بررسی اثرات تعدیل‌کنندگی ایمنی غضروف کوسه ماهی در موش و انسان

علی شیخیان[1]، زهیر محمد حسن[2]، حسین حسین‌زادگان[1]

1- استادیار، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

2- استاد، عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکدهٔ پزشکی

یافته / دوره هشتم / شماره 2 / تابستان 85 / مسلسل 28

چکیده

دریافت مقاله: 84/9/19، ***پذیرش مقاله***: 85/2/6

Ø مقدمه: کوسه‌ها از موجوداتی هستند که به ندرت سرطان می‌گیرند. تفاوت اصلی بین این حیوانات و سایر حیوانات، وجود بافت غضروفی زیاد در بدن کوسه است. از آن‌جایی که سیستم ایمنی نقش مهمی در دفاع از بدن علیه برخی از انواع سرطان دارد، اثرات تعدیل کنندگی ایمنی غضروف کوسه ماهی بر سیستم ایمنی موش و انسان مطالعه گردید.

Ø مواد و روش ها: طی یک مطالعه تجربی، تأثیر دوزهای مختلف غضروف خالص کوسه بر تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند (SRBC) در موش Balb/c بررسی شد. تأثیر غضروف بر فعالیت کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی (NK) ، با تزریق این ترکیب به صفاق موش و سپس جداسازی سلول‌های صفاقی حیوان و میزان فعالیت کشندگی آنها علیه رده سلولی K562 بررسی شد. از تست ترانسفورماسیون لنفوسیتی (LTT) برای ارزیابی اثر غضروف کوسه بر فعالیت تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان بهره گرفته شد.

Ø یافته ها: غضروف خالص کوسه، پاسخ ایمنی هومورال علیه آنتی‌ژن‌های موجود در گلبول قرمز گوسفند را در موش Balb/c تقویت کرد، به طوری که در دوز mg/kg 100، تیتر هماگلوتینین را به $\frac{1}{1355}$ (در مقایسه با تیتر $\frac{1}{147}$ در حیوانات گروه شاهد که غضروف مرغ دریافت کرده بودند) افزایش داد. غضروف کوسه و مرغ هر دو دارای تأثیر میتوژنیک بر لنفوسیت‌های خون محیطی انسان هستند. غضروف خالص کوسه فعالیت NK را کاملاً سرکوب می‌کند.

Ø بحث و نتیجه گیری: از آن جایی که غضروف کوسه می‌تواند سیستم ایمنی اختصاصی (سلولی و هومورال) را تقویت کند، از این ترکیب می‌توان برای تقویت و به طور کلی تعدیل پاسخ‌های ایمنی استفاده کرد و احتمالاً تعدیل پاسخ‌های ایمنی در برابر تومور فراهم کننده نوعی مکانیسم است که عامل ابتلای کمتر کوسه‌ماهی به سرطان می‌باشد.

واژه های کلیدی: غضروف کوسه، پاسخ ایمنی هومورال، تعدیل ایمنی، فعالیت NK

آدرس مکاتبه: خرم آباد، معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

پست الکترونیک: sheikana@yahoo.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2022-08-12]

