مطالعه اثر سیتوتوکسیک عصاره متانولی از تانتاکل‌های شقایق موکتی (*Stichodactyla haddoni*) از خلیج فارس بر روی رده سلول‌های سرطان کولون و مغز انسان در شرایط آزمایشگاهی

• **زیبا مقدسی***: گروه زیست شناسی‌دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۵

چکیده

شقایق موکتی *Stichodactyla haddoni* یک جانور ثابت و ساکن اقیانوس است. زهر شقایق‌های دریایی می‌توانند دارای یک منبع قوی از ترکیبات فعال دارویی باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر کشندگی سم خام جدا شده ازشقایق دریایی *S. haddoni* از خلیج فارس بر روی میزان مرگ و میر رده‌های سلولی سرطانی مغز و کولون با استفاده از نمک تترازولیوم در شرایط آزمایشگاهی بود. نمونه‌های شقایق دریایی از جزیره لارک خلیج فارس از جنوب ایران صید شدند. عصاره‌گیری متانولی از تانتاکل‌ها انجام شد. سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف زهر خام به‌دست آمده از ۰/۷۸-۱۰۰ میکروگرم به‌صورت رقیق‌سازی در طی زمان ۲٤ ساعت در معرض قرار گرفتند. نتایج آنالیز آماری نشان داد فعالیت ضد سرطانی عصاره روی رده‌های سلول‌های سرطانی تقریباً در همه دوزها فعالیتی مشابه به‌همدیگر داشتند (P<۰/۰۰۱). زهر خام، مرگ و میر بیش‌تری روی سلول‌های سرطانی مغز نسبت به سلول‌های کولون ایجاد کرد. نتیجه IC۵۰ غلظت‌های مختلف زهر خام بر روی رده‌های سلولی مغز و کولون به‌ترتیب (٦/٥٨ ، ۳۱/٥٤ میکروگرم) به‌دست آمد. پس زهرخام *S. haddoni* می‌تواند به‌عنوان یک عامل شیمیایی و جلوگیری کننده قوی رشد برای رده‌های سلولی به‌خصوص سرطان مغز مطرح باشد.

کلمات کلیدی: *Stichodactyla haddoni*، اثر سیتوتوکسیک، سم خام، حیوانات زهری دریایی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ziba_mg2000@yahoo.com

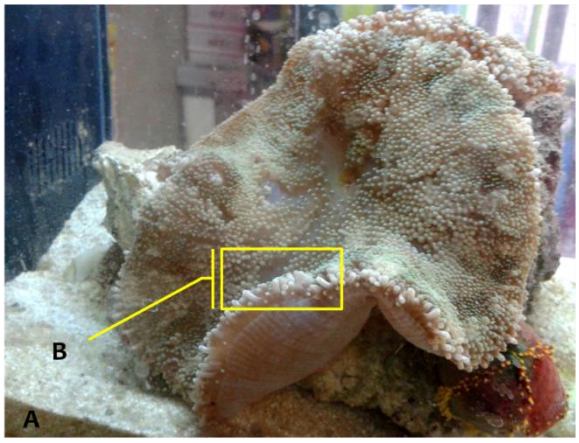
مقدمه

سموم تولید شده توسط موجودات آبزی می‌توانند حاوی منابع قوی از مواد فعال باشند که می‌توان از آن‌ها برای کاربردهای درمانی و پیشرفت داروهای جدید با منشاء طبیعی استفاده کرد. نتایج مطالعه آن‌ها در این چارچوب در سه یا چهار دهه گذشته نشان دادند که هنوز مکانیسم‌های عملکردی آن‌ها ناشناخته باقی‌مانده و تحت بررسی می‌باشد (Morabito و همکاران، ۲۰۱۲). در طی دهه‌های گذشته مکانیسم‌های آسیب سلولی زهر مرجانیان مورد ارزیابی قرار گرفته و برای‌بررسی بیش‌تر این ترکیبات پارامترهای اساسی مانند بقاء سلولی، عملکرد متابولیسم و مکانیسم‌های عملکردی آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند(Mariottini و Pane، ۲۰۱۴).نتایج مطالعات سیتوتوکسیسیتی زهر مرجانیان در طی ده‌ها قرن فعالیت قوی و مهارکنندگی و در نهایت مرگ سلولی را در برابر سلول‌های سرطانی تائید می‌کنند که انسان را برای استفاده از غلظت‌های مناسب زهر برای تولید و پیشرفت داروهای شیمی درمانی (کاهش دادن دوز مصرفی و عوارض جانبی آن‌ها)در درمان سرطان‌ها هدایت می‌کند (Soletti و همکاران، ۲۰۰۸). یک‌سری‌ازداروهای‌ضدسرطانی مثل Adcetris،Yondelis،Cytarabine و Vidarabin مثال‌های قابل توجه و موفق از داروهای مشتق شده از جانوران مهره‌دار و بی‌مهره دریایی هستند که به‌طور رایج در بازار خریداری می‌شوند.

