

Effects of Shark Cartilage Oral Treatment on T Regulatory Cells Frequency and Activity in Patients with Gastric Cancer

Razieh Zarei¹,
Mohammad Zoheyr Hasan Sarraf²,
Abolghasem Ajami³,
Daryoush Moslemi⁴,
Amrollah Mostafazadeh⁴

¹ PhD Student in Immunology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received October 29, 2013 ; Accepted March 13, 2013)

Abstract

Background and purpose: Gastric cancer is the third most common cancer in Iran and the second leading cause cancer-related death worldwide. Shark cartilage prevents angiogenesis in vivo and in vitro, however, its role on angiogenesis or anti-tumor responses in human is not clear yet. We studied the effects of oral treatment of shark cartilage on peripheral Treg frequency and TGF- β as suppressor activity and Treg cells inducer associated with TH1/TH2 cytokines pattern in patients with gastric cancer.

Materials and methods: This study included 23 patients suffering from intestinal gastric cancer who were assigned into intervention (n=14) and control group (n=9). A month after conventional treatment the patients in intervention group were given three tablets (150mg) of shark cartilage daily for 20 days. Then flow cytometry was employed to determine whether the peripheral blood mononuclear cells such as CD4⁺CD25⁺Foxp3^{high}T regulatory cells in patients with gastric cancer were changed correspondingly.

Results: The results demonstrated that γ -IFN increased and IL-4 decreased in the intervention group. But, no changes were seen in Treg cells frequency and amounts of TGF- β . The evaluations for control group showed no significant difference.

Conclusion: shark cartilage amplified anti-tumor responses in patients with gastric cancer by increase in γ -IFN (TH1 immunity) and decrease in IL-4 (TH2 immunity).

Keywords: Shark cartilage, Treg cell, TGF- β , γ -IFN, IL-4 and gastric cancer

تأثیر مصرف خوراکی غضروف کوسه ماهی بر تعداد و فعالیت سلول‌های تنظیم‌کننده T در بیماران مبتلا به سرطان معده

راضیه زارعی^۱محمد زهیر حسن صراف^۲ابوالقاسم عجمی^۳داریوش مسلمی^۴امراه مصطفی زاده^۴

چکیده

سابقه و هدف: سرطان معده سومین سرطان شایع در ایران و چهارمین سرطان شایع و دومین سرطان کشنده در سراسر جهان است. غضروف کوسه ماهی، پروتئینی دارد که آنژیوژنز (رگ زایی) را در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانی متوقف می‌سازد. اما نقش آن در مهار آنژیوژنز یا پاسخ‌های ایمنی ضد توموری انسان معلوم نشده است. هدف از این مطالعه تأثیر خوراکی این دارو بر روی تعداد سلول‌های Treg گردش خون محیطی همراه با پاسخ سایتوکاینی TGF- β معرف فعالیت مهارکننده لنفوسیت‌های T مهارکننده و همراه با آن تغییر در توازن بین الگوی سایتوکاینی سلول‌های TH1 و TH2 در بیماران مبتلا به سرطان معده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد شاهدهی بیست و سه بیمار مبتلا به سرطان معده از نوع Intestinal انتخاب و به دو گروه تحت درمان با غضروف شارک (n=14) و گروه کنترل (n=9) تقسیم شده‌اند. حداقل یک ماه پس از اتمام درمان استاندارد، به بیماران گروه درمانی، ۶۰ عدد قرص ۱۵۰ میلی‌گرمی غضروف کوسه ماهی روزی سه بار به مدت ۲۰ روز تجویز گردید و یک هفته پس از مصرف دارو، با جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای گردش خون بیماران و کشت این سلول‌ها در مجاورت آنتی‌ژن مختص تومور، سلول‌های تنظیم‌کننده T (Treg) با فلوسایتومتری و سایتوکاین‌های TGF- β ، IFN- γ ، IL-4 به روش الیزا اندازه‌گیری شدند. جهت تعیین تکثیر لنفوسیت‌ها در برابر آنتی‌ژن مختص تومور آزمایش MTT به عمل آمد. سپس داده‌ها توسط آزمون‌های آماری توصیفی و استنباطی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در گروه تحت درمان با غضروف کوسه ماهی در مقایسه با گروه کنترل بعد درمان میزان IFN- γ افزایش و IL-4 کاهش یافته بود (P < 0/05)، اما تعداد سلول‌های Treg و میزان TGF- β تغییری نیافت. تفاوت معنی‌داری در اندازه‌گیری‌ها در گروه کنترل به دست نیامد (P > 0/05).

استنتاج: این دوز مصرفی از غضروف کوسه ماهی در انسان‌های مبتلا به سرطان معده، با کاهش IL-4 (ایمونیتی سلول‌های TH2) و افزایش تولید IFN- γ (ایمونیتی سلول‌های TH1) موجب تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی ضد توموری می‌شود.

واژه‌های کلیدی: غضروف کوسه ماهی، سلول‌های Treg، سایتوکاین‌های TGF- β ، IFN- γ ، IL-4، سرطان معده

مقدمه

سرطان شایع و دومین سرطان کشنده در سراسر جهان است (۱). سرطان معده را همچنین به دو گروه روده‌ای

سرطان معده سومین سرطان شایع در ایران (وزارت بهداشت و درمان ایران - ۱۳۹۱) و چهارمین

E-mail: a.ajami@mazums.ac.ir

مؤلف مسئول: ابوالقاسم عجمی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز بیولوژی سلولی و ملکولی، دانشکده پزشکی

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

۲. دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۱/۱۰/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۲۴

(Intestinal-type) و منتشره (Diffuse-type) نیز تقسیم می‌کنند (۲). تومورهای نوع روده‌ای در ناحیه کارپوس (Corpus) معده به وجود می‌آید که به گاستریت آتروفیک و متاپلازی روده‌ای تغییر یافته‌اند. در حالی که در تومورهای منتشره، گاستریت در تمام معده وجود دارد بدون آن که دچار آتروفی شده باشند (۳). تومورهای نوع روده‌ای غالباً در نواحی جغرافیائی خاصی دیده می‌شوند و از شیوع بالایی برخوردارند، در حالی که نوع منتشره به یک شکل در سراسر جهان دیده می‌شوند (۴). بالغ بر ۵۰ درصد افراد در سراسر جهان آلوده به *H. pylori* هستند. اما، ۱۵-۱۰ درصد افراد آلوده زخم معده می‌گیرند، ۳-۱ درصد این افراد بعداً مبتلا به سرطان معده می‌شوند (۵).

پاسخ‌های ایمنی در سرطان معده شامل ایمنی ذاتی و اکتسابی است. پاسخ ایمنی حاوی فعالیت سلول‌های T، B، دندریتیک سل، ماکروفاژ و نوتروفیل‌هاست. سلول‌های Treg در چندین بدخیمی از جمله در سرطان معده افزایش می‌یابد (۶) 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 (۷)، اتوایمنیتی و بقاء سرطان را کنترل می‌کند (۸)، پس نقش مهمی در اتوایمنیتی، آلرژی، عفونت و القا تولرانس در برابر پیوند را بازی می‌کنند. سلول‌های CD4+CD25+، ۱۰-۵ درصد سلول‌های CD4+T گردش خون محیطی را تشکیل می‌دهند (۹، ۱۰).

بیش تر سلول‌های Treg فنوتیپ CD4+CD25+ دارند. این سلول‌ها ۲-۳ درصد سلول‌های CD4+T را می‌سازند (۱۱). اگر چه، بیش تر سلول‌های Treg، CD4+CD25+ هستند، اما سلول‌های CD25-Treg نیز وجود دارد (۱۲، ۱۳). سلول‌های CD4+CD25+Treg عمدتاً پروتئینی سیتوپلاسمی به نام Foxp3 را دارند. علاوه بر این، CD103 یا اینتگرین $\alpha\beta 7$ 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 (۱۴) از این رو به عنوان مارکر زیرگروهی از Treg در پوست نیز مطرح می‌باشد (۱۵). اگر چه، CD39 و CD73 اکتونوکلئوتید از غشایی که ATP را به آدنوزین تبدیل می‌کنند، به عنوان مارکرهایی برای تشخیص دقیق تر Treg با پنج مکانیزم پاسخ‌های ایمنی را تنظیم و در هموستاز ایمنی دخالت می‌کنند:

۱- اختلال متابولیکی، در این مسیر سلول‌های Treg به وسیله اکتونوکلئوتیداز غشایی 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 لنفوسیت‌ها (۱۸)، فعال کننده پاسخ‌های التهابی و القاکننده درد موضعی است (۱۹).

۲- 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 (۲۰، ۲۱).

۳- سایتولیز به واسطه گرانزیم A و B، در انسان سلول‌های Treg با ترشح گرانزیم A و در موش با تولید گرانزیم B موجب مرگ سلول هدف به روش وابسته به پرفورین می‌شود (۲۲).

۴- تولید سایتوکاین‌های مهاری نظیر TGF- β ، IL-10، و IL-35 (۴).

۵- Treg موجب تنظیم تولرانس محیطی در برابر آنتی‌ژن‌های 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 می‌کند.

سلول‌های APC حرفه‌ای نظیر DC، MQ و B cells

کیموآترکنات‌هایی نظیر CCL4 را تولید می‌کنند که موجب جذب این سلول‌ها به بافت می‌شود (۲۳). Treg با فعال کردن پروتئین پروآپوپتیک Bim، کاسپازها را فعال و موجب آپوپتوز سایر سلول‌ها از جمله سلول‌های T می‌شوند (۲۴). در گاستریک کانسر، تعداد سلول‌های Treg افزایش می‌یابد.

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 بر این 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 آژیوزنز (رگ‌زایی) را متوقف می‌سازد. تومورها به شبکه از عروق خونی برای بقا و رشد نیازمندند، بنابراین با متوقف کردن خون‌رسانی به آن، تومور از بین می‌رود (۲۵). اگرچه، گزارشی در باره خاصیت ضدتوموری غضروف کوسه ماهی ارائه شده اما داده‌های فعلی فقط بر روی اثر غضروف کوسه ماهی بر روی کند یا متوقف کردن آژیوزنز در مدل‌های حیوانی و محیط کشت (۲۶) و یا تولید سایتوکاین‌هایی نظیر IFN- γ و TNF- α در محیط کشت لکوسیت‌های انسانی دلالت دارد (۲۷).

حتی در مطالعات محدود انجام شده، سایر اثرات غضروف کوسه ماهی (به غیر از ضد رگ‌زایی) که می‌تواند از پیشرفت تومور جلوگیری کند و یا ریسک متاستاز را کاهش دهد، نشان نمی‌دهد (۲۷) به علاوه، مطالعاتی هم اثر ضد سرطانی غضروف کوسه ماهی به ویژه در سرطان ریه انسان را رد می‌کنند و آن را به عنوان داروی جایگزین در درمان سرطان مؤثر نمی‌دانند (۲۸). ضمن آن‌که تعقیب مسیرهای سلولی و ملکولی ایمنی تحت درمان با غضروف کوسه ماهی به ویژه در بدن انسان صورت نگرفته است. از این رو 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 بر آن داشته تا اثر این دارو بر روی تعداد سلول‌های Treg گردش خون محیطی همراه با پاسخ سایتوکاینی TGF- β معرف فعالیت مهارکننده‌های T مهارکننده و همراه با آن تغییر در توازن بین الگوی سایتوکاینی سلول‌های TH1 و TH2 یعنی اندازه‌گیری غلظت سایتوکاین سرمی IFN- γ معرف فعالیت سلول‌های TH1 و IL-4 معرف فعالیت سلول‌های TH2 در بیماران مبتلا به سرطان معده را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی بیست سه بیمار (۶ زن و ۱۷ مرد) مبتلا به سرطان معده تماماً از نوع روده ای به طور تصادفی از یک جمعیت ایرانی در شمال ایران انتخاب شدند. میانگین سنی این بیماران ۵۱ سال بوده است. بیمارانی که حداقل یک ماه از شیمی درمانی و یا ۷ روز از رادیوتراپی آن‌ها گذشته باشد و نیازی به داروی استروئیدی هم نداشته و به علاوه 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 می‌شدند از مطالعه خارج می‌گردیدند. خوشبختانه، مشکلات فوق در طی مطالعه روی نداده است. تنها مشکل این بیماران کم خونی به دلیل گاسترکتومی بوده است. بیماران مبتلا به سرطان معده از میان مراجعان به مرکز شیمی درمانی شهید رجایی بابلسر انتخاب شدند این بیماران از مبتلایان به Stage 1-3 تومور بدخیم، بعد تشخیص با نمونه‌برداری و اولین جراحی، و البته با رضایت و اطلاع کامل خود بیماران به مشارکت در درمان و مطابق مصوبه کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه

تربیت مدرس به شماره ۵۲/۵۷۳۲۷ و به تاریخ ۹۰/۷/۱۰ انتخاب گردیده و بر اساس مطالعه موردی - شاهدهی، به ۲ گروه تقسیم شدند:

- گروه اول (n=۱۴) فقط ۶۰ عدد کپسول ۱۵۰mg غضروف کوسه ماهی را (سه بار در روز به مدت ۲۰ روز) دریافت کردند.

- گروه دوم (n=۹) هیچ دارویی دریافت نکردند و به عنوان گروه شاهد انتخاب گردیدند.

در این مطالعه، سلول‌های Treg گردش خون محیطی با فلوسایتومتری و سایتوکاین‌های:

TGF- β , IL-4, IFN- γ خون محیطی به روش الیزا اندازه‌گیری شدند. با ده سی سی خونگیری از ورید قدامی آرنج بیماران قبل و بعد درمان و پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای 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 پلیت‌های ۲۴ چاهکی در مجاورت آنتی ژن مختص تومور CEA-MIF (ANASPEC, UK) کشت داده شده‌اند. جهت تعیین تکثیر لنفوسیت‌ها در مجاورت آنتی ژن، آزمایش MTT به عمل آمد.

MTT زرد در میتوکندری سلول‌های زنده احیاء می‌شود و به فرمازان (Formazan) بنفش رنگ تبدیل می‌شود. ضد میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای گردش خون هر بیمار به یکی از چاهک‌ها و برای رسم منحنی استاندارد به ترتیب ۴ غلظت متفاوت ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ میکرولیتر از سرم یکی از بیماران به چاهک‌های میکروپلیت الیزا اضافه کرده و چون لنفوسیت‌های T سلول‌های شناور هستند همان روز پنج میکرولیتر آنتی ژن به چاهک‌ها افزوده و ۲۴ ساعت بعد با افزودن بیست میکرولیتر محلول MTT (5mg/ml) و قراردادن میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در مجاورت دی اکسید کربن با غلظت ۵ درصد به مدت حداکثر ۴ ساعت، صدو پنجاه میکرولیتر دی متیل سولفاکساید (DMSO) به عنوان حلال MTT را به هر

یک از چاهک‌ها افزوده و بعد از تکان دادن میکروپلیت بر روی شیکر (shaker) جذب نوری محلول را در ۵۹۰ نانومتر و فیلتر رفرانس ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری کردیم. در تمام نمونهها آنتی ژن مختص تومور قادر به تکثیر سلول‌های T بوده‌اند. برای اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها (eBioscience, UK)، دوست میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (حاوی $10^5 \times 2$ سلول) هر یک از بیماران را در چاهک‌های پلیت ۲۴ تایی ریخته و با محلول RPMI 1640 حجم آن را به یک میلی‌لیتر رسانده و سپس پنج میکرولیتر آنتی ژن مختص تومور به هر یک از چاهک‌ها افزوده شد. زمان کشت مطلوب برای IL-4 و IFN- γ ۷۲ ساعت و برای TGF- β ۹۶ ساعت بوده است. سپس با سانتریفیوژ، مایه رویی را جدا و به روش الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری کمی سلول‌های Treg از کیت فلوسایتومتری CD4⁺CD25⁺Foxp3Regulatory cell خریداری شده از (eBioscience, UK) استفاده شده است. دوست میکرولیتر از سوسپانسیون تک هسته‌ای گردش خون را با RPMI 1640 به حجم یک میلی‌لیتر رسانده و در یکی از چاهک‌های پلیت ۲۴ تایی همراه با پنج میکروگرم/ میلی‌لیتر آنتی ژن مختص تومور در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در مجاورت دی اکسید کربن با غلظت ۵ درصد برای ۲۴ ساعت کشت داده دادیم. بعد از رنگ‌آمیزی مارکرهای غشایی لنفوسیت‌ها (CD4, CD25) سلول‌ها را با Fixation /permeabilization buffer مطابق پروتکل کارخانه سازنده ثابت و نفوذپذیر شدند. سپس قبل از آنالیز سلول‌ها با آنتی‌بادی کوئزگه فلوروسانس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. در تمام نمونه‌های رنگ شده، سلول‌های مرده خارج از گیت قرار داشتند و لنفوسیت‌های زنده گیت زده و تا ۱۰۰۰۰ سلول شمارش شدند. همه داده‌ها در BD FACScalibur, USA جمع‌آوری شده و با استفاده

از نرم افزار Cell Quest program آنالیز شدند.

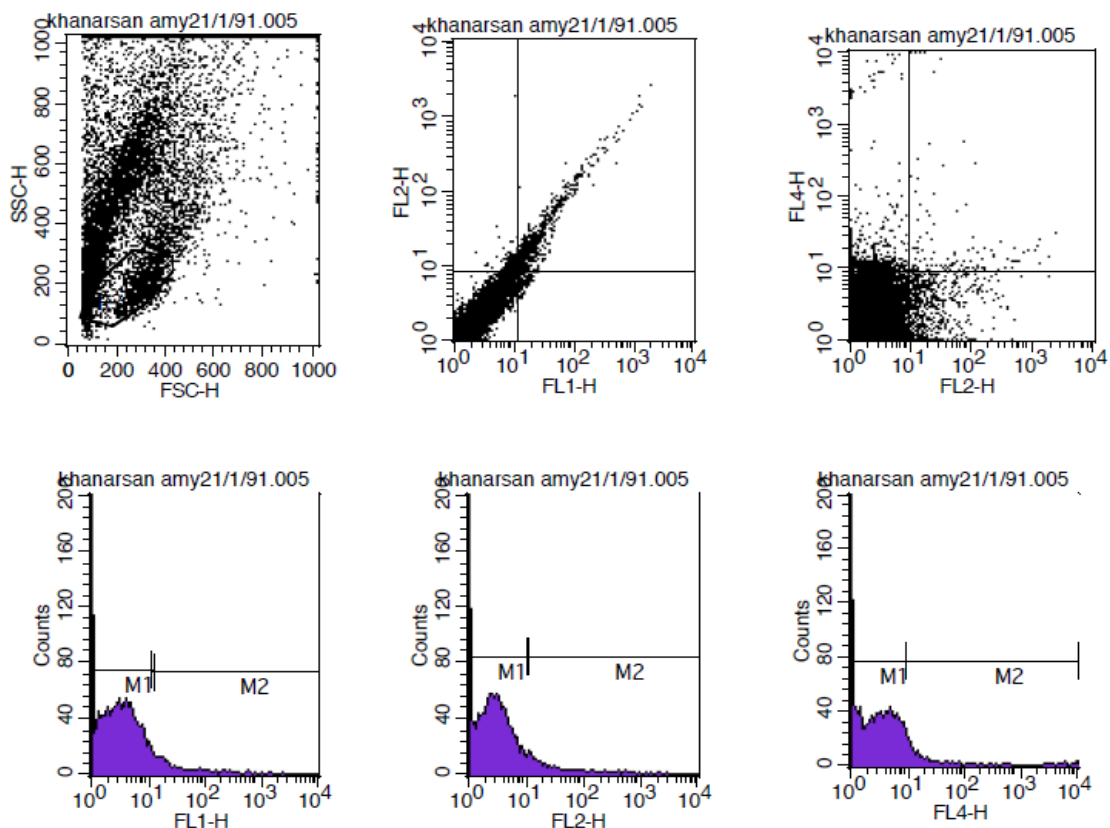
یافته‌ها

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

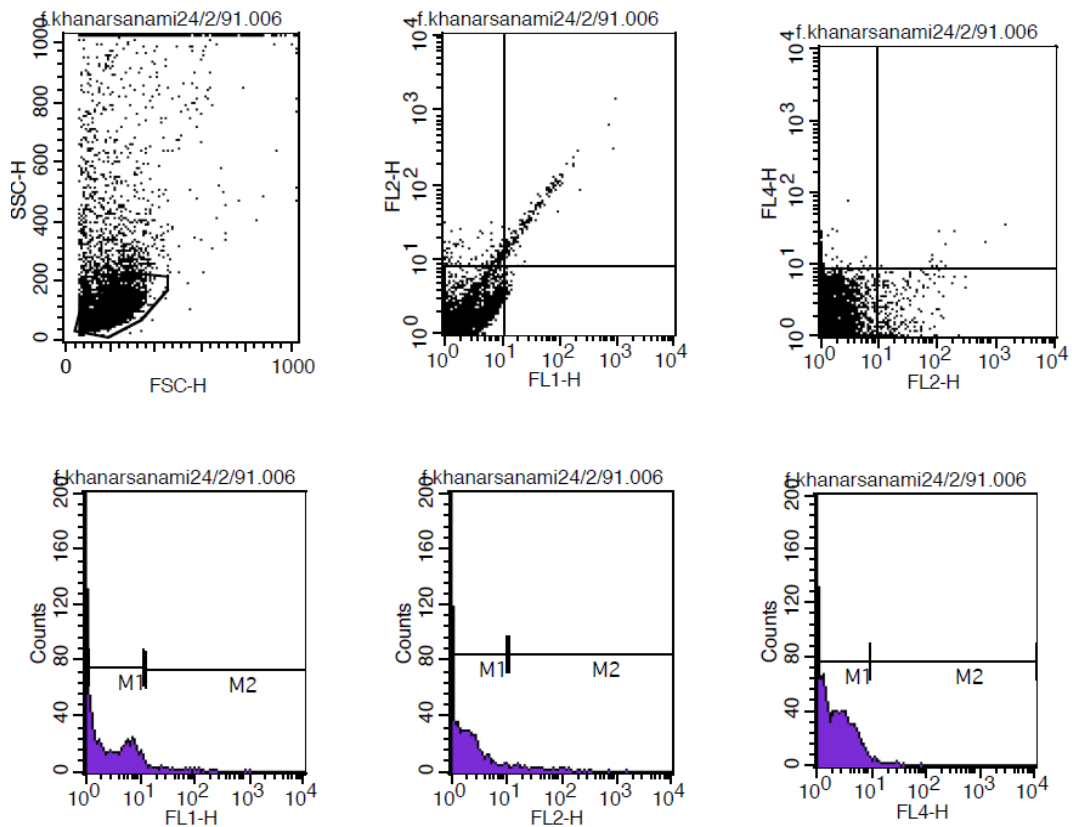
با استفاده از آزمون t وابسته میانگین، پراکندگی و معنی داری با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) تغییرات داخل گروهی و با آزمون Levene's (فرض برابری واریانس) و آزمون t (فرض عدم برابری واریانس) گروه درمانی با گروه کنترل مقایسه بین گروهی انجام و ملاحظه شد که در گروه درمانی بعد از مصرف دارو تعداد سلول‌های Foxp3 Treg (به طور میانگین از ۱/۳۳۹ قبل درمان به ۰/۸۱۲ بعد درمان)

(تصویر شماره ۱)، میزان TGF- β خون محیطی (به طور میانگین از ۳۳۵pg/ml قبل درمان به ۲۹۹ pg/ml بعد درمان)، IL-4 (به طور میانگین از ۱۹۹pg/ml قبل درمان به ۹۲ pg/ml بعد درمان) کاهش ولی میزان γ -IFN خون محیطی (به طور میانگین از ۱۰۷ pg/ml به ۱۴۱ pg/ml بعد درمان) افزایش یافت (تصویر شماره ۳). این تغییرات داخل گروه با توجه به $p < 0.05$ معنی دار بوده است. در گروه کنترل هیچ تغییر معنی داری ایجاد نشد (تصاویر شماره ۲ و ۴).

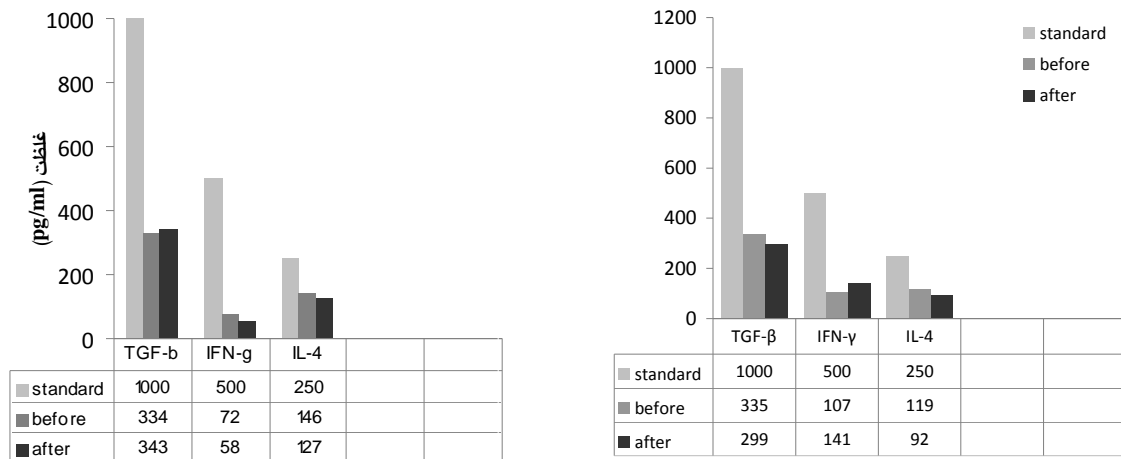
اما در مقایسه بین گروهی براساس آزمون‌های T و Levene's معلوم شد فقط افزایش γ -IFN و کاهش IL-4 معنی دار و تحت تأثیر دوز داروی مصرف شده، روی داده است. کاهش سلول‌های Treg Foxp3 و TGF- β در گروه درمانی روی داده اما به نظر نمی‌رسد تحت تأثیر غضروف کوسه ماهی بوده باشد.



تصویر شماره ۱: نمودار دات پلات و هیستوگرام بیماران قبل از درمان با غضروف کوسه ماهی



تصویر شماره ۲: نمودار دات پلات و هیستوگرام بیماران بعد درمان با غضروف کوسه ماهی



تصویر شماره ۴: نمودار تغییرات سایتوکاینی به فاصله یک ماه در گروه کنترل

تصویر شماره ۳: نمودار تغییرات سایتوکاینی قبل وبعد درمان در بیماران درمان شده با غضروف کوسه ماهی

بحث

مدل‌های حیوانی مطرح شده است. در حالات فوق نشان داده شده که، غضروف کوسه ماهی با کاهش آنژیوژنز

مطالعات و گزارشاتی مبنی بر اثر ضد سرطانی غضروف کوسه ماهی در شرایط آزمایشگاهی و

از رشد تومور جلوگیری می‌کند. آنژیوژنز فرآیند پیچیده و چند مرحله 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 (۲۹-۳۳). رشد تومور با بلوک کردن مسیر VEGF-VEGFR-2 مهار می‌شود. در این مسیر با اتصال VEGF به گیرنده‌اش، فاکتورهای نسخه برداری سیتوپلاسمی ERK1/2، سرین-تره اونین کیناز AKT فسفریله می‌گردند. این پروتئین‌های به هسته سلول مهاجرت و به پروموتورهای CXCR4 و HIF1 α سلول توموری متصل می‌شوند (۳۵،۳۴).

HIF1 α زیرواحدی از فاکتور نسخه برداری HIF1 است که نه تنها پاسخ‌های ایمنی اکتسابی ضد هیپوکسی (hypoxia) بلکه عملکرد سلولی تحت نورماکسی (normoxia) را تنظیم می‌کند. HIF1 α با تجمع VEGF موجب بقا سلول و تمایز عروقی می‌شود (۳۶). تاکنون در انسان، مهار و یا کند شدن آنژیوژنز در بافت‌های توموری به وسیله غضروف کوسه ماهی گزارش نشده است، اما در شرایط آزمایشگاهی دیده شده که با کشت و تحریک غیراختصاصی سلول‌های تک هسته‌ای گردش خون افراد سالم که غضروف کوسه ماهی مصرف کرده‌اند، میزان TNF- α ، IFN- γ و IL-8 به سرعت تولید و بسیار بیشتر از مقدار طبیعی و برعکس IL-4 تولید نشده و حتی پس از ۹۶ ساعت هم بسیار کم‌تر از مقدار طبیعی گردش خون بوده است (۲۷). اگرچه گزارشاتی مبنی بر عدم تأثیر غضروف کوسه ماهی در ممانعت از رشد تومور در افراد مبتلا به سرطان ریه (۲۸) نیز وجود دارد.

پاسخ‌های ایمنی ضد توموری حول چندین محور بررسی می‌شوند که مسیرهای Treg Foxp3-TGF- β cell و ایمنیتی Th1/Th2 از جمله آنهاست. در پاسخ‌های ضد توموری انتظار می‌رود با کاهش مسیر

TGF- β /Treg بالانس ایمنی Th1/Th2 به نفع الگوی سایتوکاینی Th1(γ -IFN) و کاهش الگوی سایتوکاینی Th2(IL-4) تغییر یابد. همان‌طور که در مقدمه گفته شد سلول‌های Treg با تولید سایتوکاین مهار کننده TGF- β پاسخ‌های ایمنی ضد توموری سلول‌های Th1 را کاسته و موجب رشد و متاستاز تومور می‌شود. به علاوه تقویت ایمنی Th2 که به واسطه اثر مهار کننده سلول‌های Treg نیز روی می‌دهد موجب کاهش فعالیت ضد توموری سلول‌های Th1 شده و به رشد تومور کمک می‌کند (۲۴-۵). با توجه به نتایج به دست آمده، غضروف کوسه ماهی با کاهش سلول‌های CD4⁺CD25⁺Foxp3^{hi}Treg در گروه درمانی همراه بوده است. همان‌طور که در مقدمه گفته شده، یکی از مکانیسم‌های عملکردی سلول‌های Treg، تولید سایتوکاین‌های مهار کننده نظیر TGF- β ، IL-10 و IL-35 است. بنابراین با کاهش سلول‌های Treg انتظار می‌رود TGF- β مهم‌ترین سایتوکاین ترشحی این زیرگروه از نفوسیت‌های T نیز کاهش یابد. کاهش محور Treg-TGF- β ، علامت مناسبی برای حذف اثر مهار کننده‌های ایمنی سلولی و در نتیجه تقویت پاسخ‌های ایمنی ضد تومور است. از این‌رو ما الگوی سایتوکاینی TH1 (IFN- γ) و TH2 (IL-4) را اندازه گرفتیم و مشاهده شد که با کاهش TGF- β ، میزان IFN- γ افزایش یافته است. منبع اصلی IFN- γ سلول‌های TH1 و همچنین سلول‌های NK هستند. ۶۰-۵۰ درصد سلول‌های تک هسته‌ای گردش خون را سلول‌های TH و کم‌تر از ۱۰ درصد آن را سلول‌های NK تشکیل می‌دهند. بنابراین، کاهش TGF- β را می‌توان یکی از عوامل افزایش IFN- γ یا الگوی سایتوکاینی TH1 تحت تأثیر غضروف کوسه ماهی مطرح نمود. افزایش این سایتوکاین می‌تواند معرف فعالیت ضد توموری سلول‌های ترشح کننده آن در بیماران مبتلا به سرطان معده باشد.

