Journal of Marine Medicine
Summer 2021, Volume 3, Issue 2
Pages: 83-90
10.30491/3.2.83

Cytotoxic Properties of Marine Sponge Thetya sp. Extract and Apoptosis Stimulation against Colorectal Cancer Cells

Samira Jalalinezhad [1,2] *, Seyed Abdolmajid Ayatolahi [3,4], Ali Taheri [5]

[1] *Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2] *Resident of Internal Diseases, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran*
[3] *Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[4] *Phytochemistry Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[5] *Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran*

Received: 30 April 2021 **Accepted:** 10 May 2021

Abstract

Background and Aim: Finding the biologically active compounds from marine sources is of particular importance for cancer control. In the present study, the effect of cytotoxicity and apoptosis stimulation of marine sponge Thetya sp. extracts against colorectal cancer cells was evaluated.

Methods: Marine sponge Thetya sp. was caught from the Oman Sea in 2017 and extracted with solvents of methanol, chloroform, hexane and ethyl acetate. The extract was evaluated at concentrations of 900, 400, 200, 100, 50 and 30 µg/ml on the colorectal cancer cell line. Cytotoxicity test was performed by MTT method and the effect of apoptosis was performed by flowcytometry method.

Results: The survival rate of colorectal cancer cells in methanolic extract of Thetya sp. at concentration of 900 µg/ml was 32.92%. The IC50 of the methanolic extract against colorectal cancer cells was 556.4 µg/ml. Chloroform extract of marine sponge with IC50=1330.95 µg/ml showed less effect for colorectal cancer cells than methanolic extract. Also, methanolic extract of marine sponge with 25% apoptosis and 14% primary colorectal cancer cell necrosis showed its effect at concentration of 756.4 µg/ml. Marine sponge Thetya sp. extracts had no significant cytotoxic effect on healthy cells.

Conclusion: It seems that the total methanolic extract of marine sponge Thetya sp. has metabolites with anti-cancer properties that can inhibit colorectal cancer cells.

Keywords: Marine Sponge, Cytotoxic, Apoptosis, Necrosis, Colorectal Cancer.

***Corresponding author:** Samira Jalalinezhad, **Email**: samirajalalinezhad@gmail.com
Address: Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2025-06-26]

[DOI: 10.30491/3.2.83]

مجله طب دریا
دوره ۳، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰
صفحات: ۹۰-۸۳
10.30491/3.2.83

خواص سمیّت سلولی عصاره اسفنج دریایی .Thetya sp و تحریک آپوپتوز سلول‌های سرطانی کولورکتال

سمیرا جلالی نژاد [۱،۲]*، سید عبدالمجید آیت اللهی [۳،۴]، علی طاهری [۵]

[۱] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] رزیدنت بیماری های داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
[۳] استاد گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۴] مرکز تحقیقات فیتوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۵] دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۱۰ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۰/۰۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: یافتن ترکیبات فعال زیستی از منابع دریایی برای مهار سرطان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعه حاضر به ارزیابی اثر سمیّت سلولی و تحریک آپوپتوز عصاره‌های اسفنج دریایی .*Thetya* sp علیه سلول سرطانی کولورکتال پرداخته شد.

روش‌ها: اسفنج دریایی .*Thetya* sp از دریای عمان در سال ۱۳۹۶ صید شد و با حلال‌های متانول، کلروفرم، هگزان و اتیل استات عصاره‌گیری گردید. عصاره در غلظت‌های ۹۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۳۰ µg/ml روی رده سلول سرطانی کولورکتال مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون سمیت سلولی با روش MTT و بررسی اثر آپوپتوزی با روش فلوسایتومتری انجام شد.

یافته‌ها: بقای سلول‌های سرطانی کولورکتال در عصاره متانولی اسفنج دریایی .*Thetya* sp در غلظت ۹۰۰ µg/ml برابر ۳۲/۹۲ درصد بود. میزان IC_{50} عصاره متانولی علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال برابر ۵۵۶/۴ µg/ml به دست آمد. عصاره کلروفرمی اسفنج با IC_{50} برابر ۱۳۳۰/۹۵ µg/ml برای سلول‌های سرطانی کولورکتال اثر کمتری نسبت به عصاره متانولی نشان داد. همچنین عصاره متانولی اسفنج با ۲۵ درصد آپوپتوزیس و ۱۴ درصد نکروزیس اولیه سلول سرطانی کولورکتال در غلظت ۷۵۶/۴ µg/ml اثر خود را نشان داد. عصاره‌های اسفنج دریایی .*Thetya* sp بر سلول‌های سالم اثر معنی‌دار سیتوتوکسیک نداشتند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره تام متانولی اسفنج دریایی .*Thetya* sp دارای متابولیت‌هایی با خواص ضد سرطانی است که توانایی مهار سلول‌های سرطانی کولورکتال را دارد.

کلیدواژه‌ها: اسفنج دریایی، سمیت سلولی، آپوپتوز، نکروز، سرطان کولورکتال.

