

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

Taheri A^{1*}, Ghaffari M¹, Houshmandi Sh¹, Namavari MM²

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 ± 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Also, chloroform extract showed the best metal chelating activity with an average of 62.18 ± 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 ± 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 ± 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

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

Please cite this article as: Taheri A, Ghaffari M, Houshmandi Sh, Namavari MM. Anticancer and antioxidant activity of organic and water extracts of the brown algae *Cystoseira indica*. *Feyz* 2017; 21(4): 317-25.

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

علی طاهری^{۱*}، مصطفی غفاری^۱، شاداب هوشمندی^۲، محمد مهدی نام‌آوری^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: امروزه مطالعات زیادی برای استفاده از ترکیبات طبیعی به‌عنوان عوامل ضدسرطان در رابطه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها انجام شده است. این تحقیق با هدف بررسی خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و آبی جلبک قهوه‌ای سیستم‌سیرا/بندیکا 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 0.36 ± 0.02 میکروگرم بر میکرولیتر بهترین قدرت کاهندگی را نسبت به سایر حلال‌ها نشان داد و در تست کلاته‌کنندگی یون فلزی، عصاره کلروفرمی با میانگین 62.18 ± 0.86 میکروگرم بر میکرولیتر نسبت به سایر حلال‌ها تأثیر بهتری نشان داد ($P < 0.05$). بهترین فعالیت مهار رادیکال آزاد در عصاره‌های اتانولی و متانولی به‌ترتیب با غلظت $15/83$ و $33/21$ میکروگرم بر میکرولیتر مشاهده گردید و عصاره متانولی دارای فعالیت مهار رادیکال آزاد بهتری نسبت به عصاره اتانولی بود ($P < 0.05$). در تعیین خواص ضدسرطانی، عصاره متانولی با غلظت $30 \pm 1/33$ میکروگرم بر میکرولیتر بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشته و کمترین اثر مربوط به عصاره آبی با غلظت $66/67 \pm 1/11$ میکروگرم بر میکرولیتر بود ($P < 0.05$).

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

واژگان کلیدی: ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان، رادیکال آزاد، قدرت کاهندگی، سیستم‌سیرا/بندیکا

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

مقدمه

اکسیداسیون حاصل از گونه‌های فعال 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 قلبی‌وعروقی است. اگرچه بدن دارای سیستم دفاعی است، ولی قرار گرفتن مداوم در معرض مواد شیمیایی و آلاینده‌ها می‌تواند منجر به افزایش تعداد رادیکال‌های آزاد خارج از ظرفیت دفاعی بدن و بروز آسیب‌های اکسیداتیو غیرقابل بازگشت شود.

بنابراین آنتی‌اکسیدان‌ها با خاصیت حذف رادیکال‌های آزاد نقش مهمی 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 بیوشیمیایی 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 به‌عنوان عوامل ضد سرطان در رابطه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب انجام شده است. تولیدات دریایی و به‌ویژه ترکیبات حاصل از متابولیسم ثانویه ارگانیک‌های دریایی یک منبع بالقوه است که نسبت به منابع خاکی بیشترین محصولات داروهای ضدسرطانی را تولید می‌کنند. جلبک‌های دریایی یکی از مهم‌ترین ارگانیک‌های دریایی در تولید مواد زیست‌فعال هستند. جلبک‌ها که تحت عنوان Sea weed در دنیا شناخته می‌شوند، به‌طور کلی شامل سه شاخه جلبک‌های سبز، قرمز و قهوه‌ای و سه رده کلروفیسه، ردوفیسه و فائوفیسه بوده و در سلسله Protoctista قرار می‌گیرند [۳]. جلبک‌های قهوه‌ای یا *Phaeophyceae* از گروه‌های مهم جلبکی در ترکیبات زیست‌فعال

^۱ دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

^۲ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران

^۳ موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

* نشانی نویسنده مسئول:

چابهار، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

تلفن: ۰۹۱۲۶۴۸۷۴۱۷ | دورنویس: ۰۵۴۳۱۲۷۲۰۹۵

پست الکترونیک: taherienator@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۰ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۴/۱۳

