

بررسی اثر سیتوتوکسیک و ضد سرطانی دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* در شرایط آزمایشگاهی

سعید بحرودی^{(۱)*}، محمد علی نعمت الهی^(۲)، محمد رضا آقا صادقی^(۳)، ملیکا ناظمی^(۴)، بهادر بهروز^(۵)

* S.bahrودي@gmail.com

- ۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه تهران
- ۲- گروه شیلات دانشگاه تهران
- ۳- گروه هیاتیت و ایدز انیستیتو پاستور ایران
- ۴- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان
- ۵- گروه میکروبیولوژی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۳

چکیده

در سال‌های اخیر تلاش‌ها به منظور یافتن مواد زیست فعال از جانداران به خصوص جانوران دریایی افزایش یافته است. در طی این پژوهش اثر ضد سرطانی و سیتوتوکسیک دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور خیارهای دریایی از عمق ۱۰ الی ۳۰ متری اطراف جزیره لارک جمع‌آوری و عصاره گیری از آن‌ها با استفاده از حلال متانول و دی اتیل اتر انجام شد. عصاره‌های به دست آمده پس از تغلیظ به وسیله دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، به وسیله دستگاه وکیوم فریز درایر به صورت پودر خشک درآمد و مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر سیتوتوکسیک و ضد سرطانی دیواره بدن خیار دریایی از روش رنگ سنجی XTT استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که عصاره متانولی استخراج شده در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و عصاره دی اتیل اتری در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توان ممانعت از تکثیر سلول‌های سرطانی اپیدرموئید دهان انسان در محیط آزمایشگاهی را داشتند. همچنین این عصاره‌ها دارای اثر سیتوتوکسیکی قوی بر روی سلول‌های نرمال بودند. در مجموع دیواره بدن خیار دریایی دارای اثر سیتوتوکسیک بسیار قوی بود و می‌توان از آن به عنوان یک ماده سیتوتوکسیک یاد کرد. ولی این عصاره‌ها ارزش درمانی قابل توجهی به منظور درمان سلول‌های سرطان دهانی از خود نشان ندادند.

لغات کلیدی: خیار دریایی، دیواره بدن، عصاره متانولی، عصاره دی اتیل اتری، سیتوتوکسیک، ضد سرطان.

مقدمه

زیست فناوری دریایی یکی از راه های توسعه و پیشرفت تولید محصولات جدید از جانداران دریایی است. این تولیدات می توانند در زمینه های متنوعی مانند سلامت و بهداشت (ترکیبات فعال زیستی با کاربرد دارویی)، غذا و انرژی (آنتی اکسیدان ها) و انرژی صنعتی (سوخت زیستی) کاربرد داشته باشند (Osinga et al., 1999). در سال های اخیر ترکیبات زیست فعال بسیاری از موجودات متنوع دریایی شناسایی و استخراج شده است. جستجو برای کشف متابولیت های جدید منجر به جداسازی حدود ۱۰۰۰ ترکیب جدید از موجودات دریایی شده است (Faulkner, 1996).

خیارهای دریایی یکی از مهم ترین اعضای جوامع آب های ساحلی ماسه ای و گلی اعماق دریاها هستند. این خارپوستان متعلق به راسته خارتنان و هم خانواده ستاره دریایی و توتیا دریایی هستند. بدن آن ها دارای تقارن شعاعی است و دارای پاهای لوله ای در بدن خود هستند که از آن برای تغذیه و حرکت استفاده می کنند. میانگین طول آن ها ۲۰ میلی متر و میانگین عرض آن ۴۸ میلی متر است اما در صورت مساعد بودن محیط اندازه آن ها ممکن است به ۱ متر برسد (Hamel et al., 1998).

