فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی پزشکی
مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال دوازدهم، شماره ۳، صفحه ۱۸۸ - ۱۸۱ (زمستان ۱۳۸۸)

تخلیص پروتئین محرک فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های کشنده طبیعی سیستم ایمنی از غضروف کوسه ماهی

افشار بارگاهی[*1]، زهیر محمد حسن[2]، عذرا ربانی چادگانی[3]

[1] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج‌فارس، پژوهشکده زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[2] گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
[3] مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

چکیده

زمینه: از آن‌جا که در طب سنتی از غضروف کوسه ماهی جهت درمان سرطان و به‌خصوص انواع مرتبط با سیستم ایمنی استفاده می‌شد، این احتمال وجود داشت که موادی در غضروف موجود باشد که قادر به تحریک و تقویت عمومی سلول‌های ایمنی بدن باشند. لذا در این تحقیق با توجه به پاسخ سلول‌های کشنده طبیعی (NK) سیستم ایمنی به طیف وسیعی از آنتی‌ژن‌ها بدون نیاز به ایمونیزاسیون قبلی، از آن جهت تخلیص پروتئین موثره غضروف کوسه ماهی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: اثر تحریک‌کنندگی پروتئین‌های جدا شده از غضروف کوسه ماهی بر فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK از منشاء لنفوسیت‌های خون محیطی انسانی، در شرایط محیط کشت مورد مطالعه قرار گرفت. پروتئین‌های غضروف کوسه ماهی توسط ستون کروماتوگرافی تعویض یون (DE-52) و روش اولترافیلتراسیون تخلیص گردید. تأثیر تحریک‌کنندگی فراکشن‌های به‌دست آمده بر فعالیت سایتوتوکسیکی سلول‌های NK فعال شده علیه سلول‌های لوکمیای میلوئیدی مزمن انسانی (K562) به روش آنزیماتیک لاکتات دهیدروژناز (LDH) سنجیده شد. جهت ارزیابی نتایج از آزمون آماری تی‌استودنت استفاده گردید.

یافته‌ها: بر اساس روند الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید نمونه‌های پروتئینی به‌دست آمده، بیشترین تأثیر سایتوتوکسیک مربوط به نمونه AR10 حاوی پروتئین به وزن مولکولی تقریباً ۱۴کیلودالتون بود.

نتیجه‌گیری: غضروف کوسه ماهی حاوی پروتئینی به وزن مولکولی تقریباً ۱۴کیلودالتون با خواص محرک فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK سیستم ایمنی بدن است.

واژگان کلیدی: غضروف کوسه ماهی، پروتئین، تخلیص، سلول‌های NK، ایمونوتراپی

دریافت مقاله: ۸۸/۵/۲۸- **پذیرش مقاله**: ۸۸/۷/۲۵

* خیابان معلم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی، دانشکده پزشکی، صندوق پستی: ۷۵۱۴۶۳۳۳۴۱

Email :abargahi@yahoo.com

مقدمه

اسکلت درونی کوسه ماهی در حدود ۸-۶ درصد از کل وزن آن می‌باشد و تقریباً به‌طور کامل غضروفی و غیر استخوانی است (۱). ماتریکس یا محیط خارج سلول در بافت غضروف در مقایسه با سلول‌های سازنده آن، از درصد بسیار بالاتری برخوردار می‌باشد؛ به گونه‌ای که سلول‌های غضروف با جمعیت کم به‌خوبی در آن ماتریکس شناور هستند. از خواص جالب توجه غضروف، عدم وجود عروق و همچنین مقاومت آن در مقابل رگزایی و متاستازهای ضروری جهت رشد و یا بروز سلول‌های سرطانی است (۲). در طب سنتی از غضروف کوسه ماهی جهت درمان بیماری‌هایی نظیر روماتیسم مفاصل، اسکلروزیس سیستمیک، بیماری گلوکومای چشمی، سارکوما، لنفوما وبرخی از دیگر انواع سرطان‌ها استفاده گردیده است (۹-۴).

