دوفصلنامه طب جنوب
پژوهشكده زيست- پزشكي خليج فارس
مركز تحقيقات طب گرمسيري و عفوني خليج فارس
دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي درماني بوشهر
سال دهم، شماره ۱، صفحه ۸ - ۱ (شهريور ۱۳۸۶)

بررسي تأثير ضد رگزايي پروتئين‌هاي استخراج شده از غضروف كوسه ماهي بر غشاء كوريوآلانتوئيک جنين جوجه

دكتر افشار بارگاهي[۱] ، دكتر عذرا رباني چادگاني*[۲]

[۱] دكتراي بيوشيمي، پژوهشگر مركز تحقيقات طب گرمسيري و عفوني خليج فارس، بوشهر
[۲] استاد بيوشيمي، مركز تحقيقات بيوشيمي و بيوفيزيک، بخش بيوشيمي، دانشگاه تهران

چكيده

زمينه: از مدت‌ها پيش غضروف كوسه ماهي به عنوان يک ماده ضد رگزاي طبيعي در طب سنتي مطرح بوده و جهت آن خواصي از جمله مهار چسبندگي، تكثير، مهاجرت سلول‌هاي اندوتليال و هضم وتجزيه ماتريكس خارج سلولي گزارش شده است. لذا به دليل كاربرد درماني وسيع آن در كنترل رگزايي، هدف تحقيق حاضر، بررسي خواص پروتئين‌هاي فعال و ضد رگزاي مربوطه مي‌باشد.

مواد و روش‌ها: پروتئين‌هاي بافت غضروف در بافر استات سديم ۱۰۰ ميلي‌مولار با pH=۴/۸ حاوي گوانيدين هيدروكلراید ۴ مولار و در حضور مخلوطي از مهاركنندگان آنزيمي استخراج گرديد. پس از كروماتوگرافي نمونه بر روي ستون هاي تعويض آنيون و كاتيون، پروتئين‌ها تفكيک و جهت ارزيابي رگزايي (شامل ضخامت و تعداد عروق، تعداد و شدت خمش شاخه‌هاي فرعي و رنگ غير طبيعي غشاء) در مدل غشاء كوريوآلانتوئيک جنين تخم مرغ به كار گرفته شدند.

يافته‌ها : بيشترين فعاليت ضد رگزايي در نمونه A_1 استخراج شده از غضروف كوسه ماهي نسبت به گروه شاهد و نيز ساير گروه‌هاي مورد آزمايش مشاهده شد. بررسي محتواي پروتئيني نمونه فعال A_1 بر روي ژل الكتروفورز، وجود پروتئين‌هايي با وزن مولكولي ۱۶- ۱۴ كيلودالتون را نشان داد.

نتيجه‌گيري: پروتئين‌هايي از غضروف كوسه ماهي خليج فارس داراي اثرات ضدرگزايي مي‌باشند. لذا با توجه به اهميت و ضرورت تحقيق در زمينه درمان بيماري‌هاي ناشي از رگزايي، اين پروتئين‌ها جهت انجام مطالعات مولكولي بيشتر و كاربرد و طراحي دارويي در درمان بيماري‌هاي ذيربط, مي‌بايست مورد توجه قرار گيرند.

واژگان كليدي: رگزايي، غضروف، كوسه ماهي, سرطان
دريافت مقاله:۴ /۱۳۸۶/۳ - پذيرش مقاله: ۱۳۸۶/۱۰/۲۳

* مركز تحقيقات بيوشيمي و بيوفيزيک، بخش بيوشيمي، دانشگاه تهران، تهران، ايران صندوق پستي ۱۳۱۸۴-۱۳۱۴۵، تلفن: ۶۶۴۹۹۴۲۲-۰۲۱
Email: rabbani@ibb.ut.ac.i

