

## اثر غضروف شارک بر تعداد و فعالیت سلول‌های تنظیم کننده T در بیماران مبتلا به سرطان معده

راضیه زارعی<sup>۱\*</sup>، محمدزهریر حسن صراف<sup>۲</sup>، ابوالقاسم عجمی<sup>۳</sup>، داریوش مسلمی<sup>۴</sup>، امراله مصطفی زاده<sup>۵</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولوکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولوکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۵)

### چکیده

سرطان معده یا گاستریک کانسر اولین سرطان شایع در ایران و چهارمین سرطان شایع و دومین سرطان‌کشنده در سراسر جهان است. پاسخ‌های ایمنی در گاستریک کانسر شامل ایمنی ذاتی و اکتسابی است. سلول‌های Treg در چندین بدخیمی از جمله در گاستریک کانسر افزایش می‌یابد. سلول‌های Treg در تنظیم پاسخ ایمنی، حفظ تولرانس و هموستاز ایمنی دخالت دارد. اتوایمنیتی و بقا سرطان را کنترل می‌کند. غضروف کوسه ماهی اساساً بعنوان درمان جانبی برای سرطان مطرح شده است. غضروف کوسه ماهی، پروتئینی دارد که آنژیوژنز (رگ زایی) را در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانی متوقف می‌سازد. تومورها به شبکه ی از عروق خونی برای بقا و رشد نیازمندند، بنابراین با متوقف کردن خون رسانی به آن، تومور از بین می‌رود، اما این نقش در انسان هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته و علاوه نقش آن در پاسخ‌های ایمنی ضد توموری نیز معلوم نشده است. از اینرو، در این مطالعه اثر این دارو بر روی تعداد سلول‌های Treg گردش خون محیطی همراه با پاسخ سایتوکاینی TGF- $\beta$  معرف فعالیت مہاری لنفوسیت های T مہار کننده و همراه با آن تغییر در توازن بین الگوی سایتوکاینی سلول‌های TH1 و TH2 در بیماران مبتلا به سرطان معده را مورد بررسی قرار داده ایم.

**مواد و روش‌های آزمایش:** 03 بیمار (6 زن و 42 مرد) مبتلا به سرطان معده از نوع intestinal انتخاب و به طور مساوی به دو گروه تحت درمان با غضروف شارک و گروه کنترل (placebo) تقسیم شده اند. حداقل یک ماه پس از اتمام درمان استاندارد، بیماران را انتخاب و 03 سی خونگیری بعمل آورده، سپس در گروه مطالعه، 63 عدد قرص 053 میلی گرمی غضروف کوسه ماهی روزی سه بار بمدت 43 روز تجویز گردیده و یک هفته پس از مصرف دارو، 03 سی خون از ورید قدامی تهیه و با جداسازی سلول‌های تک هسته ای گردش خون بیماران و با کشت این سلول‌ها در مجاورت آنتی ژن مختص تومور سلول‌های تنظیم کننده T (Treg) (با روش فلوسایتومتری واز مایه رویی کشت سایتوکاین‌های TGF- $\beta$ ، IFN- $\gamma$ ، IL-4 به روش الیزا اندازه گیری شدند. جهت تعیین تکثیر لنفوسیتها در برابر آنتی ژن مختص تومور آزمایش MTT بعمل آمد. خونگیری و آزمایشات فوق به فاصله یک ماه از یکدیگر برای بیماران گروه کنترل نیز صورت گرفته است.

**یافته ها:** مشاهده شد که در گروه تحت درمان با غضروف کوسه ماهی میزان سلول‌های Treg بطور میانگین از 0/24٪ قبل از درمان به 3/4٪ بعد درمان کاهش و میزان سایتوکاین مہاری TGF- $\beta$  از 040 pg/ml قبل از درمان به 1003 pg/ml بعد درمان کاهش ولی میزان سایتوکاین سرمی IFN- $\gamma$  (الگوی سایتوکاینی TH1) از 1063 pg/ml قبل از درمان به 1041 pg/ml بعد درمان افزایش و میزان IL-4 (الگوی سایتوکاینی TH2) از 101 pg/ml قبل از درمان به 103 pg/ml بعد درمان کاهش داشته است. در گروه کنترل تفاوت معنی داری در اندازه گیریها بدست نیامد.

**بحث نهایی:** غضروف کوسه ماهی در انسان های مبتلا به سرطان معده، با کاهش سلول‌های مہاری Treg و سایتوکاین مہاری TGF- $\beta$  و همچنین با کاهش IL-4 ایمنیتی سلول‌های TH2 (و افزایش تولید IFN- $\gamma$ ) ایمنیتی سلول‌های TH1 (موجب تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی ضد توموری می‌شود).

### کلیدواژگان

سایتوکاین های TGF- $\beta$ ، IFN- $\gamma$ ، IL-4، سلول‌های Treg، سرطان معده، غضروف کوسه ماهی.

