بسم الله الرحمن الرحیم

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم الهه صفری رشته: ایمنی شناسی گرایش:
تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر سید محمد موذنی (استاد راهنما)

دکتر زهیر صراف (استاد مشاور)

دکتر معصومه ابتکار (استاد ناظر)

دکتر طوبی غضنفری (استاد ناظر)

دکتر علی اکبر پور فتح الله (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی و پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظورآگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود ،مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر " دفتر نشر آثار علمی " دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند :

" کتاب حاضر ، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده دررشته ...الهی شناسی پزشکی... است که در سال .....۱۳۸۷..... دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ...دکتر عزیزی..... ، مشاوره ...دکتر حسن..... از آن دفاع شده است."

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ،تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قراردهد .

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳ ، ۵۰ ٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس ،تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداختهای بهای خسارت ،دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه ووصول کند .به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، ازطریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ رااز محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش ،تامین نماید .

ماده ۶: اینجانب .....الهه صفری..... دانشجوی رشته ...الهی شناسی پزشکی مقطع .....ارشد..... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی الهه صفری

تاریخ و امضا

۸۷/۵/۲۸

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱ - حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲ - انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳ - انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴ - ثبت اختراع و آذورز دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵ - این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۷/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طرق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگی : الهه صفری
تاریخ و امضاء
۸۷/۵/۲۸

دانشگاه تربیت مدرّس
دانشکده پزشکی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد ایمنی شناسی پزشکی

عنوان

بررسی اثر پروتئین 15-14 کیلو دالتونی غضروف کوسه ماهی بر روی سلول های دندریتیک

نگارش:

الهه صفری

استاد راهنما:

دکتر سید محمد مؤذنی

استاد مشاور:

دکتر زهیر حسن صراف

تابستان 87

تقدیم به :

یگانه خالق هستی

که هر آنچه هست همه از لطف اوست.

پدر و مادر عزیزم

که برگ های سبز زندگیم از حضور همیشه سبزشان رنگ گرفته و حضور مهربانشان روشنایی بخش فرداهای من است.

خواهرخوب ومهربانم

که همواره مشوق من بوده است.

تشکر و قدردانی

- از استاد ارجمندم جناب آقای **دکتر مؤذنی** که راهنمایی اینجانب را در تمامی مراحل رساله مجدانه بر عهده داشته و از هیچ مساعدتی، هیچگاه دریغ نکردن ،سپاسگزارم.

- از استاد ارجمندم جناب آقای **دکتر حسن** به خاطر تمام همکاریهای بی دریغ، راهنمایی ها و مشاوره های بسیار ارزنده سپاسگزارم.

- از اساتید محترم گروه ایمنی شناسی سرکار خانم دکتر ابتکار، جناب آقای دکتر پورفتح اله و جناب آقای دکتر زواران به خاطر تمام همکاریهایشان کمال تشکر را دارم.

- از سرکار خانم ها محسنی و اسکافی به خاطر حضور صمیمانه ، راهنمایی ها و همکاریهای بی دریغشان در تمام مراحل انجام کار، کمال قدردانی و تشکر را دارم.

- از سرکار خانمها حیات و نیکوگفتار به خاطر همکاریهای بی دریغشان کمال تشکر و قدردانی را دارم.

- از سرکار خانم دکتر غضنفری و کارکنان دانشگاه شاهد به خاطر همکاریهای بی دریغشان کمال تشکر و قدردانی را دارم.

- از جناب آقایان دکتر کریمی، بزرگمهر، مهدوی به خاطر تمام راهنمایی ها و همکاریهای بی دریغشان کمال تشکر را دارم.

- از سرکار خانم ها ریاض الحسینی، نوری و رودباری به خاطر راهنمایی ها و همکاریهای بی دریغشان کمال تشکر را دارم.

- از جناب آقای نامدار و دانشمندی به خاطر همکاریهای بی دریغشان کمال تشکر را دارم.

- از دوستان خوبم سرکار خانم ها حاجی مرادی و رحیمی به خاطر راهنمایی های بی دریغشان کمال تشکر را دارم.

- از کلیه کارمندان آموزش و پژوهش دانشکده پزشکی متشکرم.

چکیده

مقدمه: غضروف کوسه ماهی دارای اثر ضد توموری و تحریک کنندگی پاسخ ایمنی است. اثرات درمانی و مفید غضروف کوسه ماهی بیشتر به مولکول های با وزن کم موجود در آن نسبت داده میشود. از طرفی سلولهای دندریتیک(DCs) نقش اصلی را در پردازش و عرضه آنتی ژن به لنفوسیتهایT و القاء پاسخهای ایمنی اولیه دارند. این سلولها در ایمنی درمانی سرطان از اهمیت ویژه ای برخوردارند. هدف از این مطالعه بررسی اثر پروتئینKD 15-14 غضروف کوسه ماهی بر روی بلوغ و فعال سازی سلولهای دندریتیک است.

