فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۷، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۱۵-۳۰۶ (۱۳۹۰)

مطالعه اثر ضدسرطانی عصاره اتانولی جلبک سبز *Dunaliella salina* جدا شده از دریاچه حوض سلطان بر رده سلولی *Squamous cell carcinoma* در شرایط آزمایشگاهی

زیبا مقدسی[۱]، مژگان امتیازجو[۲*]، محمد ربانی[۳]، مرجان امتیازجو[٤]، فرزانه لبیبی[٥]، اذناله آذرگشب[٦] و نریمان مصفا[۷]

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی‌ارشد، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲*- نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، پست الکترونیک: moz_emtyazjoo@yahoo.com
۳- استادیار، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
٤- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه USM پینانگ، مالزی
٥- کارشناسی ارشد، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
٦- استادیار، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۷- استاد، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۹

چکیده

استفاده از گیاهان آبزی به واسطه داشتن ترکیب‌های مختلف در پیشگیری و درمان بیماریها از حدود ۳۰۰۰ سال پیش در چین رایج بوده است. جلبک سبز دونالیلا (*Dunaliella salina*) نیز یکی از میکروجلبک‌های اکوسیستم‌های دریایی است که به‌واسطه داشتن ترکیب‌هایی نظیر کاروتنوئیدها مخصوصاً بتا-کاروتن، رتینال، آپوکاروتنوئیدها، کتون‌ها، آلدهیدها و اپوکسیدها که با ساختار شیمیایی خاص و روشهای بیوشیمیایی می‌توانند اکسیژن تکی را دفع کنند و جاذب رادیکال‌ها باشند. در مطالعات زیادی خاصیت ضدسرطانی و ضداکسیدانی این ترکیب‌ها ثابت شده است. در این مطالعه از سلول‌های سرطان پوست استفاده شد. ویژگی بارز این نوع سرطان پوست وجود سلول‌های گسترش‌یافته پهن و فلس‌مانند است. هدف از این مطالعه بررسی اثر کشندگی عصاره اتانولی جلبک دونالیلا جدا شده از دریاچه حوض سلطان بر روی میزان مرگ و میر رده سلولی سرطان پوست با استفاده از نمک تترازولیوم در شرایط آزمایشگاهی بود. برای این منظور دونالیلا سالینا از دریاچه حوض سلطان در شمال شرقی قم برداشت، شناسایی و خالص‌سازی گردید. جلبک در محیط کشت جانسون کشت داده شد. توده جلبکی پس از برداشت و شستشو با بافر نمکی فسفات ((Phosphate Buffered Salts (PBS) در برودت خشک و برای تهیه عصاره اتانولی آماده شد. رده سلولی A431 از انستیتو پاستور تهیه و در محیط کشت RPMI (Royal Park Memorial Institute) حاوی سرم جنینی گاوی ۱۰٪ کشت داده شد. سلول‌ها در حضور غلظت‌های مختلف ۰، ٦/۲٥، ۱۲/٥، ۲٥، ٥۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره در فواصل زمانی ٦، ۲٤، ٤۸ ساعت در انکوباتور با دی‌اکسیدکربن ٥٪ قرار داده شد. نتایج آماری داده‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت از نظر مرگ و میر سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0/05$)، ولی در زمان ٦ ساعت سطح معنی‌داری مشاهده نشد ($P<0/05$). LC_{50} عصاره در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی سرطان پوست در فواصل زمانی گرمخانه‌گذاری ٦، ۲٤، ٤۸ ساعت ارزیابی شد. نتیجه LC_{50} پس از گذشت زمان ٤۸ ساعت ٤٦/٦ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. عصاره اتانولی جلبک دونالیلا جهت سنجش میزان بتا-کاروتن موجود در آن توسط HPLC آنالیز شد. نتایج بدست آمده از این مطالعه، اثر کشندگی عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا را بر روی رده سلولی A431 نشان می‌دهد. به‌طوری که با افزایش غلظت عصاره و افزایش انکوباسیون مرگ و میر سلول‌های سرطان پوست نیز افزایش می‌یابد. پس دونالیلا می‌تواند به‌عنوان یک عامل شیمیایی و جلوگیرنده قوی رشد برای این رده سلولی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: *Dunaliella salina*، LC_{50}، HPLC، A431.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

