

بررسی سمیت سلولی پروتئین غضروف کوسه چانه‌سفید (*Carcharhinus dussumieri*) علیه رده سلولی سرطان کلون روده (SW742) و اثر فعال‌کنندگی آن بر سلول‌های کشنده طبیعی خون

چکیده

خصوصیات درمانی غضروف کوسه برای درمان بیماری‌های ناعلاج مثل سرطان و روماتیسم مفاصل در خیلی از مطالعات به اثبات رسیده است. از این رو مطالعه حاضر به بررسی تأثیر پروتئین غضروف کوسه‌ماهی چانه‌سفید بر بیان ژن‌های NK46، CXCR3، NKG2D و NK44 در سلول‌های کشنده طبیعی و فعالیت آن‌ها علیه رده سلولی سرطان کلون روده (SW742) می‌پردازد. نمونه‌های پروتئین استخراج‌شده کوسه‌ماهی در محلول بافر PBS برای محلول‌سازی نمونه‌ها و سولفات آمونیوم برای رسوب دادن استفاده شد. پروتئین با وزن ۱۴/۵ کیلو دالتون با استفاده از روش SDS-PAGE تعیین گردید. خون محیطی افراد سالم به‌منظور تعیین زنده‌مانی بعد از مواجهه با پروتئین استخراج‌شده با استفاده از رنگ تریپان بلو بررسی شد. فعالیت سمیت سلول‌های فعال‌شده کشنده طبیعی علیه رده سلولی استفاده‌شده در آزمایش از طریق آزمایش MTT بررسی گردید. نتایج نشان داد غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئین استخراج‌شده با حجم ۱۵ میکرو لیتر بیشترین فعالیت سمیت سلولی را داشته است ($P < 0.05$). همچنین سمیت سلولی سلول‌های کشنده طبیعی به میزان قابل توجه افزایش یافت به نحوی که در مدت‌زمان ۱۸ ساعت زمان مواجهه و حجم ۱۵ میکرو لیتر پروتئین با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت کشندگی را داشته است. بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NK46 و NK44 بعد از ۴، ۸ و ۱۸ ساعت مواجهه سلول‌های کشنده طبیعی با غلظت‌های متفاوت پروتئین ۱۴/۵ کیلو دالتونی تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان دادند ($P < 0.05$). پروتئین غضروف کوسه می‌تواند منجر به بهبود کیفیت سیستم ایمنی شود و این بهبود عملکرد در پی افزایش عملکرد سلول‌های کشنده طبیعی علیه سلول‌های سرطانی می‌تواند اتفاق بیفتد ولی این پروتئین نمی‌تواند بر بیان ژن گیرنده‌های روی سلول‌های T تأثیر داشته باشد.

واژگان کلیدی: کوسه چانه‌سفید، سلول‌های کشنده طبیعی، بیان ژن، پروتئین‌های استخراج‌شده، کلون.

فاطمه ارجمند^۱

عبدالکریم شیخی^{۲*}

پرگل قوام مصطفوی^۳

احسان رضائی فرد^۴

زهیر محمد حسن^۵

۱. دکتری، گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، آزادگان، دزفول، ایران.

۳. استادیار، گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴. استادیار، گروه علوم دریایی، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۵. استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

*مسئول مکاتبات:

mostafavi_pa@srbiau.ac.ir

کد مقاله: ۱۴۰۰۴۰۸۸۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۴

این مقاله پژوهشی و برگرفته از رساله دکتری است.

مقدمه

طی دهه‌های گذشته علم شیمی دریا هزاران ماده شیمیایی و پزشکی جدید را در اکوسیستم‌های آبی بخصوص اقیانوس‌ها کشف و استخراج کرده است (Fenical and Jensen, 2006; Gerwick and Moore, 2012; Mehubub et al, 2014). استخراج این مواد برای درمان بیماری‌ها و استفاده در علوم پزشکی از عصر باستان که ابتداها توسط یونان باستان شروع و مکتوب شد و اولین موجوداتی که بدین منظور استفاده

شدند بی‌مهرگان دریایی بودند. تنوع بالای مواد شیمیایی که در محیط‌های دریایی در بدن موجودات زنده وجود دارد ناشی از شرایط زیستی خیلی متفاوت آن‌ها در این اکوسیستم‌ها و در نتیجه تنوع بالای ژنتیکی آن‌هاست (Feloren et al., 2020).

اگرچه بیوشیمی دریا هزاران ترکیب طبیعی را در این اکوسیستم‌ها کشف و استخراج کرده است تا به امروز تنها بخش کوچکی از این مولکول‌های دریایی قابلیت استفاده در علم پزشکی را پیدا کرده‌اند (Rangel and Falkenberg, 2020; Dyshlovoy, 2020; Jim, 015). در بین این مولکول‌های دریایی پنج ترکیب خیلی مهم از جمله سیتارابین (Cytarabine)، اریبولین مسیلات (Eribulin mesylate)، ترابتودین (Trabectedin)، برنتوکسیماب وتودین (Brentuximab vedotin) و زیکنوتید (Ziconotide) به‌عنوان ترکیبات با خاصیت ضد سرطانی و برای درمان سرطان شناسایی و وارد بازار دارو شده‌اند (Jimenez et al., 2020; Nigam et al., 2019). این یک واقعیت است که بیماری سرطان امروزه یکی از بزرگ‌ترین مشکلات سلامتی است که بروز انواع سرطان بر اساس سن و جنس و عوامل محیطی متفاوت است که از این بین سرطان روده یکی از شناخته‌ترین آن‌ها است. (Dosay-Akbulut et al., 2020) و از زمانی که ویلیام لین و لیندا ادعا کردند که "کوسه‌ها سرطان نمی‌گیرند"، غضروف کوسه‌ها به‌عنوان یک ماده با پتانسیل ضد سرطان مطرح شده است و از آن به بعد چندین محصول استخراج شده از غضروف کوسه به‌عنوان مکمل‌های غذایی جهت درمان بیماری‌هایی از جمله سرطان، آرتروز مفاصل، آرتروز استخوان، اسکروزیس سیستمیک و همچنین آب‌سیاه یا گلوکوم در انسان و حیوانات به بازار عرضه شده است (Hammerness and Sollars, 2002). ده‌ها محصول مشتق از غضروف کوسه به‌عنوان مکمل‌های غذایی برای درمان بیماری‌های دژنراتیو (degenerative) مانند سرطان، آرتروز (arthritis)، استئوآرتریت (osteoarthritis)، اسکروز سیستمیک (systemic sclerosis) و گلوکومین عصبی عروقی انسان و حیوانات به مردم معرفی شده است (Hammerness et al., 2002; Arjmand et al., 2022).

چندین مطالعه متناقض و دارای ابهام در خصوص غضروف کوسه و خاصیت ضد توموری آن منتشر شده است. به‌طوری‌که خیلی از محققین ادعا کرده‌اند که غضروف کوسه منجر به بیان بالای ژن‌های گیرنده‌های ضد رگ زایی و در نتیجه جلوگیری از رشد تومور می‌شود (Horsman et al., 2009; Onzalez et al., 2001). این ویژگی ضد رگ زایی غضروف کوسه منجر شده که محققین درصدد جداسازی این مهارکننده‌ها از غضروف شوند و آن‌ها را جهت استفاده در درمان بیماری‌های انسانی پیشنهاد دهند (Hammerness and Sollars, 2002). از طرف دیگر برخی محققین توجه رسانه‌ها و مردم عامه به غضروف کوسه به‌عنوان یک ماده درمانی ضد سرطان را تنها به خاطر فرار از ترس ذاتی انسان‌ها نسبت به سرطان دانسته‌اند و بیان کرده‌اند که این ماده در مراحل یک و دو استفاده کلینیکی اصلاً خاصیت درمانی قابل قبولی از خود نشان نمی‌دهد. از این رو به‌منظور کاهش این تناقض در خصوص کارایی کلینیکی غضروف کوسه در درمان بیماری سرطان، وظیفه جامعه علمی این است که از این دانش کاذب جلوگیری کرده و به‌صورت علمی و عملی خاصیت ایمنوتراپی غضروف کوسه را به اثبات برسانند (Loprinzi et al., 2005; Miller et al., 2019). در همین راستا Safari و همکاران (۲۰۱۵) اقدام به بررسی اثرات پروتئین ۱۴ کیلو دالتونی استخراج شده از کوسه‌ماهی بر روی سلول‌های فعال‌کننده دندریتیک پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که پروتئین‌های استخراج شده دارای قابلیت تحریک‌کنندگی و فعال‌کنندگی سیستم ایمنی علیه سلول‌های سرطانی است. Rakhmiyati و همکاران (۲۰۲۳) یک پژوهش باهدف تعیین محتوای ترکیبات گلوکزآمین و کندرویتین سولفات در عصاره غضروف کوسه (*Carcharhinus sorrah*) انجام داده‌اند روش مورد استفاده، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با محلول بافر فسفات پتاسیم در pH 3 بود؛ که نتایج این تحقیق عصاره SC حاوی ترکیبات گلوکزآمین و کندرویتین سولفات بازمان ماند ۱،۹۱۴ دقیقه بود که این دو ترکیب فواید بسیاری برای سلامتی دارند که عبارت‌اند از التیام زخم و کمک به فرآیند رگ زایی. در مطالعه دیگری Zheng و همکاران (۲۰۰۷) اثرات پلی پپتیدهای جدید استخراج شده از کوسه‌ماهی را بر فرایند رگ زایی تومورهای بدخیم بررسی کردند. در این مطالعه از جنین ماهی گورخری به‌عنوان گونه مدل استفاده گردید که پروتئین‌های مذکور اثرات معنی‌داری بر کنترل رگ زایی داشتند. علاوه بر این Safari and Hassan (۲۰۲۰) اثرات تحریک‌کنندگی و ضدالتهابی پروتئین‌های استخراج شده از کوسه‌ماهی را بر

بیماری‌های مختلف سرطانی بررسی کردند. عملکرد پروتئین‌های استخراج‌شده از غضروف کوسه‌ماهی‌ها عمدتاً به علت تأثیری است که روی فعالیت‌های رگ زایی و ممانعت از ایجاد تغییرات و جهش‌ها در DNA سلول‌ها می‌گذارند. از طرفی پروتئین‌های موجود در غضروف کوسه‌ماهی قادر هستند با مهار فعالیت‌های تقسیم سلولی از طریق ممانعت از تکثیر و مهاجرت سلول‌های بافت سرطانی شده مانع از توسعه و پیشرفت سرطان شوند. در این راستا شاهرخی و همکاران (۱۳۸۳) در مطالعه مشابهی عنوان کردند که فرکشن‌های پروتئینی U-995 می‌توانند اثر مهارکنندگی بر مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیالی عروق داشته باشند و موجب مهار فرایند کلاژنولیز می‌شوند.

کوسه چانه‌سفید (*Carcharhinus dussumieri*) یکی از اعضای خانواده کاراسینیده (Carcharhinidae) است. این کوسه بومی اقیانوس هند-آرام است که از دریای عرب تا خلیج فارس و جاوا اندونزی، ژاپن و استرالیا پراکنش دارد (Shahiri et al., 2018; Tabarestani et al., 2017). این کوسه به‌عنوان صید ضمنی معمولاً از دریا گرفته می‌شود و در آب‌های استرالیا حدود ۲ تا ۳ درصد از کل بیوماس صید را تشکیل می‌دهد. پوست و غضروف این کوسه‌ماهی به میزان خیلی بالایی پروتئین دارد. شواهد اخیر نشان داده که غضروف کوسه منجر به تحریک سیستم ایمنی و سلول‌های T و در نتیجه افزایش بیان ژن‌های عوامل سمیت سلولی و نکروز کننده می‌شود که در نهایت منجر به افزایش خاصیت سمیت سلولی و فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (Natural killer cells) می‌گردد (Shagiri et al., 2018). از این رو مطالعه حاضر که در قالب رساله دکتری بر این مبنا پایه‌ریزی شده است که بتواند تناقض مطالعات و ادعاهای قبلی را در خصوص خاصیت ضد سرطانی غضروف کوسه تا حد ممکن از طریق بررسی مکانیسم ژنی کاهش دهد. در همین راستا رده سلولی SW742 که در شرایط آزمایشگاهی برای انجام مطالعات زیستی بر روی سرطان کلون طراحی شده است تهیه گردید. این رده سلولی از نوع ادنوکارسینوم است که با توجه به خواستگاه آن در روده انسان آن را رده سلولی کولون انسانی نیز می‌نامند. همچنین نوع ژن‌های بیان‌شده تحت تأثیر پروتئین‌های استخراج‌شده با مطالعه گیرنده‌های طبیعی فرایند سیتوتوکسیسیته NK46، CXCR3، NK46 و NK44 معین می‌گردد. این مولکول‌های اختصاصی برای میزان موجب لیز شدن بسیاری از سلول‌های سرطانی می‌شوند (پاک و همکاران، ۱۳۹۳). بدین منظور سمیت سلولی غیرمستقیم فرکشن‌های پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه‌ماهی سفید علیه رده سلولی SW742 (رده سلولی سرطان کلون روده انسان) از طریق اندازه‌گیری بیان ژن‌های NK46، CXCR3 و NK44 در سلول‌های تک‌هسته‌ای T مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که در سال ۹۸ صورت گرفته است تعداد ۱۰ عدد کوسه‌ماهی چانه‌سفید با میانگین وزنی 135 ± 4382 گرم از سواحل خلیج فارس در محدوده بندر بوشهر صید شدند. برای استخراج پروتئین غضروف کوسه، نمونه‌برداری از بخش‌های غضروفی بدن کوسه چانه‌سفید انجام شد. نمونه‌های غضروف چرخ شدند و در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فریز درایر لیوفیلیزه شدند و در نهایت از الک با اندازه چشمی ۱۷۰ میکرومتر عبور داده شدند. غضروف الک شده تا زمان انجام آزمایش اصلی در یخچال نگهداری شد (Safari et al., 2015).

نمونه‌های غضروف پخته شدند و سپس با استفاده از بافر سدیم استات ۰/۱ مولار هموزن شدند. ۴ مولار گوانیدین هیدرو کلراید و ضد پروتئازهای دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) و فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) به محلول بافری فوق افزوده شد. سپس به میزان ۱ گرم از غضروف پخته شد در ۱۰ میلی‌لیتر از این بافر در دمای 40°C درجه سانتی‌گراد هموزن شد. سوسپانسیون به‌دست‌آمده به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد ($4000 \times \text{rpm}$) و سپس سوپرناتانت آن جدا شد و در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوپرناتانت جمع‌آوری شده با ۲۰ گرم از پلی‌اتیلن گلیکول بی‌آب مخلوط شد و در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و در نهایت به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ

با دور ۴۰۰۰ rpm انجام شد. در نهایت ماده رسوب یافته در بافر فسفات حل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیالیز شد. فرکشن های پروتئینی درون محلول دیالیز شده با استفاده از آمونوم رسوبات رسوب داده شد (Safari et al., 2015). به منظور تعیین غلظت و فراوانی پروتئین در کمپلکس پروتئینی جدا شده از غضروف کوسه ماهی تکنیک بردفورد (Bradford protein assay) استفاده شد. در مجموع ۱۰۰ میکرو لیتر از حجم های متقابل (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرو لیتر) بافر فسفات و آلبومین به درون ۵ ویال ریخته شد و سپس ۵ میلی لیتر از محلول تازه ساخته شده کوماسی بلو به هر کدام از ویال ها اضافه شد و در نهایت ورتکس شدند. میزان جذب نوری هر کدام از این محلول ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectra-MAX-PLUS 384 UV-visible Molecular Devices, USA: spectrophotometer) تعیین شد و نمودار کالیبراسیون برای سنجش میزان پروتئین نمونه های غضروف کوسه تهیه شد (بارگاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی بر اساس روش Núñez و همکاران (۲۰۱۷) صورت گرفت. برای این منظور خون تازه از افراد سالم گرفته شد و با میزان برابری محلول بافر فسفات مخلوط شد. انکوباسیون سلول های تک هسته ای خون محیطی بر اساس روش Sheikhi و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد. خون رقیق شده به داخل فالكون های حاوی مدیای فیکول (Ficoll-paque media) انتقال یافت و سپس در دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. لایه رویی سلول های فوق الذکر جداسازی و ۳ مرتبه با بافر فسفات شست و شو شدند. سپس این سلول ها در مدیای RPMI-FBS (۱۰ درصد) سوسپانسیون شدند و زنده مانی آن ها با استفاده آزمایش MTT با به کارگیری ۱۰^۶ سلول در میلی لیتر بررسی شد (رابطه ۱).

$$\text{رابطه ۱:} \quad (\%) \text{ زنده مانی} = \frac{\text{سلول زنده}}{\text{سلول مرده}} \times 100$$

نمونه های خون محیطی از افراد داوطلبی همراه با رضایت کامل اخذ گردید. میزان خیلی کمی از خون جمع آوری شده از افراد سالم با میزان برابری بافر فسفات ۰/۲ مولار مخلوط شد. سلول های کشنده طبیعی با استفاده از مدیای فیکول و طی سانتریفیوژ با دور ۹۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شدند و سپس سوسپانسیون سلولی حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. این سلول ها (۱۰^۶) با استفاده از غلظت های ۰/۲ و ۳ میکرو گرم بر میلی لیتر از فرکشن پروتئینی با وزن ۱۴/۵ کیلو دالتون استخراج شده از غضروف کوسه فعال شدند. فعال سازی این سلول ها در میکروپلیت های ۹۶ خانه ای و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴، ۸ و ۱۸ ساعت انجام شد (بارگاهی و همکاران، ۱۳۸۸). رده سلولی سلول های سرطان کلون (SW742) از موسسه تحقیقات سرم سازی و واکسن سازی رازی تهیه شد. این سلول ها در محیط RPMI-1640 (سرم جنین گاو، ۵ درصد حجمی/حجمی؛ استرپتومایسین، ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر؛ پنی سیلین، ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر؛ و ال-گلوتامات، ۲ میلی مولار) کشت داده شدند. شرایط محیط کشت نیز با ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵ درصد اکسیژن و دمای ۳۶ درجه سانتی گراد محیا شده بود. تریپسین به منظور جدا کردن سلول ها از همدیگر استفاده شد و سپس محلول بافر فسفات به منظور غیرفعال سازی تریپسین استفاده شد و این سوسپانسیون سلولی در دور ۱۸۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول های رسوب یافته SW742 بعد از سانتریفیوژ جمع آوری شدند (بارگاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

به منظور بررسی خاصیت محرک بودن فرکشن پروتئینی جداسازی شده از غضروف کوسه بر سلول های کشنده طبیعی از آزمایش MTT استفاده شد. به طوری که سلول های فعال شده NK به نسبت سلول های SW742 (۱۰:۱؛ ۲۵:۱؛ ۵۰:۱) به درون میکروپلیت ریخته و مخلوط شدند. محلول بافر فسفات به عنوان محلول کنترل استفاده شد. مخلوط سلولی به مدت سه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند و در نهایت با استفاده از ۲۵ میکرو لیتر محلول MTT وضعیت سلول ها بررسی شد. سپس سوپرناتانت جداسازی و با ۱۰۰ میکرو لیتر از DMSO مخلوط

شدند و سپس با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر میزان جذب آن‌ها قرائت شد. فعالیت سلول‌های NK با استفاده از فرمول (۲) تعیین شد (Safari and Hasan, 2020):

$$\text{رابطه ۲: } (\%) = 1 - (\text{OD (E + T)} - \text{ODE}) / \text{ODT} \times 100$$

فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی

در این فرمول ODE و ODT به ترتیب میزان دانسیته نوری سلول‌های NK و سلول‌های SW742 است (Zheng و همکاران، ۲۰۰۷). سمیت سلولی مستقیم پروتئین‌های غضروف کوسه علیه سلول‌های SW742 با استفاده از آزمایش MTT بررسی شد. بدین منظور ۲*۱۰۴ سلول SW742 در معرض غلظت‌های ۰/۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئین ۱۴،۵ کیلودالتون استخراج‌شده از غضروف کوسه در میکروپلیت های ۹۶ خانه قرار گرفت. سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس ۱۰ میکرو لیتر از محلول MTT به هر چاهک افزوده شد و دوباره به مدت ۴ ساعت انکوباسیون شدند. بعد از انکوباسیون محلولی حاوی ۱۲۰ میکرو لیتر پتاسیم هیدروکسید ۲ مولار و ۱۴۰ میکرو لیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سوسپانسیون سلولی حاصل در دور ۹۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به درون میکروپلیت های الایزا ریخته شد. در نهایت میزان جذب نوری پلیت‌ها در طول موج بین ۵۵۰-۶۰۰ نانومتر بررسی شد و سمیت سلولی پروتئین مذکور با استفاده از رابطه ۳ تعیین شد:

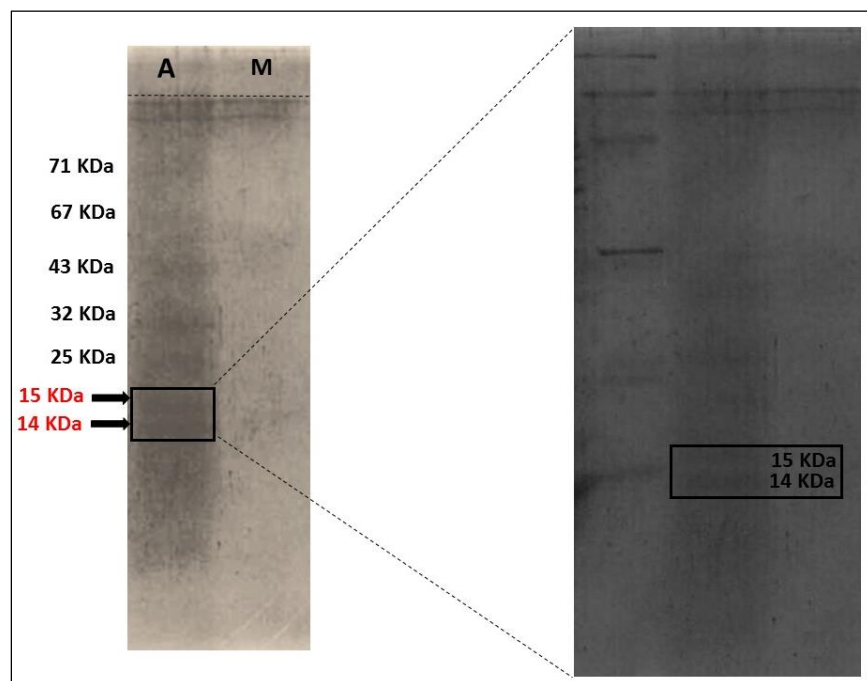
$$\text{رابطه ۳: } (\%) = (\text{OD Ncontrol} - \text{Ntest}) / (\text{OD Ncontrol}) \times 100$$

سمیت سلولی

در این فرمول OD Ntest و OD Ncontrol میزان تراکم نوری چاهک‌های کنترل و چاهک‌های حاوی سلول‌های SW742 است (Safari et al., 2015).

برای سنجش بیان ژن‌های CXCR3، NKG2D، NK46 و NK44 ابتدا کل mRNA سلول‌ها با استفاده از کیت تریزول (Triazol Rigent, Jena Bioscience GmbH, Jena Germany) و بر اساس دستورالعمل کارخانه استخراج شد. کیفیت و کمیت mRNA استخراج‌شده به ترتیب با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بررسی شد. cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific سنتز شد. واکنش‌های qPCR در سه تکرار با استفاده از پروتکل استاندارد انجام شد. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار REST- Gene (Relative Expression Software Tool for Rotor- Gene) (Livak and Schmittgen, 2001) تعیین شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ بررسی شدند. همه داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ SD بیان شدند. آزمون کولموگروف-اسمیرنوف به‌منظور تعیین نرمالیت و هموزنی داده استفاده شد. تفاوت آماری داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. اختلاف میانگین‌ها بین گروه‌های آزمایشی در سطح معنی‌داری ۵ درصد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد ($P < 0.05$). تفاوت آماری داده‌ها و گروه‌های آزمایشی به‌صورت $P < 0.05$ نشان داده‌شده است.

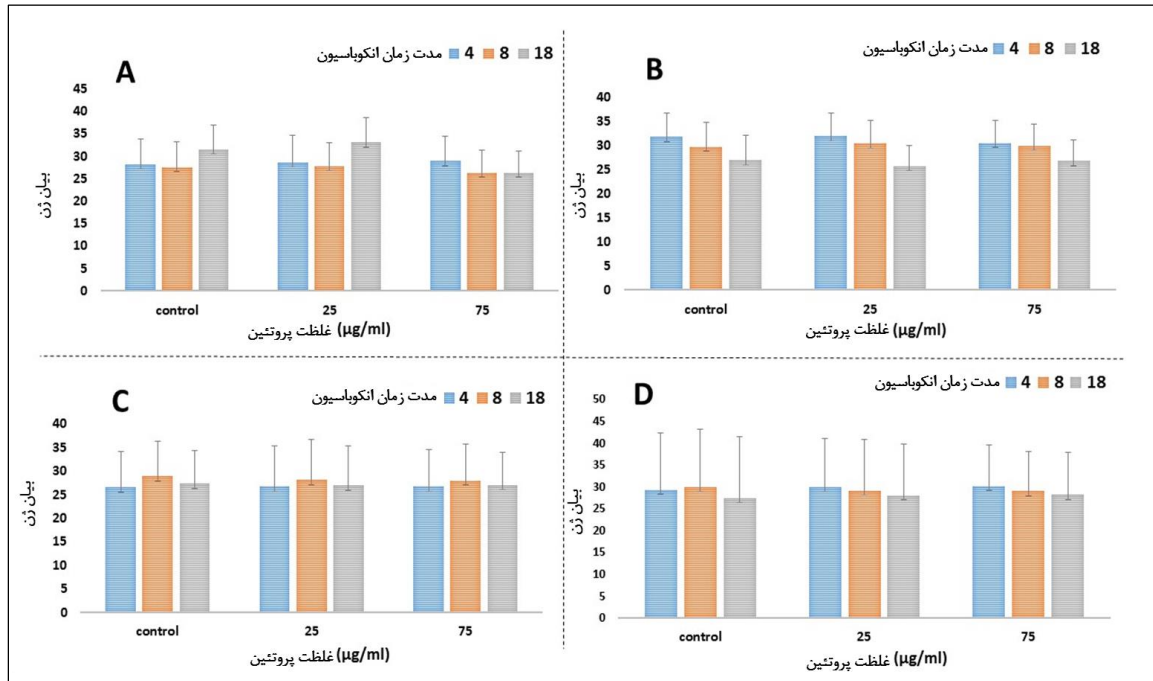


شکل ۱: ژل الکتروفوروزیس SDS-PAGE فرکشن‌های پروتئین‌های استخراج‌شده از غضروف کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*) سال ۱۳۹۸ دانشگاه دزفول.

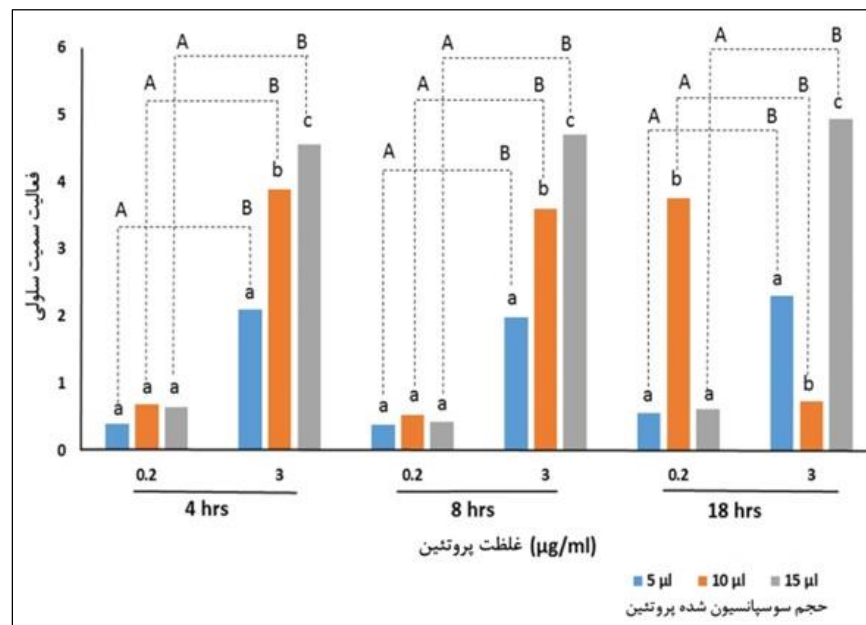
فرکشن اصلی پروتئین استخراج‌شده دارای وزن مولکولی متوسط ۱۴/۵ کیلو دالتون است.