مقدمه

شناخت فرايند رگزايي يا آنژيوژنز با مطالعات ابتدايي كلارک (Clark) و همكارانش آغاز گرديد (۱). رگزايي به صورت رشد رگ‌ها و عروق جديد به روش شاخه‌زايي از منشاء رگ‌هاي قبلي توأم با ايجاد كانال‌ها و ارتباطات بين عروقي تعريف مي‌شود (۲). ايجاد رگزايي در مواقعي، از جمله در حين رشد و نمو، بخصوص در دوران جنيني و يا در پاسخ به شرايط موضعي از جمله كمبود اكسيژن بافتي و مواد غذايي رخ مي‌دهد، ولي نوع غير طبيعي و كنترل نشده آن اغلب در شرايط بيماري‌هايي نظير آنژيوما، مهاجرت تومورها و انواع بيماري‌هاي رتينوپاتي چشمي و ساير نارسايي‌هاي عروقي مشاهده مي‌گردد. لذا با شناخت فرايند رگزايي و عوامل ايجاد آن مي‌توان طيف وسيعي از بيماري‌هاي مرتبط با رگزايي را كنترل و يا درمان نمود (۳). تا كنون تحقيقات زيادي در جهت شناخت و توليد مواد ضد رگزايي مصنوعي و يا استخراج مواد ضدرگزا از منابع طبيعي و طراحي روش-هاي ويژه جهت انتقال اين مواد انجام شده است (۴). در مجموع تجربيات فوق‌الذكر منجر به افزايش سريع شناخت مواد و عوامل طبيعي مهار كننده رگزايي گرديده است. لذا از مدت‌ها پيش، بافت غضروف به عنوان يك منبع طبيعي غني از مواد مهاركننده رگزايي مطرح بوده است (۵) كه مي‌توان به غضروف حيواناتي نظير كوسه‌ماهي كه جهت درمان سرطان، از ۳۵ سال پيش تاكنون در طب سنتي مطرح بوده - است، اشاره كرد (۶). غضروف كوسه ماهي يكي از محدود بافت‌هايي است كه حاوي مواد مهاركننده رگزايي با فعاليت بالاست. فقدان عروق خوني در غضروف منجر به اين نظريه اوليه گرديد كه سلول‌هاي غضروفي يك يا چند ماده ضد رگزا در ماتريس خود ترشح مي‌كنند كه تشكيل عروق خوني را مهار مي‌نمايد (۷). لذا بر اساس اين نظريه پيشنهاد شد كه كوسه ماهي‌ها دچار سرطان نمي‌شوند و يا سرطان-هاي بدخيم در آنها نادر مي‌باشد. زيرا بيشترين درصد اسكلت كوسه ماهي ازجنس بافت غضروفي است (۱۶ درصد از وزن كل بدن آنها در مقايسه با ۰/۶ درصد در گوساله) (۸). غضروف كوسه ماهي داراي فعاليت‌هايي از قبيل فعاليت ضد التهابي، ضد رگزايي، فعاليت شبه ليزوزمي، مهار فعاليت آنزيم‌هاي كلاژناز نوع I وIV، مهار الاستاز و ساير پروتئازها مثل تريپسين، كيموتريپسين و پلاسمين مي‌باشد (۹). فرآورده‌هاي اوليه غضروفي جهت درمان سرطان، پسوريازيس، آرتريت، ترميم زخم، پوكي استخوان، التهاب موضعي، هموروئيد و درماتيت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۰). مهمترين كاربرد درماني غضروف كوسه ماهي به دليل داشتن اثرات ضد رگزايي و ضد سرطاني در درمان تومورهاست (۱۱ و ۱۲). با توجه به ارزش دارويي، صنعتي و وفور طبيعي غضروف كوسه ماهي در آب‌هاي گرم ايران، مطالعات تجربي بيشتري در اين زمينه ضروري مي‌باشد؛ لذا هدف از اين تحقيق استخراج و جداسازي پروتئين‌هاي غضروف كوسه ماهي و ارزيابي اثر ضد رگزايي آنها به منظور طراحي يک داروي پپتيدي جهت درمان بيماري‌هاي مرتبط با رگزايي است.

مواد و روش‌كار

استخراج كلاژن نوع I

از تانـــدون‌هـــاي دم مـــوش‌هـــاي صـــحرايي مـــاده Sprague-Dawely به سن ۱۲- ۸ هفته استفاده گرديـد. جهت اسـتخراج، يـک گـرم تانـدون در ۳۰۰ ميلـي‌ليتـر محلول اسيد استيک ۰۰۱ /۰ % بـه مـدت ۴۸ سـاعت در دماي ۴ درجه سانتي‌گراد به آرامي بهـم زده شـد و پـس ازسانتريفوژ محلول رويي آن استفاده گرديد (۱۳).

استخراج پروتئين از بافت غضروف

كوسه‌ماهي‌هاي نوع Carcharhinus sorrah با وزن تقريبي دو كيلـوگرم از شـيلات خلـيج فـارس (آب‌هـاي سـواحل

بوشهر) تهیه شد و به صورت منجمد به آزمایشگاه حمل گردید. بخش‌هاي غضروفي باله، دم و ستون فقرات توزين، شستشو، ضدعفوني و سپس توسط دستگاه خردکن برقي به پودر تبديل شد. جهت استخراج پروتئين از بافر استات - سديم ۱۰۰ ميلي‌مولار با pH-۴/۸ حاوي گوانيدين هيدروکلرايد ۴ مولار و در حضور مخلوطي از مهارکنندگان آنزيمي استفاده گرديد. عمل استخراج به مدت ۴۸ ساعت در دماي ۴ درجه سانتي‌گراد انجام شد (۱۴). هموژناي حاصل در ۱۵۰۰۰۰×g به مدت نيم ساعت در دماي ۴ درجه سانتي‌گراد سانتريفوژ شد و مايع رويي تغليظ وجهت استفاده بعدي نگهداري گرديد.

