

تأثیر میدان مغناطیسی ایستا بر فعالیت سلول‌ها در مدل آزمایشگاهی آسیب نخاعی

خلاصه

هدف: آسیب نخاعی سالانه زندگی میلیون‌ها نفر از مردم جهان را با ایجاد اثرهای طولانی مدت و ماندگار در طول عمر ایشان تغییر می‌دهد. هدف اصلی تحقیقات بیوفیزیکی در سطوح سلولی و مولکولی در حیطه آسیب‌های نخاعی، بهبود روش‌های ترمیم نخاع با حداقل عوارض جانبی است. استفاده از میدان مغناطیسی ایستا (SMF) به‌عنوان یک روش درمانی غیرتهاجمی، ارزان و از راه دور می‌تواند یکی از رویکردهای امیدوارکننده باشد. هدف از انجام این روش، تحریک و کمک به شروع ترمیم عصب، تشدید مهاجرت سلول به محل آسیب، بازسازی محیط عملکردی و نهایتاً بازگرداندن کامل فعالیت‌های از دست رفته به صورتی غیر تهاجمی و با ایجاد حداقل آسیب جانبی می‌باشد.

روش بررسی: مدل ارائه شده در اینجا براساس فعالیت رفتار سلول‌های تشکیل‌دهنده نخاع موش نوزاد تازه متولدشده در کشت مرکب به صورت کشت اکسپلانت و به‌منظور تقلید شرایط ایجاد شده در اثر آسیب مکانیکی بر نخاع طراحی و اجرا گردید. رفتار سلول‌ها به‌صورت رصد لحظه به لحظه در محیط کشت ثبت گردید و تأثیر میدان مغناطیسی ایستا 10-300mT بر شکل، ریخت، فعالیت و مهاجرت سلول‌ها در ناحیه آسیب با استفاده از نرم‌افزارهای پردازش تصویر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: فعالیت، رشد، مهاجرت و ریخت انواع مختلف سلول‌ها به‌ویژه نوروها و آستروسیت‌ها در محیط کشت در تأثیر از میدان مغناطیسی ایستا به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تغییر کرد. استفاده از میدان باعث افزایش سرعت ترمیم فاصله بین اکسپلانت‌های به‌دست‌آمده از نخاع گردید. همچنین سلول‌ها در جهت اعمال میدان مغناطیسی امتداد یافتند و سرعت رشد و مهاجرت آن‌ها افزایش یافت. به علاوه تعداد سلول‌های مهاجرت‌کننده از بافت اکسپلانت در صورت قرار گرفتن در معرض میدان مغناطیسی ایستا به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: مطالعات بیوفیزیکی اولیه ما اثربخشی میدان مغناطیسی ایستا بر ریخت‌شناسی، جهت‌گیری و مهاجرت نوروها و سایر سلول‌های نخاعی را مشخص ساخت و توانایی رویکرد مطرح را در درمان برپایه مغناطیس در موارد آسیب نخاعی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: بیوفیزیک، آسیب نخاعی (SCI)، میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، اکسپلانت، ترمیم، کشت مرکب سلول‌های نخاع، رت

مطهره آقاملائی^۱
ساجده دماوندی^۲
حمید مباحثی^۳

۱. کارشناس، آزمایشگاه بیوفیزیک غشاء و ماکرومولکول، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. کارشناس ارشد، آزمایشگاه بیوفیزیک غشاء و ماکرومولکول، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. دانشیار، آزمایشگاه بیوفیزیک غشاء و ماکرومولکول، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، مرکز پژوهشی زیست‌مواد، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

نخاع یکی از اجزای اصلی دستگانه عصبی مرکزی مهره‌داران است که مسئولیت انتقال پیام‌های حسی و حرکتی بین مغز و بافت‌های مختلف بدن را برعهده دارد. در برش عرضی نخاع دو بخش دیده می‌شود که عبارت‌اند از: بخش مرکزی یا مادهٔ خاکستری، شامل جسم سلولی نورون‌ها و بخش خاکستری یا مادهٔ سفید که آکسون‌ها، دندریت‌ها و همچنین انواع نورون ارتباط‌دهندهٔ نورون‌های مختلف را شامل می‌گردد. آکسون نورون‌های فیبرهای حسی وارد نخاع می‌شوند و نورون‌های حرکتی از طریق اعصاب ریشه‌ای، نخاع را ترک می‌کنند [۱]. هر فیبر عصبی توسط چندین لایه پوشیده می‌شود که به ترتیب از داخل به خارج شامل لایهٔ آندونوریوم، لایهٔ بعد از میلین که آکسون را احاطه می‌کند پری‌نوریوم که مجموعهٔ چندین آکسون یا fascicle را پوشش می‌دهد و اپی‌نوریوم که خارجی‌ترین لایه است و به دور کل نورون‌ها پیچیده می‌شود، می‌گردد [۲].

آسیب نخاعی

متعاقب آسیب طناب نخاعی، با توجه به محل آسیب در یکی از بخش‌های آوران یا وبران آن اختلال ایجاد می‌شود و به صورت عدم پاسخ‌دهی به محرک‌های محیطی نمایان می‌گردد. در واقع طی آسیب، ارتباط بین آکسون و جسم سلولی قطع، ساختار غشاء و سلول تخریب و پیام عصبی در محل سیناپس متوقف می‌شود و در نتیجه ارتباط بین مغز و بافت‌های هدف مختل می‌گردد. آسیب نخاعی ممکن است به طور کامل یعنی قطع کامل نخاع یا به صورت ناقص یعنی صدمه به برخی از فیبرهای عصبی و در-عین حال سالم و فعال باقی‌ماندن مابقی آن‌ها باشد. بروز ضایعهٔ نخاعی کامل منجر به ناتوانی در راه رفتن، تخلیهٔ غیرارادی مثانه و روده و ناباروری می‌شود. میزان از دست دادن عملکرد در این ضایعه به موقعیت محل آسیب در نخاع و شدت آسیب سلول‌های موجود در آن بستگی دارد [۳]. در دقایق اول بعد از آسیب، در مادهٔ خاکستری خونریزی رخ می‌دهد و به تدریج پخش می‌شود. نخاع در محل ضربه متورم می‌شود و سپس سایر مناطق را دربرمی‌گیرد و رفته‌رفته به سیاهرگ‌های اطراف فشار وارد می‌کند که به نوبهٔ خود منجر به ایجاد کم‌خونی نوع دو می‌شود. در این مرحله خودتنظیمی جریان خون متوقف می‌شود و شوک وارده کم‌خونی را تشدید می‌کند و نهایتاً باعث آزادسازی مواد سمی از غشای سلول‌های آسیب‌دیده می‌گردد و در نتیجه آن شرایط شیمی فیزیکی الکترولیت‌ها تغییر می‌کند و باعث ایجاد آسیب و یا از بین رفتن سلول‌های منطقهٔ آسیب می‌گردد که به عنوان آسیب ثانویه شناخته می‌شود. با گسترش خونریزی طی آسیب ثانویه، پتانسیل عمل نورون‌ها مختل یا کاملاً قطع می‌شود. در نخاع سالم، از انتهای آکسون‌ها گلوتامات ترشح می‌شود و با اتصال به نورون بعدی باعث تحریک آن می‌شود. در مقابل در نخاع آسیب‌دیده، ترشح بیش از حد گلوتامات در آکسون و آستروسیت‌ها نورون‌های کناری را بیش از حد تحریک می‌کند و باعث

ایجاد یک جریان کلسیمی تخریبی توأم با تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه مرگ سلول‌های سالم می‌گردد. بروز سمیت نه‌تنها بر نورون‌ها بلکه بر الیگودندروسیت‌های سازندهٔ میلین‌ها هم تأثیر می‌گذارد. افزایش فعالیت گیرنده‌های گلوتامات باعث آسیب الیگودندروسیت‌ها می‌شود و منجر به دمیلینه‌شدن آکسون‌ها و عدم تحریک‌پذیری و فعالیت آن‌ها می‌گردد [۴].

