اثرات عصاره جلبک دریایی *Gracilaria arcuata* روی تحریک آپوپتوز سلول‌های سرطانی کولورکتال

علی طاهری[1*]، مصطفی غفاری[2]، شاداب هوشمندی[3]، مهدی نام‌آوری[4]

[1] *دانشیار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران*
[2] *دانشیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران*
[3] *دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران*
[4] *دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، گروه باکتری‌شناسی شیراز، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۲/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش:۹۷/۸/۱

چکیده

زمینه و هدف: ازجمله معضلات شایع در دنیای پزشکی مسئله مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر داروهای ضد سرطان بوده است لذا یافتن ترکیبات ضد سرطانی جدید با کمترین اثرات جانبی امری لازم و ضروری به نظر می‌رسد، در این راستا تا کنون پژوهش‌های متعددی بر روی انواع جلبک‌های دریایی انجام‌شده است. این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات عصاره‌های جلبک *Gracilaria arcuata* روی تحریک آپوپتوز سلول سرطانی کولورکتال و اثر روی قطعه‌قطعه شدن DNA طراحی‌شده است. این مطالعه به‌صورت In vitro study انجام شد.

روش بررسی: عصاره‌های آبی و آلی جلبک تهیه و اثرات ضد سرطانی عصاره‌های جلبک ذکرشده به روش‌های MTT Assay، رنگ‌آمیزی تریپان بلو، آپوپتوز و قطعه‌قطعه شدن DNA مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در تعیین خواص ضد سرطانی به روش تست MTT و تریپان بلو، عصاره متانولی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* با ۰/۹۱ ± ۴۴/۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر غلظت بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشت و کمترین اثر مربوط به عصاره‌های ان هگزان (۱/۲۲ ± ۷۰/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و اتیل استات (۲/۶۷ ± ۷۰/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود ($p<0.05$). نتایج برای تست تریپان بلو نیز منطبق بر تست MTT بود اما میزان زنده‌مانی متفاوت بود. برای تعیین اثر عصاره متانولی جلبک مذکور بر آپوپتوز سلولی از دو روش فلوسایتومتری و قطعه‌قطعه شدن DNA استفاده شد. عصاره‌ی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* به‌صورت وابسته به دوز در غلظت ۱۰۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای آپوپتوز ۷/۵ درصدی بود که اثر آپوپتوزی قابل‌ملاحظه‌ای را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که عصاره جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* می‌تواند دارای اثرات ضد سرطانی علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال باشد و نیاز به مطالعات تکمیلی و بررسی ساختار شیمیایی ترکیبات زیست فعال دارد.

کلمات کلیدی: ضد سرطان، *گراسیلاریا آرکواتا*، سرطان کولورکتال، آپوپتوز

***نویسنده مسئول:**
دانشیار فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

۰۹۱۲-۶۴۸۷۴۱۷
E-mail: taherienator@gmail.com

مقدمه

سرطان رده‌ای از بیماری‌ها است که در آن سلول یا گروهی از سلول‌ها به‌صورت غیر کنترل‌شده‌ای رشد می‌کنند که عامل مهمی در مرگ و میر گسترده جهانی می‌باشد. سرطان کولون شایع‌ترین سرطان دستگاه گوارش و سومین سرطان شایع در مردان و زنان به‌خصوص در کشورهای توسعه‌یافته می‌باشد، بیش از ۱/۴ میلیون مورد جدید در سال ۲۰۱۲ گزارش‌شده است.[۱] سرطان روده بزرگ به‌طورکلی در افراد ۵۰ ساله و مسن‌تر روی می‌دهد و وقتی رخ می‌دهد که سلول‌هایی غیرطبیعی در دیواره روده بزرگ یا مقعد رشد کنند که در ابتدا به‌صورت پولیپ (غده‌های خوش خیم در سطح داخلی روده بزرگ) ظاهر می‌شود. شیوع جهانی این سرطان در سال‌های اخیر موجب افزایش مطالعه راجع به آن شده است. علاوه بر پیشرفت‌هایی که در دهه اخیر در درمان بیماری سرطان شده است نرخ مرگ و میر حاصل از سرطان کولورکتال تقریباً ۴۰ ٪ بوده که اساساً حاصل از متاستاز است.[۲] افزایش مقاومت به شیمی‌درمانی یک مانع اصلی برای درمان سرطان‌های مختلف مطرح‌شده است، سهم قابل‌توجهی از بازگشت تومور و افزایش مقاومت درمانی، در نهایت منجر به مقاومت چند دارویی در زمان در معرض گذاشتن با چند داروی ضد سرطان با ساختار و عملکرد رایج (شایع) می‌شود.[۳] علاوه بر این داروهای ضد سرطان باید منحصراً بر سلول‌های سرطانی اثرگذار باشند درحالی‌که تعدادی از داروهای شیمی‌درمانی که در حال حاضر در بیماران مبتلا به سرطان استفاده می‌شود دارای اثرات جانبی زیادی بر بدن انسان می‌باشد. این اثرات شامل خونریزی، ریزش مو، اسهال و سرکوب دستگاه ایمنی بدن است.[۴] ازاین‌رو تحقیق در راستای یافتن ترکیباتی با خواص ضد توموری که توانایی جلوگیری از گسترش و رشد سلول‌های سرطانی را داشته باشد پیشرفت‌های قابل‌توجهی داشته است و با توجه به عوارض جانبی ترکیبات صناعی و داروهای فارماکولوژیک ضد سرطان، محققان همیشه در راستای یافتن ترکیبات طبیعی با خواص ضد سرطانی بوده‌اند و در این میان آبزیان دریایی به‌واسطه فراوانی و تنوع بسیار بالای آن‌ها همواره موردتوجه قرارگرفته‌اند، از این جمله می‌توان به پژوهش‌های بسیار زیادی که در خاور دور روی جلبک‌های دریایی انجام‌گرفته است اشاره کرد.[۵]