شقایق‌های دریایی متعلق به شاخه مرجانیان و رده آنتوزوآ است. این جانوران ترکیبات پیچیده‌ای‌از سم‌های پروتئینی برای دفاع و گرفتن شکار تولید می‌کنند که این سم‌ها نتیجه تولیدات ترشحی ساخته شده‌در دستگاه گلژی سلول‌های تخصص یافته کپسولی به‌نام نماتوسیست‌ها می‌باشند. نماتوسیست‌ها دارای یک رشته مارپیچ، پیچیده و محکم هستند که توسط محرک‌های شیمیایی و فیزیکی به‌درون شکار یا افراد مهاجم تزریق می‌شود (Ramezanpour و همکاران، ۲۰۱۲). شقایق‌های‌دریایی می‌توانندسموم سیتوتوکسیک مختلفی تولید کنند. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که این پروتئین‌ها دارای فعالیت قوی سیتوتوکسیک در برابر سلول‌های سرطانی انسان هستند. اخیراً Ramezanpour و همکاران(۲۰۱۲) اثرات ضدسرطانی زهر شقایق‌های دریایی *H. crispa* و *H. malu* در برابر سه ردیف‌های سلولی سرطانی را گزارش کردند. Monroy-Estrada و همکاران (۲۰۱۳) اثرات سینیرژیک فراکشن‌های جدا شده از شقایق دریایی *Bunodeopsis globulifera* روی سلول‌های سرطانی‌آدنوکارسینومای‌شش‌انسان را ثابت کردند. Soletti و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که سیتولایزین‌های مشتق شده از شقایق‌های دریایی سمیت القا شده توسط دوزهای پایین داروهای شیمیوتراپی را ۱۰ تا ۳۰۰ برابرافزایش می‌دهد (Soletti و همکاران، ۲۰۰۸). برای مطالعه حاضر از میان حیوانات زهری خلیج فارس شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* از خانواده Stichodactylidae برای جستجوی خواص ضدسرطانی بر روی دو رده‌سلولی‌سرطان انسان شامل مغز (U۸۷ میکروگرم) و کولون (SW۹۴۸) انتخاب شد که می‌تواند یک منبع قوی از ترکیبات دارویی فعال باشد. بنابراین مطالعه بیش‌تر در باره این ترکیبات از آن جهت ضرورت پیدا می‌کنند که‌می‌توان‌برای طراحی‌داروهای ضدسرطان‌جدیداز‌آن‌هااستفاده کرد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: نمونه‌های شقایق دریایی از آب‌های خلیج فارس از عمق ۲۰ متری جزیره لارک در خلیج فارس از جنوب ایران صید شد. نمونه در دمای ۲۰- نگه‌داری شد و به آزمایشگاه ونوم در انیستیتو پاستور ایران انتقال داده شد.



شکل ۱: A : *Stichodactyla haddoni* جمع‌آوری شده از جزیره لارک در خلیج فارس، B : تانتاکل‌ها

آماده‌سازی نمونه و عصاره‌گیری: در ابتدا نمونه منجمد شده در دمای اتاق ذوب شد و ماده مخاطی ترشح شده برروی سطح دهانی آن پاک گردید. تانتاکل‌ها توسط یک‌اسکالپل استریل به قطعات کوچک خورد شدند و برای عصاره‌گیری آماده گردیدند. به عصاره‌گیری ۳۴ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۵٪ به ۶/۱۶ گرم از تانتاکل‌های جدا شده اضافه شده و با یک هم‌زن مخلوط شدند. مخلوط به‌دست آمده در دمای ۴ درجه برای ۲۴ ساعت انکوبه شد. مخلوط در دور ۱۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه‌سانتریفوژ (Sigma 1-14, Germany) گردید. سوپرناتانت در دستگاه فریزدرایر (Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen Co., Germany) در انجماد خشک شد.

