

## Investigation of the anticancer and antioxidant activity of the brown algae (*Cystoseira indica*) extract against the colorectal cancer cells

Taheri A<sup>1\*</sup>, Ghaffari M<sup>1</sup>, Houshmandi Sh<sup>1</sup>, Namavari MM<sup>2</sup>

1- Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, I. R. Iran.

2- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, I. R. Iran.

Received January 30, 2016; Accepted July 3, 2016

### Abstract:

**Background:** Nowadays, numerous studies have been conducted on the use of bioactive compounds as anti-cancer agents regarding their antioxidant activities. The current study aimed to assess the anti-cancer and anti-oxidant activities of organic and water extracts of brown algae (*Cystoseira indica*) collected from the shores of Chabahar, Iran.

**Materials and Methods:** The extraction was performed based on the method of immersion by n-hexane, ethanol, methanol, chloroform and distilled water as solvent during 24 hours. The reducing power, free radical (DPPH) scavenging activity, metal chelating activity and cytotoxicity against colorectal cancer cells were examined by the MTT test.

**Results:** The chloroform extract showed the best reducing power compared to the other infusions, with an average of  $0.36 \pm 0.02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Also, chloroform extract showed the best metal chelating activity with an average of  $62.18 \pm 0.86 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $P < 0.05$ ). The best free radical scavenging activity observed in the ethanol and methanol extracts with concentrations of 15.83 and  $33.21 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectively; the inhibitory activity of methanol extracts was better than ethanol extract ( $P < 0.05$ ). Regarding the anti-cancer properties, methanol extract ( $30 \pm 1.33 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) showed the greatest effect on cancer cell death and the water extract showed the least effect ( $66.67 \pm 1.11 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The extract of the brown algae (*Cystoseira indica*) can be proposed as an antioxidant and anticancer compound for preclinical and clinical studies.

**Keywords:** Anti-cancer, Antioxidant, Free radical, Reducing power, *Cystoseira indica*

\* Corresponding Author.

Email: [taherienator@gmail.com](mailto:taherienator@gmail.com)

Tel: 0098 912 648 7417

Fax: 0098 543 1272 095

Conflict of Interests: No

Feyz, *Journal of Kashan University of Medical Sciences*, October, 2017; Vol. 21, No 4, Pages 317-325

# بررسی فعالیت ضدسرطانی و آنتیاکسیدانی عصاره جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) بر علیه سلول‌های سرطان کولورکتال

علی طاهری<sup>۱\*</sup> ، مصطفی غفاری<sup>۲</sup> ، شاداب هوشمندی<sup>۳</sup> ، محمد مهدی نام آوری<sup>۳</sup>

خلاصه:

سابقه و هدف: امروزه مطالعات زیادی برای استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان عوامل ضدسرطان در رابطه با فعالیت آنتیاکسیدانی آنها انجام شده است. این تحقیق با هدف بررسی خواص ضدسرطانی و آنتیاکسیدانی عصاره‌های آلبی و آبی جلبک قهوه‌ای سیستوسیرا/ایندیکا جمع‌آوری شده از سواحل چابهار انجام شد.

مواد و روش‌ها: عصاره‌ها براساس روش استخراج غوطه‌وری طی ۲۴ ساعت توسط حلال‌های ان‌هگزان، اتانول، متانول، کلروفرم و آب مقطر استخراج شدند. سپس، میزان قدرت کاهندگی، حذف رادیکال آزاد (DPPH)، قدرت کلاته‌کنندگی و سمیت سلولی با روش MTT بر علیه سلول‌های سرطان کولورکتال مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: عصاره کلروفرمی با میانگین  $۰/۳۶ \pm ۰/۰۲$  میکروگرم بر میکرولیتر بهترین قدرت کاهندگی را نسبت به سایر حلال‌ها نشان داد و در تست کلاته‌کنندگی یون فلزی، عصاره کلروفرمی با میانگین  $۰/۸۶ \pm ۰/۶۲$  میکروگرم بر میکرولیتر نسبت به سایر حلال‌ها تأثیر بهتری نشان داد ( $P < ۰/۰۵$ ). بهترین فعالیت مهار رادیکال آزاد در عصاره‌های اتانولی و متانولی به ترتیب با غلظت  $۱۵/۸۳$  و  $۳۳/۲۱$  میکروگرم بر میکرولیتر مشاهده گردید و عصاره متابولی دارای فعالیت مهار رادیکال آزاد بهتری نسبت به عصاره اتانولی بود ( $P < ۰/۰۵$ ). در تعیین خواص ضدسرطانی، عصاره متابولی با غلظت  $۳۰ \pm ۱/۳۳$  میکروگرم بر میکرولیتر بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشته و کمترین اثر مریبوط به عصاره آبی با غلظت  $۱/۱۱$  میکروگرم بر میکرولیتر بود ( $P < ۰/۰۵$ ).

نتیجه‌گیری: براساس نتایج بدست آمده می‌توان عصاره جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) را به عنوان یک ترکیب آنتیاکسیدان و ضدسرطان برای مطالعات پیش‌کلینیکی و کلینیکی پیشنهاد نمود.

