

ارزیابی بیان ژن ساکس ۲ با تکنیک RT-PCR در بافت سرطانی پستان موش بالب-سی (خالص) تیمار شده با فیکوسیائین سیانوباکتری (*Anabaenasp.* ISC 55)

فرناز دیاغ مقدم^۱، سمیه حامدی^۲، مهروز دزفولیان^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی-تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران.

۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران. sahar_hamed@yaho.com

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: امروزه یکی از روش های مفید در بررسی بیماری شایع سرطان پستان، مطالعات سلولی و مولکولی است. ژن ساکس ۲ در فعال کردن سلول های بنیادی و ژن های شروع کننده تمایز نقش مهمی را ایفا می کند، در حالی که افزایش بیان این ژن در بافت های سرطانی پستان نیز مشاهده شده است. هدف از این پژوهش بررسی میزان بیان ژن ساکس ۲ در بافت های سرطانی موش-های تیمار شده با فیکوسیائین سیانوباکتری *Anabaenasp.* ISC 55 است.

روش کار: برای انجام این تحقیق، ۵۰ سر موش ماده با نژاد بالب سی (خالص) تهیه و از روش کشت تومور سرطانی در ناحیه ی پستانی، جهت القا سرطان پستان استفاده گردید. از طرفی پس از کشت سویه سیانوباکتری در محیط کشت BG11، استخراج فیکوسیائین با روش های اختصاصی صورت گرفت و سپس با نتایج به دست آمده از اسپکتروفتومتری (UV-VIS)، دوزهای ۱۰ و ۱۵۰ میکرولیتری جهت تیمار گروه های درمانی در نظر گرفته شد. پس از اتمام دوره ۲۱ روزه تزریق، از بافت ها استخراج RNA و متعاقباً ساخت c DNA صورت گرفت و در حضور پرایمر های اختصاصی و شاهد (ژن بتا اکتین)، روش RT-PCR و الکتروفورز انجام و نتایج با نرم افزارهای SPSS-16 و Image مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج حاصل از RT-PCR در بررسی های سلولی و مولکولی، نشان دهنده ی این بود که فیکوسیائین با دوز ۱۵۰ میکرولیتر تأثیر مهارکنندگی بر میزان بیان ژن ساکس ۲ در سلول های سرطانی پستاندار دارد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج، فیکوسیائین آفابنا دارای خواص ضد توموری، از طریق کاهش بیان ژن ساکس ۲ در بافت درگیر با سرطان پستان می باشد.

واژه های کلیدی: *Anabaenasp.* ISC55، فیکوسیائین، سرطان پستان، ژن ساکس ۲.

مقدمه

لوبولی و نوع مهاجم (مهاجم مجرای و کارسینوم مهاجم لوبولی) می باشند (۲۳، ۱۳). مراحل پیشروی سرطان جهت درمان و تشخیص بسیار با اهمیت می باشد که بر اساس ویژگی هایی مانند اندازه ی تومور، معاینه ی غدد لنفاوی، درگیری لوبول های ناحیه ای و متاستاز از مرحله ی صفر تا ۴ تقسیم بندی می شود و با بررسی ساختارهای بافتی و سلولی از نمونه های سرطانی پستان، در ۳ گرید ۱ و ۲ و ۳ مورد مطالعه قرار می گیرند (۳۹، ۲۳). از آن جایی که سرطان نتیجه ی به هم خوردن تعادل در مکانیسم و فرآورده های ژن هایی که عملکرد مهار

طی تحقیقات انجام شده، سرطان پستان به عنوان شایع ترین نوع سرطان بدخیم در زنان سراسر دنیا شناخته شده است و زنان با سن ۶۰-۴۰ سال در مرکز ابتلا به این بیماری قرار گرفته اند (۲۶، ۲۳). شیوع سرطان پستان در ایران، ۱۲۰ نفر در هر ۱۰۰ هزار زن برآورد شده است که این آمار نشان گر پیش گرفتن سیر افزایشی این بیماری در میان زنان ایرانی می باشد (۲۹). کارسینوم پستان به دو گروه مهاجم و غیر مهاجم تقسیم می شوند که حدود ۳۰-۱۵٪ و ۷۰-۸۵٪ تمام سرطان های پستان به ترتیب از نوع غیرمهاجم (کارسینوم داخل مجرای و کارسینوم

