دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیستم، شماره ۴، صفحه ۳۶۱ - ۳۴۹ (مهر و آبان ۱۳۹۶)

Iran South Med J 2017;20(4): 349-361

استخراج کندروئیتین سولفات از غضروف ماهی خاویاری (*Acipenser stellatus*) و بررسی اثر القایی آن بر تکثیر فیبروبلاست انسانی

سعید دلشاد (MSc)[۱ و ۲]، کتایون کریم‌زاده (PhD)[۲*]، علی مصطفایی (PhD)[۳]

[۱] باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
[۳] گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، کرمانشاه، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۸/۴- پذیرش مقاله: ۹۵/۱۲/۳)

چکیده

زمینه: کندروئیتین سولفات‌ها از مهم‌ترین گلیکوز آمینوگلیکان‌های موجود در ماهیان خاویاری می‌باشند که در غضروف این ماهیان حضور دارند. این ترکیبات علاوه بر اهمیت در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی، از اهمیت بالینی در درمان آرتروز و ترمیم زخم نیز برخوردار هستند.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر استخراج کندروتین سولفات (CS) از غضروف ماهی ازون برون (۰/۲۵ گرم پودر غضروف ماهی در ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS1X) توسط هضم آنزیمی تریپسین وپپسین در زمان‌های ۱۲ و ۱۸ ساعت و با استفاده از نمک کاتیونی ستیل پیریونیوم کلراید (روش CPC) انجام شد. به منظور بررسی تأثیر کندروتین سولفات بر القای تکثیر فیبروبلاست‌های جدا شده از پوست انسان از روش رنگ‌سنجی MTT در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده گردید. بهترین زمان و مناسب‌ترین هضم آنزیمی توسط تیمار حرارتی با آنزیم‌های تریپسین وپپسین از روی الگوی الکتروفورز SDS-PAGE انتخاب شده و آنالیز FT-IR جهت شناسایی نوع کندروئیتین سولفات تخلیص شده بکار رفت.

یافته‌ها: با توجه به الگوی الکتروفورز، تیمار آنزیمی تریپسین با مدت زمان ۱۸ ساعت بیشترین هضم پروتئینی را نشان داد. در این شرایط بازده تولید کندروئیتین سولفات برابر ۴/۷۶ درصد تخمین زده شد. حضور کندروئیتین سولفات از نوع چهارم (C4S) توسط آنالیز FT-IR مشخص گردید. کندروئیتین سولفات‌های استخراجی از غضروف تأثیر افزایشی وابسته به غلظت بر میزان تکثیر سلول‌های فیبروبلاست را نشان داد، به طوری که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین افزایش تکثیر برابر با ۱۶۷ درصد، نسبت به کنترل در سلول‌های فیبروبلاست مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: کندروتین سولفات تخلیص شده به صورت وابسته به دوز دارای اثر تحریکی بر رشد سلول‌های فیبرویلاست می‌باشد، لذا می‌تواند در فرایندهای التیام و ترمیم زخم و القای تکثیر سلول‌های فیبروبلاست مؤثر واقع شود.

واژگان کلیدی: تکثیر سلولی، غضروف، کندرویتین سولفات، ماهی ازون برون

*گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

Email: karimzadehkathy@yahoo.co.uk

مقدمه

گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) پلی‌ساکاریدهای آنیونی راست زنجیری هستند که متشکل از ذرات دی ساکاریدی تکرار شونده هگزوزآمین (گلوکز آمین یا گالاکتوز آمین) و یورونیک اسید (گلوکورونیک اسید یا ایدورونیک اسید) یا گالاکتوز (در کراتان سولفات) می‌باشند (۴-۱). گلیکوزآمینوگلیکان‌های رایج موجود در گونه‌های پستانداران و پرندگان شامل کندروئیتین سولفات (CS)، درماتان سولفات (DS)، هیالورونان (یا هیالورونیک اسید)، هپاران سولفات و هپارین می‌باشند. تمامی گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) بجز هیالورونان به عنوان زنجیرهٔ گلیکان پروتئوگلیکان‌ها سنتز می‌شوند (۵). کندروئیتین سولفات در ماتریکس خارج سلولی و سطح سلولی بافت‌های مختلف پستانداران و پرندگان وجود دارد (۴-۱). این گلیکوز آمینوگلیکان در استخوان، تاندون‌ها، رگ‌های خونی، بافت عصبی و غضروف حضور دارد (۸-۶). در این میان بیشترین حضور CS در بافت‌های غضروفی که متشکل از شبکهٔ به هم تنیده شدهٔ کلاژن در ماده زمینهٔ بی‌شکلی از گلیکوپروتئین‌ها، هیالورونان و پروتئوگلیکان‌ها یافت می‌شود. زنجیرهٔ CS در دستگاه گلژی توسط اصلاح توالی (Sequental modification) پس از پلی‌مریزاسیون واحدهای دی ساکاریدی تکرار شونده گلوکورونیک اسید (GlcUA) و ان- استیل گالاکتوزآمین (GAlNAc) سنتز می‌شود که منتهی به تشکیل ساختار هتروژن متنوع در این پلی ساکاریدها می‌شود (۴-۱). کندروئیتین سولفات گالاکتوزآمینی حاوی گالاکتوزآمینوگلیکان متشکل از ذرات دی ساکاریدی تکرار شونده [→4 GlcUA β1→3 GalNAc β 1→] می‌باشد. ذرات دی ساکاریدی معمولاً در یکی از دو موقعیت C-4 یا C-6 از GalNAc سولفاته شده‌اند (۵). کندروئیتین سولفات A (CS-A) غنی از [GlcUA-GalNAc (4s)] و کندروئیتین سولفات C (CS-C) غنی از [GlcUA-GalNAc (6s)] می‌باشد (۹). هر زنجیره CS می‌تواند مخلوطی از دی ساکاریدهای با طول متفاوت باشد (۱۰). از این رو وزن مولکولی کندروئیتین سولفات طبیعی می‌تواند گسترهٔ متفاوتی (۵۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون) داشته باشد (۱۱).