\* نویسنده مسئول، رایانامه: raziehzareii@yahoo.com



## مقدمه

Treg هستند، اما سلول‌های CD25-Treg نیز وجود دارد (04,00).

سلول‌های CD4+CD25+Treg عمدتاً پروتئینی سیتوپلاسمی بنام Foxp3 را دارند. علاوه بر این، CD103 یا اینتگرین  $\alpha E\beta 7$  که به E- کادهرین سلول‌های اپیتلیال متصل و موجب ابقا لنفوسیتها در بافت میشود، دارند. این مارکر در لانه گزینی و استقرار Treg در بافت ملتهب دخالت دارد (02) از اینرو بعنوان مارکر زیرگروهی از Treg در پوست نیز مطرح میباشد (05).

اگرچه، CD39 و CD73 اکتونوکلوئوتیداز غشائی که ATP را به آدنوزین تبدیل میکنند، بعنوان مارکرهایی برای تشخیص دقیقتر CD4+CD25+Foxp3Treg از سایر سلول‌های T نیز مطرح شده است (06,01). در حال حاضر، سلول‌های Treg با پنج مکانیزم پاسخهای ایمنی را تنظیم و در هموستاز ایمنی دخالت میکنند:

1. اختلال متابولیسمی، در این مسیر سلول‌های Treg بوسیله اکتونوکلوئوتیداز غشائی خود ملکولهای ATP خارج سلولی که از سلول‌های تخریب شده در محل التهاب آزاد میشوند را به آدنوزین تبدیل میکند. ATP آزاد شده یک سیگنال خطر است و کیموترکتانت لنفوسیت ها (04)، فعال کننده پاسخهای التهابی و القا کننده درد موضعی است (09).
2. تغییر بلوغ DC، سلول‌های Treg از طریق واکنش CTLA4/CD80CD86 سلول‌های DC را مهار و موجب تلوژنیک شدن DC میشود و از این طریق سلول هدفشان را تنظیم میکنند (43,40).
3. سایتولیز بواسطه گرآنزیم A و B، در انسان سلول‌های Treg با ترشح گرآنزیم A و در موش با تولید گرآنزیم B موجب مرگ سلول هدف به روش وابسته به پرفورین میشود (44).

سرطان معده یا گاستریک کانسر اولین سرطان شایع در ایران و چهارمین سرطان شایع و دومین سرطان کشنده در سراسر جهان است (0). گاستریک کانسر را همچنین به دو گروه روده ای - intestinal type) و منتشره (diffuse - type) نیز تقسیم می کنند (4). تومورهای نوع روده ای در ناحیه کارپوس (corpus) معده بوجود می‌آید که به گاستریت آتروفی و متاپلازی روده ای تغییر یافته اند. در حالیکه در تومورهای منتشره، گاستریت در تمام معده وجود دارد بدون آنکه دچار آتروفی شده باشند (0).

تومورهای نوع روده ای غالباً در نواحی جغرافیائی خاصی دیده میشوند و از شیوع بالایی برخوردارند، در حالیکه نوع منتشره به یک شکل در سراسر جهان دیده میشوند (2). بالغ بر 53٪ افراد در سراسر جهان آلوده به H.pylori هستند. اما، 03-05٪ افراد آلوده زخم معده میگیرند، 0-0٪ این افراد بعداً مبتلا به گاستریک کانسر میشوند (5).

پاسخهای ایمنی در گاستریک کانسر شامل ایمنی ذاتی و اکتسابی است. پاسخ ایمنی حاوی فعالیت سلول‌های T, B، دندریتیک سل، ماکروفاژ و نوتروفیل هاست. سلول‌های Treg در چندین بدخیمی از جمله در گاستریک کانسر افزایش مییابد (6) سلول‌های Treg احتمالاً در تیموس تولید و عملکرد آنها مهار پاسخهای ایمنی در اندامهای محیطی است، سلول‌های Treg در تنظیم پاسخ ایمنی، حفظ تولرانس و هموستاز ایمنی دخالت دارد (1)، اتوایمونیتی و بقا سرطان را کنترل میکند (4)، پس نقش مهمی در اتوایمونیتی، آلرژی، عفونت و القا تولرانس در برابر پیوند را بازی میکنند.

سلول‌های CD4+CD25+، 03-5٪ سلول‌های CD4+T گردش خون محیطی را تشکیل میدهند (9,03). بیشتر سلول‌های Treg فنوتیپ CD4+CD25+ دارند. این سلولها 0-4٪ سلول‌های CD4+T را میسازند (00). اگرچه، بیشتر سلول‌های CD4+CD25+،



به آن، تومور از بین می رود(45). اگرچه، گزارشاتی در باره خاصیت ضدتوموری غضروف کوسه ماهی ارائه شده اما داده های فعلی فقط بر روی اثر غضروف کوسه ماهی بر روی کند یا متوقف کردن آنژیوژنز در مدل‌های حیوانی و محیط کشت(46) و یا تولید سایتوکاینهائی نظیر IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  در محیط کشت لکوسیت‌های انسانی دلالت دارد(41).

حتی در مطالعات محدود انجام شده، سایر اثرات غضروف کوسه ماهی (بغیر از ضد رگ زایی که می‌تواند از پیشرفت تومور جلوگیری کند و یا ریسک متاستاز را کاهش دهد، نشان نمی‌دهد(41). بعلاوه، مطالعاتی هم اثر ضد سرطانی غضروف کوسه ماهی بویژه در سرطان ریه انسان را رد میکنند و آن را بعنوان داروی جایگزین در درمان سرطان موثر نمی‌دانند(44). ضمن آنکه تعقیب مسیرهای سلولی و ملکولی ایمنی تحت درمان با غضروف شاک بویژه در بدن انسان صورت نگرفته است. از اینرو با توجه به تناقض در اثرات ضد سرطانی غضروف کوسه ماهی و همچنین نقش کم شناخته شده غضروف کوسه ماهی بر روی پاسخ‌های ایمنی افراد تومورال در مطالعاتی که معتقد به اثربخشی این دارو دارند ما را برآن داشته تا اثر این دارو بر روی تعداد سلولهای Treg گردش خون محیطی همراه با پاسخ سایتوکاینی TGF- $\beta$  معرف فعالیت مهارکننده لنفوسیت های T مهار کننده و همراه با آن تغییر در توازن بین الگوی سایتوکاینی سلولهای TH1 و TH2 یعنی اندازه گیری غلظت سایتوکاین سرمی IFN- $\gamma$  معرف فعالیت سلولهای TH1 و IL-4 معرف فعالیت سلولهای TH2 در بیماران مبتلا به سرطان معده را مورد بررسی قرار دهیم.

### مواد و روشهای آزمایش

03 بیمار مبتلا به سرطان معده تماما از نوع intestinal بطور تصادفی از یک جمعیت ایرانی در

4. تولید سایتوکاینهائی مهارکننده نظیر TGF- $\beta$ , IL-10, و IL-35(2).

5. Treg موجب تنظیم تولرانس محیطی در برابر آنتی ژنهای خودی میشوند.

سلولهای Treg علاوه بر واکنش CTLA4/CD80CD86 از طریق LAG-3 خود با ملکول MHC-II سلول دندریتیک واکنش داده و از فعالیت DC جلوگیری میکنند.

سلولهای APC حرفه ای نظیر DC, MQ و B cells کیموآترکتانت هائی نظیر CCL4 را تولید میکنند که موجب جذب این سلولها به بافت میشود(40). Treg با فعال کردن پروتئین پروآپوآپتتیک Bim، کاسپازها را فعال و موجب آپوآپتوز سایر سلولها از جمله سلولهای T میشوند(42). در گاستریک کانسر، تعداد سلولهای Treg افزایش مییابد.

غضروف کوسه ماهی که بنامهای 941(-, carticin, cartilade™, Benefin™, Neovastat(AE) شده بصورت پودر و یا کپسول و مایع در رژیم غذایی مردم امریکا و برخی از کشورهای امریکای لاتین استفاده میشود. تاکنون هیچ نام علمی / پزشکی برای آن انتخاب نشده است. اگرچه تعداد کمی مطالعه بر روی اثرات ضد سرطانی آن انجام شده و در حال حاضر سازمان دارو و غذای امریکا (FDA) بر روی اثر دارویی 941(-AE) تحقیق می‌کند.

برخی مطالعات آزمایشگاهی و حیوانی نشان دادند که غضروف رشد عروق خونی را کاهش میدهد ولی در انسان هنوز به اثبات نرسیده است. مطالعات کمی بر روی فواید ضد سرطانی غضروف کوسه ماهی منتشر شده است. عقیده براین است که غضروف کوسه ماهی و یا سایر حیوانات نظیر گاو و گوسفند و مرغ رشد سرطان را کند و یا متوقف می‌کند. غضروف کوسه ماهی، پروتئینی دارد که آنژیوژنز(رگ زایی) را متوقف می‌سازد. تومورها به شبکه ی از عروق خونی برای بقا و رشد نیازمندند، بنابراین با متوقف کردن خون رسانی



بیماران قبل و بعد درمان و پس از جداسازی سلولهای تک هسته ای گردش خون بیماران با استفاده از فایکول و تعیین زنده بودن آنها با استفاده از تریپان بلو و شمارش آنها بر روی لام نئوبار، در پلیت های 42 چاهکی در مجاورت آنتی ژن مختص تومور CEA- MIF(ANASPEC,UK) کشت داده شده اند.

جهت تعیین تکثیر لنفوسیت ها در مجاورت آنتی ژن، آزمایش MTT بعمل آمد.

