مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۷، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات ۷۵ تا ۸۰

Original Article

بررسی اثر پروتئین ۱۰۰ کیلو دالتونی غضروف کوسه ماهی بر رده سلولی سرطانی K_{562} و لنفوسیت‌های خون محیطی طبیعی

بهناز ریاض الحسینی[۱]، زهیرمحمد حسن[۲]، علی مصطفایی[۳]، مهدی مهدوی[۴]، مهرداد هاشمی[۵]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحدعلوم و تحقیقات تهران
[۲] استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] استادیار، مرکزتحقیقات بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
[۴] PhD ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۵] PhD ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: *غضروف کوسه یکی از مکمل‌های داروئی در حذف تومور بیماران سرطانی است. البته در مورد اثر فراکشن ۱۰۰ کیلودالتونی آن بر سیستم ایمنی گزارشی اعلام نگردیده است. .هدف این مطالعه، بررسی تاثیر این فراکشن بر رده سلولی سرطانی K562 و لنفوسیت‌های خون محیطی طبیعی انسان می‌باشد.*

روش بررسی: *در این تحقیق تجربی، جهت تخلیص پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه ماهی از روش تخلیص کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون استفاده گردید. رده سلول سرطانی و لنفوسیت‌های خون محیطی طبیعی در محیط RPMI1610 (Sigma) بعلاوه ۱۰٪ سرم جنین گاوی، گلوتامین، پنی سیلین – استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه بمدت ۲روز کشت داده شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای طبیعی خون محیطی بوسیله فایکول جمع‌آوری گردیدند. توان حیاتی سلول‌ها با روش آزمون توان حیاتی (MTT) ارزیابی شد.*

یافته‌ها: *در روش MTT، سرکوب سلول‌های سرطانی K_{562} در غلظت‌های $15\mu g$ به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل بیشتر بود ($P<۰/۰۱$).*

نتیجه‌گیری: *در این بررسی برای اولین بار القای مرگ سلولی پروتئین ۱۰۰ کیلو دالتونی غضروف کوسه ماهی بر رده سلولی سرطانی K562 در محیط خارج از بدن (in vitro) مشخص گردید.*

واژگان کلیدی: *غضروف کوسه ماهی، کانسرتراپی، رده سلولی سرطانی K_{562}*

مقدمه

ماکرومولکول‌های غضروف بواسطه ارزش‌های درمانی از نظر اقتصادی قابل‌توجه می‌باشند. این ماکرومولکول‌ها در درمان بیماری‌هایی مثل سرطان کاربرد دارند (۱).خاصیت مهم غضروف در درمان سرطان، به خاطر خاصیت ضد رگ‌زائی آن است که درآزمایشات بالینی متعددی تایید شده است (۴-۲).

هم‌چنین غضروف کوسه با داشتن خاصیت ضد التهابی در بهبودی زخم‌ها مؤثر می‌باشد (۵،۶). عصاره استاندارد شده غضروف کوسه ماهی (Æ-941)Neovastat یکی از معدود داروهای با اثر ضد رگ‌زایی است که هم اکنون در مرحله III آزمایشات بالینی در درمان سرطان ریه و کارسینومای سلول‌های کلیوی و همچنین در فاز II درمان میلوم در آمریکا و اروپا در حال بررسی است (۷-۲). برخلاف داروهای ضد رگ‌زای طبیعی دیگر، ترکیب ذکر شده دارویی با چند هدف محسوب شده و قابلیت انسداد راه‌های مختلف رگزایی را دارا می‌باشد (۸) و از آنجائی‌که اثر سمیت قابل ملاحظه‌ای حتی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی ،گروه ایمونولوژی، دکتر زهیر محمد حسن (**email**: Hassan_zm@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۵/۲۸

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-05-06]

در مصرف طولانی (۴ سال) نداشته، می‌تواند به تنهایی و یا همراه با سایر درمان‌های ضد سرطان بکار رود (۹،۱۰). شواهدی وجود دارد که غضروف کوسه، اجزای سیستم ایمنی سلولی و هومورال را تحریک می‌کند (۱۱،۱۲). البته بیشتر مطالعات انجام گرفته بر روی اثر تجویز فراکشن‌های ۱۴ و ۱۵ کیلودالتونی عصاره غضروف کوسه بوده است (۱۱)؛ ولی تاکنون در مورد اثر فراکشن ۱۰۰ کیلودالتونی آن تحقیقی صورت نگرفته است. لذا ما در این مطالعه بر آن شدیم که اثر فراکشن فوق را بر رده سلولی سرطانی K_{562} و نیز لنفوسیت-های خون محیطی بررسی کنیم.

