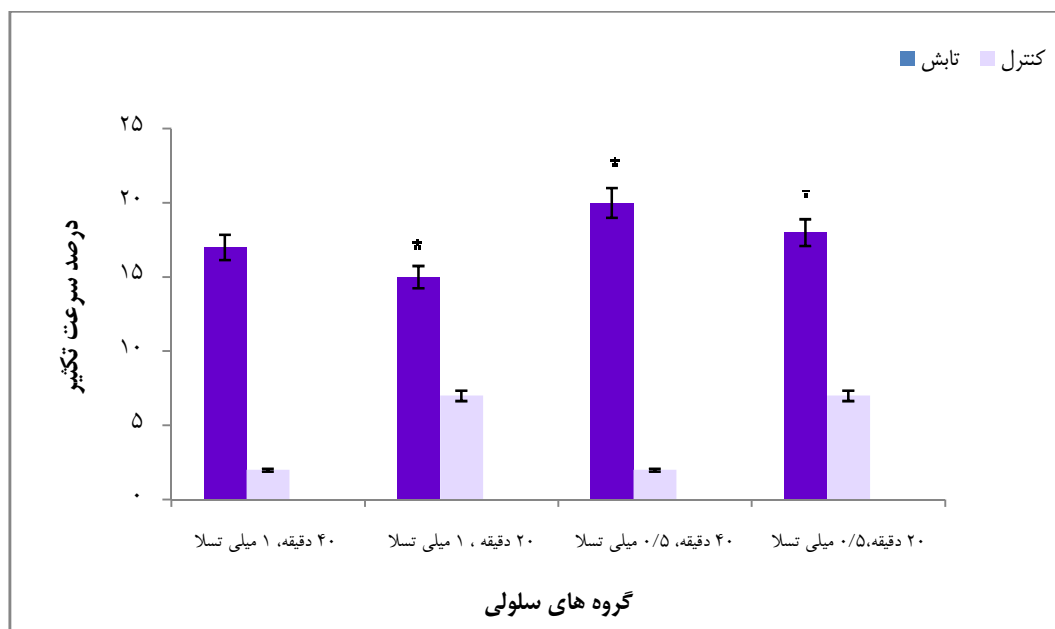
مشتق‌شده از بافت چربی انسانی با استفاده از

رنگ آمیزی تریپان بلو

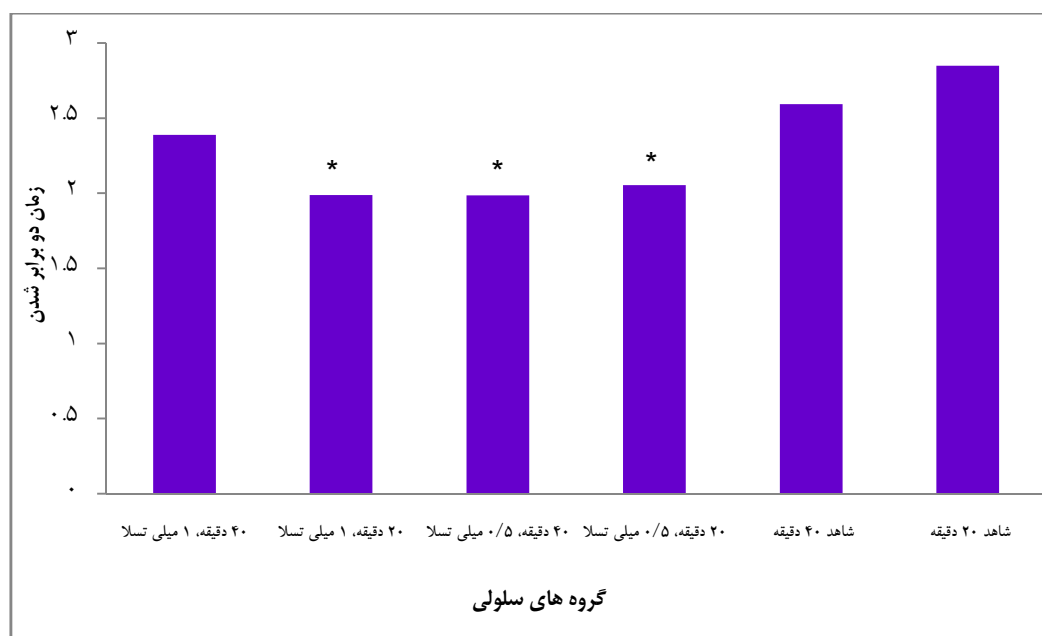
شمارش سلول‌های زنده پس از تأبش با میدان‌های الکترومغناطیسی کم فرکانس در طی ۷ روز با استفاده از روش تریپان بلو نشان داد، سرعت تکثیر سلول‌ها در همهی گروه‌های تحت تأبش به طور معنی‌داری بیشتر

دست آوردن تعداد نهایی سلول‌ها از منحنی استاندارد MTT استفاده گردید (شکل ۷).

