شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۷۳-۶۳

اثرات سایتوتوکسیک عصاره فوکوییدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum ilicifolium* سواحل خلیج فارس در القای آپوپتوز رده سلول‌های سرطانی پستان

فرهاد نیک‌نژاد [۱]، معظمه کردجزی[۲]*، امید اسدی فارسانی[۳]، کوشان سینه‌سپهر[۴]

۱. دانشیار قارچ‌شناسی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۲. استادیار فرآوری محصولات شیلاتی، گروه فرآوری محصولات شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳. دانشجوی مقطع دکترا فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۴. استادیار ایمنی‌شناسی پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۱۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸

چکیده

جلبک‌ها به عنوان منابع بالقوه جدید و دارای عوامل فعال زیستی، محققین زیادی در زمینه‌های مختلف دارویی، پزشکی و غذایی را به سوی خود جذب کرده‌اند. یکی از گونه‌های جلبکی که در مناطق ساحلی و شمالی خلیج فارس رشد می‌کند، *Sargassum ilicifolium* بوده که ممکن است اثرات غذایی و دارویی منحصر به فردی را داشته باشد. فوکوییدان از پلی‌ساکاریدهای موجود در این جلبک است که تحقیقات زیادی به اثرات ضد سرطانی آن پرداخته است. پس از استخراج فوکوییدان، بررسی‌های MTT، کشت سلولی، زنده‌مانی و آپوپتوز انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد، که در طی ۲۴ ساعت در غلظت ۱ μg/ml از عصاره باعث کاهش ۲ درصدی قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها شده و غلظت ۶۰ μg/ml باعث کاهش قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها تا کمتر از ۳۰ درصد گردیده و میزان IC_{50} برابر با۳۰-۲۰ μg/ml بود. همچنین نتایج به‌دست آمده از الایزا نشان از القا آپوپتوز توسط عصاره روی سلول‌های سرطانی دارد.

واژگان کلیدی: *Sargassum ilicifolum*، فوکوییدان، آپوپتوز، سرطان، خلیج فارس.

* نویسنده مسئول: معظمه کردجزی
Email: kordjazi@gau.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 1, Spring 2022
pp. 63-73

Cytotoxic effects of the fucoidan extracted from Persian Gulf brown algae *Sargassum ilicifolium* inducing apoptosis in breast cancer cell line

Farhad Niknejad[1], Moazameh Kordjazi[2*], Omid Asadi Farsani[3], koushan Sinehsepehr[4]

1. Associate Professor of Medical Mycology, Dept. of Laboratory Sciences, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
2. Assistant Professor of Seafood processing, Dept. of Fisheries engineering and Sciences, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.
3. Ph.D student, Dept. of Seafood processing, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran
4. Assistant Professor of Medical Immunology, Dept. of Laboratory Sciences, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Received: 21-Feb-2021 **Accepted: 10-Oct-2021**

Abstract
Algae as a new potential sources and active agents, have attracted many researchers in the field of pharmaceutical, medical and nutrition. *Sargassum ilicifolium* a seaweed that grows in the coastal and northern regions of the Persian Gul, may have unique nutritional and pharmaceutical effects because of fucoidan, one of the polysaccharides found in this seaweed. This survey, after extraction of fucoidan, have been conducted on its anticancer effects such as MTT assay, cell culture, viability and apoptosis. According to the results, within 24 h, cell viability at 1μg/ml of the extract reduced by 2% and at concentration of 60 μg/ml, reduced less than 30% and the IC_{50} was 20-30 μg/ml. Also the results obtained from ELISA showed apoptosis was induced by the extract on cancer cells.