جلبک سبز تک‌سلولی دونالیلا سالینا از خانواده پلی‌بلفاریداسه (Polyblepharidacea) می‌باشد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Raja *et al*., 2007a) و از تولیدکنندگان مهم در مسیر فتوسنتزی دریا و دریاچه‌های نمکی فوق‌اشباع است (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Garcia *et al*., 2007؛ Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009). از ۲۰۰۰ سال تحقیقات سنتی و مدرن بر روی جانداران دریایی عامل‌های ضدسرطان کشف شد که بیشتر این عامل‌ها با ترکیب‌های ساختاری گوناگون، شامل پلی‌کتیدها، ترپن‌ها، استروئیدها و لیپیدها می‌باشند که آنها را از موجودات دریایی بی‌مهره، جلبک‌ها، قارچ‌ها، باکتریها و دیگر موجودات استخراج کرده‌اند. یکی از ترکیب‌های استخراج‌شده از جلبک‌ها بتا-کاروتن می‌باشد. مواد استخراج شده از این جلبک در تعدادی از مدل‌های بالینی و در آزمایشگاه‌ها بر روی رده‌های سلول سرطان انسانی یا روی مدل‌های حیوانی خصوصیات عملکردی منحصر به فردی را از خود نشان داده‌اند (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Mayer & Gustafson, 2003). از ترکیب‌های مهم درون سلولی دونالیلا می‌توان به انواع کاروتنوئیدها، گلیسرول، پروتئین و ویتامین‌ها اشاره نمود. بخش عمده این ترکیب‌ها دارای خاصیت ضداکسیدانی و ضدسرطانی می‌باشند (El-Baz *et al*., 2002؛ Gibbs & Duffus, 1976؛ Gomez *et al*., 2003؛ Raja *e al*., 2007b؛ Poppel & Goldbohm, 1995). بتا-کاروتن یک رنگدانه ترپنوئیدی است که استفاده از آن به‌عنوان پیش‌ماده ویتامین A و داشتن خصوصیات ضداکسیدانی و ضدسرطانی و دافع رادیکال‌های آزاد در درمان بعضی از بیماریها باارزش می‌باشد (Raja *et al*., 2007c؛ Poppel & Goldbohm, 1995؛ Gomez *et al*.,2003؛ Murthy *et al*., 2005). بتا-کاروتن دارای ایزومرهای مختلف مانند ۹ سیس و تمام ترانس (All trans) است که ۸۰٪ کل بتا-کاروتن در دونالیلا را تشکیل می‌دهند. ایزومر ۹ سیس فقط در منابع طبیعی سنتز می‌شود که خصوصیات ضداکسیدانی بالاتری نسبت به تمام ترانس از خود نشان داده است (Gomez *et al*., 2003؛ Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009). پژوهش‌های انجام شده توسط مکمل بتا-کاروتن با ویتامین E کاهش ابتلا به سرطان پروستات و سرطان معده را نشان می‌دهد (Poppel & Goldbohm, 1995؛ Raja *et al*., 2007c). همچنین اثر بتا-کاروتن که به فراوانی در دونالیلا وجود دارد بر روی کاهش خطر سرطان شش، مری، پانکراس، معده، سینه، پوست، روده و تخمدان اثر چشمگیری دارد. جلوگیری از بیماریهای قلبی و عروقی، تومورهای بدخیم، افزایش تقسیم سلولی لنفوسیت‌ها، افزایش پاسخ ایمنی، تغییر شکل تومور و کنترل رشد آن از ویژگی‌های دیگر این ماده می‌باشد (Challem, 1997؛ Buiatti, 1997؛ Stryker *et al*., 1990؛ Murthy *et al*., 2005؛ Raja *et al*., 2007b). در همین ارتباط تحقیقات انجام شده نیز بر روی عصاره دونالیلا نشان داده است که دونالیلا با داشتن ترکیب‌های ضداکسیدانی باعث مهار قابل توجه فیبروسارکومای القا شده و سرطان شش در موش‌ها و رده سلولی سرطان شش انسان A549 گردیده است (Knekt *et al*., 1990؛ Wald *et al*., 1988؛ Sheu *et al*., 2008؛ Raja *et al*., 2007c). به‌طور کلی با توجه به مطالعات ذکر شده می‌توان این مطلب را بیان کرد که جلبک سبز دونالیلا به دلیل داشتن ترکیب‌هایی با خاصیت ضداکسیدانی و ضدسرطانی مانند کاروتنوئیدها به‌خصوص بتا-کاروتن می‌تواند به‌عنوان یک داروی غذایی قابل‌قبول و بالقوه برای پیشگیری و درمان

Archive of SID
www.SID.ir

بیماریها و انواع سرطان‌های رایج مورد استفاده قرار گیرد (Poppel & Goldbohm, 1995؛ Murthy *et al*., 2005).