*نویسنده مسئول: **سمیرا جلالی نژاد**. پست الکترونیک: samirajalalinezhad@gmail.com
آدرس: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2025-06-26]
[DOI: 10.30491/3.2.83]

مقدمه

عوامل بروز سرطان می‌تواند مجموعه‌ای از تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی تحت تأثیر عوامل محیطی، فیزیکوشیمیایی و پاتوژن‌ها باشد. سرطان‌های کبد، ریه، معده، پستان و کولورکتال به سرعت رشد می‌کنند و هر ساله موجب مرگ و میر زیادی می‌شوند. طبق آخرین گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۱۰ بالغ بر ۱۳ میلیون انسان به بیماری‌های سرطان مبتلا و ۷/۵ میلیون مورد مرگ گزارش شده است و تا سال ۲۰۳۰ به ۲۱ میلیون فرد مبتلا افزایش می‌یابد (۱).

سرطان سومین عامل مرگ و میر در ایران است که مرگ‌ومیر ناشی از آن طی سال‌های اخیر به شدت رو به افزایش گذاشته است. سرطان کولورکتال از سرطان‌های بسیار شایع و ۹/۷ درصد کل سرطان‌ها را شامل می‌شود و در هر دو جنس زن و مرد شایع است (۲،۳). در ایران نیز ۶/۳ درصد مرگ و میر را سرطان کولورکتال شامل می‌شود (۶-۴). کولون و رکتوم اجزای روده بزرگ هستند و سرطان زمانی رخ می‌دهد که تومور در روده بزرگ شکل بگیرد. ریسک ابتلا به این نوع سرطان در سن بالای ۵۰ سال افزایش می‌یابد؛ لذا توجه به پیشگیری و درمان این بیماری بسیار حائز اهمیت است. شیمی‌درمانی یکی از بهترین روش‌های درمان است، ولی دارای اثرات جانبی زیادی است. کشف و شناسایی داروهای ضد تومور جدید با عوارض جانبی کم، به یک هدف اساسی در بسیاری از مطالعات ایمنی- دارویی تبدیل شده است (۷). با این هدف، توجه بسیاری به ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان، موجودات دریایی و میکروارگانیسم‌ها معطوف گردیده است. از زمان‌های دور تا امروز، طبیعت همواره منبع مهمی از داروها بوده است. حدود ۶۰ ٪ از داروهای تأیید شده برای درمان انواع سرطان منبع طبیعی دارند. وین کریستین، ایری نوتکان، اتوپوزید، تاگزان و کامپتوتسین از ترکیبات دارویی ضد سرطان مشتق از گیاهان هستند. هرچند ترکیبات دریایی در منابع دارویی کنونی نماینده کمی دارد اما محیط آبزی در آینده منبع بسیار با ارزشی از ترکیبات دارویی نوین خواهد بود (۸).

در طول ۶۰ سال گذشته اسفنج‌های دریایی به علت متابولیت‌های ثانویه مستخرج از آنها به‌عنوان گنجینه باارزش شناخته شده‌اند. اسفنج‌ها از جانوران بی‌مهره دریایی هستند که به‌صورت هم‌زیست با باکتری‌ها یا ریزجلبک‌ها زندگی می‌کنند. بیش از ۳۰۰۰ گونه کشف شده اسفنج‌های دریایی در محیط دریایی و اقیانوسی گزارش شده است. بر اساس گزارش‌ها جلبک‌ها منبع ۳۵٪ مواد شیمیایی جدید کشف شده هستند و اسفنج‌ها در مقام بعدی قرار دارند (۹). اسفنج‌ها پتانسیل تولید داروهای آینده علیه بیماری‌های مهم مثل سرطان و ناراحتی‌های قلبی و عروقی را دارا هستند. اسفنج‌ها طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی با اسکلت کربنی متنوع تولید می‌کنند (۱۰). تاکنون بیش از ۱۵۰۰۰ ترکیب فعال زیستی دریایی گزارش شده است و اسفنج‌ها مسئول بیش از ۵۳۰۰ ترکیب متنوع آن هستند و هر ساله صدها ترکیب جدید کشف می‌شود (۱۱). در اوایل دهه ۱۹۵۰ نوکلئوزیدهای Spongothymidine و Spongouridine در اسفنج دریایی *Cryptotethia crypta* گزارش شد (۱۲). این نوکلئوزیدها اساس تولید و سنتز Ara-C، اولین داروی ضد سرطان با منشأ دریایی و Ara-A به‌عنوان داروی ضد ویروس بودند (۱۳). داروی Ara-C امروزه داروی روتین در درمان لوکمی و تومور لنفی است. مشتقات فلورینه (fluorinated derivative) آن نیز برای درمان سرطان پانکراس، پستان، مثانه و ریه تأیید شده است (۱۴). بر اساس تحقیقات جدید نیز ترکیباتی مثل سیتارابین (*Cryptothethya crypta*)، هالیکوندرین B (*Halichondria okadai*)، بریوستاتین (*Bugula neritina*)، دولاستاتین (*Dolabella auricularia*)، اکتیناسیدین۷۴۳ (*Ecteinascidia turbinata*) تولید شده‌اند که همگی به‌عنوان داروهای ضد سرطان تحت مطالعات تأییدی یا تجاری قرار دارند.

