

بررسی اثر امواج غیر یونیزان با فرکانس پایین بر بیان پروتئین‌های سلول فیبروبلاست انسانی

سمانه السادات سیدی^۱، مصطفی رضایی طاویرانی^{۲*}، مسین مزدارانی^۳

۱. کارشناس ارشد بیولوژی سلولی-مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه خاتم الانبیا
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

سابقه و هدف: با پیشرفت تکنولوژی و ساخت دستگاه‌های جدید الکتریکی، بشر روزانه تحت تاثیر امواج الکترومغناطیس با فرکانس بسیار پایین قرار می‌گیرد. یکی از دستگاه‌هایی که با امواج الکترومغناطیس با فرکانس پایین کار می‌کند، تحریک‌کننده مغناطیسی مغز است. محققین از تحریکات مغناطیسی برای درمان بیماری‌هایی چون افسردگی و اسکیزوفرنی استفاده می‌کنند. اخیراً "بررسی‌هایی با هدف تعیین اثرات جانبی امواج الکترومغناطیسی کم فرکانس بر بخش‌های مختلف بدن انسان انجام گرفته و این تحقیق در ادامه این سری مطالعات طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های فیبروبلاست انسانی در معرض امواج الکترومغناطیس (فرکانس ۳ هرتز و شدت ۴ میلی‌تسلا به مدت ۳ ساعت) قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت پروتئین‌های تام سلول‌ها استخراج گردید. پروتئین‌های استخراج شده، با استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی بر روی ژل الکتروفورز تفکیک و با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند. با مقایسه ژل‌های نمونه تحت تابش و کنترل، پروتئین‌هایی که بیان آنها بطور معنی‌داری تغییر نموده تعیین و با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی و نرم‌افزارهای مربوطه برخی از این پروتئین‌ها شناسایی گردیدند.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده نشان می‌دهد امواج الکترومغناطیس با فرکانس فوق‌العاده پایین می‌توانند منجر به توقف در بیان پروتئین آپولیپوپروتئین A و تولید پروتئین یوبیکیتین در سلول‌های فیبروبلاست انسانی شوند.

نتیجه‌گیری: با توجه به تغییر بیان برخی از پروتئین‌ها در سلول‌های تحت تابش ممکن است تابش امواج الکترومغناطیس با فرکانس پایین با کاربرد درمانی دارای اثرات جانبی باشد. بنابراین استفاده از آنها مستلزم انجام مطالعات بیشتری است.

واژگان کلیدی: سلول‌های فیبروبلاست انسانی، امواج الکترومغناطیس با فرکانس فوق‌العاده پایین، یوبیکیتین، آپولیپوپروتئین A.

مقدمه

تحقیقات نشان می‌دهد که تحریکات مغناطیسی به عنوان وسیله‌ای مناسب برای بررسی تحریک‌پذیری کورتکس، ارتباطات کورتیکال، فعالیت‌های شناختی و وضعیت بیماری بکار می‌رود. برخی از محققین نیز از تحریکات مغناطیسی برای درمان بیماری‌هایی چون افسردگی و اسکیزوفرنی استفاده می‌کنند.

به دنبال پیشرفتهای تکنولوژیک و ساخت دستگاه‌های جدید و حضور گسترده‌تر این امواج بر بدن انسان، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تاثیر این امواج روی سیستم‌های زیستی صورت گرفت (۴-۶). یک سری از تحقیقات در این زمینه در شرایط *in vitro* روی رده‌های مختلف سلولی انجام شده است. در مطالعات *in vitro* چون شرایط تابش کاملاً تعریف شده است،

با استفاده روزافزون از وسایل الکتریکی، بشر تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس با فرکانس فوق‌العاده پایین قرار می‌گیرد. در این میان، برخی از وسایل الکتریکی که با امواج الکترومغناطیس با فرکانس پایین کار می‌کنند، جنبه درمانی دارند (۱-۳). بعنوان مثال تحریک‌کننده مغناطیسی مغز (repetitive Transcranial Magnetic Stimulation = rTMS) در درمان بیماری‌های نوروسایکولوژیک استفاده می‌شود.

