استخراج و شناسایی فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین از اسفنج دریایی گونه *Dysidea avara* و بررسی اثر سیتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی

ملیکا ناظمی[۱و۴*]، هادی غفاری[۲]، یزدان مرادی[۲]، محمدصدیق مرتضوی[۱]، سهیلا آقایی درگیری[۳]

*melikanazemi@yahoo.com

۱- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس ودریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
٤- صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری.

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

چکیده

مطالعات اکولوژی- شیمیایی اسفنج ها نشان می‌دهد که سنتز متابولیت های ثانویه، تنها سیستم دفاعی آنها در مقابل عوامل تهدید کننده محسوب می‌شود که امروزه با توجه به خواص زیستی آنها به عنوان دارو در درمان برخی از بیماری‌های انسانی استفاده می‌شود. یکی از مهمترین خواص زیستی اسفنج‌ها اثر سیتوتوکسیک متابولیت‌های ثانویه آنها می‌باشد. مطالعه حاضر به بررسی خواص سیتوتوکسیک فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین استخراج شده از اسفنج دریایی گونه *Dysidea avara* از جزیره هنگام، خلیج فارس پرداخته است. برای این منظور با استفاده از حلال استون از پودر خشک اسفنج دریایی عصاره‌گیری شد. سپس به منظور جداسازی ترکیب آلفا سانتونین از عصاره اسفنج از ستون کروماتوگرافی سلیکاژل استفاده شد. ستون کروماتوگرافی توسط حلال‌های ان هگزان و اتیل استات شست و شو داده شد و غلظت کشندگی این ترکیب توسط آزمون XXT روی رده سلول‌های سرطانی مورد سنجش قرار گرفت. ترکیب آلفا سانتونین با فرمول شیمیایی $C_{15}H_{18}O_3$ که به گروه سزکویی‌ترپن لاکتون تعلق دارد، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی با درجه خلوص ۹۱٪ در فرکشن شماره ۲۴ شناسایی شد. اثر ترکیب آلفا سانتونین نسبت به رده سلولی کارسینوم اپیتلیوم دهانی برابر با ۸۷/۹۰ میکروگرم در میلی لیتر و رده سلولی سرطانی لنفوسیت برابر با ۳۸/۰۹ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. پژوهش انجام شده نشان داد که فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین استخراج شده از اسفنج دریایی گونه *D. avara* دارای اثر سیتوتوکسیک بسیار قوی روی سلول های سرطانی مورد بررسی است که می‌تواند به عنوان داروی ضد سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

لغات کلیدی: اسفنج، اثر کشندگی، آلفا سانتونین، جزیره هنگام، خلیج فارس

*نویسنده مسئول

مقدمه

اسفنج‌ها مانند بسیاری از آبزیان در روند تکاملی برای ادامه حیات ترکیباتی تولید می‌کنند که خواص سیتوتوکسیک دارند. این ترکیبات با جانداران مهاجمی که سطح آنها را می‌پوشانند و بنحوی مانع عملکرد حیاتی آنها می‌شوند، مقابله می‌کنند تا بتوانند در رقابت پیروز شوند. امروزه با پیشرفت علم، از این ترکیبات شیمیایی که خاصیت از بین بردن سلول‌های زنده را دارند، به عنوان داروهای ضد سرطانی استفاده می‌شود (Mol *et al.*, 2010). آمار نشان می‌دهد که سرطان عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته است. در سال‌های اخیر دانشمندان برای درمان بیماران مبتلا به سرطان تلاش‌های بسیاری انجام داده‌اند (Kraljevic *et al.*, 2006). امروزه بیش از ۶۰ درصد داروهای ضدسرطانی منشاء طبیعی دارند که در این میان می‌توان به داروهای ضد تکثیری مانند دوکسوروبیسین[1]، بلئومایسین[2]، میتومایسین[3] C، وین کریستین[4] و وینبلاستین[5] که در شیمی درمانی تومورهای بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرند، اشاره نمود (Jimeno *et al.*, 2004).

