

درمان بیورزونانس آرتریت روماتوئید^۱ و پروتئین‌های گرماشوک^۲ (HSP)

بی. آی. اسلاموف^۳، وی. آ. فونتیکوف^۴، آر. وی. بوبروفسکی^۵ و یو. وی. گوتوفسکی^۶

چکیده

درمان بیورزونانس، سنتز پروتئین در لنفوسیت‌های مبتلایان به آرتریت روماتوئید را که تا ۶۰٪ کاهش یافته بود عادی سازی کرد، سنتز مختل شده پروتئین‌های گرماشوک در زمان استراحت (پروتئین‌های ۷۳ و ۶۵ kD) و پس از القای شوک گرمایی (به ترتیب ۱۲۰، ۸۷، ۷۳ و ۷۲، ۶۵، ۵۵، ۳۲) را اصلاح کرد و در مقایسه با افراد سالم، سطوح بالای پروتئین‌های ۷۰ و ۳۲ kD را فراهم آورد. این تصور می‌رود که تأثیرات درمانی بیورزونانس تا اندازه‌ای به دلیل بازسازی فعالیت عملکردی لنفوسیت‌ها باشد که به‌نوبه‌خود ناشی از عادی شدن سنتز پروتئین‌های گرماشوک است.

واژگان کلیدی: آرتریت روماتوئید، درمان بیورزونانس، پروتئین گرماشوک،

¹ Rheumatoid arthritis

² Heat Shock Proteins

³ B. I. Islamov

⁴ V. A. Funtikov

⁵ R. V. Bobrovskii

⁶ Yu. V. Gotovskii

مقدمه

علیرغم وجود مطالعات بی‌شمار، نقش پروتئین‌های استرس در ایجاد و آسیب‌زایی آرتریت روماتوئید (RA) همچنان نامشخص باقی مانده است [۱۰]. مدلسازی‌های آزمایشی آرتریت روماتوئید در حیوانات حاکی از نقش کلیدی پروتئین‌های گرماشوگ (HSP) عضو خانواده ۶۰ kD (HSP60) در آغاز پروسه‌های خودایمنی بوده‌اند [۶، ۷]. با این وجود، بررسی سلول‌های خونی پیرامونی، سرم و محتویات مایع سینوویال نشان‌دهنده حضور کلنی‌های لنفوسیت‌های T خودواکنش‌دهنده و اتوآنتی‌بادی برعلیه HSP60 در برخی افراد سالم بودند [۸] و همین موضوع باعث شد تردیدهایی در مورد نقش خاص پروتئین‌های استرس در آغاز این بیماری بوجود بیایند. پژوهش‌های آزمایشگاهی پیشین [۳] نشان دادند که در طی بیماری آرتریت روماتوئید، بازدارندگی سنتز برخی HSP ها (۹۵، ۱۲۰ kD، ۷۰ و ۶۵) در لنفوسیت‌ها صورت می‌پذیرد؛ این بازدارندگی به مدت و شدت بیماری بستگی دارد. بازدارندگی سنتز مشابهی نیز برای تمامی پروتئین‌های لنفوسیتی مشاهده شد که حاکی از وجود نابسامانی غیراختصاصی در سنتز پروتئین‌های گرماشوگ در طی بیماری آرتریت روماتوئید و همچنین نشانگر اختلال کلی سلول‌های ایمنی به همراه اختلالات محافظت غیراختصاصی برعلیه فاکتورهای آسیب‌رسان آرتریت روماتوئید -بویژه هیپوکسی، کمپلکس‌های ایمنی و غیره- بود.