کروماتوگرافي تعويض آنيوني

جهت جداسازي پروتئين‌هاي موجود در هموژناي اوليه غضروف کوسه ماهي از ستون کروماتوگرافي تعويض آنيون Q-Sepharose FF به ابعاد (۵/۲ cm × ۱۴) در شرايط بافر Tris–HCl به غلظت ۵۰ ميلي مولار، pH- ۸/۱ داراي اوره ۶ مولار استفاده گرديد. نمونه پروتئيني پس از ديالیز عليه بافر مذکور بر ستون قرار داده شد و سپس ستون با سرعت جريان يک ميلي‌ليتر بر دقيقه شستشو داده شد. پس از خروج پيک اول کروماتوگرام، جهت تفکيک پيک دوم از غلظت نمک NaCl يک مولار استفاده گرديد. ميزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۲۵ نانومتر اندازه‌گيري شد و نمونه‌هايي به حجم دو ميلي‌ليتر از زير ستون جمع‌آوري و منحني کروماتوگرام مربوطه رسم گرديد.

کروماتوگرافي تعويض کاتيوني

جهت انجام کروماتوگرافي تعويض کاتيوني از ستون تعويض کاتيون Sp-Sepharose FF به ابعاد (۱۵×۱/۸ cm) در شرايط بافر فسفات پتاسيم ۵۰ ميلي-مولار به ميزان pH-۵/۸ حاوي اوره ۵ مولار استفاده گرديد. نمونه‌هاي پروتئيني پس از ديالیز عليه بافر فوق، بر ستون قرار داده شد و پس از شستشوي ستون توسط بافر مذکور و خروج پيک اول کروماتوگرام (پيک A_0)، جهت خروج ساير پروتئين‌هاي جذب شده به ستون، از بافر فسفات پتاسيم ۵۰ ميلي‌مولار، اوره ۵ مولار، pH- ۵/۸ حاوي گراديان ناپيوسته نمک ۵۰، ۱۰۰ ، ۲۰۰ و ۴۰۰ ميلي‌مولار NaCl استفاده شد و کروماتوگرام مربوطه با اندازه‌گيري ميزان جذب در طول موج ۲۲۵ نانومتر رسم گرديد.

سنجش پروتئين

جهت تعيين غلظت پروتئين روش اصلاح شده لوري به کار گرفته شد. از محلول پروتئين آلبومين سرم گاوي (BSA) جهت تهيه محلول استاندارد پروتئيني استفاده گرديد (۱۵).

الکتروفورز ژل پلي آکريل آميد (SDS–PAGE)

الکتروفورز براساس روش لاملي بر روي ژل ۱۲ درصد ناپيوسته پلي اکريل آميد- SDS در ولتاژ ۱۰۰ ولت و شدت جريان ثابت انجام گرديد (۱۶). سپس ژل توسط محلول رنگ کوماسي R-250 رنگ آميزي شد.

