15(1) 273-278, Spring 2023

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Anticancer effects of coral extract of *Sinularia compressa* on human gastric adenocarcinoma cell line (AGS)

Azam Zohrevand [1], Mozhgan Emtyazjoo [1], Mahnaz sadat sadeghi [1*], Hossein Hejazi [2]

[1] Department of Marine Sciences and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Key Words

AGS cell line
S. compressa coral
Bioactive compounds
Marine aquatics
Gastric cancer

Abstract

Introduction: In recent decades, extensive studies have been conducted on the effectiveness of marine aquatic extracts in the treatment of diseases including cancer. Based on the results of various experiments in Southeast Asian countries such as Thailand and Japan on the effect of the extract on the treatment of various diseases, this study is an attempt to investigate the effect of coral extract of *Sinularia compressa* on human gastric adenocarcinoma (AGS) cells.

Materials & Methods: Different concentrations of coral extract 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µg/ml were extracted. The AGS cell line was then transferred to the laboratory under sterile conditions. This cell line was cultured in "DMEM f12" medium. The cultured cells were then transferred to plate 96 of the well. The cells were incubated at three different times 18, 24, 48 hours. Then, using MTT and flow cytometers, the effectiveness of the extract on AGS cells was measured.

Results: Based on the results, it was found that at concentrations above 15 µg/mg, the cells were isolated from the surface of the plate and suspended in the medium. According to the results of the MTT method at a concentration of 10 µg/ml, more than 84% of the cells were destroyed. Based on the findings, the time factor did not show a significant effect on the results. Factor LC50 showed 50% cell death at a concentration of 7.5 µg/ml *Sinularia* coral extract. Due to the high effect of this extract on cancer cell death, the lowest concentration was tested in flow cytometry. The results of this experiment showed that cell death of 43% of cells occurred at a concentration of 5 µg / ml of coral extract, which was consistent with the results of MTT test at this concentration. Cell shape changes were also examined. Based on morphological observations, the affected cells became smaller and lost their epithelial shape.

Conclusion: *S. compressa* coral extract showed a great effect on AGS cell mortality. These findings confirm that the potential of using bioactive compounds extracted from marine aquatic animals to control cancer is very significant and can be considered as an alternative to chemical treatments and high side effects.

* Corresponding Author's email: mahnaz.sadeghi55@gmail.com
Received: 23 December 2021; Reviewed: 21 January 2022; Revised: 22 March 2022; Accepted: 24 April 2022
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.338193.2789

مقاله پژوهشی

اثرات ضد سرطانی عصاره مرجان گونه *Sinularia compressa* روی رده سلولی آدنوکارسینومای (AGS) معده انسان

اعظم زهروند[1]، مژگان امتیازجو[1]، مهنازسادات صادقی[1*]، حسین حجازی[2]

[1] گروه علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[2] مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

کلمات کلیدی

رده سلولی AGS
مرجان *S.compressa*
ترکیبات زیست فعال
آبزیان دریایی
سرطان معده

چکیده

هدف: در دهه‌های اخیر، مطالعات گسترده‌ای در مورد تأثیر عصاره‌های آبزیان دریایی در درمان بیماری‌ها ازجمله سرطان انجام‌شده است. با توجه به نتایج آزمایشات مختلف در کشورهای آسیای جنوب‌شرقی مانند تایلند و ژاپن، در مورد تأثیر عصاره بر درمان بیماری‌های مختلف، این مطالعه تلاشی برای بررسی تأثیر عصاره مرجان گونه *Sinularia compressa* بر سلول‌های آدنوکارسینومای معده انسان است (AGS) که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است.

مواد و روش‌ها: غلظت‌های مختلف عصاره مرجان ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استحصال گردید. سپس رده سلولی AGS در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد. این رده سلولی در محیط کشت "DMEM f12" کشت داده شد. در ادامه سلول‌های کشت داده شده به صفحه ۹۶ چاهک منتقل شدند. سلول‌ها در سه زمان مختلف ۱۸، ۲۴، ۴۸ ساعت انکوبه شدند. در ادامه با استفاده از دو آزمون MTT و فلوسایتومتر، اثر بخشی عصاره بر روی سلول‌های رده AGS اندازه‌گیری شد.