آبی و آلی شامل: ان‌هگزان، اتانول، متانول، 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 به‌دست آمده به روش انجمادی با دستگاه فریز درایر (Jaltec, 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 سیانید ۱ درصد مخلوط شد. محلول به‌مدت 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ 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 (۳/۷، ۳۷، ۳۷۰، ۱۸۵۰، ۳۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره جلبک ساخته شد. به محلول‌ها ۰/۴ میلی‌مولار (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کلرید آهن اضافه شد، پس از ۳ دقیقه ۰/۸ میلی‌مولار (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 به‌عنوان گروه کنترل استفاده شد و میزان درصد کلاته کنندگی یون آهن با استفاده از فرمول زیر سنجش شد [۱۳]. از اسید اسکوربیک نیز به‌عنوان استاندارد استفاده شد:

$$\text{درصد مهار} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100$$

A_0 : میزان جذب کنترل و A_1 : میزان جذب نمونه/ استاندارد
آزمون فعالیت مهار رادیکال آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) با توجه به روش ارائه شده Matoba و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام شد. به‌طور خلاصه، یک میلی‌لیتر از محلول DPPH ۰/۱ مول بر میلی‌لیتر متانول ۹۵ درصد (حجمی/ حجمی) با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها تیمار شد. مخلوط حاصل تکان داده شد و به‌مدت 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 به‌عنوان یک کاهش

می‌باشد. انواع مختلفی از جلبک‌های قهوه‌ای شامل: *Sargassum Laminaria japonica* و *Undaria pinnatifida fosiforme* هستند که به‌عنوان رژیم غذایی در آسیای شرقی استفاده می‌شوند. ترکیباتی مانند gepsin, porphyran، 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،۴]. Moussavou و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثرات ضدسرطانی جلبک‌های مختلف را بر سلول‌های سرطان سینه و کولورکتال انسانی مطالعه کرده و بیان نمودند که باتوجه 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 به‌دست آمده نشان داد که القای عصاره جلبکی در موش‌های مبتلا به سرطان EAT باعث افزایش طول عمر موش شده و به‌طور 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]. جلبک - های موجود در منابع دریایی جنوب کشور و به‌خصوص 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*) به‌دست آمده از سواحل دریای عمان علیه سلول‌های سرطانی کورکتال مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) به‌روش دستی از سواحل چابهار جمع‌آوری 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 به‌صورت پودر درآمد. عصاره‌گیری از جلبک به روش غوطه‌وری ۳۰ درصد جرم حجمی با استفاده از حلال‌های

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

$$\% = [(A_C - A_S) / A_C] \times 100$$

مهار رادیکال آزاد

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 CO_2 در فلاسک‌های استریل کشت داده شدند [۱۵]. بررسی سمیت سلولی عصاره آبی و آلی جلبک قهوه-ای با استفاده از آزمون MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide در پلیت‌های ۹۶ خانه به میزان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سلول در هر چاهک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵ درصد 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 CO_2 انکوبه شد. بعد از گذشت ۴ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج گشته، در دمای $4^\circ C$ به مدت ۳ دقیقه و در دور ۳۰۰۰ با سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شد. سپس، محتویات رویی آن‌ها دور ریخته شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی‌متیل سولفوکساید (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 الیزا ریدر خوانده شد [۱۶]. جهت تحلیل آماری، از آزمون شاپیرو-ویلک به‌منظور 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 معنی-دار 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 Fe^{+2} به Fe^{+3}

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 کلروفومی 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 کلروفومی 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 به‌علت 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 کلروفومی نسبت به عصاره اتانولی دارای اثر کلاته‌کنندگی بهتری بود. عصاره متانولی برای کلاته‌کنندگی یون فلزی فاقد محدوده استاندارد بوده و اثری نشان نداد. از سوی دیگر، DPPH یک رادیکال پایدار است که حداکثر جذب آن در ۵۱۷ نانومتر بوده و به‌راحتی 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 کلروفومی برای خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد فاقد محدوده استاندارد بوده و اثری 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 متفاوت 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 کلروفوم در مقام بعدی بود. کمترین اثر مربوط به عصاره-های ان‌هگزانی و آبی بود. میزان غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر عصاره متانولی بیشترین اثر را نسبت به کنترل و غلظت‌های کمتر عصاره نشان دادند ($P < 0.05$). دیگر عصاره‌ها در این غلظت اختلاف معنی‌داری 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

