اثرات سمیت سلولی، همولیز و ضدانعقادی عصاره خاره‌چسب *Siphonaria carbo*

- **احمد شادی*:** گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
- **امیر وزیری‌زاده:** پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
- **فاطمه آفریدون:** گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۶

چکیده

بررسی کنونی به‌منظور تعیین ویژگی سمیت سلولی عصاره‌های استخراجی از شکم‌پای *Siphonaria carbo* انجام شد. میزان سمیت عصاره‌های آبی و اتانولی این گونه به‌وسیله آزمون سمیت یاخته‌ای با استفاده از آرتمیا انجام شد. هم‌چنین اثرات انعقادی و لیزکنندگی روی گلبول‌های قرمز خون انسان بررسی گردید. نمونه‌ها از صخره‌های سواحل بوشهر جمع‌آوری شد. دو روش عصاره‌گیری از بافت تر و خشک با استفاده از حلال‌های آبی و اتانولی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آزمون سمیت یاخته‌ای نشان‌دهنده این بود که همه عصاره‌ها (به‌جز عصاره آبی خشک) اثر کشندگی داشتند و میزان سمیت با افزایش غلظت‌عصاره همبستگی داشت. عصاره آبی تر بیش‌ترین میزان سمیت (LC50-24hr=۵/۹۸) را در مقایسه با سایر عصاره‌ها داشت. نتایج به‌دست آمده از تست همولیز خونی نشان داد اثر همولیتیک معنی‌داری در عصاره‌های استخراجی وجود ندارد. هم‌چنین آزمون‌های انعقادی نشان دادند خاصیت ضدانعقادی در عصاره‌های استخراجی وجود ندارد. به‌طورکلی در بررسی کنونی خاصیت ضدانعقادی قوی مشاهده نشد، ولی بالا بودن اثر کشندگی سلولی عصاره‌ها، نشان‌دهنده احتمال بالای سایر اثرات مانند اثرات ضد توموری و ضد انگلی می‌باشد. روش‌های تخلیص عصاره‌ها به‌منظور دستیابی به کاربردهای دارویی عصاره پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: سمیت سلولی، همولیز خون، ضدانعقاد، فراورده‌های طبیعی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shadi@pgu.ac.ir

مقدمه

نرم‌تنان جنس سیفوناریا (Siphonaria) (زیر رده ریه‌داران و تیره کشک‌کداران سیفونارئیده) به‌عنوان خاره‌چسب‌های کاذب (False limpets) شناخته می‌شوند. این جانداران پوسته‌دار، به‌عنوان گیاه‌خوارانی به‌شمار می‌روند که دارای تنفس هوازی هستند (Jerez و همکاران، ۲۰۰۶؛ Ansell و همکاران، ۱۹۹۹). سیفوناریاها دارای پراکنش جهانی در کناره دریاها هستند و فقط، در قطب شمال یافت نمی‌شوند. از انواع سیفوناریا که در سواحل خلیج فارس گزارش گردیده‌اند می‌توان به گونه‌های *Siphonaria ashger*، *Siphonaria kurracheensis*، *Siphonaria savignyi* اشاره نمود. هم‌چنین انواع *Siphonaria lecanium* و *Siphonaria basseinensis* نیز در این منطقه دیده شده‌اند (Bosch و همکاران، ۱۹۹۵).

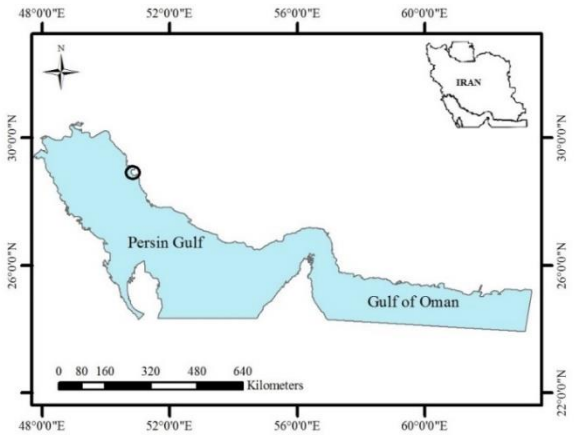
شکل ۱: تصویر خاره‌چسب *Siphonario carbo* در صخره‌های سواحل بوشهر