کنندگی تقسیم را به عهده دار می باشند، چهار دسته از ژن های کلیدی که شامل انکوژن ها، مهار کنندگان، ترمیم کنندگان DNA و ژن های دخیل در آپاپتوز می باشند در هدایت سلول های سرطانی نقش مهمی ایفا می کنند (۴،۳۱). یکی از ژن های مطرح در بیماری سرطان بستان ژن ساکس ۲ می باشد. ساکس ۲، ژن مهمی جهت ایجاد توانایی خود بازسازی بوده که عملکرد خود را با فعال کردن سلول های بنیادی و در نقطه مقابل با مهار کردن ژن های شروع کننده تمایز ایفا نموده و با این مکانیسم قابلیت خود تجدیدی سلول های بنیادی را در بدن حفظ می کند (۵). ساکس ۲ یک ژن کلیدی است که تغییرات در میزان بیان اش منجر به بیماری می شود، این ژن دارای ۲۵۱۳ جفت باز، DNA خطی و فاقد اینترون می باشد که درون اینترون ژن دیگری به نام Sox2-OT قرار دارد و جهش در این ژن، منجر به بروز آنوفتالمی دو جانبه می گردد که نقص شدید در ساختار چشم ها پدید می آورد (۱۸،۲۵). تنظیم ساکس ۲ به صورت اپی ژنتیکی صورت می گیرد و حذف این ژن شروع سرطان را مهار می نماید که برای تومورزدایی بسیار مهم است، در واقع حذف سلول های سرطانی با بیان مثبت ساکس ۲ موجب تحلیل رفتن تومور می شود (۵). امروزه یکی از گسترده ترین مطالعات برای درمان سرطان، در ارتباط با اثرات ضد سرطانی سیانوباکتری ها می باشد. سیانوباکتری ها در یک کلاس از باکتری های گرم منفی در نظر گرفته می شوند (۳۷). این موجودات یکی از قدیمی ترین پروکاریوت های روی کره ی زمین هستند که شبیه به دیگر گیاهان عالی توانایی فتوسنتز را دارند. گونه ی *Anabaena sp.* ISC 55 در منطقه ای با مقیاس جغرافیایی ($X = 0339545$ $Y = 3535959$) مسجد سلیمان در جنوب ایران جداسازی و مورد کشت قرار گرفته است (۳۸). به دلیل داشتن هتروسیست در ساختار فیزیولوژیکی، همانند گونه های *Nostoc*, *Aulosira*

راسته ی *Nostocales* طبقه بندی گردیدند (۲). جذب نور موثر در این جانداران توسط ساختارهایی به نام فایکوارترین صورت می گیرد (۱۹)، که به بخش های سلولی سازمان یافته ای به نام فایکویلی زوم ها که به صورت منظم در سطح غشا خارجی تیلاکوئید قرار گرفته اند، متصل شده اند و به عنوان رنگدانه های اصلی برای دریافت نور در سیانوباکتری ها و جلبک های قرمز شناخته می شوند (۲۱). فایکوارترین ها رنگدانه های تترا پیرولی با زنجیره های باز هستند که از چند زنجیره ی آپوپروتئینی تشکیل شده و به صورت تکووالانسی به فایکوبیلین ها متصل اند (۴۰) و انرژی را دریافت کرده و به ترتیب به بیلی پروتئین فیکوسیانین، آلفوفیکوسیانین و کلروفیل منتقل می کنند و عمل فتوسنتز از این طریق صورت می گیرد (۱۹). ساختارهای فایکویلی پروتئین بر اساس رنگشان به دو گروه فیکوسیانین (آبی) و فایکوارترین (قرمز) تقسیم می شوند که دارای رنگ های درخشان، خاصیت فلورسنتی بالا، اجزاهای پروتئینی محلول در آب از نوع کمپلکس های گیرنده های نورفتوستنتیک، می باشند (۸). بیلی پروتئین فیکوسیانین محلول در آب و غیر سمی بوده به: سی فیکوسیانین (C-PC)، آر فیکوسیانین (R-PC) و آلو فیکوسیانین تقسیم و دارای طول موج ۶۳۸-۶۲۰ نانومتر می باشد (۲) که نسبت به نور حساسیت دارد و به دلیل داشتن خاصیت فلورسنتی به عنوان Photosensitizer جدید برای فتودینامیک تراپی پیشنهاد شده است (۱۰). فیکوسیانین دارای خواص: ضد باکتریایی (۴۱،۲۷)، ضد دیابتی (۲۲)، ضد ویروسی (۹)، آنتی اکسیدانی (۲۴)، ضد التهابی (۲۰)، مهار رادیکال های آزاد (۲۴،۳۰)، ضد قارچی (۹) و ضد سرطان (۲۴، ۲۸، ۳۶) می باشد که در واقع به عنوان نوعی القا کننده برای آپاپتوز سلول های سرطانی از طریق دپلمیریزاسیون میکروتوبول ها و میکروفلامنت ها (۲۴)، کاهش سیکلو اکسیژناز (۲۴)، فعال سازی کاسپازهای ۳

pH مخلوط گردید و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس در دور RPM ۱۰/۰۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۱۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد که در نهایت بالاترین طول موج و نسبت جذب نوری فاز رنگی به دست آمده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری UV-VIS اندازه گیری و پس از استریل شدن توسط فیلترهای میکرونی، در محیطی تاریک در یخچال تا زمان استفاده نگهداری شد (۳).

حیوانات مورد مطالعه

در این مطالعه از ۵۶ سر موش ماده نژاد بالب-سی (خالص) که از انستیتو پاستور (تهران-ایران) خریداری و در حیوان خانه ی دانشگاه آزاد واحد کرج با شرایط محیطی مناسب، شامل دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، رطوبت ۴۵٪ نگهداری شدند. موش ها به مدت یک هفته با شرایط محیط آشنا و در پایان هفته ی اول به صورت تصادفی در ۶ گروه ۸ تایی (درمانی، شاهد) گروه بندی و در قفس های مخصوص و پلاستیکی جداگانه نگهداری گردیدند.

القای سرطان پستان

۱ سر موش ماده با نژاد Balb/c (خالص) با تومور القا شده ی پستان توسط رده ی سلولی 4T1 از مرکز تحقیقات سرطان پستان تهران خریداری و در شرایط استریل آزمایشگاهی نخاعی شد. سپس روی سطح مسطحی در تشکک تشریح فیکس و به کمک تیغ اسکالپل ناحیه ی حاوی تومور باز و تومور به صورت کامل از بدن حیوان خارج گردید و به درون پلیت شیشه-ای حاوی نرمال سالین ریلود منتقل گردید. سپس تمام قسمت های آپاتوز شده به کمک پنس با تیغ اسکالپل جدا و بافت های توموری در ابعاد ۳ میلی متر در ۳ میلی متر برش داده شدند. از طرفی ۸ سر موش ماده ی سالم با نژاد Balb/c ۵ تا ۷ هفته ای که به مدت ۷ روز آداپته شده بودند برای القای تومور اولیه انتخاب گردیدند. سپس با تزریق ماده ی بیهوشی کتامین و زایلوزین با دوز

۸ و در مسیر آپاتوز (۳۵)، دکربوکسیلار اورنیتین (۳۵) و نیز ایجاد تغییراتی در مرحله ی G0/G1 می باشد (۳۵). امروزه جهت تهیه ی مدل های سرطانی حیوانی، از رده های سلولی حیوانی استفاده می شود که یکی از این رده ها، رده ی سلولی 4T1 می باشد. رده سلولی توموری موش (4T1) یکی از رده های مربوط به سرطان پستان می باشد (۳۲). 4T1 از تومور خود به خود ایجاد شده در موش های نژاد BALB/c مشتق شده است که در محیط آزمایشگاهی دارای سرعت تکثیر بالا و نیز توانایی متاستاز به بافت های درگیر در طی سرطان پستان مانند ریه، کبد، مغز و استخوان را دارا می باشد (۷، ۱۲). در این مطالعه تاثیرات ضد سرطانی فیکوسیائین استخراج شده از سیانوباکتری *Anabaena sp. ISC 55* بر میزان بیان ژن ساکس ۲ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

سویه سیانوباکتری و کشت آن

نمونه ی سیانوباکتری *Anabaena sp. ISC 55* از پژوهشکده علوم کاربردی جهاد دانشگاهی واحد شهید بهشتی تهران تهیه گردید. سیانوباکتری ها به مدت ۱۲ هفته در محیط کشت BG11 (نیترات سدیم، فریک آمونیوم، سیتریک اسید، سولفات منیزیم، سدیم کربنات، EDTA، کلسیم کلراید دو آب، دی پتاسیم فسفریک اسید)، در مجاورت نور سفید لامپ های فلورسنتی، با طول روشنایی ۶۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه در دو ردیف بالا و پایین، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به صورت شبانه روزی کشت داده شدند و در محیط استریل شرایط رشدشان کنترل گردید.

استخراج فیکوسیائین

پس از رسیدن به فاز سکون رشد، سیانوباکتری ها در محیط استریل هود لامینار جداسازی شدند و با قرار گرفتن در انکوباتور ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردیدند. سپس ۴۰ میلی گرم از پودر حاصل با ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات (۱۰۰ میلی مولار، ۷/۵

استخراج RNA و سنتز c DNA

پس از اتمام دوره ی درمان ۲۱ روزه برای بررسی بیان ژن های مورد مطالعه در این پژوهش از تمامی گروه‌ها (تیمار و شاهد) ۵ سر موش به صورت تصادفی انتخاب و پس از استخراج بافت های پستانی، یک میلیون سلول جداسازی و سپس با استفاده از محلول استخراج (سیناژن، RNX Plus)، RNA کل (Total RNA) از سلول های سرطانی استخراج شد. پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری، از مقداری معین از RNA به همراه پرایمر و آنزیم ترانس کریپتاز نسخه برداری معکوس انجام شد. سپس از c DNA تولید شده به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت تکثیر قطعه مورد نظر استفاده گردید و در نهایت ژل ها با تکنیک الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

طراحی پرایمرها

پرایمرهای ساکس ۲ و بتا اکتین به صورت لیوفلیزه از شرکت ژن فناوریان تهیه گردیدند (جدول ۲). پس از رقیق سازی پرایمرها مطابق با دستور العمل زیر غلظت نهایی پرایمرها به ۱۰ میکرومول رسیده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تجویز ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم از وزن بدن بیهوش شدند. تزریق ماده ی بیهوشی به صورت درون صفاقی صورت گرفت. سپس در ناحیه ی بالای ران، قسمت راست بدن با کمک تیغ اسکالپل شکافی در حدود چند میلی متر ایجاد و سپس با پنس یک قطعه از بافت توموری در ناحیه ی زیر جلد قرار گرفت و با کلیپس بخیه، بخیه زده شد. در طول ۱۰ روز نواحی جراحی شده با بتادین ضد عفونی و پس از ۲ هفته موش ها سرطانی شده و تومورشان مشاهده گردید. سپس با استفاده از همین دستورالعمل القای تومور ثانویه ۳۲ موش انجام و بعد از ۱۰ روز جهت تیمار آماده شدند (۱).

تزریق فیکوسیانین و پکلی تاکسل

برای فیکوسیانین دو دوز در نظر گرفته شد که دوز اصلی از رابطه ی $(0/5mg/1kg)$ محاسبه گردید. برای تعیین دوز تزریقی داروی پکلی تاکسل (یک داروی ضد سرطان سایتواستاتیک از خانواده تاکسان ها می باشد که در درمان سرطان سینه، تخمدان، سر و گردن و سلول های غیر کوچک ریه مورد استفاده قرار می گیرد (۱۴)) به عنوان کنترل، از رابطه ی $(10mg/1kg)$ استفاده گردید که پس از رساندن به رقت مناسب در حضور محلول سدیم کلراید ۰/۹٪ به صورت درون صفاقی به مدت ۲۱ روز، روزانه در ناحیه نزدیک به تومور تزریق شد (جدول ۱).

جدول ۱- برنامه دوره درمانی گروه های تیماری و شاهد

گروه	نوع گروه	مسیر تزریق	مقدار تزریق	ماده تزریقی	تعداد موش ها
۱	شاهد	توموری	درون صفاقی	۱۵۰ μl آب مقطر	۸
۲	شاهد	نرمال	درون صفاقی	۱۵۰ μl آب مقطر	۸
۳	شاهد	نرمال	درون صفاقی	۱۵۰ μl فیکوسیانین	۸
۴	درمانی	توموری	درون صفاقی	۱۵۰ μl فیکوسیانین	۸
۵	درمانی	توموری	درون صفاقی	۱۰ μl فیکوسیانین	۸
۶	درمانی	توموری	درون صفاقی	۱۰۰ μl پکلی تاکسل	۸

جدول ۲- اسامی ژن ها و توالی مربوط به آغازگرهای بالادست (F) و پایین دست (R)

ژن	آغازگر تواف	دمای آنیلینگ °C	طول قطعه (bp)
SOX2	F5'-GCA CAT GAA CGG CTG GAG CAA CG-3'	۶۲	۲۰۷
	R 5'-TGC TGC GAG TAG GAC ATG CTG TAG G-3'	۶۲	۲۰۷
Bactin	F5'-GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C-3'	۶۲	۱۴۷
	R 5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C-3'	۶۲	۱۴۷

سطح زیر نمودارها آنالیزی از بیان ژن ساکس ۲ در حضور ژن شاهد بتا اکتین به دست آمد.

تجزیه و تحلیل داده ها

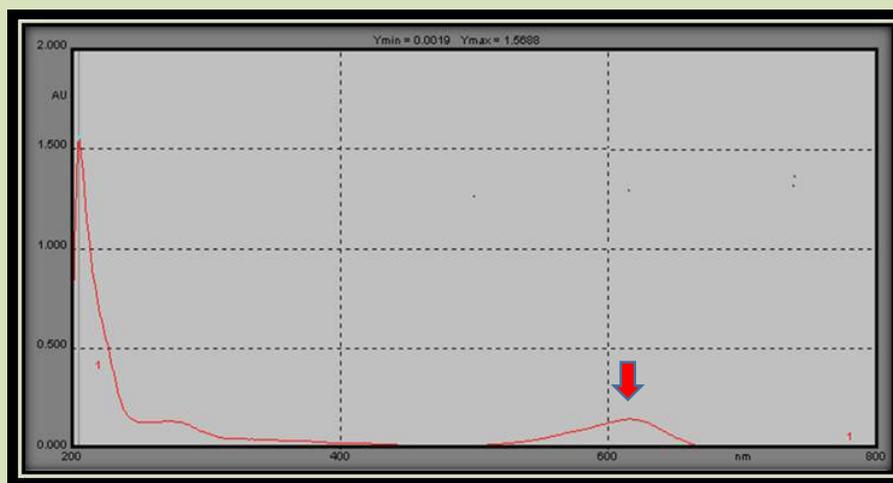
جهت تجزیه تحلیل اطلاعات از نرم افزار J Image و SPSS-16 استفاده گردید.

نتایج

نتیجه‌ی تکنیک اسپکتروفتومتری (UV-VIS) در نمونه فیکوسیائین استخراج شده، بالاترین میزان جذب نوری را در ۶۲۰ نانومتر نشان داد (نمودار ۱). پس از استخراج RNA از بافت نمونه های مورد مطالعه، توسط تکنیک RT-PCR تغییرات بیان ژن ساکس ۲ بررسی شد (شکل ۱).

استفاده از نرم افزار J Image

در راستای آنالیز بیان ژن ساکس ۲، تعداد و شدت باندهای تشکیل شده در تمامی نمونه های مورد مطالعه از نرم افزار J Image استفاده گردید. عکس ژل به برنامه وارد و سپس پس زمینه ی آن حذف و مسیرهای بارگیری انتخاب شد. پس از شماره گذاری مسیرهای مورد نظر برای بررسی در پنجره رسم نمودار، نمودارهای مسیرهای بارگیری بر اساس میزان تاریکی توسط نرم افزار رسم گردید. با انتخاب سطح زیر نمودار برای هر یک از نمودارهای زنگوله ای در پنجره ی نمایش مساحت آن سطح محاسبه گردید. با مقایسه مجموع مساحت های



نمودار ۱- محصول اسپکتروفتومتری (UV-VIS) فیکوسیائین سیانوباکتری ISC 55 *Anabaena sp.*



شکل ۱- بیان ژن بتا اکتینین (۱۴۷bp) با استفاده از روش RT-PCR در نمونه های توموری و سالم پستان.