تاکنون ۲۵۰۰ متابولیت ثانویه با خواص ضد سرطان از جانداران دریایی استخراج و شناسایی شده‌اند. این نکته قابل توجه است که مکانیسم اثر بسیاری از این ترکیبات طبیعی با سایر داروهای تجاری مورد استفاده متفاوت می‌باشد (Jimeno *et al.*, 2004). اکثر متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از جنس‌های مختلف اسفنج‌های دریایی اثرات سمی (سیتوتوکسیک) از خود نشان می‌دهند. تاکنون بیش از ۴۰۰ ترکیب جدید طبیعی از منابع دریایی با فعالیت سیتوتوکسیک در منابع علمی گزارش شده است (Schmitz *et al.*, 1993). معمولاً بیشتر مطالعات انجام شده بر اثرات سمیت سلولی متمرکز شده‌اند. شایان ذکر است، این مرحله اولین شاخص در شناسایی داروهای ضد سرطانی محسوب می‌شود (Zheng *et al.*, 2006). به طور کلی، برای تولید داروهای ضد سرطان انجام آزمایش‌های تکمیلی به منظور تشخیص مکانیسم اثر سمیت از قبیل آپوپتوز، اتوفاژی و آنکوزیس که نیازمند صرف زمان و هزینه می‌باشد، لازم است (Folmer *et al.*, 2009). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که ۳۹ ترکیب استخراج شده از اسفنج‌های دریایی با ایجاد آپوپتوز اثر ضد سرطان دارند (Essack *et al.*, 2011). با توجه به حضور اسفنج گونه *Dysidea avara* در مناطق مختلف خلیج فارس و اثرات سیتوتوکسیک ترکیب آلفا سانتون، در این پژوهش علمی برای اولین بار در کشور به بررسی و جداسازی ترکیب آلفا سانتون از این گونه اسفنج پرداخته شد.

مواد و روش کار

نمونه برداری اسفنج

نمونه‌های اسفنج گونه *D. avara*، به وزن تر ۲ کیلو گرم در شهریور ماه سال ۱۳۹۴ از عمق ۳۰-۲۵ متر از شمال جزیره هنگام خلیج فارس، توسط عملیات غواصی تهیه شدند و سپس به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل گردیدند.

عصاره‌گیری از اسفنج

نمونه‌های اسفنج دریایی پس از پاکسازی ابتدا به قطعات یک سانتی‌متری تبدیل شدند، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در نهایت نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب پودر شدند. عصاره‌گیری از پودر خشک اسفنج به وزن ۳۵۰ گرم با استفاده از حلال استون و به روش خیساندن انجام گردید (Nazemi *et al.*, 2014).

جداسازی ترکیبات ترپنوئید از اسفنج

عصاره خشک استونی به وزن ۲۷/۱۲ گرم تهیه شد و برای جداسازی ترکیبات طبیعی موجود در عصاره از ستون کروماتوگرافی شیشه‌ای استفاده شد. ستون سیلیکاژل که ۷۰ سانتی متر ارتفاع و ۲ سانتی متر قطر داخلی داشت،

[1] Doxorubicin
[2] Bleomycin
[3] Mytomicin
[4] Vincristine
[5] Vinblastine

توسط پودر سیلیکاژل مخصوص کروماتوگرافی با اندازه ۰/۶-۰/۲ میلی‌متر پر شد. شست و شوی عصاره‌های استونی به طور جداگانه و در ابتدا توسط حلال‌های ان هگزان-اتیل استات و سپس اتیل استات-متانول به عنوان فاز متحرک با نسبت‌های ۱۰۰:۰، ۹۰:۱۰، ۸۰:۲۰، ۷۰:۳۰، ۶۰:۴۰، ۵۰ :۵۰، ۳۰:۷۰،۴۰:۶۰، ۲۰:۸۰، ۱۰:۹۰و۱۰۰:۰ انجام شد. ۱۲۸ فراکسیون بدست آمده از ستون کروماتوگرافی از نظر آزمون حضور ترپنوئیدها مورد بررسی قرار گرفتند. سپس فراکسیون‌هایی که با چند لکه در کروماتوگرافی‌های لایه نازک که با معرف وانیلین به رنگ صورتی تا بنفش در آمده بودند، به ستون کروماتوگرافی شیشه‌ای دیگری با طول ۵۰ سانتی‌متر و قطر داخلی ۰/۵ سانتی‌متر مانند قبل پر شده و شست و شو داده شدند (Çitoğlu and Acıkara, 2012).