پودر به‌دست آمده با آب مقطرتزریقی استریل حل گردید. استوک محلول در دمای ۷۰- نگه‌داری شد.

سنجش پروتئین: غلظت پروتئین سم خام به‌دست آمده توسط روش بیسینکونینیک اسید(BCA) مطابق با دستورالعمل کیت خریداری شده (iNtRON Biotechnology Co. South Korea) اندازه‌گیری شد. این روش بر تبدیل CU^{+2} به CU^{+} در شرایط بازی استوار می‌باشد. این واکنش منجر به ایجاد رنگ بنفش تیره با حداکثر جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر می‌گردد (Smith، ۱۹۸۵).

SDS-PAGE: برای تعیین پروفایل پروتئینی زهر خام از روش سدیم‌دو دسیل آکریل آمید ژل الکتروفورزیس (SDS-PAGE) مطابق با روش استاندارد Laemmli (۱۹۷۰) استفاده شد. زهر خام به‌داخل ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ تزریق و با رنگ کوماسی بریلینت بلو رنگ‌آمیزی شد. برای تعیین وزن مولکولی از یک پروتئین مارکر (۸-۲۵۰ کیلو دالتون) استفاده شد.

کشت سلول: رده‌های سلولی سرطان کولون (SW948) و مغز (U87میکروگرم) از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید. رده‌های سلولی در محیط کشت کامل RPMI 1640 (Gibco Company، USA) با ۱۰٪FBS(GibcoCompany,USA)و ۱٪ پنی‌سیلین/ استرپتومایسین در فلاسک‌های کشت سلول پاساژ داده شدند. فلاسک‌های پاساژ داده شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO2 و ۸۰٪ رطوبت انکوبه شدند.

روش سیتوتوکسیسیتی: در این آزمون مبنای سنجش براساس معرض گذاری عصاره با غلظت‌های مختلف در مجاورت رده سلولی و سنجش تعداد سلول‌های مرده می‌باشد. بدین منظور از روش MTT و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان استفاده شد (Mosmann، ۱۹۸۳).

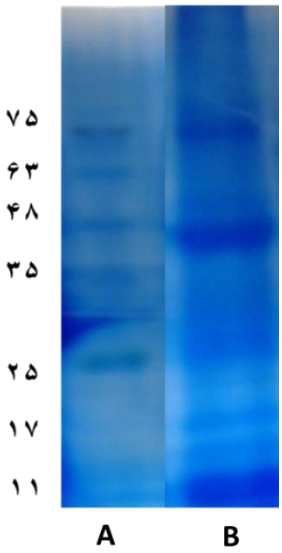
به همین دلیل در مرحله نخست برای سنجش درصد سلول‌های زنده برای کنترل تعداد سلول‌های انتقال یافته شده به پلیت‌ها از روش تریپان بلو استفاده گردید. سلول‌ها به تعداد $10^{4}\times$ در چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای در ۱۰ میکرولیتر محیط کشت کامل منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO2) ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل تازه در هر چاهک ریخته شد. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف زهر خام از ۱۰۰- ۰/۷۸ میکروگرم به‌صورت رقیق‌سازی در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت درطی زمان ۲۴ ساعت معرض قرار گرفتند. غلظت صفر به‌عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شد. پس از به اتمام رسیدن زمان انکوباسیون، محلول رویی سلول‌ها را دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیت MTT ۱۰٪ (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات) ریخته و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد و پس از برداشتن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر الکل ایزوپروپانل اضافه گردید. پلیت‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی شیکر شدند. جذب آن‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. درصد مرگ و میر با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مرگ} = \left[۱ - \left(\frac{\text{میانگین OD تست}}{\text{میانگین OD کنترل}} \right) \times ۱۰۰ \right]$$

نتایج

سنجش پروتئین: میزان جذب نوری مربوط به زهر با نمودار استاندارد مقایسه گردید و تعیین مقدار شد. غلظت زهر استخراج شده با استفاده از کیت BCA، ۸ میکروگرم در میکرولیتر به‌دست آمد.

SDS-PAGE: نتیجه SDS-PAGE ۵ باند جداگانه واضح نشان داد و وزن مولکولی پروتئین مشاهده شده به‌طور تقریبی از ۱۱ تا ۷۵ کیلو دالتون مشاهده گردید (شکل۲).



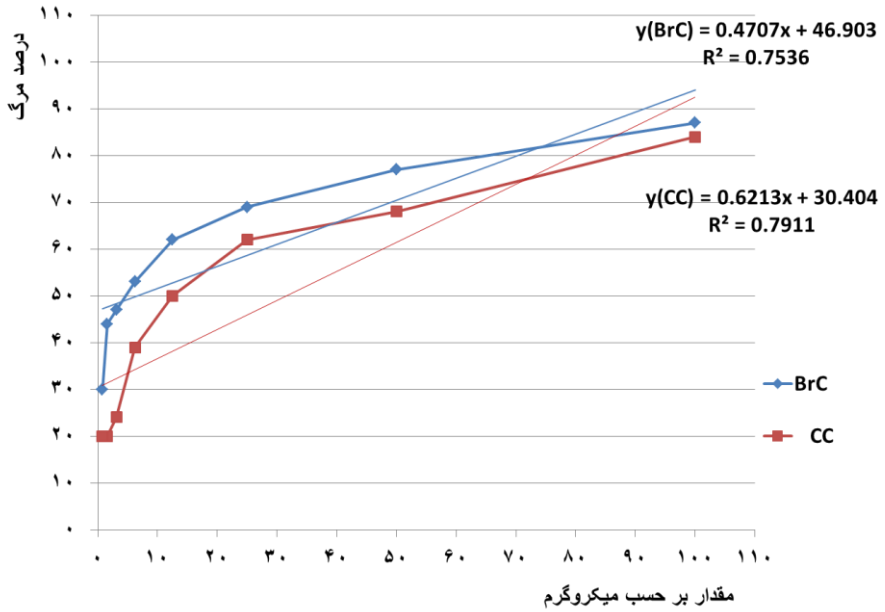
شکل۲. پروفایل پروتئینی عصاره متانولی زهر *S. haddoni*

A: وزن مولکولی مارکر. B: عصاره متانولی از تانتاکل‌های *S. haddoni*

ارزیابی فعالیت ضدسرطانی عصاره خام در برابر سلول‌های سرطانی

سرطانی: آنالیز واریانس برای فعالیت ضدسرطانی زهر خام روی ردیف سلولی‌های سرطان مغز (BrC) و کولون (CC) نشان داد که تقریباً در همه دوزها فعالیتی مشابه به همدیگر داشتند (P<۰/۰۰۱). مقایسه فعالیت‌های ضدسرطانی زهر خام بین ردیف سلولی‌های BrC و CC با آزمون دوطرفه t-test (P<۰/۰۰۲) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. زهر خام، مرگ و میر بیش‌تری روی سلول‌های سرطانی BrC نسبت

به سلول‌های CC ایجاد کرد. براساس آنالیز رگرسیون خطی، مقایسه دو به دو فعالیت ضدسرطانی زهر خام بین ردیف‌های سلولی BrC و CCارتباط معنی‌داری‌رانشان داد(R^2=۰/۹۴۴). این‌نتیجه یک مکانیسم مرگ و میر مشابه مشخص می‌کند. آنالیز رگرسیون خطی ارتباط معنی‌داری بین فعالیت ضدسرطانی زهر خام روی ردیف سلولی‌های BrC و CC و دوزهای آزمایش شده نشان داد R^2_{BrC}=۰/۷۵۴، R^2_{CC} = ۰/۷۹۱ این شباهت اشاره می‌کند به این‌که مرگ و میر در هر دو ردیف سلولی سرطان از روندی وابسته به دوز برخوردار می‌باشد. نتیجه IC۵۰ غلظت‌های مختلف زهر خام بعد ازگذشت ۲۴ ساعت بر روی‌ردیف‌های سلولی BrC وCC به‌ترتیب (۶/۵۸، ۳۱/۵۴ میکروگرم) به‌دست‌آمد.نتایج‌به‌دست‌آمده‌نشان می‌دهندکه‌باافزایش‌غلظت عصاره میزان مرگ و میر درهر دو ردیف سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد.