واژگان کلیدی: ضدسرطان، آنتیاکسیدان، رادیکال آزاد، قدرت کاهندگی، سیستوسیرا/ایندیکا

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۳۲۵-۳۱۷

## بنابراین آنتیاکسیدان‌ها با خاصیت حذف رادیکال‌های آزاد نقش

مهی در پیشگیری یا درمان بیماری‌های مرتبط با اکسیداسیون یا رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند [۱]. تحقیقات سلولی ملکولی گسترده بر سلول‌های سرطانی، یک رویکرد هدفمند در پیشگیری بیوشیمیابی از سرطان‌ها به وجود آورده است که هدف آن توقف و یا برگرداندن سلول‌ها به حالت قبل از سرطان بدون هیچ دوز سمی از طریق مواد مغذی و عوامل دارویی است [۲]. مطالعات زیادی برای استفاده از ترکیبات طبیعی و عصاره‌ها به عنوان عوامل ضد سرطان در رابطه با فعالیت آنتیاکسیدانی مناسب انجام شده است.

تولیدات دریایی و بهویژه ترکیبات حاصل از متabolism ثانویه ارگانیسم‌های دریایی یک منبع بالقوه است که نسبت به منابع خاکی بیشترین محصولات داروهای ضدسرطانی را تولید می‌کنند. جلبک‌های دریایی یکی از مهم‌ترین ارگانیسم‌های دریایی در تولید مواد زیست‌فعال هستند. جلبک‌ها که تحت عنوان Sea weed در دنیا شناخته می‌شوند، به طور کلی شامل سه شاخه جلبک‌های سبز، قرمز و قهوه‌ای و سه رده کلروفیسه، ردوفیسه و فائوفیسه بوده و در سلسه Protoctista قرار می‌گیرند [۳]. جلبک‌های قهوه‌ای یا سلسه *Phaeophyceae* از گروه‌های مهم جلبکی در ترکیبات زیست‌فعال

## مقدمه

اکسیداسیون حاصل از گونه‌های فعل اکسیژن می‌تواند سبب ازهم‌پاشیدگی غشاء سلول‌ها، وارد شدن آسیب به پروتئین‌های غشائی و جهش DNA گردد که نتیجه آن آغاز یا تشدید و گسترش بسیاری از بیماری‌ها همچون سرطان، آسیب کبدی و بیماری‌های قلبی و عروقی است. اگرچه بدن دارای سیستم دفاعی است، ولی قرار گرفتن مداوم در معرض مواد شیمیابی و آلاینده‌ها می‌تواند منجر به افزایش تعداد رادیکال‌های آزاد خارج از ظرفیت دفاعی بدن و بروز آسیب اکسیداتیو غیرقابل بازگشت شود.

<sup>۱</sup> دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوری و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

<sup>۲</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوری و علوم دریایی چابهار، ایران

<sup>۳</sup> موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

\* لیتلی نویسنده مسئله:

چابهار، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوری و علوم دریایی چابهار

تلفن: ۰۹۱۲۶۴۸۷۴۱۷ - ۰۵۴۳۱۲۷۲۰۹۵

پست الکترونیک: taherienator@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۴/۱۳

آبی و آلی شامل: ان‌هگزان، اتانول، کلروفرم و آب مقطر انجام پذیرفت. در ابتدا ۲۵ گرم پودر جلبک با ۸۰ میلی‌لیتر از حلال‌ها ترکیب شده و ۲۴ ساعت در شیکر و جای تاریک قرار داده شد. عصاره‌های حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد. عصاره‌های به دست آمده به روش انجام‌دادی با دستگاه فریز درایر (Jalteb, Iran) خشک شد و در فریزر و دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد برای بررسی بعدی قرار گرفت [۱۰]. بررسی قدرت کاهندگی عصاره‌ها طبق روش Chou و همکاران انجام شد [۱۱]. غلظت‌های مختلف از عصاره جلبک (۱، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر سدیم فسفات بافر و ۱ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیناینید ۱ درصد مخلوط شد. محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰°C تیمار شد. بعد از این زمان محلول به سرعت در دمای اتاق سرد شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد به محلول اضافه شده و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. دو میلی‌لیتر از محلول با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۴ میلی‌لیتر کلرید آهن ۰/۱ درصد ترکیب و جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه خوانده شد. جذب بالاتر نشان‌دهنده قدرت کاهندگی بیشتر بود. از بوتیل هیدروکسی تولوئن برای مقایسه استفاده شد [۱۲]. تعیین کلاته شدن یون آهن طبق روش Dinis انجام شد. بدین‌منظور، ۵ غلظت شدن یون آهن (۳/۷، ۳/۷۰، ۱۸۵۰، ۳۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره جلبک ساخته شد. به محلول‌ها ۰/۴ میلی‌مولا (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کلرید آهن اضافه شد، پس از ۳ دقیقه ۰/۸ میلی‌مولا (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) فروزین به محلول اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شد. جذب محلول در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شد. از کلرید آهن و فروزین بدون عصاره به عنوان گروه کنترل استفاده شد و میزان درصد کلاته کنندگی یون آهن با استفاده از فرمول زیر سنجش شد [۱۳]. از اسید اسکوربیک نیز به عنوان استاندارد استفاده شد:

$$\text{A}_{(0-A_1)} = \frac{\text{A}_0}{\text{A}_0 + \text{A}_1} \times 100$$

$\text{A}_0$ : میزان جذب کنترل و  $\text{A}_1$ : میزان جذب نمونه/ استاندارد آزمون فعالیت مهار رادیکال آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH) با توجه به روش ارائه شده Matoba و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام شد. به طور خلاصه، یک میلی‌لیتر از محلول DPPH ۰/۱ مول بر میلی‌لیتر متابولیت ۹۵ درصد (حجمی/حجمی) با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها تیمار شد. مخلوط حاصل تکان داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر شاهد قرائت شد. فعالیت بهدام انداختن رادیکال DPPH به عنوان یک کاهش