پوست بزرگترین ارگان بدن می‌باشد که به کنترل دمای بدن و ذخیره آب و چربی و ویتامین D کمک می‌کند. سرطان اپیدرموئید، سرطان پوستی است که در سلول‌های پهن و نازک که در لایه بالای اپیدرم سطح پوست قرار دارند تشکیل می‌شود که مشخصه بارز این سرطان شاخی‌شدن پوست است. از عامل‌های محیطی مؤثر بر این بیماری معرض‌گذاری متناوب با نور خورشید، تابش‌های درمانی با uv-A، uv-B، آلودگی با ارسنیک و آفت‌کش‌ها و کشیدن سیگار است. در این پژوهش نیز به بررسی اثر کشندگی عصاره اتانولی جلبک دونالیلا جدا شده از دریاچه حوض سلطان بر روی میزان مرگ و میر رده سلولی سرطان پوست با استفاده از نمک ترازولیوم در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شده است.

مواد و روشها

کشت جلبک

نمونه آب از دریاچه حوض سلطان واقع در قم به همراه رسوبات بستر توسط بطری نمونه‌بردار دهان گشاد استریل در بهار سال ۱۳۸۷ برداشت گردید و از لحاظ مورفولوژی شناسایی شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Massyuk, 1973؛ Garcia *et al*., 2007؛ Borowitzka & Siva, 2007). برای خالص‌سازی دونالیلا از روشهای مختلف نظیر محیط کشت اختصاصی، سانتریفوژ، اشعه نوری با طول موج‌های مختلف، کاغذهای صافی با قطر منافذ متفاوت، تغییرات شوری، pH، حرارت، نور و مواد شیمیایی مختلف استفاده شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Raja *et al*., 2007b). کشت انبوه جلبک در محیط کشت جانسون تغییریافته با شوری ۱۵٪ و pH= ۷/۵ و شدت تابش نور ۱۰۰ لوکس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در یک دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی انجام شد. نمونه‌ها با سانتریفوژ (eppendorf مدل 5810R) در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت مایع برداشت شد و نمک‌زدایی توسط بافر فسفات (PBS) برای تهیه عصاره اتانولی بکار گرفته شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Garcia *et al*., 2007؛ Raja *et al*., 2007a؛ Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009). در نهایت توده جلبکی بدست آمده در برودت خشک گردید (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009؛ Raja *et al*., 2007a؛ El-Garcia *et al*., 2007؛ Baz *et al*., 2002).

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری با استفاده از ۳۰ گرم پودر دونالیلا بدست آمده انجام شد. برای عصاره‌گیری از اتانول خالص استفاده گردید. برای تغلیظ کردن عصاره بدست آمده از تبخیرکننده چرخان (Heidolph WB2000) در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. عصاره بدست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شد (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009؛ Sheu *et al*., 2008).

آنالیز عصاره توسط HPLC

۰/۱ گرم از عصاره اتانولی جلبک دونالیلا برای سنجش میزان بتا-کاروتن در یک سی‌سی هگزان (5501-7) کاملاً حل گردید. پس از خالص‌سازی و عبور از SPE و فیلتر سلولزی ۰/۴۵ میکرون به مقدار ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC مدل Young Lin Acme 9000 تزریق شد. در این آنالیز از ستون Lichrosphere Rp 100 C18 با

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه ذرات ٤ میکرون و قطر ٤/٦ سانتی‌متر و طول ۲۵ سانتی‌متر در طول موج ٤۵۰ نانومتر توسط DAD/UV و در فاز متحرک استو نیتریل: متانول: دی‌کلرومتان (۷۰:۲۰:۱۰) استفاده گردید (Mateos & Garcia-Mesa, 2006). در این سنجش از استاندارد بتا-کاروتن سیگما با کد C4582 استفاده شد.

تهیه کشت سلولی از رده سلولی سرطان پوست

رده سلولی سرطان پوست *Squamous cell carcinoma* A431$_{30204}$ از انستیتو پاستور ایران در محیط کشت کامل تهیه گردید. جهت کشت این رده سلولی در مراحل بعدی از محیط کشت کامل شامل RPMI 1640 و سرم جنینی گاوی به میزان ۱۰٪، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن و میزان رطوبت ۸۰٪ کشت و تکثیر داده شد (خوانساری و همکاران، ۱۳۷٤؛ Sheu *et al*., 2008).

