

The effect of 15 and 30 militesla static magnetic field on the rat neuronal induced mesenchymal stem cell, cell cycle.

R. Masoomi Jahandizi¹, P. Abdolmaleki ^{*2}, S. J. Mowla³

¹Ph.D Student, Biophysics Department, Faculty of Biology Science, Tarbiat modares University, Tehran, Iran.

parviz@modares.ac.ir

²Associate Professor, Biophysics Department, Faculty of Biology Science, Tarbiat modares University, Tehran, Iran.

Masoomi_r@yahoo.com

³Associate Professor, Genetics Department, Faculty of Biology Science, Tarbiat modares University, Tehran, Iran.

sjmowla@modares.ac.ir

Abstract

The effect of 15 and 30 mT of static magnetic field on the cell cycle of neural inductive rat BMSC was evaluated. The BMSC was inducted by neural inductive medium (NIM). Duration of inductive and Exposure time were 2, 4 and 6 hours. The cells induction to neural inductive medium associated with SMF as exposed group, besides we have a control group. The apparatus we used to generate the SMF was a locally designed SMF generator in which there was an incubator instrument capable to maintain the humidity, temperature and CO₂ concentration in predefined level. After exposing, the cells were fixed, stained and their percent of cell cycle phases; G₁, S, G₂/M were elucidated using flowcytometer instrument. The WinMdi 2.9 Software was used to process data from flowcytometer and elucidation of phase's percents. The results showed SMF with 15 mT intensity did not significantly alter the cell cycle in three different (2, 4 and 6 hours) exposing times. Exposing 2 hours with 30 mT increased the G₂/M phases in neural inductive BMSC comparing to the corresponding control. Static magnetic field decreased the percent of S phase in BMSC, during 4 hours exposure.

Keywords: Bone marrow stem cells; rat; Static magnetic fields; Cell cycle; Flowcytometry.

* Corresponding author

Address: Parviz Abdolmaleki, Biophysics Department, Faculty of Biology Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Tel: +98 21 82883404

Fax: +98 21 82884484

E-mail: parviz@modares.ac.ir

تأثیر میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۱۵ و ۳۰ میلی تسلا بر روی چرخه سلولی در سلولهای مزانشیمی مغز استخوان رت القا شده با مواد تمایز دهنده سلولهای عصبی

رضا معصومی جهان‌دیزی^۱، پرویز عبدالمالکی^۲ و سید جواد مولی^۳

^۱ دانشجوی دکترای بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

masoomi_r@yahoo.com

^۲ دانشیار گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

parviz@modares.ac.ir

^۳ دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

sjmowla@modares.ac.ir

چکیده

در این مقاله به تأثیر میدان مغناطیسی ایستا با شدت‌های ۱۵ و ۳۰ میلی تسلا بر روی چرخه سلولی، سلولهای مزانشیمی مغز استخوان رت پرداخته شده است. سلولها بعد از کشت تحت تأثیر القاکننده‌های تمایز عصبی قرار گرفتند. القاء تمایز و تابش دهی به مدت ۲،۴ و ۶ ساعت صورت گرفت. یک گروه از سلولهای القا شده با مواد القاگر عصبی، تحت تابش میدان قرار گرفتند. در کنار این، گروه کنترل نیز وجود داشت که بدون تابش میدان بودند. برای تابش دهی از یک مولد میدان مغناطیسی ایستا که انکوباتوری در درون آن تعبیه شده بود استفاده گردید. بعد از تابش دهی، سلولها با اتانول ۷۰ درصد تثبیت شدند. سپس با پروپیدیم ایوداید رنگامیزی شده و توسط دستگاه فلوسایتومتر درصد فازهای G2/M,S,G1/G0 محاسبه گردید. برای محاسبه درصد مراحل مختلف چرخه سلولی از نرم افزار WinMdi2.9 استفاده شد. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بدست آمد. نتایج نشان داد که میدان مغناطیسی با شدت ۱۵ میلی تسلا تأثیری بر چرخه سلولی در سلولهای مزانشیمی رت در هیچ یک از زمانهای تابش دهی (۲، ۴ و ۶ ساعت) ندارد. میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۳۰ میلی تسلا و ۲ ساعت تابش موجب افزایش فاز G2/M گردید. تابش ۴ ساعته ۳۰ میلی تسلا بر چرخه سلولی سلولهای مزانشیمی تأثیرگذار بوده و فاز S را بطور معنی دار کاهش داد.

کلیدواژگان: سلولهای بنیادی مغز استخوان؛ موش صحرایی؛ میدان مغناطیسی ایستا؛ چرخه سلولی؛ فلوسایتومتری.

عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

تلفن: ۸۲۸۸۳۴۰۴، دورنگار: ۸۲۸۸۴۴۸۴، پیام نگار: parviz@modares.ac.ir

۱- مقدمه

با پیشرفت جهان، آسیبها و ضایعات ناشی از صنعت، حمل و نقل، پزشکی و غیره رو به فزونی می‌گذارد. آسیب برخی از بافتها مثل بافت عصبی و عضلانی که سلولهای آنها در نهایت تمایز قرار دارند، با مشکل درمان مواجه می‌باشند. برای درمان این گونه از آسیبها می‌توان از سلولهای بنیادی استفاده کرد [۱،۲]. محققان زیادی مطالعات خود را در این زمینه انجام می‌دهند تا بتوانند راهی برای درمان این گونه آسیبها پیدا کنند. در ایالات متحده امریکا حدود ۲۵۰۰۰۰ نفر دارای آسیب نخاعی می‌باشند و سالانه ۱۱۰۰۰ نفر به تعداد آنها افزوده می‌شود [۳]. در ایران نیز ۷۰۰۰۰ از این ضایعه رنج می‌برند [۴].

سلولهای بنیادی مغز استخوان به عنوان سلولهای پایه ای پرتوان، قابلیت تبدیل به سلولهای مختلفی چون سلولهای عصبی [۱۲-۵]، سلولهای شوان [۱۳]، سلولهای قلبی [۶،۱۴]، چربی، غضروفی و استخوانی [۱۵] را دارا می‌باشند. امروزه بحث سلول درمانی در حال پیشرفت می‌باشد. و برای درمان برخی از بیماریها از سلولهای بنیادی مغز استخوان می‌توان کمک گرفت [۱۶، ۱۷]. استفاده از سلولهای بنیادی مغز استخوان و پیوند زدن آنها برای کاستن از نارساییهای عصبی مورد توجه محققان در زمینه پزشکی می‌باشد [۱۸].