*نویسنده مسئول مکاتبات: مصطفی رضایی طاویرانی؛ تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس؛ پست الکترونیک: rezaie.tavirani@ibb.ut.ac.ir

نمودیم. پس از لیز کامل و خارج ساختن لیز سلولی و ریختن آن در ویال، به مدت ده دقیقه سانتیفریوژ با سرعت ده هزار دور در دقیقه انجام گرفت. محلول رویی شامل پروتئینهای محلول در اوره می باشد.

برای ساختن ژل بعد اول الکتروفورزی، مخلوطی حاوی ۴/۲ درصد اکریل آمید، ۰/۲۲ درصد بیس آکریل آمید، ۸/۵ مولار اوره، ۰/۲۷ درصد NP40، ۵ درصد سوکروز و ۶ درصد آمفولین تهیه شد و APS و TEMED به میزان ۰/۰۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط فوق الذکر به لوله های مخصوص الکتروفورز با قطر داخلی ۱/۲ میلی لیتر اضافه و تا ارتفاع ۱۴ سانتیمتر پر شد، آنگاه به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا پلیمریزاسیون ژل در درون لوله انجام گیرد. سپس لوله ها در تانک الکتروفورز قرار داده شد و پس از اضافه نمودن ۱۰ μl بافر پوشاننده (overlay) (شامل ۸ مولار اوره، آمفولین ۱ درصد با محدوده pH ۳/۵-۱۰) به فضای بالایی لوله ها، بافرهای پایین (محلول آنولیت: اسید فسفریک ۰/۰۱ مولار) و بالائی (محلول کاتولیت: هیدروکسید سدیم ۰/۰۲ مولار که به مدت طولانی دی گاز شده) به تانک اضافه شدند. فضای انتهایی لوله ها توسط بافر بالایی پر شد. دستگاه به منبع تغذیه متصل و به مدت ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه با ولتاژهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ عمل prerunning صورت گرفت.

بعد دوم الکتروفورزی شامل ژل جداکننده (resolving)، پلی آکریل آمید با غلظت ۱۲ درصد، تریس- باز یا تریس-اسید کلریدریک ۱/۵ مولار با pH حدود ۸/۸، ۰/۴ درصد SDS و ۰/۸۴ درصد TEMED بود. این محلول باید به خوبی دی گاز شود. سپس به آن ۰/۳۶ درصد از محلول ذخیره ۱۰ درصد آمونیوم پرسولفات اضافه شد. پس از مخلوط کردن به آرامی به داخل قالب شیشه ای ریخته و روی آن به آرامی توسط سمپلر مقدار کمی ایزوبوتانول اضافه شد. پس از مدت زمان حدود بیست دقیقه که ژل پلیمریزه می شود ایزوبوتانول را از روی ژل پاک کرده و روی ژل با آب مقطر شستشو داده شد. سپس ژل stacking اضافه شد. ژل stacking شامل پلی آکریل آمید ۴/۸ درصد (از محلول ذخیره ۳۰ درصد آکریل آمید به علاوه بیس آکریل آمید با نسبت ۲۹/۲ درصد به ۰/۸ درصد)، تریس باز یا تریس اسید کلریدریک ۰/۵ مولار با pH حدود ۶/۸ و ۰/۴ درصد SDS، ۰/۳۴ درصد TEMED و ۰/۳۴ درصد از محلول ذخیره ۱۰ درصد آمونیوم پرسولفات بود. می توان از بخش stacking هم صرف نظر نمود و جوابی تقریباً مشابه گرفت. پس از قرار دادن ژل های بعد اول بر روی ژل های بعد دوم، به منظور اتصال دو ژل، روی ژل بعد اول با آگار ۰/۵

