مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018

اثر سمیت سلولی سیانوپروکاریوت‌های چشمه‌ی آب گرم گنو بر رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی

حدیثه ابراهیمی[۱]، آرش اکبرزاده[۱*]، محمدعلی اسماعیلی[۲]، مرتضی یوسف زادی[۳]

[۱]گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

[۲]گروه زیست شناسی، دانشکده گیاهان و مواد اولیه‌ی دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

[۳]گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۰۳/۳۰
اصلاح: ۹۴/۰۷/۱۱
پذیرش: ۹۴/۰۸/۰۱

کلمات کلیدی:
سیانوپروکاریوت
سرطان
HeLa

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر ضدسرطانی و سمیت ۶ گونه سیانوپروکاریوت ساکن چشمه‌ی آب گرم گنو، استان هرمزگان بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی (HeLa) در غلظت‌های مختلف صورت پذیرفت. به این منظور تأثیر سمیت سلولی عصاره‌ی متانولی سیانوپروکاریوت‌های *Leptolyngbya tenuis, Chroococcus minutes, Gloeocapsa rupestris, Oscillatoria articulata, Chroococcus namiculata, Synechocystis aquatilis* متعلق به چشمه‌ی آب گرم گنو در ۵ غلظت متفاوت ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ (µg/ml) و در قالب ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که تاثیر سمیت عصاره‌های متانولی غلظت‌های مختلف جلبک‌های نام‌برده بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی (HeLa) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال $p<0/05$ دارند. مؤثرترین عصاره‌ی جلبکی برای کشتن سلول‌های سرطان دهانه‌ی رحم *G. rupestris* با IC_{50} = ۶۸/۵۶۷۲ (µg/ml) بود. از بین گونه های سیانوپروکاریوت به‌کار رفته برای سلول‌های سرطان دهانه‌ی رحم تنها سه جلبک *S. aquatilis, G. rupestris, L. tenuis* اثر سمیت داشتند و جلبک های دیگر بی‌تاثیر بودند.

مقدمه

سیانوپروکاریوت‌ها تنها عضو جمعیت فیتوپلانکتون‌های آب شیرین هستند که سم تولید می‌کنند (Voloshko *et al.*, 2008). تولید سم توسط سیانوپروکاریوتها یک ویژگی منحصر به فرد زیست فیزیولوژیکی می‌باشد که در جنس‌های خاصی از سیانوپروکاریوتها دیده می‌شود. این ویژگی احتمالاً در طی روند تکاملی و در پاسخ به تغییرات آب و هوایی ایجاد شده و به طور کلی توانایی موجود را برای زیستن در زیستگاه مربوطه بیشتر می‌کند. ارزش دارویی سیانوپروکاریوتها در اوایل ۱۵۰۰ قبل از میلاد به اثبات رسید، وقتی‌که زنجیره‌هایی از *Nostoc* برای درمان نقرس، زخم‌های نای و چندین نوع سرطان به‌کار رفتند (Shanab *et al.*, 2012). قابلیت سیانوپروکاریوت‌های دریایی به عنوان عوامل ضدسرطانی باعث شده است که آن‌ها معمول‌ترین گیاه دریایی استفاده شده برای تولید دارو باشند (Malaker and Ahmad, 2013). مطالعات اخیر تایید کننده‌ی خاصیت ضدسرطانی، ضدمیکربی، تنظیم کانال‌های غشا، مهار پروتئاز و خواص سمیت زیستی (Nagarajan *et al.*, 2012)، ضدویروسی (Challouf *et al.*, 2011) ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدالتهابی (Devi and Bhimba, 2012) و دیگر ویژگی‌های پزشکی و دارویی برخی متابولیت‌های ثانویه‌ی جلبک‌های سبز-آبی می‌باشند. مواد فعال زیستی در جلبک‌ها شامل متابولیت‌های اولیه و

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: akbarzadeh@ut.ac.ir

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018

ثانویه می‌باشند (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۹). سموم سیانوپروکاریوت‌ها سیانوتوکسین نام دارد که در آخرین فهرست عوامل آلوده کننده آورده شده‌اند (Zanchett and Failho, 2013). سیانوتوکسین‌ها می توانند براساس دو معیار اصلی تقسیم‌بندی شوند: (۱) براساس اثرات زیان‌بار و مکانیسم عملکردشان در مهره‌داران زمینی، مخصوصاً پستانداران (۲) براساس ساختار شیمیایی آن‌ها (Zanchett and Failho, 2013).

سرطان دومین عامل مرگ و میر در دنیا است که سالانه در جهان جان حدود هفت میلیون نفر را می‌گیرد (Devi and Bhimba, 2012). کشف و شناسایی داروهای جدید ضدسرطان که بدون ایجاد سمیت در سلول‌های سالم و طبیعی، سلول‌های سرطانی را از بین ببرد و یا غیرفعال کند و تأثیرات منفی کمتری روی سیستم ایمنی داشته باشد، چالشی بالقوه در زمینه‌ی پزشکی و دارویی داشته و هدف ضروری در بسیاری مطالعات می‌باشد (Mary *et al*., 2012).

سرطان دهانه‌ی رحم دومین سرطان شایع در زنان است که سالانه در سراسر جهان جان بیش از ۲۷۰۰۰۰ زن را می‌گیرد (Liu *et al*., 2012). HeLa قدیمی‌ترین و رایج‌ترین رده‌ی سلول انسانی است که نام آن برگرفته از دو حرف اول نام Henrietta Lacks است که سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم در ۸ فوریه سال ۱۹۵۱ از دهانه رحم او گرفته شد.