نتایج: براساس نتایج مشخص گردید که در غلظت‌های بالاتر از ۱۵ میکروگرم بر میلی‌گرم، سلول‌ها از سطح صفحه جدا شده و در محیط معلق شدند. با توجه به نتایج حاصل از روش MTT در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیش از ۸۴ درصد سلول‌ها از بین رفتند. بر اساس یافته‌ها عامل زمان بر نتایج تأثیر معنی‌داری نشان نداد. فاکتور LC50 مرگ سلولی ۵۰ درصد را در غلظت ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مرجان سینولاریا نشان داد. با توجه به تاثیر زیاد این عصاره بر مرگ سلول‌های سرطانی، کم‌ترین غلظت در فلوسیتومتری مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که مرگ سلولی ۴۳ درصد از سلول‌ها در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مرجان اتفاق افتاد که با نتایج آزمون MTT در این غلظت هم‌خوانی داشت. هم‌چنین تغییرات شکل سلولی نیز مورد بررسی قرار گرفت. براساس مشاهدات مورفولوژیکی، سلول‌های تحت تاثیر قرار گرفته، کوچک‌تر شده و شکل اپیتلیال خود را از دست دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره مرجان *S. compressa* تأثیر زیادی بر مرگ و میر سلول‌های AGS نشان داد. این یافته‌ها موید آن است که ظرفیت‌های استفاده از ترکیبات زیست فعال استخراج شده از آبزیان دریایی برای کنترل بیماری‌های سرطانی بسیار قابل توجه است و می‌تواند به‌عنوان جایگزین درمان‌های شیمیایی و پر عوارض در نظر گرفته شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mahnaz.sadeghi55@gmail.com

تاریخ دریافت: ۲ دی ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۱ بهمن ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲ فروردین ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: ٤ اردیبهشت ۱۴۰۱
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.338193.2789

