

بررسی فعالیت سیتوتوکسیک بخش‌های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره متانولی اسفنج *Ircinia mutans* بر سه رده سلول سرطان انسانی

فاطمه حیدری جامع‌بزرگی^۱، مرتضی یوسف‌زادی^۱، امیدرضا فیروزی^۲، ملیکا ناظمی^۳، امیررضا جاسبی^{۳*}

*jassbiar@sums.ac.ir

- ۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۳- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

چکیده

اسفنج‌ها به عنوان ابتدائی‌ترین ارگانیسم‌های یوکاریوت پرسلولی، جانورانی ساکن چسبیده به بستر و بدون اندام دفاعی مشخصی می‌باشند، بنابراین برای دفاع از خود در برابر شکارچیان و پاتوژن‌های موجود در محیط، متابولیت‌های ثانویه متعددی تولید می‌کنند. در این تحقیق، اسفنج *Ircinia mutans* جمع‌آوری شده از آبهای جزیره لارک خلیج فارس، به منظور ارزیابی خاصیت سیتوتوکسیک بخش‌های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره‌ی متانولی‌اش، مورد بررسی قرار گرفت. بخش‌های هگزانی و دی کلرومتانی با استفاده از روش استخراج مایع-مایع، از عصاره متانولی به دست آمد و سپس به وسیله آزمون رنگ سنجی MTT، بر روی سه رده سلولی MOLT-4، MCF-7 و HT-29 آزمایش شدند. بخش هگزانی با IC_{50} به ترتیب برابر با $14/57 \pm 1/5$ و $41/64 \pm 3/5$ $\mu g/mL$ و بخش دی کلرومتانی با IC_{50} به ترتیب برابر با $12/51 \pm 0/8$ و $26/65 \pm 2/2$ $\mu g/mL$ بر روی سه رده سلولی ذکر شده، فعالیت سیتوتوکسیک متوسط تا قوی را بر روی هر سه رده سلولی سرطانی نشان دادند. نتایج همچنین بیانگر آن است که بخش دی کلرومتانی نسبت به بخش هگزانی فعالیت سیتوتوکسیک قوی‌تری دارد. یافته‌های این تحقیق پتانسیل بالای اسفنج‌های خلیج فارس را به عنوان منابع ارزشمند دارای ترکیبات ضد سرطان جدید، نشان می‌دهد.

لغات کلیدی: اسفنج، متابولیت‌های ثانویه، فعالیت سیتوتوکسیک، خلیج فارس

*نویسنده مسئول

مقدمه

اکوسیستم‌های دریایی دارای منابع عظیمی از محصولات جدید طبیعی زیست فعال، با ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی خاص می‌باشند که در محیط‌های خشکی یافت نمی‌شوند (Leal et al., 2012; Malve, 2016). با وجود آنکه بررسی زیست محیطی ترکیبات طبیعی دریایی، در چند دهه اخیر آغاز گردیده است، بیش از هزار ترکیب جدید، از موجودات دریایی با خواص جالب دارویی کشف شده است. بنابراین، تصور می‌شود که موجودات دریایی، منابع بالقوه مواد فعال زیستی، برای تولید دارو می‌باشند (Ngo et al., 2012; Leal et al., 2012). در محدوده سالهای ۲۰۰۸-۱۹۸۱ حدود ۶۸٪ داروهای مورد استفاده در کنترل عفونت (شامل ترکیبات ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد انگلی و ضد قارچی) و ۶۳٪ ترکیبات ضدسرطانی، از منابع طبیعی مشتق شده اند (Malve, 2016). محققان بر شاخه‌هایی از بی مهرگان، که دارای حرکت آهسته بوده یا بی مهرگان ساکن و چسبیده به بستر که دارای بدنی نرم و فاقد اندام دفاعی مشخصی هستند و به طور کلی جانورانی که نیاز به یک مکانیسم دفاعی شیمیایی دارند، تمرکز کرده اند (Md et al., 2009; Laport et al., 2012). در مقایسه با سایر آبریان، اسفنج‌های دریایی با توجه به تنوع متابولیت‌های ثانویه شان، به عنوان "معدن طلا" نامیده شده اند، که بدلیل فراوانی و گستردگی، و توانایی بیوسنتز مجموعه‌ای از محصولات طبیعی با ساختار متنوع، منبع اصلی محصولات فعال زیستی می‌باشند (Beedessee et al., 2012). اسفنج‌ها سموم و سایر ترکیبات طبیعی را به منظور دفع شکارچیان، رقابت بر سر فضا با دیگر گونه‌های ساکن، و محافظت در برابر عفونت، تولید می‌کنند. این ارگانیسرها با بیش از ۵۳۰۰ ترکیب دریایی، بسیار با اهمیت بوده و تنوع ترکیبات طبیعی آنها قابل توجه میباشد. (Yasuhara-Bell and Lu, 2010). سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است که با تکثیر کنترل نشده سلول‌های آناپلاستیک که تمایل به حمله به بافت‌های اطراف و متاستاز به سایر بافت‌ها و اندامها را دارد، توصیف می‌شود. دانشمندان متعددی در سراسر

جهان نشان دادند که عصاره اسفنجی، فعالیت ضد سرطانی قابل توجهی در برابر سلول‌های سرطانی دارد (Beedessee et al., 2012; Bhimba et al., 2013; Dellai et al., 2010). از سال ۱۹۹۰ به بعد اسفنج‌ها و مرجانها منابع عمده کشف بیشتر ترکیبات طبیعی مستخرج از دریا، معرفی گردیدند. غیر از اقیانوس‌های منجمد شمالی و جنوبی که خارپوستان و مرجانیان منبع اصلی تولید ترکیبات طبیعی بوده اند، در سایر اقیانوس‌ها، اسفنج‌ها (۵۲-۴۴٪) و مرجانیان (۳۱-۲۸٪) منابع غالب تولید ترکیبات طبیعی دریایی می‌باشند (Leal et al., 2012). غربالگری اسفنج‌ها به منظور کشف ترکیبات ضد سرطان جدید، عوامل پاکلی تاکسل مانند laulimalide و isolaulimalide را به همراه داشته است. بعلاوه، تخمین زده شده است که عوامل وینکا آلکالوئید، Halichondrin B و spongistatin I از اسفنجهای *Halichondria okadai* و *Spongia* sp. بسیار موثر تر از پاکلی تاکسل‌ها در داخل بدن می‌باشند (Ghaderi et al., 2010). استروئیدهای استخراج شده از اسفنج‌های دریایی فعالیت سیتوتوکسیک قوی را بر روی رده‌های سلولی سرطانی مختلف نشان داده اند. اپوکسی استرول‌های استخراج شده از اسفنج *Axinella cf. bidderi* اقیانوس هند، فعالیت سیتوتوکسیک قوی را بر روی رده سلولی سرطان تخمدان (IGROV-ET)، سرطان پانکراس (PANC1)، سرطان ریه (NSCLC N6-L16)، نشان دادند (Funel et al., 2004). ترکیبهای متعددی جدا شده از اسفنج‌های مختلف، در حال حاضر در مرحله پیشرفته‌ای از آزمایشات بالینی قرار دارند (Dhinakaran and Lipton, 2012).

با وجود تحقیقات بیشمار بر روی جداسازی و شناسایی ترکیبات با خواص بیولوژیک متعدد از اسفنج‌های دریایی در سراسر دنیا، تحقیقات بسیار اندکی در این زمینه بر روی اسفنج‌های خلیج فارس صورت گرفته است، که از آن جمله میتوان به موارد ذیل اشاره کرد: ناظمی و همکاران (۱۳۹۱)، با بررسی اثر ضد قارچی متابولیت‌های ثانویه نیمه قطبی-غیرقطبی اسفنج *Ircinia mutans* در دو فصل تابستان و زمستان موجود در جزیره کیش، خلیج

شیمی دارویی و گیاهی علوم پزشکی شیراز منتقل شدند و سپس در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. نمونه اسفنج بر اساس مطالعات میکروسکوپ نوری و الکترونی بر روی لام های اسکلتی و اسپیکول های جدا شده با کلید های راهنمای اسفنجی (Hooper, 2000) شناسایی شدند.

تهیه عصاره اسفنجی Preparation of sponge extracts

نمونه اسفنج (۳/۲۹ کیلوگرم وزن تر) به قطعات کوچک (تقریباً ۱ سانتیمتر) برش داده شد و ارگانایسم هایی مانند ستاره دریایی شکننده، دو کفه ای ها، بارناکل، الیگو و پلی کیت هایی که در لابه لای اسفنج بودند جداسازی و پاکسازی شدند. سپس عصاره گیری با استفاده از حلال آلی متانول (۲ × ۴ لیتر) به مدت چهار روز در دمای اتاق در تاریکی صورت گرفت. سپس محلول به دست آمده را با استفاده از کاغذ صافی فیلتر نموده و حلال آن را در شرایط خلأ توسط دستگاه تبخیر دوار در درجه حرارت حداکثر ۴۰ درجه سانتی گراد تبخیر کرده تا عصاره آبی غلیظی به دست آمد (Jassbi et al., 2013)

جداسازی با روش مایع-مایع

اساس این روش بر مبنای اختلاف حلالیت یک جزء در دو حلال غیر قابل امتزاج می باشد. جداسازی توسط حلال های هگزان، دی کلرومتان صورت گرفت. بدین صورت که سوسپانسیون آبی بدست آمده از عصاره متانولی (۵۰۰ سی سی) را در دکانتور ریخته و ابتدا حلال هگزان را روی آن ریخته (سه مرتبه هر بار حدود ۲۵۰ سی سی) و بعد از چند بار تکان دادن اجازه داده شد که دو فاز از هم جدا شوند. ترکیبات محلول در هگزان، در حلال آلی هگزان حل شده و روی فاز آبی قرار گرفت که با باز کردن شیر دکانتور فاز هگزانی از فاز آبی گردید، سپس این کار توسط حلال دی کلرومتان نیز انجام گردید بدین صورت که سه مرتبه هر بار حدود ۲۵۰ سی سی دی کلرومتان در دکانتور روی سوسپانسیون آبی ریخته شده و بعد از چند بار تکان دادن اجازه داده شد که دو فاز از هم جدا شوند.

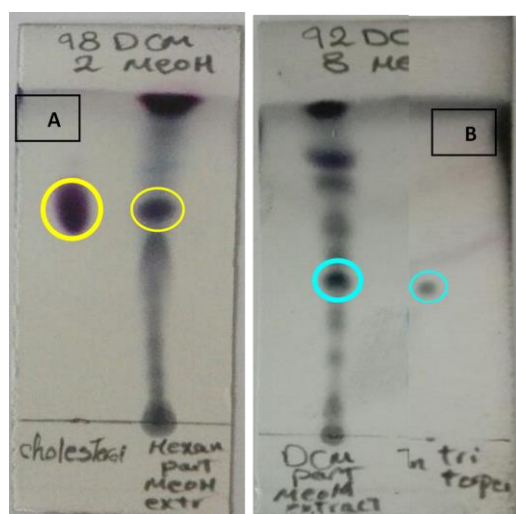
فارس، نشان دادند عصاره متانولی فصل زمستان و تابستان در غلظت های ۰/۵ میلی گرم در لیتر و ۱/۵ میلی گرم در لیتر سبب مرگ مخمر کاندیدا آلبیکانس شده است. بنابراین متابولیت های ثانویه محلول در متانول با ساختار شیمیایی قطبی دارای اثر ضد قارچ بوده و می توانند برای تولید دارو در فاز بعدی و بررسی های تکمیلی با هدف جداسازی و شناسایی ماده موثره ضد قارچی مورد استفاده قرار گیرند. Nazemi و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های غیرقطبی-نیمه قطبی و قطبی متابولیت های اسفنج *Dysidea pallescens* جمع آوری شده از جزیره هنگام مشاهده نمودند که عصاره دی اتیل اتری اثر باکتریوسیدی بر باکتری های *S. aureus* (MBC=10 mg/mL) و *B. subtilis spizizenii* (MBC=20mg/mL) دارد. این عصاره فعالیت ضدقارچی کمی نشان داد درحالیکه عصاره متانولی فعالیت ضدقارچی بر علیه سوبه های *Candida albicans* و *Aspergillus fumigatus* دارد؛ بنابراین عنوان نمودند که عصاره نیمه قطبی بیشتر اثر ضد باکتریایی و عصاره قطبی بیشتر اثر ضد قارچی دارد. به طور کلی، از ترکیبات فعال زیستی اسفنج های دریایی، به طور گسترده ای در درمان بسیاری از بیماری ها، و همچنین به عنوان الگو برای سنتز آنالوگ های مصنوعی استفاده می گردد. مولکول های متعدد جدا شده از اسفنج های مختلف، در حال حاضر در مرحله پیشرفته ای از آزمایشات بالینی قرار دارند. در این پژوهش ما توانایی سیتوتوکسیک بخشهای هگزانی و دی کلرومتانی عصاره متانولی اسفنج *I. mutans* خلیج فارس را مورد بررسی قرار داده ایم تا بتوانیم ترکیبات موثره آنها را خالص و خواص سیتوتوکسیک آنها را تعیین نماییم.

مواد و روش کار

نمونه گیری

اسفنج *Ircinia mutans* (Wilson, 1925) توسط غواصی در خرداد ماه سال ۱۳۹۵ از عمق ۱۳-۱۰ متری سواحل جزیره لارک در خلیج فارس جمع آوری شد. نمونه ی اسفنج بلافاصله در کیسه های پلاستیکی حاوی آب دریا قرار گرفته و در محیط پوشیده با یخ به آزمایشگاه

۸:۹۲ (برای بخش دی کلرومتانی) به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. از کلسترول به عنوان استاندارد کنار بخش هگزانی و از تری ترپنئوئید 3β -acetoxy-Urs-12-ene- 1β , 2α , 11α , 20β -tetraol کنار بخش دی کلرومتانی استفاده گردید. صفحات توسط معرف وانیلین (۱٪) در اسید سولفوریک-اتانول اسپری شده و روی حرارت لکه‌ها ظاهر گردیدند (شکل ۲) (Jassbi et al., 2013).



شکل ۲: TLC بخش‌های هگزانی و دی کلرومتانی بدست آمده از عصاره متانولی اسفنج *I. mutans*: A: بخش هگزانی و کلسترول به عنوان استاندارد؛ B: بخش دی کلرومتانی و تری ترپنئوئید 3β -acetoxy-Urs-12-ene- 1β , 2α , 11α , 20β -tetraol به عنوان استاندارد

Figure 2: Hexan and dichloromethane parts obtained from methanol extract of *I. mutans* sponge. A: Hexan part and cholesterol as standard; B: Dichloromethane part and triterpenoid 3β -acetoxy-Urs-12-ene- 1β , 2α , 11α , 20β -tetraol as standard

کشت سلول و سمیت سلولی

سلول‌های MOLT-4 (Human acute lymphoblastic leukemia cell line) و MCF-7 (breast cancer cell line)، تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پنی سیلین، استرپتومایسین و سلولهای HT-29 (Colon Cancer)

ترکیبات محلول در دی کلرومتان، در حلال آلی دی کلرومتان حل شده و زیر فاز آبی قرار گرفت که با باز کردن شیر دکانتور این لایه نیز جداسازی شد (Zare et al., 2015; Jassbi et al., 2013) (شکل ۱). بخش‌های هگزانی، دی کلرومتانی بدست آمده از دکانتور را توسط دستگاه تبخیر دوار تغلیظ کرده و از فرکشن‌های بدست آمده TLC تهیه کردیم.

