Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۴، شهریور ۱۳۹۴، ۴۸۰-۴۶۷

بررسی اثر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه خلیج فارس (*Ophiocoma erinaceus*) در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بر رده سلولی EL4

محبوبه افضلی[۱]، جواد بهارآرا[۲]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۳]، الهه امینی[۴]

دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۳۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۴/۱/۱۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۴/۲/۲۸ پذیرش مقاله: ۹۴/۳/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: فرآورده‌های طبیعی کاندید درمانی نوید دهنده در درمان سرطان به شمار می‌روند. ستاره شکننده از جمله خارپوستان دارای مواد فعال زیستی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه خلیج فارس (Ophiocoma erinaceus) در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) بر رده سلولی EL4 بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های لمفومایی در محیط‌کشت RPMI 1640 کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های ۷/۵، ۱۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده تیمار شدند. سپس سمیت سلولی و دوز مؤثره با آزمون *دی‌متیل‌تیازول*- دی‌فنیل *تترازولیوم* بروماید (MTT)، نوع مرگ سلولی القاء شده توسط آزمون‌های مربوطه و مسیر القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول توسط کیت کاسپاز ۳ و ۹ مطالعه شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی TUKEY تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد عصاره ستاره شکننده دارای سمیت سلولی بر رده لمفومایی است. غلظت‌های پایین‌تر از ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب مهار تکثیر و غلظت‌های بالاتر باعث تجزیه شدن سلول‌ها شد و غلظت میانه مهاری آن حدود ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($p<0/05$) تعیین گردید. تست کاسپاز نشان داد نوع مرگ سلولی القاء شده توسط عصاره ستاره شکننده، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول وابسته به کاسپاز است که از طریق مسیر درونی القاءکننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در رده لمفومایی است.

نتیجه‌گیری: عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده از طریق القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، پیش‌برنده مرگ سلولی بر رده سلولی EL4 است و می‌تواند به عنوان کاندید مناسبی جهت درمان سرطان خون پیشنهاد گردد.

واژه‌های کلیدی: سرطان خون، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، سمیت سلولی، فرآورده‌های طبیعی، خارپوستان، رده سلولی EL4

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
تلفن: ۰۵۱۳-۸۴۳۷۰۹۲، دورنگار: ۰۵۱۳-۸۴۳۷۰۹۲، پست الکترونیکی: baharara@yahoo.com
۳- استادیار ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
۴- دانشجوی دکترای تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

مقدمه

سرطان در حال‌حاضر به عنوان یکی از مشکلات اصلی سلامت، در سراسر جهان و به عنوان مسئول حدود ۱۵٪ مرگ و میر در ۲۵٪ کشورهای در حال توسعه شناخته شده است [۱]. از جمله انواع سرطان‌ها می‌توان به سرطان خون (نوعی سرطان خطرناک که توسط سلول‌های بدخیم خونساز مشخص می‌شود) اشاره کرد [۲]. از جمله شناخته شده ترین روش‌های مبارزه با سرطان خون شیمی درمانی است [۳]. هر چند که استفاده بالینی از آن به دلیل اثرات جانبی محدود شده است [۴] به همین علت تحقیق بر روی داروهای جدیدی که دارای حداقل عوارض جانبی باشند، متمرکز شده‌است [۵]. می‌توان گفت تقریباً ۵۰٪ از عوامل ضد سرطان در ۵۰ سال اخیر ترکیباتی هستند که از منابع طبیعی مشتق شده و یا آنالوگ آنها هستند [۶]. این ترکیبات معمولاً مولکول‌های کوچک با وزن مولکولی کمتر از ۳۰۰۰ دالتون هستند و توسط گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها تولید شده که، اغلب متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند و به عنوان یک منبع سنتی از داروها دارای پتانسیل دارویی شناخته می‌شوند [۷].

در اقیانوس‌ها با توجه به شوری و فشار بالا، درجه حرارت و شدت نور کم موجودات دریایی در جهت کنترل روابط زیست محیطی از جمله دفاع، رقابت و شکار مقدار زیادی مواد فعال زیستی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد انگلی و غیره تولید کرده که برخی از آنها فعالیت ضد توموری نشان داده‌اند [۸-۷]. فعالیت سمیت سلولی این ترکیبات بر روی سلول‌های سرطانی معمولاً توسط مکانیسم‌های مختلف القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول همانند قطعه قطعه کردن DNA یا توسط نفوذپذیرکردن میتوکندری و یا دخالت در متابولیسم سلولی و مهار رگ‌زایی صورت می‌گیرد [۹].

بی‌مهرگان دریایی یک منبع غنی برای کشف عوامل ضد سرطانی جدید هستند [۱۰] که شامل گروه‌های تاکسونومیکی بزرگ مانند Sponges (اسفنج‌ها)، Cnidaria (مرجانیان)، Mollusca (نرم‌تنان)، Arthropoda (بندپایان)، Bryozoans (بریوزوآ) و Echinoderms (خارپوستان) هستند و فرآورده‌های طبیعی استخراج شده از آنها طیف وسیعی از فعالیت‌های درمانی شامل ویژگی‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد فشارخون، ضد انعقاد، ضد سرطان، ضد التهاب را نشان داده‌اند [۱۱]. ترکیبات دارای سمیت سلولی مختلفی از ستاره دریایی و خیار دریایی (از نمونه‌های شاخه خارپوستان) استخراج شده است که دارای اثر قوی بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشند [۱۲]. ستاره شکننده یکی از رده‌های خارپوستان دارای ترکیبات فعال زیستی است و مطالعات اندکی در مورد اثرات درمانی آن انجام شده‌است. از انواع ستاره‌های شکننده خلیج فارس می‌توان به دوگونه ستاره شکننده *Ophiocoma scolopendrina* و *Ophiocoma erinaceus* اشاره کرد که در سال ۲۰۰۷ توسط Fatemi و همکارانش در جزیره قشم جمع‌آوری و شناسایی شدند [۱۳].