مقدمه

آبزیان دریایی در طی دو ده اخیر بسیار مورد توجه محققین و زیست‌شناسان فعال در زمینه مطالعه و استخراج ترکیبات زیست فعال قرار گرفته است. این موجودات به‌علت ویژگی‌های زیستگاهی خود و زندگی در محیط دریایی نسبت به سایر آبزیان توانایی بیش‌تری در تولید ترکیبات زیست‌فعال دارند. موجودات دریایی برای تحقیقات داروشناسی و تولید دارو بسیار مورد توجه هستند. بسیاری از ترکیبات شناخته شده در این موجودات را می‌توان به‌عنوان داروی ضد تومور استفاده کرد. مرجان‌های نرم منابع بسیار غنی از استروئیدها هستند (۱). این مواد دارای خواص بسیاری مانند اثرات ضدتومور، ضد باکتری و ضدویروس هستند (۲، ۳، ۴). استفاده از سایر آبزیان دریایی نظیر ماهی‌ها، کوسه‌ها، دوکفه‌ای‌ها، نرم‌تنان، سخت‌پوستان، ریزجلبک‌ها، گیاهان دریایی، درخت‌های دریایی و حتی باکتری‌ها به‌منظور جستجو و استخراج ترکیبات زیست فعال بسیار توسعه یافته است. مرجان‌ها از جمله موجودات دریایی هستند که به لحاظ ساختاری شبیه سنگفرش بستر دریا را می‌پوشانند. این موجودات ساکن بوده و در مناطق مختلف از سواحل تا مناطق عمیق‌تر در فلات قاره توسعه یافته‌اند. در خلیج فارس گونه‌های متعددی از مرجان‌ها وجود دارند که ازجمله آن می‌توان به گونه *S. compressa* اشاره نمود. مرجان‌ها به‌عنوان زیستگاه بسیاری از گونه‌های جانوری و گیاهی دریایی هستند و طیف وسیعی از انواع آبزیان به شکل هم‌زیست با مرجان‌ها زندگی می‌کنند. عمده تولید و رشد مرجان‌ها به‌علت فعالیت‌های بیولوژیک نوعی تاژک‌دار موسوم به زوگزانتلا Zoxantella می‌باشد که با انجام فتوسنتز و فراهم‌سازی شرایط رسوب املاح و آهک‌ها موجب رشد و زنده‌مانی مرجان‌ها می‌شوند. تنوع گونه‌های مرجانی به‌خصوص در دریای عمان، سواحل چابهار و جزایر سیری، کیش و تنب بزرگ بیش‌تر به چشم می‌آید. در همین خصوص Loghmani و Sadeghi اقدام به شناسایی و مطالعه وضعیت سلامت سنگفرش‌های مرجانی خلیج چابهار در دریای عمان کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که عامل عمق به‌عنوان یک فاکتور محدودکننده برای توزیع و پراکنش مرجان‌ها می‌باشد (۵). Loghmani و Sadeghi پراکنش و تنوع مرجان‌های سخت را در خلیج چابهار دریای عمان مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که خلیج چابهار در مقایسه با خلیج فارس تنوع بیش‌تری از مرجان‌ها را دارد (۶). اثرات ضد بیماری و ضدسرطانی مرجان‌ها در مطالعات بسیاری موردبررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای که Roostaeian و همکاران روی باکتری استرپتومیست جدا شده از مرجان نرم *Sinularia erecta* در خلیج فارس انجام شد، مشخص گردید که این باکتری عامل اصلی تولید ترکیبات سیتوتوکسیک هستند که در درمان بسیاری از سلول‌های سرطانی دستگاه گوارش کاربرد دارند (۷). هم‌چنین در تحقیق دیگری Mehdi Nia اقدام به بررسی برخی ترکیبات شیمیایی استخراج شده از نمونه‌های مرجان‌های نرم در خلیج چابهار کرد. نتایج نشان داد که در این گونه ۱۶ ترکیب به نام‌های آلفا-ترپینن، گاما-کادینن، (-) -سینولارن، بتا-کیوبین، آلفا- کوپائن، (+)- آرومادندرن، اپیزونارن، آلفا- آمرفن، دی-ژرماسرن، دلتا-سلینن، آلفا-مورولن، دلتا-کادینن، آلفا- کادینن، آلفا-کالاکورن، نئوفیتادین و سمبرن شناسایی شدند (۸). از بین ترکیبات شناخته شده، دلتا-کادینن بیش‌ترین درصد را به‌خود اختصاص داد. برای بسیاری از ترکیبات شناخته شده خواص ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضدآلزایمر و ضد اچ.آی.وی گزارش شده است. در خلال جداسازی ترکیب-C نوکلئوزیدها از اسفنج‌های کارائیب، گونه *Crytotheca cryta*، محققان برای اولین‌بار به تأثیر عصاره موجودات دریایی بر سلول سرطانی پی بردند. این تحقیقات منجر به کشف ترکیب سیتارابین، اولین ترکیب ضدسرطانی مشتق شده از موجودات دریایی شد که اخیراً برای درمان بیماری‌های لوسمی و لنفوم استفاده می‌شود (۹، ۱۰، ۱۱). سپس زیست‌شناسان به بررسی تولیدات ثانویه موجودات دریایی پرداختند به‌طوری‌که براساس نتایج مقالات مختلف، عصاره گونه‌های مختلف کارایی متفاوتی داشته و تأثیر آن‌ها بر روی رده‌های سلولی متفاوت است. یکی از موجوداتی که در این زمینه به‌طور عمده مورد توجه قرار می‌گیرد، مرجان نرم است. مرجان‌های نرم منبعی غنی از متابولیت‌های فعال زیستی هستند. تاکنون ترکیبات منحصر به فرد و فراوانی با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف شناسایی شده است که می‌توانند در تولید داروهای سرطان با منشاء بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرند. از این مواد سرامید و پالیتوکسین با خاصیت ضدمیکروبی و لمافلاووزید و دیترپن با خاصیت ضدسرطانی را می‌توان نام برد (۹). این مواد در گونه‌هایی مانند *Sinularia gyrosa*، *Sinularia kavarientes*، *Sinularia dissecta* شناسایی شده و شکل ساختاری آن‌ها با استفاده از تکنیک NMR به‌دست آمده است (۱۰، ۱۱، ۱۲). ازجمله استفاده از NMR توسط سایر محققین *S. compressa* دارای ترکیبات ضدسرطانی مانند دیترپن‌ها می‌باشد (۱۲). سرطان یکی از شایع‌ترین و وحشتناک‌ترین بیماری‌هایی است که در پزشکی بالینی مشاهده می‌شود و درصد بالایی از سرطان‌ها را سرطان‌های دستگاه گوارش تشکیل می‌دهند. با ۳۸۶۰۰۰ مرگ در سال، ششمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان محسوب می‌شود. سرطان دستگاه گوارش نیز منشأ تقریباً ۴-۳ درصد سایر سرطان‌ها است (۱۳، ۱۴، ۱۵). بنابراین در این مطالعه هدف استفاده از عصاره استخراج شده از بافت مرجان *S. compressa* بر روی رده سلولی AGS سرطان معده بود. این مطالعه در شرایط In vitro انجام گردید و طی آن اثرات ضدسرطانی و سیتوتوکسیک عصاره گونه مرجانی *S. compressa* بر مرگ و میر این رده سلولی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: گونه مرجان *S. compressa* از طریق غواصی از خلیج فارس و جزیره هنگام در عمق ۱۵ متری جمع‌آوری شد. برای

شناسایی نمونه‌ها و استخراج آن‌ها، نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی حاوی آب دریا به آزمایشگاه منتقل شدند. این گونه در اعماق ۱۰ تا ۱۵ متری و از منطقه فلات قاره توسعه یافته و دارای پراکنش‌های نقطه‌ای ولی متراکم در خلیج‌فارس می‌باشد. هم‌چنین از نظر زیستی به‌شدت وابسته به خصوصیات کیفی آب نظیر دما، آلودگی‌ها، نور، مواد معدنی و غذا می‌باشد. مهم‌ترین دلیل استفاده از این گونه بررسی خصوصیات ضدتوموری عصاره این گونه مرجان در خلیج‌فارس بود که تا زمان نوشتن این مقاله، مطالعه جامعی در مورد آن انجام نشده است.

شناسایی نمونه‌ها و عصاره‌گیری: برای شناسایی گونه‌های نمونه‌برداری شده، با توجه به نبود مرجع مناسب و کلید شناسایی معتبر در زمان انجام مطالعه، نمونه‌ها به موزه طبیعی هلند فرستاده شدند. پس از بررسی صحت انتخاب گونه مشخص شد که گونه مرجانی مورد مطالعه *S. compressa* است. در ادامه نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی به‌طور کامل خشک شدند (۱۶). نمونه‌ها سپس با استفاده از آسیاب برقی به‌طور کامل پودر شدند. روش عصاره‌گیری در این مطالعه عصاره اتیل استاتی بود. پس از استحصال عصاره، اتیل استات فیلتر شده و در سانتریفیوژ قرار داده شد تا از حلال جدا شود. سپس تحت تأثیر هگزان قرار گرفت. با استفاده از چرخش، هگزان از عصاره جداسازی شد و در نهایت عصاره خالص *S. comressa* به‌دست آمد. در ادامه عصاره هگزانی در ۱۰ درصد DMSO حل شد و غلظت‌های مختلف آن در معرض سلول ها قرار گرفت (۱۶).

کشت سلولی: سلول‌های آدنوکارسینوم معده انسان (AGS) چسبنده هستند و ظاهری شبیه اپیتلیال دارند. برای این رده سلولی از محیط کشت F12 DMEM Ham's استفاده شد. سلول‌ها در محیطی حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) و ۱٪ پنی‌سیلین- استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه در ۵٪ CO2 کشت داده شدند. آماده‌سازی محیط کشت طبق دستورالعمل شرکت سازنده (آریا فن‌ورزان، تهران) در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. هم‌چنین این محیط به نسبت ۱:۱ محیط DMEM و Ham's F12 آماده‌سازی شد و بافر با غلظت ۱۵ مولار نیز به آن اضافه گردید. سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ چاهی که هر چاهک حاوی ۱۵۰۰۰ سلول بود، اضافه شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوبه قرار گرفتند تا سلول‌ها به پلیت متصل شوند (۱). سپس محیط آن‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره تغییر یافت.

تهیه غلظت‌های مختلف عصاره مرجان: غلظت‌های مختلف عصاره (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. یعنی ۱ میلی‌گرم از هر غلظت در ۱ میلی‌لیتر DMSO ۱۰ درصد حل شد. غلظت‌های آماده‌شده از فیلترهای ۰/۲۵ میکرونی عبور داده شد تا ذرات معلق و مواد اضافی کاملاً جدا شوند.

ارزیابی سمیت عصاره مرجان *S. comressa*: سلول‌های رده سلولی ASG طی سه زمان ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض عصاره مرجان قرار گرفتند. با توجه به حل شدن عصاره‌ها در DMSO ۱۰ درصد، شاهد مثبت حاوی DMSO نیز درنظر گرفته شد تا اثر DMSO بر روی سلول‌ها اندازه‌گیری شود. در آزمایش، کنترل منفی، حاوی سلول‌ها و محیط آن‌ها نیز در نظر گرفته شد. صفحات با CO_2 و در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند.

آزمایش MTT: پس از تکثیر سلول‌های سرطانی معده، ۱۵۰۰۰ سلول به هر چاهک منتقل شد و در تماس با ۱۰ غلظت مختلف از عصاره مرجان قرار گرفتند. تست MTT حاوی (۳-(۴،۵)- dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) برای اندازه‌گیری میزان مرگ و میر سلول‌ها استفاده شد. MTT یک نمک زرد تترازولیوم است که در سلول‌های زنده به فورمازون ارغوانی رنگ ظاهر می‌شود (۱). جذب در طول موج ۴۸۰ نانومتر با استفاده از روش ELISA (Anzyme-linked immunosorbent assay) اندازه‌گیری شد. سپس با شاهد مقایسه شد. نتایج با آزمون تی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

آزمایش فلوسایتومتری: در مجموع ۱۵۰۰۰۰ سلول در پلیت‌های کشت ۲۵ میلی‌متری ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس محیط سلولی جایگزین شد. با توجه به تأثیر عصاره سلول‌ها، کم‌ترین غلظت (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌عنوان پایه اندازه‌گیری در تست فلوسایتومتری در نظر گرفته شد. سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در معرض عصاره قرار گرفتند. سلول‌ها توسط تریپسین از سطح صفحه جدا شده و به لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری منتقل شدند. سلول‌ها با یدید پروپیدیوم محلول (PI) (حاوی ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر RNase و ۰/۰۱ پروپیدیوم یدید) رنگ‌آمیزی شدند (۱۳). یک شاهد PI نیز درنظر گرفته شد. سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. نمونه‌ها در فلوسایتومتری مدل FACScalibur خوانده شدند.

