Archive of SID

Original Article

Cytotoxicity Effect and Changes in the Expression of Caspase-9 Gene in Breast Cancer Cell Line (MCF-7) Treated with the Extract of Oscillatoria Cyanobacteria

Fatemeh Sayyad Delshadpour[1], Ali Salehzadeh[1*], Seyed Ataollah Sadat Shandiz[2]

[1]Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

[2]Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

[*]Corresponding Author:
Ali Salehzadeh, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Email: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

Received: 29 Oct, 2016

Accepted: 31 Jan, 2017

Abstract

***Background and Objectives*:** Breast cancer is one of the most common cancers in women around the world. Problems, such as treatment failure, drug resistance, heavy costs, other problems associated with the treatment of this type of cancer, have attracted the interest of many researchers to cyanobacteria, since these microorganisms have fewer side-effects compared to chemical drugs. In the present research, the effect of *Oscillatoria* extract was investigated on the viability of MCF7 cell line as well as *caspase-9* gene expression.

***Methods*:** In this experimental study, MCF7 cell lines, were treated with different concentrations of extract of *Oscillatoria* cyanobacteria (0.078, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5, and 10mg/ml) for 24 hours. The effect of the extract on cell viability was assessed using MTT assay. Then, RNA extraction was carried out, and after synthesis of cDNA, real time PCR was performed to assess the expression rate of *caspase-9* gene.

***Results*:** With increasing the concentration of the extract, cell viability significantly decreased compared to the control sample. Real time PCR results also showed that the expression of *caspase-9* gene increased by 5.59 ± 0.83 ($p<0.001$) compared to the control sample in 24 hours.

***Conclusion*:** *Oscillatoria* extract can destroy cancer MCF-7 cells, which can be due to the increase in *caspase-9* gene expression.

Keywords: Breast cancer; Gene expression; *Oscillatoria.*

www.SID.ir

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره اول، فروردین ۹۷
صفحه ۲۶ الی ۳۴

Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثر سمّیت و تغییرات بیان ژن *CASPASE-9* در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) تیمارشده با عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا

فاطمه صیاد دلشادپور[۱]، علی صالح‌زاده[۱*]، سیدعطاالله سادات شاندیز[۲]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان در سراسر جهان به شمار می‌رود. وجود مشکلاتی نظیر شکست درمان، مقاومت در برابر دارو، سنگینی هزینه‌ها و دیگر مشکلات مرتبط با درمان این نوع سرطان، باعث شده تا سیانوباکتری‌ها علاقه بسیاری از محققان را به خود جلب کنند؛ زیرا این میکروارگانیسم‌ها عوارض جانبی کمتری در مقایسه با داروهای شیمیایی دارند. در پژوهش حاضر، اثر عصاره اسیلاتوریا (*Oscillatoria*) بر میزان بقای رده سلولی MCF-7 و بیان ژن کاسپاز- ۹ بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، سلول‌های رده سرطانی MCF-7 با غلظت‌های مختلف عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا (۰/۰۷۸، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. تأثیر عصاره بر میزان بقای سلولی با استفاده از تست MTT ارزیابی شد. در ادامه، استخراج RNA انجام گرفت و پس از ساخت cDNA، برای سنجش میزان بیان ژن کاسپاز - ۹، از روش Real Time PCR استفاده شد.

یافته‌ها: با افزایش غلظت عصاره، میزان زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت. همچنین نتایج Real Time PCR نشان داد بیان ژن کاسپاز - ۹ در زمان ۲۴ ساعت، به میزان ۰/۸۳±۵/۹۵ نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته است ($p<0/001$).

نتیجه‌گیری: عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی MCF-7 بوده که این امر می‌تواند ناشی از افزایش بیان ژن کاسپاز- ۹ نسبت به نمونه کنترل باشد.

کلید واژه‌ها: سرطان پستان؛ بیان ژن؛ اسیلاتوریا.