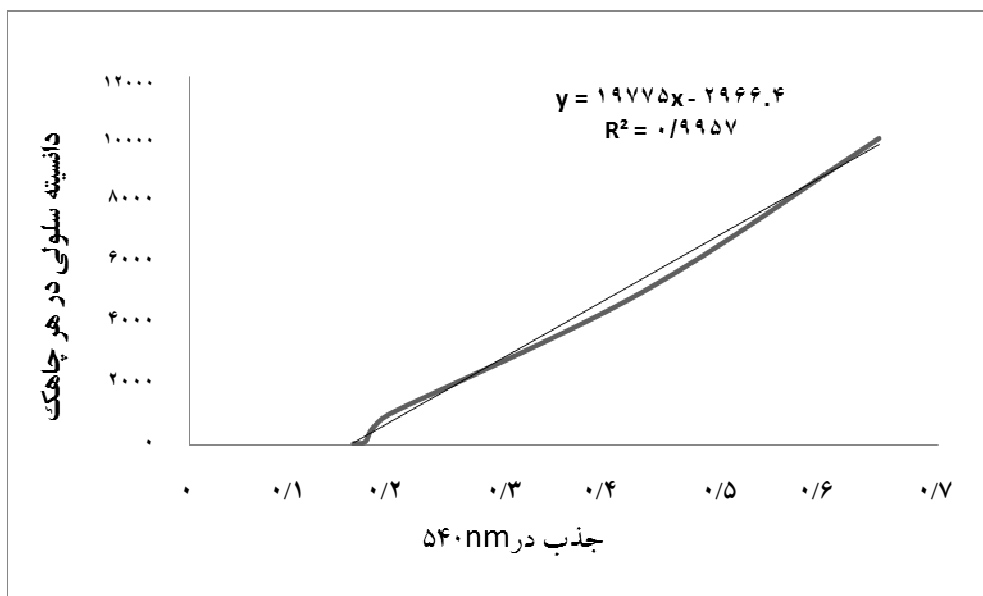
با میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس نسبت به سلول‌های گروه شاهد می‌باشد (شکل ۶). برای به



شکل ۵. بررسی سرعت تکثیر hADSCs با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو. شمارش سلول‌های زنده پس از تابش با ELF-EMF در طی ۷ روز با استفاده از روش تریپان بلو نشان داد، سرعت تکثیر سلول‌ها در تمامی گروه‌های تحت تابش به طور معنی‌داری بیشتر از سرعت تکثیر سلول‌ها در گروه‌های شاهد بود. $P < 0/05$.*



شکل ۶. بررسی زمان دو برابر شدن در گروه‌های سلولی. در تمامی گروه‌های تابش شده به غیر از گروه ۱ میلی تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز، زمان دو برابر شدن به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های شاهد بود. $P < 0/05$.*



شکل ۷. منحنی استاندارد MTT جهت بررسی تعداد سلول‌ها پس از ۷ روز این منحنی رسم گردید. با کمک این منحنی و با اندازه‌گیری میزان جذب هر نمونه می‌توان به تعداد سلول در آن نمونه دست یافت. همان‌طور که مشاهده می‌شود رابطه‌ی بین میزان جذب و تعداد سلول‌ها با تقریب قابل قبولی به صورت خطی است.

MTT و رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده گردید. در بررسی MTT سرعت تکثیر در گروه‌های تحت تابش غیر از گروه ۱ میلی‌تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز به طور معنی‌داری بیشتر از سرعت تکثیر در گروه‌های شاهد بود؛ به طوری که در رنگ‌آمیزی تریپان بلو همه‌ی گروه‌های تابش شده تکثیر بیشتری نسبت به گروه‌های شاهد داشتند.