ستاره شکننده گونه خلیج فارس مورد مطالعه در این پژوهش با نام علمی *Ophiocoma erinaceus* به رنگ سیاه می‌باشد و به خوبی از سایر گونه‌های این جنس، قابل تشخیص است. سطح دهانی در منطقه پروگزیمال تقریباً قهوه ای است و دارای بازوهای کشیده و خارهای نازک بر روی بازوهاست [۱۴-۱۳]. تحقیقات نسبتاً اندکی در جهت کشف خواص دارویی این گونه بومی کشور ایران

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

(*Ophiocoma erinaceus*) از جمله ویژگی‌های ضد سرطانی صورت گرفته است که می‌توان در این بین به پژوهشی که توسط Amini و همکارانش بر روی اثرات همولیتیک و سیتوتوکسیک ترکیبات شبه ساپونین استخراج شده از ستاره شکننده گونه خلیج فارس بر روی رده سلولی Hela (تومور دهانه رحم) انجام شده است، اشاره کرد [۱۴].

در مطالعه حاضر از رده سلولی EL4 استفاده شد که نوعی رده سرطان خون موشی بوده و از مشخصات این رده می‌توان به غیرچسبنده بودن آن اشاره کرد. برای نوآوری سعی شد از رده‌ای استفاده شود که نزدیک به لنفومای انسانی و همچنین، در دسترس باشد و کمتر بر روی آن پژوهش انجام گرفته باشد. عصاره مورد استفاده در این پژوهش عصاره دی‌کلرومتانی است که حاوی ترکیبات محلول در چربی است و همچنین، خیلی کم بر روی آن آزمایش صورت گرفته است. با توجه به کشف ترکیبات ضد سرطانی در گونه‌های نزدیک به ستاره شکننده و همچنین، اندک بودن مطالعات انجام شده بر روی خواص ضد سرطانی ستاره شکننده از جمله عصاره دی‌کلرومتانی گونه خلیج فارس، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره دی کلرومتانی گونه خلیج فارس (*O. erinaceus*) بر رده لمفوما و تعیین نوع مرگ سلولی و مسیر القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی تحت تأثیر آن بر رده سلولی EL4 است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع آزمایشگاهی است که از مهرماه ۱۳۹۲ لغایت خرداد ماه ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات زیست شناسی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد.

رده سلولی EL4 که نوعی رده سرطان خون موشی است، از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط کشت Rosvelt Park Masachuset Institute، 1640 (RPMI) از شرکت Bio idea (ایران)، سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum) و سرم شستشو دهنده Phosphate Buffered Saline (PBS) از شرکت Gibco (آمریکا) و محلول‌های MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) و PI (Propidium Iodide) و همچنین، کیت‌های AnnexinV-FITC/PI، DAPI (4, 6-DiAmidino-2-PhenylIndole) از شرکت SIGMA (آمریکا) و کیت کاسپاز ۳ و ۹ از شرکت Abcam (انگلستان) خریداری شد.

نمونه‌های ستاره شکننده از آب‌های خلیج فارس جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات زیست شناسی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد منتقل و پس از شناسایی آنها، نمونه‌ها به طور کامل شستشو شد و سپس در تاریکی در دمای اتاق خشک گردیدند. سپس به ازاء هر گرم وزن خشک ستاره شکننده، ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و به مدت ۳ شبانه روز بر روی شیکر چرخشی قرار داده شد و توسط کاغذ صافی (واتمن ۱۰، انگلستان) صاف و توسط دستگاه وکیوم (Heidolph, Germany) تغلیظ شدند. سپس عصاره غلیظ شده توسط دی‌کلرومتان/ آب به نسبت ۳ به ۱ مخلوط و درون قیف دکانتور به مدت ۶ ساعت قرار داده شد. پس از گذشت زمان مورد نظر دو بخش دی‌کلرومتانی و آب از یکدیگر تفکیک و بخش دی‌کلرومتانی درون دستگاه وکیوم قرار

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

داده شد تا تغلیظ شود. عصاره مورد نظر در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۵].

سلول‌های رده سلولی EL4 در محیط کشت RPMI1640 حاوی۲۰٪ FBS و پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (PAA, Austria) ۱٪ کشت داده شدند و درون انکوباتور (Memmert, Germany) با CO_2 ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند

اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه خلیج فارس به وسیله آزمون MTT بررسی شد. برای انجام این آزمون که روشی برای ارزیابی درصد بقاء سلولی است، سلول‌های لمفومایی در محیط کشت RPMI1640 به تعداد (۲×۱۰^{۵}) در پلیت ۹۶ خانه کشت و پس از ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده (۷/۵، ۱۵، ۳۱، ۶۲، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. بعد از گذشت بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۳۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه و به مدت ۴-۲ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. سپس به هر خانه ۸۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide) خریداری شده از شرکت AppliChem (آمریکا) افزوده شد تا MTT کاملاً حل شود، سپس جذب آن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری (BioTek, USA) در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۶].

در جهت تشخیص درصد سلول‌های زنده، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و نکروزه از کیت AnnexinV-FITC/PI استفاده شد. سلول‌های EL4 در پلیت ۶ خانه به تعداد $۱-۵\times۱۰^{۵}$ سلول کشت شده و پس از ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده (غلظت‌های مؤثره که به صورت کاملاً تجربی - آزمایشگاهی و بر اساس آزمون MTTو یافتن غلظت IC_{50} به دست آمدند) تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار طبق دستورالعمل کیت سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده از کف پلیت جدا شده، به آن ۴۰۰ میکرولیتر باندینگ بافر، ۵ میکرولیتر انکسین و ۵ میکرولیتر پروپودیوم یداید افزوده شد و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (BD FACS Calibur, Germany) نمودارها رسم گردید. برای اطمینان بیشتر ارزیابی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول توسط آزمون پروپودیوم یداید نیز انجام شد. برای انجام این روش، ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌های EL4 (به تعداد $۱-۵\times۱۰^{۵}$) در پلیت ۶ خانه و تیمار با غلظت‌های مؤثره ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده، سلول‌ها توسط محلول ایزوتونیک پروپودیوم یداید به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شده و سپس فلوگرام‌های مربوطه توسط دستگاه فلوسایتومتری گرفته شد [۱۷].

