

## Antioxidant Effects of C-Phycocyanin in Colon Cancer Cell Lines *in vitro* and *in vivo*

Leyla Najafi<sup>1\*</sup>, Mohammad Fazilati<sup>2</sup>, Hossein Salavati<sup>3</sup>

1. Ph.D., Biochemistry Department, Payame Noor University, Iran

2. Professor of Biochemistry Department, Payame Noor University, Iran

3. Associate Professor of Chemistry Department, Payame Noor University, Iran

(Received: Mar. 1, 2021 - Accepted: Oct. 17, 2021)

## بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین بر سلول‌های سرطان کولون در *in vitro* و *in vivo*

لیلا نجفی<sup>۱\*</sup>، محمد فضیلتی<sup>۲</sup>، حسین صلواتی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور اصفهان، ایران

۲. استاد بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور اصفهان، ایران

۳. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۲۵)

### Abstract

C-Phycocyanin has been demonstrated to have a series of pharmacological attributes without leading to toxicity. The aim of this study was to evaluate potential of anti-cancer and antioxidant C-PC on CT-26 and HT-29 cell lines *in vitro* and in Balb/c mice. The CT-26 and HT-29 cells were treated with various concentrations of C-PC extract (1-100 $\mu$ g/ml) in 48hr. Antiproliferative effect was measured by morphological observations, DAPI and AO/PI Staining, MTT assay, fluorescence microscope and Flow cytometry assays. Antioxidant effects of C-PC on CT-26 tumor cells transplanted in Balb/c mice was also checked out *in vivo*. Male Balb/c mice were tested in four groups. group 1 was considered as control. Group 2 were fed by C-Phycocyanin (50mg/kg) daily. In groups 2-4, cisplatin (3mg/kg) was injected, and group 3 silymarin (100mg/kg) was injected daily. Finally serum levels of MDA, TAC, and Total Billirubin, Total Protein and Albumin and activities of GPX, Catalase, SOD, ALT, AST, and LDH were assayed. C-PC showed considerable anti-proliferative effect on CT-26 and HT-29 tumor cell lines with IC<sub>50</sub> =47.4  $\mu$ g/ml and IC<sub>50</sub>=49.4  $\mu$ g/ml respectively. In addition, C-PC because of its antioxidant potential, significantly ( $P<0/001$ ), decreased MDA and increased levels of liver antioxidant enzymes.

**Keywords:** Antioxidant, Mice, Phycocyanin.

### چکیده

فیکوسیانین دارای خصوصیات درمانی بدون اثر سمیتی می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی فیکوسیانین روی سلول‌های CT-26 و HT-29 و در موش‌های Balb/c می‌باشد. این سلول‌ها با غلظت‌های ۱-۱۰۰ $\mu$ g/ml فیکوسیانین به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و اثرات ضد تکثیری آن با روش‌های مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی AO/PI و DAPI، تست MTT، میکروسکوپ فلورسانس و فلوسایتومتری بررسی شد. در فاز حیوانی موش‌ها سرطانی شده و به چهار گروه ۱- کنترل، ۲- تیمار با فیکوسیانین ۵۰ mg/kg، ۳- تیمار با سیلیمارین ۱۰۰ mg/kg و ۴- سیس‌پلاتین ۳ mg/kg تقسیم شدند. بعد از گذشت ۴ هفته سطوح سرمی MDA، TAC، بیلی‌روبین، پروتئین تام، آلبومین و فعالیت آنزیم‌های GPX، CAT، SOX، AST، ALT، LDH، سنجش شدند. فیکوسیانین اثرات ضد تکثیری قابل‌توجه با میزان IC<sub>50</sub>=۴۷/۴ $\mu$ g/ml برای رده CT-26 و IC<sub>50</sub>=۴۹/۴ $\mu$ g/ml برای رده HT-29 نشان داد. نتایج نشان داد که فیکوسیانین به‌طور معنادار  $P<0/001$  میزان MDA را کاهش و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌اکسیدان، فیکوسیانین، موش.

## مقدمه

کبد اولین خط محافظت در برابر آسیب آلاینده‌های محیطی و داروهای شیمیایی است. آسیب کبدی توسط این عوامل به‌طور مکرر منجر به نکرز کبدی و آپوپتوز می‌شود. کاملاً مشهود است که آسیب‌های اکسیداتیو نقش برجسته‌ای در آسیب‌ها و صدماتی که به‌واسطه داروها و سموم ایجاد می‌شود، بر عهده دارد (Rebecca, 2003). درمان‌های سرطان امروزه به‌طور عمده شامل جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی یا ترکیبی از این موارد است. شیمی‌درمانی یکی از درمان‌های اصلی است، اما این روش عوارضی مانند حالت تهوع، استفراغ، ریزش مو، خستگی، ضعف سیستم ایمنی بدن و هجوم عوامل عفونی و اختلالات سیستمیک دارد (Lehman et al., 1993). سیس‌پلاتین یکی از پرکاربردترین داروهای شیمی‌درمانی برای چندین نوع سرطان در انسان است. این دارو دارای خاصیت ضد سرطانی بسیار قوی است و به‌عنوان بخشی از درمان بسیاری از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان سر و گردن، بیضه، تخمدان، دهانه رحم، ریه، لنفوم روده بزرگ برای مدت نزدیک به ۳۰ سال مورد استفاده قرار گرفته است (Hanigan & Devarajan, 2003). با وجود اثرات درمانی مفید سیس‌پلاتین در درمان سرطان، این دارو دارای چندین عارضه جانبی سمی از جمله سمیت کلیوی، کبدی، عصبی و شنوایی است (Rabik & Dolan, 2007). اثرات سمیت کلیوی سیس‌پلاتین بسیار جدی است و میزان مصرف آن را محدود می‌کند. در درمان‌های تهاجمی سرطان که در آن از دوزهای بالای سیس‌پلاتین برای مهار تومور استفاده می‌شود، اثرات سمیت کبدی دارو ظاهر می‌شود، در این صورت هیدروتراپی و تجویز هم‌زمان داروهای مدر برای کاهش سمیت آن توصیه می‌شود (Borch & Markman, 1989). مطالعات متعدد برای بررسی اثرات محافظتی ترکیبات شیمیایی مختلف در کاهش سمیت سیس‌پلاتین نشان داده است که برخی از