Paul و همکاران در سال ۲۰۱۲ فعالیت ضدسرطانی عصاره‌ی خام استخراج شده از دو سیانوپروکاریوت *Phormidium valderianum* و *Phormidium tenue* را بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی (HeLa) مورد بررسی قرار داده و به این نتیجه رسیدند که این عصاره‌ها به وضوح روی مورفولوژی سلول‌های سرطانی تاثیر گذاشته و سمیت سلولی *P. valderianum* بیشتر از *P. tenue* بود. در تحقیقی دیگر Bharat و همکاران در سال ۲۰۱۳ فعالیت ضدمیکربی و سمیت سلولی عصاره‌ی ۱۰ گونه از سیانوپروکاریوت ها را در برابر رده‌های سلول سرطان Hela و Siha (سرطان دهانه‌ی رحم) انسانی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ها روی رده‌های سلولی سرطان دهانه‌ی رحم اثر سمیت دارد و لذا می‌توان این سیانوپروکاریوتها را به منظور اهداف پزشکی و درمان تخصصی سرطان به تولید انبوه رسانیده و استفاده نمود.

چشمه آب گرم گنو در فاصله ۳۴ کیلومتری شمال شرقی شهر بندرعباس واقع شده است. در سال ۱۳۹۲ آرمان و همکاران اقدام به شناسایی جلبک‌های سبز- آبی در چشمه‌ی آب گرم گنو نموده و توانستند گونه‌های *Leptolyngbya tenuis*, *Chroococcum minutes*, *Gloeocapsa rupestris*, *Oscillatoria articulata*, *Chroococcus namiculata*, *Synechocystis aquatilis*, *Oscillatoria subbrevis*, *Chroococcus turgidus*, *Phormidium gracile*, *Jaginema Anagnostidis* را شناسایی نموده و همچنین خواص ضدمیکروبی سیانوپروکاریوت‌های چشمه آب گرم گنو را مورد ارزیابی قرار دهند. علی رغم اهمیت چشمه های آب گرم به عنوان یکی از زیستگاه های مهم سیانوپروکاریوت ها، تاکنون مطالعه ای در زمینه اثرات سمیت و ضد سرطانی عصاره سیانوپروکاریوت های ساکن چشمه های آب گرم صورت نگرفته است. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات سمیت سلولی ۶ گونه از سیانوپروکاریوت‌های چشمه‌ی آب گرم گنو بر رده‌ی سلول های سرطان دهانه‌ی رحم و معرفی بهترین گونه و یا گونه‌های سیانوپروکاریوت بومی این چشمه از نظر تاثیرات سمیت سلولی می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های سیانوپروکاریوت‌ها در فصل پاییز از چشمه‌ی آب گرم گنو بندرعباس، ایران جمع‌آوری و به منظور کشت و انبوه‌سازی به بخش کشت جلبکی در آزمایشگاه شیلات دانشگاه هرمزگان، منتقل شدند. گونه‌های خالص و شناسایی شده‌ی سیانوپروکاریوتها شامل گونه های *L. tenuis*, *Ch. minutes*, *G. rupestris*, *O. articulata*, *Ch. namiculata*, *S. aquatilis* در محیط کشت سنتتیک BG-11 در پلیت کشت داده شدند. این محیط یکی از رایج‌ترین محیط‌های مورد استفاده برای سیانوپروکاریوت‌ها است که ترکیبات تشکیل‌دهنده و مقادیر آن به صورت دقیق و با جزئیات در جدول ۱ آورده شده است (Zarrini *et al*., 2011). جهت ساخت این محیط کشت کافی است ترکیبات ذکر شده در جدول ۱ را به دقت در آب مقطر حل کرده و به حجم یک لیتر رسانیده و از دستگاه اتوکلاو برای استریل‌کردن محیط کشت استفاده گردد. در مرحله بعد نمونه‌های سیانوپروکاریوتی به محیط کشت مایع منتقل و تا اواخر مرحله لگاریتمی که بسته به سرعت رشد نمونه از ۱۰ تا ۲۰ روز می‌باشد، کشت آن‌ها ادامه یافت.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018

جدول ۱. ترکیبات موجود در محیط کشت BG-11 (Anderson, 2005)

ترکیبات	($g.L^{-1}$ dH_2O)	مقدار مورد استفاده	غلظت نهایی در محیط کشت (M)
Fe citrate solution		۱ میلی لیتر	$۳/۱۲\times۱۰^{-۵}$
Citric acid	۶	۱ میلی لیتر	۳×۱۰^{-۵}
Ferric ammonium citrate	۶	۱ میلی لیتر	$۱/۷۶\times۱۰^{-۲}$
$NaNO_3$	-	۱/۵ گرم	$۱/۷۵\times۱۰^{-۴}$
$K_2HPO_4.3H_2o$	۴۰	۱ میلی لیتر	$۳/۰۴\times۱۰^{-۴}$
$MgSO_4.7H_2O$	۷۵	۱ میلی لیتر	$۲/۴۵\times۱۰^{-۴}$
Na_2CO_3	۳۶	۱ میلی لیتر	$۱/۸۹\times۱۰^{-۴}$
$MgNa_2EDTE.H_2O$	۲۰	۱ میلی لیتر	$۲/۷۹\times۱۰^{-۶}$
H_3BO_3	-	۲/۸۶۰ گرم	$۴/۶۳\times۱۰^{-۵}$
$MnCL_2.4H_2O$	-	۱/۸۱۰ گرم	$۹/۱۵\times۱۰^{-۶}$
$ZnSO_4.7H_2O$	-	۰/۲۲۰ گرم	$۷/۶۵\times۱۰^{-۷}$
$CuSO_4.5H_2O$	۷۹	۱ میلی لیتر	$۳/۱۶\times۱۰^{-۷}$
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	۰/۳۹۱ گرم	$۱/۶۱\times۱۰^{-۶}$
$Co(NO_3).6H_2O$	۴۹/۴	۱ میلی لیتر	$۱/۷۰\times۱۰^{-۷}$