Keywords: *Sargassum ilicifolium*, Fucoidan, Apoptosis, Cancer, Persian Gulf

Corresponding author: Moazameh Kordjazi Email: kordjazi@gau.ac.ir

۱. مقدمه

مطالعات نشان می‌دهد که از گذشته جلبک‌های دریایی توسط انسان به عنوان غذا و دارو استفاده شده‌اند (Aaronson, 2000). این گیاهان دریایی منبع غنی از ترکیبات زیست فعال با کارایی بالا به شمار می‌روند که قادر به تولید انواع زیادی از متابولیت‌ها با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی‌اند (Cox *et al*., 2010). تاکنون ترکیبات زیستی متعدد با کاربردهای متنوع همچون اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و جداسازی شده است (Duan *et al*., 2010). گونه جلبکی *Sargassum ilicifolium* از دسته جلبک‌های قهوه‌ای است که در سواحل شمالی خلیج فارس به وفور یافت می‌شود. این جلبک‌های دریایی حاوی مقادیر زیادی از پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای، اسیدهای آمینه لیزین، لوسین، ایزولوسین، فنیل‌آلانین، والین و ترئونین، ویتامین‌های C، A، E، تیامین، ریبوفلاوین و نیاسین، اسیدهای چرب آراشیدونیک، پالمتیک، استئاریک، لینولئیک، EPA و DHA، فیبر، چربی، پروتئین، فسفات، نیترات، کربوهیدرات، آستاگزانتین و سایر ترکیبات مغذی است (Mabeau and Fleurence, 1993; Wong and Cheung, 2000; De Silva and Barbosa, 2018). از دسته ترکیبات مهم موجود در جلبک‌های قهوه‌ای می‌توان به پلی‌ساکاریدهای سولفاته فوکوییدان اشاره کرد. فوکوییدان تنها در جلبک‌های قهوه‌ای و برخی از بی‌مهرگان دریایی مانند توتیا و خیار دریایی وجود دارد (Chizhov *et al*., 1999; Li *et al*., 2008). در دهه‌های گذشته، طی مطالعات داخلی و خارجی انجام شده بر فوکوییدان‌های استخراج شده از گونه‌های جلبکی مختلف، فعالیت زیستی متفاوتی از قبیل خواص ضدانعقادی، ضدویروس، ضدتومور، محرک ایمنی، ضدالتهاب، کاهنده چربی خون، آنتی‌اکسیدانت، اثرات محافظتی گوارشی و غیره گزارش شده است. در سال‌های اخیر نیز بررسی‌های متعددی بر اثرات دارویی و غذایی آن‌ها صورت گرفته است (Thuy*et al*., 2015; Pinheiro *et al*., 2015; Mohsin *et al*., 2016; Pushparaj *et al*., 2017). بنابراین، چنین کاربردهای بالقوه‌ای از فوکوئیدان، آن را به موضوع جالبی برای تحقیقات علمی تبدیل کرده است. امروزه سرطان یک تراژدی انسانی محسوب می شود و شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان در حال افزایش است. مطابق گزارش WHO در سال ۲۰۰۸، ۱۲/۷ میلیون نفر به عنوان بیمار سرطانی تشخیص داده شده و سالانه ۷/۶ میلیون نفر در دنیا به علت بیماری سرطان می‌میرند (Tavakoli *et al*., 2012). در طول سال‌های گذشته پیشرفت‌های زیادی در توسعه درمان تومورها مثل جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی صورت گرفته است. با این حال بیماران زیادی هنوز به این درمان‌ها مقاوم هستند و امروزه سرطان یکی از مهمترین عوامل مرگ‌ومیر در دنیا محسوب می‌شود. بنابراین، استراتژی‌های جدیدی برای افزایش بقاء و بهبود زندگی بیماران سرطانی نیاز است (Azadmehr *et al*., 2011; Ale *et al*., 2011). در دهه‌های گذشته، طی مطالعه بر فوکوئیدان‌های استخراج‌شده از گونه‌های مختلف جلبکی، فعالیت‌های زیستی مختلفی از قبیل خواص ضدانعقادی، ضدویروس، ضدتومور، محرک ایمنی، ضدالتهاب، کاهنده چربی خون، آنتی‌اکسیدانت، ضدباکتریایی و غیره گزارش شده است. در سال‌های اخیر نیز بررسی‌های متعددی بر اثرات زیستی آن‌ها انجام شده است (Ale *et al*., 2011 ;Li *et al*., 2015). تغذیه موش (Sprague–Dawley) با پلی ساکارید فوکوییدانی استخراج شده از جلبک *U. pinnatifida* (۱۵۰، ۴۵۰ و ۱۳۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) به مدت ۴ هفته، هیچ سمیت خوراکی نداشته است (Kim *et al*., 2010). تشکیل سلول‌های سرطانی در بدن انسان به طور مستقیم تحت تاثیر رادیکال‌های آزاد قرار دارد، امروزه استفاده از داروهای ضدسرطانی زیستی و طبیعی به‌عنوان عامل بازدارنده این بیماری‌ها رو به گسترش است. از این‌رو، ترکیبات مهارکننده رادیکال‌های آزاد مانند