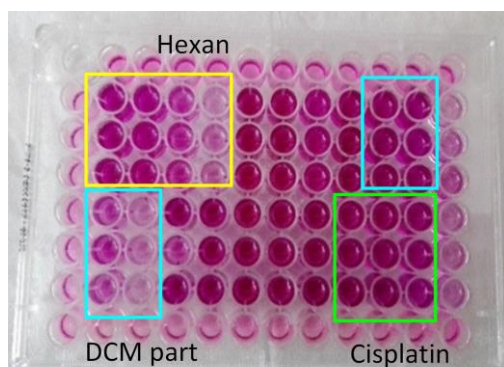


شکل ۱: جداسازی به روش مایع-مایع؛ بخش هگزانی (A)، بخش دی کلرومتانی (B)

Figure 1: Isolation by liquid-liquid chromatography: hexane part (A), dichloromethane part (B).

کروماتوگرافی لایه نازک

به منظور اسکرین اولیه دسته ترکیبات موجود در بخش‌های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره متانولی اسفنج *I. mutans*، از کروماتوگرافی لایه نازک استفاده گردید. کروماتوگرافی روی صفحات آلومینیومی پوشانده شده با لایه نازکی از ماده جاذب سلیکاژل با ابعاد 20×20 سانتی متر انجام شد. حدود ۱ mg از دو بخش هگزانی و دی کلرومتانی در ۱ میلی لیتر از حلال‌های هگزان و دی کلرومتان حل شده و به وسیله لوله موئین حدود ۱۰ میکرولیتر از محلول فوق را روی صفحه TLC در فواصل مشخص قرار داده شدند. از حلال‌های دی کلرومتان و متانول به نسبت ۲:۹۸ (برای بخش هگزانی) و به نسبت



شکل ۳: تست MTT بخش های هگزانی و دی کلرومتانی
عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *I. mutans* بر روی
رده سلولی HT-29

Figure 3: MTT test of hexan and dichloromethane parts of methanol extract isolated from *I. mutans* on HT-29 cell line.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری فعالیت سیتوتوکسیک فرکشن ها، با نرم افزار SPSS 16 انجام گرفت. پراکنش نرمال داده ها با استفاده از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف و همگن بودن واریانس ها با آزمون لَوْن سنجیده شد. نرمال سازی با روش تبدیل داده از طریق لگاریتم در پایه ۱۰ برای برخی از داده هایی که نرمال نبودند صورت گرفت و آزمون نرمال بودن و همگنی واریانس ها روی داده های جدید صورت گرفت. سپس از روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه توکی (Tukey) جهت مقایسه تفاوت آماری بین میانگین فعالیت هر فرکشن استفاده شد. سطح معنی داری در تمامی آزمونها ۵٪ ($p < 0.05$) و داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند.

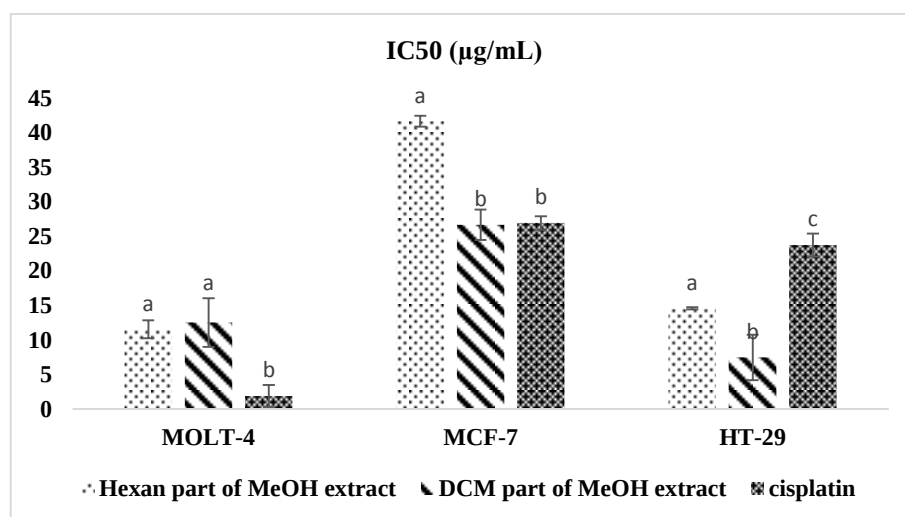
نتایج

عصاره متانولی اسفنج *I. mutans* به دو بخش غیر قطبی (بخش هگزانی) و نیمه قطبی (بخش دی کلرومتانی) تقسیم گردید. بخش هگزانی فعالیت سیتوتوکسیک

(cell line)، تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، در محیط کشت DMEM همراه با ۲۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۲ میلی مولار گلوتامین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پنی سیلین، استرپتومایسین در ۳۷ درجه سانتی گراد، و در حضور ۵٪ دی اکسید کربن، انکوبه شدند. سمیت سلولی غلظت های مختلف بخش های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره متانولی با استفاده از تست 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) اندازه گیری گردید. برای این منظور، حدود ۱۰ میلی گرم از فرکشن های هگزانی و دی کلرومتانی در ۵۰۰ میکرولیتر DMSO حل گردیدند. سلول ها با تراکم ۲۰۰۰۰ cells/well (MOLT-4)، ۳۰۰۰۰ cells/well (MCF-7) و ۱۰۰۰۰ cells/well (HT-29)، در پلیت های ۹۶ خانه، رشد داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول ها با محیط کشت تازه شستشو داده شد و با غلظت های مختلف فرکشن های مورد نظر (۵ $\mu\text{g/mL}$ ، ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ ، ۲۵ $\mu\text{g/mL}$ و ۵۰ $\mu\text{g/mL}$) و "سیس پلاتین" به عنوان کنترل مثبت، تحت تیمار قرار گرفتند. سلول های رشد داده شده در محیط فاقد عصاره، به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، ۸۰ میکرولیتر از هر خانه برداشته شده و توسط ۸۰ میکرولیتر محلول MTT رقیق شده با RPMI بدون فنل، جایگزین گردید و به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر DMSO برای حل شدن نمک فورمازان تشکیل شده، اضافه گردید و مقدار نمک فورمازان با اندازه گیری چگالی نوری OD در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر (model 680, Bio-Rad, Japan) تعیین شد. نسبت زنده ماندن سلولها بوسیله مقدار MTT تبدیل شده به نمک فورمازان، تعیین می شود. زنده ماندن سلول به عنوان درصد، نسبت به شاهد محاسبه می شود. آزمایش در سه تکرار انجام گردیده و میانگین داده ها به عنوان نتیجه این سه مجموعه از آزمایشات بیان شده است (شکل ۳) (Firuzi et al., 2013).

متوسطی را با IC_{50} برابر با $11/54 \pm 1/92$ ، $41/64 \pm 3/5$ و $12/51 \pm 0/80$ ، $26/65 \pm 2/2$ و $7/47 \pm 0/96$ $\mu\text{g/mL}$ بترتیب بر سه رده سلولی مذکور نشان دادند (شکل ۴).

متوسطی را با IC_{50} برابر با $11/54 \pm 1/92$ ، $41/64 \pm 3/5$ و $12/51 \pm 0/80$ ، $26/65 \pm 2/2$ و $7/47 \pm 0/96$ $\mu\text{g/mL}$ بترتیب بر سه رده سلولی مذکور نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۴: فعالیت سیتوتوکسیک بخش‌های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *I. mutans* در برابر سلولهای سرطانی انسانی. داده‌ها به عنوان میانگین $\pm$ SE از ۳-۵ آزمایش ارائه شده‌اند.

Figure 4: Cytotoxic activity of hexan and dichloromethane parts of methanol extract isolated from *I. mutans* sponge against human cancer cells. Data is presented as an average $\pm$ SE of 3-5 trials.

نسبت به کنترل مثبت بر روی این رده سلولی نشان می‌دهند. در رده سلولی MCF-7 بین خاصیت سیتوتوکسیک سیس پلاتین با IC_{50} برابر با $26/92 \pm 3/3$ $\mu\text{g/mL}$ و بخش دی کلرومتانی با IC_{50} برابر با $26/65 \pm 2/2$ $\mu\text{g/mL}$ تفاوت معنی دار وجود نداشت ($p > 0/05$) که نشان دهنده فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجه بخش دی کلرومتانی بر روی رده سلولی MCF-7 می‌باشد. اما بخش هگزانی با IC_{50} برابر با $41/64 \pm 3/5$ $\mu\text{g/mL}$ اختلاف معنی داری را از نظر قدرت سیتوتوکسیک با بخش دی کلرومتانی و سیس پلاتین دارد که نشان می‌دهد بخش هگزانی بر روی رده سلولی MCF-7 خاصیت سیتوتوکسیک بالایی نداشت. در رده سلولی HT-29 بین خاصیت سیتوتوکسیک فرکشن‌های هگزانی با IC_{50} برابر با $14/57 \pm 1/58$ $\mu\text{g/mL}$ دی کلرومتانی با IC_{50} برابر با $7/47 \pm 0/96$ $\mu\text{g/mL}$ و سیس پلاتین با IC_{50} برابر با $23/73 \pm 1/6$ $\mu\text{g/mL}$ از نظر آماری تفاوت معنی دار وجود