اثرات زیستی ناشی از این امواج را راحت تر می توان تخمین زد (۳، ۷، ۸). بنابراین مطالعات گسترده ای روی رده های سلولی مختلف که تحت تابش این امواج بودند، صورت گرفت. تحقیقات نشان می دهد این امواج می توانند با اثرات genotoxic، اختلال در تکثیر و تمایز سلولی، آپوپتوزیس و تغییر در بیان ژن و پروتئین همراه باشند. اثرات genotoxic ناشی از امواج الکترومغناطیس با فرکانس فوق العاده پایین می تواند شکست در DNA تکرشته ای یا دورشته ای، ناهنجاریهای کروموزومی و در برخی موارد تشکیل هسته های کوچک را به همراه داشته باشد. ایجاد این تغییرات بستگی به نوع سلول، نحوه تابش (متناوب یا پیوسته)، زمان و دوز تابش دارد (۹، ۱۰). یکی از سلول های حساس به امواج الکترومغناطیس با فرکانس فوق العاده پایین، فیبروبلاست انسانی است.

یکی از روشهای مناسب برای بررسی بیان پروتئین تکنیک پروتئومیک است. در این تکنیک، الکتروفورز دوبعدی (2DE) به عنوان یکی از بهترین گزینه ها برای مطالعه مخلوطهای پیچیده پروتئینی مطرح است. دلیل این امر وجود ویژگی استثنایی الکتروفورز دوبعدی در جداسازی همزمان چندین هزار پروتئین و به دنبال آن امکان آشکارسازی و مقایسه کمی پروتئین های جدا شده با حساسیت بالا است (۱۱-۱۳). در این مطالعه، پروتئوم سلول های فیبروبلاست تحت تابش و سلول های فیبروبلاست نرمال با یکدیگر مقایسه شده است تا تاثیر امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز و شدت ۴ میلی تسلا روی بیان پروتئین بررسی شود.

مواد و روش ها

سلول های فیبروبلاست به داخل ظرف کشت حاوی ۴/۵ میلی لیتر محیط کشت شامل RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ال-گلوتامین به میزان ۲ میلی مولار، پنی سیلین (۱۰۰ IU/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ μg/ml) اضافه شدند. ظرف کشت در دمای ۳۷°C در انکوباتور با جریان CO₂ ۵٪ قرار داده شد. سپس سلول ها به مدت ۳ ساعت تحت تاثیر امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز و شدت ۴ میلی تسلا قرار داده شدند. دما در طول تابش کنترل شده و تغییرات دما در این مدت زمان بیشتر و کمتر از ۰/۳°C نبود. ۲۴ ساعت پس از تابش، محیط کشت را خالی نموده، سلول ها را با محلول بافر فسفات ۰/۵X شستشو داده و محلول لیز (اوره ۷ مولار، تیواوره ۲ مولار، CHAPS ۰/۴ درصد، DTT ۰/۳-۰/۲ درصد و آمفولین ۱-۲ درصد) را به سلول ها اضافه

مربوط به پروتئین یوبیکیتین و آپولیپوپروتئین A است. با استفاده از نرم‌افزار Bionumerics مشخص شد حجم آپولیپوپروتئین A که در سلول‌های کنترل ۴۵۰۷ بود، در سلول‌های مورد تابش به صفر رسیده است، در حالی که حجم یوبیکیتین که در سلول‌های کنترل مشاهده نشده بود، در سلول‌های مورد آزمایش به ۱۲۲۹ رسید. در شکل ۱ نقاط مربوط به این دو پروتئین مشخص شده است. حتی با چشم می‌توان عدم بیان پروتئین آپولیپوپروتئین A و حضور پروتئین یوبیکوتینین را در سلول‌های مورد تابش مشاهده کرد.

بحث

نتایج نشان داد امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز تأثیری در مورفولوژی سلول‌ها ندارند در حالی که این امواج قادرند بیان پروتئین را در سلول‌های فیبروبلاست مورد تابش تغییر دهند.

برای مطالعه تغییر بیان پروتئین از تکنیک پروتئومیک استفاده می‌شود. در این تکنیک الکتروفورز دوبعدی یکی از بهترین روشها برای مطالعه مخلوط پروتئین‌های پیچیده است. در این روش پروتئین‌ها بر اساس دو ویژگی مستقل یعنی بار (در بعد اول) و اندازه (در بعد دوم) از هم جدا می‌شوند.

با کمک نرم‌افزار فلیکر مشخص شد که این نقاط مربوط به پروتئین یوبیکیتین و آپولیپوپروتئین A است. با استفاده از نرم‌افزار Bionumerics مشخص شد که حجم آپولیپوپروتئین A که در سلول‌های کنترل مقدارش ۴۵۰۷ بود، در سلول‌های مورد تابش به صفر رسید در حالی که حجم یوبیکیتین که در سلول‌های کنترل مشاهده نشده بود، در سلول‌های مورد آزمایش به ۱۲۲۹ رسید.

یوبیکوتینین پروتئینی است با ۷۶ اسیدآمینه و وزن ۸/۵ کیلو

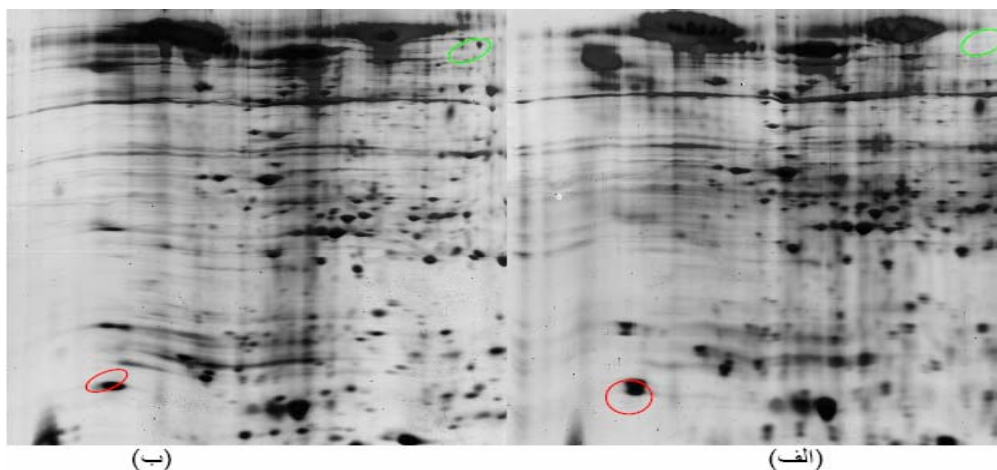
درصد پوشانده شد. سپس قالبهای شیشه‌ای حاوی ژل‌ها در تانک الکتروفورز قرار داده شد و بافر تانک الکتروفورز که شامل تریس با ۲۵ میلی‌مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی‌مولار و ۰/۱ درصد SDS می‌باشد به تانک بالا و پائین اضافه شد. در نهایت پس از برقراری جریان، الکتروفورز در جریان ثابت ۲۰ الی ۲۵ میلی‌آمپر برای هر پلیت و با استفاده از سیستم خنک‌کننده در دمای ۹ درجه سانتیگراد انجام گرفت. بعد از فیکساتیو، ژل‌ها توسط نیترات نقره رنگ شدند.

یافته‌ها

جهت مقایسه بیان پروتئین در سلول‌های تحت تابش و سلول‌های کنترل از تکنیک ژل الکتروفورز دوبعدی استفاده شد. مقایسه ژل‌های مرتبط به سلول‌های تحت تابش و کنترل نشان می‌دهد که سطح بیان پروتئین‌های یوبیکیتین و آپولیپوپروتئین A در سلول‌های مورد تابش تغییر کرده است (شکل ۱، دو نقطه که توسط پیکان و دایره بر روی ژل‌ها نشان داده شده است).

در شکل ۱، بیان برخی از پروتئین‌ها در سلول‌های مورد تابش نسبت به سلول‌های کنترل تغییر یافته است. برای آنالیز مقایسه‌ای ژل‌های دو بعدی پروتئینی، ردیابی و تعیین کمیت پروتئین‌ها از نرم‌افزارهای Flicker و Bionumerics استفاده می‌شود. با استفاده از نرم‌افزار فلیکر می‌توان نقاط موجود بر روی ژل الکتروفورز ۲ بعدی را از نظر کیفی بررسی کرد. همچنین با کمک نرم‌افزار Bionumerics نقاط پروتئینی بصورت کمی مقایسه می‌شوند و میزان بیان نقاط پروتئینی موجود در ژل‌های سلول مورد آزمایش و ژل‌های کنترل بدست می‌آید.

در اینجا با کمک نرم‌افزار فلیکر مشخص شد که این نقاط



شکل ۱- تغییر بیان پروتئین با استفاده از الکتروفورز دوبعدی در گروه کنترل (الف) و تحت تابش (ب)

تخمندان کاهش می‌یابد و حتی از کاهش این پروتئین بعنوان بیومارکر در تشخیص این سرطانها استفاده می‌شود (۲۱-۱۹). همانطور که شرح داده شد امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز و شدت ۴ میلی‌تسلا با عدم بیان آپولیپوپروتئین A و حضور یوبیکوتینین همراه است که این حالت نیز به نوبه خود می‌تواند با بیماریهایی دیگری همراه باشد.

با توجه به اینکه از تحریک مغناطیسی مغز برای درمان بیماریهایی چون اسکیزوفرنی، افسردگی و حتی پارکینسون استفاده می‌شود (۲۴-۲۲)، ممکن امواج ساطع شده از این دستگاه دارای اثرات جانبی روی بیماران باشد. بنابراین نیاز است که مطالعات گسترده‌تری در زمینه تاثیر این امواج بر روی بدن انسان صورت گیرد تا اثرات جانبی ناشی از تابش این امواج شناسایی شود.

نتیجه‌گیری

امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز و شدت ۴ میلی‌تسلا با عدم بیان آپولیپوپروتئین A و حضور یوبیکوتینین همراه است. بنابراین امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز تاثیری در مورفولوژی سلول‌ها ندارند در حالی که این امواج قادرند بیان پروتئین را در سلول‌های فیبروبلاست مورد تابش تغییر دهند.

دالتون. این پروتئین‌های کوچک به پروتئین‌هایی که قرار است تجزیه شوند، متصل می‌شوند بدین صورت که پروتئین مورد نظر با اتصال کووالان به پروتئین‌های کوچک یوبیکیتین، از حالت تاخورده درآمده و به پروتئین‌های دناتوره تبدیل می‌شوند. این پروتئین‌های باز شده وارد سیستم پروتئوزوم شده و به پپتیدهای کوچک تبدیل می‌شوند (۱۶-۱۴). یوبیکوتینین پروتئینی است که در پیری نقش دارد. تحقیقات نشان می‌دهد که میزان بیان این پروتئین در هنگام پیری در سلول‌های فیبروبلاست و سلول‌های عدسی چشم افزایش می‌یابد (۱۷).

آپولیپوپروتئین A، ۶۰ تا ۷۰ درصد پروتئین‌های HDL را تشکیل می‌دهد. HDL وظیفه انتقال لیپیدهایی را عهده‌دار است که در بافت غیرکبدی تولید می‌شوند. در طول انتقال کلسترول‌های HDL توسط آنزیمی بنام LCAT آسیله می‌شوند. آپولیپوپروتئین A فعال‌کننده این آنزیم است. کاهش سطح آپولیپوپروتئین A باعث کاهش مقدار HDL می‌شود. همچنین کاهش سطح کلسترول HDL با افزایش خطر ابتلا به بیماریهایی قلبی و عروقی همراه است (۱۸).

در تحقیقات دیگر نشان داده شده است که مقدار بیان آپولیپوپروتئین A در سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد. بعنوان مثال مقدار این آپولیپوپروتئین در سرطانهای معده و

REFERENCES

1. Narita WKK, Hanakawa K, Kasahara T, Hisamitsu T, Asano K. Induction of apoptotic cell death in human leukemic cell line, HL-60, by extremely low frequency electric magnetic fields: analysis of the possible mechanisms in vitro. In Vivo 1997;11:329-36.
2. Ruiz Go'mez MJ. 25 Hz electromagnetic field exposure has no effect on cell cycle distribution and apoptosis in U-937 and HCA-2r1cch cells. Bioelectrochemistry 2000;53:137-40.
3. Mairs RJ, Hughes K, Fitzsimmons S, Prise KM, Livingstone A, Wilson L, et al. Microsatellite analysis for determination of the mutagenicity of extremely low-frequency electromagnetic fields and ionising radiation in vitro. Mutat Res 2007;626(1-2):34-41.
4. Winker R, Ivancsits S, Pilger A, Adlkofer f, Rudiger HW. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. Mutat Res 2005;58(5):43-49.
5. McCann J, Dietrich F, Rafferty C, Martin AO. A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields. Mutat Res 1993;297(1):61-95.
6. Moulder JE. Power-frequency fields and cancer. Crit Rev Biomed Eng 1998;26(1-2):1-116.
7. Crumpton MJ, Collins AR. Are environmental electromagnetic fields genotoxic? DNA Repair 2004;3(10):1385-7.
8. Vijayalaxmi, Obe G. Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation: a review and future research recommendations. Bioelectromagnetics 2005;26(5):412-30.
9. Ivancsits S, Diem E, Jahn O, Rudiger HW. Intermittent extremely low frequency electromagnetic fields cause DNA damage in a dose-dependent way. Int Arch Occup Environ Health 2003;76(6):431-6.
10. Ivancsits S, Diem E, Jahn O, Rüdiger HW. Age-related effects on induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to electromagnetic fields. Mech Ageing Dev 2003;124(7):847-50.

11. Hahn GM, van Kersen I. Isolation and initial characterization of thermoresistant RIF tumor cell strains. *Cancer Res* 1988;48(7):1803-7.
12. Nooter K, Stoter G. Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Pathol Res Pract* 1996; 192:768-80.
13. Moscow JA, Cowan KH. Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:14-20.
14. Hu M, Li P, Li M, Li W, Yao T, Wu JW, et al. Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* 2002;111:1041-54.
15. Ciechanover A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins in health and disease. *Hepatology* 2002;35(1):3-6.
16. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Cell Mol Biol* 2002;2:169-79.
17. Pallarés-Trujillo J, Agell N, García-Martínez C, López-Soriano FJ, Argilés JM. The ubiquitin system: a role in disease? *Med Res Rev* 1997;17(2):139-61.
18. Phillips JC, Wriggers W, Li Z, Jonas A, Schulten K. Predicting the structure of apolipoprotein A-I in reconstituted high density lipoprotein disks. *Biophys J* 1997;73:2337-46.
19. Huang HL, Stasyk T, Morandell S, Dieplinger H, Falkensammer G, Griesmacher A, et al. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/ MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays *Electrophoresis* 2006;27(8):1641-50.
20. Kozak KR, Su F, Whitelegge JP, Faull K, Reddy S, Farias-Eisner R. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 2005;5(17):4589-96.
21. Ryu JW, Kim HJ, Lee YS, Myong NH, Hwang CH, Lee GS, et al. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2003;18:505-9.
22. Loo CK, Mitchell PB. A review of the efficacy of transcranial magnetic stimulation (TMS) treatment for depression, and current and future strategies to optimize efficacy. *J Affect Disord* 2005;88:255-67.
23. Aare T, Dahl AA, Johansen JB, Kjonniksen I, Neckelman D. Efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation in depression: a review of the evidence. *Nordic J Psychiatry* 2003;57(3):227-32.
24. Berman RM, Narasimhan M, Sanacora G, Miano AP, Hoffman RE, Hu XS, et al. A randomized clinical trial of repetitive transcranial magnetic stimulation in the treatment of major depression. *Biol Psychiatry* 2000;47:332-37.