مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال دوم، شماره چهارم، پاییز و زمستان ۱۳۹۵

بررسی فیتوشیمیایی و مطالعه اثر ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی جلبك قرمز *Gracilaria Salicornia.* بر روی رده‌ی سلولی سرطان پستان MCF7 و نرمال MRC5

پردیس میرزائیان[۱]، محمد شکرزاده لموکی[۲]، فاطمه رضایی[۳]، فاطره رضایی[۴*]

چکیده

استفاده از گیاهان آبزی و جلبک‌ها به واسطه داشتن ترکیب‌های مختلف در پیشگیری و درمان بیماری‌ها از سالها پیش رایج بوده است. جلبک قرمز *Gracilaria salicornia* با داشتن ترکیبهایی با ساختار شیمیایی خاص میتواند اکسیژن تکی را دفع و جاذب رادیکالها باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر کشندگی عصاره و فراکشن‌های این جلبک بر رده سلولی سرطان پستان(MCF7) و نرمال فیبروبلاست ریه جنین (MRC5) با استفاده از روش MTT و بررسی ترکیبات موجود در آن توسط GC-Mass میباشد. جلبک از سواحل چابهار برداشت و جهت تهیه عصاره هیدروالکلی به روش سوکسله و سه فرکشن هگزان، کلروفرم و اتیل استات آماده شد. ۵ غلظت از عصاره بر سلولها طی ۴۸ ساعت اثر داده و نتایج بررسی گردید. عصاره هیدروالکلی جهت سنجش ترکیبات ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی موجود در آن توسط GC-Mass ارزیابی شد. برای تعیین IC_{50} از نرم افزار Prism استفاده و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از روش ANOVA و به دنبال آن تست Tukey برای مقایسه‌ی داده‌ها انجام شد. غلظتهای مختلف عصاره اتانولی و فراکشن‌ها به شکل چشمگیری رشد سلولهای MCF7 و MRC5 را در مقایسه با گروه کنترل پس از ۴۸ ساعت کاهش داد($P<0.05$). IC_{50} عصاره تام و فرکشن‌های اتیل استاتی، کلروفرمی و هگزانی برای MCF7 به ترتیب ۵۲۸، ۱۹۲، ۱۰۷ و ۲۷۲ و برای MRC5 به ترتیب ۸۷۹، ۲۰۵، ۱۸۵و ۳۶۶ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. این جلبک می تواند به عنوان یك عامل شیمیایی و جلوگیرنده قوی رشد سلولهای سرطانی مطرح و مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: GC-Mass , *Gracilaria salicornia* , IC_{50}, MCF7,MRC5

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران.

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات علوم و دارویي، گروه سم شناسي/ فارماکولوژي، دانشکده داروسازي، دانشگاه علوم پزشکي مازندران، ساري، ایران.

۳- مربی، گروه پرستاری، دانشکده پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران.

۴*- استادیار، گروه زیست، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران. faterehrezaei62@gmail.com

مقدمه

امروزه انواع سرطان‌ها در سراسر جهان، عامل بخش زیادی از مرگ و میرها می‌باشند. روش‌های درمان متفاوتی برای سرطان‌ها وجود دارد که می توان به جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی، ایمونوتراپی و ... اشاره داشت. غیر از روش‌های رایج ذکر شده امروزه استفاده از مواد طبیعی در درمان سرطان نسبت به مواد شیمیایی از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار می باشد، زیرا گیاهان داروئی طبیعی بوده و اثرات جانبی کمتری دارد (با این حال، بسیاری از گیاهان به ویژه در مقادیر بالا و با استفاده مکرر می‌توانند اثرات سمی داشته باشند (Mahady, 2001 ; Tavakoli et al., 2012). اما هنوز تاثیر مثبت بسیاری ازمواد طبیعی مثل جلبک‌ها به صورت علمی مورد بررسی قرار نگرفته است. جلبک‌ها از منابع عظیم دریائی هستند که مورد توجه بسیاری از صنایع داروئی و درمانی جهت تولید محصولات آینده با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی، آنتی اکسیدانی و ... قرارگرفته اند.

