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

فاطمه ارجمند[۱]
عبدالکریم شیخی[۲*]
پرگل قوام مصطفوی[۳]
احسان رمضانی 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: ۱۴۰۰۰۴۰۸۸۶
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۴
این مقاله پژوهشی و برگرفته از رساله دکتری است.

چکیده

خصوصیات درمانی غضروف کوسه برای درمان بیماری‌های ناعلاج مثل سرطان و روماتیسم مفاصل در خیلی از مطالعات به اثبات رسیده است. ازاین‌رو مطالعه حاضر به بررسی تأثیر پروتئین غضروف کوسه‌ماهی چانه‌سفید بر بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 در سلول‌های کشنده طبیعی و فعالیت آن‌ها علیه رده سلولی سرطان کلون روده (SW742) می‌پردازد. نمونه‌های پروتئین استخراج‌شده کوسه‌ماهی در محلول بافر PBS برای محلول سازی 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 ($P < ۰/۰۵$). همچنین سمیت سلولی سلول‌های کشنده طبیعی به میزان قابل‌توجه افزایش یافت به‌نحوی‌که در مدت‌زمان ۱۸ ساعت زمان مواجه و حجم ۱۵ میکرو لیتر پروتئین با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت کشندگی را داشته است. بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 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 ($P < ۰/۵$) 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.

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؛ Mehbub *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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

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 درنتیجه 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 پیداکرده‌اند(Rangel and Falkenberg؛ Dyshlovoy, 2020؛ Jim, 015). در بین این مولکول‌های دریایی پنج ترکیب خیلی مهم ازجمله سیتارابین (Cytarabine)، اریبولین مسیلات (Eribulin mesylate)، ترابکتودین (Trabectedin)، برنتوکسیماب وتودین (Brentuximab vedotin) و زیکونوتید (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). این‌یک 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 ازاین‌بین 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 مطرح‌شده است و از آن به بعد چندین محصول استخراج‌شده از غضروف کوسه به‌عنوان مکمل‌های غذایی جهت درمان بیماری‌هایی ازجمله سرطان، آرتروز مفاصل، آرتروز استخوان، اسکلروزیس سیستمیک و همچنین آب‌سیاه یا گلوکوم در انسان و حیوانات به بازار عرضه‌شده است (Hammerness and Sollars, 2002). ده ها محصول مشتق از غضروف کوسه به‌عنوان مکمل‌های غذایی برای درمان بیماری‌های دژنراتیو (degenerative) مانند سرطان، آرتریت (arthritis)، استئوآرتریت (osteoarthritis)، اسکلروز سیستمیک (systemicsclerosis) و گلوکومین عصبی عروقی انسان و حیوانات به مردم معرفی‌شده است (Arjmand *et al*., 2022؛ Hammerness *et al*., 2002).

چندین مطالعه متناقض و دارای ابهام در خصوص غضروف کوسه و خاصیت ضد توموری آن منتشرشده است. به‌طوری‌که خیلی از محققین ادعا کرده‌اند که غضروف کوسه منجر به بیان بالای ژن‌های گیرنده‌های ضد رگ زایی و درنتیجه 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. ازاین‌رو 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 ایمونوتراپی 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 استخراج‌شده از کوسه‌ماهی بر روی سلول‌های فعال‌کننده دندریتیک پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که پروتئین‌های استخراج‌شده دارای قابلیت تحریک‌کنندگی و فعال‌کنندگی سیستم ایمنی علیه سلول‌های سرطانی است. Rakhmiyati و همکاران (۲۰۲۳) یک پژوهش باهدف تعیین محتوای ترکیبات گلوکزامین و کندرویتین سولفات در عصاره غضروف کوسه (Carcharhinus sorrah) انجام داده‌اند روش مورداستفاده، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با محلول بافر فسفات پتاسیم در pH 3 بود؛ که نتایج این تحقیق عصاره SC حاوی ترکیبات گلوکزامین 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 استخراج‌شده 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 استخراج‌شده از کوسه‌ماهی را بر