ترکیبات فعال زیستی اسفنج‌ها به‌عنوان عامل ضد التهاب، ضد تومور، سرکوب‌کننده سیستم ایمنی یا سیستم عصبی، ضد ویروس، ضد باکتری، ضد مالاریا و ضد کلنی مزاحم طبقه‌بندی می‌شوند. تنوع شیمیایی ترکیبات اسفنج‌ها نیز قابل توجه است. بعلاوه نوکلئوزیدهای غیرطبیعی، ترپن‌های فعال زیستی، استرول‌ها، پپتیدهای حلقوی، آلکالوئیدها، اسیدهای چرب و مشتقات اسیدهای آمینه که اغلب هالوژنه هستند و همگی خواص زیستی فعال قوی دارند از اسفنج‌ها مشتق شده‌اند (۱۰). مطالعات متعددی روی خواص ضد سرطانی اسفنج‌های دریایی انجام شده است. Shubina و همکاران، یک پنتاسیکلیک گوانیدین آلکالوئید با نام monanchoxymycalin از اسفنج دریایی *Monanchora pulchra* استخراج نمودند. این ترکیب فعالیت سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطانی HeLa در غلظت کم نشان داد و مرگ مرتبط با آپوپتوزیس را با جلوگیری از تشکیل توده سلول‌های سرطانی نشان داد. همچنین با داروی cisplatin اثر سینرژیک و افزایشی داشت (۱۵). Azcuna و همکاران نیز روی عصاره اسفنج *Callyspongia samarensis* کار کردند. ترکیب خالص شده عصاره متانولی این اسفنج دارای خاصیت مهار بالای رشد سلول‌های سرطان کولون بود (۱۶).

در خلیج‌فارس و دریای عمان اسفنج‌های دریایی به طور گسترده‌ای پراکنده هستند. بر اساس منابع، روی خواص سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره اسفنج‌های سواحل دریای عمان تحقیقات اندکی انجام شده است و نیاز است روی اسفنج‌های خلیج‌فارس و دریای عمان در حوزه زیست‌فناوری پزشکی - دارویی تحقیقات بیشتری انجام شود؛ لذا در مطالعه حاضر به بررسی برون‌تنی خواص سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره‌های آلی اسفنج دریایی Thetya سواحل دریای عمان علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال پرداخته شد.

[Downloaded from jmarmed.ir on 2025-06-26]

[DOI: 10.30491/3.2.83]

روش‌ها

تهیه نمونه اسفنج و استخراج

اسفنج‌های دریایی *Thetya* sp. از دریای عمان در سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. استخراج اسپیکول‌ها با کمک کلید شناسایی توسط متخصص زیست‌شناسی دریا، در حد جنس مورد شناسایی قرار گرفت. اسفنج بعد از برداشت، ابتدا با آب دریا و سپس با آب مقطر شستشو گردید و در هوای آزاد در سایه خشک شد. ۱۰ گرم نمونه آماده شده در ۵۰ میلی‌لیتر حلال قرار گرفت و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای اتاق توسط شیکر انکوباتور مورد استخراج قرار گرفت. از حلال‌های متانول، کلروفرم، ان‌هگزان و اتیل‌استات استفاده شد. سپس با کاغذ صافی شماره ۴۲ واتمن صاف گردید. پس از فیلتر شدن در خشک‌کن انجمادی تحت خلأ (Jalteb, Iran) خشک شد. عصاره‌های خشک شده تا زمان آنالیز در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۱۷).

بررسی اثرات ضد سرطانی

نمونه‌های حل شده در حلال‌های متانول، کلروفرم، ان هگزان و اتیل‌استات، قبل از بررسی اثر سیتوتوکسیک، توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شدند. سلول‌های مورد مطالعه در ۱۵ میلی‌لیتر محیط DMEM درون فلاسک استریل ۷۵ سی‌سی به همراه ۳۰۰ میکرولیتر سرم FBS و ۳۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک پن استرپ یک بار پاساژ داده شدند تا به تعداد نهایی ۱۷×۱۰^{۴} سلول در میلی‌لیتر برسند.

تست MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

برای انجام تست MTT از پلیت ۹۶ خانه کف تخت استفاده شد. عصاره اسفنج اول تا رقت ۱/۶۴ مورد سنجش قرار گرفت. برای گروه کنترل از بافر فسفات سالین PBS استفاده شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سلول اضافه شد که در مجموع هر چاهک حاوی ۲۰۰ لاندا نمونه گردید. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار حاوی ۵ درصد گازکربنیک قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) که تازه آماده شده بود به هر چاهک اضافه شد و ۴-۳ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفت. بعد از این مدت پلیت‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و در دور ۳۰۰۰ با سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شد. بعد از زمان موردنظر، محتوی چاهک‌ها خالی شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید اضافه و پلیت با فویل آلومینیومی پوشیده گردید و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. بعد از این مدت، جذب نوری در طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر و تست ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید (۱۸). از سلول‌های سالم Vero (کلیه میمون) و J774 (رده سلولی ماکروفاژ موش) برای بررسی اثر عصاره‌ها روی سلول غیرسرطانی استفاده شد. میزان IC_{50} هر عصاره برای سلول سرطانی کولورکتال با استفاده از رگرسیون خطی برآورد شد.

سنجش فعالیت آپوپتوزی با فلوسایتومتری

بهترین عصاره با فعالیت سیتوتوکسیک وارد مرحله سنجش فعالیت آپوپتوزی شد. تشخیص آپوپتوزیس 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 ۳×۱۰^{۵} سلول استفاده شد و به همان روشی که در تست MTT بیان‌شد سلول‌ها در پلیت کشت شد. سپس سلول‌ها را پس از ۴۸ ساعت با EDTA-Tripsin ۰/۱ درصد از کف خانه‌ها جدا و ۲ بار با بافر کلسیم شستشو داده، سپس ۱۰ میکرولیتر از Annexin v با ۱۰۰ میکرولیتر سلول مخلوط گردید. نمونه ۲۰ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شد، سپس سلول‌ها شسته و ۱۰ میکرولیتر رنگ پروپیدیوم یدید (PI) به آن اضافه گردید. نمونه مجدد ۱۰ دقیقه در تاریکی روی یخ انکوبه شد و نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتری مدل (Becton Dickinson. Facs caliber-USA) آنالیز گردیدند. در این روش، سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند فقط رنگ Annexin v را گرفتند، سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده و دیواره سلولی آنها اندکی نفوذپذیر شده بودند با دو رنگ Annexin v و رنگ PI رنگ گردیدند، و سلول‌هایی که نکروز شده بودند فقط رنگ PI را به خود گرفتند و هر کدام در plot فلوسیتومتری جداگانه قرار گرفتند و به این ترتیب دسته‌های مختلف سلولی جدا شدند (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro-wilk مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز و رسم نمودارها با نرم‌افزار Graphpad Prism نسخه ۵ انجام شد. برای بررسی نتایج آزمون‌ها و مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه One Way ANOVA استفاده شد. معنی‌داری در سطح $p\leq0.05$ بررسی شد. در صورت معنی‌دار بودن تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون توکی مقایسه میانگین انجام گرفت. تمامی اندازه‌گیری‌ها برای هر نمونه عصاره سه بار تکرار شد و مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شد.

نتایج

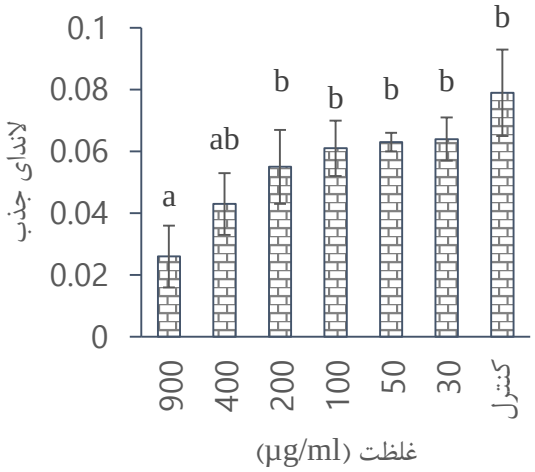
آزمون سیتوتوکسیتی عصاره‌های آلی اسفنج تتیا علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال

نتایج بررسی اثر سمیّت عصاره‌های متانولی و کلروفرمی اسفنج دریایی *Thetya* sp. روی سلول‌های سرطانی کورکتال در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است. بر اساس نمودار-۱، غلظت µg/ml ۹۰۰ اختلاف معنی‌داری با کنترل نشان می‌دهد و اثر سمیت بالایی بر سلول‌های سرطانی کولورکتال دارد ($p<۰/۰۵$) و در این غلظت

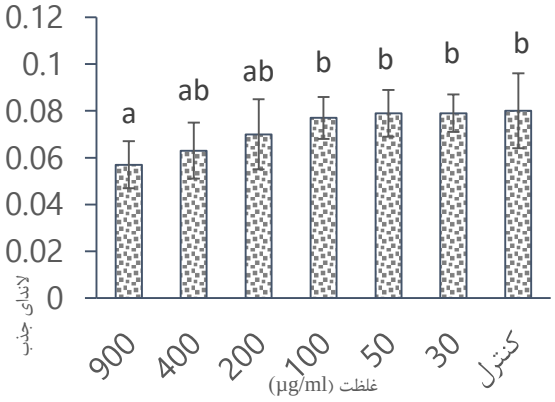
[Downloaded from jmarmed.ir on 2025-06-26]

[DOI: 10.30491/3.2.83]

میانگین زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال ۳۲/۹۲ درصد است. اما غلظت‌های µg/ml ۴۰۰ و کمتر فاقد اختلاف معنی‌دار با کنترل هستند. بر اساس نمودار-۲ عصاره کلروفرمی در غلظت µg/ml ۹۰۰ اختلاف معنی‌داری با کنترل نشان می‌دهد و اثر سمیت بر سلول‌های سرطانی کورکتال دارد ($p<۰/۰۵$) و در این غلظت میانگین زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال ۷۱/۲۵ درصد است. اما غلظت‌های کمتر فاقد اختلاف معنی‌دار با کنترل هستند. میزان IC_{50} برای عصاره‌های متانولی و کلروفرمی به ترتیب ۵۵۶/۴ و ۱۳۳۰/۹۵ µg/ml محاسبه شد. عصاره‌های هگزانی و اتیل استاتی فاقد اثر سیتوتوکسیک معنی‌دار در غلظت‌های مختلف بودند. همچنین اثر عصاره‌ها بر سلول‌های سالم Vero و J معنی‌دار نبود ($p >۰/۰۵$).



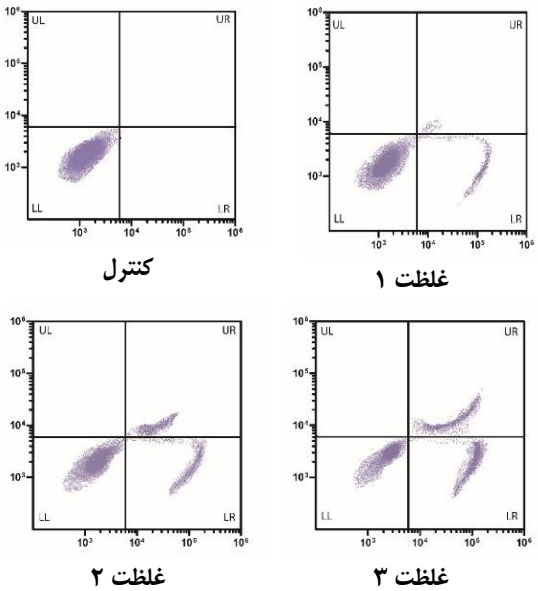
نمودار-۱. اثر سمیت سلولی عصاره متانولی اسفنج .Thetya sp علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال. حروف a، b و c اختلاف معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.



نمودار-۲. اثر سمیت سلولی عصاره کلروفرمی اسفنج Thetya sp. علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال. حروف a، b و c اختلاف معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.

بررسی اثر آپوپتوتیک و نکروتیک عصاره متانولی اسفنج دریایی

نتایج بررسی آپوپتوزیس با فلوسیتومتری سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی اسفنج تتیا به ترتیب ۷۵۶/۴ (غلظت ۳)، ۵۵۶/۴ (غلظت ۲) و ۳۵۶/۴ (غلظت ۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های سرطانی کولورکتال بود (نمودار-۳). محور افقی Annexin V-FITC و محور عمودی پروپیدیوم یدید (Annexin-PI) است. با توجه به نمودار-۳، درصد مرگ سلولی در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره متانولی اسفنج تتیا نسبت به نمونه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. بدین ترتیب که، درصد آپوپتوز گروه کنترل (نمونه سلولی بدون عصاره) صفر درصد، در غلظت ۱، آپوپتوزیس ۵ درصد و نکروزیس اولیه ۲ درصد، در غلظت ۲ آپوپتوزیس ۱۵ درصد و نکروزیس اولیه ۷ درصد و در غلظت ۳ آپوپتوزیس ۲۵ درصد و نکروزیس اولیه ۱۴ درصد را نشان دادند. در هیچ‌کدام از تیمارها نکروزیس نهایی دیده نشد.



نمودار-۳. نتایج بررسی آپوپتوزیس با فلوسایتومتری سلول‌های سرطانی کولورکتال در مواجهه با غلظت‌های ۷۵۶/۴ (غلظت ۳)، ۵۵۶/۴ (غلظت ۲) و ۳۵۶/۴ (غلظت ۱) میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی اسفنج تتیا. محور افقی (AnnexinV-FITC) و محور عمودی (Annexin-PI) است.

بحث

در مطالعه حاضر اثر سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره‌های آلی اسفنج دریایی Thetya علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال ارزیابی شد. عصاره‌های متانولی و کلروفرمی اثر سمیت سلولی و تحریک مرگ خود به خودی سلول‌های سرطانی کولورکتال را نشان دادند اما عصاره‌های هگزانی و اتیل استاتی فاقد اثر معنی‌دار

[Downloaded from jmarmed.ir on 2025-06-26]
[DOI: 10.30491/3.2.83]

بودند. اثر عصاره متانولی بیشتر از عصاره کلروفرمی بود. زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولورکتال در عصاره متانولی در غلظت ۹۰۰ µg/ml برابر ۳۲/۹۲ درصد بود. میزان IC_{50} عصاره متانولی علیه سلول‌های سرطانی کولورکتال برابر ۵۵۶/۴ µg/ml به دست آمد. عصاره کلروفرمی اسفنج تتیا با IC_{50} ۱۳۳۰/۹۵ µg/ml برای سلول‌های سرطانی کولورکتال اثر کمتری نسبت به عصاره متانولی نشان داد و درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی بیشتر بود. همچنین عصاره متانولی اسفنج با ۲۵ درصد آپوپتوزیس و ۱۴ درصد نکروزیس اولیه سلول سرطانی کولورکتال در غلظت ۷۵۶/۴ µg/ml اثر خود را نشان داد. عصاره‌های مطالعه حاضر بر سلول‌های سالم اثر معنی‌دار سیتوتوکسیک نداشتند. بر این اساس عصاره‌های تام متانولی و کلروفرمی اسفنج دریایی تتیا دارای متابولیت‌هایی هستند که خواص ضد سرطانی مشخصی از خود نشان می‌دهند و توانایی مهار سلول‌های سرطانی کولورکتال را دارند.

هرچند در بررسی متون، تحقیقی روی خواص ضد سرطان اسفنج دریایی تتیا یافت نشد، اما مطالعاتی به بررسی عصاره‌های سایر اسفنج‌های دریایی و اثر سمیت سلولی و ضد سرطانی آنها پرداخته بودند. در تحقیقی فعالیت ضد سرطان عصاره ۱۰ گونه اسفنج سواحل کشور برزیل بررسی شد. عصاره‌های آلی گونه‌های *Polymastia janeirensis*، *Haliclona tubifera*، *Mycale arcuiris* و *Raspailia sp.* در غلظت ۱۰۰ µg/ml علیه سلول سرطانی کولورکتال (HT29) خواص سمیت سلولی نشان دادند. مطالعه بیشتر روی سلول‌های سرطانی غلظت IC_{50} برای HT29 (۲۸±۴)، U373 (۳۱±۳) و NCI-H460 (۳۰±۱ µg/ml) را نشان داد (۲۰).