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

LC₅₀ عصاره‌های جلبک *Cystoseira indica* روی سلول‌های سرطان کولورکتال در نمودار شماره ۳ آورده شده است. کمترین میزان برای سلول‌های سرطانی کولورکتال مربوط به عصاره متانولی (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 زنده ماندن 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 کاهندگی (Reducing power) عصاره‌های مختلف جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*)

عصاره غلظت mg/ml	کلروفومی	متانولی	اتانولی
۱	۰/۳۶±۰/۰۱۸ ^{ai}	۰/۱۰۶±۰/۰۰۱ ^{bm}	۰/۱۲±۰/۰۰۶ ^{bm}
۰/۵	۰/۱۷۱±۰/۰۰۸ ^{bi}	۰/۰۴۷±۰/۰۰۴ ^{cm}	۰/۰۶۱±۰/۰۰۲ ^{cm}
۰/۱	۰/۰۳±۰/۰۰۲ ^{ci}	۰/۰۰۷±۰/۰۰۳ ^{dm}	۰/۰۰۳ ^{dm}
۰/۰۱	۰/۰۰۳ ^{ci}	۰/۰۰۴±۰/۰۰۱ ^{dm}	۰/۰۰۵±۰/۰۰۱ ^{dm}
۰/۰۰۱	۰/۰۱۶ ^{ci}	۰/۰۵±۰/۰۰۰ ^{dm}	۰/۰۰۱۵±۰/۰۰۴ ^{dm}
استاندارد	۰/۲۰۳±۰/۰۰۲ ^{bi}	۰/۲۰۳±۰/۰۰۲ ^{ai}	۰/۲۰۳±۰/۰۰۲ ^{ai}

نتایج به شکل انحراف میانگین می‌باشد. حروف a,b,c,d,e اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف I,i,m 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 زنده ماندن سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک قهوه‌ای

(*Cystoseira indica*)

عصاره غلظت mg/ml	متانولی	کلروفومی	ان-هگزانی	اتیل استاتی	آبی
۱۰۰۰	۳۰±۱/۳۳ ^{al}	۵۰/۱۱±۱/۴۴ ^{am}	۶۹/۱۱±۱/۲۳ ^{ao}	۵۸/۵۵±۲/۶۷ ^{an}	۶۶/۶۷±۱/۱۱ ^{ao}
۵۰۰	۶۶/۶۶±۰/۳۸ ^{bl}	۶۹/۵۵±۱/۶۶ ^{bl}	۷۷/۲۳±۱/۶۶ ^{bm}	۶۶/۷۸±۱/۸۸ ^{al}	۷۷/۳۳±۱/۰۶ ^{blm}
۲۵۰	۸۸/۳۲±۰/۱۱ ^{cm}	۷۷/۵۵±۲/۳۳ ^{cl}	۸۹/۲۲±۱/۰۹ ^{cm}	۷۹/۹۹±۳/۴۹ ^{bl}	۸۵/۷۱±۱/۳۱ ^{cm}
۱۲۵	۸۹/۷۷±۰/۴۴ ^{cl}	۸۹/۲۲±۳/۴۴ ^{dl}	۹۰/۱۱±۲/۶۹ ^{cl}	۸۹/۷۷±۲/۷۷ ^{cl}	۸۷/۵±۰/۴۴ ^{cl}
کنترل	۹۴/۲۲±۰/۴۴ ^c	۹۴/۵۵±۲/۱۴ ^c	۹۶/۳۸±۰/۹۹ ^c	۹۵/۵۵±۱/۵۸ ^c	۹۲/۲۲±۱/۷۸ ^d