مقدمه

از سال‌ها پیش برای درمان بیماران سرطانی کوشش‌های فراوانی انجام گرفته و سعی شده است که از راه‌های مختلفی به مبارزهٔ علیه سلول‌های توموری بپردازند. به همین دلیل از روش‌هایی چون اشعه درمانی و شیمی درمانی و جدیداً از روش ایمونوتراپی استفاده شده است. اما واقعیت این است که هیچ کدام از روش‌های فوق با موفقیت کامل همراه نبوده‌اند (1 ، 2). در تومورهای جامد، رگ‌زایی از اهمیت حیاتی برخوردار است و اگر بتوانیم این روند را به نحوی متوقف کنیم، گامی مهم در جهت درمان این نوع تومورها برداشته‌ایم (3). بافت‌شناسان از مدت‌ها پیش می‌دانستند که غضروف بافتی فاقد رگ است و بعداً به وجود مواد ضد رگ‌زا در این بافت پی بردند (4 ، 5). وانگهی کوسه‌ها از موجوداتی هستند که به ندرت به سرطان مبتلا می‌شوند، ضمن این که دارای غضروف بیشتری نسبت به سایر حیوانات هستند (6). بر اساس همین یافته‌ها بود که محققان به مطالعه غضروف این حیوان روی آوردند. مطالعات نشان داد که مواد ضد رگ‌زای موجود در بافت غضروفی این حیوانات اولاً قویتر از همتایان خود در غضروف دیگر حیوانات هستند و ثانیاً غلظت آنها در واحد وزن غضروف، بسیار زیادتر از سایر حیوانات است. به علاوه، اثرات تعدیل کنندگی ایمنی غضروف حیواناتی چون گوساله تأیید شده است (7) و اهمیت سیستم ایمنی در مبارزه علیه تومورها نیز امر شناخته شده‌ای است (8). از طرفی، استفاده از غضروف کوسه در بیماران سرطانی توانسته است در بهبود آنها مؤثر باشد (6). بنابراین، تصمیم به مطالعه اثرات تعدیل کنندگی غضروف کوسه گرفته شد تا مشخص گردد آیا مواد موجود در غضروف می‌توانند سیستم ایمنی را در مبارزه علیه تومورها یاری دهند.

مواد و روش ها

طرز تهیه پودر غضروف

پودر غضروف خالص و ناخالص کوسه از کمپانی Twin Laboratory تهیه گردید و پودر غضروف مرغ نیز از غضروف جناغ سینه این حیوان تهیه شد. سعی شد از روشی استفاده شود که پروتئین‌ها و سایر مواد موجود در آن، فعالیت بیولوژیک خود را از دست ندهند. به این منظور غضروف تازه مرغ ابتدا در سرما خشک گردید و پس از پودر کردن از صافی عبور داده شد تا ذرات درشت آن حذف گردند.

ارزیابی تأثیر غضروف بر پاسخ آنتی‌بادی علیه SRBC

تعداد یک میلیارد گلبول قرمز گوسفند (SRBC) در روز صفر یا روز شروع آزمایش به صورت داخل صفاقی به تمامی حیوانات تزریق شد. به این منظور سیزده گروه پنج‌تایی موش انتخاب شد. گروه اول گروه شاهد بود که فقط SRBC دریافت کرد، به گروه دوم تا هشتم دوزهای 10، 20، 50، 100، 200 و 400 mg/kg از غضروف خالص کوسه تزریق شد، به گروه نهم دوز 150 mg/kg از غضروف ناخالص کوسه و به چهار گروه دیگر دوزهای 20، 50، 100 و 150 mg/kg از غضروف ناخالص مرغ تزریق گردید. تزریق انواع غضروف یک ساعت قبل از تزریق آنتی‌ژن، به صورت داخل صفاقی انجام شد. برای محلول‌سازی هر سه نوع غضروف از سرم فیزیولوژی استفاده شد. در روز هفتم از قلب حیوانات خونگیری شد و سرم آنها جدا گردید و پس از تهیهٔ رقت‌های سریال دوبل، تیتر آنتی SRBC به روش هماگلوتیناسیون ارزیابی شد. از آنالیز واریانس یک طرفه برای تحلیل نتایج استفاده گردید.

ارزیابی تأثیر غضروف بر پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان (تست ترانسفورماسیون لنفوسیتی)

سوسپانسیونی تک سلولی از سلول‌های تک هسته‌ای خون انسان تهیه شد و پس از شستشو شمارش گردید. محیط کشت شامل RPMI-1640 (Sigma) به علاوه 5٪ FCS (Sigma) بود. به ازاء هر خانه (well) دویست هزار سلول کشت داده شد و به هر خانه 50 µl از مادهٔ محرک [از PHA (غلظت محلول استوک = 1 mg/ml) رقت‌های $\frac{1}{20}$،

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2022-08-12]