جلبک‌ها تولیدکنندگان اولیه اکوسیستم‌های دریایی هستند و تنوع آن‌ها در نواحی جزر و مدی اقیانوس‌ها و دریاها تحت تأثیر عوامل جغرافیایی و اقلیمی حاکم بر آن مناطق می‌باشد. این منبع پرارزش بیولوژیکی دارای کاربردهای گوناگونی از جمله غذا و دارو است.[۶و۷و۸] جلبک‌های دریایی علاوه بر غذا می‌توانند برای محصولات صنعتی، آرایشی و پزشکی مورد استفاده قرار گیرند و همچنین این موجودات حاوی مقادیر بالایی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای چرب ضروری‌اند.[۹] جلبک‌ها به‌واسطه داشتن پلی‌ساکاریدهای ارزشمند مانند آگار (Agar)، کارآژینان (Carrageenan) و آلژینات (Alginat) دارای ارزش و اهمیت اقتصادی زیادی می‌باشند.[۸] جلبک‌های قرمز به‌ویژه جنس گراسیلاریا از منابع اصلی استخراج آگار در جهان محسوب می‌شوند که به‌واسطه رشد سریع و داشتن خاصیت ژل بیش از سایر آگاروفیت‌ها موردتوجه می‌باشند. این جلبک‌ها در برخی از کشورها به‌عنوان ماده خام برای استخراج مواد پلی ساکاریدی و یا به‌صورت مستقیم به‌عنوان سبزی تازه مورد استفاده قرار می‌گیرند.[۱۰] جلبک های دریایی کاربردهای فراوانی در صنایع کاغذسازی، نساجی، رنگ سازی، تهیه فیلم‌های عکاسی، لوازم‌آرایشی و بهداشتی و همچنین در علوم پزشکی در داروسازی جهت تهیه محیط کشت میکروبی، تهیه قرص‌ها، شربت‌های دارویی و قالب‌های اولیه دندان دارند و در تغذیه به‌طور مستقیم و غیرمستقیم مورد استفاده قرارمی‌گیرند.[۱۱] تاکنون ترکیبات زیستی متعددی با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و مشتق شده‌اند که بسیاری از متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه این جانداران می‌توانند به مواد فعال مورد علاقه صنایع دارویی تبدیل‌شوند.[۱۲و۱۳]

با توجه به مجاورت دریای عمان و عدم مطالعات همه‌جانبه اثرات ضد سرطان بسیاری از جنس‌ها و گونه‌های مختلف جلبک‌های قرمز و نیز استفاده‌های آینده‌نگر آن بر این تصمیم شدیم که در این راستا مطالعه حاضر طراحی‌شود. لذا در این مطالعه به بررسی اثر عصاره‌های آلی و آبی جلبک قرمز *Grasilaria arcuata* جمع‌آوری‌شده از سواحل چابهار روی سلول‌های سرطانی کولورکتال پرداخته‌شده است.

مواد و روش‌ها

جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* به‌روش دستی از سواحل چابهار جمع‌آوری‌شده و با پاکت نایلونی به آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انتقال داده شد. ابتدا جلبک با دقت شسته و از شن و ماسه و جانداران اپیفیت کاملاً عاری گردید، سپس جلبک را درون آب مقطر غوطه‌ور کرده (برای خارج شدن املاح) و هرچند ساعت آب آن تعویض شد. سپس جلبک روی پارچه تمیزی در سایه پهن و طی سه روز خشک شد. در مرحله بعد نمونه توسط آسیاب برقی کاملاً به‌صورت پودر درآمد. عصاره‌گیری از جلبک‌ها به روش غوطه‌وری ۱۰ درصد جرمی- حجمی با استفاده از حلال‌های متانولی، کلروفرمی، اتیل استات، ان-هگزانی و آبی به این ترتیب انجام پذیرفت که در ابتدا ۱۰ گرم از پودر خشک شده جلبک توزین شد و به ظروف شیشه-ای منتقل شدند. سپس به‌طور جداگانه ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال آلی (برای تهیه عصاره آلی) و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (برای تهیه عصاره آبی) به آن‌ها افزوده و پس از ۴-۳ ساعت هم زدن در شیکر انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. در پایان محتویات ارلن به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد و مایع صاف‌شده در دستگاه سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی به‌عنوان عصاره خام جلبکی برداشته شد. [۱۴] سپس عصاره‌های تغلیظ شده توسط فیلتر میکروبی ۰/۲۲ میکرون عاری از باکتری شد.

آزمون ضد سرطان

کشت سلول

سلول‌های سرطان کولورکتال (HTC116) که از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد، در محیط کشت مایع RPMI1640 که همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ میلی‌لیتر پن استرپ بود، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۵ درصد CO_2 در فلاسک‌های استریل کشت داده شدند. [۱۵]

آزمون MTT

سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه به میزان ۱۰۰ µg/ml سلول در هر چاهک و در دمای ۳۷ °C همراه با ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از *گراسیلاریا آرکواتا*، شامل ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰ µg/ml و کنترل به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از این مدت به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول (MTT 5 mg/ml) اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شد. بعد از گذشت ۴ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج گشته، در دمای ۴°C به مدت ۳ دقیقه و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه با سانتریفیوژ یخچال دار سانتریفیوژ شد، سپس محتویات رویی آن‌ها دور ریخته شده، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO اضافه شد تا فورمازان حاصل حل گردد. پلیت‌ها به مدت بیست دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد و سپس جذب نوری فورمازان در ۵۷۰-۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاریدر خوانده‌شد. [۱۶] میزان سمیت ایجادشده با استفاده از فرمول زیر موردمحاسبه قرار گرفت:

$$\text{درصد سلولی سمیت}=1-\frac{\text{میانگین جذب توکسیکانت}}{\text{میانگین جذب کنترل منفی}}\times 100$$

سنجش توانایی زیستی با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو

سلول‌های سرطانی با دانسیته (2×10^4 سلول بر چاهک) کشت داده شد، این سلول‌ها را در معرض غلظت‌های مختلف عصاره جلبکی قرار داده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباسیون ۵٪ CO_2 نگه‌داری شد. بعد از ۷۲ ساعت ۲۰ میکرولیتر محیط کشت و حجم مساوی از تریپان بلو را باهم ترکیب کرده و سپس تعداد سلول‌های زنده و مرده با لام نئوبار هموسیتومتر شمارش شد. [۱۷] سپس به کمک فرمول زیر درصد فعالیت حیاتی محاسبه شد:

$$\text{درصد زنده‌مانی سلولها}=1-\frac{\text{تعداد سلولهای زنده}}{\text{کل سلول‌ها}}\times 100$$

اثرات سلولی عصاره‌ها

آپوپتوزیس

تشخیص آپوپتوزیز با Annexinv-fitc و رنگ PI انجام شد. طبق دستور کیت (Phosphatidyl serine detection IQP-116F) ساخت کشور هلند از پلیت‌های ۲۴ خانه و تعداد 3×10^5 سلول

استفاده شد و به همان روشی که در تست MTT بیان شد سلول‌ها در پلیت کشت شدند، سپس سلول‌ها را پس از ۴۸ ساعت با EDTA-Tripsin تیمار کرده و ۲ بار با بافر کلسیم شستشو داده، سپس ۱۰ میکرولیتر از Annexin v را با ۱۰۰ میکرولیتر سلول مخلوط کرده، ۲۰ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شد، سپس سلول‌ها را شسته و ۱۰ میکرولیتر رنگ پروپیدیوم یدید (PI) به آن اضافه و ۱۰ دقیقه در تاریکی روی یخ انکوبه شد و نمونه‌ها با فلوسایتومتری مدل (Becton Dickinson. Facs caliber-USA) آنالیز شدند. در این روش سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند فقط رنگ Annexin v را گرفتند و سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شدند و دیواره سلولی آن‌ها اندکی نفوذپذیر شده با دورنگ Annexin v و رنگ PI رنگ‌شده و سلول‌هایی که نکروز شده فقط رنگ PI را به خود گرفتند و هرکدام در plot فلوسیتومتری جداگانه قرارگرفته و به‌این‌ترتیب دسته‌های مختلف سلولی جدا شدند.[۱۸]

قطعه‌قطعه شدن DNA

برای این فرآیند از روش McGahon و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد. برای ارزیابی قطعه‌قطعه شدن DNA در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف از جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* (۱۰۱۰/۱۶، ۸۱۰/۱۶، ۶۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شدند. بعد از ۴۸ ساعت سوسپانسیون سلولی حاوی $۴-۶ \times ۱۰^{۴}$ سلول بودندکه این سلول‌ها در میکروتیوب میکروسانترفیوژ در دور g× ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانترفیوژ شدند. به پلیت حاوی DNA به میزان ۱۰ گرم بر میلی‌لیتر، RNase اضافه شد و برای یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. DNA با استفاده از کیت DNA purification ساخته شده با پروتکل Qiagen ، استخراج شد. DNA استخراج‌شده در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل‌شده و الکتروفورز بر روی آگارز ۸/۱ ٪ حاوی اتیدیوم بروماید انجام شد.[۱۹]

آنالیز آماری

نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-wilk مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز و رسم نمودارها با نرم‌افزار Graphpad- prism 5 و Excell انجام شد برای بررسی نتایج آزمون‌ها و مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) استفاده شد. گروه‌ها در سطح ($p \leq 0.05$) معنی‌دار هستند. ابتدا نرمال بودن داده‌ها بررسی شد. در صورت معنی‌دار بودن تحلیل داده‌ها با استفاده از روش‌های پس آزمون توکی انجام‌گرفت. تمامی اندازه‌گیری‌ها برای هر نمونه‌ی جلبکی سه بار تکرار شد و مقادیر به‌صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شد.

یافته‌ها

آزمون MTT

درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک *Gracilaria arcuata* مورد آزمایش قرارگرفته است که در جدول (۱) آورده شده است.

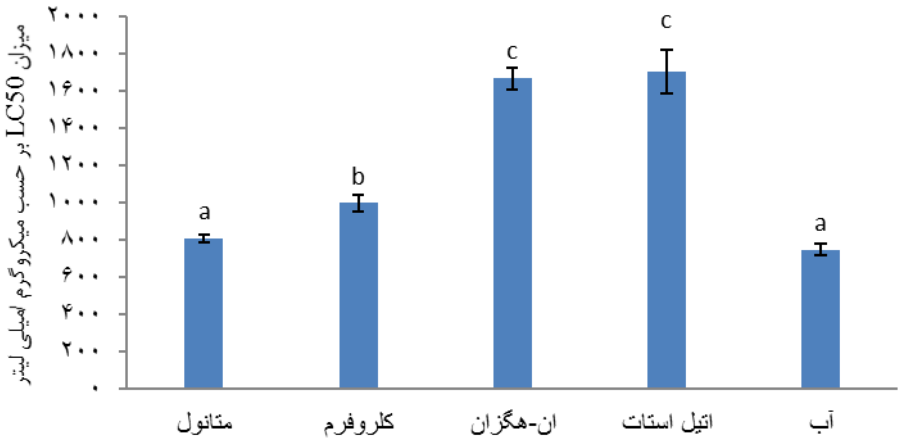
عصاره متانولی و آبی بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشتند و کلروفرم در مقام بعدی بود. کمترین اثر مربوط به عصاره‌های انهگزانی و اتیل‌استاتی بود. میزان غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های متانولی و آبی بیشترین اثر را نسبت به کنترل و غلظت‌های کمتر عصاره نشان‌دارند ($p<0.05$). عصاره کلروفرمی نیز نسبت به انهگزان و اتیل‌استات اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0.05$). عصاره‌های انهگزانی و اتیل‌استاتی کمترین اثر را بر سلول‌های سرطانی نشان دادند و میزان بازدارندگی از رشد در مقایسه با غلظت‌های مؤثر دیگر عصاره‌ها کمتر بود ($p<0.05$). در تمامی عصاره‌ها با کاهش غلظت عصاره در فاز محلول زنده‌مانی سلول‌های سرطانی افزایش یافت که در مورد ان هگزان، متانول و آب غلظت‌های کمتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p>0.05$).

میزان LC۵۰ عصاره‌های جلبک *Gracilaria arcuata* بر روی سلول‌های سرطان کولورکتال در نمودار (۱) آورده شده است. کمترین میزان برای سلول‌های سرطانی کولورکتال مربوط به عصاره‌های متانولی (۲۱/۲۷ ± ۸۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و آب (۳۱/۶۲ ± ۷۴۷/۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود.

جدول ۱: درصد زنده‌مانی سلول‌های کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک *Gracilaria arcuata*

غلظت / عصاره	متانولی	کلروفرمی	ان- هگزانی	اتیل استاتی	آبی
۱۰۰۰	۴۴/۴۵ ± ۱/۰۹^{al}	۵/۱۱ ±۱/۳۷^{am}	۷/۲۲ ± /۲۳^{an}	۷/۵۵±۲/۶۷^{an}	۴/۴۰ ±/۱۲^{al}
۵۰۰	۶۰/۱ ± ۱/۵۶^{bl}	۶/۷۷ ±۱/۹۸^{bm}	۷/۰۹ ± /۹۹^{an}	۷/۷۸±/۷۸^{abn}	۵/۵۵ ±/۱۱^{bl}
۲۵۰	۸۰/۳۲ ± ۰/۳۳^{cl}	۷۵/۴۵±۲/۳۳^{cl}	۹/۰۹ ±/۹۸^{bm}	۸/۶۸±۲/۳۵^{bl}	۷/۷ ±۱/۰۱^{cl}
۱۲۵	۸۹/۸۸ ±۱/۸۸^{cdm}	۸/۴۵ ±۲/۷۲^{dm}	۹/۵۵ ±/۸۸^{bm}	۸/۷۷ ±/۷۹^{cm}	۷/۷۹ ±/۳۱^{cl}
کنترل	۹۶ ± ۱/۱۹^{d}	۹۵/۴۳ ±۱/۱۴^{e}	۹/۷۷ ±۱/۷۷^{b}	۹/۶۷ ±۱/۹۸^{c}	۹۹۹۵±/۵۵^{d}

نتایج به شکل انحراف معیار ± 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 هم نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵٪ می‌باشد.



نمودار ۱: میزان LC50 عصاره‌های جلبک *Gracilaria arcuata* بر سلول‌های سرطان کولورکتال

سنجش توانایی زیستی با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو

درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک *Gracilaria arcuata* با روش تریپان‌بلو مورد آزمایش قرارگرفته است که در جدول (۲) آورده شده است.

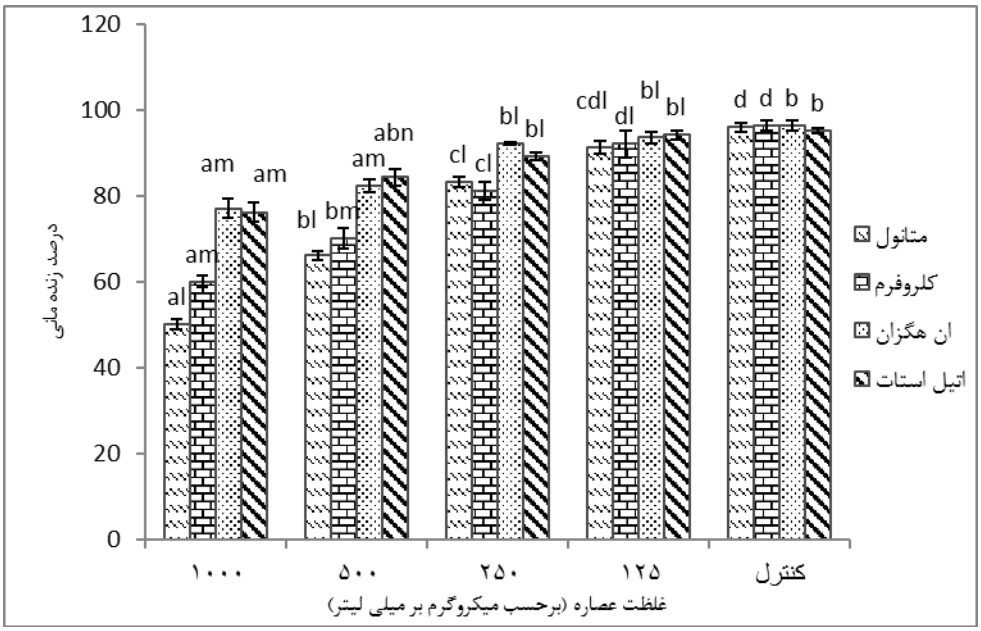
بر اساس جدول عصاره متانولی بیشترین اثر را بر مرگ سلول‌های سرطانی داشت و کلروفرم در مقام بعدی بود. کمترین اثر مربوط به عصاره‌های انهگزانی و اتیل‌استاتی بود. میزان غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی بیشترین اثر را نسبت به کنترل و غلظت‌های کمتر عصاره نشان دادند ($p<0.05$). دیگر عصاره‌ها در این 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 مؤثر دیگر عصاره‌ها کمتر بود ($p<0.05$). در تمامی عصاره‌ها با کاهش غلظت عصاره در فاز محلول زنده‌مانی سلول‌های سرطانی افزایش یافت که به‌جز متانول و کلروفرم در دیگر عصاره‌ها غلظت‌های کمتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p>0.05$) و با نتایج حاصل از MTT هماهنگ بود.

درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان کولورکتال در نمودار (۲) آورده شده است. کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به سلول‌های سرطانی کولورکتال تیمار شده با عصاره اتیل استاتی (۲/۳۴ ± ۷۶/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود.

جدول ۲: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های متفاوت عصاره‌های جلبک *Gracilaria arcuata* با روش تریپان بلو

غلظت / عصاره	متانولی	کلروفرمی	ان- هگزانی	اتیل استاتی
۱۰۰۰	۵۰/۱۱± ۱/۲۹^{al}	۶۰/۱۲ ±۱/۲۲^{am}	۷۷/۱۲ ±۲/۱۱^{an}	۷۶/۲۲ ±۲/۳۴^{an}
۵۰۰	۶۶/۱ ± ۱/۱۶^{bl}	۷۰/۱۷ ±۲/۳۸^{bm}	۸۲/۲۹ ±۱/۵۵^{an}	۸۴/۳۶±۹۹۱^{abn}
۲۵۰	۸۳/۲۱ ± ۱/۲۱^{cl}	۸۱/۱۵ ± ۲/۲۲^{cl}	۹۲/۱۱ ±۰/۳۶^{bl}	۸۹/۱۸ ±۰/۹۵^{bl}
۱۲۵	۹۱/۲۸ ± ۱/۴۴^{cdl}	۹۲/۱۵ ± ۳/۱۲^{dl}	۹۳/۵۵ ±۱/۲۸^{bl}	۹۴/۲۲ ±۱/۰۴^{bl}
کنترل	۹۶ ± ۱/۰۹^{d}	۹۶/۲۳ ± ۱/۲۴^{d}	۹۶/۴۴ ± ۱/۱۷^{b}	۹۵/۲۲ ± ۰/۵۵^{b}

نتایج به شکل انحراف معیار ± 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 هم نام نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵٪ می‌باشد.



نمودار ۲: سمیت سلولی درتیمارهای مختلف عصاره‌های آلی و آبی جلبک *Gracilaria arcuate* با روش تریپان‌بلو

نتایج حاصل از بررسی آپوپتوز سلول‌های اثر داده‌شده با آزمون AnnexinV-FITC توسط فلوسایتومتری

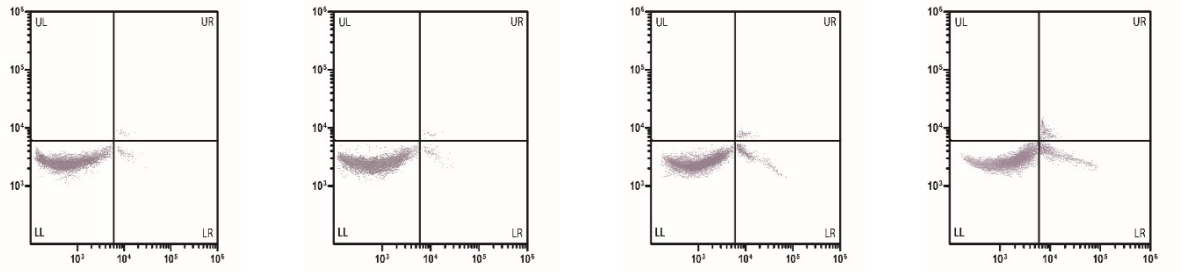
نتایج بررسی آپوپتوزیس با فلوسایتومتری سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* (شامل غلظت‌های ۱۰۱۰/۱۶، ۸۱۰/۱۶ و ۷۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر میکروگرم بر میلی‌لیتر) در نمودار ۳ نشان داده‌شده است. محور افقی آنکسین وی- اف آی تی سی (Annexin V-FITC) و محور عمودی پروپیدیوم یدید (Annexin-PI) می‌باشد. با توجه به شکل، درصد مرگ سلولی در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* نسبت به نمونه کنترل افزایش قابل‌ملاحظه‌ای نداشته است، بدین ترتیب که درصد آپوپتوز گروه کنترل (نمونه سلولی بدون

عصاره) ۰/۷۶ بود درحالی‌که غلظت ۱۰۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای آپوپتوز ۷/۵ درصد بود.

درصد آپوپتوز LC50 غلظت متوسط عصاره برای جلبک‌های *گراسیلاریا آرکواتا* (۸۱۰/۱۶±۲۱/۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ۳/۲ درصد می‌باشد، این مطلب نشان می‌دهد که گراسیلاریا آرکواتا دارای اثر آپوپتوزی زیادی نمی‌باشد.

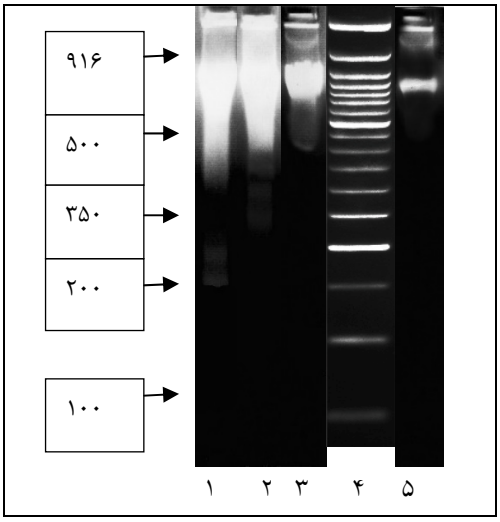
قطعه‌قطعه شدن DNA

نتایج حاصل از قطعه‌قطعه شدن DNA سلول‌های سرطانی کولورکتال تحت غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* در نمودار ۴ آورده شده است که منطبق بر نتایج آپوپتوز بوده و نشان می‌دهد جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* (شامل ۱۰۱۰/۱۶، ۸۱۰/۱۶ و ۷۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به نمونه کنترل (سلول سرطانی بدون عصاره) تأثیر بیشتری بر قطعه‌قطعه شدن DNA دارد. عصاره‌های جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* به‌صورت وابسته به دوز دارای اثر بهتری بر قطعه‌قطعه شدن DNA هستند، بدین ترتیب که با افزایش غلظت عصاره قطعه‌قطعه شدن DNA افزایش‌یافته است.



غلظت ۱۰۱۰/۱۶	غلظت ۸۱۰/۱۶	غلظت ۷۱۰/۱۶	کنترل
(آپوپتوز ۷/۵٪)	(آپوپتوز ۳/۲٪)	(آپوپتوز ۱٪)	(آپوپتوز ۰/۷۶)

نمودار ۳: نتایج بررسی آپوپتوزیس با فلوسایتومتری سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک *گراسیلاریا ارکوآتا*، محور افقی آنکسین وی- اف آی تی سی (AnnexinV-FITC) و محور عمودی پروپیدیوم یدید (Annexin-PI)



نمودار ۴: تصویرالکتروفورز فراگمنت DNA سلول سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک *گراسیلاریا آرکواتا*. ۱) لدر، ۲) کنترل، ۳) غلظت کم عصاره، ۴) غلظت متوسط، ۵) غلظت زیاد (محور افقی: وزن ملکولی بر اساس BP(Bais per))

