

اثر میدان‌های شعوری طاهری بر چرخه سلولی رده‌های سلولی Raji و HEK-293 در شرایط میکروگراویتی

محمدعلی طاهری^۱، زهرا حاج ابراهیمی^۲، سارا ترابی^۳، فرید سمسارها^{۴*}

* نویسنده مسئول: فرید سمسارها، موسسه‌ی بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران،

صندوق پستی: ۱۳۸۴-۱۳۱۴۵، تهران، ایران

تلفن: ۹۱۲۱۷۸۶۵۷۷ - ۹۸+

ایمیل: Semsarha@ut.ac.ir

DOI: doi.org/10.61450/joci.FA.v2i12.164

۱- بخش تحقیق و توسعه‌ی ساینس‌فکت، مرکز تحقیقات کازمواینتل، انتاریو، کانادا

۲- محقق هوافضا و علوم زیستی، تهران، ایران

۳- گروه بیولوژی گیاهی، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران،

تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

میدان‌های شعوری طاهری (TCFs) را به‌عنوان میدان‌هایی غیرمادی و غیرانرژیایی- محمدعلی طاهری معرفی کرده است. پیش از این، تاثیر این میدان‌ها بر ویژگی‌های مواد نشان داد که متمایز و متفاوت از میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی هستند. اما اثر آن‌ها در غیاب گرانش بررسی نشده است. گرانش یکی از نیروهای بنیادی است که بر همه‌چیز در جهان تاثیر می‌گذارد و مقدار آن در سطح زمین ۱G بیان می‌شود. کالینوستات شرایط میکروگراویتی (MG) را شبیه‌سازی و این امکان را فراهم می‌کند که آزمایش‌هایی در شرایط نزدیک به بی‌وزنی انجام شود. در مطالعه‌ی حاضر، دو آزمایش به‌طور مجزا انجام شد. ابتدا، اثر میدان شعوری فرادرمانی، به‌عنوان یکی از میدان‌های شعوری(ط)، بر رده‌ی سلولی لنفوئیدی Raji به مدت چهار و هشت ساعت تحت استرس MG بررسی شد. بر اساس داده‌های به دست آمده از سنجش فلوسایتومتری، آپوپتوز در سلول‌های مواجهه‌شده با MG مشاهده شد و درصد فاز sub-G1 در نمونه‌های بدون تیمار فرادرمانی ۸۵٪ نسبت به نمونه‌ی تحت تیمار افزایش یافت. در حالی که درصد فازهای G1 و S تحت اعمال فرادرمانی به ترتیب حدود صد و ۳۵٪ و ۴۵٪ بیش‌تر از نمونه‌ی کنترل بود. در آزمایش دوم، اثر سه نوع میدان شعوری(ط) بر رده‌ی سلولی HEK-293 و در مدت ۲۴ ساعت در شرایط MG ارزیابی شد. نتایج نشان داد که درصد فاز Sub-G1 در شرایط استرس میکروگراویتی نسبت به نمونه‌ای که تحت تاثیر میدان‌های شعوری(ط) قرار گرفت دو برابر بیش‌تر بود. همچنین، TCFs باعث افزایش معنادار فاز S تا حدود ۱۸/۶٪ شد. با توجه به نتایج به دست آمده، اعمال این میدان‌ها آپوپتوز ناشی از استرس MG را مهار کرده و بقای سلولی را افزایش داده است. ضمن این که نشان می‌دهد TCFs می‌توانند مستقل از گرانش عمل کنند. بر اساس نظریه‌ی طاهری، اطلاعات منتقل‌شده در اثر اعمال این میدان‌ها باعث ایجاد سیستم جدید در محیط میکروگراویتی و جبران گرانش کاهش‌یافته شده است. به منظور درک بهتر اثر میدان‌های شعوری(ط)، سنجش وضعیت انرژی سلولی و غلظت ATP تحت دو گرانش ۱G و MG با و بدون اعمال TCFs پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: میدان‌های شعوری طاهری، فرادرمانی، میکروگراویتی، چرخه سلولی، Raji، HEK-293

کشت سلولی

در این آزمایش سلول های B-لنفوبلاستوئید انسانی Raji و رده ی سلولی HEK-293 با مورفولوژی اپیتلیال جدا شده از کلیه ی جنین انسان از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در محیط کشت 640-1640 Roswell Park Memorial Institute (Gibco Laboratories, Grand Island, NY)، حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی 100 IU میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین کشت شد. کشت ها در انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتی گراد (Schwabach, Memmer, آلمان) با 5% CO₂ و اتمسفر مرطوب نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از تشکیل جاب های هوا، فلاسک ها به طور کامل با محیط کشت پر شدند و پس از آن، نمونه ها در نگهدارندهای دایره ای در محیط کلینواسات ثابت شدند. سرعت چرخش سی دور در دقیقه بود (۶) و برای تامین زمان دو برابر شدن سلول Raji، به مدت ۴۸ ساعت و در مورد سلول هک، ۲۴ ساعت در دستگاه ادامه پیدا کرد.

فلوسایتومتري

سلول های برداشت شده دو بار با PBS شسته شدند و پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر PBS سرد (۲+ تا ۸+°C)، در مدت کوتاهی ورتکس شدند. سپس سلول ها در یک میلی لیتر اتانول سرد (۷۰-۲۰ درجه ی سانتی گراد) تثبیت شدند و مجددا ورتکس شدند. پس از آن سوسپانسیون سلولی در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد و پس از خارج کردن مایع رویی، سلول ها یک بار با PBS شسته شدند. سپس PBS به آرامی حذف شد و یک میلی لیتر محلول MIX MASTER PI اضافه شد. غلظت نهایی سلول ها در محلول مذکور باید ۵×۱۰^۵ سلول در میلی لیتر باشد. در نهایت سلول ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه و به وسیله ی فلوسایتومتري خوانده می شوند. نسبت سلول ها در مراحل مختلف چرخه ی سلولی با استفاده از فلوسیتومتر در سیستم BDFACS caliber (BD bioscience, San Joe, CA, USA) ارزیابی شد. مراحل چرخه ی سلولی با نرم افزار FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA) بررسی شد.

محلول مستر میکس PI جهت بررسی چرخه سلولی

Propidium iodide (PI) 1 mg/ml: 40 µl
RNase (DNaseFREE) 10MG/ML: 10 µl
PBS, ca⁺², mg⁺² Free: 950 µl

گرایش نیروی فیزیکی شناخته شده ای است که به طور ثابت در تاریخ زمین حضور داشته است. حیات در حضور این نیروی بنیادی تکامل یافته است. به همین دلیل، محققان همواره مشتاق بوده اند اثر آن را در شکل گیری و تکامل حیات زمینی بررسی کنند. شتاب هر جسم یا چیزی به سمت زمین ۹/۸ m/s² است که به طور گراویتی نرمال یا ۱G بیان می شود (۱). فضاوردان تحت گرانش کاهش یافته به مشکلات فیزیولوژیکی متعدد مانند آتروفی عضلانی^۱، مشکلات قلبی عروقی، دمیترالیزاسیون استخوان و اختلال در عملکرد سیستم ایمنی دچار می شوند (۲). به همین دلیل کاهش دادن این مشکلات جسمی یکی از دغدغه های موجود در مطالعات این حوزه است (۳). اگرچه اکتشاف های فضایی انسان، محققان حوزه ی علم را قادر می سازد تا سازوکارهای سازگاری با محیط میکروگراویتی را مطالعه کنند اما صرف نظر از عوامل استرس زای دیگر مانند تشعشعات کیهانی، باید بودجه ی زیادی برای انجام این آزمایش ها صرف شود. به همین دلیل استفاده از امکانات زمینی مانند دستگاه کلینواسات که سیستم بیولوژیکی را از درک بردار شتاب گرانشی باز می دارد، یکی از راه های بسیار مناسب برای شبیه سازی محیط میکروگراویتی است (۴).

پیش از این، اثر میدان های شعوری (ط) بر خواص مغناطیسی نیکل، آلومینا و مس بررسی شده است و بر اساس نتایج گزارش شده، مغناطش این فلزات تحت تاثیر این میدان ها تغییر کرده است (۵). این مشاهده تاییدکننده ی اثر متمایز میدان های شعوری (ط) است. بنا بر نظریه ی طاهری، اطلاعاتی که از طریق این میدان ها منتقل می شود، می تواند ویژگی های مواد را تغییر دهد. در مطالعه ی حاضر، نتایج حاصل از دو آزمایش ارائه شده است. ابتدا اثر فرادرمانی، به عنوان یکی از میدان های شعوری ای که طاهری معرفی کرده، بر پیشروی چرخه ی رده ی سلولی Raji تحت MG بررسی شد و پس از آن به منظور تکرار مشاهدات، آزمایش مشابهی بر رده ی سلولی HEK-293 طراحی شد. این تحقیقات این امکان را فراهم می کند که علاوه بر درک تمایز ماهیت این میدان های شعوری با گرانش، اثر آن ها را بر بقای سلولی در محیط استرس MG فضا مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

به کارگیری میدان شعوری فرادرمانی: مطابق با ملاحظات ذکر شده در این شماره انجام شده است.

اعمال میکروگراویتی

در این مطالعه، شرایط میکروگراویتی با استفاده از کلینوستات (اهدای دفتر امور فضایی سازمان ملل متحد در وین به پژوهشگاه هوافضای ایران) انجام شد. اگرچه حذف بردار گرانش در سطح زمین امکان پذیر نیست اما این دستگاه می تواند نمونه ی قابل اعتمادی از آزمایش های فضایی در شرایط میکروگراویتی واقعی ارائه دهد. برای این منظور ابتدا کلینوستات با اشعه ی ماوراء بنفش و اتانول (۷۰٪) استریل شد و سپس در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه ی

آنالیز آماری

نتایج و بحث

هر آزمایش سه بار تکرار شد و داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد ارائه شد. سپس آنالیز واریانس دو طرفه همراه با مقایسه‌های چندگانه با فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۹) انجام و مقادیر معنادار کم‌تر از ۰.۰۵/۰ (p < 0.05) ارائه شد.

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، فاز sub-G1 حدود ۸۵٪ بیش از نمونه‌های تحت تاثیر میدان است. بنابراین، می‌توان در سلول‌های موجود در کلینوستات، نشانه‌های آپوپتوز را به شکلی واضح مشاهده کرد. اما میدان شعوری فرادمانی این روند را تا حد زیادی متوقف کرد. از طرفی فاز G1 و S در نمونه‌های تحت اعمال میدان به ترتیب حدود ۱۳۵٪ و ۴۵٪ بیش‌تر از نمونه‌ی کنترل بودند. در مورد فازهای G2 و سوپر G2 تغییرات معناداری مشاهده نشد.

جدول ۱. تغییرات درصد فازهای چرخه‌ی سلولی در رده‌ی سلولی Raji در محیط میکروگراویتی یا فرادمانی (FCF+/MG) و بدون فرادمانی (FCF-/MG).

Groups	Sub G1	G1	S	G2	Super G2
FCF-/MG	42.10 $\pm$ 2.44	20.33 $\pm$ 0.80	28.27 $\pm$ 0.92	11.17 $\pm$ 1.88	0.70 $\pm$ 0.31
FCF+/MG	6.29** $\pm$ 0.79	47.78** $\pm$ 0.05	40.85** $\pm$ 1.96	10.17 $\pm$ 1.13	0.57 $\pm$ 0.33

معناداری در مقایسه با گروه کنترل (FCF-/MG) و با ستاره نمایش داده شده است: *: p-value < 0.0001, **: p-value < 0.00001.

جدول ۲- تغییرات درصد فازهای چرخه‌ی سلولی در رده‌ی سلولی HEK-293 در شرایط میکروگراویتی تحت تاثیر میدان‌های شعوری ظاهری (TCFs+/MG) و بدون میدان‌های شعوری (ط) (TCFs-/MG).

Groups	Sub G1	G1	S	G2	Super G2
TCFs-/MG	13.41 $\pm$ 0.86	41.14 $\pm$ 1.15	28.44 $\pm$ 2.47	23.17 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.45
TCFs+/MG	7.49** $\pm$ 0.21	38.61 $\pm$ 0.60	33.70** $\pm$ 1.65	21.89 $\pm$ 0.27	0.42 $\pm$ 0.08

معناداری در مقایسه با گروه کنترل (TCF-/MG) و با ستاره نمایش داده شده است: *: p-value < 0.05.

شد که محتوای ATP تحت تاثیر این سه نوع از میدان‌های شعوری (ط) و در گرانش نرمال زمین به‌طور معناداری از نظر آماری بالاتر از نمونه‌ی کنترل بود (۱۰). بنابراین، به منظور تکمیل مطالعه‌ی حاضر، پیشنهاد می‌شود تولید ATP تحت تاثیر این میدان‌ها و در شرایط میکروگراویتی نیز اندازه‌گیری شود.