اثر سیتوتوکسیک عصاره دونالیلا بر رده سلولی سرطانی پوست

در این آزمون مبنای سنجش براساس معرض‌گذاری عصاره با غلظت‌های مختلف در مجاورت رده سلولی و سنجش تعداد سلول‌های مرده می‌باشد. بدین منظور از ماده مؤثره زرد رنگ تترازولیوم (MTT) و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان در روش MTT استفاده شد (شکرگذار و همکاران، ۱۳۸٦؛ Sheu *et al*., 2008). به همین دلیل در مرحله نخست برای سنجش درصد سلول‌های زنده برای کنترل تعداد سلول‌های انتقال یافته به پلیت‌ها از روش تریبان‌بلو استفاده گردید. سلول‌ها به تعداد ۱×۱۰^{٤} سلول بر میلی‌لیتر به پلیت‌های ۹٦ خانه‌ای در محیط کشت کامل منتقل شدند. بعد از ۲٤ ساعت سلول‌ها با بافر فسفات شستشو و با غلظت‌های مختلف از عصاره اتانولی جلبکی (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاوی گرمخانه‌گذاری شدند. غلظت صفر به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از به اتمام رسیدن زمان گرمخانه‌گذاری، محلول رویی سلول‌ها را دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر الکل ایزوپروپانل اسیدی ٤٪ (حجم/حجم) اضافه شد. پلیت‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و بعد با دستگاه خواننده دانش‌گر (Elisa Reader Anthos 2020) در طول موج ٤۹۰ نانومتر و طول موج رفرانس ٦۳۰ شدت جذب اندازه‌گیری شد (شکرگذار و همکاران، ۱۳۸٦؛ Sheu *et al*., 2008). برای هر آزمایش سه چاهک (triplicate) در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها نیز دو بار تکرار گردید. برای محاسبه درصد مرگ سلول‌ها از فرمول زیر استفاده گردید (غضنفری و همکاران، ۱۳۸۵؛ شکرگذار و همکاران، ۱۳۸٦).

$$\text{درصد مرگ و میر} = \frac{\text{میانگین جذب تست}}{\text{میانگین جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

سنجش آماری

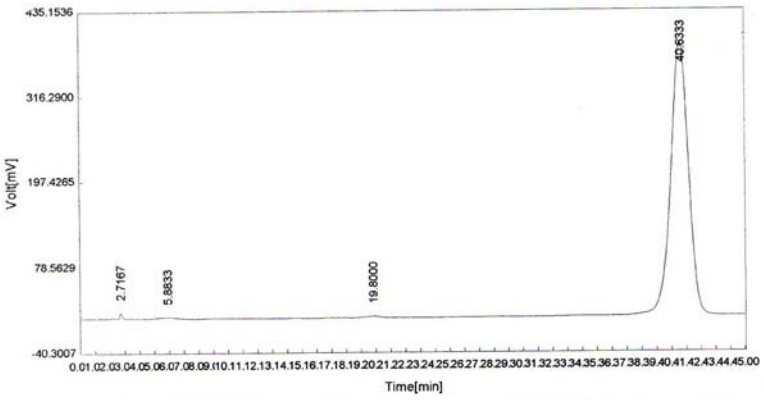
برای تحلیل داده‌های خام از بسته نرم‌افزاری SPSS 16 استفاده شد. در این خصوص میانگین و انحراف معیار نتایج بدست آمده محاسبه گردید. میزان LC_{50} عصاره دونالیلا از آزمون probit value تعیین شد (شکرگذار و همکاران، ۱۳۸٦؛ Sheu *et al*., 2008).

Archive of SID
www.SID.ir

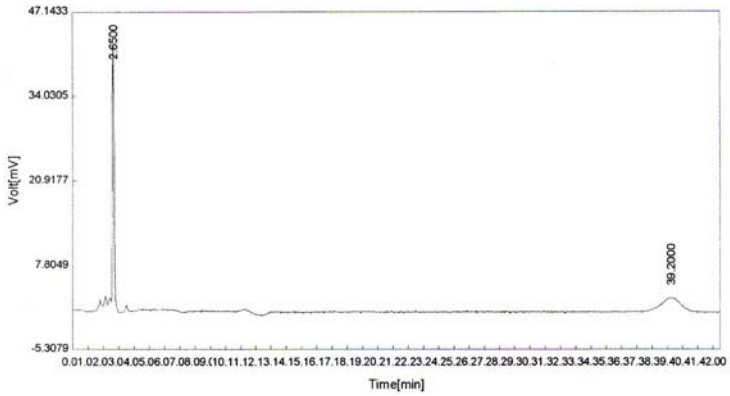
نتایج

جهت بدست آوردن پودر خشک دونالیلا، ۱۱۰۰ لیتر کشت داده شد. این جلبک براساس کلید شناسایی (Borowitzka & Siva, 2007) بررسی و شناسایی شد (امتیازجو، ۱۳۷۹؛ Massyuk, 1973؛ Raja *et al*., 2007a؛ Garcia *et al*., 2007). براساس اندازه‌گیری سطح زیر منحنی بدست آمده از آنالیز HPLC عصاره اتانولی دونالیلا (شکل ۱) با حلال استونیتریل: متانول: دی‌کلرو متان (۱۰:۲۰:۷۰) مقدار ترکیب بتا-کاروتن در ۱۰۰ گرم از دونالیلا محاسبه گردید. این مقدار ppm ۹۲۰ برآورد شد.

a



b



شکل ۱- آنالیز HPLC (a: استاندارد بتا-کاروتن؛ b: عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا)

اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی جلبک دونالیلا در زمان‌های مختلف بر روی رده سلولی A431 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی در سه بازه زمانی ٦، ٢٤، ٤٨ ساعت و در ٦ غلظت ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره دونالیلا در جدول ۱ ارائه شده است. روش آزمون مبتنی بر سنجش درصد کشندگی سلول‌ها و به روش MTT بوده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت و زمان‌های مختلف، میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی A431 افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 گویای آن است که بین غلظت‌های مختلف عصاره در زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت از نظر مرگ و میر سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P<۰/۰۰۵). شکل ۲، LC_{50} بدست آمده از عصاره جلبکی بر سلول‌های A431 در طی زمان‌های ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت را نشان می‌دهد که در زمان ٦ ساعت میزان درصد کشندگی

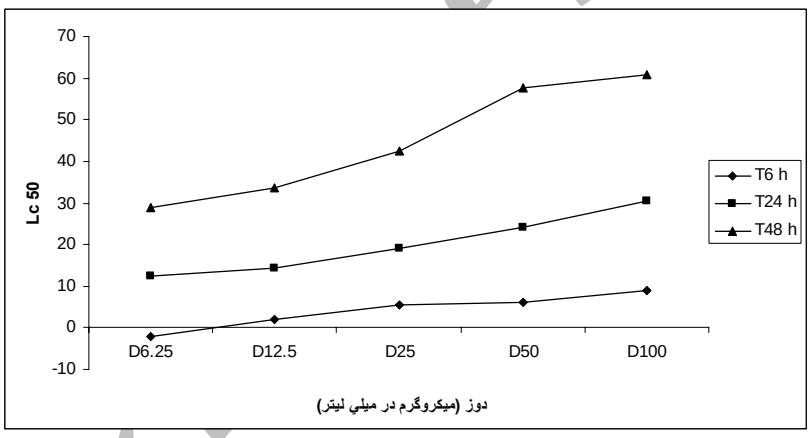
Archive
www.SID.ir

زیر ۵۰٪ بود. بنابراین، براساس آنالیز پروبیت در زمان ۲٤ ساعت، غلظت بیشتری به میزان ٤۷۸/٦ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره لازم است تا بتوان به ۵۰٪ کشندگی سلولی دست یافت. البته در زمان ٤۸ ساعت این مقدار ٤٦/٦ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل گردید.

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی دونالیلا سالینا در زمان‌های مختلف بر روی تعداد مرگ و میر رده سلولی A431

زمان (ساعت)	غلظت (*µg/ml*)					
	۰	٦/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰
٦	۰	۱۹۷/۸ ± ۱٦٦/۷ *	۲۰٤/۳ ± ۸٦۷/۸	۵۵۹/۵ ± ۱۲۰٦/٤	٦۲۵/۸ ± ۵۳۲/۱	۸۹۷/۵ ± ۱۰۷/٤
۲٤	۰	۱۲٤۱/٦ ± ۱۵۰/٤	۱٤۲۲/۸ ± ۲۷۰/۷	۱۹۰۲/۱ ± ۸۹۳/۷	۲٤۱۵ ± ۹٤۰/۹	۳۰۵۹/۵ ± ۱۹۱۳/۱
٤۸	۰	۲۸۷٤/۳ ± ۵٦۷/۷	۳۳٦٦/۸ ± ۳۲۳۸/۳	٤۲۵۱/٦ ± ۱۷۱۵	۵۷۷۲/۸ ± ۱۵۱۲/۵	٦۰۷۱/۱ ± ۲۹٦۷/۷

*: اعداد به صورت Means ± SD می‌باشند.



شکل ۲- مقدار LC_{50} عصاره اتانولی جلبک دونالیلاسالینا بر روی تعداد مرگ و میر رده سلولی A431 در طی زمان‌ها و غلظت‌های مختلف

D (Dozes) ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر، T (Time) ٦، ۲٤، ٤۸ بر حسب ساعت و LC_{50} حداقل دوز کشندگی بر حسب درصد مرگ و میر

بحث

خواص دارویی ترکیب‌های موجود در دونالیلا مخصوصاً بتا-کاروتن در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. در طی سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای استخراج ترکیب‌های طبیعی از میکروجلبک دونالیلا به‌عنوان غذا و دارو صورت گرفته است. از گونه‌های مختلف آن آنزیم‌های با ارزش، ویتامین‌ها و مواد دارویی زیادی استخراج گردیده که از نظر اقتصادی نیز حائز اهمیت می‌باشند. بخش عمده این ترکیب‌ها دارای خاصیت ضداکسیدانی و ضدسرطانی می‌باشند (Hosseini

Archive of SID

www.SID.ir

Tafreshi & Shariati, 2009). در مطالعه‌ای که بر روی عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا انجام شده بود، عصاره بدست آمده با HPLC آنالیز گردید که وجود بتا-کاروتن و کاروتنوییدهای دیگر ازجمله آلفا-کاروتن، لیکوپن، لوتئین، گزانتین و کریپتوزانتین در این عصاره محرز شده است (Sheu *et al*., 2008). ساختار شیمیایی این کاروتنوئیدها به گونه‌ایست که می‌توانند دفع‌کننده رادیکال‌های آزاد باشند و همچنین با همکاری با همدیگر اثر محافظت‌کننده مفیدی در برابر تخریب اکسیداتیو نشان می‌دهند (Challem, 1997؛ Sheu *et al*., 2008) و از پدیده سرطان‌زایی و بیماریهای مختلف ممانعت بعمل می‌آورند. تحقیقات روی خواص دارویی کاروتنوئیدها نشان داده شده که این ترکیب‌ها منجر به مهار رشد سلول‌های نوروبلاستوما و کاهش خطر سرطان کبد و شش، پوست، معده، پروستات در بدن موش شده است، همچنین باعث تغییر و کاهش در تعداد و سایز تومورها و کاهش تخریب ماکولار و کوری در فرد، باعث افزایش سلول‌های کمکی T4 و افزایش ایمنی در بدن می‌شوند (Challem, 1997؛ Reja *et al*., 2007). در تحقیق حاضر نیز با استفاده از آنالیز HPLC وجود بتا-کاروتن در عصاره محرز شد. داده‌های حاصل از این تحقیق با نتایج Sheu و همکاران (۲۰۰۸) هم‌خوانی دارد. نتایج بدست آمده در این مطالعه از میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی پوست و اثبات حضور بتا-کاروتن در عصاره اتانولی دونالیلا و گزارش‌های موجود از مطالعات گذشته بر روی این جلبک ناشی از وجود این ترکیب‌های ضدسرطانی و ضداکسیدانی در ساختار سلولی جلبک دونالیلا سالینا است (Sheu *et al*., 2008). مدارک اپیدمیولوژی نشان دادند که بتا-کاروتن توسط فعالیت ضداکسیدانی مانع سرطان در ارگان‌های مختلف بدن می‌گردد (Buiatti, 1997؛ Murthy *et al*., 2005؛ Poppel & Goldbohm, 1995). در تحقیق انجام شده توسط Blot و همکاران (۱۹۹۳)، در چین مشخص گردید که بتا-کاروتن می‌تواند خطر سرطان معده را کاهش دهد. تحقیقات دیگری نیز به‌صورت هم‌سویه نشان داد که بتا-کاروتن با از بین بردن رادیکال‌های آزاد مانع سرطان پوست گردیده است (Challem, 1997؛ Stryker *et al*., 1990). در تحقیقاتی مشابه در آمریکا نیز مشخص گردید که ۳۰۰ میلی‌گرم در روز بتا-کاروتن به همراه ۲۵۰۰۰ واحد بین‌المللی رتینول پالمیتات باعث کاهش ابتلا به سرطان شش گردیده است (امتیازجو، ۱۳۷۹). Prakash و همکاران (۲۰۰۱) نیز نشان دادند که بتا-کاروتن می‌تواند مورفولوژی سلول‌های سرطان شش NCI-H69 را تغییر دهد و باعث کاهش رشد و تقسیم سلولی در آنها گردد. محققان در آمریکا ثابت کردند که عصاره جلبک دونالیلا، جلبک اسپیرولینا، بتا-کاروتن، آلفا-توکوفرول و کانتازانتین می‌تواند باعث القاء فاکتور نکروز تومور (TNF- α) گردد که منجر به کاهش خطر سرطان اپیدرموئید کیسه‌دهانی در موش می‌گردد (Shaklar & Schwarts, 1988). در مطالعه‌ای درمان سرطان بافت فیبروزی در موش‌ها با عصاره دونالیلا سالینا نشان داد که میزان آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز در سرم خون موش‌های درمان شده افزایش یافته است که نقش مهمی در حذف رادیکال‌های توکسیک نامطلوب را دارند و از سوی دیگر باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در سطح DNA و RNA در بافت کبد و کلیه موش‌ها شده است. این پدیده نقش مهمی در تغییر شکل تومور ایفا می‌کند و نشان‌دهنده درمان موش‌های سرطانی‌شده می‌باشد (Raja *et al*., 2007a). عصاره اتانولی دونالیلا

Archive of SID

www.SID.ir

سالینا می‌تواند باعث مرگ سلولی در رده سلولی اپی‌تلیوم غده‌ای سرطان شش انسان توسط تغییر در بیان پروتئین‌هایی که تنظیم‌کننده چرخه سلولی هستند شوند، در نتیجه باعث توقف چرخه سلولی گردد. بنابراین با افزایش غلظت عصاره و افزایش زمان معرض‌گذاری، میزان درصد مرگ و میر سلول‌های سرطانی نیز افزایش پیدا می‌کند (Sheu *et al*., 2008). در تحقیق حاضر نیز مشخص گردید که با افزایش غلظت عصاره و در طی زمان‌های مختلف معرض‌گذاری میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی A431 افزایش می‌یابد. به‌طوری که میزان ٤٦/٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره در طی زمان ٤٨ ساعت می‌تواند باعث ۵۰٪ کشندگی سلول‌های سرطان گردد. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا می‌تواند به‌عنوان یک عامل جلوگیری‌کننده در برابر سرطان پوست باشد.