بررسی خواص سیتوتوکسیک

ارزیابی میزان سمّیت با استفاده از آزمون XTT[1]

برای این منظور، سلول‌های سرطانی اپیدرموید دهان انسان (KB/ C152)، لنفوسیتی (HUT-78/ C185) و سلول سالم جنین کلیه انسانی (Hek 293) از بخش کشت سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت فلاسک تهیّه شدند و به محیط کشت روزلت پارک مدیوم انستیتو RPMI -۱۶۴۰ منتقل شدند. برای آزمون XTT ابتدا توسط عمل تریپنیزاسیون سلول‌های اپیدرموید دهان و لنفوسیت انسانی از سطح فلاسک جدا و به مدّت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس سلول‌ها با تراکم $۲۵*۱۰^{۳}$ در هر کدام از پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای کشت سلولی توزیع گردیدند و از محیط کشت RPMI -۱۶۴۰ به مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر به هر حفره اضافه شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول‌ها در میکروپلیت‌ها رشد نمایند. به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین بر سلول‌های سرطانی، غلظت های ۲، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفتند و آزمون سه بار تکرار شد. به عنوان شاهد منفی، در تعدادی از چاهک‌ها محیط کشت RPMI -۱۶۴۰ بدون ترکیب افزودنی اضافه شد. سپس با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مدل (Bio-Tek ELx 800) در طول موج ۴۹۰ نانومتر و۶۹۰ نانومتر میزان اکسیژن محلول خوانده شد. میزان $IC_{۵۰}$[2] (میزان ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی) ۵۰٪ از سلول های بر اساس رابطه ذیل درصد کشندگی محاسبه شد (Roehm *et al.*, 1991).

$$\text{درصد کشندگی} = \frac{\text{OD کنترل منفی} - \text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل منفی}} \times 100$$

اکسیژن محلول = OD[3]

شناسایی ترکیبات ترپنوئید اسفنج

فراکسیون‌های بدست آمده از ستون کروماتوگرافی شیشه‌ای بوسیله لوله موئینه روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) لکه‌گذاری شدند. سپس به منظور خشک شدن به مدت ۲۰ دقیقه در معرض هوا قرار گرفتند و سپس در تانک کروماتوگرافی لایه نازک حاوی حلال های متانول، کلروفرم، ان هگزان با نسبت‌های ۷۰:۲۰:۱۰ قرار داده شدند. جهت جستجوی فرکشن حاوی ترکیبات ترپنوییدی از معرف وانیلین-اسید سولفوریک، به صورت محلول ۱ درصد وانیلین در اتانول و محلول ۵ درصد اسید سولفوریک در اتانول به صورت اسپری روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. سپس صفحات کروماتوگرافی لایه نازک در آون و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و تغیرات در نور مرئی بررسی شد. فرکشن های حاوی ترکیبات ترپنوئید به طیف رنگی صورتی تا بنفش تغییر رنگ دادند (Çitoğlu and Acıkara, 2012). لکه‌هایی که به رنگ صورتی، بنفش کمرنگ و بنفش پر رنگ در آمدند، برای شناسایی نوع ترپنوئید به دستگاه جی سی مس (مدل Agilent7000 Series Triple Quad GC/MS

[1] 2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide

[2] Inhibitory concentration

[3] Oxygen dissolved

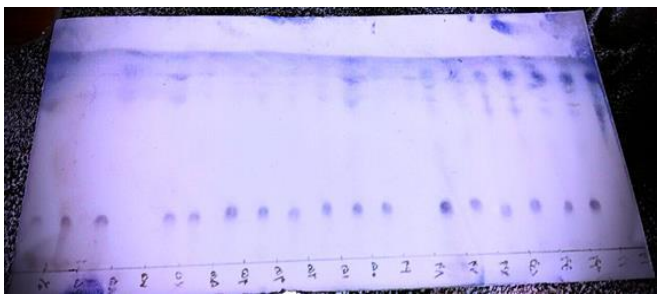
MainFrame؛ گاز کریر هلیوم ۹۹/۹۹ درصد، دکتور ۵۹۷۵C، ستون Part number 19091s-436، طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر، لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی تزریق شدند.