نتایج

برای شناسایی پروتئین جداسازی شده از غضروف کوسه چانه سفید پروتئینی بر روی ژل SDS-PAGE انتقال یافت. این ژل فرکشن‌های پروتئینی جداسازی شده از غضروف کوسه را نشان داد (شکل ۱). بر اساس آنالیز ژل مذکور چندین پروتئین با وزن‌های مولکولی کم‌وزیاد نمایان شد. پروتئین تخلص شده به صورت یک تک باند بر روی ژل SDS-PAGE با وزن مولکولی ۱۴/۵ کیلو دالتون نمایان شد. میزان بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NK46 و NK44 بین تیمارهای مختلف در طول دوره آزمایش تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (شکل ۲، $P < 0.05$). همچنین میزان سمیت سلولی غلظت‌های آزمایشی پروتئین استخراج‌شده علیه سلول‌های SW742 در شکل ۳ نشان داده شده است. به طور کلی غلظت ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پروتئین ۱۴/۵ کیلو دالتون استخراج‌شده سمیت سلولی بسیار کمتری در مقایسه با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه زمانی ۲۴ ساعت از خود نشان داد. سمیت سلولی این پروتئین علیه رده سلولی سرطانی شده با غلظت و زمان رابطه مستقیم نشان داد. طی بازه زمانی ۴ و ۸ ساعت میزان سمیت سلولی هر دو غلظت ۰/۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر این پروتئین برای رده سلولی استفاده‌شده تفاوتی نشان مشاهده نشد ولی بعد از ۲۴ ساعت تفاوت قابل توجهی مشاهده شد ($P < 0.05$).

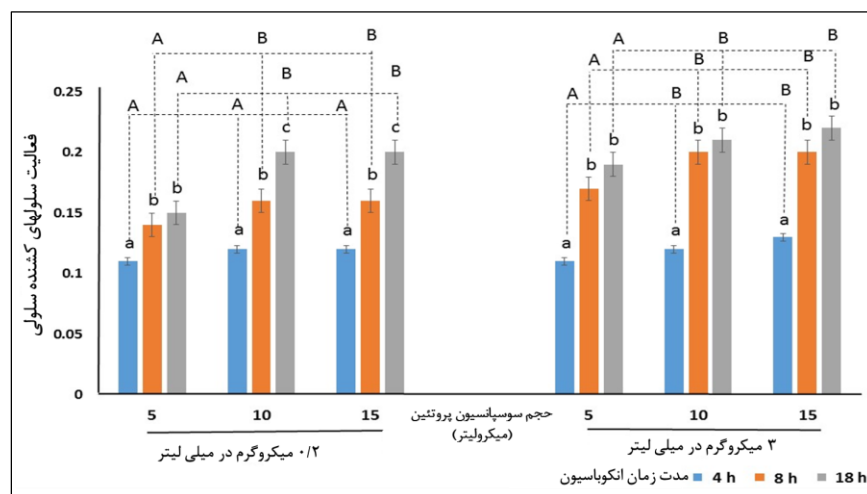


شکل ۲: بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 (به ترتیب A، B، C و D) بعد از ۴، ۸ و ۱۸ ساعت مواجهه سلول‌های کشنده طبیعی با غلظت‌های متفاوت پروتئین ۱۴/۵ کیلو دالتونی استخراج‌شده از غضروف کوسه چانه‌سفید (*Carcharhinus dussumieri*).



شکل ۳: فعالیت سمیت سلولی فرکشن پروتئین با وزن مولکولی ۱۴/۵ کیلو دالتونی استخراج‌شده از غضروف کوسه چانه‌سفید (*Carcharhinus dussumieri*) بعد از مواجهه با غلظت‌های متفاوت این پروتئین در حجم‌های مختلف.

میزان فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) پس از مواجهه با پروتئین استخراج شده از غضروف کوسه در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میزان فعالیت این سلول‌ها پس از رویارویی با پروتئین استخراج شده به میزان قابل توجهی افزایش یافت و این افزایش فعالیت با افزایش غلظت و زمان مواجهه رابطه مستقیم نشان داد ($P < 0.05$). طی ۲۴ ساعت اول آزمایش تفاوت معنی داری بین فعالیت این سلول‌ها در غلظت‌ها و حجم‌های متفاوت پروتئین استفاده (به جز در غلظت ۳ میکروگرم در میلی لیتر) مشاهده نشد ($P < 0.05$). اگرچه در مطالعه حاضر بین سمیت سلولی غلظت‌های ۰/۲ و ۳ میکروگرم بر میلی لیتر از پروتئین استخراج شده تفاوتی مشاهده نشد ولی در حجم ۵ میکرو لیتر از این پروتئین میزان فعالیت سلول‌های NK در مقایسه با غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ افزایش نسبی مشاهده شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوبه شدن این سلول‌ها در مواجهه با حجم‌های ۱۰ و ۱۵ میکرو لیتر با غلظت ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر این پروتئین میزان فعالیت آن‌ها افزایش یافت ولی در حجم‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرو لیتر با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر تفاوتی در فعالیت آن‌ها مشاهده نشد ($P < 0.05$).



شکل ۴: فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) پس از مواجهه با حجم‌های متفاوت سوسپانسیون پروتئینی با وزن مولکولی ۱۴/۵ کیلو دالتونی که از غضروف کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*) استخراج شده است.

بحث و نتیجه گیری

در خصوص خواص دارویی و ضد سرطانی غضروف کوسه ماهی مطالعات زیادی انجام شده است (Lagman and Molaie et al., 2019; Rakhmiyati et al., 2023; Walsh, 2003). علاوه بر این خواص ضد رگ زایی و ضد توموری غضروف کوسه ماهی در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (Onzalez et al., 2001; Cho and kim, 2002; Gingers et al., 2000; Ghen et al., 2022; Kang et al., 2003). تاکنون مطالعات متعددی توانایی پروتئین‌های غضروف کوسه در بهبود و تحریک سلول‌های دخیل در سیستم ایمنی جهت مبارزه با سلول‌های سرطانی را اثبات کرده‌اند (Zheng et al., 2015; Safari and Hassan, 2020). به طور مثال Safari and Hassan در سال ۲۰۲۰ به این نتیجه رسیدند که تحریک ایمنی و مهار رگ زایی برای درمان سرطان توسط بخش پروتئینی آرتريت روماتوئید (rheumatoid arthritis) القا می‌شود. با این حال، پاسخ ضد التهابی توسط پروتئوگلیکان (proteoglycan) و کندرویتین سولفات (chondroitin sulfate) القا می‌شود که برای بیماری‌های التهابی از جمله آرتريت روماتوئید و پسونوزیس مفید هستند. همچنین در برخی از مطالعات نشان داده شده است که