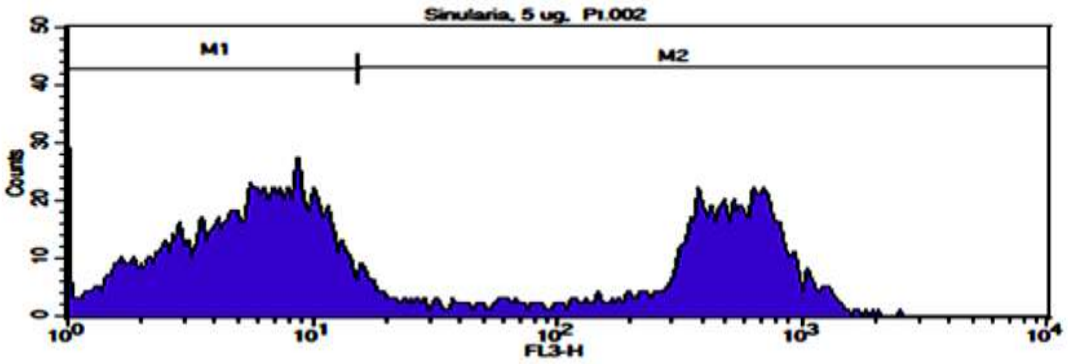
آنالیزهای آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌های خام از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. سپس میانگین و انحراف معیار داده‌های به‌دست‌آمده محاسبه شد. برای بررسی معنی‌داری تفاوت بین داده‌ها از آزمون تی و آنالیز واریانس با سطح معنی‌داری ۵ درصد و فاصله اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد (۱).

نتایج

میزان چسبندگی سلول‌ها: نتایج حاصل از میزان چسبندگی سلول‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، سلول‌هایی که در معرض عصاره مرجان قرار گرفتند اندازه کوچک‌تر از سلول شاهد را نشان دادند. هم‌چنین در تصاویر مشخص است که لایه اپیتلیالی این سلول‌ها تحت تاثیر عصاره تحلیل رفته‌اند. شکل ۳ نشان می‌دهد که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۸۴ درصد از سلول‌ها از بین رفتند. سلول‌های AGS متعلق به دسته‌ای از سلول‌های چسبیده به سطح صفحه هستند. بنابراین سلول‌هایی که از ته چاهک‌ها جدا شده و در محیط معلق شده‌اند، زنده نیستند.

a b c

شکل ۱: تغییرات ساختاری و وضعیت چسبندگی سلول‌های رده سلولی ASG (a: گروه شاهد، b : غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، c : غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره)



Histogram Statistics

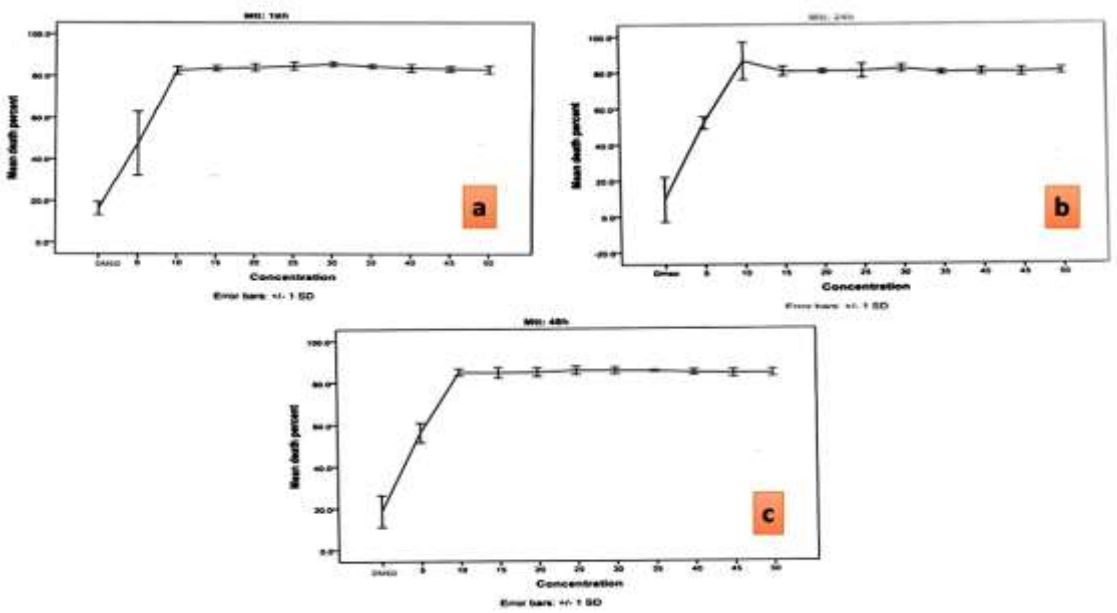
File: Sinularia, 5 ug, P1.002
Sample ID: Sinularia, 5 ug, P1
Tube: Untitled
Acquisition Date: 19-Dec-11
Gated Events: 7359
X Parameter: FL3-H (Log)