ترکیبات مورد استفاده به‌عنوان محافظ شیمیایی برای کاهش عوارض جانبی و سمیت سیس‌پلاتین، موجب کاهش اثرات ضد سرطانی آن می‌شوند، ولی برخی دیگر به‌طور کامل سمیت دارو را از بین نمی‌برند (Aamdal et al., 1987). مواد بیولوژیکی گیاهی عوارض جانبی بسیار کمی در بیماران سرطانی به‌جا می‌گذارند، بنابراین تلاش برای یافتن هر محصول طبیعی در این زمینه از اهمیت بالینی خاصی برخوردار است. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که حتی در مقادیر کم نیز می‌توانند بدن را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کنند (Sanchez-Moreno et al., 1999). بدین‌جهت، دستیابی به انواع جدید آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مورد توجه جدی بسیاری از محققان قرار گرفته است. جلبک‌های سبز آبی از جمله جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس<sup>۱</sup> ابتدایی‌ترین اشکال حیات روی زمین هستند. سیانوباکتر فیکوسیانین<sup>۲</sup> (C-PC) یک رنگ‌دانه غیر سمی محلول در آب است که از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس جدا شده و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و مهارکننده رادیکال قابل‌توجهی است و همچنین اصلی‌ترین فیکو بیلی پروتئین در سیانوباکتری‌ها است. این بیلی پروتئین فلورسانس قرمز آبی، برای اولین بار در سال ۱۹۲۸ توسط لمبرگ<sup>۳</sup> گزارش شد. این ماده از یک پروتئین و یک کروموفور تشکیل شده است که قسمت پروتئینی از زیر واحد  $\alpha$  و  $\beta$  تشکیل شده است (Patel et al., 2005). خواص محصولات فیکوسیانین به نسبت خلوص آن بستگی دارد که به‌عنوان نسبت جذب در ۶۲۰ و ۲۸۰ نانومتر تعریف می‌شود (Bermejo Acien et al., 2003). با توجه به اثرات بسیار مفید درمانی فیکوسیانین، به‌ویژه اثرات آنتی‌اکسیدانی آن،

1. Spirulina platensis  
2. Phycocyanin  
3. Lemberg

ساعت انکوبه گردید. سپس محلول MTT به هر خانه اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در تاریکی نگهداری و جذب نوری محتوای حفره‌ها در طول موج ۵۷۰ nm و رفرنس ۶۳۰ nm خوانده شد (Mahendran & Bai, 2013). همچنین از طریق تست Probit میزان IC50 نیز محاسبه شد. مراحل این تست برای هر کدام از عصاره‌ها و روی هر رده سلولی ۳-۴ بار تکرار شد. جهت بررسی مورفولوژیکی سلول‌های CT-26 و HT-29 که به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف فیکوسیانین قرار گرفته بودند، از شیوه رنگ‌آمیزی AO/PI استفاده و سپس سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند (Namvar *et al.*, 2014). از روش رنگ‌آمیزی به نام DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) که عموماً جهت رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها و بررسی وضعیت مورفولوژیکی هسته به کار می‌رود نیز جهت بررسی تغییر شکل و ساختار هسته استفاده شد (Thangam *et al.*, 2014). به منظور آنالیز فلوسایتومتری، سلول‌های سرطانی CT-26 و HT-29 که به رشد مناسب رسیده بودند، آنالیز فلوسایتومتری انجام شد. بدین منظور، از کیت فلوسایتومتری BD Annexin V (شرکت سیگما آلدبریج) حاوی سه محلول بافر باندکننده، ماده PE و 7AAD (Tayarani-najaran *et al.*, 2013).

#### فاز *in vivo*

در فاز حیوانی جامعه آماری مورد مطالعه ما شامل گروه ۴۰ تایی سر موش سوری نر Balb/c، ۶-۴ هفته‌ای با وزن  $20 \pm 2$  گرم بودند که از محل پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. حیوانات تحت چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ بودند که از ساعت ۶ صبح تا ۶ عصر بود. دمای محیط آزمایشگاه  $23 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد بود (Deng *et al.*, 2013). جهت ایجاد مدل

احتمالاً این ماده قادر به محافظت از کبد در برابر اثرات سمی اکسیداتیو داروی شیمی‌درمانی سیس‌پلاتین است. این مطالعه خصوصیات ضدسرطانی فیکوسیانین در محیط خارج بدن و بر روی سلول‌های رده سرطانی کولون موش (CT-26) و انسانی (HT-29) و همچنین بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن در محافظت از بافت کبد در برابر سمیت سیس‌پلاتین را ارزیابی می‌کند.