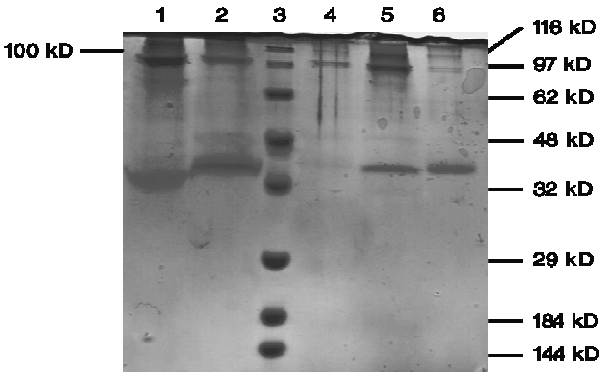
مواد و روشها

در این تحقیق تجربی، پروتئین ۱۰۰ کیلو دالتونی غضروف ماهی بوسیله رسوب توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول و نیز ژل-فیلتراسیون در بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تخلیص شد. سپس اثر سایتوتوکسیسیته آن بر رده سلولی سرطانی K562 و لنفوسیت خون محیطی طبیعی در محیط خارج از بدن (in vitro) توسط روش آزمون توان حیاتی (MTT)مورد ارزیابی قرار گرفت.

نواحی غضروفی کوسه ماهی‌هایی که از خلیج فارس صید شده، جدا و پس از شستشو با آب مقطر چرخ گردیدند و به مدت یک شب در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس غضروف‌های منجمد شده به قطعات کوچکی بریده شده و با استفاده از لیوفیلیزاسیون یخچال‌دار، لیوفیلیزه گردیدند. پس از آن در آزمایشگاه با استفاده از میکسر و هاون کاملا نرم شده و پس از عبور از یک مش با قطر ۱۷۰ میکرون بصورت پودر درآمدند. آنگاه محلول بافر حاوی استات سدیم ۰/۱ مولار حاوی گوانیدین هیدروکلراید ۴ مولار با pH=۵/۸ تهیه گردید. به این بافر ۶ نوع آنتی پروتئاز اضافه شد و سپس به ازای هر ۱۰ میلی لیتر بافر، یک گرم پودر غضروف کوسه ماهی اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در حال هم خوردن مداوم انکوبه گردید (۱۱). پس از گذشت این زمان، محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، رسوب حاصل که حاوی قسمت‌های غیر پروتئینی بود دور ریخته شد واز مایع شفاف رویی (عصاره غضروف کوسه) برای ادامه کاراستفاده شد.

