

## ***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<sup>1</sup>, Ali Salehzadeh<sup>1\*</sup>, Seyed Ataollah Sadat Shandiz<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Department of Biology,  
Rasht Branch, Islamic Azad  
University, Rasht, Iran.

<sup>2</sup>Department of Biology,  
Central Tehran Branch,  
Islamic Azad University,  
Tehran, Iran.

\*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  $5.59 \pm 0.83$  ( $p < 0.001$ ) 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*.

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

فاطمه صیاد دلشادپور<sup>۱</sup>، علی صالحزاده<sup>۱\*</sup>، سیدعطاله سادات شاندیز<sup>۲</sup>

### 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 بر میلی‌لیتر) به مدت 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  $5/95 \pm 0/83$  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.

گروه زیست‌شناسی، واحد رشت،  
دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

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 به صورت 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]

**مقدمه**

سرطان پستان، یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها به‌شمار می‌رود که هر ساله باعث مرگ و میر زیادی در بین زنان می‌شود (۱). با وجود پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زودهنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته، کماکان به‌عنوان مهم‌ترین دلیل مرگ در زنان مطرح است (۲-۴). 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 (۵، ۶).

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). از جمله راهکارهای درمانی سرطان پستان می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد (۸)؛ با وجود 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 (۹، ۱۰). 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 از جمله 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 محیط کشت 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 استیگنوماتال (۴٪) وجود دارند. سیانوباکتری‌ها انواع ترکیبات با ارزش زیاد مانند کارتنوئیدها، اسیدهای چرب، لیپوپپتیدها، پلی‌ساکاریدها و سایر ترکیبات زیست‌فعال را تولید می‌کنند. از جمله استفاده‌هایی که در علم داروسازی و پزشکی می‌توان از سیانوباکتری‌ها کرد، به کارگیری آن‌ها به‌عنوان داروهای مختلف ضدسرطان، ضد ویروس، ضد قارچ، 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* (از جمله 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 اسیلاتوریال 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 بر مترمربع 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

از اتانول ۷۵٪ استفاده شد. غلظت RNA به وسیله دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH, Germany) تعیین گردید. ساخت cDNA از RNAهای استخراج شده به وسیله کیت ۲-Stepes RT-PCR (ساخت شرکت Vivantis) انجام گرفت. توالی پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژن کاسپاز - ۹، همچنین ژن  $\beta$ -actin به عنوان کنترل داخلی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی (۳'-۵')
<i>Caspase9 F</i>	5' TGGTTCATCCAGTCGCTTG'3
<i>Caspase9 R</i>	5' ATTCTGTTGCCACCTTTCG'3
<i><math>\beta</math>-actin F</i>	5' TCCTCCTGAGCGCAAGTAC'3
<i><math>\beta</math>-actin R</i>	5' CCTGCTTGCTGATCCACATCT'3

بررسی میزان بیان ژنهای مورد نظر با استفاده از روش کمیّت سنجی 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، به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل: واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۰ ثانیه؛ اتصال پرایمرها به DNA الگو ۶۲ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه سانتیگراد، به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر، داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج گردید. در پایان، برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده، از روش مقایسه میزان تغییرات سطح آستانه هر ژن (Ct) با میزان آن در نمونه شاهد ( $\Delta\Delta Ct$ ) استفاده شد.

اطلاعات به دست آمده به صورت Mean $\pm$ SD ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶، آزمون واریانس یک طرفه و روش آماری post-hoc test Tukey's HSD (جهت تفاوت بیان ژنهای هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده) تحلیل شدند. سطح معنی داری،  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

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. سلول‌ها در محیط کشت RPMI<sub>1640</sub> حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) FBS و ۵۰۰ واحد بر میلی لیتر آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با دی اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪، کشت داده شدند.

به منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی عصاره سیانوباکتری از تست رنگ سنجی MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) استفاده شد. این روش بر اساس 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<sub>1640</sub>، حاوی ۱۰٪ سرم FBS در هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کاشته شد. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت، محیط کشت روی برداشته شد و عصاره سیانوباکتری در غلظت‌های مختلف ۰/۰۷۵، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۵، ۵، ۱۰ به صورت ۳ بار تکرار به مدت 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 میلی گرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. به منظور حل کردن بلورهای فورمازون (شاخص مولکولی سلول‌های زنده)، میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر کدام از چاهک‌ها افزوده شد و در طول موج ۵۹۰ نانومتر با دستگاه قرائت خوان الیزا خوانده شد. با استفاده از فرمول زیر:

$$100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های کنترل} / \text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده}) = \text{میزان بقای سلولی}$$

درصد حیات سلول‌ها در غلظت‌های مختلف محاسبه گردید. به منظور استخراج RNA، تعداد  $1 \times 10^6$  در هر ویال پلیت ۶ خانه‌ای کاشته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تیمار با غلظت IC<sub>50</sub> 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 شست و شوی،

## یافته‌ها

نشان داد افزایش غلظت عصاره اسیلاتوریا، سبب کاهش بقای سلول‌ها می‌شود (جدول شماره ۲).