اختلاف معنی‌داری بین سرعت تکثیر سلول‌ها در گروه‌های ۰/۵ میلی‌تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز مشاهده نشد، در حالی که سرعت تکثیر سلول‌ها در گروه ۱ میلی‌تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز کمتر از گروه ۱ میلی‌تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز بود. در مقایسه‌ی اخیر با کاهش زمان تابش و دوز تابشی سرعت تکثیر افزایش یافت؛ بنابراین به نظر می‌رسد سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی ارتباط مستقیمی با

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با شدت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا برای ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز در طی ۷ روز متوالی می‌تواند سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی را به طور معنی‌داری افزایش دهد.

میدان‌های الکترومغناطیسی ELF به دلیل نداشتن انرژی کافی جهت یونیزاسیون مولکول‌ها در دسته‌ی تابش‌های غیر یونیزان دسته‌بندی می‌شوند (۵۴، ۲۵)، که در آن‌ها دوز تابشی تابعی از قدرت میدان و مدت زمان تابش می‌باشد (۵۵). در این مطالعه دو شدت (۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا) و دو زمان تابش (۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز) انتخاب شد تا تأثیر دوزهای تابشی مختلف بر روی سرعت رشد سلول‌ها بررسی شود. برای بررسی سرعت تکثیر و رشد از دو روش

این رده‌ی سلولی (سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی) و فرکانس ۵۰ هرتز نزدیک به ۰/۵ میلی‌تسلا باشد.

نتایج این مطالعه مطابق با نتایج مطالعه‌ی Piacentini و همکاران بود که نشان داد تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی تحت تابش میدان مغناطیسی ۱ میلی‌تسلا و ۵۰ هرتز برای مدت ۶ تا ۲۴ ساعت افزایش یافت. در مطالعه‌ی آن‌ها زمان تابش ۶ ساعت بیشترین تأثیر را بر میزان تکثیر سلول‌ها داشت و با افزایش مدت زمان تابش اختلاف بین تکثیر در گروه‌های تابش شده و شاهد کاهش یافت (۴۳). در مطالعه‌ی مشابهی، میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با شدت ۳ تا ۳/۶ میلی‌تسلا به مدت ۳۰ دقیقه باعث افزایش میزان تکثیر سلول‌های استئوبلاست گردید (۵۷).

در مطالعاتی میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس دارای اثر منفی بر رشد و تکثیر سلول‌ها بوده است. در مطالعه‌ی Yan و همکاران تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با شدت ۲۰ میلی‌تسلا به مدت ۱۲ ساعت در روز از رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جلوگیری کرده است (۱).

مطالعه‌ی Sul و همکاران نشان داد که پاسخ سلول‌ها به مدت زمان تابش بستگی دارد. در مطالعه‌ی اخیر تأثیر میدان مغناطیسی ۲ میلی‌تسلا با فرکانس ۵۰ هرتز بر روی تکثیر چهار رده‌ی سلولی HCN-2, RPMI 7666 cells, hFOB1.19 و T/G HA-VSMC به مدت زمان‌های مختلف تابش ۳، ۶ و ۱۴ روز متوالی بررسی شد. هر رده‌ی سلولی در یک زمان تابش

دوز تابشی نداشته باشد. به دلیل قرار گرفتن کویل تولیدکننده میدان مغناطیسی در خارج از انکوباتور، این احتمال وجود داشت که کاهش آهنگ تکثیر در گروه ۱ میلی‌تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز به دلیل بیرون بودن از انکوباتور به مدت طولانی‌تر باشد. برای بررسی این فرضیه، گروهی از سلول‌ها در تمام مدت آزمایش در داخل انکوباتور قرار داده شدند که سرعت تکثیر در این گروه در تمام آزمایشات به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های در معرض تابش بود.

اختلاف بین گروه‌های تابش ۱ و ۰/۵ میلی‌تسلا به مدت ۴۰ دقیقه در روز معنی‌دار بود که نشان داد با کاهش شدت میدان مغناطیسی، میزان رشد سلول‌ها افزایش می‌یابد.

به علاوه، نتایج رنگ‌آمیزی تریپان بلو نشان داد که آهنگ تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی تحت تأثیر میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس افزایش یافت و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های ۰/۵ میلی‌تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز و گروه‌های ۱ میلی‌تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز مشاهده نشد؛ اگر چه میزان تکثیر در گروه‌های تابش شده با شدت میدان ۰/۵ میلی‌تسلا بیشتر از ۱ میلی‌تسلا بود.