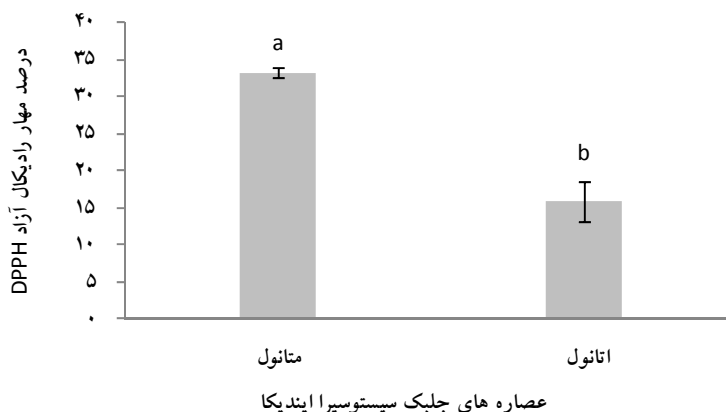
نتایج به شکل انحراف میانگین می‌باشد. حروف a,b,c,d,e اختلاف معنی‌دار در هر ستون و حروف l,m,n,o,p اختلاف معنی‌دار در هر ردیف را نشان می‌دهد. وجود حداقل یک حرف همنام نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد.



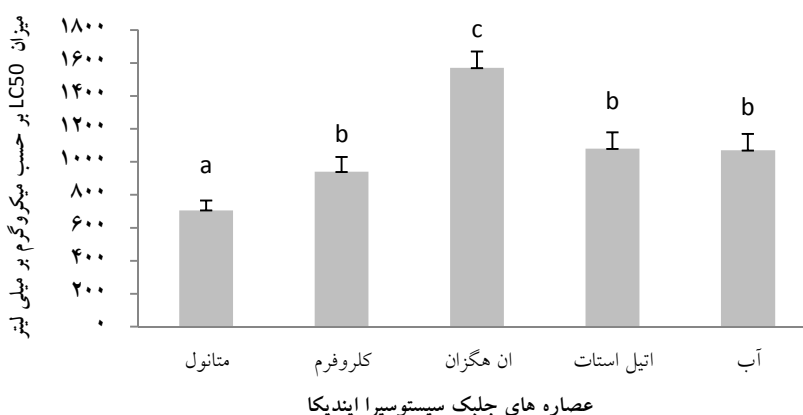
عصاره های جلبک سیستوسیرا ایندیکا

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- خشتی کنندگی رادیکال آزاد (درصد) در تیمارهای مختلف عصاره‌های آلی جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*)
حروف غیرهمنام نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد.



نمودار شماره ۳- میزان LC 50 عصاره‌های جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) بر سلول‌های سرطان کورکتال

بحث

آب اکسیژنه، جلوگیری از جدا کردن هیدروژن، قدرت کاهش و مهار رادیکال آزاد می‌باشد [۲۰،۱۹]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهنده بر پایه شکست زنجیره رادیکال آزاد و دادن یک اتم هیدروژن است. هم‌چنین، کاهنده‌ها با پیش‌سازهای خاصی از پراکسید وارد واکنش می‌شوند. در نتیجه از تشکیل پراکسید جلوگیری می‌کنند [۲۱]. ترکیبات جلبک قهوه‌ای ممکن است به‌عنوان کاهنده عمل کند و بدین‌ترتیب یون الکترون‌ها را اهدا کرده و با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و آنها را به ترکیبات پایدار تبدیل می‌کند که در نهایت زنجیره رادیکال آزاد را خشتی می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که قادرند با اثرات مخرب اکسیدان‌ها در بدن مقابله کنند. از نقطه نظر بیولوژیکی، آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان سوبسترای هستند که در غلظت پایین در مقایسه با سوبسترای مستعد اکسید شدن توانایی به‌تاخیر انداختن یا مهار روند اکسیداتیو را دارند. در این تعریف سوبسترا به هر مولکول قابل اکسید شدن در محیط زنده یعنی لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA گفته می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حلال متانول تأثیر معنی-