پس از ضایعه، بیان ژن‌هایی مانند نوروتروفین‌ها، انتقال‌دهنده‌های عصبی و گیرنده‌های آن‌ها کاهش می‌یابد و مانع ترمیم نورون‌ها می‌گردد. متعاقب ایجاد صدمه، پاسخ‌های بیولوژیک آغاز می‌گردد، سیتوکین‌ها ترشح می‌گردد و التهاب ایجاد می‌شود. سلول‌های ششوان به‌همراه نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها به محل ضایعه می‌روند و با فعالیت ضد التهابی و سیتوتوکسیک خود سبب پیشرفت ضایعه و بروز آسیب ثانویه می‌شوند [۴]. با گذشت زمانی در حد روزها و هفته‌ها، آسیب باعث ایجاد یک جریان خودکشی و آپوپتوز در نورون‌ها، الیگودندروسیت‌ها، میکروگلیاها و شاید آستروسیت‌ها می‌شود و باعث گسترش محل ضایعه می‌گردد. مرگ الیگودندروسیت‌ها در مادهٔ سفید تا چند هفته پس از آسیب ادامه دارد و ممکن است به دمیلینه‌شدن پس از آسیب کمک نماید. با وجود اینکه عوامل واسط مؤثر در ایجاد آپوپتوز پس از بروز ضایع نخاعی به خوبی مشخص نیستند، نقش میکروگلیا در ایجاد مرگ الیگودندروسیت‌ها ممکن است در ایجاد و گسیل آن‌ها مؤثر باشد. با این حال فعالیت مسیرهای شناخته‌شدهٔ مهم و مؤثر در ایجاد آپوپتوز در سلولی می‌توانند مورد بررسی قرار گیرند و در شناخت مکانیسم‌های مطرح مؤثر افتند. به‌عنوان مثال، مشخص شده است که بعضی از مولکول‌های خانوادهٔ کاسپاز پروتئازهای سیستمین پس از ایجاد ضایعهٔ نخاعی فعال می‌شوند. بروز پدیده‌هایی نظیر نکروز و آپوپتوز که متعاقب ایجاد ضایعه صورت می‌گیرند [۶و۵] نیز مد نظر قرار می‌گیرند و در جهت شناخت مکانیسم‌های مطرح به کار برده می‌شوند.

در کنار آسیب‌های سیستم عصبی مرکزی، سیستم عصبی محیطی نیز ممکن است دچار آسیب‌های مختلفی گردد. این آسیب‌ها ممکن است انواع مختلفی داشته باشند و با توجه به موقعیت آسیب نسبت به گره رانویه، تغییرات متفاوتی در نورون و سیستم عصبی واجد آن صورت گیرد. برای مثال چنانچه آکسون در اثر فعالیت فاگوسیتوزی ماکروفاژها در ناحیهٔ پایین محل ضایعه (distal) تا محل گره رانویهٔ بعدی از بین بروند، آسیب والرین (Wallerian) رخ می‌دهد در حالی که بخش نزدیک به جسم سلولی آن در نورون (proximal) همچنان سالم باقی می‌ماند. در این حالت هسته بزرگ می‌شود، به یک گوشه کشیده می‌شود، اندازهٔ جسم سلولی افزایش می‌یابد و مجموعاً تا حدود سه هفته به همین صورت باقی می‌ماند تا شرایط برای رشد مجدد آکسون فراهم آید و ترمیم صورت گیرد. از انواع این آسیب‌ها می‌توان به نوراپراکسیا (Neuropaxia) اشاره کرد که در آن عصب از بین نرفته فقط کشیده شده،

انواع سلول‌ها باشند نظیر سلول‌های بنیادی یا سلول‌های بنیادی جنینی. در حالت طبیعی اعصاب سیستم عصبی محیطی توانایی ترمیم و بازتولید خود را دارند. به این معنی که فیبر عصبی آسیب‌دیده (آکسون) با وجود طویل بودن به علت حضور سلول‌های شوان که می‌توانند بستری برای استتاله‌های آکسونی جدید ایجاد کنند، می‌تواند آسیب را ترمیم کند و عملکرد اولیه خود را مجدداً به دست آورد. در طی فرآیند ترمیم، پس از فاگوسیت شدن آکسون و میلین و شکل‌گیری یک ناحیه خالی، مولکول‌های کمک‌کننده به رشد، در محل افزایش می‌یابند و سپس استتاله‌های آکسون طویل می‌گردند در این حالت نرخ طویل شدن در بهترین شرایط حدود 1 mm/day است [۸].

پیشرفت علوم پایه در بخش آسیب نخاعی و تحقیقات برای بازسازی آن منجر به پیدایش انواع روش‌های جدید شده است که از آن جمله می‌توان به درمان‌هایی که در جهت تشدید و تسهیل ایجاد استتاله‌های آن طراحی شده‌اند، اشاره نمود. در میان این روش‌ها روش‌هایی بیوفیزیکی غیرتهاجمی و هدفمند و متمرکز با بهره‌گیری از تأثیرات میدان‌های الکتریکی، مغناطیسی و یا الکترومغناطیسی خارجی، ماهیت فیزیکی، الکتریکی، و مغناطیسی بر بافت‌های زیستی و به‌خاطر حضور مولکول‌های باردار در بستر قطبی آب آن‌ها شکل گرفته است، عمل می‌کنند [۹]. از جمله اثرهای میدان‌ها در ترمیم نخاع می‌توان به تسهیل بازسازی ساختار و آرایش مولکولی آکسون و بهبود عملکرد آکسون با وجود کاهش تعداد آستروسیت‌ها توسط میدان‌های الکتریکی، اثر پیزوالکتریک و ایجاد ارتعاشات مکانیکی در مولکول‌ها و اتم‌های تشکیل‌دهنده یافت صدمه‌دیده، تنظیم هومئوستازی توسط میدان‌های الکترومغناطیسی، افزایش تمایز سلولی و نرخ رشد، تغییر مورفولوژی سلول‌ها بخصوص سلول‌های فیروبلاستی، افزایش طول استتاله‌های نورونی، افزایش استتاله‌زایی آکسون، تحریک جریان کلسیمی و تأثیر بر میکروتوبول‌ها و در نهایت افزایش سرعت ترمیم در حضور میدان‌های مغناطیسی اشاره نمود [۹].

میدان مغناطیسی ثابت و تأثیر آن بر فعالیت‌های زیستی

میدان‌های مغناطیسی توسط بارهای الکتریکی ایجاد می‌شوند. چنانچه جزء باردار ثابت باشد و شدت میدان مغناطیسی در طول زمان تغییر نکند، آن را میدان مغناطیسی ثابت می‌نامند [۱۰]. ارتباط بین عوامل مطرح در میدان‌های مغناطیسی (B) و میدان‌های الکتریکی ایجادشده در محیط (E) بر بار الکتریکی در حال حرکت (q) با سرعت خاص (V)، نیرویی (F) وارد می‌کنند که طبق قانون لورنز به صورت معادله ۱ نشان داده می‌شود.

$$F=q(E+(V \times B)) \quad \text{معادله ۱}$$

میدان مغناطیسی براساس سه کمیت اصلی ۱- چگالی شار (B)، که عبارت از خطوط میدانی است که از واحد سطح می‌گذرند و یکای

از نظر عملکردی سالم مانده و شدت ضایعه کم خواهد بود. آسیب دیگر آکسونوتمسیس (Axonotmesis) است که با وجود صدمه دیدن آکسون و غلاف میلینی، بافت‌های هدف همچنان سالم باقی می‌مانند. در اثر وقوع هردو آسیب ذکرشده تخریب والرین اتفاق می‌افتد. آسیب دیگر نوروتمسیس (Neurotmesis) خوانده می‌شود که در اثر آن نورون کاملاً تخریب و غیر فعال می‌گردد، ترمیم امکان‌پذیر نمی‌باشد، نوروما ایجاد شده و معالجه توأم با جراحی خواهد بود [۴].