پاسخ سیستم‌های بیولوژیکی به تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس شدت‌ها، زمان‌های تابش و فرکانس‌های خاصی از میدان الکترومغناطیس بیشینه می‌باشد (اثر پنجره‌ای). در واقع اثر پنجره‌ای روزنه‌ای است که سیستم‌های زیستی بیشترین حساسیت را به تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس نشان می‌دهند (۵۶). به نظر می‌رسد در مطالعه‌ی حاضر پنجره‌ی اثر میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس برای

تحریک کند (۶۰، ۴۳). جریان Ca^{+2} از طریق این کانال‌ها نقش اساسی را در بیان ژن‌های مؤثر در تکثیر و تمایز سلول بازی می‌کند (۶۱).

در مطالعه ای غلظت K^+/Na^+ خارج سلولی پس از تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس افزایش یافت که می‌تواند دلیل کاهش تکثیر سلول‌های تحت تابش باشد (۱).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد تابش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌تسلا به مدت ۲۰ و ۴۰ دقیقه در روز می‌تواند باعث افزایش آهنگ تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی شود؛ اگر چه مکانیسم تأثیر به خوبی مشخص نمی‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از آقای کیانی، مدیر محترم گروه علوم تشریح، آقای دکتر اسفندیاری و کارشناس محترم آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریح سرکار خانم علی اکبری که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

خاص بیشترین افزایش تکثیر را تحت میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس داشت؛ به طوری که در سلول‌های hFOB1.19 با افزایش زمان تابش میزان تکثیر افزایش می‌یافت و در سه رده‌ی دیگر یک پاسخ غیر خطی به زمان تابش دیده شد (۵۱).

مکانیسم‌های درگیر در واکنش میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس با سیستم‌های بیولوژیکی هنوز به خوبی مشخص نیست. یکی از فرضیات افزایش غلظت، میزان فعالیت و نیمه عمر رادیکال‌های آزاد محیط می‌باشد. در واقع میدان مغناطیسی به واسطه‌ی رادیکال‌های آزاد بر برخی واکنش‌های ایجادشده در سلول مؤثر است (۵۸). Pacini و همکاران معتقد هستند برخی مولکول‌ها مانند سیالیک اسید بر روی غشای سلول تحت تأثیر میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس قرار می‌گیرند و تکثیر سلولی را کنترل می‌کنند (۵۹).

فرضیه‌ی دیگر بیان می‌کند میدان الکترومغناطیسی کم فرکانس موجب تغییر سیگنال دهی و هموستاز Ca^{+2} داخل سلولی می‌شود. علاوه بر آن می‌تواند فعالیت کانال‌های کلسیمی بر روی غشای سلولی را

References

1. Yan J, Dong L, Zhang B, Qi N. Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Electromagn Biol Med* 2010; 29(4): 165-76.
2. Ahlbom IC, Cardis E, Green A, Linet M, Savitz D, Swerdlow A. Review of the epidemiologic literature on EMF and Health. *Environ Health Perspect* 2001; 109(Suppl 6): 911-33.
3. Czyz J, Nikolova T, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50 Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells-the role of tumour suppressor p53. *Mutat Res* 2004; 557(1): 63-74.
4. Aaron RK, Ciombor DM, Keeping H, Wang S, Capuano A, Polk C. "Power frequency fields promote cell differentiation coincident with an increase in transforming growth factor-b(1) expression". *Bioelectromagnetics* 2000; 21(1): 73.
5. Kaviani Moghadam M, Firoozabadi SM, Janahmadi M. Reduction of F1 neuronal excitability by exposure to 217 Hz magnetic fields from GSM 900 mobile phone. *Cell J Yakhteh* 2009; 11(2): 176-83.
6. Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 1979; 109(3): 273-84.
7. Feychting M, Forssen U, Floderus B. Occupational and residential magnetic field

