ژورنال علمی کازموایـــنتـــل
Journal of Cosmointel
اولیـــن ژورنـــال تـحقیـقـات عـلـمـــی در حـــوزه شعور(ط)

بررسی چرخه‌ی سلولی رده‌های سلولی فیبروبلاست جنینی و SW480 (سرطان کولون) تحت تاثیر میدان‌های شعوری طاهری

محمدعلی طاهری[1]، سارا ترابی[2]، شیما روشنی[3]، نوشین نبوی[4]، فرید سمسارها[5*]

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران
تلفن: ۹۱۲۱۷۸۶۵۷۷-۹۸+
ایمیل: Semsarha@.ut.ac.ir

DOI: doi.org/10.61450/joci.FA.v2i10.149

۱- بخش تحقیق و توسعه Sciencefact، مرکز تحقیقات Cosmointel Inc، انتاریو، کانادا
۲- گروه بیولوژی گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴- خدمات تحقیقاتی دانشگاه ویکتوریا، BC، کانادا
۵- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

بر اساس تئوری طاهری، اعمال میدان شعوری فرادرمانی (FCF) می‌تواند به ترمیم و بهبود هر سیستمی که تحت تأثیر این میدان قرار می‌گیرد، منجر شود. پیش از این، اثر القا کننده رشد FCF بر روی رده‌های سلولی سرطانی MCF7 و 4T1 به ترتیب در محیط‌های *in vitro* و *ex vivo* مشاهده شد. اثر مشابهی را نمی‌توان برای آزمایش *in vivo* مشاهده کرد. زیرا FCF رشد تومور را در مدل‌های موش سرطانی مهار کرد. به طور کلی، نتایج مطالعات قبلی تایید کرد که بقا و رشد سلول‌های سرطانی تحت تأثیر فرادرمانی قرار گرفتند. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تکرارپذیری مشاهدات در مطالعات قبلی با استفاده از کشت سلولی *in vitro* رده سلولی فیبروبلاست و میدان شعوری فرادرمانی و رده‌ی سلولی سرطانی کولون (SW480) و دو نوع میدان شعوری(ط) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های چرخه‌ی سلولی نشان داد که فرادرمانی منجر به کاهش آپوپتوز و افزایش تکثیر در فیبروبلاست می‌شود و از این نظر این مشاهده مطابق با مطالعات قبلی بود. همچنین بر اساس نتایج MTT، دو میدان TCF1 و TCF2 زنده مانی SW480 را افزایش دادند. . داده‌های فلوسایتومتری نیز هم‌راستا با همین مشاهده بود. آنالیز چرخه سلولی نشان داد که TCF2 زنده‌مانی و میزان تکثیر SW480 را کاهش داد. در جمع‌بندی، میدان‌های شعوری(ط) مرگ و بقا را در این رده‌ها تحت تاثیر قرار داد. مطالعات *in vitro* و *in vivo* بیشتری برای مشخص کردن مکانیسم این میدان‌های غیرمادی و غیر انرژیایی نیاز است.

کلمات کلیدی: میدان شعوری فرادرمانی، میدان‌های شعوری طاهری، فیبروبلاست، چرخه سلولی، سرطان کولون، SW480

