مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۶، شهریور ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثرات فیکوسیانین بر میزان نیتریک اکساید در رده‌ی سلولی توموری فیبروسارکوما HT1080

سینا صارمی: دانشجوی گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

طاهره ناجی: دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول)
tnaji2002@gmail.com

نیکو نصوحی: استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: در حال حاضر سرطان یکی از دلایل مرگ و میر در دنیا به شمار می‌رود. میزان شیوع سرطان و مرگ ومیر ناشی از آن تحت تاثیر دو عامل سن و نژاد افراد است. در مطالعه حاضر به بررسی اثرات فیکوسیانین بر میزان نیتریک اکساید در رده‌ی سلولی توموری فیبروسارکوما HT1080 پرداخته شده است.

روش کار: جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. جهت کشت آن از محیط کشت زاروک استفاده شد.پس از استخراج فیکوسیانین ، تست MTT با غلظت‌های مختلف از فیکوسیانین ۱۰۰۰ ، ۵۰۰، ۲۵۰ ، ۱۲۵ میکرو گرم بر میلی گرم بر رده سلولی توموری فیبروسارکوما HT1080 اثر داده شد بعد از انجام تست MTT و مشخص شدن دوز IC50، غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره فیکوسیانین را بر روی رده سلولی مورد نظراثر داده شد. پس از استخراج RNA با استفاده از متد گریس به ارزیابی فعالیت NO پرداخته شد ,و سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به بیان ژن iNOS پرداخته شد و تغییر بیان ژن iNOS با استفاده از Real time PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در بررسیMTT از غلظت ۲۵۰ ماکروگرم بر میلی لیتر تعداد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشت ($p\leq$۰/۰۰۱). همچنین آنالیز میزان رهایش NO نشان داد که در غلظت‌های بالای ۲۵۰ ماکرولیتر بر میلی گرم افزایش معنی‌داری در ترشح NO وجود داشته است ($p\leq$۰/۰۰۱). همچنین با توجه به آنالیز MTT که سمیت نیز از این غلظت به بعد صورت گرفت بنابراین میتوان نتیجه گرفت که این دارو از غلظت بالای ۲۵۰ ماکرولیتر بر میلی‌گرم می‌تواند در القا اثرات ضد سرطانی موثر باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS و آزمون One way ANOVA انجام گرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که میزان ترشح NO بعد از ۲۴ ساعت تیمار با دارو افزایش معنی داری در ترشح NO در غلظت‌های بالای ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌گرم را نشان داد که با توجه به آنالیز MTT فیکوسیانین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا از غلظت بالای ۲۵۰ میکروگرم بر میلی گرم میتواند در القا اثرات ضد سرطانی موثر باشد.

کلیدواژه‌ها
بیان ژن iNOS،
فیکوسیانین،
سلولی توموری فیبروسارکوما

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۲
تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۰۶/۲۱

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:
Saremi S, Naji T, Nasoohi N. Evaluation of the effects of phycocyanin on nitric oxide in fibrosarcoma HT1080 tumor cell line. Razi J Med Sci. 2021;28(6):116-126.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;28(6):116-126. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of the effects of phycocyanin on nitric oxide in fibrosarcoma HT1080 tumor cell line

Sina Saremi: Student Student of pharmacy,Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Tahereh Naji: Associate professor Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran (* Corresponding author) tnaji2002@gmail.com

Nikoo Nasoohi: Assistant Professor Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: The various studies show that cancer is currently one of the leading causes of death in the world. Its spread and high mortality rate is influenced by two factors, age and race. Spirulina platensis is a microalga with biological activities such as antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory which nowadays is used to produce nutritional supplements named Phycocyanin. Phycocyanine isolated from Spirulina algae is a non-toxic, water-soluble protein pigment that exhibits antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, and neuroprotective effects. In addition to these health benefits, this pigment has been used in dietary nutritional supplements and natural colorant applications in the food, cosmetic, and biotechnology industries. Fibrosarcoma is a rare example of soft tissue sarcoma that originates in fibrous tissue, fascia, and tendons in and between muscles. The purpose of this research was to investigated the effects of Phycocyanin on nitric oxide (NO) levels in the Fibrosarcoma HT1080 tumor cell line.

Methods: In this study, Spirulina platensis was obtained from the National Center for Genetic and Biological Resources of Iran, and for its cultivation, Zarok medium was used . The composition of the culture medium (g/l) includes [NaHCO3] 38.0 g, K2 [HPO4] 0.5 g, [NaNO3] 2.5 g, [K2 SO4] 1.0 g,[NaCl2] 1.0 g, [MgSO4 +7water] 0.2 g, [FeSO4 +7 water] 0.05 g and urea 0.2 g in pH 8.5. After culturing the algae and exposing it to fluorescent light with an intensity of 3500 lux in period of 12 hours of darkness and 12 hours 0f light, and then for its cultivation the samples were placed at 29 ° C for 16 days. The specimens were shaken 3 times daily for good algal growth. After observing the algal crystal, cell masses were collected. This process was performed using 100 and 20λ filters which are used to separate larger particles and algal masses, respectively. The collected masses were washed 3 times to eliminate the existence of the culture medium, and for drying the algae it was put in a 45 ° C incubator for 48 hours. After extraction of Phycocyanin, destruction rate of cell with MTT test was used with various concentration of 125, 250, 500, 1000 µg/ml and evaluated on the cell line HT1080. For MTT Assay, cells were harvested from exponential-phase maintenance cultures . Single-cell suspensions were prepared, cells counted using a hemocytometer and then dispersed within replicate 96-well microliter plates to a total volume of 200 µl/well. Eight duplicate wells were used for each determination. Plates were maintained at 37°Cin a humidified atmosphere of 90% N2-5% CO2-5% O2. A 24-h pre incubation time was allowed prior to irradiation. To perform the MTT assay, culture medium was removed from the wells ensuring that the monolayer of cells was not