- exposure and leukemia and central nervous system tumors. *Epidemiology* 1997; 8(4): 384-9.
8. Schreiber GH, Swaen GM, Meijers JM, Slangen JJ, Sturmans F. Cancer mortality and residence near electricity transmission equipment: a retrospective cohort study. *Int J Epidemiol* 1993; 22(1): 9-15.
 9. Verkasalo PK, Pukkala E, Hongisto MY, Valjus JE, Jarvinen PJ, Heikkila KV, et al. Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. *BMJ* 1993; 307(6909): 895-9.
 10. Morandi MA, Pak CM, Caren RP, Caren LD. Lack of an EMF-induced genotoxic effect in the Ames assay. *Life Sci* 1996; 59(3): 263-71.
 11. Savitz DA. Overview of occupational exposure to electric and magnetic fields and cancer: advancements in exposure assessment. *Environ Health Perspect* 1995; 103(Suppl 2): 69-74.
 12. Pacini S, Vannelli GB, Barni T, Ruggiero M, Sardi I, Pacini P, et al. Effect of 0.2 T static magnetic field on human neurons: remodeling and inhibition of signal transduction without genome instability. *Neurosci Lett* 1999; 267(3): 185-8.
 13. De Mattei M, Caruso A, Traina GC, Pezzetti F, Baroni T, Sollazzo V. Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro. *Bioelectromagnetics* 1999; 20(3): 177-82.
 14. Lixia S, Yao K, Kaijun W, Deqiang L, Huajun H, Xiangwei G, et al. Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. *Mutat Res* 2006; 602(1-2): 135-42.
 15. Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics* 2002; 23(5): 398-405.
 16. Tsai MT, Chang WH, Chang K, Hou RJ, Wu TW. Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. *Bioelectromagnetics* 2007; 28(7): 519-28.
 17. Bassett CA, Mitchell SN, Gaston SR. Pulsing electromagnetic field treatment in ununited fractures and failed arthrodeses. *JAMA* 1982; 247(5): 623-8.
 18. Bassett CA, Schink-Ascani M. Long-term pulsed electromagnetic field (PEMF) results in congenital pseudarthrosis. *Calcif Tissue Int* 1991; 49(3): 216-20.
 19. Mishima S. The effect of long-term pulsing electromagnetic field stimulation on experimental osteoporosis of rats. *J UOEH* 1988; 10(1): 31-45.
 20. Rubin CT, McLeod KJ, Lanyon LE. Prevention of osteoporosis by pulsed electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am* 1989; 71(3): 411-7.
 21. Tabrah F, Hoffmeier M, Gilbert F, Jr., Batkin S, Bassett CA. Bone density changes in osteoporosis-prone women exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *J Bone Miner Res* 1990; 5(5): 437-42.
 22. Wei H, Tan G, Manasi, Qiu S, Kong G, Yong P, et al. One-step derivation of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2012; 9(2): 87-100.
 23. Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR. Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol* 2002; 185: 127-56.
 24. Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Prog Biophys Mol Biol* 2005; 87(2-3): 213-23.
 25. Noriega-Luna B, Sabanero M, Sosa M, Avila-Rodriguez M. Influence of pulsed magnetic fields on the morphology of bone cells in early stages of growth. *Micron* 2011; 42(6): 600-7.
 26. Zhou J, Ming LG, Ge BF, Wang JQ, Zhu RQ, Wei Z, et al. Effects of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentiation and mineralization potentials of rat osteoblasts. *Bone* 2011; 49(4): 753-61.
 27. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164(2): 247-56.
 28. Lu J, Mochhala S, Moore XL, Ng KC, Tan MH, Lee LK, et al. Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2006; 398(1-2): 12-7.
 29. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006; 24(4): 150-4.
 30. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev* 2008; 17(4): 761-73.
 31. Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab* 2006; 32(5 Pt 1): 393-401.

32. Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 272(1): 398-402.
33. Guo Z, Yang J, Liu X, Li X, Hou C, Tang PH, et al. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114(9): 950-3.
34. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
35. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(4): 1153-61.
36. Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(2): 481-8.
37. Long X, Olszewski M, Huang W, Kletzel M. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2005; 14(1): 65-9.
38. Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, Sakurai K, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, et al. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(9): 3296-300.
39. Huang T, He D, Kleiner G, Kuluz J. Neuron-like differentiation of adipose-derived stem cells from infant piglets in vitro. *J Spinal Cord Med* 2007; 30(Suppl 1): S35-S40.
40. Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 1999; 17(3): 171-7.
41. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33(6): 919-26.
42. Rao RR, Halper J, Kisaalita WS. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on APP695 transcription levels in differentiating human neuroblastoma cells. *Bioelectrochemistry* 2002; 57(1): 9-15.
43. Piacentini R, Ripoli C, Mezzogori D, Azzena GB, Grassi C. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Ca(v)1-channel activity. *J Cell Physiol* 2008; 215(1): 129-39.
44. Van Den Heuvel R, Leppens H, Nemethova G, Verschaeve L. Haemopoietic cell proliferation in murine bone marrow cells exposed to extreme low frequency (ELF) electromagnetic fields. *Toxicol In Vitro* 2001; 15(4-5): 351-5.
45. Kwee S, Raskmark P. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 1. ELF electromagnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1995; 36(2): 109-14.
46. Sullivan K, Balin AK, Allen RG. Effects of static magnetic fields on the growth of various types of human cells. *Bioelectromagnetics* 2011; 32(2): 140-7.
47. Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* 2004; 25(6): 457-65.
48. Chang K, Chang WH, Huang S, Huang S, Shih C. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. *J Orthop Res* 2005; 23(6): 1308-14.
49. Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Guerkov H, Dean DD, Simon B, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. *J Orthop Res* 2000; 18(4): 637-46.
50. Falahati SA, Bolouri B, Norouzi J, Masjedian F. The effect of extremely low frequency magnetic fields on growth of E.Coli. *J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci* 2000; 7(4): 47-53. [In Persian].
51. Sul AR, Park SN, Suh H. Effects of sinusoidal electromagnetic field on structure and function of different kinds of cell lines. *Yonsei Med J* 2006; 47(6): 852-61.
52. Winker R, Ivancsits S, Pilger A, Adlkofer F, Rudiger HW. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res* 2005; 585(1-2): 43-9.
53. Falone S, Grossi MR, Cinque B, D'Angelo B, Tettamanti E, Cimini A, et al. Fifty hertz extremely low-frequency electromagnetic field causes changes in redox and differentiative status in neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(11): 2093-106.
54. Mann K, Roschke J. Sleep under exposure to high-frequency electromagnetic fields. *Sleep Med Rev* 2004; 8(2): 95-107.
55. Villa M, Mustarelli P, Caprotti M. Biological effects of magnetic fields. *Life Sci* 1991; 49(2): 85-92.

56. Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Jahn O, Rudiger HW. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res* 2005; 583(2): 184-8.
57. Cuccurazzu B, Leone L, Podda MV, Piacentini R, Riccardi E, Ripoli C, et al. Exposure to extremely low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields enhances adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. *Exp Neurol* 2010; 226(1): 173-82.
58. Sarvestani AS, Abdolmaleki P, Mowla SJ, Ghanati F, Heshmati E, Tavasoli Z, et al. Static magnetic fields aggravate the effects of ionizing radiation on cell cycle progression in bone marrow stem cells. *Micron* 2010; 41(2): 101-4.
59. Pacini S, Gulisano M, Peruzzi B, Sgambati E, Gheri G, Gheri BS, et al. Effects of 0.2 T static magnetic field on human skin fibroblasts. *Cancer Detect Prev* 2003; 27(5): 327-32.
60. Bekhite MM, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. Static magnetic fields increase cardiomyocyte differentiation of Flk-1(+) cells derived from mouse embryonic stem cells via Ca(2+) influx and ROS production. *Int J Cardiol* 2012.
61. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(7): 552-65.

Effect of Extremely Low-Frequency (50 Hz) Field on Proliferation Rate of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells

Marzieh Salimi¹, Daryoush Shahbazi-Gahrouei PhD², Saeid Karbasi PhD³,
Saied Kermani PhD³, Shahnaz Razavi PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: The effects of non-ionizing extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) chronic exposure on human beings due to its potential health hazards has become a focus of interest since many years ago. Stem cells are useful models for assessment of effects of ELF-EMF on other cell lines and human beings. Adipose tissue has been known source of multipotent stromal cells (MSCs), which can be obtained by a less invasive method and in large amounts compared with bone marrow stromal cells (BMSCs); so this study was done on human adipose-derived stem cells (hADSCs). The effect of ELF-EMF with intensity of 0.5 and 1 mT and 50 Hz on proliferation rates of hADSCs at 20 and 40 min/day for 7 days was assessed.

Methods: MTT assay was used to determine the growth and metabolism of cells and Trypan blue test was also done for cell viability.

Findings: The proliferation rate and growth of hADSCs in all exposure groups was significantly higher than that in sham groups except in group of 1 mT, 40 min/day ($P < 0.05$).

Conclusion: The results showed that 0.5 and 1 mT magnetic strength fields can promote the proliferation rates of the hMSCs derived adipose tissue regarding the duration of exposure.

Keywords: Non-ionizing extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF), Human adipose-derived stem cells (hADSCs), Adipose, Proliferation rate, Growth

Citation: Salimi M, Shahbazi-Gahrouei D, Karbasi S, Kermani S, Razavi Sh. **Effect of Extremely Low-Frequency (50 Hz) Field on Proliferation Rate of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(232): 439-55

* This paper is derived from a MSc thesis No. 391231 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Medical Physics and Medical Engineering, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Medical Physics and Medical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Medical Physics and Medical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir