پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال چهاردهم، شماره ۴، پی در پی ۷۰، صفحات ۱۷۳ تا ۱۷۷
مهر و آبان ۱۳۸۸

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۳/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۶/۲۶

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

سمانه‌السادات سیدی[1]، مصطفی رضایی طاویرانی[2*]، حسین مزدارانی[3]

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. اخیرا" 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

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 (۳-۱). بعنوان مثال تحریک‌کننده مغناطیسی مغز (repetitive Transcranial Magnetic Stimulation = rTMS) در درمان بیماریهای نوروسایکولوژیک استفاده می‌شود. 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.

به‌دنبال 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 (۶-۴). 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 کاملا تعریف شده است،

*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

اثرات زیستی ناشی از این امواج را راحت‌تر می‌توان تخمین زد (۳،۷،۸). بنابراین مطالعات گسترده‌ای روی رده‌های سلولی مختلف که تحت تابش این امواج بودند، صورت گرفت. تحقیقات نشان می‌دهد این امواج می‌توانند 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 فوق‌العاده پایین می‌تواند شکست در DNA تک‌رشته‌ای یا دورشته‌ای، ناهنجاریهای کروموزومی و در برخی موارد تشکیل هسته‌های 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 سلول‌های حساس به امواج الکترومغناطیس با فرکانس فوق‌العاده 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 گزینه‌ها 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 پروتئین‌های جدا شده با حساسیت بالا است (۱۳-۱۱).

در این مطالعه، پروتئوم سلول‌های فیبروبلاست تحت تابش و سلول‌های فیبروبلاست نرمال با یکدیگر مقایسه شده است تا تاثیر امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز و شدت ۴ میلی‌تسلا روی بیان پروتئین بررسی شود.

مواد و روش‌ها

سلول‌های فیبروبلاست به داخل ظرف کشت حاوی ۴/۵ میلی‌لیتر محیط کشت شامل RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ال-گلوتامین به میزان ۲ میلی‌مولار، پنی‌سیلین (۱۰۰IU/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰µg/ml) اضافه شدند. ظرف کشت در دمای ۳۷°C در انکوباتور با جریان ۵٪ CO_2 قرار داده شد. سپس سلول‌ها به مدت ۳ ساعت تحت تاثیر امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز و شدت ۴ میلی‌تسلا قرار داده شدند. دما در طول تابش کنترل شده و تغییرات دما در این مدت زمان بیشتر و کمتر از۰/۳°C نبود.

۲۴ ساعت پس از تابش، محیط کشت را خالی نموده، سلول‌ها را با محلول بافر فسفات ۰/۵X شستشو داده و محلول لیز (اوره ۷ مولار، تیواوره ۲ مولار، CHAPS ۰/۴درصد، DTT ۰/۳-۰/۲ درصد و آمفولین ۲-۱ درصد) را به سلول‌ها اضافه نمودیم. پس از لیز کامل و خارج ساختن لیز سلولی و ریختن آن در ویال، به مدت ده دقیقه سانتریفوژ با سرعت ده هزار دور در دقیقه انجام گرفت. محلول رویی شامل پروتئین‌های محلول در اوره می‌باشد.

برای ساختن ژل بعد اول الکتروفورزی، مخلوطی حاوی ۴/۲ درصد اکریل آمید، ۰/۲۲ درصد بیس‌آکریل 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 فوق‌الذکر به لوله‌های مخصوص الکتروفورز با قطر داخلی ۱/۲ میلی‌لیتر 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 لوله‌ها در تانک الکتروفورز قرار داده شد و پس از اضافه نمودن ۱۰µl بافر پوشاننده (overlay) (شامل ۸ مولار اوره، آمفولین ۱ درصد با محدوده pH ۱۰-۳/۵) به فضای بالایی لوله‌ها، 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 لوله‌ها 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 preruning صورت گرفت.

بعد دوم الکتروفورزی شامل ژل جداکننده (resolving)، پلی‌آکریل آمید با غلظت ۱۲ درصد، تریس- باز یا تریس-اسید کلریدریک ۱/۵ مولار با pH حدود ۸/۸، ۰/۴درصد SDS و ۰/۸۴درصد TEMED بود. این محلول باید به خوبی دی گاز شود. سپس به آن ۰/۳۶درصد از محلول ذخیره ۱۰ درصد آمونیوم‌پرسولفات اضافه شد. پس از مخلوط کردن به آرامی به داخل قالب شیشه‌ای ریخته و روی آن به آرامی توسط سمپلر مقدار کمی ایزوبوتانول اضافه شد. پس از مدت زمان حدود بیست دقیقه که ژل پلیمریزه می‌شود ایزوبوتانول را از روی ژل پاک کرده و روی ژل با آب مقطر شستشو داده شد. سپس ژل stacking اضافه شد. ژلstacking شامل پلی‌آکریل‌آمید ۴/۸ درصد (از محلول ذخیره ۳۰ درصد آکریل‌آمید به علاوه بیس‌آکریل‌آمید با نسبت ۲۹/۲ درصد به ۰/۸ درصد)، تریس‌باز یا تریس‌اسیدکلریدریک 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 آمونیوم‌پرسولفات بود. می‌توان از بخش stacking هم صرفنظر نمود و جوابی تقریباً مشابه گرفت. پس از قرار دادن ژل‌های بعد اول بر روی ژل‌های بعد دوم، به منظور اتصال دو ژل، روی ژل بعد اول با آگار ۰/۵

درصد پوشانده شد. سپس قالبهای شیشه‌ای حاوی ژل‌ها در تانک الکتروفورز قرار داده شد و بافر تانک الکتروفورز که شامل تریس‌باز 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 تکنینک 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 باکمک 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 مربوط به پروتئین یوبیکیتین و آپولیپوپروتئین A است. با استفاده از نرم‌افزار Bionumerics مشخص شد حجم آپولیپوپروتئین A که درسلول‌های کنترل ۴۵۰۷ بود، درسلول‌های مورد تابش به صفر رسیده است، در حالی‌که 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.

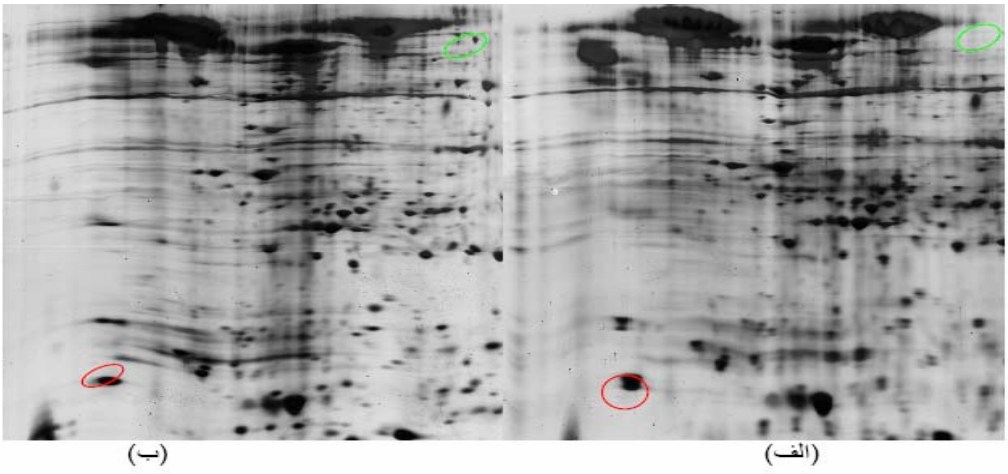
بحث

نتایج نشان داد امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳ هرتز تاثیری در مورفولوژی سلول‌ها ندارند در حالی‌که 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 حالی‌که حجم یوبیکیتین که در سلول‌های کنترل مشاهده نشده بود، در سلول‌های مورد آزمایش به ۱۲۲۹رسید.

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



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

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 تخمدان 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 حالی‌که این امواج قادرند بیان پروتئین را در سلول‌های فیبروبلاست مورد تابش تغییر دهند.

REFERENCES

1. Narita WXK, 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. Biophysic 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.