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: Sinularia, 5 ug, P1
Parent: Untitled Acquisition Tube List
Gate: G1
Total Events: 151875

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	7359	100.00	4.85	212.48	30.14	150.95	10.94	1
M1	1, 15	4146	56.34	2.73	5.98	4.84	59.30	5.47	1
M2	15, 9910	3218	43.73	2.12	478.23	317.78	69.28	451.12	615

شکل ۲: نتایج تکنیک فلوسایتومتری در برآورد میزان مرگ سلولی ناشی از اثرات عصاره مرجان

ارزیابی مرگ سلولی در تست فلوسایتومتری: غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در معرض سلول‌ها قرار گرفت. با توجه به این‌که تکنیک فلوسایتومتری می‌تواند تعداد سلول‌ها را شناسایی کرده و آن‌ها را با دقت و سرعت بالاتر تشخیص دهد، روشی دقیق برای اندازه‌گیری مرگ‌سلولی است. برخی از کنترل‌ها برای‌هر آزمون مورد نیاز است. این کنترل برای تنظیم دستگاه و مقایسه آن با نشانگر اصلی استفاده می‌شود. برای به‌دست آوردن مقدار فلورسانس در هر گروه از سلول‌ها و تعداد دقیق آن‌ها، نشانگرهای (M) با استفاده از فلوسیتومتری انتخاب شدند که تجزیه و تحلیل نرم‌افزاری ویژگی‌های سلول‌های انتخاب شده در این مناطق را نشان داد. نشانگر (M1) نشان‌دهنده سلول‌های کنترل است. نشانگر (M2) سلول‌های مثبت (سلول‌هایی که تحت تأثیر عصاره قرار گرفتند) را نشان می‌دهد. نرم‌افزار فلوسیتومتری اطلاعات آماری مربوط به هیستوگرام نشان داده شده در شکل ۲ را محاسبه می‌کند. تعداد کل ۴۱۴۶ سلول در محدوده M1 و ۳۲۱۸ سلول در محدوده M2 سنجش شدند. سطوح فلورسانس نسبی سلول‌ها به‌عنوان میانگین درنظر گرفته شد. در جمعیت تعیین شده توسط M2 ، عدد ۴۷۸/۲۳ است که به‌وضوح مثبت است که در مقایسه با ناحیه سلول‌های M1 عدد ۵/۹۸ را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل ۲، در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴۲ درصد از سلول‌ها با توجه به درصد خطا مردند، نتیجه با آزمون MTT انجام شده مطابقت دارد.



شکل ۳: درصد مرگ سلولی سلول‌های سرطانی در معرض قرار گرفته با عصاره مرجان در تکنیک MTT (a: مدت زمان ۱۸ ساعت b: مدت زمان ۲۴ ساعت، c: مدت زمان ۴۸ ساعت)

ارزیابی مرگ سلولی در تست MTT: شکل ۳ نتایج حاصل از تکنیک MTT را درخصوص اثر کشنده عصاره *S. compressa* بر روی رده سلولی AGS نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که سلول‌های مرده تغییرات رنگی نداشتند. شکل ۳ رنگ‌سنجی میزان مرگ و میر رده سلولی AGS را نشان می‌دهد. با درنظر گرفتن شکل ۳، عصاره *S. compressa* در غلظت ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مرگ سلول‌ها به‌میزان ۵۰ درصد (LC50) شد و در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میزان اثر عصاره بر روی سلول‌ها مشابه بود. حدود ۸۴ درصد با توجه به نتایج کنترل DMSO، میزان استفاده از DMSO برای حل کردن عصاره تأثیر چندانی در مرگ سلول‌ها نداشت. اثر زمان بر روی سلول‌های تحت تأثیر تقریباً صفر بود، زیرا با گذشت زمان، هیچ تغییری در مرگ سلول‌ها مشاهده نشد.

