Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، سال دوازدهم، شماره ۴۴و۴۵، پاییز و زمستان ۸۳

تأثیر استفاده از غضروف کوسه ماهی بر سلولهای $CD4^+$ و $CD8^+$ در بیماران سرطان پستان

سمیه شاهرخی*[۱]، زهیر محمد حسن[۲]، محمد علی محققی[۳]، طوبی غضنفری[۴]

چکیده

مقدمه: در کنار روشهای درمانی رایج، استفاده از مکملهای دارویی در بیماران سرطانی شایع است. غضروف کوسه از جمله مکملهای دارویی است. در مورد اثر آن بر سیستم ایمنی اطلاعات کمی در دست است. ما در این مطالعه اثر آنرا بر سلولهای $CD4^+$ و $CD8^+$ و میزان IFN_y بررسی می‌کنیم.

مواد و روشها: در این مطالعه تعداد ۳۲ بیمار سرپایی مراجعه کننده به مراکز درمانی انستیتو پاستور در مجتمع بیمارستانی امام خمینی تهران که مبتلا به سرطان پستان بودند بصورت تصادفی به دو گروه Case و کنترل تقسیم شدند. بیماران گروه تست کپسولهای غضروف کوسه و گروه کنترل کپسولهای نشاسته را مصرف کردند، پس از جداسازی سلولها و تهیه سوسپانسیون سلولی و کشت آنها، تست فلوسیتومتری والایزا انجام شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج حاصله نشان داد که بیمارانی که ۱۲ هفته تحت درمان با غضروف کوسه بودند افزایش معنی‌داری در درصد سلولهای CD^+ و $CD4/CD8^+$ داشتند و میزان ترشح IFN_y بعد از مصرف دارو در سه گروه تست افزایش معنی‌داری داشت در حالی که در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

نتیجه گیری نهائی: غضروف کوسه ماهی سبب تقویت سیستم ایمنی سلولی در مقابله با تومورها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: غضروف کوسه، CD8، CD4 ، سرطان پستان، سیستم ایمنی

۱ - کارشناسی ارشد گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهران

۲ - استاد گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهران

۳ - استادیار جراحی مرکز تحقیقات مبارزه با سرطان انستیتو کانسر

۴ - استادیار گروه ایمونولوژی دانشگاه شاهد تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

علیرغم پیشرفتهای قابل توجه، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان است(۱۹،۱۸،۱۷). تا امروز هنوز فرضیه واحدی برای بیان و توضیح این بیماری پیچیده و هتروژن وجود ندارد (۱۹). اما چند عامل مهم در مورد علل ایجاد این بیماری مطرح شده است از جمله: فاکتورهای ژنتیکی، هورمونی، محیطی(وضعیت تغذیه، اشعه‌های یونیزان) و ایمونولوژیک فرد (۲۳،۱۷،۱۸).

در کنار روشهای درمانی رایج ، استفاده از مکملهای دارویی (CAM)[1] در این بیماری شایع است (۲۲،۲۱،۱۶،۸،۷،۶،۵).

نتایج یک مطالعه سیستمیک نشان داد که حدود یک سوم بیماران سرطانی از این روش درمانی استفاده می‌کنند(۱۷). از جمعیتهای استفاده کننده از این داروها بیماران مبتلا به سرطان پستان هستند، مدرک دقیقی از اینکه چه تعداد از آنان به تنهایی یا به همراه دیگر درمانهای رایج از این درمان استفاده می‌کنند وجود ندارد(۳). در یک مطالعه بر روی ۴۳۵ نفر زن مبتلا به این بیماری دیده شد که ۸۰٪ آنها از مکملهای غذایی و داروئی استفاده کردند(۱۵). غضروف کوسه از جمله این مکملهای دارویی مورد استفاده است(۲۱). غضروف کوسه اثر ضد رگزایی دارد که کمک به مهار رشد تومور می‌کند و ویژگی ضد سرطانی در آن دیده شده است(۱۱،۱۰،۹).