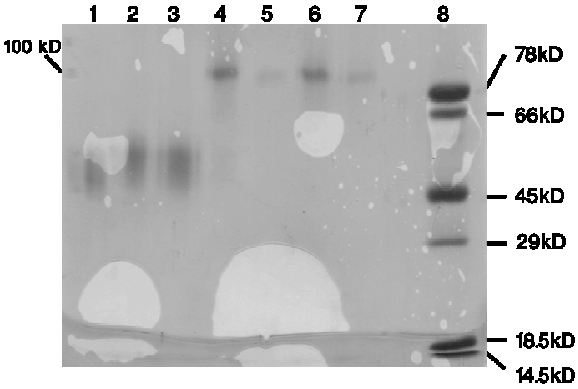
به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از عصاره غضروف کوسه، مقدار ۲۰ گرم پودر PEG_{6000} را به آرامی و در حال هم‌خوردن محلول به آن افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعداز سپری شدن این زمان، محلول در دمای۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ دقیقه و نیروی ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. به مایع رویی حاصل از سانتریفوژ در مراحل متوالی، در کل ۶۰ گرم پلی‌اتیلن‌گلیکول اضافه گردید تا غلظت نهایی PEG در نمونه به ۶۰ درصد رسید. بررسی‌های ما در مورد حضور پروتئین ۱۰۰ کیلو دالتونی در مایع رویی حاصل از سانتریفوژ در مراحل متوالی افزودن پلی اتیلن گلیکول نشان داد که هر گاه از غلظت ۶۰ درصد از PEG_{6000} برای جداسازی پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی استفاده گردد، بیشترین مقادیر پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی حاصل می‌آید (شکل ۱). در مرحله بعدی جهت تخلیص پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی از ژل فیلتراسیون با استفاده از سفادکس G100 استفاده شد و فراکشن‌ها جمع آوری و میزان جذب آنها با اسپکتروفتومتر درطول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. از بین فراکشن‌های جمع‌آوری شده در لوله‌ها، ۷ فراکشن که دارای بیشترین میزان جذب بودند، با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند تا فراکشن مورد نظر (حاوی پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه) تعیین گردد (باند پروتئینی موجود در ستون۴ از شکل ۲). فراکشن حاوی پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه تا زمان استفاده دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از افراد سالم به حجم مورد نیاز خون گرفته شد و پس از افزودن مواد ضدانعقاد به آن، به نسبت یک به یک، خون با PBS مخلوط گردید. پس از کمی پیپتاژ و هموژن شدن PBS با خون، به آرامی و از جدار لوله به نسبت دو به یک از خون رقیق شده بر روی فایکول برده شد و سپس دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ۱۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس با رعایت شرایط استریل و در زیر هود لامینار، توسط پیپت پاستور به آرامی لایه لنفوسیتی سفید رنگی که بین لایه فایکول و پلاسمای زرد رنگ فوقانی قرار گرفته بود را برداشته و به یک لوله فالکون دیگر منتقل گردید. سپس ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه و در ۳۵۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سلول‌ها با PBS شستشو داده شد. به رسوب سلولی در آخرین شستشو ۱ میلی‌لیتر محیط RPMI – FBS ده درصد اضافه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر از تریپان بلو مخلوط شده و زیست‌پذیری سلول‌ها و تعداد آنها مشخص گردید (۱۳).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-05-06]



شکل ۱- SDS-PAGE فراکشن ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه ماهی در ژل ۱۲/۵ درصد

ستون ۱ و ۲ : به ترتیب مربوط به مایع رویی و رسوب عصاره ۶۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول غضروف کوسه؛ ستون ۳ : مارکر؛ ستون ۴ و ۵ : به ترتیب مربوط به رسوب و مایع رویی عصاره ۴۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول غضروف کوسه؛ ستون ۶ : مربوط به رسوب عصاره ۲۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول غضروف کوسه



شکل ۲- الگوی SDS-PAGE ۷ نمونه از فراکشن‌های جمع‌آوری شده پس از کروماتوگرافی ستونی در سفادکس G100

ستون‌های ۱ ، ۲ و ۳ حاوی پروتئین‌های با وزنهای مولکولی بین ۶۶-۴۵ کیلودالتون هستند. ستونهای ۴ ، ۵ ، ۶ و ۷ حاوی پروتئین‌های با وزنهای مولکولی بین ۱۰۰-۷۸ کیلودالتون می‌باشند. ستون ۸: مارک

برای بررسی تاثیر پروتئین ۱۰۰ کیلو دالتونی غضروف کوسه ماهی بر پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T از آزمون MTT استفاده گردید. در این آزمون، لنفوسیت‌های بدست آمده از خون محیطی افراد سالم، پس از فرآیند ذکرشده به تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر رسانده شدند. ازچنین سوسپانسیونی، ۱۰۰ میکرولیتر که حاوی ۱×۱۰^{۵} سلول بود، در هرچاهک میکروپلیت ریخته شد. درآزمایشات ابتدایی از غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید که درغلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیشترین سرکوب پاسخ تکثیری مشاهده شد. لذا جهت آزمون نهایی، سلول‌هایی که در چاهک‌ها قرار داده شده بودند، با ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه ماهی، مجاور شدند. دراین سری از آزمون‌ها به‌عنوان کنترل منفی، سلول تنها و بدون آنتی‌ژن مورد استفاده قرارگرفت و به عنوان کنترل مثبت، به برخی از چاهک‌ها PHA به غلظت ۵ میکروگرم در ازای هر چاهک اضافه گردید. تعداد نمونه‌ها ۷ مورد بود و آزمایشات به‌صورت دوتایی انجام گرفت.