[۱]گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

[۲]گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
علی صالح‌زاده، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
salehzadeh@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۵/۸/۷

تاریخ پذیرش:۹۵/۱۱/۱۱

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Sayyad Delshadpour F, Salehzadeh A, Sadat Shandiz SA. Cytotoxicity effect and changes in the expression of Caspase-9 gene in breast cancer cell line (MCF-7) treated with the extract of oscillatoria cyanobacteria. Qom Univ Med Sci J 2018;12(1):26-34. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

مقدمه

سرطان پستان، یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها به‌شمار می‌رود که هرساله باعث مرگ‌ومیر زیادی در بین زنان می‌شود (۱). باوجود پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زودهنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته، کماکان به‌عنوان مهم‌ترین دلیل مرگ در زنان مطرح است (۴-۲). هرچند که شیوع سالانه بدخیمی سرطان پستان در دنیا رو به افزایش است؛ با این حال میزان شیوع آن در کشورهای دنیا، متفاوت گزارش شده است (۶،۵).

مطالعات انجام‌شده در کشور نشان می‌دهد سرطان پستان به‌عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی مطرح بوده و اطلاعات موجود از افزایش شیوع این بدخیمی طی دو دهه گذشته حکایت دارد (۷). ازجمله راهکارهای درمانی سرطان پستان می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد (۸)؛ باوجود این واقعیت که بسیاری از تومورها ابتدا به شیمی‌درمانی پاسخ می‌دهند، اما سلول‌های سرطان پستان می‌توانند پس از آن زنده مانده و به درمان مقاوم شوند (۱۰،۹). آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) که در پاسخ به عوامل تنش‌زای گوناگون مانند عوامل فیزیولوژیک، پاتولوژیک یا محرک‌های سیتولوژیک در بدن رخ می‌دهد (۱۱)؛ نقش اساسی و مهمی در کنترل فیزیولوژی بدن و بسیاری از شرایط پاتولوژیک ایفا می‌کند. مقاومت به آپوپتوز از نشانه‌های سرطان بوده و کاهش حساسیت به آپوپتوز منجر به افزایش آستانه درمانی برای موارد کلاسیکی مانند شیمی‌درمانی و رادیوتراپی می‌شود (۱۲). بنابراین، بیشتر مطالعات سال‌های اخیر در جهت یافتن داروهای ضدسرطانی انجام شده تا بتوانند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کنند. پپتیدهای کشف‌شده از موجودات دریایی موجب تحریک مرگ سلولی با مکانیسم‌های مختلفی ازجمله آپوپتوز، تأثیر بر توازن توبولین - میکروتوبول (ضدمیکروتوبول)، مهار رگزایی، ضدتکثیر و سیتوتوکسیک می‌شوند (۱۳). عصاره‌گیری گسترده سیانوباکتری‌ها مشخص کرده است تعدادی از گونه‌ها قادر به سنتز ترکیبات ثانویه متنوعی با فعالیت‌های زیستی هستند. سیانوباکتری‌ها، منبعی از متابولیت‌های فعال زیستی بوده که می‌توانند ترکیبات خود را در محیط‌کشت سنتز کنند و به‌همین دلیل مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. همچنین آن‌ها قادر به سنتز و تجمع مولکول‌های پیچیده‌ای هستند که ممکن است سنتزشان را از طریق فعالیت‌های شیمیایی دشوار سازد (۱۴). دانشمندان دریافتند که متابولیت‌های ثانویه عمدتاً در اعضای اسیلاتوریال (۴۹٪)، و پس از آن در نوستوکال (۲۶٪)، کروکوکال (۱۶٪)، پلوروکاپسال (۶٪) و استیگونماتال (۴٪) وجود دارند. سیانوباکتری‌ها انواع ترکیبات با ارزش زیاد مانند کارتنوئیدها، اسیدهای چرب، لیپوپپتیدها، پلی‌ساکاریدها و سایر ترکیبات زیست فعال را تولید می‌کنند. ازجمله استفاده‌هایی که در علم داروسازی و پزشکی می‌توان از سیانوباکتری‌ها کرد، به کارگیری آن‌ها به‌عنوان داروهای مختلف ضدسرطان، ضدویروس، ضدقارچ، آنتی‌پلاسمودیال، ایمنی، سیتوتوکسین، مهار آنزیمی و غیره می‌باشد (۱۵). با توجه به اینکه یکی از مکانیسم‌های عملکردی داروهای ضدسرطان، القای آپوپتوز است، در پژوهش حاضر بیان ژن *Caspase9* (ازجمله ژن‌های القاکننده مسیر آپوپتوز) به‌وسیله عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بررسی شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ابتدا باکتری استوک سیانوباکتری اسیلاتوریا، از آزمایشگاه بخش فیزیولوژی گیاهی دانشگاه گیلان تهیه گردید و در محیط زاندر منفی (سیگما، آلمان) کشت داده شد. جهت رشد بهتر، نمونه‌ها در اتاقکی با دمای ۲۶ درجه سانتیگراد و شدت نوری ۶۰ میکرومول فوتون برمترمربع در ثانیه (با دوره نوری ۱۲ ساعت نوری، ۱۲ ساعت تاریکی و هوادهی ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه) قرار گرفتند. سپس محیط کشت از کاغذ صافی واتمن با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و مخلوط صاف‌شده لیوفیلیزه گردید. برای تهیه عصاره، ۳ گرم پودر خشک‌شده سیانوباکتری با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰٪ (سیگما، آلمان) مخلوط و روی شیکر انکوباتور (Memmert، آلمان) قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت، مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف‌شده در دستگاه روتاری (مدل RE301A-W، Memmert، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