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

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 فرکشن های 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 خلیج‌فارس و جاوا اندونزی، ژاپن و استرالیا پراکنش دارد (Shahiri *et al*., 2018; Tabarestani *et al*., 2017). این کوسه به‌عنوان صید ضمنی معمولاً از دریاگرفته 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 درنتیجه افزایش بیان ژن‌های عوامل سمیت سلولی و نکروز کننده می‌شود که درنهایت منجر به افزایش خاصیت سمیت سلولی و فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (Natural killer cells) می‌گردد (Shagiri *et al*., 2018). ازاین‌رو 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 طراحی‌شده 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 بامطالعه گیرنده‌های طبیعی فرایند سیتوتوکسیسیتی NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 معین می‌گردد. این مولکول‌های اختصاصی برای میزبان موجب لیز شدن بسیاری از سلول‌های سرطانی می‌شوند (پاک و همکاران، ۱۳۹۳). بدین منظور سمیت سلولی غیرمستقیم فرکشن های پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه‌ماهی سفید علیه رده سلولی SW742 (رده سلولی سرطان کلون روده انسان) از طریق اندازه‌گیری بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 در سلول‌های تک‌هسته‌ای T موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که در سال ۹۸ صورت گرفته است تعداد ۱۰ عدد کوسه‌ماهی چانه‌سفید با میانگین وزنی ۱۳۵ ± ۴۳۸۲ گرم از سواحل خلیج‌فارس 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 ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فریز درایر لیوفیلیزه شدند و درنهایت 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 هموژن شدند. ۴ مولار گوانیدین هیدرو کلراید و ضد پروتئازهای دیامین 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 ۴۰ درجه سانتی‌گراد هموژن شد. سوسپانسیون به‌دست‌آمده به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۴۰۰۰ rpm) و سپس سوپرناتانت آن جدا شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوپرناتانت جمع‌آوری‌شده با ۲۰ گرم از پلی‌اتیلن گلیکول بی‌آب مخلوط شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و درنهایت به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

با دور ۴۰۰۰ rpm انجام شد. درنهایت ماده رسوب یافته در بافر فسفات حل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز شد. فرکشن های پروتئینی درون محلول دیالیز شده با استفاده از آمونیوم سولفات رسوب داده شد (Safari *et al*., 2015).

به‌منظور تعیین غلظت و فراوانی پروتئین در کمپلکس پروتئینی جداشده از غضروف کوسه‌ماهی تکنیک بردفورد (Bradford protein assay) استفاده شد. درمجموع ۱۰۰ میکرو لیتر از حجم‌های متقابل (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرو لیتر) بافر فسفات و آلبومین به درون ۵ ویال ریخته شد و سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول تازه ساخته‌شده کوماسی بلو به هرکدام از ویال‌ها اضافه شد و درنهایت ورتکس شدند. میزان جذب نوری هرکدام از این محلول‌ها در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectra-MAX-PLUS 384 UV–visible spectrophotometer؛Molecular Devices, USA) تعیین شد و نمودار کالیبراسیون برای سنجش میزان پروتئین نمونه‌های غضروف کوسه تهیه شد (بارگاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای 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 سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بر اساس روش Sheikhi و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد. خون رقیق‌شده به داخل فالکون‌های حاوی مدیای فیکول (Ficoll-paque media) انتقال یافت و سپس در دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. لایه رویی سلول‌های فوق‌الذکر جداسازی و ۳ مرتبه با بافر فسفات شست‌وشو شدند. سپس این سلول‌ها در مدیای RPMI-FBS (۱۰ درصد) سوسپانسیون شدند وزنده‌مانی آن‌ها با استفاده آزمایش MTT با به‌کارگیری $۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر بررسی شد (رابطه ۱).