سنجش رگزايي توسط غشاء کوريوآلانتوئيک جوجه

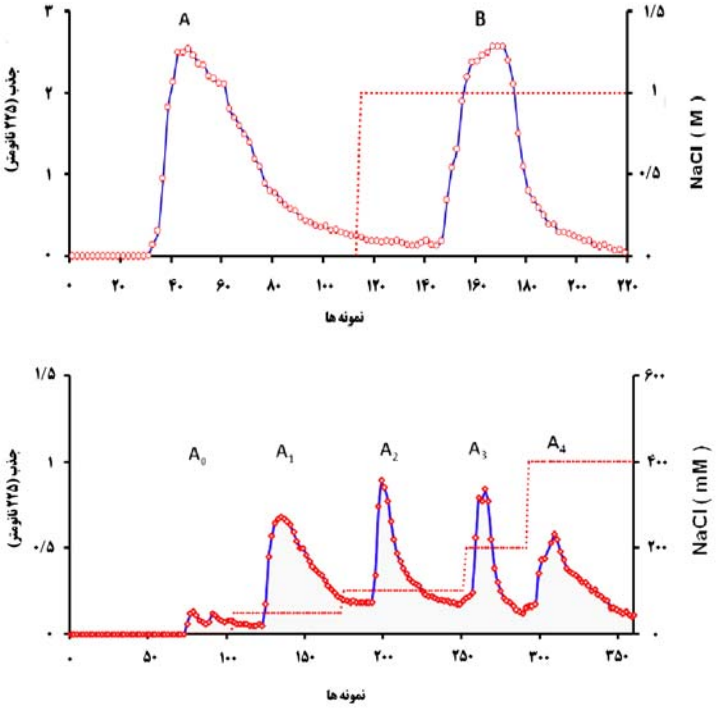
در اين آزمايش ابتدا تخم مرغ‌هايي از نژاد لومان (Lohman) توسط گاز فرمالين ضدعفوني و گازدهي گرديدند. جهت هر گروه آزمايشي و نيز گروه شاهد، تعداد پنج عدد تخم مرغ به کار گرفته شد و سپس در انکوباتور جوجه‌کشي در شرايط دمايي ۳۷ درجه سانتي‌گراد و رطوبت ۶۰- ۵۵ درصد قرار داده شدند. در روز هشتم ناحيه پوسته هوايي تخم مرغ‌ها برش داده شد تا سطح فوقاني غشاء کوريوآلانتوئيک جنين نمايان گردد. مخلوط ژل متيل سلولز حاوي نمونه‌هاي پروتئين به دست آمده، از اختلاط يک حجم ژل ۱% متيل سلولز (ويسکوزيته ۴۰۰۰ سانتي‌پواز) با يک حجم از محلول نمونه پروتئيني بگونه اي مخلوط شد که با ويسکوزيته نهايي ۰/۵ درصد و غلظت نهايي ۲ ميکروگرم بر ميکروليتر پروتئين حاصل گردد (۱۷). آنگاه

جهت تهیه پلاک‌هاي متیل‌سلولز به ازاء هر پلاک مقدار ۵۰ میکرولیتر از مخلوط پروتئین- ژل مذکور بـر سـطح نـوار تفلون قرار داده شد و در زیر هود بـه مـدت نـیم سـاعت خشک گردید. بدین منظور پلاک‌هاي متیل سـلولز حـاوي غلظت۱۰۰ میکروگرم پروتئین نسبت به هر یک از نمونـه-هاي A و B تهیه و بر غشاء کوریوآلانتوئیک جنین‌هـا در گروه‌هاي آزمایشي قرارداده شد. گروه شاهد فقـط پـلاک-هاي متیل سلولز حاوي بافر فسفات سدیم ۵۰ میلي‌مـولار pH=۷/۴ دریافت نمود. تخم‌مرغ‌ها مجدداً تا روز دهـم بـه آنکوباتور برگردانده شدند. سـپس غشـاء کوریوآلانتوئیـک توسط محلول تثبیت کننده شامل ۳ درصد گلوتارآلدئید در بافر کاکودیلات ۰/۱ مـولار بـا pH=۷/۴ تثبیـت گردیـده و آنگـاه توسـط استرئومیکروسـکوپ مجهـز بـه دوربـین از نواحي تحت تأثیر نمونه تصویر برداري شد. میزان رگزایي و گسترش سلول‌ها در مقایسه بـا گـروه شـاهد بـه روش مشـاهده‌اي (Blinded observer method) بـا در نظـر گرفتن معیارهایي از جمله تعداد عـروق در واحـد سـطح، شدت خمش‌ها، تعداد شاخه‌هاي فرعي، رنگ طبیعي، قطر عروق و سایر فاکتورهاي کمي و کیفي بشرح زیـر درجـه بندي گردید (۱۸).

معیار رگزایي بصورت کیفي انجام شد: حداکثر مهار رگزایـي (+++)، مهار رگزایي قابل ملاحظه ولي کمتر از میـزان فـوق (++)، حداقل مهار رگزایي (+) و بدون تأثیر بر رگزایي (±). جهت آنالیز نتایج بدست آمـده بـه روش آمـاري مـان ویتني یو، هر گروه مورد آزمایش با گروه شـاهد و بـا در نظر گرفتن (P <۰/۰۵) مقایسه گردید.

یافته‌ها

شکل (۱) کروماتوگرام حاصل از عصاره غضروف کوسه‌ماهي را نشان مي‌دهد.



شکل۱ : کروماتوگرام حاصل از عصاره غضروف کوسه ماهي.

A) کروماتوگرام Q- Sepharose نمونه اولیه در بافر تریس ۵۰ میلي‌مولار، اوره۶ مولار pH=۸ . گرادیان پیوسته NaCl (....)؛ جذب نمونه در ۲۲۵ نانومتر (-◊-).