خاره‌چسب‌های سیفوناریا به‌دلیل نداشتن آبشش واقعی از خاره چسب‌های حقیقی (زیررده جلوآبششان یا Prosobranchia و تیره کشک‌کداران یا Patellidae و Acmaedae) متمایز هستند. سیفونارئیده مثل سایر ریه‌داران در سمت راست بدن دارای حفره ریوی می‌باشد. وجود چنین حفره‌ای اجازه می‌دهد تا برروی خشکی و از هوا تنفس نمایند. آن‌ها با دارا بودن جبه پشتی تکامل یافته که توسط یک سری چین خوردگی‌های پیچیده، تشکیل یک آب‌شش ثانویه را داده است، توانایی تنفس در زیر آب را نیز دارند (Ansell و همکاران، ۱۹۹۹). سیفوناریا به‌دلیل توانایی تنفس هوایی در خشکی و آب قادرند در منطقه جزر و مدی ساکن باشند. این موجودات می‌توانند در خط سواحل صخره‌ای مناطق بسیار گرم نیز زندگی کنند (Garson، ۲۰۰۶). این جانداران دارای اجداد دریایی هستند. هم‌چنین شواهد نشان‌دهنده این است که آن‌ها پل تکاملی میان نرم‌تنان شکم‌پای دریایی و خشکی‌زی هستند (Ansell و همکاران، ۱۹۹۹). مخاط ترشح‌شده از شکم‌پایان توسط غدد موجود در بخش‌های روی پوست و زیرپوست تولید می‌گردد (Luchtel و همکاران، ۱۹۹۷؛ Bubel، ۱۹۸۴). ماده ترشح شده از آن‌ها حاوی متابولیت‌های ثانویه متفاوتی است، که دلیل تفاوت آن در نوع رژیم غذایی موجود و یا ماهیت شیمیایی خاص خودجانور می‌باشد (Davies-Coleman، ۲۰۰۶؛ Wagele و همکاران، ۲۰۰۶؛ Ansell و همکاران، ۱۹۹۹؛ Bubel، ۱۹۸۴). وجود ملکول‌های چسبنده سفید از غدد ترشحی خانواده سیفونارئیده یکی ازمکانیسم‌های اجتناب از شکارچی می‌باشد (Ansell و همکاران، ۱۹۹۹). دفاع شیمیایی در بعضی از گونه‌های سیفوناریا بسیار موثر هستند به‌طوری‌که بسیاری از شکارچیان در سیستم تغذیه‌ای خود به راحتی پتلوگاستروپودها را مصرف، اما از خوردن سیفونارئیدها اجتناب می‌کنند (McQuaid و همکاران، ۱۹۹۹؛ Branch و Cherry، ۱۹۸۵؛ Branch، ۱۹۸۱). اما تحقیقات کمی برروی نقش ماده یاد شده در دفاع شیمیایی صورت گرفته است (McQuaid و همکاران، ۱۹۹۹؛ Ansell و همکاران، ۱۹۹۹).

بررسی کنونی به‌منظور تعیین ویژگی سمیت عصاره‌های استخراجی از شکم‌پای *Siphonaria carbo* انجام شد. در این رابطه با استفاده از آزمون کشندگی آرتمیا و اثرات انعقادی و لیزکنندگی روی گلبول‌های قرمز خون میزان سمیت عصاره‌های آبی و اتانولی این گونه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

خاره‌چسب (*Siphonaria carbo*) از بخش‌های مختلف صخره‌ای مناطق جزرومدی شهربوشهر و با اسکالپل جداگردید. سپس نمونه‌های جدا شده از این سواحل، با یونولیت حاوی آب دریا به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها را چندین بار با آب شست و شو داده تا هر گونه گل و لای اضافی خارج گردد. در ادامه، خاره‌چسب‌ها جهت نگه‌داری تا ادامه آزمایش‌ها در دمای ۲۰- منتقل شدند.



شکل ۱ منطقه جغرافیایی نمونه‌برداری (سواحل شهر بوشهر در شمال خلیج‌فارس)

از دو روش عصاره‌گیری از بافت تر و خشک استفاده شد. در روش عصاره گیری از بافت تر در هر بار عصاره گرفتن مقدار ۲۵۰ گرم نمونه تر با نسبت ۴:۱ با اتانول به خاره‌چسب‌ها اضافه گردید و بعد از۹۶-۷۲ ساعت به‌هم‌زدن توسط شیکر، ظرف دربردارنده نمونه با فویل آلمینیومی پوشیده و به‌مدت ۹۶ ساعت زیر هود قرار گرفت. مایع به‌دست آمده فیلتر شد و محلول حاصل طی مدت ۲روز در دمای ۳۹-۳۵درجه‌سانتی‌گراد به‌طور کامل خشک گردید (Ravi و همکاران، ۲۰۱۲؛ Jamali و همکاران، ۲۰۱۰). در روش عصاره‌گیری از بافت خشک مقدار۵۰گرم از نمونه‌های بدون صدف برای مدت ۹۶ ساعت در اون با دمای ۵۵-۵۰ به‌مدت ۹۶ ساعت خشک شد. نمونه‌های خشک شده به‌صورت پودر درآمد. سپس نمونه حاصله با الکل ۹۶ درجه به نسبت ۱:۴ ترکیب و به‌مدت ۹۶ ساعت تحت شرایط دمای اتاق و نور کم روی شیکر قرار گرفت (Ramasamy و همکاران، ۲۰۱۳؛ Jamali و همکاران، ۲۰۱۰). محلول حاصل فیلتر شد و در دمای ۳۹-۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو روز خشک گردید (Ravi و همکاران، ۲۰۱۲؛ Mariana و همکاران، ۲۰۰۹). در عصاره‌گیری به حلال آبی از روش فریزدرای جهت خشک‌کردن عصاره استفاده گردید.

آزمون سیتوتوکسیک: برای انجام تست سمیت سلولی از روش کشندگی ناپلیوس آرتمیا (BSLA یا brine shrimp lethality assay) استفاده شد. مطابق این روش ابتدا ۱ گرم از سیست آرتمیا در ۷۵۰ میلی‌لیتر آب با شوری تقریبی ۲۵ بخش در هزار ، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد آب، در زیر نور لامپ فلورسنت و تحت شرایط هوادهی مداوم به‌مدت ۲۴ ساعت تفریخ گردید. سپس، از ناپلئوس‌های هچ شده برای هر آزمون تعداد ۲۰ ناپلئوس فعال انتخاب شدند و به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر از آب با شوری ۲۵ بخش در هزار منتقل شد. در ادامه به لوله‌ها مقدار ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره اضافه گردید. کلیه تیمارها با سه بار تکرار انجام شد و یک تیمار کنترل منفی نیز درنظر گرفته شد. همه لوله‌ها دارای شرایط یکسان در زیر نور و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از طی ۲۴ ساعت تعداد لاروهای زنده و مرده در زیر میکروسکوپ استریو شمارش گردید. این نتایج به‌منظور سنجش پتانسیل سمیت‌زایی مورد استفاده قرار گرفت (Meyer و همکاران، ۱۹۸۲). نتایج براساس این فرمول محاسبه گردید:

ارزیابی زیستی درصد مرگ = {(تست – کنترل)/کنترل}×۱۰۰

آزمون همولیتیک: سنجش‌اثر همولیزی عصاره‌های استخراجی براساس روش انجام شده توسط Bondoc و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از گلبول‌های قرمز انسانی انجام شد. ابتدا خون شسته شده دو درصد از فردی، غیرسیگاری و مرد تهیه گردید. خون با Tris-HCl با۸= pH توسط نرمال سیلین(NaCl ۰/۸٪) سه بار شستشو داده شد. سپس از رسوب گلبول‌های قرمز شسته شده در Tris-HCl و NaCl سوسپانسیون دو درصد تهیه گردید. مقادیر ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰ و۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را با ۱۵۰ میکرولیتر حلال مخلوط گردیدند و با حلال Tris-HCl و NaCl به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده، سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون دو درصد اریتروسیت اضافه گردید. پس از انکوبه کردن به‌مدت ۳۰ دقیقه فعالیت همولایتیکی به‌وسیله قرائت طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا بررسی گردید.

آزمون ضدانعقاد -Activaited Partial ThromboplastinTime a-PPT: برای ارزیابی اثر ضدانعقاد مطابق روش Margolis (۱۹۵۷) ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها با ۱۵۰ میکرولیتر نرمال سالین ۰/۹٪ و ۲/۲۵ میلی‌لیتر از پلاسمای انسانی مخلوط گردید. سپس محلول آزمون به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام گرم بن‌ماری قرار گرفت. از محلول آزمون فوق مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شده و با ۱۰۰ میکرولیتر سفالوپلاستین مخلوط گردید. برای سنجش زمان انعقاد میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کلسیم کلراید اضافه شد. به‌منظور یکسان‌سازی محلول با دمای محیط با روش پارویی مخلوط شد. زمان انعقاد لخته فیبرین بعد از ۳۰ ثانیه ثبت گردید. در مورد آزمون همولیز سلول‌های خونی، جذب بین ۰/۵ تا۱،بیانگر همولیز متوسط و بین ۰/۵ تا۰/۲ نشانگر فعالیت همولیتیکی پایین می‌باشد. توکسین‌هایی که همولیز آن‌ها زیر ۰/۲ باشد، غیرهمولیتیک می‌باشند.

Prothrombin Time (PT): برای ارزیابی اثر ضدانعقاد مطابق روش Quick (۱۹۴۵) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آزمون با ۱۰۰ میکرولیتر از ترمبوپلاستین‌مخلوط گردید. در مرحله بعد برای سنجش زمان انعقاد لخته فیبرین میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کلسیم کلراید ۰/۹ درصد اضافه گردید. سپس با روش پارویی به‌منظور یکسان سازی محلول با دمای محیط مخلوط شد. سپس زمان انعقاد لخته فیبرین بعد از ۱۰ ثانیه ثبت گردید.

آنالیز داده‌ها: کلیه آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام گرفت. برای تعیین غلظت‌کشنده ۵۰٪(LC۵۰)ازنرم‌افزار Probit Analyser استفاده شد. سایر سنجش‌ها از جمله محاسبه میانگین و انحراف معیار و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۰ انجام گرفت.

نتایج

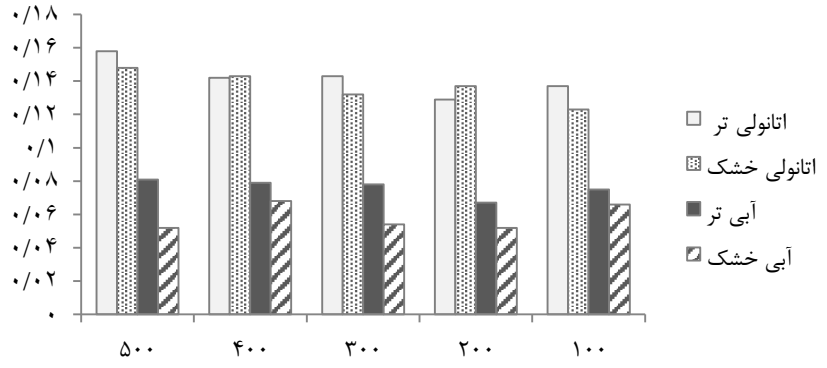
نتایج آزمون سمیت یاخته‌ای روی ناپلی آرتمیا نشان‌دهنده این بود که به‌جز عصاره آبی خشک بقیه عصاره‌ها اثر کشندگی روی یاخته‌های مورد نظر داشتند (جدول ۱). در مورد عصاره آبی خشک، سطح کشندگی کم بود و هم‌چنین برخلاف سایر عصاره‌ها میزان کشندگی با افزایش غلظت کاهش می‌یافت. عصاره آبی تر دارای سمیت کشنده ۵۰٪ کم‌تری نسبت به بقیه بود، لذا از نظر سمیت بیش‌ترین سمیت را در بین عصاره‌های استخراجی داشت. از آن‌جاکه کلیه مقادیر به‌دست آمده در این بررسی در زیر ۰/۲ قرار دارند (جدول۲)، بنابراین عصاره‌های استخراجی فاقد خاصیت همولیتیک هستند.

جدول ۱: نتایج آزمون سمیت سلولی به‌روش BSLA

	LC50	µ۱۰۰۰ غلظت	µ۱۰۰ غلظت	µ۱۰ غلظت
اتانولی تر	۲۳/۴۷	۷۳/۳۳±۵/۷۷	۴۳/۳۳±۷/۸۵	۲۶/۶۶±۷/۸۵
اتانولی خشک	۲۱/۶۱	۷۳/۳۳±۵/۷۷	۴۰ ±۰	۲۶/۶±۵/۱۶
آبی خشک	۱۲۰/۷۱	۲۰±۱۰	۴۰±۱۰	۶۶/۶±۵/۷
آبی تر	۵/۹۸	۶۳/۳۳±۱۱/۵۴	۳۳/۳۳±۵/۷	۶۰±۳۴/۶۴

جدول۲: نتایج بررسی همولیز عصاره‌های استخراجی

عصاره	µ ۱۰۰	µ ۲۰۰	µ ۳۰۰	µ ۴۰۰	µ ۵۰۰
اتانولی تر	۰/۰۴۲ ±۰/۱۳۷	۰/۰۲۲ ±۰/۱۲۹	۰/۰۲۷±۰/۱۴۳	۰/۰۲۰±۰/۱۴۲	۰/۰۱۱± ۰/۱۵۸
اتانولی خشک	۰/۰۳۱±۰/۱۲۳	۰/۰۳۲±۰/۱۳۷	۰/۰۳۹±۰/۱۳۲	۰/۰۲۹± ۰/۱۴۳	۰/۰۲۱± ۰/۱۴۸
آبی تر	۰/۰۰۷±۰/۰۷۵	۰/۰۱۳±۰/۰۶۷	۰/۰۱۸±۰/۰۷۸	۰/۰۱۰±۰/۰۷۹	۰/۰۰۴±۰/۰۸۱
آبی خشک	۰/۰۲۹±۰/۰۶۶	۰/۰۰۶±۰/۰۵۲	۰/۰۰۴±۰/۰۵۴	۰/۰۲۶±۰/۰۶۸	۰/۰۰۳±۰/۰۵۲



شکل۳: همولیز سلول‌های خونی انسانی توسط عصاره‌های مختلف

آزمون ضدانعقاد: میزان فعالیت‌ضدانعقادی هر چهار عصاره مورد آزمون براساس روش‌های Quick (۱۹۴۵) برای آزمون PT و Margolis (۱۹۵۷) برای آزمون a-PPT ارزیابی گردید. نتایج نهایی نشان داد هیچ‌یک از عصاره‌های استخراجی دارای ویژگی ضدانعقادی نبودند. از آن‌جاکه محدوده نرمال آزمون a-PPT (۴۵-۳۰) می‌باشد و نتایج همه عصاره‌های استخراجی در محدوده نرمال a-PPT قرار داشتند لذا هیچ یک ازعصاره‌هادارای ویژگی ضدانعقادی چشم‌گیری نبودند (جدول۳).

جدول ۳: نتایج نهایی آزمون ضدانعقادی به‌روش a-PPT

(اعداد بر حسب ثانیه هستند)

عصاره	میانگین
اتانولی تر	۳۲/۶۴±۲/۸۵
اتانولی خشک	۳۳/۵۳±۲/۵۱
آبی تر	۳۱/۷۳±۱/۲۲
آبی خشک	۳۷/۴۷±۰/۹۲

در مورد آزمون PT نیز نتایج مشابهی مشاهده شد. بر این اساس نتایج خام به‌دست آمده به‌وسیله جدول استاندارد INR محاسبات PTT و PT مورد ارزیابی قرار گرفت. در میان نتایج نهایی مشخص گردید هیچ‌یک از عصاره‌های استخراجی دارای ویژگی ضدانعقادی نبودند (جدول۴).

جدول۴: نتایج آزمون ضدانعقاد PT

عصاره	INR
اتانولی تر	۱۴/۰±۰۲/۱۸
اتانولی خشک	۱۵/۰±۱۲/۱۳
آبی تر	۱۴/۰±۶۰/۵۴
آبی خشک	۱۴/۱±۷۶/۰۷

بحث

در سال‌های گذشته تلاش‌های بسیاری در جهت یافتن ترکیبات زیست فعال از منابع طبیعی صورت گرفته است. در این میان، زیست‌مندان دریایی به‌دلیل تنوع بسیار زیاد گونه‌ها و هم‌چنین زیست بوم‌های مختلف سبب شده بسیاری از تحقیقات جهت شناسایی و استخراج مواد زیست پزشکی نوین به بررسی جانداران دریایی متمرکز شود. به‌دلیل نیروهای گزینشی که در محیط‌های دریایی به‌طور پیاپی بر موجودات تاثیر می‌گذارند، سازگاری‌های زیستی و فیزیکوشیمیایی مختلفی در آن‌ها به‌وجود آمده که سبب شده دریا سرچشمه خوبی برای تامین داروهای جدید باشد.