GAGها در فرآیندهای پاتو فیزیولوژیکی مختلف شامل انعقاد خون، رشد و تمایز سلول، متابولیسم و ترابری لیپیدها، عفونت ویروسی، علامت‌دهی (signaling) سلول به سلول و سلول به ماتریکس، التهاب، آنژیوژنز و سرطان از طریق تعامل با پروتئین‌های مختلف نظیر فاکتورهای رشد، آنزیم‌ها و سایتوکائین‌ها نقش دارند (۱۲). این قابلیت‌های مختلف آنها را قادر ساخته تا در زمینه‌های دارویی، غذایی و آرایشی و بهداشتی نقش داشته باشند (۱۳). کندروئیتین سولفات کاربردهای غذایی و دارویی در درمان آرتروز، عفونت ویروسی هرپس، مالاریا، ترمیم بافت عصبی و باززایی کبد دارد (۱۳). همچنین کندروئیتین سولفات‌ها در ترمیم زخم نیز مؤثرند. این ماکرومولکول‌های با ارزش با تحریک مسیرهای پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) در تسریع ترمیم زخم نقش بسزایی دارند (۱۴). مسیرهای MAPK (Mitogen-activated protein kinase) ایستگاه تقویت و یکپارچه‌سازی سیگنال‌ها برای پاسخ فیزیولوژیک مناسب به طیف متنوعی از محرک‌ها می‌باشند. پاسخ‌های فیزیولوژیک سلولی شامل تکثیر، توسعه، پاسخ التهابی و آپوپتوز در پستانداران می‌باشد (۱۵). کندروئیتین سولفات‌ها باعث تحریک سلول‌های فیبروبلاست به مهاجرت، تکثیر، چسبندگی و رسوب‌گذاری ماتریکس می‌شوند (۱۴). CS مشابه دیگر پلی‌ساکاریدها از منابع جانوری مختلف توسط روش‌های استخراج و تخلیص به‌دست می‌آید (۱۵). تولید تجاری CS متکی به حضور آن در ضایعات گاو، خوک، مرغ،

ماهیان غضروفی مانند کوسه و سفره ماهی می‌باشد (۱۶). با این حال تولید عمدهٔ CS از بافت پستاندارانی چون خوک و گاو صورت می‌گیرد (۱۵ و ۱۷). اما با توجه به وجود بیماری‌هایی چون انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی (BSE) و همچنین سایر بحران‌های غذایی توجه روز افزون مطالعات به اکتشاف میکروارگانیسم‌ها و ارگانیسم‌های دریایی برای یافتن منابع جدید از گلیکوکانژوگه‌ها (Glycoconjugates) معطوف شده است (۲۰-۱۸). دریاها به عنوان منشأ حیات، منبعی بی‌نظیر از محصولات طبیعی را در خود جای داده‌اند. این مواد با ارزش در بدن موجوداتی چون ماهی‌ها، اسفنج‌ها، جلبک‌ها، تونیکات‌ها، بریوزوان‌ها، نرم تنان، سیانوباکتری‌ها و سایر آبزیان نهفته‌اند (۲۱). حال با توجه به اهمیت یافتن داروهای جدید از دریا و همچنین خطرات گلیکوکانژوگه‌های تخلیص شده از منابع حیوانی و به منظور یافتن کندروئیتین سولفاتی با ویژگی‌های جدیدی چون جرم مولکولی و پلی‌دیسپرسیتی متفاوت که به واسطه جایگاه‌های متفاوت اتصال گروه سولفات در فرآیندهای بیوسنتز مرتبط به بافت‌های خاص و گونه‌ها در موجودات مختلف ایجاد می‌شوند (۲۲)، تحقیق حاضر را بر روی ماهی ازون برون (Acipenser stellatus) که یکی از با ارزش‌ترین ماهیان خاویاری دریای خزر می‌باشد اجرایی کردیم. این ماهی به دلیل زودرس بودن بلوغ جنسی از لحاظ استحصال خاویار و فیله ارزشمند بوده و می‌تواند به عنوان یکی از آبزیان پرورشی سودآور مطرح باشد (۲۳ و ۲۴). بنابراین در طی فراوری آن ضایعات زیادی از جمله غضروف، پوست و سر تولید می‌شود که منبع مناسبی از ترکیبات زیست فعال را فراهم می‌سازند. لذا در این مطالعه ضمن جداسازی و شناسایی کندروئیتین سولفات از غضروف ماهی ازون برون *Acipenser stellatus*، اثرات آن بر روی تکثیر سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از پوست انسان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی ستون مهره‌ها

ستون مهره‌ها از بازار محلی لاهیجان تهیه شده و به صورت ایمن و به همراه یخ به مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی کرمانشاه منتقل و در فریزر ۲۰- تا زمان استفاده نگهداری شدند. در زمان آزمایش، آماده سازی غضروف‌ها بر اساس روش ماکاری (Maccari) و همکاران انجام شد. ابتدا پاکسازی‌های اولیه توسط قیچی به منظور جداسازی گوشت و بافت‌های پیوندی اضافه از ستون مهره‌ها صورت گرفت (بر روی یخ)، سپس با آب مقطر و بافر PBS 1X (۰/۱ مولار PH برابر ۷/۶) شستشو داده شدند. در ادامه بافت غضروفی با کاتر کاملاً ریز شده و برای ورود به دستگاه فریز درایر در فریزر ۵۰- درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه جهت هم دمایی با دستگاه نگهداری شدند. پس از خشک شدن به منظور تهیهٔ پودر مناسب از آسیاب صنعتی استفاده شد. پودر غضروفی تا زمان شروع آزمایش در فریزر ۲۰- نگهداری شد (۲۲).

تخلیص کندروئیتین سولفات به روش (Cetyl pyridinium chloride :CPC)

در تخلیص کندروئیتین سولفات به روش CPC از روش ایم (Im) و همکاران استفاده شد. ۰/۲۵ گرم پودر غضروف ماهی خاویاری توسط استون چربی‌زدایی شد و سپس در دمای اتاق برای حذف استون نگهداری گردید و در ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS1X حل گردید و برای انجام تیمار آنزیمی به نسبت ۱ به ۱۰ آنزیم (وزنی - حجمی) به سوبسترا استفاده شد. جهت انجام تیمار آنزیمی از آنزیم‌های تریپسین و پپسین در بازه‌های زمانی ۱۲ و ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ °C استفاده گردید (۲۵). سپس به مدت ۱۰ دقیقه تیمارها جوشانده شدند و به فیلترا تری کلرواستیک اسید ۶/۱ M تا حجم نهایی ۵ درصد حجمی- حجمی اضافه شد. پروتئین‌های