جلبک‌های دریایی برای بیماری‌هایی مانند اسهال خونی، فشار خون بالا، عفونت دستگاه ادراری، عفونت های میکروبی و... مفید هستند و همچنین آن‌ها به عنوان یک داروی گیاهی برای درمان سرفه، آسم، هموروئید، جوش، گواتر، بیماری های معده ، کاهش بروز تومور، زخم معده و سردرد استفاده می‌شوند(Kandale et al., 2011). ترکیبات آنتی اکسیدانی که در جلبک‌ها وجود دارد نقش مهمی را در برابر بیماری‌های مختلف مانند تصلب شرایین، التهاب مزمن، اختلالات قلبی و عروقی، سرطان و فرایند پیری بازی می‌کنند. در سال ۲۰۰۲ هارادا و یاماشیتو متوجه فعالیت ضد توموری پالمتیک اسید استخراج شده از جلبک قرمز به عنوان ماده سیتوتوکسیک انتخابی در درمان سلول های لوکمی انسان (MOLT- 4) شدند که سبب آپاپتوز این سلول‌ها می‌شود. همچنین جلبک‌ها به واسطه داشتن ترکیب‌هایی نظیر کاروتنوئیدها مخصوصاً بتا-کاروتن، رتینال، آپوکاروتنوئیدها، کتون‌ها، آلدهیدها و اپوکسیدها و محتوی کلروفیل، فنل آزاد و همچنین اسید چرب با ساختار شیمیایی خاص می توانند اکسیژن تکی را دفع کنند و جاذب رادیکال‌ها باشند و خاصیت سایتوتوکسیسیته داشته باشند. همچنین از ترکیب‌های مهم درون سلولی جلبک‌ها می‌توان به گلیسرول، پروتئین و ویتامین‌ها اشاره نمود. بخش عمده این ترکیب‌ها دارای خاصیت ضداکسیدانی و ضدسرطانی می‌باشند (Gibbs & Gomez et al., El-Baz et al., 2002 ; Duffus, 1976 Goldbohm, 1995 ; 2003; Raja et al, 2007 ; Kohen and Nyska, 2002 ; Poppel and). حدود ۵۰۰ گونه جلبک خوراکی بعنوان منبع غذائی شناخته شده است و ۱۶۰ گونه از آن ها مصارف تجاری مهمی دارند (Clinton, 1998). این مطالعه به صورت in vitro انجام شده و هدف آن بررسی اثر ضد سرطانی گونه‌ای از جلبک قرمز به نام *گراسیلاریا سالیکورنیا* (*Gracilaria salicornia*) از خانواده Florideophyceae می باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری جلبک و عصاره گیری

جلبك پس از بررسی و شناسایی براساس کلید شناسایی (Borowitzka & Siva, 2007) از سواحل چابهار جمع آوری شد و در دمای ۴۰ درجه‌ی محیط به مدت ۵ روز خشک و توسط آسیاب برقی پودر شد. ۱۰۰ گرم از نمونه‌ی خشک شده به روش سوکسله با حلال آب-اتانول به نسبت ۸۰:۲۰ عصاره گیری گردید. سپس عصاره توسط دستگاه روتاری اواپوراتور(Heidolph WB2000) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تغلیظ شد و عصاره حاصل توسط فریز درایر خشك و به صورت پودر تهیه شد و بر اساس وزن خشك استاندارد شد(بازده حدود ۷/۵ گرم بدست آمد). در لوله فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری، مقدار۲۰ میلی گرم از عصاره تام، فراکشن هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی را وزن کرده سپس ۱۰ میلی‌لیتر استون ۷۰% (آب ۳۰: استون۷۰) به هر یک افزوده گردید. پس از پیپتاژ کردن، فالکون‌ها با دور ۳۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. عصاره بدست آمده در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد و در

تاریکی نگهداری شد (Hosseini and Shariati, 2009 ; Tafreshi et al., 2008). عصاره در DMSO حل شده و سپس غلظت‌های مختلف (۰, ۱۰,۵۰,۱۰۰,۲۰۰) میکروگرم در میلی لیترتهیه شد (غلظت صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد) (غلظت DMSO در محیط کشت جهت جلوگیری از سمیت حلال ۰/۱ درصد در نظر گرفته شده و نمونه کنترل سلو ل های انکوبه شده با DMSO ۰/۱ درصد می باشد)(Rezaei et al., 2014).