همچنین وجود مواد فعال بیولوژیکی در غضروف کوسه ماهی گزارش شده است؛ که به‌دلیل تحریک سیستم ایمنی سلولی و یا هومورال سبب کاربرد آن جهت درمان سرطان یا تقویت و تحریک سیستم ایمنی بدن گردیده است (۱۲-۱۰). تأثیر مواد سازنده ماتریکس خارج سلولی غضروف بر تحریک فعالیت سلول‌های لنفوسیتی T در عدم حضور مونوسیت‌ها و سلول‌های ارائه‌کننده آنتی‌ژن (APC) گزارش شده است (۱۳). برخی مواد سازنده غضروفی به‌طور مستقیم با گیرنده‌های سطح سلول‌های T وارد واکنش گردیده و سبب افزایش ترشح و بیان ژن سایتوکاین‌هایی نظیر اینترلوکین-۲ (IL-2) و اینترفرون-گاما (IFN- γ) و فاکتور نکروز کننده تومور-آلفا (TNF- α)، بدون نیاز به فعال‌سازی قبلی گیرنده‌های سطحی سلول‌های T می‌گردند (۱۴). سایتوکاین‌های مذکور به‌خصوص IL-2 و IFN-γ سبب افزایش فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK[1] می‌گردند (۱۵). بدین‌گونه سلول‌های NK فعال شده قادر به اتصال و حذف سلول‌های هدف، بدون نیاز به فعال‌سازی قبلی سیستم ایمنی میزبان می‌باشند (۱۶). از طرفی وجود موادی در غضروف جانوران گزارش شده است که می‌تواند موجب افزایش توان کشندگی سلول‌های NK علیه سلول‌های سرطانی شود (۱۷ و ۱۸). لذا با توجه به تحقیقات انجام شده در مورد غضروف انواع جانداران به‌خصوص کوسه ماهی، این مطالعه با فرض وجود مواد پروتئینی با خواص تحریکی و تقویت‌کنندگی سلول‌های NK ازسیستم ایمنی طراحی گردیده و هدف تخلیص و شناسایی این‌گونه مواد می‌باشد.

مواد و روش‌کار

تهیه سلول‌های هدف

سلول‌های لوکمیای میلوئیدی مزمن انسانی (K562)[2] از انستیتوی رازی- ایران تهیه گردید. از این سلول‌ها به‌عنوان سلول‌های هدف جهت سلول‌های NK فعال شده تحت تأثیر نمونه‌های تهیه شده از غضروف کوسه ماهی استفاده گردید (شکل ۱). ابتدا سلول‌های K562 در محیط کشت RPMI-1640[3] حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی (FCS)، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامات در شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد اکسیژن در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس از آن به‌عنوان

[1] Natural Killer Cells
[2] Human Chronic Myeloid Leukemia
[3] Roswell Park Memorial Institute

سلول‌های هدف (T)[4] استفاده گردید (۱۵ و ۱۹).

تهیه سلول‌های مهاجم

سلول‌های لنفوسیتی تک هسته‌ای خون محیطی انسانی از طریق خون‌گیری از افراد سالم و بالغ به‌صورت تازه به‌دست آمد. نمونه با حجم معادلی از بافر فسفات سالین (PBS) به غلظت ۰/۲ مولار و PH معادل ۷/۴ مخلوط گردید و توسط محیط فیکول[5]، در دور g×۹۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سلول‌های لنفوسیتی جدا گردید. جهت حذف سلول‌های مونوسیت و ماکروفاژ، این سوسپانسیون در فلاسک‌های کشت به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور کشت سلول، نگهداری گردید (۲۰). از این سلول‌ها به‌عنوان ذخیره سلول‌های NK مهاجم (E)[6] جهت مراحل بعدی آزمایش استفاده گردید.