مقدمه

سـلول‌های فیبروبلاسـت جنینـی بـه دلیـل دسترسـی آسـان، سـرعت رشـد سـریع یـک سیسـتم توانمنـد بـرای بررسـی اثرگـذاری عوامـل موثـر بـر رشـد اسـت. فیبروبلاسـت‌ها گروهـی از سـلول‌های سـاکن ناهمگـن بـا منشـاء مزانشـیمی هسـتند کـه دارای مکان‌هـای مختلـف، ظاهـر متنـوع و فعالیت‌هـای متمایـز هسـتند (۱). در تحقیقـات قبلـی، بـر مبنـای "ساینسـفکت[1]" بـا اسـتفاده از میدان‌هـای شـعوری طاهـری آزمایش‌هایـی در شـرایط *in vivo* (۲)، *ex vivo* (سـه بعـدی) (۳) و *in vitro* (دو بعـدی) (۴) انجـام شـده اسـت. در واقـع علـم رایـج بـر بخـش فیزیکـی یـا مـاده و انـرژی متمرکـز اسـت. ایـن درحالیسـت کـه بـر اسـاس نظریهـی طاهـری، شـعور ماهیتـی غیرفیزیکـی دارد. بـه منظـور تمایـز ایـن دیـدگاه از سـایر نظریـات، کلیدواژهـی شـعور(ط) در اینجـا بهـکار رفتـه اسـت. بنابرایـن ساینسـفکت رویکـردی اسـت کـه بـا طراحـی آزمایشـهای علمـی بـه آشکارسـازی اثـرات شـعور(ط) میپـردازد. همچنیـن میدانهـای شـعوری متنوعـی بـا کارکردهـای گوناگـون معرفـی شـده انـد کـه زیرمجموعهـی شـبکهی شـعور کیهانـی هسـتند. اگرچـه نمیتـوان میدانهـای شـعوری را بـا ابزارهـای کمیتـی بـه طـور مسـتقیم اندازهگیـری کـرد، ایـن امـکان وجـود دارد تـا بـا طراحـی آزمونهایـی اثـرات آنهـا را ثبـت و بررسـی کـرد (۴). بـه منظـور ارزیابـی تکرارپذیـری نتایـج گـزارش شـده قبلـی از تأثیـر TCFs بـر رده‌هـای سـلول سـرطانی در شـرایط آزمایشـگاهی، مـا تأثیـر FCF را بـر روی سـلول‌های فیبروبلاسـت جنینـی بـا ظرفیـت تکثیـر مطلـوب بـا اسـتفاده از فلوسـیتومتری مطالعـه کردیـم.

از سـوی دیگـر، سـرطان کولورکتـال سـومین سـرطان شـایع اسـت و بـا افزایـش سـن میـزان بـروز آن افزایـش مـی یابـد. اکثـر سـرطان‌های کولورکتـال بـا یـا بـدون متاسـتاز غـدد لنفـاوی، موضعـی هسـتند و تـا ۲۰ درصـد از بیمـاران مبتـلا بـه بیمـاری متاسـتاتیک، بـا احتمـال بیشـتر بـه در گیـری کبـد، مراجعـه می‌کننـد (۵). رده سـلولی SW480 از تومـور کولـون یـک بیمـار مـرد ۵۰ سـاله قفقـازی مبتـلا بـه آدنوکارسـینوم کولورکتـال ایجـاد شـد. سـلول هـا مورفولـوژی اپیتلیـال را نشـان می‌دهنـد. SW480 سـطوح بالایـی از پروتئیـن p53 را نشـان می‌دهـد و بـه طـور مثبـت انکوژن‌هـای myb, sis, N-ras, H-ras, K-ras, c-myc و fos را بیـان می‌کنـد. ایـن رده‌هـای سـلولی بـه طـور گسـترده در تحقیقـات زیست‌پزشـکی مربـوط بـه جسـتجوی درمـان بـرای سـرطان روده بـزرگ اسـتفاده مـی شـود (۶). در مطالعـه حاضـر اثـر دو نـوع میـدان شـعوری(ط) (TCFs) بـر رده‌ی سـلولی سـرطان کولـون (SW480) بررسـی شـد.

مواد و روش‌ها

کاربـرد میـدان شـعوری فرادرمانـی (FCF1): در ایـن مطالعـه، ایـن میـدان هـر ۲۴ سـاعت یـک بـار بـرای محیـط کشـت سـلولی نمونـه، در کل دوره مطالعـه اعـلام شـد.کنترل منفـی سـلول‌های فیبروبلاسـت بـدون تاثیـر فرادرمانـی هسـتند.

کاربـرد میدان‌هـای شـعوری در مـورد رده سـلولی SW480: در ایـن مطالعـه، نمونه‌هـا در زمان‌هـای ۱۲، ۲۴ و ۴۸ سـاعت تحـت تاثیـر میدان‌هـای شـعوری(ط) بودنـد و اعـلام به‌صـورت هـر ۲۴ سـاعت یکبـار در تمـام طـول آزمایـش انجـام شـد.