روش‌های ترمیم آسیب نخاعی

از نوشته‌های مصر باستان چنین برمی‌آید که آسیب نخاعی شرایطی غیرقابل درمان بوده است. شرایط بهبود این افراد تا حدود سال ۱۹۴۰ و زمان کشف آنتی‌بیوتیک‌ها بهبود قابل توجهی نداشت. از آنجایی که سلول‌های درون سیستم عصبی مرکزی پس از تخریب و از بین رفتن، بازسازی نمی‌شوند، درمان‌های پزشکی و توانبخشی همیشه بر روی پیشگیری از گسترش عوارض و به حداکثر رساندن ظرفیت عملکردی باقی‌مانده متمرکز شده بود [۴]. تا قبل از دهه پیش، آسیب نخاعی یادآور یک صندلی چرخدار و یک عمر درمان پزشکی بود. اما، پیشرفت در علوم اعصاب توجهات را به تحقیقات در زمینه آسیب نخاعی جلب نمود. امروزه، روش‌های پیشرفته درمانی، امید بالایی برای بازسازی و ترمیم عملکردی ایجاد کرده‌اند. همچنین محققان به دنبال یافتن راهی برای تحریک رشد مجدد سلول‌های عصبی و جلوگیری از فرآیندهایی برآمده‌اند که باعث مهار رشد و بهبود عملکرد سلول‌ها در طول منطقه آسیب گردند، به طوری که رویکردهای درمانی مختلف بتوانند در کنار هم و مرحله‌به‌مرحله پیش بروند [۷]. درمان آسیب‌های نخاعی به معنی توالی منظم از مداخلات مختلف است که عبارت‌انداز: ۱) جلوگیری از پیشرفت آسیب ثانویه، نکرور و مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوز) توسط داروهای مهارکننده گیرنده گلوتامات و عوامل رشد ضد آپوپتوز نظیر BDNF، NT-3 و مهارکننده‌های پروتئاز (ICE، ۲) جبران تخریب میلین توسط مواد شیمیایی ممانعت‌کننده از اضمحلال پتانسیل عمل در مناطق دمیلینه (جلوگیری از انسداد انتقال پیام عصبی) و تسهیل کننده ساخت مجدد میلین بر روی آکسون‌ها توسط الیگودندروسیت‌های باقی‌مانده و حتی جایگزینی الیگودندروسیت‌های از دست رفته، ۳) حذف مهار عواملی که از فعالیت مهارکننده‌های طبیعی بازسازی جلوگیری می‌کنند نظیر داروهای کاهش‌دهنده بیان پروتئین‌های مهارتی، ۴) ارتقاء بازسازی آکسون از طریق فراهم کردن فاکتورهای رشد که بازسازی (استتاله‌زایی) آکسون جدید را باعث می‌شوند، نظیر BDNF، NT-3، ۵) جهت‌دهی آکسون‌ها در جهت اهداف مناسب از طریق بیان مولکول‌های هدایت‌کننده، ۶) ایجاد پل یا ساخت داربستی که آکسون را برای رشد تشویق کند، برای مثال با افزایش حضور بسترهای فیزیکی نظیر سلول‌های گلیا که از رشد آکسون حمایت می‌کنند و ۷) جایگزینی سلول‌های از دست‌رفته از طریق وارد ساختن سلول‌هایی که قادر به تولید

سمت قطب N آن [۱۶]، افزایش انشعاب و فعالیت فیلوپودیا، افزایش جوانه‌زنی آکسون و افزایش سرعت ترمیم اشاره نمود [۱۷]. با این حال کماکان مکانیسم اثر میدان مغناطیسی ایستا بر بازسازی اعصاب محیطی و مرکزی به‌طور کامل شناسایی نشده است. اعمال میدان مغناطیسی ایستا با شدت متوسط، بر انواع سیستم‌های زیستی بخصوص آن‌هایی که عملکردشان مرتبط با عملکرد کانال‌های یونی غشاء است، تأثیر گذار بوده است [۱۸]. تأثیر میدان بر تغییر پتانسیل برانگیخته حسی در موش، فعالیت عصبی سیستم عصبی مرکزی ناخودآگاه در گربه‌ها، رهاپش انتقال‌دهنده‌های عصبی در محل پایانه‌های عصبی-عضلانی در موش و پتانسیل عمل عصبی در محیط کشت سلول‌های عصبی گانگلیون ریشه پستی موش نشان داده شده است [۱۹]. اعمال میدان مغناطیسی ایستا در شدت‌های مختلف، به‌تنهایی تأثیر مگرگاری بر روی فعالیت، رشد و بقای سلول‌ها در محیط کشت نشان نداده است. مورفولوژی سلول‌ها بخصوص سلول‌های فیبروبلاستی تحت تأثیر یک میدان مغناطیسی ایستا در حدود ۰/۲ تسلا، تغییر می‌کند و طول استتاله‌های نورونی در حضور میدان نسبت به حالت کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و با افزایش شدت میدان تا یک حد خاص رابطه مستقیم دارد. بر این اساس می‌توان انتظار داشت اعمال میدان مغناطیسی بر نرخ رشد سلول‌های عصبی و در نتیجه ترمیم بخش آسیب‌دیده نقش به‌سزایی داشته‌باشد و در نتیجه نتایج به‌دست‌آمده را می‌توان در جهت تدوین درمان‌های مبتنی بر اعمال میدان مغناطیسی ثابت برای افراد قطع نخاعی مورد استفاده قرار داد، هرچند لازم است تحقیقات بیشتری در جهت شناخت دقیق اثرهای مثبت و منفی میدان‌ها و نحوه اعمال آن‌ها صورت پذیرند [۲۰].

در این تحقیق با توجه به اینکه متعاقب آسیب مکانیکی نخاعی ممکن است آرایش و ساختار پیوسته بافت نخاع در محل ضایعه صدمه ببیند و به‌صورت قطعات گسسته و پراکنده درآید، مدلی براساس رفتار قطعات پراکنده نخاع، اکسپلانت (Explant)، در محیط کشت ایجاد گردید و با بررسی رفتار سلول‌های موجود در اکسپلانت‌های قرار گرفته در فواصل متفاوت نسبت به یکدیگر در حضور و غیاب میدان مغناطیسی خارجی، تلاش گردید تأثیر میدان بر بقای سلول‌ها، میزان حضور و مهاجرت آن‌ها از اکسپلانت‌ها و همچنین میزان رشد و جهت استتاله‌های عصبی سلول‌های مجزا در طول زمان کشت را به‌صورت لحظه‌به‌لحظه (Time-Lapse)، ثبت و مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گیرد.

روش کار

جدا کردن نخاع و سلول‌های تشکیل‌دهنده آن

ابتدا، بدن رت دوروزه خارج از هود با الکل و بتادین استریل شد، پس از بیهوش کردن آن با کتامین و زایلازین به‌طور ناگهانی سرش با قیچی قطع گردیده و چند دقیقه زمان داده شد تا رفلکس‌های بدنش قطع

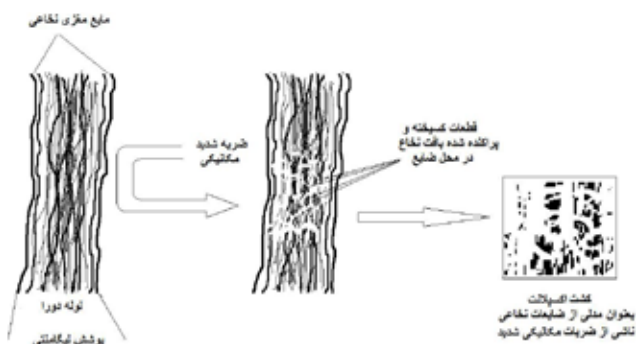
آن در سیستم CGS گوس و در SI، تسلا، یک نیوتن بر آمپر متر، ۲- شدت میدان (H)، معرف نیروی لازم برای مغناطیس کردن اجسام و ۳- مغناطیس‌شوندگی (M) که نشان‌دهنده وضعیت مغناطیسی مواد است با واحدهای 3 emu cm در CGS و Am-1 در SI بیان می‌شود و برابر جمع برداری گشتاورهای مغناطیسی اتمی به‌ازای واحد حجم جسم می‌باشد [۱۱]. به این ترتیب با در نظر گرفتن مقدار نفوذپذیری مغناطیسی (μ^0)، رفتار یک جسم در میدان مغناطیس به‌صورت معادله ۲ نشان داده می‌شود.

$$\text{معادله ۲} \quad B = \mu^0(H + M)$$

تمامی موجودات زنده در سطح کره زمین از بدو تولد و به‌طور مداوم در معرض میدان‌های مغناطیسی مختلف با شدت‌هایی بین ۲۰ تا ۷۰ میکروتسلا، بسته به ضخامت و جنس پوسته زمین در مناطق جغرافیایی محل سکونت خود قرار می‌گیرند. به‌طور کلی میدان‌های مغناطیسی براساس شدت آن‌ها به چهار دسته میدان‌های ضعیف (کمتر از 1mT)، میدان‌های با شدت متوسط (بین ۱ میلی‌تسلا تا ۱ تسلا)، میدان‌های قوی (بین ۱ تا ۵ تسلا) و میدان‌های بسیار قوی (بیشتر از ۵ تسلا) تقسیم می‌شوند [۱۲].