در مطالعه Seleghim و همکاران، عصاره متانولی ۲۱۵ گونه اسفنج دریایی در کشور برزیل مورد بررسی قرار گرفت. ۱۸٪ عصاره‌ها علیه سلول سرطانی کولون (HCT-8) و ۸٪ علیه مورین ملانوما (B16) سمیت نشان دادند (۲۱). در مطالعه Biegelmeyer و همکاران روی *Polymastia janeirensis* فراکشن اتیل استاتی با IC_{50} برابر ۷۶/۱۶ علیه سلول‌های سرطانی glioma و ۳۷/۳۳ علیه سلول‌های سرطانی نوروبلاستوما خاصیت سمی نشان دادند. این خاصیت وابسته به pH بود و در pH اسیدی خاصیت سیتوتوکسیک دیده نشد (۲۲). Ibrahim و همکاران روی اسفنج‌های دریایی *Callyspongia crassa* و *Callyspongia siphonella* کار کردند. عصاره متانولی استخراج شد. عصاره خام *C. siphonella* خاصیت ضد تومور شدیدی نشان داد. IC_{50} ۵/۵۷ µg/ml علیه سلول‌های سرطانی کولون فعالیت سیتوتوکسیک داشت (۲۳). احتمالاً در عصاره اسفنج تتیا که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفته است ترکیب یا ترکیبات ضد سرطان در مقدار کم موجود است که دوز IC_{50} بالاتری را برای القا اثر سیتوتوکسیک، آپوپتوزی و نکروزی نیاز دارد.

جداسازی و خالص‌سازی و شناسایی ترکیبات ضد سرطان از اسفنج‌های دریایی متعددی انجام شده است. در مطالعه Azcuna و همکاران روی عصاره اسفنج دریایی *Callyspongia samarensis* ۱۵ فراکشن با HPLC به دست آمد و اثر سمیت سلولی روی دو نوع سلول سرطانی MCF-7 و HCT-116 بررسی شد. فراکشن شماره ۸ سیتوتوکسیتی مشخصی علیه HCT-116 نشان داد که با زنده‌مانی کمتر از ۴۰ درصد همراه بود، اما روی سلول‌های طبیعی اثری نداشت (۱۶). در یک گزارش علمی ۳۹ ترکیب از اسفنج‌های دریایی معرفی شد که خاصیت تحریک آپوپتوز را دارند (۲۴). Renieramycins از خانواده Tetrahydroiso-quinoline است که از اسفنج دریایی متعلق به جنس *Reniera* جدا شده و آپوپتوز را از طریق مسیر وابسته به p_{53} تحریک می‌کند و ممکن است متاستاز در سلول‌های سرطانی ریه را مهار کند (۲۵). Monanchocidin یک آلکالوئید گوانیدین پلی سیکلیک است که از اسفنج دریایی *Monanchora pulchra* جدا شده و مرگ سلولی را در لوکمیای انسانی (THP-1)، سرطان سرویکال انسانی (HeLa) و سلول‌های اپیدرمال دهان (JB6 C141) القا می‌کند (۲۶). Smenospongine که یک سسکوئی ترپن Aminoquinone است از اسفنج *Smenospongia* sp. جدا شده (۲۷) و میتوز و شکل‌گیری میکروتوبول‌ها را مهار می‌کند و مرگ سلولی را در چندین سل لاین سرطانی تحریک می‌کند (۲۸). با توجه به مؤثر بودن عصاره متانولی اسفنج تتیا در مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی ترکیب/ ترکیبات موثر ضد سرطان از این عصاره توصیه می‌گردد.

Ferreira و همکاران اثر سمیت سلولی عصاره ۶ گونه اسفنج از سواحل کشور اسپانیا را علیه سلول سرطانی نوروبلاستوما BE(2)-M17 بررسی نمودند. گونه‌های *Halichondria panicea*، *Pachymatisma johnstonia*، *Ophlitaspongia seriata* و *Haliclona sp.* بیشترین اثر را نشان دادند. تغییر شکل سلول سرطانی، افزایش آپوپتوز و فعالیت نکروز ثانویه در این سلول‌ها گزارش شد (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر اثر سمیت سلولی عصاره هگزانی، اتیل استاتی و بوتانولی اسفنج دریایی علیه ۹ نوع سلول سرطانی انسانی بررسی گردید. عصاره اتیل استاتی با ۲۷٪، هگزانی با ۱۱٪ و بوتانولی با ۲٪ کارایی سمیت بالای ۷۵٪ نشان دادند. فعال‌ترین عصاره‌ها مربوط به اسفنج‌های *Petrosia sp.*، *Pericharax keteroraphis* و *Jaspis sp.* بود. در این مطالعه تجمع مواد در فاز $Sub\text{-}G_1$ تقسیم سلولی دیده شد که نشان از تحریک آپوپتوزیس سلولی داشت (۳۰). در مطالعه حاضر نیز آپوپتوزیس و به‌علاوه نکروزیس اولیه در سلول‌های سرطانی تیمار شده با دوز بالای عصاره اسفنج تتیا دیده شد. دو راه برای مرگ سلولی شناخته شده است؛ نکروز و آپوپتوز. نکروز پاسخ طبیعی سلول به صدمه‌های فیزیولوژیکی است که با برهم‌خوردگی توانایی سلول برای نگه‌داری هموستازی شروع می‌شود، با نفوذ آب و