در (3-(4-5-Dimethylthiazole-2-yl) MTT در diphenyltetrazoliumbromide, a tetrazole میتوکندری سلولهای زنده احیا می شود و به فرمازان (Formazan) بنفش رنگ تبدیل می شود. 033 میکرولیتر از PBMCs هر بیمار به یکی از چاهکها و برای رسم منحنی استاندارد به ترتیب 2 غلظت متفاوت 03,34,033,53 میکرولیتر از سرم یکی از بیماران به چاهکهای میکروپلیت الیزا اضافه کرده و چون لنفوسیت های T سلولهای شناور هستند همان روز 5 میکرولیتر آنتی ژن به چاهکها افزوده و 42 ساعت بعد با افزودن 43 میکرولیتر محلول MTT (5mg/ml) و قراردادن میکروپلیت در دمای 01° و در مجاورت 5CO<sub>2</sub> 2% بمدت حداکثر 2 ساعت، 053 میکرولیتر دی متیل سولفاکساید (DMSO) بعنوان حلال MTT را به هر یک از چاهکها افزوده و بعد از تکان دادن میکروپلیت بر روی شیکر (shaker) جذب نوری محلول را در 593 نانومتر و فیلتر فرانس 643 نانومتر اندازه گیری کردیم. در تمام نمونه ها آنتی ژن مختص تومور قادر به تکثیر سلولهای T بوده اند.

برای اندازه گیری سایتوکاینها (eBioscience,UK)، 433 میکرولیتر از سوسپانسیون PBMCs (حاوی 5<sup>5</sup>-03<sup>5</sup>-4x سلول) هر یک از بیماران را در چاهکهای پلیت 42 تایی ریخته و با محلول RPMI 1640 حجم آن را به یک میلی لیتر رسانده و سپس 5 میکرولیتر آنتی ژن مختص تومور به هر یک از چاهکها افزوده شد. زمان کشت مطلوب برای IL-4 و IFN-γ 14 ساعت و برای

شمال ایران انتخاب شدند) 6 نفر زن و 42 نفر مرد). میانگین سنی این بیماران 50 سال بوده است. بیماران که حداقل یک ماه از شیمی درمانی و یا 1 روز از رادیوتراپی آنها گذشته باشد و نیازی به داروی استروئیدی هم نداشته و بعلاوه متاستاز مغزی، آلودگی با HIV، بارداری، بیماری قلبی و عروقی، فشار خون بالا در طی یک سال، سابقه سکته قلبی، زخمهای بهبود نیافته، نداشته و از وضعیت عمومی پایداری برخوردار بودند، انتخاب گردیدند. همچنین چنانچه بیمارانی که با مصرف دارو دچار حمله بیماری نظیر: عدم تحمل دارو، آلرژی و حتی انصراف بیمار از ادامه درمان می شدند از مطالعه خارج می گردیدند. خوشبختانه، مشکلات فوق در طی مطالعه روی نداده است. تنها مشکل این بیماران در زمان مطالعه کم خونی به دلیل گاسترکتومی بوده است (میانگین هموگلوبین بیماران برابر 9/gt/dl2 بوده است).

بیماران مبتلا به سرطان معده از بیمارستان شهید رجایی بابلسر تحت درمان دکتر داریوش مسلمی - انکولوژیست و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل انتخاب شدند این بیماران از مبتلایان به stage 1-3 تومور بدخیم، بعد تشخیص با نمونه برداری و اولین جراحی، و البته با رضایت و اطلاع کامل خود بیماران به مشارکت در درمان و مطابق مصوبه کمیته اخلاق پزشکی انتخاب گردیدند و به 4 گروه 05 نفره تقسیم شدند:

1. گروه اول فقط 63 عدد کپسول 053mg غضروف کوسه ماهی را ( سه بار در روز بمدت 43 روز) دریافت کردند.
  2. گروه دوم هیچ دارویی دریافت نکردند و بعنوان گروه کنترل انتخاب گردیدند.
- در این مطالعه، سلولهای Treg گردش خون محیطی با فلوسایتومتری و سایتوکاین های: TGF-β, IL-4, IFN-γ خون محیطی به روش الیزا اندازه گیری شدند. با 03 سی سی خونگیری از ورید قدامی آرنج



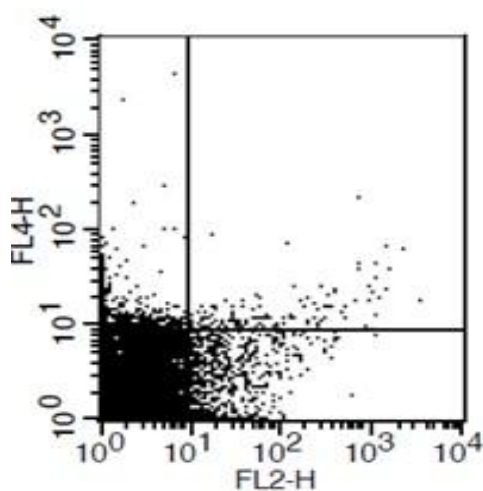
سلولها با آنتی بادی کونژگه فلوروسانس بمدت 03 دقیقه در دمای اتاق رنگ آمیزی شدند. در تمام نمونه های رنگ شده، سلولهای مرده خارج از گیت قرار داشتند و لنفوسیت‌های زنده گیت زده و تا 03333 سلول شمارش شدند. همه داده ها در BD FACScalibur, USA جمع آوری شده و با استفاده از نرم افزار Cell Quest program آنالیز شدند.