#### مواد و روش‌ها

##### استخراج و تصفیه فیکوسیانین

پودر خشک جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در آب مقطر به نسبت ۱ به ۲۵ حل شد و طی ۳-۵ چرخه منجمد و ذوب شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه، با فرکانس ۴۰ هرتز سونیکه شد. محلول به دست آمده در ۱۰۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روی سطح (سوپرناتانت) به رنگ آبی شفاف توسط کاغذ واتمن No.1 صاف گردید. سولفات آمونیوم جامد به صورت تدریجی، به ماده خام حاصل، اضافه شد تا به ۵۰ درصد حد اشباع رسید. محلول حاصل به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شد. رسوب حاوی فیکوسیانین در بافر فسفات سدیم ۰/۰۰۵ M و pH=۷ حل شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ظرف در بسته نگهداری شد. در نهایت تصفیه فیکوسیانین از طریق دیالیز انجام شد. بعد از استخراج و تخلیص فیکوسیانین، کاردردو فاز *in vitro* و *in vivo* دنبال شد.

##### فاز *in vitro*

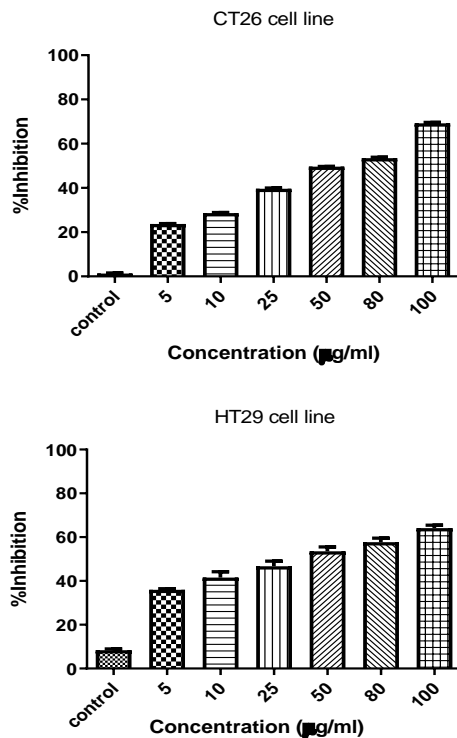
رده سلول‌های سرطان روده بزرگ CT-26 و HT-29 به دست آمده از NCBI در محیط RPMI-1640 با ۱۰ درصد FBS کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه انکوباتور ۵ درصد مرطوب CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. سوسپانسیون سلولی حاوی تعداد مناسب سلول تهیه و در پلیت کشت ۹۶ تایی به مدت ۴۸

TCA ۱۵٪، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه حمام بخار، خنک شد و در ۳۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول شناور شفاف در ۵۳۵nm در مقابل محلول بلانک اندازه‌گیری شد.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD:EC1.15.1.1) توسط روش Nishikimi *et al.* (1972) تعیین شد. در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هموژنات کبد با بافر پیرو فسفات سدیم، PMT (Phenazine methosulfate) و NBT (Nitro-blue tetrazolium) مخلوط شد. واکنش با افزودن NADH (Nicotinamide-) آغاز شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگ‌زای تشکیل شده در ۵۶۰nm اندازه‌گیری شد (Nishikimi *et al.*, 1972). فعالیت کاتالاز توسط روش Claiborne (1985) و براساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰nm موردسنجش قرار گرفت. به‌طور خلاصه، مخلوط موردسنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۰۵ M, pH=۷)، ۱ میلی‌لیتر پرکسید هیدروژن ۰/۱۹ M و ۰/۰۵ میلی‌لیتر PMS (۱۰ درصد) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. تغییرات جذب، در ۲۴۰nm اندازه‌گیری شد (Claiborne, 1985). فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز با استفاده از روش Rotruck *et al.* (1973) سنجش شد. گلوکوتایون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوکوتایون را اکسیده کرده که به‌طور هم‌زمان پر اکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوکوتایون باقیمانده توسط محلول DTNB (Dithiobis nitrobenzoic acid) دوباره فعال شده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفوتومتر در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری شد.

سرطانی موش‌ها، سلول‌های CT-26 کشت داده‌شده با حجم ۳×۱۰<sup>۶</sup> سلول در هر ۱۰۰ ماکرو لیتر PBS به‌صورت زیرپوستی تزریق شدند. پس از تقریباً ۱۰ روز، حیوانات به‌طور تصادفی به گروه‌های مساوی تقسیم شدند، از جمله گروه ۱- گروه کنترل، ۲- گروه درمان با فیکوسیائین، ۳- گروه کنترل مثبت، سیلیمارین ۴- گروه سیس‌پلاتین. سیس‌پلاتین به میزان ۳mg/kg در ۱۰ml/kg سالین ۰/۹ درصد هر پنج روز یک‌بار به‌صورت داخل صفاقی (جمعاً پنج نوبت) به گروه‌های ۲ تا ۴ تزریق شد. به گروه ۱ نیز نرمال سالین ۰/۹ درصد به همان روش تزریق شد. گروه ۳ نیز به‌عنوان رفرنس، داروی سیلیمارین را به میزان ۱۰۰ mg/kg در ۱۰ ml/kg نرمال سالین با تزریق داخل صفاقی به مدت ۴ هفته دریافت کردند. گروه ۲ نیز با فیکوسیائین به میزان ۵۰ mg/kg در ۱۰ ml/kg نرمال سالین به‌صورت گاوژ به مدت ۴ هفته روزانه تغذیه شدند (Baluchnejadmojarad *et al.*, 2009). در پایان دوره درمان، ۱ میلی‌لیتر خون از قلب موش‌ها توسط سرنگ برای اندازه‌گیری عوامل بیوشیمیایی شاخص عملکرد کبد گرفته شد و نمونه‌های سرم خون جدا شد. از نمونه‌های سرمی برای اندازه‌گیری میزان آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز، بیلی روبین، پروتئین کل و آلبومین استفاده شد (Teitz, 1987). پراکسیداسیون چربی در کبد با روش رنگ‌سنجی به‌وسیله اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید در قالب TBARS (Thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش Fraga *et al.* (1988) انجام شد. به‌طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی‌لیتر محلول TBA (Trichloroacetic acid-HCl) (reagent) (۳۷ درصد TBA، ۰/۲۵ مول HCL و

سنجش فعالیت آنزیم کبدی آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون) و توسط روش پیشنهادی فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی (IFCC) با کمک دستگاه اتوآنالایزر انجام شد. اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز سرم در آزمایشگاه به روش اسپکتروفتومتری با دستگاه اتوآنالایزر و با استفاده از روش (DGKC) روش استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان انجام شد. در این روش فعالیت آنزیم با توجه به میزان تغییر غلظت NADH تعیین می‌شود. برای سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون) استفاده شد.



شکل ۱. اثرات سیتوتوکسیک غلظت‌های مختلف فیکوسیانین بر روی سلول‌های CT-26 و HT-29 در طی ۴۸ ساعت تیمار که به وسیله تست MTT سنجیده شد. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند ( $P < 0.001$ ).

تغییرات ساختاری سلول‌های CT-26 و HT-29 بعد از ۴۸ ساعت تیمار با فیکوسیانین، شامل تغییر شکل سلول‌ها، متراکم شدن کروماتین، بیرون‌زدگی غشای پلاسمایی و تشکیل اجسام آپوپتوزی بود به‌گونه‌ای که سلول‌های CT-26 که در حالت نرمال به صورت دوکی شکل و کشیده بودند، تغییر شکل داده و به فرم دایره‌ای شکل درآمده بودند. سلول‌هایی که با غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فیکوسیانین تیمار شده بودند به‌وسیله رنگ‌آمیزی اختصاصی اکریدین اورنج/ پروپدیوم یداید و همچنین رنگ‌آمیزی DAPI و با میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند، اشکال آپوپتوزی در غلظت

روش تجزیه و تحلیل آماری در مطالعه حاضر بعد از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل با استفاده از روش‌های آماری توصیفی و استنباطی انجام شد. از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه هفت در سطح معنی‌داری ( $P < 0.001$ ) استفاده شد. در بخش آمار توصیفی، از شاخص‌های پراکندگی شامل میانگین و انحراف استاندارد و نمودار استفاده شد. همچنین همسان بودن واریانس‌ها در مقایسات بین گروهی توسط آزمون لون سنجیده شد به دلیل نرمال بودن توزیع، از آزمون پارامتریک، آزمون ANOVA استفاده شد.

### روش تجزیه و تحلیل آماری

نتایج بعد از کشت سلول‌های سرطانی CT-26 و HT-29 در محیط مناسب و تیمار با غلظت‌های متفاوت فیکوسیانین  $1-100 \mu\text{g/ml}$  و بررسی به‌وسیله تست MTT، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فیکوسیانین بر روی سلول‌ها در طی ۴۸ ساعت، اثرات ضد تکثیری و مهار رشد بیشتری شود. غلظت  $IC_{50}$  غلظتی که در آن غلظت، رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها مهار می‌شود، به‌وسیله تست MTT مشخص شد و غلظت‌های

### نتایج

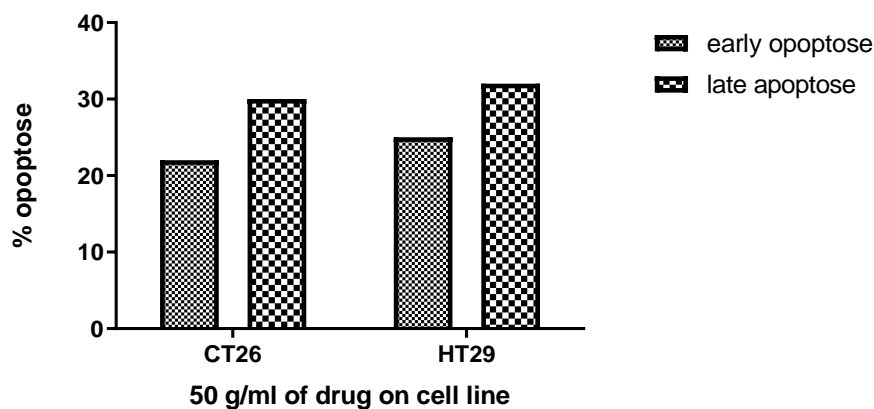
نتایج

داد. در گروه ۳، داروی سیلیمارین و در گروه ۲، فیکوسیانین سطوح سرمی افزایش یافته آنزیم‌های شاخص آسیب کبد و بیلی‌روبین تام سرم در اثر سیس‌پلاتین را به‌طور معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) و تا حد طبیعی کاهش و مقادیر کاهش یافته پروتئین تام و آلبومین سرم در اثر سیس‌پلاتین را تا سطوح طبیعی خود افزایش دادند (جدول ۱).