نتایج

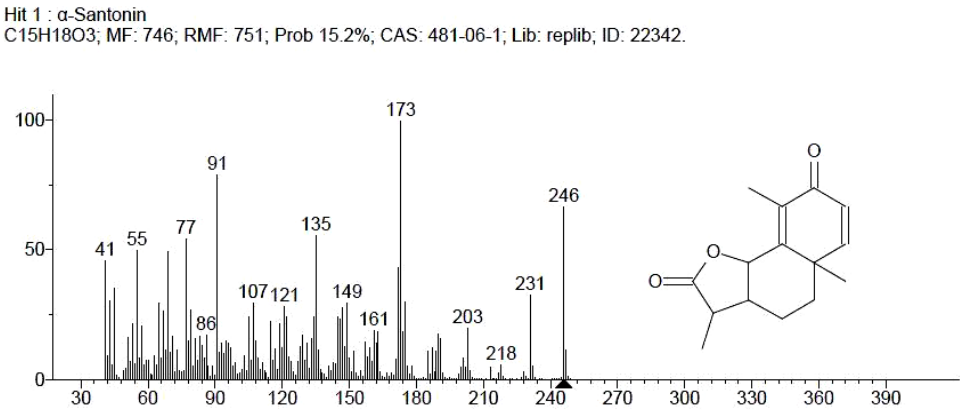
جداسازی فرکشن‌های حاوی ترپنوئید و استروئید

۱۲۸ فرشکن از عصاره اولیه اسفنج گونه *D. avara* تهیه شد (شکل ۱). بر اساس شناساگر وانیلین فرکشن‌های حاوی ترپنوئید به رنگ صورتی تا بنفش و فرکشن‌های حاوی استروئید به رنگ آبی (شکل ۲) تغییر می‌کنند، بر این اساس از سایر فرکشن‌ها جداسازی شدند. با استفاده از کروماتوگرافی گازی فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین (α-Santonin) IUPAC= (3*S*,3a*S*,5a*S*,9b*S*)-3,5a,9-trimethyl-3a,5,5a,9b-tetrahydronaphtho[1,2-*b*]furan-2,8(3*H*,4*H*)-dione) با فرمول شیمیایی $C_{15}H_{18}O_3$، وزن مولکولی $246/3016 g \cdot mol^{-1}$ به مقدار ۹۱ ٪ در فرکشن شماره ۳۱ (ان هگزان-اتیل استات ۶۰:۴۰ در دقیقه ۱۶ شناسایی شد. این ترکیب به گروه سزکویی‌ترپن لاکتون (Sesquitpene lactone) متعلّق می‌باشد (شکل ۳).

شکل ۱: فرکشن های تهیه شده از اسفنج دریایی.
Figure 1: Fraction isolated of sponge.



شکل۲. کروماتوگرافی صفحه نازک فرکشن‌های عصاره استونی اسفنج.
Figure 2: Thin layer choromatoghrapgy of Fractions acetone extract of sponge.



شکل ۳. طیف جی سی فرکشن شماره ۳۱ حاوی ترکیب آلفاسانتونین
Figure 3: The GC spectrum fraction number 31 contains the alpha-Santonin compound.

بررسی خواص سیتوتوکسیک فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین

بر اساس سنجش اکسیژن محلول در آزمون XTT، پنجاه درصد کشندگی فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین استخراج شده از اسفنج دریایی گونه *D. avara* در غلظت های مورد بررسی روی رده های سلول سرطانی اپیتلیوم دهانی و لنفوسیت سنجیده شد (جدول ۱).

