



Anti-angiogenesis Effect of C-Phycocyanin of *Spirulina platensis* on B16-F10 Melanoma Tumors in C57BL/6 Mouse

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Dibaei F.¹ MSc,
Fazilati M.¹ PhD,
Moenzadeh F.² PhD,
Kefayat A.H.³ PhD,
Jazayeri N.¹ MSc,
Talebi A.* PhD

How to cite this article

Dibaei F, Fazilati M, Moenzadeh F, Kefayat A H, Jazayeri N, Talebi A. Anti-angiogenesis Effect of C-Phycocyanin of *Spirulina platensis* on B16-F10 Melanoma Tumors in C57BL/6 Mouse. Pathobiology Research. 2018;21(3):141-146.

ABSTRACT

Aims Melanoma is one of the most dangerous forms of skin cancer, which is unresponsive to the current chemotherapy drugs. As a natural product purified from *spirulina*, phycocyanin can inhibit the angiogenesis. The aim of this study was to investigate the anti-angiogenesis effect of C-phycocyanin of *spirulina platensis* on B16-F10 melanoma tumors in C57BL/6 mouse.

Materials & Methods In this experimental study, 16 C57BL/6 mice with the age range of 6-8 weeks were randomly divided into two groups, including control and phycocyanin groups. On the day 0 of the study, melanoma cells were injected and all the mice were treated for 20 days. Phycocyanin group received 40mg/kg phycocyanin every day. The tumors were extracted on the day 21 and the effect of phycocyanin on the angiogenesis and proliferation of cancer cells was investigated, using immunohistochemical staining with CD31 and Ki-67, respectively. The data were analyzed, using JMP 11 software by one way ANOVA test.

Findings In the phycocyanin group, angiogenesis was significantly lower than that of the control group ($p < 0.01$), while the mitotic index was not significantly lower than that of the control group in the mice treated with phycocyanin.

Conclusion Phycocyanin has ability to inhibit angiogenesis in the B16-F10 melanoma tumors in C57BL/6 mouse, but it is not able to reduce the proliferation of melanoma cells.

Keywords Phycocyanin; Angiogenesis; Ki67; Melanoma; *Spirulina platensis*

CITATION LINKS

[1] B16 as a mouse model for human melanoma [2] Melanoma epidemiology and trends [3] Fundamental concepts of the angiogenic process [4] Mechanisms of cancer angiogenesis [5] Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: Evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression [6] Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina* (Arthrospira) [7] Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycocyanin [8] Molecular immune mechanism of Cphycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro [9] Antidiabetic potential of phycocyanin: Effects on KKAY mice [10] Cphycocyanin: A potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro [11] Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats [12] Screening for antifungal and antiviral activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* [13] Antibacterial and antifungal activity of selected microalgae and cyanobacteria [14] Purified C-phycocyanin from *spirulina platensis* (nordstedt) geitler: A novel and potent agent against drug resistant bacteria [15] Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin [16] Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* Cphycocyanin induces apoptosis in the doxorubicinresistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2 [17] Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas [18] Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis [19] Phycocyanin from *Spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield [20] Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga [21] Measuring intratumoral microvessel density [22] Piroxicam and C-Phycocyanin mediated apoptosis in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride induced colon carcinogenesis: Exploring the mitochondrial pathway [23] Cell cycle regulation and apoptotic cell death in experimental colon carcinogenesis: Intervening with Cyclooxygenase-2 Inhibitors, Biochem

*Pathology Department, Medicine Faculty, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

¹Biology Department, Basic Sciences Faculty, Isfahan Branch, Payam-e-Noor University, Isfahan, Iran

²Pathology Department, Medicine Faculty, Najaf Abad Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

³Cancer Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Correspondence

Address: Pathology Department, Medicine Faculty, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Postal Code: 8174683461
Phone: +98 (31) 37929075
Fax: +98 (31) 36688597
talebi@med.mui.ac.ir

Article History

Received: December 16, 2017

Accepted: March 11, 2018

ePublished: September 03, 2018

اثر ضد رگ‌زایی فیکوسیانین سی اسپیرولینا B16-F10 بر رده سرطانی ملانوما در موش سوری C57BL/6

فرزانه دیبایی MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اصفهان، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران

محمد فضیلتی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اصفهان، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران

فروزان معین‌زاده PhD

گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

امیرحسین کفایت PhD

مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نرگس جزایری MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اصفهان، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران

اردشیر طالبی PhD

گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

اهداف: ملانوما یکی از خطرناک‌ترین انواع سرطان پوست است که به داروهای شیمی‌درمانی رایج مقاوم است. مهار رگ‌زایی هدفی بزرگ در مبارزه با سرطان تلقی می‌شود. فیکوسیانین، به‌عنوان متابولیت استخراج‌شده از اسپیرولینا قادر به مهار رگ‌زایی است. بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر ضد رگ‌زایی فیکوسیانین سی اسپیرولینا پلاتنسیس (*Spirulina platensis*) بر رده سرطانی ملانوما B16-F10 در موش سوری C57BL/6 بود.