رابطه ۱:

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

نمونه‌های خون محیطی از افراد داوطلبی همراه با رضایت کامل اخذ گردید. میزان خیلی کمی از خون جمع‌آوری‌شده از افراد سالم با میزان برابری بافر فسفات ۰/۲ مولار مخلوط شد. سلول‌های 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 سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. این سلول‌ها ($۱۰^{۶}$) با استفاده از غلظت‌های ۰/۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فرکشن پروتئینی با وزن ۱۴/۵ کیلو دالتون استخراج‌شده از غضروف کوسه فعال شدند. فعال‌سازی این سلول‌ها در میکروپلیت های ۹۶ خانه‌ای و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴، ۸ و ۱۸ ساعت انجام شد (بارگاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

رده سلولی سلول‌های سرطان کلون (SW742) از موسسه تحقیقات سرم‌سازی و واکسن‌سازی رازی تهیه شد. این سلول‌ها در محیط RPMI-1640 (سرم جنین گاو، ۵ درصد حجمی/حجمی؛ استرپتومایسین، ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر؛ و ال-گلوتامات، ۲ میلی مولار) کشت داده شدند. شرایط محیط کشت نیز با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد اکسیژن و دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد محیا شده بود. تریپسین به‌منظور جدا کردن سلول‌ها از همدیگر استفاده شد و سپس محلول بافر فسفات به‌منظور غیرفعال سازی تریپسین استفاده شد و این سوسپانسیون سلولی در دور ۱۸۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های رسوب یافته SW742 بعد از سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند (بارگاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

به‌منظور بررسی خاصیت محرک بودن فرکشن پروتئینی جداسازی شده از غضروف کوسه بر سلول‌های کشنده طبیعی از آزمایش MTT استفاده شد. به‌طوری‌که سلول‌های فعال‌شده NK به نسبت سلول‌های SW742 (۱:۱۰؛ ۱:۲۵؛ و ۱:۵۰) به درون میکروپلیت ریخته و مخلوط شدند. محلول بافر فسفات به‌عنوان محلول کنترل استفاده شد. مخلوط سلولی به مدت سه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و درنهایت با استفاده از ۲۵ میکرو لیتر محلول MTT وضعیت سلول‌ها بررسی شد. سپس سوپرناتانت جداسازی و با ۱۰۰ میکرو لیتر از DMSO مخلوط

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

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

رابطه ۲: فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی $(\%) = 1 - (\mathrm{OD}\ (\mathrm{E} + \mathrm{T}) - \mathrm{ODE})/\mathrm{ODT} \times 100$

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 ۱۰۴*۲ 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. درنهایت میزان جذب نوری پلیت‌ها در طول‌موج بین ۵۵۰–۶۰۰ نانومتر بررسی شد و سمیت سلولی پروتئین مذکور با استفاده از رابطه ۳ تعیین شد:

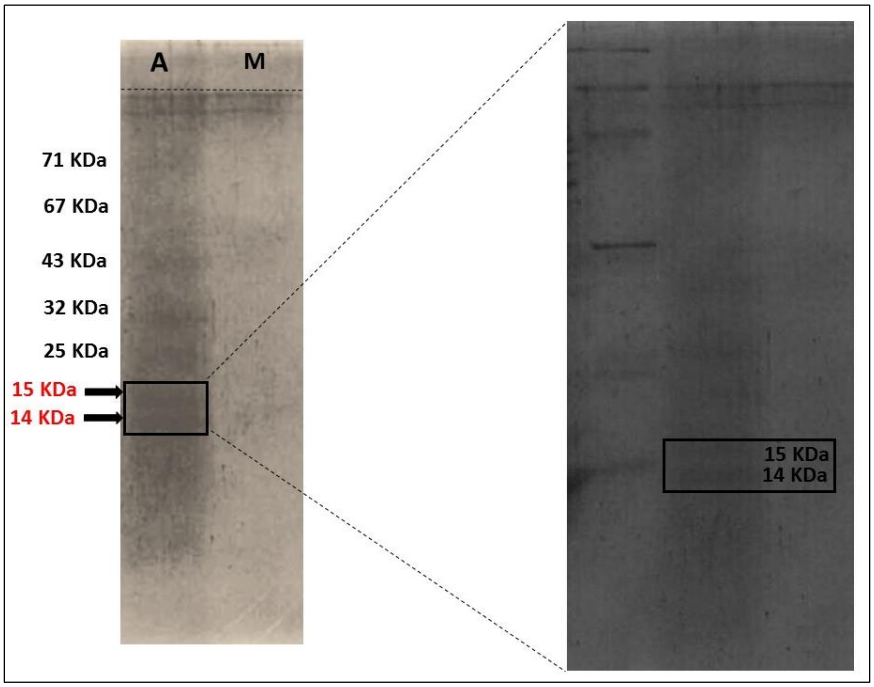
رابطه ۳: سمیت سلولی $(\%) = (\mathrm{OD\ Ncontrol} - \mathrm{Ntest})/(\mathrm{OD\ Ncontrol}) \times 100$

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

برای سنجش بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 ابتدا کل mRNA سلول‌ها با استفاده از کیت تریزول (Triozol 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 طول‌موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بررسی شد. cDNA با استفاده از کیت cDNA 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 Relative Expression Software Tool for Rotor- Gene (REST-RG, version 3) آنالیز شدند. هر نمونه در سه تکرار بررسی شد و از ژن بتا–اکتین به‌عنوان ژن رفرنس استفاده شد و میزان بیان mRNA با استفاده از روش 2-ΔΔct تعیین شد (Livak and Schmittgen, 2001).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ بررسی شدند. همه داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD بیان شدند. آزمون کولموگروف– اسمیرنوف به‌منظور تعیین نرمالیته و هموژنی 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 ($P<۰/۰۵$). تفاوت آماری داده‌ها و گروه‌های آزمایشی به‌صورت $P<۰/۰۵$ نشان داده‌شده است.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]



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

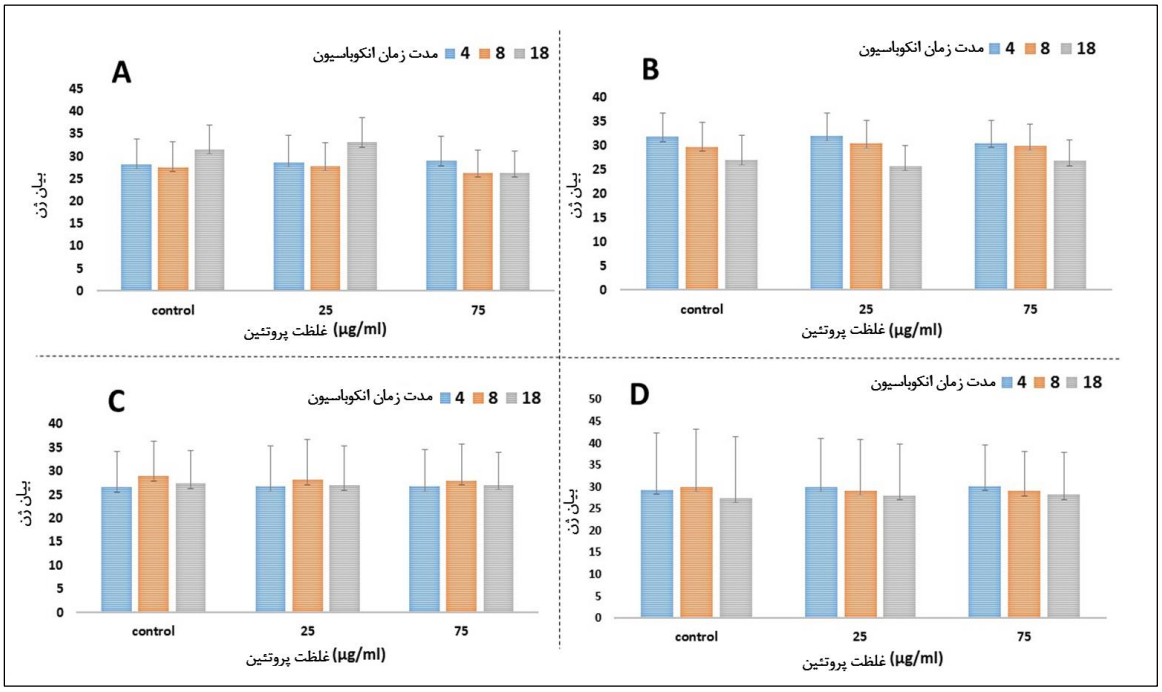
فرکشن اصلی پروتئین استخراج‌شده دارای وزن مولکولی متوسط ۱۴/۵ کیلو دالتون است.