Keywords

iNOS gene expression,

Phycocyanin,

Cancer,

Fiberosarcoma

Received: 12/06/2021

Published: 12/09/2021

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

disturbed. MTT solution (100 µl) at appropriate concentrations was then added to each well and the plates incubated at 37°C for 2-4 h, depending upon individual cell line requirements. Following incubation, cells were inspected using low power microscopy to confirm reduction of the tetrazolium and to assess confluency of the monolayer. The remaining MTT solution was then removed and 100 µl of DMSO was then added to each well to dissolve the formazan crystals. Plates were shaken for 5 min on a plate shaker to ensure adequate solubilization. Absorbance readings on each well were performed at 540 nm. A reference wavelength was not used in as much as this made little difference to the absorbance readings obtained. Control wells for absorbance readings contained no cells or medium but MTT solution was added as per experimental wells, and removed after incubation, then DMSO was added. All experiments were performed at least three times. The experimental groups were treated with 125, 250, 500, 1000 µg/ml of Phycocyanin keeping control group intact. HT1080 cells were exposed to 250 µg/ml of Phycocyanin for 24 hours. Then the supernatant was removed and the NO activity was evaluated HT1080 cells exposed to different concentrations of Phycocyanin using Grease method. In the Grease method, the amount of NO is measured indirectly in such a way that sulfanilic acid was made to react with nitrite in an acidic solution. This action forms an azo dye that can be measured at a light absorption of 520 to 590 nm. After measuring NO activity and RNA extraction, iNOS gene expression was evaluated using Real time PCR with designed primers. Keeping House gene was GAPDH. Data analysis was performed by SPSS18 software. One-way analysis of varience (ANOVA) was used to compare the data between the groups.

Results: Cell viability significantly decreased in HT1080 cells exposed to at least 250 µg / ml of Phycocyanin compared with control group. Nitric oxide assay showed that NO concentration significantly increased. iNOS gene expression level significantly increased in HT1080 cells exposed IC50 dose of Phycocyanin .

Conclusion: According to MTT analysis, it could be concluded that amount of NO after 24h treatments with phycocyanine showed significant discharge in concentration more than 250 µg/ml where toxicity initiated from this concentration. Extracted Phycocyanin from Spirulina algae with more than 250 µg/ml concentration could have anti-cancer effects. Also, the results of the NO release analysis confirmed the above claim. Because the amount of NO secretion after 24 hours of drug treatment showed a significant increase in NO secretion at concentrations above 250 µg / ml, which according to MTT analysis, the toxicity of this drug after this concentration, the drug from a concentration above 250 µg/ml can be effective in inducing anti-cancer effects.

Finally, gene expression analysis was performed which showed that in the drug-treated sample iNOS gene expression was significantly increased compared to the control group ($P \leq 0.001$). The studies have shown the iNOS gene expresses a calcium / calmodulin-independent enzyme that can accelerate the production of nitric oxide, it can be concluded that Phycocyanin is involved in inhibiting cancer cells by inducing nitric oxide production.

During treatment with Phycocyanin, cell proliferation as well as the ability of cells to form colonies decreased. The other studies have shown that Phycocyanin induces apoptosis by increasing γ-H2AX levels and altering the Bcl2 / Bax ratio, followed by the release of cytochrome C and increasing Caspase 9 levels. It can be concluded that Phycocyanin can be a capable compound in the treatment of cancer.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Saremi S, Naji T, Nasoohi N. Evaluation of the effects of phycocyanin on nitric oxide in fibrosarcoma HT1080 tumor cell line. Razi J Med Sci. 2021;28(6):116-126.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

مقدمه

در حال حاضر سرطان عامل ۱۲٪ تمامی مرگ‌ها در سرتاسر جهان است. سالانه بیش از ۳۰۰۰ نفر در اثر سرطان، جان خود را از دست می‌دهند. تخمین زده می‌شود که هر سال در کشور، بیش از ۷۰۰۰ مورد جدید سرطان، اتفاق می‌افتد. از طرفی با افزایش امید به زندگی و افزایش درصد سالمندی در جمعیت کشور، انتظار می‌رود موارد بروز سرطان در دهه آینده به شدت افزایش یابد (۱).

سارکومای بافت نرم یک گروه هتروژن از تومورهای جامد بدخیم است که یک درصد از سرطان‌های جدید در اروپا و ایالات متحده را شامل می‌شود. فیبروسارکوما یک نمونه‌ی نادر از سارکومای بافت نرم می‌باشد که از بافت فیبری، فاسیا و تاندون‌ها داخل و بین عضلات منشا می‌گیرد و تنها ۳ درصد از انواع سارکوما را شامل می‌شود. درمان فیبروسارکوما باید هم به‌صورت فردی (Individualized) و هم چندوجهی (Multimodal) باشد. جراحی یکی از درمان‌های انتخابی این بیماری است که طی آن بخش وسیعی از بافت سالم نیز برداشته می‌شود و پس آن با رادیوتراپی احتمال عود مجدد را کاهش می‌دهند. متاسفانه در حدود نیمی از بیماران دچار متاستاز می‌شوند که در این صورت امکان جراحی وجود نخواهد داشت. در این دسته از بیماران که دچار متاستاز پیشرفته می‌شوند؛ زمان بقا بدون توجه به انجام یا عدم انجام شیمی‌درمانی ۱۲ ماه خواهد بود! گروهی از داروها مانند دوکسوروبیسین، ایفسفامید و داکاربازین در درمان این نوع از سارکومای بافت نرم موثر خواهند بود؛ اگرچه نتایج این درمان‌ها ضعیف هستند و اغلب در میزان بقای بیماران رشد قابل توجهی را نشان نمی‌دهند. دوکسوروبیسین اغلب در پروتکل شیمی‌درمانی فیروسارکوما وجود دارد که پاسخ ۳۰-۲۰٪ در بهبود را نشان می‌دهد. مصرف ترکیب دو داروی دوکسوروبیسین با ایفسفامید در مقایسه با دوکسوروبیسین به تنهایی دارای اثربخشی بیشتری می‌باشد اما دارای سمیت‌های کوتاه مدت و بلند مدت گوناگون مانند سرکوب مغز استخوان و کاردیومیوپاتی است (۲).