پلی‌ساکاریدهای فوکوییدانی، می‌توانند به طور غیرمستقیم در کاهش ایجاد سرطان در انسان نقش داشته باشند. بیشتر ترکیبات ضدسرطانی زیستی توانایی مهار رشد سلول‌های سرطانی را بدون یا به میزان خیلی اندک اثرات جانبی، دارا هستند. بنابراین، شناسایی ترکیبات موثر در جلوگیری از سرطان به عنوان رویکردی جهانی مطرح‌اند (Wijesekaraa and Pangestutia, 2011). خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی فوکوییدان، این ترکیبات پلی‌ساکاریدی را به عنوان مواد ممانعت کننده جدید در درمان سرطان معرفی می کند (Wang *et al*., 2015). امروزه نیز فوکوئیدان‌ها به دلیل خصوصیات منحصر به فرد خود، به عنوان مواد اولیه برای ساخت داروهای جدید و ترکیبات غذایی بهبود دهنده سلامت مورد استفاده قرار می‌گیرند. به همین دلیل مطالعاتی روی سمیت این مواد در گونه‌های مختلفی از جلبک‌های قهوه‌ای انجام شده است (Mohammadi *et al*., 2016). در تحقیقی دیگر سمیت حاد را با مقادیر مختلفی از فوکوییدان جلبک قهوه‌ای *Cladosiphon okamuranus* روی موش به صورت خوراکی آزمایش کردند و سمیت معنی‌داری در مقدار روزانه ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان مشاهده نکردند. در مقادیر ۱۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و بیشتر از آن باعث افزایش زمان انعقاد به طور معنی‌داری شد. اما علائم دیگری از سمیت مشاهده نگردید (Gideon and Rengasamy, 2008). در مطالعه‌ای بیان کردند که فوکوییدان می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی روده القا کند (Kim *et al*., 2010). همچنین فعالیت بالای بیولوژیکی و کاربردهای وسیع فوکوئیدان استخراج شده از جلبک‌های قهوه‌ای در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و تغذیه دام و طیور را گزارش شده است (Wijesinghe and Jeon, 2012). اثرات مثبت فوکوییدان استخراج شده از *Turbinaria conoides* در جلوگیری از گسترش و پیشرفت سرطان پانکراس را نیز گزارش کرده‌اند (Delma *et al*., 2015). پتانسیل ضدسرطانی پلی‌ساکاریدهای جلبک‌های قهوه‌ای و خواص ضدسرطانی و ضدتوموری فوکوییدان و لامینارین نیز به اثبات رسیده است (Sanjeewa *et al*., 2017). بیان شده است که فوکوییدان می تواند به عنوان یک ماده ضدسرطان، از توسعه و گسترش توده سلولی سرطانی جلوگیری کند (Kwak, 2018). پتانسیل زیست‌فعال پلی‌ساکاریدهای سولفاته فوکوییدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum sp* در ارتباط با سلامتی انسان مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده است که با توجه به مضرات داروهای شیمیایی ضدانعقاد، ضدسرطان، ضدالتهاب و غیره، استفاده از داروهای طبیعی می‌تواند موثرتر از داروهای ساختگی باشد (Sanjeewa *et al*., 2018). با توجه به اهمیت بسیار بالای جلبک‌ها و کاربردهای متنوع آن‌ها مطالعات گسترده‌ای روی آن‌ها صورت گرفته است. همچنین با توجه به استفاده‌های گوناگون از جلبک‌های دریایی در زمینه‌های مختلف و اهمیت این موجودات آبزی با دیدگاه‌های مختلف علمی مانند جنبه‌های بوم‌شناسی، زیست‌محیطی، تغذیه‌ای، پزشکی و نیز فناوری زیستی یا بیوتکنولوژی، انجام پژوهش‌های گوناگون به خصوص بررسی پزشکی و دارویی و سنجش پتانسیل گونه‌های مختلف در کشور ما یک ضرورت تلقی می شود. لذا، دراین پژوهش، پس از استخراج پلی‌ساکاریدهای سولفاته فوکوییدان از جلبک قهوه‌ای *Sargassum sp*، این ماده در بررسی‌های MTT، کشت سلولی، زنده‌مانی و آپوپتوز روی سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. روش استخراج فوکوئیدان

۲۰ گرم پودر جلبک در یک لیتر اتانول ۸۵ درصد مخلوط شد، سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق به منظور حذف رنگدانه‌ها و پروتئین همراه با تکان مکانیکی مداوم قرار گرفت. پس از آن نمونه‌ها با استون شسته و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰×g سانتریفیوژ و در دمای اتاق خشک شدند. سپس ۵ گرم از مواد خشک شده فوق، با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه در دمای ۶۵ درجه

سانتی‌گراد، همراه با تکان دادن به مدت یک ساعت، عصاره‌گیری شد (این عمل یک‌بار دیگر تکرار گردید)، سپس عصاره‌ها جمع و باهم مخلوط گشته و با دور ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری و با کلرید کلسیم ۱ درصد مخلوط شدند تا در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در طول شب ته‌نشست اسید آلژینیک صورت گیرد. پس از حذف اسیدآلژینیک، باقی مانده مواد با دور ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و بار دیگر سوپرناتانت جمع آوری و با اتانول ۹۶ درصد برای رسیدن به غلظت نهایی اتانل ۳۰ درصد مخلوط شدند و به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه، از اتانل ۹۶ درصد برای رسیدن به غلظت نهایی اتانول ۷۰ درصد استفاده گردید. سپس محلول حاصل تمام شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. فوکوئیدان با عمل فیلتر نمودن با استفاده از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرومتر همراه با ۳ بار شستشوی مداوم با اتانول ۹۶ درصد و استون به دست آمد و در نهایت کاغذ صافی آغشته به مواد فوکوئیدانی تمام شب در دمای اتاق خشک گردید. مقدار فوکوئیدان بر حسب وزن خشک نمونه پودر شده با اتانول ۸۵ درصد محاسبه شد. تعیین ترکیب شیمیایی فوکوئیدان بوسیله HPLC انجام شد (Mehdinezhad *et al*., 2016).

۲.۲. تهیه محلول PBS

از نمک‌های ذکر شده KH2PO4=0/2g، NaCl=8gr، DW=1000cc، Na_2Hpo_4.12H2o=2.85gr و Kcl=0/2gr در آب مقطر تهیه گردید (Oh *et al*., 2014).

۳.۲. تهیه محلول PBS/EDTA

مقدار ۰/۰۲ گرم از پودر EDTA در ۱۰۰ سی سی بافر PBS حل گردید (Oh *et al*., 2014).

۴.۲. تست MTT

این تست MTT[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] شامل تبدیل نمک تترازولیوم به ماده رنگی فورمازان (formazan) به وسیله میتوکندری سلول‌های فعال است که این محصول کاملا در محلول اسیدیک ایزوپروپانل حل می‌شود. به طور غیرمستقیم می‌توان میزان تکثیر سلول‌ها، تغییرات viability و خاصیت سیتوتوکسیک عامل مداخله‌گر را بررسی نمود. پس از اینکه سلول‌ها حدود ۶۰-۵۰درصد رشد نمودند و در مجاورت عصاره در زمان و غلظت‌های مختلف قرار گرفتند، با محلول PBS استریل شستشو داده شدند و سپس محیط کشت تازه نرمال حاوی MTT اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، سپس به سلول‌ها DMSO و Sorenson buffer اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پلیت‌ها در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج 570nm بررسی شد. در این آزمایش ۵۰۰۰ عدد cells/well و به صورت تریپلیکت، در زمان‌های ۲۴ ساعت تحت تیمار با عصاره در غلظت‌های صفر-کنترل (PBS)، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ µg/ml قرار گرفتند. همچنین در آزمایش دیگری ۵۰۰۰ عدد سلول و با سه تکرار در طی ۱۲ ساعت سلول‌ها تحت تیمار با تاکسول در غلظت‌های صفر-کنترل (PBS) ۰، ۴/۲، ۸/۵، ۱۲، ۱۷و ۴۲µg/ml قرار گرفتند (Nagamine *et al*., 2009).

۵.۲. کشت سلولی

رده سلولی MCF7 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران (ایران) خریداری شده و در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ FCS کشت داده می‌شوند. سپس این سلول‌ها وقتی که حدود ۶۰-۵۰٪ رشد نمودند در مجاورت با عصاره در زمان و غلظت‌های مختلف قرار می‌گیرند. اثرات آپوپتوزی و نکروزی عصاره روی سلول‌های سرطانی بررسی می‌شود. یک‌سری از سلول‌ها به عنوان کنترل در محیط کشت طبیعی فاقد عصاره جلبک رشد می‌کنند (Nagamine *et al*., 2009).

۶.۲. زنده مانی

رنگ آمیزی به وسیله تریپان‌بلو برای مشخص نمودن (viability) و تعیین نسبت سلول‌های زنده به مرده با میکروسکوپ نوری انجام شد (Choo *et al*., 2016).

۷.۲. بررسی آپوپتوز به روش الایزا

این آزمایش برای مشخص نمودن اثر القای آپوپتوزی عصاره و مقایسه آن با تاکسول انجام گرفت. از کیت Cell Death Detection ELISA (Roche .Cat.No: 11 774 425 001) برای مشخص شدن آپوپتوز استفاده شد. این کیت دارای دو نوع آنتی‌بادی مونوکلونال موشی شناسایی کننده هیستون‌ها و قطعات DNA است. سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ عدد cells/well را به هر خانه پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و با سه تکرار در طی ۱۲ ساعت، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره برابر صفر-کنترل (PBS) ۱۰،۲۰،۳۰،۴۰ و ۶۰ µg/ml و غلظت‌های مختلف تاکسول صفر-کنترل (PBS)، ۰، ۴/۲، ۸/۵، ۱۲ و ۱۷ µg/ml قرار گرفتند (Choo *et al*., 2016).

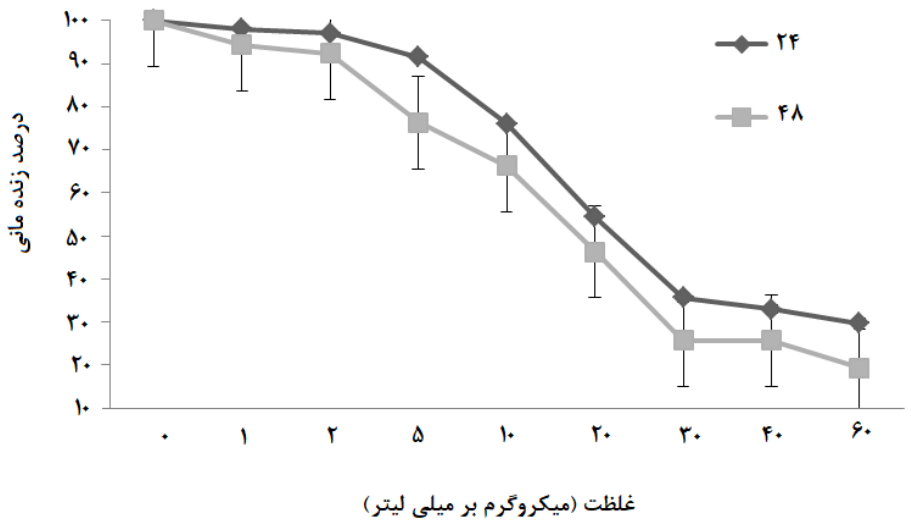
۸.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش ها با سه تکرار انجام شد و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها ازتجزیه واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد و برای مقایسه میانگین‌ها از روش تست چند دامنه‌ای دانکن در سطح $p<0.05$ استفاده شد.

۳. نتایج

۳.۱. بررسی اثرات سایتوتوکسیک

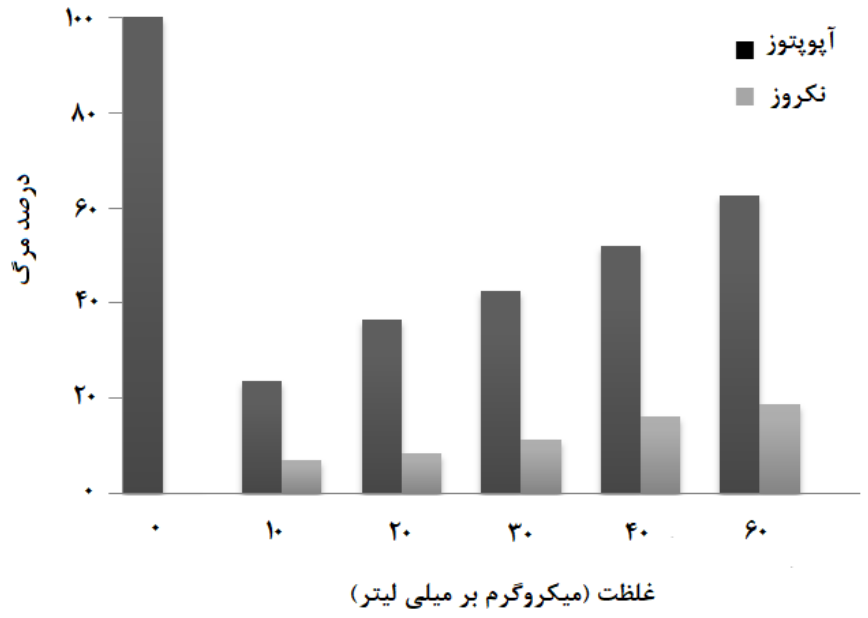
آزمایش MTT برای تعیین اثرات سایتوتوکسیک عصاره، تعیین دقیق‌تر قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها انجام شد. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۰-۶۰µg/ml (کنترل-PBS) از عصاره در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت، اثر سایتوتوکسیک عصاره به صورت نمودار ۱ نشان داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد، که در طی ۲۴ ساعت قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها در غلظت µg/ml ۱ از عصاره باعث کاهش ۲درصدی قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها شده و غلظت µg/ml ۶۰ باعث کاهش قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها تا کمتر از ۳۰ درصد خواهد گردید و میزان LC_{50} برابر با µg/ml ۳۰-۲۰ است. (LC_{50} غلظتی از عصاره است که در آن غلظت ۵۰ درصد سلول‌ها زنده و ۵۰ درصد سلول‌ها از بین رفته‌اند).



شکل ۱- تاثیر سایتوتوکسیک عصاره طی ۲۴و۴۸ ساعت بر سلول‌های سرطانی پستان

۳.۲. بررسی آپوپتوز به روش ELISA

با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش MTT غلظت‌های مختلف (کنترل-PBS) از عصاره و زمان ۲۴ ساعت برای بررسی خاصیت القاءکنندگی آپوپتوز در نظر گرفته شدند و نتایج آن در نمودار شکل۲ نشان داده شده است. نتایج به‌دست آمده از الایزا نشان از القا آپوپتوز توسط عصاره روی سلول‌های سرطانی دارد.



شکل ۲- بررسی القاء آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

طبق نتایج بدست آمده از نمودارشکل۱، در طی ۴۸ ساعت قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها در غلظت ۱ µg/ml از عصاره باعث کاهش نزدیک به ۵ درصدی قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها شده که از طریق نسبت سلول‌های زنده به مرده با میکروسکوپ نوری تعیین می‌شود. غلظت ۶۰ µg/ml نیز باعث کاهش قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها تا ۲۰ درصد گردید، میزان LC_{50} برابر با ۲۰-۱۸ µg/ml بود، در واقع غلظتی از عصاره که در آن غلظت ۵۰ درصد سلول‌ها زنده و ۵۰ درصد سلول‌ها از بین رفته‌اند.

که طبق نتایج به‌دست آمده با افزایش عصاره قابلیت زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی کاهش یافت. بررسی‌ها تشریح کرده‌اند که فوکوییدان خام به‌طور پیشرونده‌ای فسفوریلاسیون ERK1/2 را از یک ساعت تا نه ساعت بعد از تیمار کاهش داده است. JNK و P38 دیگر ابرخانواده MAPKهستند که به‌طور فعالی توسط فوکوییدان تغییر کرده‌اند. فوکوییدان سبب مرگ سلولی در سرطان پستان از طریق فسفوریلاسیون و فعال کردن JNK و P38 پس از سی دقیقه القا شده است (Cumashi *et al.*, 2007). همچنین نتایج یک تحقیق نشان داد که فوکوییدان از تکثیر سلول‌های توموری و چسبیدن آن‌ها به ترکیبات دیگر جلوگیری می‌کند (Rocha *et al.*, 2007).

در مطالعه‌ای اثر مهارکنندگی فوکوییدان استخراج‌شده از جلبک دریایی *fucos vesiculosus* در مهاجرت و تهاجم سلول سرطان ریه انسان از طریق مسیر PI3K-AKt-mTOR بررسی گردید. در این مطالعه عملکرد ضدمتاستازی فوکوییدان و مکانیسم عمل آن با

استفاده از A549 سل‌لاین متاستاتیک سرطان ریه انسان بررسی گردید. فوکوییدان رشد سلول‌های A549 را در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار کرد. تیمار فوکوییدان از دوز غیرسمی (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) غلظت‌های وابسته به مهارکنندگی با تأثیر بر تهاجم و مهاجرت سلول سرطانی از طریق کاهش فعالیت MMP-2 دارد. برای شناخت مکانیسم اثر مهارکنندگی آن وسترن بلات انجام گرفت (Lee *et al*., 2012). در یک تحقیق با بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی فوکوییدان، این ترکیبات پلی‌ساکاریدی را به عنوان مواد ممانعت کننده جدید در درمان سرطان معرفی کردند (Wang *et al*., 2015). همچنین گزارش شده است که بیماران مصرف‌کننده پلی‌ساکارید فوکوییدان، دوره شیمی‌درمانی را بهتر تحمل کردند (Chen *et al*., 2015). در مطالعه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کشندگی علیه رده سلولی HCT-15 با فوکوییدان استخراج شده از جلبک *Surgussum cinereum* بررسی گردید. خالص‌سازی فوکوییدان توسط DEAE سلولز و دیالیز انجام شد. اثر آنتی‌اکسیدانی فوکوییدان از جلبک سارگاسوم سینریوم توسط DPPH تعیین شد. بیشترین فعالیت DPPH در غلظت ۱۰۰ میکروگرم یافت شد. درحالی‌که فوکوییدان خام استخراج شده فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد در ۶۳/۵۸ را نشان داد. اثر کشندگی توسط MTT بررسی گردید. فوکوییدان استخراج شده سبب ۵۰درصد مرگ سلولی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با ۰/۹۰۳۷±۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر درHCT-15 شد (Somasundaram *et al*., 2016).

طبق نمودار شکل۲، در طی ۲۴ ساعت القا آپوپتوز در غلظت ۱۰ µg/ml عصاره باعث مرگ ۲۰ درصد سلول‌های سرطانی شده و این میزان مرگ سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت عصاره تا ۶۰ µg/ml به ۶۰ تا ۷۰ درصد سلول‌های سرطانی می‌رسد. طبق نتایج بدست آمده با افزایش غلظت عصاره، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی نیز افزایش پیدا می‌کند. در سرطان پستان موش ویژگی‌های ضدسرطانی و مکانیسم فوکوییدان به‌طور آزمایشگاهی و بالینی بررسی گردید. در نمونه آزمایشگاهی، رنگ‌آمیزی فلورسنس، فلوسیتومتری و وسترن بلات برای تجزیه و تحلیل آپوپتوز و بیان فاکتور رشد اندوتلیالی در سل‌لاین 4T1 سرطان پستان موش انجام شد. در نمونه بالینی درمان روی ژن c/Babl موش‌های حامل سرطان پستان صورت گرفت. تزریق درون پریتونئالی فوکوییدان در مدل سرطان پستان سبب کاهش حجم و وزن تومور شد. افزایش تأثیر ضدسرطان وابسته به کاهش آنژیوژنز و افزایش القای آپوپتوز بیان شد. این مطالعه نشان داد فوکوییدان خالص رشد سرطان پستان موش را در مدل‌های آزمایشگاهی و بالینی محدود خواهد کرد (Xue *et al*., 2012). همچنین بررسی‌ها نشان داد که فوکوییدان در محیط آزمایشگاه قادر به مهار رشد سلول‌های سرطانی است. در مطالعه‌ای که روی بیان ژن ERBB2/EGFR در شش رده سلولی سرطانی انتخاب شده به‌عنوان مدل آزمایشگاهی بررسی گردید و حساسیت آن‌ها به رژیم فوکوییدان در حضور مهارکننده تیروزین کیناز الپاتینیب و مهارکننده تیروزین‌کیناز در عدم حضور رژیم فوکوییدان سنجیده شد. نتایج نشان داد، در آزمون حساسیت مستقل از دارو، رژیم فوکوییدان به‌تنهایی بیان ژن‌های BB2/EGFR در رشد سلول‌های سرطانی را در آزمایشگاه محدود نمی‌کند. هنگامی‌که رژیم فوکوییدان در ترکیب با الپاتینیب باشد، اگرچه رشد سلول را در یک سل‌لاین محدود کرد اما در سایر رده‌های سلولی به‌طور مغایری با الپاتینیب عمل می کند. این مطالعه نشان داد که رژیم فوکوییدان این پتانسیل را دارد اثر بعضی از داروهای ضدسرطانی را در برخی از انواع سلول سرطانی کاهش یا افزایش دهد (Oh *et al*., 2014). فوکوییدان به‌طور گسترده‌ای متاستاز سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهد. با سلول‌های سرطانی برای اتصال به غشای پایه رقابت می‌کند و به این شکل از تهاجم سلول سرطانی جلوگیری می‌کند. مطالعات بعدی نشان دادند که فوکوییدان با تمایل بالایی به فیبرونکتین متصل می‌گردد و از اتصال سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (Atashrazm *et al*., 2015). در مطالعه‌ای اثر فوکوییدان