مواد وروش ها: غضروف کوسه ماهی با استفاده از گوانیدیوم هیدروکلراید عصاره گیری و پروتئین KD 15-14 با روش اولترا فیلتراسیون توسط فیلترهای با منافذKD 30 و10 تخلیص و پروتئین45KD با روش کروماتوگرافی ژل فیتراسیون با سفادکس G50 تخلیص گردید و با انجام SDS-PAGE خلوص آنها تایید شد. DCها از طحال موش BALB\c با استفاده از محیط گرادیان نایکودنز وخصوصیت چسبندگیDCها به پلیت پلاستیکی و شناور شدن آنها بعد از کشت شبانه جداسازی و تخلیص شده(خلوص بالای 90%) و پروتئین تخلیص شده KD 15-14 و 45KD غضروف کوسه ماهی به محیط کشت آنها افزوده شد. بعد از کشت شبانهDCها، با anti-CD11c وanti-CD40 و anti-MHCII و anti-CD86 نشاندار رنگ آمیزی و توسط فلوسایتومتر مورد آنالیز دو رنگی قرار گرفتند. به علاوه سلول هایT از غدد لنفاوی موش C57BL/6 به روش نایلون وول جدا گردید و تحت تحریک آلوژنیک با DCهای جدا شده از موش BALB\c و تیمار شده با پروتئین 14KD غضروف کوسه ماهی قرار گرفت. در واکنش MLR میزان تکثیر سلول هایT بعد از 72 ساعت به روش MTT و رنگ سنجی سنجیده شد.

نتایج: نتایج به دست آمده از آنالیز فلوسایتومتری، افزایش بیان مارکرهای بلوغ (CD40, CD86, MHCII) را در DCهای تیمار شده با هر دو پروتئین (در مقایسه با کنترل منفی) نشان داد. نتایج حاصل از تست MLR نیز افزایش میزان جذب و اندکس تحریک را در چاهک سلول هایT تحریک شده با DCهای تیمار شده با پروتئین 14KD غضروف کوسه ماهی را نشان داد. به دلیل تحریک یکسان سلول های دندریتیک با هر دو پروتئین KD 14و 45 غضروف کوسه ماهی، آزمایش MLR با پروتئین 45KD غضروف کوسه ماهی انجام نشد و به نتایج حاصل از پروتئین 14KD استناد میشود.

بحث و نتیجه گیری: بنابراین پروتئینهای 14KD و 45 غضروف کوسه ماهی سبب بلوغ و فعال سازی سلول های دندریتیک میشود و درصد بیان شاخص های بلوغ در DCهای تیمار شده با هر دو پروتئین تفاوت معنی داری ندارد ($p>0.05$). از طرفی پروتئینهای 14KDو45 غضروف کوسه ماهی از طریق افزایش بیان شاخص های بلوغ DCها باعث تحریک و تکثیر بیشتر لنفوسیت هایT آلوژن میشوند. در نتیجه پروتئینهای موجود در غضروف کوسه ماهی از طریق افزایش بلوغ و فعالسازی DCها باعث تحریک لنفوسیت های T و ایجاد پاسخ قوی ضد توموری میشود. اگرچه این مطالعه باید با فراکشن های دیگر غضروف کوسه ماهی و پروتئین های دیگر به عنوان کنترل ادامه یابد و یا سایر مسیرهای تحریک کنندگی سیستم ایمنی مثل مسیر های انتقال سیگنال بررسی شود.

کلمات کلیدی: غضروف کوسه ماهی ؛ سلول های دندریتیک؛ پاسخ ایمنی ضد توموری

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول‌ها ..... د
فهرست شکل‌ها ..... ه
فهرست نمودارها ..... و