نتایج حاصل از سنجش آنزیم‌های کبدی در جدول (۲) آورده شده است. بر طبق این نتایج، در گروه ۴، سیس‌پلاتین مقادیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) را در مقایسه با گروه ۱، به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.001$ ) کاهش و میزان مالون‌دی‌آلدهید را به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.001$ ) افزایش داد. در گروه ۳، داروی سیلی مارین و در گروه ۲، فیکوسیانین، مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی فوق را که در اثر سیس‌پلاتین کاهش یافته بود، به‌طور معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) و تا حد طبیعی خود افزایش دادند. در گروه ۳، سیلیمارین و در گروه ۲، فیکوسیانین مقدار افزایش یافته مالون‌دی‌آلدهید در اثر سیس‌پلاتین را به‌طور معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) و تا حد طبیعی خود کاهش دادند (جدول ۲).

IC<sub>50</sub> و مرگ سلولی نوروزی در غلظت‌های بالاتر را نشان دادند. رنگ‌آمیزی DAPI نیز قطعه‌قطعه شدن کروماتین و آپوپتوز هسته‌ای را نشان داد که نشان‌دهنده مرگ سلولی آپوپتوزی در غلظت IC<sub>50</sub> می‌باشد. نتایج فلوسایتومتری نشان‌دهنده وقوع آپوپتوز یا مرگ سلولی در این سلول‌ها بود. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است در رده سلولی CT-26، ۲۲ درصد و در رده سلولی HT-29، ۲۵ درصد سلول‌ها در مرحله آپوپتوز زودرس (Early apoptose) و ۳۰ درصد از سلول‌های CT-26 و ۳۲ درصد از سلول‌های HT-29 در مرحله آپوپتوز تأخیری (Late apoptose) قرار دارند که نشان‌دهنده اثرات سیتوتوکسیک فیکوسیانین می‌باشد.

در فاز *in vivo* بعد از جداسازی سرم موش‌ها، میزان آنزیم‌های شاخص آسیب کبدی مانند آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز، بیلی‌روبین تام، آلبومین و پروتئین تام سنجیده شد. در موش‌های گروه ۴، داروی سیس‌پلاتین سطوح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز و بیلی‌روبین تام سرم را در مقایسه با گروه ۱ به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.001$ ) افزایش و میزان پروتئین تام و آلبومین سرم را کاهش



شکل ۲. آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های CT-26، HT-29 تیمار شده با فیکوسیانین ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  به مدت ۴۸ ساعت نشان‌دهنده اثرات سیتوتوکسیک این ماده می‌باشد. در رده سلولی CT-26، ۲۲٪ و در رده سلولی HT-29، ۲۵٪ سلول‌ها در مرحله آپوپتوز زودرس (early apoptose) و ۳۰٪ از سلول‌های CT-26 و ۳۲٪ از سلول‌های HT-29 در مرحله آپوپتوز تأخیری (late apoptose) قرار دارند که نشان‌دهنده اثرات سیتوتوکسیک فیکوسیانین می‌باشد ( $P < 0.001$ ).

جدول ۱. تأثیر فیکوسیانین بر فرا سنج‌های بیوشیمیایی سرم موش در آسیب کبدی ناشی از سیس‌پلاتین

گروه‌ها	۱	۲	۳	۴
آل‌انین آمینوترانسفراز (U/L)	۵۲/۵۷±۲/۱۴	۵۴/۹۸±۲/۴۷ <sup>b</sup>	۵۳/۶۹±۲/۲۷	۷۱/۸±۱/۶۳ <sup>a</sup>
آسپاراتات آمینوفراز (U/L)	۶۳/۶۹±۱/۲۴	۶۸/۶۷±۱/۳۴ <sup>b</sup>	۶۲/۱۴±۱/۳۵	۸۹/۹۸±۲/۱ <sup>a</sup>
لاکتات دهیدروژناز (U/L)	۶۴۷/۴۲±۱۶/۷۳	۶۸۶/۱۷±۲۷/۶ <sup>b</sup>	۶۷۹/۹۳±۳۲/۴	۹۹۶±۳۴/۸۱ <sup>a</sup>
بیلی‌روبین تام سرم (mg/dl)	۰/۷۹±۰/۰۴	۰/۹۵±۰/۰۵ <sup>b</sup>	۰/۹۸±۰/۰۳	۱/۵۶±۰/۰۴ <sup>a</sup>
آلبومین (g/dl)	۴/۲۹±۰/۳۹	۴/۲۰±۰/۳۵ <sup>b</sup>	۴/۱۴±۰/۳۶	۲/۹۸±۰/۳۱ <sup>a</sup>
پروتئین تام سرم (g/dl)	۸/۵۵±۰/۶۵	۷/۵۷±۰/۴۹ <sup>b</sup>	۷/۶۷±۰/۴۴	۵/۸۷±۰/۳۸ <sup>a</sup>

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد برای ۱۰ سر موش در هر گروه ارائه شده است ( $p < 0.001$ ). ۱- گروه کنترل، ۲- گروه سرطانی و فیکوسیانین، ۳- گروه سرطانی و سیلیمارین، ۴- گروه سرطانی و سیس‌پلاتین. (a) اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، (b) اختلاف معنی‌دار با گروه ۴.