بحث

ترکیبات زیستی متعددی با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و استخراج شده است و بسیاری از متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه این ارگانیسم‌ها می‌توانند به مواد زیست فعال مورد استفاده در صنایع دارویی تبدیل شوند. در پژوهش حاضر عصاره‌های مختلف جلبک دریایی *گراسیلاریا آرکواتا* اثر مهاری ضد سرطانی مناسبی را بر اساس تست‌های MTT، تریپان بلو، آپوپتوزیس و قطعه‌قطعه شدن DNA نشان دادند، که برای اندازه‌گیری اثرات سمیت سلولی عصاره‌های آبی و آلی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* از آزمون MTT و تریپان‌بلو استفاده شد. در این روش ۳-(۴ و ۵- دی متیل تیازول ۲-ایل)-۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید و یا به‌اختصار MTT که زردرنگ است، توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال به ترکیب غیر محلول و ارغوانی فورمازان تبدیل می‌شود.[۲۰و۲۱] میزان حساسیت این رنگ می‌تواند تحت تأثیر فاکتورهای ویژه‌ای ازجمله حجم سلولی و مواد رنگی داخل سیتوپلاسم قرار گیرد.[۲۰] یکی از محدودیت‌های رنگ‌آمیزی با MTT نسبت به تریپان بلو در مواردی است که سلول دارای کلسترول بالاست و در چنین موردی درصد بقای سلول‌ها کاذب بوده و میزان جذب اندازه‌گیری شده کمتر از میزان واقعی است. زیرا در حضور کلسترول گرانول‌های فورمازان از طریق اگزوسیتوز از سلول خارج می‌شوند درحالی‌که در همین شرایط و در رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو میزان بقای سلول‌ها بیشتر از رنگ‌آمیزی با MTT محاسبه خواهد شد.[۲۲] جذب نوری این ترکیب پس از حل شدن در DMSO، به کمک دستگاه الیزا و در طول‌موج معین قابل‌اندازه‌گیری است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کمترین درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در عصاره جلبکی *گراسیلاریا آرکواتا* در حلال متانولی و آبی مشاهده گردید و در این حلال‌ها غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کمترین زنده‌مانی این سلول‌ها را نشان داد. ونگ و همکاران (۲۰۰۸) آزمایشی برای تعیین اثر عصاره آبی دوازده گونه جلبک از هنگ‌کنگ بر سلول‌های سرطان سینه MCF-۷ و HL-۶۰ انجام دادند، نتایج نشان داد که جلبک‌های *Hydroclathrus clathratus* و *Padina arborescens* موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی با کمترین اثر بر سلول‌های سالم شدند. شعیب و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت سیتوتوکسیک جلبک قرمز *Polysiphonia lanosa* را در آزمایشگاه علیه سلول‌های سرطانی DLD ۱ و HTC ۱۱۶ (سرطان کولورکتال) انسانی موردبررسی قراردادند، نتایج نشان داد که نتیجه عملکرد عصاره کلروفرمی و عصاره متانولی بهتر بود. در این مطالعه نیز عصاره‌های متانولی و آبی *گراسیلاریا آرکواتا* موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی با کمترین اثر بر سلول‌های سالم شدند. در این آزمایش اثر عصاره‌های آبی و آلی جلبک مذکور علیه سلول‌های سرطان کولورکتال انسانی مورد بررسی قرار گرفت، نشان داده شد که بیشترین اثر سیتوتوکسیک برای عصاره‌های متانولی بود که فعالیت سمی علیه سلول‌های سرطانی را نشان داد.

اساس رنگ‌آمیزی تریپان بلو برجذب رنگ توسط سلول‌های مرده است درحالی‌که سلول‌های زنده اجازه ورود رنگ را به درون سلول نمی‌دهند و میزان سمیت با شمارش مستقیم سلول‌های زنده و مرده به دست می‌آید. محدودیت این روش آن است که سلول‌های زنده نیز ممکن است رنگ را جذب کنند و این در شرایطی است که بیشتر از ۵ دقیقه در رنگ باقی بمانند. علاوه بر محدودیت در دقت این رنگ، مشکوک بودن به خواص کارسینوژنیک آن نیز استفاده از آن را محدود می‌کند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کمترین درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در عصاره *گراسیلاریا آرکواتا* در حلال متانولی مشاهده گردید و در این حلال غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کمترین زنده‌مانی این سلول‌ها را نشان داد (جدول ۱-۲). احمدزاده (سال ۸۸) مطالعه‌ای به‌منظور بررسی اثر ضد توموری عصاره حاصل از جلبک قهوه‌ای *سارگاسوم الیگوسیستوم* بومی خلیج‌فارس بر لاین-های سلولی BLL و K562 انجام داد که این مطالعه به‌صورت In vitro انجام شد و در آن عصاره محلول در آب سرد فیلتر شده از جلبک تهیه شد، اثرات ضد توموری جلبک به دو روش MTT Assay و رنگ‌آمیزی تریپان بلو مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان دادند که عصاره جلبک قهوه‌ای در غلظت ۶۴۵-۶۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اثرات ضد توموری قابل‌توجهی علیه لاین سلولی K۵۶۲ و خصوصاً BLL است.[۲۳] در مطالعه حاضر بهترین اثر برای

جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* مربوط به غلظت عصاره متانولی (۱/۲۹±۵۰/۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. با توجه به پژوهش‌های انجام‌شده از دیگر پژوهش‌گران اثبات‌شده است که حلال‌هایی با قطبیت کمتر نتایج بهتری نسبت به حلال‌هایی با قطبیت بیشتر دارند که می‌توان احتمال داد که به علت قطبیت بیشتر، اغلب ترکیبات و اجزای جلبکی دیگر را همراه ماده فعال استخراج می‌کند و درنهایت در این نوع عصاره نسبت مواد فعال زیستی با ویژگی ضد سرطانی نسبت به‌کل محلول استخراجی در قیاس با عصاره‌های با قطبیت کمتر کاهش می‌یابد.