موجود در پلیت با دور ۱۲۰۰ rpm در مدت زمان ۳۰ دقیقه و در دمای منهای ۴°C سانتریفیوژ شدند. پس از رسوب دادن مایع رویی این مرحله به کمک اتانول ۸۰ درصد مجدداً سانتریفیوژ شد (مطابق شرایط قبل). پلیت در این مرحله خشک و سپس در آب حل و با محلول ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC) با حجم نهایی ۱ درصد وزنی – حجمی مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. مجدداً سانتریفیوژ با شرایط قبلی صورت گرفت و رسوب نگهداری گردید. پلیت در محلول ۲/۵ مولار کلرید سدیم حل و توسط اتانول ۸۰ درصد حجمی – حجمی رسوب داده شد و مجدداً سانترفیوژ صورت گرفت. رسوب نهایی در آب حل و سپس به مدت ۲ روز با کیسه دیالیز ۳/۵ کیلو دالتونی (سیگما آلدریچ) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز شد. در نهایت رسوب نهایی لیوفیلیزه شد (۲۶).

الکتروفورز SDS-PAGE

جهت انجام الکتروفورز (SDS-PAGE) از ژل آکریل آمید با غلظت ۱۲/۵ درصد در بافر تریس– سدیم دو دسیل سولفات با pH، ۸/۸ استفاده شد. نمونه‌ها در بافر تریس– گلایسین با pH ۳/۸ (بافر الکترود) به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۵۰ ولت و سپس در ۱۵۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز گردید. ژل با رنگ کوماسی آبی R-۲۵۰ به مدت ۲ ساعت روی شیکر رنگ‌آمیزی شد. در ادمه برای رنگ‌بری شستشو با آب و پس از آن چندین بار رنگ‌بری توسط محلول رنگ بر (متانول، اسید استیک گلاسیال و آب مقطر به نسبت ۸:۱:۱ حجمی) صورت گرفت. پس از شفاف شدن زمینه، ژل برای بررسی‌های بیشتر در اسید استیک نگهداری شد (۲۷).

الکتروفورز PAGE

جهت انجام الکتروفورز (PAGE) از ژل‌هایی با غلظت ۷/۵ درصد در HCL Tris- با pH ۸/۸ استفاده شد. نمونه‌ها در بافر تریس– گلایسین pH ۸/۳ (بافر الکترود) به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۵۰ ولت و سپس در ۱۵۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز گردید. ژل با رنگ آلسیان بلو به مدت ۵۰ دقیقه و سپس رنگبری با اسید استیک ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه برای بررسی آماده شد (۲۸).

جداسازی فیبروبلاست از پوست انسان

برای بدست آوردن فیبروبلاست انسانی از پوست ختنه گاه نوزاد استفاده گردید. پوست در محیط DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و استرپتومایسین) و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه کشت سلولی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه منتقل شد. برای جداسازی سلول‌ها محلول DMEM از محیط پوست خارج و با FBS شستشو داده شد. سپس اپیدرم در طی چند مرحله با تیمار آنزیمی اکتینیدین و تریپسین جدا شد. درم به قطعات کوچک‌تر از ۱ میلی‌متر به وسیله قیچی تقسیم و در فلاسک‌های ۵۰ میلی‌لیتری کشت داده شد. فلاسک‌ها به انکوباتور (دمای ۳۷ °C و ۵ درصد دی اکسید کربن) منتقل شدند. سپس محیط کشت کامل محتوی DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum)، L-gluamine، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به فلاسک اضافه شد. پس از آن سلول‌های کشت داده شده هر سه روز یکبار تغذیه شدند. پس از به هم پیوستگی کلونی‌ها با استفاده از آنزیم تریپسین و اکتینیدین فیبروبلاست‌ها از سایر سلول‌ها جدا شدند و پس از تهیهٔ سوسپانسیون و سانتریفیوژ فیبروبلاست‌ها جمع و در فلاسکی دیگر کشت داده شدند (۲۶).

کشت سلول‌های فیبروبلاست

فیبروبلاست‌ها در دمای ۳۷°c، ۹۵ درصد هوا، ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت نگهداری

شدند. برای کشت آنها از محیط کشت DMEM (سیگما آلدریچ) با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) حاوی ۲۵ میلی‌مولار HEPES، ۱۰۰ واحد بر مول پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین رشد داده شدند (۲۶).

سنجش MTT

ابتدا cells/well ۵×۱۰۳ از سلول‌های فیبروبلاست درون پلیت ۹۶ خانه‌ای به همراه محیط کشت DMEM و ۱ درصد FBS (محیط کشت حداقل) به مدت ۲۴ ساعت برای رشد و چسبندگی اولیه کشت شدند. سپس سلول‌ها را با نمونه‌های تخلیص شده از غضروف در غلظت‌های مختلف صفر (کنترل)، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شده و مجدداً در دمای ۳۷°c انکوبه گردیدند. میزان سمیت پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سنجیده شد. سپس محیط کشت قدیمی دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰میکرولیتر از MTT (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS) اضافه شده و به مدت ۲ تا ۴ ساعت در دمای ۳۷°c و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد. پس از خارج کردن MTT به هر چاهک DMSO اضافه و میزان جذب آنها با میکروپلیت خوان در ۶۳۰ نانومتر قرائت گردیدند (۲۶).

آنالیز طیف FT-IR

ساختار مواد و شناسایی گروه‌های عاملی روی ترکیبات استخراج شده از طریق طیف سنج مادون قرمز (USA، BIO-RAD، FTS-165) در محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} صورت گرفت. به این منظور مقدار مشخصی از ماده به طور کامل، به صورت قرصی با KBr با نسبت وزنی ۱:۱۰۰ مخلوط شد (۲۲).

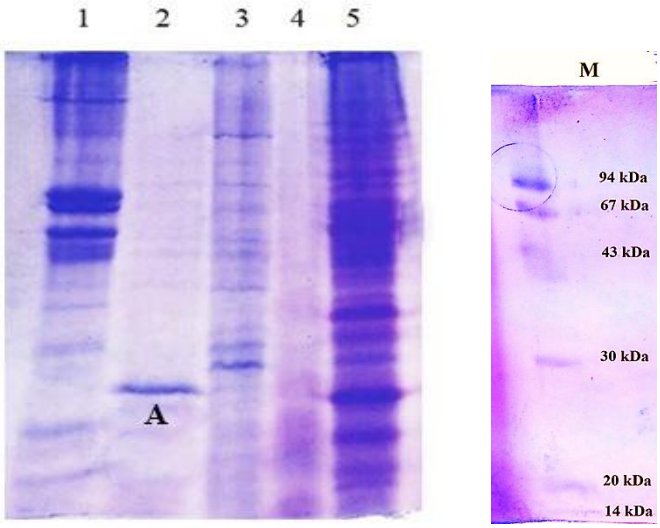
آنالیز آماری

داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷ و آنالیز یکطرفه ANOVA درسطح خطای ۰/۰۵ و با آزمون تعقیبی توکی تحلیل گردیدند و نمودارها توسط نرم‌افزار EXCEL رسم شدند.