این جاندار در جنوب شرق آسیا به عنوان یک ماده غذایی نیروبخش و بهبوددهنده بیماری های نظیر فشارخون، آسم، روماتیسم، بریدگی و سوختگی، ناتوانی های جنسی و مشکلات مزاجی شناخته می شود (Yaacob et al., 1997; Wen et al., 2010). تابه حال ترکیبات زیادی از گونه های مختلف خیار دریایی شناسایی شده است که تعداد بسیاری از این ترکیبات جزء ترکیبات زیست فعال هستند. برخی از گونه های شناسایی شده در کشور مالزی به صورت تجاری در پزشکی و بهبود زخم، زخم های پوستی، آرتروز و فشارخون مورد استفاده قرار می گیرد (Farouk et al., 2007). تاکنون خواص بسیاری از خیار دریایی بررسی و اثبات شده اند که از آن جمله می توان به خواص ضد رگ زایی، ضد سرطانی، ضد انعقاد، ضد

فشارخون، ضد التهاب، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد تصلب شراین، ضد تومور و تسریع در بهبود زخم است (Bordbar et al., 2011). حضور مواد زیست فعالی مانند ساپونین ها، کندروتین سولفات، گلیکوز آمینو گلیکان، پلی ساکاریدهای سولفات، گلیکو پروتئین ها، گلیکو اسفنگو لیپید و اسیدهای چرب ضروری را می توان عامل اصلی پیدایش این خواص در خیار دریایی دانست (Bordbar et al., 2011; Patar et al., 2012).

آمارها نشان می دهد که سرطان عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته است. در سال های اخیر دانشمندان برای درمان این بیماری تلاش های بسیاری انجام داده اند (Kraljevic et al., 2006). بدن انسان تریلیون ها سلول زنده تولید می کند. سلول های سالم رشد می کنند، به سلول های جدید تقسیم می شوند و در نهایت می میرند. در طی سال های ابتدایی زندگی هر فرد سلول های نرمال به سرعت تقسیم می شوند و شرایط رشد طبیعی بدن فرد را فراهم می کنند. بعد از بلوغ بیشتر سلول ها به منظور ترمیم و یا جایگزینی سلول های مرده تقسیم می شوند. انواع مختلفی از سرطان وجود دارد اما همه آن ها به دلیل رشد خارج کنترل سلول های غیرطبیعی بدن ایجاد می شوند. سرطان دهان ششمین سرطان شایع در دنیا می باشد که نزدیک به ۵٪ از تمام بدخیمی ها در مردان و ۲٪ در زنان را تشکیل می دهد (Rodriguez et al., 2004). این بدخیمی جز ده علت اول مرگ و میر محسوب می شود. سالیانه چیزی حدود سی هزار نفر در آمریکا و دو هزار نفر در انگلیس دچار این سرطان می شوند. این بیماری بیشتر در افراد بالای ۴۰ سال شیوع دارد ولی در افراد جوان تر که از تنباکو استفاده می کنند، میزان مبتلایان در حال افزایش است. از عوامل اصلی ایجاد این سرطان می توان به مصرف دخانیات و نوشیدنی های الکلی اشاره کرد. به منظور درمان این بیماری پزشکان از روش هایی مانند جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی استفاده می کنند در حالی که این سرطان به درمان مقاوم بوده و درمان آن با موفقیت چندانی همراه نیست (Atkinson et al., 2008).

در سال‌های اخیر محققین مطالعاتی را به‌منظور بررسی و اثبات اثر سیتوتوکسیکی گونه‌های مختلف خیار دریایی انجام داده‌اند و نتایج حاصل از این مطالعات نیز گویای وجود اثر سیتوتوکسیکی قوی در گونه‌های موردبررسی بودند (Hua et al., 2012; Tian et al., 2005; Rodriguez et al., 1991). بر طبق این مطالعات ترکیباتی مانند تری‌ترپن‌گلیکوزیدها عامل اصلی ایجاد این اثر در خیار دریایی معرفی شده‌اند (Hua et al., 2012). گونه خیار دریایی موردبررسی در این پژوهش گونه *Holothuria leucospilota* می‌باشد که از عمق ۱۰-۳۰ متری اطراف جزیره لارک در خلیج فارس جمع‌آوری شدند. جزیره لارک یکی از جزیره‌های ایران در خلیج فارس و جزئی از استان هرمزگان است. از آنجا که خلیج فارس بستر مناسبی برای زیست بسیار از بی‌مهرگان مانند خیارهای دریایی می‌باشند و از آنجاکه خیارهای دریایی نسبت به سایر خارپوستان خواص دارویی بسیار زیادی را از خود نشان داده‌اند، بررسی خواص دارویی خیارهای دریایی بسیار حائز اهمیت است.