سپاسگزاری

در پایان از مسئولان محترم دانشکده علوم و فنون دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و از گروه ایمونولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی به‌خصوص آقای بابک فرخی که ما را در انجام این طرح تحقیقاتی یاری و مساعدت کردند کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

- امتیازجو، م.، ۱۳۷۹. شناسایی جلبک تک‌سلولی دونالیلا از خلیج فارس و استخراج بتا-کاروتن از این ارگانیسم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم وفنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
- خوانساری، ن.، توکلی، م.ع. و شمشیری، م.، ١٣٧٤. روشهای بنیادی کشت یاخته‌های جانوری. انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران، ۲۸۱ صفحه.
- شکرگذار، م.ع.، زالی، ح.، رضایی طاویرانی، م. و امان‌زاده، ا.، ١٣٨٦. مقایسه دو روش رنگ‌سنجی MTT و تریبان‌بلو در تعیین سیتوتوکسیسیتی‌کال پروتکتین بر سلول‌های سرطانی معده انسان در شرایط آزمایشگاهی. پزشکی کوثر، ۱۲(۲): ۱۳۷-۱۲۷.
- غضنفری، ط.، شاهرخی، س.، ناصری، م.، جلالی ندوشن، م.ر.، یارایی، ر. و کاردر،م.، ۱۳۸۵. بررسی سمیت فراورده گیاهی ACA1 بر روی رده سلول سرطانی ملانومای انسانی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ١٦(٥٥): ٤٩-٤٢.
- Blot, W.J., Li, J.Y., Taylor, P.R., Guo, W., Dawsey, S., Wang, G.Q., Yang, C.S., Zheng, S.F., Gail, M. and Li, G.Y., 1993. Nutrition intervention trials in Linxian China: supplementation with specific vitamin/mineral combination, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. Journal of the National Cancer Institute, 85(18): 1483-1492.
- Borowitzka, M.A. and Siva, C.J., 2007: The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, *Dunaliellales*) with emphasis on the marine and halophilic species. Journal of Applied Phycology, 19(5): 567-590.
- Buiatti, E., 1997. The role of chemoprevention in cancer control. Salud Publica de Mexico, 39(4): 310-317.
- Challem, J.J., 1997. Beta-carotene and other carotenoids: promises failures, and a new vision. Journal of Orthomolecular Medicine, 12(1): 11-19.
- El-Baz, F.K., Abul-Enein, A.M., El-Baroty, G.M., Youssef, A.M. and Abdel-Baky, H.H., 2002. Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. Journal of Biological Science, 2(4):220-223.
- Garcia, F., Freile-pelegrin, Y. and Robledo, D., 2007. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. BioresourceTechnology, 98(7): 1359-1365.
- Gibbs, N. and Duffus, C.M., 1976. Natural protoplast *Dunaliella* as a source of protein. Applide and Environmental Microbioloy, 31(4): 602-604.
- Gomez, P.I., Barriga, A., Cifuentes, A.S. and Gonzalez, M.A., 2003. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* accumulated (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (ATCC30861) chlorophyta. Biological Research, 36(2): 185-192.
- Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M., 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology, 107(1): 14-35.