کشت سلول

ردههـای سـلولی ایـن مطالعـه، از انسـتیتو پاسـتور ایـران خریـداری شـد و در محیـط کشـت ۱۶۴۰ Roswell Park Memorial Institute حـاوی ۱۰٪ سـرم جنین گاوی (Gibco Laboratories, Grand Island, NY), ۱۰۰ IU در میلـی لیتـر پنـی سـیلین و ۱۰۰ میکروگـرم در میلـی لیتـر استرپتومایسـین کشـت شـد. کشـت هـا در انکوباتـور ۳۷ درجـه سـانتی گـراد (Memmert، Schwabach، آلمـان) بـا ۵٪ CO2 و اتمسـفر مرطـوب نگهـداری شـدند. رطوبـت نسـبی بیـن ۹۸ و ۹۵ درصـد بـا سیسـتم اتومایـزر یـا مخـزن آب ثابـت نگهداشـته شـد. در تمـام مراحـل آزمایشـی، سـلول هـا در فـاز رشـد لگاریتمـی مـورد اسـتفاده قـرار گرفتنـد. کنتـرل منفـی ردههـای سـلولی بـدون هیـچ تیمـاری بـود و کنتـرل مثبـت داروی دوکسوروبیسـین دریافـت کردنـد.

آزمون MTT

بـرای آزمـون MTT، تعـداد سـلول ۳×۱۰^{۳} در یـک صفحـه کشـت ۹۶ چاهکـی کشـت شـد. اثـرات میدانهـای شـعوری بـر زنـده مانـی سـلول-هـای نمونـه بـا اسـتفاده از روشMTT (دی متیـل تیـازول - دی فینـل تترازولیـوم بروماید)[2] ارزیابـی شـد. بـرای ایـن منظـور از MTT (Sigma, Taufkirchen, Germany) در غلظـت ۰,۲ میلـی گـرم در میلـی لیتـر در محیـط RPMI-۱۶۴۰ اسـتفاده شـد. سـپس سـلولها در انکوباتـور ۳۷ درجـه سـانتی گـراد قـرار داده شـدند. پـس از ۴ سـاعت محیـط بـا ۱۰۰ میکرولیتـر دی متیـل سولفوکسـید (DMSO) و ۲۵ میکرولیتـر از بافـر سورنسـون (گلیسـین ۰,۱ مـولار، ۰/۱ مـولار NaCl ، pH: ۱۰/۵ بـا ۰,۱ pH NaOH ۱۰/۵) جایگزیـن شـد. پـس از تـکان دادن ملایـم، سـلولها بـه مـدت ۳۰ دقیقـه در دمـای ۳۷ درجـه سـانتیگراد قـرار گرفتنـد. بـرای اندازهگیـری جـذب در ۵۷۰ نانومتـر از دسـتگاه میکروپلیتریـدر (Tecan,Sunrise)، سـوئیس) اسـتفاده شـد.

آنالیز چرخه سلولی

تجزیـه و تحلیـل پیشـرفت چرخـه سـلولی از طریـق رنـگ آمیـزی بـا یدیـد پروپیدیـوم انجـام شـد. سـلولها در صفحـات ۶ چاهکـی (۱×۱۰^{۵} سـلول در هـر چاهـک) کشـت داده شـدند و یـک شـب در انکوباتـور اسـتاندارد نگهـداری شـدند. سـلولهای گـروه آزمایـش شسـته، جـدا و برداشـت شـدند، مجـدداً معلـق شـدند، در اتانـول ۷۰ درصـد تثبیـت شـدند و بـه مـدت ۷۲ سـاعت دیگـر در دمـای ۴ درجـه سـانتی گـراد نگهـداری شـدند. سـلولها در دمـای ۳۷ درجـه سـانتی گـراد بـه مـدت یـک سـاعت بـا اسـتفاده از ۵۰ میکروگـرم بـر میلـی لیتـر یدیـد پروپیدیـوم رنـگ آمیـزی شـدند. نسـبت سـلولها در مراحـل مختلـف چرخهـی سـلولی بـا اسـتفاده از فلوسـیتومتر در سیسـتم FACSCalibur (Miltenyi Biotec MACSQuant ۱۰) ارزیابـی شـد.