در مطالعه پیش‌رو، سنتز پروتئین در لنفوسیت‌های مبتلایان به آرتریت روماتوئید که درمان بیورزونانس (BRT) را بصورت روتین و جهت از بین بردن اختلالات انرژی سیستم مریدین‌ها دریافت کرده‌اند مورد بررسی قرار گرفته است. دستگاه بیورزونانس مورد

استفاده ما، در مرکز IMEDIA در سال ۱۹۹۳ ساخته شده بود [۲]. درمان با استفاده از امواج الکترومغناطیسی در دامنه فرکانس $10-500000 \text{ Hz}$ صورت پذیرفت. ارتعاشات ثبت شده از پوست بیمار پردازش شده و برای درمان بکار گرفته شدند [۱]. در طی درمان، بیمار و دستگاه یک مدار بسته با تنظیم آدپتوری را تشکیل می‌دادند که ظرفیت‌های ارگانیسم برای بازسازی هوموستاز فیزیولوژیکی را تقویت می‌کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش شش بیمار بین سنین ۳۳ تا ۵۰ سال دارای ۱۰-۱۵ سال سابقه آرتریت روماتوئید مورد بررسی قرار گرفتند. پیش از دوره بیورزونانس، نقاط زیست فعالی که شرایط مفاصل و سیستم ایمنی را مشخص می‌کردند با استفاده از متد طب سوزنی الکتریکی فول^۷ تعیین شدند [۱]. پدیده افت شاخص در تمامی بیماران مشاهده شد.

پنج نفر از افراد متعلق به همان گروه‌های سنی که پارامترهای طب سوزنی الکتریکی آنها طبیعی (۵۰ واحد) بودند، به عنوان گروه کنترل نقش‌آفرینی کردند.

یک دوره درمان بیورزونانس شامل ۱۰-۱۵ جلسه (هر کدام ۳۰ دقیقه)، تحت کنترل پارامترهای طب سوزنی انجام پذیرفتند؛ به این صورت هر جلسه پس از نرمال شدن پارامترها پایان می‌پذیرفت. لنفوسیت‌ها از 10 ml خون محیطی دارای هپارین با سانتریفیوژ در گرادیان ficoll Urografin (1.077 g/cm^3) برای مدت ۴۰ دقیقه در ۴۰۰ دور جداسازی شدند. سلول‌ها دوبار در بافر فسفات دالبکو^۸ (سیگما) شستشو شده و سپس به همراه ماده PRMI-164 (سیگما) در ۴۰۰ دور برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. لنفوسیت‌هایی که به

⁷ Foll

⁸ Dulbecco phosphate buffer

این ترتیب استخراج شدند (۱۰^۶×۲ ml) در RPMI-1640 حاوی S^{۳۵}-
متیونین (۱۰ μCi/ml) با همزم ملایم انکوبه شدند (شرایط
استراحت). پس از انکوباسیون، سلول‌ها رسوب کرده و جهت
استخراج پروتئین بکار گرفته شدند.

شوک گرمایی در پروتئین‌ها با ۱۵ دقیقه گرمادهی در ۴۴°C درجه
سانتیگراد در محیط RPMI-1640 حاوی S^{۳۲}-متیونین القا شد و به
دنبال آن ۳ ساعت انکوباسیون ۳۷°C در همان محیط صورت پذیرفت.
سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو^۹ ۰/۲٪ رنگ‌آمیزی شده و
سلول‌های مرده در یک محفظه گوریائف^{۱۰} (هموسیتومتر) شمارش
شدند. میزان مرگ سلولی در تمامی مراحل جداسازی لنفوسیت‌ها و
انکوباسیون، از ۳٪ فراتر نرفت.

ترکیبات پلی‌پپتیدی پروتئین‌هایی که به تازگی [پس از دوره‌های
انکوباسیون] سنتز شده بودند با استفاده از روش الکتروفورز
در ژل پلی‌آکریل آمید^{۱۱} در حضور سدیم دودسیل سولفات^{۱۲} [۹]،
اتورادیوگرافی کمی، الکتروفورز تعدیل شده دوبعدی [۵] و
اتورادیوگرافی (برای تخمین دیداری) تحلیل شدند.

مارکرهای وزن مولکولی استاندارد برای الکتروفورز با سدیم
دودسیل سولفات (سیگما) بکار گرفته شدند. نقاط ایزوالکتریک
(pI) در الکتروفوروگرام‌ها برای پروتئین‌های مورد بررسی، با
استفاده از pI پروتئین‌های استاندارد تعیین شدند [۵].