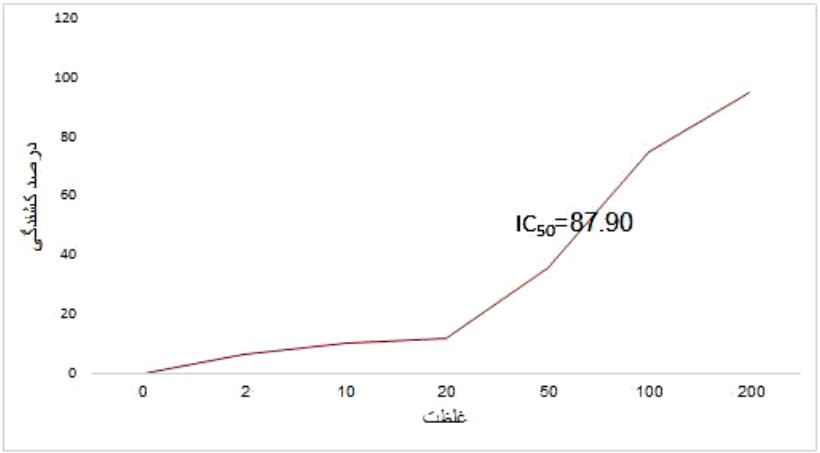
بر اساس شکل‌های ۴ الی ۶، پنجاه درصد کشندگی فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین رده سلولی اپیتلیوم دهانی (KB/C152) برابر با ۸۷/۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، و رده سلولی جورکت (E6-1) برابر با ۳۸/۰۹ میکروگرم در میلی‌لیتر است.

فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین در غلظت ۱۶۵/۷۹ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مرگ سلول‌های سالم جنین کلیه انسانی (Hek 293) شده است.

جدول ۱: درصد کشندگی فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین اسفنج گونه *D. avara*

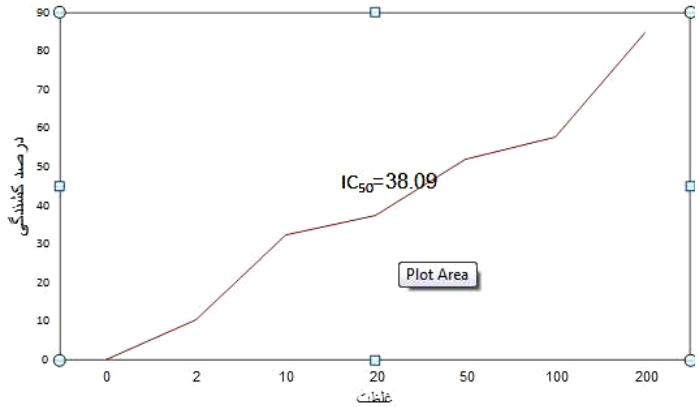
Table 1: Percentage fecundity of fractionation containing the alpha-Santonin composition of *D. avara*.

غلظت ترکیب آلفا سانتونین (µg/ml)	رده سلولی KB/C152 ٪ کشندگی	رده سلولی Jurkat/E6-1 ٪ کشندگی	رده سلولی(سلول سالم) Hek 293 ٪ کشندگی
۰	۰	۰	۰
۲	۶/۷۶	۱۰/۵۱	-۳/۹۷
۱۰	۱۰/۰۹	۳۲/۲۷	۴/۴۰
۲۰	۱۲/۰۶	۳۷/۳۴	۱۱/۱۹
۵۰	۳۶/۱۲	۵۱/۸۹	۱۸/۰۵
۱۰۰	۷۴/۹۰	۵۷/۵۹	۲۹/۶۰
۲۰۰	۹۵/۳۰	۸۴/۸۱	۵۹/۶۶



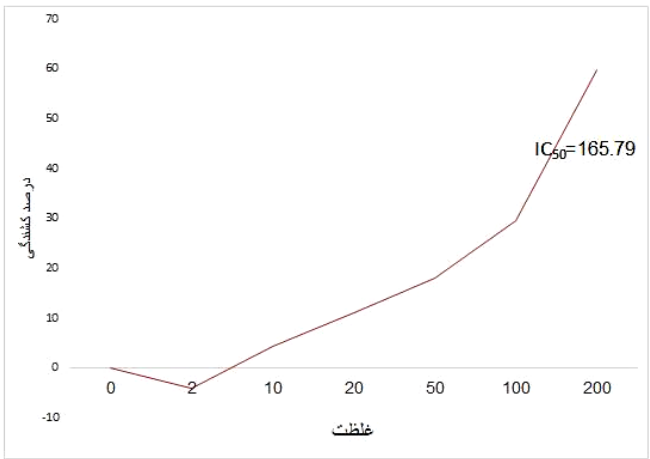
شکل ۴. میزان IC_{50} فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین اسفنج گونه *D. avara* بر رده سلولیKB/C152.