تخلیص پروتئین‌های غضروف کوسه از اهمیت بالایی برخوردار است، به‌طوری‌که خاصیت هم‌افزایی درمانی فرکشن‌های متفاوت پروتئین‌های استخراج‌شده از غضروف کوسه در درمان موش سرطانی مشاهده شد (Molaie et al., 2019). در این مطالعه یافته‌های SDS-PAGE نشان داد که پروتئین‌های با وزن مولکولی ۱۴/۵ کیلو دالتون فرکشن اصلی در این ژل را تشکیل داده است و میزان این فرکشن در مقایسه با یافته‌های محققان دیگری که فرکشن پروتئینی با وزن ۱۳/۷ کیلو دالتون را از غضروف کوسه جداسازی کرده بودند، بالاتر است (Rabbani-chadegani et al., 2008)؛ و همچنین در مطالعه Rakhmiyati و همکاران (۲۰۲۳) نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره (*Carcharhinus sorrah*) حاوی ترکیبات گلوکزآمین و کندرویتین سولفات با زمان ماند ۱،۹۱۴ دقیقه بود که این دو ترکیب فواید بسیاری برای سلامتی دارند که عبارت‌اند از التیام زخم و کمک به فرآیند رگ‌زایی. در همین راستا Safari و همکاران (۲۰۱۵) اقدام به بررسی اثرات فرکشن‌های پروتئینی ۱۴ کیلو دالتونی استخراج‌شده از غضروف کوسه‌ماهی به‌عنوان محرک سلول‌های دندریتیک کردند. نتایج نشان داد که پروتئین‌های فوق‌قادر هستند به‌عنوان محرک‌های اصلی سلول‌های ایمنی علیه سلول‌های سرطانی نقش‌آفرینی کنند. این نتایج با یافته‌های تحقیق پیش‌رو از نظر تحریک سلول‌های کشنده طبیعی علیه رده سلولی سرطانی کلون SW742 مطابقت داشت. همچنین این نتایج با مطالعات قبلی که پروتئین‌های با وزن مولکولی ۱۴/۵ کیلو دالتون از غضروف کوسه جداسازی کرده بودند و خاصیت ضد سرطانی آن‌ها بررسی کردند مطابقت دارد (Rabbani-chadegani et al., 2018؛ Bargahi et al., 2011). محققین دیگری ادعا کرده‌اند که مهم‌ترین فرکشن‌های پروتئینی استخراج‌شده از غضروف کوسه که نقش محرک ایمنی را دارند دارای وزن مولکولی ۱۴ و ۱۵ کیلو دالتون هستند و یافته‌های آن‌ها نیز با نتایج این تحقیق تطابق دارد (Safari et al., 2015).

مطالعات نشان داده است که گیرنده‌های ممانعت‌کننده که بر روی سلول‌های کشنده طبیعی مستقر شده‌اند نقش حیاتی در عملکرد این سلول‌ها و فعالیت آن‌ها بر عهده‌دارند (Guia et al., 2006؛ Pfeifer et al., 2018؛ He et al., 2017). مطالعات نشان داده‌اند که ژن‌های فعال‌کننده گیرنده‌های روی سطح سلول‌های کشنده طبیعی از جمله NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 نقش مهمی در شروع فعالیت و تحریک این سلول‌ها در سیستم دفاعی اعمال می‌کنند. در مطالعه حاضر نشان داده شد که پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه‌ماهی چانه‌سفید تأثیر قابل‌توجهی در بیان این ژن‌ها نداشته است. در توجیه این یافته‌ها می‌توان به مطالعات دیگری اشاره نمود که بیان داشته‌اند CXCR3 و NKG2D در توسعه و بلوغ و تحریک سلول‌های کشنده طبیعی در پی مواجهه با پروتئین غضروف کوسه نقشی نداشته‌اند (Muntasell et al., 2016؛ Sheppard, 2013؛ Wensveen and Jelene, 2018). این یافته‌ها با نتایج مطالعات انجام‌شده توسط بارگاهی و همکاران (۱۳۸۸) که اقدام به تخلیص و جداسازی پروتئین‌های محرک سیتوتوکسیک سلول‌های کشنده طبیعی از کوسه‌ماهی کرده بودند، مطابقت داشت. آن‌ها عنوان کردند که پروتئین‌های مذکور موجب افزایش گیرنده‌های NKG2D و CXCR3 و درنهایت تحریک سلول‌های کشنده علیه سلول‌های سرطانی می‌شوند. همچنین در مطالعه‌ای دیگری بیان شده که گیرنده‌های ژن‌های NKG2D و NKP46 بر روی سلول‌های کشنده طبیعی پس از مواجهه با پروتئین‌های استخراج‌شده از غضروف کوسه فعال نمی‌شوند (Sheppard, 2013). در مطالعه حاضر بیان ژن CXCR3 پاسخ وابسته به زمان به پروتئین غضروف کوسه نشان داد و این نتیجه با تحقیق دیگری که نشان داد غضروف کوسه منجر به تنظیم لیگاند‌های مربوط به CXCR3 می‌شود، مشابهت دارد (Metzemaekers, 2013). ژن NKP46 به‌عنوان مارکر خاص برای سلول‌های کشنده طبیعی تمایز یافته شناخته شده است، به‌طوری‌که سلول‌های کشنده طبیعی که این ژن را بیان می‌کنند را می‌توان به مراحل تکاملی و بلوغی متفاوت دسته‌بندی کرد و طی این تکامل یا توسعه سلولی، ژن مارکرهای سطحی از جمله گیرنده‌های سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و مولکول‌های دیگری بیان می‌شوند (Malarkannan, 2018؛ Conelley, 2014). نتایج مطالعه حاضر در خصوص ژن NKP46 تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در ساعات مختلف انکوباسیون و در پی مواجهه با پروتئین غضروف کوسه نشان نداد. در مطالعه‌ای مشابه Robert و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند

که پروتئین استخراج شده از غضروف کوسه هیچ تأثیر فعال کنندگی بر روی گیرنده های NKP46 در سلول های T سیستم گردش خون پستانداران ندارد (Horton and Mathew, 2015).

سمیت سلولی ناشی از بیان ژن NKP44 و در نتیجه افزایش دادن فعالیت سلول های کشنده طبیعی در از بین بردن رده های سلولی توموری در شمار زیادی از مطالعات به اثبات رسیده است (Parodi et al., 2019; Rajagopalan and Long, 2019; Kosental et al., 2008; Sheikhi et al., 2008). در مطالعه حاضر این ژن هیچ گونه تغییر قابل توجهی در پی مواجهه سلول های کشنده سلولی با پروتئین استخراج شده از غضروف کوسه از خود نشان نداد. از این رو می توان گفت که پروتئین استخراج شده تأثیری بر بیان این ژن نداشته است و از طرفی فعالیت کشندگی سلول های NK می تواند به دلیل بیان ژن های دیگر باشد (Sheikhi et al., 2008). با این حال نتایج نشان داد که سمیت سلولی سلول های کشنده طبیعی علیه سلول های SW742 در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی لیتر از پروتئین استخراج شده از غضروف کوسه نسبت به غلظت ۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر بالاتر بوده است. مطالعات قبلی بیان داشته اند که پروتئین های خاصی در غضروف کوسه ماهیان وجود دارد که می توانند منجر به تحریک و افزایش فعالیت سلول های کشنده طبیعی علیه سلول های SW742 می شوند (Safari and Hassan, 2020). در توجیه این یافته ها می توان اظهار داشت که پروتئین غضروف کوسه منجر به افزایش بیان ژن های سیتوکین ها بخصوص اینترلوکین ۲ و در نتیجه افزایش فعالیت سمیت سلولی سلول های کشنده طبیعی می شود (Sosnowska, 1997).