می‌باشد. انواع مختلفی از جلبک‌های قهوه‌ای شامل: *Sargassum*, *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida flosiforme* هستند که به عنوان رژیم غذایی در آسیای شرقی استفاده می‌شوند. ترکیباتی مانند gepsin, porphyrin, و آلژینیک اسید موجود در جلبک‌های قهوه‌ای خصوصیات ضدباکتریایی داشته و این مزایای جلبک‌های قهوه‌ای تصویر روشنی از اهمیت و تنوع ترکیبات استخراج شده از آنها را نشان می‌دهد [۵, ۶]. Moussavou و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثرات ضدسرطانی جلبک‌های مختلف را بر سلول‌های سرطان سینه و کولورکتال انسانی مطالعه کرده و بیان نمودند که با توجه به توانایی ترکیبات موجود در جلبک دریایی برای مقابله با سرطان‌های مذکور می‌توان از جلبک‌های دریایی به عنوان عوامل ضدسرطان بالقوه استفاده نمود [۶]. Patra و Muthuraman در سال ۲۰۱۳ خواص ضدسرطانی و تحریک آپوپتوز سلولی توسط عصاره جلبک گراسیلاریا را مورد بررسی قرار دادند؛ نتیجه به دست آمده نشان داد که القای عصاره جلبکی در موش‌های مبتلا به سرطان EAT باعث افزایش طول عمر موش شده و به طور معنی‌داری از رشد تومورها جلوگیری می‌کند [۷]. جلبک‌ها منبع غنی از ترکیبات فعال زیستی هستند و بسیاری از محصولات متابولیسمی نخستین و یا دومین این جانداران می‌توانند به مواد فعال مورد علاقه صنایع دارویی تبدیل شوند [۸]. جلبک‌های موجود در منابع دریایی جنوب کشور و به خصوص چابهار، یکی از ظرفیت‌های زیستی ارزشمند کشور هستند که تحقیقات زیادی روی آنها صورت نگرفته است و برنامه‌ریزی اصولی و مدونی برای بهره‌برداری از این ذخائر دریایی وجود ندارد [۹]. لذا در این تحقیق اثرات آنتی‌اکسیدان و ضدسرطان جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) به دست آمده از سواحل دریای عمان علیه سلول‌های سرطانی کورکتال مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) به روش دستی از سواحل چابهار جمع آوری شده و با پاکت نایلونی به آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انتقال داده شد. ابتدا جلبک با دقت شسته شده و از شن و ماسه و جانداران اپی‌فیت کاملاً عاری شد. سپس، جلبک را درون آب مقطر غوطه‌ور کرده (برای خارج شدن املاح) و هر ۳ ساعت آب آن تعویض گردید. سپس، جلبک را روی پارچه تمیزی در سایه گسترانیده و طی سه روز خشک شد. در مرحله بعد جلبک آسیاب شده و کاملاً به صورت پودر درآمد. عصاره گیری از جلبک به روش غوطه‌وری ۳۰ درصد جرم حجمی با استفاده از حلال‌های

در حضور عصاره‌های جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) مورد بررسی قرار گرفت. طبق جدول شماره ۱ قدرت کاهندگی عصاره‌های مختلف جلبک آورده شده است. بین سه حلال تست شده عصاره کلروفرمی بهترین قدرت کاهندگی را نسبت به دو حلال دیگر نشان داد. هم‌چنین، نتایج مشخص نمود که عملکرد هر سه عصاره وابسته به غلظت است و عصاره کلروفرمی در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بالاترین خاصیت کاهندگی را نشان داده که با استاندارد اختلاف معنی‌داری داشته و بهتر بوده است ( $P<0.05$ ): پس از آن عصاره اتانولی و متانولی قرار داشتند. داده‌های ارائه شده در اینجا نشان می‌دهد که عصاره جلبک قهوه‌ای به علت قدرت کاهندگی خوب دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد. هم‌چنین، عصاره‌های جلبک مذکور در حد قابل قبولی دارای اثر کلاته‌کنندگی بر فلزات بودند (نمودار شماره ۱). عصاره کلروفرمی نسبت به عصاره اتانولی دارای اثر کلاته‌کنندگی بهتری بود. عصاره متانولی برای کلاته‌کنندگی یون فلزی فاقد محدوده استاندارد بوده و اثرباری نشان نداد. از سوی دیگر، DPPH یک رادیکال پایدار است که حداکثر جذب آن در ۵۱۷ نانومتر بوده و به راحتی قابل استفاده است. این راحتی واکنش باعث استفاده گسترده آن در ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد شده است [۱۷]. فعالیت مهار رادیکال آزاد توسط عصاره *Cystoseira indica* در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است و درصد کاهش جذب اولیه DPPH توسط ترکیبات تست شده بیان شد. بهترین فعالیت مهار رادیکال آزاد مربوط به عصاره‌های اتانولی و متانولی بود و عصاره متانولی با میانگین ۳۳/۲۱ درصد دارای فعالیت مهار رادیکال آزاد بهتری نسبت به عصاره اتانولی بود (نمودار شماره ۲). عصاره کلروفرمی برای خنثی کنندگی رادیکال آزاد فاقد محدوده استاندارد بوده و اثرباری نشان نداد. در مطالعه حاضر اثر سمیت سلولی عصاره‌های جلبک قهوه‌ای روی رده سلولی HTC116 بررسی شد. درصد زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی کولورکتال رده سلولی HTC116 در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره‌های جلبک در جدول شماره ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج این جدول عصاره متانولی بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشت و کلروفرم در مقام بعدی بود. کمترین اثر مربوط به عصاره‌های ان‌هگزانی و آبی بود. میزان غلظت ۱۰۰۰ میکرو‌گرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی بیشترین اثر را نسبت به کنترل و غلظت‌های دیگر عصاره نشان دادند ( $P<0.05$ ). دیگر عصاره‌ها در این غلظت کمتر معمنی‌داری را نسبت به یکدیگر نشان دادند ( $P<0.05$ ). عصاره ان‌هگزانی کمترین اثر را بر سلول‌های سرطانی نشان داد و میزان بازدارندگی از رشد در مقایسه با غلظت‌های موثر دیگر