بحث

بهره‌مندی از ترکیبات زیست فعال استخراج شده از آبزیان دریایی در طی سال‌های اخیر اهمیت زیادی پیدا کرده است. این در حالی است که نیاز به جایگزینی داروها و روش‌های درمانی کنونی که مبتنی بر مواد شیمیایی و صنعتی هستند بیش از پیش احساس می‌گردد. آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی، ضد دردهای شیمیایی و روش‌های شیمی درمانی با عوارض بسیار خطرناک از جمله ایجاد انواع مقاومت‌های باکتریایی، آسیب‌های بافتی به اندام‌های حیاتی بدن و ایجاد بیماری‌های ثانویه تنها بخشی از اثرات سوء این داروها و ترکیبات شیمیایی است. در این‌خصوص استفاده از ظرفیت‌های منابع آبزی در دریا می‌تواند زمینه مناسبی برای استفاده از ترکیبات زیست فعال برای مبارزه با بیماری‌ها باشد. اکوسیستم‌های دریایی یکی از منابع اصلی تولید محصولات بیولوژیکی با کاربردهای متنوع هستند. مهم‌ترین محصولات مشتق شده مربوط به مرجان‌های نرم، اسفنج‌ها، نرم‌تنان و جلبک‌ها هستند (۱۶). هم‌چنین استخراج ترکیبات با خواص دارویی از آبزیان دیگر ازجمله ماهی‌ها، کوسه‌ها، گیاهان دریایی، پستانداران و سخت پوستان گزارش شده است. براساس نتایج مقالات مختلف، عصاره‌های موجودات مختلف دارای کارایی متفاوت بوده و حتی تأثیر آن‌ها در درمان بیماری یکسان نیست. به‌عنوان مثال، در آزمایشات مختلف مشخص شد که عصاره گونه‌هایی مانند *Sinularia nanolobata* و *Sinulari parva* در مقایسه با گونه‌هایی مانند *Sinularia triangula*، *S. gibberosa*، *S. grandilobata* اثرات بازدارندگی بیش‌تری بر رشد سلول‌ها دارند (۱). تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های AGS سمیت عصاره مرجان *S. compressa* را برای این سلول‌ها نشان می‌دهند. با توجه به نتایج LC50 به‌دست‌آمده از تأثیر عصاره *S. compressa* بر رده سلولیAGS، مشخص شد که در غلظت ۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت ۱۸ ساعت، ۵۰ درصد سلول‌ها مرده‌اند که این غلظت برای گونه‌های مختلف مرجان متفاوت است. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای که به تأثیر عصاره *S. compressa* بر روی رده سلولی SCC25 پرداخته شد، در غلظت‌های بالاتر از ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، ۵۰ درصد سلول‌ها از بین رفتند که در آن تأثیر گونه‌های *Sinularia depressan*، *Sinularia inflat* بر رده سلولی HaCaT در غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۲). LC50 عصاره کمپرسا ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در نوع

خود بی‌نظیر است. سینولارین موجود در عصاره مرجان دارای قدرت کشندگی سلول‌های سرطانی می‌باشد که این مکانیسم دفاعی و ایمنی‌زایی با از بین بردن سلول‌های سرطانی شده دربافت هدف انجام می‌شود. طی تحقیقات انجام شده بر روی مرجان *S. compressa*، مشخص شد که ترکیب فورمازون موجود در این مرجان دارای اثرات سمی بر سلول‌های سرطانی است. با جداسازی ترکیبات موجود در عصاره این ارگانیسم، دو ترکیب جدید به نام‌های سینولارین و دی هیدرو سینولارین یافت شد که اثرات بازدارندگی بر رشد سلولی دارند (۱۰). محصولات ثانویه مرجان‌ها بر روی باکتری‌ها و هم‌چنین سلول‌های حیوانی آزمایش شده است. محققان دریافتند که جلبک‌ها و باکتری‌ها در اطراف مرجان‌ها زندگی نمی‌کنند. عصاره این مرجان مورد آزمایش قرارگرفت و مشخص شد که سینولارید موجود در این مرجان به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک قوی عمل می‌کند و اجازه نمی‌دهد باکتری‌ها در اطراف آن‌ها رشد کنند (۱۵). با توجه به نتایج به‌دست آمده از GC-mass بر روی عصاره *Sinularia compressa*، مشخص شد که این مرجان دارای سینولارین نیز می‌باشد که می‌تواند به عنوان یک مهارکننده رشد برای کنترل افزایش هلیکوباکتر موجود در معده انسان استفاده شود (۱۶). برخی از موارد سرطان معده ناشی از این باکتری است، بنابراین با استفاده از این عصاره برای تولید دارو، می‌توان میزان باکتری معده انسان را کاهش داد و دارو در درمان سرطان نیز مؤثر بود. عصاره هم‌چنین دارای اثر مهاری بر روی باکتری‌هایی مانند باسیلوس پومیلوس و سودوموناس وزیکولاریس است (۹). در این مطالعه اثر عصاره *S. compressa* بر سلول‌های سرطانی بررسی شد. حال باید تاثیر این عصاره بر سلول‌های سالم را نیز سنجید. تاثیر این عصاره بر روی هلیکوباکتر پیلوری که می‌تواند یکی از دلایل سرطان معده باشد قابل اندازه‌گیری است. به‌دلیل وجود سینولارین در عصاره، این ترکیب به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک قوی به‌نظر می‌رسد. آبزیان دریایی خلیج‌فارس منابع غنی از طیف وسیعی از ترکیبات زیست‌فعال با خواص درمانی، ضدسرطانی، ضد باکتریایی، ضددرد و ترمیم‌کننده بافت‌های آسیب‌دیده می‌باشند. مرجان‌ها به دلیل ساختارهای خاص خود و خصوصیات زیستگاهی و ساختاری که دارند کم‌تر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و بسیاری از زمینه‌های درمانی آن‌ها هم‌چنان ناشناخته باقی‌مانده است. براساس یافته‌های این مطالعه مشخص گردید که عصاره استخراج شده از مرجان *S. compressa* اثرات مهارکننده‌ای روی سلول‌های سرطانی معده داشتند و این امکان وجود دارد که بتوان از این ترکیبات زیست فعال به‌عنوان داروی بی‌خطر و جایگزین ایمن برای داروهای شیمیایی و صنعتی استفاده شود. در این‌خصوص جایگزینی عصاره استخراج شده از مرجان *S. compressa* با بسیاری از داروهای شیمی درمانی و رادیوتراپی سرطان‌های سیستم گوارش که همواره عوارض بسیاری برای سلامت بیماران دارند توصیه می‌گردد.