گروههای متعددی بر این باورند که پیوند سلولهای بنیادی مغز استخوان بازبازی فعالیتها مغزی در مدل‌های حیوانی که دچار آسیب مغزی می‌باشند، را به پیش می‌برد و مغز آسیب دیده جوندگان را با ساخت و ترشح فاکتورهای نوتروفیک محافظت می‌کند [۱۹]. پیوند سلولهای شوان-تهیه شده از سلولهای بنیادی مغز استخوان - در عصب سیاتیک برش داده شده موجب بازبازی و احیاء عصب در سیستم عصب محیطی می‌گردد و شاخص فعالیت عصب سیاتیک را افزایش می‌دهد [۲۰، ۲۱]. پیوند سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در بافت قلب سکنه زده خوک می‌تواند فعالیتهای انقباضی را به این بافت برگرداند [۲۲].

پیشبرد روش تمایز در محیط آزمایشگاهی برای طراحی پروتکل های درمانی نقشی اساسی دارد. پیوند سلولهایی که

در محیط آزمایشگاه تمایز پیدا کرده اند در مقایسه با سلولهای تمایز نیافته، از کارایی بالایی در پیوند برخوردار بوده و علاوه بر این کیفیت درمان نیز افزایش خواهد یافت. تمایز سلولهای بنیادی در محیط آزمایشگاهی قبل از اینکه در موجود زنده پیوند زده شود، موجب می‌شود که از تمایز خود بخودی سلولهای بنیادی به سایر سلولها در محل کاشت جلوگیری شود. ضمن اینکه خطر تومورزایی را در مورد سلولهای بنیادی جنینی نیز کاهش می‌دهد [۲۳].

ما بر آن هستیم که سلولهای بنیادی را به کمک میدان مغناطیسی ایستا بعنوان یک محرک فیزیکی وارد تمایز کنیم، در حالیکه سایر محققین در ازمون محرک های شیمیایی دچار مشکلاتی مانند سمیت زایی ترکیب شیمیایی می‌باشند. امروزه می‌توان سلولهای بنیادی را به صورت کنترل شده تمایز داد. میدان مغناطیسی نیز به عنوان یک عامل تمایز دهنده سلولهای استئوبلاست انسانی [۲۴]، موثر بر تشکیل استخوان [۲۵]، شکل سلولی [۲۶]، آپوپتوزیس [۲۷] و انتقال سیگنال [۲۸] مطالعه شده است.

گزارشهایی دیده می‌شود که در آنها تاثیر میدان مغناطیسی بر روی چرخه سلولی بررسی شده است. تاثیر میدان مغناطیسی تنها و بعد از تیمار با پرتو ایکس مطالعه شده است. نتایج بررسی محققان نشان می‌دهد که تابش میدان مغناطیسی موجب بدتر شدن اثر پرتو ایکس بر روی چرخه سلولی می‌گردد [۲۹]. سلولهای تخمدان همستر با میدان ۱۳ تسلا تابش دهی شدند و سپس چرخه سلولی آنها بررسی شد. نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که میدان مغناطیسی بر روی سلولها چه سینکرونایز شده و چه نشده، تاثیر اندکی می‌گذارد [۳۰].

علاوه بر این در برخی مطالعات از میدان مغناطیسی سینوسی استفاده شده است. در یک آزمایش ابتدا سلولهای مخمر (Sey2101a) را با اشعه فرابنفش تابش دادند سپس در معرض میدان مغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز قرار دادند. و چرخه سلولی را بررسی نمودند و مشاهدات آنها حاکی از تغییر چرخه سلولی در اثر تابش با میدان مغناطیسی سینوسی بود [۳۱].

۲- مواد و روشها

۲-۱- جداسازی سلولهای مزانشیمی

برای جداسازی و استخراج سلولهای مزانشیمی، از رتهای ۸-۱۰ هفته ای استفاده شد. این حیوانات را از حیوان خانه دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. موشهای صحرایی با کلروفرم بیهوش شدند و با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی گردیدند. بعد با کمک قیچی استخوان بر دو طرف مفصل زانو بریده شد. درون استخوان بریده شده با سرنگ ۲۶- حاوی محیط کشت α MEM، برای چند بار تخلیه گردید تا تمام سلولهای درون آن خارج شود. محیط کشت دارای پنی سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و آفوتریسین B (۰.۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) می باشد. سلولهایی که به این شکل استخراج شدند، در حجم ۴ میلی لیتر بوده که بعداً ۱ میلی لیتر سرم جنین گاوی به آن افزوده شد. این سلولها در یک فلاسک 25cm^2 در انکوباتور کشت داده شدند. یک روز بعد محیط کشت تعویض گردید. در طی این عمل، سلولهای بنیادی مغز استخوان به سطح ظرف می چسبند. نتیجه این عمل آن است که سلولهای بنیادی مغز استخوان خالص می گردد. محیط سلولها یک روز در میان تعویض گردید. اگر تعداد سلولها زیاد باشد، طوری که ۹۰-۸۰ درصد سطح ظرف را بپوشاند، باید آنها را پاساژ داد. برای این عمل محیط کشت را دور ریخته و به آن ۱ میلی لیتر تریپسین ۰.۲۵ درصد اضافه کرده و به مدت ۳-۵ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد. سپس سلولها را به یک لوله فالكون منتقل نموده و در شرایط ۱۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ محیط بالایی را دور ریخته و به رسوب ۲-۳ میلی لیتر محیط کشت اضافه کرده و خوب پیتاژ می کنیم تا به صورت یکنواخت در بیاید. حال با توجه به تعداد فلاسکهای مورد نظر سلولها را بین آنها تقسیم شد. بعد از ۵-۶ پاساژ

اثر میدان مغناطیسی سینوسی ۵۰ هرتز بر چرخه سلولی، سلولهای بنیادی مزانشیمی رت به کمک دستگاه فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفته است. برای این منظور سلولهای لکومیای انسانی (HL-60) تحت تابش ۲۰ میلی تسلا- ۵۰ هرتز- قرار گرفتند. سپس توزیع فراوانی سلولها در هر فاز سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاکی از تاثیر کم ولی معنی دار بر روی چرخه سلولی بود [۳۲]. میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۱.۵ و ۷.۰۵ تسلا و میدان مغناطیسی با فرکانس خیلی پایین و شدت ۱۰۰ و ۱۰ میلی تسلا، تاثیری بر روی چرخه سلولی در دو رده سلولهای توموری انسان، سلولهای لوسمی انسانی و EA2 ندارد [۳۳]. تابش با میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا به مدت ۷۲ ساعت می تواند فعالیتهای متابولیکی سلولهای HL60 را به تاخیر بیندازد [۳۴].