M مارکر ۱۰۰ bp. ستون ۱ به عنوان شاهد منفی، ستون ۲ گروه تیمار شده با فیکوسیائین آنابنا ۵۵ (دوز ۱۵۰ میکرولیتر)، ستون ۳ به عنوان شاهد مثبت، ستون ۴ گروه تیمار شده با فیکوسیائین آنابنا ۵۵ (دوز ۱۰ میکرولیتر)، ستون ۵ گروه شاهد با تزریق فیکوسیائین آنابنا ۵۵ (دوز ۱۵۰ میکرولیتر)، ستون ۶ گروه تیمار شده با پکلی تاکسل (دوز ۱۰۰ میکرولیتر) می باشد که در تمامی گروه ها بیان مشاهده گردید.

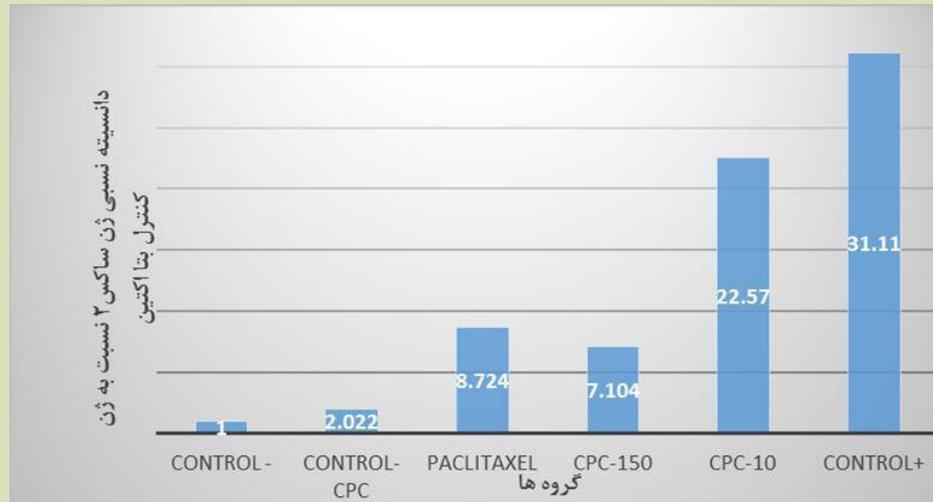


شکل ۲- بیان ژن ساکس ۲ (۲۰۷bp) با استفاده از روش RT-PCR در نمونه های توموری و سالم پستان.

M مارکر ۱۰۰ bp. ستون ۱ به عنوان شاهد مثبت، ستون ۲ گروه تیمار شده با فیکوسیائین آنابنا ۵۵ (دوز ۱۵۰ میکرولیتر)، ستون ۳ گروه شاهد با تزریق فیکوسیائین آنابنا ۵۵ (دوز ۱۵۰ میکرولیتر)، ستون ۴ به عنوان شاهد منفی، ستون ۵ گروه تیمار شده با پکلی تاکسل (دوز ۱۰۰ میکرولیتر)، ستون ۶ گروه تیمار شده با فیکوسیائین آنابنا ۵۵ (دوز ۱۰ میکرولیتر). در تمامی گروه ها بیان ژن ساکس ۲ مشاهده شد که تراکم و شدت بیان متفاوت می باشد.

ی کمتری را نمایش می دهد در حالی که گروه دریافت کننده ی داروی پکلی تاکسل دانسیته ی نزدیکتری به فیکوسیائین دوز بالا دارا می باشد. در مقایسه اعداد به دست آمده می توان بیان کرد که در گروه های درمانی تیمار شده با دوز بالای فیکوسیائین میزان دانسیته ی نسبی به مراتب کمتری از گروه دریافت کننده ی فیکوسیائین با دوز پایین و شاهد مثبت نمایش می دهد در حالی که اختلاف کمتری با گروه دریافت کننده ی داروی پکلی تاکسل دارد (نمودار ۲).

نتایج حاصل از نرم افزار Image J در ارتباط با شدت و دانسیته نسبی باندهای مزبور به ژن ساکس ۲ نسبت به ژن شاهد بتا اکتینین در گروه های تیمار-شاهد به صورت نمودار مستطیلی (نمودار ۲) تهیه گردید. بالاترین دانسیته نسبی ژن ساکس ۲ مربوط به گروه شاهد مثبت می باشد و در نقطه ی مقابل کمترین مقدار را گروه شاهد منفی به خود اختصاص داده است. در این میان گروه تیمار شده با دوز بالای فیکوسیائین (۱۵۰ میکرولیتر) در مقایسه با گروه تیمار شده با فیکوسیائین دوز پایین (۱۰ میکرولیتر) دانسیته



نمودار ۲- اثر تیمار با فیکوسیپانین آنابنا بر بیان ژن ساکنین ۲ Sp.ISC55

بحث و نتیجه گیری

سبز آبی باعث شد تا به دلیل داشتن تاثیرات ضد سرطان اثبات شده در ارتباط با این سیانوباکتری ها، این مطالعه صورت گیرد. سلطانی و همکاران در سال ۱۳۹۱ گروهی از گونه های مختلف سیانوباکتری استخراج شده از جنوب ایران را مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه ی آنان، برای اولین بار بررسی های مولکولی *Anabaenasp. ISC 55* انجام گرفت. شناسایی مولکولی برای گونه های سیانوباکتری سبز آبی مثل آنابنا با توجه به سکانس sr RNA 16 بررسی و انگشت نگاری پروفایل ریز جلبکی *Anabaenasp. ISC 55* انجام شد (۳۸). به طوری که از سال ۱۹۸۷ محققان دانشگاه هاروارد بررسی های با ارزشی در ارتباط با فیکوسیپانین آغاز کردند. در این دانشگاه از سال ۲۰۰۰ گونه ی سیانوباکتری اسپیرولینا و سایر گونه های میکروجلبکی مورد کشت قرار گرفتند و اثرات آن ها بر روی سلول های مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج امید بخش حاصل از آزمایشات اثر فیکوسیپانین روی سلول ها در این دانشگاه مشاهده ی ۴۹٪ کاهش در تکثیر رده سلول های لوسمی و ۵۰٪ کاهش در تکثیر رده سلول های سرطانی کبد می باشد که در اتصال فیکوسیپانین با سلنیوم، پتانسیل ضد تکثیری در برابر سلول های ملانوما و