جدول ۲. تأثیر فیکوسیانین بر فعالیت آنتی‌اکسیداتیوی کبد موش در آسیب ناشی از سیس‌پلاتین

گروه‌ها	۱	۲	۳	۴
مالون دی‌آلدهید (nmol/g protein)	۲/۶۳±۰/۲۷	۲/۷۸±۰/۱۹ <sup>b</sup>	۲/۶۹±۰/۲۱ <sup>b</sup>	۳/۶۱±۰/۲۴ <sup>a</sup>
سوپر اکسید دیسموتاز (U/mg protein)	۱۲/۱۲±۰/۵۲	۱۲/۵۸±۰/۷۸	۱۳/۲۱±۰/۴۹ <sup>b</sup>	۹/۵۴±۰/۸۱ <sup>a</sup>
کاتالاز (U/mg protein)	۶۵/۳۸±۲/۱۸	۵۸/۸۶±۱/۹۴ <sup>b</sup>	۵۷/۰۸±۱/۷۸	۴۳/۱۹±۲/۰۱ <sup>a</sup>
گلوکاتایون پراکسیداز (U/mg protein)	۲۳/۳۱±۱/۸۱	۱۷/۴۳±۱/۱۴	۱۹/۲۲±۱/۵۲ <sup>b</sup>	۱۵/۷۴±۱/۳۸ <sup>a</sup>
ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (mmol/Fe)	۱۵/۴۰±۳/۱۴	۱۱/۶۴±۲/۲۱	۱۲/۶۶±۳/۷ <sup>b</sup>	۱۰/۱۵±۲/۰۱ <sup>a</sup>

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد برای ۱۰ سر موش در هر گروه ارائه شده است ( $p < 0.001$ ). ۱- گروه کنترل، ۲- گروه سرطانی و فیکوسیانین، ۳- گروه سرطانی و سیلیمارین، ۴- گروه سرطانی و سیس‌پلاتین. (a) اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، (b) اختلاف معنی‌دار با گروه ۴، را نشان می‌دهد.

## بحث و نتیجه‌گیری

بررسی‌های مورفولوژیکی این تحقیق، نشان دادند که فیکوسیانین، دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده سلول‌های سرطانی کولون می‌باشد که این اثرات به‌صورت تغییر شکل سلول‌ها، متراکم شدن کروماتین، بیرون‌زدگی غشای سلول و چروکیدگی سلول نشان داده شد که با مطالعات Thangam *et al.* (2013) مطابقت داشت. همچنین Basha *et al.* (2008) دریافتند که فیکوسیانین در تومورهای انسانی می‌تواند سیکل سلولی را در مرحله G0/G1 متوقف کند و سنتز DNA را بلوک کند و به این طریق تکثیر سلول توموری را مهار کند. در مطالعه‌ای دیگر، Yong *et al.* (2012) فعالیت ضد توموری فیکوسیانین را بر روی سلول‌های HeLa مطالعه کردند و به میزان مهار رشد تا ۳۱ درصد با غلظت ۸۰ mg/l رسیدند که با نتیجه این تحقیقات که فیکوسیانین باعث القای ۳۰ درصد آپوپتوز در سلول‌های CT-26 و همچنین ۳۲ درصد

آپوپتوز در سلول‌های HT-29 شد، همسو می‌باشد (Ou *et al.*, 2012). با جمع‌بندی همه این اطلاعات، نتیجه‌گیری اولیه این است که مکانیسم مهاری فیکوسیانین، سیکل سلولی را در مرحله G1 به فاز S مهار می‌کند، بنابراین باعث تضعیف سنتز DNA می‌شود و تکثیر سلول توموری به‌وسیله مهار تکثیر DNA، مهار می‌شود. در مرحله *in vivo*، در این مطالعه، سیس‌پلاتین باعث افزایش معنی‌دار مقادیر سرمی آنزیم‌های شاخص آسیب کبدی آسپاراتات آمینوترانسفراز، آل‌انین آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز و بیلی‌روبین تام و کاهش معنی‌دار پروتئین تام و آلبومین سرم در مقایسه با گروه شاهد سالم شد. تغییرات معنی‌دار در مقادیر سرمی فرا سنج‌های مذکور متعاقب تیمار با سیس‌پلاتین که نشان‌دهنده آسیب کبد می‌باشند، این نتایج قبلاً توسط Yousef *et al.* (2009) نیز گزارش شده است. اثرات محافظتی فیکوسیانین در برابر کبد توسط Vadiraja