مساله حایز اهمیت در این مورد بررسی و شناسایی تمایز هدفمند این سلولها می باشد. برای بدست آوردن نتیجه مطلوب باید تمام جوانب مساله را مورد بررسی قرار داد. تمایز سلولها به کمک مواد شیمیایی امکان پذیر است ولی واقعیت آنست که استفاده از مواد شیمیایی با موانعی همراه می باشد. القا تمایز توسط مواد شیمیایی در فاصله نزدیک به سلول، صورت می پذیرد. برخی محرکهای تمایز نیز وجود دارند که بدون تماس با سلول و از فاصله ای دور این اثر را دارا می باشند. این محرکها در مقایسه با محرکهای شیمیایی اثرات نامطلوب کمتری دارند.

یکی از خصوصیات سلولی، چرخه آن می باشد. در این مطالعه به اثرگذاری میدان مغناطیسی ایستا بر چرخه سلولی پرداخته می شود. میدان مغناطیسی می تواند رشد سلول را که در اثر ماده تمایز دهنده BT2cAMP دچار وقفه شده است را القا کند [۴۵]. اگر میدان مغناطیسی ایستا بر چرخه سلولی تاثیر گذار باشد، بر روی رشد سلولی و نرخ تمایز نیز می تواند موثر باشد. دانستن رفتار سلولها در برابر تابش میدان مغناطیسی ایستا، برای استفاده از این پدیده فیزیکی لازم و ضروری می باشد.

۳-۲ مولد میدان مغناطیسی

تابش دهی نمونه‌ها به کمک یک بوبین (سلنونید) انجام گرفت که دارای ۱۴۰۰ دور سیم پیچ، ۴۰ سانتی متر طول و ۱۰ سانتی متر قطر می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- تصویری از مولد میدان مغناطیسی ایستا- بوبین- که در آن بدنه اصلی، پروانه خنک کننده و کمپرسور گاز فرئون دیده می‌شود.

در داخل این بوبین میدان مغناطیسی ایستای تقریباً یکنواخت تولید می‌گردد. با توجه به جریان عبوری می‌توان تا شدت ۹۰ میلی تسلا با این دستگاه کار کرد. دستگاه مولد میدان مغناطیسی در درون خود دارای انکوباتور می‌باشد که مجهز به حسگرهای گاز دی اکسید کربن، رطوبت و دما می‌باشد.

برای کنترل گاز CO_2 ، میزان رطوبت و دما به ترتیب حسگر گاز دی اکسید کربن -ITR 498 ADOS-، رطوبت و سنح و کنترلر حرارتی در آن تعبیه گردید (شکل ۲).



شکل ۲- تصویری از بوبین به همراه سیستم کنترل کننده دما، رطوبت و گاز CO_2 دیده می‌شود.

متوالی می‌توان مطمئن شد که سلولها یک دست شده و همه از نوع سلولهای مزانشیمی می‌باشند. بطور معمول سلولها بعد از ۴-۵ روز به مرحله پاساژدهی می‌رسند. شکل این سلولها در موقعی که شناور هستند گرد ولی بعد از چسبیدن به سطح محیط کشت شکل آنها کشیده و دوکی می‌باشد.

۲-۲-۲ القا عصبی

برای القاء تمایز به سلولهای عصبی، سلولهای مزانشیمی را به دو طریق می‌توان تیمار کرد [۹]. برای انجام این کار ما از روش نوروکوتل استفاده کردیم [۹،۷]. مواد مورد استفاده برای القاء تمایز عصبی شامل ۲٪ دی متیل سولفوکساید (مرک)، ۲۵ میلی مولار کلرید پتاسیم (مرک)، ۲ میلی مولار والپروئیک اسید (سیگما)، ۱۰۰ میلی مولار بوتیلید هیدروکسی انیزول (سیگما)، ۵ میکروگرم بر میلی لیتر انسولین (سیگما)، ۱۰ میکرومولار فورسکولین (شرکت سیگما) و ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر فاکتور رشد فیروبلاست قلیایی (شرکت رش) بود. برای ایجاد تمایز به طرف سلولهای عصبی، سلولهای بنیادی مغز استخوان با محیط القا کننده عصبی تیمار شدند. روز قبل از اعمال تمایز عصبی، محیط کشت تعویض گردید و سلولهای بنیادی در معرض فاکتور رشد با غلظت ۱۰ نانوگرم بر هر میلی لیتر در محیط کشت حاوی ۲۰ درصد سرم قرار گرفتند. روز بعد محیط کشت سلولها تخلیه گردید و با بافر فسفات شستشو داده شد. سپس محیط کشت حاوی مواد القا کننده عصبی و فاکتور رشد به آنها اضافه گردید. در این مطالعه سلولها به دو گروه آزمون و شاهد تقسیم شدند. سلولهای موجود در گروه آزمون به مدت زمانهای ۲، ۴ و ۶ ساعت و شدتهای ۱۵ و ۳۰ میلی تسلا در دستگاه مولد میدان مغناطیسی نگهداری شدند. گروه کنترل نیز با محیط القا کننده عصبی، هم زمان با گروه آزمون در انکوباتور کشت داده شدند.