آپوپتوز واژه‌ای یونانی، به معنای افتادن است. این فرآیند به‌طور طبیعی، برای حذف سلول‌هایی که دچار آسیب DNA شده‌اند می باشد و در مراحل خاص رشد و تکامل جنین رخ می‌دهد. [۲۴] آپوپتوز کنترل نشده ممکن است باعث بیماری‌های مختلفی در انسان شود. برای مثال، آپوپتوز بیش‌ازحد باعث کوچک شدن اعضا و اختلال در کار آن‌ها می‌شود که بیماری‌های تحلیل برنده (دژنراتیو) عصبی نمونه‌ای از آن است. حذف آپوپتوز نیز ممکن است به افزایش تولید سلول‌ها و انواع سرطان‌ها منجر شود. [۲۵] مطالعات ملکولی نشان داده است که مرگ سلولی اتفاقی نیست و با بیان ژن‌های خاصی تنظیم می‌شود. همچنین، سلول‌ها در این فرآیند دچار تغییرات ریخت شناختی خاصی می‌شوند که عبارت است از تراکم کروماتین، ایجاد هسته هلالی شکل، تغییر در اسکلت سلولی و غشاء سلول، قطعه‌قطعه شدن هسته، تراکم سیتوپلاسم و در نهایت، تبدیل سلول به یک یا چند جسم آپوپتوتیک که توسط فاگوسیت‌ها احاطه و هضم می‌شوند. آپوپتوز دو مسیر داخلی و خارجی دارد که هردو مسیر نهایتاً خانواده‌ای از پروتئازها، به نام کاسپازها، را فعال می‌کنند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که، درصد مرگ سلولی در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* (۱۰۱۰/۱۶، ۸۱۰/۱۶، ۷۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به نمونه کنترل افزایش قابل‌ملاحظه‌ای نداشته است، بدین ترتیب که، درصد آپوپتوز گروه کنترل (نمونه سلولی بدون عصاره) ۰/۷۶ است درحالی‌که غلظت ۱۰۱۰/۱۶ دارای آپوپتوز ۷/۵ درصد است. پاترا و موتورامان (۲۰۱۳) خواص ضد سرطانی و تحریک آپوپتوز سلولی توسط عصاره جلبک گراسیلاریا را مورد بررسی قراردادند. در این آزمایش خواص عصاره جلبک *Gracilaria edulis* علیه سلول‌های سرطانی Ehrich ascites(EAT) در آزمایشگاه و محیط طبیعی مورد بررسی قرار گرفت که عصاره اتانولی گراسیلاریا دارای اثر سمی معنی‌داری بر سلول‌های سرطانی EAT بود. در این تحقیق از شاخص سمیت (EEGE) عصاره گراسیلاریا بر سلول سرطانی EAT در سلول‌های سرطانی استفاده شد. سلول‌های سرطانی باعث تولید اکسیژن فعال (ROS) و کاهش سطح Glutathione (GSH) درون‌سلولی و استرس اکسیداتیو می‌شود. پارامترهای استفاده‌شده برای القای آپوپتوز سلولی شامل Annexin-V مثبت سلولی، افزایش سطح قطعات DNA، افزایش فعالیت پروتئین‌های Caspase ۲، ۳، ۹ بودند. القای EEGE در موش‌های مبتلابه سرطان EAT باعث افزایش طول عمر موش شده و به‌طور معنی‌داری از رشد تومورها جلوگیری می‌کند که زنده‌مانی موش‌ها را افزایش داد. [۲۶] در این مطالعه نتایج نشان دادند که عصاره‌های متانولی *گراسیلاریا آرکواتا* به‌صورت وابسته به دوز دارای اثر آپوپتوزی قابل‌ملاحظه‌ای نبودند که این مسئله می‌تواند به دلیل کم بودن متابولیت‌هایی مانند بروموفنول‌ها، کاروتن، استروئیدها و ترکیبات سولفیتی مانند فوکوئیدان در جلبک قرمز *گراسیلاریا آرکواتا* که نقش مانعی مهمی در برابر برخی از سلول‌های سرطانی انسانی دارند، باشد.

مشخصه دیگر آپوپتوز، فعال شدن د- اکسی ریبونوکلئاز به‌واسطه فعال شدن کاسپاز می‌باشد. د- اکسی ریبونوکلئاز یک اندونوکلئاز سلولی است که رشته DNA را در نواحی که به‌وسیله هیستون‌ها پوشش داده نشده است، برش می‌دهد. وقتی این قطعات روی ژل آگارز الکتروفورز شوند از هم تفکیک‌شده و خصوصیات شبیه به مارکر DNA از خود نشان می‌دهد که بیانگر آپوپتوز می باشد. [۲۵] در این مطالعه قطعه‌قطعه شدن DNA ژنومی سلول‌های سرطان کولورکتال انسانی تیمار شده با عصاره متانولی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* در سه غلظت نزدیک به غلظت بالا ۱۰۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت به روش الکتروفورز قطعات DNA بر روی ژل آگارز مشاهده گردید. در سال ۲۰۰۱ در ژاپن اثرات ضد توموری *مارژینوزوپوم رودوفیکان* به‌عنوان جلبک قرمز دریائی در محیط درون‌سلولی و برون سلولی بررسی شد که نشان‌دهنده اثر مهاری عصاره جلبک در رشد چندین تومور مثل $B_{16} - BL_6$ ملانوم و JVG-B و kpl- 1 کارسینوم مامیلاری بود و

تزریق عصاره به‌صورت داخل صفاقی بر روی متاستاز ریه $B_{16} - BL_6$ به ورید نیز اثرات مهاری جلبک را تائید کرد و این اولین مطالعه آنتی متاستاتیک این جلبک بود.[۲۷] در سال ۲۰۰۲ هارادا و یاماشیتو متوجه فعالیت ضد توموری پالمتیک اسید استخراج شده از جلبک قرمز به‌عنوان ماده سیتوتوکسیک انتخابی در درمان سلول‌های لوکمی انسان شدند اما این اثرات بر روی فیبروبلاست‌های پوست انسانی دیده نمی‌شود. پالمتیک اسید در غلظت ۵۰- ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خواص سیتوتوکسیک روی سلول‌های لوکمی و منجر به آپوپتوز سلول‌های لوکمی انسانی (Molt-۴) با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شدند و در مطالعات بعدی این اثرات روی موش نیز دیده شد.[۲۷] در مطالعه حاضر نتایج حاصل از قطعه‌قطعه شدن DNA سلول‌های سرطانی کولورکتال تحت غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* منطبق بر نتایج آپوپتوز بوده و نشان می‌دهد عصاره جلبک *گراسیلاریا آرکواتا* (شامل ۱۰۱۰/۱۶، ۸۱۰/۱۶ و ۷۱۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به نمونه کنترل (سلول سرطانی بدون عصاره) تأثیر بیشتری بر قطعه‌قطعه شدن DNA دارد. از آن جا که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در واکنش‌های التهابی و سرطانی دارد، محصولات طبیعی جلبک دریایی دارای قابلیت بالقوه جهت استفاده در داروهای ضدالتهابی و ضد سرطانی هستند. در جمع‌بندی می‌توان گفت که عصاره‌های آبی و متانولی جلبک *گراسیاریا آرکواتا* از خواص ضد سرطانی مشخصی برخوردار است و در صورت بررسی ترکیبات شیمیایی زیست فعال و مطالعات پیش کلینیکی و کلینیکی می‌تواند به‌عنوان یک کاندیدای تولید داروهای ضد سرطان به کار رود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری وزارت علوم به دلیل حمایت از تحقیق حاضر در قالب طرح پژوهشی شماره **۳/۸۲۶۰۱** و دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به دلیل حمایت از تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Kim EJ, Park SY, Lee JY, Park JH. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. BMC Gastroenterol. 2010; 10, 96.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 2012; 62:10–29.
3. Perez EA. Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer, Breast Cancer Research and Treatment. 2009; 114(2):195–201.
4. Kranz D, Dobbelstein M. A killer promoting survival: p53 as a selective means to avoid side effects of chemotherapy. Cell Cycle. 2012; 11(11):2053–2054.
5. Athukorala Y, Kim KN, Jeon YJ. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. Food and Chemical Toxicology. 2006; 44(7):1065-1074.
6. Riahi H. Biology algae. 1988. Tehran. Al-Zahra University.[In Persian]
7. Alvian Z, Farmohammad S, Savary A, Zahzad B. Prevalence and distribution of microscopic marine algae (seaweed) off the coast of the island in relation to environmental pollution. Iranian Fisheries. 1988; (3)11:63-68.
8. Dhargalkar VK, Verlecar XN. Southern Ocean seaweeds. A resource for exploration in food and drugs. Aquaculture. 2009; 287(3): 229-242.
9. Rajasulochana P, Dhamotharan R, Krishnamoorthy. Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. Journal of American Science. 2009; 5(3):20-25.
10. Rabei R, Asadi M, Nejad satary T, Majd A, Sohrabipour J. Algae red algae species diversity in habitats on the shores of the island *Gracilaria salicornia*, Research and Construction. Research and development. 2005; 66. [In Persian]
11. Kaladhara NP, Kaliaperumal N. *Seaweed industry in India.* Naga: india.1999.
12. Derakhshesh B, Yousefzady M, Afsharnasab M, Yeganeh V, Dashtiannasab A. *Lurencia snyderiae* investigate the antimicrobial activity seaweed and *sargassum angustifolium* against human pathogens. Journal of Medicine south. Institute of bio-medical Persian Gulf. 2011; 1: 22-17.
13. Kumaran S, Deivasigamani B, Alagappan K, Sak. Antibiotic resistant *Esherichia coli* strains from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2010*;12*: 977-981.

14. Srivastava VP, Mishra S, Rastogi R. Non-Newtonian arterial blood flow through an overlapping stenosis. Applications and Applied Mathematics. 2010; 5(1):225-38.

15. Élica AC, Teresinha G, Jacia S, Ludiana D, Laura M, Antonio EG. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian. Journal of Pharmacognosy. 2013; 23(4):668-673.

16. Van Dloosdrecht A, Beelen R, Ossenkoppelegj Broekhoven M, Lagenhuijsen M. A tetra-zolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leuk. J Immunol Methods. 1994; 311-320.

17. Morgan S, Darlin D. *Animal cell culture.* IRI press: A practical approach.1992.

18. Tabasi NA, Rad KH, Mahmoudi M, Baharara J, Rastin M. Effect of alcoholic extract of *Nigella sativa* on proliferation and apoptosis of cancer cells all categories ACH. Shahrkord University of Medical Sciences, 2009; 12(3):7-14. [In Persian]

19. Patra S, Muthuramam S, Sundaram M. *Gracilaria edulis* extract induces apoptosis and inhibits tumor in Ehrlich Ascites tumor cells in vivon. *BMC* Complementary and Alternative Medicine. 2013; 331(13), 1472-6882.

20. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemo sensitivity in leukemia. Leukemia & lymphoma. 2003; 44(11):1957-1962.

21. Wang XJ, Wang K, Qian J, Zou Y. Evaluation of MTT assay for measurement of emodin-induced cytotoxicity. Assay and drug development technologies. 2006; 4(2): 203-207.

22. Ahmad S, Ahmad A, Schneider BK, White C. Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells. International journal of toxicology, 2006; 25(1), 17-23. [In Persian]

23. Ahmadzadeh. S. Effect of *Sargassum olygosystum* brown algae on inhibition of cancer cells and K562 BLL in *In vitro*, The final report thesis PhD medical professionals. Bushehr: final report thesis. 2009. [In Persian]

24. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. Trends in cell biology. 2001; 11(12), 526-534.

25. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular cell biology. 2008; 9(1), 47-59.

26. Patra S, Muthuraman MS. *Gracilaria edulis* extract induces apoptosis and inhibits tumor in *Ehrlich Ascites* tumor cells in vivo. BMC complementary and alternative medicine, 2013; 13(1.1).

27. Harada H, Kamei Y. Dose- dependent selective cytotoxity of extract from marine, *cladophorosis vaucheriaeformis*, agonist mouse leukemia 11210 cell. Boil pharm bull, 1998; 21:386-389.

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences

Alborz University of Medical Sciences Journal, November 2018, Vol. 7, No. 4: 281-292 *Original Article*

Ali Taheri[1*], Mostafa Ghaffari[1], Shadab Houshmandi[1], Mehdi Namavari[2]

[1] *Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran*

[2] *Razi Vaccine and Serum Research Institute, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran*

The Effects of Seaweed *Gracilaria arcuata* Extract on the Stimulation of Apoptosis in Colorectal Cancer Cell Lines

Received:8 Apr. 2018 ; Accepted: 23 Oct. 2018

Abstract

***Introduction*:** The most common problems in the medical sciences is resistance of cancer cells to anticancer drugs. Thus, finding new anti-cancer agents with minimal side effects seem necessary. In this regard, different studies on different marine algae are reported. This study aimed to investigate the effects of the algae *Gracilaria arcuata* extract on the stimulation of apoptosis in colorectal cancer cell lines and the effects on cell DNA fragmentation. This study was conducted as an In vitro study.

Materials and Methods: The anticancer effects of aqueous and organic extracts of algae were tested by the MTT Assay, Trypan blue staining, apoptosis by flow cytometry and DNA fragmentation assay methods.

***Results*:** The results of this study imply that the anti-cancer properties tested by MTT and Trypan blue assay, showed that methanol extract of *Gracilaria arcuata* with 44.45 ± 0.91 µg/mL concentration had the maximum effect on cancer cell death and the minimum effect was seen in the hexane (70.22 ± 1.22 µg/mL) and ethyl acetate extracts (70.55 ± 2.67 µg/mL), respectively ($p < 0.05$). Results of trypan blue test confirmed the results of the MTT test, but the survival rate were different. To determine the effect of the algae methanol extract, cell apoptosis was assayed by two methods of flow cytometry and DNA fragmentation. Algae extracts of *Gracilaria arcuata* have LC50 in the concentration of 1010.16 µg/mL and apoptosis of 7.5 percent, which showed little apoptotic effect.

Conclusion: The results show that the algae *Gracilaria arcuata* extract had anticancer effects against colorectal cancer cell lines, but additional studies of the chemical structure of bioactive compounds are needed.

***Keywords*:** Anti-cancer, *Gracilaria arcuata*, Colorectal cancer, Apoptosis

***Corresponding Author:**
Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

Tel: 0912-6487417
E-mail: taherienator@gmail.com