### یافته ها

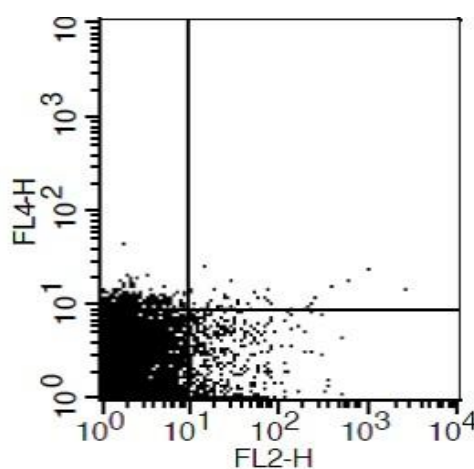
با استفاده از فلوسایتومتری میزان سلولهای Treg بیماران درمان شده با غضروف کوسه ماهی بطرز معنی داری کاهش یافته است. این کاهش در دات پلات زیر نشان داده شده است.

TGF- $\beta$ ، 96 ساعت بوده است. سپس با سانتریفیوژ، مایه رویی را جدا و به روش الیزا در طول موج 253 نانومتر اندازه گیری شدند.

برای اندازه گیری کمی سلولهای Treg از کیت فلوسایتومتری CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregulatory cell خریداری شده از (eBioscience, UK) استفاده شده است. 433 میکرولیتر از سوسپانسیون PBMCs را با RPMI 1640 به حجم یک میلی لیتر رسانده و در یکی از چاهکهای پلیت 42 تایی همراه با 5 میکروگرم/میلی لیتر آنتی ژن مختص تومور در انکوباتور 01° در مجاورت CO<sub>2</sub> 5٪ برای 42 ساعت کشت داده دادیم. بعد از رنگ آمیزی مارکرهای غشائی لنفوسیت ها (CD4, CD25) سلولها را با Fixation / permeabilization buffer مطابق پروتکل کارخانه سازنده فیکس و نفوذپذیر شدند. سپس قبل از آنالیز



الف- میزان سلولهای Treg (ناحیه راست فوقانی) قبل از درمان با غضروف کوسه ماهی.



ب- میزان سلولهای Treg (ناحیه راست فوقانی) در بیماران درمان شده با غضروف کوسه ماهی.

		Mean	Std. Deviation
shark cartilage	AFTER	.202	.084
	BEFORE	1.484	.481
control	AFTER	1.127	.692
	BEFORE	1.127	.692



با استفاده از آزمون t وابسته ملاحظه شد که در گروه آزمایشی بعد از استعمال دارو تغییراتی ایجاد شد ولی در گروه کنترل که دارویی دریافت نکرد تغییرات ایجاد نشد به طوری که در جدول فوق مشاهده می شود در گروه shark cartilage قبل از درمان میانگین سلولهای Treg بیماران 0/242 بوده که بعد از درمان به 3/434 کاهش داشته است.

با توجه به جدول زیر ملاحظه می شود در گروه مورد درمان تغییرات در سطح خطای 3/35 معنی دار ( $p < 0.05$ ) بوده است.

با استفاده از آزمون t وابسته ملاحظه شد که در گروه آزمایشی بعد از استعمال دارو تغییراتی ایجاد شد ولی در گروه کنترل که دارویی دریافت نکرد تغییرات ایجاد نشد به طوری که در جدول فوق مشاهده می شود در گروه shark cartilage قبل از درمان میانگین سلولهای Treg بیماران 0/242 بوده که بعد از درمان به 3/434 کاهش داشته است.

با توجه به جدول زیر ملاحظه می شود در گروه مورد درمان تغییرات در سطح خطای 3/35 معنی دار ( $p < 0.05$ ) بوده است.

اما میزان IL-4 در همین بیماران بطور میانگین قبل از درمان 01pg/ml و بعد درمان به 03pg/ml کاهش یافته، این کاهش هم با توجه به ( $p < 0.05$ ) معنی دار بوده است.

در گروه کنترل تغییر معنی داری در میزان IFN- $\gamma$ ، TGF- $\beta$  و IL-4 سرمی بیماران دیده نشد.

### بحث نهایی

مطالعات و گزارشاتی مبنی بر اثر ضد سرطانی غضروف کوسه ماهی در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانی مطرح شده است. درحالات فوق نشان داده شده که، غضروف کوسه ماهی با کاهش آنژیوژنز از رشد تومور جلوگیری می کند. آنژیوژنز فرآیند پیچیده و چند مرحله‌ی شامل ناپایداری عروق از قبل تشکیل شده، تکثیر سلولهای اندوتلیال، مهاجرت این سلولها و تشکیل عروق خونی جدید است. آنژیوژنز نقش مهمی در رشد، تهاجم و متاستاز تومورهای جامد دارد. رشد و متاستاز تومور هر دو به آنژیوژنز بافت توموری بستگی دارد. (00-49)

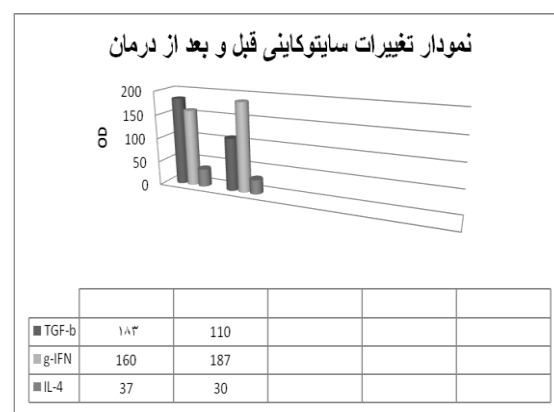
رشد تومور با بلوکه کردن مسیر VEGF--2 VEGFR مهار می شود. در این مسیر با اتصال VEGF به گیرنده اش، فاکتورهای نسخه برداری سیتوپلاسمی ERK1/2. سرین - تره اونین کیناز AKT فسفریله می گردند. این پروتئین های به هسته سلول مهاجرت و به پروموتورهای CXCR4 و HIF1 $\alpha$  سلول توموری متصل می شوند (02.05).

HIF1 $\alpha$  زیرواحدی از فاکتور نسخه برداری HIF1

		t	df	Sig. (2 tailed)
shark cartilage	AFTER	-	14	.000
	BEFORE	10.275		
control	AFTER	-	14	1.000
	BEFORE	.000		

	N	Mean	Std. Deviation
shark cartilage	15	-1.282	.483
control	15	.000	.001

با توجه به جدول فوق ملاحظه می شود، میزان سلولهای Treg بیماران تحت درمان با شاربک 0/444 کاهش و در گروه کنترل تغییری مشاهده نشد.



میزان سایتوکاین TGF- $\beta$  در بیماران مورد مطالعه، قبل از درمان، بطور میانگین 040pg/ml به



گردش خون را سلولهای TH و کمتر از 03٪ آنرا سلولهای NK تشکیل میدهند. بنابراین، کاهش  $TGF-\beta$  را میتوان یکی از عوامل افزایش  $IFN-\gamma$  یا الگوی سایتوکائینی TH1 تحت تاثیر غضروف کوسه ماهی مطرح نمود. افزایش این سایتوکائین میتواند معرف فعالیت ضد توموری سلولهای ترشح کننده آن در بیماران مبتلا به سرطان معده باشد.

سلولهای T ترشح کننده  $TGF-\beta$  در بعضی موارد IL-10 و IL-4 را نیز تولید می کنند، که هر دو همانند  $TGF-\beta$  خاصیت مهار ایمنی سلولی را دارند و از تولید  $IFN-\gamma$  و تمایز سلولهای T به سلولهای TH1 جلوگیری کرده، ولی تمایز و پاسخهای TH2 را تقویت می کنند. بنابراین انتظار میرفت با کاهش سلولهای Treg، تولید سایتوکائینهای  $TGF-\beta$  و IL-4 نیز کاهش یابد. این اثر بخوبی در مطالعه ما مشاهده گردید.

بنابراین، پیشنهاد می شود، غضروف کوسه ماهی در انسان های مبتلا به سرطان معده، با کاهش سلولهای مهاري Treg و سایتوکائینهای  $TGF-\beta$ ، IL-4 و افزایش تولید  $IFN-\gamma$  موجب تقویت پاسخهای ایمنی سلولی ضد توموری می شود.

در خاتمه لازم است، با بررسی بیشتر اثرات غضروف کوسه ماهی بر روی سایر ابعاد ایمنی اکتسابی در افراد تومرال مدارک بیشتری برای اثبات خاصیت ضد توموری این ماده ارائه شود. ضمن آنکه اثر این ماده بر روی آنژیوژنز، رشد و بقا، مهاجم و متاستاز تومور در افراد انسانی هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته است.

### قدردانی

از زحمات بی دریغ و رهنمودهای آقایان دکتر محسن تهرانی عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ساری، هادی حسین نتاج - کارشناس ارشد ایمونولوژی، عراز محمد میرابی - کارشناس ارشد ایمونولوژی، سرکار خانم عابدیان - کارشناس ارشد ایمونولوژی در

است که نه تنها پاسخهای ایمنی اکتسابی ضد هیپوکسی (hypoxia) بلکه عملکرد سلولی تحت نورماکسی (normoxia) را تنظیم می کند.  $HIF1\alpha$  با تجمع VEGF موجب بقا سلول و تمایز عروقی می شود (01،06).

یکی از مشتقات عصاره غضروف کوسه ماهی بنام Neovastat(AE-)941 با وزن ملکولی کمتر از 533 کیلودالتون با نام علمی squalusacanthias مستقیماً از رشد تومور و آنژیوژنز جلوگیری می کند (09،04).