[Downloaded from jmarmed.ir on 2025-06-26]

[DOI: 10.30491/3.2.83]

یون‌های خارج سلولی تمام اندامک‌های درون سلولی به خصوص میتوکندری متورم می‌شود و سپس با از هم پاشیدگی غشای سلولی و لیز سلولی تخریب صورت می‌گیرد و اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیم های لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها می‌شوند. بنابراین به علت پاسخ‌های التهابی، مرگ سلولی از طریق نکروز با تخریب گسترده بافتی همراه است (۳۱،۳۲). برخلاف آن در آپوپتوز که اکثراً به علت تحریک‌های داخل سلولی اتفاق می‌افتد، سلول خودکشی می‌کند. سلول آپوپتوزی مشخصات موفولوژیکی خاصی دارد که مشخص‌ترین آنها اجسام آپوپتوزی است. این اجسام شامل قسمتی از سیتوپلاسم و هسته در وزیکول‌های پلاسمایی و همچنین حاوی ریبوزوم است. این وزیکول‌ها خیلی سریع توسط فاگوسیت‌ها یا سلول‌های اپیتلیال مجاور شناسایی و هضم می‌شوند؛ بدون این که پاسخ التهابی ایجاد کنند (۲۷،۲۰). بنابراین می‌توان عنوان کرد که عصاره متانولی اسفنج تتیا می‌تواند پاسخ‌های غیرالتهابی و التهابی را در سلول‌های سرطانی کولورکتال القا نماید.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر در طی ۴۸ ساعت از بین رفتن حجم مشخصی از سلول‌های سرطانی کولورکتال، آپوپتوزیس و نکروزیس در آنها می‌تواند نشان‌دهنده تاثیر عصاره متانولی بر این سلول ها و مختل شدن روند حیات آنها باشد. لذا این عصاره دارای توانایی مناسبی برای تحقیقات پیش کلینیکی داروهای ضد سرطان است و از این رو مطالعات بیشتری نیاز است تا به تخلیص و شناسایی ترکیبات ضد سرطان موجود در عصاره اسفنج تتیا بپردازد و اثرات ضد سرطانی در غلظت‌های کمتر ترکیب تخلیص شده را بررسی نماید.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای حمایت مادی و معنوی از تحقیق حاضر در قالب پروژه پزشکی عمومی خانم دکتر سمیرا جلالی‌نژاد تقدیر و تشکر می‌نمایند.

نقش نویسندگان: جلالی‌نژاد: ارائه ایده و طرح اولیه، مطالعات آزمایشگاهی و جمع آوری داده؛ آیت‌اللهی: تحلیل و تفسیر داده ها و هدایت طرح؛ طاهری: تهیه نمونه دریایی، آنالیز آماری و نوشتن مقاله. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. World Health Organization. Cancer. 2012. Retrieved from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/.
2. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022. Availabale online at: https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures.
3. Ernst J, Kuipers WMG, Lieberman D, Seufferlein T, Joseph J, Sung PGB, vet al. Colorectal cancer. Nature Reviews Disease Primers. 2015; 1:15065. doi:10.1038/nrdp.2015.65
4. Alhurry AMAH, Rezaianzadeh A, Rahimikazerooni S, Akool MA, Bahrami F, Shahidinia SS, et al. A Review of the Incidence of Colorectal Cancer in the Middle East. Annals of Colorectal Research. 2017; 5(3-4):46292.
5. Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in Iran: a review. Archieves of Iranian Medicine. 2009; 12(2):161-169.
6. Rezaianzadeh A, Safarpour AR, Marzban M, Mohaghegh A. A systematic review over the incidence of colorectal cancer in Iran. Annals of colorectal research. 2015; 3(1). doi:10.17795/acr-25724
7. Xu L, Zhou L, Zhao J, Li J, Li X, Wang J. Fungal endophytes from Dioscorea zingiberensis rhizomes and their antibacterial activity. Letters in Applied Microbiology. 2008; 46(1):68-72. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02264.x
8. Amador ML, Jimeno J, Paz-Ares L, Cortes-Funes H, Hidalgo M. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. Annals of Oncology. 2003; 14:1607-1615. doi:10.1093/annonc/mdg443
9. Ireland CM, Copp BR, Foster MP, McDonald LA, Radisky DC, Swersey JC. Biomedical potential of marine natural products. In Atta way DH, ZaborskyOR (eds), Marine Biotechnology, 1993. Vol. 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products, Plenum Press, NY, pp. 1-43. doi:10.1007/978-1-4899-2391-2_1
10. Sipkema D, Franssen MCR, Osinga R, Tramper J, Wijffels RH. Marine Sponges as Pharmacy. Marine Biotechnology 2005; 7:142-162. doi:10.1007/s10126-004-0405-5
11. Faulkner DJ. Marine natural products. Natural Product Reports. 2002; 19:1-48. doi:10.1039/b009029h
12. Bergmann W, Feeney RJ. Contributions to the study of marine products, XXXII: the nucleosides of sponges, I. Journal of Organic Chemistry. 1951; 16: 981-987. doi:10.1021/jo50002a005doi:10.1021/jo01146a023
13. Proksch P, Edrada R, Ebel R. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. Applied Microbiology and Biotechnology. 2002; 59 (2-3):125-134. doi:10.1007/s00253-002-1006-8