نتایج

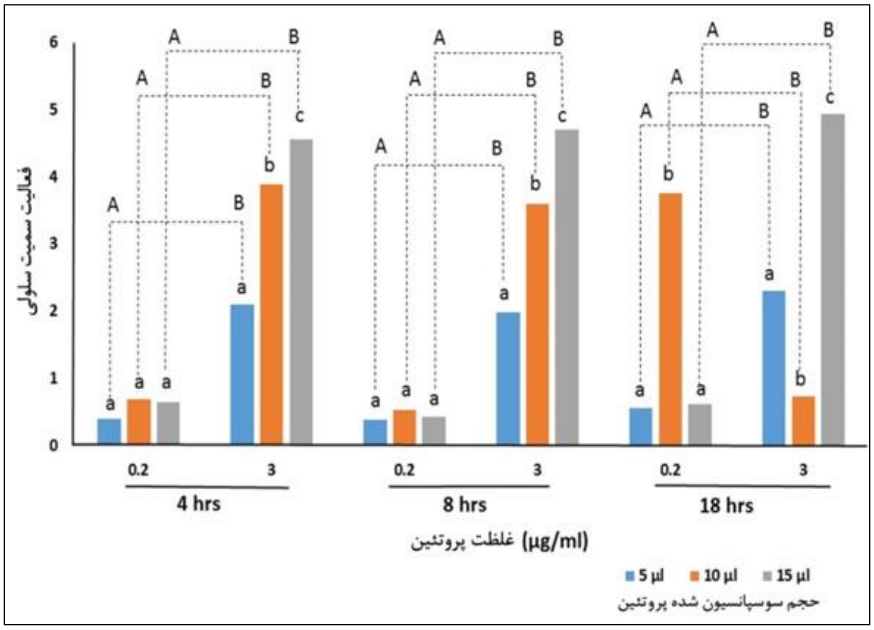
برای شناسایی پروتئین جداسازی شده از غضروف کوسه جناح‌های پروتئینی بر روی ژل SDS-PAGE انتقال یافت. این ژل فرکشن های پروتئینی جداسازی شده از غضروف کوسه را نشان داد (شکل ۱). بر اساس آنالیز ژل مذکور چندین پروتئین با وزن‌های مولکولی کم‌وزیاد نمایان شد. پروتئین تخلیص شده به‌صورت یک تک باند بر روی ژل SDS-PAGE با وزن مولکولی ۱۴/۵ کیلو دالتون نمایان شد.

میزان بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 بین تیمارهای مختلف در طول دوره آزمایش تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (شکل ۲، P<۰/۰۵). همچنین میزان سمیت سلولی غلظت‌های آزمایشی پروتئین استخراج‌شده علیه سلول‌های SW742 در شکل ۳ نشان داده‌شده است. به‌طورکلی 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 قابل‌توجهی مشاهده شد (P <۰/۰۵).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]