تغلیظ شود، سپس در آون (Memmert، آلمان) با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد خشک شد. رده سلولی سرطانی آدنوکارسینومای پستان MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌هادر محیط‌کشت $RPMI_{1640}$ حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی FBS (Fetal Bovine Serum) و ۵۰۰ واحد برمیلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با دی‌اکسیدکربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪، کشت داده شدند.

به‌منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی عصاره سیانوباکتری از تست رنگ‌سنجی MTT -3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- [Diphenyltetrazolium Bromide)] استفاده شد. این روش براساس توانایی سلول زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فرمازان نامحلول است. ابتدا میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی، حاوی ۱۰۰۰۰ سلول به همراه محیط کشت $RPMI_{1640}$، حاوی ۱۰٪ سرم FBS در هرکدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کاشته شد. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت، محیط کشت رویی برداشته شد و عصاره سیانوباکتری در غلظت‌های مختلف ۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۵، ۵، ۱۰ به‌صورت ۳ بار تکرار به‌مدت ۲۴ ساعت اضافه گردید. همچنین گروه کنترل شامل: چاهک‌های حاوی سلول‌های بدون تیمار با عصاره در نظر گرفته شد، سپس مقدار ۰/۲ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و به‌مدت ۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. به‌منظور حل کردن بلورهای فورمازون (شاخص مولکولی سلول‌های زنده)، میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هرکدام از چاهک‌ها افزوده شد و در طول موج ۵۹۰ نانومتر با دستگاه قرائت‌خوان الایزا خوانده شد. با استفاده از فرمول زیر:

۱۰۰×(جذب نوری سلول‌های کنترل/جذب نوری سلول‌های تیمارشده)= میزان بقای سلولی

درصد حیات سلول‌ها در غلظت‌های مختلف محاسبه گردید.

به‌منظور استخراج RNA، تعداد ۱×۱۰^{۶} در هر ویال پلیت ۶ خانه‌ای کاشته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور CO_2دار با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تیمار با غلظت IC50 عصاره انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت، استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناژن، ایران) طبق دستور شرکت سازنده انجام گرفت. جهت جداسازی RNA از کلروفوم، ایزوپروپانول و برای شست‌وشوی، از اتانول ۷۵٪ استفاده شد. غلظت RNA به‌وسیله دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH, Germany) تعیین گردید.

ساخت cDNA از RNAهای استخراج‌شده به‌وسیله کیت Stepes RT-PCR-۲ (ساخت شرکت Vivantis) انجام گرفت.