در نتیجه گیری نهایی می توان گفت که پروتئین استخراج شده از غضروف کوسه چانه سفید تا حدودی منجر به افزایش فعالیت و سمیت سلولی سلول های کشنده طبیعی می شود ولی مکانیسم اثر این پروتئین از طریق تحریک بیان ژن های بررسی شده در آزمایش حاضر نیست و از این رو عملکرد سمیت سلولی این سلول های کشنده طبیعی را از مسیرهای دیگری منجر می شود؛ بنابراین اگرچه داده های بیان ژن های مورد بررسی در مطالعه حاضر فرضیه تحقیق را به اثبات نرساند ولی می توان گفت که پروتئین استخراج شده از غضروف کوسه ممکن است مکانیسم دیگر سمیت سلولی ناشی از سلول های کشنده طبیعی علیه رده سلولی استفاده شده در مطالعه حاضر را فعال کرده باشد.

سپاسگزاری

تمامی نویسندگان از دانشگاه آزاد دزفول به خاطر حمایت های بی دریغ و آزمایشگاهی جهت انجام رساله دکتری و مقاله استخراج شده از این پژوهش، نهایت تشکر را ابراز می دارند.

منابع

- بارگاهی، ا.، زهیر، م.، چادگانی، ع.، ۱۳۸۸. تخلیص پروتئین محرک فعالیت سایتوتوکسیک سلول های کشنده طبیعی سیستم ایمنی از غضروف کوسه ماهی. مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر. ۱۲ (۳): صفحات ۱۸۸-۱۸۱.
- پاک، ف.، براتی، م.، شکراللهی باروق، م.، کوخایی، پ.، ۱۳۹۳. ایمونولوژی تومور و مکانیسم های فرار سلول های تومور از پاسخ ایمنی. کومش، ۱۵ (۴) (پیاپی ۵۲)، تابستان ۱۳۹۳. ۴۳۰-۴۱۲.
- شاهرخی، س.، غضنفری، ط.، محقق، م. ع.، محمدحسن، ز. و بابایی، غ.، ۱۳۸۴. بررسی اثر سایتوتوکسیسیته عصاره غضروف کوسه بر رده سلولی آدنوکارسینومای پستان (MCF7). مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ۲: صفحات ۱۸-۱۲.

Arjmand, F., Sheikhi, A., Ghavam Mostafavi, P., Ramezani-Fard, E. and Muhammad Hassan, Z., 2022. Do derived whitecheek shark proteins motivate T cells to fight cancer cells? A case study in using SW742 cell line. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 21(2): 403-421.

- Bargahi, A., Hassan, Z. M., Rabbani, A., Langroudi, L., Noori, S. H. and Safari, E., 2011.** Effect of shark cartilage derived protein on the NK cells activity. 33(May 2010): 403–409. <https://doi.org/10.3109/08923973.2010.500294>
- Connelley, T. K., Longhi, C., Burrells, A., Degnan, K., Allan, A., Hammond, J. A., Storset, A. K. and Morrison, W. I., 2014.** Europe PMC Funders Group cattle exhibiting both NK cell and T-cell features. 192(8): 3868–3880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302464.NKp46>
- Cho, J. J. and Kim, Y. T., 2002.** Sharks : A Potential Source of Antiangiogenic Factors and Tumor Treatments. 521–525. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0064-3>
- Connelley, T. K., Longhi, C., Burrells, A., Degnan, K., Allan, A., Hammond, J. A., Storset, A. K. and Morrison, W. I., 2014.** Europe PMC Funders Group cattle exhibiting both NK cell and T-cell features. 192(8): 3868–3880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302464.NKp46>
- Dyshlovoy, S. A., 2020.** Marine Compounds and Cancer : The First Two Decades of XXI Century. 18–21.
- Dosay-Akbulut, M.İ. N. E., Akgul, E. and Bozkurt, F., 2021.** Determination of the protective effect of shark cartilage and shark liver oil (SLO) on colon cancer by using experimental DMH.
- Fenical, W. and Jensen, P. R., 2006.** Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. 2(12): 666–673. <https://doi.org/10.1038/nchembio841>
- Florea, C., Dicato, M. Diederich, M., 2020.** Immune-modulating and anti-inflammatory marine compounds against cancer. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.008>
- Gerwick, W. H. and Moore, B. S., 2012.** Review Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, 19(1): 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.014>
- Gingras, D., Renaud, A., Mousseau, N. and Béliveau, R., 2000.** Shark cartilage extracts as antiangiogenic agents: Smart drinks or bitter pills? *Cancer and Metastasis Reviews*, 19(1–2), 83–86. <https://doi.org/10.1023/A:1026504500555>
- Guia, S., Anfossi, N., Andre, P., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Revirón, D. and Ugolini, S., 2006.** Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for
- Horton, N. C. and Mathew, P. A., 2015.** NKp44 and natural cytotoxicity receptors as damage-associated molecular pattern recognition receptors. 6(February), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00031>
- He, Y., Peng, H., Sun, R., Wei, H., Ljunggren, H. G., Yokoyama, W. M. and Tian, Z., 2017.** Contribution of inhibitory receptor TIGIT to NK cell education. *Journal of Autoimmunity*, 81: 112. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.04.001>
- Horsman, M. R., Alsner, J., Overgaard, J., Horsman, M. R., Alsner, J. and Overgaard, J., 2009.** The Effect of Shark Cartilage Extracts on the Growth and Metastatic Spread of the SCCVII Carcinoma. The Effect of Shark Cartilage Extracts on the Growth and Metastatic Spread of the SCCVII Carcinoma. <https://doi.org/10.1080/028418698430386>
- Hammerness, P. and Sollars, D., 2002.** Shark Cartilage Monograph : A Clinical Decision Support Tool. April. <https://doi.org/10.1300/J157v02n02>
- Horton, N. C. and Mathew, P. A., 2015.** NKp44 and natural cytotoxicity receptors as damage-associated molecular pattern recognition receptors. 6(February), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00031>
- He, Y., Peng, H., Sun, R., Wei, H., Ljunggren, H. G., Yokoyama, W. M. and Tian, Z., 2017.** Contribution of inhibitory receptor TIGIT to NK cell education. *Journal of Autoimmunity*, 81, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.04.001>
- Jime, C., 2015.** Marine Natural Products in Medicinal Chemistry'. 10–12. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00368>
- Jimenez, P. C., Wilke, D. V., Branco, P. C., Teixeira, P. R., Gaudêncio, S. P. and Lotufo, L. V. C., 2020.** Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. February 2019, 3–27. <https://doi.org/10.1111/bph.14876>