شکل ۳: میانگین درصد مرگ سلول‌های U۸۷ میکروگرم، SW۹۴۸. بر اثر زهر خام *S.haddoni*. IC۵۰ غلظت‌های مختلف زهر خام بر روی ردیف‌های سلولی BrC وCC به‌ترتیب (۶/۵۸، ۳۱/۵۴ میکروگرم) می‌باشد. آنالیز رگرسیون خطی ارتباط معنی‌داری بین فعالیت ضدسرطانی زهر خام روی ردیف‌های سلولی BrC وCC و دوزهای آزمایش شده نشان داد (R^2_{BrC}=۰/۷۵۴، R^2_{CC}=۰/۷۹۱). سرطان مغز (BrC)، سرطان کولون (CC).

بحث

امروزه تولیدات طبیعی نقش مثبتی در درمان سرطان بازی می‌کنند. عوامل ضدسرطان استفاده شده در کلینیک به‌صورت طبیعی یا مشتق شده از تولیدات طبیعی از منابع گوناگون مخصوصاً موجودات دریایی‌وجود دارند.تحقیق برای پیشرفت‌داروهای جدید شیمی درمانی با اثرات جانبی کم‌تر و با بازده درمانی بالاتر هنوز مهم است. مطالعه روی پتانسیل دارویی زهر شقایق‌های دریایی به‌طور ضعیف انجام شده است. در مطالعات وجود پروتئین‌ها در عصاره متانولی زهر شقایق به روش SDS-PAGEمحرزشده‌است که‌ساختار شیمیایی این پروتئین‌ها می‌توانند در درمان بیماری‌های مختلف از جمله سرطان مفید باشند (Malve، ۲۰۱۶؛ Cheung R C و همکاران، ۲۰۱۵). در تحقیق حاضر نیز با استفاده از روش SDS-PAGE باندهای پروتئینی واضحی از زهر با وزن مولکولی ۱۱، ۲۵، ۴۸، ۷۵ کیلودالتون مشاهده شد . Veeruraj و همکاران (۲۰۰۷) باندهای پروتئینی به‌دست آمده به‌روش SDS-PAGE از زهر *S. haddoni* در آب‌های ساحلی هند با وزن مولکولی ۱۰۳، ۸۲، ۶۳ کیلودالتون را گزارش کردند. با مقایسه نتایج مطالعه اخیر و مطالعه Veeruraj و همکاران (۲۰۰۷) می‌توان این تفاوت در پروتئین‌ها را به‌خاطر تاثیرات اکولوژی بر پروتئین‌ها بیان کرد. فعالیت ضدسرطانی مشابه زهر خام *S. haddoni*، روی رده‌های سلولی BrC و CC مطابق با آنالیز واریانس (P<۰/۰۰۱)، این شباهت قابل ملاحظه نه تنها ممکن است شانسی برای پیدایش یک فراکشن با این ویژگی بدهد بلکه ممکن هست یک شانس برای پیدا کردن یک عامل ضدسرطان با دوزهایی کم‌تر ایجاد نماید یا مانع از سمیت بر روی سلول‌های نرمال شود. نتایج مقایسه دو به دو فعالیت ضدسرطانی زهر خام بر روی سلول‌های سرطانی BrC و CC، این دو رده سلولی

