مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۸۸، صفحات ۱ تا ۱۰

Original Article

بررسی کشت درازمدت قلب جنین موش سوری نژاد Balb/C وتاثیر میدان‌های الکترومغناطیسی و L-Arginine بر رشدوتمایز آن

هما محسنی کوچصفهانی[۱]، کاظم پریور[۲]، مسعود مشهدی اکبر بوجار[۱]، الناز گل بوستان[۳]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم تهران
۲ استاد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۳ دانشجوی کارشناسی ارشد، زیست شناسی جانوری، گرایش تکوینی، دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

سابقه و هدف: *تاکنون مطالعات اندکی بر روی کشت قلب جنین موش در شرایط in vitro صورت گرفته است. هدف این تحقیق تعیین مدت زمان امکان نگهداری قلب فعال در محیط کشت و مقایسه میزان رشد و نمو آن تحت شرایط in vitro با in vivo و تاثیر میدان الکترومغناطیسی و L-Arginine در رشد و نمو قلب و تمایز آن می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، قلب جنین موش‌های ۱۱ روزه با استفاده از استریومیکروسکوپ جدا شده وبه محیط کشت Medium 199 همراه با ۱۵ درصد سرم گاوی منتقل و در انکوباتور واجد ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد هوا ، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز کشت داده شدند. سپس قلب جدا شده موش‌ها در گروه‌های تجربی ۱ (تحت اثر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۷۸/۳ گوس به مدت ۳۰ دقیقه)، تجربی ۲ (تحت تاثیر L-Arginine با غلظت ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر یعنی ۵ برابر غلظت استاندارد موجود در محیط کشت)، تجربی ۳ (به طور همزمان تحت اثر میدان الکترومغناطیسی و L-Arginine)، شم (تحت شرایط کشت بدون میدان الکترومغناطیسی و بدون L-Arginine) وشاهد (کاملا دست نخورده) قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *مطالعات مورفولوژیکی و هیستولوژیکی شامل طول و قطر قلب‌ها، قطر داخلی دهلیز، قطر داخلی بطن، طول دیواره بین دهلیز، طول دیواره بین بطنی، ضخامت دیواره بین دهلیز و ضخامت دیواره بین بطنی کاهش معنی‌داری را بین گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($p<۰/۰۰۱$). تعداد گلبول‌های قرمز هسته‌دار و بدون هسته خون و نیز تعداد ضربان قلب در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۰۱$).*

نتیجه‌گیری: *یافته‌ها بیانگر اثرات منفی میدان‌های الکترومغناطیسی و L-Arginine در رشد و نمو قلب جنین موش و اثرات مثبت L-Arginine و میدان‌های الکترومغناطیسی در افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون و نیز ضربان قلب می‌باشند.*

واژگان کلیدی: *رشد و نمو، قلب جنین موش، L-Arginine، میدان الکترومغناطیسی.*

مقدمه

میدان‌های الکترومغناطیسی اولین بار در سال ۱۸۰۰ میلادی توسط فیزیکدان انگلیسی به نام Faraday کشف شد .وی پی برد که توسط عبور جریان الکتریسیته از سیم پیچ، میدان مغناطیسی تولید می‌شود و نیز تغییرات میدان مغناطیسی موجب تشکیل ولتاژ الکتریکی می شود و بر هم کنش این میدان‌ها میدان الکترومغناطیسی را تولید می‌کند (۱). مطالعات نشان می‌دهند که میدان الکترومغناطیسی فوق‌العاده بالا با شدت ۱۴۰۰-۱۰۰۰ مگا هرتز باعث افزایش رشد در سلول‌های بافت قلبی جنین جوجه در محیط کشت می شود

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت معلم، گروه زیست شناسی، دکتر هما محسنی کوچصفهانی
(**email**: Kouchesfehani@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۶/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۱۲/۲۷

(۲). هم‌چنین میدان الکترومغناطیسی غیرحرارتی، میوکارد جنین جوجه را از صدمات ناشی از کمبود اکسیژن حفظ می‌کند و نیز نیروی مغناطیسی با افزایش اکسیژن و یا مواد مغذی، با بالا بردن مقدار متابولیسم به التیام قلب‌های آسیب‌دیده کمک می‌کند (۳).

Arginine اسید آمینه‌ای با دو عامل آمینی است که در تمام مواد پروتئینی طبیعی وجود دارد و از گوانیدین مشتق می‌شود (۴). در موجودات زنده در طی مسیر متابولیکی L-Arginine توسط آنزیم نیتریک‌اکساید سنتتاز به نیتریک اکساید تبدیل می‌شود (۵) . ثابت شده است که L-Arginine از گرفتگی عضلات ملتهب در قلب‌های آسیب دیده موش ممانعت کرده و ساختار عضلات را بازسازی می‌کند (۶). هم‌چنین نیتریک اکساید در تنظیم قدرت انقباض عضلات قلبی، ضربان قلب، تنفس میتوکندریایی و آپوپتوزیس نقش داشته و به طور کلی در رشد و نمو طبیعی قلب موثر می‌باشد (۶) .

رشدونمو قلب جنین موش از روز ۷/۵ جنینی آغاز می‌شود (۷). عمده‌ترین بخش قلب از مزودرم احشایی تشکیل می‌شود که به صورت یک بخش نعل اسبی شکل در قسمت قدامی غشای دهانی– حلقی قرار دارد (۸). لوله قلبی اولیه در روز ۸/۵ به صورت یک لوله منفرد ضربان‌دار در می‌آید. در روز ۹ جنینی لوله کوتاه و مستقیم قلبی خمیده شده و موقعیت بطن و دهلیز تغییر می‌کند. در طی روز دهم، قلب به صورت برجستگی مشخصی در مجاورت قوس‌های احشایی دیده می‌شود. تشکیل دو دهلیز از دهلیز اولیه توسط دیواره اولیه صورت می‌گیرد، ولی در این زمان بطن به صورت حفره‌ای منفرد دیده می‌شود. در روز ۱۴ جنینی دیواره بطن‌ها به طور کامل بسته شده و قلب ۴ حفره‌ای تشکیل می‌شود. فرم نهایی قلب جنین موش پیش از تولد در روز ۱۶ جنینی شکل می‌گیرد (۹).