۲-۴-۱- رنگ آمیزی

برای اینکه دستگاه فلوسایتومتر بتواند سلولها را شمارش کند و بر اساس مقدار مولکول DNA آنها را گزارش دهد، ضروری است که با رنگی مناسب سلولها رنگ آمیزی شوند. برای این منظور از پروپیدیوم آیواید (سیگما) استفاده گردید. در مرحله رنگآمیزی علاوه بر رنگ، از دو ماده دیگر نیز استفاده شد. از آنجایی که مولکولهای RNA نیز به این رنگ واکنش نشان می دهند، و در آزمایش اختلال ایجاد می کنند، به کمک آنزیم تجزیه کننده RNA که فاقد آنزیم تجزیه کننده DNA می باشد، مولکول های RNA را در ادامه آزمایش حذف کردیم. برای تاثیر RNase (فرمتاز) بر روی مولکولهای RNA این آنزیم به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه بر روی سلولها تیمارگردید. از ماده تریتون X100 (مرک) هم برای نفوذپذیر کردن غشاء سلول استفاده شد. مطابق روش کار به ازاء هر میلی لیتر از کوکتل رنگ، ۱ میکرولیتر تریتون X100 و ۲۰ میکرولیتر از محلول استوک رنگ (با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) و ۲۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر RNase استفاده شد. در مرحله رنگآمیزی، ابتدا سلولها سانتریفیوژ شده سپس با ۰.۵ میلی لیتر بافر فسفات شستشو داده شدند. بعد از چند بار پیپتاژ دوباره سانتریفیوژ شده و محلول روئی دور ریخته شد. سپس به رسوب بدست آمده ۰.۵ میلی لیتر از کوکتل رنگی اضافه کرده و با توجه به دما، ۳۰-۴۵ دقیقه فرصت می دهیم. بعد از سپری شدن زمان لازم نمونه ها آماده برای دستگاه فلوسایتومتر می باشند.

۲-۴-۲- فلوسایتومتری

دستگاه فلوسایتومتر (FACS Calibur Becton Dickinson) با ارسال امواج الکترومغناطیس با طول موج مشخص، موجب تحریک رنگ فلورسانس موجود در سلول می گردد. از آنجایی که این رنگ به مولکولهای DNA متصل می گردد لذا مقدار آن متناسب با مقدار مولکولهای DNA می باشد. سلولها به وسیله دستگاه و توسط یک سوزن باریک به داخل کشیده می شوند و به صورت باریکه ای از جریان سلول، از مقابل پرتو عبور می کنند.

میزان دقت شدت میدان ۰.۱ میلی تسلا، رطوبت ۱٪ و دما نیز از دقت ۰.۱ سانتی گراد برخوردار بود. برای تابش دهی نمونه ها، آنها را در داخل انکوباتور قرار داده و در پوش دستگاه به کمک پیچهای مخصوص بسته شد. بعد از تثبیت دما می توان شصتی تزریق و کنترل گاز CO₂ را فشار داد تا آرام آرام این گاز به درون آن روانه گردد. وقتی که مقدار آن به ۵٪ رسید دستگاه بطور اتوماتیک ورود گاز را قطع می کند. در طول آزمایش از روی مانیتور می توان میزان رطوبت، دما و درصد CO₂ را مشاهده کرد.

به جهت عبور جریان الکتریکی، در درون مولد میدان مغناطیسی ایستا مقدار زیادی حرارت تولید می شود. برای خنک کردن محیط انکوباتور از گردش گاز فرئون درون لوله مسی که به دور انکوباتور پیچیده شده است، استفاده گردید. گاز به کمک یک کمپرسور در لوله مسی گردش می کند و توسط فن خنک می گردد (شکل ۲). در حین آزمایش فلاسکهای حاوی سلول، در درون انکوباتور قرار گرفته و گروه شاهد آنها در انکوباتور اتاق کشت گذاشته شد. برای جلوگیری از اثر میدان مغناطیسی تولید شده در دستگاه بر روی گروه شاهد، آنها را در اتاق دیگری قرار دادیم. نمونه های گروه آزمون به مدت ۴،۲ و ۶ ساعت در معرض میدان مغناطیسی ایستا قرار گرفتند.

۲-۴-۳- بررسی چرخه سلولی

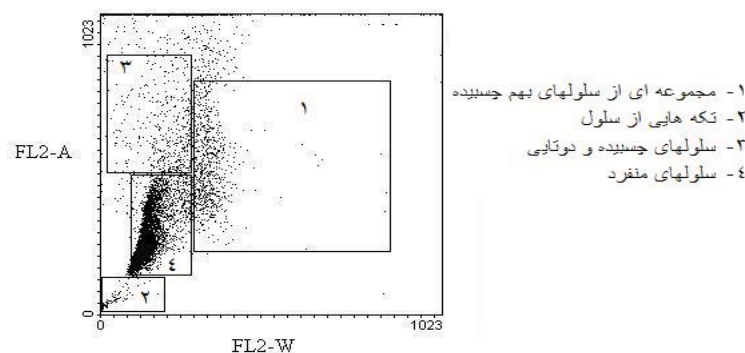
برای بررسی چرخه سلول از دستگاه فلوسایتومتری دانشگاه علوم پزشکی تهران- ایران- استفاده کردیم. بعد از اتمام تابش دهی سلولها را به یک فالكون متقل کردیم. با کمک محلول تریپسین ۰.۲۵ درصد و تیمار ۳-۵ دقیقه ای در انکوباتور، سلولهای چسبیده به سطح فلاسک جدا شدند. سپس سوسپانسیون سلولها با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه ته نشین شدند. برای تثبیت سلولها از ۴.۵ میلی لیتر الکل اتانول ۷۰ درصد و ۰.۵ میلی لیتر بافر فسفات استفاده گردید. سلولها به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و به این ترتیب تثبیت آنها کامل شد.

۲-۵ - تجزیه و تحلیل

تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده توسط نرم افزار ۱۳ SPPS انجام گرفت. برای این کار از میانگین داده ها و انحراف معیار استفاده گردید.

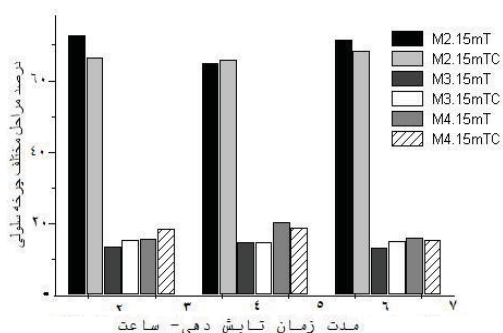
۳- نتایج

نتایج خام به صورت نمودار نقطه ای پراکنده، توسط نرم افزار WinMdi 2.9 پردازش گردید. نمودار پراکنده نقطه ای



شکل ۳- توزیع سلولها بر اساس مقدار DNA موجود در آنها دیده می شود.