تأثیر میدان مغناطیسی ثابت بر سیستم‌های زیستی در شدت‌های مختلف متفاوت است. در بسیاری از فرآیندهای حیاتی بدن موجودات زنده، یون‌ها و مولکول‌های باردار شرکت مؤثر دارند و هیچ‌گونه فرآیند زیستی بدون دخالت مولکول‌های باردار صورت نمی‌گیرد. این اجزای باردار برای ایفای نقش در سلول حرکت می‌کنند و تولید جریان‌های الکتریکی و به‌دنبال آن میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی می‌نمایند. بر این اساس، اعمال هر گونه میدان مغناطیسی خارجی با توجه به شدت، جهت و مدت اعمال آن می‌تواند بر موقعیت و دینامیک این گروه‌های باردار تأثیر گذارد و به تبع آن باعث بروز رخداد‌های متفاوتی در بافت‌ها و سلول‌ها گردد که ممکن است در نهایت به صور سازنده یا مخرب نمود پیدا نمایند. برای مثال در شرایط طبیعی، سرعت پلیمریزاسیون و دپلمریزاسیون میکروتوبول‌ها در حال تعادل ثابت می‌باشد اما، اعمال میدان مغناطیسی باعث افزایش میزان پلیمریزاسیون میکروتوبول می‌شود که به‌خاطر شرایط خاص دیامگنتیک میکروتوبول و دایمرتوبولین اتفاق می‌افتد [۱۳]. مسئله دیگر، اثر میدان مغناطیسی بر رادیکال‌های آزادی است که در اثر فعالیت آنزیم‌های مختلف ایجاد می‌گردند، عمر کوتاهی دارند و به‌سرعت با جفت‌شدن مجدد تک‌الکترون‌هایشان در اربیتال‌ها از لحاظ فعالیت به حالت خنثی درمی‌آیند. از جمله رادیکال‌های آزادی که در سلول تشکیل می‌شوند، می‌توان به رادیکال اکسیژن، هیدروکسیل و نیتریک‌اکسید اشاره نمود [۱۴].

اعمال میدان‌های مغناطیسی خارجی باعث ایجاد اثرات مثبتی بر ترمیم اعصاب شده‌اند که از آن جمله می‌توان به افزایش تمایز سلولی [۱۵]، جهت‌گیری آکسون و دندریت در جهت میدان و افزایش نرخ رشد به



شکل ۱: مدل کشت اکسپلانت برای شبیه‌سازی شرایط سلول‌ها در ضایعه نخاعی مکانیکی. در این مدل تعامل بین قطعات آسیب‌دیده و پراکنده‌شده نخاع در اثر ضربه مکانیکی و رفتار سلول‌های آن‌ها به‌طور لحظه‌به‌لحظه در محیط کشت تصویربرداری و بررسی گردید.

پس از گذشت سه تا پنج روز بقاء، ریخت‌شناسی، تحرک، مهاجرت، جهت‌گیری، استتال‌زایی و سایر فعالیت‌های سلول‌های مختلف اعم از آستروسیت‌ها و نورون‌ها در داخل اکپلانت و محیط پیرامونی آن به‌صورت لحظه‌به‌لحظه تصویربرداری شدند و با روش‌های پردازش تصویر و آماری مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

اعمال میدان مغناطیسی ایستا بر کشت اکسپلانت نخاع

برای اعمال میدان مغناطیسی ایستا، محفظه (Chamber) و بزه‌های در حد و اندازه پلیت‌های ۹۶ خانه کشت، طراحی و در یک قطعه پلکسی گلاس توسط لیزر ساخته شد به‌طوری‌که در مرکز آن جایگاهی برای قرار دادن چاهک حاوی بافت و سلول‌های نخاعی و در اطراف آن فضای برای قرار دادن دو تا ده آهن‌ربای دائمی نئودیمی (NdBrFe) ضد‌زنگ تعبیه گردید تا امکان اعمال میدان با شدت‌های مختلف فراهم آید. طراحی و ساخت چمبر با ابعاد پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با هدف ایجاد امکان بررسی تأثیرات هم‌زمان میدان بر سلول‌ها در دستگاه پلیت‌ریدر صورت گرفت. با توجه به تعداد آهن‌رباها امکان ایجاد شار مغناطیسی ۱۰ تا ۳۰۰ میلی‌تسلا فراهم گردید. برای تعیین شار مغناطیسی در نقطه نقطه محل قرارگیری بافت و سلول‌های نخاعی از گوس‌متر (Hirst GM08, England) استفاده شد که براساس هال‌افکت عمل می‌کند و شار مغناطیسی در محدوده ۱ میکروتسلا تا ۱ تسلا اندازه‌گیری گردید. باتوجه به نصب پروب آن بر روی میکرومنوپولاتور، عملاً امکان شناسایی میزان شدت میدان در هر دو میلی‌متر از صفحه محل قرارگیری چاهک محتوی بافت و سلول‌های نخاعی فراهم گردید و براین‌اساس میزان هم‌وزن بودن میدان شناسایی شده و ظرف کشت در محلی با میدان یکسان قرار گرفت (شکل ۲).

تصویربرداری لحظه‌به‌لحظه Time-lapse از رفتار سلول‌ها در مدل اکسپلانت نخاع

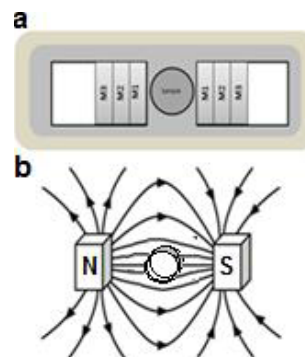
تصویربرداری از سلول‌ها به‌صورت لحظه‌به‌لحظه Time-lapse و با استفاده از میکروسکوپ نوری (Juli Smart Fluorescent,)

شود [۲۱]. سپس زیر هود و در شرایط استریل، بدن موش درون یک پلیت بزرگ گذاشته و پوست آن از دم تا گردن برش داده شد. ستون مهره‌ها از عضلات اطراف جدا گردیده و در داخل بافر PBS قرار داده‌شد تا خون و بافت‌های همبند اضافی آن شسته‌شود. این کار چندین بار تکرار شد تا از تمیزی ستون مهره‌ها و همچنین تعادل فیزیولوژی در آن اطمینان حاصل گردد [۲۲]. سپس ستون مهره‌ها در همان محلول و با قیچی دیگری به‌صورت عرضی به سه بخش تقسیم شد. هر بخش با یک پنس مهار شد و با ایجاد فشار به مناطق بالاتر آن توسط یک پنس دیگر نخاع سفید رنگ از ستون مهره‌ها خارج گردید. این کار بر روی یخ انجام گرفت تا نخاع حالت ژله‌ای خود را حفظ کرده و با ساختاری سالم و آسیب‌نندیده به راحتی از داخل ستون مهره‌ها خارج گردد [۲۳ و ۲۴]. نخاع خارج‌شده در بافر PBS روی یخ یا درون یخچال نگهداری شد و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. قطعاتی از بخش‌های خاص لومبار نخاع در اندازه‌های در حد یک میلی‌متر انتخاب شدند و در محلول محیط کشت شستشو گردیدند سپس روی هر قطعه نخاعی یک برش افقی و در راستای طول ایجاد گردید و به آرامی پرده مننژ دور نخاع با تیغ و یا با کشش پنس کنار گذاشته شد و از میان آن نخاع جدا گردید و تلاش گردید هیچ‌گونه سلول فیبروبلاستی همراه بافت نخاعی به محیط کشت منتقل نگردد.