در جذب اندازه‌گیری شد. محاسبه مربوط به آن با استفاده از فرمول زیر صورت گرفت [۱۴]. از اسید اسکوربیک نیز به عنوان استاندارد استفاده شد:

$$\% = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$

$A_C$ : میزان جذب کنترل و  $A_S$ : میزان جذب نمونه/استاندارد برای بررسی ویژگی‌های ضدسرطانی عصاره‌های جلبک مورد مطالعه سلول‌های سرطان کولورکتال (HTC116) در محیط کشت مایع RPMI1640 که همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ سی‌سی پن استرپ بود، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۵۵ درصد  $\text{CO}_2$  در فلاکسکهای استریل کشت داده شدند [۱۵]. بررسی سمیت سلولی عصاره آبی و آلی جلبک قهوه‌ای با استفاده از آزمون ۲-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT: در پلیت‌های ۹۶ خانه به میزان ۱۰۰ میکرو‌گرم بر میلی‌لیتر سلول در هر چاهک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵ درصد  $\text{CO}_2$  به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از عصاره جلبک شامل ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو-گرم بر میلی‌لیتر و کنترل به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از این مدت به هر چاهک ۲۰ میکرو‌لیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد  $\text{CO}_2$  انکوبه شد. بعد از گذشت ۴ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج گشته، در دمای ۴°C به مدت ۳ دقیقه و در دور ۳۰۰۰ با ساترنفیوژ یخچالدار ساترنفیوژ شد. سپس، محتويات روبی آن‌ها دور ریخته شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرو‌لیتر از محلول دی‌متیل سولفونکساید (DMSO) اضافه شد تا فورمازان حاصل حل گردد. پلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد و سپس جذب نوری فورمازان در ۵۷۰-۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر خوانده شد [۱۶]. جهت تحلیل آماری، از آزمون شاپیرو-ویلک به منظور بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. جهت مطالعه اثر غلظت عصاره‌ها در آزمون‌های مختلف و مقایسه با استاندارد از تجزیه واریانس یک‌طرفه استفاده شد و در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار جهت آزمون تعقیبی از آزمون توکی استفاده شد. هم‌چنین، برای مقایسه بین گروهی از آزمون  $t$  مستقل استفاده شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار Graphpad-Prism ویرایش ۷ در سطح معنی‌داری  $P<0.05$  انجام شد.

## نتایج

برای اندازه‌گیری قدرت کاهندگی، تبدیل  $\text{Fe}^{+2}$  به

## فعالیت ضدسرطانی و آنتی اکسیدانی عصاره جلبک قهوه‌ای، ...

عصاره‌های جلبک *Cystoseira indica* LC<sub>50</sub> روى سلول‌های سرطان کولورکتال در نمودار شماره ۳ آورده شده است. کمترین میزان برای سلول‌های سرطانی کولورکتال مربوط به عصاره مтанولی (۷۲۳/۱۶+۱۴/۴۷) میکروگرم بر میلی لیتر بود.

عصاره‌ها کمتر بود ( $P<0.05$ ). در تمامی عصاره‌ها با کاهش غلظت عصاره در فاز محلول زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی افزایش یافت که به جز اتیل استات در دیگر عصاره‌ها غلظت‌های کمتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. میزان

جدول شماره ۱ - قدرت کاهنده‌ی (Reducing power) عصاره‌های مختلف جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*)

اعشاره	غلظت mg/ml	کلروفرمی	متانولی	اتانولی
۱	۰/۳۶±۰/۰۸ <sup>ai</sup>	۰/۱۰۶±۰/۰۰۱ <sup>bm</sup>	۰/۱۲±۰/۰۰۶ <sup>bm</sup>	
۰/۵	۰/۱۷۱±۰/۰۰۸ <sup>bi</sup>	۰/۰۴۷±۰/۰۰۴ <sup>cm</sup>	۰/۰۶۱±۰/۰۰۲ <sup>cm</sup>	
۰/۱	۰/۰۳±۰/۰۰۲ <sup>ci</sup>	۰/۰۰۷±۰/۰۰۳ <sup>dm</sup>	۰/۰۰۳ <sup>dm</sup>	
۰/۰۱	۰/۰۰۴۳ <sup>ci</sup>	۰/۰۰۴±۰/۰۰۱ <sup>dm</sup>	۰/۰۰۵±۰/۰۰۱ <sup>dm</sup>	
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱۶ <sup>ci</sup>	۰/۰۵±۰/۰۰۰ <sup>dm</sup>	۰/۰۰۱۰±۰/۰۰۴ <sup>dm</sup>	
استاندارد	۰/۲۰۳±۰/۰۰۲ <sup>bi</sup>	۰/۲۰۳±۰/۰۰۲ <sup>ai</sup>	۰/۲۰۳±۰/۰۰۲ <sup>ai</sup>	

نتایج به شکل انحراف معیار  $\pm$  میانگین می‌باشد. حروف a,b,c,d,e,i,j,m,n,o,p اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف a,i,j,m,n,o,p اختلاف معنی‌دار در هر ردیف را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف همنام نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد.

جدول شماره ۲ - درصد زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*)

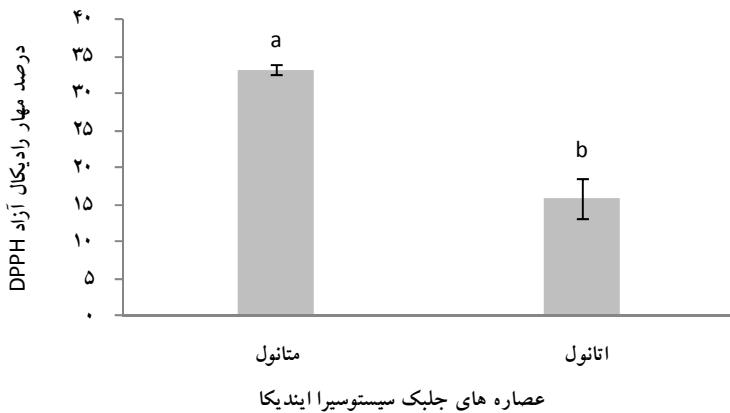
اعشاره	غلظت mg/ml	کلروفرمی	ان-هگزانی	اتیل استاتی	آبی
۱۰۰۰	۳۰±۱/۳۳ <sup>al</sup>	۵۰/۱۱±۱/۴۴ <sup>am</sup>	۶۹/۱۱±۱/۲۲ <sup>ao</sup>	۵۸/۵۵±۲/۶۷ <sup>an</sup>	۶۶/۶۷±۱/۱۱ <sup>ao</sup>
۵۰۰	۶۶/۶۶±۰/۳۸ <sup>bl</sup>	۶۹/۵۵±۱/۶۶ <sup>bl</sup>	۷۷/۲۳±۱/۶۶ <sup>bm</sup>	۶۶/۷۸±۱/۸۸ <sup>al</sup>	۷۷/۳۳±۱/۰۶ <sup>blm</sup>
۲۵۰	۸۸/۳۲±۰/۱۱ <sup>cm</sup>	۷۷/۵۵±۲/۳۳ <sup>cl</sup>	۸۹/۲۲±۱/۰۹ <sup>cm</sup>	۷۹/۹۹±۲/۴۹ <sup>bl</sup>	۸۵/۷۱±۱/۳۱ <sup>cm</sup>
۱۲۵	۸۹/۷۷±۰/۴۴ <sup>cl</sup>	۸۹/۹۷۷±۲/۷۷ <sup>cl</sup>	۹۰/۱۱±۲/۶۹ <sup>cl</sup>	۸۹/۷۷±۲/۷۷ <sup>cl</sup>	۸۷/۵۰±۰/۴۴ <sup>cl</sup>
کنترل	۹۴/۲۲±۰/۴۴ <sup>c</sup>	۹۴/۵۵±۲/۱۴ <sup>c</sup>	۹۶/۳۸±۰/۹۹ <sup>c</sup>	۹۵/۵۵±۱/۵۸ <sup>c</sup>	۹۲/۲۲±۱/۷۸ <sup>d</sup>

نتایج به شکل انحراف معیار  $\pm$  میانگین می‌باشد. حروف a,b,c,d,e,i,j,m,n,o,p اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف a,i,j,m,n,o,p اختلاف معنی‌دار در هر ردیف را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف همنام نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد.