حساسیت متفاوتی در معرض مقدار مساوی از زهر خام از خود نشان دادند. زهر خام مرگ بیش‌تری را روی سلول‌های BrC نسبت به سلول‌های سرطانی CCالقاکرد.بامقایسه ارتباط معنی‌داری بین فعالیت ضدسرطانی زهرخام روی‌رده‌های‌سلولی BrC و CC مکانیسم مشابهی در ایجادسمیت‌را نشان می‌دهند. EqTx-IIجدا شده از *Actinia equina* برای فعالیت سیتوتوکسیک در برابر رده‌های سلولی گلیوبلاستومای انسان U۸۷ و A۱۷۲ مطالعه شد. بعد از ۲۴ ساعت از درمان، ۱۰ میکروگرم/میکرولیتر از EqTx-II نشان داد که به‌طور قابل توجهی سیتوتوکسیک بوده و قابلیت زنده بودن سلول‌های U۸۷ و A۱۷۲ را به‌ترتیب تا۶۰٪ و ۴۸٪ کاهش داد اما ۱۰ میکروگرم/میکرولیتر از سلول‌های نرمال قابلیت زنده بودن را تا ۸۰٪ کاهش داد (Soletti و همکاران، ۲۰۰۸). تحقیق حاضر فعالیت ضدسرطانی زهرخام *S. haddoni* در برابر سرطان مغز انسان (U۸۷) را اثبات می‌کند. داده‌های حاصل از این تحقیق با نتایج Soletti و همکاران (۲۰۰۸) هم‌خوانی دارد. Clineوهمکاران(۱۹۹۵)نشان‌دادندزهر خام شقایق دریایی *Urticina piscivora* توانسته است که ۵۰٪ از سلول‌های سرطانی اپیدرموئید دهانی انسان (KB)، سلول‌های لوکمیا (L۱۲۱۰)، سلول‌های دیپلوئید جنینی شش انسان (HEL۲۹۹) را به‌ترتیب در مقدارهای ۶/۵۴، ۱۰/۰۷ و ۲/۳۴ میکروگرم/میکرولیتر مهار کند. زهر خام جدا شده از شقایق‌های دریایی *H. malu*, *C. adhaesivum* و *E. quadricolor* یک اثر مهارکنندگی قابل توجه‌ای روی سرطان پوست A۴۳۱ داشت. به‌علاوه، *H. malu* و *C. adhaesivum* یک اثر مهارکنندگی قابل توجه‌ای روی رده سلولیT۴۷D، سرطان سینه به‌مقدار ۴۰ میکروگرم/میکرولیتر داشت(Ramezanpour و همکاران، ۲۰۱۲). Cline و همکاران (۱۹۹۵) اثر ضدسرطانی یک پروتئین طراحی شده UpI و جدا شده از شقایق دریایی *Urticina piscivora* را مشخص کرد و نشان داد که رشد ۵۰٪ از سلول‌های سرطان اپیدرموئید انسان (KB)، سلول‌های لوکمیای لنفوشیت موش (L۱۲۱۰)، سلول‌های دیپلوئید شش جنینی انسان (HEL۲۹۹)، به‌ترتیب در مقدارهای ۴۰/۳۲، ۲۹/۹۹ و ۲۹/۷۴ میکروگرم/میکرولیتر می‌باشد. در مطالعه Jiang و همکاران (۲۰۰۳)، یک پروتئین recombinant شده، Src I از شقایق دریایی *Sagartia rosea* ۵۰٪فعالیت سیتوتوکسیک‌را روی رده‌های سلولی انسانی شامل آستروسیتوما (U۲۵۱)(۳/۵ میکروگرم/میکرولیتر)، سرطان شش (NSCLC) (۲/۸ میکروگرم/میکرولیتر)، سرطان کبد (BEL- ۷۴۰۲) (۳/۶ میکروگرم/میکرولیتر)، آدنوکارسینومای معده (BGC- ۸۲۳) (۷/۴ میکروگرم/میکرولیتر)، سلول‌های جنین موشی NIH سویس (NIH/۳T۳g) (۳/۴ میکروگرم/میکرولیتر) مهار کرد. Avila و همکاران (۱۹۸۸) یک سم از شقایق دریایی *Stoichactis helianthus* جدا کردند که سمیت را بر روی سلول‌های لوکمیای میلوسیت انسان HL-۶۰ مهار کرد.

Fedorov و همکاران(۲۰۱۰)یک پروتئین ضدسرطانی RTX-A از شقایق دریایی *Heteractis crispa* جدا کرد. RTX-A زنده بودن سلول‌های JB6 P+C۱۴۱، Hela, THP-۱، MDA-MB-۲۳۱ و snu-c۴ انسان را کاهش داد.

سیتولایزین EqTX-I از شقایق‌دریایی *Actinia equina* هم‌چنین یک کاهش در زنده بودن سلول‌های V-۷۹-۳۷۹A (دیپلوئید شش فیبروبلاست از هامستر چینی) در یک رفتار وابسته به دوز را القا می‌کند (Batista و همکاران، ۱۹۹۰). نتایج به‌دست آمده در این مطالعات نیز هم‌چنین فعالیت ضدسرطانی زهر خام *S. haddoni* را در برابر رده‌های سلولی سرطان مغز و کولون ثابت کرد. مطابق با نتایج به‌دست آمده، برای پیدا کردن پتانسیل دارویی با ارزش با فعالیت ضدسرطانی از زهر *S. haddoni*، در مدل حیوانی پیشنهاد می‌شود.