خاره‌چسب‌ها موجوداتی قلمروطلب با تنفس از هوا هستند. آن‌ها در زمان مد به سختی به محل معین و همیشگی بستر صخره‌ای خود می‌چسبند. حاشیه پوسته صدفی آن‌ها با فرورفتگی‌ها و برآمدگی‌های محل اتصال آن‌ها به صخره کاملاً متناسب است. در زمان جزر برای چرای جلبک‌ها از منزلگاه خود خارج می‌شوند و بنابراین در معرض شکارچیان ساحلی قرار می‌گیرند. هنگامی‌که خاره‌چسب توسط شکارچی تهدید می‌گردد از خود مخاط سفیدرنگی ترشح می‌کند که دارای متابولیت‌های پلی پروپیونات است. با توجه به این‌که بررسی‌های اندکی روی این ترکیبات صورت گرفته است، اطلاعات اندکی درباره تاثیرات آن روی سایر موجودات وجود دارد. برخی مطالعات نشان‌دهنده اثرات ضدباکتریایی این ترکیبات می‌باشند (Carballeira و همکاران، ۲۰۰۱).

از حدود سی سال پیش مشخص شده است خاره‌چسب‌های سیفونارید دارای متابولیت‌های پلیپروپیونات هستند که به‌عنوان دفاع شیمیایی در برابر شکارچیان از آن استفاده می کنند (Fautin، ۱۹۸۸).

این متابولیت‌ها مورد توجه بسیاری از شیمی‌دان‌ها قرار گرفته است و ویژگی ضدباکتریایی آن‌ها به‌اثبات رسیده است (Garson و همکاران، ۱۹۹۴؛ Paterson و Perkins، ۱۹۹۲) ولی تا کنون بررسی کشندگی یاخته‌ای ترکیبات این موجودات بررسی نشده است.

در بررسی کنونی به اثرات کشندگی سلولی براساس آزمون آرتمیا و همولیز و ضدانعقادی این ترکیبات با هدف کاربردهای زیست پزشکی پرداخته شد. در مورد اثرات کشندگی سلولی، برخی عصاره‌ها دارای اثرات قابل توجهی بودند، ولی درباره تاثیرات آن‌ها روی یاخته‌های خونی اثرات قابل توجهی به‌دست نیامد.

عصاره‌های متعددی با منشا جانوران دریایی بر روی ناپلی آرتمیا مورد آزمون قرار گرفته‌اند و در بیش‌تر موارد دارای اثر سمیت بوده‌اند (Mohammadizadeh و همکاران، ۲۰۱۳؛ Carballo و همکاران، ۲۰۰۲؛ Thompson و همکاران، ۱۹۸۵). در مرحله بعدی بسیاری ازترکیبات به‌دست آمده از این روش شناسایی شده‌اند. برخی از این ترکیبات روی دیگر مدل‌های زیست پزشکی مورد غربال‌گری قرار گرفته‌اند. نتایج نشان‌دهنده گستره وسیعی از فعالیت‌های زیستی مانند ویژگی‌های ضدسرطانی، ضدالتهابی و سرکوب ویروس HIV از این عصاره‌ها می‌باشد (Shakouri و همکاران، ۲۰۱۶؛ Bahroudi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Ehsanpour و همکاران، ۲۰۱۵؛ Herencia و همکاران، ۱۹۹۸؛ McCune و همکاران، ۱۹۹۰).

میزان کشندگی سلولی (LC۵۰) عصاره‌های استخراجی مقادیر بالایی را نشان می‌دهد که سبب می‌شود این عصاره‌ها، جهت ادامه ارزیابی‌های زیست پزشکی گزینه بسیار مناسبی باشند. برای نمونه عصاره‌های متانولی استخراجی از خیار دریایی *H. leucospilota* دارای LC۵۰ حدود ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. در بررسی‌های بعدی ترکیبات استخراجی از این گونه دارای ویژگی ضدسرطانی مناسبی شناخته شد (Sarhadizadeh و همکاران، ۲۰۱۴؛ Mohammadizadeh و همکاران، ۲۰۱۳). مقدار کشندگی سلولی به دست آمده در بررسی کنونی (۵/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر مطابق جدول۱) نشان‌دهنده سمیت نسبی بالاتری می‌باشد که به‌همین جهت بررسی‌های بیش‌تری روی یاخته‌های سرطانی در مورد این عصاره‌ها توسط نگارندگان در حال انجام می‌باشد.

در بررسی‌های پیشین مشخص شده است که گونه‌های سیفوناریا دارای ترکیبات پلی پروپیونات با ساختارهای متنوع هستند (Beukes و Davies-Coleman، ۱۹۹۹). در سایر گونه‌های سیفوناریا این ترکیب مسئول سمیت سلولی عصاره‌های استخراجی از این گونه‌ها معرفی شده است. در بررسی کنونی، عصاره استخراجی از این خاره‌چسب سواحل بوشهر دارای خاصیت سمیت بود. این ویژگی سمیت را می‌توان به وجود ترکیبات پلی پروپیونات نسبت داد (Paul و همکاران،

۱۹۹۷). براساس میزان LC۵۰ به‌دست آمده از درصد مرگ، بیش‌ترین اثر کشندگی مربوط به عصاره آبی تر می‌باشد و عصاره آبی خشک، کم‌ترین اثر کشندگی را دارد. در مطالعات Cutignano و همکاران (۲۰۱۲) استئاریک‌اسید به‌عنوان یکی از ترکیبات شناخته شده در برخی سیفوناریاها گزارش گردیده است. این ماده به‌علت ماهیت اسیدی خود در آب انحلال‌پذیر است. بنابراین می‌توان نتایج کشندگی بالاتر در عصاره آبی را به‌احتمال حضور این ترکیب در عصاره مربوط دانست.