فعال‌سازی و تحریک سلول‌های مهاجم NK

در هر مرحله از فرآیند تخلیص غضروف کوسه ماهی جهت فعال‌سازی اولیه و ایجاد تحریک در سلول‌های NK مهاجم، غلظت‌های افزایشی ۱×۱۰۵ و ۲×۱۰۵ و ۴×۱۰۵ سلول بر میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI-1640 به ازاء هر چاهک میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول قرار داده شد. سپس دوزهای معینی از فراکشن‌های پروتئینی خالص شده از غضروف که قبلا در همان محیط کشت به تعادل رسیده بود افزوده گردید. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور نگهداری شدند.

سنجش فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK

جهت ارزیابی اثر تحریک‌کنندگی فراکشن‌های پروتئینی حاصل از غضروف کوسه ماهی بر میزان فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK علیه سلول‌های K562، از روش سنجش آنزیمی لاکتات دهیدروژناز (LDH) استفاده گردید (۱۹). بدین منظور تعداد ۲×۱۰۴ سلول K562 به ازای هر چاهک ازمیکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای الیزا[7] در مجاورت سلول‌های NK که قبلاً تحت تأثیر پروتئین‌های غضروف کوسه ماهی تحریک‌شده بودند، به نسبت‌های مختلف ۲۰/۱، ۱۰/۱ و ۱/ ۵ از سلول‌های مهاجم به سلول‌های هدف (E/T)[8] افزوده شدند. مجموعه فوق به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه آنکوبه گردید. سپس در دور g×۹۰۰ به‌مدت ده دقیقه سانتریفوژ شده و ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی از سوسپانسیون سلولی مجدداً به پلیت‌های مخصوص الیزا انتقال داده شد و به آن حجمی معادل با ۰/۱ میلی‌لیتر از سوبسترای آنزیمی LDH شامل: L-لاکتات ۲- ۵/۴×۱۰ مولار، +NAD[9] ۳- ۱/۳×۱۰ مولار و INT[10] ۴-۶/۶×۱۰ مولار افزوده گردید. پس از گذشت ۳ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا (Lab system, Multi ms) قرائت گردید. درصد فعالیت سایتوتوکسیک (C درصد) سلول‌های NK طبق معادله

[4] Target Cells
[5] Ficoll-Hypaque Gradient Technique (Lymphoper; Norway)
[6] Effector
[7] Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
[8] Effectors/Targets
[9] Nicotinamide Adenine Dinucleotide
[10] Iodo -Nitrotetrazolium Formazan

زیر محاسبه شد:

$$\%C = \frac{E-S}{M-S}$$

E: غلظت آنزیم LDH آزاد شده از منشاء سلول‌های K562.

S: آزاد شدن خودبه‌خودی آنزیم LDH از سلول‌های K562 در عدم حضور سلول‌های NK

M: حداکثر غلظت آنزیم مذکور تحت شرایط سونیکاسیون سلول‌های K562

استخراج و تخلیص پروتئین

جهت استخراج پروتئین از غضروف کوسه ماهی ابتدا بخش‌های غضروفی جدا گردید و سپس به کمک محلول آنزیمی شامل آلکالاز در بافر HEPES[11] به غلظت ۰/۰۱ درصد در PH معادل ۸/۵ به‌مدت ۶۰ دقیقه شستشو داده شد (۵). سپس بافت کلاژن و چربی سطحی غضروف حذف گردید (۲۱ و ۲۲). جهت استخراج پروتئین بافت غضروف در محیط بافر استات سدیم ۰/۱ مولار با میزان PH معادل ۴/۸ حاوی گوانیدین هیدوکلراید ۴ مولار و کوکتل مهارکنندگان آنزیمی، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت هموژن گردید (۲۳). جهت تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۴).