کشت قطعات نخاع (explant)

با توجه به قطعه قطعه شدن نخاع متعاقب اعمال ضربه مکانیکی به نخاع و ایجاد ضایعه نخاعی متناسب با آن، در مدل ارائه‌شده در این مطالعه تلاش گردید شرایط ایجادشده در نخاع تا حد امکان در مدل لحاظ گردد. براین‌اساس با روش‌های مختلف اعم از فشرده کردن نخاع در داخل ظرف کشت و یا قطعه قطعه کردن نخاع و قرار دادن قطعات یک منطقه در مجاورت هم در ظرف کشت، شرایط قطعات پراکنده‌شده نخاع در ضایعه نخاعی به‌صورت قطعات اکسپلانت همانندسازی گردید (شکل ۱). در این رویکرد، شرایط رشد سلول‌ها در اکسپلانت و همچنین میزان استتال‌زایی سلول‌های حاشیه‌ای و تعامل آن‌ها با سلول‌های حاشیه از اکسپلانت مجاور و همچنین سطح مهاجرت سلول‌های موجود در اکسپلانت مد نظر قرار گرفت. هدف نهایی در این مدل، شناسایی شرایط مناسب برای ایجاد ارتباط بین دو اکسپلانت مجاور بود که تأثیر عواملی نظیر فاصله، شدت، جهت و زمان اعمال میدان و غیره ثبت و مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای این کار پس از خارج کردن قطعات نخاعی و شستشوی آن‌ها با بافر، دو یا سه قطعه با طول‌هایی در حد نیم تا یک میلی‌متر در وسط پتری قرار داده شد، پس از گذشت حدود یک دقیقه و اطمینان از چسبیدن بافت به کف ظرف، محیط کشت DMEM/F12 (۱۰ درصد FBS و ۱ درصد Pen/Str) به آن اضافه شد [۲۵] و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند.

به صورت دوقطبی و کشیده ملاحظه گردیدند. این سلول‌ها به صورتی کشیده و گاه امتداد یافته از سطح اکسپلانت ملاحظه شدند.



شکل ۲: طرح شماتیک محفظه طراحی شده برای اعمال میدان مغناطیسی ایستا بر بافت و سلول‌های نخاعی. صفحه انکوباتور از نمای بالا (a) و میزان و جهت خطوط میدان مغناطیسی اعمال شده بر نمونه (b) و محل قرارگیری ظرف کشت که در منطقه هموزن میدان تعبیه گردیده است، نشان داده شده است.

در حالت زمینه روشن و با بزرگ‌نمایی ۲۰ و ۴۰ برابر به مدت ۲۴-۴۸ ساعت با سرعت تصویربرداری ۱۲ frame rate تصویر در هر ساعت (هر پنج دقیقه یکبار) صورت گرفت. بقای سلول‌ها، ریخت‌شناسی، مسیر حرکت سلول‌ها، نرخ رشد و میزان مهاجرت و استتاله‌زایی سلول‌ها توسط نرم‌افزار Tracking Tool مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها

بقای سلول‌ها و اکسپلانت‌های نخاعی در محیط کشت

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، سلول‌ها در طول مدت آزمایش فعالیت‌های مختلفی داشتند و میزان بقای سلولی در آن‌ها در حد طبیعی بود به طوری که به ندرت گرد و جدا شدن سلول‌ها که نشان‌دهنده مرگ سلولی است، در حضور و غیاب میدان ملاحظه گردید. بر این اساس مدل، مدت اعمال، شدت و جهت میدان‌های اعمالی و محفظه ارائه شده در این بررسی برای مطالعه آسیب نخاعی مناسب بوده و امکان بررسی رفتاری و ریخت انواع مختلف سلول‌ها اعم از نورون‌ها، آستروسیت‌ها و میکروگلیاها در مراحل مختلف ترمیم آسیب و در حضور و غیاب میدان مغناطیسی و عوامل شیمیایی مختلف را فراهم می‌سازد.

ریخت‌شناسی اکسپلانت و سلول‌های نخاعی در محیط کشت

پس از کشت اکسپلانت به مدت چهار روز، سلول‌های مختلف اعم از آستروسیت و نورون در محیط کشت قابل شناسایی بودند. سلول‌های آستروسیت به صورت ستاره‌ای شکل در ابعاد ۵ در ۴ میکرون به صورت سنگفرشی با زوائد سلولی متعدد که از سطح جسم سلولی منشعب شده بودند، ملاحظه گردیدند. با توجه به کیفیت تصویربرداری صورت گرفته، سیتوپلاسم، غشاء و هسته سلولی قابل تشخیص بودند اما، امکان مشاهده ارگانل‌های مختلف دیگر وجود نداشت (شکل ۳). نورون‌ها در محیط کشت

شکل ۳: سلول‌های شناسایی شده در اکسپلانت نخاع رت در محیط کشت. سلول‌های آستروسیت با پیکان تیره و سلول‌های نورون توسط پیکان توخالی نشان داده شده‌اند. بزرگ‌نمایی تصویر ۴۰ بوده و میکروسکوپ در حالت فاز کنتراست از سلول‌های بدون رنگ آمیزی تصاویر فوق را در شرایط انکوباسیون ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به دست داده است.

سرعت حرکت و جهت‌گیری سلول‌های نخاع رت در حضور و غیاب میدان مغناطیسی ایستا

سرعت مهاجرت سلول‌ها تحت اثر اعمال میدان به شکل معنی‌داری افزایش یافت به طوری که با توجه به زمان کوتاه حیات سلول‌های عصبی در محیط کشت (in vitro)، تقریباً ۸ روز، این مسئله امری مثبت و قابل توجه است زیرا که امکان مطالعه ارتباطات بین سلولی و رفتار سلول‌ها را فراهم می‌سازد. نتایج نشان داد که کشیدگی بیشتر سلول‌ها عملاً باعث افزایش نرخ مهاجرت آن‌ها در حضور میدان نسبت به حالت کنترل می‌گردید (شکل ۶).

الگوی مهاجرت سلول‌های نخاع و میزان تمایل به قطب‌های مختلف میدان مغناطیسی ایستا در محیط کشت