ب) کشت سلولی

رده سلولی سرطانیMCF7 و MRC5 از انستیتو پاستور تهیه گردید. RPMI- 1640 غنی شده با سرم جنین گاوی ۱۰% و محلول پنیسیلین- استرپتومایسین ۱% به منظور فراهم کردن محیط مناسب برای رشد بهینه سلول‌ها انتخاب و استفاده گردید. سلول‌ها تحت شرایط کنترل شده دما (۳۷ درجه سانتی گراد) و اتمسفر مرطوب حاوی CO2 ۵% کشت داده شد (Sheu Rezaei et al, 2014; *et al*, 2008). در زمان برداشت سلولی، بعد از تخلیه محیط کشت، سلول‌ها تریپسینه و پس از انکوباسیون در دمای۳۷ درجه سانتی گراد (حدود ۳ تا ۵ دقیقه) ازکف فلاسك جدا شدند و با استفاده از بافر فسفات سالین، سه بار در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در دور rpm ۲۵۰۰ مورد شستشو قرار گرفتند رسوب سلولی در یك میلی لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسیتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست استفاده شد Shokrzadeh (Rezaei et al, 2014 et al, 2013;).

ج) سنجش میزان سمیت سلولی (آزمون MTT)

در این آزمون مبنای سنجش براساس معرض گذاری عصاره با غلظت‌های مختلف در مجاورت رده سلولی و سنجش تعداد سلول‌های مرده می‌باشد. بدین منظور از ماده مؤثره زرد رنگ تترازولیوم و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان در روش MTT استفاده شد (Sheu et al., 2008; Rezaei et al.,2014). بر اساس این آزمون، در هر یك از چاهك‌های یك پلیت ۹۶ خانه ای ۲۰۰میکرولیتر محیط کشت حاوی 10^5 سلول انتقال و کشت داده شد. پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، محیط کشت با محیط کشت جدید جایگزین می‌شود. عصاره جلبک در ۴ غلظت مختلف برای هر غلظت ۳ بار تکرار گذاشته شده و غلظت صفر هم به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته می‌شود. بعد از گذشت زمان مورد نظر به هر چاهك ۲۵ میکرولیتر از محلول ذخیره‌ی MTT با غلظت ۴ میکروگرم بر میلی لیتر افزوده و پس از گذشت زمان سه ساعت، با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) میزان محصول فورمازان تولید شده توسط دستگاه (Elisa Reader Anthos 2020) در طول موج ۴۹۰ نانومتر و طول موج رفرانس ۶۳۰ شدت جذب اندازه گیری شد (Sheu *et al*, 2008) و کلیه آزمایش نیز دو بار تکرار گردید. توان زیستی سلول های تیمار شده با عصاره جلبک قرمز به شکل نسبت درصد جذب نوری فورمازان تولیدی در نمونه در قیاس با میزان جذب نوری فورمازان تولیدی در شاهد منفی (سلول های بدون تیمار دارویی) تعیین و در یك منحنی دوبعدی (درصد توان زیستی یا بقاء سلول ها در مقابل غلظت عصاره) نشان داده شد با استفاده از این منحنی می توان IC_{50} را برای جلبک در غلظت‌های مختلف محاسبه و تعیین نمود. برای محاسبه درصد مرگ سلول‌ها از فرمول زیر استفاده گردید

میانگین / میانگین جذب تست = میر و مرگ درصد
۱۰۰× جذب کنترل منفی

اعداد IC_{50} مبنای مطالعات آماری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS 16 انجام شد. مقدار P کمتر از 0/05 برای تعیین سطح معنادار بودن بین گروه‌ها در نظر گرفته شد(Rezaei et al.,2014).

