Archive of SID

مقاله پژوهشی

الگوی الکتروفورزی کلاژن جدا شده از یک جفت نابالغ و مقایسه آن با کلاژن جفت بالغ

رقیه عباسعلی پورکبیر ره *، دکتر ناصر ملک نیا **، دکتر پروین پاسالار ***

چکیده:

انواع مختلف کلاژن در داخل بدن شناسائی شده اند و در دهه اخیر جفت انسان به عنوان ماده اولیه جهت استخراج و مشخص کردن انواع مختلف ژنتیکی کلاژن شامل مولکولهای نوع I, III, IV و V توسط بسیاری از محققین مورد استفاده قرار گرفته است. جفت همچنین شامل پروتئازهایی است که در تجزیه پروتئین های ماتریکس خارج و داخل سلولی شرکت می کنند . این مطالعه با هدف مقایسه الگوی الکتروفورزی کلاژن های یک جفت نابالغ حاصل از یک سقط جنین با کلاژن جفت بالغ از یک زایمان طبیعی و ترم انجام گردید.

جهت استخراج کلاژن نوع III , I , IV ، یکبار بافت جفت طبیعی و ترم (۳۸ هفته ای) و یکبار بافت جفت نابالغ (۱٤ هفته ای) بطور جداگانه تحت هضم آنزیمی با حداقل مقدار پپسین قرار داده شد. مراحل استخراج کلاژن ها توسط الکتروفورز بر پایه ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS - PAGE) کنترل شد.

الگوی الکتروفورتیکی کلاژن جفت نابالغ نشان می دهد که تعداد باندهای کلاژن های I، III و IV جفت نابالغ کمتر از جفت کامل و ترم است. بر طبق الگوی الکتروفورزی در جفت نابالغ زنجیره(IV) α 2 ، (I) β11 ، (I) β12 ، (III) α1 وجود ندارد.

بنابراین احتمال دارد در بعضی سقط جنینهای عادتی کاهش در سنتز کلاژن و یا افزایش در تجزیه کلاژن وجود داشته باشد ، از این رو بهتر است در سقط جنینهای بی دلیل میزان کلاژن و کلاژناز اندازه گیری شود و در بارداریهای بعدی سعی شود که هیچگونه انقباض در رحم ایجاد نشود.

کلید واژه ها: الکتروفورز / جفت / کلاژن

مقدمه:

بافت همبند بافتی است که در ساختمان اعضاء بدن شرکت داشته و مسئول فرم و شکل بدن حیوانات است (۱). بافت همبند از سلولهای تخصصی یافته که مسئول شکل بافت هستند و ماتریکس خارج سلولی که ترکیب آن خواص بافت را تعیین می کند ، تشکیل شده است.

کلاژن ها که فراوانترین پروتئین بدن پستانداران هستند (۲) ، ساختمان بافت همبند را مستحکم کرده و در شکل گیری ، شیموتاکسی ، چسبندگی سلولی تجمع و پیوستگی پلاکت ها جهت هموستاز و ترمبوژنز دخالت دارند(۵-۳).

* عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

** استاد گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** استادیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.SID.ir

Archive of SID

انواع مختلف کلاژن در invivo شناسائی شده اند و در دهه اخیر جفت انسان بعنوان ماده اولیه جهت استخراج و مشخص کردن انواع مختلف ژنتیکی کلاژن شامل مولکولهای نوع I , III , IV و V توسط بسیاری از محققین مورد استفاده قرار گرفته است(۶).

جفت انسان دارای نقش مرکزی در رشد و توسعه جنین است. علاوه بر این جفت برای کنترل اعمال حیاتی تغذیه و تنفس جنین ، در بیوسنتز هورمونهای استروئیدی ، پپتیدی و فاکتورهای رشد دخیل است ، همچنین این ارگان پیچیده به علت غنی بودن از کلاژن مورد توجه و علاقه پژوهشگران می باشد (۷،۸).

گزارشات نشان می دهند که جفت شامل آنزیم کلاژناز است که در مکانیسم اتساع یافتن سرویکس رحم در زمان زایمان دخالت دارد ، همچنین تجزیه آنزمی کلاژن جفتی و سایر اجزاء ماتریکس خارج سلولی در زمان زایمان وقتی جفت باید از دیواره رحمی جدا شود حائز اهمیت است(۸).