نکته قابل توجه این بود که در میان عصاره‌های مورد آزمون، عصاره آبی خشک که کم‌ترین اثر کشندگی را داشته، دارای اثر معکوس جالب توجهی می‌باشد. به‌نحوی‌که میزان کشندگی این عصاره در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میکرون، کاهش یافته است. یعنی با افزایش مقدار عصاره در غلظت، میرایی کم‌تر شده است. تفاوت‌های ناشی از انواع عصاره‌های متنوع و روش‌های عصاره‌گیری که ترکیبات متفاوتی را از پیکره موجود جدا می‌کنند، احتمالاً دلیل نتایج غیر یکسان در پژوهش حاضر می‌باشد. هم‌چنین وجود تفاوت در بین عصاره‌ها به‌دلیل تنوع ناشی از فرآیند پیش‌عصاره‌گیری بافت‌های خشک و خیس موجود می‌تواند دلیل دیگری برای تفاوت در نتایج باشد.

ایمنی هومورال در بی‌مهرگان دریایی، با عوامل ضدمیکروبی که در سلول‌ها خونی و پلاسما وجود دارد، همراه با واکنش‌هایی مانند کواگلوسیون همولنف یا ملانیزاسیون توأم بوده و ایمنی سلولی نیز در این ارگانیسم‌ها توسط هموسیت‌ها که سلول‌های متحرکی هستند و میکروب‌ها را فاگوسیتوز کرده و مواد محلول سیتوتوکسیک و ضد باکتریایی را به‌درون همولنف ترشح می‌کنند، اعمال می‌شود (Becker و Terlau، ۲۰۰۸).

بررسی خاصیت همولیتیک با هدف ارزیابی تاثیر مواد بر گلبول‌های قرمز با هدف غربال‌گری اولیه ترکیبات موجودات به‌منظور ورود به صنایع مختلف به‌ویژه بخش دارویی صورت می‌پذیرد. ویژگی همگلوتیناسیون و همولیز در حدود ۶۰ در صد از نرم‌تنان دریایی دیده می‌شود. این ویژگی به برخی ملکول‌های زیست فعال مانند لکتین‌ها نسبت داده می‌شود (Dresch و همکاران، ۲۰۰۵؛ Mojica و همکاران، ۲۰۰۵). در بسیاری از موارد هم هنوز ماهیت ماده همولیزکننده مشخص نشده است، اگر چه برخی موجودات دریایی که دارای ویژگی همولیز مناسبی بوده‌اند و یا مطالعات بسیار زیادی روی آن‌ها انجام شده‌اند دارای ترکیبات شناخته شده‌ای با این ویژگی‌های کاربردی می‌باشند. برای نمونه ویژگی همولایتیک بسیاری از خیارهای دریایی به ترکیبات ساپونینی و شبه ساپونینی نسبت داده شده است (Bahroudi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Shadi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Ismail و همکاران، ۲۰۰۸؛ Kalinin و همکاران، ۱۹۹۶). داشتن ویژگی کشندگی یاخته‌ای در کنار نبود فعالیت همولیتیک در برخی موجودات دریایی گزارش شده است (Alencar و همکاران، ۲۰۱۵؛ Wilke و همکاران، ۲۰۱۰). در بررسی کنونی هیچ‌یک از عصاره‌ها دارای ویژگی همولیتیک نبودند. از آن‌جاکه عصاره‌های به‌دست آمده دارای خواص ضدانعقادی نبودند، به‌طورکلی در این زمینه نمی‌توان سمیت خونی بالایی را برای عصاره‌های استخراجی از این نرم‌تن درنظر گرفت. یکی از مواردی که در رابطه با این سمیت پایین در مقایسه با موجوداتی مانند لیسه‌های دریایی که دارای ویژگی‌های همولیتیک بالایی بوده‌اند می‌توان به وجود پوسته مستحکم که به‌عنوان سد دفاعی فیزیکی عمل می‌کند آن اشاره نمود که موجود نیاز کم‌تری به مکانیسم‌های شیمیایی جهت مقابله با عوامل محیطی از قبیل شکارچیان دارد.

به‌طورکلی در بررسی کنونی ویژگی ضدانعقادی و همولیتیک بالایی از ترکیبات خارچسب *S. carbo* مشاهده نشد، ولی ویژگی کشندگی یاخته‌ای بالایی دیده شد. وجود این خواص کشندگی سلولی در برخی عصاره‌ها را می‌توان اثر مناسبی برای ادامه این بررسی مطرح نمود. این غربالگری اولیه در مورد کشندگی سلولی می‌تواند در مطالعات آینده در زمینه بررسی اثرات ضدتوموری و ضدانگلی ترکیبات مورد نظر ادامه یابد. به‌طورکلی ترکیبات جداسازی شده از بی‌مهرگان دریایی که دارای کشندگی یاخته‌ای (LC۵۰) کم‌تر از ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در آزمون کشندگی آرتمیا (BSLT) باشند، نشانگر داشتن پتانسیل فعالیت علیه سلول‌های سرطانی می‌باشد (Edrada و همکاران، ۲۰۰۰؛ Edradaو همکاران، ۱۹۹۸). کشندگی یاخته‌ای قوی به‌دست آمده در بررسی کنونی، پتانسیل مناسبی برای اثرات زیست پزشکی نشان می‌دهد.

منابع

۱. **Alencar, D.B.; Melo, A.A.; Silva, G.C.; Lima, R.L.; Pires Cavalcante, K.; Carneiro, R.F. and Viana, F.A., .2015.** Antioxidant, hemolytic, antimicrobial, and cytotoxic activities of the tropical Atlantic marine zoanthid Palythoa caribaeorum. Anais Da Academia Brasileira de Ciências. Vol. 87, No. 2, pp: 1113-1123.