منابع

1. **Ahmed A.F., Su, J.H., Shiue, R.T., 2004.** New caryophyllene-derived terpenoids from the soft coral *Sinularia nanolobata*. Journal of Natural Products. 67(4): 592-597.
2. **Ahmed, A.F., Hsieh, Y.T., Wen, Z.H., Wu, Y.C. and Sheu, J.H. 2006.** polyoxygenated sterols from Formosan soft coral *sinularia gibberosa*. journal of natural product. 69(9): 1275-1279.
3. **Anjaneyulu, A.S.R., Gowri, P.M. and Krishna Murthy, M.V.R., 1999.** New sesquiterpenoids from the soft coral *Sinularia intacta* of the Indian Ocean. Journal of Natural Products. 62(12): 1600-1604.
4. **Chaoa, Ch., Hsieha, Ch.H., Chena, Sh.P., Lub, Ch.K., Daid, Ch.F., Wue, Y.Ch. and Sheu, J.H., 2006.** Novel cyclic sesquiterpene peroxides from the Formosan soft coral Sinularia sp. Tetrahedron Letters. 47(13): 2175-2178.
5. **Loghmani, M. and Sadeghi, P., 2012.** Identifying and studying the health status of coral pavements in Chabahar Bay (Oman Sea). Journal of Animal Environment. 4(1): 58-68. (In Persian)
6. **Loghmani, M. and Sadeghi, P., 2015.** Study of distribution and diversity of hard corals in Chabahar Bay, Oman Sea. Journal of Animal Environment. 7(4): 105-116. (In Persian)
7. **Roostaeian, A., Safaeian, Sh., Ashraf Sadat, N., Naked, sh. And Asmar, M., 2002.** Investigation of Sinularia erecta soft coral from the Persian Gulf and taxonomic study of a strain of streptomycetes producing cytotoxic compounds isolated from it. Iranian Journal of Marine Science. 1(2): 51-59.
8. **Mehdi Nia, A., Rezaei, H. and Shejooni, N., 2014.** Investigation of some chemical compounds extracted from soft coral samples in Chabahar Bay. Oceanographic Research Institute. Journal of the Persian Gulf. 5(15): 51-58.
9. **Rashid, M.A., Gustafson, K.R. and Boyd, M.R., 2000.** HIV inhibitory cembrane derivatives from a Philippines collectionof the soft coral *Lobophytum* species. Journal of Natural Products. 63(4): 531-533.
10. **Sato, A. and Fenical, W., 1985**. Norcembrene diterpenoids from pacific soft-corals of the genus *sinularia* (Alcyonacea; Octocorallia). Tetrahedron. 41(19): 4303-4308.
11. **Schwartsman, N., Brondanida, G.R. and Jimeno, J., 2002.** Marine organisms as a source of new anticancer agents. Lancet Oncol. 2(4): 221-224.
12. **Wang, G.H., Cheu, T.H., Sheu, J.H. and Liang, C.H., 2009.** Cytotoxic Effect of the Genues Sinularia Extracts on human scc25 and HaCaT cells. Journal of Toxicology. 634868: 85-86.
13. **Chenga, S.Y., Chuanga, C.T., Wena, Z.H., Wangb, S.K., Chioua, S.F., Hsua, C.H., Daic, C.F. and Duh, Ch.Y., 2010.** Bioactive norditerpenoids from the soft coral Sinularia gyrosa. Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 18(10): 3379-3386.
14. **Coll, J.C., Bowden, B.F. and Tapiolas, D.M, 1985.** Studies of australian soft corals the terpenoid chemistry of soft corals and its implications. Tetrahedron. 41: 1085-1092.
15. **Duh, C.Y., Wang, S.K., Chu, M.J. and Sheu, J.H., 1998.** Cytotoxic sterols from the soft coral *Nephtheaerecta*. Journal of Natural Products. 61(8): 1022-1024.
16. **Zohari, M., 1999.** Effect of ecological diffrences onnatural product of soft coral. MSc thesis, College of Marine Science and Technology, Islamic Azad University North Tehran Branch. 6-46. (In Persian)