د) آنالیز عصاره توسط GC-Mass

۰/۱ گرم از عصاره اتانولی جلبك برای سنجش میزان ترکیبات ضد سرطانی در ۱ سی سی اسید نیتریک حل گردید تا شفاف شود. مقداری منیزیوم سولفات نیز برای جذب آب اضافه کردیم. پس از خالص سازی و عبور از SPE و فیلتر سلولزی ۰/۴۵ میکرونی, به مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه GC-Mass تزریق شد. برنامه دمایی ستون به این نحو که دمای ابتدایی آون ۷۰ درجه سانتیگراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی۱۰ درجه سانتی گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۰۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه ، افزایش دما تا ۲۸۰ درجه سانتیگراد و ۵ دقیقه توقف در این دما تنظیم گردید. دمای اتاقك تزریق ۲۴۰ درجه سانتیگراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید.

نتایج

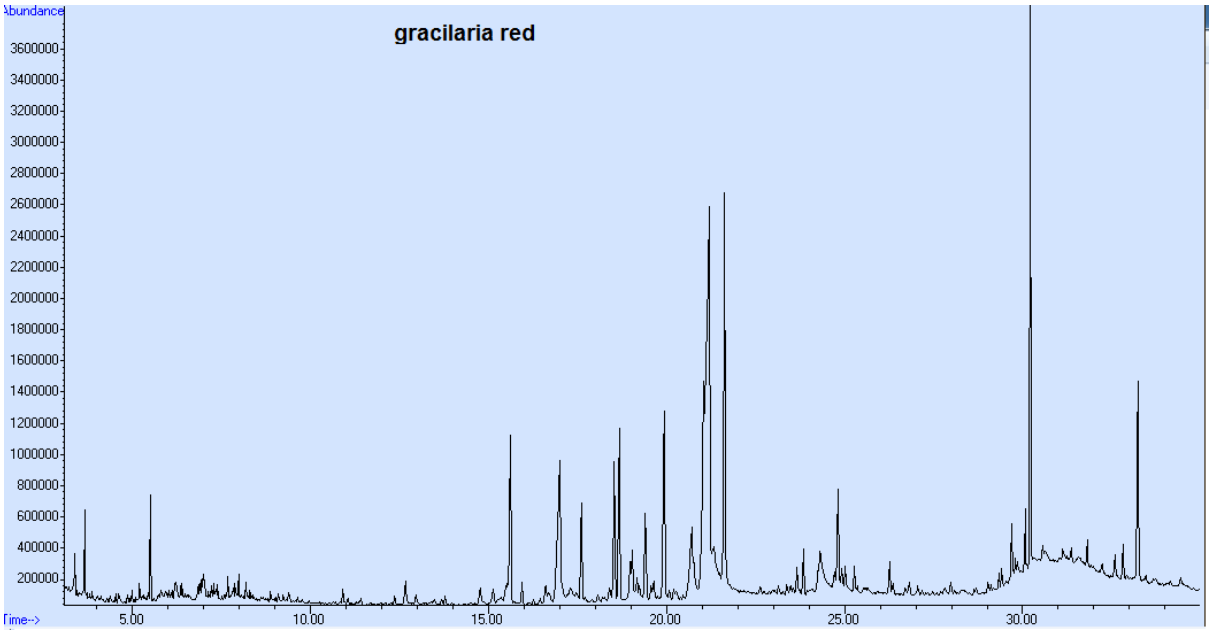
فعالیت ضدسرطانی عصاره تام و فراکشن‌های اتیل استات، کلروفرم و هگزانی جلبک گراسیلاریا سالیکورنیا در غلظت‌های (۰, ۱۰,۵۰,۱۰۰,۲۰۰) میکروگرم در میلی لیتر در برابر خطوط سرطانی پستان و نرمال مورد آزمایش قرار گرفت. مقادیر IC_{50} مربوط به هر یک از عصاره‌ها پس از ۴۸ ساعت در جدول شماره ۱ آورده شده است. مقایسه IC_{50} عصاره‌ها نشان داد که تفاوت معنی داری بین تمامی داده‌ها وجود دارد($P<0/05$).

جدول ۱- مقادیر IC_{50} مربوط به عصاره تام و فراکشن‌های جلبک قرمز(*G. salicornia* L.) و داروی سیس پلاتین بر روی رده‌های سلولی MCF- 7 و MRC-5 در زمان مورد آزمایش (۴۸ ساعت).