قرار داشتند. گروه کنترل نیز در زمانهای مشابه ولی بدون اعمال میدان مغناطیسی ایستا در انکوباتور نگهداری شدند. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که میدان مغناطیسی با شدت ۱۵ میلی تسلا در هیچ یک از مراحل چرخه سلولی موثر واقع نشده است. و تفاوت درصد فازهای چرخه سلولی آزمون با شاهد معنی دار نمی باشد (نمودار ۱).



نمودار ۱- تاثیر میدان مغناطیسی ۱۵ میلی تسلا بر روی مراحل مختلف چرخه سلولی در زمانهای تابشی مختلف را نشان می دهد.

با این کار قسمت هایی که شامل سلولهای غیر از سلول واحد باشد، حذف شده و فقط سلولهای منفرد مورد بررسی قرار می گیرند.

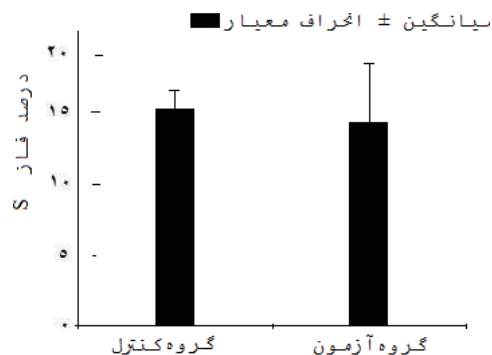
دستگاه فلوسایتومتر بطور معمولی ۱۰۰۰۰ سلول را شمارش می کند و براساس مقدار مولکول DNA نمودار نقطه ای آنها را رسم می کند. بعد از پردازش داده ها، درصد هر یک از مراحل چرخه سلولی محاسبه گردید.

۳-۱- میدان ۱۵ میلی تسلا

برای مطالعه تاثیر میدان مغناطیسی با شدت ۱۵ میلی تسلا، نمونه ها و کنترل آنها پنج بار مورد آزمون قرار گرفتند. نمونه ها به مدت ۴،۲ و ۶ ساعت با عوامل تمایز دهنده سلولهای بنیادی به طرف سلولهای عصبی تیمار شدند. ضمن اینکه در این مدت آنها تحت تابش میدان مغناطیسی ایستا نیز

۲-۳- میدان ۳۰ میلی تسلا

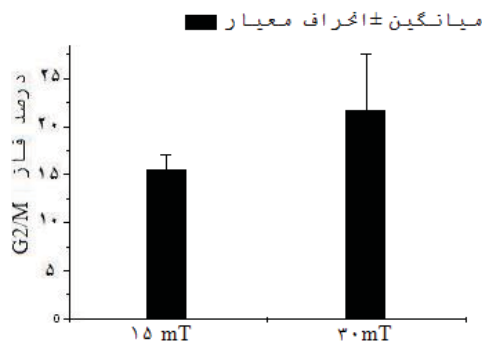
علاوه بر این سلولهایی که به مدت ۴ ساعت تحت تاثیر میدان ۳۰ میلی تسلا قرار گرفته بودند، فاز S مربوط به آنها با کاهش روبرو می باشند ($p=0.001$) (نمودار ۴).



نمودار ۴- نشان می دهد که مرحله S در چرخه سلولی، سلولهایی که به مدت ۴ ساعت تابش دیده اند، در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است ($p=0.001$)

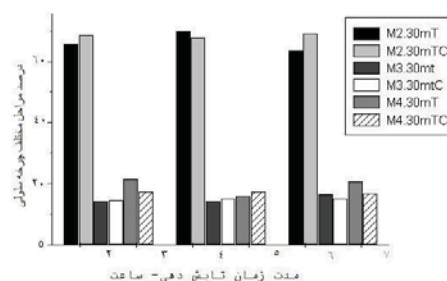
۳-۳- مقایسه ۱۵ و ۳۰ میلی تسلا

برای بررسی و مطالعه تاثیر دو میدان مغناطیسی ایستای متفاوت، روی چرخه سلولی، تغییر فازهای چرخه سلولی در دو شدت ۱۵ و ۳۰ میلی تسلا با همدیگر مقایسه گردید. نتیجه نشان داد که مرحله G2/M دو تابش یاد شده با زمان ۲ ساعت دچار تغییر معنی دار شده است. ($p < 0.001$). در صورتی که زمانهای تابشی ۴ و ۶ ساعته دو میدان با همدیگر تفاوت معنی داری را نشان ندادند (نمودار ۵).



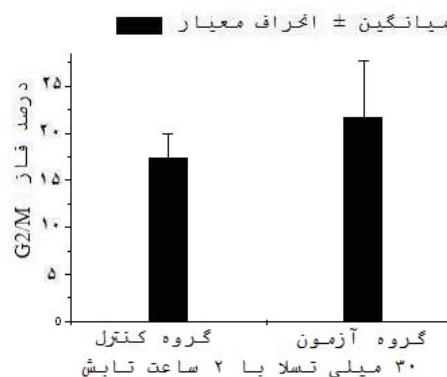
نمودار ۵- نشان می دهد که مرحله G2/M در اثر تابش با میدان مغناطیسی ۳۰ و ۱۵ میلی تسلا دچار تغییر شده است. مدت تابش ۲ ساعت می باشد. داده های مربوط به اختلافات معنی دار در جدول ۱ آمده است

داده های بدست آمده از تاثیر میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۳۰ میلی تسلا به طور یکجا در نمودار ۲ نشان داده شده است. در اثر تابش دهی نمونه ها با میدان مغناطیسی ایستا درصد فاز G0/G1 دچار کاهش شده ولی این کاهش معنی دار نیست. ۶ ساعت نگهداری سلولهای تحریک شده در میدان مغناطیسی ۳۰ میلی تسلا مرحله G2/M را افزایش می دهد ولی این افزایش معنی دار نیست.



نمودار ۲- تاثیر میدان مغناطیسی ۳۰ میلی تسلا بر روی مراحل مختلف چرخه سلولی در زمانهای تابشی مختلف را نشان می دهد.