$\frac{1}{40}$، $\frac{1}{80}$، $\frac{1}{180}$، $\frac{1}{360}$ از غضروف خالص کوسه (غلظت محلول استوک = 1/275 mg/ml) و غضروف ناخالص کوسه (غلظت استوک = 0/775 mg/ml) و غضروف ناخالص مرغ (غلظت محلول استوک = 0/225 mg/ml) رقت‌های 1، $\frac{1}{20}$، $\frac{1}{40}$، $\frac{1}{80}$] اضافه شد. برای ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف از سه چاهک استفاده شد. پلیت به مدت 72ساعت در انکوباتور (370°C ،%5 CO_2) قرار داده شد. پس از گذشت زمان فوق به تمامی خانه‌ها تایمیدین نشاندار (Amersham) اضافه شد به طوری که هر خانه حاوی یک µci از مادهٔ رادیواکتیو باشد. هیجده ساعت بعد، هاروست صورت گرفت. میزان تشعشع فیلترهای کاغذی حاوی لاشه سلول‌های کشت شده موجود در چاهک‌ها با استفاده از شمارشگر سنتیلاتور (Wallac 1410) اندازه‌گیری شد. ایندکس تحریکی با تقسیم میانگین (مربوط به سه چاهک) شمارش در دقیقه یا CPM رقت‌های مختلف هر کدام از مواد محرک بر میانگین CPM سه چاهک شاهد به دست آمد. در این مورد نیز از آنالیز واریانس یک طرفه برای تحلیل نتایج استفاده شد.

ارزیابی تأثیر غضروف بر فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK Cells)

برای تعیین میزان فعالیت NK، دوزهای مختلف از مادهٔ مورد نظر (انواع غضروف) به صفاق حیوان تزریق شد و 24 ساعت بعد از صفاق آنها سلول تهیه گردید. پس از شستشو، شمارش صورت گرفت و درصد سلول‌های مرده با استفاده از روش طرد تریپان بلو تعیین گردید که کمتر از پنج درصد بود.

از ردهٔ سلولی K562 به عنوان سلول هدف استفاده گردید که درصد مرده‌های آن حدود پنج درصد بود. سپس نسبت‌های یک به پنج، یک به ده، یک به بیست، و یک به چهل از سلول‌های هدف[1] به اجرایی[2] (E:T) در محیط کشت کامل (PRMI + %10 FCS) تهیه گردید. تمامی نمونه‌ها هفت دقیقه در 250g سانتریفیوژ شدند و سپس انکوباسیون (370°C ،%5 CO_2) صورت گرفت. آنگاه نمونه‌ها به آرامی تکان داده شدند تا به صورت سوسپانسیون درآیند و عمل انکوباسیون یک ساعت دیگر ادامه یافت.

در پایان مراحل فوق، آن‌قدر پروپودیوم آیوداید (Sigma) به نمونه‌ها اضافه شد که غلظت نهایی رنگ به 0/5 µg/ml برسد. استفاده از این ماده به خاطر تعیین درصد سلول‌های مرده است. ضمناً در کنار نمونه‌های تست، نمونه‌ای از سلول‌های هدف به تنهایی قرار داده شد و تمام مراحل فوق روی آن انجام گردید تا درصد سلول‌های خود بخود مردهٔ هدف مشخص شود. سپس با دستگاه فلوسایتومتر (Coulter Counter) با سرعت آهسته از هر نمونه‌ای ده هزار سلول شمارش گردید. تعیین درصد سلول‌های مرده و زنده هدف با استفاده از روش تأیید شده انجام شد (9). از آزمون «کای دو» برای تجزیه و تحلیل داده استفاده شد.