بنابراین عصاره متانولی زهر شقایق دریایی *S. haddoni* خلیج فارس می‌تواند دارای یک عامل ضدسرطانی قوی با فعالیت قابل قبول در برابر دو نوع رده سلولی سرطانی باشد.

منابع

۱. **Avila, A.D.; Mateo de Acosta, C. and Lage, A., 1988.** A new immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. Int. J. Cancer. Vol. 42, PP: 568-571.

۲. **Batista, U.; Macek, P. and Sedmak, B., 1990.** The cytotoxic and cytolytic activity of Equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina*. Cell Biol Int Rep. Vol. 14, No. 11, pp:1013-1024.

۳. **Cheung, R.C.F.; Ng, T.B. and Wong, J.H., 2015.** Marine Peptides: Bioactivities and Applications. Mar. Drugs. Vol. 13, pp: 4006-4043.

۴. **Cline, E.I.; Wiebe, L.I; Young, J.D. and Samuel, J., 1995.** Toxic effects of the novel protein UpI from the sea anemone *Urticina piscivora*. Pharmacol. Res. Vol. 32, No. 5, pp: 309-314.

۵. **Fedorov, S.; Dyshlovoy. S.; Monastyrnaya, M.; Shubina, L.; Leychenko, E.; Kozlovskaya, E.; Jin, J.O.; Kwaj.; J.Y.; Bode, A.M.; Dong, Z. and Stonick, V., 2010.** The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (*Radianthus macrodactylus*). Toxicon. Vol. 55, No. 4, pp: 811-817.

۶. **Jiang, X.; Chen, H.; Yang, W.; Liu, Y.; Liu, W.; Wei, J.; Tu, H.; Xie, X.; Wang, L. and Xu, A., 2003.** Functional expression and characterization of an acidic actinoporin from sea anemone *Sagartia rosea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 312, pp: 562-570.

۷. **Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Vol. 227, pp: 680-685.

۸. **Malve, H., 2016.** Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. J Pharm Bioallied Sci. Vol. 8, No. 2, pp: 83-91.

۹. **Mariottini, G.L. and Pane, L., 2014.** Cytotoxic and Cytolytic Cnidarian Venoms. A Review on Health Implications and Possible Therapeutic Applications. Toxins. Vol. 6, pp: 108-151.

۱۰. **Monroy-Estrada, H.; Chirino, Y.; Soria-Mercado, I.E. and Sánchez-Rodríguez, J., 2013.** Toxins from the Caribbean sea anemone *Bunodeopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. Vol. 19, 12 p.

۱۱. **Morabito, R.; Condello, S.; Currò, M.; Marino, A.; Ientile, R. and La Spada, G., 2012.** Oxidative stress induced by crude venom from the jellyfish *Pelagia noctiluca* in neuronal-like differentiated SH-SY5Y cells. Toxicol. In Vitro. Vol. 26, pp: 694-699.

۱۲. **Mosmann, T., 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. Vol. 65, No. 1- 2, pp: 55-63.

۱۳. **Ramezanpour, M.; Burke da Silva, K. and Sanderson, B.J.S., 2012.** Differential susceptibilities of human lung, breast and skin cancer cell lines to killing by five sea anemone venoms. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. Vol. 18, No. 2, pp: 157-163.

۱۴. **Smith, P.K., 1985.** Measurment of protein using bicinchoninic acide. Anal. Biochem.Vol. 150, No. 1, pp: 76-85.

۱۵. **Soletti, R.C.; de-Faria, G.P.; Vernal, J.; Terenzi, H.; Anderluh, G.; Borges, H.L.; Moura-Neto, V. and Gabilan, N.H., 2008.** Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. Anticancer Drugs. Vol. 19, No. 5, pp :517-525.

۱۶. **Veeruraj, A.; Arumugam, M.; Ajithkumar, T. and Balasubramanian, T., 2007.** Isolation and Biological Properties of Neurotoxin from Sea Anemone (*Stichodactyla mertensii, S. haddoni*). The Internet Journal of Toxicology. Vol. 5, No. 2, pp: 1-7.