بر سلول‌های DU-145 سرطان پروستات، جلوگیری از بیان مسیر MAPK و P13k/AKt را نشان داد. در این مطالعه نشان داده شد که سیگنال‌های وابسته به خاصیت ضدسرطانی فوکوییدان در سلول‌های سرطان پروستات، سبب سرکوب تکثیر شده است. فوکوییدان به‌طور قابل‌توجهی بقا سلول‌های سرطانی DU-145 را در غلظت‌های وابسته به دوز MTT کاهش داده است. بنابراین، فوکوییدان ممکن است نویدبخش داروی بازدارنده سرطان به‌واسطه اثرات مهارکنندگی رشد و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان پروستات باشد (Choo *et al*., 2016).

نتیجه‌گیری کلی

ماکروجلبک‌های دریایی می توانند نقش مهمی را در تولید ترکیبات زیست فعال به عنوان دارو باشند و کمک شایانی را در پیشگیری و ابتلای انسان به بسیاری از بیماریها داشته باشند. در این تحقیق اثرات سایتوتوکسیک عصاره فوکوییدانی استخراج شده از جلبک قهوه ای جنس *Sargassum ilicifolium* در القای آپوپتوز در رده سلول های سرطانی پستان مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن نشان‌دهنده نقش مثبت فوکوئیدان در القای آپوپتوز و ایجاد سمیت برای سلول‌های سرطانی بود، از این رو فوکوییدان می‌تواند عامل امیدوار کننده‌ای برای استفاده در صنایع دارویی و غذایی باشد.

تشکر و قدردانی

از تمامی پرسنل و کارکنان دانشگاه‌های علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشگاه علوم پزشکی گلستان که نهایت همکاری را داشته‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

۵. منابع

References

Aaronson, S., 2000. Algae. In cambridge UK, In: The cambridge world history of food, kiple, k. and ornelas, KC, Eds. Cambridge university press, pp. 231-249.

Ale, M.T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J.D., Meyer, S., 2011. Fucoidan from Sargassum sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules* 49(3), 331-336.

Atashrazm, F., Lowenthal, R.M., woods, G., Holloway, A., Dickinson, J., 2015. Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Journal of Marine drugs* 13(4), 2327-2346.

Azadmehr, A., Hajiaghaee, R., Afshari, A., Amirghofran, Z., Refieian-Kopaei, M., 2011. Evaluation of in vivo immune response activity and in vitro anti-cancer effect by *Scrophularia megalantha*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(11), 2365-2368.

Chen, Y., Tsai, Y., Tsai, T., Chiu, Y., Wei, L., 2015. Fucoidan supplementation improves exercise performance and exhibits anti-fatigue action in mice. *Nutrients Journal* 7(1), 239-252.

Chizhov, A.O., Dell, A., Morris, H.R., 1999. A study of fucoidan from the brown seaweed *chorda filum*. *Journal of Carbohydrate Research* 320(1-2), 108-119.

Choo, G.S., Lee, H.N., Shin, S.A., Kim, H.J., Jung, J.Y., 2016. Anticancer effect of fucoidan on DU-145 prostate cancer cells through inhibition of PI3K/Akt and MAPK pathway expression. *Marine drugs* 14(7), 126.

Cox, S., Abu-Ghannam, N., Gupta, S., 2010. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible irish seaweeds. *International Food Research Journal* 17(1), 205-220.

Cumashi, A., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M., D'incecco, A., Piccoli, A., 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17(5), 541-552.

Delma, C., Somasundaram, S., Srinivasan, G.P., Bashyam, M., Aravindan, N., 2015. Corrigendum to Fucoidan from *Turbinaria conoides*. A multifaceted deliverable to combat pancreatic cancer progression. *International Journal of Biological Macromolecules* 74(2015), 447-457.

Da Silva, R.L., Barbosa, J.M., 2018. Seaweed meal as a protein source for the white shrimp *L. vannamei*. *Journal of Apply Phycology* 21(2), 193-197.