Neovastat با مهار VEGF و مسیر  $HIF1\alpha$  از آنژیوژنز و نتیجتاً رشد تومور پیشگیری می کند. در موشهای درمان شده با Neovastat میزان بیان VEGF و  $HIF1\alpha$  در بافت ریه به میزان قابل توجهی کاهش یافته است (23).

اگرچه تاکنون در انسان، مهار و یا کند شدن آنژیوژنز در بافتهای توموری بوسیله غضروف کوسه ماهی گزارش نشده است، بر آن شدیم تا برای نخستین بار اثر ضد توموری این ماده را در پاسخهای ایمنی سلولی انسان مورد پژوهش قرار دهیم.

با توجه به نتایج بدست آمده، غضروف کوسه ماهی موجب کاهش سلولهای  $CD4^+CD25^+Foxp3^{hi}Treg$  شده است. همانطور که در مقدمه گفته شده، یکی از مکانیسم های عملکردی سلولهای Treg، تولید سایتوکائینهای مهاري نظیر  $TGF-\beta$ ، IL-10 و IL-35 است. بنابراین با کاهش سلولهای Treg انتظار میرفت  $TGF-\beta$  مهمترین سایتوکائین ترشحی این زیرگروه از لنفوسیت های T نیز کاهش یابد. کاهش محور Treg- $TGF\beta$ ، علامت مناسبی برای حذف اثر مهار پاسخهای ایمنی سلولی و در نتیجه تقویت پاسخهای ایمنی ضد تومور است. از اینرو ما الگوی سایتوکائینی  $IFN-\gamma$  (TH1 و TH2) IL-4 (را اندازه گرفتیم و مشاهده شد که با کاهش  $TGF-\beta$ ، میزان  $IFN-\gamma$  افزایش یافته است. منبع اصلی  $IFN-\gamma$  سلولهای TH1 و همچنین سلولهای NK هستند. 53-63٪ سلولهای تک هسته ای



### اختصارات

**LAG-3:** Lymphocyte Activating Gene-3  
**VEGF:** vascular endothelial growth factor  
**ERK1/2:** extracellular signal-regulated kinase1/2  
**HIF1 $\alpha$ :** hypoxia inducible factor 1 alpha  
**NKC:** natural killer cell

دانشگاه علوم پزشکی ساری، آقای دکترعابدیان عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ساری، آقای دکتر مهدوی عضو هیئت علمی انستیتو پاستور تهران، آقای امیرزکی پور کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد چالوس و سرکار خانم رودگری قدردانی شایان بعمل می آید.





## منابع و مأخذ

1. S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, "Immunologic selftolerance maintained by activatedT cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25): breakdownof a single mechanism of self-tolerance causes variousautoimmune diseases," *Journal of Immunology*, vol. 155, no.3, pp. 1151–1164, 1995.
2. Franco Pandolfi,etal."Cellular mediator of inflammation:Treg and Th17Cells in gastrointestinal diseases". *Mediators of Inflammation*Volume 2009, Article ID 132028, 11 pages.
3. T. R. Malek and A. L. Bayer, "Tolerance, not immunity,crucially depends on IL2," *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 9, pp. 665–674, 2004.
4. L. Borish and L. Rosenwasser, "TH1/TH2 lymphocytes: doubtsome more," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 99, no. 2, pp. 161–164, 1997 [5] J.Wang, T.W. Huizinga, and R. E. Toes, "De novo generationand enhanced suppression of human CD4+CD25+ regulatoryT cells by retinoic acid," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 6, pp. 4119–4126, 2009.
5. Y. Mizukami, K. Kono, Y. Kawaguchi, et al., "Localisationpattern of FoxP3+ regulatory T cells is associated with clinicalbehaviour in gastric cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 98, no. 1, pp. 148–153, 2008.
6. S. Sakaguchi and F. Powrie, "Emerging challenges in regulatoryT cell function and biology," *Science*, vol. 317, no. 5838,Pp;. 627–629,.7002
7. S. Sakaguchi, "Regulatory T cells in the past and for thefuture," *European Journal of Immunology*, vol. 38, no. 4, pp901–937,.8002
8. H. Jonuleit, E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk,
9. "Identification and functional characterizationof human CD4+CD25+ T cells with regulatory propertiesisolated from peripheral blood," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 193, no. 11, pp. 1285–1294,.1002.
10. L. A. Stephens, C. Mottet, D. Mason, and F. Powrie, "Human CD4+CD25+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro," *European Journalof Immunology*, vol. 31, no. 4, pp. 1247–1254,.1002.
11. C. Baecher-Allan, J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler, "CD4+CD25+ high regulatory cells in human peripheral blood," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 3, pp.1245–1253, 2001.
12. Q. Xu, J. Lee, E. Jankowska-Gan, et al., "HumanCD4+CD25+low adaptive T regulatory cells suppress delayed-type hypersensitivity during transplant tolerance," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 6, pp. 3983–3995, 2007.
13. S.Sakaguchi, "Regulatory T cells in the past and for the future," *European. Journal of Immunology*, Vol. 38, no.4, pp. 901-937, 2008.
14. Suffia, S. K. Reckling, G. Salay, and Y. Belkaid, "A rolefor CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and controlofLeishmania major infection," *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 9, pp. 5444–5455, 2005.
15. J. Lehmann, J. Huehn, M. de la Rosa, et al., "Expression of the integrin  $\alpha E\beta 7$  identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25–regulatory T cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99,no. 20, pp. 13031–13036, 2002.
16. G. Borsellino, M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, et al., "Expression of ectonucleotidase CD39 by FoxP3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression,"*Blood*, vol. 110, no. 4, pp. 1225–1232, 2007.
17. S. Deaglio, K. M. Dwyer, W. Gao, et al., "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73



