

بررسی اثر سم میکروسیستین از جلبک میکروسیستیس بر روی رده سلولی HepG2 کارسینومای کبد انسان با استفاده از Real-TimePCR

سمانه محمدخانی^{۱*}، رودابه بهزادی اندوهجردی^۲، فاطمه نوری^۲

۱. کارشناس ارشد سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

۲. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۰)

چکیده

سابقه و هدف: میکروسیستین یک هپتاپتیدحلقوی است که به عنوان فراواترین سیانوتوکسین تولیدی با توزیع گسترده جهانی شناخته شده است و رایج ترین هپاتوتوکسین تولید شده توسط سیانوباکترها می باشد. فاقد نفوذ به غشا سلول های مهره داران است به همین دلیل سمیت این سیانوتوکسین ها تنها به اندام هایی محدود می گردد که مانند کبد بیان کننده و انتقال دهنده (ترانسپورتر) آنیونی آلی بر روی غشا سلولی خود باشند. در این مطالعه میزان بیان ژن های BAX و BCL2 در رده سلولی HepG2 تحت تاثیر میکروسیستین با استفاده از تکنیک Real-TimePCR مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان با انجام تحقیق و بررسی بیشتر در مورد مکانیسم و نحوه اثر این سم از آن به عنوان یک هدف مناسب برای درمان سرطان کبد استفاده کرد.

روش کار: در ابتدا پاساژ سلولی رده سلولی HepG2 انجام شد، سپس تست MTT Assay صورت گرفت، در مرحله بعد استخراج RNA و سنتز CDNA صورت گرفت و جهت اطمینان از خلوص نمونه RNA از اسپکتروفتومتر نانودراپ استفاده شد، سپس پرایمرهای اختصاصی و مناسب ژن مورد نظر طراحی و سنتز گشت و با استفاده از Real-Time PCR بیان ژن های Bax و BCL2 سنجیده شد.
یافته ها: این سم بیان ژن های BAX را افزایش داده و موجب کاهش ژن های BCL2 به صورت چشمگیری شده است.
نتایج: ژن BAX به عنوان یک پروآپتوز بیانش افزایش یافته و هر چقدر HepG2 مدت زمان بیشتری در معرض سم قرار گرفت میزان بیان BAX افزایش یافته و در مقابل بیان BCL2 کاهش و در این حالت سلول به سمت آپتوزی شدن پیش رفت.

کلیدواژگان

HepG2، سرطان، میکروسیستین.



مقدمه

سرطان اختلال در سلول‌های بدن است و بعد از بیماری‌های قلبی عروقی دومین علت مرگ و میر به شمار می‌رود (Alsayyid j et al 2007). سرطان کبد که در بین مردان پنجمین و در بین زنان هفتمین سرطان شایع می‌باشد توزیع گسترده‌ای داشته و سلامتی افراد را بطور شدیدی تهدید می‌نماید. بطوریکه سالانه بیش از ۵۰۰۰ نفر در سطح جهان به این بیماری مبتلا می‌شوند و میزان مرگ و میر ۵ ساله آن بیش از ۹۵ درصد می‌باشد و بعد از سرطان‌های ریه و معده ۶۹۶ هزار مورد مرگ در هر سال (۹/۲ درصد از کل مرگ و میرهای ناشی از سرطان) بیشترین مرگ و میر ناشی از سرطان را به خود اختصاص داده است (بابایی-۱۳۸۲). روش‌های متعددی در درمان سرطان از جمله سرطان کبد به کار گرفته شده است که به سلول‌ها و بافت‌های سالم آسیب می‌رساند و علاوه بر هزینه‌های بالا عوارض جانبی متعددی دارد (خدایی-۱۳۹۴).

از آنجایی که کبد مسئولیت فیلتر کردن خون از تمام قسمت‌های بدن را دارد سلول‌های سرطانی از دیگر نقاط بدن در کبد تسلیم می‌شوند و شروع به رشد می‌کنند. انواع زیادی از تومورهای کبدی وجود دارد که تنها برخی از آن‌ها سرطانی است. سرطان سلول کبد (Hcc) یا هپاتوما در امریکا و اروپای غربی شایع نیست اما در افریقا، چین و خاور دور نسبتاً شایع می‌باشد. تعداد مبتلایان به این تومور یک میلیون در سطح کره زمین تخمین زده می‌شود که نسبت مردان به زنان در حدود ۴:۱ می‌باشد. در چین، تایوان، کره و صحرای افریقا سرطان سلول کبدی از مهمترین تومورهای بدخیم از نظر شیوع می‌باشد و نسبت افراد مبتلا به کل جامعه ۱۵۰ نفر در یک میلیون جمعیت می‌باشد، در حالیکه در امریکا نسبت ۴ در ۱۰۰۰۰۰ (صدهزار) است (مهبین فرهمند، ۱۳۸۱-۱۳۸۸).