مواد و روش کار

جمع‌آوری خیار دریایی

۱۰ عدد از گونه خیار دریایی موردنظر، هر یک به وزن تقریبی ۰/۳۵ کیلوگرم، از عمق ۱۰-۳۰ متری اطراف جزیره لارک جمع‌آوری و با استفاده از یخ به ساحل منتقل گردید. به‌محض رسیدن به ساحل نمونه‌ها منجمد و با استفاده از یخ خشک به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه تهران منتقل شدند.

عصاره‌گیری

نمونه‌ها با استفاده از آب شیر انجماد زدایی شدند و سپس به‌طور کامل برای برداشتن گل‌ولای، ذرات خارجی و یا ماسه‌های باقیمانده از سطح بدن، با آب شسته شدند. از دو طرف خط وسط پشت بدن نمونه‌ها برش داده شدند، ارگان‌های داخلی بدن آن جدا و دیواره بدن با استفاده از

آب جاری شهری پاک شد.

استخراج عصاره‌ها بر اساس روش Naik و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد. ابتدا نمونه‌ها را شسته و سپس با استفاده از قیچی در اندازه‌های ۱ سانتیمتری برش داده شدند، نمونه‌های خردشده به ارلن منتقل شدند و ۱۰۰۰ سی‌سی دی اتیل اتر به آن اضافه شد و تمام سطح نمونه را پوشانند. با استفاده از پنبه و فویل در ارلن بسته شد و به مدت ۲۴ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (۲۵°C) قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت محلول به‌دست‌آمده از صافی گذرانده شد تا ذرات نمونه از آن جدا شود.

به‌منظور استخراج عصاره متانولی، به نمونه‌های خردشده ۱۰۰۰ سی‌سی متانول اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (۲۵°C) قرار گرفت. پس از ۷۲ ساعت محلول به‌دست‌آمده از صافی گذرانده شد و آنچه باقی ماند حلال متانولی و ترکیبات آلی موجود در نمونه بود.

عصاره‌های به‌دست‌آمده به‌منظور حذف حلال آن‌ها (متانول و دی اتیل اتر)، به دستگاه روتاری با دمای ۴۵°C و دور ۱۴۵ وارد شدند. به‌منظور حذف تمام حلال از عصاره نمونه‌ها بعد از این مرحله به مدت ۲۴ ساعت به‌وسیله فریز درایر خشک و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند.

بررسی فعالیت سیتوتوکسیک و ضد سرطانی

سلول‌های سرطانی اپیدرموئید دهان انسان (KB/ C152) و سلول کلیه جنین انسان (HEK/T293) از بخش کشت سلولی انستیتو پاستور ایران به‌صورت فلاسک تهیه شدند و به محیط کشت DMEM^۱ منتقل شد. ابتدا محیط کشت DMEM در pH ۷/۳ تهیه گردید و توسط فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد. سپس به محیط کشت به نسبت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین G و ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین و نیز به نسبت ۱۰

^۱ Dulbecco's Modified Eagle's medium

سپس به منظور بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها رنگ هرکدام از چاهک‌ها به وسیله الیزا ریدر مورد بررسی قرار گرفت (Scudiero et al., 1988). در این بررسی کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شد و به منظور محاسبه IC50 (غلظتی از عصاره که باعث ممانعت از تکثیر ۵۰٪ از سلول‌های سرطانی شده)، CC50 (غلظتی از عصاره که ۵۰٪ سمیت بر روی سلول‌های نرمال داشت) و TI (شاخص درمانی) از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه شش استفاده شد.