Cell line	Time	Total extrc.	Ethylacetate frc.	Chloroform frc.	Hexan frc.	Cisplatin
		IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}
		Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
MCF- 7	48 h	528.64 ± 9.4	192.89 ± 7. 1	107.06 ± 3.6	272.43± 10.1	99.00± 4.7
MRC-5	48 h	879.75 ± 12.6	205.84 ± 6.4	185.23 ± 2.7	366.74 ± 8.6	115.336 ± 4.1

a µg/ml,
*p<0.05,
MCF7: breast adenocarcinoma

در تحقیق حاضر مشخص گردید علاوه بر این که با افزایش غلظت عصاره میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی MCF7 و MRC5 افزایش می‌یابد، به ترتیب فراکشن اتیل استات، کلروفرم و هگزان اثر قویتری نسبت به عصاره تام دارند. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی جلبك گراسیلاریا می تواند به عنوان یك عامل جلوگیری کننده در برابر سرطان پستان باشد. همچنین براساس اندازه گیری سطح زیر منحنی بدست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره اتانولی جلبک، مقدار ترکیبات ضد سرطانی در ۱ گرم از عصاره بدست آمد که در جدول ۱ مشاهده می‌شود. در این سنجش ترکیبات ضد سرطانی با درصد های بالای ۹۰% در جلبک یافت شد (Archana et al., 2014 ; Usha and Maria Victorial Rani, 2015; Mandlik Rahul et al., 2014; Gopinath et al., 2013; Bambang et al., 2013). در شکل شماره ۱ بلانک‌های بدست امده از نرم افزار حاصل از GC-Mass را مشاهده می‌کنید.



شکل۱- بلانک‌های بدست آمده حاصل از GC-Mass جلبک *Gracilaria Salicornia*

جدول۲- ترکیبات بدست آمده از عصاره اتانولی جلبک قرمز گراسیلاریا سالیکورنیا

Chemical constituents	RT	Peak Area%	MW	MF
Silane, diethoxydimethyl	3.39	0.75	148	$C_6H_{16}O_2Si$
Cyclotetrasiloxane, octamethyl	5.20	0.35	296	$[Si(CH_3)O]_4$
Benzyl chloride	5.51	1.18	126	C_7H_7CL
Benzoic acid	7.00	0.28	122	$C_7H_6O_2$
Nonanoic acid	7.98	0.31	158	$C_9H_{18}O_2$
Dodecanoic acid	12.67	0.61	200	$C_{12}H_{24}O_2$
Heptadecane	15.60	3.89	240	$C_{17}H_{36}$
Dodecane, 2-methyl-6-propyl	15.62	3.89	226	$C_{16}H_{34}$
Pentadecanal	15.94	0.48	226	$C_{15}H_{30}O$
Hexadecanal	15.94	0.48	240	$C_{16}H_{32}O$
Tetradecanal	15.94	0.48	212	$C_{14}H_{28}O$
Tetradecanoic acid	17.01	6.87	228	$C_{14}H_{28}O$
Tetradecanoic acid, ethyl ester	17.61	1.95	256	$C_{16}H_{32}O_2$
2-Pentadecanone,6,10,14 trimethyl	18.67	3.52	268	$C_{18}H_{36}O$
Pentadecanoic acid	18.98	0.98	242	$C_{15}H_{30}O_2$
n-Hexadecanoic acid	20.71	19.81	256	$C_{16}H_{32}O_2$
Dibutyl phthalate	21.04	6.93	278	$C_{16}H_{22}O_4$
Hexadecanoic acid, ethyl ester	21.63	8.34	248	$C_{18}H_{36}O_2$
Octadecanoic acid	24.31	3.35	284	$C_{18}H_{36}O_2$
9-Octadecanoic acid, (E)	24.31	3.35	282	$C_{18}H_{34}O_2$
Oleic Acid	24.31	3.35	282	$C_{18}H_{34}O_2$
(Z)9-Octadecanoic acid methyl ester	24.82	2.40	296	$C_{19}H_{36}O_2$
1-Heptacosanol	29.79	0.31	412	$C_{27}H_{56}O_2$
Pentacosane	29.79	0.31	352	$C_{25}H_{52}$
Bis(2-ethylheyl) phthalate	30.21	6.96	390	$C_{24}H_{38}O_4$
Phthalic acid, di(2-propylpentyl) ester	30.21	6.96	390	$C_{24}H_{38}O_4$
Diisooctyl phthalate	30.21	6.96	390	$C_{24}H_{38}O_4$
1,4-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	31.80	0.39	390	$C_{24}H_{38}O_4$
Squalene	32.59	0.46	410	$C_{30}H_{50}$