امروزه یکی از گسترده‌ترین مطالعات برای درمان سرطان، در ارتباط با اثرات ضدسرطانی سیانوباکتری‌ها می‌باشد. سیانوباکتری‌ها جز باکتری‌های فتوسنتزی گرم منفی می‌باشند. سیانوباکتری Anabaena sp. ISC دارای ریشه‌های بدون انشعاب، کلنی‌های مجتمع، فیکوبیلی پروتئین و اغلب دارای هتروسیست‌های میانی هستند.

فیکوبیلی پروتئین‌ها، پروتئین‌های پایداری هستند که شامل گروه‌های پروتستیک کروموفور بوده و عامل خواص فلورسنتی برای این پروتئین‌ها می‌باشند که بر اساس رنگشان به دو گروه فیکوسیانین (آبی) و فیکواریترین (قرمز) تقسیم شده و دارای رنگ‌های درخشان، خاصیت فلورسنتی بالا می‌باشند. اجزای پروتئینی محلول در آب از نوع کمپلکس‌های گیرنده‌های نوری فتوسنتتیک هستند (۴،۳). فیکوسیانین یک نوع بیلی پروتئین محلول در آب و غیر سمی است که از ترکیب دو زیر واحد آلفا و بتا با هم و به سه شکل سی‌فیکوسیانین، آرفیکوسیانین و آلوفیکوسیانین دیده می‌شوند و سی فیکوسیانین‌ها از طریق ارتباطات تیواتر که شامل باقی‌مانده‌های سیستئین هستند به پروتئین‌های اطراف متصل می‌گردند. فیکوسیانین دارای خواص زیادی از جمله ضد التهابی، ضد دیابتی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضد باکتریایی، مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد.

فیکوسیانین (C - PC) رنگ دانه آبی رنگ، گیرنده نور با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فلورسنت در سیانوباکتری‌ها و دو جنس رودوفیت‌ها و کریپتوفیت‌ها است. PC -C به بسیاری از سیانوباکتری‌ها رنگ آبی می‌بخشد و به همین خاطر با نام جلبک‌های سبز- آبی شناخته می‌شوند. C-PC ترکیبی قابل حل در آب، به شدت فلورسنت و دارای خواص آنتی اکسیدانی است. PC و دیگر فایکوبیلی پروتئین‌ها خواص زیادی در صنعت غذا، صنایع آرایشی بهداشتی، زیست فناوری، تشخیص بیماری و درمان دارند. در حال حاضر ۱۱ کمپانی در حال تولید و فروش فایکوبیلی پروتئین‌ها و مشتقات آن‌ها هستند (۵). فایکوسیانین توسط یک شرکت ژاپنی تحت نام Blue Lina تجاری شده است. محصول پودر آبی رنگ غیر سمی، بدون بو، کمی شیرین است و هنگامی که در آب حل می‌شود فلورسنس درخشان مایل به قرمز خفیفی دارد. از pH ۴-۸ و تا دمای C ° ۶۰- پایدار ولی مقاومت آن در مقابل نور ضعیف است

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

(۶).

مهم‌ترین ویژگی فیکوسیانین ماده ضد سرطانی بودن باکتریایی آن است که در واقع به عنوان نوعی القاکننده مرگ سلولی برای سلول‌های سرطانی به شمار می‌آید که آن را از طریق دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها و میکروفلامنت‌ها، کاهش سیکلو اکسیژناز ۲، فعارسازی کاسپازهای ۲ و ۹ در مسیر آپوپتوز، ایجاد تغییراتی در نسبت BCL2/Bax و نیز ایجاد تغییراتی در مرحله‌ی G_0/G_1 سیکل سلولی انجام می‌دهد (۷).

فیکوسیانین دارای خواص ضد اکسیدکننده و ضد التهاب است و بر پراکسیل، هیدروکسیل و رادیکال‌های آلکسی همه اکسیدان‌ها موثر می‌باشد. با این حال، بیشترین تاثیر را بر رادیکال‌های پراکسیل دارد.

فیکوسیانین‌سی یک آنتی‌اکسیدان اتصال‌دهنده فلزی است زیرا از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کند. رادیکال‌های پراکسیل توسط کروموفور یک زیر واحد فیکوسیانین‌سی تثبیت می‌شوند. برای این‌که رادیکال‌های هیدروکسیل از بین برود، واکنش باید در نور کم و با سطح بالایی از فیکوسیانین‌سی انجام شود. رادیکال‌های هیدروکسیل در قسمت‌های التهابی بدن دیده می‌شوند. فیکوسیانین‌سی، به عنوان یک ضد اکسیدکننده، آسیب این رادیکال‌ها را تحریک می‌کند و از این‌رو عامل ضد التهاب است (۹،۸). فیکوسیانین سی سبب محافظت در برابر سمیت کبد می‌شود که با استفاده از سیستم سیتوکروم P_450 از کبد محافظت می‌کند. این می‌تواند تولید متیوفوران را مختل کند و یا ایجاد آلفا، بتا، گاما کتوآلدهید غیر اشباع را مختل کند که هر دو از اجزای کلیدی سیستم سیتوکروم P_450 هستند که یک متابولیت واکنشی تولید می‌کنند که در هنگام اتصال به بافت‌های کبدی، سبب ایجاد سموم می‌شود.