1.Sciencefact

2. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyl tetrazolium bromide

فلوسایتومتری

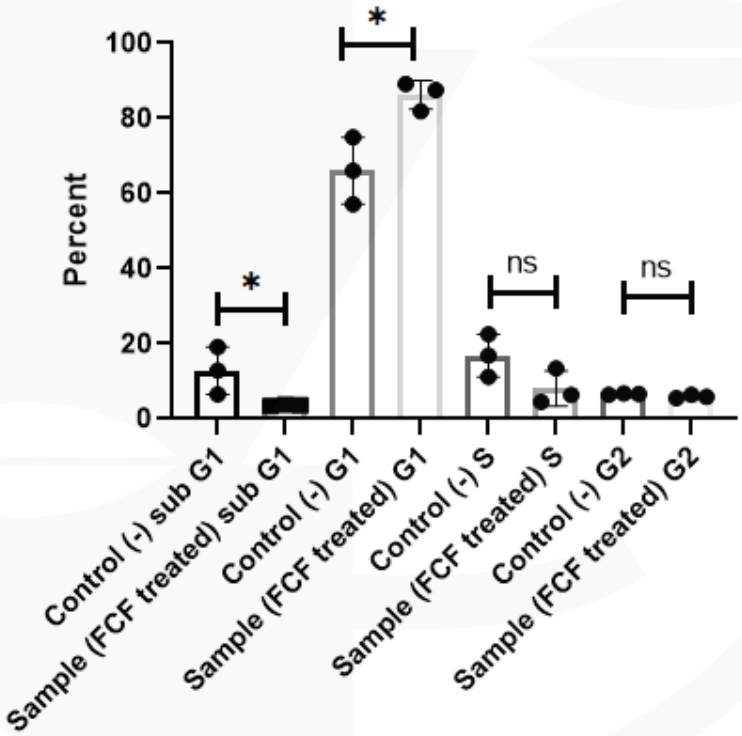
میـزان تغییـرات احتمالـی در آپوپتـوز تحـت تاثیـر میدانهـای شـعوری بـا اسـتفاده از روش فلوسـیتومتری انکسـین V/ پروپیدیـوم یدیـد اندازهگیـری شـد. تعـدادی سـلول آزمایشـی ۱×۱۰^۵ در پلیـت کشـت ۶ چاهکـی بـرای ایـن سـنجش در نظـر گرفتـه شـد. پـس از آن، تیمـار بـا میدانهـای شـعوری ادامـه یافـت و ۲۴ سـاعت بعـد، سـلول هـا تریپسـینیه شـدند و در دور ۱۵۰۰ بـه مـدت ۵ دقیقـه سـانتریفیوژ شـدند. سـلولها بـا انکسـین V و PI طبـق دسـتورالعمل سـازنده (روش) رنـگ آمیـزی شـدند. بـرای رنـگ آمیـزی انکسـین V، ۲ میکرولیتـر انکسـین V، ۱ میکرولیتـر یدیـد پروپیدیـوم و ۱۰۰ میکرولیتـر بافـر اتصـال بـه نمونـه هـا اضافـه شـد. سـپس سـلولها بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در دمـای اتـاق و در شـرایط تاریـک انکوبـه شـدند. نمونههـا بـا دسـتگاه فلوسـیتومتری (Macs Quant Analyzer, Miltenyi Biotech, Germany) آنالیـز شـدند و میـزان آپوپتـوز بـه وسـیلهی نـرم افـزار (FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA) ارزیابـی شـد.

تحلیل آماری

داده هـا بـا نـرم افـزار آمـاری GraphPad Prism نسـخهی ۶/۰ (San Diego, CA) تجزیـه و تحلیـل شـد. تمـام مقادیـر بـه صـورت میانگیـن ± خطـای اسـتاندارد بیـان شـد. تمـام آنالیزهـا حداقـل سـه بـار تکـرار شـدند. بـرای تعییـن معنیـداری تفاوتهـا از آزمونهـای t و آنالیـز واریانـس (ANOVA)) اسـتفاده شـد و مقادیـر p<۰/۰۵ معنیـدار در نظـر گرفتـه شـد.