[Downloaded from jmarmed.ir on 2025-06-26]
[DOI: 10.30491/3.2.83]

14. Schwartsmann G. Marine organisms and other novel natural sources of new cancer drugs. Annals of Oncology. 2000; 11(3):235-243. doi:10.1093/annonc/11.suppl_3.235
15. Shubina LK, Makarieva TN, von Amsberg G, Denisenko VA, Popov RS, Dyshlovoy SA. Monanchoxymycalin C with anticancer properties, new analogue of crambescidin 800 from the marine sponge Monanchora pulchra. Natural Product Research. 2017; 33(10): 1415-1422. doi:10.1080/14786419.2017.1419231
16. Azcuna M, Tun JO, Yap HT, Concepcion GP. Callyspongia samarensis (Porifera) extracts exhibit anticancer activity and induce bleaching in Porites cylindrica (Scleractinia). Chemistry and Ecology. 2018; 34(5):397-411. doi:10.1080/02757540.2018.1437148
17. Chairman K, Ranjit Singh AJA, Alagumuthu G. Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges. Asian Pacific Journal of Tropic Disease. 2012; 2(3):234-238. doi:10.1016/S2222-1808(12)60053-X
18. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Joutnal of Immunological Methods. 1983; 65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
19. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flowcytometry-based apoptosis detection. Methods in Molecular Biology. 2009; 559:19-32. doi:10.1007/978-1-60327-017-5_2
20. Monks NR, Lerner C, Henriques AT, Farias FM, Schapoval EES, Suyenaga ES, da Rocha AB, Schwartzmann G, Mothes B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off coast of Santa Catarina. Journal of Experiment Marine Biology and Ecology 2002; 281(1-2):1-12. doi:10.1016/S0022-0981(02)00380-5
21. Seleghim MHR, Lira SP, Kossuga MH, Batista T, Berlinck RGS, Hajdu E, et al. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007; 17(3):287-318. doi:10.1590/S0102-695X2007000300002
22. Biegelmeyer R, Schröder R, Rambo DF, Dresch RR, Carraro JLF, Mothes BB, Moreira JCF, da Frota Jounior MLC, Henriques AT. pH-dependent cytotoxic effects of extracts of the marine sponge Polymastia janeirensis on cancer cell lines. Natural Product Research. 2016; 30(23): 2734-2737. doi:10.1080/14786419.2016.1143824
23. Ibrahim HAH, El-Naggar HA, El-Damhougy KA, Bashar MAE, Abou-Senna FM. Callyspongia crassa and C. siphonella (Porifera, Callyspongiidae) as a potential source for medical bioactive substances, Aqaba Gulf Red Sea Egypt. Journal of Basic and Applied Zoology. 2017; 78(7):1-10. doi:10.1186/s41936-017-0011-5
24. Essack M, Bajic VB, Archer JA. Recently confirmed apoptosis-inducing lead compounds isolated from marine sponge of potential relevance in cancer treatment. Marine Drugs. 2011; 9(9):1580-1606. doi:10.3390/md9091580
25. Halim H, Chunhacha P, Suwanborirux K, Chanvorachote P. Anticancer and antimetastatic activities of renieramycin M, a marine tetrahydroisoquinoline alkaloid, in human non-small cell lung cancer cells. Anticancer Research. 2011; 31(1):193-201.
26. Guzii AG, Makarieva TN, Denisenko VA, Dmitrenok PS, Kuzmich AS, Dyshlovoy SA, Krasokhin VB, Stonick VA. Monanchocidin: a new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge Monanchora pulchra. Organic Letters. 2010; 12(19):4292-4295. doi:10.1021/ol101716x
27. Kong D, Yamori T, Kobayashi M, Duan H. Antiproliferative and antiangiogenic activities of smenospongine, a marine sponge sesquiterpene aminoquinone. Marine Drug. 2011; 9(2):154-161. doi:10.3390/md9020154
28. Bai R, Cichacz ZA, Herald CL, Pettit GR, Hamel E. Spongistatin l. A highly cytotoxic, sponge-derived, marine natural product that inhibits mitosis, microtubule assembly, and the binding of vinblastine to tubulin. Molecular Pharmacology. 1993; 44 (4): 757-766.
29. Ferreira M, Cabado AG, Chapela MJ, Fajardo P, Atanassova M, Garrido A, ET AL. Cytotoxic activity of extracts of marine sponges from NW Spain on a neuroblastoma cell line. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2011; 32:430-437. doi:10.1016/j.etap.2011.08.012
30. Beedessee G, Ramanjooloo A, Tiscornia I, Cresteil T, Raghothama S, Arya D, et al. Evaluation of hexane and ethyl acetate extracts of the sponge J aspis diastra collected from M auritius W aters on HeLa cells. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2014; 66(9):1317-27. doi:10.1111/jphp.12256
31. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. Pharmacology and Therapeutics. 2001; 92(1):57-70. doi:10.1016/S0163-7258(01)00159-0
32. Raveendran AT, Skaria PC. Learning and cognitive deficits in hypoxic neonatal rats intensified by BAX mediated apoptosis: protective role of glucose, oxygen and epinephrine. International Journal of Neuroscience. 2013; 123(2):80-88. doi:10.3109/00207454.2012.731457

[Downloaded from jmarmed.ir on 2025-06-26]

[DOI: 10.30491/3.2.83]