برای بررسی تاثیر میدان مغناطیسی ایستا بر روی مراحل مختلف چرخه سلولی، رابطه بین مدت زمان تابش دهی و درصد فازها در نمودارهای جداگانه ای، ترسیم شدند. نتایج حاصل از تابش ۲ ساعته میدان مغناطیسی ایستا، نشانگر آنست که با تابش ۳۰ میلی تسلا فاز G2/M بطور معنی دار افزایش می یابد ($p < 0.005$) (نمودار ۳).



نمودار ۳- درصد مرحله G2/M رادر دو گروه تابش دیده و کنترل نشان می دهد. تفاوت معنی دار است ($p=0.017$)

جدول ۱-

میانگین و انحراف معیار برای مراحل مختلف چرخه سلولی که در آن تفاوتی معنی دار می باشد

مرحله G2/M، ۲۰ ساعت تابش میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۳۰ میلی تسلا (p=۰.۰۱)

شدت میدان مغناطیسی ایستا	فاز	میانگین	انحراف معیار
کنترل - ۳۰ میلی تسلا	G2/M	۱۷.۴	۲.۵۵
۳۰ میلی تسلا	G2/M	۲۱.۷۵	۵.۹

مرحله S، ۴ ساعت تابش میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۳۰ میلی تسلا (p=۰.۰۰۱)

شدت میدان مغناطیسی ایستا	فاز	میانگین	انحراف معیار
کنترل - ۳۰ میلی تسلا	G2/M	۱۵.۱۸	۱.۳۵
۳۰ میلی تسلا	G2/M	۱۴.۲۷	۴.۱۲

داده های مربوط به مرحله G2/M در دو شدت میدان که تفاوت آنها معنی دار می باشد (p=۰.۰۰۱)

شدت میدان مغناطیسی ایستا	فاز	میانگین	انحراف معیار
۱۵ میلی تسلا	G2/M	۱۵.۶۵	۱.۴۷
۳۰ میلی تسلا	G2/M	۲۱.۷۵	۵.۹

۴- نتیجه گیری و بحث

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر میدان مغناطیسی ایستا بر روی چرخه سلولی، سلولهای مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی بود. مطالعات انجام شده حاکی از اثر گذاری میدان مغناطیسی بر رشد سلولها و بیان ژن می باشد [۳۶،۳۵]. نتایج برخی از تحقیقات نشان می دهد که میدان الکترومغناطیسی می تواند بر جریان کلسیم تاثیرگذار باشد [۳۸،۳۷]. تاثیر میدان مغناطیسی ایستا بر روی چرخش ترکیب پروتئین-یون نیز بررسی شده است. نتیجه حاصل از این تحقیق بیانگر آنست که میدان مغناطیسی بر روی ترکیب مولکول-یون تاثیر می گذارد [۳۹]. علاوه بر این امواج الکترومغناطیسی می توانند صورت بندی پروتئینها را تغییر دهند [۴۰]. گزارشهایی مبنی بر مضر بودن میدان مغناطیسی بر روی شکل گیری غضروف دیده می شود [۴۱]. برخی مطالعات نیز از سودمند بودن میدان مغناطیسی برای بقاسلول خبر می دهند [۴۲]. با توجه به مطالب و مراجع اخیر میتوان گفت که میدان مغناطیسی بر عملکرد سلول و مولکولهای بزرگ داخل آن تاثیر چشمگیری دارد. اگرچه در برخی موارد نتایج ضد و نقیض دیده می شود. در خصوص تاثیر میدان مغناطیسی، شدت میدان و نوع آن حایز اهمیت می باشد. سلولهای بنیادی مغز استخوان، نمونه خوبی برای سلول درمانی می باشند. به عقیده دانشمندان عاملهای فیزیکی می توانند به عنوان ابزاری برای تمایز هدفمند این سلولها قرار گیرند.

برای آشکار شدن اثر میدان مغناطیسی و آماده کردن بستر استفاده از آن در مسایل درمانی، اثرات میدان مغناطیسی بر روی سلول و موجود زنده باید با دقت کافی مطالعه شود. تا استفاده از آن با بهترین وضعیت صورت پذیرفته و از اثرات زیان آور احتمالی جلوگیری شود. بر اساس برخی تحقیقات انجام شده، با تغییر شرایط موجود، می توان سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را در مسیر تمایز خاصی، به حرکت واداشت. این کار به توسط تعدادی از مواد شیمیایی امکان پذیر است. ولی سعی ما بر آن است که از عاملهای فیزیکی - میدان مغناطیسی ایستا - در این راستا استفاده کنیم و واکنش سلولهای بنیادی را در برابر آن مورد مطالعه قرار دهیم. تعداد معدودی از محققان بر این باورند که سلولهای بنیادی مغز استخوان جزء سلولهای بنیادی پرتوان محسوب شده و توانایی تمایز به هر سه رده سلول جنینی را دارا می باشند [۸]. با این حال خیلی از پژوهشگران اعتقاد دارند که این سلولها، سلولهای پایه ای بالغ بوده و در مسیر تمایز خود با محدودیتهایی روبرو می باشند و فقط به رده های محدودی از سلولها تمایز پیدا می کنند. از آنجاییکه مطالعه و تحقیق بر روی این سلولها مبحث جدید و تازه ای می باشد لذا مطالعات زیادی در این زمینه ضروری به نظر می رسد. شایان ذکر است که رفتار سلولها در برابر میدان مغناطیسی ایستا و الکترومغناطیسی یکسان نبوده و به نوع سلول، مدت زمان تابش، نوع میدان بستگی دارد [۴۳]. نتایج ما نشان داد که میدان مغناطیسی با شدت ۱۵ میلی تسلا در هیچ یک از زمانهای تابشی تاثیر معنی داری بر روی تغییر مراحل مختلف چرخه سلولی نداشت. ناکاهازا و همکارانش سلولهای CHO-K1 را با میدان ۱۰ تسلا تابش دادند و مراحل مختلف چرخه سلولی را بررسی نمودند. نتایج آنها نشان داد که میدان مغناطیسی تاثیر معنی داری بر مراحل چرخه سلولی نداشته است [۴۴]. با وجود اینکه دو شدت میدان ۱۵ میلی تسلا و ۱۰ تسلا با همدیگر اختلاف زیادی دارند، ولی در هر دو مورد میدان مغناطیسی بر مراحل چرخه سلولی بی تاثیر می باشد. واضح است که دو رده سلولی CHO-K1 و BMSC با همدیگر خیلی تفاوت دارند. علاوه بر این سلولهای