Archive of SID

www.SID.ir

- Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. and Rengasamy, R., 2007a. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on Wistar rats. Microbiological Research, 162(2): 177-184.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. and Rengasamy, R., 2007b. PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. Microbiological Research, 162(2): 168-176.
- Raja, R., Hemaiswarya, S. and Rengasamy, R., 2007c. Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(3): 517-523.
- Sheu, M.J., Huang, G.J., Wu, C.H., Chen, J.S., Chang, H.Y., Chang, S.J. and Chung, J.G., 2008. Ethanol extract of *Dunaliella salina* induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 Human non-small cell lung cancer. In vivo, 22(3): 369-378.
- Shaklar, G. and Schwarts, J., 1988. Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alphatocopherol, beta-caroten, canthaxanthin and algae extract. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 24(5): 839-850.
- Stryker, W.S., Stampfer, M.J., Stein, E.A., Kaplan, L., Louis, T.A., Sober, A. and Wellett, W.C., 1990. Diet, plasma levels of beta-carotene and alpha-tocopherol, and risk of malignant melanoma. American Journal of Epidemiology, 131(4): 597-611.
- Wald, N.J., Thompson, S.G., Densem, J.W., Boreham, J. and Bailey, A., 1988. Serum beta-carotene and subsequent risk of cancer: results from the BUPA study. British Journal of Cancer, 57(4): 428-433.
- Knekt, P., Aromaa, A., Maatela, J., Aaran, P.K., Nikkari, T., Hakama, M., Hakulinen, T., Peto, R. and Teppo, L., 1990. Serum vitamin a and subsequent risk of cancer: cancer incidence follow-up of the finnish mobile clinic health examination survey. American Journal of Epidemiology, 132(5): 857-870.
- Massyuk, N.P., 1973. Morphology, Taxonomy, Ecology and Geographic Distribution of the Genus *Dunaliella* Teod. and Prospects for its Potential Utilization. Naukova Dumka, Kiev, 312p.
- Mateos, R. and García-Mesa, J.A., 2006. Rapid and quantitative extraction method for the determination of chlorophylls and carotenoids in olive oil by high-performance liquid chromatography. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385(7): 1247-1254.
- Mayer, A.M.S. and Gustafson, K.R., 2003. Marine pharmacology in 2000: Antitumor and cytotoxic compounds. International Journal of Cancer, 105: 291-299.
- Murthy, K.N.C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M.M., Sowmya, P.R. and Ravishankar, G.A., 2005. Invivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*-a green microalga. Life Sciences, 76(12): 1381-1390.
- Poppel, G.V. and Goldbohm, R.A., 1995. Epidemiologic evidence for beta-caroten and cancer prevention. American Journal of Clinical Nutrition, 62: 1393-1402.
- Prakash, P., Manfredi, T.G., Jackson, C.L. and Gerber, L.E., 2001. Beta carotene alters the morphology of NCI-H69 Small cell lung cancer cells. The Journal of Nutrition, 132(1): 121-124.

Archive of SID

www.SID.ir

Study effect of anti cancer ethanol extract *Dunaliella salina* isolated from Hoz-Soltan against Squamous cell carcinoma in vitro

Z. Moghadassi[1], M. Emtyazjoo*[2], M. Rabanie[1], M. Emtyazjoo[3], F. Labibie[4], E. Azarghashb[5] and N. Mosaffa[5]

1- MSc. Student, Marine Science and Technology Faculty, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Marine Science and Technology, Islamic Azad University, Tehran, Iran
E-mail: moz_emtyazjoo@yahoo.com
3- Ph.D. Student, Biotechnology Department, USM University, Pinang, Malaysia
4- Immunology Group, Medicine Faculty, Shahid Beheshtie University, Tehran, Iran
5- Medicine Faculty, Shahid Beheshtie University, Tehran, Iran

Received: April 2010 Revised: August 2010 Accepted: August 2010

Abstract

Aquatic plants have been used prevalently in China since 3000 years ago due to having various chemical compounds for diseases prevention and cure. *Dunaliella salina* is one of the micro algae in marine ecosystems containing beta-carotene, retinal, apocarotenoides, ketones, aldehydes and epoxides which enable it to absorb free radicals and produce singlet oxygen. In many studies, the anti-cancer and anti-oxidant effects of these chemical compounds have been confirmed. In this study, squamous cell skin cancer was used. The main goal of this research was to study the killing effects of the ethanol extract from the mentioned alga against *Squamous cell carcinoma* in vitro through using tetrazolium salt under in vitro conditions. *Dunaliella Salina* was collected from Hoz-Soltan Salt Lake located in the northeast of Qom. Algae were cultured on Johnson Medium. Algae mass were purified with PBS and then freeze dried. A431 cell line obtained from Pasteur Institution was cultured in RPMI medium containing FBS 10%. Cells were incubated with 5% CO_2 in presence of different concentrations 0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml of extracts in time periods of 6, 24, and 48 hours. Results of the statistical analysis showed that there was a significant difference among various extract concentrations on death cells in 24 h and 48 h incubation ($P < 0.05$). Lc_{50} of different concentrations of extract against skin carcinoma cell line were evaluated in incubation period of 6, 24, and 48 hours. Lc50 results after 48 hours showed value of 46.6 6 µg/ml. The ethanol extract of *Dunaliella* algae was analyzed by HPLC in order to evaluate the available beta carotene in algae. Our results confirm the killing effect of ethanol extract of Dunaliella against line Squamous cell carcinoma. With increasing extract concentration and incubation time, death of cells on the skin cancer cell line increased. Therefore, *Dunaliella* can be considered as a strong chemopreventive agent and anti cancer against this cell line.

Key words: *Dunaliella salina*, LC_{50}, HPLC, A431.

Archive of SID

www.SID.ir