



Development of Novel Antiangiogenic Approach due to Suppression of K⁺ Cl⁻ Cotransporter by *Spirulina platensis*: *In Ovo, In Vitro* and *In Vivo* Studies

Venu KOLA¹, Ganesh Kumar GUDAS¹, Jala SIRIKONDA¹,
Manish Kumar THIMMARAJU², Papagatla POLIREDDY³, Chamakuri Subba RAO⁴,
Nandru Prashanth KUMAR⁵, Byram RAVINDER², Syed AHAD⁵,
HUSSAIN⁴, Eddla Sravana JYOTHI⁶ & Chandana KAMILI⁷

¹ Department of Pharmacy, Srikrupa Institute of Pharmaceutical Sciences, Siddipet 502277, Telangana, India.

² Balaji Institute of pharmaceutical Sciences, Narsampet, Warangal-506132

³ Department of Pharmacology, Nalanda College of Pharmacy, Nalgonda, India-508001

⁴ Department of Pharmacology, Vaageswari College of Pharmacy, Karimnagar, India-505481

⁵ Department of Pharmacology, University College of Pharmaceutical Sciences, Warangal, Telangana-506009

⁶ Department of Pharmacology, St.Pauls College of Pharmacy, Hyderabad, India-501510

⁷ Department of Pharmacology CMR college of Pharmacy, Medchal, Hyderabad- 501401

SUMMARY. Pathologically excessive angiogenesis can be the root cause of many diseased conditions. Ion channels on endothelium have a prime action in multi-stepped activity of angiogenesis. These ion channel functions are responsible for cell proliferation, migration, cell volume expansion, tubulogenesis resulting in microneovascularization. The present study aims to evaluate the antiangiogenic activity of *Spirulina platensis*, by K⁺ Cl⁻ cotransporter suppression. The antiangiogenic activity of *Spirulina platensis* was screened by chick chorioallantoic membrane assay (CAM) (*in ovo* method), endothelial cell proliferation assay, transwell migration assay, matrigel cord-like morphogenesis assay (*in vitro* methods), corneal neovascularization, aortic ring assay, and sponge implantation method (*in vivo* methods). The antiangiogenic activity of the test drug was compared with the marketed antiangiogenic agent Bevacizumab. All the groups were compared by control using one way ANOVA, and then by Dunnett's test to compare mean of all the groups by the control mean. In CAM assay, number of branches and angiogenic-score were evaluated and significant results were observed at 10⁻⁵M and 10⁻⁴M. In the studies on human umbilical vein endothelial cells the test drug (100nM) resulted in potential arrest of proliferation, migration and decrease in network length of cord like tubes in a dose dependent manner. Percentage area of neovascularization and histopathological studies were the assessing parameters in the corneal neovascularization method. In the aortic ring assay reduction in the area of sprouts were observed at 5-10 μM test dose and a significant reduction in sponge weight, count of blood vessels formed and content of hemoglobin were observed at all the three tested concentrations of *Spirulina platensis* in the sponge implantation method. The scientific findings indicate that the test drug has potent antiangiogenic activity by inhibiting the cell proliferation, cell volume expansion, arresting cell cycle progression and by causing membrane hyperpolarization. The potent antiangiogenic drug obtained by repurposing this ion channel modulators will be able to treat the diseases due to excess angiogenesis from the root cause.

RESUMEN. La angiogénesis patológicamente excesiva puede ser la causa principal de muchas enfermedades. Los canales iónicos en el endotelio tienen una acción principal en la actividad de angiogénesis en varios pasos. Estas funciones de los canales iónicos son responsables de la proliferación celular, la migración, la expansión del volumen celular y la tubulogénesis, lo que da como resultado la microneovascularización. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antiangiogénica de *Spirulina platensis*, mediante la supresión del cotransportador K⁺ Cl⁻. La actividad antiangiogénica de *Spirulina platensis* se evaluó mediante el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) (método *in ovo*), ensayo de proliferación de células endoteliales, ensayo de migración transwell, ensayo de morfogénesis tipo cordón de matrigel (métodos *in vitro*), neovascularización corneal, ensayo de anillo aórtico, y método de implantación de esponja (métodos *in vivo*). La actividad antiangiogénica del fármaco de prueba se comparó con el agente antiangiogénico comercializado Bevacizumab. Todos los grupos fueron comparados por control usando ANOVA de una vía, y luego por la prueba de Dunnett para comparar la media de todos los grupos por la media de

KEY WORDS: antiangiogenesis, Bevacizumab, cell proliferation, K⁺ Cl⁻ cotransporter, *Spirulina platensis*.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: venupharmacology@gmail.com

control. En el ensayo CAM, se evaluaron el número de ramas y la puntuación angiogénica y se observaron resultados significativos a 10^{-5} M y 10^{-4} M. En los estudios sobre células endoteliales de vena umbilical humana, el fármaco de prueba (100 nM) dio como resultado una detención potencial de la proliferación, migración y disminución de la longitud de la red de tubos similares a cordón de una manera dependiente de la dosis. El porcentaje de área de neovascularización y los estudios histopatológicos fueron los parámetros evaluadores en el método de neovascularización corneal. En el ensayo del anillo aórtico, se observó una reducción en el área de los brotes con una dosis de prueba de 5-10 μ M y una reducción significativa en el peso de la esponja, el recuento de vasos sanguíneos formados y el contenido de hemoglobina en las tres concentraciones probadas de *Spirulina platensis* en el método de implantación de esponja. Los hallazgos científicos indican que el fármaco de prueba tiene una potente actividad antiangiogénica al inhibir la proliferación celular, la expansión del volumen celular, detener la progresión del ciclo celular y causar hiperpolarización de la membrana. El potente fármaco antiangiogénico obtenido mediante la reutilización de estos moduladores de los canales iónicos podrá tratar las enfermedades debidas al exceso de angiogénesis desde la raíz.