بخش هگزانی با IC_{50} برابر با $11/54 \pm 1/92$ و $14/57 \pm 1/58$ $\mu\text{g/mL}$ بترتیب بر رده‌های سلولی MOLT-4 و HT-29، فعالیت سیتوتوکسیک متوسطی را نشان داد. فعالیت سیتوتوکسیک بخش هگزانی اختلاف معنی داری را بر این دو رده سلولی نشان نداد ($p > 0/05$). بخش دی کلرومتانی نیز با IC_{50} برابر با $12/51 \pm 0/80$ و $7/47 \pm 0/96$ $\mu\text{g/mL}$ بترتیب بر رده‌های سلولی MOLT-4 و HT-29، فعالیت سیتوتوکسیک بالایی را نشان داد که اختلاف معنی داری را نیز بر روی این دو رده سلولی نشان نداد ($p > 0/05$). در رده سلولی MOLT-4 تفاوت معنی داری بین خاصیت سیتوتوکسیک سیس پلاتین (کنترل مثبت) با IC_{50} برابر با $23/73 \pm 1/6$ $\mu\text{g/mL}$ ، با فرکشن‌های هگزانی و دی کلرومتانی به ترتیب با IC_{50} برابر با $11/54 \pm 1/92$ و $12/51 \pm 0/80$ $\mu\text{g/mL}$ وجود داشت ($p < 0/05$) که نشان می‌دهد این دو بخش فعالیت سیتوتوکسیک متوسطی را

داشت ($p < 0.05$) که نشان می‌دهد بیشترین اثر سیتوتوکسیک متعلق به بخش دی کلرومتانی بر روی این رده سلولی می‌باشد. همچنین هر دو بخش هگزانی و دی کلرومتانی بر روی این رده سلولی IC_{50} کمتری از سیس پلاتین نشان دادند که نشان دهنده حساسیت بالای رده سلولی HT-29 نسبت به فرکشن‌های تست شده می‌باشد. بر اساس تحقیقات تکمیلی انجام شده در راستای این مقاله، به منظور شناسایی ترکیبات موثره ی مسئول خاصیت سیتوتوکسیک بخش‌های هگزانی و دی کلرومتانی، دریافتیم که بخش هگزانی محتوی استروئیدی، و بخش دی کلرومتانی احتمالا ترکیبات تری ترپنوئیدی می‌باشد. بنابراین از کلسترول به عنوان استاندارد در کنار بخش هگزانی و از تری ترپنوئید 3β -acetoxy-Urs-12-ene- 1β , 2α , 11α , 20β -tetraol به عنوان استاندارد در کنار بخش دی کلرومتانی استفاده کردیم (شکل ۲). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌کنید در صفحه TLC-A، لکه موجود در بخش هگزانی با لکه کلسترول به عنوان استاندارد، از نظر رنگ و $R_f=0.6$ مشابه می‌باشند. هر دو لکه رنگ بنفش تیره و R_f دارند. همچنین در صفحه TLC-B، لکه مشاهده شده در بخش دی کلرومتانی با لکه تری ترپنوئید به عنوان استاندارد، از نظر رنگ و R_f مشابه می‌باشد. هر دو لکه رنگ سبز تیره و $R_f=0.4$ دارند.

بحث

از آنجاییکه اسفنج‌ها توانایی بالایی در بیوسنتز مجموعه ای از محصولات طبیعی با ساختار متنوع دارند و با توجه به اینکه تحقیقات انجام شده در زمینه بررسی پتانسیل زیستی متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌های خلیج فارس اندک می‌باشد، در این تحقیق به بررسی فعالیت سیتوتوکسیک فرکشن‌های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره متانولی اسفنج *I. mutans* جمع‌آوری شده از جزیره لارک خلیج فارس پرداختیم. نتایج حاصله نشان داد که این اسفنج محتوی متابولیت‌های ثانویه با خاصیت سیتوتوکسیک بالایی می‌باشد. هر دو بخش هگزانی و دی کلرومتانی فعالیت سیتوتوکسیک متوسط تا قوی را در