توده‌های سیانوپروکاریوتی پس از رسیدن به حجم مطلوب به منظور عصاره‌گیری از کاغذ صافی شماره‌ی ۱ عبور داده شد و جلبک‌های جامد به جا مانده بر روی کاغذ صافی پس از جمع آوری به مدت ۴۸ ساعت در ارلن‌های حاوی متانول (حلال) قرار گرفت و سپس عصاره گیری انجام شد. به منظور از بین رفتن کامل متانول و به دست آمدن عصاره‌ی خالص به صورت خشک برای جلوگیری از تخریب ترکیبات، دمای روتاری کمتر از ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد تنظیم شد و پس از سپری شدن زمان لازم، عصاره‌ی خالص به صورت خشک از هر کدام از نمونه‌های جلبکی تهیه گردید. وزن عصاره‌ی هرکدام از نمونه‌ها نسبت به وزن اولیه‌ی خود محاسبه شد (Yousefzadi *et al*., 2011).

رده‌ی سلول سرطان دهانه‌ی رحم انسانی (Hela) از انستیتو پاستور ایران گرفته شد. سلول‌ها در ۸۸ سی‌سی محیط کشت RPMI-1640[1] شرکت INOCLON، ۱۱-۱۲ سی‌سی از FBS (سرم جنینی گوساله)[2] و ۱ سی‌سی پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور Co_2 دار با غلظت دی‌اکسیدکربن ۰/۰۵، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و رطوبت ۸۶-۹۹٪ کشت داده شدند (Yousefzadi *et al*., 2011).

به منظور بررسی سلول‌های سرطانی تست MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium، همراه با رنگ‌آمیزی تریپان بلو صورت گرفت. به طور خلاصه، مخلوطی از سلول های سرطانی، محیط کشت افزودنی و PBS در هر یک از ۹۶ خانه‌ی پلیت ریخته شد. سپس، ترکیبی از عصاره‌ها با DMSO[3] در حجم و غلظت مورد نظر تهیه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض این ترکیب قرار داده شدند. در مرحله‌ی بعد هر یک از ۹۶ خانه‌ی پلیت با ترکیب نمک تریزول و محیط کشت غیرافزودنی پر گردیده و به مدت ۳ ساعت در داخل انکوباتور انکوبه گردیدند. پس از ۳ ساعت محلول رویی تخلیه و در هر خانه ۱۰۰ (µl) DMSO فیلتر شده اضافه و ۱۵ دقیقه در داخل انکوباتور قرار گرفت. سمیت سلولی به صورت غلظتی از عصاره‌ها که مانع از رشد ۵۰٪ سلول‌ها شد (IC_{50}) بیان گردید.

1. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
2. Fetal Bovine Serum (FBS)
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018

همه‌ی داده‌های مربوط به فعالیت سمیت سلولی با سه تکرار برای هر نمونه، به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. تجزیه و تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار Excel و توسط آزمون ANOVA انجام شد. $P<0.05$ برای بیان تفاوت معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

از آنجائیکه سمیت سلولی یک ویژگی مفید و بالقوه برای مبارزه با سرطان می‌باشد، در این تحقیق فعالیت سمیت سلولی عصاره‌ی متانولی سیانوپروکاریوت‌های *L. tenuis, Ch. minutes, G.rupestris, O. articulata, Ch. namiculata, S. aquatilis*, چشمه‌ی آب گرم گنو بر رده‌ی سرطان دهانه‌ی رحم انسانی با روش MTT و براساس IC_{50} مورد ارزیابی قرار گرفت. در جدول ۲، IC_{50} مربوط به هر یک از ۶ گونه‌ی جلبکی مورد تحقیق آورده شده است. از آنجائیکه ۵ غلظت به‌کار رفته در این آزمایش همگی زیر ۱۰۰ بودند، اگر IC_{50} مربوط به گونه‌ای خاص بالاتر از ۱۰۰ به دست آمده باشد، IC_{50} آن بدون ذکر عدد و تنها با آوردن IC_{50} >۱۰۰ نشان داده شده است. لذا IC_{50} >۱۰۰ مربوط به هر گونه به معنی عدم سمیت جلبک مربوطه بر روی رده‌ی سلول سرطانی نبوده و صرفاً نشان‌دهنده‌ی تأثیرگذاری آن در غلظتی بالاتر از غلظت‌های به کار رفته در این آزمایش است.

جدول ۲. مقایسه‌ی سمیت سلولی IC_{50} عصاره‌ی شش گونه‌ی از سیانوپروکاریوت‌های چشمه‌ی آب گرم گنو بر رده‌ی سلولهای سرطان دهانه‌ی رحم انسانی

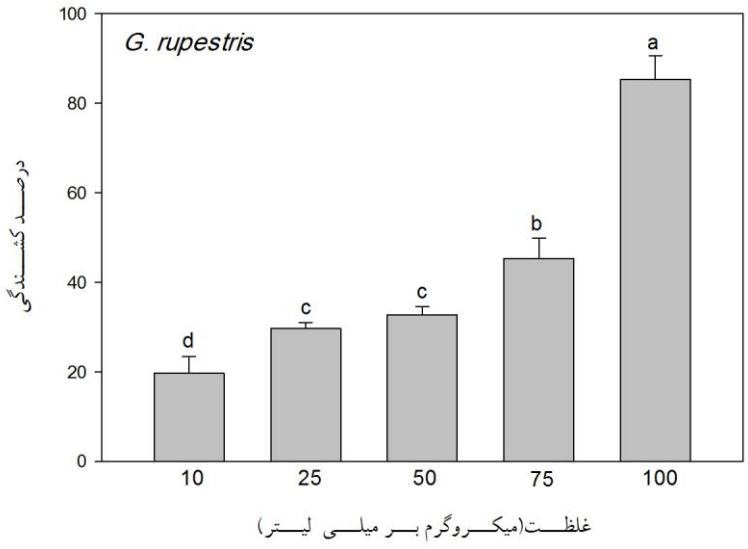
جلبک	IC_{50} (µg/ml)
G. rupestris	۶۸/۵۶۷۲
S. aquatilis	۷۵/۵۱۲
Ch. namiculata	IC_{50} >۱۰۰
O. articulate	IC_{50} >۱۰۰
L. tenuis	۹۶/۳۵۱۷
Ch. minutes	IC_{50} >۱۰۰