فصل 1- مقدمه 1

1-1- روش های نوین در درمان سرطان ۱
1-1-1- مکملهای دارویی ۱
1-2- غضروف کوسه ماهی ۲
1-2-1- شیوع کم سرطان در کوسه ماهی ۴
1-2-2- ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در غضروف کوسه ۴
1-2-3- خواص درمانی غضروف کوسه ماهی ۷
1-2-4- غضروف کوسه در درمان سرطان ۸
1-2-5- غضروف کوسه و مهار رگزایی ۹
1-2-6- غضروف کوسه و پاسخهای ایمنی ۹
1-3- سلول های دندریتیک ۱۰
1-3-1- مورفولوژی سلول های دندریتیک ۱۱
1-3-2- منشاء سلول های دندریتیک ۱۱
1-3-3- توزیع سلول های دندریتیک در بافت های مختلف ۱۲
1-3-4- زیرگروه های سلول های دندریتیک ۱۲
1-3-5- زیرگروه های سلول های دندریتیک در انسان ۱۴
1-3-6- بیان مولکول های کمک محرکی و چسبندگی ۱۵
1-3-7- پروسه بلوغ ۱۶
1-3-8- برداشت آنتی ژن ۱۷
1-3-9- پردازش آنتی ژن ۱۹
1-3-9-1- عرضه محدود به کمپلکس سازگار نسجی کلاس II ۱۹
1-3-9-2- عرضه محدود به کمپلکس سازگار نسجی اصلی کلاس I ۲۱
1-3-10- خصوصیات مهاجرت ۲۱
1-3-11- رهایی سایتوکین ۲۲
1-3-11-1- اینترلوکین-12 ..... ۲۲
1-3-11-2- اینترفرون آلفا ۲۳
1-3-11-3- اینترلوکین-2 ..... ۲۴
1-3-12- خصوصیات تحریک کنندگی سلول های دندریتیک و تمایز T ۲۴
1-3-13- مرگ سلول های دندریتیک (آپوپتوزیس) ۲۶

1-3-13-1- فلوسایتومتری ۲۷
1-4- مروری بر مطالعات انجام شده ۲۹
1-5- هدف از انجام پروژه ۳۲

فصل 2- مواد و روش ها 34

2-1- عصاره گیری وتخلیص پروتئین از غضروف کوسه ماهی ۳۴
2-1-1- عصاره گیری (Extraction) از غضروف چرخ شده کوسه ماهی ۳۴
2-1-2- سنجش پروتئین به روش میکروبرادفورد ۳۴
2-1-3- تغلیظ و تخلیص پروتئین KD 15-14 غضروف ۳۵
2-1-4- تخلیص پروتئین KD 45 غضروف به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۳۷
2-1-5- الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE ۳۸
2-1-6- رنگ آمیزی ژل با کوماسی آبی R-250 ..... ۴۰
2-1-7- رنگ آمیزی به روش نیترات نقره ۴۱
2-2- کار با سلول های دندریتیک ۴۲
2-2-1- تهیه محیط کشت RPMI ۴۲
2-2-2- تهیه بافر فسفات سالین (PBS; Phosphate Buffer Saline)؛ 0.15 مولار با pH=7.2 ..... ۴۲
2-2-3- تهیه استوک آنزیم کلاژنازD ۴۳
2-2-4- تهیه استوک آنزیم DNase I ۴۳
2-2-5- تهیه بافر هضم کننده ۴۴
2-2-6- تهیه محیط گرادیان نایکودنز ۴۴
2-2-7- شمارش سلولی و تعیین درصد سلول های زنده ۴۴
2-2-8- تخلیص سلول های دندریتیک از طحال موش BALB/C ۴۵
2-2-8-1- خارج کردن طحال از بدن موش ۴۶
2-2-8-2- هضم بافت طحال و تهیه سوسپانسیون سلولی ۴۶
2-2-8-3- جداسازی سلول های کم چگال توسط نایکودنز ۴۷
2-2-8-4- غنی سازی سلول های دندریتیک از طریق اتصال به پلاستیک ۴۷
2-2-8-5- کندن سلول های دندریتیک چسبان ۴۸
2-2-9- پالس سلول های دندریتیک با پروتئین های تخلیص شده ۴۸
2-2-10- تعیین میزان خلوص و فنوتیپ سلول های دندریتیک طحال موش ۴۹
2-2-10-1- تعیین خلوص سلول های دندریتیک به روش فلوسایتومتری ۵۰
2-2-10-2- تعیین فنوتیپ و بلوغ سلول های دندریتیک ۵۱
2-2-11- غنی سازی جمعیت سلول های T به روش Nylon Wool ۵۱
2-2-11-1- آماده کردن ستون Nylon Wool ۵۲
2-2-11-1- آماده سازی ستون برای بارگذاری سلول ها ۵۳
2-2-11-2- جداسازی سلول از غدد لنفاوی موش C57BL/6 ..... ۵۳
2-2-11-3- غنی سازی لنفوسیت های T ۵۳
2-2-12- تعیین میزان خلوص لنفوسیت های T ۵۴
2-2-13- تعیین غلظت اپتیمم از سلول های دندریتیک در MLR آلوژنیک ۵۴