پس از کشت سه روزه و مدت زمان ۷۲ ساعت، به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT اضافه گردید و سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ Co2 قرارگرفت. با تشکیل شدن کریستال‌های فورمازان، سوپ رویی آنها برداشته شده و ۱۰۰ میکرولیتر، DMSO به هر چاهک اضافه و کمی پیپتاژ گردید و سریعا در طول موج ۵۴۰ نانومتر با ELISA Reader خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول زیر، میزان اندکس تحریک سلول‌ها محاسبه شد:

اندکس تحریک برابر است با جذب سلولهای تحریک نشده تقسیم بر جذب سلولهای تحریک شده

برای کشت سلول‌های K_{562} از محیط کامل (10 % FBS - RPMI) استفاده گردید. درابتدا، یک ویال از این سلول‌ها را که درتانک ازت به‌صورت فریز بوده را از ازت خارج کرده و سریعا ذوب گردید و به آن ۱۰ میلی‌لیتر محیط کامل اضافه شد. سپس در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، ۳ مرتبه شستشو صورت گرفت. رسوب در۱۰ میلی‌لیتر محیط کامل، سوسپانسیون شد و در دو فلاسک تقسیم گردید. سلول‌های مذکور پس از طی شدن ۳ روز، فلاسک‌ها را پر نمودند. بنابراین به فلاسک‌های جدید پاساژ داده شدند. به منظور سازگاری سلول‌ها، کشت به مدت حدود دو هفته ادامه داشت . پس از طی شدن این زمان، سلول‌ها از فلاسک خارج شده و در یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری، سه مرتبه در دور ۱۲۰۰rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۰ دقیقه دردمای شستشو داده شدند.

۲×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتردر محیط کامل به تعلیق در آمدند و به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. سپس آنتی‌ژن (فراکشن ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه) درغلظت ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به آن اضافه گردید و حجم نهایی چاهک‌ها، به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. به‌عنوان کنترل منفی نیز، معادل حجم آنتی‌ژن به چاهک‌ها PBS اضافه گردید. کشت به مدت ۳ روز ادامه داشت (زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت). پس از طی شدن زمان مذکور، ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت

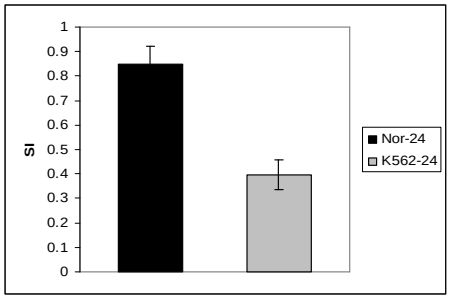
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-05-06]

۴ ساعت درانکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و Co2 ۵ درصد قرار داده شد. پس از گذشت ۴ ساعت، مایع رویی آن به‌طور کامل خارج شده و به آن ۱۰۰ میکرولیتر، DMSO اضافه گردید. سپس پیپتاژ کرده و به سرعت در طول موج ۵۴۰ نانومتر با ELISA Reader خوانده شد (۱۴). نتایج برحسب اندیکس تحریک محاسبه شده و مورد آنالیز آماری با آزمون t قرارگرفتند.

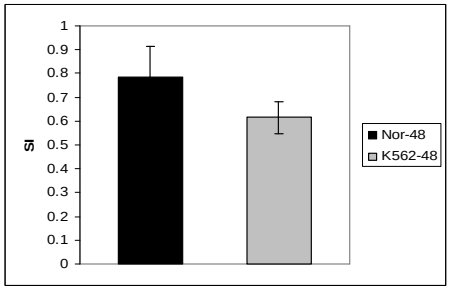
یافته‌ها

از مقایسه نتایج حاصل از آزمون MTT بر لنفوسیت‌های خون محیطی طبیعی که در مجاورت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه قرار گرفته بودند، با نتایج تاثیر PHA بر همان سلول‌ها مشخص گردید که این پروتئین نه تنها موجب تکثیر این سلول‌ها نمی‌گردد، بلکه تا حدی هم سرکوب درآنها ایجاد می‌کند. بنابراین نمی‌توان نقش میتوژنیک برای پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه (شکل ۱و۲) قایل شد. از طرف دیگر نتایج بررسی پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه بر روی سلولهای K 562 در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که این پروتئین موجب سرکوب سلول‌های K 562 در مقایسه با گروه کنترل می‌شود و حداکثر سرکوب‌گری نیز در ۲۴ ساعت اول بود. البته خاصیت سرکوب‌گری در ۲۴ ساعت دوم و سوم نیز مشاهده شد.

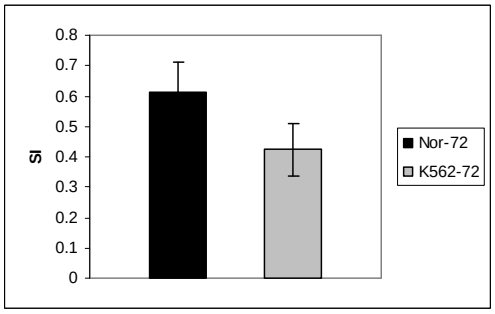
تأثیر پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درآزمون MTT در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. به عبارت دیگر پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه در MTT ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته به‌طور معنی‌داری (به‌ترتیب P=۰/۰۱۶، P=۰/۰۰۷، P=۰/۰۰۰۱) نسبت به گروه کنترل موجب سرکوب سلول‌های K562 شد.



نمودار۱-MTT ۲۴ ساعته، پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه ماهی در غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر برسلولهای K562 و سلولهای خون محیطی طبیعی



نمودار۲ -MTT ۴۸ ساعته، پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه ماهی در غلظت ۱۵میکروگرم بر میلی لیتر برسلولهای K562 و سلولهای خون محیطی طبیعی



نمودار۳ -MTT ۷۲ ساعته، پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه ماهی در غلظت ۱۵میکروگرم بر میلی لیتر برسلولهای K562 و سلولهای خون محیطی طبیعی

بحث

از آنجایی که روش‌های معمول در درمان سرطان (جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی) علاوه بر سلول‌های توموری بر سلول‌های طبیعی در حال تقسیم نیز اثر کرده و آنها را می‌کشند و یا تقسیم سلولی را مهار می‌کنند (۱۵)، در سالهای اخیر برای درمان بیماران سرطانی از روش‌های مؤثرتری مثل ایمونوتراپی استفاده می‌شود.

مزیت روش‌های ایمونولوژیکی در این است که با استفاده از ویژگی سیستم ایمنی میزبان منجر به حذف سلول‌های توموری شده و در عین حال به سلول‌های سالم آسیب نمی‌رساند (۱۹). محرک‌های ایمنی گوناگونی می‌توانند سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار دهند و آنرا تقویت نمایند، لذا تلاش‌های فراوانی برای دست یافتن به این محرک‌ها انجام شده است. محققین همچنین به دنبال ترکیباتی هستند که نه تنها سبب تحریک پاسخ‌های ایمنی و نابودی تومور می‌شود بلکه دارای کمترین اثرات جانبی نیز باشد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-05-06]

با شناخت به اینکه آمار سرطان در کوسه ماهی‌ها کم می‌باشد، تحقیقات گسترده‌ای روی غضروف کوسه ماهی تمرکز یافته است (۲۰). با مطالعات بعدی که بر روی پروتئین‌های استخراج شده از غضروف کوسه ماهی انجام شد، مشخص گردید که این پروتئین‌ها قابلیت مهار رگ‌زایی را در تومورهای بدخیم و خوش‌خیم دارند (۲۱). یافته‌های بعدی به موازات تحقیقات مذکور نشان داده است که فراکشن‌های بدست آمده از غضروف کوسه ماهی قادرند اثرات ضد التهابی نیز داشته باشند. بررسی‌ها در مورد آرتریت روماتوئید نشان داده است که پروتئین‌های کوسه ماهی باعث مهار التهاب در این بیماری نیز می‌گردند (۶، ۲۲).

استفاده از غضروف کوسه ماهی در مطالعات متعددی به عنوان یکی از مکمل‌های دارویی که از منشاء طبیعی می‌باشد، مطرح شده است. این ترکیب با تحریک پاسخ‌های ایمنی (۱۲) و مهار آنژیوژنز (۵) موجب ممانعت از رشد تومور می‌شود و از آنجایی که اثر توکسیسیتی قابل ملاحظه‌ای در بیمارانی که حتی به مدت طولانی (۴ سال) از این ترکیب استفاده کرده‌اند، دیده نشده، می‌تواند به تنهایی و یا همراه با سایر درمان‌های ضدسرطان بکار رود (۹، ۱۰).

Neovastat عصاره استاندارد شده غضروف کوسه است که بر رده‌های سلولی سرطانی پستان، تخمدان، پروستات و ریه اثر ضد تکثیری دارد (۲۳). در مراحل پیشرفته کارسینومای ریه، این دارو باعث افزایش معنی‌دار طول عمر بیماران شده است (۲۴).

غضروف کوسه ماهی دارای پروتئین‌های بسیار متعددی می‌باشد که دارای طیف متنوعی از وزن‌های مولکولی می‌باشند. برای مثال دکتر حسن و همکارانش موفق شدند از غضروف کوسه ماهی، پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۱۴ و ۱۵ کیلودالتونی جدا نموده و اثرات ضد توموری و ضد رگ‌زایی آن را به اثبات برسانند (۱۱). محققین دیگری نیز روی پروتئین‌هایی با وزن‌های مولکولی مختلف جدا شده از غضروف کوسه ماهی تحقیق نمودند.

بر این اساس سعی شد در تحقیق حاضر پروتئین ۱۰۰ کیلو دالتونی غضروف کوسه ماهی را از آن جدا نموده و اثرات سایتوتوکسیسیته آن بر رده سلولی K_{562} و اثرات میتوژنیک آن بر روی خون محیطی انسان و همچنین اثر ضد رگ‌زایی آن را بررسی شود. بررسی‌های اولیه در مورد اثر سایتوتوکسیسیته غلظت‌های مختلف پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی بر سلول‌های سرطانی K_{562} نشان داد که این پروتئین در هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب سرکوب سلول‌های K_{562} می‌گردد. اما بهترین اثر این پروتئین در غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. بر این اساس جهت انجام آزمایشات از غلظت بهینه شده ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. یافته‌های ما در ۷ آزمایش مجزا نشان داده است که پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه ماهی موجب سرکوب شدید سلول‌های K_{562} می‌شود و این سرکوب در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری کاملاً معنی‌دار می‌باشد.

یافته‌های دیگر محققین نیز نتایج ما را تأیید می‌نماید. Sheu و همکارانش یک پروتئین به نام U-995 را از غضروف کوسه ماهی جدا نمودند و نشان دادند که این پروتئین هم اثرات آنتی‌آنژیوژنز و هم خاصیت سرکوب سلول‌های توموری را دارد (۲۵). Dupont و همکارانش یک پروتئین با وزن مولکولی ۵۰۰ کیلودالتونی را از غضروف کوسه ماهی جدا نمودند که اثرات مذکور را بر سلول‌های سرطانی داشت (۲۶). یافته‌های ما نیز در این تحقیق نشان داده است که پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی مشتق از کوسه ماهی، موجب مهار سلول‌های سرطانی K_{562} شده، به عبارت دیگر این زیر واحد پروتئینی مشتق از غضروف کوسه ماهی نیز مانند دیگر پروتئین‌های غضروف کوسه ماهی دارای اثرات ضد توموری می‌باشد.

در مرحله بعدی پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی غضروف کوسه ماهی بر سلول‌های طبیعی خون محیطی انسان اثر داده شد تا اثرات میتوژنیک آن بررسی گردد. نتایج ۷ آزمون مجزا نشان داد که این پروتئین اثرات میتوژنیک ندارد. واضح است که این پروتئین موجب سرکوب شدید سلول‌های سرطانی K_{562} شده است اما اثر آن بر سلول‌های طبیعی اثر میتوژنیک نبوده است بلکه تا به حد مختصری موجب سرکوب سلول‌های طبیعی هم شده است. اما اثرات سرکوب‌گری پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی بر روی سلول‌های سرطانی K_{562} به مراتب قوی‌تر از این اثر بر روی سلول‌های طبیعی بوده است.

یافته‌های ما در این زمینه نشان می‌دهد که احتمالاً مصرف چنین فرآورده بیولوژیکی نه تنها اثرات مضری برای سیستم ایمنی بدن ندارد، بلکه قادر خواهد بود با اثر سایتوتوکسیسیته بر سلول‌های توموری رشد آنها را مهار نماید. پیشنهاد می‌گردد خصوصیت پروتئین مورد نظر، تعیین توالی و ساختار و بررسی تشابه آن با بانک پروتئین، ارتباط آن با سایر پروتئین‌ها و اثرآن بر الگوی سایتوکاینی در بیماران مبتلا به سرطان بررسی گردد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-05-06]

REFERENCES

1. Harper GS, Allingham PG , Xiaoyi Q, editors. Cartilage co-products. Commercial development from alternative production species. 2000; RIRDC Publication, No 00/35; pp:1- 23.
2. Binghua J, Jianhe C, Weimin M, Lianghua w, Yuping Z, Huinan M. Identification and Biological Characterization of Angiogenic and Tumor Growth Inhibitors Derived From *Sinica cetorhinus maximum* Cartilage. Marine Drugs 2004;12:30-38
3. Lane IW, Contreras E. High nute of bioactivity (reduction in gross tumor Size). Observed in advanced cancer patients treated with shark cartilage material. J Neuropathol1992;31:80-86.
4. Mecutecheon L. Taking a bite out of shark cartilage. Skept Inq 1997;21:44-48.
5. Gonzalez RP, Leyva A, Moraes MO. shark cartilage as source of antiangogenic compounds: from basic to clinical research. Biol Pharm Bull 2001;24:1097-101.
6. Fontenele JB, Arujo GB, Dealenear JW, Debarros VG. The analgesis and anti inflammatory effects of shark cartilage are due to A peptide molecules and are Nitric Oxide (NO) system depended. Biol Pharm bull 1997;20:1151– 54.
7. Gingras D, Renaud A, Mousseau N, Beliveau R. shark cartilage extracts as antiangiogenic agent: smart drinks or bitter pills ?. Cancer metast Rev 2000;23:83-86.
8. Beliveau R, Gingras D, Kruger EA. The Antiangiogenic Agent Neovastat (AE-941) Inhibits Vascular Endothlial Growth Factor-mediated Biological Effects. Clin Cancer Resear 2002;1242:1242-50.
9. Bukowski RM. AE -941, a multifunctional antiangiogenic compound: trials in renal cell carcinoma. Exp Opin Invest Drugs 2003;12:1403-11.
10. Dredge K. AE-941 (Aeterna). Curr Opin Inv Drugs 2004;5:668-77.
11. Feyzi R, Hassan ZM, Mostafaie A. Modulation of CD4 and CD8 Tumor infiltration lymphocytes by a fraction from shark cartilage : Shark cartilage Modulates anti tumor immunity. Int Immunopharmacology 2002;406:1-6.
12. Kralovec JA, Guan Y, Metera K, Carr RI. Immunodulating principles from shark cartilage. Int Immunopharmacol 2003;3:657-69.
13. Johnstone A, Thrope R. Immunochemistrry in practice. Boston: Blackwell;1990:88-95.
14. Huny TJ,Connelly JF. Shark cartilage for cancer treatment. Am Health Syst Pharm 1992;52:1756-60.
15. Chabner BA, Friedman MA. Progress Against rare and not so-rare cancer. New Engl J Med 1992;326:564-68.
16. Walkers LG, Anderson J. Testing complementary and alternative therapies within a research protocol. Euro J Cancer 1999;35:1614-18.
17. Ernest E, Cassileth BR. How useful are unconventional cancer treatment? Euro J Cancer 1999;35:1608-13.
18. Ernest E. The current position of complementary /alternative medicine in cancer. Euro J Cancer 2003;39:2273-77.
19. Franks LM, Teich NM. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. New York: Oxford university press;1997
20. Cataldi JM, Osborne DL. Effects of shark cartilage on mammary tumor neovascularization in vivo and cell proliferation in vitro. Am Soc Exp Biol J 1995;9: 135.
21. Anonymous. What are the merits of shark cartilage therapy as a treatment for cancer? Harvard Health Letter 1995;20:7.
22. Gomes E M, Felzeszwalb S I. shark cartilage preparation protects cells against hydrogen peroxide Induced damage and mutagenesis. Mutation Res 1996;367:203–208.
23. Anonymous. AE-941. Drugs RD 2004;5:83-89.
24. Latreille J, Bastits G, Laberge F, Champagne P, Croteau D, Falardea P. Phase I/II trial of the safety and efficacy of AE-941 (Neovastat) in the treatment of non small cell lung cancer. Clin Lung Cancer 2003;4:4:231-36.
25. Sheu R, FU CC, Tsai ML, Chung WJ. Effect of U-995, potent shark cartilage –derived inhibitor, on anti angiogenesis and anti tumor activities Anti cancer Rew 1998;18:4435-42.
26. Dupont E, Savard E, Jourdian C, Juneau C, Thibodeau A, Ross N, et al. Antiangiogenic properties of a novel shark cartilage Extract: Potential role in the treatment of psoriasis. J Cutan Med Surg 1998;2:321-25.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-05-06]