سرطان زمانی اتفاق می‌افتد که سلول‌ها بدون کنترل به رشد خود ادامه دهند. فیکوسیانین سی (C-PC) اثرات ضد سرطان دارد و از رشد بدون کنترل سلول‌ها جلوگیری می‌کند. فیکوسیانین سی شکل‌گیری تومور را قبل از مرحله S متوقف می‌کند و سنتز DNA به علت ورود سلول‌های تومور به G انجام نمی‌شود و در نتیجه هیچ‌گونه تکثیر تومور وجود نخواهد گرفت. علاوه بر این، فیکوسیانین سی‌آپوپتوز می‌شود. هنگامی که سلول‌ها با فیکوسیانین سی درمان می‌شوند، گونه‌های اکسیژن رادیکال‌های اکسیژن (ROS) ساخته می‌شوند. این مولکول‌ها تولید BCl2 (تنظیم‌کننده آپوپتوز) را کاهش می‌دهد. در این‌جا BCl2 پروتئین‌هایی را به نام کاسپاز مهار می‌کند که کاسپازها بخشی از مسیر آپوپتوزی هستند. هنگامی‌که BCl2 کاهش می‌یابد، بیان کاسپاز افزایش می‌یابد؛ در نتیجه آپوپتوز رخ می‌دهد. باید در نظر داشت که فیکوسیانین سی به تنهایی برای درمان سرطان کافی نیست و برای درمان و غلبه بر ماهیت پایدار سلول‌های تومور، باید داروهای دیگری نیز به کار برده شود (۱۰). نیتریک اکساید در طی یک فرآیند آنزیمی از واکنش ال‌آرژنین و اکسیژن حاصل می‌شود. آنزیم‌های سازنده نیتریک اکساید شامل سه ایزومر هستند، دو ایزومر این آنزیم به شکل ساختمانی (nNOS, cNOS) در سلول دیده می‌شوند؛ در حالی که ایزومر سوم (iNOS) تنها در سلول‌های تحریک شده، فعال می‌شود. ژن iNOS بر اثر عوامل مختلف التهابی بیان می‌گردد و به همین دلیل نوع القایی NOS نامیده می‌شود. ژن القایی نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) نوعی آنزیم غیر وابسته به کلسیم/کالمودولین را بیان می‌کند که می‌تواند تولید نیتریک اکسید را از ال‌آرژنین تسریع کند. تنظیم بیان آن در سطح ژن صورت گرفته و میزان بیان آن ارتباط مستقیمی با تولید بالای NO دارد. بررسی بیان iNOS ابزار قدرتمندی برای درک شاخص‌های مولکولی موثر در پاسخ‌های بافتی و سلولی به عوامل خارجی است (۱۱).

NO یکی از چندین مولکول سیگنالینگ گازی و شناخته شده است. علاوه بر این NO یک پیام‌رسان بیولوژیک کلیدی مهره‌داران است که نقش مهمی در فرآیندهای بیولوژیکی ایفا می‌کند. این محصول زیستی شناخته شده تقریباً در همه انواع موجودات، از جمله باکتری‌ها، گیاهان، قارچ‌ها و سلول‌های جانوری است (۱۲).

NO با مهار انقباض عضله صاف عضلانی و رشد، تجمع پلاکت‌ها و چسبندگی لکوسیت به اندوتلیوم به هوموستاز عروقی کمک می‌کند. افرادی که مبتلا به آترواسکلروز، دیابت یا فشار خون بالا هستند، اغلب نقایص مسیرهای NO را نشان می‌دهند. مصرف زیاد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

نمک برای کاهش تولید NO در بیماران مبتلا به فشار خون ضروری نشان داده شده است، اگرچه قابلیت دسترسی بیولوژیک باقی می‌ماند (۱۳).

مشخص شده است که NO از طریق تحریک سیکلاز گوانیلات محلول که یک آنزیم heterodimeric با تشکیل بعد GMP cyclic است، عمل می‌کند-Cyclic GMP پروتئین کیناز G را فعال می‌کند که سبب جذب دوباره Ca^{+2} و باز شدن کانال‌های پتاسیم فعال کلسیم می‌شود. کاهش غلظت Ca^{+2} اطمینان می‌دهد که کیناز نایزین مایوسین (MLCK) دیگر نمی‌تواند فسفرولیه مولکول میوزین را داشته باشد، در نتیجه توقف چرخه عبور و جلوگیری از آرام‌سازی سلول‌های عضلانی صاف رخ می‌دهد.

نیتریک اکسید یک رادیکال آزاد مؤثر در سرطان است و eNOS می‌تواند وقایع مرتبط با سرطان (آنژیوژنز، آپوپتوز، چرخه سلولی، تهاجم و متاستاز) را تنظیم کند (۱۴). همچنین NO می‌تواند با سوپراکساید واکنش داده و واسطه‌های ثانویه نیرومندی مانند پروکسی نیتریت (Peroxynitrite: $ONOO^-$) و دی اکسید نیتروژن (Nitrogen Dioxide: $N0_2$) را تشکیل دهد که این واسطه‌ها اثرات سیتوتوکسیک خود را از طریق تأثیر بر متابولیسم چربی و آسیب DNA و تغییرات پس ترجمه‌ای پروتئین اعمال می‌کنند. سطوح پایین NO که توسط ایزوفرم eNOS تولید می‌شود، پاتولوژیک است و می‌تواند اثرات پیش سرطانی داشته باشد (۱۵).

هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثرات فیکوسیانین بر میزان نیتریک اکساید در رده‌ی سلولی توموری فیبروسارکوما HT1080 می‌باشد.

روش کار

جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. جهت کشت اسپیرولینا از محیط کشت زاروک استفاده شد. پس از کشت در مقیاس‌های کوچک‌تر، کشت نهایی در حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. پس از کشت جلبک و قرار دادن در برابر نور فلورسنت با شدت ۳۵۰۰ لوکس نوری (با پریود زمانی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نمونه‌ها در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ روز قرار داده شدند. نمونه‌ها روزانه ۳ بار تکان داده شده تا رشد جلبکی بخوبی انجام گیرد. پس از مشاهده بلور جلبکی، نسبت به جمع‌آوری توده سلولی اقدام شده که این فرآیند با استفاده از صافی‌های ۱۰۰ و ۲۰ میکرونی انجام شده که به ترتیب برای جداسازی ذرات بزرگ‌تر و توده جلبکی مورد استفاده قرار گرفت. توده جمع‌آوری شده ۳ بار شست‌وشو داده شد که این عمل در واقع برای از بین رفتن اثرات محیط کشت انجام گردید. برای خشک کردن جلبک نیز دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. استخراج طبق روش ارائه شده توسط موتولاکشمی و همکاران (در سال ۲۰۱۲) با اندکی تغییر انجام شد که ابتدا مقدار معین از توده خشک اسپیرولینا (خشک شده در دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد آون به مدت ۴۸ ساعت) به مقدار ۴۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار اضافه شده و سپس از آنزیم لیزوزیم و EDTA استفاده شد.

مخلوط تهیه شده در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم برای مدت ۴ ساعت شیک شده. بعد از اتمام فرآیند تیمار با آنزیم، نمونه در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول روی برای آزمایش ما مورد استفاده قرار گرفت. برای خالص‌سازی نیز از سولفات آمونیوم با درجه اشباع ۴۰ درصد بهره گرفته شد. پس از قرار دادن نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در محیط تاریک فرآیند سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه انجام شد. مایع بی‌رنگ رویی حاصل از سانتریفیوژ دور ریخته شده و به رسوب آبی رنگ مقداری محلول بافر فسفات اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای استخراج فیکوسیانین از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس ابتدا مقدار ۱ گرم از توده خشک اسپیرولینا به ۲۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۶/۸ اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق روی استیرر با دور rpm ۴۰۰ هم زده شد. سپس به لوله فالکون منتقل کرده و با دور g ۱۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی آبی رنگ که حاوی فیکوسیانین بود جدا شد. همچنین برای خالص‌سازی فیکوسیانین از کیتوزان و زغال فعال استفاده شد. ابتدا

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

کیتوزان با غلظت ۰/۲۴ درصد وزنی حجمی در استیک اسید ۱ درصد حل کرده و زغال فعال با غلظت ۸/۴ درصد وزنی حجمی به آن اضافه شد. سپس ۲۵ میلی لیتر از فیکوسیانین استخراج شده به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی استیرر با دور ۱۵۰۰rpm هم زده شد. سپس به لوله فالکون منتقل کرده و با دور g ۱۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی آبی رنگ که حاوی فیکوسیانین بود جدا شد. رده سلول‌سرطانی فیبروسارکومار HT1080 از انستیتوپاستور خریداری شد، این سلول را در شرایط استاندارد مطابق با پروتکل کشت و تکثیر داده شد تا زمانی که آماده برای تست MTT گردند. بدین صورت که در محیط کشت DMEM در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله تحت شرایط ۵ درصدی دی اکسید کربن در یک فلاسک ۷۵ میلی‌لیتری کشت شدند. سلول‌های کشت داده شده از انکوباتور بیرون آورده شده و بعد از خالی کردن محیط و دو بار شستشو با PBS، عمل تریپسینیزه کردن انجام شد. بعد از تریپسینیزه کردن حدود ۴-۲ میلی‌لیتر محیط درون فلاسک ریخته و فلاسک را به صورت افقی قرار داده شد. آنگاه شمارش سلولی انجام شده و بر حسب مقدار مورد نیاز (بین یک تا دو میلیون سلول در هر کرایوویال)، از محیط حاوی سلول‌ها درون یک لوله سانتریفوژ ریخته شده و در دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵-۴ دقیقه سانتریفوژ انجام شد. بعد از سانتریفوژ در زیر هود مایع بالایی را دور ریخته و روی آن یک میلی‌لیتر محیط انجماد (۹۰٪ محیط کشت DMEM با ۱۰٪ سرم و ۱۰٪ DMSO) را که از قبل تهیه شده بود، ریخته شد.

درصد سلول‌های زنده (Viability) با رنگ‌آمیزی سلول توسط تریپان بلو تعیین می‌گردند. در این مطالعه سلول سرطانی فیبروسارکومار HT1080 از انستیتوپاستور خریداری شد، این سلول را در شرایط استاندارد مطابق با پروتکل ذکر شده کشت و تکثیر داده شد تا زمانی که آماده برای تست MTT گردند. بدین صورت که در محیط کشت DMEM در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله تحت شرایط ۵ درصدی دی اکسید کربن در یک فلاسک ۷۵ میلی‌لیتری کشت شدند.

برای تست MTT غلظت‌های مختلفی از فیکوسیانین با استفاده از محیط کشت سلولی تهیه شد. تهیه غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ به صورتی انجام شد که ناحیه توکسیک و غیرتوکسیک مشخص شود. بعد از انجام تست MTT و مشخص شدن دوز IC50، میزان ۷۱۲,۴ µg/ml از فیکوسیانین را بر روی سلول فیبروسارکوما HT1080 ریخته و بعد از ۲۴ ساعت سوپ رویی را برداشته و با استفاده از متد گریس به ارزیابی فعالیت NO پرداخته شد و نهایتا با طول موج ۵۴۰ نانومتر OD خوانده شد. در این مطالعه بعد از مشخص شدن غلظت IC50 این غلظت از عصاره را بر سلول فیبروسارکوما HT1080 اثر داده شد و متعاقباً با استفاده از کیت‌های تجاری، استخراج RNA صورت گرفت و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به بیان ژن iNOS پرداخته شد. در این مرحله جهت ارزیابی بیان ژن iNOS از روش Real Time PCR استفاده گردید. اولین مرحله در انجام تست Real time PCR استخراج RNA بود و در این تحقیق ژن کنترل ژن هاوس کیپینگ GAPDH بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS و آزمون One way ANOVA انجام گرفت.