نظر به اینکه کارهای تحقیقاتی نشان داده است که در زمان زایمان مقدار کلاژناز افزایش و در نتیجه میزان کلاژن کاهش می یابد ، بنظر رسید که در بعضی سقط جنین ها ممکن است کاهش در سنتز کلاژن وجود داشته باشد ، لذا بر آن شدیم تا الگوی الکتروفورزی کلاژن های یک جفت نابالغ حاصل از یک سقط جنین را بررسی و با کلاژن جفت بالغ از یک زایمان طبیعی و ترم مقایسه کنیم.

روش کار:

مواد شیمیایی:

اتانل ۹۸٪ ، اسید فرمیک۹۹٪ ، کوماسی بریلیانت بلو G-250 ، اسید سیتریک و سیترات سدیم نوع Dihydrat Crystalin ، پپسین با فعالیت0.7 Fipunit /mg ، سود سوز آور ، کلرید سدیم که همه از شرکتSigma تهیه شد.

جفت نابالغ متعلق به یک جنین ۱۵-۱۴ هفته ای بود که در اثر حمل بار سنگین سقط شده بود. جفت مذکور که در حالت فریز ۸۵ گرم وزن داشت از بیمارستان امام خمینی (ره) تهران تحویل گرفته شد.

شستشو و آماده نمودن بافت:

برای انجام هر گونه کار بروی جفت لازم است ابتدا شستشوی کافی روی آن صورت گیرد تا خون آن کاملاً پاک شود. چون کلاژن پروتئین نامحلول و تقریباً پایدار است بنابراین شستشو می تواند در محیط ۴ درجه سانتیگراد و در زمان طولانی انجام گیرد(۹).

خلاصه روش به شرح زیر است:

ابتدا بند ناف ، کیسه آمنیون و کوریون را از جفت جدا کرده و سپس آن را توسط یک بیستوری به قطعات بسیار کوچک تقسیم کردیم. جفت قطعه قطعه شده را جهت شستشو به ترتیب در محلولهای زیر قرار دادیم:

- ۲۰۰ میلی لیتر محلول مایع حاوی ۸ درصد اتانل ، نمک کلرید سدیم به غلظت ۶ گرم بر لیتر و مقداری سلولز
- محلول سیترات سدیم ۰/۰۵ مولار و pH=۷/۲
- محلول اسید سیتریک ۰/۰۵ مولار و pH=۸/۲
- محلول اسید فرمیک ۰/۰۵ مولار

بعد از انجام مراحل شستشو بافت جفت سفید شده بدست آمد که آماده هضم آنزیمی بود.

استخراج کلاژن نوع IV از بافت جفت:

جهت جداسازی این نوع کلاژن بافت جفت فقط یکبار تحت هضم آنزیمی قرارمیگیرد(۹).خلاصه روش به شرح زیر است:

۰/۰۱ گرم از پپسین نوع 0.7 Fipunit /mg را در ۲۰ میلی لیتر اسید سیتریک ۰/۰۵ مولار حل کرده و بافت شستشو داده شده به مدت ۲۴ ساعت جهت هضم آنزیمی در آن قرار گرفت ، عمل هضم آنزیمی در محیط ۱۰ درجه سانتیگراد و در حال تکان خوردن محلول انجام گرفت. بعد از ۲۴ ساعت ، ۲۰ میلی لیتر آب مقطر جهت رقیق شدن سوسپانسیون به آن اضافه و محلول توسط اضافه کردن سود ۴ نرمال از حالت اسیدی به pH=۷/۵ تغییر پیدا کرد. بعد از ۲۴ ساعت آنرا سانتریفوژ کردیم. رسوب را دور ریخته و محلول روئی که حاوی کلاژن نوع IV است را نگهداشتیم. همراه با این مراحل کلاژن نوع IV از یک جفت بالغ و طبیعی را استخراج کردیم تا باهم مقایسه کنیم.

استخراج کلاژن نوع I+III از بافت جفت:

جهت جداسازی کلاژن نوع I+III بافت جفت دو بار تحت هضم آنزیمی قرار می گیرد (۱۰). خلاصه روش به شرح زیر است:

۰/۰۱ گرم از پپسین نوع Fipunit/gr ۹۰۰۰ را در ۷۰ میلی لیتر اسید فرمیک ۰/۵ مولار حل کرده و بافت مورد نظر به مدت ۶ ساعت جهت اولین هضم آنزیمی در آن قرار گرفت. سپس ۰/۰۱ گرم از همان آنزیم پپسین جهت دومین هضم آنزیمی به محلول اضافه شد. هر دو مرحله

www.SID.ir

Archive of SID

هضم آنزیمی در محیط ۴ درجه سانتیگراد و در حال تکان خوردن مخلوط انجام گرفت. بعد از آنکه یک شب از دومین هضم آنزیمی گذشت ، مخلوط با دور ۱۰۰۰۰g به مدت یک ساعت سانتریفوژ شد.