توالی پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژن کاسپاز - ۹، همچنین ژن *β-actin* به‌عنوان کنترل داخلی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی (۳'-۵')
***Caspase9* F**	5' TGGTTCATCCAGTCGCTTG'3
***Caspase9* R**	5' ATTCTGTTGCCACCTTTCG'3
***β-actin* F**	5' TCCTCCTGAGCGCAAGTAC'3
***β-actin* R**	5' CCTGCTTGCTGATCCACATCT'3

بررسی میزان بیان ژن‌های موردنظر با استفاده از روش کمّیت‌سنجی Real-Time PCR انجام گرفت. محلول واکنش Real-Time PCR شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه فاقد نوکلئاز بود. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن شامل: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، به‌مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل: واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، به‌مدت ۲۰ ثانیه؛ اتصال پرایمرها به DNA الگو ۶۲ درجه سانتیگراد، به‌مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه سانتیگراد، به‌مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر، داده‌های خام به‌صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج گردید. در پایان، برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیرشده، از روش مقایسه میزان تغییرات سطح آستانه هر ژن (Ct) با میزان آن در نمونه شاهد ($\Delta\Delta Ct$) استفاده شد.

اطلاعات به‌دست‌آمده به‌صورت Mean±SD ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، آزمون واریانس یک‌طرفه و روش آماری post-hoc test Tukey's HSD (جهت تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمارشده) تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

یافته‌ها

میانگین مقایسه درصد بقای رده سلولی MCF-7 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره *Oscillatoria* با روش رنگ‌سنجی نشان داد افزایش غلظت عصاره اسیلاتوریا، سبب کاهش بقای سلول‌ها می‌شود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: میانگین توان زیستی سلول رده MCF-7 با عصاره اسیلاتوریا در مدت زمان ۲۴ ساعت با روش MTT

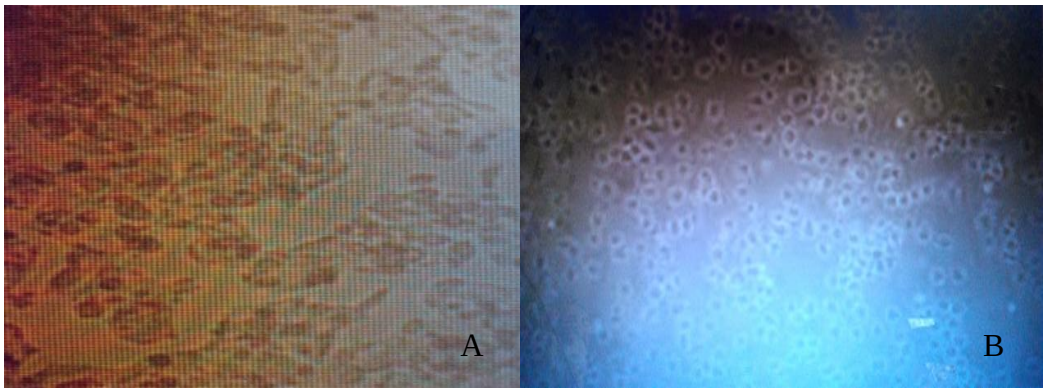
زمان	۰/۰۷۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	۰/۱۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	۰/۳ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	۰/۶ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	۱/۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	۲/۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر	۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر
۲۴ ساعت	۸۲/۶±۰/۳۴	*۶۸/۶±۰/۶۴	**۵۴± ۰/۲۵۶	**۴۸/۵± ۰/۵۲	**۴۳/۲± ۰/۳۵	***۳۴/۷±۰/۳۳۵	***۲۸/۵±۰/۳۷	***۱۵/۲±۰/۲۳۵

مقادیر به‌دست‌آمده به‌صورت Mean±SD می‌باشد

تفاوت میانگین‌ها در سطح p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شده و نتایج به‌صورت درصد بقا با ۳ بار تکرار در مقایسه با نمونه کنترل گزارش شده است (*:p<۰/۰۵، **:p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۱: n=3).

عصاره اسیلاتوریا در غلظت ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر، بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشت و نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱)، درحالی‌که غلظت ۰/۰۷۸ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری نشان نداد (p=۰/۹۹).

مهار وابسته به غلظت رشد سلولی به‌وسیله عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا از نظر میزان IC_{50} مورد بررسی قرار گرفت. میزان IC_{50} در مهار رشد سلولی در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار به مقدار ۰/۴۳۲±۰/۳۲۴ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱). با توجه به مشاهده سلول‌های تیمارشده (شکل A) و مقایسه مورفولوژی آن‌ها با سلول‌های بدون تیمار (شکل B)، تفاوت مورفولوژی قابل رؤیت بود. در شکل A-۱ به‌خوبی کاهش حجم، متراکم شدن و تغییر شکل دیواره (از نشانه‌های آپوپتوز) قابل‌مشاهده است.



شکل: مقایسه مورفولوژی سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمارشده.

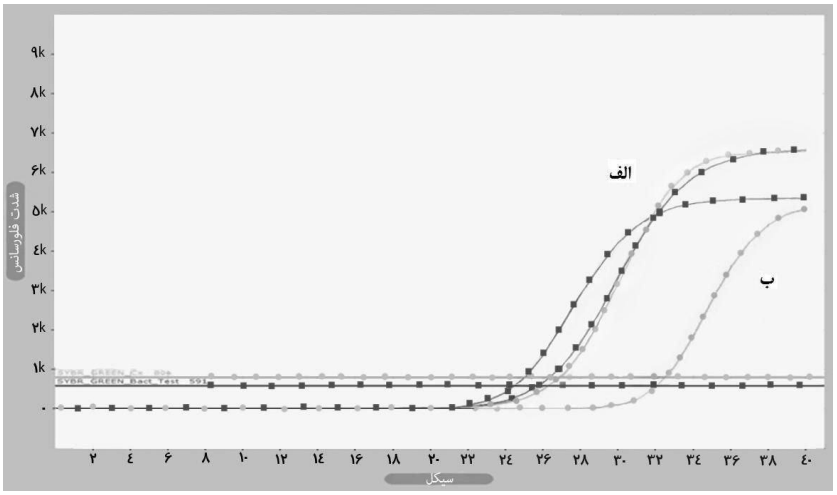
A) سلول‌های تیمارشده MCF-7، در غلظت IC_{50} عصاره به مقدار ۰/۴۳۲ ±۰/۳۲۴ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر؛ B) سلول‌های کنترل MCF-7 بدون تیمار.

پس از سنتز cDNA، واکنش Real time PCR با پرایمرهای مربوط به ژن‌های کاسپاز - ۹ و بتا اکتین صورت گرفت که در نمودار شماره ۱، تکثیر ژن‌های *Casp9* و *β- actin* در سلول‌های تیمارشده و تیمارنشده با عصاره اسیلاتوریا در واکنش Real time PCR نشان داده شده است.

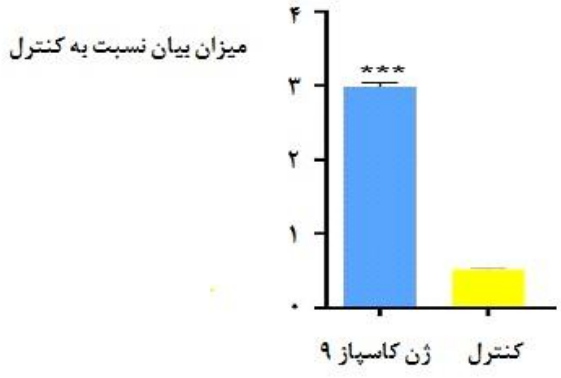
در نتایج بررسی بیان ژن مشاهده گردید نسبت بیان ژن کاسپاز - ۹ به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی MCF-7 تیمارشده با غلظت IC_{50} عصاره (۰/۴۳۲±۰/۳۲۴ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) به میزان ۵/۹۵±۰/۸۳ طی ۲۴ ساعت تغییر یافته است (p>۰/۰۰۱) (نمودار شماره ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره ۱: منحنی تکثیر ژن‌های بتا اکتین (ژن مرجع) و کاسپاز- ۹ تیمارشده با غلظت ۵۰٪ کشندگی عصاره اسیلاتوریا.
الف) در نمونه کنترل، چرخه آستانه ژن‌های بتااکتین و کاسپاز- ۹ به ترتیب ۲۴/۲۵ و ۲۶/۸۲ می‌باشد. چرخه آستانه ژن مرجع بتا اکتین در نمونه تیمارشده با عصاره تقریباً نزدیک به کنترل برابر ۲۵/۷۵ محاسبه شده است.
ب) در نمودار تیمارشده با غلظت IC_{50} عصاره، چرخه آستانه ژن کاسپاز-۹ برابر ۳۲/۱۹ محاسبه شده که نشان‌دهنده افزایش بیان این ژن طی واکنش Real time PCR می‌باشد.