مواد و روش‌ها: پژوهش تجربی حاضر روی ۱۶ سر موش ماده C57BL/6 با سن ۶-۸ هفته انجام شد که به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل و دریافت‌کننده فیکوسیانین تقسیم شدند. به همه موش‌ها در روز صفر مطالعه، سلول ملانوما تزریق شد و موش‌ها به مدت ۲۰ روز بیمار شدند. گروه فیکوسیانین، روزانه ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فیکوسیانین را دریافت کردند. تومورها روز ۲۱ استخراج شدند و تاثیر فیکوسیانین بر رگ‌زایی و تکثیر سلول‌های سرطانی به ترتیب با کمک روش ایمونوهیستوشیمی با CD31 و Ki-67 بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار JMP 11، از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه صورت گرفت.

یافته‌ها: رگ‌زایی در گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$)، در حالی که شاخص میتوز در موش‌های درمان‌شده با فیکوسیانین به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل نبود.

نتیجه‌گیری: فیکوسیانین، قادر به مهار رگ‌زایی تومور ملانوما B16-F10 در موش سوری C57BL/6 است، ولی قادر به کاهش تکثیر سلول‌های ملانوما نیست.

کلیدواژه‌ها: فیکوسیانین، رگ‌زایی، Ki-67، ملانوما، اسپیرولینا پلاتنسیس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

*نویسنده مسئول: talebi@med.mui.ac.ir

مقدمه

ملانوما یک سرطان تهاجمی بدخیم و نسبتاً مقاوم به درمان است و ششمین سرطان معمول در دنیا محسوب می‌شود که ناشی از دگرگونی ملانوسیت‌های تولیدکننده رنگدانه است^[1]. سرطان ملانوما ۸۰٪ مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان پوست را به خود اختصاص می‌دهد که شمار قربانیان آن در حال افزایش است و بیشترین قربانیان، افراد جوان هستند. تلاش‌های متعددی برای درمان موثر این بیماری انجام شده و روش‌های درمانی آن شامل

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی

جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، هورمون‌درمانی و ایمون‌درمانی است. در نوع موضعی بیماری، جراحی موثرترین روش درمانی است، ولی این نوع بدخیمی معمولاً متاستاتیک می‌شود که بیانگر اهمیت سایر روش‌های درمانی است^[2].

آنژیوژنز یا رگ‌زایی به معنی تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق اولیه است که در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز و همچنین در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشدونمو ارگان، ترمیم زخم و تولید مثل دخالت دارد^[3]. فرآیند آنژیوژنز نه تنها در القای رشد تومور بلکه در فرآیند پیچیده گسترش و متاستاز تومورها که شامل دورشدن سلول‌های سرطانی از محل اولیه خودشان، مهاجرت آنها در طول عروق خونی و لنفاوی و پراکنده شدن آنها در نقاط دور دست است، نیز نقش مهمی دارد. به این ترتیب که هر چه عروق بیشتری در بافت تومور تشکیل می‌شود، سلول‌های تومور بیشتری از دیواره نفوذپذیر عروق عبور می‌کنند و وارد گردش خون می‌شوند^[4]. بنابراین درمان‌های آنتی‌آنژیوژنیک در جلوگیری از رشد و متاستاز تومورها مورد توجه فراوان قرار گرفته‌اند.

آنزیم سیکلواکسیژناز (Cox) که آنزیم کلیدی در تبدیل اسیدآرآشیدونیک به پروستاگلاندین‌ها است، دو ایزوفرم به نام‌های Cox-1 و Cox-2 دارد. آنزیم Cox-2 نقش مهمی در تنظیم تکثیر سلولی، تمایز زایی و سرطان‌زایی ایفا می‌کند و با التهاب، درد، رگ‌زایی و سرطان ارتباط دارد^[5]. همان‌طور که اشاره شد، Cox-2 یکی از فاکتورهای موثر در افزایش رگ‌زایی است و بیان بیش از حد آن در سرطان سبب ازدیاد تولید فاکتورهای رشد رگ‌زا می‌شود. بنابراین مهار Cox-2 به‌عنوان یک استراتژی امیدبخش و موثر برای درمان و جلوگیری از سرطان مورد توجه قرار گرفته است.

آنتی‌ژن Ki-67 به‌عنوان نشانگر تزايد سلولی، در تعیین رفتار بیولوژیک تومورها نقش موثری دارد. آنتی‌ژن Ki-67 یکی از شناخته‌شده‌ترین پروتئین‌های مرتبط با چرخه سلولی است که در هیستوپاتولوژی تشخیصی استفاده می‌شود. Ki-67 یک آنتی‌ژن هسته‌ای است و فقط در سلول‌های در حال تکثیر و مراحل خاصی از چرخه سلولی حضور دارد. کلون معتقد بوده است که در تجربیات روزمره، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی منوکلونال Ki-67 بهترین روش برای اندازه‌گیری تکثیر سلولی است^[6].

امروزه یکی از گسترده‌ترین مطالعات برای درمان سرطان در ارتباط با اثرات ضدسرطانی، سیانوباکتری‌ها هستند. اسپیرولینا، سیانوباکتر رشته‌ای میکروسکوپی است که حاوی آنتی‌اکسیدان‌های قوی است و خواص سلامت‌بخش آن در ارتباط با رنگدانه‌های آنتی‌اکسیدانی آن است. فیکوسیانین، یک رنگدانه آبی و به‌صورت یک بیل‌پروتئین غیررسمی است که از ترکیب دو زیرواحد آلفا و بتا ساخته شده است و به سه شکل فیکوسیانین سی (C-PC)، فیکوسیانین آر (R-PC) و آلفوفیکوسیانین (APC) دیده می‌شود^[7]. فیکوسیانین دارای خواص ضدالتهابی^[8]، ضد دیابتی^[9]، آنتی‌اکسیدانی^[10]، مهار رادیکال‌های آزاد^[11]، ضدقارچی^[12]، ضدباکتریایی^[13-14] و مهم‌ترین آن خاصیت ضدسرطانی آن است^[15] که در واقع به‌عنوان القاکننده مرگ سلول‌های سرطانی از طریق تغییرات در نسبت BAX/BCL₂^[16]، دپلی‌مریزاسیون میکروتوبول‌ها و میکروفیلانته‌ها^[15]، فعال‌سازی کاسپازهای ۳ و ۸ در مسیر آپوپتوز، دکریوسیلز اورنیتین^[17] و نیز ایجاد تغییراتی در مرحله G₀/G₁ است^[17]. پژوهش‌های انجام‌شده، فیکوسیانین را به‌عنوان مهارکننده آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ و عامل موثر در آپوپتوز معرفی کرده است^[18]. بنابراین هدف پژوهش

جلدی است که در موش‌های C57BL/6 به‌خوبی تکثیر می‌یابند. این سلول‌ها به‌دلیل سینرژیک‌بودن با مدل موشی مورد مطالعه انتخاب شدند. میان زیررده‌های B16، سلول‌های سرطانی ملانوما B16F10 دارای بیشترین ظرفیت تکثیر بوده و این مدل سلولی، دارای قابلیت متاستاز است. به‌منظور انجام این پژوهش، رده سلول‌های سرطان ملانوما B16-F10 (انستیتو پاستور؛ ایران) در محیط کشت DMEM (Gibco؛ ایالات متحده)، حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco؛ ایالات متحده) کشت و در انکوباتور در ۳۷°C و ۵٪ CO₂ نگهداری شد.

به همه موش‌ها در روز اول مطالعه ۵×۱۰^۵ سلول ملانوما B16-F10 در حجم ۱۰۰ میکرولیتر با سرنگ انسولین به‌روش زیرجلدی و در پهلوی سمت چپ موش‌ها تزریق شد. تومور ملانوما به‌طور متوسط یک هفته پس از تزریق سلول‌های ملانوما به موش‌ها به وجود آمد. بعد از مشاهده تومور، فیکوسیانین با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌میزان ۵/۵ سی‌سی به‌صورت داخل صفاقی، هر روز به موش‌ها تزریق شد. در پایان مطالعه (روز بیست‌ویکم)، تومور جدا شد و رگ‌زایی از طریق روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

الف) ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی CD31: از آنجایی که رگ‌زایی، اساساً وابسته به تکثیر، اتصال، مهاجرت و بلوغ سلول‌های اندوتلیال است، بنابراین اکثر رویکردها برای تعدیل رگ‌زایی بر اعمال سلول‌های اندوتلیال طی تشکیل رگ خونی متمرکز شده است و تا به امروز موفق‌ترین استراتژی برای مهار رگ‌زایی، استفاده از عواملی بوده است که به‌طور اختصاصی از رشد سلول‌های اندوتلیال ممانعت می‌نمایند [21]. از این رو، برای تعیین میزان آنژیوژنز و سلول‌های اندوتلیال از آنتی‌بادی مونوکلونال CD31 به‌عنوان شاخص سلولی اندوتلیال استفاده شد. بدین منظور بلوک‌های پارافینی از تومور تهیه و برش‌های ۵ میکرومتری ایجاد شد و روی لام قرار گرفت. سپس نمونه‌ها پارافین‌زدایی شدند. در مرحله بعد آنتی‌بادی اولیه اضافه و به آنتی‌ژن CD31 موجود در بافت متصل شد، بعد از آن آنتی‌بادی ثانویه نشاندار شده (متصل به آنزیم پراکسیداز) اضافه و به آنتی‌بادی اولیه متصل شد. سپس دی‌آمینوبندین اضافه شد که با آنزیم پراکسیداز واکنش داده و محصول قهوه‌ای‌رنگی ایجاد می‌کند که با کمک میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است. هر لام در ۱۰ فیلد که دارای عروق بیشتری بودند، به‌صورت تصادفی توسط میکروسکوپ نوری (Olympus) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برسی و میزان آنژیوژنز براساس میانگین تعداد عروق خونی کوچک (MVD) شمارش شده محاسبه شد.

ب) ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی Ki-67: از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی مونوکلونال Ki-67 برای اندازه‌گیری تکثیر سلولی استفاده شد. به‌منظور انجام این تکنیک، مانند مرحله قبل، مقاطع ۵ میکرونی از تمام بلوک‌های پارافینی با میکروتوم تهیه شد. برای عمل ماسک‌زدایی پس از پارافین‌زدایی نمونه‌ها در داخل کوپلین ظرف بافر سترات قرار داده شدند و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ماکروویو دمای ۹۵°C قرار گرفتند. مهار پراکسیداز بافتی با آب اکسیژنه انجام گرفت. از آنتی‌بادی مونوکلونال Ki-67 (Dako؛ ایالات متحده) استفاده و زمان، دما و غلظت آنتی‌بادی طبق دستورالعمل کیت انجام شد. پس از شست‌وشوی اسلایدها با بافر فسفات‌سالین، آنتی‌بادی ثانویه بیوتینیل شده (Biotinylated) روی لام‌ها چکانده شد. سپس از استرپتوآوبیدین متصل به هورس‌رادیش پراکسیداز (HRP) که قادر است دی‌آمینوبندین را اکسید کند، استفاده شد. سلول‌هایی که با

حاضر، بررسی اثر ضد رگ‌زایی فیکوسیانین سی اسپیرولینا پلاتنسیس (*Spirulina platensis*) بر رده سرطانی ملانوما B16-F10 در موش سوری C57BL/6 بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش تجربی حاضر روی ۱۶ موش ماده C57BL/6 با سن ۸-۶ هفته (انستیتو پاستور؛ ایران) انجام شد. حیوانات در دما و رطوبت مناسب نگهداری شدند و دسترسی کافی به آب و مواد غذایی داشتند. بعد از یک هفته تطابق با لانه حیوانات گروه فیزیولوژی و رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات (شماره نامه ۳۵۲۹۲ کمیته اخلاقی)، موش‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه (هر گروه، ۸ موش) تقسیم شدند. گروه اول به‌عنوان گروه کنترل (که فقط دریافت‌کننده آب و مواد غذایی بودند) و گروه دوم به‌عنوان گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم‌بندی شدند.

روش استخراج فیکوسیانین از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس: برای استخراج فیکوسیانین، از نمونه تر جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (دانش‌پژوهان سبز قشم؛ ایران) و روش فریز-دفریز استفاده شد [19]. بدین صورت که ابتدا بیومس تر جلبک به‌مدت ۱۲ ساعت در فریزر در دمای ۴- تا ۲۰°C و پس از آن به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق (۲۵°C) و به دور از نور قرار داده شد و این فرآیند به‌مدت ۴۸ ساعت تکرار شد. در هر مرحله، فیکوسیانین استخراجی که به رنگ آبی است، به‌وسیله سرنگ جدا و در یک ظرف تیره ریخته (به‌دلیل حساسیت فیکوسیانین به نور) و در فریزر دمای ۴- تا ۲۰°C (به‌دلیل حساسیت فیکوسیانین به دما) تا زمان مصرف نگهداری شد.

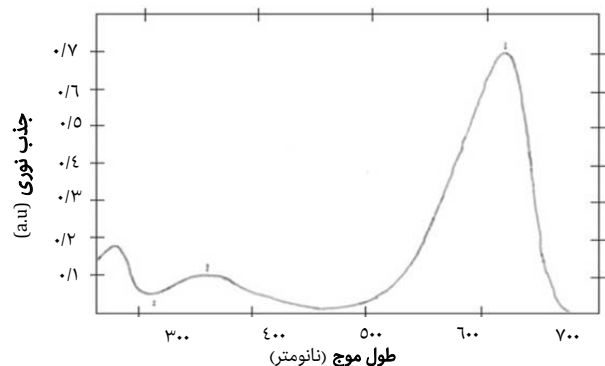
تعیین غلظت فیکوسیانین: غلظت فیکوسیانین سی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در طول موج (OD) ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر (بیشترین جذب فیکوسیانین بین این طول موج‌هاست)، با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (نمودار ۱) [20]:

$$CPC = \frac{(OD_{620} - 0.474 OD_{652})}{5.34}$$

$$OD_{620} = 0.68$$

$$OD_{652} = 0.32$$

برای تعیین غلظت از دستگاه اسپکتوفتومتر UV-Visible 2550 (shimadzu؛ ژاپن) استفاده شد.



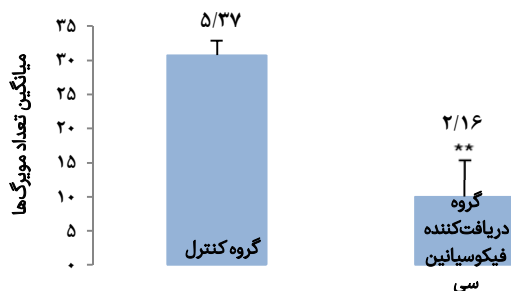
نمودار ۱) محصول اسپکتروفوتومتری (UV-VIS) فیکوسیانین سیانوباکتری اسپیرولینا پلاتنسیس

کشت سلولی

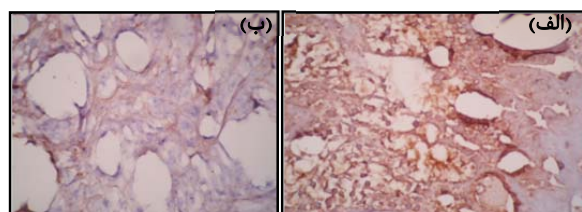
رده B16 یکی از معمول‌ترین و تطبیق‌پذیرترین مدل ملانوما

جدول ۱) میانگین آماری و درصد اختلاف حاصل از اندازه‌گیری حجم تومور گروه کنترل و دریافت‌کننده فیکوسیانین سی (هر گروه، ۸ موش)

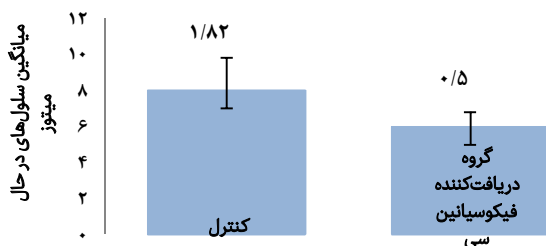
درصد اختلاف	گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین سی	گروه کنترل	دفعات اندازه‌گیری حجم تومور (میلی‌متر مکعب)
اول	۱۱۱±۱۲/۰۲	۱۲۱/۵±۱۹/۲	
دوم	۱۳۱/۵±۷/۰۷	۱۸۱/۰±۱۱/۳	
سوم	۳۹۰±۱۰۳/۲۳	۴۹۷/۰±۱۶۵/۱	
چهارم	۴۵۹/۵±۸۹/۰	۹۸۷/۰±۱۴۲/۵	
پنجم	۷۴۳/۵±۹۱/۹۲	۱۳۰۵/۰±۱۴۷/۰۷	
ششم	۱۰۳۲/۰±۸۰/۶۱	۱۴۱۰/۰±۱۲۸/۹	
هفتم	۱۴۰۴/۰±۱۶۲/۶۳	۲۴۱۵/۰±۲۶۰/۲	



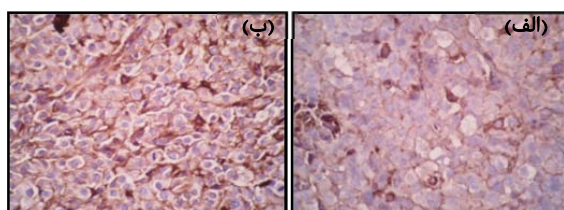
نمودار ۲) نتایج تاثیر فیکوسیانین سی / اسپیرولینا پلاتنسیس بر تراکم مویرگی تومور ملانوما B16-F10 موش‌های C57BL/6 در گروه کنترل و دریافت‌کننده فیکوسیانین سی
 ** نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح $p < 0.01$ است. اعداد بالای هر ستون نشان‌دهنده انحراف معیار است



شکل ۲) رنگ‌آمیزی CD31 مویرگ‌های تومور ملانوما B16-F10 به روش ایمونوهیستوشیمی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ در موش‌های C57BL/6 الف، گروه کنترل ب، گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین سی / اسپیرولینا پلاتنسیس



نمودار ۳) مقایسه میانگین سلول‌های Ki-67 مثبت در گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین سی / اسپیرولینا پلاتنسیس در موش‌های C57BL/6 مربوط به ملانوما B16-F10
 اعداد بالای هر ستون نشان‌دهنده انحراف معیار است



شکل ۳) رنگ‌آمیزی Ki-67 بافت توموری ملانوما B16-F10 به روش ایمونوهیستوشیمی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ در موش‌های C57BL/6 الف، گروه کنترل ب، گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین سی / اسپیرولینا پلاتنسیس

بیان Ki-67 همراه هستند، رسوب غیرمحلول قهوه‌ای‌رنگ ایجاد می‌کنند. پس از رنگ‌آمیزی، زمینه بافت‌ها با همتاکسیلین لام‌ها از طریق میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. اسلایدها توسط پاتولوژیست بررسی شدند.

ابعاد تومورها هر دو روز یک‌بار توسط کولیس با دقت اندازه‌گیری و حجم آن با استفاده از فرمول $W1 \times W2 \times W2 / 6\pi$ محاسبه شد. W1، بزرگ‌ترین قطر تومور و W2، کوچک‌ترین قطر تومور بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار JMP 11، از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه برای مقایسه میزان تراکم مویرگی و میزان تکثیر سلول‌های سرطانی ملانوما در دو گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین و گروه کنترل صورت گرفت.

یافته‌ها

تومورهای گروه موش‌های C57BL/6 دریافت‌کننده فیکوسیانین دارای سایز کمتری نسبت به گروه کنترل بودند. تومورها در گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین، فاقد نکروز مرکزی بودند، در صورتی که در گروه کنترل در تمامی تصاویر، نکروز مرکزی دیده می‌شد (شکل ۱). میانگین حجم تومور ملانوما در دو گروه، در پایان مطالعه افزایش یافت. افزایش حجم تومور ملانوما در پایان مطالعه، در گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کمتر بود (جدول ۱؛ $p = 0.05$).

میزان تراکم مویرگی (به‌روش ایمونوهیستوشیمی با رنگ‌آمیزی CD31) در موش‌های دریافت‌کننده فیکوسیانین با میانگین $10.0 \pm 0.7/3$ نسبت به گروه کنترل با میانگین $30.7 \pm 5.0/3$ کاهش چشمگیری داشت ($p = 0.002$; نمودار ۲؛ شکل ۲). میزان تکثیر سلول‌های سرطانی ملانوما (به‌روش ایمونوهیستوشیمی با Ki67) در گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین با میانگین $6.5 \pm 0.5/7$ نسبت به گروه کنترل با میانگین $8.2 \pm 1.0/82$ کاهش معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$; نمودار ۳؛ شکل ۳).



شکل ۱) تصاویر تومور ملانوما B16-F10 در گروه کنترل و دریافت‌کننده فیکوسیانین سی / اسپیرولینا پلاتنسیس در موش‌های C57BL/6 الف، ب و ج، به‌ترتیب مربوط به روز هفتم، چهاردهم و بیست و یکم گروه کنترل است

و، ه و ی، به‌ترتیب مربوط به روز هفتم، چهاردهم و بیست و یکم گروه دریافت‌کننده فیکوسیانین سی / اسپیرولینا پلاتنسیس است

در رگ‌زایی، فاکتورهای متعددی شرکت دارند که می‌توانند نقش محرک یا مهارکننده داشته باشند. پژوهش‌های انجام‌شده، فیکوسیانیل را به‌عنوان مهارکننده آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ معرفی کرده است. همان‌طور که اشاره شد آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ یکی از فاکتورهای بسیار موثر در رگ‌زایی است. ساینی و سانیل به بررسی تاثیر فیکوسیانیل (به‌عنوان مهارکننده آنزیم سیکلواکسیژناز ۲) بر مسیر آنژیوژنز سرطان روده پرداخته‌اند. آنها برای مهار سرطان روده از داروی پیروکسیکام و فیکوسیانیل استفاده کرده‌اند. نتایج نشان داده است که اندازه و سایز تومور از طریق درمان فیکوسیانیل و پیروکسیکام کاهش یافته است. ارزیابی فاکتور رشد اندوتلیال عروق و ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ و ۹ به‌عنوان فاکتورهای مورد نیاز برای متاستاز و تهاجم به بافت‌های اطراف انجام شد. داروی پیروکسیکام از طریق اتصال به گیرنده شماره ۱ و ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروق، منجر به مهار اتصال این پروتئین به گیرنده‌اش می‌شود، در حالی که فیکوسیانیل قادر است فقط به گیرنده شماره ۱ فاکتور رشد اندوتلیال متصل شود. در نهایت پتانسیل مهار رگ‌زایی فیکوسیانیل به‌خوبی نشان داده شده است [23].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق فیکوسیانیل (با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به موش‌های مبتلا به سرطان ملانوما طی فرآیند ۲۰ روزه موجب کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی ملانوما شد، لیکن این کاهش معنی‌دار نبود. نتایج میکروسکوپی لام‌های Ki67 نشان داد که تعداد سلول‌های در حال میتوز در گروه دریافت‌کننده فیکوسیانیل نسبت به گروه کنترل به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر نبود. با توجه به پژوهش‌های انجام‌شده به نظر می‌رسد فیکوسیانیل، بیشتر از طریق القای آپاپتوز، باعث مهار رشد تومور ملانوما شد و نقش کمتری در مهار تکثیر سلول‌های ملانوما B16-F10 داشت. براساس نتایج پژوهش، فیکوسیانیل می‌تواند کاربرد بالینی داشته باشد و از آن در مقابله با سرطان و بیماری‌های مرتبط با رگ‌زایی استفاده نمود.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان اشاره کرد که اگر چه بررسی مسیرهای مولکولی کمک شایانی به تایید نتایج حاصل از پژوهش می‌نمود، لیکن به‌دلیل محدودیت امکانات قادر به بررسی این مسیرها نبودیم. پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی برای شناخت مسیرهای سیگنالینگ برای روشن‌شدن این موضوع انجام شود.