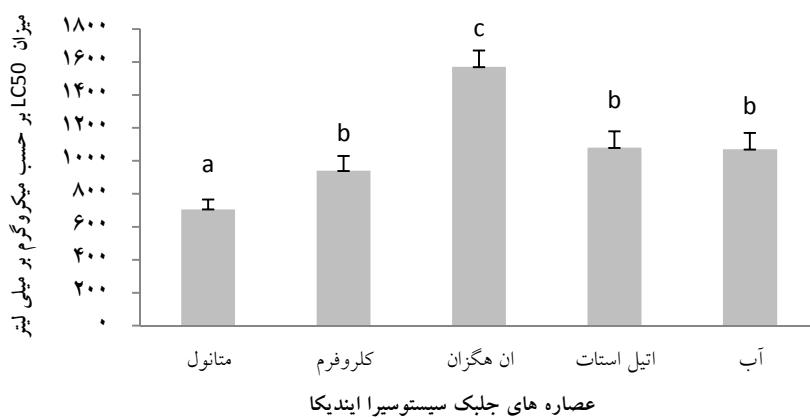


عصاره‌های جلبک سیستوسریا ایندیکا

نمودار شماره ۱ - قدرت کلاته‌کنندگی یون فلزات (درصد) در تیمارهای مختلف عصاره‌های آلی جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) حروف غیر همنام نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد.



نمودار شماره ۲- خشتش کنندگی رادیکال آزاد (درصد) در تیمارهای مختلف عصاره های آلی جلبک قهوه ای (*Cystoseira indica*) حروف غیرهمنام نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می باشد.



نمودار شماره ۳- میزان LC 50 عصاره های جلبک قهوه ای (*Cystoseira indica*) بر سلول های سرطان کورکتال

آب اکسیژنه، جلوگیری از جدا کردن هیدروژن، قدرت کاهش و مهار رادیکال آزاد می باشد [۱۹، ۲۰]. فعالیت آنتی اکسیدانی کاهنده بر پایه شکست زنجیره رادیکال آزاد و دادن یک اتم هیدروژن است. هم چنین، کاهنده ها با پیش سازه ای خاصی از پراکسید وارد واکنش می شوند. در نتیجه از تشکیل پراکسید جلوگیری می کنند [۲۱]. ترکیبات جلبک قهوه ای ممکن است به عنوان کاهنده عمل کنند و بدین ترتیب بون الکترون ها را اهدا کرده و با رادیکال های آزاد واکنش داده و آنها را به ترکیبات پایدار تبدیل می کند که در نهایت زنجیره رادیکال آزاد را خشی می کنند. آنتی اکسیدان ها موادی هستند که قادرند با اثرات مخرب اکسیدان ها در بدن مقابله کنند. از نقطه نظر بیولوژیکی، آنتی اکسیدان ها به عنوان سوبیستراپی هستند که در غلظت پایین در مقایسه با سوبیستراپی مستعد اکسید شدن توانایی به تأخیر اندختن یا مهار روند اکسیداتیو را دارند. در این تعریف سوبیسترا به هر مولکول قابل اکسید شدن در محیط زنده یعنی لیپیدها، پروتئین ها، کربوهیدرات ها و DNA گفته می شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حلال متانول تأثیر معنی-

## بحث

ترکیبات زیستی متعددی با گستره کاربردی متنوعی هم چون اثرات آنتی بیوتیکی، ضد ویروسی، ضدقارچی و ضد سلطانی از جلبک های پرسلوی شناسایی و استخراج شده است و بسیاری از متابولیت های اولیه و یا ثانویه این ارگانیسم ها می توانند به مواد زیست فعال مورد استفاده در صنایع دارویی تبدیل شوند. در پژوهش حاضر عصاره های مختلف جلبک قهوه ای (*Cystoseira indica*) اثر مهاری آنتی اکسیدانی و ضد سلطانی مناسبی را بر اساس تست های قدرت کاهنده کنندگی، فعالیت کلاماته کنندگی، DPPH و MTT نشان دادند. در بین حلال های مورد مطالعه بهترین میزان قدرت کاهنده کنندگی در حلال کلروفرم مشاهده گردید و در این حلال نیز غلظت ۱ میلی گرم در میکرو لیتر بهترین تأثیر را در تست قدرت کاهنده کنندگی نشان داد (جدول شماره ۱). قدرت کاهنده کنندگی یک ترکیب می تواند به عنوان شاخص قابل توجهی از فعالیت آنتی اکسیدانی باشد [۱۸]. فعالیت آنتی اکسیدانی شامل مکانیسم های متنوعی مانند جلوگیری از شروع زنجیره اکسیداسیون، اتصال به یون فلز، تجزیه