نتایج

همان‌طور که از نمودار A-۱ برمی‌آید، عصاره متانولی حاصل‌شده از دیواره بدن خیار دریایی در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سیتوتوکسیکی بیشتری بر سلول‌های سرطانی KB نسبت به سلول‌های نرمال از خود نشان داد. در غلظت ۵۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، این اثر بر سلول‌های نرمال بیشتر شد، به نحوی که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سیتوتوکسیک عصاره تنها بر سلول‌های نرمال مشاهده می‌شود. همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد، غلظت IC50 در این عصاره کمتر از غلظت CC50 است ولی با توجه به شاخص درمانی به دست آمده می‌توان گفت این غلظت‌ها به هم نزدیک بوده‌اند و عصاره اثر سیتوتوکسیکی قوی روی هر دو رده سلولی از خود به نمایش گذاشته است.

عصاره دی اتیل اتری به دست آمده از دیواره بدن خیار دریایی، همان‌طور که در نمودار B-۱ قابل رویت است، جز در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر سیتوتوکسیک عصاره روی سلول‌های نرمال HEK بیشتر از سلول‌های سرطانی KB بود. در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز میزان زنده‌مانی سلول‌های نرمال در حدود ۴۱ درصد بود که عدد نسبتاً خوبی به شمار نمی‌رود و نشان‌دهنده سیتوتوکسیسی بالای این عصاره بر سلول‌های نرمال است. بررسی جدول ۱- نیز گویای این مطلب است

درصد سرم جنین گاو (FBS^۲) فیلتر شده به محیط اضافه شد. روزانه سلول‌های اپیدرموئید دهان و سلول‌های کلیه جنین انسان مورد بررسی قرار گرفتند و سلامت سلول‌های منتقل‌شده به محیط کشت تازه به منظور ادامه آزمایش مورد تأیید قرار گرفت. پس از آن که تعداد سلول‌ها (فلاسک‌های کشت سلولی) افزایش داده شد به منظور بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره متانولی از روش رنگ سنجی XTT (۲-۳-بیس (۲-متوکسی-۴-نیترو-۵-سولفونیل)-۵-(فنیل آمین) کربونیل]-H_۲-تترازولیم هیدروکسید)^۳ استفاده گردید.

به منظور انجام آزمون XTT، ابتدا توسط عمل ترپنیزاسیون سلول‌های اپیدرموئید دهان و سلول کلیه جنین انسان از سطح فلاسک جدا شده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس سلول‌ها با تراکم ۲۵×۱۰^۳ در هرکدام از پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای کشت سلولی توزیع گردیدند و از محیط کشت DMEM به مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر به هر حفره اضافه شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌های در میکرو پلیت‌ها رشد نمایند. در طول این مدت تراکم سلولی بررسی شد و بعد از ۴۸ ساعت که سلول‌ها رشد کردند و به دیواره پلیت متصل شدند محیط کشت سلول‌ها عوض شد و محیط کشت جدید که حاوی هر یک از عصاره‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر اضافه گردید و آزمون سه بار تکرار شد. به منظور شاهد منفی در تعدادی از چاهک‌ها محیط کشت DMEM بدون ترکیب افزودنی اضافه شد. در این آزمون از ترکیب سیکلوسپورین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت از افزودن عصاره‌ها به سلول‌ها به هرکدام از چاهک‌ها به مقدار ۵۰ میکرو لیتر محلول XTT طبق دستورات شرکت سازنده افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد.

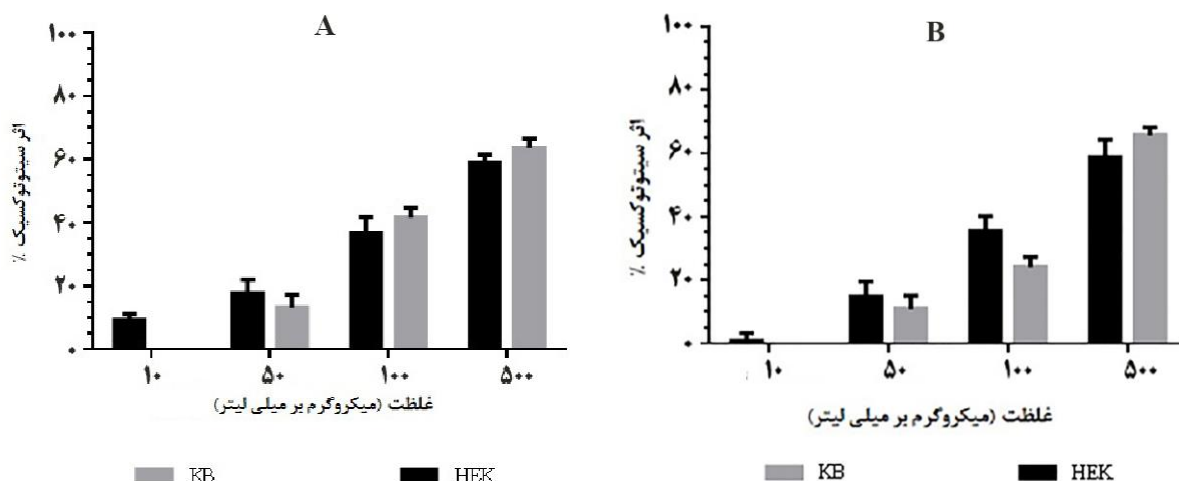
^۲ Fetal Bovine serum

^۳ 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5sulphonyl)-5[(phenylamino)carbonyl]-2 H -tetrazolium hydroxide

که غلظت‌های IC50 و CC50 مربوط به این عصاره نزدیک به هم بودند به‌نحوی که شاخص درمان نزدیک به یک را نشان می‌دهد. به‌دست‌آمده برای این عصاره عددی نزدیک به یک را نشان می‌دهد.

جدول ۱: میزان IC50 (میکروگرم بر میلی‌لیتر)، CC50 (میکروگرم بر میلی‌لیتر) و TI (شاخص درمانی) عصاره متانولی و دی اتیل اتری دیواره بدن خیار دریایی

	عصاره متانولی	عصاره دی اتیل اتری
% IC50	$224/9 \pm 1/33$	$279 \pm 1/17$
% CC50	$281 \pm 1/18$	$284/9 \pm 1/19$
TI (CC50/IC50)	1/24	1/02



نمودار ۱: مقایسه میزان اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های متانولی (A) و دی اتیل اتری (B) دیواره بدن خیار دریایی بر روی سلول‌های سرطانی (KB) و نرمال (HEK293T)

بحث

دریایی، وابسته به غلظت مصرفی قادر به ممانعت از رشد سلول‌های سرطان روده بزرگ هستند. در عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی، میزان اثر سیتوتوکسیک عصاره نسبت به اثر ممانعت از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی اپیدرموئید دهانی انسان مقداری کمتر بود. شاخص درمانی به‌دست‌آمده در مورد این عصاره نیز گویای این مطلب است. همان‌طور که در نمودار ۱ نیز مشخص است عصاره متانولی خام استخراج‌شده از دیواره بدن خیار

مقالات زیادی از حضور مواد دارای خاصیت ضد سرطانی در خیار دریایی خبر می‌دهند (Ogushi *et al.*, 2005). همان‌طور که از نتایج برمی‌آید، عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی تا حدودی از خود خاصیت ضد سرطانی نشان دادند و مانع از رشد سلول‌های سرطانی اپیدرموئید دهان انسان شدند. Ogushi و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۶ اثبات کردند، مولکول‌های بزرگ استخراج‌شده از خیار

دریایی بهترین شاخص درمانی را در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بین سایر غلظت‌ها از خود به‌جای گذاشته است و می‌توان با پی بردن به ترکیبات مؤثره این عصاره و تخلیص این ترکیبات اثر ممانعت‌کنندگی بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی به‌جای گذاشت. همان‌طور که Tian و همکارانش در سال ۲۰۰۵ همچنین خواص ضد توموری و ضد رگ زایی تری ترپن‌های گلیکوزیدی استخراج‌شده از خیار دریایی را به اثبات رساندند.