جهت بررسی و مشاهده تغییراتی که بر روی غشاء سلولی و هسته سلول‌های EL4 تیمار شده توسط عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده در طی روند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول رخ می‌دهد، روش رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. به این صورت که ابتدا کاور اسلیپ استریل را در وسط خانه‌های پلیت ۶ خانه قرار داده و برای کوت کردن پلیت، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کلاژن اضافه شد. سپس سلول‌ها به تعداد $۱-۵\times۱۰^{۵}$ بر روی کاور اسلیپ کشت داده شده و با غلظت‌های مؤثره ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

تیمار، مورفولوژی هسته‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت (ZEISS، USA) بررسی شدند [۱۸].

در روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / پروپودیوم یداید تغییرات مربوط به رنگ هسته سلول‌های EL4 تیمار شده با عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه خلیج فارس توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و مطالعه شد. برای انجام این روش، سلول‌های EL4 در پلیت ۱۶ خانه به تعداد $۱-۵\times۱۰^{۵}$ کشت و همزمان با غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، سلول‌های گروه کنترل و تیمار هر کدام به اپندورف های جداگانه انتقال یافته و در دور ۴۵۰۰ در مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس سلول های معلق شده در PBS، بعد از اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر پروپودیوم یداید و اکریدین اورنج به وسیله میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۹].

برای تعیین مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول القاء شده توسط عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه خلیج فارس بر روی سلول‌های EL4 از کیت کاسپاز ۳ و ۹ استفاده شد. برای این منظور سلول‌های EL4 به تعداد ۲ تا ۵ میلیون سلول کشت داده شدند و با غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده تیمار و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، بر طبق دستورالعمل سلول‌ها سانتریفیوژ و به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر بافر لیز کننده سلولی افزوده و بعد از سانتریفیوژ با استفاده از محیط رویی و تست بیوره میزان پروتئین موجود در هر گروه تعیین گردید. با انجام محاسبات مربوطه به هر نمونه بافر لیز کننده اضافه کرده و به آن 2x buffer، DDT و ۵ میکرولیتر از سوبسترای کاسپاز (Mm LEHD-p-NA) افزوده و به مدت ۲-۱ ساعت درون انکوباتور در تاریکی انکوبه شد. پس از آن در طول موج ۴۰۰ یا ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری جذب نوری آن اندازه‌گیری شد [۱۷].

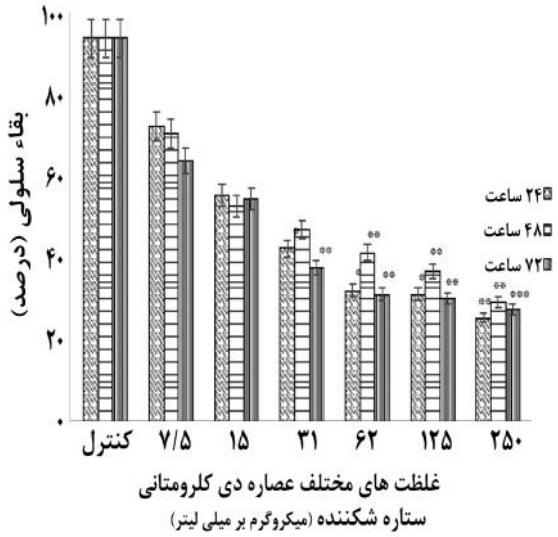
داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ و توسط آنالیز واریانسیک طرفه و آزمون تعقیبی TUKEY در سطح معنی داری ۰/۰۵ ارزیابی شدند. نمودارهای مربوطه توسط برنامه نرم‌افزاری EXCEL نسخه ۲۰۰۷ رسم گردید.

نتایج

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، بررسی نتایج آزمون 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) نشان داد غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه *O. erinaceus* در سطح معنی‌داری ۰/۰۵به عنوان غلظت مهاری (IC_{50}) در نظر گرفته شد و در بازه ۲۴ ساعت بعد از تیمار تقریباً باعث مهار تکثیر نیمی از سلول‌های EL4 شد.

همچنین، نشان داده شد با افزایش غلظت عصاره ستاره شکننده، درصد بقاء سلولی کاهش یافته و بیشتر سلول‌ها به سمت تجزیه شدن پیش رفتند. تأثیر زمان بر درصد بقاء سلول‌ها در غلظت‌های پایین‌تر از غلظت مهاری نیز مشهود است به طوری که در این غلظت‌ها با افزایش زمان از درصد بقاء سلولی کاسته شده است. شاید زمان در غلظت‌های بالاتر از غلظت مهاری (IC_{50}) تأثیر کمی دارد.

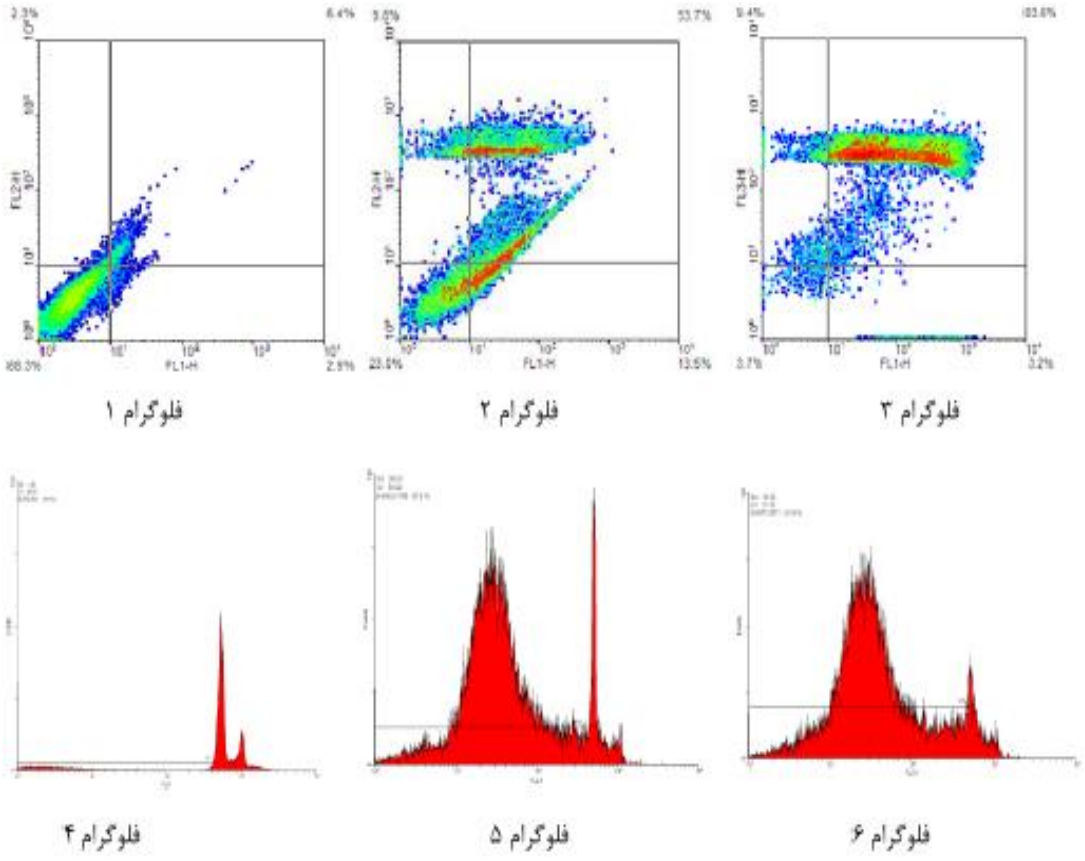
Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017