نمودار شماره ۲: بررسی بیان ژن.

نسبت بیان ژن کاسپاز- ۹ به ژن مرجع در رده سلولی MCF-7 تیمارشده در غلظت IC_{50} عصاره به میزان ۰/۸۳±۵/۹۵ طی ۲۴ ساعت افزایش نشان داد. اختلاف چرخه آستانه به‌دست‌آمده از نمونه‌های مورد آزمایش و شاهد، محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$، نسبت ژن هدف به ژن مرجع (از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$) محاسبه گردید. نتایج براساس حداقل ۳ بار تکرار استوار بود ($p<0/05$).

$$\Delta Ct = Ct_{Target} - Ct_{Reference}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Test\ Sample} - \Delta Ct_{Control\ Sample}$$
$$\text{Relative Expression: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ct: چرخه آستانه؛ ΔCt: تفاوت بین چرخه آستانه سلول‌های شاهد و تیمارشده؛ $\Delta\Delta Ct$: تفاوت بین ΔCtهای سلول‌های شاهد و تیمارشده.

بحث

امروزه، سرطان به‌عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر، به یکی از بزرگترین چالش‌های علوم پزشکی و دارویی در جهان در حال توسعه تبدیل شده است. لذا محیط زیست دریایی به‌عنوان یک منبع غنی از فرآورده‌های طبیعی با کاربردهای درمانی گسترده، مورد توجه است. بسیاری از پپتیدهای زیست فعال و دی‌پپتیدهای با توانایی و پتانسیل ضدسرطانی، از موجودات دریایی مختلف نظیر تونیکات‌ها، اسفنج‌ها، نرم‌تنان و دیگر ارگانیسم‌های دریایی مانند سیانوباکتری‌ها استخراج شده که قادر به تولید ترکیبات پیچیده ضدتوموری بوده و به مراتب، مؤثرتر از ترکیبات موجود می‌باشند. برخی از این پپتیدهای دریایی تحت مراحل مختلف کارآزمایی‌های بالینی قرار دارند.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

همچنین آن‌ها، متابولیت‌های ثانویه حاصل از این موجودات هستند.

امروزه، وجود مشکلاتی نظیر شکست درمان، مقاومت در برابر دارو، سنگینی هزینه‌ها و دیگر مشکلات مرتبط با درمان سرطان باعث شده تا یافتن ترکیبات طبیعی از ارگانیسم‌های دریایی، به‌ویژه سیانوباکتری‌ها مورد توجه قرار گیرد. مطالعات نشان می‌دهد سیانوباکتری‌ها دارای اقدامات پیشگیرانه یا ضدسرطانی از طریق فعال کردن آپوپتوز می‌باشند (۱۶).

در مطالعه حاضر، نتایج مورفولوژی رده سلولی MCF-7 نشان داد عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا، تغییرات قابل‌توجهی در مقایسه با سلول‌های کنترل (فاقد عصاره) در خصوصیات مورفولوژی سلول‌ها ایجاد کرده است. همچنین در نتایج بررسی زنده ماندن سلول‌ها مشاهده گردید پس از ۲۴ ساعت، کاهش زنده ماندن سلول تحت تأثیر اسیلاتوریا رخ می‌دهد. در واقع، بین غلظت‌های مختلف عصاره در این زمان، اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

Nair و همکاران با بررسی فعالیت ضدسرطانی عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria Spp.* علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) نشان دادند طی مدت ۲۴ ساعت به ترتیب با افزایش غلظت‌ها، بقای سلول‌ها کاهش یافته و در غلظت ۱ میکروگرم برمیلی‌لیتر، بیشترین مهار تکثیر سلولی قابل‌مشاهده است، همچنین آن‌ها بیان کردند حضور ترکیبات فعال زیستی موجود در عصاره خام سیانوباکتری‌ها منجر به فعالیت ضدسرطانی علیه سرطان پستان می‌شود (۱۷). احمدزاده نیز با مطالعه بر روی سیانوباکتری *Sargassum* متوجه شد این سیانوباکتری به دلیل داشتن اثر سیتوتوکسیک (با غلظت ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) توانسته سلول‌های سرطانی ریه را از بین ببرد (۱۸)، که یافته‌های این محققان با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت.