یافته ها

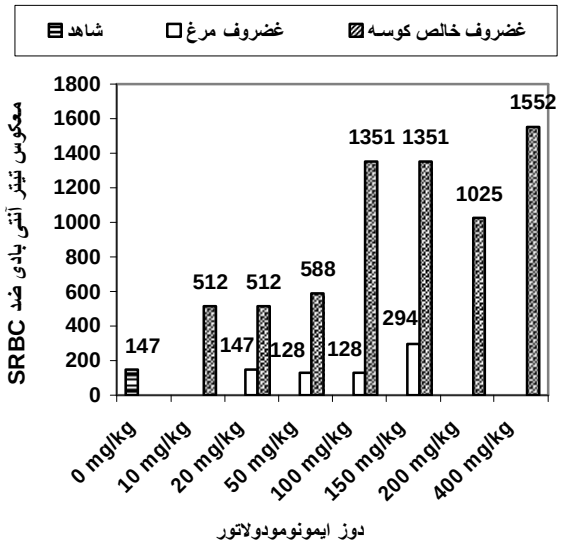
تأثیر انواع مختلف غضروف بر پاسخ آنتی‌بادی علیه SRBC

همان طور که در نمودار شماره 1 ملاحظه می‌گردد، غضروف خالص کوسه در تمامی دوزها تیتر آنتی‌بادی را به طور معنی‌داری افزایش داده است ($p<0/01$) و از دوز 100 mg/kg به بالا تیتر آنتی‌بادی بسیار افزایش یافته است ($\frac{1}{1552}$)، به طوری که بین دوزهای بالاتر از 100 و پایین‌تر از آن تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$). غضروف ناخالص کوسه در دوز مورد استفاده (150mg/kg) تیتر آنتی‌بادی را به حدی افزایش داده است ($\frac{1}{588}$) که با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ملاحظه می‌شود ($p<0/01$) ولی قدرت تحریک کنندگی آن به اندازهٔ دوز معادل از غضروف خالص کوسه نیست و در حد دوز 50 mg/kg از

1. Target 2. Effector

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2022-08-12]

غضروف خالص است (در نمودار نشان داده نشده است). غضروف ناخالص مرغ در هیچ دوزی نتوانسته است تیتر آنتی‌بادی علیه SRBC را به طور معنی‌داری افزایش دهد.



نمودار شماره 1ـ تأثیر انواع مختلف غضروف بر پاسخ ایمنی هومورال علیه گلبول قرمز گوسفند.

تأثیر انواع غضروف بر پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان

غضروف خالص کوسه در تمامی رقت‌ها باعث تحریک سلول‌های تک هسته‌ای خون انسان شده است ($p<0/01$) و در رقت $\frac{1}{40}$ بیشترین ایندکس تحریکی را دارد (جدول 1).

غضروف ناخالص کوسه در تمامی رقت‌ها به طور معنی‌داری ($p<0/01$) پاسخ تکثیری را افزایش داد و در رقت 1 بیشترین ایندکس تحریکی را دارد که برابر با 6/74 است.

غضروف ناخالص مرغ به جز در رقت 1 در تمامی رقت‌ها به میزانی سبب تکثیر سلول‌ها می‌شود که تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان می‌دهد ($p<0/01$) و از بین اینها رقت 1 از غضروف ناخالص کوسه بیشترین ایندکس تحریکی را داشت. آنالیز واریانس دو طرفه، تفاوت معنی‌داری را بین این چهار ماده (انواع غضروف و PHA) نشان نمی‌دهد.

سلول‌های اجرایی گرفته شده از گروه شاهد در تمامی نسبت‌های سلول‌های هدف به اجرایی (E:T) فعالیت کشندگی معنی‌داری نشان ندادند. بیشترین فعالیت کشندگی در نسبت40 به یک از سلول‌های اجرایی گرفته شده از حیوانات شاهد دیده شد (30%) ولی تفاوت معنی‌داری بین این نسبت و نسبت 20 به یک مشاهده نشد. پس بهترین نسبت، نسبت 20 به یک از سلول‌های اجرایی به هدف است. نتایج در جدول شمارهٔ 2 آورده شده‌اند، هر جا که فعالیت کشندگی معنی‌دار است با علامت * مشخص شده است .