- Replaces Oligodendrocytes and Astrocytes after Primate Spinal Cord Injury; *The Journal of Neuroscience* 2006; 26(8):2157-2166.
- [2] Ankeny P. D, McTigue M. D, Jakeman B. L; Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats; *Experimental Neurology* 2004; 190:17-31
- [3] <http://www.sci-info-pages.com/facts.html>
- [4] <http://noorportal.net/1/23/27/19201.aspx>
- [5] Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, Medico E, Madon E, Vercelli A, and Fagioli F; Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types; *Experimental Hematology* 2006;34: 1563-1572.
- [6] Krause DS. ; Plasticity of marrow-derived stem cells; *Gene Therapy* 2002; 9:754-758.
- [7] Woodbury D, Schwarz J. E, Prockop J. D, and Black B. I; Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons; *Journal of Neuroscience Research* 2000; 6: 364-370.
- [8] Woodbury D, Reynolds K, and Black B. I; Adult Bone Marrow Stromal Stem Cells Express Germline, Ectodermal, Endodermal, and Mesodermal Genes Prior to Neurogenesis; *Journal of Neuroscience Research* 2002; 96:908-917.
- [9] Schultz S. S, Lucas A. P; Human stem cells isolated from adult skeletal muscle differentiate into neural phenotypes; *Journal of Neuroscience Methods* 2006;152:144-155.
- [10] Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T. B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D. R., and Sanberg P. R. ; Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro; *Experimental Neurology* 2000; 164:247-256.
- [11] Lu P, Blesch A, and Tuszynski M. H.; Induction of Bone Marrow Stromal Cells to Neurons: Differentiation, Transdifferentiation, or Artifact? ; *Journal of Neuroscience Research* 2004;77: 174-191.
- [12] Deng W, Obrocka M, Fischer I, and Prockop J. D; In Vitro Differentiation of Human Marrow Stromal Cells into Early Progenitors of Neural Cells by Conditions That Increase Intracellular Cyclic AMP; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;282:148-152.
- [13] Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M; Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;359: 915-920
- [14] Li XiaoH, Yu X.Y , Lin Q.X, Deng C.Y, Shan Z.X, Yang M, Lin S; Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2007; 42: 295-303.
- [15] Birgit N, Gianluca G, Linda H, Lisa K, Alastair M, and Itzhak F; Reevaluation of In Vitro Differentiation Protocols for Bone Marrow Stromal Cells: Disruption of Actin Cytoskeleton Induces Rapid Morphological Changes and

BMSC تحت تاثیر القا کننده عصبی تیز بودند. تاثیر متفاوت شدت های مختلف میدان الکترومغناطیسی بر روی رشد سلولی، در سلولهایی که با ماده تمایز دهنده BT2cAMP تیمار شده بودند، گزارش شده است. تونینی و هم تیمیهای علمی وی سلولهای نوروبلاستوما- گلیا(NG108-15) را با ماده تمایز دهنده BT2cAMP تیمار کردند. سپس شدت میدانهای متفاوت و در زمانهای مختلف بر این سلولها تابیده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که تا مدت زمان تابشی ۱۵ ساعت و تیمار ماده تمایز دهنده و میدان الکترومغناطیسی تفاوتی در تعداد سلولها دیده نشد. ولی بعد از این زمان تابش میدان الکترومغناطیسی بر روی ماده تمایز دهنده اثر مهاری اعمال می کند[۴۵]. شدت میدان ۳۰ میلی تسلا با ۲ ساعت تابش موجب تغییر معنی دار فاز G2/M گردید($p < 0.05$). فاز S نیز با ۴ ساعت تابش دچار تفاوت معنی دار بین گروه آزمون و کنترل شد. به نظر می رسد که تاثیر میدان مغناطیسی بر روی سلولها از یک قاعده کلی تبعیت نمی کند به این معنی که اثر میدان همیشه متناسب با شدت آن نیست. رفتار و اثر هر شدت میدان بر روی سلول خاص، مربوط به خود آن شدت میدان، زمان تاثیر و نوع سلول می باشد. بنابر این لازم است که در این خصوص مطالعات زیادی انجام گیرد تا از این طریق شدت میدان و زمان تابش بهینه، تعیین شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از سرکار خانم حیات، تکنیسین دستگاه فلوسایتومتر دانشگاه تهران، صمیمانه تشکر می کنند.

علائم اختصاری

BMSC: Bone Marrow Stromal Stem Cell
SMF: Static Magnetic Field
NIM: Neural Inductive Medium

مراجع

- [1] Yang H, Lu P, McKay M. H, Bernot T, Keirstead H, Steward O, Gage H. F, Edgerton V. R, and Tuszynski H. M; Endogenous Neurogenesis