جلبک‌های دریایی نشان دهنده مخزن پایان ناپذیر مواد اولیه مورد استفاده در داروسازی، پزشکی، صنایع غذایی، آرایشی بهداشتی هستند. فعالیت‌های بیولوژیکی در ترکیبات زیستی طبیعی فعال در جلبک‌ها دارای اثرات گسترده ضدباکتریایی، ضد توموری و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هستند. هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی است (Badea V, Balaban DP, et al. 2009). رادیکال‌های آزاد، ترکیباتی معمولاً ناپایدار، کاملاً واکنش پذیر و با انرژی بالا می‌باشند که به علت ایجاد آسیب اکسیداتیو در لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک منجر به بیماری‌های التهابی، دیابت ملیتوس، آترواسکلروز، سکته قلبی و مغزی، سرطان، نقص سیستم ایمنی، پیری و چندین بیماری فرساینده دیگر در انسان می‌شوند (Bourgeois CF. 2003-Blomhoff R. 2005).

بررسی اثر جلبک سبز-آبی میکروسیستیس و استفاده از سم میکروسیستین استخراج شده از آن این نوید را به ما خواهد داد که اگر نتیجه مثبتی در مهار سلول‌های سرطانی کبد دریافت کنیم از سم مورد نظر به عنوان داروی ضد سرطان استفاده نماییم، با در نظر داشتن این موضوع که از این سم استفاده‌های درمانی متعددی صورت گرفته است. به طور مثال فعالیت میکروسیستین در حداقل غلظت ممانعت کننده بین ۰/۴۲ و ۵۳ در برابر سویه‌های میکوباکتریوم تست شده است و فعالیت ضد میکروبی در هگزانیک استخراج شده از میکروسیستین در برابر بیماری سل مشاهده شده است. ترکیبات فعال بیولوژیکی دارای خواص زیستی، مانند ضدتکثیری، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال از منابع دریایی مخصوصاً جلبک‌ها و سیانو باکتری‌ها استخراج شده و اخیراً تحقیقات بر روی پپتیدها از منابع جانوری دریایی متمرکز شده است (Danial-2015).



روش کار

پاساژ دادن

جهت نگهداری سلول‌ها می‌توان آن‌ها را به طور منظم پاساژ داد. بدین منظور پس از شدن بستر کشت سلول، پس از تخلیه ی محیط کشت قبلی سلول He جهت شستشو و تخلیه مواد زائد و اجسام سلول‌های مرده، با توجه به حجم فلاسک چند میلی لیتر PBS یا محیط کشت به فلاسک اضافه شده و مجدداً تخلیه گردید. سپس جهت جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک و از بین بردن اتصال بین سلول‌ها، ۱ میلی لیتر تریپسین به آن اضافه گردید، باید دقت کرد که تریپسین نباید حرارت ببیند و برای بهتر عمل کردن تریپسین ۲ میلی لیتر از محیط کشت ناکامل هم اضافه می‌کنیم و به مدت ۲-۵ دقیقه در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. در صورتیکه سلول‌ها به طور کامل از کف فلاسک جدا نشده باشد با زدن چند ضربه به کف فلاسک این فرآیند تسریع شد.

۲ میلی لیتر محیط کشت کامل یا FBS ۲۰ درصد جهت خنثی کردن تریپسین داخل فلاسک ریخته و سوسپانسیون سلولی داخل فلاسک به میکروتیوب یا لوله فالکن منتقل گردید و با دور ۳۰۰۰ در دمای ۸ درجه به مدت ۱۰ دقیقه ساتریفیوژ شد تا جداسازی کامل تریپسین از سلول‌ها صورت گیرد. محلول رویی دور ریخته شد و ۱ میلی لیتر از محیط کشت کامل به رسوب سلولی اضافه شد از این سوسپانسیون سلولی داخل فلاسک‌ها یا پلیت‌های جدید ریخته شد و محیط کشت کامل به آن اضافه گردید و در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد.