۶۵ میلی لیتر مایع روئی را جدا کرده و توتال پروتئین آن را به وسیله روش برادفورد اندازه گرفتیم(۱۱). سپس پروتئین های موجود در محلول رویی توسط افزایش غلظت نمک رسوب داده شد. ۴/۶۲ گرم نمک NaCl را در محیط ۴ درجه سانتیگراد و در حال تکان خوردن اضافه کردیم تا غلظت نمک در محلول به ۱/۲ مولار برسد. بعد از ۶ ساعت تکان خوردن ، رسوب پروتئینی توسط سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰g و به مدت یک ساعت از محلول جدا شد. رسوب پروتئینی حاصله را در ۱۰۰ میلی لیتر با فرتریس ۵۰ میلی مول ، pH=۸ حاوی یک مولار نمک NaCl حل کردیم. حل شدن کامل طی ۱۶ ساعت تکان خوردن مخلوط در ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. همراه انجام این مراحل ، کلاژن نوع I+III از ۱۰ گرم جفت نرمال نیز استخراج شد.

نتایج :

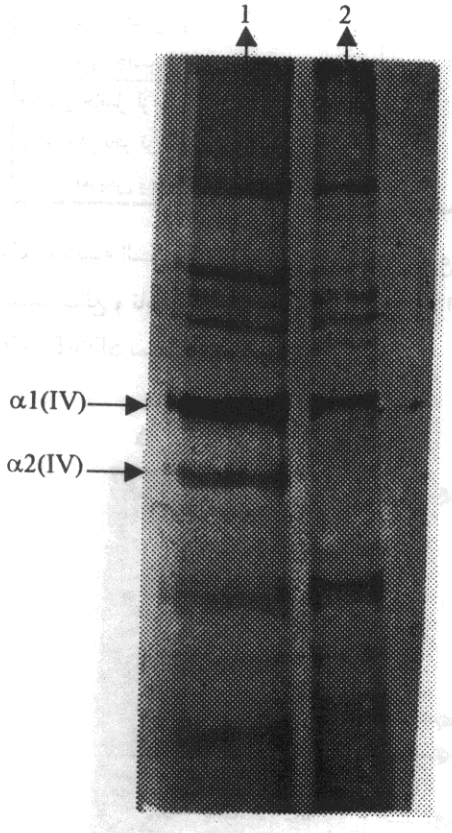
آنزیم پپسین باعث حل شدن کلاژن غشاء پایه و جدا شدن آن از بافت جفت می شود. چون پپسین نواحی غیر مارپیچ سه گانه کلاژن را پرتئولیز می کند زنجیره های۱ و۲ کلاژن نوع IV به قطعات با وزن مولکولی متفاوت شکسته می شوند. همچنین پپسین پروتئین های دیگر موجود در جفت را حل کرده و به سوپر ناتانت می آورد ، بنابراین پروتئین تام اندازه گیری شده در این مرحله مجموع پروتئین کلاژنی و سایر پروتئین هاست(جدول ۱).

جدول ۱: میزان توتال پروتئین یک جفت نابالغ و یک جفت ترم بعد از هضم آنزیمی

نمونه	پروتئین توتال mg/ml	حجم ml	وزن mg
محلول حاصل از هضم آنزیمی جفت نابالغ	۱/۰۵۳	۳۵	۳۶/۸۵۵
محلول حاصل از هضم آنزیمی جفت طبیعی و ترم	۱/۳۶۲	۳۵	۴۷/۶۷

بر طبق جدول ۱ میزان توتال پروتئین جفت نابالغ تقریباً ۱/۳ بار کمتر از پروتئین جفت طبیعی و ترم است.

برای بررسی باندهای پپتیدی کلاژن نوع IV دو جفت مذکور نمونه ها را روی ژل ۵٪ الکتروفورز SDS-PAGE نمودیم (تصویر ۱) همانطور که مشاهده می شود در جفت نابالغ زنجیره α2(IV) وجود ندارد.