- [28] Pacini S, Barbara V. G, Barnia T, Ruggiero M, Sardi I, Paolo P, Gulisano M; Effect of 0.2 T static magnetic field on human neurons: remodeling and inhibition of signal transduction without genome instability; *Neuroscience Letters* 1999;267:185-188.
- [29] Sabet S. A, Abdolmaleki P, Mowla S. J, Ghanati F, Heshmati E, Tavasoli Z, Manoochehri J. A; Static magnetic fields aggravate the effects of ionizing radiation on cell cycle progression in bone marrow stem cells; *Micron* 2010; 41:101–104.
- [30] Guoping Z, Shaopeng C, Ye Z, Lingyan Z, Pei H, Lingzhi B, Jun W, Lei W, Lijun W, Yuejin W, An X; Effects of 13T Static Magnetic Fields (SMF) in the Cell Cycle Distribution and Cell Viability in Immortalized Hamster Cells and Human Primary Fibroblasts Cells; *Plasma Science and Technology* 2010;12(1): 123-128
- [31] Markkanen A, Juutilainen J, Lang S, Pelkonen J, Rytomaa T, and Naarala J; Effects of 50 Hz Magnetic Field on Cell Cycle Kinetics and the Colony Forming Ability of Budding Yeast Exposed to Ultraviolet Radiation; *Bioelectromagnetics* 2001;22: 345-350.
- [32] Huang L, Dong L, Chen Y, Qi H, and Xiao D; Effects of sinusoidal 50 Hz magnetic field on viability, cell cycle and apoptosis of HL-60 cells; *The European Physical Journal applied physics* 2006;35:217–221.
- [33] Schiffer B.I, Schreiber G.W, Graf R, Schreiber M. E, Jung D, Rose M.D, Hehn M, Gebhard S, Sagemu ller J, Spie W. H, Oesch F, Thelen M, and Hengstler G. J; No Influence of Magnetic Fields on Cell Cycle Progression Using Conditions Relevant for Patients During MRI; *Bioelectromagnetics* 2003;24: 241-250.
- [34] Sabo J., Mirossay L., Horovcak L., Sarissky M., Mirossay A., Mojzis J; Effects of static magnetic field on human leukemic cell line HL-60; *Bioelectrochemistry* 2002;56: 227– 231.
- [35] Potenza L, Ubaldi L, Sanctis R. D, Bellis R. D, Cucchiari L, Dachà M; Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli*; *Mutation Research* 2004; 561: 53–62
- [36] Hirai T, Nakamichi N, and Yoneda Y; Activator Protein-1 Complex Expressed by Magnetism in Cultured Rat Hippocampal Neurons; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 292: 200–207
- [37] Teodori L, Gohde W, Valente M. G, Tagliaferri F, Coletti D, Perniconi B, Bergamaschi A, Cerella C, and Ghibelli L; Static Magnetic Fields Affect Calcium Fluxes and Inhibit Stress-Induced Apoptosis in Human Glioblastoma Cells; *Cytometry* 2002; 49:143–149
- [38] Aldinucci C, Palmi M, Sgaragli, Benocci A, Meini A, Pessina F, Pessina G.P; The effect of pulsed electromagnetic fields on the physiologic behaviour of a human astrocytoma cell line; *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1499:101-108
- [39] Binhi V.N., Alipov Y.D., and Belyaev I.Y; Effect of Static Magnetic Field on *E. coli* Cells and Mimics Neuronal Phenotype; *Journal of Neuroscience Research* 2004;77:192–204.
- [16] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Ishii K, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H; Mesenchymal Stem Cells That Produce Neurotrophic Factors Reduce Ischemic Damage in the Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Model; *Molecular therapy* 2005;11(1) :96-104.
- [17] Chopp M and Li Y; Treatment of neural injury with marrow stromal cells; *the lancet neurology* 2002; 1: 92-100.
- [18] Chen C-J, Ou Y-C, Liao S-L, Chen W-Y, Chen S-Y, Wu C-W, Wang C-C, Wang W-Y, Huang Y-S, Hsu S-H; Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair; *Experimental Neurology* 2007; 204:443–453.
- [19] Chen Q, Long Y, Yuan X, Zou L, Sun J, Chen S, Perez-Polo J. R, and Yang K; Protective Effects of Bone Marrow Stromal Cell Transplantation in Injured Rodent Brain: Synthesis of Neurotrophic Factors; *Journal of Neuroscience Research* 2005; 80:611–619.
- [20] Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Sawada H, and Yamamoto I; Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats; *J Neurosurg* 2004;101:806–812.
- [21] Keilhoff G, Gohl A, Langnase K, Fansa H, Wolf G; Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells; *European Journal of Cell Biology* 2006;85:11–24.
- [22] Amado C. L, Schuleri H.K, Saliaris P.A, Boyle J. A, Helm R, Oskouei B, Centola M, Eneboe V, Young R, Lima A. C. J, Lardo C. A, Heldman W. A, Hare M. J; Multimodality Noninvasive Imaging Demonstrates In Vivo Cardiac Regeneration After Mesenchymal Stem Cell Therapy; *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48(10):2116 -2124
- [23] Heng B. C, Cao T, Khawaja H. H, Zheng M. W.D, Kwang-Wei S. E, Chye N. S; An overview and synopsis of techniques for directing stem cell differentiation in vitro; *Cell Tissue Res.* 2004; 315:291–303.
- [24] Yuge L, Okubo A, Miyashita T, Kumagai T, Nikawa T, Takeda S, Kanno M, Urabe Y, Sugiyama M, and Kataoka K; Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 311: 32–38.
- [25] Yan Q.C., Tomita N., Ikada Y; Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs; *Medical Engineering & Physics* 1998;20:397–402.
- [26] Pacini S, Gulisano M, Peruzzi B, Sgambati E, Gheri G, Gheri S. B, Vannucchi S, Polli G, Ruggiero M; Effects of 0.2 T static magnetic field on human skin fibroblasts; *Cancer Detection and Prevention* 2003;27:327–332.
- [27] Jajte J, Grzegorzczak J, Zmysl M, Rajkowska E; Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes; *Bioelectrochemistry* 2002; 57:107–111.

- Individual Rotations of Ion-Protein Complexes; Bioelectromagnetics 2001; 22:79-86.
- [40] Laurence A. J, French W. P, Lindner A. R And Mckenzie R. D; Biological Effects of Electromagnetic Fields-Mechanisms for the Effects of Pulsed Microwave Radiation on Protein Conformation; J. Theor. Biol. 2000; 206:291-298.
- [41] Hsieh C.H, Lee M.C, Tsai-Wu J.J, Chen M.H, Lee H.S, Chiang H, Herbert Wu C. H and Jiang C.C Deleterious effects of MRI on chondrocytes. Osteoarthritis and Cartilage 2008; 16: 343-351.
- [42] Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, and Ghibelli L, Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx. The FASEB Journal 1999;13:95-102.
- [43] Bodega G, Forcada I, Suarez I, Fernandez B; Acute and chronic effects of exposure to a 1-mT magnetic field on the cytoskeleton, stress proteins, and proliferation of astroglial cells in culture; Environmental Research 2005; 98: 355-362
- [44] Nakahara T, Yaguchi H, Yoshida M, Miyakoshi J; Effects of Exposure of CHO-K1 Cells to a 10-T Static Magnetic Field; Radiology 2002; 224:817-822
- [45] Tonini R, Baroni M.D, Masala E, Micheletti M, Ferroni A and Mazzanti M; Calcium Protect s Differentiation Neuroblastoma Cells during 50 Hz electromagnetic Radiation; Biophysical Journal 2001; 81: 2580-2589