شده است که حلال‌هایی با قطبیت کمتر نتایج بهتری نسبت به حلال‌هایی با قطبیت بیشتر دارند که می‌توان احتمال داد به علت قطبیت بیشتر، اکثر ترکیبات و اجزاء جلبکی دیگر را همراه ماده فعال استخراج می‌کنند و در نهایت در این نوع عصاره نسبت مواد فعال زیستی با ویژگی آنتی اکسیدانی نسبت به کل محلول استخراجی در قیاس با عصاره کلروفرمی (با قطبیت کمتر) کاهش می‌یابد. برای اندازه‌گیری اثرات سمیت سلولی عصاره‌های آبی و هیدروکلکلی جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) از آزمون MTT استفاده شد. در این روش MTT که زردرنگ است توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال به ترکیب غیر- محلول و ارغوانی فورمازان تبدیل می‌شود. جذب نوری این ترکیب پس از حل شدن در DMSO به کمک دستگاه الیزا و در طول موج معین قابل اندازه‌گیری است [۲۷]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کمترین درصد زنده‌ماندن سلول‌های سرطانی کورکتال در عصاره جلبکی در حلال متابولی قابل مشاهده است و در این حلال غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کمترین زنده‌ماندن این سلول‌ها را نشان داد. Wang و همکاران آزمایشی برای تعیین اثر عصاره آبی ۱۲ گونه جلبک از هنگ کنگ بر سلول‌های سرطانی سینه ۷- MCF- ۶۰ و HL-۶۰ انجام دادند. نتایج نشان داد که جلبک- *Padina arborescens* و *Hydroclathrus clathratus* های موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی با کمترین اثر بر سلول‌های سالم می‌شوند [۲۸]. در مطالعه فعالیت سیتو توکسیک جلبک قرمز DLD1 و HTC116 (سرطان کولورکتال انسانی) نتیجه عملکرد عصاره کلروفرمی و عصاره متابولی بهتر بوده است [۲۹]. در این مطالعه نیز عصاره‌های آبی و کلروفرمی و متابولی جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی با کمترین اثر بر سلول‌های سالم شدند. محصولات طبیعی مشتق از جلبک‌های دریایی از سلول‌ها در برابر اثرات استرس اکسیداتیو از طریق بالابردن قابلیت طبیعی سلول برای سازش پذیری نسبت به محیط زیست آن‌ها، حفاظت می‌کند.

### نتیجه گیری

تحقیق حاضر نشان داد که عصاره متابولی جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین فعالیت قدرت کاهنده‌گی و فعالیت حذف رادیکال آزاد را دارد. بیشترین فعالیت کلاته‌کننده‌گی در عصاره کلروفرمی دیده شد. هم‌چنین، عصاره متابولی و سپس کلروفرمی بیشترین اثر سمیت سلولی را علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال نشان دادند. با توجه

داری در توانایی خنثی کننده‌گی رادیکال آزاد در تیمارهای مختلف عصاره‌های جلبک نسبت به حلال اتانول بوده و حلال کلروفرم نیز تأثیری بر توانایی خنثی کننده‌گی رادیکال آزاد نشان نداد (نمودار شماره ۲). براساس گزارش‌ها بیشترین فعالیت مهاری رادیکال آزاد جلبک‌ها مربوط به ترکیبات فنولی آنها می‌باشد. هم‌چنین، وابستگی قابل توجهی بین فعالیت مهاری رادیکال آزاد DPPH و محتوی فتل تام گزارش شده است. در واقع تغییر در قطبیت حلال، توانایی آنها را جهت انحلال گروه‌های عاملی ترکیبات آنتی اکسیدانی تغییر می‌دهد و بر فعالیت آنتی اکسیدانی تأثیرگذار می‌باشد [۲۲]. تنوع و عملکردهای چند بعدی در مواد استخراج شده از جلبک‌ها می‌تواند ناشی از متابولیت‌های زیست‌فعال فراوان در آنها باشد. متابولیت‌های زیست‌فعال ثبت شده در جلبک‌های دریایی شامل فتل‌های برومینه، هتروسیکل‌های اکسیژن برومینه، هتروکسیل‌های نیتروژنی، کانیک اسیدها، مشتقات گوانیدینی، مشتقات فسفازین، اسیدهای آمینه و آمین‌ها، استرول‌ها، پلی‌ساقاریدهای سولفاته و پروستا- گلاندین‌ها می‌باشد [۲۳]. بررسی اثر ضدسرطانی جلبک قرمز- *Porphyra dentata* نشان داد استرول این جلبک پتانسیل بالقوه برای حفاظت سلول‌ها در برابر پیدایش تومور سلول‌های ۴T1 دارد [۲۴]. فعالیت کلاته‌کننده‌گی فلزات، از تولید اکسی‌رادیکال و در نتیجه اکسیداتیوهای خط‌ناک جلوگیری می‌کند. ظرفیت کلاته‌کننده‌گی فلزات دارای نقش مهمی در مکانیسم آنتی اکسیدانی، از طریق کاهش غلظت تبدیل فلز می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان داد که حلال کلروفرم بهترین عملکرد را در قدرت کلاته‌کننده‌گی یون فلزات در تیمارهای مختلف عصاره‌های جلبک دارد (نمودار شماره ۱). تحقیقات نشان داده است که عوامل کلاته‌کننده با فلزات تشکیل باند می‌دهند و از آنجایی که باعث کاهش پتانسیل احیایی و در نتیجه پایداری اکسید یون فلزات می‌شوند، به عنوان آنتی اکسیدان‌های ثانویه مؤثر هستند [۲۴]. بین فعالیت آنتی اکسیدانی و قدرت کاهنده‌گی آهن ارتباط مثبت وجود دارد [۲۵]. روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری قدرت و میزان کارآمدی یک آنتی- اکسیدان توسعه پیدا کرده‌اند که مبتنی بر سیستم‌های دفاعی آنتی- اکسیدان‌ها است و بر اساس پاکسازی انواع اکسیژن فعال، رادیکال‌های هیدروکسیل، کاهش رادیکال پروکسیل چربی و یا فعالیت کلاته‌کننده‌گی آهن می‌باشد. رادیکال پایدار DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است و اغلب تخمین مناسبی از فعالیت جذب رادیکال عصاره می‌دهد. این رادیکال آزاد در ۵۱۷ نانومتر بالاترین جذب را دارد و به رنگ ارغوانی است. این رادیکال در حضور یک دهنده هیدروژن که همان آنتی اکسیدان می‌باشد، کاهش یافته و رنگ زرد منتج شده، جذب عصاره را کاهش می‌دهد [۲۶]. ایات

علوم، تحقیقات و فناوری در قالب طرح پژوهشی شماره ۳/۸۲۶۰۱ و دانشگاه دریانوری و علوم دریایی چابهار در قالب پایاننامه کارشناسی ارشد خانم مهندس شاداب هوشمندی انجام شده است. نویسندهای این دو سازمان محترم تشکر و قدردانی می‌نمایند.