Figure 4: The rate of IC_{50} fraction containing the alpha-Santonin compound sponge species *D. avara* on the cell line KB/C152.



شکل ۵: میزان IC_{50} فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین اسفنج گونه *D. avara* روی رده سلولی Jurkat/ E6-1

Figure 5: The rate of IC_{50} fraction containing the alpha-Santonin compound sponge species *D. avara* on the cell line Jurkat/ E6-1.



شکل ۶: میزان IC_{50} فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین اسفنج گونه *D. avara* روی رده سلولی Hek 293

Figure 6:The rate of IC_{50} fraction containing the alpha-Santonin compound sponge species *D. avara* on the cell Hek 293.

بحث

در پنج دهه اخیر توجه زیست شناسان و شیمیدان‌ها به ترکیبات طبیعی با منابع دریایی معطوف شده است. تاکنون نزدیک به ۱۶۰۰۰ ترکیب از منابع دریایی استخراج شده است که در بیش از ۶۸۰۰ گزارش علمی منتشر شده است. اگر مقالات منتشره در زمینه سنتزها، مقالات مروری، بررسی خواص بیولوژیک و مطالعات اکولوژی را نیز به آن اضافه کنید، این عدد به ۹۰۰۰ گزارش علمی افزایش می‌یابد (Datta *et al.*, 2015). در این تحقیق از اسفنج دریایی *D. avara* ترکیب آلفا سانتونین در فرکشن‌های شماره ۳۱ توسط حلال‌های ان هگزان-اتیل استات با نسبت ۴۰ به ۶۰ با دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شد. آلفا سانتونین متعلق به سزکویی ترپن لاکتون‌ها می‌باشد، این ترکیب به مقدار قابل توجهی از گونه‌های گیاه دارویی درمنه متعلق به جنس *Artemisia* با عصاره‌گیری توسط حلال استون و ستون کروماتوگرافی و شست و شو با حلال‌های ان هگزان و اتیل استات استخراج شده است (Puranik *et al.*, 2010). روش استخراج ترکیب آلفا سانتونین با روش استخراج این ترکیب از اسفنج گونه *D. avera* مشابه است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد این ترکیب دارای اثرات زیستی، ضد سرطان، ضد التهابی، ضد تب،

ضدانگل و ضد درد است (Kita *et al*., 2007). نتایج حاصل از استخراج آلفا سانتونین در پروژه حاضر با سایر مطالعات انجام شده، نشان می‌دهد که عصاره‌گیری با استفاده از استون و سپس شست و شوی آن با حلال‌های غیر قطبی مانند ان هگزان مناسب می‌باشد. ترکیبات طبیعی استخراج شده از جانداران دریایی به عنوان عامل‌های ضد سرطانی بالقوه در سال ۲۰۱۱ مورد بررسی قرار گرفتند که از ۳۹ ترکیب که اثر ضد سرطانی از خود نشان دادند، ۱۸ ترکیب متعلق به اسنفج‌ها بوده است (Bhanot *et al*., 2011). شایان ذکر است که ۶ ترکیب از ۱۶ ترکیب طبیعی استخراج شده با اثر ضدسرطانی از جانداران دریایی که مراحل مختلف کلینیکی را طی می کنند، متعلق به اسفنج‌هاست (Petit *et al*., 2013). در تحقیق حاضر، فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونی در غلظت‌های ۸۷/۹۰ و ۳۸/۰۹ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مرگ پنجاه درصد سلول‌های سرطانی اپیتلیوم دهانی و لنفوسیت گردید و در غلظت بسیار بالاتری ۱۶۵/۷۹ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر کشندگی بر سلول‌های کلیه جنین انسانی نشان داد. در پژوهشی دیگری که بر اسفنج گونه *Ircinia mutans* از جزیره لارک در خلیج فارس انجام شد، فرکشن‌های هگزانی و دی کلرومتانی این گونه در غلظت‌های ۱۱/۵۳ و ۱۲/۵۱ میکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ پنجاه درصدی سلول های سرطانی لنفوسیت، MOLT-4 گردید (Heidary Jamebozorgi *et al*., 2018).

مطالعات انجام شده توسط Khazir و همکاران (۲۰۱۳) نشان می‌دهد ترکیب آلفا سانتونین استخراج شده از منابع طبیعی و سنتز شده دارای اثرات ضد سرطان بر رده‌های سلولی سرطان سینه انسانی (MCF-7) و سرطان پروستات انسانی (PC-3) می‌باشد. همچنین بررسی اثر سیتوتوکسیک ترکیب آلفا سانتونین بر رده‌های سلول‌های سرطانی لوسمی (HL-60)، کلون (HCT-8)، ملانوما (MDA-MB-435)، ریه (A549)، تخمدان (ovarian)، پروستات (PC-3) نشان داد این ترکیب در غلظت‌های ۱۴/۵-۰/۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به اثر کشندگی پنجاه درصد (IC_{50}) سلول‌های سرطانی گردیده است (Arantes *et al*., 2009). نتایج این تحقیق همسو با سایر پژوهش‌ها، نشان داد فرکشن حاوی ترکیب آلفا سانتونین با غلظت بالاتر اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های نرمال از خود نشان می‌دهد. به عبارت دیگر، قدرت اثر کشندگی آن بر سلول‌های سرطانی بسیار بیشتر از سلول‌های طبیعی سالم است.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب با کد ۹۴۰۰۶۵۶۰ از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور می باشد. بدینوسیله از همکاری عزیزانی که در انجام آن با ما همکاری داشته‌اند، سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

Arantes, F.F., Barbosa, L.C., Alvarenga, E.S., Demuner, A.J., Bezerra, D.P., Ferreira, J.R., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C. and Moraes, M.O., 2009. Synthesis and cytotoxic activity of α-santonin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(9): 3739-3745. DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.03.036.

Bhanot, A., Sharma, R., and Noolvi, M.N., 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *International Journal Phytopathology*, 3: 9–26. DOI: 10.2174/187152012802649996

Çitoğlu, G.S., and Ö.B. Acıkara. 2012. Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids. In Chromatography and its applications: INTECH Rijeka, 13-49.

Datta, D., S. Talapatra, and S. Swarnakar. 2015. Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-an overview. *International Letters of Natural Sciences*, 7: 34-42. DOI: 10.18052/www.scipress. com/ilns.

Essack, M.; Bajic, V.B.; Archer, J.A. 2011. Recently confirmed apoptosis-inducing lead compounds isolated from marine sponge of potential relevance in cancer treatment. Marine. *Drugs*, 9: 1580–1606. DOI: 10.3390/md9091580.

Folmer, F.; Jaspars, M.; Dicato, M.; Diederich, M. 2009. Marine cytotoxins: Callers for the various dances of death. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench***,** 2: 34–50**.**

Heidary Jamebozorgi F, Yousefzadi M, Firuzi O, Nazemi M, Jassbi A., 2018. Cytotoxic activity of hexane and dichloromethane parts of methanol extract of Ircinia mutans sponge on three human cancer cell lines. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 27 (2): 105-114.

Jimeno, J., G. Faircloth, J. Sousa-Faro, P. Scheuer, and K. Rinehart. 2004. New Marine Derived Anticancer Therapeutics─ A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Marine Drugs*, 2 (1):14-29.