با توجه به این که تاکنون مطالعه دقیقی در مورد محیط کشت مناسب برای رشدونمو قلب در مراحل ابتدایی و نیاز آن به فاکتورهای مختلف جهت تکمیل رشدو نمو و دیواره بندی آن صورت نگرفته است، در این تحقیق بر آن شدیم که اندام قلب جنین موش را در مراحل ابتدایی‌تر رشد و نمو (روزهای ۱۱ تا ۱۴جنینی) در محیط کشت Medium ۱۹۹ مورد بررسی قرار دهیم. به علاوه با توجه به استفاده روزافزون از میدان‌های الکترومغناطیسی در زندگی روزمره و اثرات منفی و مثبت این میدان‌ها بر سیستم‌های زیستی، نقش میدان‌های الکترومغناطیسی بر تکوین قلب جنین موش در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. از طرفی با توجه به نقش L-Arginine و نیتریک اکساید در رگزایی و قلب انسان، اثرات L-Arginine و نیتریک اکساید را به تنهایی و همراه با میدان الکترومغناطیسی بر رشد و نمو قلب جنین موش در محیط کشت مورد مطالعه قرار دادیم.

مواد و روشها

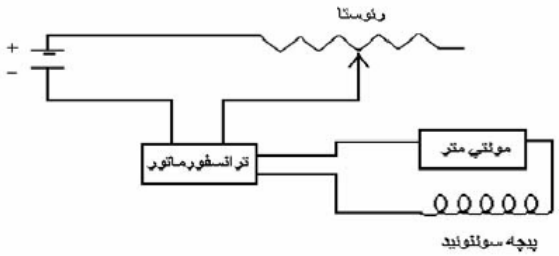
در این مطالعه تجربی، موش‌های نر و ماده سوری نژاد Balb/C از انستیتو پاستور تهران خریداری شده و پس از انتقال به اتاق پرورش حیوانات در قفس‌های پلاستیکی به ابعاد مشخص و استاندارد که غذا و آب در دسترس آنها قرارداشت، نگهداری شدند. درجه حرارت اتاق پرورش حیوانات ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد بود. میزان نور اتاق نگهداری حیوانات توسط تایمر الکترونیکی اتوماتیک به صورتی تنظیم شدکه حیوانات ۱۲ ساعت در نور و ۱۲ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. در این تحقیق از موش‌های بالغ ماده و نر با وزن ۳۰-۲۶ گرم استفاده شد. شب هنگام موش‌های نر و ماده به صورت پلی‌گامی در یک قفس قرار گرفته و با مشاهده درپوش واژنی (*Vaginal Plug= VP*) در صبح روز بعد، روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. سپس موش‌ها در قفس‌های مجزایی قرارگرفتند.

در روز ۱۱ حاملگی موش‌های ماده توسط شکستگی گردن کشته شده و سپس در روی تشتک تشریح به پشت خوابانده شده و پوست بدن آنها جدا گردید. سپس لوله‌های رحمی به دقت از بدن مادر جدا شده و در داخل یک ظرف پتری حاوی محلول نمکی متعادل شده هنکس (HBSS، Hanks balanced salt solution) قرار گرفت. در مرحله بعد، جنین‌ها در زیر استریومیکروسکوپ از رحم و سپس از پرده آمنیون خارج شدند. قلب‌های جنین‌ها با دقت جدا شده و در داخل ظرف پتری دیگری که حاوی HBSS تازه بود، قرار گرفتند. سپس قلب‌ها بلافاصله پس از شستشو در HBSS، به ظروف محتوی محیط کشت Medium 199 که حاوی گلوتامین و سدیم بی‌کربنات، به همراه ۱۵ درصد سرم New born calf serum که با احتیاط اضافه شد، منتقل گردیدند. روش کشت مورد استفاده، تکنیک گرید بود. در این روش، بافت توسط گرید فلزی پایه‌دار و فیلتر میلی‌پور در فاز بین محیط کشت مایع و هوا قرار گرفته، سپس ظروف کشت در داخل انکوباتور که ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد هوا در آن جریان داشته و دمای آن ۰/۱±۳۷ درجه سانتی‌گراد بود، انکوبه شدند. محیط کشت هر ۲۴ ساعت یک بار تعویض می‌گردید.

به منظور ارزیابی اثر عوامل محیطی در رشد و نمو قلب جنین موش در شرایط in vitro، دو عامل میدان‌های الکترومغناطیسی

و L-Arginine مورد توجه قرار گرفتند. سیستم طراحی شده (سولنوئید، ترانسفورماتور، رئوستا و مولتی‌متر) میدانی با شدت ۷۸/۳ گوس و فرکانس ۵۰ هرتز تولید می‌کرد که به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید تا اثرات میدان الکترومغناطیسی بر مراحل تکوین و رشد و نمو قلب جنین موش در شرایط *in vitro* بررسی گردد (تصویر و شکل ۱).

تصویر ۱- سیم پیچ سولنوئید مورد استفاده جهت تولید میدان الکترومغناطیسی



شکل ۱- طرح مدار تولید کننده میدان الکترومغناطیسی

سپس قلب‌های مورد مطالعه در سه گروه تقسیم‌بندی شدند:

۱) گروه شاهد: قلب جنین موش‌های این گروه، در دو زمان یعنی روز ۱۱ جنینی (شاهد ۱، n=۱۲) و روز ۱۴ جنینی (شاهد ۲، n=۱۲) از بدن جدا شده و بدون اینکه در محیط کشت قرار گیرند مورد مطالعه میکروسکوپی قرارگرفتند.

۲) گروه شم: قلب آن‌ها در روز ۱۱ جنینی از بدن جدا شده و به مدت ۳ روز در محیط کشت فاقد میدان الکترومغناطیسی و L-Arginine قرار گرفتند (n=۲۷).

۳) گروه تجربی: قلب آن‌ها در روز ۱۱ جنینی از بدن جدا شده خود به ۳ زیرگروه زیر تقسیم شدند:

الف) زیرگروه اول پس از ۲۴ ساعت تطبیق با محیط کشت در انکوباتور به مدت نیم ساعت تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی (با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۷۸/۳) قرار گرفتند و پس از تعویض محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری شدند (n=۲۷).

ب) زیرگروه دوم که از همان ابتدا در محیط کشتی که حاوی ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (۵ برابر غلظت استاندارد L-Arginine) بود، کشت داده شدند و به مدت ۳ روز انکوبه شدند. تعویض محیط کشت هر ۲۴ ساعت یک بار انجام گرفت (n=۲۷).