تصویر ۱: الگوی الکتروفورزی کلاژن IV یک جفت بالغ و نابالغ

نمونه ها به ترتیب :
ستون ۱: محلول حاصل از هضم آنزیمی جفت بالغ
ستون ۲: محلول حاصل از هضم آنزیمی جفت نابالغ

برای جدا کردن کلاژن نوعI+III جفت شسته شده و عاری از خون دوبار با فاصله ۶ ساعت تحت هضم آنزیمی پپسین قرار داده شد. پپسین کلاژن های جفتی را حل کرده و به سوپر ناتانت می آورد. توتال پروتئین اندازه گیری شده ، مجموع پروتئینهای کلاژن نوع I+III و سایر پروتئین هایی است که تحت اثر آنزیم پپسین تجزیه شده اند(جدول۲).

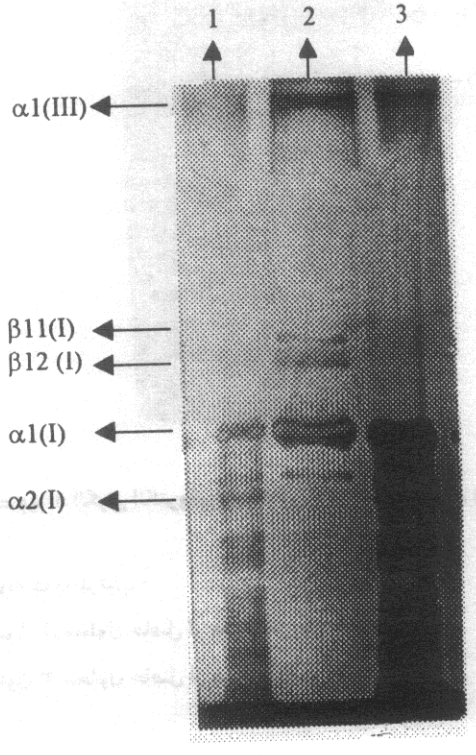
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: میزان توتال پروتئین کلاژن I+III استخراج شده از جفت نابالغ و یک جفت طبیعی

نمونه	پروتئین توتال mg/ml	حجم ml	وزن mg
محلول حاصل از هضم آنزیمی جفت نابالغ	۰/۲۵۹	۶۵	۱۶/۸۳۵
محلول حاصل از هضم آنزیمی جفت طبیعی و ترم	۰/۲۴۹	۶۶	۱۶/۴۳۴
محلول حاصل از حل کردن رسوب پروتئینی در بافر تریس جفت نابالغ	۰/۰۷۷	۱۱۰	۸/۴۷
محلول حاصل از حل کردن رسوب در بافر تریس جفت طبیعی و ترم	۰/۰۹۵	۱۱۳	۱۰/۷۳۵

برای مقایسه الگوی الکتروفورزی کلاژن نوع I+III از دو جفت بالغ و نابالغ نمونه ها را روی ژل ۵٪ الکتروفورز SDS-PAGE نمودیم (تصویر ۲).



تصویر ۲: الگوی الکتروفورزی کلاژن I+III جفت نابالغ

نمونه ها به ترتیب:

ستون اول:محلول حاصل از هضم آنزیمی جفت نابالغ

ستون دوم: کلاژن I+III استاندارد

ستون سوم: رسوب پروتئینی با نمک ۱/۲ مولار حل شده در

برطبق الگوی الکتروفورزی در جفت نابالغ زنجیره های α1(I)، α2(I) وجود دارد ولی زنجیره های β11(I) ، β12(I) و زنجیره α1(III) وجود ندارد.

بحث:

بررسی اکثر تحقیقات جمع آوری شده در ارتباط با تهیه کلاژن نشان می دهد که کلاژن ها به علت اینکه مولکول های نامحلول ماتریکس خارج سلولی هستند ، برای استخراج آنها از تمام بافتهای حاوی این بیومولکول چه بافت طبیعی (مانند جفت ، تاندون ، غضروف و غیره) و چه بافت توموری از هضم آنزیمی بخصوص آنزیم پپسین تحت شرایط غیر دناتوره استفاده شده است. پپسین ضمن حذف باندهای دی سولفیدی قطعات انتهایی غیر هلیکسی را از مولکول جدا می کند(۷).

سالهای زیادی است که الکتروفورز بر پایه ژل پلی آکریل آمید مناسب ترین و عملی ترین روش برای جدا کردن و تعیین کمیت زنجیره های α کلاژن به حساب می آید(۱۲).