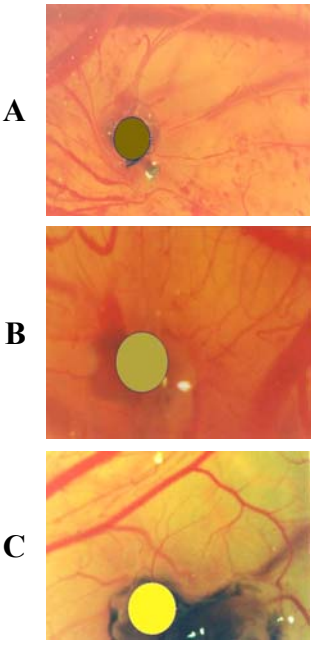
B) کروماتوگرام Sp-Sepharose نمونه A در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلي مولار، اوره ۵ مولار، pH= ۵/۴ در شرایط گرادیان مرحله‌اي ۴۰۰, ۲۰۰, ۱۰۰ و ۵۰ میلي‌مولار NaCl (....)؛ جذب نمونه در ۲۲۵ نانومتر (-◊-).

به طوري كه در شكل (A_1) مشاهده مي‌شود نمونه اوليه به دو نمونه منطبق بر پيک A و B تفكيک شده است. جهت ارزيابي تأثير ضدرگزايي نمونه‌ها، پيک‌هاي A و B از ستون كروماتوگرام شكل (A_1) جمع آوري و جهت سنجش رگزايي بر غشاء كوريوآلانتوئيک جوجه بكار گرفته شد. همان طور كه در شكل (۲) مشاهده مي‌شود گروه دريافت كننده نمونه A بر اساس پارامترهاي ارزيابي رگزايي ازجمله ضخامت و تعداد عروق، تعداد و شدت خمش شاخه‌هاي فرعي و رنگ غيرطبيعي غشاء، بيشترين فعاليت مهار رگزايي را نسبت به گروه شاهد، همچنين گروه B نشان مي‌دهد. لذا جهت تخليص بيشتر فراكنش‌هاي متناسب با پيک دوم كروماتوگرام (نمونه A) جمع‌آوري و پس از تغليظ, عليه بافر ستون ديباليز گرديده و سپس بر ستون تعويض يون Sp-Sepharose قرار داده شد و كروماتوگرام مربوطه رسم گرديد (شكل B_1). سپس پيک‌هاي حاصل از كروماتوگرام جمع‌آوري، تغليظ، ديباليز و پس از تعيين غلظت جهت سنجش فعاليت ضدرگزايي بر غشاء كوريوآلانتوئيک جوجه بكار گرفته شد. ميزان رگزايي در نواحي اطراف هر يک از ديسک‌هاي متيل‌سلولز حامل نمونه‌هاي پروتئيني مورد آزمايش در مقايسه با گروه شاهد ارزيابي و مقايسه گرديد. همانطور كه در شكل (۳) مشاهده مي‌گردد گروه دريافت كننده نمونه A_1 در مقايسه با گروه شاهد بيشترين فعاليت ضد رگزايي را داشته و اين فراكنش در واقع حاوي پروتئين فعال موجود در غضروف كوسه ماهي است. همان‌گونه كه درشكل (۴) مشاهده مي‌شود نمونه A حاوي پروتئين-هايي با وزن‌هاي مولكولي متنوع بوده و قسمت اعظم آنرا پروتئين‌هاي با وزن مولكولي بالا تشكيل مي‌دهد در حالي‌كه نمونه A_1 كه بيشترين فعاليت ضدرگزايي را داشت متشكل از يک جفت باند پروتئيني سبک و با وزن مولكولي پايين و حدود ۱۶-۱۴ كيلودالتون مي‌باشد.

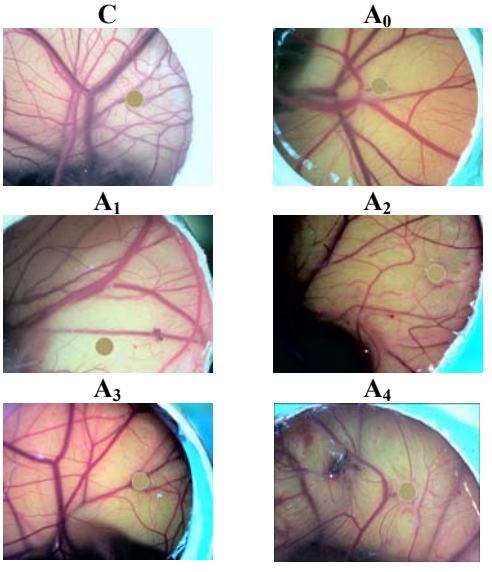
بحث

در اين تحقيق پس از استخراج بافت غضروف كوسه ماهي بروش كروماتوگرافي تعويض آنيون و كاتيون، كل پروتئين‌هاي مربوطه تفكيک گرديده و سپس به صورت نمونه‌هايي جداگانه تاثير ضد رگزايي آنها توسط مدل سنجش رگزايي آئورت موش صحرايي (Rat) مورد ارزيابي قرار گرفت. با بررسي نتايج حاصله مشخص گرديد كه نمونه فعال نهايي شامل يک جفت پروتئين با وزن مولكولي ۱۶-۱۴ كيلودالتون مي‌باشد.