از مشاهده‌ی جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت که از بین عصاره‌ی ۶ گونه‌ی مختلف جلبک سیانوپروکاریوتی مطالعه شده تنها عصاره‌ی ۳ جلبک *G. rupestris* با IC_{50}= (µg/ml) ۶۸/۵۶۷۲، *S. aquatilis* با IC_{50}= ۷۵/۵۱۲ و جلبک *L. tenuis* با IC_{50}= (µg/ml) ۹۶/۳۵۱۷ بر رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم اثر کشندگی داشتند که *G. rupestris* بیشترین درصد کشندگی را داشت. ۳ جلبک دیگر در غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ هیچ تاثیری بر روی سلول‌های سرطانی نداشتند و در واقع IC_{50} آن‌ها بالاتر از ۱۰۰ بود.

نتایج سمیت سلولی عصاره‌های سیانوپروکاریوت‌های *L. tenuis, Ch. minutes, G.rupestris, O. articulata, Ch. namiculata, S. aquatilis* بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی (HeLa) در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ به ترتیب در شکل‌های ۱،۲، ۳، ۴، ۵، ۶ نشان داده شده است.

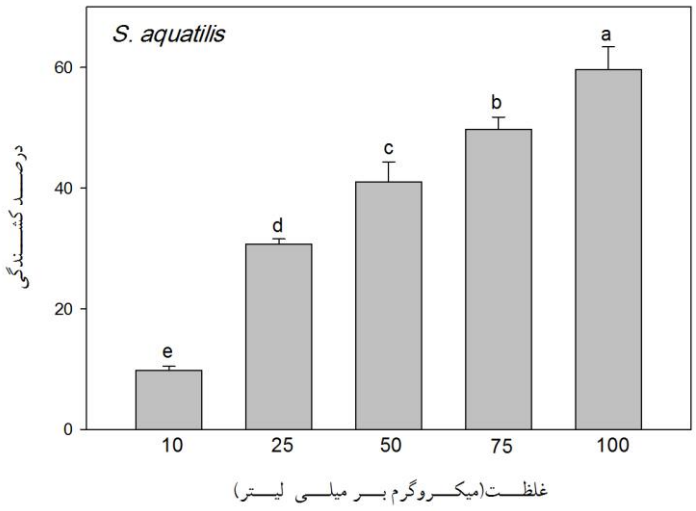
با تکیه بر نتایج، در بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *G. rupestris*، بیشترین میزان کشندگی غلظت ۱۰۰ µg/ml و کمترین قدرت کشندگی را غلظت ۱۰ µg/ml بر روی سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی دارد. بررسی‌ها نشان داد که بین اثر کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی *G. rupestris* در سلول سرطانی دهانه‌ی رحم در سطح احتمال p<۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری وجود دارد، اما بین اثر کشندگی غلظت‌های ۲۵ µg/ml و ۵۰ عصاره‌ی جلبک *G. rupestris* تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱).

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018



شکل ۱. مقایسه‌ی درصد کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *G. rupestris* بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسان. آنتنک‌ها نشانه‌ی انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت عصاره در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

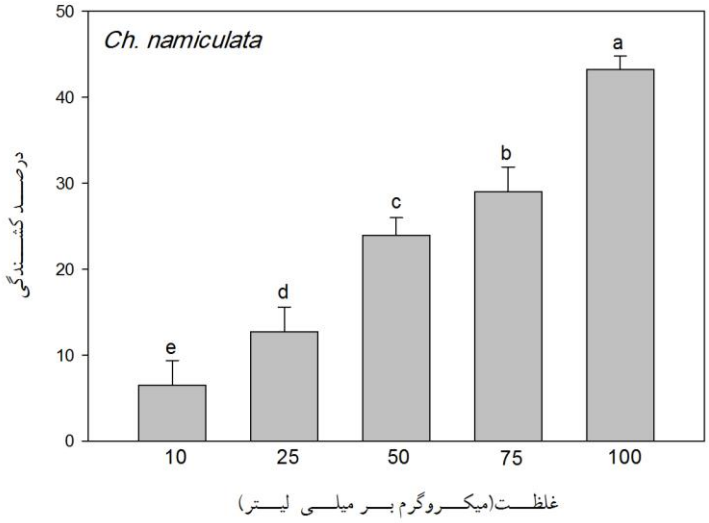
نتایج نشان می‌دهد که در بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *S. aquatilis*، بیشترین میزان کشندگی غلظت ۱۰۰ µg/ml و کمترین قدرت کشندگی را غلظت ۱۰ µg/ml برروی سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی دارد. بررسی‌ها حاکی از این است که بین اثر کشندگی تمامی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی *S. aquatilis* در سلول سرطانی دهانه‌ی رحم در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه‌ی درصد کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *S. aquatilis* بر روی رده‌ی سلول سرطانی رحم انسانی. آنتنک‌ها نشانه‌ی انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت عصاره در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

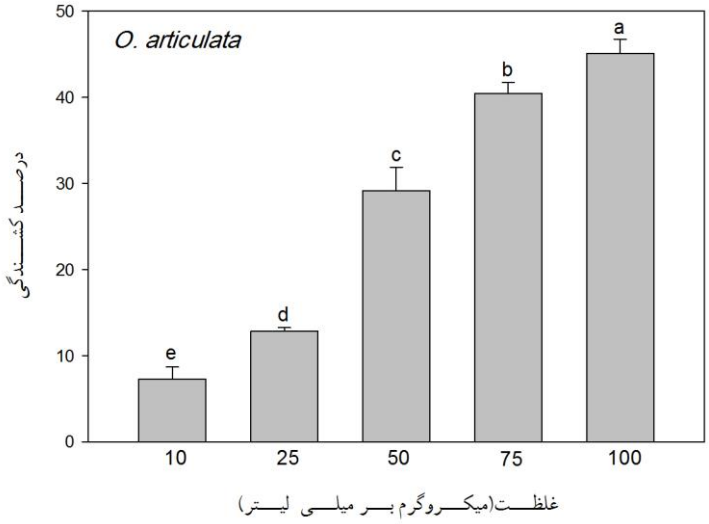
با استناد بر نتایج، در بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *Ch. namiculata*، غلظت ۱۰۰ µg/ml بیشترین میزان کشندگی و غلظت ۱۰ µg/ml کمترین قدرت کشندگی را بر روی سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی دارد. بررسی‌ها نشان دهنده‌ی این است که بین اثر کشندگی تمامی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی *Ch. namiculata* در سلول سرطانی دهانه‌ی رحم در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۳).

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018



شکل ۳. مقایسه‌ی درصد کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *Ch. namiculata* بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی. آنتنک‌ها نشانه‌ی انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت عصاره در سطح احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد.

با تکیه بر نتایج، در بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *O. articulate*، غلظت ۱۰۰ µg/ml بیشترین میزان کشندگی و غلظت ۱۰ µg/ml کمترین قدرت کشندگی را بر روی سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی دارد. بررسی‌ها بیانگر این است که بین اثر کشندگی تمامی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی *O. articulata* در سلول سرطانی دهانه‌ی رحم در سطح احتمال p<۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۴).

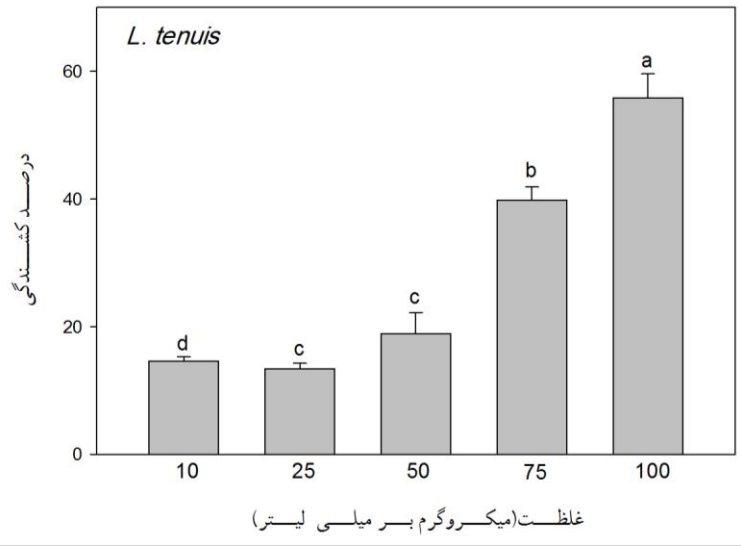


شکل ۴. مقایسه‌ی درصد کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *O. articulata* بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی. آنتنک‌ها نشانه‌ی انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت عصاره در سطح احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد.

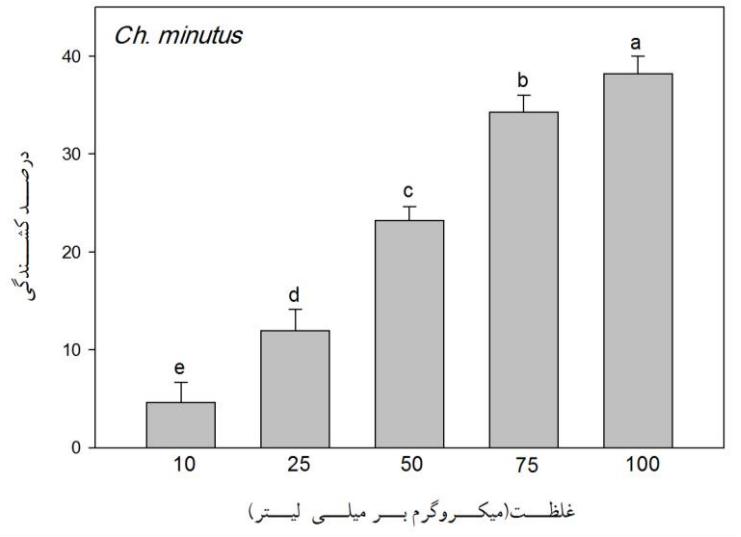
نتایج نشان می‌دهد که در بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *L. tenuis*، بیشترین میزان کشندگی غلظت ۱۰۰ µg/ml و کمترین قدرت کشندگی را غلظت ۲۵ µg/ml برروی سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی دارد. بررسی‌ها نشان داد که بین اثر کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی *L. tenuis* در سلول سرطانی دهانه‌ی رحم در سطح احتمال p<۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری وجود دارد، اما بین غلظت‌های µg/ml ۱۰ و ۲۵ و µg/ml ۱۰ و ۵۰ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۵).

در بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *Ch. minutus*، غلظت ۱۰۰ µg/ml بیشترین میزان کشندگی و غلظت ۱۰ µg/ml کمترین قدرت کشندگی را برروی سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی دارد. بررسی‌ها نشان داد که بین اثر کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی *Ch. minutus* در سلول سرطانی دهانه‌ی رحم در سطح احتمال p<۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۶).

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018



شکل ۵. مقایسه‌ی درصد کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *L. tenuis* بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی. آنتنک‌ها نشانه‌ی انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت عصاره در سطح احتمال $p< ۰/۰۵$ می‌باشد.



شکل ۶. مقایسه‌ی درصد کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *Ch. minutus* بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی. آنتنک‌ها نشانه‌ی انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت عصاره در سطح احتمال $p< ۰/۰۵$ می‌باشد.

بحث

یکی از بیماری‌های شایع و علت اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته که در سال‌های اخیر دانشمندان برای درمان این بیماری تلاش‌های بسیاری انجام داده‌اند سرطان است (Kraljevic *et al.*, 2006). برای درمان سرطان، تعداد محدودی داروهای شیمیایی موثر و مرسوم وجود دارد که آنها نیز اثرات جانبی از قبیل حالت تهوع، استفراغ، اسهال، تحریکات و خارش‌های پوستی و سردرد را ایجاد می‌کنند. (Dhorajiya *et al.*, 2012).

فعالیت زیستی متابولیت‌های ثانویه‌ی سیانوپروکاریوتها بر روی بسیاری از رده‌های سلول سرطانی در پستانداران به اثبات رسیده است (Nagarajan *et al.*, 2012). به عبارتی متابولیت‌های ثانویه‌ی جلبک‌ها که برای رشد معمول خود جلبک‌ها غیرضروری است از جنبه‌ی زیستی و پزشکی بسیار با اهمیت است (Devi and Bhimba, 2012; Mirhoseini Ardakani *et al.*, 2014; Nagarajan *et al.*, 2012). در مطالعه‌ی حاضر تاثیر ضدسرطانی و خاصیت سمیت سلولی و کشندگی گونه‌های سیانوپروکاریوتی چشمه‌ی آب گرم گنو مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های متانولی سیانوپروکاریوت‌ها فعالیت سمیت سلولی بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم انسانی (HeLa) دارند. بنابراین احتمال این‌که عصاره‌های متانولی این سیانوپروکاریوت‌ها منبع بالقوه‌ی ترکیبات زیست‌فعال با ویژگی مثبت ضدسرطانی باشند وجود دارد.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018

نتایج حاصل از مقایسه‌ی تاثیر عصاره‌ی متانولی سیانوپروکاریوت‌های مختلف بر روی رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم نشان داد که بیشترین میزان درصد کشندگی در جلبک *G. rupestris* می‌باشد. عصاره‌های جلبکی *S. articulate* و *L. tenuis* نیز میزان قابل توجهی از درصد کشندگی را نشان دادند. همچنین، کمترین درصد کشندگی در عصاره‌ی جلبکی *Ch. minutus*، *Ch. namiculata* و *O. articulata* مشاهده شد. در این مطالعه از بین ۶ جلبک مذکور تنها عصاره‌ی ۳ جلبک *G. rupestris*، *L. tenuis* و *S. articulate* اثر کشندگی داشتند و در این میان *G. rupestris* بیشترین درصد کشندگی را نشان داد. ۳ جلبک دیگر در غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ که غلظت‌های به‌کار رفته در این آزمایش بود، هیچ تاثیری بر روی سلول‌های سرطانی نداشتند؛ در واقع IC_{50} آن‌ها بالاتر از ۱۰۰ بود.

با توجه به دسته بندی سمیت سلولی ترکیبات طبیعی که توسط Ballantyne در سال ۱۹۹۴ صورت گرفته است، ترکیباتی که IC_{50} آنها بیشتر از ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باشد غیر سمی و ترکیباتی که IC_{50} آنها بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به طور بالقوه مضر (harmful) و ترکیباتی که IC_{50} آنها کمتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر باشد سمی معرفی شده‌اند (Shirazi *et al*., 2004). لذا با توجه به این مطلب از بین عصاره‌ی متانولی ۶ سیانوپروکاریوت آزمایش حاضر، ۳ جلبک *L. tenuis, G. rupestris, S. aquatilis* سمی و ۳ جلبک *Ch. minutus, O. articulata, Ch. namiculata* به صورت بالقوه سمی بودند.

نتایج این تحقیق نشان داد که تاثیر جلبک‌های مذکور بر سلولهای سرطانی دهانه‌ی رحم چندان چشم‌گیر نبود. البته مطالعات انجام شده نشان داده است که رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم بسیار مقاوم است و در برابر داروهای ضدسرطانی مقاومت می‌کند. Galper (۱۹۷۴) بخشی از این مقاومت را ناشی از وجود پلی‌زوم‌ها[1] (حالت چند تایی ریبوزوم‌ها) و نوعی از mRNA در میتوکندری سلول دانسته است، ولی اثبات آن را مستلزم مطالعات بیشتر دانست. اما مطالعات جدیدتر با اطمینان بیشتری از مقاومت بالای سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم می‌گویند. Liu و همکاران (۲۰۱۲) شناسایی پتانسیل مکانیسم‌های مقاومت به درمان و یافتن روابط بین ویژگی‌های بیولوژیکی با تغییرات ژنتیکی را از ملزومات بالقوه‌ی درمان سرطان‌ها و به‌ویژه سرطان دهانه‌ی رحم دانسته اند. مطالعات بسیاری مقاومت بالای سرطان دهانه‌ی رحم نسبت به درمان را یک مشکل بزرگ در مدیریت سرطان دهانه‌ی رحم بیان کرده اند که اغلب این امر را ژنتیکی دانسته‌اند (Contreras *et al*., 2013; Merghoub *et al*., 2009).

Veerabadhran و همکاران (۲۰۱۴) تاثیر سمیت عصاره‌های مختلف ۲۵ سیانوپروکاریوت جمع‌آوری شده از مناطق ساحلی بر رده‌ی سلول سرطانی دهانه‌ی رحم را با استفاده از آزمون MTT بررسی کردند. این عصاره‌ها اثر سمیت و کشندگی بر سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم داشتند، اما هیچ گونه سمیتی بر سلول‌های سالم نداشتند که نشان دهنده مناسب بودن این سیانوپروکاریوت‌ها برای ساخت داروهای ضدسرطان دهانه‌ی رحم بود. Mirhoseini Ardakani و همکاران (۲۰۱۴) تاثیر سمیت سلولی و ضدسرطانی عصاره‌های متانولی نژادهای مختلف سیانوپروکاریوت‌های *Anabaena* و *Leptolyngbya* جمع آوری شده از آب‌های آلوده به نفت جنوب ایران را بر روی سرطان دهانه‌ی رحم بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ی این جلبک‌ها برای سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم سمی بوده و در نتیجه فعالیت ضدسرطانی دارند. همچنین با افزایش غلظت عصاره به‌کار رفته مرگ و میر در سلول‌های سرطانی بیشتر شد. نتایج آنها نشان داد که تاثیر کشندگی جلبک *Anabaena* در غلظت‌های مختلف متفاوت و اغلب افزایش کشندگی سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت همراه بود (Mirhoseini Ardakani *et al*., 2014). Kyadari و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت ضد تکثیر سلول‌های سرطانی عصاره‌ی Dichloromethane و Methanol (۱:۲) سیانوپروکاریوت‌های گونه‌ی *Oscillatoria* sp. و *Lyngbya officinalis* بر روی رده‌ی سرطانی دهانه‌ی رحم در انسان را بررسی کردند. نتایج آزمون MTT در مطالعه آنها نشان داد که عصاره‌ی جلبک‌های نامبرده در کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی دهانه‌ی رحم نقش داشتند. در مطالعه آنها IC_{50} مربوط به جلبک‌های *Oscillatoria* و *L. officinalis* به ترتیب ۲۲۰ و ۲۶۰ µg/ml به دست آمد. آنها عنوان کردند نوع عصاره‌های انتخاب شده و غلظت آن‌ها عامل تاثیرگذار در نتیجه‌ی نهایی بود (Kyadari *et al*., 2014).

[1] Polysome

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018

تاثیر سمیت سیانوپروکاریوت‌های این مطالعه را می‌توان به ترکیبات متعددی نسبت داد. روشهای مختلفی برای سنجش سمیت سلولی ترکیبات طبیعی سیانوپروکاریوتی بر روی رده‌های سلول سرطانی وجود دارد . حتی ترکیبات مختلف بـه‌دسـت آمـده از یک جلبک خاص اثرات متفاوتی را با روش‌های گوناگون بر روی سلولهای سرطانی مختلف القا می‌کنند. مکانیسم‌های دخیل در سمیت سلولی ترکیبات سیانوپروکاریوتی در سلول‌های سرطانی هنوز تا حـد زیـادی مجهـول بـاقی مانـده اسـت امـا مطالعـات متعددی اشاره به توقف چرخه‌ی سلولی، اختلالات میتوکندری، آسیب اکسیداتیو، تغییـرات در سـطح پـروتئین هـای خـاص و تغییرات در فعالیت پمپ سدیم غشا دارند (Costa *et al*., 2012). سـیانوپروکـاریوت‌هـا دارای سـموم متعـدد بـا طبقـه‌بنـدی و مکانیسم عمل متفاوت می‌باشند که بررسی آن‌ها حتی به صورت کلی و بدون وارد شدن بـه حیطـه‌ی جزییـات مبحثـی بسـیار گسترده و تخصصی است. سیانوتوکسین‌ها شامل منبعی غنی از ترکیبات سمی طبیعی می‌باشـند کـه از طریـق نقـل و انتقـال (جذب و ترشح) مواد خاص، سلول های سرطان‌ی را مورد هدف قرار می‌دهند (Zanchett and Failho, 2013).

سالانه چندین مولکول جدید ضدسرطانی از طبیعت جداسازی و گاه با ترکیب چند ماده‌ی موثر ساخته می‌شوند، امـا متاسـفانه اکثر این مولکول‌ها در مراحل تحقیقات بالینی باقی می‌مانند؛ در حالیکه، جامعه‌ی بیماران سرطانی به تولیـدات حاصـل از ایـن مطالعات و به داروهای جایگزین برای داروها و درمان‌های شیمیایی پرعوارض و پرهزینه نیاز دارند.

در این تحقیق، نشان داده شد که عصاره‌های متانولی سیانوپروکاریوت‌های چشمه‌ی آب گرم گنو فعالیت سمیت بالقوه بر رده‌ی سلول سرطان دهانه‌ی رحم انسانی دارند و از این رو می توانند واجد برخی ترکیبات زیست فعال با خاصیت ضد سرطانی باشند که شناسایی این ترکیبات مستلزم مطالعه‌ی بیشتر در این زمینه می‌باشد.

منابـع

آرمان، م.، ریاحی، ح.، حیدری، ف.، سنبلی، ع. ۱۳۹۲. بررسی خواص ضدمیکروبی سیانوباکتری های چشمه آب گرم گنو. مجله بـوم شناسـی آبزیان. سال سوم، شماره ۳، صفحات ۲۴-۱۹.

رحیمی، س.، ذکایی، م.، سلطانی، ن. ۱۳۸۹. فعالیت ضدمیکروبی ۵ گونه جلبک سبز-آبی و ۳ گونه جلبک سبز جمع‌آوری شده از مشهد و حومه. داروهای گیاهی. سال اول، شماره ۲، صفحات ۵۰-۴۷.