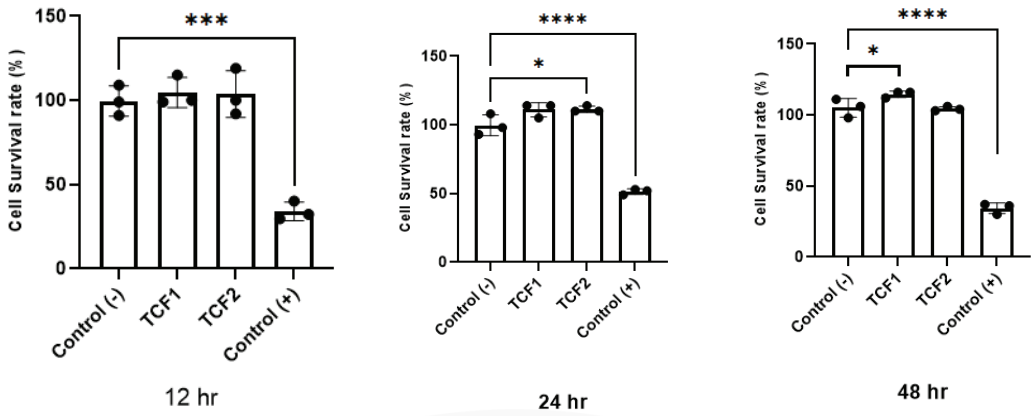
نتایج و بحث

بـر اسـاس شـکل ۱ سـلولهای فیبروبلاسـت در مواجهـه بـا ایـن میـدان، در مراحـل سـاب جـی ۱ کاهـش و در جـی ۱ افزایـش درصـد جمعیـت را نشـان میدهـد. در فازهـای S و G2 تغییـرات معنـاداری مشـاهده نمـی شـود. بهعبـارت دیگـر، فرادرمانـی باعـث کاهـش میـزان آپوپتـوز و افزایـش زندهمانـی ایـن رده سـلولی شـده اسـت.



شکل ۱. بررسی چرخههای سلولی فیبروبلاست در مواجهه با میدان شعوری فرادرمانی(FCF). ns: غیر معنادار و p-value<0.05 :*

بهعـلاوه سـنجش MTT بـا هـدف انـدازه گیـری فعالیـت متابولیـک سـلولی در مـورد ردهی سـلولی SW480 انجـام شـد. تغییـرات بقـای رده سـلولی SW480 در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ سـاعت تحـت تأثیـر TCFs در مقایسـه بـا شـاهد در شـکل ۲ ارائـه شـده اسـت.



شکل ۲. مقایسه آنالیز MTT رده سلولی SW480 در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. (TCFs: میدان‌های شعوری طاهری).
*: p-value<0.05 ***:p-value<0.001, ****: p-value<0.0001.

همانطـور کـه مشـاهده می‌شـود، رده سـلولی SW480 در ۲۴ سـاعت و ۴۸ سـاعت بـه ترتیـب افزایـش بقـا تحـت تأثیـر TCF1 و TCF2 را نشـان داد. اگرچـه داده‌هـای به‌دسـت‌آمده از سـنجش MTT معمـولاً بـه تعـداد سـلول‌های زنـده نسـبت داده می‌شـود، امـا میـزان کاهـش تترازولیـوم نشـان‌دهنده فعالیـت متابولیکـی سـلول‌ها ماننـد میـزان تولیـد NADH گلیکولیتیـک اسـت (۷). بنابرایـن بـر اسـاس نتایـج ذکـر شـده مـی تـوان گفـت کـه فعالیـت متابولیکـی در SW480 تحـت TCF1 طـی ۱۲ بـه ۴۸ سـاعت مطالعـه، افزایـش یافتـه اسـت و در نتیجـه‌ی تیمـار TCF2 همیـن رفتـار در ۲۴ سـاعت اول مشـاهده شـد. لازم بـه ذکـر اسـت کـه تأثیـر TCF2 بـا آپوپتـوز و کاهـش میتـوز در ۴۸ سـاعت همـراه اسـت. تجزیـه و تحلیـل چرخـه‌ی سـلولی در سـاعت ۴۸ انجـام شـد. همانطـور کـه در جـدول ۱ مشـاهده مـی شـود، فـاز G2/M در رده سـلولی SW480 در نتیجـه‌ی تاثیـر TCF2 بـه طـور قابـل توجهـی کاهـش یافـت.

جدول ۱. چرخه سلولی رده SW480 تحت تاثیر میدان‌های شعوری(ط) (TCFs).