نمودار ۱- مقایسه اثر عصاره دی کلرومتانی ستاره شکننده گونه Ophiocoma erinaceus با غلظت های مختلف بر درصد بقاء سلول رده سلولی EL4 بعد از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت نسبت به گروه کنترل توسط MTT assay. غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره مورد نظر باعث مهار رشد سلولی تقریباً نیمی از سلول‌ها (IC_{50}) با $p<۰,۰۵$ شده و غلظت های بالاتر آن اغلب سلول‌ها را از بین برده است.

در نمودار ۲ بخش الف، فلوگرام‌های حاصله از آزمون AnnexinV-FITC/P را می‌توان مشاهده کرد. درصد سلول‌های زنده در بخش پایین سمت چپ فلوگرام، درصد سلول‌ها در مراحل اولیه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در بخش پایین سمت راست، درصد سلول‌ها در مرحله مرگ برنامه‌ریزی شده سلول تأخیری در بخش بالا سمت راست و درصد سلول‌های نکروزه در بخش بالا سمت چپ قرار می‌گیرند. نتایج حاصل از آزمون AnnexinV-FITC/PI بعد از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره ستاره شکننده در مقایسه با گروه کنترل (نمودار ۲، فلوگرام ۱) نشان داد نوع مرگ سلولی القاء شده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بوده و در غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره ستاره شکننده (نمودار ۲، فلوگرام ۲) ۵۲٪ سلول‌ها و در غلظت ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره ستاره شکننده (نمودار ۲، فلوگرام ۳)، ۸۸٪ سلول‌ها دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلول شده‌اند. در جهت شناسایی مرگ سلولی از محلول PI استفاده شد. پروپودیوم یداید یک مولکول فلورسنت است که به نوکلئیک اسید اتصال می‌یابد. نتایج آزمون فلوسیتومتری پروپودیوم افزایش فاز sub G0/G1 (پیک مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) و کاهش چشم‌گیر فاز S در غلظت ۳۱، ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده (نمودار ۲، فلوگرام ۵) نسبت به گروه کنترل (نمودار ۲، فلوگرام ۶) نشان داد که بیان کننده نوع مرگ سلولی القاء شده در گروه‌های تیماری مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017



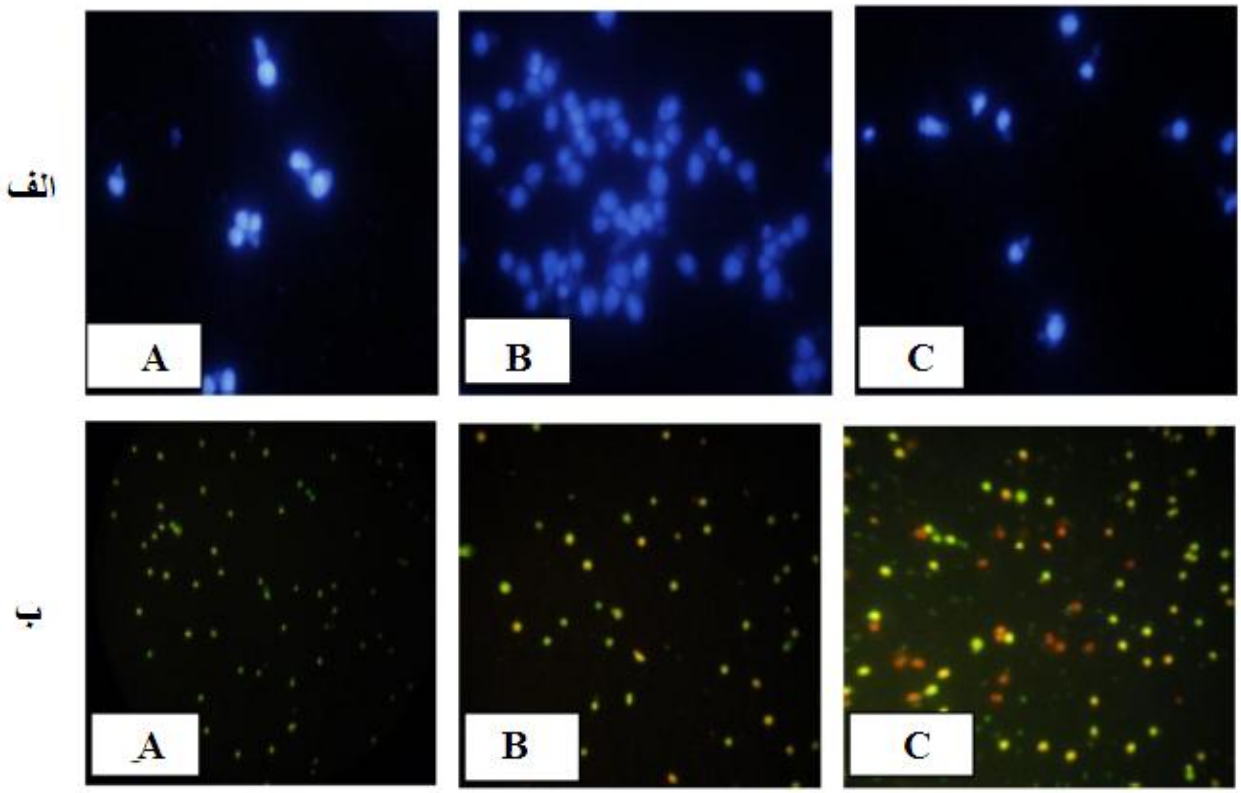
نمودار ۲- فلوگرام ۱،۲ و۳ به دست آمده از کیت Annexin V-FITC / PI برای تعیین نوع مرگ سلولی رسم شده توسط دستگاه فلوسایتومتری: گروه کنترل (فلوگرام ۱) که اکثر سلول‌ها (۹۸/۲٪) زنده اند. در فلوگرام ۲ و ۳، تیمار رده سلولی EL4 با غلظت ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده به ترتیب ۵۳/۷ و ۸۳/۶ درصد سلول‌ها را در مرحله مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نشان داد. فلوگرام ۴ و ۵ و ۶ حاصله از آزمون پروپودیوم یداید رسم شده توسط دستگاه فلوسایتومتری: گروه کنترل (فلوگرام ۴)، در فلوگرام ۵ و ۶ افزایش پیک sub G0/G1 مشاهده شد که نشان دهنده القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول تحت تأثیر تیمار سلول‌های رده سلولی EL4 با غلظت ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده می‌باشد.

DAPI یک رنگ فلورسنت برای رنگ‌آمیزی DNA است که به میزان بالایی به جفت بازهای AT در DNA متصل شده و بوسیله میکروسکوپ فلورسنت می‌توان تغییرات مورفولوژی هسته (مانند قطعه قطعه شدن) را بررسی کرد. نتایج حاصله از این رنگ‌آمیزی نوع مرگ سلولی القاء شده توسط عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده را مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نشان می‌دهد. از جمله نشانه‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلول قطعه قطعه شدن هسته و غیریکنواخت شدن غشاء سلول‌هاست که در گروه‌های تیمار با دوزهای مؤثر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل ۱، بخش الف).

در رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / پروپودیوم یداید سلول‌های زنده به رنگ سبز، سلول‌هایی که در مراحل اولیه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول هستند به رنگ زرد و

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

نارنجی و سلول‌هایی که در مراحل آخر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول هستند به رنگ قرمز درآمده‌اند که نتایج حاصله نشان می‌دهد در غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده (شکل ۱ بخش ب، قسمت B) سلول‌های EL4 به رنگ زرد و نارنجی در آمده که نشان دهنده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول اولیه در این سلول‌ها بوده و در غلظت ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شکل ۱ بخش ب، قسمت C) سلول‌های EL4 به رنگ نارنجی-قرمز تمایل داشته که نشان می‌دهد در این غلظت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول ثانویه شدیدتر است.

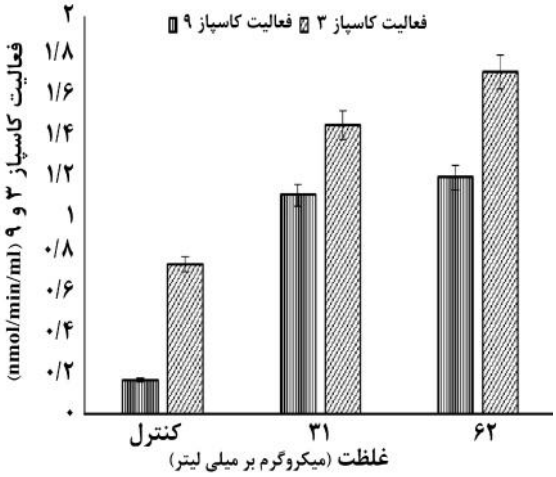


شکل ۱- قسمت الف: رنگ آمیزی DAPI (با بزرگنمایی×۲۰۰). در گروه کنترل (بخش A) هسته‌ها منسجم هستند. هسته سلول‌های EL4 بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده (بخش B و C) در مقایسه با گروه کنترل، قطعه قطعه شده که معرف تغییر شکل مورفولوژیکی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است. قسمت ب: رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / پروپودیوم یداید. گروه کنترل(بخش A)، سلول‌ها زنده و به رنگ سبز مشاهده می‌شوند. تیمار با غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده بر روی رده سلولی EL4 (بخش B و C) که ظهور رنگ زرد و نارنجی نشان دهنده مرگ سلولی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است. تصاویر توسط میکروسکوپ فلورسنت Olympus با بزرگنمایی ×۲۰۰ گرفته شده اند.

در تعیین مسیر القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول توسط کیت کاسپاز ۳ و ۹، نتایج آزمایشات انجام شده بر روی سلول‌های رده سلولی EL4 تحت تیمار با غلظت‌های ۶۲ و ۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده (نمودار ۳) در مقایسه با گروه کنترل افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ را نشان داد معرف این

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

مطلب است که مرگ سلولی القاء شده با عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده بر رده سلولی EL4 وابسته به کاسپاز بوده و به احتمال زیاد از مسیر داخلی باعث القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در سلول‌های لمفومایی می‌شوند.



نمودار ۳- میزان فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های تیمار شده با عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده در مقایسه با گروه کنترل. داده‌ها نشان داد فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در غلظت‌های ۳۱ و ۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته که وابسته به غلظت است.

بحث

در طی دهه گذشته هر ساله چندین مولکول ضد سرطانی از جانوران دریایی استخراج شده است. با توجه به آزمایش ما اثر سیتوتوکسیک و نوع مرگ سلولی القاء شده توسط عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه خلیج فارس بر روی سلول‌های سرطان لنفومایی نشان داده شد.