مقداری از عصارهٔ پروتئینی به‌دست آمده از مرحله فوق توسط ستون تعویض یون به ابعاد ۲۰×۱/۶ سانتی‌متر از ژل DE-52 درمحیط بافرتریس ۵۰ میلی‌مولار به میزان PH معادل ۷، کروماتوگرافی گردید (۲۵). در نهایت جهت تفکیک مواد جذب شده به ستون، از همان بافر که در اینجا شامل کلرید سدیم به غلظت ۱ مولار بود، استفاده گردید. در نهایت دو نمونه A و B[12] به‌دست آمد که پس از تعیین غلظت پروتئین کل، جهت آزمایش سنجش فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK به روش ذکر شده در قبل به‌کار گرفته شد. نمونه فعال A که دارای فعالیت بیشتری بود، به روش اولترافیلتراسیون توسط فیلتر XM-300 به دو جزء به وزن مولکولی بالای ۳۰۰ کیلودالتون (AR_{300}) و کمتر از ۳۰۰ کیلودالتون (AF_{300}) تفکیک گردید. این نمونه‌ها نیز متعاقباً جهت آزمایش توانایی تحریک فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK به روشی که قبلاً شرح داده شد به‌کار گرفته شدند. فراکشن AF_{300} با بیشترین اثر تحریک‌کنندگی مجدداً توسط فیلترهای XM-100، XM-50 و YM-10 به‌ترتیب به نمونه‌های AR_{100}، AR_{50}، AR_{10} و AF_{10} تفکیک گردید. اثر تحریک‌کنندگی هر نمونه بر فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های موجود در هر نمونه به‌دست آمده از غضروف کوسه ماهی از روش الکتروفورز SDS-۱۳PAGE ناپیوسته شامل ژل متراکم کننده ۵ درصد و ژل جداکننده ۱۰ درصد، در ولتاژ ۱۱۰ میلی‌آمپر به‌مدت زمان یک ساعت استفاده شد (۲۶). جهت تعیین موقعیت باندهای پروتئینی بر روی ژل از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (۲۷).

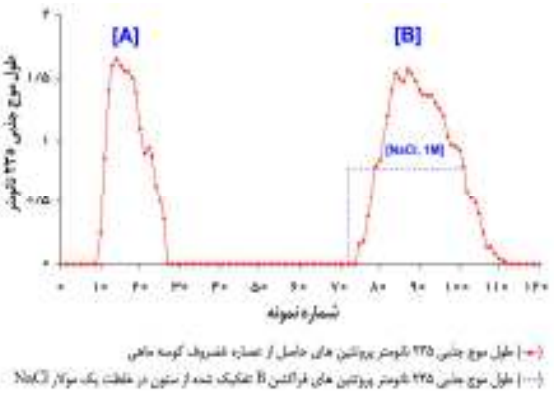
آنالیز آماری

جهت ارزیابی نتایج به‌دست آمده از این تحقیق از روش آماری استیودنت تی‌تست[14] استفاده گردید. نتایج حاصل به‌صورت میانگین و انحراف معیار به ازاء سه بار تکرار جهت هر آزمایش نشان داده شد. میزان $P<0/05$ به‌عنوان معیار پذیرش نتایج در نظر گرفته شد.

[11] N-[2-Hydroxyethyl] Piperazine-N'- [2-Ethanesulfonic Acid]
[12] Fraction
[13] Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
[14] Student's Unpaired t test

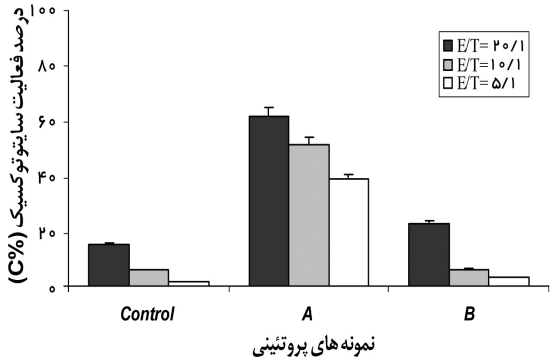
یافته‌ها

در این مطالعه، استخراج و تخلیص نمونه‌های پروتئینی از منشاء غضروف کوسه ماهی و همچنین تأثیر آن‌ها بر فعالیت سایتوتوکسیک (C درصد) سلول‌های NK علیه سلول‌های سرطانی K562، مورد مطالعه قرار گرفت. عصارهٔ پروتئینی به‌دست آمده از غضروف کوسه ماهی به روش کروماتوگرافی تعویض یونی به دو فراکشن A و B تفکیک گردید (نمودار۱).