- expressed on regulatory T cells mediates immune suppression,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 6, pp. 1257–1265, 2007.
18. K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, et al., “CTLA-4 control over FoxP3+ regulatory T cell function,” *Science*, vol. 322, no. 5899, pp. 271–275, 2008.
  19. M. J. L. Bours, E. L. R. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein, and P. C. Dagnelie, “Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 112, no. 2, pp. 358–404, 2006.
  20. D. A. Horwitz, S. G. Zheng, and J. D. Gray, “Natural and TGF- $\beta$ -induced FoxP3+CD4+CD25+ regulatory T cells are not mirror images of each other,” *Trends in Immunology*, vol. 29, no. 9, pp. 429–435, 2008.
  21. J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi, “Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance,” *Nature Immunology*, vol. 3, no. 2, pp. 135–142, 2002.
  22. X. Cao, S. F. Cai, T. A. Fehniger, et al., “Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance,” *Immunity*, vol. 27, no. 4, pp. 635–646, 2007.
  23. R. S. Bystry, V. Aluvihare, K. A. Welch, M. Kallikourdis, and A. G. Betz, “B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4,” *Nature Immunology*, vol. 2, no. 12, pp. 1126–1132, 2001.
  24. P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo, “CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells,” *Nature Immunology*, vol. 8, no. 12, pp. 1353–1362, 2007.
  25. Food and Drug Administration. Company ordered to halt sales of unapproved drugs, reimburse buyers. FDA Consumer Magazine, September-October 2004. Accessed at: [www.fda.gov/fdac/departs/2004/504\\_upd.html#sales](http://www.fda.gov/fdac/departs/2004/504_upd.html#sales) on June 11, 2008.
  26. S.M. Sagar MD, D. Yancey MH "Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer – part 1" *Current Oncology* – vol. 13, No. 1.
  27. Liza Merly, Shabana Simjee "Induction of inflammatory cytokine by cartilage extracts: *International Immunopharmacology* 04/2007;7(3):383-91.
  28. Charles Lu "Shark cartilage no help cancer" *Journal National Cancer Institute (NCI)* 26 May 2010.
  29. Lan-Hong Zheng, Yue-Jun Wang "Antitumor peptides from marine organisms" *Mar. Drugs* 2011, 9, 1840–19581
  30. Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* 1992, 3, 65–17
  31. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1995, 1, 27–13
  32. Bouck, N.; Stellmach, V.; Hsu, S.C. How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.* 1996, 69, 135–174.
  33. Folkman, J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. *EXS* 1997, 79, 1–8.
  34. Nakamura, S.; Chikaraishi, Y.; Tsuruma, K.; Shimazawa, M.; Hara, H. Ruboxistaurin, a PKC $\beta$  inhibitor, inhibits retinal neovascularization via suppression of phosphorylation of ERK1/2 and Akt. *Exp. Eye Res.* 2009, 90, 137–145.
  35. Ushio-Fukai, M. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* 2006, 71, 226–532.
  36. Chiavarina, B.; Whitaker-Menezes, D.; Migneco, G.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Pavlides, S.; Howell, A.; Tanowitz, H.B.; Casimiro, M.C.; Wang, C.; Pestell, R.G.; et al. HIF1- $\alpha$  functions as a tumor promoter in cancer associated fibroblasts, and as a tumor suppressor in breast cancer cells: Autophagy drives compartment-specific oncogenesis. *Cell Cycle* 2010, 9, 3534–3551.



37. Fukushima, K.; Murata, M.; Hachisuga, M.; Tsukimori, K.; Seki, H.; Takeda, S.; Asanoma, K.; Wake, N. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates matrigel-induced endovascular differentiation under normoxia in a human extravillous trophoblast cell line. *Placenta* 2008, 29, 324–331.
38. Lee, A.; Langer, R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 1983, 221, 1185–1187.
39. Dupont, E.; Brazeau, P.; Juneau, C. Extracts of shark cartilage having an antiangiogenic activity and an effect on tumor regression: Process of making thereof. *U.S. Patents* 5,985,839, 16 November 1999.
40. Lee, S.Y.; Chung, S.M. Neovastat (AE-941) inhibits the airway inflammation via VEGF and HIF-2 alpha suppression. *Vasc. Pharmacol.* 2007, 47, 313–813.