بحث

یک استراتژی برای پیشگیری از ایجاد سرطان پستان جستجو برای یافتن ترکیبات خوراکی است که منجر به مرگ سلو ل‌ها ی سرطانی شده پستان شوند. جلبک‌ها از نظر تغذیه ای جزو غذاهای عملکردی بوده و بارزترین تاثیر پزشکی جلبک‌ها و متابولیت‌های آن ها که توجه عموم را به خود جلب کرده است، تاثیر ضد توموری آن‌ها می‌باشد. خواص دارویی ترکیب‌های موجود در جلبک‌ها مخصوصاً بتا-کاروتن در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. در طی سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای استخراج ترکیب‌های طبیعی از جلبک‌ها به عنوان 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 Tafreshi and Shariati, 2009).

در این مطالعه نیز باتوجه به این که تاکنون اثر ضد سرطانی جلبک گراسیلاریا سالیکورنیا گزارش نشده است، فعالیت ضد سرطانی عصاره تام و فراکشن‌های این جلبک که از سواحل چابهار جمع آوری شده بود، بر روی سلول سرطانی MCF7 و نورمال MRC5 با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه ما نشان داد که فراکشن اتیل استاتی

دارای اثر آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر فراکشن‌ها بوده که این به علت قطبی بودن غالب ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌باشد از طرف دیگر ترکیبات قابل حل در هگزان اثر آنتی اکسیدانی بالایی ندارند مگر در مواردی که این ترکیبات فنلی باشند. همچنین نتایج نشان دهنده اثر نسبی مهارکنندگی رشد عصاره‌ها بر رده سرطانی نسبت به رده نرمال بوده است. این امر می‌تواند ناشی از توانایی این سلول‌ها در خارج نمودن داروها و عصاره مورد نظر از سلولها دانست. هم چنین روش‌ها یا سرعت مقابله سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی در مواجه با ترکیبات مختلف بدین ترتیب است که سلول‌های نرمال مسیرهای مقابله با خصوصیات سمی ترکیبات را که منجر به مهار رشد می‌شود، با سرعت بیش تری راه اندازی می‌نمایند به عنوان مثال، ترکیبات آنتی اکسیدانی داخل سلولی از قبیل گلوتاتیون در مواجه با ترکیبات سمی سبب حذف ترکیبات اکسیداتیو قوی می گردد (Rezaei et al,2014). از آن جا که مطالعه بر روی روش های مختلف درمان سرطان یکی از مهم‌ترین اهداف پزشکی در عصر حاضر به حساب می آید، لذا جهت یافتن روش‌های درمانی و اثربخش، تلاش‌های گسترده‌ای آغاز شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی اثرات ضدسرطانی ترکیبات گیاهی در شرایط آزمایشگاهی با روش سنجش MTT اشاره کرد. هرچند این روش، یک روش پرکاربرد در آزمایشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی مختلف است، اما خود نیز دارای معایبی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به این حقیقت اشاره نمود که این روش بر پایه فعالیت سلول‌های زنده استوار می‌باشد و با استفاده از نتایج این تست تشخیصی نمی‌توان در مورد کاهش تعداد سلول‌ها با قاطعیت کامل قضاوت نمود زیرا اگر ماده‌ای سبب تغییر در تعداد میتوکندری‌های سلول شود اثر آن توسط این تست مشابه تغییر تعداد سلول‌های زنده تفسیر می‌شود. از طرفی برای استفاده بالینی ترکیبات گیاهی نیاز به انجام تست‌های دقیق تر بوده لذا بررسی فیتوشیمیایی اجزای عصاره پیشنهاد می‌شود. بدین منظور عصاره اتانولی این جلبک با GC-Mass آنالیز گردید که وجود بتا-کاروتن و کاروتنوییدهای دیگر ازجمله آلفا-کاروتن لیکوپن، لوتئین، گزانتین و کریپتوزانتین در این عصاره محرز شده است. ساختار شیمیایی این کاروتنوئیدها به گونه ایست که می توانند دفع کننده رادیکال‌های آزاد باشند و همچنین با همکاری با همدیگر اثر محافظت کننده مفیدی در برابر تخریب اکسیداتیو نشان می‌دهند (Challem, 1997 ؛Stryker et al., 1990; Sheu et al., 2008) و از پدیده سرطان زایی 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، پروستات در بدن موش شده است (Murthy et al, 2005 ; Buiatti, 1997 ; Poppel and Goldbohm, 1995).