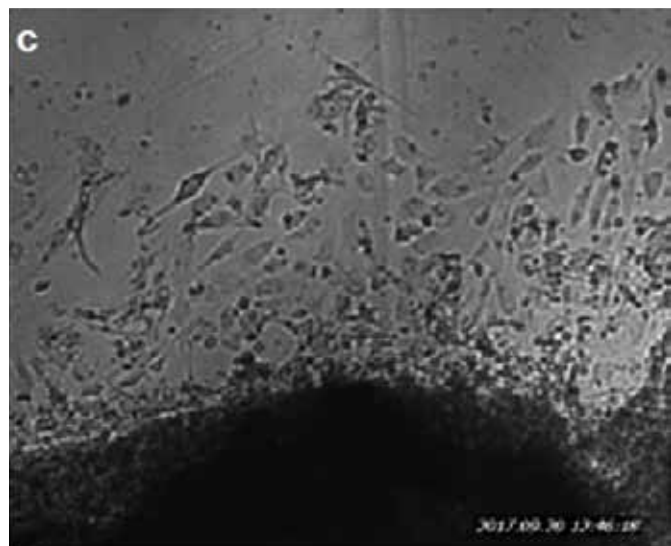
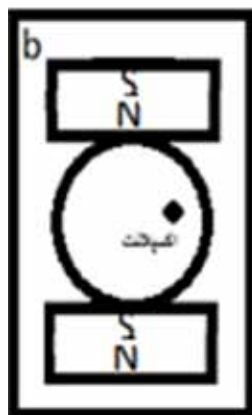
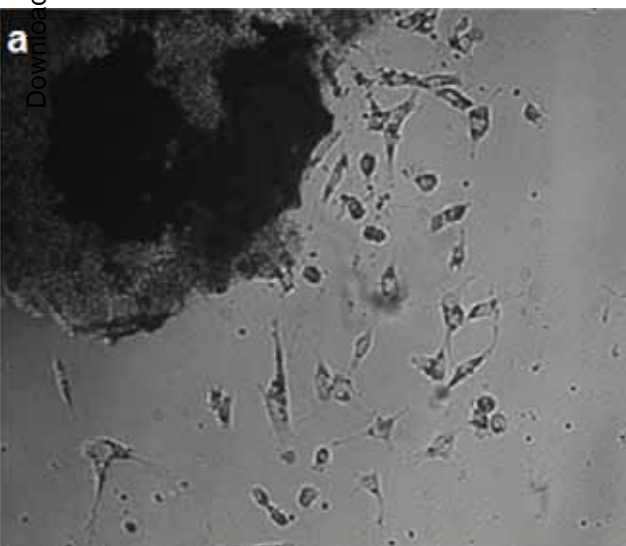
مهاجرت سلول‌ها در صفحه اعمال میدان با توجه به جهت اعمال میدان و در نظر گرفتن نقطه شروع مهاجرت سلول به عنوان مبدأ مختصات نیز بررسی گردید تا امکان تأثیر میدان در مناطق نزدیک به هر یک از قطب‌های میدان مغناطیسی و میزان گرایش سلول‌ها به قطب‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد (شکل ۷). بررسی‌های نرم‌افزاری اطلاعات موجود در عکس‌برداری ۴۸ ساعته با سرعت تصویربرداری در هر پنج دقیقه یک‌بار از بیست سلول آستروسیت ردیابی شد و رفتار دو نورون موجود در فضای بین دو اکسیپلانت نشان داد که نرخ رشد سلول‌ها تحت اثر میدان افزایش یافته، جهت مهاجرت آن‌ها به سمت میدان تغییر کرده و مسیرها پراکنده و بی‌هدف نبوده و همچنین میدان باعث مرگ سلول‌ها نشده است.

جهت‌گیری سلول‌های اکسیپلانت در حضور و غیاب میدان مغناطیسی ایستا

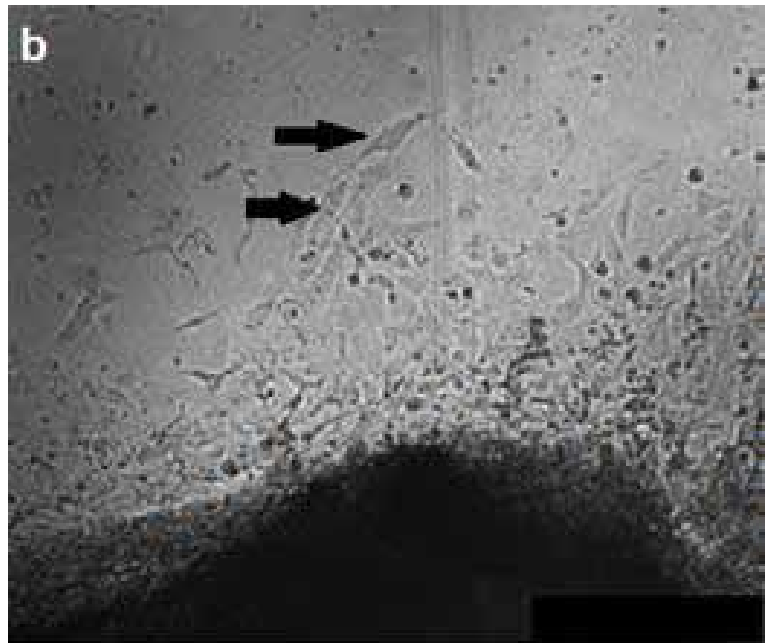
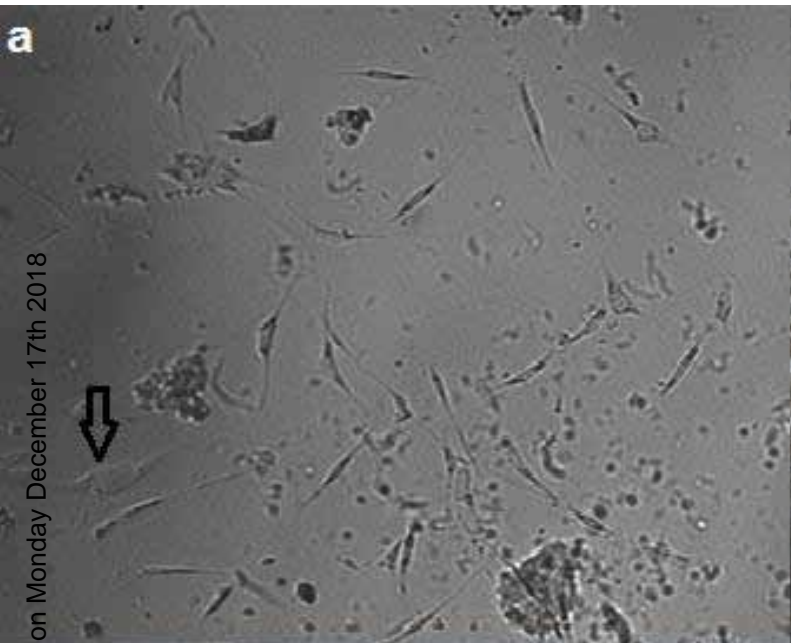
آستروسیت‌ها و نورون‌ها در این کشت، پس از چهار روز از بافت خارج شدند و عموماً به سمت قطب N میدان مغناطیسی ایستا حرکت نمودند. در واقع، میدان مغناطیسی به حرکت سلول‌ها جهت می‌دهد. چنین حرکت منظم و جهت‌داری بهترین و بی‌خطرترین اثر میدان مغناطیسی برای کمک به روند ترمیم آسیب نخاعی در کشت مرکب است. زیرا در زمان آسیب، حرکت سلول‌ها در جهات مختلف و به شیوه‌ای پراکنده است و امکان برقراری ارتباط بین سلول‌ها را بسیار کم می‌کند. در نتیجه ترمیم خودبه‌خودی بسیار سخت، زمان‌بر و بعضاً غیرقابل انجام می‌گردد (شکل ۴).

جهت و میزان ایجاد استتاله‌های سلولی تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا در محیط کشت

نتایج بررسی‌های مقدماتی حاضر نشان می‌دهد که طول استتاله‌های سلول‌های آستروسیت‌ها در حضور میدان مغناطیسی نسبت به شرایط کنترل در غیاب میدان افزایش یافته در حالی که به نظر می‌رسد تعداد آن‌ها کاهش یافته است. تغییرات شدید شکل، ساختمان و ریخت سلولی در حضور میدان کاهش یافته در حالی که کشیدگی سلول‌ها به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرده بود. کشیدگی سلول‌ها تا حد زیادی متمایل به جهت اعمال میدان بود که با توجه به مقدار شاخص جهت‌گیری $Directness=0.23$ استتاله‌ها که از بررسی‌های صورت گرفته با استفاده از نرم‌افزار Gradientech به دست آمد، قابل تأیید می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۴: جهت‌گیری سلول‌های مشتق شده از اکسیپلانت نخاع در محیط کشت در حضور و غیاب میدان مغناطیسی ایستا. سلول‌های موجود در داخل اکسیپلانت در غیاب میدان (a) به خاطر تراکم زیاد و عدم امکان نفوذ نور به صورت کاملاً تیره و سیاه قابل تشخیص نمی‌باشند، با این حال آن‌ها در حال آن‌دسته از سلول‌هایی که از اکسیپلانت مشتق گردیده و مهاجرت کرده و یا استتاله‌هایشان به طرف بیرون امتداد یافته‌اند، به خوبی قابل تشخیص می‌باشند. در حضور میدان (c) سلول‌ها به صورتی کشیده متمایل به جهت میدان امتداد یافته‌اند. تغییر خاص و جهت‌داری در شکل کلی اکسیپلانت ملاحظه نگردید. شدت میدان اعمال شده در شرایط کشت بالا ۱۰ میلی‌تسلا به صورت شکل b بوده است که در مدت ۵۰ ساعت در شرایط کشت در انکوباتور اعمال شده است. تصاویر فوق در غیاب و حضور میدان به ترتیب شرایط اکسیپلانت در ساعت بیستم و بیست‌وششم کشت را نشان می‌دهند.