میانگین مقایسه درصد بقای رده سلولی MCF-7 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره *Oscillatoria* با روش رنگ‌سنجی

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

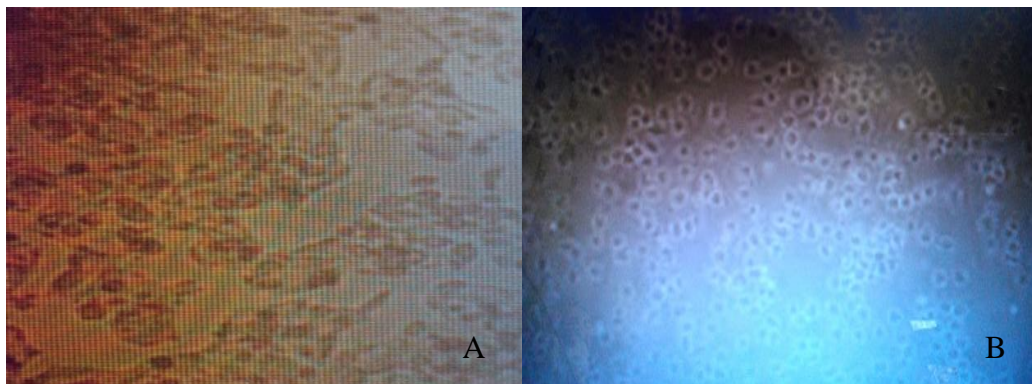
زمان	۰/۰۷۵	۰/۱۵	۰/۳	۰/۶	۱/۲	۲/۵	۵	۱۰
میلی گرم	میلی گرم	میلی گرم	میلی گرم	میلی گرم	میلی گرم	میلی گرم	میلی گرم	میلی گرم
بر میلی لیتر	بر میلی لیتر	بر میلی لیتر	بر میلی لیتر	بر میلی لیتر	بر میلی لیتر	بر میلی لیتر	بر میلی لیتر	بر میلی لیتر
۲۴ ساعت	۸۲/۶±۰/۳۴	*۶۸/۶±۰/۶۴	**۵۴±۰/۲۵۶	**۴۸/۵±۰/۵۲	**۴۳/۲±۰/۳۵	**۳۴/۸±۰/۳۳۵	**۲۸/۵±۰/۳۷	**۱۵/۲±۰/۲۳۵

مقادیر به دست آمده به صورت Mean±SD می‌باشد

تفاوت میانگین‌ها در سطح  $p < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شده و نتایج به صورت درصد بقا با ۳ بار تکرار در مقایسه با نمونه کنترل گزارش شده است ( $n=3$ ;  $p < 0/05$ ;  $p < 0/01$ ;  $p < 0/001$ ).

عصاره اسیلاتوریا در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر، بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشت و نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $p < 0/001$ )، در حالی که غلظت ۰/۰۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $p = 0/99$ ). مهار وابسته به غلظت رشد سلولی به وسیله 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 میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ( $p < 0/001$ ). با توجه به مشاهده سلول‌های تیمار شده (شکل A) و مقایسه مورفولوژی آن‌ها با سلول‌های بدون تیمار (شکل B)، تفاوت مورفولوژی قابل رؤیت بود. در شکل A-۱ به خوبی کاهش حجم، متراکم شدن و تغییر شکل دیواره (از نشانه‌های آپوپتوز) قابل مشاهده است.

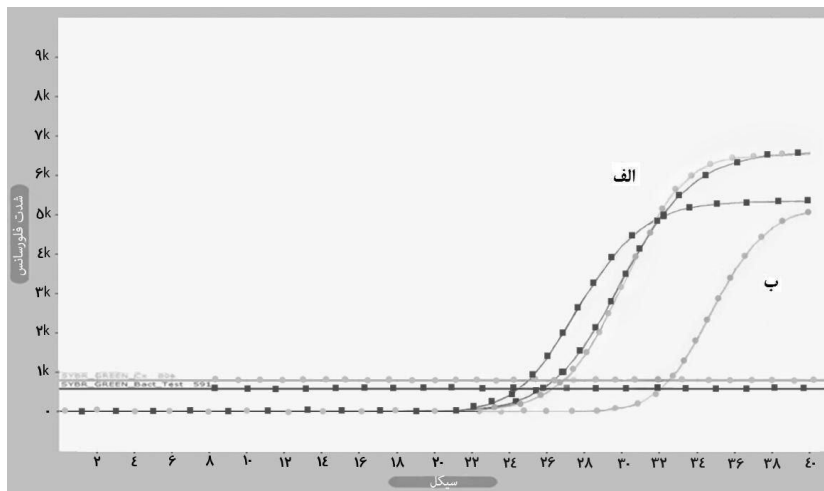


شکل: مقایسه مورفولوژی سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده.

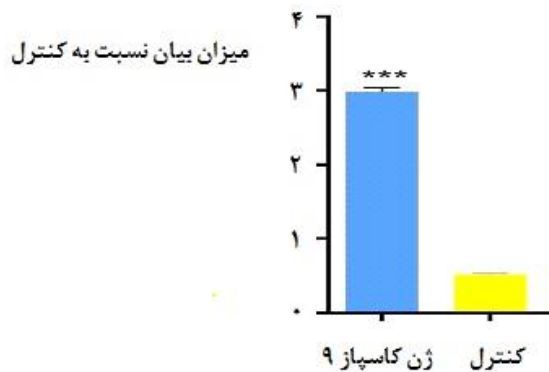
(A) سلول‌های تیمار شده MCF-7، در غلظت  $IC_{50}$  عصاره به مقدار  $0/432 \pm 0/324$  میلی گرم بر میلی لیتر؛ (B) سلول‌های کنترل MCF-7 بدون تیمار.

در نتایج بررسی بیان ژن مشاهده گردید نسبت بیان ژن کاسپاز - ۹ به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی MCF-7 تیمار شده با غلظت  $IC_{50}$  عصاره  $0/432 \pm 0/324$  میلی گرم بر میلی لیتر) به میزان  $5/95 \pm 0/83$  طی ۲۴ ساعت تغییر یافته است ( $p > 0/001$ ) (نمودار شماره ۲).

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  $\beta$ -actin در سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با عصاره اسیلاتوریا در واکنش Real time PCR نشان داده شده است.



نمودار شماره ۱: منحنی تکثیر ژن‌های بتا اکتینین (ژن مرجع) و کاسپاز-۹ تیمار شده با غلظت ۵۰٪ کشندگی عصاره آسیلاتوریا. (الف) در نمونه کنترل، چرخه آستانه ژن‌های بتا اکتینین و کاسپاز-۹ به ترتیب ۲۶/۸۲ و ۲۴/۲۵ می‌باشد. چرخه آستانه ژن مرجع بتا اکتینین در نمونه تیمار شده با عصاره تقریباً نزدیک به کنترل برابر ۲۵/۷۵ محاسبه شده است. (ب) در نمودار تیمار شده 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.

## 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.

نسبت بیان ژن کاسپاز-۹ به ژن مرجع در رده سلولی MCF-7 تیمار شده در غلظت  $IC_{50}$  عصاره به میزان  $5/95 \pm 0/83$  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؛  $\Delta Ct$ : تفاوت بین چرخه آستانه سلول‌های شاهد و تیمار شده؛  $\Delta\Delta Ct$ : تفاوت بین  $\Delta Ct$ ‌های سلول‌های شاهد و تیمار شده.

میانگین مقدار  $IC_{50}$  عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* بر روی رده سلولی سرطان ریه A549، به ترتیب  $14/67 \pm 0/980$  میلی گرم بر میلی لیتر می باشد. بنابراین، مشخص گردید عصاره سیانوباکتری به طور قابل توجهی باعث مهار تکثیر سلول های سرطانی می شود (۲۰). در مطالعه حاضر، محاسبه میزان  $IC_{50}$  مربوط به عصاره اسیلاتوریا در زمان ۲۴ ساعت برابر  $0/432 \pm 0/324$  میلی گرم بر میلی لیتر ( $p < 0/001$ ) به دست آمد که در مقایسه با گروه کنترل، معنی دار بود. یافته های حاصل از پژوهش حاضر با نتایج محققان فوق مطابقت داشت که وجود اختلاف ناچیز را می توان به نوع عصاره های انتخاب شده و غلظت آن ها به عنوان عامل تأثیر گذار در نتیجه مهار در سرطان دانست.