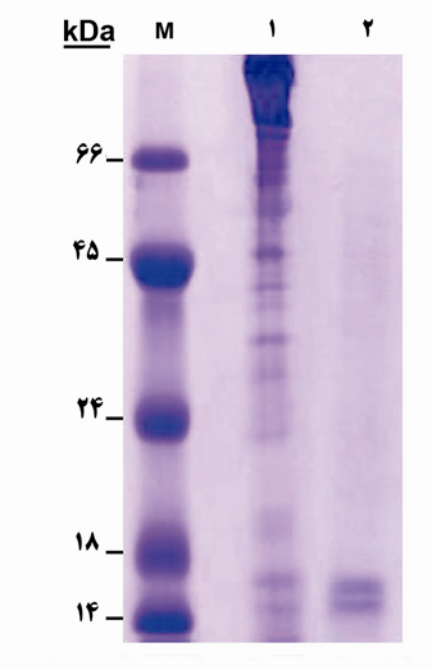
رگزايي پديده‌اي است كه در حالت طبيعي تحت عملكرد مكانيسم‌هاي طبيعي كنترل سلولي است. هر چند كه فعاليت رگزايي در حالت طبيعي جهت رشد و بقاء موجود ضروري است ولي حالت كنترل نشده آن منجر به بروز طيف وسيعي از بيماري‌هاي عروقي بخصوص انواع سرطان مي‌گردد. نتايج بدست آمده از تحقيقات كلينيكي بيانگر رشد سريع و درصد بالاي افراد مبتلا به بيماري‌هاي عروقي در جمعيت‌هاي مختلف است. عوامل و علل اين گونه بيماري‌ها، در نهايت در سطح سلول مطرح بوده و مرتبط با عملكرد سلول‌هاي اندوتليال سازنده عروق بافت مورد نظر است. لذا كنترل رشد و تكثير سلولي دراينگونه بيماري‌ها داراي كاربرد درماني است. مواد دارويي طبيعي و مصنوعي بسياري جهت كنترل رشد بي رويه رگزايي در سلول‌هاي اندوتليال معرفي و طراحي گرديده‌اند. اما امروزه رويكرد ساخت و طراحي داروهاي درماني بيشتر در جهت استفاده از انواع با منشاء طبيعي است (۱۹).



شکل۲: تأثیر نمونه‌هاي A وB حاصل از عصاره غضروف کوسه ماهي برميزان رگزايي غشاء کوريوآلانتوئيک جوجه. A وB; غشاء در حضور۱۰۰ میکروگرم پروتئین حاصل از به‌ترتیب، پیک اول و دوم کروماتوگرام ستون تعویض آنیون. C ; نمونه کنترل در حضور بافر فسفات. دایره‌ها بیانگر نواحي قرارگیري پلاک‌هاي متیل سلولز مي‌باشند



شکل۳: مقایسه تاثیر نمونه‌هاي پروتئیني A_0، A_1، A_2، A_3 و A_4 بر میزان رگزایي در غشاء کوریوآلانتوئیک جوجه در غلظت ثابت ۱۰۰ میکروگرم پروتئین به ازاء هر جنین. نمونه شاهد در حضور بافر فسفات. دایره‌ها بیانگر نواحي قرارگیري پلاک‌هاي متیل سلولز مي-باشند.



شکل۴: طرح الکتروفورز SDS-PAGE مربوط به پروتئین‌هاي استخراج شده از غضروف کوسه ماهي بر ژل ۱۲ درصد آکریل آمید، رنگ آمیزي شده با کوماسي بلو R 250 :M ؛ استاندارد وزن مولکولي پروتئین. ردیف‌هاي ۱ و ۲؛ به‌ترتیب مربوط به نمونه‌هاي پروتئیني A و A_0.