ج) زیرگروه سوم که از همان ابتدا در محیط کشت، به طور هم‌زمان تحت تاثیر L-Arginine به غلظت ۵ برابر حالت استاندارد و نیز نیم ساعت میدان الکترومغناطیسی قرارگرفته و سپس به مدت ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری شدند (n =۲۷).

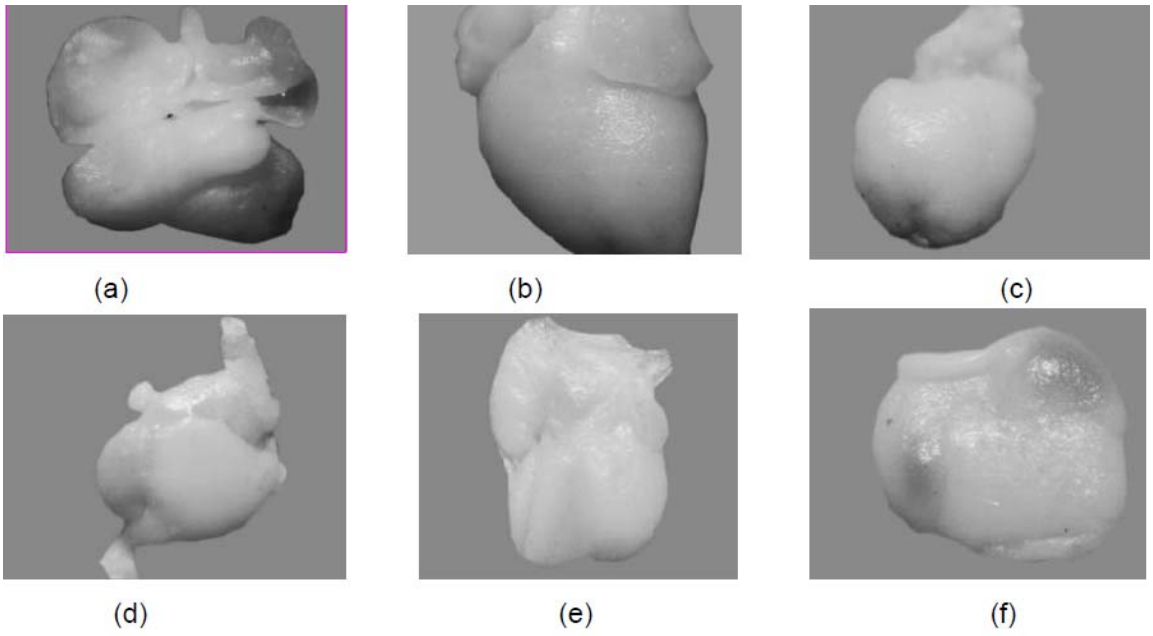
برای تهیه مقاطع میکروسکوپی، ابتدا نمونه‌ها به مدت دو ساعت در فیکساتور بوئن قرار گرفتند و پس از ثبوت به روش معمول تهیه مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و با H&E رنگ آمیزی شدند (۱۰). سپس لام‌های آماده شده مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. در مطالعه میکروسکوپی مقاطع بافتی، ابتدا نمای کلی بافت مورد بررسی قرار گرفت و سپس شمارش سلولی و اندازه‌گیری‌های لازم انجام شد. در این حالت، ابتدا طول و قطر کل اندام با استفاده از گراتیکول یا خط‌کش اکولری اندازه گرفته شد. همچنین ضخامت دیواره بین دهلیزی و ضخامت دیواره بین بطنی،طول دیواره بین دهلیزی و طول دیواره بین بطنی، قطر داخلی دهلیز و قطر داخلی بطن و قطر تنه سرخرگی اندازه‌گیری شد. در شمارش‌های سلولی، تعداد گلبول‌های قرمز داخل قلب، شامل گلبول‌های قرمز هسته‌دار و بدون هسته و نیز تعداد ضربان قلب در دقیقه شمارش گردید. آنگاه نمای سه بعدی و کامل نمونه‌ها با استریومیکروسکوپ دوربین‌دار تصویربرداری شد.

از نرم افزار SPSS11 برایرتحلیل داده‌ها استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون ANOVA صورت گرفت. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

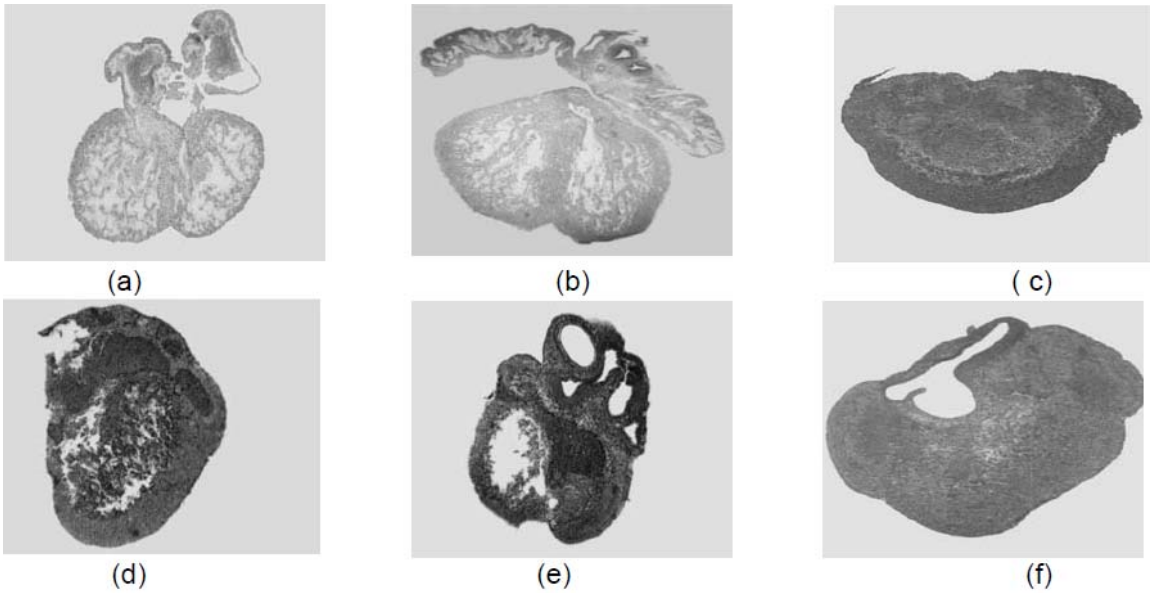
اختلال واضحی در رشد و نمو قلب درگروه‌های شم و تجربی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. درتصویر ۲ نمای سه بعدی و کامل نمونه‌ها و در تصویر ۳ مقاطع میکروسکوپی آنها نشان داده شده است.

یافته‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی قلب و شمارش سلولی گروه‌های مختلف در جدول ۱ آمده است.



تصویر ۲- استریومیکروگراف قلب جنینی.

(a): قلب جنین ۱۱ روزه در گروه شاهد ۱؛ (b): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه شاهد ۲؛ (c): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه شم (۱۱روزه + ۳ روزمحیط کشت)؛ (d): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه تجربی ۱ (۱۱ روزه + ۳ روزمحیط کشت + میدان الکترومغناطیسی)؛ (e): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه تجربی ۲ (۱۱ روزه + ۳ روز محیط کشت + L-Arginine)؛ (f): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه تجربی ۳ (۱۱روزه + ۳ روز محیط کشت + میدان الکترومغناطیسی + L- Arginine). بزرگنمایی میکروسکوپی × ۱۲۵



تصویر ۳- فتومیکروگراف قلب جنینی.

(a): قلب جنین ۱۱ روزه در گروه شاهد ۱؛ (b): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه شاهد ۲؛ (c): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه شم (۱۱ روزه + ۳ روز محیط کشت)؛ (d): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه تجربی ۱ (۱۱روزه + ۳ روز محیط کشت + میدان الکترومغناطیسی)؛ (e): قلب جنین ۱۴ روزه در گروه تجربی ۲ (۱۱روزه + ۳روز محیط کشت + L- Arginine

طول و قطر قلب جنین‌ها در هر سه گروه تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ کاهش معنی‌داری را نشان داد. طول و قطر قلب جنین‌ها در گروه شم نسبت به گروه شاهد ۱ و ۲ کاهش معنی‌داری داشت.

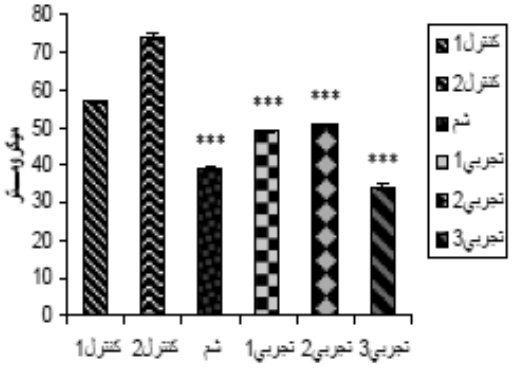
کاهش طول و قطر قلب جنینی در گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ در مقایسه با گروه شم کمتر بود، که در گروه‌های ۱ و ۲ غیر معنی‌دار و در گروه ۳ معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۱ و ۲).

جدول ۱- یافته‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی قلب و شمارش سلولی گروه‌های مختلف

	شاهد ۱	شاهد ۲	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳
طول قلب (µm)	۵۷/۱±۰/۴*	۷۴/۳±۰/۶	۳۹/۱±۰/۳	۴۹/۳±۰/۲	۵۰/۸±۰/۲	۳۴/۲±۰/۷
قطر قلب (µm)	۵۴/۳±۰/۶	۷۲/۸±۰/۲	۳۸/۳±۰/۲	۴۳±۰/۲	۴۱/۴±۰/۲	۴۰/۷±۱
قطر تنه سرخرگی (µm)	۶/۱±۰/۲	۱۳/۳±۰/۲	۴/۳±۰/۱	۴/۳±۰/۱	۱۳/۵±۰/۱	۴/۹±۰/۲
قطر داخلی دهلیز (µm)	۱۵/۴±۰/۲	۳۵/۲±۰/۴	۱۲±۰/۲	۱۱/۷±۰/۲	۱۱/۴±۰/۲	۷/۸±۰/۵
قطر داخلی بطن (µm)	۲۲/۹±۰/۶	۲۸/۲±۱/۱	۱۵/۹±۰/۲	۱۶±۰/۲	۱۵/۹±۰/۲	۱۴±۰/۲
طول دیوار بین دهلیز (µm)	۹/۱±۰/۱	۱۳/۷±۰/۲	۳/۳±۰/۱	۳/۱±۰/۱	۴±۰/۱	۲±۰/۱
طول دیواره بین بطن (µm)	۱۸/۶±۰/۳	۳۹/۴±۲	۷/۱±۳/۱	۴/۳±۰/۱	۷/۶±۰/۱	۳/۳±۰/۱
ضخامت دیواره بین دهلیز (µm)	۴±۰/۱	۹/۴±۰/۱	۳/۲±۰/۱	۲/۹±۰/۱	۴±۰/۱	۳/۲±۰/۱
ضخامت دیواره بین بطن (µm)	۵/۳±۰/۱	۱۳/۳±۰/۲	۴±۰/۱	۳/۶±۰/۱	۵/۲±۰/۲	۴±۰/۲
تعداد گلبولهای قرمز هسته دار	۶۲/۴±۳/۲	۱۶/۳±۰/۹	۷۷/۳±۱/۳	۶۹/۳±۱/۱	۱۰۳±۵/۱	۱۰۰/۹±۱
تعداد گلبولهای قرمز بدون هسته	۹/۸±۰/۵	۳۴/۵±۲/۱	۳۵/۲±۱/۱	۴۳/۶±۲	۳۴/۷±۲/۳	۴۰/۳±۱/۵
تعداد ضربان در دقیقه	۱۱۹±۰/۶	۷۵/۹±۰/۱	۱۷۰±۰/۸	۱۶۶/۷±۲۳/۶	۱۵۲±۴/۶	۱۵۲/۷±۶/۶

* اعداد به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شده اند.

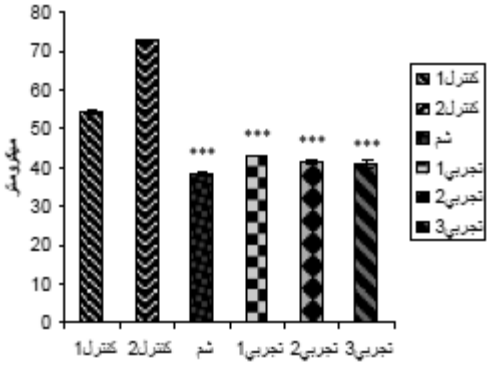
قطر تنه سرخرگی در گروه‌های تجربی ۱ و ۳ نسبت به گروه شاهد ۲ کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۰۱$)، در حالی که اختلاف گروه تجربی ۲ با گروه شاهد ۲ معنی‌دار نبود (نمودار ۳).



نمودار ۱- طول قلب جنینی در گروه های مختلف.

کاهش معنی داری درگروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.

*** $p<۰/۰۰۱$

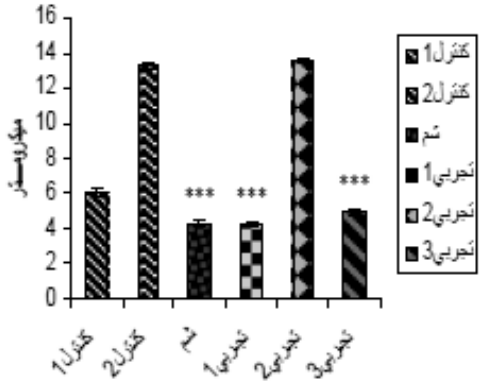


نمودار ۲- قطر قلب جنینی در گروه های مختلف.

کاهش معنی داری در گروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.

*** $p<۰/۰۰۱$

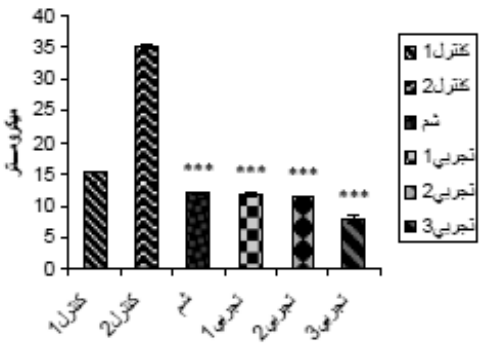
قطر داخلی دهلیز و قطر داخلی بطن در هر سه گروه تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۴ و ۵).



نمودار ۳- قطر تنه سرخرگی در قلب جنینی گروه های مختلف.

کاهش معنی داری در گروه تجربی ۱ و ۳ نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.

*** $p<۰/۰۰۱$

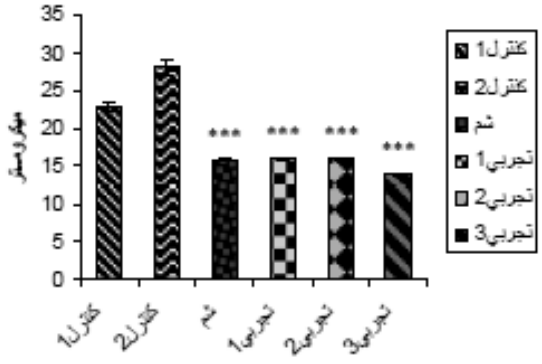


نمودار ۴- قطر داخلی دهلیز در قلب جنینی گروه های مختلف.

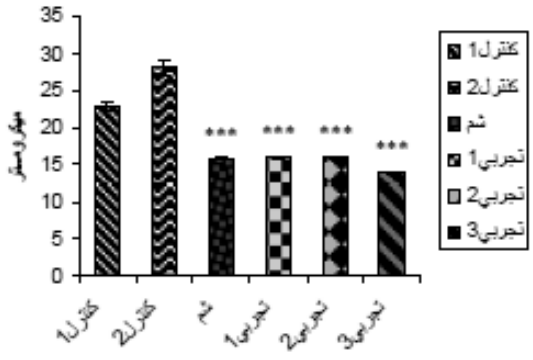
کاهش معنی داری درگروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.

*** $p<۰/۰۰۱$

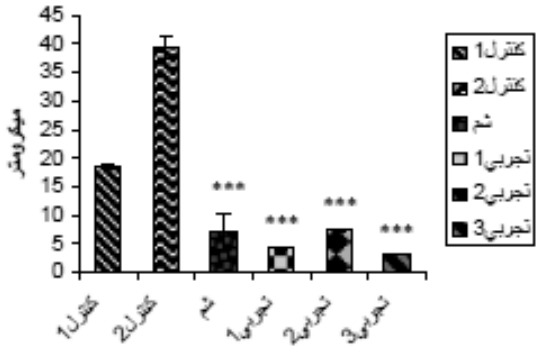
طول و ضخامت دیواره بین دهلیز و دیواره بین بطنی نیز در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۰۱$) (نمودارهای ۶ تا ۹).



نمودار ۵- قطر داخلی بطن در قلب جنینی گروه های محتلف.
کاهش معنی داری درگروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.
*** $p<۰/۰۰۱$

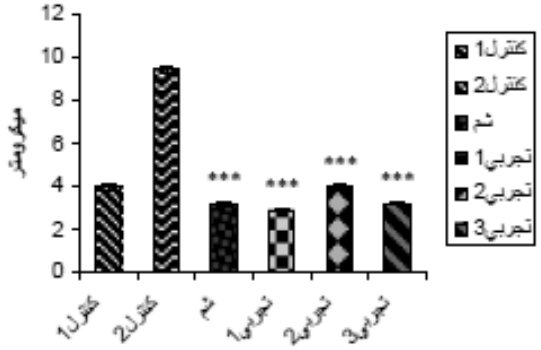


نمودار ۶- طول دیواره بین دهلیز در قلب جنینی.
کاهش معنی داری در گروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.
*** $p<۰/۰۰۱$

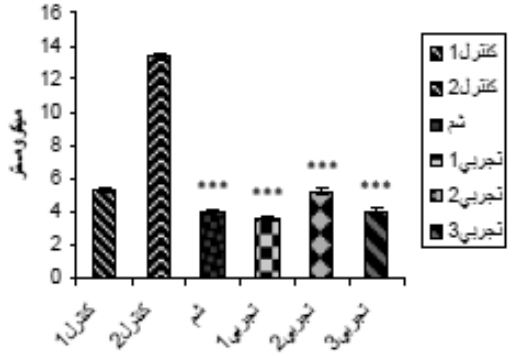


نمودار ۷- طول دیواره بین بطنی در قلب جنینی گروه های مختلف.
کاهش معنی داری در گروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.
*** $p<۰/۰۰۱$

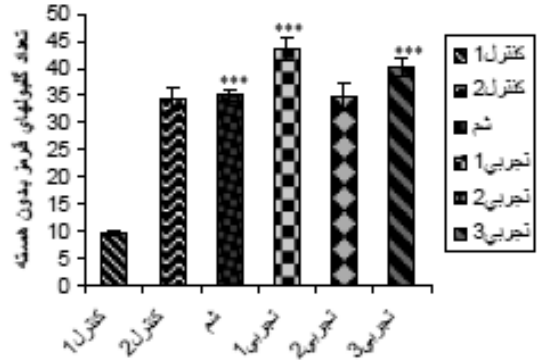
تعداد گلبول‌های قرمز هسته‌دار در هر سه گروه تجربی و تعداد گلبول‌های قرمز بدون هسته در گروه‌های تجربی ۱ و ۳ نسبت به گروه شاهد ۲ افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار۱۰ و ۱۱).



نمودار ۸- ضخامت دیواره بین دهلیزی و بین بطنی در قلب جنینی.
کاهش معنی داری در گروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.
*** $p<۰/۰۰۱$

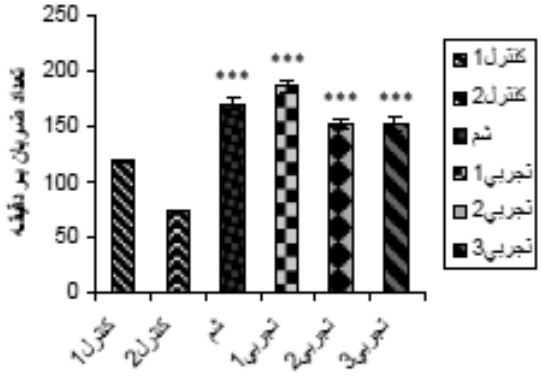


نمودار ۹- ضخامت دیواره بین دهلیزی و بین بطنی در قلب جنینی.
کاهش معنی داری در گروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.
*** $p<۰/۰۰۱$



نمودار۱۰- تعداد گلبول های قرمز بدون هسته درون قلب جنینی گروه های مختلف.
افزایش معنی داری در گروه های تجربی ۱ و ۳ نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.
*** $p<۰/۰۰۱$

تعداد ضربان قلب جنین‌ها در محیط کشت، در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ افزایش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۱۲).



نمودار۱۱- تعداد ضربان قلب جنینی (در دقیقه).
افزایش معنی داری درگروه های تجربی نسبت به گروه شاهد ۲ مشاهده می شود.
*** p<۰/۰۰۱

بحث

کشت قلب اولین بار در سال ۱۹۷۰ و ۱۹۷۱ میلادی صورت گرفت. به این ترتیب که قلب جنین موش را در روزهای ۱۹ الی ۲۱ حاملگی که قلب‌ها به طور کامل تمایز پیدا کرده و اندازه آنها هم برای مطالعات میکروسکوپی و نیز کشت مناسب بود، در شرایط *in vitro* کشت دادند. روش کشت در این تحقیق تکنیک گرید بوده و قلب‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷/۲±۰/۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هوای انکوباتور و محیط کشت به طور متناوب تعویض می‌شد. محیط کشت استفاده شده Medium 199 بود که با ۳۵ درصد سرم به اضافه ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انسولین به اضافه ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کورتیزول و ۵/۴ پتاسیم میلی‌اکی‌والان در لیتر غنی شده بود. هم‌چنین اتمسفر شامل ۹۵ درصد اکسیژن بود. به هر حال ثابت شد که در محیط کشت قلب‌های ۱۹ تا ۲۱ روزه حدود ۲۱/۳±۴/۸۱ روز زنده مانده و ضربان دارند. اما شواهد حاکی از آن بود که قلب‌های جنین موش در شرایط *in vitro* دچار تمایز زدایی می‌شوند. یعنی در بهترین شرایط در محیط کشت حتی با افزودن انسولین و کورتیزول دژنره شدن قلب-های جنین (در مراحل فتال پیشرفته ۱۹ تا ۲۱ روزه) اجتناب-ناپذیر است. اما به هر حال قسمت عمده قلب‌ها باقی مانده و برای چند روز ضربان دارند (۱۳-۱۱) .

در این مطالعه، چگونگی رشد و نمو قلب در محیط کشت Medium199 مورد بررسی قرار گرفت. یکی از مزایای انجام کشت قلب این است که تکنیک کشت به عنوان یک سیستم مفید برای تجزیه و تحلیل اثر عوامل مورد آزمایش در متابولیسم و فعالیت قلبی محسوب می‌شود. قلب‌های موجود در محیط کشت به عنوان یک مدل ساده برای بررسی فاکتورهایی که ممکن است از نظر بالینی در حفظ و نگهداری قلب‌ها قبل از عمل جراحی پیوند قلب یا در اعمال جراحی طولانی مدت قلب‌ها با ارزش باشند، محسوب می‌شوند (۱۲). از آن جایی که شروع تشکیل اندام قلب در جنین موش از روز ۷/۵ جنینی است (۸)، به همین خاطر روز ۱۱ جنینی به عنوان روز جداسازی قلب از بدن جنین و شروع انکوباسیون آن در محیط کشت انتخاب گردید. زیرا از یک طرف در این روز قلب قابل تشخیص و جداسازی بود و از طرف دیگر رشد آن در مراحل ابتدایی قرار داشت که بسیار حساس می‌باشد و می‌توان اثرات عوامل محیطی مثل میدان الکترومغناطیسی و L-Arginine را در مراحل ابتدایی تکوین بررسی نمود.

نتایج حاصل از کشت قلب در محیط کشت Medium 199 بیانگر آن است که فاکتورهایی مثل طول و قطر قلب، قطر تنه سرخرگی، قطر داخلی دهلیز و بطن، طول دیواره بین دهلیز و طول دیواره بین بطن، ضخامت دیواره بین دهلیز و ضخامت دیواره بین بطن پس از ۷۲ ساعت در محیط کشت نسبت به گروه شاهد ۱ (قلب‌های ۱۱روزه) کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. هم‌چنین تعداد گلبول‌های قرمز هسته‌دار و بدون هسته و نیز تعداد ضربان در دقیقه در قلب‌های کشت شده پس از ۷۲ ساعت نسبت به گروه شاهد ۱ و ۲ (قلب‌های ۱۱ و ۱۴ روزه) افزایش معنی‌داری دارد. کاهش در فاکتورهایی مثل طول و قطر و اندازه قلب با نتایج مطالعات Wildenthal و همکارانش در سال ۱۹۷۰ مطابقت دارد که بیان کننده تمایززدائی قلب جنینی موش‌ها در شرایط *in vitro* می‌باشد و این مطلب نشان دهنده این است که تخریب قلب‌ها اجتناب‌ناپذیر است (۱۱). افزایش تعداد گلبول‌های قرمز هسته‌دار و بدون هسته در قلب‌های کشت شده نشان‌دهنده رشد و نمو و تمایز این سلول‌ها است، یعنی در محیط کشت Medium 199 خون‌سازی انجام شده است. از آن جایی که از دست دادن هسته‌های گلبولهای قرمز در جنین موش در روزهای ۱۵-۱۴ رشد و نمو جنینی صورت می‌گیرد (۱۴)، این امر وجود گلبول‌های قرمزهسته‌دار را در تجربیات ما توجیه می‌سازد. در این مطالعه، افزایشی در تعداد ضربان قلب در قلب‌های کشت شده نسبت به گروه شاهد ۱ (قلب‌های ۱۱روزه) مشاهده شد. این بررسی‌ها نشان دهنده این است که تعداد ضربان قلب تا روز ۱۱ جنینی حدود ۱۱۹ ضربان در دقیقه می‌باشد، درحالی که از روز ۱۲ به بعد کاهش