اکسید دیسموتاز شاخص حساس برای آسیب سلول‌های کبدی است. این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی است. سوپراکسید دیسموتاز آنیون سوپراکسید را با تبدیل به پر اکسید هیدروژن پاک‌سازی کرده و بدین ترتیب اثرات سمی آن را کاهش می‌دهد (Curtis *et al.*, 1972). در این پژوهش، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های دریافت‌کننده سیس‌پلاتین به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که در پی آن فعالیت آنزیم‌های پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز در این حیوانات به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز توسط آنیون‌های افزایش‌یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود. کاتالاز با تجزیه پر اکسید هیدروژن بافت‌ها را در برابر رادیکال‌های فعال هیدروکسید محافظت می‌کند. بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن منجر شود (Chance *et al.*, 1952). در این تحقیق، مصرف فیکوسیانین مانع از کاهش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در اثر سیس‌پلاتین شد که این اتفاق ممکن است در اثر پاک‌سازی رادیکال‌ها توسط فیکوسیانین باشد که باعث حفظ و بقای این آنزیم‌ها شده است. فیکوسیانین استخراج‌شده از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، فقط یک پروتئین ساده نیست بلکه یک ترکیب طبیعی عالی غذایی و سالم و ایمن است که مجموعه‌ای از خواص فیزیولوژیکی و دارویی مانند خاصیت ضدسرطانی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی بدون عوارض جانبی دارد. با توجه به تحقیقات ما نیز، فیکوسیانین احتمالاً با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، کبد را در برابر اثرات سمی اکسیداتیو سیس‌پلاتین محافظت می‌کند. بنابراین، پس از انجام کارآزمایی‌های اتفاقی و حصول نتایج مثبت، می‌تواند

(2001) اثبات شد. آن‌ها فعالیت دارویی فیکوسیانین روی سمیت القا شده در کبد موش (rat) را بررسی کردند و نشان دادند که فیکوسیانین می‌تواند به‌طور مشخص سمیت کبد را که به‌وسیله تعداد زیادی رادیکال‌های آزاد به وجود آمده بود را کاهش دهد که با نتایج این مطالعه نیز همخوانی داشت. در ارزیابی آسیب کبد، سنجش سطوح آنزیم‌هایی نظیر آسپاراتات و آلانین آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز به‌طور وسیع مورداستفاده قرار می‌گیرد. وقوع نکروز یا آسیب غشای سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها در خون می‌شود. از سوی دیگر، سطح سرمی بیلی‌روبین، آلومین و پروتئین تام با عملکرد سلول‌های کبدی در ارتباط می‌باشد (Stockham & Scott, 2002). در این پژوهش، تیمار با فیکوسیانین، به‌طور معنی‌داری مانع از بروز اثرات سمیت سیس‌پلاتین در کبد موش‌ها شد. این اثر احتمالاً به دلیل محافظت غشای سلول و ممانعت از نشت آنزیم‌های داخل آن حاصل می‌شود (Thabrew *et al.*, 1987). کنترل مؤثر سطوح بیلی‌روبین، آلومین و پروتئین تام سرم، بهبود زودهنگام مکانیسم‌های عملکردی و ترشحی سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد. اثرات مفید فوق را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین مربوط دانست که فیکوسیانین با جلوگیری از پر اکسیداسیون لیپیدی، منجر به تثبیت غشاهای سلولی شده و مانع از نشت آنزیم‌ها می‌شود (Vadiraja *et al.*, 1998). افزایش مالون‌دی‌آلدید در بافت کبد، متعاقب مصرف سیس‌پلاتین در موش‌ها، نشان داد که آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، یکی از مکانیسم‌های احتمالی در آسیب کبدی سیس‌پلاتین می‌باشد. نقش استرس اکسیداتیو و مداخله گونه‌های فعال اکسیژن در سمیت کبدی سیس‌پلاتین توسط Iraz *et al.* (2006) به اثبات رسیده است. در این مطالعه تغییراتی در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی و میزان مالون‌دی‌آلدید بافت کبد موش‌ها متعاقب تیمار با سیس‌پلاتین مشاهده شد. کاهش فعالیت سوپر



با سایر داروهای شناخته‌شده که یک بیماری خاص را به‌خوبی درمان می‌کنند بسیار جالب و بحث‌برانگیز خواهد بود.

### سپاسگزاری

این مطالعه با همکاری دانشگاه علوم پزشکی شیراز (انستیتوی تحقیقات سرطان) و دانشگاه پیام نور (گروه بیوشیمی) اصفهان انجام شده است. بدین‌وسیله از همکاری واحدهای فوق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان با منشأ طبیعی جهت پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو کبد ناشی از سیس‌پلاتین، در بیماران سرطانی مورد‌استفاده قرار گیرد. همچنین به‌دلیل فعالیت ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی عالی که فیکوسیانیین از خود نشان داد، ممکن است به‌عنوان یک گزینه کمک دارویی در درمان سرطان روده بزرگ در آینده در نظر گرفته شود. با توجه به اثرات دارویی فیکوسیانیین و خاصیت طبیعی بودن آن، ترکیب غیر سمی و ایمن فیکوسیانیین