نتیجه‌گیری

فیکوسیانیل، قادر به مهار رگ‌زایی تومور ملانوما B16-F10 در موش سوری C57BL/6 است، ولی قادر به کاهش تکثیر سلول‌های ملانوما نیست.

تشکر و قدردانی: این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب شورای پژوهشی دانشگاه پیام نور اصفهان است. مراحل این تحقیق در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و آزمایشگاه دانشگاه پیام نور اصفهان انجام شده است، لذا بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و دانشگاه پیام نور اصفهان به عمل می‌آید.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات با شماره نامه ۳۵۲۹۲ کمیته اخلاقی انجام شد.

تعارض منافع: موردی وجود نداشته است.

سهم نویسندگان: فرزانه دیبایی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ محمد فضیلتی

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر ضد رگ‌زایی فیکوسیانیل سی /اسپیرولینا پلاتنسیس بر رده سرطانی ملانوما B16-F10 در موش سوری C57BL/6 انجام شد. ملانوما که از تغییر شکل سلول‌های ملانوسیت در پوست ایجاد می‌شود، کشنده‌ترین نوع سرطان پوست است که برای درمان آن از روش‌های درمانی متفاوتی از جمله جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی استفاده می‌شود. از آنجایی که این نوع روش‌های درمانی با عوارض جانبی بسیار زیادی همراه هستند، لذا در سال‌های اخیر علاقه زیادی به پیدا کردن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و استفاده از آنها در پیشگیری و درمان انواع سرطان‌ها به وجود آمده است. شواهد حاکی از آن است که جلبک‌ها حاوی مقادیر متفاوت از موادی هستند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. از سوی دیگر امروزه خواص دارویی فیکوسیانیل جلبک اسپیرولینا در درمان سرطان‌های مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته و جنبه‌های زیادی از تاثیرات آن مشخص شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تاثیر این ترکیب بر رگ‌زایی سرطان ملانوما صورت نگرفته است. این موضوع منجر به شکل‌گیری این ایده شد که تاثیر فیکوسیانیل جلبک اسپیرولینا بر سرطان ملانوما بررسی شود. مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که فیکوسیانیل از سه طریق القای آپاپتوز [22]، مهار تکثیر سلول‌های سرطانی [15] و مهار رگ‌زایی [23] قادر به مهار سرطان است. لذا انتظار می‌رود که با توجه به این ویژگی‌ها، فیکوسیانیل، قادر به مهار رگ‌زایی و تکثیر سلول‌های سرطانی در سرطان ملانوما نیز باشد. مطالعات ساینی و همکاران در سال ۲۰۱۲، برای بررسی تاثیر فیکوسیانیل بر سرطان روده انجام شده است. آنها از دی‌متیل‌هیدرازین‌دی‌هیدروکلراید برای القای سرطان روده استفاده کرده‌اند. در این مطالعه تاثیر فیکوسیانیل سی و داروی پیروکسیکام (داروی ضد التهاب) به‌طور جداگانه و به‌صورت ترکیبی بررسی شده است. نتایج نشان داده است که استفاده از فیکوسیانیل باعث القای آپاپتوز از طریق کاهش بیان BCL-2 و افزایش BAX می‌شود [22]. در مطالعه‌ای تاثیرات ضد سرطانی فیکوسیانیل را بر رده سلولی سرطانی پستان انسانی، نوع MCF-7 بررسی نموده‌اند. نتایج حاصل نشان‌دهنده تاثیر فیکوسیانیل بر مهار تکثیر سلولی MCF-7 و تغییرات فراساختاری از جمله از دست‌دادن میکروویلی، تراکم کروماتین و تغییرات غشایی بوده است [15].

در مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات ضد رگ‌زایی فیکوسیانیل روی سرطان ملانوما رده B16-F10 بررسی شد. نتایج میکروسکوپی لام‌های CD31 بیانگر اختلاف قابل ملاحظه‌ای در تعداد و ضخامت عروق گروه کنترل نسبت به گروه دریافت‌کننده فیکوسیانیل و گروه کنترل، دارای عروق مضاعف با ضخامت بیشتر بود. بنابراین می‌توان گفت که فیکوسیانیل به‌طور چشمگیری باعث مهار رگ‌زایی در تومور ملانوما موش سوری C57BL/6 شد. بنابراین یافته‌های مرتبط با اثر ضد رگ‌زایی فیکوسیانیل بر سلول سرطانی ملانوما در این پژوهش هم‌راستا با نتایج سایر مقالات و نشان‌دهنده خاصیت ضد رگ‌زایی فیکوسیانیل بود. با توجه به مطالعات قبلی انجام‌شده روی فیکوسیانیل، یکی از مکانیزم‌های محتمل اثر فیکوسیانیل مشخص شد و نشان داده شد که فیکوسیانیل با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ قادر است رگ‌زایی را مهار کند. قطعاً مکانیزم‌های دیگری نیز در مهار رگ‌زایی توسط فیکوسیانیل دخیل هستند که نیازمند تحقیقات بیشتری است تا جوانب مختلف اثر فیکوسیانیل مورد بررسی قرار گیرد.

and antiviral activity of C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *J Pharm Res*. 2011;4(11):4161-3.

13- Najdenski HM, Gigova LG, Iliev II, Pilarski PS, Lukavský J, Tsvetkova IV. Antibacterial and antifungal activity of selected microalgae and cyanobacteria. *Int J Food Sci Technol*. 2013;48(7):1533-40.

14- Sarada DVL, Kumar CS, Rengasamy R. Purified C-phycoyanin from *spirulina platensis* (nordstedt) geitler: A novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011;27(4):779-83.

15- 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-phycoyanin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010;42(1):80-9.

16- Roy KR, Arunasree KM, Reddy NP, Dheeraj B, Reddy GV, Reddanna P. Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycoyanin induces apoptosis in the doxorubicin-resistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. *Biotechnol Appl Biochem*. 2007;47(Pt 3):159-67.

17- Chen HW, Yang TSh, Chen MJ, Chang YCh, Chen Wang EI, Ho ChL, et al. Purification and immunomodulating activity of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochem*. 2014;49(8):1337-44.

18- Yogianti F, Kunisada M, Nakano E, Ono R, Sakumi K, Oka S, et al. Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. *J Invest Dermatol*. 2014;134(10):2610-9.

19- Sarada R, Pillai MG, Ravishankar GA. Phycocyanin from *Spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield. *Process Biochemistry*. 1999;34(8):795-801.

20- Bennett A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J Cell Biol*. 1973;58(2):419-35.

21- Weidner N. Measuring intratumoral microvessel density. *Methods Enzymol*. 2008;444:305-23.

22- Saini MK, Sanyal SN, Vaiphei K. Piroxicam and C-Phycocyanin mediated apoptosis in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride induced colon carcinogenesis: Exploring the mitochondrial pathway. *Nutr Cancer*. 2012;64(3):409-18.

23- Saini MK, Sanyal SN. Cell cycle regulation and apoptotic cell death in experimental colon carcinogenesis: Intervening with Cyclooxygenase-2 Inhibitors, *Biochem. Nutr Cancer*. 2015;67(4):206-18.

(نویسنده دوم)، روش شناس (۱۰٪)؛ فروزان معین زاده (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش شناس (۱۰٪)؛ امیرحسین کفایت (نویسنده چهارم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ نرگس جزایری (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ اردشیر طالبی (نویسنده ششم)، روش شناس/نگارنده بحث (۱۰٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

منابع

- 1- Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 20: Unit 20.1.
- 2- Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*. 2009;27(1):3-9.
- 3- Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 2003;3(7):643-51.
- 4- Sacewicz I, Wiktorska M, Wysocki T, Niewiarowska J. Mechanisms of cancer angiogenesis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2009;63:159-68. [Polish]
- 5- Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: Evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer*. 2000;86(5):667-71.
- 6- Gutiérrez-Salmeán G, Fabila-Castillo L, Chamorro-Cevallos G. Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*). *Nutr Hosp*. 2015;32(1):34-40.
- 7- Kuddus M, Singh P, Thomas G, Al-Hazimi A. Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycoyanin. *BioMed Res Int*. 2013;(2013):742859.
- 8- Li B, Gao MH, Zhang XC, Chu XM. Molecular immune mechanism of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnol Appl Biochem*. 2006;43(Pt 3):155-64.
- 9- Ou Y, Lin L, Yang X, Pan Q, Cheng X. Antidiabetic potential of phycocyanin: Effects on KKAY mice. *Pharm Biol*. 2013;51(5):539-44.
- 10- Bhat VB, Madyastha KM. C-phycoyanin: A potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(1):20-5.
- 11- Nasirian F, Dadkhah M, Moradi-kor N, Obeidavi Z. Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats. *Diabetes Metab Syndr Obes Target Ther*. 2018;11:375-80.
- 12- Murugan T, Radhamad H. Screening for antifungal