سلول‌های T ترشح کننده TGF- β در بعضی موارد IL-10 و IL-4 را نیز تولید می‌کنند، که هر دو همانند

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

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از زحمات بی دریغ و رهنمودهای اساتید و همکارانی که در انجام این طرح ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

TGF- β خاصیت مهار ایمنی سلولی را دارند و از تولید IFN- γ و تمایز سلول های T به سلول های TH1 جلوگیری کرده، ولی تمایز و پاسخ های TH2 را تقویت می کنند. بنابراین انتظار می رفت با کاهش سلول های Treg، تولید سایتوکاین های TGF- β و IL-4 نیز کاهش یابد. این اثر به خوبی در داخل گروه مشاهده گردید. بنابراین، پیشنهاد می شود، غضروف کوسه ماهی در انسان های مبتلا به سرطان معده، همراه با کاهش سلول های مهاری Treg و سایتوکاین TGF- β موجب کاهش میزان IL-4 و افزایش تولید IFN- γ شده و زمینه تقویت پاسخ های ایمنی سلولی ضد توموری را فراهم می سازد.

References

1. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25) breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151-1164.
2. Pandolfi F, Cianci R, Pagliari D, Landolfi R, Cammarota G. Cellular mediator of inflammation: Tregs and Th17 Cells in gastrointestinal diseases. *Mediators Inflamm*. 2009; Article ID: 132028.
3. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(9): 665-674.
4. Borish L, Rosenwasser L. TH1/TH2 lymphocytes: doubt some more. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(2): 161-164.
5. Wang J, Huizinga TW, Toes RE. De novo generation and enhanced suppression of human CD4+CD25+regulatory T cells by retinoic acid. *J Immunol* 2009; 183(6): 4119-4126.
6. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. Localisation pattern of FoxP3+regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer* 2008; 98(1): 148-153.
7. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 2007; 317(5838): 627-629.
8. Sakaguchi S. Regulatory T cells in the past and for the future. *Eur J Immunol* 2008; 38(4): 901-937.
9. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4+CD25+T cells with regulatory properties Isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193(11): 1285-1294.
10. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4+CD25+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001; 31(4): 1247-1254.
11. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25+ regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167(3): 1245-1253.
12. Xu Q, Lee J, Jankowska-Gan E, Schultz J,

- Roenneburg DA, Haynes LD, Kusaka S, et al. HumanCD4+CD25low adaptive T regulatory cells suppress delayed-type hypersensitivity during transplant tolerance. *J Immunol* 2007; 178(6): 3983-3995.
13. Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania* major infection. *J Immunology* 2005; 174(9): 5444-5455.
14. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszynas F, Kretschmer U, Krenn V, et al. Expression of the integrin $\alpha E\beta 7$ identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *PNAS* 2002; 99(20): 13031-13036.
15. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Giometto R, Hopner S, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by FoxP3+Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007; 110(4): 1225-1232.
16. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp MED* 2007; 204(6): 1257-1265.
17. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 controlover FoxP3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322(5899): 271-275.
18. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112(2): 358-404.
19. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF- β -induced FoxP3+CD4+CD25+ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008; 29(9): 429-435.
20. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3(2): 135-142.
21. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; 27(4): 635-646.
22. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001; 2(12): 1126-1132.
23. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *2007 Nat Immunol* 2007; 8(12): 1353-1362.
24. 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. Accessed June 11, 2008.
25. Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-part 1. *Curr Oncol* 2006; 13(1): 14-26.
26. Merly L, Simjee S, Smith SL. Induction of inflammatory cytokines by-cartilage extracts. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(3): 383-391.

27. Charles Lu. Shark cartilage no help for cancer. *J Natl Cancer I* 2010; 26.
28. Zheng LH, Wang YJ, Sheng J, Wang F, Zheng Y, Lin XK, et al. Antitumor peptides from marine organisms. *Mar Drugs* 2011; 9(10): 1840-1859.
29. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3(2): 65-71.
30. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1(1): 27-31.
31. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-174.
32. Folkman, J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 1997; 79: 1-8.
33. Nakamura S, Chikaraishi Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H. Ruboxistaurin, a PKCbeta inhibitor, inhibits retinal neovascularization via suppression of phosphorylation of ERK1/2 and Akt. *Exp Eye Res* 2010; 90(1): 137-145.
34. Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 2006; 71(2): 226-235.
35. Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Migneco G, Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, 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(17): 3534-3551.
36. Fukushima K, Murata M, Hachisuga M, Tsukimori K, Seki H, Takeda S. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates matrigel-induced endovascular differentiation under normoxia in a human extravillous trophoblast cell line. *Placenta* 2008; 29(4): 324-331.