Anderson, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier. 578 p.

Bharat, N., Irshad, M., Rizvi, M.M., Fatma, T. 2013. Antimicrobial and cytotoxic activities of cyanobacteria. International journal of innovative research in science, engineering and technology. 2(9): 4328-4343.

Ballantyne, B. 1994. Acute percutaneous systemic toxicity of cyanides. Cutaneous and Ocular Toxicology. 13(3): 249- 263.

Challouf, R., Trabelsi, L., Dhib, R.B., Abed, O.E., Yahia, A., Ghozzi, Kh., Ammar, J.B., Omran, H., Ouada, H.B. 2011. Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 54(4): 831-838.

Contreras-Ortiz, J., Vázquez-Chagoyán, J., Martínez-Castañeda, J., Estrada-Franco, J., Aparicio-Burgos, Acosta-Dibarrat, J., Barbabosa-Pliego, A. 2013. Resistance of cervical adenocarcinoma cells (HeLa) to venom from the scorpion Centruroides limpidus limpidus. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases. 19: 20.

Costa, M., Costa-Rodrigues, J., Fernandes, M., Barros, P., Vasconcelos, V., Martins, R. 2012. Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: a review on the implication of apoptosis. Marine Drugs. 10: 2181-2207.

Devi, J.S., Bhimba, B.V. 2012. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed *Ulva lactuca* invitro. Open Access Scientific Reports. 1(4): 1-5.

Dhorajiya, B., Malani, M., Dholakiya, B. 2012. Extraction and preservation protocol of anti-cancer agents from marine world. Chemical Sciences Journal. 2012: 1-13.

Galper, J. 1974. Mitochondrial protein syntheses in Hela cells. The Journal of Cell Biology. 60 (3): 755-763.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 4:04 +0430 on Sunday June 24th 2018

Hisem, D., Hrouzek, P., Tomek, P., Tomsickova, J., Zapomelova, E., Skacelova, K., Lukesova, A., Kopecký, J. 2011. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. Toxicon. 57(1): 76-83.

Kraljevic, S., Sedic, M., Scott, M., Gehrig, P., Schlapbach, R., Pavelic, K. 2006. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: what can be seen from the proteomics point of view? Cancer Treatment. 32(8): 619-629.

Kyadari, M., Fatma, T., Velpandian, T., Malliga, P., Bharat, N., Bano, F. 2014. Antiangiogenic and antiproliferative assessment of cyanobacteria. Indian Jornal of Experimental Biology. 52(8): 835- 842.

Liu, J., Yang, L., Zhang, J., Zhang, J., Chen, Y., Li, K., Li, Y., Li, Y., Libo, Y., Guo, G. 2012. Knock-down of NDRG2 sensitizes cervical cancer Hela cells to cisplatin through suppressing Bcl-2 Expression. BMC Cancer. 12: 370.

Malaker, A., Ahmad, S.I. 2013. Therapeutic potency of anticancer peptide derived from marine organism. International Journal of Engineering and Applied Sciences. 2(3): 82-94.

Mary, J.S., Vinotha, P., Pradeep, A.M. 2012. Screening for *in vitro* cytotoxic activity of seaweed, *Sargassum* sp. against Hep-2 and MCF-7 cancer cell lines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 13(12): 6073-6076.

Merghoub, N., Benbacer, L., Amzazi, S., Morjani, H., Elmzibri, M. 2009. Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines. Journal of Medicinal Plants Research. 3(12): 1045- 1050.

Mirhoseini Ardakani, S., Dezfulian, M., Soltani, N. 2014. Implementation antiviral activity of cyanobacteria collected from Oil-Polluted areas in south of Iran. Advances in Environmental Biology. 8(9): 147- 152.

Nagarajan, M., Maruthanayagam, V., Sundararaman, M. 2013. SAR analysis and bioactive potentials of freshwater and terrestrial cyanobacterial compounds a review. Journal of Applied Toxicology. 33(5): 313- 349.

Paul, S., Pal, R., Kundu, R. 2012. Antiproliferative activity of *Phormidium valderianum* and *Phormidium tenue* (Cyanobacteria) on human cervical cancer cells (HeLa) in vitro. Journal of Algal Biomass Utilization. 3(4): 30-37.

Shanab, S.M., Mostafa, S.S., Shalaby, E.A., Mahmoud, G.I. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(8): 608-615.

Shirazi, F.S., Ahmadi, N., Kamalinejad, M. 2004. Evaluation of northern Iran *Mentha peulegium* cytotoxicity. Daru.12(3).106-110.

Veerabadhran, M., Manivel, N., Mohanakrishnan, D., Saha, D., Muthuraman, S. 2014. Antiplasmodial activity of extracts of 25 cyanobacterial species from coastal regions of Tamil Nadu. Pharmaceutical Biology. 52(10): 1291-1301.

Voloshko, L., Kopecky, J., Safronova, T., Pljusch, A., Titova, N., Hrouzek, P., Drabkova, V. 2008. Toxins and other bioactive compounds produced by cyanobacteria in Lake Ladoga. Estonian Journal of Ecology. 57(2): 100- 110.

Yousefzadi, M., Heidari, M., Akbarpour, M., Mirjalili, M., Zeinali, A., Parsa, M. 2011. In *vitro* cytotoxic activity of the essential oil of *Dorema ammoniacum* D. Don. Middle-East Journal of Scientific Research. 7(4): 511-514.

Zanchett, G., O-Failho, E.C. 2013. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. Journal of Toxins. 5: 1896-1917.

Zarrini, G., Rasooli, I., Abazari, M., Ghasemi, Y. 2011. Investigation of antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from Urmia Lake catchment area. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 11(4): 329-336.