سرطان پستان بدخیمی شایع در زنان سراسر دنیا می باشد که در کشورهای غربی بین سن ۴۴ تا ۳۵ و در ایران در بین سن های ۵۵-۴۰ سال شایع تر می باشد. تشخیص زود به هنگام این بیماری در مراحل اولیه و از طرفی پیدایش راه های جدید درمانی می تواند تاثیر حائز اهمیتی در روند زندگی این افراد داشته باشد (۲۶، ۲۳، ۱۰). بررسی های سلولی و مولکولی در راستای مطالعات ژنتیکی بخشی از این مسیرهای مورد اهمیت می باشد. در این مطالعه از موش های ماده نژاد بلب سی (خالص) جهت مدل سازی سرطان پستان استفاده شد که از این طریق امکان بررسی و سنجش اثر بخشی پروتئین فیکوسیپانین امکان پذیر گردید (۳۴، ۱۱). جهت القا سرطان پستان در این مدل ها از رده ی سلولی 4T1 که برای اولین بار از تومور پستانی که خود به خود در موش های بلب سی ایجاد شده بود و توسط Aslakson و همکارانش در Karmanos Cancer Institute به دست آمده بود استفاده گردید (۴۲). مطالعات صورت گرفته در ارتباط با تاثیرات ضد سرطانی گیاهان از جمله گون، قارچ موسوم به گانو درما لوسیدوم (۸، ۶)، عصاره آبی برگ خربزه درختی *Carica papaya*، خار مریم (۴۳) و پروتئین فیکوسیپانین سویه های مختلف سیانوباکتری های

آدنوکارسینومای سینه MCF-7 مشاهده شد (۲۱)، این نتایج با یافته‌های حاصل از این مطالعه با انجام تست MTT و تعیین درصد سایتوتوکسیسیته فیکوسیانین بر سلول‌های 4T1 همسو بود. Subhashini و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مطالعات بیشتری با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و میکروسکوپ الکترونی بر روی اثرات بالای C-PC به دست آمده از سیانوباکتری *Spirulina platensis* بر روی رشد و تکثیر رده‌ی سلولی k562 در سلول‌های لوکمی میلوییدی مزمن انسانی انجام دادند که اشکال آپاپتوزیس مانند انقباض غشا و تراکم هسته‌ی ای را به وضوح نشان داد (۱۰). Kuddus و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که C-PC می‌تواند برای درمان LPS مربوط به آسیب حاد ریه با مهار پاسخ التهابی و ایجاد آپاپتوز در بافت‌های ریه به درمان کمک کند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های مهارری رادیکال‌های آزاد از مستندات بسیار با ارزش C-PC می‌باشد (۲۲). Hsiao-Wei و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در ارتباط با تصفیه و فعالیت ایمونولوژیکی C-PC استخراج شده از *Spirulina platensis* به مطالعه پرداختند و از رده‌ی سلولی ماکروفاژ موشی 774A.1 ریه عنوان یک مدل تجربی استفاده کردند. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که C-PC قابلیت خاصی در القاء ترشح سایتوکاین‌های التهابی از جمله IL-6، IL-1 و TNF دارد که به دنبال آن پروتئین COX-2 وابسته به دوز نیز بیان می‌شود و در نهایت با تحریک توسط ماکروفاژها، سیستم ایمنی بدن افزایش می‌یابد (۲۰). محمودی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ مطالعه‌ی ای در ارتباط با ژن ساکس ۲ انجام دادند (ساکس ۲ متعلق به گروهی از فاکتورهای رونویسی است که با کاهش سطح بیان آن باعث افزایش توانایی مهاجرت و تهاجم در سرطان معده می‌شود) در مطالعه آنان برای اولین بار با مهار ژن PIGF توسط تکنیک siRNA در رده سلولی AGS میزان بیان

ژن ساکس ۲ توسط روش real time PCR اندازه‌گیری و مشخص شد که در پی کاهش بیان PIGF بیان ژن ساکس ۲ در رده سلولی AGS افزایش یافته است. نتایج حاصل از این مطالعه بیان‌کننده تاثیر بیان PIGF بر بیان ژن ساکس ۲ می‌باشد. با توجه به یافته‌های گذشته افزایش بیان ژن ساکس ۲ احتمالاً باعث کاهش توانایی مهاجرت و تهاجم در سلول‌های AGS می‌شود (۲۵). هم چنین امینی و همکارانش در سال ۱۳۸۹ بیان ژن‌های خودبازسازی oct-4، nucleostemin، nanog، ساکس را در رده‌های سلولی سرطانی کولون HT-29 و Caco2 مورد بررسی قرار دادند. مطالعه آن‌ها نشان داد که در سلول‌های سرطانی کولون، ژن‌های خودبازسازی، از جمله ساکس ۲ به میزان بالایی بیان می‌شود (۵). با توجه به مطالعات جدیدی که صورت گرفته است، دسته‌ی جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان تحت عنوان ژن‌های کنترل‌کننده سلول‌های خودبازسازی سلول‌های بنیادی، معرفی شده است که بیان کنترل نشده‌ی این ژن‌ها باعث ایجاد سرطان می‌شود (۳۳، ۱۵). ژن ساکس ۲ یکی از این ژن‌های خودبازسازی می‌باشد که در تنظیم نوروزنر سیستم عصبی جنین در حال تکوین نقش مهم و با ارزشی دارد و از طرفی در مهار تمایز و در تکثیر و حفظ سلول‌های بنیادی موثر می‌باشد (۱۶). افزایش بیان ژن ساکس ۲ در انواع مختلفی از سرطان‌ها مشاهده شده است که می‌توان به بیمارانی با کارسینوم تخمدان و سرطان پستان ملانوما اشاره کرد (۳۷). در سال ۲۰۰۹ Schoenhals و همکارانش ارتباط معنی‌داری را بین درجه بدخیمی تومور و افزایش بیان ژن ساکس ۲ در سرطان‌های مثانه، کبد و مغز پیدا کردند (۳۷). در اواخر سال ۲۰۰۹ متیو و همکارانش بیان هم‌زمان ژن‌های ساکس ۲ و Oct-4 را در سرطان‌های بدخیم پروستات، مثانه، مغز، ریه نشان دادند (۳۷) که در پی مطالعات کرسیتیل و همکارانش در سال ۲۰۰۷ که مطالعاتشان را در

تومورپستان که توسط رده سلولی 4T1 القا شده بود و توسط فیکوسیانین استخراج شده از سیانوباکتری ISC 55 *Anabaenasp.* تیمار شده بود نشان داد، حائز اهمیت می باشد. با توجه به این موضوع انجام مطالعات بیشتر و بررسی‌های دیگر در جهت شناخت مکانیسم های دقیق تر این تاثیرات ضروری به نظر می رسد.

7. Baliga, M.S., Meleth, S., Katiyar, S.K. (2005). Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells invitro and invivo systems. *Clin Cancer Res*, 11(5); 1918-27.
8. Bashash, D., Safa, M., Shahbazi, A., Mohammadian, M., Shah-Mohammad, N. (2012). Apoptotic effect of milk thistle extract on human breast cancer MCF-7 cell. *Journal research-cam spring*, 2 (1); 85-95.
9. Bhat, V.B., Madyastha, K.M. (2000). C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 275(1); 20-25.
10. Bing, L., Xianming, C., Meihua, G., Wuxiu, L. (2010). Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoyanin. *Acta Biochim Biophys*, 80-89.
11. Disease control center, department of non - communicable diseases, cancer management cancer registries country report 1382, published Avl. *Thran. antsharat old trick*, 38-25.
12. DuPre, S.A., Redelman, D., Hunter, K.W. Jr. (2007). The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumors and metastatic tumor foci. *Int J Exp Pathol*, 88(5); 351-60.
13. Ellisen, L.W., Haber, D.A. (1998). Hereditary breast cancer. *Annual Rev Med*, 49; 425-36.
14. Evans, W.C. (2002). *Trease and evans pharmacognosy*. W.B.Saunders. Edinburgh, London, New York.
15. Ezech, U.I., Turek, P.J., Reijo, R.A., Clark, A.T. (2005). Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer*, 104(10); 2255-65.

ارتباط با بیان هم زمان دو ژن Sox2، Nanog و Oct-4 بود اثبات کردند (۱۷). در آنالیز باندهای به دست آمده از تمامی گروه‌ها (درمانی-شاهد) با کمک تکنیک RT-PCR و بررسی به کمک نرم افزار Image J مشاهده شد که گروه درمانی با تیمار دوز بالا برای فیکوسیانین (۱۵۰ میکرولیتر) نسبت به گروه کنترل از نظر دانسیته دارای کاهش آماری معنی داری می باشد. نتایج این پژوهش به دلیل این که برای اولین بار بیان ژن ساکس ۲ را در بافت

منابع

- ۱- امیرپور اصل، ص.، نیونی، م.، یزدانیان، ز.، رفوئی، م. ۱۳۹۴. اثرات ضد توموری ترکیب جدیدتری آنزنی: یک مطالعه آزمایشگاهی. فصلنامه علمی-پژوهشی ابن سینا. اداره بهداشت امداد و درمان نه‌جا. سال ۱۷. شماره ۲.
- ۲- بابایی، ث. ۱۳۹۰. بررسی اثرات نفت خام بر رشد، فتوسنتز و فعالیت آنزیم نیتروژناز در سیانوباکتری *Aneabana.sp. ISC55*، پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم.
- ۳- فرجی، د.، رضایی، ک.، کلاتری، م.، هاشمی روان، م. ۱۳۹۳. بهینه سازی شرایط مختلف (دما، تغییر شدت نور، روش های کشت (غیر مداوم و نیمه مداوم) و نوع منبع کربنی برای تولید حداکثر فایکوسیانین توسط ریزجلبک اسپروئینا پلاتنسیس (*Arthrospira platensis*). علوم غذایی و تغذیه. سال دوازدهم. شماره ۱.
4. Abbas, A.K., Lichman, A.H., Pillai, S. (2009). *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. China: Elsevier.
5. Amini, S., Fathi, F., Parivar, K., Nikkho, B., Sofimajidpour, H., Mobaleghi, J., Davari, B. (2011). Evaluation of the expression of self-renewal genes (Oct-4, Nanog, Sox2, Nucleostemin, Bmi and Zfx) in bladder, colon and prostate cancers and in cancer cell lines (LNCaP, HepG2, HT-29, CaCo2, HT-1376). *Urinary Bladder Neoplasms Sci J Iran Blood Transfus Organ*, 8(3); 174-185.
6. Aslakson, C.J., Miller, F.R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res*, 52(6); 1399-405.

16. Ferri, A.L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15); 3805-19.
17. Freberg, C.T., Dahl, J.A., Timoskainen, S., Collas, P. (2007). Epigenetic reprogramming of Oct-4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell*, 18(5); 1543-1553.
18. Gilbert, S. (2011). *Developmental Biology*. biology homes. Chapter 9.(2).
19. Hanukoglu, I., Tanese, N., Fuchs, E. (1983). Complementary DNA sequence of a human cytoplasmic actin. Interspecies divergence of 3' non-coding regions. *J Mol Biol*, 163(4); 673-8.
20. Hsiao-Wei, C., Tsung-Shi, Y., Mao-Jing, C., Yu-Ching, C., Eugene I-Chen, W. (2014). Purification and immunomodulating activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochemistry*, 49; 1337-1344.
21. Itokawa, H., Lee, K-H. (2002). *Taxus* the genus *Taxus*. Taylor and Francis. London and New York.
22. Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycoerythrin, Hindawi Publishing Corporation, 9 pages.
23. Kumar, V., Robbins, S., Cotran, R. (1999). *Raobbins pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: sa unders, 1623-6.
24. Li, B., Gao, M.H., Zhang, X.C., Chu, X.M. (2006). Molecular immune mechanism of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnol Appl Biochem*, 43(3); 155- 164.
25. Mahmoudi, F. (2013). SOX-2 gene expression levels of PIGF gene silencing by siRNA technique in AGS cell line, a quarter of breast disease. *Biotechnol Appl Biochem*, 27(4); 779-783.
26. Majd, M., Delaware, B., Yaghubi, P. (2002). *Avl. Thran Znan. chap common national program for cancer: The Ministry of Health*, 4.
27. Murugan, T., Radhamad, H. (2011). Screening for antifungal and antiviral activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *J Pharm Res*, 4(11); 4161- 4163.
28. Najdenski, H., Gigova, L., Iliev, I., Pilarski, P., Lukavský, J., Tsvetkova, I., et al. (2013). Antibacterial and antifungal activity of selected microalgae and cyanobacteria. *Int J Food Sci Technol*, 48(7); 1533-1540.
29. Orangy, E., Hojati, Z., Ghaedi, K., Tabatabaeean, M. (2012). Comparison of the HER2/neu gene amplification assesment by differential PCR and immunohistochemistry in breast cancer patients in Isfahan. *J Shahrekord Univ Med Sci*, 13(5); 71-82.
30. Ou, Y., Lin, L., Yang, X., Pan, Q., Cheng, X. (2013). Antidiabetic potential of phycocyanin: Effects on KKAy mice. *Pharm Biol*, 51(5); 539-544.
31. Parsa, N. (2011). The pious, cellular and molecular basis of cancer in human. *Cells and Tissues Magazine (Science and Technology)*, 2 (4); 376-365.
32. Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. Chapter, 20(20); Unit 202.
33. Rodda, D.J., Chew, J.I., Lim, L.H., Loh, Y.H., Wang, B., Ng, H.H. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280(26); 24731-7.
34. Rosen, L.S., Ashurst, H.L., Chap, L. (2010). Targeting signal transduction pathways in metastatic breast cancer: a comprehensive review. *Oncologist*, 15(3); 216.
35. Roy, K.R., Arunasree, K.M., Reddy, N.P., Dheeraj, B., Reddy, G.V., Reddanna, P. (2007). Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicinresistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. *Biotechnol Appl Biochem*, 47(3); 159-167.
36. Sarada, D., Kumar, S.C., Rengasamy, R. (2011). Purified C phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 27(4); 779-783.
37. Schoenhals, M., Kassambara, A., De Vos, J., Hose, D., Moreaux, J., Klein, B. (2009). Embryo nic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 383(2); 157-6.
38. Soltani, N., Baftechi, L., Dezfulian, M., Shokravi, S.H., Alnajjar, N. (2012). Molecular and morphologi cal characterization of oil polluted. *Int J Environ Res*, 6(2); 481-492.
39. Vinay, K., Abbas, F. (2005). *Pathologic Basis of Disease*. 7 th edition, Saunders, 862-867.
40. Vonshak, A. (1977). *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell biology and bio Te Ch nol ogy. Taylor and Francis, London, 117-130.
41. Wang, H. (2008). The C-phycoerythrin/beta protein inhibits cancer cell proliferation. *Biology Theses*, Department of Biology, Georgia State University, 4-22.

42. Weigelt, B., Baehner, F.L., Reis-Filho, J.S. (2010). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*, 220(2); 263-80.

43. Yahaghi, L. (2011). The effect of caricapapaya on the IFN and IL-4 expersion in mice with breast cancer. *journal of Iranian breast cancer*, 16(3); 44.