در رابطه با اثرات ضد سرطانی فرآورده‌های طبیعی دریایی تا به حال کارهای زیادی بر روی فلور دریایی گزارش شده است. Pereira و همکارانش فعالیت ضد تکثیری ترکیبات استخراج شده از نوعی جلبک قهوه‌ای (گونه *Stypopodium flabelliforme*) را بر روی چندین رده سلولی نشان دادند [۲۰]. از جمله مطالعاتی که اثرات ضد سرطانی خارپوستان را مطالعه کرده‌اند می‌توان به ارائه گزارشی از مواد فعال زیستی با خاصیت ضد سرطانی از بی‌مهرگان دریایی توسط Sima و همکارش اشاره کرد [۱۲]. در بین خارپوستان دریایی اغلب مطالعات بر روی خیار دریایی و ستاره دریایی متمرکز شده و مطالعات کمتری بر روی ستاره شکننده صورت گرفته است که از جمله بررسی اثرات سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و آلی دو گونه خیار دریایی *Holothuri aedulis* و *Stichopus horrens* توسط Althunibat و همکارانش مطالعه شد و بیان شد که عصاره آلی *Stichopus horrens* اثرات سیتوکسیک بیشتری بر ضد سلول‌های سرطانی A549 و TE1 (سرطان ریه) نشان داده است. در میان دو عصاره آبی، عصاره آبی *Holothuri aedulis* اثرات سیتوکسیک بیشتری داشته و عمده اثرگذاری آن بر روی رده سلولی TE1 گزارش شد [۲۱]. در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر می‌توان این گونه گفت که تأثیر عصاره آلی (ارگانیک) خیار دریایی نسبت به عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده بهتر بوده و در دوزهای پایین‌تر دارای اثر سمیت سلولی است. شاید علت این نتایج متفاوت در آزمایشات انجام شده، تفاوت در میزان حساسیت رده‌های مختلف سلولی به عصاره های مورد مطالعه باشد.

JO و همکارانش علاوه بر فعالیت ضدالتهابی عصاره متانولی ستاره دریایی گونه *Asterina pectnifera*، فعالیت سیتوتوکسیک این عصاره را بر روی رده RAWZ64.7 (رده سلولی لوکمیای مونوسیتی موش) مورد بررسی قرار دادند [۲۲]. نتایج حاصله توسط این محققین نشان داد عصاره مورد نظر در غلظت‌های بسیار بالاتر از غلظت‌های عصاره دی‌کلرومتانی اثر سمیت سلولی دارد [۲۲]. این تفاوت آشکار نیز بستگی به متفاوت بودن عصاره‌های مورد

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

استفاده و ماده مؤثره و نوع رده سلولی قابل توجیه است. Ferreres و همکارانش، از عصاره متانولی ستاره دریایی گونه *Marthasteria sglacialis* چندین کاراتنوئید استخراج نموده و اثر ضد سرطانی آن را مورد ارزیابی قرار دادند، که مهار تکثیر سلولی شدیدتری را بر روی رده سلولی RBL-2H3 (سرطان خون بازوفیلیک موش صحرائی) نشان داد [۲۳]. اثر سمیت سلولی و آپوپتوتیک عصاره بافر فسفات تام ستاره دریایی گونه *Acanthaster planci* را در مقایسه با تاموکسیفن (داروی متداول سرطان سینه) بر روی رده سلولی سرطان پستان MCF-7توسط Mutee و همکارانش مطالعه کردند که در مجموع نتایج نشان داد عصاره بافر فسفات ستاره دریایی اثرات مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بهتر و سریع‌تری نسبت به داروی تاموکسیفن دارد [۲۴]. نتایج حاصله از این تحقیق در مقایسه با این آزمایش نشان داد عصاره بافر فسفات ستاره دریایی نسبت به عصاره دی کلرومتانی ستاره شکننده گونه خلیج فارس، اثر سریع‌تر و بهتری داشته است.

در پژوهشی دیگر Mutee و همکاران وی از این گونه ستاره دریایی (*Acanthaster planci*) عصاره‌های مختلف شامل عصاره متانولی، عصاره اتانولی و عصاره بافر فسفات تهیه کرده و بر روی رده‌های سلولی MCF-7 و HCT-116 اثر سیتوتوکسیک آنها را مقایسه نموده و گزارش کردند که عصاره بافر فسفات ستاره دریایی بیشتر از سایر عصاره‌ها فعالیت سمیت سلولی بر ضد رده‌های سلولی MCF-7 و HCT-116 دارد [۲۵]. با توجه به این نتایج و مقایسه آزمایشات انجام شده می‌توان گفت نتایج حاصله از عصاره بافر فسفات ستاره دریایی به عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده بیشتر شبیه است که با توجه به متفاوت بودن روش عصاره‌گیری و رده سلولی اثرات هر عصاره متفاوت است. Malyarenko و همکارانش به بررسی فعالیت ضد سرطانی ستاره دریایی گونه *Leptasteria sochotensis* پرداخته و شش استروساپونین از عصاره الکلی این ستاره استخراج نموده که برخی از آنها فعالیت سمیت سلولی متوسط و برخی سمیت بالایی بر ضد رده سلولی سرطانی D-T47 و RPMI-7951 نشان داده‌اند [۲۶].

در رابطه با پژوهش های صورت گرفته بر روی ستاره شکننده، Prabhu و همکارش به بررسی ویژگی‌های سمیت سلولی و ضد میکروبی و همولایتیک عصاره تام ستاره شکننده گونه *Ophiocnemis marmorata* پرداخته و پیشنهاد دادند که عصاره اتانولی تام این گونه دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی و عصاره متانولی تام این گونه دارای بیشترین میزان خاصیت همولایتیک است. این پژوهشگران گزارش نمودند که ویژگی سیتوتوکسیک عصاره تام این گونه ستاره شکننده مربوط به ترکیبات استروئیدی موجود در عصاره تام این گونه می‌باشد [۲۷]. همچنین، Amini و همکارانش بر روی اثرات سیتوتوکسیک و همولیتیک ترکیبات شبه ساپونین استخراج شده از ستاره شکننده خلیج فارس بر رده سلول سرطان سرویکس Hela مطالعه کرده و نشان دادند این ترکیبات دارای اثر مهاری بر رشد سلول‌های سرطان دهانه رحم هستند [۱۴].