برابر هر سه رده سلولی مورد آزمایش نشان دادند. بخش دی کلرومتانی نسبت به بخش هگزانی فعالیت سیتوتوکسیک قوی‌تری را بر روی رده‌های سلولی MCF-7 و HT-29 نشان داد. همانطور که در بخش نتایج عنوان گردید بر اساس تحقیقات بیشتری که در راستای این مقاله به منظور شناسایی ترکیبات موثره ی مسئول خاصیت سیتوتوکسیک بخش‌های هگزانی و دی کلرومتانی انجام شد، دریافتیم که بخش هگزانی محتوی ترکیبات استروئیدی، و بخش دی کلرومتانی احتمالا محتوی ترکیبات تری ترپنوئیدی می‌باشد. استروئیدهای جدا شده از اسفنج‌های دریایی، فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی را بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند. تحقیق مروری انجام شده روی استروئیدهای استخراج شده از اسفنج‌ها نشان داد که استروئیدها عوامل ضد سرطان، ضد ویروس، ضد باکتری و ضد قارچی موثری هستند (Aiello et al., 1999). یک سری از ۵ و ۶-اپوکسی استرول‌های جدا شده از اسفنج چینی *Ircinia nagensis* فعالیت سیتوتوکسیک متوسط تا قوی را روی رده‌های سلولی LOVO، H-460 و MCF-7 نشان داده‌اند (Xu et al., 2008). در تحقیق تکمیلی انجام شده توسط اینجانب و همکاران، استروئیدهای جدا شده از اسفنج *I. mutans* نیز فعالیت سیتوتوکسیک قوی را بر روی رده‌های سلولی MOLT-4، MCF-7 و HT-29 نشان داده‌اند. بنابراین می‌توان فعالیت سیتوتوکسیک بخش هگزانی عصاره متانولی اسفنج *I. mutans* خلیج فارس را به ترکیبات استروئیدی موجود در آن ربط داد. Beedessee و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت سیتوتوکسیک عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و بوتانولی اسفنج دریایی آب‌های Mauritius را بر روی چندین رده سلولی سرطانی انسانی، مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که از میان عصاره‌های تست شده، بسیاری از آنها فعالیت سیتوتوکسیک را حداقل در یک رده از ۹ رده سلولی مورد آزمایش، نشان دادند. همچنین مشخص شد که از میان عصاره‌های مورد بررسی، ۲۷٪ عصاره اتیل استاتی، ۱۱٪ عصاره هگزانی و ۲٪ عصاره بوتانولی، دارای سمیت سلولی بالای ۷۵٪ در ۹ رده سلولی سرطان‌های

- Soest, R.W.M., Cresteil, T. and Marie, D.P.E., 2012.** Cytotoxic activities of hexane, ethyl acetate and butanol extracts of marine sponges from Mauritian Waters on human cancer cell lines. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34: 397–408. DOI: 10.1016/j.etap.2012.05.013
- Bhimba, V., Beulah, C. and Vinod, V., 2013.** Efficacy of bioactive compounds extracted from marine sponge *Haliclona exigua*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6: 347-349.
- Dellai, A., Laroche-Clary, A., Mhadhebi, L., Robert, J. and Bouraoui, A., 2010.** Anti-inflammatory and antiproliferative activities of crude extract and its fractions of the defensive secretion from the Mediterranean sponge, *Spongia officinalis*. *Drug development research*, 71: 412–418. DOI: 10.1002/ddr.20392
- Dhinakaran, D.I. and Lipton, A.P., 2012.** Antimicrobial Potential of the Marine Sponge *Sigmadocia pumila* from the South Eastern Region of India. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(4): 344-348. DOI: 10.5829/idosi.wjfm.2012.04.04.6353
- Firuzi, O., Miri, R., Asadollahi, M., Eslami, S. and Jassbi, A.R., 2013.** Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities and phenolic contents of eleven salvia species from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4): 801-810.
- Funel, C., Berrué, F., Roussakis, C., Fernandez Rodriguez, R. and Amade, P., 2004.** New Cytotoxic Steroids from the مختلف، می باشند. همانطور که مشاهده میشود عصاره اتیل استاتی که پلاریته بیشتری نسبت به عصاره هگزانی دارد فعالیت سیتوتوکسیک قوی تری را نشان داده است. در تحقیق حاضر نیز بخش دی کلرومتانی فعالیت سیتوتوکسیک قوی تری را نسبت به بخش هگزانی بر روی رده‌های سلولی MOLT-4، MCF-7 و HT-29 نشان داد که گویای آنست که ترکیبات با پلاریته بیشتر، از نظر خاصیت سیتوتوکسیک، ترکیباتی قوی تر می باشند. Mahdian و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت سیتوتوکسیک عصاره و فرکشن‌های پنج گونه اسفنج خلیج فارس (*Dysidea avara*، *Ircinia echinata*، *Axinella sinoxea*، *Haliclona tubifera* و *Haliclona violacea*) را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که از میان اسفنج‌های تست شده عصاره اسفنج‌های *I. echinata* و *D. avara* دارای فعالیت سیتوتوکسیک بر روی رده‌های سلولی HeLa و PC₁₂ می باشند. این نتایج به همراه نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان میدهد که اسفنج‌های متعلق به جنس *Ircinia sp.* منبع مهمی از ترکیبات با خاصیت سیتوتوکسیک می باشند. این تحقیق پتانسیل بالای اسفنج‌های خلیج فارس را به عنوان منابع ارزشمند کشف ترکیبات ضدسرطان جدید نشان می‌دهد.
- منابع**
- ناظمی، م.، مطلبی، ع.، جمیلی، ش.، مصطفوی، پ.، ماشینچیان، ع.، احمدزاده، ا.، ۱۳۹۱. بررسی اثر ضد قارچ متابولیت‌های ثانویه نیمه قطبی-غیرقطبی اسفنج *Ircinia mutans* در دو فصل تابستان و زمستان موجود در جزیره کیش، خلیج فارس. مجله علمی شیلات ایران، ۲۲ (۱): ۱۳۸-۱۲۹
- Aiello, A., Fattorusso, E. and Menna, M., 1999.** Steroids from sponges: recent reports. *Steroids*, 64: 687-714. DOI: 10.1016/S0039-128X(99)00032-X
- Beedessee, G., Ramanjooloo, A., Aubert, G., Eloy, L., Surnam-Boodhun, R., van**

- Indian Ocean Sponge *Axinella* cf. *b idderi*. Journal of natural products, 67: 491-494. DOI: 10.1021/np034021t
- Ghaderi, F., Fooladvand, Z., Salimpour, M., Ashourion, H., Nazari, S. and Abolmaali, S., 2010.** Screening Secondary Metabolites of Persian Gulf Sponges for Anticancer Agents. Journal of biotechnology, 150S: S1-S576. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.582.
- Hooper, J.N., 2000.** SPONGUIDE: Guide to sponge collection and identification: Queensland Museum.
- Jassbi, A.R., Mohabati, M., Eslami, S., Sohrabipour, J. and Miri, R., 2013.** Biological activity and chemical constituents of red and brown algae from the Persian Gulf. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 12(3): 339-348.
- Laport, M., Santos, O. and Muricy, G. 2009.** Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. Current pharmaceutical biotechnology, 10: 86-105. DOI: 10.2174/138920109787048625
- Leal, M.C., Puga, J., Serôdio, J., Gomes, N.C. and Calado, R., 2012.** Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades—where and what are we bioprospecting? PLoS One, 7: e30580. DOI: 10.1371/journal.pone.0030580
- Mahdian, D., Iranshahy, M., Shakeri, A., Hoseini, A., Yavari, H., Nazemi, M. and Iranshahi, M., 2015.** Cytotoxicity evaluation of extracts and fractions of five marine sponges from the Persian Gulf and HPLC fingerprint analysis of cytotoxic extracts. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5: 896-901. DOI: 10.1016/j.apjtb.2015.07.020
- Malve, H., 2016.** Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. Journal of pharmacy and bioallied sciences, 8: 83-91. DOI: 10.4103/0975-7406.171700
- Md, S.H., Fareed, s., Ansari, s. and Sajid khan, M., 2012.** Marine natural products: A lead for anti-cancer. Indian journal of Geo-marine science, 41(1): 27-39.
- Nazemi, M., Moradi, Y., Rezvani Gilkolai, F., Ahmaditaba, M., Gozari, M. and Salari, Z., 2017.** Antimicrobial activities of semi polar-nonpolar and polar secondary metabolites of sponge *Dysidea pallescens* from Hengam Island, Persian Gulf. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 16(1): 200-209.
- Ngo, D.H., Vo, T.S., Ngo, D.N., Wijesekara, I. and Kim, S.K., 2012.** Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. International Journal of Biological Macromolecules, 51:378– 383. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.06.001. *Sigmadocia pumila* from the South Eastern Region of India. World Journal of Fish and Marine Sciences, 4(4): 344-348. DOI: 10.5829/idosi.wjfm.2012.04.04.6353
- Xu, S., Liao, X., Du, B., Zhou, X., Huang, Q. and Wu, C., 2008.** A series of new 5, 6-epoxysterols from a Chinese sponge *Ircinia aruensis*. Steroids, 73: 568-573. DOI:10.1016/j.steroids.2008.01.009

- Yasuhara-Bell, J. and Lu, Y., 2010.** Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research*, 86: 231–240. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.03.009
- Zare, S., Ghaedi, M., Miri, R., Heiling, S., asadollahi, m., Baldwin, I. T. and Jassbi, A. R., 2015.** Phytochemical Investigation on *Euphorbia macrostegia* (Persian wood spurge). *Iranian journal of pharmaceutical research*, 14: 243-249.

Cytotoxic activity of hexane and dichloromethane parts of methanol extract of *Ircinia mutans* sponge on three human cancer cell lines

Heidary Jamebozorgi F.^{1,2}, Yousefzadi M.¹, Firuzi O.R.², Nazemi M.³, Jassbi A.R.^{2*}

*arjassbi@hotmail.com

1-Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2-Medicinal and Natural Products Chemistry Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Zip: 71348-53734, Shiraz, Iran

3-Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

Abstract

Sponges are the most primitive multicellular eukaryotic organisms and sessile without defense organs therefore, they produce different secondary metabolites to protect themselves from predators and pathogens in their environment. This study aims to evaluation of cytotoxic properties of hexane and dichloromethane parts of methanol extract of the sponge (*Ircinia mutans*), collected from Larak Island. Hexane and dichloromethane parts were extracted by liquid-liquid extraction from methanol extract then tested by MTT colorimetric assay on three cancer cell lines MOLT-4, MCF-7 and HT-29. The hexane part with IC₅₀ value 11.53 ± 1.3 , 41.64 ± 3.5 and 14.57 ± 1.5 µg/mL, and the dichloromethane part with IC₅₀ value 12.51 ± 0.8 , 26.6 ± 2.2 and 7.47 ± 0.97 µg/mL respectively, on three mentioned cell line showed moderate to strong cytotoxic activity on all three cancer cell lines. The results also indicate that the dichloromethane part has stronger cytotoxic activity than the hexane part. This study's findings showed the potential of Persian Gulf sponges as valuable sources of new anti-cancer compounds.

Keywords: Sponge, Secondary metabolite, Cytotoxic activity, Persian Gulf

*Corresponding author