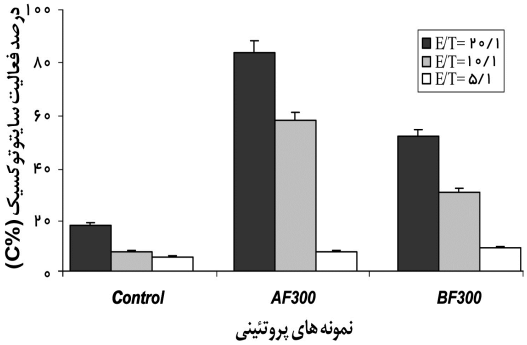
نمودار ۱) کروماتوگرام ستون تعویض یون (۲۰ cm × ۱/۶) ژل DE-۵۲
درمحیط بافرتریس ۵۰ میلی مولار به میزان PH معادل ۷

سپس دوز معادل ۱۹/۱ میکروگرم به ازاء هرچاهک از میکروپلیت الیزا از نمونه‌های A و B به محیط کشت سلول‌های NK افزوده شد. سپس سلول‌های NK فعال‌شده به نسبت‌های E/T مساوی با۱ /۲۰، ۱۰/۱، ۵/۱ به سلول‌های K562 به‌عنوان هدف افزوده شد. فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK تحت تأثیر نمونه A در مقایسه با نمونه B به‌طور معنی‌دار ($P<0/05$) بیشتر بود (نمودار ۲). جهت خالص‌سازی بیشتر نمونه A حاصل از کروماتوگرام نموداریک، توسط فیلتر XM-300 به روش اولترا فیلتراسیون به دو نمونه AF_{300} و AR_{300} به وزن مولکولی به‌ترتیب کمتر و بیشتر از ۳۰۰ کیلودالتون تفکیک گردید واز هرنمونه دوز ۱۶/۷ میکروگرم به سلول‌های NK جهت ارزیابی فعالیت سایتوتوکسیک علیه سلول‌های هدف K562 اضافه گردید.



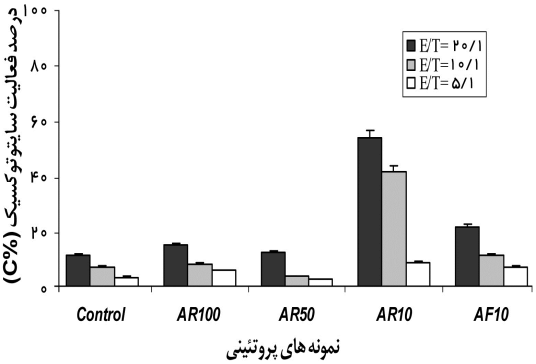
نمودار ۲) مقایسه فعالیت تحریک‌کنندگی نمونه‌های پروتئینی A و B بر فعایت سایتوتوکسیک سلول‌های NK

با مقایسه فعالیت تحریک‌کنندگی هر نمونه پروتئینی بر سلول‌های NK نتیجه گرفته شد که نمونه AF_{300} از فعالیت بیشتری برخوردار می‌باشد (نمودار ۳).



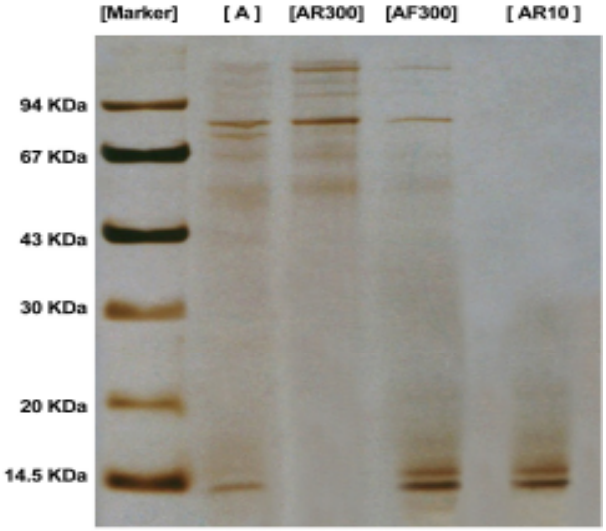
نمودار ۳) مقایسه فعالیت تحریک‌کنندگی نمونه‌های پروتئینی AF300 و AR300 بر فعایت سایتوتوکسیک سلول‌های NK.