به نتایج، عصاره‌های متابولی و کلروفرمی جلبک قهوه‌ای برای بررسی‌های پیش‌کلینیکی و کلینیکی تولید دارو پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت معاونت پژوهش و فناوری وزارت

### References:

- [1] Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food Chemistry* 2003; 83(4): 547-50.
- [2] Gamal-Eldeen AM, Ahmed EF, Abo-Zeid MA. In vitro cancer chemo preventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium*. *Food Chemical Toxicol* 2009; 47(6): 1378-84.
- [3] Sohrabipour J, Rabii R. A list of marine algae of seashores of the Persian Gulf and Oman Sea in the Hormozgan province. *Iran J Bot* 1999; 8(1): 131 – 62. [in Persian]
- [4] Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(2): 333-42.
- [5] Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA. Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2012; 29(2): 144-222.
- [6] Moussavou G, Kwak DH, Obiang-Obonou BW, Maranquy CA, Dinzouna-Boutamba SD, Lee DH, et al. Anticancer effects of different seaweeds on human colon and breast cancers. *Mar Drugs* 2014; 12(9): 4898-911.
- [7] Patra S, Muthuraman MS. Gracilaria edulis extract induces apoptosis and inhibits tumor in Ehrlich Ascites tumor cells *in vivo*. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13(1): 331.
- [8] Movahedinia A, Heydari M. Antioxidant activity and total phenolic content in two alga species from the Persian Gulf in Bushehr province. *Iran Int J Sci Res* 2014; 3(5): 954-58.
- [9] Rabie R, Asadi M, Sohrabipour J, Nejadsatari T, Majd M. Morphology and anatomy algae *Gracilaria salicornia* in the Persian Gulf seashores (Qeshm Island). *Pajouhesh Va Sazandegi* 2007; 20(2): 47-53. [in Persian]
- [10] Salehi P, Sonboli A, Eftekhar F, Nejad-Ebrahimi S, Yousefzadi M. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (BOISS.) RECH. f. from Iran. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(10): 1892-6.
- [11] Chou HJ, Kuo JT, Lin ES. Comparative antioxidant properties of water extracts from different parts of beefsteak plant (*Perilla frutescens*). *J Food Drug Anal* 2009; 17(6): 489-96.
- [12] Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochemistry Biophysics* 1994; 315(1): 161-9.
- [13] Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agricultural Food Chemistry* 1995; 43(1): 27-32.
- [14] Zandi K, Farsangi MH, Nabipour I, Soleimani M, Khajeh K, Sajedi RH, et al. Isolation of a 60 kDa protein with in vitro anticancer activity against human cancer cell lines from the purple fluid of the Persian Gulf sea hare, *Aplysia dactylomela*. *African J Biotechnol* 2007; 6(11).
- [15] O'Hara M, Kiefer D, Farrell K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Fam Med* 1998; 7(6): 523-36.
- [16] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 1995; 28(1): 25-30.
- [17] Meir S, Kanner J, Akiri B, Philosoph-Hadas S. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agricultural Food Chemistry* 1995; 43(7): 1813-9.
- [18] Diplock AT. Will the 'good fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease?. *Free Radic Res* 1997; 27(5): 511-32.
- [19] Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur ÖF, Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of *Tilia* (*Tilia argentea Desf ex DC*), sage (*Salvia triloba L.*), and Black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agricultural Food Chemistry* 2000; 48(10): 5030-34.
- [20] Siriwardhana N, Lee KW, Kim SH, Ha JW, Jeon YJ. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci Technol International* 2003; 9(5): 339-47.
- [21] Srivastava A, Harish SR, Shivanandappa T. Antioxidant activity of the roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight & Arn.). *LWT-Food Sci Technol* 2006; 39(10): 1059-65.
- [22] Namvar F, Mohamad R, Baharara J, Zafar-Balanejad S, Fargahi F, Rahman HS. Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*Sargassum muticum*). *Biomed Res Int* 2013; 2013: 604787.
- [23] Kazłowska K, Lin HV, Chang SH, Tsai. In vitro and in vivo anticancer effects of sterol fraction

from red algae *Porphyra dentata*. *Evidence-Based Complementary Alternative Med* 2013.

[24] Ganesan P, Kumar CS, Bhaskar N. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technol* 2008; 99(8): 2717-23.

[25] Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry* 2006; 99(4): 835-41.

[26] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunological Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.

[27] Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunological Methods* 1994; 174(1-2): 311-20.

[28] Wang SK, Liang PH, Astronomo RD, Hsu TL, Hsieh SL, Burton DR, et al. Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of *Oligomannose dendrons* with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *PNAS. Chem Biodivers* 2008; 195: 3690-95.