جدول شماره 1ـ تأثیر غلظت‌های مختلف فیتوهماگلوتینین (PHA)، غضروف خالص و ناخالص کوسه و غضروف ناخالص مرغ بر فعالیت تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای خون انسان (تست ترانسفورماسیون لنفوسیتی). تأثیر غضروف خالص کوسه بر فعالیت NK

نوع ماده	RPMI	PHA					غضروف خالص کوسه				غضروف ناخالص کوسه				غضروف ناخالص مرغ			
غلظت اولیه (mg/ml)	-	1					1/275				0/775				0/225			
معکوس رقت مورد استفاده	-	20	40	80	160	320	1	20	40	80	1	20	40	80	1	20	40	80
ایندکس تحریکی	1	3/5	1/5	6	3/5	3/9	2/8	3/2	4/3	3/2	6/7	5/5	4/1	4/3	1/7	4/9	3/6	5
معنی‌داری آماری p<0/01		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2022-08-12]

جدول شماره 2ـ میزان فعالیت کشندگی طبیعی (NK activity) تحت تأثیر انواع غضروف.

نمونه	E:T	تعداد سلول‌های زنده هدف	تعداد سلول‌های مرده هدف	مرده + زنده	درصد مرده	X^2	معنی‌دار
تست	فقط k562	1738	84	1822	4/6	_	
	5:1	541	23	564	4/0	0/28	_
	10:1	238	15	253	5/9	0/85	_
	20:1	86	5	91	5/5	0/15	_
	40:1	75	7	82	8/5	2/66	_
شاهد	5:1	422	35	457	7/6	6/8	*
	10:1	327	103	430	23/9	170/9	**
	20:1	305	107	412	25/9	196/1	**
	40:1	545	238	783	30/4	336/1	**

**: نشان دهندهٔ نمونه‌هایی است که میزان فعالیت کشندگی آنها خیلی معنی‌دار است.

بحث

اخیراً از غضروف خالص کوسه به دلیل داشتن اثرات ضد رگ‌زایی قوی در درمان سرطان استفاده شده است. در این تحقیق به مطالعه اثرات تعدیل کنندگی ایمنی این ترکیب پرداخته شد، زیرا سیستم ایمنی در دفاع ضد توموری نقش دارد و احتمال می‌رود که غضروف کوسه علاوه بر فعالیت ضد رگ‌زایی، از طریق تعدیل سیستم ایمنی نیز به حذف تومور کمک کند. نتایج نشان داد که غضروف خالص کوسه ایمنی هومورال (پاسخ آنتی‌بادی علیه SRBC) را تقویت می‌کند و دوز 100mg/kg مناسب‌ترین دوز است. پروتئین‌ها جزء فعال غضروف کوسه را تشکیل می‌دهند (7). علت افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه SRBC ممکن است ناشی از تأثیر مستقیم مواد موجود در غضروف بر سلول‌های B باشد. از طرفی این اثر ممکن است به صورت غیر مستقیم اعمال شده باشد، یعنی ابتدا سلول‌هایی چون سلول‌های T تحریک شده باشند و آن‌گاه این سلول‌ها سبب تقویت پاسخ هومورال شده باشند. پرادن و همکارانش ضمن مطالعه روی غضروف گوساله به چنین نتیجه‌ای رسیده‌اند (7). غضروف ناخالص کوسه از این لحاظ ضعیف‌تر است اما اثر معنی‌داری دارد و غضروف ناخالص مرغ هیچ تأثیر معنی‌داری بر این واکنش ندارد. در پاسخ‌های ایمنی علیه آنتی‌ژن‌ها (از جمله آنتی‌ژن‌های توموری) تکثیر کلون‌های لنفوسیتی از اهمیت زیادی برخوردار است (9) و تست LTT نشان می‌دهد که غضروف خالص و ناخالص کوسه و غضروف ناخالص مرغ از این لحاظ قدرتی در حد PHA دارند. به علت سمیت زیاد، امکان استفاده از PHA وجود ندارد، حال آن‌که اجزاء غضروف سمیت شناخته شده‌ای ندارند. بنابراین، امکان استفاده از آن برای تقویت سیستم ایمنی انسان وجود دارد. البته این که کدام گروه از لنفوسیت‌ها وادار به تکثیر شده‌اند، معلوم نیست و لازم است این تست با استفاده از لنفوسیت‌های B و T جداگانه انجام گیرد تا معلوم گردد کدام از اینها وادار به تکثیر شده‌اند.

کاهش فعالیت سلول‌های NK در اثر غضروف خالص کوسه می‌تواند به دلیل ممانعت از تشکیل کونژوگه بین سلول‌های اجرایی و هدف باشد. البته ممکن است این ترکیب بر فعالیت کشندگی این سلول‌ها به نحو دیگری مؤثر باشد، به این صورت که سلول‌هایی چون ماکروفاژها فعال شده باشند و موادی چون پروستاگلاندین‌ها تولید کرده باشند. این مواد بر فعالیت NK اثر بازدارندگی دارند (10). با توجه به این که همبستگی چندانی بین فعالیت NK و پیش آگهی بیماران سرطانی وجود ندارد، به نظر می‌رسد اثر فوق مانعی بر سر راه استفاده از غضروف کوسه نباشد (11).

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2022-08-12]

نتیجه گیری

می‌توان چنین نتیجه گرفت که سیستم ایمنی اختصاصی تحت تأثیر غضروف کوسه، کاملاً تقویت می‌شود و غضروف مرغ اثر قابل ملاحظه‌ای بر این سیستم ندارد، اما اثر آنها بر ایمنی ذاتی معکوس است. با توجه به تحقیقات اخیر و نقش ارجح ایمنی اختصاصی علیه سرطان، به نظر می‌رسد که غضروف کوسه بتواند از این طریق نیز در دفاع ضد توموری مؤثر افتد. امتیاز دیگر و مهم این ترکیب همان خاصیت ضد رگ‌زایی است و مجموع این دو خاصیت می‌تواند غضروف کوسه را کاندید خوبی در درمان سرطان کند.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2022-08-12]

References

1. Robert K. Oldham. Cancer biotherapy: General principles, DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Biologic therapy of cancer, Philadelphia, USA, JB Lippincot Company, 2003; pp: 15-18
2. Minich E. Immunological approach to cancer therapeutics, New York, USA, John Wiley & Sons Inc 1982
3. Siemeister G, Schirner M, Weindel K, Reusch P, Menrad A, Marme D, et al. Two independent mechanisms essential for tumor angiogenesis: inhibition of human melanoma xenograft growth by interfering with either the vascular endothelial growth factor receptor pathway or the tie-2 pathway, Cancer Research, 1999; 59: 3185–3191
4. Oikawa T, Ashino-Fuse H, Shimamura M, Koide U, Iwaguchi T. A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis, Cancer Letters, 1990; 51(3): 181-6
5. Langer R, Brem H, Falterman K, Klein M, Folkman J. Isolations of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization, Science, 1976; 193(4247): 70-72
6. Lance IW and Linda C. Sharks don’t get cancer, Avery publishing group, New York, USA, 1992
7. Rosen J, Sherman WT, Prudden JF, Thorbecke GJ. Immunoregulatory effects of catrix, J Biol Response Mod, 1988; 7 (5): 498-512
8. Robert K Oldham. Biologic therapy with TNF: preclinical, DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Biologic therapy of cancer, Philadelphia, USA, JB Lippincot Company, 2003, pp: 163-182
9. Vitale M, Neri LM, Comani S, Falcieri E, Rizzoli R, Rana R, Papa S. Natural killer function in flow cytometry. II. Evaluation of NK lytic activity by means of target cell morphological changes detected by right angle light scatter, J. Immunol. Methods, 1989; 121(1): 115-20
10. Nelson DS. Natural immunity, Academic Press, London, England, 1989
11. Uchida A. Clinical significance of autologous tumor killing (ATK) and its induction therapy in human cancer, Biotherapy, 1995; 8: 113-122

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2022-08-12]