مجدداً نمونه AF_{300} به نمونه‌های AR_{100}، AR_{50}، AR_{10} و AF_{10} تفکیک گردید و از هریک غلظتی معادل ۱۶/۷ میکروگرم به روش مشابه قبل به سلول‌های NK اضافه شد و با مقایسه نتایج به‌دست آمده نمونه AR_{10} از بیشترین فعالیت تحریک‌کنندگی و تأثیر بیولوژیکی برخوردار بود (نمودار۴).



نمودار ۴) مقایسه فعالیت تحریک کنندگی نمونه‌های پروتئینی AR100، AR50، AR10 و AF10 بر فعایت سایتوتوکسیک سلول‌های NK

جهت تعیین میزان خلوص هر فراکشن پروتئینی به‌دست آمده از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده گردید (شکل ۱).



شکل ۱) الکتروفوروگرام ژل SDS پلی اکریل آمید فراکشن های پروتئینی A، AR300، AF300 و AR10 استخراج شده از غضروف کوسه ماهی.
Marker (استاندارد پروتئین) شامل: فسفریلاز- b، ۹۴کیلودالتون.
سرم آلبومین گاوی، ۶۷ کیلودالتون. آوآلبومین، ۴۳ کیلودالتون. کربونیک انهیدراز، ۳۰ کیلودالتون. مهار کننده تریپسین سویبین، ۲۰ کیلودالتون و آلفا- لاکتالبومین، ۱۴/۴ کیلودالتون نام فراکشن‌ها

از الگوی الکتروفورزی به‌دست آمده نتیجه شد که نمونه AR_{10} حاصل از مراحل تخلیص غضروف کوسه ماهی حاوی پروتئین، دارای بیشترین تأثیر تحریک‌کنندگی بر فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK بوده و دارای وزن مولکولی تقریباً ۱۴ کیلودالتون است.

بحث

امروزه تجربیات به‌دست آمده در خصوص ارتباط عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی بدن با برخی از بیماری‌های ضعف در سیستم ایمنی و به خصوص سرطان، سبب طرح فرضیه تداخل در عملکرد این سلول‌ها جهت اهداف درمانی گردیده است. روش‌های درمانی متکی بر عملکرد سیستم ایمنی، به روش‌های ایمونوتراپی مشهور می‌باشند. برخی از مواد با منشاء طبیعی نظیر غضروف کوسه ماهی به‌دلیل داشتن اثر تحریک‌کنندگی برفعالیت سیستم ایمنی بدن کاربرد زیادی جهت درمان انواع بیماری‌های سیستم ایمنی پیدا نموده‌اند. قبلاً تأثیر غضروف‌هایی ازمنشأ گاو، سگ و جوجه بر تحریک فعالیت سایتوتوکسیک لنفوسیت‌های T و مونوسیت‌ها گزارش شده است (۱۳ و ۲۸). سلول‌های NK نقش مهمی در مهار متاستاز سلول‌های سرطانی به عهده دارند (۲۹ و ۳۰). سلول‌های NK به‌طور مستقیم قادر به شناسایی و تهاجم علیه انواع آنتی‌ژن‌ها وسلول‌های هدف هستند. لذا در این تحقیق از عملکرد این سلول‌ها جهت کنترل و ارزیابی فعالیت سایتوتوکسیک القاء شده توسط پروتئین‌های تخلیص شده از غضروف کوسه ماهی استفاده گردید. تأثیر مستقیم پروتئین‌هایی از منشأ غضروف برخی از حیوانات بر لنفوسیت‌های T گزارش شده است. این سلول‌ها دارای گیرنده‌هایی سطحی جهت پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی غضروف می‌باشند (۱۳). اتصال این‌گونه گیرنده‌ها با پروتئین‌های غضروفی منجر به افزایش ترشح برخی از سایتوکاین‌های وابسته به لنفوسیت‌های T می‌گردد. این سایتوکاین‌ها پس از ترشح توسط لنفوسیت‌های T چون دارای گیرنده‌هایی بر سطح سلول‌های NK هستند، لذا منجر به افزایش فعالیت تهاجمی آن‌ها علیه انواع آنتی‌ژن‌ها، به‌خصوص انواع مرتبط با سلول‌های سرطانی می‌گردد (۱۵). بنابراین ترشح سایتوکاین‌هایی نظیر IL-2 و IFN- γ توسط لنفوسیت‌های Th1 در محیط کشت سبب تسهیل اتصال این‌گونه پروتئین‌ها به گیرنده‌های سطحی سلول‌های NK می‌گردد. در این تحقیق تأثیر پروتئین‌های استخراج شده از غضروف کوسه ماهی بر فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های NK