- Kang, J. A., Tae, J., Seok, H., Bae, M., Yi, E., Kim, K. and Kim, Y., 2003. Anti-angiogenic and anti-tumor invasive activities of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 from shark, *Scyliorhinus torazame*. 1620, 59–64. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00508-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00508-1)
- Loprinzi, C. L., Levitt, R., Barton, D. L., Sloan, J. A., Atherton, P. J., Smith, D. J., Dakhil, S. R., Moore, D. F., Krook, J. E., Rowland, K. M., Mazurczak, M. A., Berg, A. R. and Kim, G. P., 2005. Evaluation of shark cartilage in patients with advanced cancer: A north central cancer treatment group trial. *Cancer*, 104(1): 176–182. <https://doi.org/10.1002/cncr.21107>
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lagman, R. and Walsh, D., 2003. Dangerous nutrition? Calcium, vitamin D, and shark cartilage nutritional supplements and cancer-related hypercalcemia. 232–235. <https://doi.org/10.1007/s00520-002-0428-2>
- Muntasell, A., Magri, G., Pende, D., Angulo, A. and Lo, M., 2016. Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. 115(25): 5170–5180. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-256479>
- Metzemaekers, M., Mortier, A., Janssens, R., Boff, D., Vanbrabant, L., Lamoen, N., Damme, J. Van, Teixeira, M. M., Meester, I. D. and Amaral, A., 2013. Glycosaminoglycans Regulate CXCR3 Ligands at Distinct Levels : Protection against Processing by Dipeptidyl Peptidase IV / CD26 and Interference with Receptor Signaling. <https://doi.org/10.3390/ijms18071513>
- Malarkannan, S., 2018. Natural Killer Cells : Development, Maturation, and Clinical Utilization. 9(August), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
- Molaie, S., Ghaffarifar, F., Dalimi, A., Hassan, Z. M. and Sharifi, Z., 2019. Evaluation of synergistic therapeutic effect of shark cartilage extract with artemisinin and glucantime on visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(2): 146–153. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.31124.7504>
- Miller, B. D. R., Anderson, G. T., Stark, J. J., Granick, J. L. and Richardson, D., 2019. Cartilage in the Treatment of Advanced Cancer. 16(11): 3649–3655.
- Nigam, M., Ansar, H., Suleria, R., Farzaei, M. H. and Mishra, A. P., 2019. Marine anticancer drugs and their relevant targets : a treasure from the ocean. 491–515.
- Núñez, E. V., Guest, P. C. and Martins-de-souza, D., 2017. Proteomic Methods in Neuropsychiatric Research. 974, 219–227. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-52479-5>
- Onzález, R. P. G., Eyva, A. L., Odorico, M. and Oraes, M., 2001. Shark Cartilage as Source of Antiangiogenic Compounds : From Basic to Clinical Research. 24(October), 1097–1101.
- Onzález, R. P. G., Eyva, A. L., Odorico, M. and Oraes, M., 2014. Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds : from basic to clinical Shark Cartilage as Source of Antiangiogenic Compounds : From Basic to Clinical Research. June 2014. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.1097>
- Parodi, M., Favoreel, H., Candiano, G., Gaggero, S., Sivori, S., Mingari, M. C., Moretta, L., Vitale, M., & Cantoni, C., 2019. NKp44-NKp44 Ligand Interactions in the Regulation of Natural Killer Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Humans. 10(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00719>
- Pfeifer, C., Highton, A. J., Peine, S., Sauter, J., Schmidt, A. H., Bunders, M. J., Altfeld, M. and Körner, C., 2018. Natural Killer Cell Education Is Associated With a Distinct Glycolytic Profile. 9(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03020>
- Rajagopalan, S. and Long, E. O., 2019. inside blood. 122(17), 2921–2923.
- Rakhmiyati, R., Widiyanti, T. and Budiharjo, A., 2023. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Detection of Glucosamine and Chondroitin Sulfate Compounds. *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry*, 12(1): 5-8.
- Rangel, M. and Falkenberg, M. D. B., 2015. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market *Journal of Coastal Life Medicine*. May. <https://doi.org/10.12980/JCLM.3.2015JCLM-2015-0018>

- Rabbani-Chadegani, A., Abdossamadi, S., Bargahi, A. and Yousef-Masboogh, M., 2008.** Identification of low-molecular-weight protein (SCP1) from shark cartilage with anti-angiogenesis activity and sequence similarity to parvalbumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(3): 563–567. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.029>
- Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Appel, M. Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, A., Aharoni, A., Cerwenka, A., Campbell, S., Braiman, A. and Porgador, A., 2020.** Proliferating Cell Nuclear Antigen Is a Novel Inhibitory Ligand for the Natural Cytotoxicity Receptor NKp44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102267>
- Safari, E. and Hassan, Z. M., 2020.** Immunomodulatory effects of shark cartilage: Stimulatory or anti-inflammatory. *Process Biochemistry*, 92: 417–425.
- Sheikhi, A. K., Tayade, C., Paffaro, V. A. and Croy, B. A., 2007.** Are natural killer cells distributed in relationship to nerve fibers in the pregnant mouse uterus? *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(17): 2885–2889
- Sheikhi, A., Nazarian, M., Khadem-al-melleh, A., Yahaghi, N. and Sheikhi, R., 2008.** In-vitro effects of Mycobacterium bovis BCG-lysate and its derived heat shock proteins on cytokines secretion by blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients in comparison with healthy controls *International Immunopharmacology*, 8(6): 887–892
- Sheikhi, A., Saadati, K., Jafarzadeh, A., Karimi, H. and Mousavinasab, N., 2014.** Augmenting the expression of NKp44 molecule and the natural killer activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with malignant colorectal carcinoma *Drug Research*, 64(6): 281–286
- Safari, E., Hassan, Z. M. and Moazzeni, S. M., 2015.** Shark cartilage 14 kDa protein as a dendritic cells activator. 3973(2), 165–170. <https://doi.org/10.3109/08923973.2015.1006370>
- Safari, E. and Hassan, Z. M., 2020.** Immunomodulatory effects of shark cartilage: Stimulatory or anti-inflammatory. *Process Biochemistry*, 92: 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.032>
- Sosnowska, D., Mysliwski, A., Dzierzbicka, K. and Kolodziejczyk, A. M., 1997.** The in vitro effect of new muramyl peptide derivatives on cytotoxic activity of NK (Natural Killer) cells from hamsters bearing Ab Bomirski melanoma. *Biotherapy*, 10(2), 161–168. <https://doi.org/10.1007/BF02678543>
- Sheppard, S., 2013.** Investigating the role of two activating receptors, NKG2D and NKp46, in natural killer cell education and in the development of hepatocellular carcinoma linked to chronic inflammation.
- Shahiri Tabarestani, H., Sedaghat, N., Jahanshahi, M., Motamedzadegan, A. and Mohebbi, M., 2016.** Physicochemical and Rheological Properties of White-Cheek Shark (*Carcharhinus dussumieri*) Skin Gelatin. *International Journal of Food Properties*, 19(12): 2788–2804. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1050595>.
- Tabarestani, H. S., Sedaghat, N., Jahanshahi, M., Motamedzadegan, A. and Mohebbi, M., 2017.** us cr t. 8850(August). <https://doi.org/10.1080/10498850.2015.1126664>
- Wensveen, F. M. and Jelenc, V., 2018.** Felix M. Wensveen, Vedrana Jelenc ić and Bojan Polić. 9(March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00441>
- Zheng, L., Ling, P., Wang, Z., Niu, R., Hu, C., Lin, X., Activity, A., Ling, P. and Zhang, T., 2015.** ND ES RIB. 4047(December). <https://doi.org/10.4161/cbt.6.5.4002>
- Zheng L, Ling P. and Wang Z., 2007.** A novel polypeptide from shark cartilage with potent anti-angiogenic activity. *Cancer Biol Ther* 6: 775–780. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.5.4002>