Rodriguez و همکارانش (۱۹۹۱) ۵ نوع تری ترپن و ساپونین از خیار دریایی گونه *Holothuria forskalii* جداسازی نمودند و اثر سیتوتوکسیک و ضدویروسی آن‌ها را گزارش کردند. از آنجاکه ساپونین در حلال‌های قطبی قابل انحلال است، می‌توان گفت این ترکیبات، ترکیب اصلی در این عصاره هستند که باعث ایجاد خاصیت سیتوتوکسیکی در این عصاره شده است. فعالیت سیتوتوکسیکی گلیکوزیدهای تری ترپنی در نتیجه توانایی این ترکیب با ایجاد کمپلکس با غشای سلولی و ایجاد کانال‌های یونی و خلل و فرج در سلول‌ها است. این امر در نهایت باعث اختلال در تنظیم اسمز سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود (Chludil et al., 2003). همچنین Hua و همکارانش (۲۰۱۲) فعالیت سیتوتوکسیکی تری‌ترپن‌گلیکوزیدهای استخراج‌شده از خیار دریایی *Holothuria scabra* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این ترکیبات اثر سیتوتوکسیکی قوی بر روی این ۵ رده سلولی از خود داشت ولی در این تحقیق به میزان این اثر بر روی سلول‌های نرمال و همچنین شاخص درمان برای این ترکیبات گزارش نشد. با توجه به این مطالب می‌توان دلیل اثر سیتوتوکسیکی قوی این عصاره‌ها را بر روی سلول‌های نرمال متوجه شد.

در عصاره دی اتیل اتری استخراج‌شده از دیواره بدن خیار دریایی، اثر سیتوتوکسیکی بالایی روی هر دو رده سلولی

مشاهده شد و با توجه به شاخص درمانی به‌دست‌آمده برای این عصاره می‌توان گفت این اثر روی هر دو رده سلولی تقریباً یکسان بوده است. Althunibat و همکاران (۲۰۱۳) اثر ضد سرطانی دو گونه از خیار دریایی (*Holothurian edulis* و *Stichopus horrens*) را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره ارگانیک به‌دست‌آمده از *S. horrens* اثر سیتوتوکسیک بسیار قوی در برابر دو رده سلولی مورد بررسی دارد. عصاره دی اتیل اتری استخراج‌شده از دیواره بدن خیار دریایی می‌تواند غنی از بازهای اسفنگوئیدی باشند (Althunibat et al., 2009). این ترکیبات از خیار دریایی جداسازی شده‌اند و خاصیت سیتوتوکسیکی آن نیز به اثبات رسیده است (Sugawara et al., 2006). اسفنگوئیدهای بازی باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در قطعات فشرده کروماتین و افزایش فعالیت کاسپاز ۳ (caspase-3) می‌شود که این امر نشان‌دهنده کاهش زنده‌مانی به‌وسیله آپوپتوز سلول‌ها است. همچنین اسفنگو لیپیدهای به‌دست‌آمده از خیار دریایی می‌توانند به‌عنوان یک ماده برای سرکوب سرطان روده بزرگ در رژیم غذایی مورد استفاده قرار بگیرد (Sugawara et al., 2006). به‌علاوه Yang و همکارانش در سال ۲۰۰۳ زنجیره اسید چرب ۱۲- متیل تترا دکانوئیک اسید را از خیار دریایی استخراج کردند و اثبات کردند که این ترکیب مانع از تکثیر سلول‌های سرطان پروستات (PC3) می‌شود (Yang et al., 2003).