چشم‌گیری داشته و به حدود ۷۵ ضربان در دقیقه می‌رسد (۱۵). در حالی که نتایج حاصل از بررسی‌های اخیر نشان دهنده افزایش تعداد ضربان قلب‌های کشت شده به حدود ۱۵۰ ضربان در دقیقه می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی تعداد ضربان در تجربیات ما با یافته‌های Wildenthal در سال ۱۹۷۲ مطابقت دارد. در مطالعه Wildenthal و همکارانش، تعداد ضربان قلب در محیط کشت در ۲ تا ۴ روز اول کشت ۱۸۰-۸۰ ضربان در دقیقه بود که این مورد با افزایش تعداد ضربان قلب در گروه‌های قلب کشت شده در تجربیات ما سازگاری دارد (۴) .

برای بررسی اثر عوامل محیطی در رشد و نمو قلب جنین موش در محیط کشت، ما دو فاکتور میدان‌های الکترومغناطیسی و L-Arginine را مورد مطالعه قرار دادیم. در این پژوهش از سیستم طراحی شده (سولنوئید، ترانسفورماتور، رئوستا و مولتی متر) که میدانی با شدت ۷۸/۳ گوس و فرکانس ۵۰ هرتز تولید می‌کرد، به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد و به این ترتیب اثرات میدان الکترومغناطیسی با فرکانس بسیارکم (ELF) بر مراحل تکوینی و رشد و نموی قلب جنین موش در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تاثیر میدان الکترومغناطیسی بر تکوین قلب بیانگر آن است که طول و قطر و در کل اندازه قلب در نمونه‌های تجربی ۱ (تحت تاثیر میدان) نسبت به گروه شاهد ۱ و ۲ کاهش معنی-داری را نشان می‌دهد، ولی کاهش اندازه در نمونه تجربی نسبت به نمونه شم کمتر بود. یعنی احتمالا میدان الکترومغناطیسی تا حدودی اثر محافظتی بر روی قلب‌های کشت شده دارد. البته استثناهایی هم در این میان دیده می-شود. مقایسه تعداد گلبول‌های قرمز هسته دار و بدون هسته در گروه‌های تجربی ۱ (تحت تاثیر میدان) نسبت به گروه شاهد ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. این امر بیانگر تاثیر میدان الکترومغناطیسی بر فرایند خون‌سازی است. این نتایج با تجربیات Cieslar و همکارانش در سال ۱۹۹۴ مطابقت دارد. آنها ثابت کردند که میدان‌های الکترومغناطیسی می‌توانند برخی پارامترهای خونی را تحریک کرده و افزایش معنی‌داری را در تعداد اریتروسیت‌ها، غلظت هموگلوبین و پروتئین‌های پلاسمایی موجب گردند (۱۶). هم‌چنین افزایش تعداد ضربان قلب در گروه‌های تجربی میدان دیده، نسبت به گروه‌های شاهد ۱ و ۲ نشان دهنده اثر تحریکی میدان‌های الکترومغناطیسی بر تعداد ضربان قلب جنین‌ها می‌باشد. عامل محیطی دیگری که اثر آن بر رشد و نمو قلب جنین موش در محیط *in vitro* مورد بررسی قرارگرفت، اسید آمینه L-Arginine می‌باشد. با توجه به اینکه L-Arginine به عنوان اسیدآمینه ضروری در محیط‌های کشت وجود دارد و بر اساس مطالعات انجام شده نقش مثبت L-Arginine در دوران جنینی در رگ‌زایی و رشد و نمو سیستم عروقی مشخص شده است (۸)، در این مطالعه اثر L-Arginine اگزوژن در رشد و نمو قلب در محیط کشت و نیز نقش آن در قلب‌های تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه اثرات بیولوژیک L-Arginine به صورت اندوژن (۱۷) و نیز اثرات بیولوژیک نیتریک اکساید (NO) که توسط آنزیم NOS یا نیتریک اکساید سنتتاز از L-Arginine (۱۸) ساخته می‌شود، نشان می‌دهد که نیتریک اکساید که یک گاز نامحلول با نیمه عمر کمتر از چند ثانیه است، اثرات فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی معینی در بافت‌های مختلف دارد (۱۸). در این رابطه از اسید آمینه L-Arginine به صورت پودر در محیط کشت استفاده گردید. به این ترتیب که با غلظت ۵ برابر استاندارد موجود در محیط کشت Medium 199 (۷۰mg/l) یعنی ۳۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به محیط اضافه گردید.

نتایج ما در مورد به کارگیری L-Arginine اگزوژن در رشد و نمو قلب در محیط کشت بیانگر آن است که طول، قطر و اندازه قلب در نمونه‌های تجربی ۲ (تحت تاثیر L-Arginine) نسبت به گروه شاهد ۱ و ۲ کاهش معنی‌داری دارد. ولی کاهش اندازه اکثرا در نمونه‌های تجربی نسبت به نمونه شم کمتر است. یعنی احتمالا L-Arginine نیز تا حدودی اثر محافظتی بر روی قلب‌های کشت شده دارد. مقایسه قطر تنه سرخرگی نشان می‌دهد که در نمونه‌های تجربی ۲ (تحت تاثیر L-Arginine) اختلاف قطر تنه سرخرگی با گروه شاهد ۲ (۱۴ روزه) معنی‌دار نیست، یعنی کاهش در اندازه قطر تنه سرخرگی دیده نمی‌شود. درحالی که در نمونه‌های تجربی ۱ (تحت تاثیر میدان) و شم کاهش معنی‌داری مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های Cotton و همکارانش مطابقت دارد. آنها ثابت کردند که سنتز نیتریک اکساید اندوژن دارای اثرات مثبت در قلب انسان بوده و در رگ‌زایی هم نقش مثبتی دارد (۱۹).

