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

فاطمه حیدری‌جامع‌بزرگی[۱]، مرتضی یوسف‌زادی[۱]، امیدرضا فیروزی[۲]، ملیکا ناظمی[۳]، امیررضا جاسبی[۲*]

[*]jassbiar@sums.ac.ir

۱- گروه زیست شناسی 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

اسفنج ها به عنوان ابتدائی ترین ارگانیسم های یوکاریوت پرسلولی، جانورانی ساکن چسبیده به بستر و بدون اندام دفاعی مشخصی می باشند، بنابراین برای دفاع از خود در برابر شکارچیان و پاتوژن های موجود در محیط، متابولیت های ثانویه متعددی تولید می کنند. در این تحقیق، اسفنج *Ircinia mutans*، جمع آوری شده از آبهای جزیره لارک خلیج فارس، به منظور ارزیابی خاصیت سیتوتوکسیک بخش های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره ی متانولی اش، مورد بررسی قرار گرفت. بخش های 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 ۱/۳±۱۱/۵۳، ۳/۵±۴۱/۶۴ و ۱/۵±۱۴/۵۷ µg/mL و بخش دی کلرومتانی با IC_{50} به ترتیب برابر با ۰/۸±۱۲/۵۱، ۲/۲±۲۶/۶۵ و ۰/۹±۷/۴۷ µg/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 قوی تری دارد. یافته های این تحقیق پتانسیل بالای اسفنج های خلیج فارس را به عنوان منابع ارزشمند دارای ترکیبات ضد سرطان جدید، نشان میدهد.

لغات کلیدی: اسفنج، متابولیت های ثانویه، فعالیت سیتوتوکسیک، خلیج فارس

[*]**نویسنده مسئول**

مقدمه

اکوسیستم های دریایی دارای منابع عظیمی از محصولات جدید طبیعی زیست فعال، با ویژگی های ساختاری و شیمیایی خاص می باشند که در محیط های خشکی یافت نمی شوند (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 می شود که موجودات دریایی، منابع بالقوهٔ مواد فعال زیستی، برای تولید دارو می باشند (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 شاخه هایی از بی مهرگان، که دارای حرکت آهسته بوده یا بی مهرگانِ 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*., 2012; Laport *et al*., 2009). در مقایسه با سایر آبزیان، اسفنج های دریایی با توجه به تنوع متابولیتهای ثانویه شان، به عنوان "معادن طلا" نامیده شده اند، که بدلیل فراوانی و گستردگی، و توانایی بیوسنتز مجموعه ای از محصولات طبیعی با ساختار متنوع، منبع اصلی محصولات فعال زیستی می باشند (Beedessee *et al*., 2012). اسفنج ها سموم و سایر ترکیبات طبیعی را به منظور دفع شکارچیان، رقابت بر سر فضا با دیگر گونه های ساکن، و محافظت در برابر عفونت، تولید می کنند. این ارگانیسمها 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 سلول های آناپلاستیک که تمایل به حمله به بافت های اطراف و متاستاز به سایر بافت ها و اندامها را دارد، توصیف می شود. دانشمندان متعددی در سراسر جهان نشان دادند که عصارهٔ اسفنجی، فعالیت ضد سرطانی قابل توجهی در برابر سلول های سرطانی دارد (Beedessee *et al*., 2012; Bhimba *et al*., 2013; Dellai *et al*., 2010). از سال ۱۹۹۰ به بعد اسفنج ها و مرجانها منابع عمده کشف بیشتر ترکیبات طبیعی مستخرج از دریا، معرفی گردیدند. غیر از اقیانوس های منجمد شمالی و جنوبی که خارپوستان و مرجانیان منبع اصلی تولید ترکیبات طبیعی بوده اند، در سایر اقیانوس ها، اسفنج ها (۵۲-۴۴٪) و مرجانیان (۳۱-۲۸٪) منابع غالب تولید ترکیبات طبیعی دریایی می باشند (Leal *et al*., 2012). غربالگری اسفنج ها به منظور کشف ترکیبات ضد سرطان جدید، عوامل پاکلی تاکسل مانندِ laulimalide و isolaulimalide را به همراه داشته است. بعلاوه، تخمین زده شده است که عوامل وینکا آلکالوئید، Halichondrin B و spongistatin I از اسفنجهای *Halichodria okadai* و *Spongia* sp. بسیار موثر تر از پاکلی تاکسل ها در داخل بدن می باشند (Ghaderi *et al*., 2010). استروییدهای استخراج شده از اسفنج های دریایی فعالیت سیتوتوکسیک قوی را بر روی رده‌های سلولی سرطانی مختلف نشان داده اند. اپوکسی استرول های 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 های متعددِ جدا شده از اسفنج های مختلف، در حال حاضر در مرحله پیشرفته ای از آزمایشات بالینی قرار دارند (Dhinakaran and Lipton, 2012).

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

فارس، نشان دادند عصارۀ 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 ثانویۀ 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 مادۀ موثره ضد قارچی مورد استفاده قرار گیرند. Nazemi و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های غیرقطبی-نیمه قطبی و قطبی متابولیتهای اسفنج *Dysidea pallescens* جمع آوری شده از جزیره هنگام مشاهده نمودند که عصاره دی اتیل اتری اثر باکتروسیدی 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 سویه 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 متعددِ 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 عصارۀ متانولی اسفنج *I. mutans* خلیج فارس را مورد بررسی قرار داده ایم تا بتوایم ترکیبات موثره آنها را خالص و خواص سیتوتوکسیک آنها را تعیین نماییم.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

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 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.

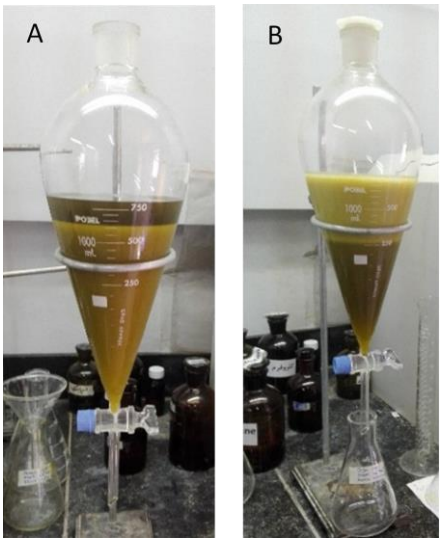
تهیۀ عصارۀ اسفنجی Preparation of sponge extracts

نمونه اسفنج (۳/۲۹ کیلوگرم وزن تر) به قطعات کوچک (تقریبا ۱ سانتیمتر) برش داده شد و ارگانیسم 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 دکانتوور 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 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.

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). بخش های هگزانی، دی کلرومتانی بدست آمده از دکانتور را توسط دستگاه تبخیر دوار تغلیظ کرده و از فرکشن های بدست آمده TLC تهیه کردیم.

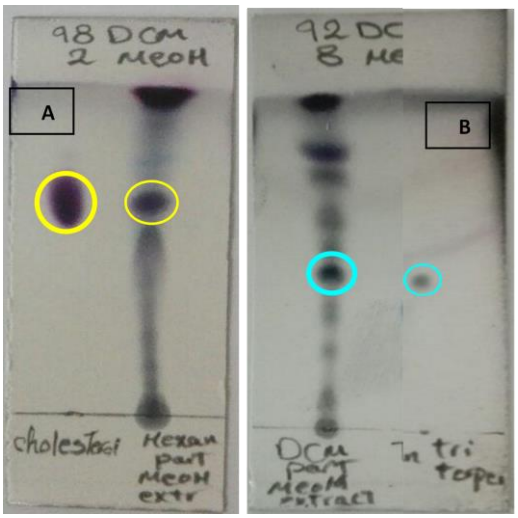


شکل ۱: جداسازی به روش مایع-مایع؛ بخش هگزانی (A)، بخش دی کلرومتانی (B)

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

کروماتوگرافی لایه نازک

به منظور اسکرین اولیه دسته ترکیبات موجود در بخش های 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 ابعـاد ۲۰ × ۲۰ 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 صحفه TLC در فواصل مشخص قرار داده شدند. از حلال های دی کلرومتان و متانول به نسبت ۲:۹۸ (برای بخش هگزانی) و به نسبت ۸:۹۲ (برای بخش دی کلرومتانی) به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. از کلسترول به عنوان استاندارد کنار بخش هگزانی و از تری ترپنوئید 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 لکه ها ظاهر گردیدند (شکل ۲) (Jassbi *et al*., 2013).



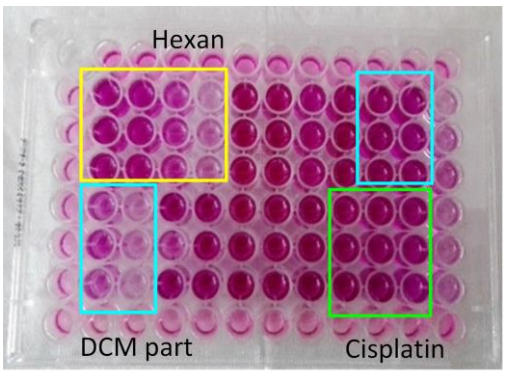
شکل ۲: TLC بخش های هگزانی و دی کلرومتانی بدست آمده از عصاره متانولی اسفنج *I. mutans* A: بخش هگزانی و کلسترول به عنوان استاندارد؛ B بخش دی کلرومتانی و تری ترپنوئید 3β-acetoxy-Urs-12-ene-1β, 2α, 11α, 20β-tetraol به عنوان استاندارد

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 (cell breast cancer 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

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 µg/mL ، ۱۰ µg/mL، ۲۵ µg/mL و ۵۰ µg/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 فورمازانِ 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 بوسیلهٔ 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 نتیجهٔ این سه مجموعه از آزمایشات بیان شده است (شکل ۳) (Firuzi *et al.*, 2013).



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.

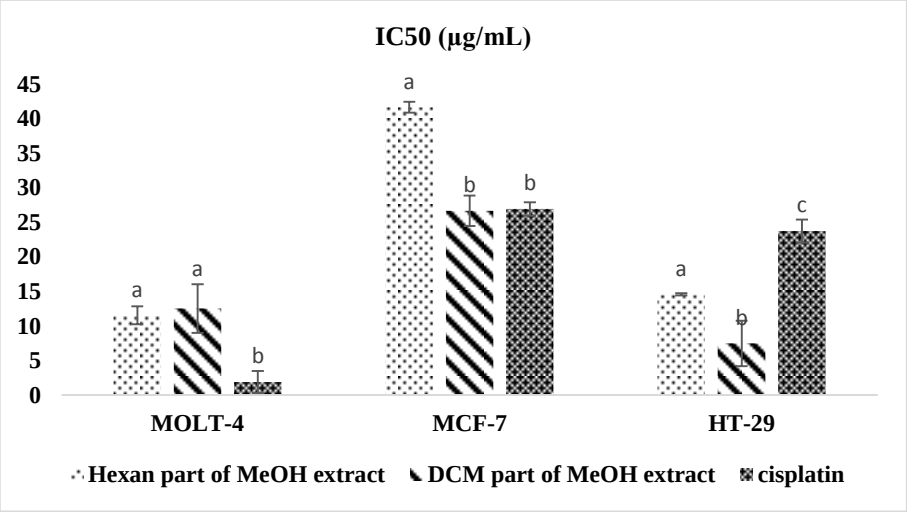
تجزیه و تحلیل داده‌ها

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 لِوِن 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 ± 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

متوسطی را با IC_{50} برابر با 1/92±11/54، 3/5±41/64 و 1/58±14/57 µg/mL و بخش دی کلرومتانی فعالیت سیتوتوکسیک متوسط تا قوی را با IC_{50} برابر با 0/80±12/51، 2/2±26/65 و 0/96±7/47 µg/mL بترتیب بر سه رده سلولی مذکور نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۴: فعالیت سیتوتوکسیک بخش های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *I. mutans* در برابر سلولهای سرطانی انسانی. داده ها به عنوان میانگین SE ± از ۳-۵ آزمایش ارائه شده اند.

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 ± SE of 3-5 trials.

بخش هگزانی با IC_{50} برابر با 1/92±11/54 و 1/58±14/57 µg/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 ۰/۸۰±۱۲/۵۱ و ۰/۹۶±۷/۴۷ µg/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 ۰/۱۶±۱/۸۹ µg/mL، با فرکشن های هگزانی و دی کلرومتانی به ترتیب با IC_{50} برابر با ۱/۹۲±۱۱/۵۴ و ۰/۸۰±۱۲/۵۱ µg/mL وجود داشت ($p<0/05$) که نشان میدهد این دو بخش فعالیت سیتوتوکسیک متوسطی را نسبت به کنترل مثبت بر روی این رده سلولی نشان می دهند. در رده سلولی MCF-7 بین خاصیت سیتوتوکسیک سیس پلاتین با IC_{50} برابر با ۳/۳±۲۶/۹۲ µg/mL و بخش دی کلرومتانی با IC_{50} برابر با ۲/۲±۲۶/۶۵ µg/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 می باشد. اما بخش هگزانی با IC_{50} برابر با ۳/۵±۴۱/۶۴ µg/mL اختلاف معنی داری را از نظر قدرت سیتوتوکسیک با بخش دی کلرومتانی و سیس پلاتین دارد که نشان می داد بخش هگزانی بر روی رده سلولی MCF-7 خاصیت سیتوتوکسیک بالایی نداشت. در رده سلولی HT-29 بین خاصیت سیتوتوکسیک فرکشن های هگزانی با IC_{50} برابر با ۱/۵۸±۱۴/۵۷ µg/mL، دی کلرومتانی با IC_{50} برابر با ۰/۹۶±۷/۴۷ µg/mL و سیس پلاتین با IC_{50} برابر با ۱/۶±۲۳/۷۳ µg/mL از نظر آماری تفاوت معنی دار وجود

داشت ($p<۰/۰۵$) که نشان می‌دهد بیشترین اثر سیتوتوکسیک متعلق به بخش دی کلرومتانی بر روی این رده سلولی می باشد. 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 فرکشن های تست شده می باشد. بر اساس تحقیقات تکمیلی انجام شده در راستای این مقاله، به منظور شناسایی ترکیبات موثره ی مسئول خاصیت سیتوتوکسیک بخش های هگزانی و دی کلرومتانی، دریافتیم که بخش هگزانی محتوی ترکیبات استروییدی، و بخش دی کلرومتانی احتمالا محتوی ترکیبات تری ترپنوئیدی می باشد. 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 می کنید در صحفه TLC-A، لکه موجود در بخش هگزانی با لکه کلسترول به عنوان استاندارد، از نظر رنگ و R_f مشابه می باشند. هر دو لکه رنگ بنفش تیره و R_f=0.6 دارند. همچنین در صحفه TLC-B، لکه مشاهده شده در بخش دی کلرومتانی با لکه تری ترپنوئید به عنوان استاندارد، از نظر رنگ و R_f مشابه می باشد. هر دو لکه رنگ سبز تیره و R_f=0.4 دارند.

بحث

از آنجاییکه اسفنج ها توانایی بالایی در بیوسنتز مجموعه ای از محصولات طبیعی با ساختار متنوع دارند و با توجه به اینکه تحقیقات انجام شده در زمینهٔ بررسی پتانسیل زیستی متابولیت های ثانویهٔ اسفنج های خلیج فارس اندک می باشد، در این تحقیق به بررسی فعالیت سیتوتوکسیک فرکشن های هگزانی و دی کلرومتانی عصاره متانولی اسفنج *I. mutans* جمع آوری شده از جزیره لارک خلیج فارس پرداختیم. نتایج حاصله نشان داد که این اسفنج محتوی متابولیت های ثانویه با خاصیت سیتوتوکسیک بالایی می باشد. 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 قوی تری 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 بخش های هگزانی و دی کلرومتانی انجام شد، دریافتیم که بخش هگزانی محتوی ترکیبات استروییدی، و بخش دی کلرومتانی احتمالا محتوی ترکیبات تری ترپنوئیدی می باشد. استروئید های جدا شده از اسفنج های دریایی، فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی را بر روی رده‌های مختلف سلول های سرطانی نشان داده اند. تحقیق مروری انجام شده روی استروئیدهای استخراج شده از اسفنج ها نشان داد که استروئید ها عوامل ضد سرطان، ضد ویروس، ضد باکتری و ضد قارچی موثری هستند (Aiello *et al*., 1999). یک سری از ۵ و۶-اپوکسی استرول های جدا شده از اسفنج چینی *Ircinia nagensis*، فعالیت سیتوتوکسیک متوسط تا قوی را روی رده‌های سلولی H-460، LOVO و MCF-7 نشان داده اند (Xu *et al*., 2008). در تحقیق تکمیلی انجام شده توسط اینجانب و همکاران، استروییدهای جداشده از اسفنج *I. mutans* نیز فعالیت سیتوتوکسیک قوی را بر روی رده‌های سلولی MOLT-4، MCF-7و HT-29 نشان داده اند. بنابراین می توان فعالیت سیتوتوکسیک بخش هگزانی عصاره متانولی اسفنج *I. mutans* خلیج فارس را به ترکیبات استروییدی موجود در آن ربط داد. Beedessee و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت سیتوتوکسیک عصاره های هگزانی، اتیل استاتی و بوتانولی اسفنج دریایی آب های Mauritius را بر روی چندین رده سلولی سرطانی انسانی، مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که از میان عصاره های تست شده، بسیاری از آنها فعالیت سیتوتوکسیک را حداقل در یک رده از ۹ ردهٔ سلولی مورد آزمایش، نشان دادند. همچنین مشخص شد که از میان عصاره های مورد بررسی، ۲۷ ٪ عصارهٔ اتیل استاتی، ۱۱٪ عصارهٔ هگزانی و ۲٪ عصاره بوتانولی، دارای سمیت سلولی بالای ۷۵٪ در ۹ رده سلولی سرطان های

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 (*Ircinia echinata* ، *Dysidea avara*، *Axinella sinoxea*، *Haliclona tubifera*، و *Haliclona violacea*) را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که از میان اسفنج های تست شده عصاره اسفنج های *I. echinata* و *D. avara* دارای فعالیت سیتوتوکسیک بر روی رده‌های سلولی HeLa و PC_{12} 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 اسفنج های 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 متابولیت های ثانویهٔ 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 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.wjfms.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

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.wjfms.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 IC_{50} value 11.53 ± 1.3, 41.64 ± 3.5 and 14.57 ± 1.5 µg/mL, and the dichloromethane part with IC_{50} 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