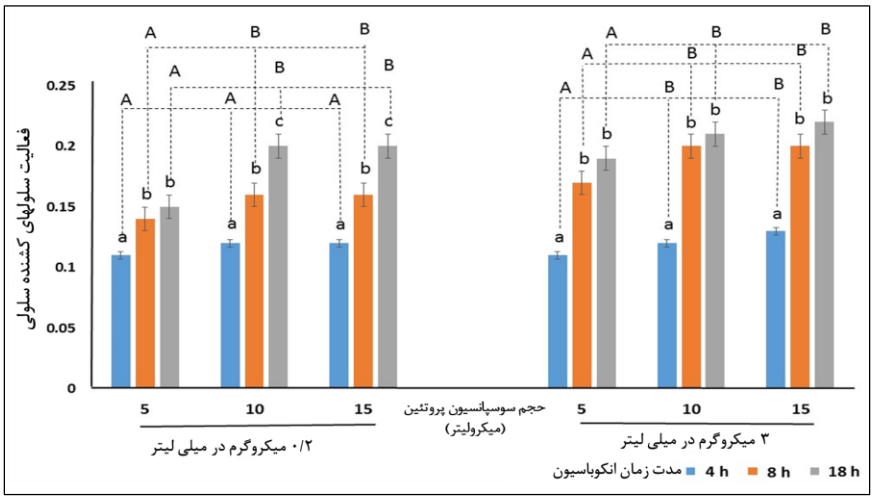
شکل ۲: بیان ژن‌های NKG2D، CXCR3، NKP46 و NKP44 (به ترتیب A، B، C و D) بعد از ۴، ۸ و ۱۸ ساعت مواجهه سلول‌های کشنده طبیعی با غلظت‌های متفاوت پروتئین ۱۴/۵ کیلو دالتونی استخراج‌شده از غضروف کوسه چانه‌سفید (*Carcharhinus dussumieri*).



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.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

میزان فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) پس از مواجهه با پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه در شکل ۴ نشان داده‌شده است. نتایج نشان داد که میزان فعالیت این سلول‌ها پس از رویارویی با پروتئین استخراج‌شده به میزان قابل‌توجهی افزایش یافت و این افزایش فعالیت با افزایش غلظت و زمان مواجهه رابطه مستقیم نشان داد (P <۰/۰۵). طی ۲۴ ساعت اول آزمایش تفاوت معنی‌داری بین فعالیت این سلول‌ها در غلظت‌ها و حجم‌های متفاوت پروتئین استفاده (به‌جز در غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده نشد (P <۰/۰۵). اگرچه در مطالعه حاضر بین سمیت سلولی غلظت‌های ۰/۲ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پروتئین استخراج‌شده 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 میلی‌لیتر این پروتئین میزان فعالیت آن‌ها افزایش یافت ولی در حجم‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرو لیتر با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوتی در فعالیت آن‌ها مشاهده نشد (P <۰/۰۵).



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 چانه‌سفید (*Carcharhinus dussumieri*) استخراج‌شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

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 گلوکزامین 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 همین راستا Safari و همکاران (۲۰۱۵) اقدام به بررسی اثرات فرکشن های پروتئینی ۱۴ کیلو دالتونی استخراج‌شده از غضروف کوسه‌ماهی به‌عنوان محرک سلول‌های دندریتیک کردند. نتایج نشان داد که پروتئین‌های فوق قادر هستند به‌عنوان محرک‌های اصلی سلول‌های ایمنی علیه سلول‌های سرطانی نقش‌آفرینی کنند. این نتایج با یافته‌های تحقیق پیش رو ازنظر 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 فرکشن های پروتئینی استخراج‌شده از غضروف کوسه که نقش محرک ایمنی رادارند 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 ممانعت کننده که بر روی سلول‌های کشنده طبیعی مستقرشده‌اند نقش حیاتی در عملکرد این سلول‌ها و فعالیت آن‌ها بر عهده‌دارند (He *et al*., 2017؛ Pfeifer *et al*., 2018؛ Guia *et al*., 2006). مطالعات نشان داده‌اند که ژن‌های فعال‌کننده گیرنده‌های روی سطح سلول‌های کشنده طبیعی ازجمله 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 NKG2D و CXCR3 در توسعه و بلوغ و تحریک سلول‌های کشنده طبیعی در پی مواجهه با پروتئین غضروف کوسه نقشی نداشته‌اند (Muntasell *et al*., 2016; Wensveen and Jelene, 2018؛ Sheppard, 2013). 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 بیان‌شده 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 تمایزیافته شناخته‌شده 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 ازجمله گیرنده‌های سیتوکین ها، کموکین ها 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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

که پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه هیچ تأثیر فعال‌کنندگی بر روی گیرنده‌های NKP46 در سلول‌های T سیستم گردش خون پستانداران ندارد (Horton and Mathew, 2015).