2-2-14- بررسی اثر پروتئین 14-15 KD غضروف کوسه ماهی بر سلول های دندریتیک در القاء پرولیفراسیون سلول های T در واکنش MLR آلوژنیک ۵۵
2-3- روش آنالیز آماری ۵۶
فصل 3- نتایج 58
3-1- نتایج عصاره گیری، تخلیص، الکتروفورز و میزان پروتئین ۵۸
3-2- تخلیص سلولهای دندریتیک از طحال موش BALB/C ۶۱
3-2-1- هضم آنزیمی طحال و تهیه سوسپانسیون تک سلولی ۶۱
3-2-2- جداسازی سلولهای کم چگال ۶۱
3-2-3- کشت 2 ساعته و اتصال سلولهای چسبان به سطوح پلاستیکی ۶۱
3-2-4- کشت شبانه (overnight) سلولهای چسبان ۶۲
3-3- نتایج حاصل از بررسی فنوتیپ و بلوغ سلول های دندریتیک به روش فلوسایتومتری ۶۴
3-4- نتایج جداسازی لنفوسیتهای T از غدد لنفاوی موش ۷۴
3-5- نتایج حاصل از تاثیر پروتئین 14-15KD غضروف کوسه ماهی بر عملکرد سلول های دندریتیک در MLR آلوژنیک ۷۵
فصل 4- بحث و نتیجه گیری 80
4-1- پیشنهادات ۹۰
فصل 5- فهرست منابع 92

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول1-1:طبقه بندی درمانهای مکمل ۲
جدول1-2:.زیر گروه های سلول های دندریتیک ۱۳
جدول2-1: برادفورد ۳۵
جدول2-2: تعیین غلظت بهینه به روش فلوسایتومتری ۴۸
جدول2-3: مشخصات و ویژگی آنتی بادی های مونوکلونال ضد شاخص های سطحی سلول های دندریتیک موش ۴۹
جدول3-1: میانگین درصد سلول های دندریتیک($CD11c^+$) پالس شده با غلظت های مختلف پروتئین غضروف کوسه ماهی دارای شاخص های بلوغ MHC-classII، CD86، CD40 ..... ۶۵
جدول3-2:نتایج درصد سلول های دندریتیک($CD11c^+$) پالس شده پروتئین های غضروف کوسه ماهی و پالس نشده دارای شاخص های بلوغ MHC-classII، CD86، CD40 ..... ۷۲
جدول3-3: نتایج حاصل از میزان تکثیر لنفوسیت ها در مقابل سلول های دندریتیک تیمار شده با پروتئین 14 KD غضروف کوسه ماهی بر حسب OD و SI ۷۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل 1-1:تحریک سلول های T توسط سلول دندریتیک ۲۵
شکل 1-2 : اصول فلوسایتومتری ۲۹
شکل2-1: سیستم آمیکون ۳۷
شکل2-2 : MTT ۵۶
شکل3-1: الکتروفروز عصاره تغلیض شده غضروف کوسه ماهی ۵۹
شکل3-2: الکتروفروز پروتئین 45 KD غضروف کوسه ماهی ۶۰
شکل3-3: الکتروفروز پروتئین 14 KD غضروف کوسه ماهی ۶۰
شکل3-4: سلولهای دندریتیک بعد از کشت دو ساعته،سلول های غیر چسبان حذف شده اند.این سلول ها نابالغ می باشند. میکروسکوپ فاز کنتراست و بزرگنمایی 2000 برابر ۶۲
شکل3-5: سلول های دندریتیک بالغ بعد از 16 ساعت کشت شبانه به شکل کلامپ سلولی مشاهده میشوند. میکروسکوپ فاز کنتراست و بزرگنمایی 2000 برابر ۶۳

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار2-1: آنالیز سلول های دندریتیک برای ایزوتیپ کنترل ۵۰
نمودار3-1 :نمودار حاصل از جذب و غلظت استاندارد ها برای سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد ۵۸
نمودار3-2: فراکشن های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون عصاره غضروف کوسه ماهی. پیک دوم مربوط به پروتئین 45 KD غضروف کوسه ماهی می باشد. ۵۹
نمودار3-3: بررسی بروز شاخص CD11c بر سلول های دندریتیک خالص شده توسط فلوسالتومتر. میزان خلوص 2±90 می باشد ۶۳
نمودار3-4: درصد شاخص های سطحی سلول های دندریتیک تیمار شده با غلظت های مختلف پروتئین غضروف کوسه ماهی ۶۵
نمودار3-5: آنالیز سلول های دندریتیک الف) تیمار نشده و ب) تیمار شده با پروتئین 14 KD غضروف کوسه ماهی و نشان دار شده با CD11c/PE و CD40 ..... ۶۶
نمودار3-6: آنالیز سلول های دندریتیک الف) تیمار نشده و ب) تیمار شده با پروتئین 14 KD غضروف کوسه ماهی و نشان دار شده با CD11c/PE و CD86/FITC ۶۸
نمودار3-7: آنالیز سلول های دندریتیک الف) تیمار نشده و ب)تیمار شده با پروتئین 14 KD غضروف کوسه ماهی و نشان دار شده با CD11c/PE و MHCII/FITC ۷۰
نمودار3-8: درصد بیان CD40 توسط سلول های دندریتیک تیمار نشده و تیمار شده با پروتئین14 KDو 45 غضروف کوسه ماهی ۷۳
نمودار3-9: درصد بیان CD86 توسط سلول های دندریتیک تیمار نشده و تیمار شده با پروتئین14 KDو 45 غضروف کوسه ماهی ۷۳
نمودار 3-10: درصد بیان IIMHC توسط سلول های دندریتیک تیمار نشده و تیمار شده با پروتئین14 KDو 45 غضروف کوسه ماهی ۷۴
نمودار3-11:بررسی شاخص CD3 بر روی لنفوسیت های جدا شده از غدد لنفی توسط فلوسایتومتر. میزان خلوص 2±89 می باشد. ۷۵
نمودار3-12: مقایسه میزان پاسخ تکثیری القا شده در لنفوسیت های T توسط سلول های دندریتیک تیمار شده با پروتئین 14 KD غضروف کوسه ماهی بر حسب OD ۷۸

فصل اول:

مقدمه

فصل 1- مقدمه

1-1- روش های نوین در درمان سرطان

بیشتر بیماران سرطانی به وسیله ترکیبی از جراحی، شیمی درمانی و اشعه درمان می شوند. از آنجایی که شیمی درمانی و اشعه دارای اثرات جانبی می باشند و علاوه بر سلول های توموری بر سلول های سالم در حال رشد نیز اثر می گذارد. امروزه برای درمان سرطان از روش های موثر و دقیق تری مانند استفاده از انواع ایمنوتراپی نظیر ایمنوتوکسین ها، آنتی بادی های مونوکلونال و رادیوایمنوتراپی استفاده می شوند. استفاده از مکمل های داروئی نیز در دهه های اخیر رواج داشته است. ایمنوتراپی یعنی درمان بیماری ها (به خصوص سرطان) به کمک روش های ایمونولوژیکی که با استفاده از ویژگی های ایمنی میزبان منجر به حذف سلول های توموری، بدون آسیب رساندن به سلول های سالم می گردد.

فایده ایمونوتراپی آن است که به طور طبیعی سبب تقویت دفاع خود بدن در برابر تومور می شود. موادی که در ایمونوتراپی به کار گرفته می شوند، از هر منشاء که باشند می بایست سیستم ایمنی میزبان را به خوبی تقویت نمایند.

محرک های ایمنی گوناگونی می توانند سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار دهند. این مواد تعدیل کننده پاسخ ایمنی (Immunomodulator) نامیده می شوند.

این مواد با خاصیت تحریک کنندگی سیستم ایمنی بسته به نوع اثری که بر میزبان دارند، به صورت فعال یا غیرفعال اثر خود را اعمال می کنند [1،2،3،4،5].

1-1-1- مکملهای دارویی

استفاده از مکملهای دارویی (CAM) در دهه های اخیر شیوع گسترده ای داشته است. اهمیت آن به خصوص در مورد بیماریهای خطرناکی همچون سرطان شایعتر است. نتایج یک مطالعهٔ سیستمیک نشان داد که حدود یک سوم بیماران سرطانی از چنین روش درمانی استفاده می کنند.

درمانهای مکمل معمولاً به درمانهایی گفته می شود که در کنار درمانهای رایج استفاده می شوند و شامل رایحه درمانی، بازتاب شناسی، اعمال مذهبی وتفکر است. درمانهای جایگزین درمانهایی هستند که می توانند به عنوان جایگزین در مانهای رایج پزشکی به کار روند؛ به عنوان مثال داروهای گیاهی چینی و درمانهای تغذیه ای از این دسته اند. با وجود این، غالب اوقات واژه ها به جای هم به کار می روند و گاه به آنها درمانهای غیررایج نیز می گویند. مکانیسمهای احتمالی اثر این داروها عبارتند از : اثرضد سرطانی مستقیم ، تقویت سیستم ایمنی و حذف توکسینها[6،7،8]. در جدول 1-1 نمونه ای از این درمانها مطرح شده است.

جدول1-1:طبقه بندی درمانهای مکمل

Category of complementary therapies	example of therapies used for cancer
-Diet and nutrition	Macrobiotics, Gerson diet, Antioxidants
-Mind-body intervention	Meditation, Imagery, Hypnosis, Support groups
-Bioelectromagnetics	Electromagnetic, Electro acupuncture
- folk Remedies	Naturopathy, Ayuveda, Traditional Chinese medicine
- Pharmacological and biological treatments	Antineoplastons, Chelatine therapy, Immunoaugmentation therapy, ***shark cartilage***
- Manual healing methods	massage, chiropractic, therapeutic touch
- Herbal Medicine	Esssiac, Iscador

شواهدی از وجود خاصیت ضد سرطانی این داروها در in vitro وجود دارد .مثلاً دیده شده که عصارهٔ لکتینی Mistletoe در in vitro سنتز پروتئینهای داخل سلولی را مهار می کند، سبب تحریک ترشح سایتوکاینها، مانع کلونیزاسیون و القای نکروز در سلولهای توموری می شود.

در یک مطالعهٔ کارآزمایی بالینی تصادفی گزارش شد که بیماران با متاستاز مغزی که با ملاتونین درمان شده بودند بقای بیشتری نسبت به بیمارانی که تنها از درمان های حمایتی استفاده می کردند، داشتند. مدارک علمی در مورد مؤثر بودن درمانهای مکمل کم است و در حال حاضر هیچ مکمل دارویی کاملاً مؤثری برای سرطان شناخته نشده است. بسیاری از CAM ها توانسته اند کیفیت زندگی را در بیماران سرطانی بهبود دهند، بنابراین ممکن است در درمان حمایتی این بیماران مؤثر باشد.

بیماران مبتلابه سرطان پستان از جمله استفاده کنندگان این داروها هستند .مدارک دقیقی از اینکه چه تعداد از آنان به تنهایی یا به همراه دیگر درمانهای رایج از این درمان استفاده می کنند وجود ندارد ؛ اما در یک مطالعه بر 435 نفر زن مبتلا به این بیماری دیده شد که 80 % آنها از مکملهای غذایی و داروئی استفاده کردند[9،10،11]. غضروف کوسه از جملهٔ این مکملهای دارویی مورد استفاده است. نظرات متعددی پیرامون مؤثر بودن یا نبودن این مکمل دارویی وجود دارد که در بخش های دیگر به تفصیل به آن می پردازیم.

1-2- غضروف کوسه ماهی

غضروف بافتی شبیه پلاستیک است که در سراسر بدن وجود دارد.حضور این ماده در بین مهره ها و انتهای استخوانهای بلند باعث کاهش اصطلاک بین قسمتهای متحرک و مهار ضربه های ناگهانی می شود.غضروف برای بدن اهمیت زیادی دارد و این موضوع در ساختمان جنین بسیار محسوس می باشد. در مراحل اولیه تشکیل جنین هیچ استخوانی درآن وجود ندارد و تماما از غضروف ساخته شده است.

دراین مرحله غضروف مانند چهارچوبی عمل می کند تا استخوان های اصلی بر روی آن شکل بگیرد، بتدریج با رسوب نمکهای کلسیم این ساختمان غضروفی سفت شده و استخوانها ظاهر می شوند. در کودکان استخوانها به دلیل داشتن مقادیر بیشتر غضروف و همچنین نمکهای کلسیم کمتر ، انعطاف پذیرند و در دوران سالمندی بدلیل افزایش رسوب نمکهای کلسیم و کاهش بافتهای نرم مثل غضروف استخوانها سخت و شکننده می شوند.

براساس تئوری ارائه شده ای وجود مقادیر زیاد غضروف در نوزادان باعث مصونیت آنها در برابر بسیاری از بیماریها میشود.

باید توجه داشت که غضروف بافتی است که تمام اعمال خود را بدون حضور اعصاب عروق خونی و لنفی انجام میدهد. در این بافت، مواد مغذی از طریق خون یا لنف منتقل نمی شوند و این وضعیت خاص غضروف آنرا در مبارزه با بیماریها با اهمیت می سازد.

در طی سالیانی که محققین به دنبال یافتن روشی برای مبارزه با سرطان بودند متوجه وجود پروتئین هایی در غضروف کوسه شدند.بررسیهای بعدی نشان میدهد که این مواد دارای خاصیت ضد گسترش عروق خونی هستند این پروتئین ها به همراه مولکولهای موکوپلی ساکاریدی که خاصیت ضد التهابی و تحریک کنندگی سیستم ایمنی دارند، غضروف را به یک ترکیب قوی برای مبارزه با بیماریها تبدیل می کند.

مطالعه مقایسه ای بین غضروف کوسه و گاو نشان می دهد که غضروف کوسه خالص تر و قویتر از غضروف گاو است. زیرا برای بدست آوردن 1 میلی گرم عصاره مهار کننده رشد عروق خونی باید 500 گرم غضروف گاو مصرف کرد درحالیکه همین مقدار عصاره را می توان از 0/5 گرم غضروف کوسه بدست آورد [12،13،14].

مطالب بیان شده را می توان چنین جمع بندی کرد که :

1. ندرتا کوسه ها بیمار می شوند.
2. غضروف ها بخشهایی از بدن هستند که فاقد عروق خونی و لنفی می باشند.
3. قسمت اعظم بدن کوسه ها از غضروف است.
4. غضروف کوسه ماده ایی موثر و بی خطر است که از گسترش عروق خونی جلوگیری کرده و دارای خاصیت ضد التهابی و تحریک کنندگی سیستم ایمنی است.
5. غضروف کوسه هزار بار قدرتش از غضروف گاو بیشتر است.

غضروف کوسه در فرم های کپسولهای 250mg، 500mg، 740mg، 750mg و پودرهای glscoop 6 و قرص های 740mg،750 mg عرضه شده اند. که750 mg باید 3 تا 4 بار در روز استفاده شود . باید غضروف کوسه به صورت 100% خالص خریداری شود. محصولات غضروفی به صورت تجاری در آمریکا بعنوان مکمل های غذایی فروخته می‌شوند بیش از 40 نام مختلف تجاری از غضروف کوسه در دسترس مصرف کنندگان قرار دارد .

1-2-1- شیوع کم سرطان در کوسه ماهی

ریسک ابتلا کوسه ماهی به سرطان حدود یک مورد در یک میلیون است ، چه عاملی باعث شده است که کوسه ها کمتر دچار سرطان شوند؟ درپاسخ به این سؤال چند نظریه مطرح شده است :درسال 1980 Rosen پیشنهاد کرد که ممکن است شیوع کم تومور در کوسه به علت قدرت یونی زیاد بافتهایشان باشد، این قدرت یونی زیاد با افزایش دمای بدن همراه است و در چنین شرایطی سیستم ایمنی کوسه بهتر می تواند نظارت خود را اعمال کند[15،16].

Marchlands در سال 1990 نشان داد که IgM در کوسه قادر است به تنهایی به هر نوع مهاجمی حمله کند. در همان سال McKinney و همکارانش نشان دادند ماکروفاژهای کوسه با تشخیص سلول نئوپلاستیک از نرمال در این حیوان، سلولهای توموری را از بین می برند[17].

عده ای از محققین معتقدند که اسکلت غضروفی کوسه ها سبب محافظت آنها در برابر تومور می شود ؛ چرا که تفاوت اصلی کوسه با سایر حیوانات اسکلت کاملاً غضروفی آنها (بدون استخوان) است. با انتشار نظریه آخر عدهٔ زیادی تحقیقات خود را بر غضروف کوسه ماهی متمرکز کردند. در سال 1983 در انستیتو تکنولوژی ماساچوست Lee و Langer ثابت کردند که غضروف حاوی پروتئینی است که مانع تشکیل رگهای جدید در تومورهای خوش خیم یا بدخیم می شود [18،19].

1-2-2- ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در غضروف کوسه

غضروف کوسه یک منبع عالی و موثر از مولکول های فعال بیولوژیکی است. زیرا کوسه ها دارای اسکلت داخلی غضروفی وسیع می باشند. برعکس پستانداران مثل گاو و پرندگان و جوجه که دارای درصد کمی از غضروف می باشند.

امکان اینکه غضروف بتواند منبع یک یا چند نوع ماده مهارکننده رگ زائی جهت معالجه سرطان باشد مورد مطالعه قرار گرفته است. مواد ساختمانی عمده غضروف کوسه شامل چند نوع پروتئین کلاژن و چند نوع گلیکوزا مینوگلیکان که همه پلی ساکارید هستند. یکی از اینها کوندروتین سولفات که یک گلیکوزا مینوگلیکان موجود در غضروف می باشد.

دلایل زیادی وجود دارد که غضروف کوسه شامل حداقل یک مهارکننده رگزائی است که دارای گلیکوزآمینوگلیکان است . بعضی از گلیکوزآمینوگلیکان های موجود در غضروف دارای خواص ضد التهابی و محرک سیستم ایمنی بدن بودن و پیشنهاد می شود که هم خود اینها و هم مواد حاصل از تجزیه آنها برای سلولهای توموری سمی می‌باشد.

کوندروتین سولفات ترکیب طبیعی در غضروف است که باعث مهار و بلوکه شدن آنزیم های که در تخریب بافت غضروف نقش دارند می شود و همچنین باعث افزایش نگهداری آب و نگهداری حالت الاستیکی در غضروف مفاصل می شود به این دلیل کوندروتین سولفات بعنوان یک مکمل غذایی جهت درمان آرتروز استخوانها معروفیت دارد کوندروتین معمولاً در ترکیب با گلوکز آمین که یک ترکیب دیگر موجود در شکل گیری غضروف می باشد فروخته می شود. یافته های جدید دلالت بر این می کند که

کوندروتین سولفات به خانواده هتروپلی ساکارید که به گلوکز آمینوگلی کان ها معروف هستند GAG می باشد .

کوندروتین سولفات دارای انواع AوBوC است و آنچه مد نظر ما است کوندروتین سولفات نوع C است که در غضروف کوسه یافت می شود . کوندروتین سولفات C ، اغلب کوندروتین سولفات 6 نیز نامیده می شود و عملکرد این اگر بصورت خوراکی مصرف شود باعث نگهداری ساختار و عملکرد غضروف و کاهش درد مفاصل در بیماری آرتروز استخوان و کاهش التهاب می‌باشد. کوندروتین سولفات باعث مهار آنزیم های که نقش در توقف انتقال مواد مغذی به غضروف هستند، می شود .

کوندروتین سولفات و هیالورونیک اسید ترکیبات اصلی اگریکن (پروتوگلیکانهای تجمع یافته) هستند که در غضروف مفاصل یافت می شوند. آگریکن ها دارای خاصیت ضربه‌گیری در غضروف مفاصل هستند و این کار با متورم کردن غضروف انجام می‌دهند که توسط خاصیت ارتجاعی فیبرهای کلاژن مهار می شود این تعادل به دلیل خاصیت ارتجاعی در مقابل دفرمه شدن غضروف مفاصل که برای عملکرد آنها بسیار حیاتی است صورت می گیرد. هیالورونیک اسید همچنین در مایع سینوویال (مایع غضروفی) یافت می شود که باعث روان کردن حرکت مفاصل می شود.

با پیشرفت دژنره شدن مفاصل در بیماری آرتروز استخوان، سنتز آگریکن ها کاهش پیدا می کند. و منجر به از بین رفتن خاصیت ارتجاعی غضروف و ایجاد درد و سایر علائم آرتروز استخوان می شود. تزریق درون وریدی هیارولونیک اسید و داروی F.D.A باعث کاهش درد و افزایش تحرک مفاصل می شود. اگر کوندروتین سولفات به مفاصل وارد شود همین اثرات را خواهد داشت. در مطالعات انسانی مصرف خوراکی کوندروتین سولفات با وزن مولکولی کم آن، منجر به افزایش هیالورونیک اسید و افزایش ویسکوزیتی مایع داخل غضروف و کاهش کلاژناز در مایع داخل غضروفی می شود . گلوکز آمین که به مفاصل وارد می شود باعث مهار آنزیم های دخیل در تجزیه غضروف و افزایش تولید هیارولونیک اسید می شود . کوندروتین سولفات با وزن مولکولی کم در روده کوچک و معده جذب می‌شود و همچنین در درمان و پیشگیری از آرتروز هم خودش به تنهایی و هم در ترکیب با مکمل های گلوکز آمین مورد استفاده قرار می گیرد.

گلوکز آمین از بافت حیواناتی مثل خرچنگ ، لابستر، میگو استخراج می شود و کوندروتین سولفات در غضروف حیواناتی مثل کوسه یافت می شود. اینها بعنوان مکملهای غذائی معروف هستند. گلیکوزآمینوگلیکان عمده در غضروف کوسه، کوندروئیتین سولفات بعلاوه کلاژن است. غضروف کوسه شامل 10% -5% آب و مقادیر زیادی کلسیم و فسفات و چند مولکول کم وزن است و اینها باعث فعالیت ضد رگزائی است، و این مواد بعنوان دارو مورد استفاده قرار می گیرند. غضروف کوسه به ضد سرطان بودن، ضد التهاب آنتی اکسیدان و ضد تصلب شرائین معروف است. امروز از غضروف کوسه مستقیماً در درمان سرطانهای پیشرفته در انواع مختلف فاز IوII استفاده می شود.

اینها منبع مطمئن قابل جذب با اثرات جانبی کم می باشد. کوندروتین سولفات یک مولکول بزرگ است و در انسان 70% آن در اثر مصارف خوراکی در روده ها جذب می شود و در غضروف و مفاصل متمرکز می شود. در غضروف مفاصل، کوندروتین سولفات نقش مهم ساختاری در باند شدن یا فیبرکلاژن داشته