شکل ۵: جهت و شکل استپاله‌های سلول‌های کشت شده از نخاع در حضور و غیاب میدان مغناطیسی ایستا در محیط کشت. استپاله‌های سلول‌های آستروسیت در حالت کنترل (a) و در حضور میدان (b) نشان داده شده‌اند. استپاله‌های ایجاد شده توسط نورون‌ها در حضور میدان با پیکان توپر و در غیاب میدان توسط پیکان توخالی نشان داده شده‌اند. بزرگ‌نمایی ۴۰× و تصاویر از سلول‌ها بدون رنگ آمیزی و در حالت فاز کنتراست گرفته شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

مورفولوژی و نرخ مهاجرت سلول‌ها نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرند. یعنی، میدان مغناطیسی ایستا کشیدگی سلول‌ها را در جهت اعمال میدان افزایش می‌دهد و باعث ایجاد ارتباط مؤثر و پایداری بین سلول‌های مجاور هم می‌گردد. به علاوه در مواردی کشیده‌تر شدن سلول‌های قرار گرفته در معرض میدان مغناطیسی مقدمهٔ تحرکات بیشتر سلول می‌باشد و با وقوع آن عملاً نرخ مهاجرت سلول‌ها نیز افزایش می‌یابد. این امر در مهاجرت سلول‌ها از سطح اکسیپلانت‌های قرار گرفته در معرض میدان مغناطیسی به‌خوبی ملاحظه گردید و می‌تواند به‌عنوان تأییدی بر اثر بخشی میدان مغناطیسی ایستا برای ایجاد ارتباط در بین قطعات متفرق ایجاد شدهٔ نخاع مطرح شود و در نهایت در جهت بازگرداندن فعالیت‌های از دست رفته در اثر بروز ضایعات نخاعی مورد استفاده قرار گیرد.

عملکرد سلول‌های نخاع موش در تأثیر میدان مغناطیسی ثابت در این تحقیق، به‌خوبی اطلاعات حاصل از بررسی‌های مولکولی نحوهٔ پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در محیط *In vitro* [۲۶] را تأیید می‌کند. بر این اساس می‌توان تغییرات ایجاد شده در میزان مهاجرت، مورفولوژی و استپاله‌زایی را مستقیماً با تغییرات پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها مرتبط دانست. تأثیر میدان بر شبکهٔ اکتین و سایر فیبرهای پروتئینی سازندهٔ شبکهٔ اسکلتی سلول که نقش آرایش، جهت‌گیری و تحرکات سلولی را برعهده دارند از جمله عوامل تأثیر پذیر از میدان مغناطیسی خارجی محسوب شده و عمدهٔ نتایج به‌دست آمده بر این اساس در اثر تغییر عملکرد این مولکول‌ها حاصل شده‌اند.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و در تأیید تحقیقات اخیر در زمینهٔ ترمیم آسیب نخاعی، برخلاف تصور عمومی، در اعصاب مرکزی نیز ترمیم و مهاجرت هرچند به‌صورت محدودتر از اعصاب محیطی مشاهده می‌گردد. به‌علاوه با توجه به ساختار اتمی و مولکولی سلول‌ها و حضور یون‌ها و الکترون‌ها در بستری از مولکول‌های قطبی آب، سیستم کاملاً حساس به میدان مغناطیسی خارجی می‌باشد. به‌طوری‌که با قرار گرفتن آن‌ها در معرض میدان، عملکرد پیچیدهٔ سلول‌ها دستخوش تغییرات می‌شود و در تأثیر از میدان مغناطیسی ایستای ۱۰ میلی‌تسلا ریخت و شکل سلول، میزان کشیدگی، استپاله‌زایی، جهت قرار گرفتن و حرکت سلول‌ها از حالت پراکنده به‌صورتی هماهنگ و آرایش یافته تغییر می‌کند. حرکت سلول‌ها که به‌خاطر عدم وجود گرادیان نورتروفیک‌های انتشار یافته از سلول‌های مجاور در فاصلهٔ نزدیک، به‌صورتی بی‌هدف اتفاق می‌افتاد، در حضور میدان جهت‌دار می‌گردد و به‌طرف قطب N میدان آرایش یافته و مهاجرت می‌نمایند. این رخداد و امکان هدایت جهت حرکت و آرایش سلول‌ها در نخاع صدمه‌دیده از اهمیت خاصی برخوردار است. زیرا با تکمیل آزمایش‌ها و فراهم‌سازی امکان به‌کارگیری این رویکرد، ممکن است عملاً بتوان از دستگاه‌های مولد میدان مغناطیسی نظیر MRI در جهت آرایش دادن و تحریک رشد و حرکت سلول‌های محل آسیب به‌طرف یکدیگر اقدام نموده و شرایط لازم برای ترمیم را فراهم ساخت.

علاوه بر این، این بررسی‌ها نشان دادند که پس از اعمال میدان،

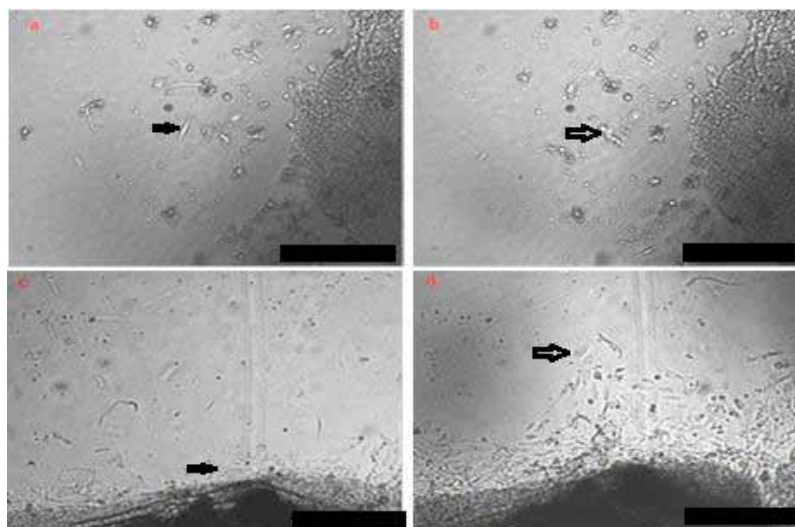
اصلی و یا مکمل مفید در بازسازی آرایش به هم ریخته نخاع، متعاقب بروز آسیب نخاعی منظور نمود. غیرتهاجمی بودن این رویکرد و تأثیر متمرکز و هدفمند آن بر بخش خاصی از بدن که در واقع محل ضایعه می باشد، عملاً امکان ایجاد اثرات جانبی را منتفی می سازد. به علاوه کوچک و قابل حمل و نصب بودن مغناطیس‌ها در محل آسیب، از دیگر محسنات این رویکرد است که می توانند مورد توجه قرار گیرند. باین حال نتایج حاضر حاصل تحقیقات اولیه‌ای است که در این حیطه صورت گرفته است و لازم است قبل از طرح آن به عنوان یک روش درمانی کلینیکی با بررسی نکات مختلف نظیر احتمال ایجاد تومور، تحمیل بروز تمایز در سلول‌های هدف، تحریک بیان متابولیت‌های خاص بعضاً مضر، از صحت رویکرد و کاملاً بی ضرر بودن آن اطمینان حاصل کرد.