در جمع‌بندی، این آزمایش‌ها شواهدی از افزایش بقای سلولی تحت استرس میکروگراویتی را فراهم می‌کند. بر اساس نظریه‌ی ظاهری، اطلاعات منتقل شده در پی اعمال TCFs باعث ایجاد وضعیت جدیدی در سیستم مورد مطالعه شده است. این شرایط جدید منجر به جبران گرانش کاهش یافته و مهار آپوپتوز شده است.

جدول ۲ داده‌های مربوط به تغییرات فازهای چرخه‌ی سلولی را در رده‌ی سلولی HEK-293 را ارائه می‌دهد. همان‌طور که مشخص است درصد فاز Sub-G1 در نمونه‌ی کنترل محیط میکروگراویتی تقریباً دو برابر نمونه‌ی تحت تاثیر میدان‌های شعوری در این شرایط استرس است. سلول‌های آپوپتوتیک با تغییرات مشخص در مورفولوژی سلول و کاهش محتوای DNA (sub-G1) مشخص می‌شوند و فلوئوسیتومتری یکی از مهم‌ترین سنجش‌ها برای تعیین آن است (۷).

این تغییرات در فاز Sub-G1 مطابق با دیگر مطالعات بود. پیش از این نیز، گزارش شده است که تنش میکروگراویتی بر پیشروی چرخه‌ی سلولی تاثیر منفی می‌گذارد و آپوپتوز را افزایش می‌دهد (۸). تغییر قابل توجه دیگر در چرخه‌ی سلولی مربوط به فاز S بود. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، درصد این فاز به شکلی معنادار تحت تاثیر TCFs حدوداً ۱۸/۶٪ بالاتر است. این افزایش هم‌راستا با تغییرات در رده‌ی سلولی Raji بود.

القای فاز S تحت تاثیر TCFs در محیط MG ممکن است با القای رشد و تکثیر مرتبط باشد. همچنین، توقف چرخه‌ی سلولی احتمال دیگری است که به عنوان یکی از مسیرهای ترمیم DNA تحت این شرایط استرس مطرح شده است؛ زیرا می‌تواند باعث فراهم کردن زمان به منظور ترمیم DNA آسیب دیده شود (۹). اثر TCFs در موضوعات مختلف در گرانش زمین مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال، در رده‌ی سلولی HEK-293 مشاهده

1. Morey-Holton, E. R. (2003). The impact of gravity on life. In *Evolution on planet Earth* (pp. 143-159). Academic Press.
2. Wolfe, J. W., & Rummel, J. D. (1992). Long-term effects of microgravity and possible countermeasures. *Advances in Space Research*, 12(1), 281-284.
3. Abdulrashid, F. A., Oluwafemi, F. A., Hussaini, S. J., Daniel, I. B., Isah, B., Ademu, A., ... & Dumbiri, C. O. (2020). *Possible solutions to the effects of space environment on astronauts' physiology*. J Eng Res.
4. Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christianen, P. C., de Geest, M., ... & Hemmersbach, R. (2013). Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*, 13(1), 1-17.
5. Taheri, M. A., Payervand, F., Ahmadkhanlou, F., Torabi, S., & Semsarha, F. (2022). The Distinction of Taheri Consciousness Fields from Conventional Physical Fields: Evaluating the Magnetic Properties of Materials. *Journal of Cosmointel*, 1(4), 8-19.
6. Moreno M-Villanueva, Honglu Wu c. (2019). Radiation and microgravity – Associated stress factors and carcinogenesis. *REACH*, 13, 100027
7. Plesca, D., Mazumder, S., & Almasan, A. (2008). DNA damage response and apoptosis. *Methods in enzymology*, 446, 107-122.
8. Vidyasekar, P., Shyamsunder, P., Arun, R., Santhakumar, R., Kapadia, N. K., Kumar, R., & Verma, R. S. (2015). Genome wide expression profiling of cancer cell lines cultured in microgravity reveals significant dysregulation of cell cycle and MicroRNA gene networks. *PloS one*, 10(8), e0135958.
9. Prasad, B., Grimm, D., Strauch, S. M., Erzinger, G. S., Corydon, T. J., Lebert, M., ... & Krüger, M. (2020). Influence of microgravity on apoptosis in cells, tissues, and other systems in vivo and in vitro. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9373.
10. Taheri, M. A., Torabi, S., & Semsarha, F. (2022). The Effect of Taheri Consciousness Fields on the ATP Production in HEK-293 Cell Line by Measuring Luciferase Activity. *Journal of Cosmointel*, 1(9), 34-55.