TCF	Cell cycle percentage		
	G1	S	G2/M
Control (-)	74.3	17.8	7.58
TCF1	72.3	18.8	8.17
TCF2	89.5	8.58	1.25*

*: p-value<0.05

نتایـج حاصـل از فلوسـایتومتری در مـورد ردهـی سـلولی SW۴۸۰ در جـدول ۲ ارائـه شـده اسـت. همانطـور کـه مشـاهده میشـود بخـش عمدهـای از سـلولها مشـابه نمونهـی کنتـرل در ناحیهـی Q4 قـرار دارنـد. گـروه مربـوط بـه میـدان شـعوری ۲ درصـد پایینتـری در ناحیهـی Q4 قـرار داشـتند و افزایشـی در نواحـی Q1 و Q3 مشـاهده شـد. بـا توجـه بـه عـدم تغییـر فاحـش در نواحـی، مشـاهدات ایـن بخـش همراسـتا بـا آزمـون MTT اسـت.

جدول ۲. نتایج فلوسایتومتری مرگ سلولی در ردهی SW480.

Cell line	Sample	% of each cell state			
		Q1	Q2	Q3	Q4
SW480	Control (-)	0.94	0.68	0.086	98.3
	TCF1	1.35	0.37	0.18	98.1
	TCF2	1.77	0.9	0.92	96.7

در اینجـا TCF: میدانشـعوری، درصـد سـلولهای نکروتیـک (Q1)؛ درصـد سـلولهای آپوپتیـک تاخیـری (Q2)؛ دردصـد سـلولهای آپوپتیـک اولیـه (Q3) و درصـد سـلولهای زنـده (Q4).

همانطـور کـه در مقدمـه توضیـح داده شـد، هـدف از طراحـی آزمایش‌هـا در فـاز صفـر تحقیقـات TCFs عمدتـاً گـزارش اثـرات ایـن میدان‌هـای جدیـد صـرف نظـر از مکانیسـم آنهـا در سـطح سـلولی اسـت. بـا توجـه بـه نتایـج ارائـه شـده، فیبروبلاسـت جنینـی پاسـخ مشـخص افزایـش رشـد در مواجهـه بـا میـدان شـعوری فرادرمانـی را نشـان داد و رده سـلولی SW480 تحـت میدان‌هـای شـعوری(ط) ۱ و ۲ در مقایسـه بـا کنتـرل رفتـار متفاوتـی داشـت. ایـن مشـاهدات مسـتلزم مطالعـات بیشـتری اسـت، بنابرایـن تحقیقـات بیشـتر در مـورد تأثیـر TCF هـا بـر پاسـخ هـای سـلولی بـرای آزمایـش تکرارپذیـری انجـام خواهـد شـد.

تشکر و قدردانی

نویسـنده هـا از دپارتمـان زیسـت شناسـی دانشـگاه تهـران و گـروه زیست‌شناسـی دانشـگاه تبریـز، بابـت ارائـه خدمـات جمع‌آوری و تحلیـل اولیـه داده‌هـا، قدردانـی و تشـکر می‌کننـد.

منابع

1- Qiu, L. Q., Lai, W. S., Stumpo, D. J., & Blackshear, P. J. (2016). Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation. *Bio-protocol, 6*(13), e1859.https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1859

2- Taheri, M. A., Karimi, H., Torabi, S., Nabavi, N., & Semsarha, F. (2022). Effect of Faradarmani Consciousness Field on the Mice 4T1 Breast Cancer Model. *Journal of Cosmointel, 1*(6), 54–63

3- Taheri, M. A., Torabi, S., & Semsarha, F. (2022). Screening the Effect of Faradarmani Consciousness Field on the Ex vivo Controlled Microenvironment on Solid 4T1 Tumors. *Journal of Cosmointel, 1*(6), 46–53.

4- Taheri, M. A. 2013. Human from another outlook (2nd Edition). ISBN-13: 978-1939507006, ISBN- 10: 1939507006.

5- Haraldsdottir, S., Einarsdottir, H. M., Smaradottir, A., Gunnlaugsson, A., & Halfdanarson, T. R. (2014). Krabbamein í ristli og endaþarmi [Colorectal cancer - review]. *Laeknabladid, 100*(2), 75–82. https://doi.org/10.17992/lbl.2014.02.531

6- Xiong, B., Ma, L., Hu, X., Zhang, C., & Cheng, Y. (2014). Characterization of side population cells isolated from the colon cancer cell line SW480. *International journal of oncology, 45*(3), 1175–1183. https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2498

7- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.