در مطالعه کیادری و همکاران با بررسی سیانوباکتری گونه‌های *Oscillatoria sp.* بر روی رده سرطانی دهانه رحم در انسان، IC_{50} مربوط به جلبک‌های *Oscillatoria* و *L. officinalis* به‌ترتیب ۰/۲۲۰ و ۰/۲۶۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به دست آمد (۱۹). همچنین Mukund و همکاران به بررسی اثرات سمّیت عصاره *Oscillatoria terebriformis* با غلظت‌های مختلف به‌مدت ۴۸ ساعت با استفاده از روش MTT پرداختند، نتایج آن‌ها نشان داد میانگین مقدار IC_{50} عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* بر روی رده سلولی سرطان ریه A549، به ترتیب ۱۴/۶۷±۰/۹۸۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر می‌باشد. بنابراین، مشخص گردید عصاره سیانوباکتری به‌طور قابل‌توجهی باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۰). در مطالعه حاضر، محاسبه میزان IC_{50} مربوط به عصاره اسیلاتوریا در زمان ۲۴ ساعت برابر ۰/۳۲۴±۰/۴۳۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر ($p<0/001$) به دست آمد که در مقایسه با گروه کنترل، معنی‌دار بود. یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر با نتایج محققان فوق مطابقت داشت که وجود اختلاف ناچیز را می‌توان به نوع عصاره‌های انتخاب‌شده و غلظت آن‌ها به‌عنوان عامل تأثیرگذار در نتیجه مهار در سرطان دانست.

در همین زمینه Wang و همکاران، با بررسی تأثیرات مهارکنندگی فیکوسیانین سیانوباکتری بر تکثیر سلول‌های سرطانی و نیز القای آپوپتوز در رده سلولی سرطانی ناحیه سر و گردن، مشاهده کردند فیکوسیانین از طریق القای دپلیمریزاسیون و فعال‌کردن کاسپازها در مسیرهای بیرونی سیستم آپوپتوز، باعث مرگ سلول‌ها می‌شود (۲۱). Oftedal و همکاران (سال ۲۰۱۰) نیز عنوان کردند القای آپوپتوز به‌وسیله عصاره‌های سیانوباکتری‌های موجود در اعماق دریا تا حدی وابسته به کاسپازها می‌باشد (۲۲). همچنین در تحقیق حاضر، بررسی بیان ژن با استفاده از Real Time PCR نشان داد که بیان ژن کاسپاز- ۹ پس از ۲۴ ساعت تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل افزایش می‌یابد. بنابراین، می‌توان گفت اثرات سیتوتوکسیک عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا می‌تواند از طریق تنظیم بیان ژن کاسپاز- ۹ اعمال گردد و خاصیت القای مرگ سلولی و افزایش بیان ژن کاسپاز- ۹ نیز به‌دلیل وجود ترکیبات خاص در سیانوباکتری اسیلاتوریا می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام‌شده نشان داد عصاره سیانوباکتری دارای اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک است. ضمن اینکه شروع اثر و شدت اثر بین رده‌های مختلف سلولی در سرطان‌های مختلف، متفاوت است.

www.SID.ir

Archive of SID

برای توجیه اثرات ضدسرطانی عصاره سیانوباکتری‌ها، مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد شده که بخشی از آن مربوط به تأثیر بر فعالیت آنزیم‌ها، مهار تکثیر سلولی، تغییر میزان گلوتاتیون سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، همچنین القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد در میان این مکانیسم‌ها، القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی از مهم‌ترین مکانیسم‌های اثر در فعالیت ضدسرطانی عصاره سیانوباکتری‌ها می‌باشد.