۲. **Ansell, A.D.; Gibson, R.N. and Barnes, M., 1999.** The biology of siphonariid limpets (Gastropoda: Pulmonata). Oceanography and Marine Biology. An Annual Review. Vol. 37, pp: 245-314.

۳. **Bahroudi, S.; Nematollahi, M.A.; Aghasadeghi, M.R.; Nazemi, M. and Behrouz, B., 2015.** In vitro cytotoxic and anti-cancer effects of body wall for sea cucumber (Holothuria leucospilota). Iranian Journal of Fisheris. Vol. 23, No. 3, pp: 11-19.

۴. **Becker, S. and Terlau, H., 2008.** Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 79, No. 1, pp: 1-9.

۵. **Beukes, D.R. and Davies Coleman, M.T., 1999.** Novel polypropionates from the South African marine mollusc Siphonaria capensis. Tetrahedron. Vol. 55, No. 13,

Mediterranean marine invertebrates. Life Sciences. Vol. 62, No. 9, pp: 115-120.

۲۳. **Ismail, H.; Lemriss, S.; Aoun, Z.B.; Mhadhebi, L.; Dellai, A.; Kacem, Y. and Bouraoui, A., 2008.** Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, Holothuria polii. Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology. Vol. 18, No. 1, pp: 23-26.

۲۴. **Jamali, S.; Emtiazjoo, M.; Teymoori toolabi, L.; Zeynali, S.; Kaypoor, S.; Sardari, S. and Azarang, B., 2010.** Antibacterial effect of the Persian Gulf sea cucumber Holoturia. SP extracts on three strain of Escherichia coli. Pathobiology Research. Vol. 12, No. 2, pp: 37-49.

۲۵. **Jerez, J.; Cueto, M. and Díaz-Marrero, A.R., 2006.** The chemistry of marine pulmonate gastropods. In Molluscs. Springer. pp: 105-131.

۲۶. **Kalinin, V.I.; Anisimov, M.M.; Prokofieva, N.G.; Avilov, S.A.; Afiyatullov, S.S. and Stonik, V.A., 1996.** Biological activities and biological role of triterpene glycosides from holothuroids (Echinodermata). Echinoderm Stud. Vol. 5, pp: 139-181.

۲۷. **Luchtel, D.L.; Martin, A.W.; Deyrup-Olsen, I. and Boer, H.H., 1997.** Gastropoda: pulmonata. Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 6, pp: 459-718.

۲۸. **Margolis, J., 1957.** Initiation of blood coagulation by glass and related surfaces. The Journal of Physiology. Vol. 137, No. 1, pp: 95-109.

۲۹. **Mariana, N.S.; Norfarrah, M.A.; Nik, K.; Yusoff, F.M. and Arshad, A., 2009.** Evaluating the antibacterial activity and in vivo assay of methanolic extract of Stichopus badionotus. International Journal of Pharmacology. Vol. 5, No. 3, pp: 228-231.

۳۰. **McCune, J.M.; Namikawa, R.; Shih, C.C.; Rabin, L. and Kaneshima, H., 1990.** Suppression of HIV infection in AZT-treated SCID-hu mice. Science. Vol. 247, No. 4942, pp: 564-566.

۳۱. **McQuaid, C.D.; Cretchley, R. and Rayner, J.L., 1999.** Chemical defence of the intertidal pulmonate limpet Siphonaria capensis (Quoy & Gaimard) against natural predators. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Vol. 237, No. 1, pp: 141-154.

۳۲. **Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobsen, L.; Nichols, D. and McLaughlin, J., 1982.** Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica. Vol. 45, No. 5, pp: 31-34.

۳۳. **Mohammadizadeh, F.; Ehsanpor, M.; Afkhami, M.; Mokhlesi, A.; Khazaali, A. and Montazeri, S., 2013.** Antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of a sea cucumber Holothuria leucospilota, from the north coast of the Persian Gulf. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. Vol. 93, No. 5, pp: 1401-1405.

۳۴. **Mojica, E.; Deocaris, C.C. and Merca, F.E., 2005.** A survey of lectin-like activity in philippine marine invertebrates. Philippine Journal of Science. Vol. 134, No. 2, 135 p.

۳۵. **Paterson, I. and Perkins, M.V., 1992.** Studies in polypropionate synthesis: stereoselective synthesis of denticulatins A and B. Tetrahedron Letters. Vol. 33, No. 6, pp: 801-804.

۳۶. **Paul, M.C.; Zubía, E.; Ortega, M.J. and Salvá, J., 1997.** New polypropionates from Siphonaria pectinata. Tetrahedron. Vol. 53, No. 6, pp: 2303-2308.

۳۷. **Quick, A.J., 1945.** On the quantitative estimation of prothrombin. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 15, No. 12, pp: 560-566.

۳۸. **Ramasamy, P.; Thampi, D.P.K.; Chelladurai, G.;** pp: 4051-4056.

۶. **Bondoc, K.G.V.; Lee, H.; Cruz, L.J.; Lebrilla, C.B. and Juinio-Meñez, M.A., 2013.** Chemical fingerprinting and phylogenetic mapping of saponin congeners from three tropical holothurian sea cucumbers. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 166, No. 3, pp: 182-193.

۷. **Bosch, D.T.; Dance, S.P.; Moolenbeek, R.G. and Oliver, P.G., 1995.** Seashells of eastern Arabia. Motivate publishing.

۸. **Branch, G.M., 1981.** The biology of limpets: physical factors, energy flow, and ecological interactions.