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کارکنان آزمایشگاه‌های دانشکده داروسازی دانشگاه پیامبر اعظم ساری که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند.

منابع

Bambang, B.S., Kumalaningsih , S., Susinggih, W.,Hardoko .(2013). Polyphenol Content and Antioxidant Activities of Crude Extract from Brown Algae by Various Solvents. Journal of Life Science and Biomedicine, 3(6): 439-443.

Borowitzka, M.A., 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

Clinton, J. Dawes.,(1998). Human affairsand marine plants, book. page 113. Macroalgae.

El-Baz, F.K., Abul-Enein, A.M., EI-Baroty, G.M., Youssef, A.M., 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., Robledo, D. (2007). Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. BioresourceTechnology, 98(7): 1359-1365

Gibbs, N., 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., Gonzalez, M.A. (2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina*.

Gopinath, S., Sakthidevi, G., Muthukumaraswamy, S., Mohan, V.R. (2013). GC-Mass analysis of bioactive constituents of *hypericum mysorense* (Hypericaceae). Journal of current chemical & pharmaceutical Siences, 3(1): 6-15.

Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology, 107(1): 14-35.

Ismail, M., Bagalkotkar, G., Iqbal, S., Adamu, H.A. (2012). Anticancer Properties and Phenolic Contents of Sequentially Prepared Extracts from Different Parts of Selected Medicinal Plants Indigenous to Malaysia. Molecules, (17): 5745-5756.

Kandale, A., Meena, M.M., Rao, P., Panda Mangal, A.K., Reddy, G., Ramesh Babu. (2011). Marine algae: An Introduction, Food value and Medicinal uses. Journal of Pharmacy Research, 4(1). 123-127.

Kohen, R., Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. Toxicol Pathol, 30. 620-650.

Mahady, G. (2001). global harmonisation of herbal health claims. Journal of Nutrition, 131(3): 1120-1123.

Mandlik, R., Naik, S., Tatiya, A., Maseeh, A., Ghayal, N., Biware, M.V. (2014). GC-MS Analysis of Phytocomponents of Seaweed, *Caulerpa racemosa*. International Journal of Pharma Research & Review, 3(11):39-45.

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.

Murthy, K.N.C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M.M., Sowmya, P.R., Ravishankar, G.A. (2005). Invivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*-a green microalga. Life Sciences, 76(12): 1381-1390.

Pal, A., Kamthania, M.C., Kumar, A.(2014). Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds—A Review. Open Access Library Journal.

Poppel, G.V., Goldbohm, R.A. (1995). Epidemiologic evidence for beta-caroten and cancer prevention. American Journal of Clinical Nutrition, 62: 1393-1402

Raja, R., Hemaiswarya, S., Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(3): 517-523.

Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D., Rengasamy, R. (2007). PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. Microbiological Research, 162(2): 168-176 .

Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. , Rengasamy, R. (2007). Protective effect of

Shokrzadeh, M., Parvaresh, A. , Shahani, S., Habibi, O., Zalzar, Z. (2013). Cytotoxic Effects of *Lagenaria siceraria* Standl. Extract on Cancer Cell Line. J Mazandaran Univ Med Sci , 23(97): 225-230.