با توجه به تحقیقات گذشته می‌توان علت متفاوت بودن نتایج در میزان سیتوتوکسیک و میزان مهار تکثیر سلولی را به میزان مقاومت و میزان حساسیت متفاوت هر رده سلولی نسبت به عصاره‌ها و ترکیبات و غلظت‌های مختلف هر عصاره نسبت داد و همچنین، این‌گونه توضیح داد که میزان اثرگذاری یک ترکیب خالص یا یک عامل فعال در

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

عصاره مورد نظر می‌تواند تأثیر بهتر و سریع‌تری را موجب شود.

مطالعه حاضر نیز نشان دهنده وجود مواد مؤثره در عصاره دی کلرومتانی ستاره شکننده بوده و با توجه به اثری که به ضد سرطان خون دارد در شرایط *In Vitro* می‌تواند در درمان سرطان خون نوید دهنده باشد. پیشنهاد می‌شود در آینده با جداسازی ماده مؤثره موجود در عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه خلیج فارس (*Ophiocoma erinaceus*)(با توجه به اینکه کاری زمان‌بر بوده و تجهیزات به خصوصی برای جداسازی ترکیبات نیاز است) اثرات آن را بر روی سایر رده‌های سلولی نیز بررسی شود.

نتیجه‌گیری

عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه *Ophiocoma erinaceus* می‌تواند باعث مهار تکثیر ۵۰٪ سلول‌های EL4 شود. نوع مرگ سلولی القاء شده توسط عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول تعیین شده و تمام آزمون‌های انجام شده از جمله PI و رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیم یداید و Annexin V-FITC و DAPI و کیت تشخیصی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول همه تأیید کننده نتایج به دست آمده می‌باشند. همچنین، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول القاء شده از مسیر درونی باعث القاء مرگ سلولی در دوزهای مؤثره در این رده سلولی می‌شود. به عنوان نتیجه کلی می‌توان گفت احتمالاً عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده گونه *O. erinaceous* به عنوان منبعی از ترکیبات بر مهار تکثیر سلول‌های سرطان لنفوما مؤثر است و با توجه به القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول توسط ترکیبات این عصاره، عصاره دی‌کلرومتانی ستاره شکننده می‌تواند کاندید مناسبی جهت مطالعات بیشتر در زمینه سرطان لنفوما باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات زیست شناسی کاربردی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد و نویسندگان برخود لازم می‌دانند از کلیه کارشناسان و همکاران محترم مرکز تحقیقات تشکر و سپاسگزاری نمایند.

References

[1] El-Henawy AA, Khowdiary MM, Badawi AB, Hussein MS. In Vivo Anti-Leukemia, Quantum Chemical Calculations and ADMET Investigations of Some Quaternary and Isothiouronium Surfactants. *Pharmaceuticals* 2013; 6(5): 634-49.

[2] Aied MA, Siti A, Abu B, Rola A, Abdul Rahman O, Mohd Hair B, et al. Effects of Newcastle disease virus strains AF2240 and V4-UPM on cytolysis and apoptosis of leukemia cell lines. *Int J Mol Sci* 2011; 12(12): 8645-60.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

[3] Károlyi BI, Bösze S, Orbán E, Sohár P, Drahos L, Gál E, et al. Acylated mono-, bis- and tris- cinchona-based amines containing ferrocene or organic residues: synthesis, structure and in vitro antitumor activity on selected human cancer cell lines. *Molecules* 2012; 17(3): 2316-29.

[4] Kovar L, Etrych T, Kabesova M, Subr V, Vetvicka D, Hovorka O, et al. Doxorubicin attached to HPMA copolymer via amide bond modifies the glycosylation pattern of EL4 cells. *Tumor Biol* 2010; 31(4): 233-42.

[5] Wu S, Zhao X, Li Y, Du Q, Sun J, Wang Y, et al. Adsorption Properties of Doxorubicin Hydrochloride onto Graphene Oxide: Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic Studies. *Materials* 2013; 6(5): 2026-42.

[6] Schumacher M, Mareike K, Mario D, Marc D. A survey of marine natural compounds and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2010. *Molecules* 2011; 16(7): 5629-46.

[7] Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Mar Drugs* 2014; 12(2): 1066-101.

[8] Hu X, Song L, Huang L, Zheng Q, Yu R. Antitumor Effect of a Polypeptide Fraction from Arca subcrenata in Vitro and in Vivo. *Mar Drugs* 2012; 10(12): 2782-94.

[9] Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol* 2011; 4(6): 687–99.

[10] Liu M, Zhao X, Zhao J, Xiao L, Liu H , Wang C, et al. Induction of apoptosis, phase arrest and microtubule disassembly in K562 leukemia cells by Mere15, a novel polypeptide from Meretrix meretrix Linnaeus. *Mar Drugs* 2012; 10(11): 2596-607.

[11] Zoysa MD. Medicinal benefits of marine invertebrates: sources for discovering natural drug candidates. *Adv Food Nutr Res* 2012; 65: 153-69.

[12] Sima P, Vaclav V. Bioactive substances with anti-neoplastic efficacy from marine invertebrates: Bryozoa, Mollusca, Echinodermata and Urochordata. *World J Clin Oncol* 2011; 2(11): 362-6.

[13] Fatemi SMR, Jamili S, Valinassab T, Kuranlu N. Diversity of Ophiuroidea from lengeh portand Qeshm island in the persian gulf. *J Fish Aquat Sci* 2010*;* 5(1)*:* 42-8.

[14] Amini E, Nabiuni M, Baharara J, Parivar K, Asili J. Hemolytic and cytotoxic effects of Saponin like Persian Gulf brittle star (Ophiocoma erinaceus). *J Coast Life Med* 2014; 2(10): 762-68.

[15] Yorsin S, Kanokwiroon K, Radenahmad N, Jansakul Ch. Effects of Kaempferia parviflora rhizomes dichloromethane extract on vascular functions in middle-aged male rat. *J Ethnopharmacol* 2014; 156: 162-74.