ترکیبات زیستی متعددی با گستره کاربردی متنوعی هم- چون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و استخراج شده است و بسیاری از متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه این ارگانیسم‌ها می‌توانند به مواد زیست‌فعال مورد استفاده در صنایع دارویی تبدیل شوند. در پژوهش حاضر عصاره‌های مختلف جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) اثر مهار آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی مناسبی را بر اساس تست‌های قدرت کاهندگی، فعالیت کلاته‌کنندگی، DPPH و MTT نشان دادند. در بین حلال‌های مورد مطالعه بهترین میزان قدرت کاهندگی در حلال کلروفرم مشاهده گردید و در این حلال نیز غلظت ۱ میلی‌گرم در میکرولیتر بهترین تأثیر را در تست قدرت کاهندگی نشان داد (جدول شماره ۱). قدرت کاهندگی یک ترکیب می‌تواند به‌عنوان شاخص قابل‌توجهی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد [۱۸]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل مکانیسم‌های 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 می‌کند و در نهایت در این نوع عصاره نسبت مواد فعال زیستی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی نسبت به کل محلول استخراجی در قیاس با عصاره کلروفومی (با قطبیت کمتر) کاهش می‌یابد. برای اندازه‌گیری اثرات سمیت سلولی عصاره‌های آبی و هیدروالکلی جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) از آزمون MTT استفاده شد. در این روش MTT که زرد رنگ 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 متانولی 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 سرطان سینه ۷-MCF و HL-۶۰ انجام دادند. نتایج نشان داد که جلبک-های *Hydroclathrus clathratus* و *Padina arborescens* موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی با کمترین اثر بر سلول‌های سالم می‌شوند [۲۸]. در مطالعه فعالیت سیتوتوکسیک جلبک قرمز *Polysiphonia lanosa* در آزمایشگاه بر علیه سلول‌های سرطانی DLD۱ و HTC۱۱۶ (سرطان کولورکتال انسانی) نتیجه عملکرد عصاره کلروفومی و عصاره متانولی بهتر بوده است [۲۴]. در این مطالعه نیز عصاره‌های آبی و کلروفومی و متانولی 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 بالا بردن قابلیت طبیعی سلول برای سازش‌پذیری نسبت به محیط زیست آن‌ها، حفاظت می‌کند.

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر نشان داد که عصاره متانولی جلبک قهوه‌ای (*Cystoseira indica*) در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین فعالیت قدرت کاهندگی و فعالیت حذف رادیکال آزاد را دارد. بیشترین فعالیت کلاته‌کنندگی در عصاره کلروفومی دیده شد. هم-چنین، عصاره متانولی و سپس کلروفومی بیشترین اثر سمیت سلولی را علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال نشان دادند. با توجه

داری در توانایی خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد در تیمارهای مختلف عصاره‌های جلبک نسبت به حلال اتانول بوده و حلال کلروفوم نیز تأثیری بر توانایی خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد نشان نداد (نمودار شماره ۲). بر اساس گزارش‌ها بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد جلبک‌ها مربوط به ترکیبات فنولی آنها می‌باشد. هم‌چنین، وابستگی قابل توجهی بین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و محتوی فنل تام گزارش شده است. در واقع تغییر در قطبیت حلال، توانایی آنها را جهت انحلال گروه‌های عاملی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تغییر می‌دهد و بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 فنل‌های برومینه، هتروسیکل‌های اکسیژن برومینه، هتروکسیل‌های نیتروژنی، کانییک اسیدها، مشتقات گوانیدینی، مشتقات فسفازین، اسیدهای آمینه و آمین‌ها، استرول‌ها، پلی‌ساکاریدهای سولفاته و پروستا-گلان‌دین‌ها می‌باشد [۲۳]. بررسی اثر ضدسرطانی جلبک قرمز *Por-phyra dentata* نشان داد استرول این جلبک پتانسیلی بالقوه برای حفاظت سلول‌ها در برابر پیدایش تومور سلول‌های 4T1 دارد [۲۴]. فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات، از تولید اکسی‌رادیکال و در نتیجه اکسیداتیوهای خطرناک جلوگیری می‌کند. ظرفیت کلاته-کنندگی فلزات دارای نقش مهمی در مکانیسم آنتی‌اکسیدانی، از طریق کاهش غلظت تبدیل فلز می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان داد که حلال کلروفوم بهترین عملکرد را در قدرت کلاته‌کنندگی 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 آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه مؤثر هستند [۲۴]. بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت کاهندگی آهن ارتباط مثبتی 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 کلاته‌کنندگی 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 آنتی‌اکسیدان می‌باشد، کاهش یافته و رنگ زرد متنج شده، جذب عصاره را کاهش می‌دهد [۲۶]. اثبات

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

به نتایج، عصاره‌های متانولی و کلروفومی جلبک قهوه‌ای برای بررسی‌های پیش‌کلینیکی و کلینیکی تولید دارو پیشنهاد می‌گردند.

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, Nejadstari 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, Eftekhari 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.