شواهدی در مورد اثر تقویتی این ماده بر سیستم ایمنی وجود دارد(۱۱،۹،۲). مطالعه‌ای که در موشهای توموری با استفاده از فراکشن ۱۴ و ۱۵ کیلودالتونی غضروف کوسه انجام شد میزان ارتشاح سلولهای لنفوسیت به درون تومور و نسبت CD4/CD8 افزایش یافته بود که بیانگر این است که این فراکشن می‌تواند نقش تحریکی در ارتشاح این سلولها به درون تومورهای موش داشته باشد(۹). در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از پودر غضروف کوسه و مقایسه آن با پودر غضروف مرغ افزایش میزان تولید آنتی بادی SRBC در موش در اثر پودر غضروف ک۳۰۸۰/۰وسه تا ۱۰ برابر مشاهده شد ولی غضروف مرغ چنین خاصیتی را نشان نداد(۱).

با توجه به وجود چنین شواهدی درباره اثر تحریکی این دارو بر سیستم ایمنی و اهمیت این سیستم در مقابله با سرطان و فقدان مدرک علمی معتبری در مورد تأثیر مصرف خوراکی کپسولهای محتوی پودر پروتئینی عصاره غضروف کوسه بر سلولهای خارجی CD4/CD8 و میزان IFN_y بیماران سرطانی، ما در این مطالعه تصمیم گرفتیم تا برای اولین بار اثر غضروف کوسه ماهی را بر فعالیت این سلولها و ترشح این سایتوکاین در انسان ارزیابی کنیم.

مواد و روشها

تهیه دارو:

محلول بافر استات سدیم ۰/۱M حاوی گوانیدیوم هیدروکلراید ۴ مولار با PH= ۵/۸ تهیه شد. به این بافر ۶ آنتی پروتئاز اضافه شد، سپس به ازای هر ۱۰ میلی لیتر از بافر مقدار ۱ گرم پودر غضروف کوسه (بندر بوشهر) اضافه شد. محلول حاصله به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه و نیروی g۸۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید(۹،۱۳،۴). مایع رویی که حاوی عصاره‌ای از پروتئینهای غضروف کوسه ماهی بود به روش برادفورد از نظر میزان پروتئین بررسی شد.

عصاره بدست آمده در فیلتر با قطر ۰/۲۲ میکرون استریل شد، با استفاده از لیوفلیزاتور پودر پروتئینی

1-Complementary and alternative medicine

www.SID.ir

Archive of SID

از عصاره تهیه شد. حجمهای ۲۰۰mg از پودر پروتئینی عصاره غضروف کوسه ماهی، در کپسولهای دارو تقسیم شد، سپس ۶۰، ۱۲۰ و ۲۲۵ عدد از این کپسولها جهت گروه تست بسته‌بندی شد. همچنین ۲۰۰mg از پودر نشاسته در کپسولهای گروه کنترل ریخته و بسته‌بندی شد.

پروتکل درمانی بیماران :

پس از اخذ مجوز کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور جهت اجرای این تحقیق، از بین مراجعین(بیماران سرپایی مرکز درمانی انستیتو پاستور در مجتمع بیمارستانی امام خمینی تهران)، بیمارانی که مبتلا به سرطان پستان بودند و شرایط زیر را داشتند انتخاب شدند:

مرحله(stage)II و III نوع invasive ductal carcinoma، طیف سنی ۳۵ تا ۶۰ سال و در مرحله هورمون درمانی(تاموکسیفن) بودند به صورت تصادفی انتخاب شدند و مراحل کار برای بیماران شرح داده شد. در صورت رضایت، بیماران به طور تصادفی در گروهای تست و کنترل تقسیم شدند. تعداد کل بیماران مورد مطالعه ۳۲ نفر بود. بیماران گروه تست خود به سه زیرگروه تقسیم شدند که تفاوت این گروهها در مدت زمان استفاده از دارو بود بطوریکه ۱۰ نفر به مدت ۳ هفته , روزی ۳ بار از کپسولهای حاوی ۲۰۰mg پودر پروتئینی عصاره غضروف کوسه را مصرف می‌کردند، ۵ نفر دیگر به مدت ۶ هفته و ۵ نفر دیگری به مدت ۱۲ هفته کپسولها را مصرف کردند. در مدت درمان بیماران تحت نظر پزشک و پژوهشگر بودند.