MTT assay

جهت بررسی سایتوتوکسیسیته ترکیبات دارویی بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و اینکه چه غلظتی از سم ۵۰ درصد از رده‌های سلولی را از بین می‌برد از روش رنگ سنجی MTT استفاده می‌شود. پودر MTT

یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامی که این ترکیب در محیط کشت فاقد فنول رد یا بافر PBS حل می‌شود، ترکیب زرد رنگی ایجاد می‌کند. اساس این تست شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفاکساید (DMSO) به صورت محلول درمی‌آیند. هرچه سلول‌ها فعال تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۴۹۰-۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده الیزا اندازه گیری می‌شود. این روش نسبت به سایر روشهای بررسی پولیفراسیون سلولی ساده تر بوده، به علاوه کلیه مراحل آزمایش در پلیت ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

در این مطالعه پس از شمارش سلول‌های HepG2 حجمی از سوسپانسیون سلولی که حاوی 10^4 سلول می‌باشد را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل کرده و مقدار محیط کشت DMEM کامل روی آن اضافه گردید و حدود ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از تهیه رقت‌های مختلف سم، محیط کشت مربوط به سلول‌هایی که روز قبل در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شده بود تخلیه گردید و با توجه به اینکه برای هر دوره زمانی سه چاهک به عنوان کنترل یا (untreated) در نظر گرفته شده و برای هر رقت نیز سه چاهک در نظر گرفته شده بود، ۵/۴ میکرولیتر از محیط کشت DMEM به تک تک خانه‌ها اضافه می‌کنیم سپس از سم مورد نظر به استثنا یک ردیف از پلیت که بدون تیمار است

به بقیه خانه‌ها به ترتیب با دوزهای تعیین شده ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰ و ۸۰ اضافه می‌کنیم البته این آزمایش سه بار تکرار می‌شود. سپس پلیت‌های مربوطه را داخل انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه برای دوره‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه گردید.



۲۰- درجه قرار داده شد. مجدداً میکروتیوب‌ها در دمای ۴- درجه و با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از پایان سانتریفیوژ محلول رویی را دور ریخته و به رسوب زیرین آن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد که به کمک DEPC-treated Water تهیه شده بود اضافه شد و به صورت سوسپانسیون درآورده شد سپس محتویات دو میکروتیوب treated به یک میکروتیوب منتقل و محتویات untreated به میکروتیوب دیگر منتقل شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴- درجه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از پایان سانتریفیوژ محلول رویی دور ریخته شده و به کمک سرسمپلر تا حد امکان محلول را از رسوب جدا می‌کنیم سپس برای چند دقیقه تیوب‌ها را در زیر لامینار قرار داده تا اتانول باقی مانده تبخیر شود و در نهایت به این رسوب حاوی RNA، 20 میکرولیتر آب دیس اضافه کرده و نمونه در دمای ۷۰- درجه نگهداری می‌شود.

طراحی پرایمر

ابتدا توالی کامل ژن‌های BCL2 - BAX - House kiping از بانک اطلاعات ژنتیکی مربوطه به داده پایگاه NCBI استخراج شد. توالی‌ها به نرم افزار oligo جهت طراحی و دقت سنجی پرایمرها انتقال یافت پس از طراحی پرایمرها با استفاده از امکان BLAST در داده پایگاه NCBI پرایمرها بر روی رده سلولی HepG2 تست شد سپس پرایمرهای تست شده جهت سنتز به شرکت ارسال شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

ردیف	ژن	توالی
۱	GAPDH - F	CTGACTTCAACAGCGACAGG
۲	GAPDH - R	TAGCCAAATTCGTTGCATAGG
۳	BAX - F	GAGCTGCAGAGGATGATTCG
۴	BAX - R	AAGTTGCCGTCAGAAAAACAG
۵	BCL2 - F	ATTGGGAAGTTCAAATCACG
۶	BCL2 - R	CAGTCTACTCCTCTGTGATGTGT

پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان انکوباسیون سلول‌های تیمار شده با رقت‌های مختلف سم میکروسیستین پلیت مربوطه از انکوباتور خارج شد و به تمام چاهک‌هایی که سلول قبلاً کشت داده شده بود ۲۰ میکرو لیتر رنگ MTT اضافه گردید و پس از زدن چند ضربه به پلیت مربوطه برای کمک به هموژن شدن محتویات چاهک‌ها، مجدداً پلیت مربوطه به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور CO₂ دار در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. پس از گذشت ۴ ساعت در نور کم، محتویات چاهک‌ها تخلیه گردید و ۱۵۰ میکرولیتر ۲- propanol به همه چاهک‌ها افزوده شد و جهت جلوگیری از اثر نور محیط پلیت مربوطه را داخل فویل آلومینیومی پیچیده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰ شیک گردید. پس از پایان مدت زمان شیک به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر جذب آن خوانده شد.

استخراج RNA

پس از گذشت مدت زمان لازم جهت تیمار سلول‌ها با سم، محتویات چاهک‌ها باتیمار و بدون تیمار تخلیه گردید سپس با استفاده از ۲ میلی لیتر PBS سلول‌ها شستشو داده شد. ۱ میلی لیتر محلول بایوزول به هر چاهک اضافه شد و پس از ۲ دقیقه عمل پیتاژ که انجام شد محتویات هر چاهک به میکروتیوب‌های ۱.۵ میلی لیتر منتقل گردید. ۴۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه و پیتاژ گردید و محلول کدری حاصل شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴- درجه و با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ محلول به سه فاز آبی، میانی و آلی تقسیم شده بود که فاز آبی که حاوی RNA می‌باشد و در قسمت بالایی قرار دارد به آرامی و به کمک سمپلر برداشته و به میکروتیوب دیگری منتقل گردید. هم حجم فاز آبی جدا شده، ۲- propanol سرد به میکروتیوب‌ها اضافه شد و پس از پیتاژ در دمای



تست Real-Time PCR

اصول انجام روش Real-Time PCR بر مبنای خاصیت فلورسنت استوار است. پرکاربردترین رنگ فلورسنت سایبرگرین (SYBER-Green) است که در صورت ترکیب شدن و واکنش دادن با شیار کوچک DNA از خود نور فلورسنت ساطع می‌کند در نتیجه با اندازه گیری فلورسنت ایجاد شده در هر مرحله پیش روی واکنش قابل اندازه گیری است.

با توجه به این مطلب و نیز با در نظر گرفتن این موضوع که هر محصولی از PCR از نظر توالی طول خاص خود را دارد، هر محصول در دمای متفاوت و اختصاصی ذوب شده و این ذوب نیز یک پیک اختصاصی تولید می‌نماید. در نتیجه به این منحنی ذوب، در صورت وجود دایمر-پرایمر و یا هر نوع آلودگی احتمالی پیک‌های متفاوتی دیده خواهد شد. این مطلب صحت و اعتبار واکنش و محصول بدست آمده را تایید می‌کند. در این مطالعه ابتدا ۰/۱ میکروگرم از total RNA و ۱ میکرولیتر راندوم هگزامر را داخل میکروتیوب ریخته، سپس آب دیس را تا رسیدن به حجم ۱۲ میکرولیتر اضافه می‌کنیم بعد از پیتاژ ۳-۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه انکوبه شده، ۴ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر ریبونوکلاز و ۲ میکرولیتر 10mM dNTP را اضافه می‌کنیم و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه داخل انکوباتور قرار می‌دهیم بعد با اضافه کردن ۱

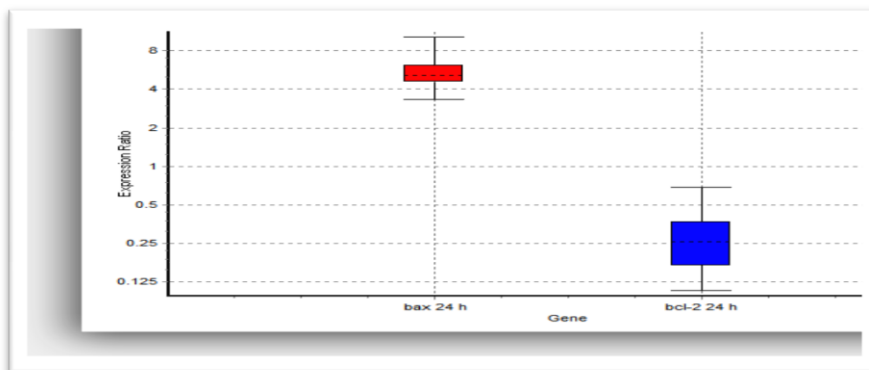
میکرولیتر از آنزیم ترانس کریپتاز حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر می‌رسد. سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه و ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه می‌شود.