یافته‌ها

نتایج الکتروفورز SDS-PAGE

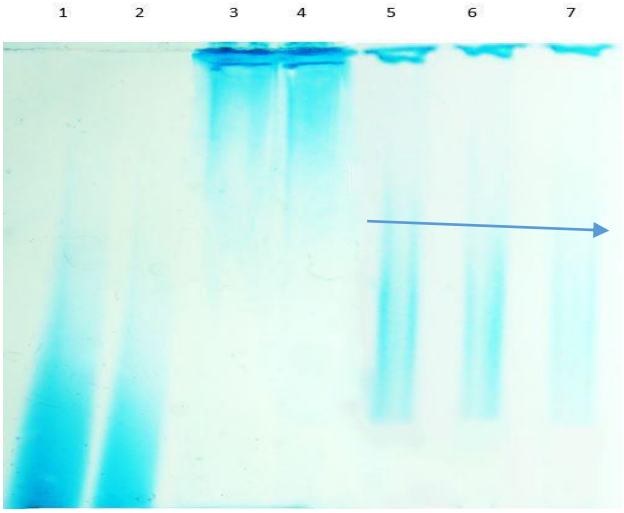
در استخراج CS با روش آنزیمی از آنزیم‌های اندوپروتئیناز تریپسین و پپسین استفاده شد. بدین منظور از بین چهار تیمار آنزیمی مختلف (تریپسین ۱۸h، ترپسین ۱۲h، پپسین ۱۸h و پپسین ۱۲h) تیمار ۱۸ ساعته با آنزیم تریپسین با توجه به الگوی الکتروفورز برگزیده شد. در الگوی الکتروفورز (شکل ۱) به خوبی می‌توان تفاوت ستون ۲ (ترپسین ۱۸ ساعته) که ناشی از هضم آنزیمی قوی تریپسین می‌باشد را با سایر ستون‌ها (۵-۳) مشاهده کرد. تک باند موجود در ستون ۲ که با حرف A نشان داده شده است مربوط به خود آنزیم تریپسین است که با توجه به مارکر، وزنی در حدود kDa ۲۷را دارا می‌باشد. تفاوت اندکی در وزن مولکولی تریپسین در ژل با وزن مولکولی استاندارد (۲۳kDa) در کاتولوگ‌های اوزان مولکولی مشاهده شده که این امر می‌تواند ناشی از شرایط حاکم بر انجام الکتروفورز باشد. افزایش باندها در ستون ۳، ۴ و ۵ ناشی از هضم ناقص پروتئین‌های غضروف توسط آنزیم است.



شکل ۱) الگوی الکتروفورز SDS-PAGE (۱۲/۵ درصد) تیمارهای آنزیمی غضروف ماهی خاویاری ازون برون (*Acipenser stellatus*) رنگ‌آمیزی شده با کوماسی آبی R-۲۵۰. ستون ۱: غضروف هضم نشده، ستون ۲: غضروف تیمار شده با ترپسین (۱۸h)، ستون ۳: غضروف تیمار شده با پپسین (۱۲h)، ستون ۴: غضروف تیمار شده با تریپسین (۱۲h)، ستون ۵: غضروف تیمار شده با پپسین (۱۸h). ستون M: شامل مارکرهای وزنی.

نتایج الکتروفورز PAGE کندروئیتین سولفات استخراج شده

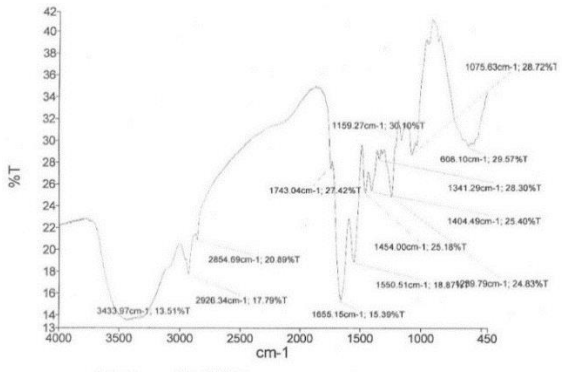
برای تأیید حضور کندروئیتین سولفات استخراج شده در رسوب نهایی و بدست آوردن وزن مولکولی تقریبی آن از روش الکتروفورز PAGE استفاده شد (شکل ۲). بازده کندروئیتین سولفات به روش CPC بر اساس وزن خشک پودر غضروف حدود ۴/۷۶ درصد تخمین زده شد. کندروئیتین سولفات استخراج شده با وزن مولکولی ۴۵-۴۰ کیلو دالتون (ستون‌های ۵، ۶ و ۷ با غلظت‌های متفاوت ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و وزن مولکولی گلیکوزآمینوگلیکان (ستون ۴)، برابر با ۴۰ کیلودالتون ارزیابی گردید.



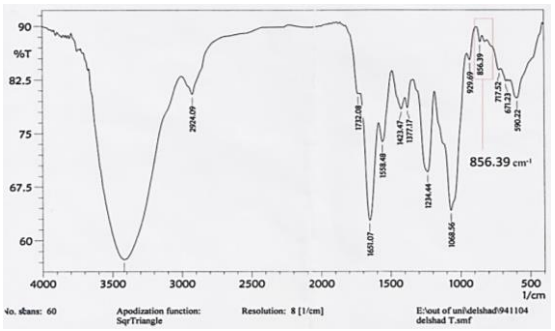
شکل ۲) الگوی الکتروفورز PAGE (۷/۵ درصد) کندروئیتین سولفات تخلیص شده از غضروف ماهی خاویاری ازون برون (*Acipenser stellatus*) رنگ‌آمیزی شده با آلسیان بلو. ستون ۱و۲) مارکر هپارین (وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون) به ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر. ستون۳: محتوای گلیکوزآمینوگلیکانی (GAGs) کل غضروف ازون برون حل شده در تریس ـ باز (وزن تقریبی ۶۰ کیلودالتون). ستون ۴: محتوای گلیکوزآمینوگلیکانی (GAGs) کل غضروف ازون برون محلول دربافر BS 1X (وزن تقریبی ۶۰ کیلو دالتون). ستون‌های ۵، ۶ و ۷: کندروئیتین سولفات استخراج شده با وزن مولکولی ۴۵-۴۰ کیلو دالتون (بر اساس الگوی الکتروفورز و مارکر وزنی)به ترتیب در غلظت‌های ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر.

نتایج آنالیز FT-IR

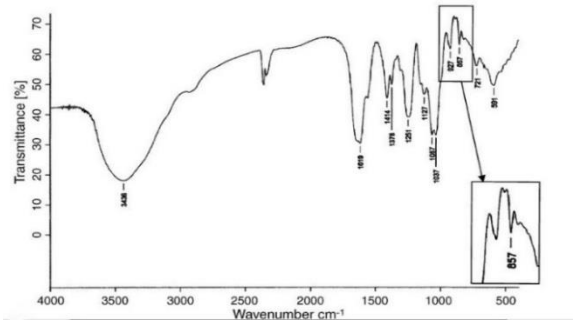
به منظور تأیید کندروئیتین سولفات استخراجی از غضروف از آنالیز FT-IR استفاده شد. در نمودار آنالیز اسپکتروسکوپی مادون قرمز گروه‌های عاملی کندروئیتین سولفات موجود در نمونه تخلیص شده غضروف ماهی ازون برون به روش CPC مشخص شده‌اند (نمودار ۱ ب). باندهای حاصله: ناحیهٔ بالای ۲۰۰۰ نانومتر که گروه عاملی هیدروکسیل؛ ۱۶۵۱/۰۷ نانومتر گروه آمیدی؛ ۱۲۳۴/۴۴ نانومتر گروه عاملی سولفوکسید؛ ۸۵۶/۳۹ نانومتر ارتعاش کششی گروه عاملی C-O-S؛ ۱۱۵۰ و ۱۰۵۰نانومتر ارتعاش کربن- کربن و ۱۴۲۳/۴۷ و ۱۳۷۷/۱۷ نانومتر کربن- هیدروژن را نشان می‌دهند. نواحی آشکار شده بر روی طیف FTIR کندروئیتین سولفات استخراجی از غضروف مشابه با نواحی طیفی FTIR حاصله از کندروئیتین سولفات استاندارد (C4S: Sigma) می‌باشد.



(الف)



(ب)



(ج)

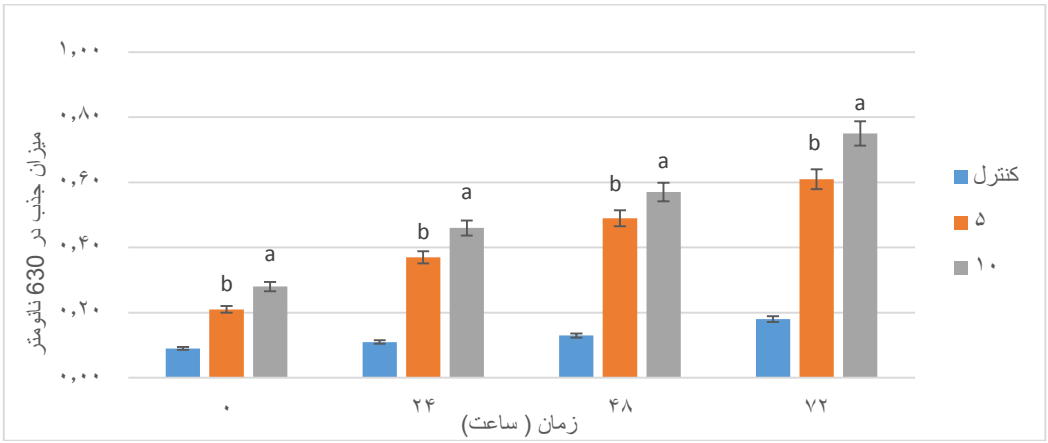
نمودار ۱) طیف FT-IR: الف) غضروف هضم نشده ازون برون. ب) کندروئیتین سولفات تخلیص شده از غضروف ماهی خاویاری ازون برون. ج) کندروئیتین ۴- سولفات استاندارد (سیگما) (۷).

Fig 1) FTIR spectrum. A) Undigested cartilage. B) Purified chondroitin sulfate from sturgeon cartilage.C) Chondroitin 4 sulfate Standard (Sigma).

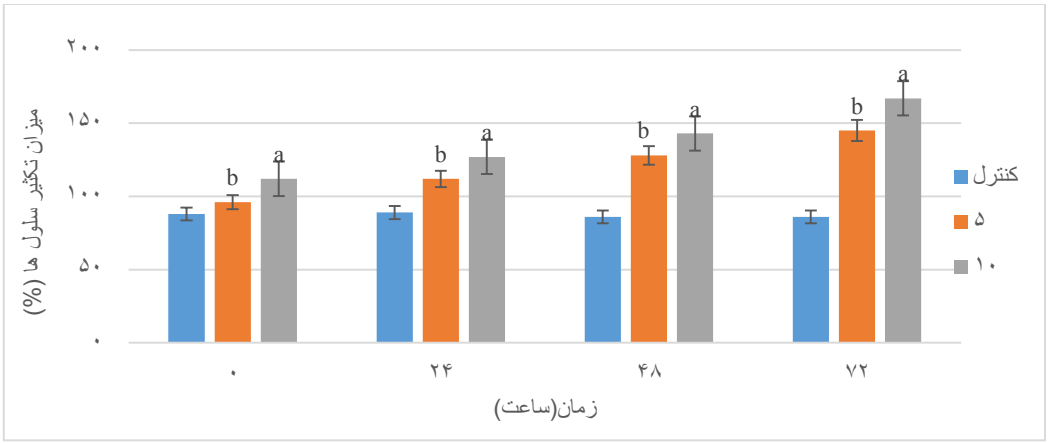
نتایج MTT

در تست MTT از CS تخلیص شده با روش CPC در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای تیمار فیبروبلاست‌ها استفاده شد. نتایج سنجش MTT، سمیت نداشتن و افزایش تکثیر سلول‌ها در غلظت‌های مختلف نسبت به کنترل را نشان داد. (نمودار ۲).