در کل با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش XTT که به‌منظور بررسی اثر ضد سرطانی احتمالی دیواره بدن خیار دریایی انجام شد، مشخص می‌شود که عصاره‌های استخراج‌شده از خیار دریایی توان ممانعت از تکثیر سلول‌های سرطانی اپیدرمیوید دهان انسان (KB) در محیط *Vitro* را دارند؛ اما این عصاره‌ها اثر سیتوتوکسیکی قوی نیز روی سلول‌های نرمال داشتند که این امر سبب کاهش ارزش دارویی و درمانی این عصاره به‌منظور درمان

Farouk A.A., Ghouse F.A.H. and Ridzwan B.H., 2007. New bacterial species isolated from Malaysian sea cucumbers with optimized secreted antibacterial activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3: 60-65.

Faulker J., 1996. Marine natural products. *Natural Products*, 13: 75- 125.

Hamel J.F. and Mercer A., 1996. Evidence of chemical communication during the Gametogenesis of *Holothuroids*. *Ecology*, 77 (5): 1600-1616.

Hua H., ling L., Yangyang-Hua Y., Xiao-Hua W. and Min-Xiang P., 2012. Triterpen glycosides from sea cucumber *Holothuria scabra* with cytotoxic activity. *Chinese Herbal Medicines*, 4(3): 183-188.

Kraljevic S., Sedic M., Scott M., Gehrig P., Schlapbach R. and Pavelic K., 2006. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: what can be seen from the proteomics point of view. *Cancer Treatment Reviews*, 32(8): 619-29.

Naik C.G., Kamat S.Y., Parameswaran P.S., Das B., Bhattacharya S., Ramani P., Bhakuni D.S., Goel A.K., Jain S. and Srimal R.C., 1989. Bioactivity of marine organisms. IV- Screening of some marine animals from the Indian Ocean.

این سرطان شد؛ اما با توجه به مطالعات قبلی و همچنین نتایج حاصل شده از این بررسی، می توان انتظار داشت که با شناسایی و استخراج مواد مؤثره موجود در این عصاره ها، شاهد اثر درمانی به مراتب بهتری باشیم.

تشکر و قدردانی

در انتها جا دارد از زحمات و پشتیبانی های استاد خوبم دکتر سید ولی حسینی و همچنین راهنمایی های دکتر روح الله وهاب پور و کمک های بی شائبه مهندس سپیده افشار رضایی کمال قدردانی را داشته باشیم.

منابع

Althunibat O.Y., Hashim R.B., Taher M., Daud J.M., Ikeda M.A. and Zali B.I., 2009. In vitro antioxidant and anti proliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *European Journal of Scientific Research*, 37 (3): 376-387.

Atkinson J.C., Harvey K.E. and Domingo D.L., 2008. Oral and dental phenotype of dyskeratosis congenita. *Oral Disease*, 14: 419-427.

Bordbar S., Anwar F. and Saari N., 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods. *Marine Drugs*, 9: 1761-1805.

Chludil, H.D. Murray, A.P. Seldes, A.M. and Maier, M.S., 2003. Biologically active triterpene glycosides from sea cucumbers (holothuroidea, echinodermata). *Studies in natural products chemistry*, 28 (Part I): 587-616.