Duan, X.J., Zhang, W., Wang, G., 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red algae, *polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry* 95(1), 37-43.

Gideon, T.P., Rengasamy, R., 2008. Toxicological evalution of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. *Journal of Medicinal Food* 11(4), 638-642.

Kim, J., Park, Y., Lee, Y., Park, H., 2010. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC gastroenterology*, 10(9), 1-11.

Kwak, J.Y., 2018. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Journal of Marine Drugs* 12(2), 851-870.

Lee, H., Kim, J.S., Kim, E., 2012. Fucoidan from seaweed *Fucus vesiculosus* inhibits migration and invasion of human lung cancer cell via PI3K-Akt-mTOR pathways. *PloS one* 7(11), e50624.

Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R., 2008. Fucoidan: structure and Bioactivity. *Journal of Molecules* 13, 1671-1695.

Mabeau, S., Fleurence, J., 1993. Seaweed in food products. Biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Science and Technolgy* 4(4), 103–107.

Mehdinezhad, N., Ghannadi, A., Yegdaneh, A., 2016. Phytochemical and biological evaluation of some Sargassum species from Persian Gulf. *Research in Pharmaceutical Sciences* 11(3), 243-249.

Mohammadi, E., Shabanpour, B., Kordjazi, M., 2016. Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of brown algae *(Iyengaria stellata)* collected from the shores of the Persian Gulf. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology* 4(3), 1-15. (In Persian)

Mohsin, S., Mahadevan, R., Sumayya, A.S., Muraleedhara Kurup, G., 2016. Bifunctional effect of fucoidan from *Padina tetrastromatica* against human pathogenic microbes and free radicals. *Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine* 2(2), 1-10.

Nagamine, T., Hayakawa, K., Kusakabe, T., Takada, H., Nakazato, K., Hisanaga, E., Iha, M., 2009. Inhibitory effect of fucoidan on Huh7 hepatoma cells through downregulation of CXCL12. *Nutrition and cancer* 61(3), 340-347.

Oh, B., Kim, J., Lu, W., Rosenthal, D., 2014. Anticancer effect of fucoidan in combination with tyrosine kinase inhibitor lapatinib. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014, 1-6.

Pinheiro, A.C., Bourbon, A.I., Cerqueira, M.A., Maricato, E., Vicente, A.A., 2015. Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers* 115(2015), 1-9.

Pushparaj, A., Raubbin, R.S., Ronald, J., Aswany, T., 2017. An antibacterial activity of selected brown, green and red seaweeds from Manapad, Thoothukudi, Tamil Nadu, India. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* 2(8), 854-856.

Rocha de Souza, M.C., Marques, C.T., Dore, M.G., Ferreira da Silva, F., 2007. Antioxidant activities of sulphated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 19(2), 153–160.

Sanjeewa, K.K., kang, N., Ahn, G., Jee, y., Kim, Y., Jeon, Y., 2018. Bioactive potentials of sulfated polysaccharides isolated from brown seaweed Sargassum spp in related to human health applications. A review. *Journal of Food Hydrocolloids* 81(2018), 200-208.

Somasundaram, S.N., Shanmugam, S., Subramanian, B., Jaganathan, R., 2016. Cytotoxic effect of fucoidan extracted from *Sargassum cinereum* on colon cancer cell line HCT15. *International journal of biological macromolecules* 91(2016), 1215-1223.

Tavakoli, J., Miar, S., Zadehzare, M., Akbari, H., 2012. Evaluation of effectiveness of herbal medication in cancer care: A Review Study. *Iran Journal Cancer Prevention* 5(3), 144-156.

Thuy, T., Ly, B.M., Van, T., Ai, U., 2015. Anti-HIV activity of fucoidans from thee brown seaweed species. *Carbohydrate Polymers* 115(2015), 122-128.

Xue, M., Ge, Y., Zhang, J., Wang, Q., Hou, L., Liu, Y., Sun, L., 2012. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer in vitro and in vivo. *PLoS one* 7(8), e43483.

Wang, C.Y., Wu, T.C., Hsieh, S.L., Tsai, Y.H., Yeh, C.W., Huang, C.Y., 2015. Antioxidant activity and growth inhibition of human colon cancer cells by crude and purified fucoidan preparations extracted from *Sargassum cristaefolium*. *Journal of Food and Drug Analysis* 23(4), 766-777.

Wijesekaraa, I., Pangestutia, R., 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* 84(11), 14-21.

Wijesinghe, W.A.J.P., Jeon, Y., 2012. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds. A review. *Carbohydrate Polymers* 88(1), 13-20.

Wong, K.H., Cheung, P.C.K., 2000. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweed. Part I. Proximate composition, amino acid profiles and some physic-chemical properties. *Food Chemistry* 71(4), 475-482.

Sanjeewa, K.K., Lee, J., Kim, W., Jeon, Y., 2017. The potential of brown-algae polysaccharides for the development of anticancer agents: An update on anticancer effects reported for fucoidan and laminarian. *Carbohydrate Polymers* 177(2017), 451-459.