حرکت الکتروفورزی SDS-PAGE کلاژن نوع IV از یک جفت نابالغ نشان داد که کلاژن IV جفت مذکور فاقد زنجیره α2(IV) است . زنجیره های α1 و α2 کلاژن IV از نظر ژنتیکی مجزا هستند (۷،۱۳). در این صورت این احتمال وجود دارد که زنجیره α2 یا هنوز ساخته نشده و در ماههای بعد سنتز می شود و یا در اثر ایجاد شرائطی میزان فعالیت آنزیمهای پروتئازی مثل کلاژناز ، کاتپسین و غیره افزایش یافته و باعث تجزیه این زنجیره شده اند . کلاژناز بصورت زایموژن است و در اثر مکانیسم آبشاری فعال می شود. این آنزیم در محل های اختصاصی روی ساختمان هلیکسی عمل می کند و مولکول را به سه چهارم از قسمت N- ترمینال و یک چهارم از قسمت C- ترمینال تقسیم می کند. کاتپسین تجزیه را کامل کرده و مولکول را به پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد تبدیل می کند(۱۴).

بنابراین در بعضی سقط جنین های عادتی ممکن است کاهش در سنتز کلاژن و یا تجزیه کلاژن وجود داشته باشد ، از این رو بهتر است در سقط جنین های بی دلیل میزان کلاژن اندازه گیری شود و در بارداری های بعدی سعی شود که هیچ گونه انقباض در رحم ایجاد نشود.

برای اثبات رابطه بین سقط جنین ، افزایش کلاژناز ، کاهش سنتز کلاژن و تجزیه کلاژن باید نمونه های بیشتری را در ماههای مختلف مورد مطالعه و بررسی قرار داد. اگر

www.SID.ir

Archive of SID

وجود چنین ارتباطی ثابت شود شاید بتوان برای درمان علاوه بر استراحت کامل در زمان بارداری و جلوگیری از انقباضات رحمی از مهارکننده های بافتی کلاژناز مثل متالوپروتئیناز که از جفت قابل استخراج است (۸) با دوزهای مناسب استفاده کرد.

سپاسگزاری:

شایسته است که مراتب تشکر خود را از جناب آقای دکتر گودرزی عضوهیأت علمی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی همدان به خاطر مطالعه مقاله و خانم بخت عضو هیأت علمی دانشکده پرستاری مامائی همدان به خاطر تهیه نمونه و دانشگاه تربیت مدرس به خاطر فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی ابراز نمایم.

منابع:

1. Smith JR. Pathophysiology. 2nd ed. Philadelphia : W.B. Saunders , 1985:611-653.
2. Smolenski K. Investigation of the parameter for reversed HPLC of collagen. J Chromatogr 1984; 287: 29-44.
3. Blum S. Polyacrylamide gel electrophoresis of native collagen. J Chromatogr 1990; 530: 432-437.
4. Chiang TM. Collagen-Platelet interaction. J Thromb Res 1990; 59: 509-520.
5. Kawamoto Y. Procoagulant activity of collagen. J Biochem Biophys 1990; 1053: 361-368.
6. Tiollier J. Fibroblast behavior on gels of type I and III human placental collagens. Exp Cell Res 1990; 191: 95-104.
7. Foidart J. Biosynthesis of type IV collagen. Coll Res 1981; 1: 137-150.
8. Rajabi MR. Changes in active and latent collagenase. Am J Obstet Gynecol 1990; 163: 499-505.
۹. پورکبیر ر. استخراج و تخلیص کلاژن نوع IV از جفت انسان. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان. سال چهارم ، شماره ۱ ، پائیز و زمستان ۱۳۷۵ : ۲۹-۲۴.
10. Klasson S. The effects of tissue pretreatment and pepsin levels on the isolation of collagen from human placenta. Collagen Rel Res 1986; 6: 397-408.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann Biochem 1976; 72: 248-254.
12. Sokolov BP. Modified method for peptide mapping of collagen. Ann Biochem 1988; 176: 365-367.
13. Haralson MA. Synthesis of [Proα1(IV)]3 collagen molecules by cultured embryo-dreived parietal yolk sac cells. Biochemistry 1985; 24: 5792-5797.
14. Lapiere C. Collagen pathology at the molecular level. Biochem Collagen 1976: 377-427.

www.SID.ir