به‌دست آمده از لنفوسیت‌های خون محیطی انسان علیه سلول‌های K562، در شرایط محیط کشت سلول بررسی گردیده است. بر اساس نتایج حاصل پروتئین‌های غضروف کوسه ماهی بر سیستم ایمنی موثر بوده و سبب تحریک فعالیت سلول‌های NK می‌گردند. از آن‌جا که کروماتوگرافی تعویض یونی دارای ضریب تفکیک و بازده بالایی می‌باشد و ما در اینجا نیاز به جمع‌آوری غلظت نمونه زیادی جهت ادامه سایر مراحل تخلیص داشتیم، لذا از این روش در ابتدای تخلیص استفاده نمودیم. همان‌گونه که در کروماتوگرام نمودارشماره یک آمده است، در این روش عصاره غضروف به جزء A شامل مواد با بارخالص مثبت و مواد خنثی و همچنین جزء B شامل مواد با بارخالص منفی تفکیک شده است. از آنجا که نمونه فعال A از پیک اول کروماتوگرام جمع‌آوری شد، لذا احتمال اینکه به دسته پروتئین‌های با بار مثبت و یا خنثی تعلق داشته باشد وجود دارد. در مرحله بعد جهت ادامه تخلیص بر اساس وزن مولکولی از روش اولترافیلتراسیون مرحله‌ای استفاده گردید. با توجه به الکتروفورگرام شکل یک و آنالیز محتوی پروتئینی مربوطه، نمونه AR_{10} دارای وزن مولکولی تقریبی ۱۴ کیلودالتون بود. این پروتئین بر اساس نتایج به‌دست آمده از نمودار ۴ دارای بیشترین تأثیر تحریکی‌کنندگی بر فعالیت سلول‌های NK علیه سلول‌های K562 بود ($P<۰/۰۵$). با توجه به فعالیت قابل توجه نمونه AR_{10}، این پروتئین می‌تواند جهت ایمونوتراپی برخی از بیماری‌های مرتبط با نقص و یا ضعف در سیستم ایمنی و مقابله بهتر در برابر انواع آنتی‌ژن‌های درونی و برونی و به‌خصوص انواع سرطانی به‌کار رود.

References:

1. Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. Science 1983; 221(4616):1185-7.
2. Castronove V, Dimitriadou V, Savard P, et al. Cartilage as a source of natural inhibitors of angiogenesis. In: Teicher BA, ed. Angiogenic agents in cancer therapy.Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1999:175-83.
3. Fontenele JB, Araujo GB, deAlencar JW, et al. The analgestic and anti- inflammatory effects of shark cartilage are due to a peptide molecule and are nitric oxide (NO) system dependent. Biol Pharm Bull 1997;20:1151-4.
4. Gomes EM, Souto PRF, Felzenswalb I. Shark cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced and mutagenesis. Mutat Res1996;367: 203-8.
5. Lane JW. Method and dosage unit for inhibiting angiogenesis or vascularization in animal using shark cartilage. United States Patent. 1991; USP No: 5,075,112.
6. Matheews J. Media feeds frenzy over shark cartilage as cancer treatment. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 1190-1.
7. Hunt TJ, Connelly JF. Shark cartilage for cancer treatment. Am J Health-Syst Pharm 1995;52: 1756-60.
8. Green S. Shark cartilage therapy against cancer. Nutr Health Forum 1997;14: 1-5.
9. Gonzalez RP, Leyva A, Moraes MO. Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds: from basic to clinical research. Biol Pharm Bull 2001;24(10):1097–101.
10. Raithaus LR. Shark liver for stimulating the immune system. United States Patent. 1998; USP No:5,840,342.
11. Feyzi R, Zuhair MH, Mostafaie A. Modulation of CD+4 and CD+8 tumor infiltrating lymphocytes by a fraction isolated from Shark Cartilage modulates anti-tumor immunity. Int Immunopharmacol 2003; 3:921-6.
12. Merly L, Simjee S ,Smith S L. Induction of inflammatory cytokines by cartilage extracts. Int Immunopharmacol 2007; 7: 383–91.
13. Gorski A, Kupiec-Weglinski JW. Extracellular matrix proteins, regulators of T-cell functions in healthy and diseased individuals. Clin Diagn Lab Immunol 1995; 6: 646-51.
14. Gilat D, Cahalon L, Hershkoviz R, et al.

Interplay of T cells and cytokines in the context of enzymatically modified extracellular matrix. Immunol Today 1996; 1: 16-20.
15. Sosnowska D, Mysliwski A, Dzierzbicka K, et al.The in vitro effect of new muramyl peptide derivatives on cytotoxic activity of NK (natural killer) cells from hamsters bearing Ab Bomirski melanoma. Biotherapy 1997;10:161-168.
16. Garcia-Penarrubia P, Cabrera L, Alvarez R, et al. Effector-Target interactions: saturability, affinity and binding isotherms. A study of such interactions in the human NK cell - K562 tumour cell system. J. Immunol Methods 1992; 155(1): 133-47.
17. Rosenberg SA. Immunotherapy of cancer using interleukin: current status and future prospects. Immunol Today 1988; 9(2): 58-62.
18. Sedlacek HH, Weidman E, Seiler FR.Tumor immunotherapy using vibrocholerae neuraminidase (VCN), In: Jeljaszewicz J, Pulverer G, Bacteria and cancer , Academic Press, London. 1982:246-90.
19. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. J Immunol Methods 1983;64(3): 313-20.
20. Lemaire I, St-Jean M. Modulation of lung-associated natural killer activity by resident and activated alveolar macrophages. Immunol Invest 1990; 19(1): 27-40.
21. Lafuma C, Moczar M, Robert L. Isolation and characterization of lung connective-tissue glycoproteins. Biochem J. 1982; 203(3): 593-601.
22. Folch J, Less M, Sloane Stanley HG. A Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol Chem 1957; 226: 497-509.
23. Boils S, Christopher C, Handley C. Passive loss of proteoglycan from articular cartilage explants. Biochim Biophys Acta 1989;993:157-67.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
25. Front P, Aprile F, Mitrovic DR and Swann DA. Age-related changes in the synthesis of matrix macromolecules by bovine articular cartilage. Connect Tissue Res 1989;19:121-33.
26. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 1987; 166(2): 368-79.
27. Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal Biochem 1981; 117(2): 307-10
28. Kralovec J, Guan Y, Metera K, Carr RI. Immunomodulating principles from shark cartilage Part I. Isolation and biological assessment in vitro. Int Immunopharmacol 2003;3:657–69.
29. Beliveau R, Gingras D, Kruger EA, Lamy S, Sirois P, Simard B, Sirois MG, Tranqui L, Baffert F, Beaulieu E, Dimitriadou V, Pepin MC, Courjal F, Ricard I, Poyet P, Falardeau P, Figg WD, Dupont E. The antiangiogenic agent Neovastat (Æ-941) inhibits vascular endothelial growth factor mediated biological effects. Clin Cancer Res 2002; 8:1242-50.
30. Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: A universal chemosensitization strategy for cancer. Sci 2006; 312:1171-5.