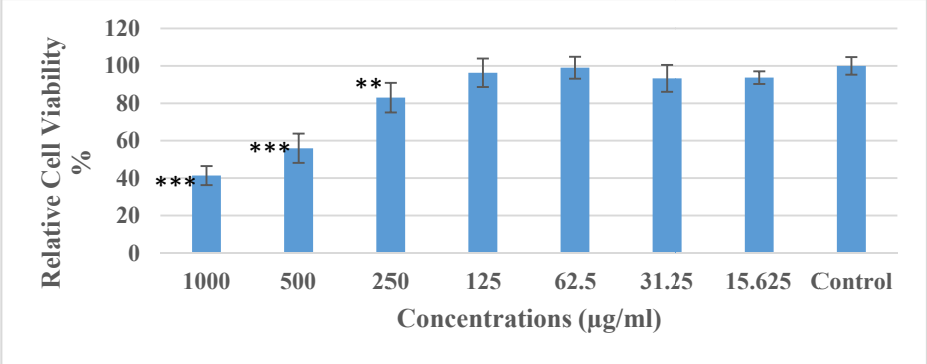
یافته‌ها

آنالیز MTT: تست MTT جهت بررسی میزان موفقیت داروی مورد نظر بر ایجاد سمیت در سلول‌های سرطانی بررسی گردید. این دارو از غلظت ۲۵۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر سمیت ایجاد می‌کند؛ و تفاوت معنی‌داری با نمونه کنترل مثبت در این غلظت‌ها دارد ($p\leq ۰/۰۰۱$) (نمودار ۱).

نمودار میزان رهایش NO: نمودار ۲، میزان ترشح NO بعد از ۲۴ ساعت تیمار با دارو را نشان می‌دهد. افزایش معنی‌داری در ترشح NO در غلظت‌های بالای ۲۵۰ ماکرولیتر بر میلی‌گرم وجود دارد. با توجه به آنالیز MTT که سمیت نیز از این غلظت به بعد صورت گرفت (نمودار ۲).

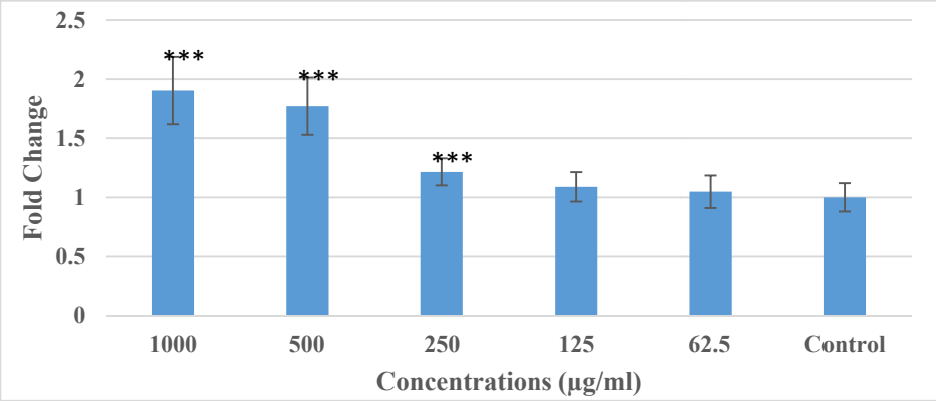
آنالیز بیان ژن: نمودار زیر بیان ژن iNOS را نشان می‌دهد. در نمونه تیمار شده با دارو بیان این ژن به صورت معناداری نسبت به نمونه کنترل افزایش می‌یابد ($p\leq ۰/۰۰۱$).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]



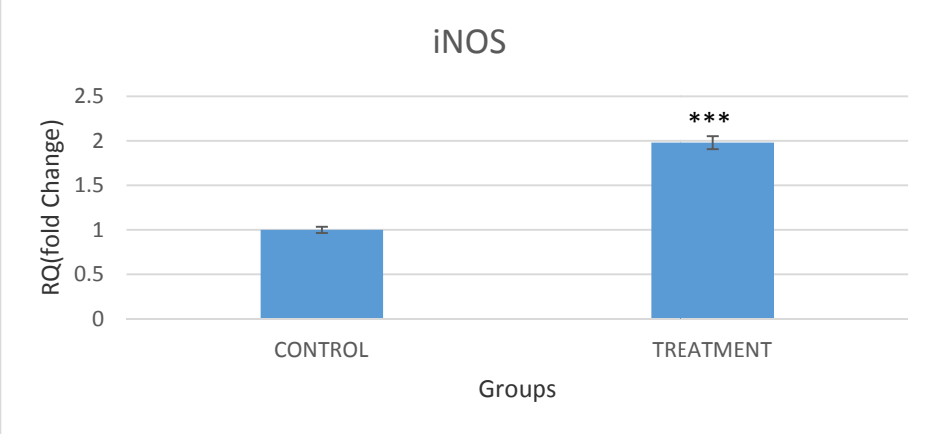
نمودار ۱– سمیت سلولی

*** نشان‌دهنده‌ی معناداری نسبت به گروه کنترل (p≤۰/۰۱)



نمودار ۲– نمودار میزان رهایش نیتروژن اکساید

*** نشان‌دهنده‌ی معناداری نسبت به گروه کنترل (p<۰/۰۰۱)



نمودار ۳– آنالیز میزان بیان ژن نیتروژن اکساید

*** نشان‌دهنده‌ی معناداری نسبت به گروه کنترل (p<۰/۰۰۱)

بحث و نتیجه‌گیری

فیکوسیانین یک آنتی اکسیدان فوق العاده قوی می‌باشد و رادیکال‌های آزاد را مهار و از اکسید شدن چربی‌ها نیز جلوگیری می‌کند، همچنین دارای خاصیت ضد التهابی قوی می‌باشد. فیکوسیانین ضد سکته مغزی است. اکسیژن بیش از حد در مغز باعث ساخته شدن اکسیژن گونه فعال (ROS) می شود که باعث صدمه زدن به مغز می‌گردد و منجر به سکته مغزی می‌شود. فیکوسیانین می‌تواند این نوع اکسیژن اضافی را مهار کند همچنین می‌تواند از آستروسیتوز و التهاب های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

مغزی پیشگیری کند. این رنگریزه با مهار هپاتوتوکسین ها از بیماری‌های کبدی جلوگیری می‌کند. این رنگریزه ضد سرطان می باشد، سرطان زمانی اتفاق می‌افتد که سلول ها به صورت غیر کنترل شده شروع به تقسیم می‌کنند که این رنگریزه می‌تواند این حالت را مهار کند. فیکوسیانین می‌تواند جلوی تشکیل شدن تومورها را قبل از مرحله S بگیرد و علاوه بر این همراه با داروهای دیگر در شیمی درمانی می تواند به درمان سرطان نیز کمک کند (۶).