تقدیر و تشکر

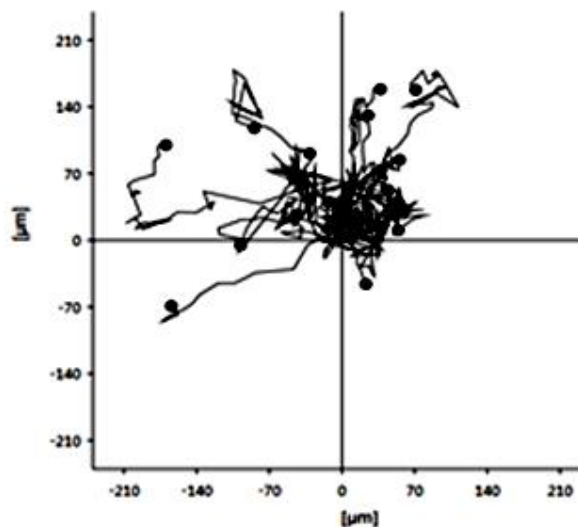
این تحقیق با حمایت دانشگاه تهران صورت گرفته است که بدین وسیله از ایجاد امکان انجام آن تشکر و قدردانی می گردد. همچنین نویسندگان وظیفه خود می دانند از اهتمام و مساعدت آقای مهندس حمید یزدی، مدیر محترم شرکت فرژن پویس در جهت انجام برخی از آزمایشات عملی، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

References:

1. Jr FMM, Bracken MB, Creasey G, Jr JFD, Donovan WH, Ducker TB. International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. Spinal Cord [Internet]. 1997; 35(5): 266–74. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.sc.3100432>
2. Su Z, He C. Olfactory ensheathing cells: Biology in neural development and regeneration. Prog Neurobiol [Internet]. 2010; 92(4): 517–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.08.008>
3. Crewe NM, Krause JS. Spinal Cord Injury. Medical, Psychosocial and Vocational Aspects of Disability. 2009; 289-304.
4. McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. Lancet. 2002; 359(9304): 417–25.
5. Beattie MS. Review of Current Evidence for Apoptosis After Spinal Cord Injury. 2000; 17(10): 915–25.
6. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald



شکل ۶: مقایسه نرخ مهاجرت سلول‌ها از اکسیلانت نخاع در حضور و غیاب میدان مغناطیسی ایستا. سلول‌های آستروسیت در حالت کنترل با سرعت بسیار کم حرکت می کنند به طوری که فلش‌ها نشان دهنده یکی از این سلول‌ها بعد از هفت ساعت است که تحرک بسیار کمی در حد کمتر از یک میکرومتر داشته است (a,b) در حالی که در شرایط کاملاً یکسان اما در حضور میدان مغناطیسی ۱۰ میلی تسلا سلول مشابه در مدت هفت ساعت با سرعتی در حد ده برابر حالت کنترل جابه جا شده است. مقیاس نشان داده شده برابر ۱۰ میکرومتر می باشد



شکل ۷: الگوی مهاجرت و تمایل سلول‌های نخاع به قطب‌های مختلف میدان مغناطیسی ایستا در محیط کشت. جهت گیری سلول‌های آستروسیت تحت اثر میدان اعمال شده که با استفاده از دستور کار Tracking Tool از نرم افزار Gradientech محاسبه و نمایش داده شده است نقطه شروع حرکت همه سلول‌ها مبدأ مختصات فرض شده و میزان تحرک آن‌ها در جهات مختلف در بازه‌های زمانی یکسان ثبت و نمایش داده شده است. مشاهده می شود که آستروسیت‌ها عمدتاً به سمت قطب N میدان مغناطیسی ایستا (بالای شکل) حرکت کرده اند.

باتوجه به شدت ضعیف میدان مغناطیسی اعمال شده و تأثیرات آن بر رفتار سلول‌های مختلف نخاع رت که در این مطالعه ثبت گردیدند، می توان استفاده از میدان مغناطیسی ایستا را به عنوان یکی از عوامل

JW. Neuronal and Glial Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury. 1997; 17(14): 5395–406.

7. Salehi M, Pasbakhsh P, Soleimani M, Abbasi M, Hasanzadeh G, Modaresi MH. Repair of spinal cord injury by co-transplantation of embryonic stem cell-derived motor neuron and olfactory ensheathing cell. *Iran Biomed J.* 2009; 13(3): 125–35.

8. Ekberg JAK, Amaya D, MacKay-Sim A, St. John JA. The migration of olfactory ensheathing cells during development and regeneration. *NeuroSignals.* 2012; 20(3): 147–58.

9. Mert T, Gunay I, Gocmen C, Kaya M, Polat S. Regenerative effects of pulsed magnetic field on injured peripheral nerves. *Altern Ther Heal Med.* 2006; 12(5): 42–9.

10. Zhang X, Yarema K, Xu A. Biological Effects of Static Magnetic Fields.

11. Schenck JF. Physical interactions of static magnetic fields with living tissues. *Prog Biophys Mol Biol.* 2005; 87(2–3 SPEC. ISS.): 185–204.

12. Khodarahmi I, Mobasheri H, Firouzi M. The effect of 2.1 T static magnetic field on astrocyte viability and morphology. *Magn Reson Imaging [Internet].* 2010; 28(6): 903–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mri.2010.03.003>.

13. Vassilev PM, Dronzine T, Vassileva MP, Georgiev GA. Parallel arrays of microtubules formed in electric and magnetic fields. *Biosci Rep.* 1982; 2: 1025–9.

14. Rosen AD. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochem Biophys.* 2003; 39(2): 163–73.

15. Macias MY, Battocletti JH, Sutton CH, Pintar FA, Maiman DJ. Directed and enhanced neurite growth with pulsed magnetic field stimulation. *Bioelectromagnetics [Internet].* 2000; 21(4): 272–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10797456>.

16. Coots A, Shi R, Rosen AD. Effect of a 0.5-T static magnetic field on conduction in guinea pig spinal cord. *J Neurol Sci.* 2004; 222(1–2): 55–7.

17. Kelleher MO, Al-Abri RK, Lenihan DV., Glasby MA. Use of a static magnetic field to promote recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosurg [Internet].* 2006; 105(4): 610–5. Available from: <http://thejns.org/doi/abs/10.3171/jns.2006.105.4.610>.

18. Shapiro S, Borgens R, Pascuzzi R, Roos K, Groff M, Purvines S. Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a phase 1 trial. *J Neurosurg Spine.* 2005; 2(1): 3–10.

19. Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Prog Biophys Mol Biol.* 2005; 87(2–3 SPEC. ISS.): 213–23.

20. Miyakoshi J. The review of cellular effects of a static magnetic field. *Sci Technol Adv Mater.* 2006; 7(4): 305–7.

21. Wikswo JP, Barach JP. An Estimate of the Steady Magnetic Field Strength Required to Influence Nerve Conduction. *J. P. WIKSWO, JR., AND J. P. BARACH.* 1980; (12): 722–3.

22. Seibenhener ML, Wooten MW. Isolation and Culture of Hippocampal Neurons from Prenatal Mice. *J Vis Exp.* 2012; (65): 4–9.

23. Sleight JN, Weir GA, Schiavo G. A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC Res Notes [Internet].* 2016; 9(1): 82. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/9/82%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26864470%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4750296>.

24. Cheng S, Shi Y, Hai B, Han X, Chen Z, Li B. Culture of motor neurons from newborn rat spinal cord. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2009; 29(4): 413–6.

25. Cao D-L, Jing P-B, Jiang B-C, Gao Y-J. Primary Culture of Mouse Neurons from the Spinal Cord Dorsal Horn. *Bio-Protocol [Internet].* 2017; 7(1): 1–9. Available from: <http://www.bio-protocol.org/e2098>.

26. Mousavidoust S, Mobasheri H, Riazi GH. Effects of static magnetic fields on the structure, polymerization, and bioelectric of tubulin assemblies. *J Biomol Struct Dyn [Internet].* 2017; 35(15): 3370–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2016.1254683>.