گروه کنترل(Placebo): به دو زیرگروه تقسیم شدند که ۶ نفر کپسولهای حاوی ۲۰۰mg پودر نشاسته را روزی ۳ بار و به مدت ۶ هفته و ۶ نفر دیگر با همان برنامه به مدت ۱۲ هفته مصرف کردند. قبل و بعد از مصرف دارو از بیماران خون‌گیری به عمل آمد.

جداسازی و کشت سلولهای منونوکلئر خون محیطی:

نسبت ۲ به ۱ از خون برروی فایکول (sigma) برده شد و در دور ۸۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۸ درجه سانتریفوژ شد. سپس با پیپت پاستور حلقه میانی حاوی سلولهای منونوکلوئر به لوله دیگری انتقال داده شد، سلولها ۳ بار در دور ۴۵۰g به مدت ۱۰ دقیقه با PBS شسته شدند.

۲×۱۰^{۵} سلول منونوکلوئر در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه با کف صاف کشت داده شد و حجم نهایی هر چاهک با محیط ۱۰٪(Gibco) RPMI-FBS به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد سپس به هر چاهک ۵ میکروگرم PHA(Gibco) اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور $۳۷^{\circ}C$ با $۵\%co_2$ انکوبه شد. پس از پایان این مدت میکروپلیت سانتریفوژ شد و مایع رویی حاصل از کشت سلولهای منونوکلئر در حجمهای ۲۰۰ میکرولیتر در اپندرف ریخته و تا زمان انجام تست الایزا در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد(۱۲).

تست فلوسایتومتری :

پس از تهیه سوسپانسیون سلولی ۱×۱۰^{۶} سلول را در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در لوله مخصوص دستگاه ریخته و براساس غلظت آنتی بادیها، مقادیر ۱۰ میکرولیتر از آنتی بادی ضد CD4 و CD8 اضافه گردید. پس از تکان دادن لوله به مدت نیم ساعت، در شرایط تاریک در یخچال نگه‌داری شدند و سپس با استفاده از پارافرمالدئید ۲٪ واکنش متوقف شد و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری نتایج قرائت گردید(۹).

www.SID.ir

Archive of SID

تست الایزا(ELISA):

با استفاده از کیت الایزای شرکت Bender Med System(BMS228) غلظت IFN_y اندازه گیری شد.

یافته های پژوهش

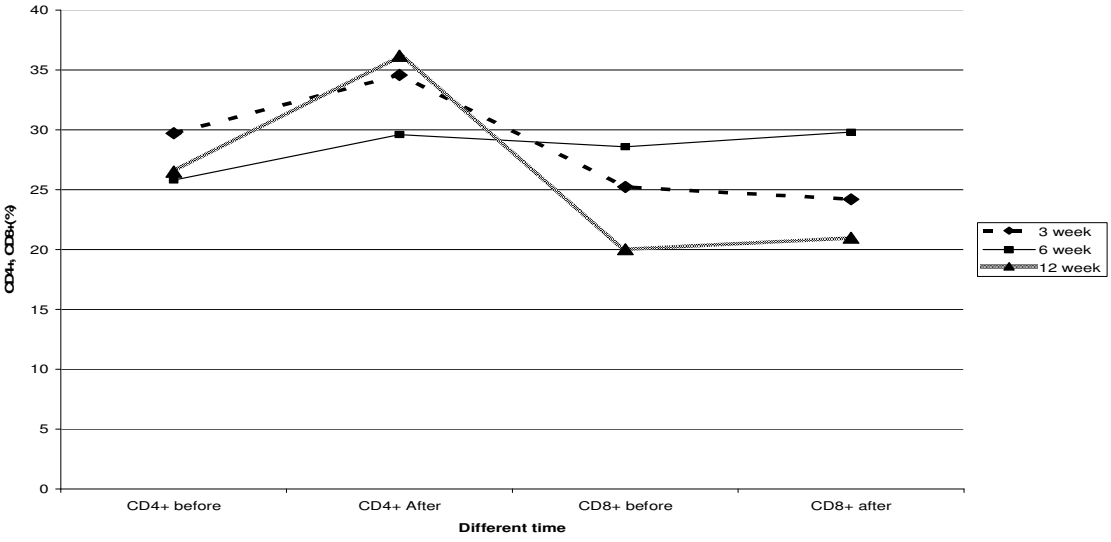
نتایج تست فلوسایتومتری:

نتایج حاصل از تست فلوسایتومتری در گروه تست که به مدت ۳ و ۶ هفته از کپسولهای غضروف کوسه ماهی استفاده کرده بودند بعد از پایان درمان تفاوت معنی‌داری در میزان و نسبت CD4 و CD8 در مقایسه با قبل از درمان را نشان نداد ($P>0.05$).

تعداد سلولهای CD4 در گروه تست که ۱۲ هفته تحت درمان بودند افزایش معنی‌داری در مقایسه با قبل از درمان داشت($P<0.05$)، اما تفاوت معنی‌داری در درصد سلولهای CD8 در مقایسه با قبل از این دوره مشاهده نشد. نسبت CD4 و CD8 در این گروه افزایش معنی‌داری داشت (نمودار۱ و ۳).

میزان و نسبت CD4 و CD8 در گروه کنترل که به مدت ۱۲ و ۶ هفته از کپسولهای نشاسته استفاده کرده بودند در مقایسه با قبل از درمان تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0.05$),(نمودار۲).

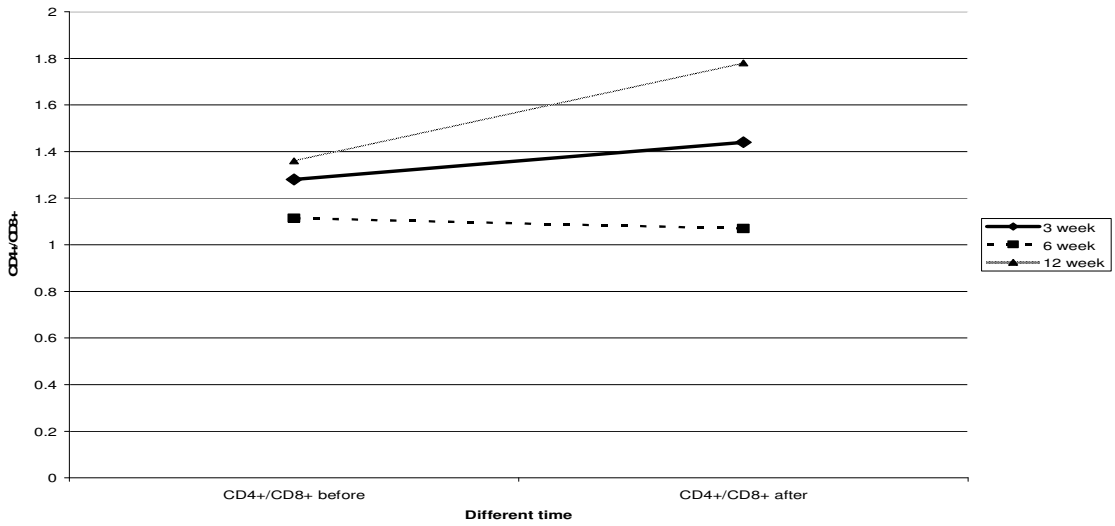
در مقایسه کلی بین دو گروه تست و کنترل قبل از درمان تفاوت معنی‌داری بین گروه تست(۳، ۶ و ۱۲هفته) و کنترل(۶ و ۱۲ هفته) نبود اما پس از درمان افزایش معنی‌داری در گروه تست در درصد سلولهای $CD4^+$ و نسبت سلولهای CD4/CD8 دیده شد(نمودار۳).



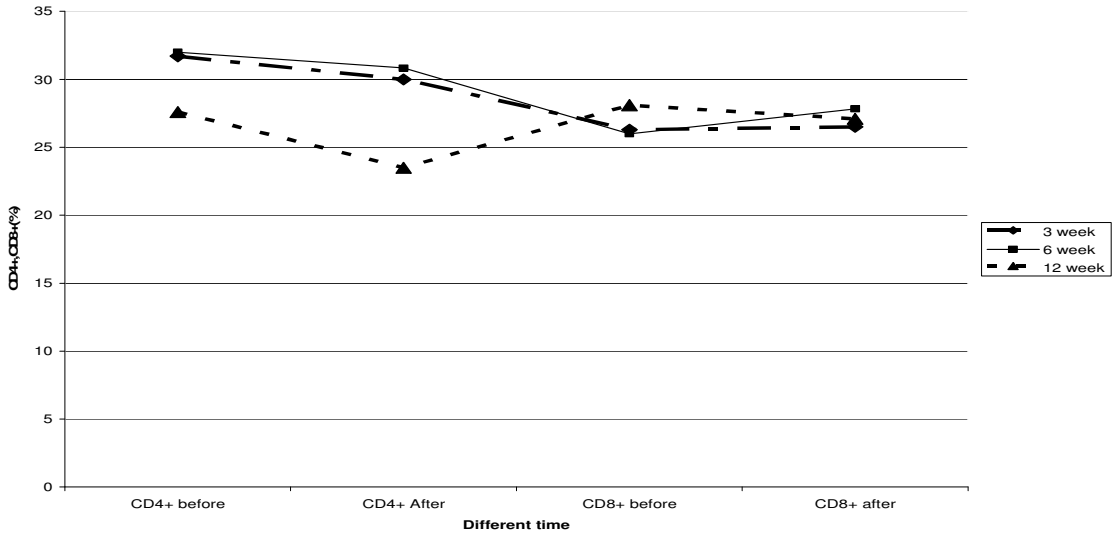
نمودار۱: مقایسه میانگین درصد سلولهای $CD4^+$ و $CD8^+$ قبل وبعد از درمان در گروه تست در دوره های درمانی مختلف

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۲: مقایسه میانگین درصد سلولهای $CD4^+$ و $CD8^+$ قبل و بعد از درمان در گروه کنترل در دوره های مختلف



نمودار۳: مقایسه میانگین نسبت سلولهای $CD4^+$ به $CD8^+$ قبل وبعد از درمان در گروه تست در دوره های درمانی مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج سنجش غلظت IFN_{γ} :

غلظت IFN_{γ} که با استفاده از منحنی استاندارد تست آلایزا بدست آمده بود با استفاده ازتستهای آماری آنالیز شد.

میزان این سایتوکاین در گروه اول و دوم تست که به مدت ۳ و ۶ هفته از دارو مصرف کرده بودند در مقایسه با قبل از درمان، افزایش داشت و این افزایش از نظر آماری معنی دار بود($P<0.05$).

در گروه سوم تست که به مدت ۱۲ هفته تحت درمان بودند در میزان IFN_{γ} افزایش کاملاً معنی‌داری نسبت به قبل از درمان مشاهد شد($P<0.05$).

مقایسه میزان این سایتوکاین در هر دو گروه کنترل (۶ و ۱۲ هفته‌ای) تغییر معنی داری در غلظت این سای‌توکاین را نشان نداد($P>0.05$).

در مقایسه کلی بین دو گروه کنترل و تست، میزان این سایتوکاین قبل از درمان، در گروههای تست و کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$)، ولی مقایسه غلظتهای این سایتوکاین در نمونه‌های بعد از درمان در این دو گروه تفاوت معنی‌داری ($P<0.05$) را بین این دو گروه نشان داد.

بحث و نتیجه گیری

در دهه‌های اخیر استفاده از مکمل های دارویی شیوع گسترده‌ای داشته است ولی در حال حاضر هیچ مکمل دارویی کاملاً مؤثری برای سرطان شناخته نشده است(۲۱) و تلاش در جهت تهیه یک داروی مؤثر در برابر سرطان همچنان ادامه دارد. مکمل‌های دارویی متعددی وجود دارند از جمله اینها غضروف کوسه ماهی می‌باشد که با مکانیسمهای متعددی سبب مهار رشد تومور می‌شود(۹،۱۰،۱۱). از جمله این ویژگیها, اثر تقویتی آن بر سیستم ایمنی است که مطالعات علمی محدودی در این زمینه صورت گرفته است.