در این مطالعه از دستگاه Real-Time PCR مدل BIOER استفاده شد. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد مرحله اول که منجر به دناتوره شدن مولکول‌های cDNA و فعال شدن آنزیم پلیمرز می‌گردد به صورت ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه، مرحله دوم ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱ و ۶۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه برای ۴۰ چرخه متوالی و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب (Melting curve) به صورت ۹۴ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه انجام شد.

واکنش Real-Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۰/۵ میکرولیتر SYBR-Green master، یک میکرولیتر پرایمر رقیق شده اختصاصی هر ژن (Forward+revers) (BCL2+BAX+House keeping)، یک میکرولیتر cDNA و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد تا به حجم ۲۰ میکرو لیتر رسید.

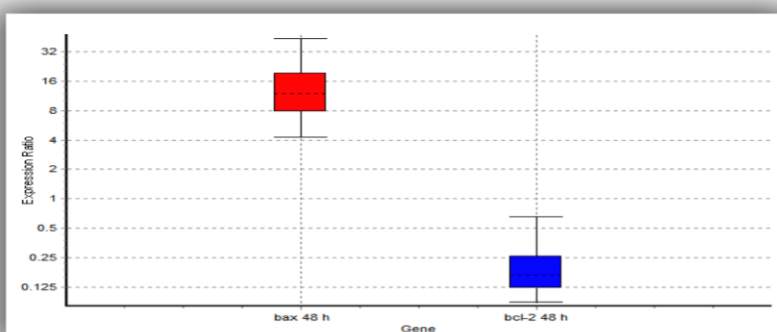
یافته‌ها

نمودارهای مربوط به آنالیز بیان ژن BAX و BCL2



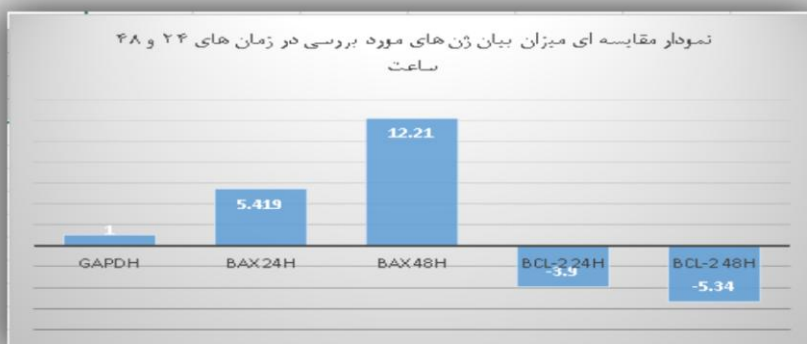
Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
bax 24 h	TRG	1.0	5.419	4.154 - 7.036	3.551 - 9.726	0.010	UP
bcl-2 24 h	TRG	1.0	0.256	0.152 - 0.442	0.107 - 0.620	0.006	DOWN
GAPDH 24 h	REF	1.0	1.000				