سمیت سلولی ناشی از بیان ژن NKP44 و درنتیجه افزایش دادن فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی در از بین بردن رده‌های سلولی توموری در شمار زیادی از مطالعات به اثبات رسیده است (Kosental *et al*., 2008؛ Rajagopalan and Long, 2019؛ Parodi *et al*., 2019؛ Sheikhi *et al*., 2008). در مطالعه حاضر این ژن هیچ‌گونه تغییر قابل‌توجهی در پی مواجهه سلول‌های کشنده سلولی با پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه از خود نشان نداد. ازاین‌رو می‌توان گفت که پروتئین استخراج‌شده تأثیری بر بیان این ژن نداشته است و از طرفی فعالیت کشندگی سلول‌های NK می‌تواند به دلیل بیان ژن‌های دیگر باشد (Sheikhi *et al*., 2008). بااین‌حال نتایج نشان داد که سمیت سلولی سلول‌های کشنده طبیعی علیه سلول‌های SW742 در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه نسبت به غلظت ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاتر بوده است. مطالعات قبلی بیان داشته‌اند که پروتئین‌های خاصی در غضروف کوسه‌ماهیان وجود دارد که می‌توانند منجر به تحریک و افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی علیه سلول‌های SW742 می‌شوند (Safari and Hassan, 2020). در توجیه این یافته‌ها می‌توان اظهار داشت که پروتئین غضروف کوسه منجر به افزایش بیان ژن‌های سیتوکین‌ها بخصوص اینترلوکین ۲ و درنتیجه افزایش فعالیت سمیت سلولی سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود (Sosnowska, 1997).

در نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت که پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه چانه‌سفید تا حدودی منجر به افزایش فعالیت و سمیت سلولی سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود ولی مکانیسم اثر این پروتئین از طریق تحریک بیان ژن‌های بررسی‌شده در آزمایش حاضر نیست و ازاین‌رو عملکرد سمیت سلولی این سلول‌های کشنده طبیعی را از مسیرهای دیگری منجر می‌شود؛ بنابراین اگرچه داده‌های بیان ژن‌های موردبررسی در مطالعه حاضر فرضیه تحقیق را به اثبات نرساند ولی می‌توان گفت که پروتئین استخراج‌شده از غضروف کوسه ممکن است مکانیسم دیگر سمیت سلولی ناشی از سلول‌های کشنده طبیعی علیه رده سلولی استفاده‌شده در مطالعه حاضر را فعال کرده باشد.

سپاسگزاری

تمامی نویسندگان از دانشگاه آزاد دزفول به خاطر حمایت‌های بی‌دریغ و آزمایشگاهی جهت انجام رساله دکتری و مقاله استخراج‌شده از این پژوهش، نهایت تشکر را ابراز می‌دارند.

منابع

بارگاهی، ا. زهیر، م. چادگانی، ع.، ۱۳۸۸. تخلیص پروتئین محرک فعالیت سایتوتوکسیک سلول‌های کشنده طبیعی سیستم ایمنی از غضروف کوسه‌ماهی. مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر. ۱۲ (۳): صفحات ۱۸۸-۱۸۱.

پاک، ف. براتی، م. شکراللهی باروق، م. کوخایی، پ. ۱۳۹۳. ایمنولوژی تومور و مکانیسم‌های فرار سلول‌های تومور از پاسخ ایمنی. کومش، ۱۵(۴) (پیاپی ۵۲)، تابستان ۱۳۹۳. ۴۳۰-۴۱۲.

شاهرخی، س.، غضنفری، ط.، محققی، م. ع.، محمدحسن، ز. و بابایی، غ.، ۱۳۸۴. بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی 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.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

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

Florean, 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., Breso, V., Frassati, C., Reviron, 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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

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

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-ΔΔCT 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.The

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., Widiyani, 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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

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 ˇ ic´ and Bojan Polic´. 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

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-09]