برای تحلیل اتورادیوگرافی، ژل‌ها با کوماس^{۱۳} R-250 ۰/۲۵٪ (۵۰٪
الکل: ۷٪ استیک اسید) رنگ‌آمیزی شده و در دستگاه Gel-1

^۹ trypan blue

^{۱۰} Goryaev chamber

^{۱۱} Polyacrylamide gel

^{۱۲} sodium dodecyl sulfate

^{۱۳} Coomasse

(اوکراین) به همراه یک نوار فیلم اشعه ایکس RT-IV (اسوما^{۱۴}) برای مدت ۱۳ روز خشک شدند. نوارهای فیلم توسعه یافته، خشک شده و سپس با استفاده از یک دانسیتومتر (چگالی‌سنج) دو پرتویی (انستیتوبیوفیزیک، پوشچینو^{۱۵}) اسکن شدند. دانسیتوگرام‌ها با استفاده از یکپارچه‌ساز کروموپاتیک C-R3A (شیمادزو^{۱۶}) تحلیل شدند.

تحلیل آماری با استفاده از تست فیشر^{۱۷} صورت گرفت. نسبت میان پروتئین‌های نوسنتز دارای S^{۳۲}-متیونین (بخش زیر قله مرتبط با تست پروتئین در دانسیتوگرام) و محتوای پروتئین کل در نمونه (مجموع تمامی قله‌ها در دانسیتوگرام که با اسکن همان ژل رنگ شده با R250 کوماس بدست آمده بود) مورد تحلیل قرار گرفت. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

در مبتلایان به آرتریت روماتوئید یک بازدارندگی معنادار (میانگین ۶۰٪)، در سنتز پروتئین‌ها در لنفوسیت‌ها در آزمایشگاه مشاهده شد (تصویر a.۱). شوک گرمایی بیشتر سنتز پروتئین‌های ساختاری را سرکوب کرد (تا حدود ۳۰٪ مقدار طبیعی) و سنتز پروتئین‌های kD ۹۵، ۷۰ و ۶۵ را به دلیل القای HSP‌های مربوط به آنها افزایش داد که این مورد توسط الکتروفورز دوبعدی مشخص شد، سطح القای آنها بصورت معناداری پایین‌تر از حد نرمال بود.

¹⁴ Svema

¹⁵ Pushchino

¹⁶ Shimadzu

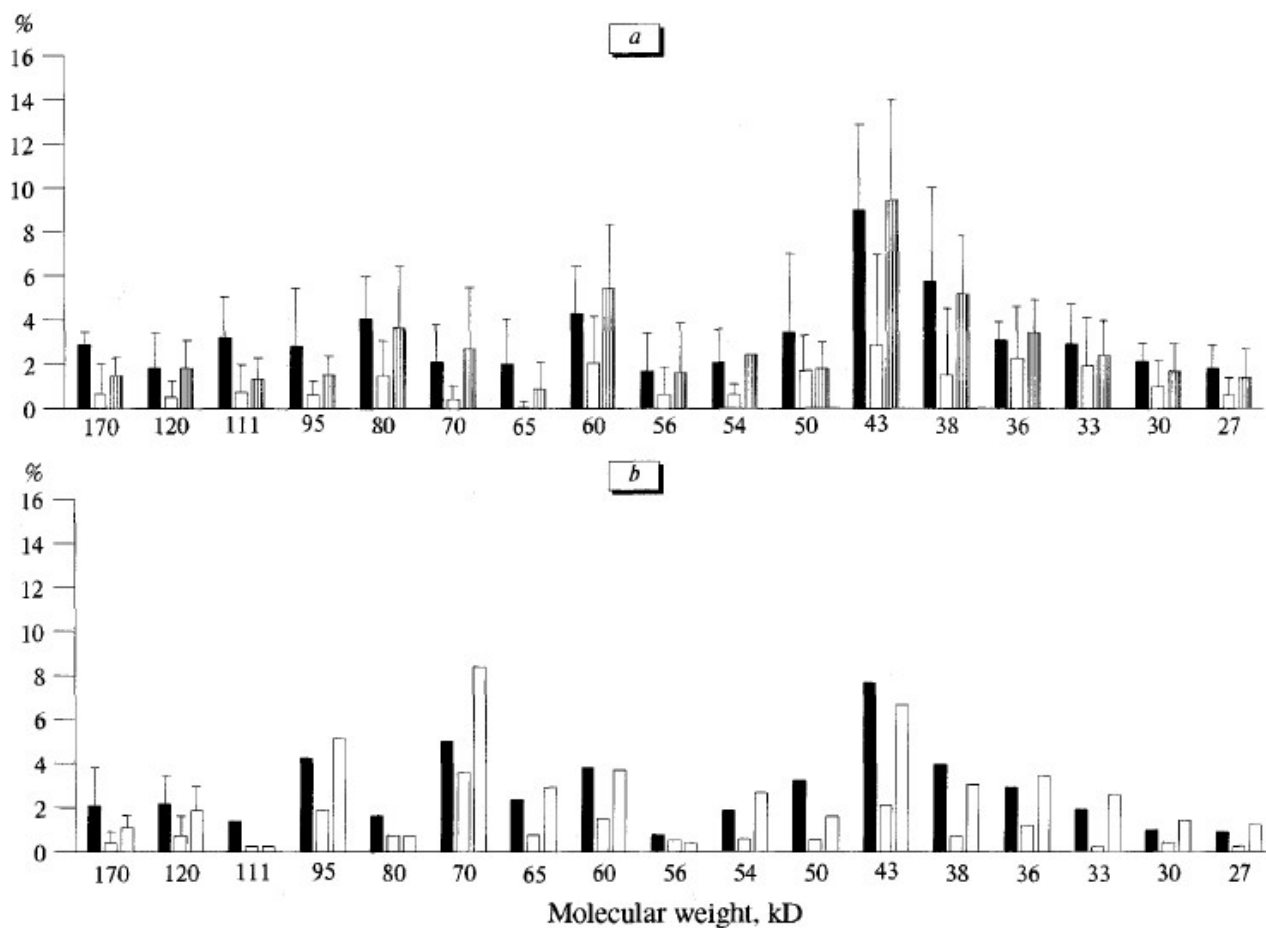
¹⁷ Fisher test.

آزمون‌های بیوشیمیایی خون حاکی از آن فعالیت بالای پروتئین واکنشدنده C (+++) و غلظت اوریک اسید ($612 \pm 31 \mu\text{mol/liter}$) و سرعت رسوب گلبول‌های قرمز (ESR، $25 \pm 12 \mu\text{mol/liter}$) زیاد بودند. پس از درمان بیورزونانس، شدت سنتز پروتئین در لنفوسیت‌های در حال استراحت مبتلایان به آرتریت روماتوئید عملاً به سطح طبیعی بازگشت (تصویر ۱)، هرچند که سنتز پروتئین‌های 120 kD ، 111 ، 95 و 50 پایین باقی ماند. شوک گرمایی (تصویر ۱، b)، سنتز پروتئین‌های 95 kD ، 70 ، 65 ، 54 و 33 را به دلیل القای HSP‌های مربوط به آنها ارتقا بخشید و این مورد در الکتروفورز دو بعدی مشخص بود (تصویر ۲). باید توجه داشت که HSP‌های 70 و 33 بصورت معناداری از سطوح طبیعی فراتر رفتند. سنتز پروتئین‌های ساختاری با ثبات‌تر بود، هرچند که از سنتز پروتئین‌های 170 kD ، 111 و 50 و پروتئین اکترین (43 kD) جلوگیری شد.

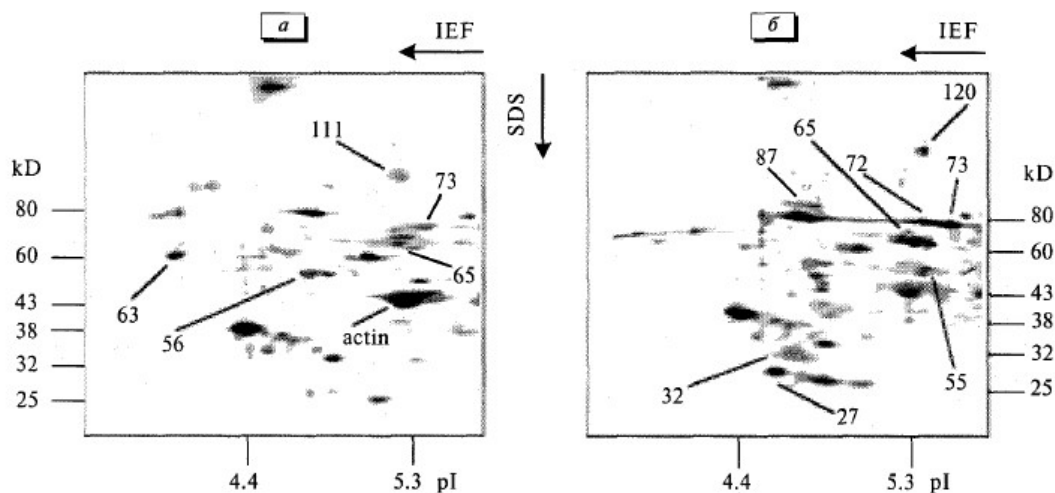
تحلیل مقایسه‌ای از سنتز پروتئین در لنفوسیت‌های در حال استراحت پیش و پس از درمان بیورزونانس (تصویر a، b) نشان داد که درمان مذکور این سنتز را به میزان دو برابر افزایش داده است. این مورد با بهبود معنادار سنتز پروتئین‌های HSP 170 kD ، 70 و 65 و پروتئین 56 (احتمالاً توبولین) و 54 kD پروتئین همراه بود. شوک گرمایی باعث القای تغییرات مشابهی شد: سنتز پروتئین‌های 80 kD ، 54 ، 50 ، 38 ، 33 ، 30 و 27 به شکل معناداری (سه برابر) پس از دوره درمان بیورزونانس افزایش یافت.

الکتروفورز دوبعدی و اتورادیوگرافی پروتئین‌های لنفوسیتی نشان دادند که پس از درمان بیورزونانس، ترکیب پلی‌پپتیدی

پروتئین‌های ساخته شده در آزمایشگاه با ترکیب پلی‌پتیدی
پروتئین‌های گروه کنترل در حالت



تصویر ۱. سنتز پروتئین اولیه (a) و القا شده در اثر شوک گرمایی (b) در لنفوسیت‌های در حال استراحت بیماران آرتریت روماتوئید ($n=6$) پیش و پس از درمان بیورزونانس در مقایسه با کنترل ($n=4$) در آزمایشگاه. محور افقی: پروتئین‌های نوسنتز/کل پروتئین‌ها. [Molecular weight = وزن مولکولی]



تصویر ۲. فلوگرام‌های دوبعدی معمولی (اسکن کامپیوتری) از ترکیب پلی‌پپتیدی پروتئین‌های سنتز شده در لنفوسیت‌های بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید پس از درمان بیورزونانس؛ در حال استراحت (a) و پس از شوک گرمایی (b). IEF: جهت تمرکز ایزوالکتریکی، SDS: جهت الکتروفورز در ژل پلی آکریل‌آمید با سدیم دودسیل سولفات، pI: نقاط ایزوالکتریک ترومپومیزین و اکتین.

استراحت و پس از شوک گرمایی هم‌خوانی دارد (تصویر ۲) [۳]. در لنفوسیت‌های در حال استراحت، سنتز پایه‌ای HSP ۷۳ و ۶۵ مشاهده شد، در حالی که شوک گرمایی به شکل قابل توجهی این سنتز را بهبود بخشید و سنتز HSP‌های ۱۲۰، ۸۷، ۷۲ و ۵۵ و همچنین پروتئین‌های ۳۳ (احتمالاً HSP ۳۲) و ۲۷ kD (به ترتیب ۴/۹ pI و ۵/۱) را القا کرد. سنتز پروتئین‌های ساختاری ۵۶- kD از خانواده توبولین، باثباتر بود. این حالت با بازدارندگی سنتز پروتئین‌های ۱۱۱ kD (pI=۵/۳)، اکتین و اسید ۶۳ kD همراه شد.

در تمامی بیماران درمان منجر به بهبود بالینی باثبات شد که به شکل نرمال شدن ESR (5 ± 0.5 mm/h)، کاهش میزان اوریک اسید

تا سطح $63 \pm 275 \mu\text{mol/liter}$ و کاهش فعالیت پروتئین واکنش‌دهنده C خود را نشان داد.

آرتریت روماتوئید با بازدارندگی سنتز پروتئین‌های ساختاری و استرسی در لنفوسیت‌ها همراه است که این موضوع حاکی از وجود اختلال در سنتز پروتئین موجود زنده است. درمان بیورزونانس با عادی‌سازی سنتز پروتئین در لنفوسیت‌ها و بهبود پارامترهای بیوشیمیایی خون، یک تاثیر تنظیم ایمنی دارد. ما تصور می‌کنیم که تاثیر درمانی بیورزونانس با بهبود مقاومت غیراختصاصی ایمنی سلولی در برابر فاکتورهای آسیب‌رسان آرتریت روماتوئید از راه عادی‌سازی سنتز پروتئین‌های گرماشوک (هیپوکسی، کمپلکس‌های ایمنی و غیره) مرتبط است. بنابراین درمان بیورزونانس سنتز پروتئین‌های HSP های ۷۳ و ۶۵ را القا و سنتز تحریک شده در اثر شوک گرمایی را در تقریبا تمامی HSP های معمول لنفوسیت‌های افراد سالم موجب شد. سنتز برخی پروتئین‌ها (پروتئین‌های گرماشوک ۷۰ kD) از سطح کنترل بالاتر رفت. درمان بیورزونانس، سنتز پروتئین‌های ساختاری به جز پروتئین‌های ۱۷۰، ۱۱۱ (pI=۵/۳) و ۵۰ kD و اکتین (۴۳ kD) را در زمان استراحت و پس از شوک گرمایی با ثبات کرد؛ با این‌حال شناخت موجود از نقش این پروتئین‌ها در آسیب‌زایی آرتریت روماتوئید بسیار کم است.

بنابراین BRT یک متد امیدوارکننده برای درمان آرتریت روماتوئید است که می‌تواند برای مدیریت این بیماری به رویکردهای درمانی موجود اضافه شود. مشخص نیست که آیا HSP هدفی مستقیم برای ارتعاشات الکترومغناطیسی فرکانس پایین [۴] که زیربنای تاثیرات BRT را تشکیل می‌دهند محسوب می‌شود یا خیر [۱]. این امکان وجود دارد که BRT از راه تنظیم سایر

عوامل فعال‌سازی سلولی (سیستم آنتی‌اکسیدانی، سیتوکین‌ها و غیره)، ژنوم سلول‌های ایمنی از جمله ژن‌های HSP را فعال می‌سازد.

منابع

1. Yu. V. Gotovskii and A. V Samokhin, *Electropuncture Diagnostics and Therapy According to R. Foll Method*, Moscow (1995).
2. Yu. V. Gotovskii, Patent No. 35, p. 144 (1996).
3. V. A. Funtikov, B. I. Islamov, R. V. Bobrovskii, and Yu. V. Gotovskii, *Dokl. Ross. Akad. Nauk.*, 364, No. 1, 126-129 (1999).
4. P. Cairo, B. Greenebaum, and E. Goodman, *J. Cell Biochem.*, 68, 1-7 (1998).
5. J. E. Celis, B. Gesser, H. H. Rasmussen, *et al.*, *Electrophoresis*, No. 11(12), 989-1071 (1990).
6. I. R. Cohen, *Adv. Intern. Med.*, 37, 295-311, (1992).
7. J. Holoshitz, A. Matitau, and I. R. Cohen, *J. Clin. Invest.*, 73, 211-215 (1984).
8. M. Jaattela and D. Wissing, *Ann. Med.*, 24, 249-258 (1992).
9. U. K. Laemmly, *Nature*, 227, 680-685 (1970).
10. J. B. Winfield and W. N. Jarjour, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 167, 161-187 (1991).