رومو و آریاس در سال ۲۰۱۹ به مطالعه روی گیاه زنجبیل پرداختند. ارزش غذایی زنجبیل را می‌توان به انواع ترکیبات فعال زیستی آن از جمله Shogaol، Gingerol و Zingiberene نسبت داد. Shogaol و Gingerol گروهی از ترکیبات فنلی فرار هستند که عمدتاً مسئول طعم تند ریزوم می‌باشند. تحقیقات نشان می‌دهد که ۶-shogaol فعالیت ضدتوموری بهتری نسبت به ۶-gingerol دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر ۶-shogaol بر میزان جذب گلوکز و بقای سلول‌های توموری با ارزیابی تولید ROS و برخی سرکوب‌کننده‌های مسیرهای بقای سلولی بود. به‌طور کلی در این مطالعه پی بردند که ۶-shogaol هنگامی که روی سلول‌های توموری HT1080 و یا فیبروبلاست به کار می‌رود دارای اثرات مختلفی می‌باشد. براثر درمان با ۶-shogaol بقای HT1080 با افزایش ROS کاهش یافت؛ در صورتی‌که هیچ تغییر معناداری در فیبروبلاست‌ها رویت نشد. حدس زده می‌شود که ۶-shogaol در مدل توموری HT1080 با افزایش تولید ROS، فعال‌سازی Akt/mTOR و کاهش جذب گلوکز، باعث پیری زودرس می‌شود. همه‌ی این عوامل در کنار هم سبب می‌شود که سلول بسیار به القای آپوپتوز حساس شود (۱۶). همچنین مطالعات انجام شده نشان داده اند که فیکوسیانین از سه طریق القای آپاپتوز سرطانی، مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و مهار رگزایی قادر به مهار سرطان است. لذا انتظار می‌رود که با توجه به این ویژگی ها، فیکوسیانین، قادر به مهار رگزایی و تکثیر سلول‌های سرطانی در سرطان ملانوما نیز باشد. در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای در کشور کُره توسط هنسو و همکارانش روی اثر فیکوسیانین علیه سلول‌های سرطانی پستان در شرایط آزمایشگاهی مطالعه‌ای انجام شد. در این تحقیق از سیستم LLTI که دارای ایمنی بیشتری نسبت به سایر سیستم‌های لیزری می‌باشد، بهره گرفته شد. پس از مطالعه مشخص شد که فیکوسیانین در عدم وجود نور باعث سمیت سلولی نمی‌شود که همین باعث شده تا در صنایع غذایی از آن استفاده شود. برای بررسی انتقال اکسیژن از دو تست SOSG و DOBF استفاده شد. در آزمایش SOSG انتشار فلورسانس سبز رنگ بر واکنش با رادیکال‌های اکسیژن اندازه‌گیری شد؛ همچنین از روش DPBF برای تایید نتیجه‌ی SOSG در تولید اکسیژن بهره گرفته شد. هنگامی که فیکوسیانین تحت تابش لیزر ۶۲۵ نانومتر قرار گرفت، باعث القای ROS و در نتیجه مرگ وابسته به دوز سلول‌های سرطان سینه‌ی MDA-MB-231 شد که نرخ مرگ سلولی آن نسبت به سلول‌های طبیعی کلیه‌ی جنین بیشتر بود. با رنگ‌آمیزی فلورسنت سلول‌های درمان‌شده با لیزر به تحقیق درخصوص چگونگی آپوپتوز سلول از جمله کوچک‌شدن خود سلول، چگالش سیتوپلاسمی، تغییرات هسته‌ی سلول و چگونگی تغییر ساختار کلی در آپوپتوز پرداخته شد. به‌صورت نتیجه‌ی کلی پی برده شد که فیکوسیانین یک رنگ‌دانه‌ی فلورسنت غیرسمی است که می‌تواند در درمان با نور کم استفاده شود (۱۷).

سرطان سینه‌ی سه‌گانه‌ی منفی یک چالش مهم بالینی می‌باشد چرا که این نوع از سرطان به درمان‌های معمولی غدد درون‌ریز و سایر عوامل درمانی روتین پاسخ نمی‌دهد. مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ در کشور هند روی کارآیی ضد بدخیمی فیکوسیانین، در محیط کشت یک‌سری از رده‌های سلولی سرطان پستان انجام شد. در واقع در این طرح به بررسی اثر فیکوسیانین بر القای مرگ DNA از طریق وسترن‌بلات و qPCR پرداخته‌شد. همچنین درباره‌ی خواص ضدمتاستاز و ضد رگ‌زایی این ماده نیز تحقیق شد.