در همین زمینه Wang و همکاران، با بررسی تأثیرات مهارکنندگی فیکوسیانین سیانوباکتری بر تکثیر سلول های سرطانی و نیز القای آپوپتوز در رده سلولی سرطانی ناحیه سر و گردن، مشاهده کردند فیکوسیانین از طریق القای دپلمریزاسیون و فعال کردن کاسپازها در مسیرهای بیرونی سیستم آپوپتوز، باعث مرگ سلول ها می شود (۲۱). Oftedal و همکاران (سال ۲۰۱۰) نیز عنوان کردند القای آپوپتوز به وسیله عصاره های سیانوباکتری های موجود در اعماق دریا تا حدی وابسته به کاسپازها می باشد (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 تحت تأثیر غلظت های مختلف عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان به طور معنی داری نسبت به نمونه کنترل افزایش می یابد. بنابراین، می توان گفت اثرات سیتوتوکسیک عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا می تواند از طریق تنظیم بیان ژن کاسپاز-۹ اعمال گردد و خاصیت القای مرگ سلولی و افزایش بیان ژن کاسپاز-۹ نیز به دلیل وجود ترکیبات خاص در سیانوباکتری اسیلاتوریا می باشد.

### نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام شده نشان داد عصاره سیانوباکتری دارای اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک است. ضمن اینکه شروع اثر و شدت اثر بین رده های مختلف سلولی در سرطان های مختلف، متفاوت است.

همچنین آن ها، متابولیت های ثانویه حاصل از این موجودات هستند.

امروزه، وجود مشکلاتی نظیر شکست درمان، مقاومت در برابر دارو، سنگینی هزینه ها و دیگر مشکلات مرتبط با درمان سرطان باعث شده تا یافتن ترکیبات طبیعی از ارگانسیم های دریایی، به ویژه سیانوباکتری ها مورد توجه قرار گیرد. مطالعات نشان می دهد سیانوباکتری ها دارای اقدامات پیشگیرانه یا ضدسرطانی از طریق فعال کردن آپوپتوز می باشند (۱۶).

در مطالعه حاضر، نتایج مورفولوژی رده سلولی MCF-7 نشان داد عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا، تغییرات قابل توجهی در مقایسه با سلول های کنترل (فاقد عصاره) در خصوصیات مورفولوژی سلول ها ایجاد کرده است. همچنین در نتایج بررسی زنده ماندن سلول ها مشاهده گردید پس از ۲۴ ساعت، کاهش زنده ماندن سلول تحت تأثیر اسیلاتوریا رخ می دهد. در واقع، بین غلظت های مختلف عصاره در این زمان، اختلاف معنی داری 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 غلظت ها، بقای سلول ها کاهش یافته و در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر، بیشترین مهار تکثیر سلولی قابل مشاهده است، همچنین آن ها بیان کردند حضور ترکیبات فعال زیستی موجود در عصاره خام سیانوباکتری ها منجر به فعالیت ضدسرطانی علیه سرطان پستان می شود (۱۷). احمدزاده نیز با مطالعه بر روی سیانوباکتری *Sargassum* متوجه شد این سیانوباکتری به دلیل داشتن اثر سیتوتوکسیک (با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) توانسته سلول های سرطانی ریه را از بین ببرد (۱۸)، که یافته های این محققان با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت.

در مطالعه کیادری و همکاران با بررسی سیانوباکتری گونه های *Oscillatoria sp.* بر روی رده سرطانی دهانه رحم در انسان،

$IC_{50}$  مربوط به جلبک های *Oscillatoria* و *L. officinalis* به ترتیب  $0/220$  و  $0/260$  میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد (۱۹). همچنین Mukund و همکاران به بررسی اثرات سمیت عصاره *Oscillatoria terebriformis* با غلظت های مختلف به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از روش MTT پرداختند، نتایج آن ها نشان داد

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.

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 گلوکوتایون 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.

## References:

- 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]
- Moheghi N, Afshari JT, Brook A. The cytotoxic effect of zingiber officinale in breast cancer (MCF7) cell line. *J Ofogh Danesh* 2011;17(3):28-34. [Full Text in Persian]
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genetics in medicine. Translated by: Ghofrani M, Habibi I. Tehran: Farda Pub; 2009. [Text in Persian]
- 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.
- Farooq S, Coleman MP. Breast cancer survival in South Asian women in England and Wales. *J Epidemiol Community Health* 2005;59(5): 402-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Motaghd 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.
- Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: Programmed cell death. *J Qazin Univ Med Sci* 2013;17(3):48-57. [Full Text in Persian]
- 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.
- Glenn K. Venoms to drugs: Translating venom peptides into therapeutics. *Aust Biochem* 2013;44(3):13-16.



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 oligosystem 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.