در کوسه ماهي‌ها احتمال ابتلا به سرطان بسیار کم و در حدود یک در میلیون بوده واز طرفي خصوصیت جالب کوسه ماهي‌ها وجود اسکلت کاملاً غضروفي آنهاست (۲۰). با مطالعاتي که راجع به خواص ضد رگزایي غضروف کوسه ماهي انجام گرفت، دانشمندان به این نتیجه رسیدند که غضروف کوسه ماهي حاوي پروتئین‌هایي با خواص مختلفي بخصوص خاصیت ضد رگزا بوده ومیتواند سبب مهار تومورهاي خوش خیم وبد خیم مي‌گردد. این نتایج سبب مطرح شدن غضروف کوسه ماهي به عنوان یکي از مکملهاي دارویي از منشاء طبیعي گردید (۲۱). با توجه به کاربردهاي کلینیکي و درماني غضروف کوسه ماهي، استخراج مواد موثر آن جهت درمان انواع بیماري‌هاي عروقي و سرطان حائز اهمیت مي‌باشد (۲۲). بر این

اساس در این تحقیق سعي گرديد كه پروتئين‌هاي فعال ضد رگزاي غضروف كوسه ماهي جدا سازي و فعاليت ضد رگزايي آنها ارزيابي گردد. جهت تخليص از روش كروماتوگرافي تعويض آنيون Q-Sepharose استفاده شد كه با توجه به دقت تفكيك در اين گونه كروماتوگرافي، عصاره اوليه كاملاً به دو پيک (A و B) تفكيك گرديد (شكل A_1). با بررسي تأثير ضد رگزايي نمونه A مذكور بر غشاء كوريوآلانتوئيک جوجه در شكل ۲ نتيجه شد كه پروتئين‌هاي موجود در پيک اول كروماتوگرام (نمونهA) در مقايسه با گروه شاهد از فعاليت ضد رگزايي بيشتري برخوردار است ($P<۰/۰۱۳$). لذا نتيجه گرفته شد كه پروتئين ضدرگزا جزء پيك A بوده و پروتئين‌هاي موجود تحت شرايط pH بكار رفته در ستون جزء دسته پروتئين‌هاي با بار مثبت مي‌باشند. آناليز ژل الكتروفورز نمونه A بيانگر وجود تعداد محدودي پروتئين با وزن مولكولي پايين است (به طور طبيعي درصد ماكرومولكول‌هاي با وزن مولكولي پايين در بافت غضروف نسبت به سايرمواد سازنده كمتر هستند) (شكل۴).

جهت تخليص بيشتر، نمونه A بر ستون كروماتوگرافي تعويض كاتيون Sp-Sepharose قرار داده شد و پيک‌هاي (A_0- A_4) از زير ستون جمع آوري گرديد (شكل۱B). مجدداً هريک از نمونه‌ها جهت ارزيابي فعاليت ضدرگزايي در مدل غشاء كوريوآلانتوئيک در مقايسه با گروه شاهد به كار گرفته شد كه بيشترين فعاليت ضدرگزايي مربوط به نمونه A_1 بود ($P<۰/۰۱۶$). زيرا غشاء كوريوآلانتوئيک جنين‌هاي تحت تأثير نمونه كاهش شديد از نظر اندازه، تعداد و قطر عروق در واحد سطح، تعداد خمش‌ها، انشعابات رگ‌ها نشان دادند (شكل۳). بنابراين تأثير ضد رگزايي عصاره اوليه تهيه شده در آزمايشگاه در توافق با گزارشات علمي منتشر شده مبني بر تأثير ضد رگزايي عصاره اوليه و نيمه خالص غضروف كوسه بر رگزايي مجدداً تأييد گرديد (۲۶-۲۳). جهت تعيين محتوي پروتئيني نمونه‌هاي فعال A و A_1 آناليز ژل الكتروفورز SDS-PAGE انجام شد كه نمونه A_1 با بيشترين فعاليت ضدرگزايي متشكل از يک جفت باند پروتئيني با وزن مولكولي ۱۶-۱۴ كيلودالتون بود (شكل۴). ولي برخلاف گزارش شو (Sheu)در سال ۱۹۹۸ و همچين گزارش ليانگ (Liang) و ونگ (Wong) در سال ۲۰۰۰ الگوي ژل الكتروفورز حاصل از اين تحقيق و نتايج بدست آمده از آزمايش‌هاي سنجش رگزايي مربوطه بيانگر عدم وجود پروتئين ۱۰ كيلودالتوني داراي خواص ضد رگزايي در غضروف كوسه ماهي است (۲۷).