- Mahasagar - Bulletin National Institute of Oceanography, 22: 99-104.
- Ogushi M., Yoshie-stark M. and Suzuki T., 2005.** Cytostatic Activity of Hot Water Extracts from the Sea Cucumber in Caco-2. Food Science and Technology Research, 11(2): 202-206.
- Ogushi M., Yoshie-stark M., and Suzuki T., 2006.** Apoptosis-inducing Activity of HotWater Extracts from the Sea Cucumber in Human Colon Tumor Cells. Food Science and Technology Research, 12 (4): 290-294.
- Patar A., Jamalullail S.M.S.S., Jaafar H. and Abdullah J.M., 2012.** Analysis of sea cucumber body wall extracts from *Perhentian stichopus variegatus* species using gas chromatography mass spectrophotometry. European Journal of Scientific Research, 68(1): 54-59.
- Rodriguez J., Castro R. and Riguera R., 1991.** Holothurinosides: New anti-tumor non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothruia forskalii*. Tetrahedron, 47: 4753-4762.
- Rodriguez T., Altieri A., Chatenoud L., Gallus S., Bosetti C., Negri E., Franceschi S., Levi F., Talamini R. and Vecchia C.L., 2004.** Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. Oral Oncology, 40: 207-213.
- Scudiero DA., Shoemaker RH., Paull KD., Monks A., Tierney S., Nofziger TH., Currens MJ., Seniff D. and Boyd MR., 1988.** Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res, 48(17):4827-33.
- Sugawara T., Zaima N., Yamamoto A., Sakai S., Noguchi R. and Hirata T., 2006.** Isolation of sphenoid bases of sea cucumber cerberosides and their cytotoxicity against human colon cancer cells. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70: 2906-2912.
- Tian F., Zhang X., Tong Y., Yi Y., Zhang S., Li L., Sun P., Lin L. and Ding J., 2005.** A new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities in vitro and in vivo. Cancer Biology & Therapy, 4: 874-882.
- Wen J., Hu C. and Fan S., 2010.** Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90: 2469-2474.
- Yaacob H.B., Kim K.H., Shahimi M., Aziz N.S. and Sahil S.M., 1997.** Malaysian sea cucumber (Gamat): A prospect in health food and therapeutic. In: Proceeding of

Asian Food Technology Seminar, Kuala Lumpur, Malaysia, 6 P.

Yang P., Collin P., Madden T., Chan D., Sweeney-Gotsch B., McConkey D. and Newman R.A., 2003. Inhibition of

proliferation of PC3 cells by the branched-chain fatty acid, 12-methyltetradecanoic acid, is associated with inhibition of 5-lipoxygenase. Prostate, 55: 281–291.

In vitro cytotoxic and anti-cancer effects of body wall for sea cucumber (*Holothuria leucospilota*)

Bahroodi, S.^{(1)*}; Nematollahi, M. A.⁽²⁾; Aghasadeghi, M.R.⁽³⁾; Nazemi, M.⁽⁴⁾; Behroz, B.⁽⁵⁾

* S.bahroodi@gmail.com

1-processing marine products, Fisheries Dept. Faculty of Natural Resources/ University of Tehran, Karaj, Iran

2-Fisheries Dept. Faculty of Natural Resources/ University of Tehran, Karaj, Iran

3-Hepatitis and AIDS Departments, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

4-Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Bandar abbas, Hormozgan, Iran

5-Microbiology Department of Tehran, University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Key words: Sea cucumber, body wall, methanolic extract, diethyl etheric extract, cytotoxic, anti-cancer

Abstract

In recent years efforts to find bioactive compounds from live organisms especially marine animals have been increased. In the present study, the anticancer and cytotoxic effects of sea cucumber body walls (*Holothuria leucospilota*) were investigated. For this purpose, sea cucumbers were collected from Larak Island at depths of 10 to 30 m and extraction process was done with methanol and diethyl ether solvent which then concentrated by rotary evaporator (40°C) following lyophilization with vacuum freeze dryer. XTT method was used to investigate anticancer and cytotoxic effects of body wall extracts. The results showed that the methanolic extract could prevent proliferation of human oral epidermoid carcinoma cells (KB) at concentrations of 100 and 500 µg/ml. The diethyl etheric extract also could prevent proliferation of KB at 500 µg/ml concentration. Overall result showed that sea cucumber body wall had a strong cytotoxic effect on normal cell line (Human embryonic kidney cell [HEK]) which can be used as potent cytotoxic material. However these extracts did not show significant therapeutic value against KB cells.

*Corresponding author