### REFERENCES

- Aamdal, S.; Fodstad, O.; Pihl A. (1987). Some procedures to reduce cis-platinum toxicity reduce antitumour activity. *Cancer Treatment Reviews*; 14(3-4): 389-395.
- Baluchnejadmojarad, T.; Roghani, M.; Homayounfar, H.; Khaste Khodaie, Z. (2009). Protective effects of chronic administration of silymarin on blood glucose and lipids and oxidative stress in diabetic rats. *Journal of Semnan University of Medical Sciences*; 10(2): 143-150.
- Bermejo, P.; Pinero, E.; Villar, A.M.; (2008). Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protein extract of *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 110(2): 436-445.
- Bermejo, R.; Acien, F.G.; Ibanez, M.J.; Fernandez, J.M.; Molina, E.; Alvarez-Pez, J.M. (2003). Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalgae *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of chromatography B*; 790: 317-325.
- Borch, R.F.; Markman, M. (1989). Biochemical modulation of cisplatin toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*; 41: 371-380.
- Chance, B.; Greenstein, D.S.; Roughton, R.J.W. (1952). The mechanism of Catalase action. 1. Steady-state analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 37(2): 301-321.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In: Boca Raton FL, editor. *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*. Florida: CRC Press, Boca Raton, pp: 283-284.
- Curtis, S.J.; Mortiz, M.; Sondgrass, P.J. (1972). Serum enzymes derived from liver cell fractions. I. The response to carbon tetrachloride intoxication in rats. *Gastroenterology*; 62(1):84-92.
- Deng, Sh.; Hu, B.; An, H.M.; Du, Q.; Xu, L.; Shen, K.; *et al.* (2013). Teng-Long-Bu-Zhong-Tang, a Chinese herbal formula, enhances anticancer effects of 5-Fluorouracil in CT26 colon carcinoma. *BMC Complement Altern Med*; 13: 1-11.
- Fraga, C.G.; Leibowitz, B.E.; Toppel. A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as TBARS in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biology and Medicine*; 4: 155-161.
- Hanigan, M.H.; Devarajan, P. (2003). Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Therapeutics*; 1: 47-61.
- Iraz, M.; Ozerol, E.; Gulec, M.; Tasdemir, S.; Idiz, N.; Fadillioglu, E.; *et al.* (2006). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochemistry and Function*; 24(4): 357-361.
- Lehman, T.A.; Modali, R.; Boukamp, P.; Stanek, J.; Bennett, W.P.; Welsh, J.A. (1993). P53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*; 14(5): 833-839.
- Mahendran, G.; Bai, V.N. (2013). Antioxidant and antiproliferative activity of *Sewertia corymbosa* (GRISEB) Wight

- EX C.B. CLARKE. *Int J Pharm Pharmaceutical Sci*; 5:551-558.
- Namvar, F.; Suleiman Rahman, H.; Mohammad, R.; Baharara, J.; Mahdavi, M.; Amini, E.; *et al.* (2014). Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nano particles synthesized via seaweed aqueous extract. *Int J Nanomedicine*; 9: 2479 -2488.
- Nishikimi, M.; Rao, N.A.; Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 46: 849-854.
- Patel, A.; Mishra, S.; Pawar, R.; Ghosh, P.K. (2005). Purification and characterization of C-phycoyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein expression and Purification*; 40, 248-255.
- Rabik, C.A.; Dolan, M.E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*; 33: 9-23.
- Ramakrishnan, G.; Raghavendran, H.R.; Vinodhkumar, R.; Devaki, T. (2006). Suppression of Nnitroso diethylamine induced hepato-carcinogenesis by silymarin in rats. *Chemico-Biological Interactions*; 161: 104-114.
- Rebecca, T. (2003). Hepatoprotection via the Il-6/Stat3 pathway. *Journal of Clinical Investigation*; 112: 978-980.
- Romay, C.; Armesto, J.; Ramirez, D.; Gonzalez, R.; Ledon, N.; Garcia, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*; 47(1): 36-41.
- Rotruck, I.T.; Pope, A.L.; Ganther, H.E.; Swanson, A.B.; Hafeman, D.G.; Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*; 179: 588-590.
- Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A.; Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*; 32: 407-412.
- Stockham, S.L.; Scott, M.A. (2002). *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Ames: Iowa State University Press. pp: 434-459.
- Tayarani-najaran, Z.; Mousavi, S.H.; Tajfard, F.; Asili, J.; Soltani, S. (2013). Cytotoxic and apopto- genic properties of three isolated diterpenoids from *Salvia chora-ssanica* through bioassay - guided fractionation. *Food Chem Toxicol*; 57: 346-351.
- Teitz, N.W. (1987). *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Philadelphia: NB Saunders Company, pp: 638.
- Thabrew, M.I.; Joice, P.D.; Rajatissa, W. (1987). A comparative study of the efficacy of *Pavetta indica* and *Osbeckia octanda* in the treatment of liver dysfunction. *Planta Medica*, 53(3): 239-241.
- Thangam, R.; Sathuvan, M.; Poongodi, A.; Suresh, V.; Pazhanichamy, K. (2014). Sivasubramanian S, *et al.* Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by *Cymbopogon citrates* polysaccharide fractions. *Carbohydr Polym*; 107: 138-150.
- Vadiraja, B.B. (1998). Gaikwad, N.W. and Madyastha, K.M. Hepatoprotective effect of C-phycoyanin; protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone- mediated hepatotoxicity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 249(2): 428-431.
- Yousef, M.I.; Saad, A.A.; El-Shennawy, L.K. (2009). Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food and Chemical Toxicology*; 47(6): 1176-1183.
- Ou, Y.; Yuan, Z.; Li, K.; Yang, X. (2012). "Phycocyanin may suppress D-galactose-induced human lens epithelial cell apoptosis through mitochondrial and unfolded protein response pathways," *Toxicology Letters*; 215(1): 25-30.