Khazir, J., Singh, P.P., Reddy, D.M., Hyder, I., Shafi, S., Sawant, S.D., Chashoo, G., Mahajan, A., Alam, M.S., Saxena, A.K. and Arvinda, S., 2013. Synthesis and anticancer activity of novel spiro-isoxazoline and spiro-isoxazolidine derivatives of α-santonin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63: 279-289. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.01.003

Kita, K., Shiomi, K., and Ōmura, S. 2007. Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology*, 23(5): 223-229. DOI: 10.1016/j.pt.2007.03.005

Kraljevic, S., M. Sedic, M. Scott, P. Gehrig, R. Schlapbach, and K. Pavelic. 2006. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: What can be seen from the proteomics point of view? *Cancer Treatment Reviews*, 32 (8):619-629. DOI: 10.1016/j.ctrv.2006.09.002

Mol, V. L., T. Raveendran, K. Abhilash, and P. Parameswaran. 2010. Inhibitory effect of Indian sponge extracts on bacterial strains and larval settlement of the barnacle, Balanus amphitrite. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64 (6):506-510. DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.06.003

Nazemi, M., M. M. AA, S. Jamili, A. Mashinchian, and G. Mostafavi. 2014. Comparison of antibacterial activities of Ircinia mutans extracts in two different seasons from Kish Island, Persian Gulf, Iran. Iranian *Journal of Fisheries Sciences*, 13 (4):823-833. DOI: 10.7763/ijesd.2010.v1.21

Petit, K., and Biard, J. F. 2013. Marine natural products and related compounds as anticancer agents: an overview of their clinical status. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(4): 603-631. DOI: 10.2174/1871520611313040010

Puranik, V. and Deshpande, N., 2010. GC-MS study and isolation of a sesquiterpene lactone from Artemisia pallens. *Oriental Journal of Chemistry*, 26(1):143-146

Roehm, N. W., G. H. Rodgers, S. M. Hatfield, and A. L. Glasebrook. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142 (2):257-265. DOI: 10.1016/0022-1759(91)90114-u

Schmitz, F.J.; Bowden, B.F.; Toth, S.I. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. In Pharmaceutical and Bioactive Natural Products; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 197–308.

.

DOI: 10.3390/md7020210

Zheng, L.; Yan, X.; Han, X.; Chen, H.; Lin, W.; Lee, F.S.; Wang, X. . 2006. Identification of norharman as the cytotoxic compound produced by the sponge (*Hymeniacidon perleve*)-associated marine bacterium *Pseudoalteromonas* piscicida and its apoptotic effect on cancer cells. *Biotechnol. Appl. Biochem*., 44, 135–142. DOI: 10.1042/ba20050176

Extraction and identification of α-Santonin compound from sponge *Dysidea avara* and evaluation of its cytotoxic activity on carcinogenic cells

Nazemi M.[1,4*]; Ghaffari H.[2]; Morady Y.[2]; Mortazavi M.S.[1]; Aghaei Dargeri S.[3]

melikanazemi@yahoo.com

1. Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.
2. Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.
3. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
4. Iran National Science Foundation, Presidency of Islamic Republic of Iran,

Abstract

Chemical-ecological studies of sponges show that the secondary metabolites are only defense system. Nowadays natural products with biological activities are used as drugs for treatment of human diseases. One of the most important biological activities of sponges is cytotoxic activity. This study investigated the cytotoxic activities of α-Santonin compound which extracted from *Dysidea avara*. In this study, dried powder of sea sponge was extracted by acetone solvent. Then, in order to isolate the α-Santonin compound, the extract was washed by silica gel column chromatography with N-hexane and ethyl acetate solvents. The IC_{50} value of this compound was measured by XTT assay on cancer cell lines, Jurkat/E6-1, KB/C152 and healthy Hek293 cells. The α-Santonin compound with the chemical formula $C_{15}H_{18}O_3$, which belongs to the Sesquiterpene-lactone group, was identified by gas chromatography, with a purity of 91% in fraction No. 24. The IC_{50} value of the α-Santonin extracted from sea sponge compared to the oral epithelial cancer cell line and lymphocyte cell line was 88.90 µg/ml and 38.09 µg/ml respectively. Our study demonstrated that α-Santonin extracted from *D. avara* has an extremely potent cytotoxic effect that could be used as an anticancer agent.

Keywords: Sponge, LC_{50} value, α-Santonin, Hengam Island, Persian Gulf

*Corresponding author