شکل ۱- بیان ژن‌های BAX و BCL2 بعد از گذشت ۲۴ ساعت



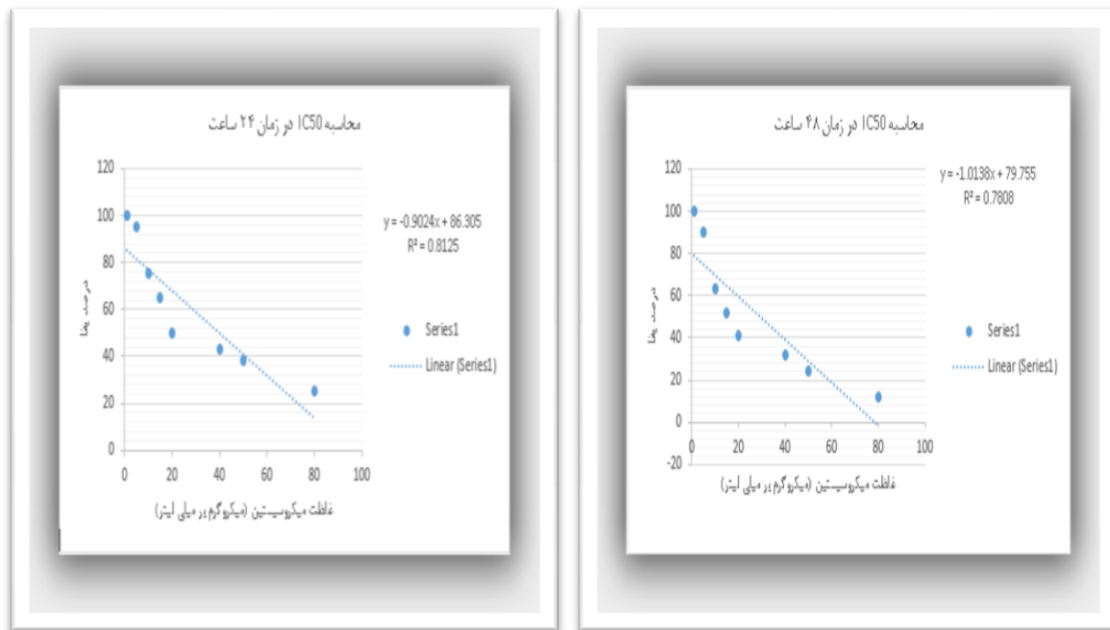
Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
bax 48 h	TRG	1.0	12.210	6.250 - 23.283	4.472 - 41.332	0.000	UP
bcl-2 48 h	TRG	1.0	0.187	0.114 - 0.305	0.090 - 0.556	0.001	DOWN
GAPDH 48 h	REF	1.0	1.000				

شکل ۲- بیان ژن‌های BAX و BCL2 بعد از گذشت ۴۸ ساعت



شکل ۳- نمودار مقایسه ای میزان بیان ژن‌های BAX و BCL2





شکل ۴- محاسبه IC50 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت

بحث

در مطالعات تجربی انجام شده بررسی سم میکروسیستین استخراج شده از جلبک میکروسیستیس بر روی القای آپوپتوز و بیان ژن‌های BAX و BCL2 در رده سلولی HepG2 در کارسینومای کبد انسان صورت گرفته است و پاساژ دادن سلول‌ها و تیمار آن‌ها طی فرایند MTT Assay به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و سه بار تکرار هر آزمایش انجام شده است.

سرطان کبد ششمین سرطان شایع در جهان و یکی از کشنده ترین سرطان‌های گوارشی است و از آنجا که در مراحل پیشرفته شناسایی می‌شود چهارمین سرطان کشنده است (گایتون وهال-۲۰۱۱). عوامل بسیاری در ایجاد سرطان نقش دارند. کبد مسئولیت فیلتر کردن خون از تمام قسمت‌های بدن را دارد سلول‌های سرطانی از دیگر نقاط بدن در کبد تسلیم می‌شوند و شروع به رشد می‌کنند و با علائمی مانند تورم شکم، کاهش وزن بدون دلیل، تهوع و استفراغ، ضعف عمومی و خستگی، زرد شدن چشم‌ها و غیره.. همراه است. آنزیم آلکالین فسفاتاز یک اکتوانزیم

متصل به غشا است که به همراه تعداد دیگری از گلیکو پروتئین‌های موجود در سرم خون انسان از قبیل آلفا فتوپروتئین ترانسفرین‌های شاخص کبدی در نظر گرفته می‌شوند. افزایش غلظت‌های سرمی این پروتئین‌ها، تولید اکتوپیک آن‌ها و تغییرات الگوی گلیکوزیلاسیون آن‌ها ابزاری برای تمیز دادن سرطان کبد از انواع بیماری‌های خوش خیم کبد است.

بیش از دو هزار سال است که از جلبک‌های دریایی هم به عنوان غذای جانبی بشر و هم در پزشکی استفاده می‌شود. این جلبک‌ها که در اعماق دریاها رشد می‌کنند به ۱۲ گروه و ۳۰ کلاس مختلف طبقه بندی می‌شوند. جلبک‌های دریایی از جمله موجودات مهم دریایی هستند که به صورت مستقیم و غیرمستقیم در تغذیه انسان و تولید مواد شیمیایی مختلف به کار می‌روند (مهشید جلیلی-۲۰۰۶).