پس از انجام پژوهش مشخص شد که سلول‌های سه‌گانه‌ی منفی در مقایسه با سایر سلول‌ها به فیکوسیانین حساس‌تر هستند. در هنگام تیمار با فیکوسیانین تکثیرسلولی و همچنین توانایی تشکیل کلنی سلول‌ها کاهش یافت. با تجزیه و تحلیل چرخه‌ی سلولی پی برده شد فیکوسیانین با توقف مرحله‌ی G_1 چرخه سلولی باعث کاهش سطح mRNA و افزایش

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

سطح p21 می‌شود. مطالعات نشان دادند که فیکوسیانین با افزایش سطح γ-H2AX و تغییر نسبت Bcl2/Bax و در ادامه‌ی آن آزادسازی سیتوکروم C و افزایش سطح Caspase 9 باعث القای آپوپتوز می‌شود. با جمع‌بندی این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که فیکوسیانین می‌تواند یک ترکیب امیدوارکننده در درمان سلول‌های سرطان سه‌گانه‌ی منفی پستان باشد (۱۸).

در مطالعه‌ی انجام یافته توسط مطلب و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد به بررسی بیان ژن iNOS در بیماران مبتلا به سرطان مری با استفاده از روش Reverse Transcriptase Real-Time پرداختند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین بیان ژن iNOS در دو گروه بیمار و کنترل وجود نداشت ولی در گروه بیمار بیان ژن iNOS افزایش یافته بود. از سوی دیگر اختلاف معنی‌داری بین بیان ژن iNOS بین مردان و زنان در دو گروه بیمار و سالم وجود داشت و در زنان نسبت به مردان بیشتر بود. مطالعات بیشتر نیاز دارد در حجم نمونه بزرگتر و جمعیت‌های دیگر برای تایید این یافته انجام گیرد (۱۹).

نتایج این تحقیق نشان داد بیان ژن iNOS در سلولهای تیمار شده با فیکوسیانین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به میزان قابل توجهی افزایش یافته و میتوان نتیجه گرفت فیکوسیانین میتواند در غلظت بالای ۲۵۰ میکروگرم بر میلی گرم میتواند در القا اثرات ضد سرطانی موثر باشد. به نظر می رسد که فیکوسیانین از سه طریق القای آپاپتوز سرطانی، مهار تکثیر سلول های سرطانی و مهار رگزایی قادر به مهار سرطان است گر چه بررسی مکانیسم دقیق اثر به مطالعات بیشتری نیاز دارد. از محدودیتهای پژوهش حاضر می‌توان اشاره کرد که اگر چه بررسی مسیرهای مولکولی کمک شایانی به تایید نتایج حاصل از پژوهش می نماید، لیکن به دلیل محدودیت امکانات قادر به بررسی این مسیرها نبودیم. لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی برای شناخت مسیرهای سیگنالینگ برای روشن شدن این موضوع انجام شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل کار تحقیقاتی پایان نامه داروسازی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1399.254 می باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله از آقای دکتر عسکری بخاطر کمک شایانی که در به ثمر نشستن این تحقیق نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. Cancer J Clin. 2010;60(5):277-300.
2. Harati K, Slodnik P, Chromik AM, Behr B, Goertz O, Hirsch T, et al. Pro-apoptotic effects of pycnogenol on HT1080 human fibrosarcoma cells. Int J Oncol. 2015;46(4):1629-1636.
3. Chakdar H, Pabbi S. Extraction and purification of phycoerythrin from Anabaena variabilis (CCC421). Phykos. 2012;42(1):25-31.
4. Li B, Chu X, Gao M, Li W. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. Acta Biochim Biophys Sin. 2010;42(1):80-89.
5. Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. J Appl Phycol. 2008;20(2):113-136.
6. Vonshak A, ed. Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology. CRC Press. 1997.
7. Pankaj PP, Seth RK, Mallick N, Biswas S. Isolation and purification of C-Phycocyanin from Nostoc Muscorum (Cyanophyceae and cyanobacteria) exhibits antimalarial activity in vitro. J Advance Lab Res Bio. 2010;1(2):86-91.
8. Buchweitz M. Natural solutions for blue colors in food. In Handbook on natural pigments in food and beverages (pp. 355-384). Woodhead Publishing. 2016.
9. Romay CH, Armesto J, Remirez D, Gonzalez R, Ledon N, Garcia I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. Inflammation research, 198;47(1):36-41.
10. Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. Apoptosis, 2004;9(6):691-704.
11. DeRosa F, Keefer LK, Hrabie JA. Nitric oxide reacts with methoxide. J Organ Chem. 2008;73(3):1139-1142.
12. Astier J, Gross I, Durner J. Nitric oxide production in plants: an update. J Experim Botany. 2018;69(14):3401-3411.
13. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. Proceed Natl Acad Sci. 2018;115(23):5839-5848.
14. Ying L, Hofseth LJ. An emerging role for

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]

endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. Cancer Res. 2007;67(4):1407-1410.
15. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. Free Rad Biol Med. 2003;34(8):955-968.
16. Romero-Arias AC, Sequeda-Castañeda LG, Aristizábal-Pachón AF, Morales L. Effect of 6-Shogaol on the Glucose Uptake and Survival of HT1080 fibrosarcoma cells. Pharmaceuticals. 2019;12(3):131.
17. Bharathiraja S, Seo H, Manivasagan P, Santha Moorthy M, Park S, Oh J. In vitro photodynamic effect of phycocyanin against breast cancer cells. Molecules. 2016;21(11):1470.
18. Ravi M, Tentu S, Baskar G, Prasad SR, Raghavan S, Jayaprakash P, et al. Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. BMC Cancer. 2015;15(1):768.
19. Motalleb G, Sancholi S, Yegane Moghadam A, Talaee R. P53 gene expression evaluation in patients with esophageal cancer using reverse transcriptase real time polymerase chain reaction. Pajoohandeh J. 2015;20(3):154-162.
20. Maksouri F, Sepehri H, Dolphi L. Effect of Pectin Substances on NO Release and Apoptosis Induction in Human Prostate Cancer cells LnCap. 2016;29(4):480-492. [Persian]
21. Ebrahimi M, Sadeghizadeh M, Noori Dalooei MR. Expression of stimulated gene iNOS by H_2O_2 in endotelial cells. Sience J Isal Repub Iran. 2011;13(1).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-31]