در این مطالعه تصمیم گرفته شد تا اثر کپسولهای محتوی پودر پروتئینی عصاره غضروف کوسه ماهی تهیه شده در ایران را بر سلولهای $CD4^{+}$ و $CD8^{+}$ بیماران سرطان پستان که در مرحله هورمون درمانی بودند بررسی شود. نتایج حاصله افزایش میزان این سلولها را در گروه تست نشان داد، گروهی که ۱۲ هفته تحت درمان با غضروف کوسه ماهی بودند افزایش معنی‌داری در درصد سلولهای $CD4^{+}$ و CD4/CD8 در مقایسه با قبل از درمان داشتند ولی تفاوت معنی‌داری در گروه کنترل نسبت به قبل از درمان دیده نشد.

همچنان که نتایج این مطالعه نشان داد، غضروف کوسه ماهی با تحریک سیستم ایمنی در تولید IFN_{γ} در گروه تست، سبب افزایش میزان این سایتوکاین در مقایسه با قبل از درمان شد که با افزایش دوره درمان، اختلاف غلظت IFN_{γ} با قبل از درمان بیشتر شد. در گروه کنترل تغییر معنی داری در مقایسه با قبل از درمان مشاهده نشد.

نتایج حاصل از این مطالعه تأییدکننده چند نکته مهم در مورد اثر این دارو بر سیستم ایمنی سلولی است: افزایش نسبت CD4/CD8 در مدل حیوانی تومور، که فاکتور پروگنوزی خوبی در مبتلایان به تومور است. افزایش DTH (۹)، افزایش تولید IL12 و نیتریک اکساید از ماکروفاژ که بیانگر تقویت پاسخهای ایمنی سلولی است که در مقابله با تومور و پاتوژنها مفید است(۱۱).

به نظر می‌رسد که این دارو با افزایش میزان سلولهای CD4 و تحریک تولید اینترفرون گاما از این سلولها سبب تقویت پاسخ ایمنی سلولی Th1

www.SID.ir

Archive of SID

شده است. با توجه به اینکه IFN_y سایتوکاین ضد تکثیری مهمی در جلوگیری از تکامل سلولهای توموری است. اهمیت نتایج این مطالعه بیشتر مشخص می‌شود و به نظر نمی‌رسد که این دارو نقش مؤثری در افزایش پاسخهای سایتوتوکسیک وابسته به CD8 داشته باشد.

نتایج مطالعه ما مشابه مطالعه‌ای است که توسط Lane بر بیماران سرطان کولون، پستان و پانکراس انجام شد که ۷۵٪ بیماران در پایان ۱۲ هفته درمان با غضروف کوسه به سوی بهبودی پیش رفتند(۲۰).

علت تناقضهای موجود در مورد اثر این دارو به عوامل مختلفی بستگی دارد مثلاً در مطالعاتی که از این دارو استفاده شده بود در بیماران مراحل پیشرفته نتایج مطلوبی مشاهده نشد(۱۴).

همچنان که ما نیز در چنین بیمارانی پاسخهای خوبی مشاهده نکردیم(اطلاعات منتشر نشده)، همچنین استفاده از این دارو در مطالعاتی که بصورت مونوتراپی از آن استفاده کرده اند مطلوب نبوده است(۸،۷), و بهتر است که بصورت ترکیبی با یکی از روشهای درمانی رایج مصرف شود، همچنین روش تهیه دارو و نوع کوسه مورد استفاده نیز در تنوع پاسخها مؤثر است(۱۰).

بنابر آنچه که گفته شد می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در دوره ۱۲ هفته‌ای درمان با کپسولهای پودر پروتئینی عصاره غضروف کوسه به همراه تاموکسیفن سبب تقویت سیستم ایمنی سلولی می‌شود. البته مطالعات بیشتری در خصوص اثر آن بر سایر پاسخهای ایمونولوژیک، پاتولوژیک و علایم بالینی این بیماران ضروری به نظر می‌رسد تا ضمن بررسی اثرات سلولی مولکولی این دارو در کنار علایم بالینی به نتیجه مطلوب و قانع‌کننده‌ای از اثر این دارو رسید.

سپاسگزاری

بدین وسیله ازهمکاری صمیمانه سرکارخانم دکتر نحوی جو و پرسنل درمانگاه جراحی انستیتو کانسر(سرکار خانمها: لطفی،ایجی، سعیدی، شریفی و...)در اجرای این تحقیق تشکر می شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱-شیخیان، ع. اثرات ایمونومدولاتوری غضروف کوسه بر ایمنی سلولی و هومورال. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ایمونولوژی ، دانشگاه تربیت مدرس،۱۳۷۵

2- Anonymous; So far, shark cartilage is a fishy treatment for cancer; Env Nutr, 1997,20(9):7.

3-Balneaves LG., Krisjanson JL.; describing complementary use by 1999,38: women living with breast cancer; Pat Edu Couns, convention: Tataryn; Beyond 143.

4-Dupont E, Brazeau P, Juneau C , et al; Methods of using extract of shark cartilage; United States Patents (USP) 1991,No,6,028,118.

5-Erg T, Vickers A, Bermnes RM, et al; Does of alternative medicine predict survival from cancer?; Euro J Cancer ,2003,39: 372-377.

6- Ernest E;the current position of complementary/alternative medicine in cancer; Euro J Cancer , 200,339:2273-2277.

7- Ernest E ;The role of complementary and alternative medicine in cancer; Lan Oncol 2000;1:176-80.

8-Ernest E, Cassileth BR ;How useful are unconventional cancer treatment?; Euro J cancer ,1999,35,11:1608-1613.

9- Feyzi R, Hassan ZM, Mostafaie A; Modulation of CD4+ and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes by a fraction from shark cartilage: Shark cartilage modulates anti tumor immunity; Int Immunopharm ,2002,406:1-6.

10- Gonzalez RP, Leyva A , Moraes MO ; Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds: from basic to clinical research; Biol Pharm Bull, 2001,24(10): 1097-1101.

11-Kralovec JA, Guan Y , Metera K , et al; Immunomodulating principles from shark cartilage part1. isolation and biological assessment in vitro; int immunopharm, 2003,3:657-669.

12-Kuhlwein E, Irwin M; Melatonine modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine experesion; J Neruo Immunol,2001,117,51-57.

13-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.

www.SID.ir

Archive of SID

14- Miller DR, Anderson GT, Stark JJ, et al; Phase I/II trial of the safety and efficacy of shark cartilage in treatment of advanced cancer ;J Clin Oncol, 1998,16:3649-3655.

15-Newman V., Rock CL, Faerber S, et al; Dietary supplement use by women at risk for breast cancer recurrence the women's healthy eating and living study group; J Am Diet Assoc, 1998,98,3:285-92.

16-Risberg T, Vickers A , Bermnes RM , et al; Does of alternative medicine predict survival from cancer?; Euro J Cancer, 2003, 39:372-377.

17- Rosenthal S, Bennet JM; Practical Cancer Chemotherapy;New York: Medical Examination Publishing Co Inc: 1981.

18- Rubin Ph; Clinical oncology for medical students and physicians- a multidisciplinary approach. Rochester. New York: American Cancer Society Inc:1983, p 120-141.

19- Sakorafas GH , Krespis E, Pavlakis G; Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective; Surg Oncol, 2002,10:183-192.

20- Vae BW; shark cartilage; total health ,1993,15,4:42.

21- Verhoe MJ, Hilsden RJ, Berine MO; Complementary therapies and cancer care: an overview; Pat Edu Counseling ,1999, 38:93-100.

22-Walkers LG, Anderson J; Testing Complementary and Alternative therapies within a research protocol;Euro J cancer ,1999,35,11:1614-1618.

23- Winchester DJ, Winchester DJ; American Cancer Society ,Atlas of Clinical Oncology ,breast cancer. London: Decker Inc : 2000.

24-Herenberg, M. Lymphocyte subsets as prognostic markers for cancer patient srecieving immunomodulative therapy. *Med. Oncol*., (1999).16:145-53.

www.SID.ir