۹. **Branch, G.M. and Cherry, M.I., 1985.** Activity rhythms of the pulmonate limpet Siphonaria capensis Q. & G. as an adaptation to osmotic stress, predation and wave action. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Vol. 87, No. 2, pp: 153-168.

۱۰. **Bubel, A., 1984.** Epidermal cells. In Biology of the Integument Springer. pp: 400-447.

۱۱. **Carballeira, N.M.; Cruz, H.; Hill, C.A.; De Voss, J.J. and Garson, M., 2001.** Identification and total synthesis of novel fatty acids from the siphonarid limpet Siphonaria denticulata. Journal of Natural Products. Vol. 64, No. 11, pp: 1426-1429.

۱۲. **Carballo, J.L.; Hernández-Inda, Z.L.; Pérez, P. and García-Grávalos, M.D., 2002.** A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnology. Vol. 2, No. 1, 17 p.

۱۳. **Cutignano, A.; Villani, G. and Fontana, A., 2012.** One metabolite, two pathways: convergence of polypropionate biosynthesis in fungi and marine molluscs. Organic Letters. Vol. 14, No. 4, pp: 992-995.

۱۴. **Davies-Coleman, M.T., 2006.** Secondary metabolites from the marine gastropod molluscs of Antarctica, Southern Africa and South America. In Molluscs Springer. pp:. 133-157.

۱۵. **Dresch, R.R.; Haeser, A.S.; Lerner, C.B.; Mothes, B.; Hampe, M.M.V. and Henriques, A.T., 2005.** Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia. São Paulo, SP. Vol. 15, No. 1, pp: 16-22.

۱۶. **Edrada, R.A.; Proksch, P.; Wray, V.; Witte, L. and Van Ofwegen, L., 1998.** Four New Bioactive Lobane Diterpenes of the Soft Coral Lobophytum p auciflorum from Mindoro, Philippines. Journal of Natural Products. Vol. 61, No. 3, pp: 358-361.

۱۷. **Edrada, R.A.; Wray, V.; Witte, L.; Ofwegen, L. and Proksch, P., 2000.** Bioactive terpenes from the soft coral Heteroxenia sp. from Mindoro, Philippines. Zeitschrift Für Naturforschung C. Vol. 55, No. 1-2, pp: 82-86.

۱۸. **Ehsanpour, Z.; Archangi, B.; Salimi, M.; Salari, M.A. and Zolgharnein, H., 2015.** Cytotoxic Assessment of Extracted Fractions of Sea Cucumber Holothuria parva on Cancer Cell Line (MCF7) and Normal Cells. JOC. Retrieved from http://joc.inio.ac.ir/article-1-720-fa.html

۱۹. **Fautin, D.G., 1988.** Biomedical importance of marine organisms. California Academy of Sciences.

۲۰. **Garson, M., 2006.** Marine mollusks from Australia and New Zealand: chemical and ecological studies. In Molluscs. Springer. pp: 159-174.

۲۱. **Garson, M.J.; Goodman, J.M. and Paterson, I., 1994.** A configurational model for siphonariid polypropionates derived from structural and biosynthetic considerations. Tetrahedron Letters. Vol. 35, No. 37, pp: 6929-6932.

۲۲. **Herencia, F.; Ubeda, A.; Ferrándiz, M.L.; Terencio, M.C.; Alcaraz, M.J.; García-Carrascosa, M. and Payá, M., 1998.** Anti-inflammatory activity in mice of extracts from

Gautham, N.; Mohanraj, S. and Mohanraj, J., 2013. Screening of antibacterial drugs from marine gastropod Chicoreus ramosus. Journal of Coastal Life Medicine. Vol. 1, No. 3, pp: 181-185.

۳۹. **Ravi, C.; Karthiga, A. and Venkatesan, V., 2012.** Isolation and biomedical screening of the tissue extracts of two marine gastropods Hemifusus pugilinus (Born, 1778) and Natica didyma (Roding, 1798). Asian Fisheries Science. Vol. 25, pp: 158-169.

۴۰. **Sarhadizadeh, N.; Afkhami, M. and Ehsanpour, M., 2014.** Evaluation bioactivity of a sea cucumber, Stichopus hermanni from Persian Gulf. Eur. J. Exp. Biol. Vol. 4, pp: 254-258.

۴۱. **Shadi, A.; Oujifard, A. and Moosavi, T., 2015.** Antibacterial, Cytotoxic and Hemolytic activity of Holothuria parva sea cucumber from north Persian Gulf.

۴۲. **Shakouri, A.; Shoushizadeh, M.R. and Nematpour, F., 2016.** Antimicrobial Activity of Sea Cucumber (*Stichopus variegatus*) Body Wall Extract in Chabahar Bay, Oman Sea. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, (In Press).

۴۳. **Thompson, J.E.; Walker, R.P. and Faulkner, D.J., 1985.** Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. Marine Biology. Vol. 88, No. 1, pp: 11-21.

۴۴. **Wagele, H.; Ballesteros, M. and Avila, C., 2006.** Defensive glandular structures in opisthobranch molluscs from histology to ecology. Oceanography and Marine Biology. Vol. 44, 197 p.

۴۵. **Wilke, D.V.; Jimenez, P.C.; Araújo, R.M.; da Silva, W.M.B.; Pessoa, O.D.L.; Silveira, E.R. and Simerska, P., 2010.** Pro apoptotic activity of lipidic α-amino acids isolated from Protopalythoa variabilis. Bioorganic and Medicinal Chemistry. Vol. 18, No. 22, pp: 7997-8004.