میزان تکثیر سلول‌های فیبروبلاست در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در تمام زمان‌های انکوباسیون به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کندروئیتین سولفات بود که در نمودار، حروف مختلف معنی‌دار بودن این تفاوت را نشان می‌دهند (P≤۰/۰۵). تکثیر سلول‌های فیبروبلاست پس از ۲۴ ساعت به ۱۱۲ و ۱۲۷ درصد به ترتیب در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر لیتر رسید. افزایش وابسته به غلظت در زمان‌های متفاوت در میزان تکثیر سلولی مشاهده گردید به طوری که میزان تکثیر سلول‌های فیبروبلاست پس از ۷۲ ساعت به مقدار ۱۶۷ درصد رسید.



(الف)



(ب)

نمودار ۲) القای تکثیر سلولی توسط کندروئیتین سولفات تخلیص شده (غلظت ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از غضروف ماهی خاویاری ازون برون (*Acipenser stellatus*) الف) میزان جذب تیمارها در ۶۳۰ نانومتر در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲. ب) درصد تکثیر سلول‌ها بر حسب زمان کشت ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. حروف مختلف معنی‌دار بودن را در سطح P≤۰/۰۵ نشان می‌دهد، نتایج به صورت درصد تکثیر در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

Fig 2) induction of cell proliferation by purified chondroitin sulfate (5 and 10 µg / ml) from the *Acipenser stellatus*. A) Absorbance of the treatments at 630 nm at 0, 24, 48 and 72 days. B) Percentage of cell proliferation according to the culture time of 0, 24, 48 and 72 hours. Different letters show significant at P≤0.05. The results were reported as percentage of prolifration in comparison with controls and were reported as mean ± standard deviation.

بحث

در تخلیص کندروئیتین سولفات از غضروف ماهیان خاویاری و کوسه‌ها از هضم آنزیمی استفاده شده است. پروتئینازها به وبژه آنزیم‌های اگزوپروتئیناز از جمله پاپایین بیشترین کاربرد را دارند (۵ و ۳۱-۲۹). در مطالعه انجام شده بر روی غضروف بالهٔ کوسه، غضروف کروکودیل (نای، جناغ سینه، و دنده) و جناغ مرغ، جهت تیمار آنزیمی از پاپائین به مدت ۴۸h در دمای ۶۵°C استفاده شد (۷). بیشترین بازده تخلیص از آنزیم پاپائین به مدت ۱۲h و دمای ۶۰°C در غضروف و ستون مهره‌های ماهی خاویاری A. siensis گزارش شده است (۲۶). ماکاری نیز از پاپائین بر روی استخوان ماهی خاویاری به مدت ۲۴h در دمای ۶۰°C برای انجام تیمار آنزیمی استفاده کرد (۲۲).

گلیکوزآمینوگلیکان‌ها را می‌توان با آنزیم‌های اندوپروتئینازی که در خود بافت نیز وجود دارند به حالت اتولیز از پروتئین‌های متصل به آن جدا کرد (۳۱). در مطالعه حاضر تیمار آنزیمی با آنزیم اندوپروتئیناز پپسین و تریپسین انجام گرفت. بهترین تیمار آنزیمی با تریپسین در مدت ۱۸h و دمای ۳۷°C حاصل شد. تریپسین ۱۸ ساعته بطور بهینه قادر به حذف پروتئین از بافت غضروف خرد شده بود. در این روش دسته‌ای از پروتئین‌های سبک‌تر ناشی از شکست پروتئین‌های سنگین در تیمارهای تریپسین ساعت ۱۲، پپسین ۱۲ ساعت و ۱۸ ساعت ایجاد شدند که انتظار می‌رود از دسته پپتیدهای زیست فعال باشند (۲۲).

به منظور جداسازی و ترکیب قندها بویژه ترکیبات پلی آنیونی گلیکوزآمینوگلیکان از اتانول ۸۰ درصد استفاده شده است (۲۶ و ۲۹). استفاده از سیتیل پیریدنیوم کلراید (Cetyl pyridinium chloride) جهت تشکیل کمپلکس با پلی آنیون‌ها در خالص سازی کندروئیتین سولفات (CS-CPC) صورت گرفته است (۲۸).

بازدهی در روش تخلیص با CPC در مطالعه بر غضروف و ستون مهره‌های ماهی خاویاری گونه *Acipenser sinensis* به ترتیب ۱۰/۵ درصد و ۱۳/۳ درصد ثبت شده است. در مطالعه حاضر بر ستون مهره‌ها بازدهی با سه تکرار ۴/۷۶ درصد به‌دست آمد. این بازدهی اندک می‌تواند به علت استفاده از آنزیم تریپسین باشد، که یک اندوپروتئیناز است و نسبت به پاپایین قطعات پپتیدی کوچک‌تری ایجاد می‌کند؛ زیرا، کندروئیتین سولفات می‌تواند به این قطعات پپتیدی متصل شود و در مرحله رسوب با TCA خارج گردد (۳۲). روش اسپکتوفتومتری FT-IR برای کنترل کیفیت CS استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت. در طیف سنج مادون قرمز (FT-IR) کندروئیتین سولفات تخلیص شده از ماهی ازون برون، حضور پیک در محدوده ۲۰۰۰ cm-1 که نشان دهنده ارتعاش کششی گروه OH می‌باشد، به خوبی مشهود است. این ناحیه در استخراج کندروئیتین از بسیاری منابع مانند جناغ مرغ وغضروف کوسه ماهیان نیز گزارش شده است (۷ و ۳۳). طیف FT-IR کندروئیتین ۴- سولفات و کندروئیتین ۶- سولفات استاندارد باپیک‌های شاخصی به ترتیب، در طول موج ۸۵۷ و ۸۲۶c نانومتر آورده شده است.

بر این اساس پیک ۸۵۷ نانومترمی‌تواند برای شناسایی کندروئیتین ۴- سولفات و پیک ۸۲۶ نانومتر برای شناسایی کندروئیتین ۶- سولفات استفاده شود (۷). در طیف FT-IR مطالعه حاضر پیکی در طول موج ۸۵۶-۳۹ نانومتر نشان داده شده است که بیانگر نوع کندروئیتین سولفات تخلیص شده به عنوان کندروئیتین ۴- سولفات (MW:۴۰ kDa) است و وزن مولکولی تقریبی به‌دست آمده با کندروئیتین سولفات خالص شده از غضروف نهنگ مشابهت دارند (۳۴). کندروئیتین ۴- سولفات (CS-A) غنی از [GlcA-Gal NAc] (4s)

می‌باشد که نقش مهمی در فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و پیشگیری از تصلب شرائین ایفا می‌کند (۳۵).

در این تحقیق اثرات تحریکی CS بر روی القا تکثیر سلول به خوبی نشان داد که در روند ترمیم زخم ماتریکس پوست آسیب دیده توسط ماتریکس جدید غنی از کلاژن که توسط فیبروبلاست‌های مهاجر به محل زخم سنتز شده‌اند، قادر به جایگزین شدن می‌باشند. CS باعث تحریک مسیرهای MAPK که احتمالاً به‌طور معمول با آسیب و تکثیر انواع سلول‌های خاص مرتبط‌اند، می‌شود (۳۶ و ۳۷). در بین مسیرهای مختلف MAPK، مسیر ERK1/2 نقش مهمی در تکثیر و تمایز سلولی ایفا می‌کند (۳۶ و ۳۸). در این مطالعه کندروئیتین سولفات می‌تواند باعث تحریک فیبروبلاست‌ها گردد فیبروبلاست جدا شده از پوست، در غلظت‌های بکار برده شده (۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) توانست رشد سلول‌های فیبروبلاست را افزایش دهد که این افزایش وابسته به دوز بوده ودر غلظت ۱۰میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). نتایج به‌دست آمده از آزمون سمیت سلولی (MTT) حاکی از افزایش قابل توجه تکثیر سلولی در پاسخ به کندروئیتین سولفات بود که نتایج مشابهی در تأثیر کندروئیتین استخراجی از گونه ماهی خاویاری *Acipenser sinensis* بر روند ترمیم زخم و رشد سلول‌های فیبروبلاست گزارش شده است (۳۶). بنابراین کندروئیتین سولفات می‌تواند به عنوان یک بیومواد برای ترمیم وجایگزینی بافت‌های صدمه دیده غضروفی، استخوانی وپوست پیشنهاد شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد که ماهی خاویاری ازون برون (*A. stellatus*) منبع غنی کندروئیتین سولفات می‌باشد. نتیجهٔ طیف FT-IR و الگوی الکتروفورز حضور کندروئیتین سولفات استخراج شده از نوع کندروئیتین ۴- سولفات را آشکار می‌نماید. بر اساس نتایج این مطالعه کندروئیتین سولفات تخلیص شده از غضروف ماهی خاویاری ازون برون این پتانسیل را دارد که در بالابردن تکثیر فیبروبلاست و درمان زخم مؤثر باشد. همچنین کندروئیتین سولفات تخلیص شده در این مطالعه می‌تواند جایگزین ارزشمندی برای CS تجاری در دسترس که به‌طور عمده از غضروف نهنگ و خوک بدست می‌آید، باشد.

سپاس و قدردانی

این مطالعه حاصل پایانامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان بود که با حمایت آن واحد و مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد..

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Roden L. Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans. The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans. In: Lennarz WJ, editors. Plenum Press: New York, 1980, 267-371.

2.Beaty N, Mello RT. Extracellular mammalian polysaccharides: Glycosaminoglycans and proteoglycans. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1987; 418: 187-222.

3.Nakano T, Dixon WT, Ozimek L. Proteoglycan (Glycosaminoglycans/ Mucopolysaccharides). Biopolymers. In: Steinbüchel A, editors. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim: Germany, 2002, 575-604.

4.Vynios DH, Karamanos NK, Tsiganos CP. Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological states of connective tissues. J

Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 781(1-2): 21-38.
5.Nakano T, Betti M, Pietrasik Z. Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans. Recent Pat Food Nutr Agric 2010; 2(1): 61-74.
6.Deepa SS, Kalayanamitra K, Ito Y, et al. Novel sulfated octa- and decasaccharides from squid cartilage chondroitin sulfate-E: sequencing and their application for determination of the epitope structure of monoclonal antibody MO-225. Biochemistry 2007; 46(9): 2453-65.
7.Garnjanagoonchorn W, Wongekalak L, Engkagul A. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. Chem Eng Process: Process Intensification 2007; 46(5): 465-71.
8.Zhang F, Xie J, Linhardt RJ. Isolation and structural characterization of glycosaminoglycans from heads of red salmon (Oncorhynchus nerka). Jacobs J Biotechnol Bioeng 2014; 19(1): 002.
9.Lamari FN, Karamanos NK. Structure of chondroitin sulfate. Chondroitin sulfate: Structure, role and pharmacological activity, advances in pharmacology. In: Volpi N, editor. Academic Press: San Diego, 2006, 33-48.
10.Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. J Pharm Pharmacol 2009; 61(10): 1271-80.
11.Tat SK, Pelletier JP, Mineau F, et al. Variable effects of 3 different chondroitin sulfate compounds on human osteoarthritic cartilage/chondrocytes: relevance of purity and production process. J Rheumatol 2010; 37(3): 656-64.
12.Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. Angew Chem Int Ed Engl 2002; 41(3): 391-412.
13.Yamada S, Sugahara K. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. Curr Drug Discov Technol 2008; 5(4): 289-301.
14.Kuhn MA, Smith PD, Hill DP, et al. In vitro fibroblast populated collagen lattices are not good models of in vivo clinical wound healing. Wound Repair Regen 2000; 8(4): 270-6.
15.Vazquez JA, Rodriguez-Amado I, Ignacia Montemayor MI, et al. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and eco-friendly processes: a review. Mar Drugs 2013; 11(3): 747-74.
16.Luo XM, Fosmire GJ, Leach RM. Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate. Poult Sci 2002; 81(7): 1086-9.
17.Axelsson I, Heinegard D. Characterization of chondroitin sulfate-rich proteoglycans from bovine corneal stroma. Exp Eye Res 1980; 31(1): 57-66.
18.Mourao PA. Perspective on the Use of sulfated polysaccharides from marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. Mar Drugs 2015; 13(5): 2770-84.
19.Seno N, Meyer K. Comparative biochemistry of skin the mucopolysaccharides of shark skin. Biochim Biophys Acta 1963; 78: 258-64.
20.Vieira RP, Mourao PA. Occurrence of a unique fucosebranched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber. J Biol Chem 1988; 263(34): 18176-83.
21.Kinoshita-Toyoda A, Yamada S, Haslam SM, et al. Structural determination of five novel tetrasaccharides containing 3-O-sulfated D-glucuronic acid and two rare oligosaccharides containing a β-D-glucose branch isolated from squid cartilage chondroitin sulfate E. Biochemistry 2004; 43(34): 11063-74.
22.Maccari F, Ferrarini F, Volpi N. Structural characterization of chondroitin sulfate from sturgeon bone. Carbohydr Res 2010; 345(11): 1575-80.
23.Williot P, Sabeau L, Gessner J, et al. Sturgeon farming in Western Europe: recent developments and perspectives. Aquat Living Resour 2001; 14(6): 367-74.
24.Norouzi M, Pourkazemi M, Fatemi M. Application of microsatellite markers to study the genetic structure of stellate sturgeon populations (*Acipenser stellatus Pallas*, 1771) in the south Caspian Sea. Iran J Fish Sci 2009; 8(1): 73-84.
25.Im AR, Sim R, Park JS, et al. Isolation and characterization of chondroitin sulfates from the by-products of marine organisms. Food Sci Biotechnol 2009; 18(4): 872-7.
26.Im AR, Park Y, Kim YS. Isolation and characterization of chondroitin sulfates from sturgeon (*Acipenser sinensis*) and their effects on growth of fibroblasts. Biol Pharm Bull 2010; 33(8): 1268-73.