یافته دیگر این مطالعه افزایش تعداد گلبول‌های قرمز هسته‌دار و بدون هسته در گروه تجربی ۲ (تحت تاثیر L-Arginine) نسبت به گروه‌های شاهد می‌باشد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که L-Arginine در خون‌سازی هم نقش مثبتی دارد. طبق تحقیقات انجام شده، سلول‌های اندوتلیایی با e-NOS مثبت (آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز حاصل از L-Arginine) در افزایش گردش خون نقش فیزیولوژیکی دارند (۵). تعداد ضربان قلب در گروه تجربی ۲ (تحت تاثیر

L-Arginine) افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های شاهد نشان می‌دهد که احتمالا به دلیل اثرات تحریکی L-Arginine در ضربان قلب می‌باشد، ولی نسبت به گروه شم اختلاف معنی‌دار نیست. در مورد گروه تجربی ۳، که قلب‌های جنینی موجود در محیط کشت به طور هم‌زمان تحت تاثیر میدان های الکترومغناطیسی و L-Arginine قرار گرفته بودند، نتایج بیانگر آن است که طول و قطر قلب و اندازه قلب در نمونه‌های تجربی ۳، ۷۲ ساعت پس از کشت کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های شاهد ۱ و ۲ (۱۱ و ۱۴ روزه) نشان می‌دهند. تعداد گلبول‌های قرمز هسته‌دار و بدون هسته در نمونه‌های تجربی ۳ نسبت به نمونه‌های شاهد ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری را نشان داد که بیانگر تاثیر میدان الکترومغناطیسی و نیز L-Arginine بر فرایند خونسازی است که با نتایج تجربیات Cieslar وهمکارانش درسال ۱۹۹۴ و shakeel وهمکارانش در سال ۱۹۹۹ مطابقت دارد.

تعداد ضربان قلب در گروه تجربی ۳ (تحت تاثیر میدان و L-Arginine) نسبت به گروه شاهد ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری را نشان داد، هر چند که تعداد ضربان در گروه تجربی ۳ نسبت به گروه تجربی ۱ و ۲ و شم کمتر بود، ولی می‌توان نتیجه گرفت که میدان‌های الکترومغناطیسی و L-Arginine به صورت هم‌زمان نیز اثر تحریکی بر تعداد ضربان قلب دارند. تجربیات ثابت کرده است که میزان حساسیت قلب‌های کشت شده پس از تیمار طولانی مدت (۲روز) با تری‌یدوتیرونین نسبت به اپی نفرین افزایش یافته و نوراپی‌نفرین باعث افزایش میزان ضربان قلب در آنها می‌شود (۱۲) که با نتایج حاصل از تاثیر توام میدان‌های الکترومغناطیسی و L-Arginine مطابقت دارد. نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کندکه میدان‌های الکترومغناطیسی و L-Arginine در رشد و نمو قلب جنینی اثر منفی داشته و ایجاد اختلال می‌کنند، درحالی که بر سیستم‌های خون‌سازی، رگ‌زایی و تعداد ضربان قلب اثرات مثبتی نشان می‌دهند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مسئولان محترم گروه زیست‌شناسی و دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران در تأمین امکانات اجرایی این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Blaxham J. The evolution of the earth magnetic field. Sci Am 1989;12:68-75.
2. Synder SH, Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uht GR. Mechanisms of No mediated neurotoxicity in primary brain culture. J Neurosci 1993;13:2051-61.
3. Dicarlo AL, Farrell JM, Litovitz TA. Myocardial protection conferred by electromagnetic fields. Circulation 1999;99:813-16.
4. Shahbazi P, Maleknia N. General biochemistry.17th Ed. Tehran: Tehran University Press; 1999. [In Persian]
5. Shareef S, Samada A, Arthur H. Isoforms of No synthase in the optic Nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. Meufeld Ivestigative Pthalonlmoy and Visual Science 1999;40:2884-91.
6. Kanno S, Lee PC. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by super induction of inducible NO synthase. American Heart Association, Inc. 2000.
7. Mauricette V, Pexieder T. Normal stages of cardiac organogenesis in the mouse: I, Development of the external shape of the heart. Am J Anat 1989;184:101-13.
8. Parivar K, Mohseni Kouchesfahani H. Atlas of embryology and experimental embryology. Tehran: Jahad Daneshgahi Press; 1993. [In Persian]
9. Fishman MC, Chien KR. Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. Development 1997;124:2099-117.
10. Mohseni Kouchesfahani H, Parivar K. General histological, embryological and zoological microtechniques. Tehran: Alhosein Press; 1999. [In Persian]
11. Wildenthal K. Factors promoting the survival and beating of intact fetal mouse hearts in organ culture. J Mol Cell Cardiol 1970;1:101-106.
12. Wildenathal K. Long-term maintenance of spontaneously beating mouse hearts in organ culture. J Appl physiol 1971;30:23-30.
13. Wildenthal K. Studies of isolated fetal mouse hearts in organ culture. J Clin Invest 1972;51:87-99.

14. Deruiter MC, Poelmann RE, Vanderplasdevies I, Mentink MMT, Gittenbergerdegroot AC. The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos-fusion of two heart tubes? Anat Embryol 1992;185:401-73.

15. Porter GAJ, Rivkess SA. Ontogeny of humoral heart rate regulation in the embryonic mouse. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001;281:R401-407.

16. Cieslar G, Sieron A, Turczynski B, Adamek M, Jaskolski F. The influence of extremely low-frequency variable magnetic fields on rheologic and dielectric properties of blood and the water electrolyte balance in experimental animals. Bielectrochemistry and Bioenergetics 1994;35:29-32.

17. Wohlrab J, Siemes C, Marsch WC. The influence of L-Arginine on the regulation of epidermal Arginase. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2002;15:44-54.

18. Massion PB, Moniotte S, Balligand JL. Nitric oxide: does it play a role in the heart of the critically ill? Curr Opin Crit Care 2001;7:323-36.

19. Cotton JM, Kearney MT, MacCarthy PA, Grocott-Mason RM, McClean DR, Heymes C, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on Basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. Circulation. 2001 Nov 6;104(19):2318-23.