Stryker, W.S., Stampfer, M.J., Stein, E.A., Kaplan, L., Louis, T.A., Sober A., Wellett, W.C.(1990). Diet, plasma levels of beta-carotene and alphatocopherol, and risk of malignant melanoma. American Journal of Epidemiology, 131(4): 597- 611.

Tavakoli, J., Miar, S., Zadehzare, M.M., Akbari, H. (2012). Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care. A Review Study; Iran J Cancer Prev , 5(3): 144-156 .

Usha, R., Maria Victorial Rani, S. (2015). Gas chromatography and mass spectrometric analysis of *Padina pavonia* (L.) Lamour. Bioscience Discovery, 6(1):01-05.

Yeh, Y., Chen, Y.H. (2012). from knowledge sharing to knowledge creation :A blended knowledge-management model for improving university students creativity.thinking skills and creativity, 7(3). 245-247.

Dunaliella salina (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on Wistar rats. Microbiological Research, 162(2): 177-184.

Rezaei F, shokrzadeh M, Majd A, Nezhadsattari T. Cytotoxic activity of Ripe and Unripe cornellian cherry (cornus MasL.) Fruits. emergencias2014; 3: 98 -104.

Rezaei F, shokrzadeh M, Majd A, Nezhadsattari T. Cytotoxic Effect of Hydroalcoholic Extract of Cornus mas L.fruit on MCF7, HepG2 and CHO cell line by MTTAssay. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(113);130-138.

Salimi, M., Majd, A., Sepahdar, Z., Azadmanesh, K., Irian, S., Ardestaniyan, M.H.(2012)Cytotoxicity effects of various *Juglans regi*a (walnut) leaf extracts in human cancer cell lines. Pharmaceutical Biology, 50(11): 1416-1422.

Sheu, M.J., Huang, G.J., Wu, C.H., Chen, J.S., Chang, H.Y., Chang, S.J., 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.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 2, No 4, Autumn & Winter 2016

Phytochemical analysis and anti-cancer effect of fractions and hydro-alcoholic extracts of red Algae(*Gracilaria salicornia*) on the MCF7 and MRC5 cell line

Pardis Mirzaeyan[1], Mohammad Shokrzadeh lamouki[2], Fatemeh Rezaei[3], Fatereh Rezaei[4*]

Abstract

The use of Algae was common for a long time for prevention and treatment of diseases through their various combinations. Red Algae (*Gracilaria salicornia*) has some combinations with specific chemical structures, so it can dispose singlet oxygen and absorb radicals. The objective of this study is to show the lethal effects of *Gracilaria salicornia* extract on breast cancer (MCF 7) and the human lung fibroblast cell line (MRC5) using the MTT method and study of compounds by GC MASS. Algae was harvested from Chabahar coast and it was prepared for hydro-alcoholic extract based on Soxhlet method and three fractions of hexane, chloroform and ethyl acetate . The five concentrations of extracts were effected and the results were evaluated. Grasilaria hydro-alcoholic extract was used to assess its anti-cancer compounds and antioxidant effects by GC-Mass. Statistical analysis was performed using prism. The statistical significance of difference analyzed by one-way ANOVA/Tukey test. Result was considered significant at $P< 0.05$.

The results showed that different concentrations of ethanolic extract and fractions significantly reduced the growth of MCF7 and MRC5 cell lines compared to the control group after 48 hours ($P<0.05$). The IC50 results was determined in MCF7 for total extract, fractions of ethyl acetate, chloroform and hexane it was respectively equal to 528, 192, 107, and 272 µg/ml and for MRC5 in order 879,205,185 and 366 µg/ml. Based on the results, the Algae can be considered as a strong chemical agent and suitable growth deterrent for this cell line.

Key words: GC-Mass , *Gracilaria salicornia* , IC_{50}, MCF7, MRC5.

1. MSc. graduate student, Department of Biology, Faculty of Science, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

2.Associate Professor, Pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

3.Department of Nursing, Faculty of Nursing , Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

4*.Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. faterehrezaei62@gmail.com, 09112112963.