در حال حاضر اهمیت جلبک‌های دریایی به خوبی از ۳۰۰ سال پیش از میلاد در چین و ژاپن دو کشوری که به عنوان تولیدکننده و مصرف کننده جلبک، کشت عمده آن را انجام می‌دهند تاکنون شناخته شده است. عصاره خاص جلبک‌های دریایی قهوه ای و



هر دو آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری و فعالسازی کاسپاز ۹ و ۳ را القا می‌کند (Eliseo et al 2016). نشان‌هایی مبنی بر نقش پیام رسی ثانویه در سمیت سلولی و القا آپوپتوز ایجاد شده توسط میکروسیستین LR وجود دارد (Daniela Fernandes 2015).

راه‌های درمانی افراد مبتلا به سرطان کبد شامل جراحی (از جمله پیوند کبد)، تخریب بافت، امبولیزاسیون، هدف درمانی، پرتو درمانی و شیمی درمانی هستند. در حال حاضر سرطان کبد در صورتی درمان می‌شود که در مرحله اولیه (پیش از انتشار) شناسایی شده باشد تا بتواند تحت عمل جراحی قرار گیرد. در صورتیکه فرد قادر به انجام جراحی نباشد از درمان‌های دیگری برای طولانی کردن مدت زمان زنده بودن و بهبود وضعیت کلی او استفاده می‌کنند.

طبق بررسی‌های اخیر محققین داروهای شیمیایی علاوه بر هزینه‌های بالا عوارض جانبی فراوانی دارد. پرکاربردترین روش درمانی سرطان‌ها شیمی درمانی و پرتو درمانی است که عوارضی همچون تهوع و استفراغ، ریزش مو، کاهش سلول‌های سفید خون، کاهش مقاومت بدن را به دنبال دارد (فاطمه فرهمند و همکاران ۲۰۱۷). با توجه به ویژگی‌های متعدد جلبک‌های دریایی از قبیل: ضدتومور، ضدانعقاد، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضدویروسی (ایشیمی ۲۰۰۶-کوما ۲۰۰۶) و ویژگی‌های بدست آمده از جلبک میکروسیستیس که از جلبک‌های سبزآبی سیانوباکتر است می‌توان گفت که احتمالاً این جلبک برای درمان بیماری در دراز مدت سودمند خواهد بود.

نتیجه‌گیری

پس از گذشت مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت و تیمار سلول کارسینومای کبد انسان (HepG2) با سم

سبزآبی (سیانوباکترها مانند میکروسیستیس) ممکن است دارای ویژگی‌هایی از قبیل: ضد تومور، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد انعقادی و... باشند (Czabotar PE 2014). توکسین‌های سیانوباکتریایی سموم طبیعی تولیدی ذخیره شده در سلول‌های گونه‌های معین سیانوباکترها است. از نقطه نظر توکسیکولوژیکی، سیانوتوکسین‌ها در محدوده چهار دسته اصلی قرار می‌گیرند: نوروکسین‌ها، هپاتوتوکسین‌ها، سیتوتوکسین‌ها و درماتوکسین‌ها (Calteau A, Fewer E. 2008).

هنگامی که میکروسیستین LR به طور مستقیم به مرکز کاتالیزوری آنزیم‌های PPP متصل می‌شود، به طور کامل از دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم جلوگیری می‌نماید. در نتیجه فعالیت آنزیم پروتئین فسفاتاز مهار می‌شود و پروتئین‌های فسفریله بیشتری سلول‌های کبدی را ترک می‌کنند. این رویداد مسئول سمیت کبدی میکروسیستین LR می‌باشد (Pereira (SR, Vasconcelos VM. 2013).

طبق بررسی‌های اخیر محققین اینگونه بیان شد که فوکوکسانتینون باعث کاهش پایداری سلول‌های HepG2 همراه با القا شدن چرخه سلولی در مرحله G0/G1 در ۲۵ میکرومولار می‌شود (DAS et al 2008). جلبک‌های سبزآبی (BGA) حاوی اجزا مختلف زیستی فعال مانند فیکوسیانین، کاروتنوئیدها، اسید Y لینولئیک و الیاف و استرول گیاهی است که می‌تواند سلامت مطلوب را در انسان افزایش دهد. BGA می‌تواند با مهار فعالیت عامل هسته ای KB و کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی باعث کاهش التهاب شود.

BGA با مهار پراکسیداسیون چربی و فعالیت رادیکال آزاد می‌تواند برای محافظت در برابر استرس اکسیداتیو مفید باشد (Yan Jin 2017). در مطالعات Eliseo, مکمل EPA نشان داد که آپوپتوز در HepG2 سلول‌های سرطانی کبد انسان ناشی از تشکیل ROS منجر به انباشت کلسیم و افزایش فعالسازی JNK که



را به سمت سرطانی شدن سوق دهد از طرفی ژن‌های BAX پروآپوپتوزهایی هستند که افزایش بیان آن‌ها موجب افزایش نفوذپذیری غشا میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C از غشا داخلی میتوکندری طی مسیر داخلی آپوپتوز می‌شود و در نهایت باعث فعال شدن آبشار کاسپازی می‌شود، در این حالت سلول به سمت آپوپتوزی شدن و جلوگیری از متاستاز پیش می‌رود.

میکروسیستین طی روش MTT Assay و Real-Time PCR مشاهده شد که این سم بیان ژن‌های BAX را افزایش داده و موجب کاهش بیان ژن‌های BCL2 به صورت چشمگیری شده است. از آنجایی که ژن‌های BAX و BCL2 دو ژن کلیدی تنظیم کننده فرایند آپوپتوز است ژن BCL2 به عنوان یک آنتی آپوپتوز به واسطه سایر انکوژن‌ها مانند P53 و مهار سنتز و تولید کاسپازها می‌تواند فرایند آپوپتوز را مهار نماید و سلول



منابع و مأخذ

۱. بابایی، علیرضا (۱۳۸۲)، بررسی سن و عامل جغرافیایی بر سلول‌های کبدی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان.
۲. جلیلی، مهشید (۲۰۰۶)
۳. خدایی، آرش. بلندنظر، سهیلا (۱۳۹۴)، بیولوژی سرطان.
۴. فرهمند، فاطمه (۱۳۸۶)، تومورهای کبد در اطفال، ۵۲-۵۶.
۵. فرهمند، مهین. حشینی الماسی، امیر (۱۳۸۰-۱۳۸۷)، اپیدمیولوژی سرطان کبد و مجاری صفراوی.
۶. گایتون وهال (۲۰۱۱)، فیزیولوژی پزشکی، جلد ۲، فصل ۷۹.
7. Alsayyad J, Hamgleh R. (2007), cancer incidence among the bahraini population; A five-year (1998-2002) experience. *Ann Saudi Med*; 27(4): 251-80
8. Bourgeois CF. (2003), Antioxidant vitamins and health: cardiovascular disease, cancer, cataracts, and aging. New York: Hnb Pub
9. Blomhoff R. (2005), Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*; 16: 47-54.
10. Badea V, Balaban DP, Rapeanu G, et al. (2009), The antibacterial activity evaluation of *Cystoseira barbata* biomass and some alginates upon bacteria from oropharyngeal cavity. *Rom Biotechnol Lett*; 14: 4851-72.
11. Herrero A, Flores E. (2008), The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution. Norfolk: Caister Academic Press, 335-82.
12. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. (2014), Control of apoptosis by the Bcl2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014, Jan. 49-63.
13. Das SK, Hashimoto T, Kanazawa K. (2008), Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cell by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. *Appl Biochem Biotechnol*; 148(4): 178-84.
14. Daniela Fernandes, Ramos1* Alexandre Matthiensen2. (2015), Antimicrobial and cytotoxicity activity of microcystins, DOI 10. 1186/s40409-015-0009-8, 2015 Castenholz RW and Waterbury JB, 1989 cyanobacteria in Bergey's manual of systematic Bacteriology volumes. Staley. T. Bryant, mp pfennig N.
15. Pereira SR, Vasconcelos VM, Antunes A. (2013), Computational study of the covalent bonding of microcystins to cysteine residues--a reaction involved in the inhibition of the PPP family of protein phosphatases. *FEBS J*, 280: 674-80.
16. Yan Jin a, Haiyan Pei a,b. (2017) A promising application of chitosan quaternary ammonium salt to removal of *Microcystis aeruginosa* cells from drinking water, 496-5.