27.Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. Nature 1970; 227(5259): 680-5.
28.Mostafaei, A. Theoretical and practical guide of gel electrophoresis of proteins. 2nd ed. Yadavaran: Tehran, 2003, 19-34. (Persian)
29.Rodén L, Baker JR, Cifonelli JA, et al. Isolation and characterization of connective tissue polysaccharides. Method enzymol 1972; 28: 73-140.
30.Taniguchi N. Isolation and analysis of glycosaminoglycans. glycosaminoglycans and proteoglycans in physiological and pathological processes of body systems. In: Varma RS, Varma R, editors. Karger: Basel, 1982; 20-40.
31.Silva LCF. Isolation and purification of chondroitin sulfate. chondroitin sulfate: Structure, role and pharmacological activity, advances in pharmacology. In: Volpi N, editors. Academic Press: San Diego, 2006, 21-31.
32.Nakano T, Nakano K, Sim JS. Extraction of glycosaminoglycan peptide from bovine nasal cartilage with 0.1M sodium acetate. J Agric Food Chem 1998; 46(20: 772-8.
33.Yang H, Liu S, Cai H, et al. Chondroitin sulfate as a molecular portal that preferentially mediates the apoptotic killing of tumor cells by penetratin-directed mitochondria-disrupting peptides. J Biol Chem 2010; 285(33): 25666-76.
34.Foot M, Mulholland M. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate. J pharm Biomed Anal 2005; 38(3): 397-407.
35.Sugahara K, Masuda M, Harada T, et al. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin sulfate proteoglycans of whale cartilage. Eur J Biochem 1991; 202(3): 805-11.
36.Syrokou A, Tzanakakist G, Tsegenidis T, et al. Effects of glycosaminoglycans on proliferation of epithelial and fibroblast human malignant mesothelioma cells: a structure-function relationship. Cell Prolif 1999; 32(2-3): 85-99.
37.Vazirizadeh A, Naderi-Manesh H, Bargahi A, et al . Impacts of Persian Gulf blackfin stonefish crude venom on the haematological factors and serum enzymes levels of laboratory rat ,ISMJ 2014; 17(4): 723-732
38.Marques J, Vilanova E, Mourão PA, et al. Marine organism sulfated polysaccharides exhibiting significant antimalarial activity and inhibition of red blood cell invasion by Plasmodium. Sci Rep 2016; 6: 24368.

Original Article

Extraction of Chondroitin Sulfate From Cartilage Sturgeon, Stellate Sturgeon (*Acipenser stellatus) and* its Inductive Effect on Human Fibroblast Proliferation

S. Delshad (Msc)[1,2], K. Karimzadeh (PhD) [2*], A. Mostafaie (PhD [3]

[1] Young Researchers and Elite Club, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
[2] Department of Marine Biology, School of Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
[3] Department of Immunology, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received 25 Oct 2016 Accepted 21 Feb 2017)

Abstract

Background: Chondroitin sulfates (CS) is one of the essential glycosaminoglycan's which is found in sturgeon fishes and exists in the cartilage part of these fishes. In addition to food and cosmetic industries, these compounds have significant medical and clinical applications, mainly in the treatment of arthritis and wound healing.

Materials and Methods: In this study, the chondroitin sulfate extraction was performed using pepsin and trypsin enzyme digestions in 12 and 18 hours intervals followed by cationic salt, cetyl pyridinium chloride (CPC) treatment. To investigate the effect of Chondroitin sulfate on induction of proliferation of fibroblasts isolated from human skin, MTT assay method was used, which was applied at different incubation times (24, 48 and 72 h). To determine the proper time and enzymatic digestion, after temperature treatment of samples using pepsin and trypsin enzymes, the SDS-PAGE electrophoresis was used. Moreover, the FT-IR analysis was performed to characterize the type of CS.

Results: The maximum yield of enzymatic digestion was observed for trypsin digestion at 18h, according to electrophoresis patterns. The amount of CS yield was estimated at 4.76% in this situation. FT-IR analysis revealed that the CS belongs to the C4S type. Chondroitin sulfates extracting from cartilage showed the concentration-dependent effect on fibroblast cell proliferation. This dose-response effect showed 167% increase in proliferation at 10 µg/ml dose of CS compared to the control in fibroblast cells.

Conclusion: Extracted CS has a positive stimulatory effect on fibroblast cells proliferation in a dose-dependent manner. So it can be used for fibroblast prolioferation induction for wound healing and repairing damaged tissues.

Key word: Cell proliferation, Cartilage, Chondroitin sulfate, Acipenser stellatus

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Delshad S, karimzadeh k, Mostafaie A. Extraction of Chondroitin Sulfate From Cartilage Sturgeon, Stellate Sturgeon (Acipenser stellatus) and its Inductive Effect on Human Fibroblast Proliferation. Iran South Med J 2017; 20(4): 349-361

Copyright © 2017 Delshad, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*]*Address for correspondence:* Department of Marine Biology, School of Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran. Email: karimzadehkathy@yahoo.co.uk