با توجه به نتايج به دست آمده از اين تحقيق مي‌توان نتيجه گرفت كه غضروف كوسه ماهي يک منبع غني و قوي از فاكتورهاي ضد رگزا از جمله تركيبات پروتئيني با وزن مولكولي كم بوده كه تفكيک بيشتر آنها نيازمند بررسي‌هاي بيشتر و استفاده از روش‌هاي جدا سازي پيشرفته‌تري است. از مشكلات تخليص بيشتر اين پروتئين‌ها نزديک بودن وزن مولكولي و همچنين با توجه به الگو و نتايج به دست آمده از كروماتوگرام تعويض يون آنها، يكسان بودن بار الكتريكي و قطبيت آنها است.

لذا با توجه به خواص ضدرگزايي قوي و نيز وفور طبيعي و فراوان كوسه ماهي در آب‌هاي گرم ايران اين پروتئين مي‌تواند با به كارگيري روش‌هاي مهندسي ژنتيک جهت طراحي نوعي داروي پپتيدي ضدرگزا جهت اهداف درماني به‌كار گرفته شود.

References:

1. Clark ER, Clark EL. Microscopic observations on the growth. of blood capillaries in the living mammal. Am J Anat 1939;64:. 251-301.
2. Egginton S, Gerritsen M. Lumen formation: in vivo versus in vitro observations. Microcirculation 2003;10:45-61.
3. Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:605-19.
4. Mahadevan V, Hart IR. Metastasis and angiogenesis. Acta Oncol 1990; 29: 97-103.
5. Lane IW, Comac L. Sharks Don't Get Cancer.1st ed. New York, USA: Avery Pub Group, 1992, 1-192.
6. Brem H, Folkman J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. J Exp Med 1975;141(2):427-39.
7. Leitner SP, Rothkopf MM, Haverstick DD, et al. Two phase II studies of oral dry shark cartilage powder (SCP) in patients with either metastatic breast or prostate cancer refractory to standard treatment. Amer Soc Clin Oncol 1998;17:A240.
8 Hunt TJ, Connelly JF. Shark cartilage for cancer treatment. Am J Health Syst Pharm 1995; 52:1756, 60.
9. Spielburg CA, Schuck JM. Novel glycoproteins from bovine cartilage. United State Patent (USP) 1981; No: 4, 243, 582.
10. Cassileth BR. Shark and bovine cartilage therapies. In: The Alternative Medicine Handbook: The Complete Reference Guide toAlternative and Complementary Therapies. New York, USA: WW Norton & Company, 1998; 197- 200.
11. Harshbarger JC, Ostrander GK. Cancer in sharks, skates, rays, and other lower fishes. Proceedings of the American Association for Cancer Research; 1–5 April 2000; San Francisco, CA, USA, 41: A4848.
12. Saul G. Shark cartilage therapy against cancer. Nutr Health Forum. January/February 1997; 14:1-5.
13. Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. J Cell Biol 1972;54:626-37.
14. Bolis S, Handley CJ, Comper WD. Passive loss of proteoglycan from articular cartilage explants. Biochim Biophys Acta 1989;993: 157-67.
15. Markwell MA, Haas SM, Tolbert NE, et al. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. Methods Enzymol 1981;72:296-303.
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
17. Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. Science 1985;230:1375-8.
18. Malinda KM, Nomizu M, Chung M, et al. Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. Faseb J 1999;13:53-62.
19. Lane IW, Comac L. Sharks don't get cancer. Avery Publishing Group, Inc, 1992.
20. Liu N, Lapcevich RK, Underhill CB, et al. Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth. Cancer res 2001;61:1022-8.
21. Evans W, Latreille J, Batist G, et al. AE-941, an inhibitor of angiogenesis: Rationale for development in combination with induction chemotherapy/ radiotherapy in patients with non small cell lung cancer (NSCLC). Proceedings of the American Society of Clinical Oncology; 1999; USA, 18: A1938.
22. Juranic ZD, Neskovic-Konstantinovic Z, Stanojkovic TP, et al. The antitumor immune response in HER-2 positive, metastatic breast cancer patients. J Transl Med 2005; 3:13.
23. Lane IW. Method of and dosage unit for inhibiting angiogenesis or vascularization in an animal using shark cartilage. United State Patent (USP) ,1991; No: 5,075,112.
24. Balasa, LL. Method of processing animal cartilage. United State Patent (USP). 1987; No: 4, 656, 137.
25. Schinitsky M. Anti-inflammatory composition. United State Patent (USP). 1984; No: 4,473,551.
26. Sheu JR, Fu CC, Tsai ML, et al. Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor, on anti-angiogenesis and anti-tumor activities. Anticancer Res 1998; 18: 4435-41.
27. Liang JH, Wong KP. The characterization of angiogenesis inhibitor from shark cartilage. Adv Exp Med Biol 2000;476:209-23.