در پایان، با توجه به نتایج مطالعه حاضر و سایر تحقیقات مرتبط، پیشنهاد می‌گردد ترکیبات سیانوباکتری اسیلاتوریا در جهت مصرف منطقی به‌عنوان کمک درمانی انواع سرطان مورد استفاده قرار گیرد. همچنین بررسی بیان دیگر ژن‌های مسیر آپوپتوز، شناخت بیشتر مکانیسم اثر، مطالعه بر روی غلظت‌های عصاره و دفعات مصرف نیز در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

References:

1. Hussein Zadegan H, Ezat Pour B, Abdollah Pour F, Motamedi M, Rashidi Pour M. Study of cytotoxic activity of olive and green tea extracts on breast tumor cell line. J Ardabil Univ Med Sci 2010;10(4):287-94. [Full Text in Persian]

2. Moheghi N, Afshari JT, Brook A. The cytotoxic effect of zingiber afficinale in breast cancer (MCF7) cell line. J Ofogh Danesh 2011;17(3):28-34. [Full Text in Persian]

3. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genetics in medicine. Translated by: Ghofrani M, Habibi I. Tehran: Farda Pub; 2009. [Text in Persian]

4. Liu CY, Hung MH, Wang DS, Chu PY, Su JC, Teng TH, et al. Amoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A–dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor–negative human breast cancer cells. Breast Cancer Res 2014;16(5):431.

5. Farooq S, Coleman MP. Breast cancer survival in South Asian women in England and Wales. J Epidemiol Community Health 2005;59(5): 402–6.

6. Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. BMC Cancer 2002;2:37.

7. Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni SM, Montazeri A, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: Downstaging without a formal screening program Ann Oncol 2011;22(1):93-7.

8. Guo J, Bourre L, Declan M, Soden M, Gerald CO, Driscoll C. Can non-viral technologies knockdown the barriers to sirna delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? Biotechnol Adv 2011;29(4):402-17.

9. Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC, et al. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by Antrodia camphorate. Cancer Lett 2006;231(2):215-27.

10. Motaghed M, Al-Hassan FM, Hamid SS. Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF7. Pharmacognosy Res 2013;5(3):200-6.

11. Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: Programmed cell death**.** J Qazin Univ Med Sci 2013;17(3):48-57. [Full Text in Persian]

12. Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemo resistance. Oncogene 2002;21(57):8843-51.

13. Glenn K. Venoms to drugs: Translating venom peptides into therapeutics. Aust Biochem 2013;44(3):13-16.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Victory KJ. Isolation and characterization of antimicrobial compounds synthesized by Microcystis SP. [Phd Thesis]. School of Chemical Engineering, Faculty of engineering. Computer and mathematica sciences, The University of Adelaide Australia; 2008.

15. Oftedal L, Skjærven KH, Coyne RT, Edvardsen B, Rohrlack T, Skulberg OM, et al. The apoptosis-inducing activity towards leukemia and lymphoma cells in a cyanobacterial culture collection is not associated with mouse bioassay toxicity. J Ind Microbiol Biotechnol 2011;38(4):489-501.

16. Bajpai R, Sharma NK, Rai AK. Anticancerous/antiviral compounds from cyanobacteria. Algas 2010;43:4–6.

17. Nair S, Bhimba BV. Bioactive potency of Cyanobacteria Oscillatoria SPP. Int J Pharm Pharm Sci 2013;5(2):611-12.

18. Ahmadzade S. Effect of Sargazum oligosystum brown algae (Sargassum oligocystom) extract on inhibition of cancer cells and K562 BLL in Invitro. [MSc Thesis]. Faculty of Medicine. Bushehr University of Medical Sciences; 2009. [Text in Persian]

19. Kyadari M, Fatma T, Velpandian T, Malliga P, Bharat N. Fareha, B. Antiangiogenic and antiproliferative assessment of cyanobacteria. Indian J Exp Biol 2014;52(8):835-42.

20. Mukund S, Sivasubramanian V. Anticancer activity of oscillatoria terebriformis cyanobacteria in human lung cancer cell line A549. Int J Appl Biol Pharm Technol 2014;5:34-45.

21. Wang H, Liu Y, Gao X, Carter Ch, Liu Z. The recombinant b subunit of Cphycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. Cancer Lett 2007;247(1):150-8.

22. Oftedal L, Selheim F, Wahlsten M, Sivonen K, Doskeland SO, Herfindal L. Marine benthic cyanobacteria contain apoptosis-inducing activity synergizing with daunorubicin to kill leukemia cells, but not cardiomyocytes. Mar Drugs 2010;8(10):2659-72.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 11:00 IRDT on Monday April 9th 2018

www.SID.ir