[16] Franchi GC, Moraes CS, Toreti VC, Daugsch A, Nowill AE, Park YK. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

Evidence-based Complement Altern Med 2012; 2012: 1-6.

[17] Chen G, Zhang P, Huang T, Yu W, Lin J, Li P, et al. Polysaccharides from rhizopus nigricans mycelia induced apoptosis and G2 / M arrest in BGC-823 cells. *Carbohydr Polym* 2013; 97(2): 800-8.

[18] Dwivedi V, Richa Sh, Showket H, Chaiti G, Mausumi B. Cytotoxic potential of indian spices (extracts) against esophageal squamous carcinoma cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2011*;* 12: 2069-73.

[19] Siti AAB, Madihah Z, Abdul Manaf A, Aini I. Induction of apoptosis by newcastle disease virus strains AF220 and V4-UPM in human Promyelocytic Leukemia (HL60) and Human T- Lymphoblastic Leukemia (CEM-SS) cells. *World Acad Sci Eng Technol* 2012*;* 6(4): 356-60.

[20] Pereira DM, Cheel J, Areche C, San-Martin A, Rovirosa J, Silva LR, et al. Anti-proliferative activity of meroditerpenoids isolated from the brown alga Stypopodium flabelliforme against several cancer cell line. *Mar Drugs* 2011; 9(5) :852-62.

[21] Althunibat OY, Ridzwan BH, Taher M, Daud JM, Jauhari Arief Ichwan S, Qarahheh H. Antioxidant and cytotoxic properties of two sea cucumbers, Holothuria edulis lesson and Stichopus horrens selenka. *Acta Biologica Hungarica* 2013; 64(1): 10-20.

[22] Jo W, Jin Choi Y, Ji Kim H, Hyouk Nam B, An Lee G, Yeong Seo Su, et al. Methanolic extract of Asterina pectinifera inhibits LPS-induced inflammatory mediators in murine macrophage. *Toxicol Res Mar* 2010; 26(1): 37-46.

[23] Ferreres F, Pereira DM, Gil-Izquierdo A, Valenta˜o P, Botelho J, Mouga T, et al. HPLC-PAD-atmospheric pressure chemical ionization-ms metabolite profiling of cytotoxic carotenoids from the echinoderm marthasterias glacialis (spiny sea-star). *J Sep Sci* 2010; 33: 2250-7.

[24] Mutee AF, Salhimi SM, Ghazali FC, Al-Hassan FM, Lim CP, Kamarruddin I, et al. Apoptosis induced in human breast cancer cell line by Acanthaster planci starfish extract compared to Tamoxifen. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012; 6(3): 129-34.

[25] Mutee AF, Salhimi SM, Ghazali FC, FA Aisha A, Lim CP, Kamarruddin I, et al. Evaluation of anti-cancer activity of acanthester planci extracts obtained by different methods of extraction. *Pak J Pharm Sci* 2012; 25: 697-703.

[26] Malyarenko TV, Kicha AA, Ivanchina NV, Kalinovsky AI, Popov RS, Vishchuk OS, et al. Asterosaponins from the Far Eastern starfish Leptasterias ochotensis and their anticancer activity. *SteroIids* 2014; 87: 119-27.

[27] Prabhu K, Bragadeeswaran S. Biological properties of brittle star Ophiocnemis marmorata collected from parangipettai, southeast coast of India 2013. *J Microbiol Antimicrob* 2013; 5(10): 110-8.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 12:53 IRDT on Monday August 7th 2017

Effect of the Persian Gulf Brittle Star (*Ophiocoma erinaceus*) Dichloromethane Extract on Induction of Apoptosis on EL4 Cell Line

M. Afzali[1], J. Baharara[2], Kh. Shahrokhabadi[3], E. Amini[4]

Received: 20/01/2015 Sent for Revision: 08/04/2015 Received Revised Manuscript: 18/05/2015 Accepted: 14/06/2015

Background and Objective: The natural products are considered promising candidates for cancer treatment. Brittle stars are echinoderms that biologically include active compounds. The aim of this study was to evaluate the effect of the Persian Gulf brittle star (*Ophiocoma erinaceus*) dichloromethane extract on induction of apoptosis in the EL4 cell line.

Materials and Methods: In this laboratory study, the lymphoma cells were cultured in RPMI 1640 medium. After 24 h, cells were treated with different concentrations (7.5, 15, 31, 62, 125 and 250 µg/ml) of brittle star dichloromethane extract. Then, cytotoxic effect and effective dose were studied using MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), further, cell death was induced by the relevant tests and apoptosis induction pathway was investigated by caspase 3 and 9 assay. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by TUKEY's multiple comparisons test**.**

Results: The findings showed that the brittle star extract had a cytotoxic effect on Lymphoma cell line. So that lower concentrations of 31 µg/ml inhibited cell proliferation and higher concentrations of 31 µg/ml caused lysis of cells and the IC_{50} concentration was 31 µg/ml ($p<0.05$). The caspase colorimetric assay showed that apoptosis induced by brittle star extracts was caspase-dependent via intrinsic pathway on lymphoma cell line.

Conclusion: Brittle star dichloromethane extract promoted apoptosis in EL4 cells that proposed an innovative candidate for treatment of leukemia, altogether

Key words: Leukemia, Apoptosis, Cytotoxic, Natural products, Echinoderm, EL4 cell line

Funding: This study was funded by Islamic Azad University of Mashhad.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University of Mashhad approved the study.

How to cite this article: Afzali M, Baharara J, Shahrokhabadi Kh, Amini E. Effect of the Persian Gulf Brittle Star (*Ophiocoma erinaceus*) Dichloromethane Extract on Induction of Apoptosis on EL4 Cell Line. *J RafsanjanUniv Med Sci* 2015; 14(6): 467-80. [Farsi]

1- MSc Student of Research Center for Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2- Associate Prof., Dept. of Animal Developmental Biology, Research Center for Animal Development Applied Biology & Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
(Corresponding Author) Tel: (0513) 8437092, Fax: (0513) 8437092, E-mail: baharara@yahoo.com
3- Assistant Prof., Dept. of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
4- PhD Student, Dept. of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran