

مقاله پژوهشی

جداسازی و بررسی فعالیت بیولوژیک فراکشن‌های جدا شده از زهر شقایق دریایی خلیج فارس *Stichodactyla haddoni*

• زیبا مقدسی*: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، آزمایشگاه مولکولی درمانی و زهر انیستیتو
پاستور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۸

چکیده

Stichodactyla haddoni یکی از حیوانات زهری خلیج فارس است و خصوصیات بیولوژیکی و سمیت آن‌ها ارزش زیادی در خصوص کشف عامل‌های با پتانسیل دارویی جدید را دارند. هدف از این مطالعه بررسی تعیین فعالیت‌های بیولوژیکی فراکشن‌های جدا شده از عصاره متانولی تانتاکل‌های شقایق دریایی خلیج فارس بود. LD50 فراکشن‌های جدا شده از زهر *S. haddoni* به صورت تزریق درون رگی در موش Balb/c ثبت شد. فعالیت ادماتوژنیک فراکشن‌های جدا شده از زهر با تزریق به پنجه عقبی پای موش‌های BALB/c 21 ± 20 گرمی در گروه‌های چهارتایی انجام گردید. فعالیت درمونکروتیک فراکشن‌های زهر بر روی پوست خرگوش نر نیوزیلند با وزن ۳ کیلو گرم بررسی شد. LD50 در فراکشن F1 $38/8$ میلی‌لیتر ثبت شد. بالاترین فعالیت ادماتوژنیک فقط در ۲ ساعت بعد از تزریق در مقدار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از F4 ($179/4\%$) مشاهده شد و بعد از ده روز به $70/5\%$ کاهش یافت. ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از فراکشن‌های F1، F3 و F4 ناحیه نکروز سریع بعد از ۳ ساعت به ترتیب به قطر ۴، ۳ و ۵ میلی‌متر ایجاد کرد. ادم ماندگار و فعالیت درمونکروتیک سریع پس از تزریق زیر پوستی زهر پدیده قابل توجه هستند. این اولین گزارش یک عامل ادماتوژنیک ماندگار و درمونکروتیک سریع زهر از شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* خلیج فارس است. نتایج این تحقیق برای مدیریت بهتر شرایط کلینیکی و به دنبال آن استراتژی‌های درمان با ارزش خواهد بود.

کلمات کلیدی: *Stichodactyla haddoni*، زهر، فعالیت بیولوژیکی، HPLC، حیوانات زهری دریایی

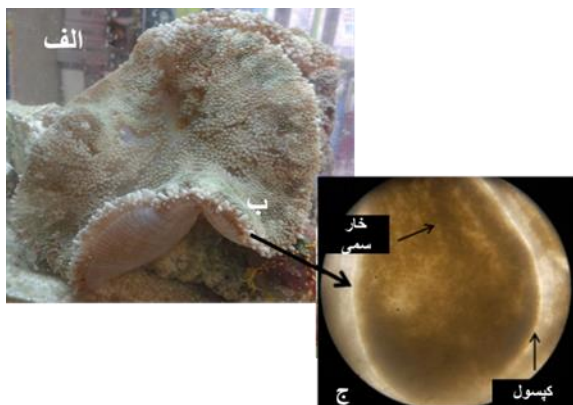


مقدمه

sinensis بر روی مغز، قلب، کلیه و کبد موش اثبات شده است (Ravindran و همکاران، ۲۰۱۰). Ghafari و همکاران (۲۰۱۳) بر روی زهر ماهی اسکات خلیج فارس *Scatophagus argus* که فعالیت‌های بیولوژیک همولایتیک و ادماطیک آن را ثابت کردند. شناخت خواص زهرهای دریایی، امروزه یکی از موضوعات مهم در علوم پزشکی محسوب می‌شود. گوناگونی در پراکنش جغرافیایی حیوانات زهری مشابه، می‌تواند به گوناگونی فعالیت‌های بیولوژیک و سمیتی منجر شود. شرایط خاص خلیج فارس به‌عنوان یک اکوسیستم بسته یک فرصت مناسب برای مطالعه فعالیت‌های بیولوژیک و سمیتی در حیوانات زهری است. هدف این مطالعه تعیین دوز نیمه‌کشنده و بررسی فعالیت‌های بیولوژیک ادماطونیک و درمونکروٹیک فراکشن‌های جدا شده از عصاره متانولی زهر شقایق دریایی، *Stichodactyla haddoni* خلیج فارس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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



شکل ۱: الف: شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* جمع‌آوری شده از جزیره لارک در خلیج فارس، ب: تصویر میکروسکوپی تانتاکل‌های حاوی کنیدوسیت (ب: X1۰)، ج: تصویر میکروسکوپی کنیدوسیت حاوی کپسول و خار سمی (ج: X۴۰)

آماده‌سازی نمونه و عصاره‌گیری: در ابتدا نمونه منجمد شده در دمای اتاق ذوب شد و ماده مخاطی ترشح شده بر روی سطح دهانی آن پاک گردید. تانتاکل‌ها توسط یک اسکالپل استریل به قطعات کوچک خرد شدند و برای عصاره‌گیری آماده گردیدند. جهت عصاره‌گیری ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۵٪ به ۶۱/۲۳ گرم از تانتاکل‌های جدا شده اضافه شده و با یک هم‌زن مخلوط شدند. مخلوط به‌دست

تعدادی از پروتئین‌ها، پپتیدها و عامل‌های شیمیایی در زهر جانوران زهری دریا به‌طور قوی مولکول‌های فعال بیولوژیک با خصوصیات دارویی مفید هستند (Malve، ۲۰۱۶). در طی دهه‌های گذشته، اکثر مطالعات روی جستجوی داروهای جدید از حیوانات دریایی متمرکز شده بود (Malve، ۲۰۱۶؛ Cheung و همکاران، ۲۰۱۵؛ Michael و Clinton، ۲۰۱۵). اقیانوس این اکوسیستم وسیع، با حالات غیرقابل پیش‌بینی و اشکال بی‌شمار حیات در بالا و پایین آن با گنجینه وسیعی از منابع انرژی که در اعماق آن پنهان می‌باشد، انسان را مسحور خود نموده و ذهن او را به خود مشغول داشته است. منابع بالقوه اقیانوس‌ها که هنوز کشف نشده و انسان از آن‌ها بی‌بهره مانده است به‌طور محسوسی بر روی سلامت و دارایی ملت‌ها تاثیرگذار می‌باشد. ترکیبات سمی به دلیل ایجاد قالب‌های سه بعدی برای ساخت مولکول‌های کوچک با خصوصیات منحصر به‌فرد، در طراحی دارو مورد توجه قرار گرفته‌اند. توکسین‌ها می‌توانند به‌طور بالقوه به‌عنوان ابزارهای دارویی برای اهداف درمانی استفاده شوند. اغلب توکسین‌ها در آزمایش‌های عملکردی در مقایسه با عاملین دارویی استاندارد، بسیار مفیدتر هستند (Harvey، ۱۹۶۲). توان و ویژگی زیستی بعضی از این ترکیبات سمی زهر واقعاً مبهوت کننده است و به این خاطر جذابیت بسیاری برای سم‌شناسان، داروشناسان و بیوشیمیدان‌ها به‌همراه دارد. توکسین‌ها مولکول‌های بسیار قدرتمندی هستند. مقادیر اندک توکسین‌های دریایی می‌توانند دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی باشند. این فعالیت‌های زیستی برای موجودات هدف، می‌تواند زبان‌آور باشند. شقایق‌های دریایی ترکیبات پیچیده‌ای از سم‌های پروتئینی، برای دفاع و گرفتن شکار تولید می‌کنند. نیش آن‌ها می‌تواند در هنگام فعالیت‌های انسانی (در موقعیت کار-غواصی) عوارض بدنی و موضعی مانند مسمومیت قلبی، مسمومیت عصبی، تورم پوستی، خارش پوستی، قرمزی، فلج کردن، درد ماهیچه، نکروز، استفراغ، تهوع و سرگیجه ایجاد نماید (Mariottini و Pane، ۲۰۱۴). برخلاف اثرات زبان‌آور عمومی سم در موجودات، توکسین‌ها این قابلیت را دارند که برای تأثیر بر روی موجودات غیرهدف و به‌منظور تولید داروهای انسانی به‌کار گرفته شوند. محققان علمی اخیراً در پیدا کردن پتانسیل دارویی زهر آب‌زبان سمی، کار خود را آغاز کرده‌اند. خصوصیات فارماکولوژی و بیولوژیکی سم شقایق‌های دریایی، *Paracondactylis sinensis*، *Paracondactylis indicus* و *Heteractis magnifica* فعالیت کشندگی، ایجاد ادم، ضد درد، آنتی‌باکتریال و ضدالتهاب آن‌ها ثابت گردیده است (Subramanian و همکاران، ۲۰۱۱). سیتوتوکسیک فراکشن‌های جدا شده از سم خام گونه‌های مختلف شقایق دریایی، *Paracotylactis*، *Stichodactyla haddoni*، *Heteractis magnifica*

در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تگه‌داری گردید. غلظت فراکشن‌ها همان‌طور که در قبلاً توضیح داده شد تعیین گردید.

تعیین حداقل دوز کشندگی (LD₅₀): فعالیت کشندگی زهر خام و فراکشن‌های جدا شده از HPLC (F1-F11) مطابق با روش Sperm-Karber بر روی موش‌های BALB/c انجام شد (Finey, ۱۹۸۵). شرایط نگهداری موش‌ها در کمیته اخلاق انیستیتو پاستور ایران با کد (IR.PII.REC.1394.38) تأیید شد. غلظت‌های مختلف فراکشن‌ها F1-F11 از ۴/۶، ۸/۳۸ و ۴/۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر تزریقی آماده‌سازی شد و به موش‌های BALB/c نر به وزن ۲۰-۲۲ گرمی در گروه‌های چهارتایی به صورت تزریق درون رگی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر تزریق گردید و سمیت آن‌ها تا ۲۴ ساعت بررسی شد. ۵۰٪ کشندگی با فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{Log LD}_{50} = \log X 100 - [(\log f d / n) \times (\sum T / n)]$$

بررسی فعالیت ایجاد ادم در پنجه پای موش: فعالیت ایجاد ادم زهرخام بر طبق روش Fu و همکاران (۲۰۰۱) بر روی پنجه پای موش‌های BALB/c ۲۰±۲۱ گرمی در گروه‌های چهارتایی انجام شد. مقدار ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر فراکشن (F1-F11) در نرمال سالین ۰/۹٪ به حجم ۳۰ میکرولیتر به کف پای چپ موش تزریق شدند. مقدار ۳۰ میکرولیتر از نرمالین سالین ۰/۹٪ به تنهایی به‌عنوان کنترل به کف پای راست تزریق شد. ضخامت کف پای چپ پس از تزریق زهر با کولیس عقربه‌ای در زمان‌های مختلف (صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و ۱۰ روز) اندازه‌گیری گردید. ضخامت پا قبل از تزریق برای ساعت صفر در نظر گرفته شد. ضخامت اندازه‌گیری شده در زمان‌های مختلف از مقدار ضخامت قبل از تزریق کم شد. درصد ادم با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times [\text{ضخامت کف پای راست} / (\text{ضخامت کف پای چپ} - \text{ضخامت کف پای راست})]$$

بررسی فعالیت درمونکروتیک: فعالیت درمونکروتیک زهر بر روی خرگوش نر نیوزیلند با وزن ۳ کیلو گرم بررسی شد (Borchani و همکاران، ۲۰۱۱). مقدار ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر فراکشن جمع‌آوری شده از HPLC (F1-F11) در نرمال سالین ۰/۹٪ به حجم ۱۵۰ میکرولیتر آماده شدند. موی محل تزریق تراشیده شد. نمونه‌های آماده شده به صورت زیرجلدی تزریق گردیدند. ۱۵۰ میکرولیتر از نرمال سالین تنها به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. نواحی نکروز و ملتهب شده، ۳ ساعت بعد از تزریق فراکشن‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

نتیجه

میزان پروتئین زهر خام: میزان جذب نوری مربوط به زهر با نمودار استاندارد مقایسه گردید و تعیین مقدار شد. غلظت زهر استخراج شده با عصاره‌گیری متانولی ۵٪ و با استفاده از کیت BCA، $5/32 \pm 2/2$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (به دست آمد).

آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت قرار داده شد. مخلوط با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (Sigma 1-14, Germany). سوپرناتانت در دستگاه فریزدرایر (Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen Co., Germany) در انجماد خشک شد. پودر به دست آمده با آب مقطر تزریقی استریل حل گردید. استوک محلول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Bragadeeswaran و Thangarj, ۲۰۱۲).

سنجش پروتئین: غلظت پروتئین سم خام به دست 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).

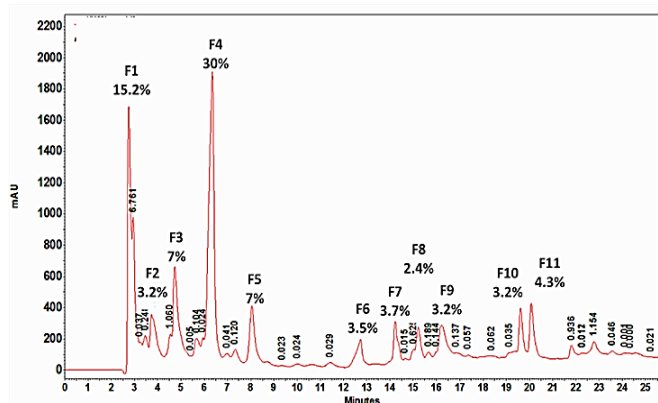
SDS-PAGE: برای تعیین پروفایل پروتئینی زهر خام از روش سدیم دو سدیل آکریل آمید ژل الکتروفورزیس (SDS-PAGE) مطابق با روش استاندارد Laemmli (۱۹۷۰) استفاده شد. زهر خام به داخل ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ تزریق و با رنگ کوماسی بریلینت بلو رنگ آمیزی شد. برای تعیین وزن مولکولی از یک پروتئین مارکر (۸-۲۵۰ کیلو دالتون)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

جداسازی پروتئین‌ها و پپتیدها به روش کروماتوگرافی

مایع با کارایی بالا (RP-HPLC): کروماتوگرافی (Knaauer-HPLC Germany) فاز معکوس با استفاده از ستون C18 که در داخل آن رزین سیلیکاژل حاوی اکتادسیل سیلان ODS قرار دارد استفاده شد. خالص سازی پروتئین بر اساس اثرات هیدروفوبی (آب‌گریزی) آن‌ها می‌باشد. پروتئین‌هایی که کم‌تر هیدروفوب می‌باشند زودتر از ستون خارج می‌شوند. خروج پروتئین با UV-detector که به دستگاه متصل می‌باشد قابل تشخیص و جداسازی می‌باشند. زهر خشک شده در انجماد در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل شدند و مواد نامحلول توسط سانتریفوژ در ۱۰۶۲۵ g برای ۱۰ دقیقه دور ریخته شدند. فراکشن‌های پروتئین با کاربرد یک دستگاه HPLC جداسازی شدند (Knaauer-Germany). ۵۰ میکرولیتر از زهر آماده شده (۸/۰۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به روش دستی به ستون C18 (۵ میکرومتر، ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر) تزریق شد. در تمامی مراحل جداسازی با سرعت جریان محلول‌ها ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. میزان جذب خروجی ستون در طول موج ۲۱۴ نانومتر تعیین شدند. در این مطالعه فراکشن‌ها به روش دستی جمع‌آوری گردیدند. فراکشن‌های جمع‌آوری شده در یک سیستم فریزدرایر خشک شدند (Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen Co., Germany). پودر دوباره در آب مقطر تزریقی حل شد و محلول



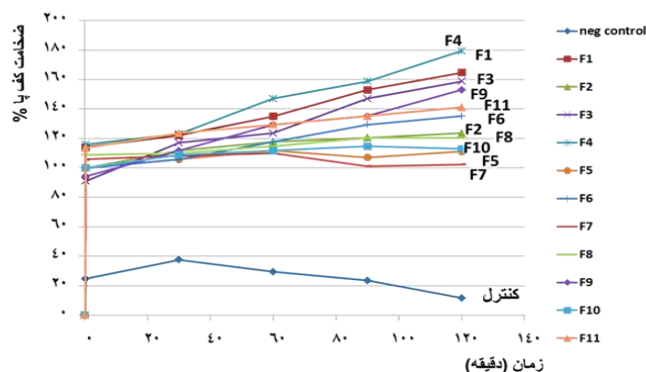
توسط *S. haddoni* خلیج فارس اتفاق بیافتد. مقدار درصد ادم گروه شاهد از گروه‌های تست کم‌تر بود (شکل ۶). تزریق ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هر فراکشن فوراً (۲۰ ثانیه) بیش‌ترین تورم را در F4 (۱۱۵/۸٪) و کم‌ترین تورم در F9 (۹۴/۱٪) و گروه شاهد (۲۴/۷٪) در ناحیه کف پای موش BALB/c ایجاد کردند. یک روند خطی و وابسته به زمان قابل توجه‌ای ($R^2=1$) در همه فراکشن‌ها در این زمان مشاهده شد. ایجاد ادم گروه‌های تست بیش‌تر از گروه شاهد بود. یک روند خطی و وابسته به زمان قابل توجهی در گروه شاهد ($R^2=1$) نیز مشاهده گردید. مقدار تورم شاهد کم‌تر از گروه‌های تست بود (شکل ۷).



شکل ۲: پروفایل HPLC عصاره متانولی تانتاکل‌ها از *S. haddoni*. ۱۱ پیک عمده اصلی و جزئی مشاهده شدند. F4 بیش‌ترین سطح زیرمنحنی را داشت.



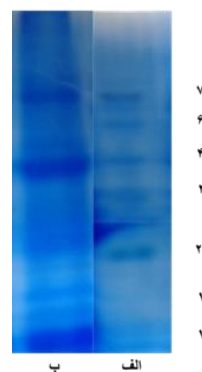
شکل ۴: الف. ادم ایجاد شده توسط تزریق کف پا توسط فراکشن F4. ب. اندازه‌گیری قطر کف پا با کولیس عقربه‌ای



شکل ۵: بررسی فعالیت ادم‌توزنیک فراکشن‌های F1-F11 زهر *S. haddoni* بر روی موش BALB/c

SDS-PAGE: وزن مولکولی پروتئین مشاهده شده به‌طور تقریبی

از ۱۱ تا ۷۵ کیلودالتون مشاهده گردید. در این پروفایل ۵ باند جداگانه واضح مشخص شد (شکل ۲).



شکل ۲: پروفایل پروتئینی عصاره متانولی زهر *S. haddoni*، الف: وزن مولکولی مارکر، ب: عصاره متانولی از تانتاکل‌های *S. haddoni*

تعیین خصوصیت فراکشن‌های زهر خام شقایق دریایی توسط

RP-HPLC: با کروماتوگرافی HPLC زهر *S. Haddoni* روی ستون ۱۱، ۱۸C فراکشن نتیجه داد. در میان پیک‌های شسته شده، ۱۱ پیک با سطح زیرمنحنی حداقل ۳٪ برای آزمایش‌ها انتخاب شدند. F4 بیش‌ترین سطح زیرمنحنی را داشت. سطح زیرمنحنی هر فراکشن در شکل ۳ نشان داده شد. بیش‌تر فراکشن‌ها در حدود ۲۳ دقیقه گرفته شدند. فراکشن‌های عمده هیدروفیل یا ویژگی هیدروفوبیک خیلی ضعیف داشتند.

تعیین دوز نیمه‌کشننده زهر شقایق دریایی (LD_{50}): از بین

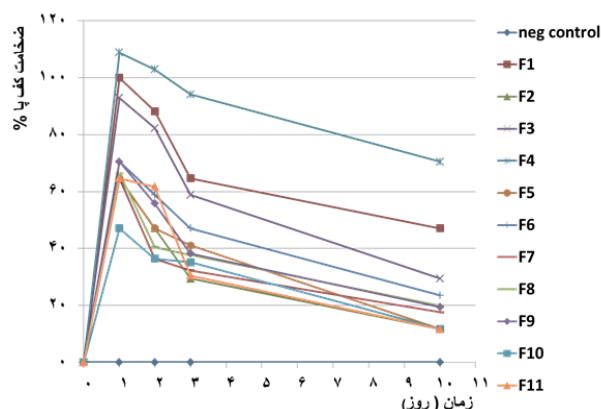
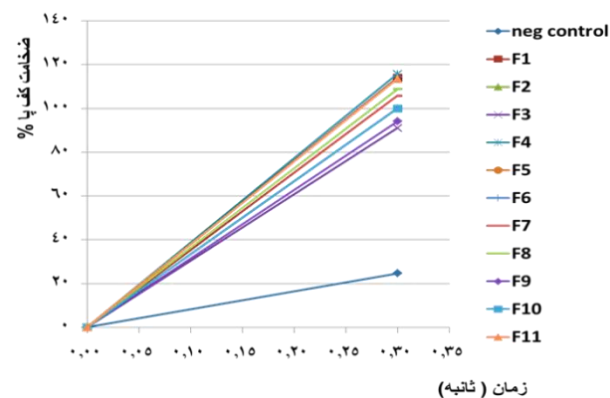
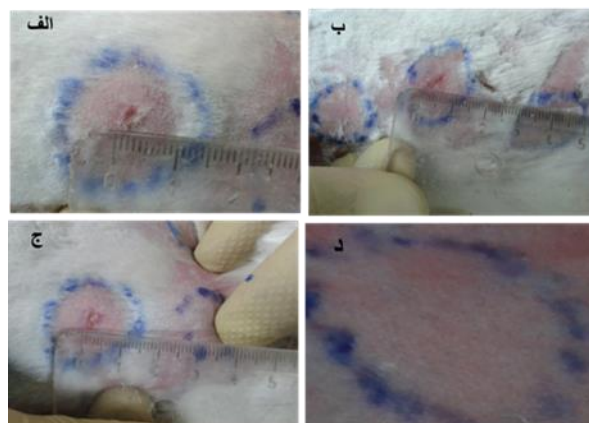
فراکشن‌ها با تزریق درون‌رگی به‌مقدار ۳۷/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از F1 ۵۰٪ کشندگی را در گروه‌های آزمایش ایجاد کرد. در این مقدار بی‌حالی زیاد، حرکت ضعیف، فلج اندام عقبی، بی‌نظمی تنفسی و تاکیکاردی، عدم تعادل مشاهده شد. در دوزهای پایین‌تر هیچ علائمی مشاهده نشد. در فراکشن‌های F2-F11 در این مقدار ۵۰٪ کشندگی مشاهده نشد.

فعالیت ایجاد ادم: فعالیت ادم در هر فراکشن (F1-F11) به‌مقدار

۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۴). F4 ادم قوی‌تری نسبت به بقیه فراکشن‌ها ایجاد کرده بود. بالاترین فعالیت ادم‌تیک فقط در زمان دو ساعت برای همه فراکشن‌ها مشاهده شده بود. شیب فعالیت درصد ادم در زمان دو ساعت در F4 (۱۷۹/۴٪) افزایش بیش‌تری یافته بود و یک روند خطی ($R^2=0.609$) مشاهده شد ولی گروه شاهد در این زمان ۱۱/۷٪ را نشان دادند. بالاترین فعالیت ادم برای گروه شاهد در زمان نیم‌ساعت بالاترین افزایش (۳۷/۶٪) و در زمان ۳ ساعت به صفر می‌رسد (شکل ۵). فعالیت ادم‌توزنیک ۱۱ فراکشن زهر تا ۳ روز شیب کاهشی تندی را نشان دادند ولی پس از آن به‌مدت ۱۰ روز به آهستگی کاهش یافته بودند. F4 در پایان ۱۰ روز ۷۰/۵٪ بود. نتایج نشان داد که یک فعالیت ادم‌توزنیک پایدار می‌تواند بعد از نیش زدن

بحث

زهرهای جانوری با منشاء دریایی در مقایسه با دیگر جانوران سمی خشکی کمی کم تر مورد توجه و بررسی قرار گرفته اند و اطلاعات کمی در مورد این منابع مهم بیولوژیک وجود دارد. این کمبود اطلاعات ناشی از دشواری استخراج زهر، ناپایداری و متنوع بودن ترکیبات دریایی می باشد. مطالعه بر روی مکانیسم زهر دریایی و نحوه عملکرد آن ها نه تنها ما را به سوی شناسایی ترکیبات مضر رهنمون می کند بلکه ما را با ترکیباتی آشنا می سازد که از نظر دارویی و پزشکی بسیار مفید می باشد. زهر شقایق های دریایی مجموعه ای از سم های گوناگون با خصوصیات فارمولوژی متنوع و ویژگی بیولوژیکی زیاد می باشند به طوری که هر کدام از آن ها می توانند منبعی از داروهای مفید باشند. *S. haddoni* خلیج فارس از این دسته از موجودات زهری می باشد و با توجه به ناشناخته بودن خصوصیات سم شناسی زهر آن به عنوان موضوع این مطالعه انتخاب شد. علائم های ایجاد شده پس از تزریق فراکشن های زهر مورد مطالعه مانند بی حالی زیاد، حرکت ضعیف، فلج اندام عقبی، بی نظمی تنفسی و تاکی کاردی، عدم تعادل، حرکات چرخشی، مرگ با مطالعه Ravindran و همکاران (۲۰۱۰) هم خوانی داشت. در مطالعه Sanchez-Rodriguez و همکاران (۲۰۰۶) سمیت عصاره آبی زهر خام و فراکشن استخراج شده از شقایق دریایی *Bartholomea annulata* را نشان دادند. در این مطالعه با تزریق درون صفاقی عصاره خام ۷۰۰/۷ میلی گرم بر کیلوگرم بر روی موش و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم بر روی خرچنگ دریایی را بیان کردند. در مطالعه دیگر Al-Hazmi و همکاران (۲۰۱۵) LD₅₀ با تزریق درون صفاقی عصاره اتانولی زهر خام از شقایق دریایی *Gyrostoma helianthus* بر روی موش را ۲۹ میلی گرم بر کیلوگرم را نشان دادند. مطالعه Sudharsan و همکاران (۲۰۱۳)، LD₅₀ عصاره متانولی زهر خام و فراکشن های جدا شده از شقایق دریایی *Stichodactyla mertensii* را به ترتیب ۱۰۸/۲۴، ۳/۷۵ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم را بیان کردند. در مقایسه با فراکشن مورد مطالعه سمیت کمتری را نشان دادند. Subramanian و همکاران (۲۰۱۱)، LD₅₀ عصاره خام از شقایق دریایی *S. magnifican*، *P. indicus*، *P. sinensis*، *H. magnifican*، *S. haddoni* در همه شقایق های مورد مطالعه حداکثر ۵ میلی گرم را نشان دادند. مقایسه LD₅₀ جنس های دیگر از خانواده Stichodactylidae با *S. haddoni* خلیج فارس متفاوت بودند. ادم فوری بعد از تزریق زیر پوستی زهر یک مولکول ادماتوژنیک قوی در زهر مشخص می کند. حداکثر ضخامت بعد از ۲ ساعت برای فراکشن های زهر خام مشاهده شد و ادم خیلی به آهستگی در ۱۰ روز کاهش یافت. درصد ادم F4 در مدت ۱۰ روز ۷۰/۵ اندازه گیری شد. نتایج مشخص می کرد که یک فعالیت ادماتوژنیک ماندگار بعد از نیش زدن توسط *S. haddoni* خلیج فارس می تواند اتفاق بیافتد. Subramanian و همکاران (۲۰۱۱) هم چنین

شکل ۶: بررسی فعالیت ادم F1-F11 فراکشن های زهر *S. haddoni* بر روی موش BALB/cشکل ۷: فعالیت لحظه ای ادم F1-F11 از *S. haddoni* بعد از ۲۰ ثانیهشکل ۸: فعالیت در مونوکروتیک فراکشن های زهر *S. haddoni* روی پوست خرگوش، ۳۰ میکروگرم از فراکشن های F1، F3 و F4 به ترتیب ناحیه ای به قطر ۳، ۴ و ۵ میلی متر ایجاد کردند. الف: F1، ب: F3، ج: F4، د: شاهد (عدم ایجاد نکروز)

فعالیت در مونوکروتیک: یک فعالیت در مونوکروتیک و التهابی سریع در طی ۳ ساعت بعد از تزریق مقدار ۳۰ میلی گرم در میلی لیتر از فراکشن های جمع آوری شده زهر از HPLC نیز مشاهده شد. فقط ناحیه نکروز در فراکشن های F1، F3 و F4 مشاهده گردید که به ترتیب ناحیه ای به قطر ۴، ۳ و ۵ میلی متر را ایجاد کردند (شکل ۸).



منابع

1. Al-Hazmi, M.A.; Gomma, M.N.; Waggas, A.S. and Rawi, S.M.; 2015. Brain Biogenic Monoamines in Relation to Brain Histopathology and Plasma Glutathione Shuttle in Rat after Exposure to Sea anemone *Gyrostoma helianthus* Extract. *J Bioequiv Availab*. Vol. 7, pp: 005-011.
2. Bruhn, T.; Schaller, C.; Schulze, C.; Sanchez-Rodriguez, J.; Danneier, C.; Ravens, U.; Heubach, J.F.; Eckhardt, K.; Schmidt-mayer, J. and Schmidt, H.L., 2001. Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *A. elegantissima*. *Toxicology*. Vol. 39, pp: 693-702.
3. Bunc, M.; Drevensek, G.; Budihna, M. and Suput, D., 1999. Effects of equinatoxin II from *Actinia equina* (L.) on isolated rat heart: the role of direct cardiotoxic effects in equinatoxin II lethality. *Toxicol*. Vol. 37, pp: 109-123.
4. Cheung, R.C.F.; Ng, T.B. and Wong, J.H., 2015. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. *Mar. Drugs*. Vol. 13, pp: 4006-4043.
5. Finney, D.J., 1985. The median lethal dose and its estimation. *Arch. Toxicol*. Vol. 56, pp: 215-218.
6. Ghafari, S.M.; Jamili, S.; Bagheri, K.P.; Ardakani, E.M.; Fatemi, M.R.; Shahbazzadeh, F. and Shahbazzadeh, D., 2013. The first report on some toxic effects of green scat, *Scatophagus argus* an Iranian Persian Gulf venomous fish *Scatophagus argus* an Iranian Persian Gulf venomous fish. *Toxicol*. Vol. 66, pp: 82-87.
7. Harvey, A.L., 2014. Toxins and drug discovery. *Toxicol*. Vol. 92, pp: 193-200.
8. Kawai, N. and Konno, K., 2004. Molecular determinants of two neurotoxins that regulate sodium current inactivation in rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett*. Vol. 361, pp: 44-46.
9. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Vol. 227, pp: 680-685.
10. Luciano, M.N.; da Silva, P.H.; Chaim, O.M.; dos Santos, V.L.; Franco, C.R. and Soares, M.F., 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. *J. Histochem. Cytochem*. Vol. 52, pp: 455-467.
11. Malve, H., 2016. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J Pharm Bioallied Sci*. Vol. 8, pp: 83-91.
12. 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.
13. Michael, T.D.C and Clinton, G.L.V., 2015. Recent Advances in Drug Discovery from South African Marine Invertebrates. *Mar. Drugs*. Vol. 13, pp: 6366-6383.
14. Mizuno, M.; Nishikawa, K.; Yuzawa, Y.; Kanie, T.; Mori, H.; Araki, Y.; Hotta, N. and Matsuo S., 2000. A case report of acute renal failure following a sting presumably by a sea anemone. *Am. J. Kidney Dis*. Vol. 36, pp: 10.
15. Ramkumar, S.; Arun Sudhagar, S. and Venkateshvaran K., 2012. Bioactivity of venom extracted from the sea anemone *Anthopleura asiatica* (Cnidaria: Anthozoa): Toxicity and Histopathological studies. *International J of fisheries and aquaculture*. Vol. 4, No. 4, pp: 71-76.
16. Ravindran, S.V.; Kannan, L. and Venkateshvaran, K., 2010. Biological activity of sea anemones proteins: I Toxicity and histopathology. *Indian journal of Experimental Biology*. Vol. 47, pp: 1225-1232.
17. Romero, L.; Marcussi, S.; Marchi-Salvador, D.P.; Silva, F.P.; Jr, Fuly, A.L.; Stabelli, R.G.; da Silva, S.L.; Gonzalez, J.; Monte, A.D. and Soares, A.M., 2010. Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A(2) from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie*. Vol. 92, pp: 1063-1071.
18. Sanchez-Rodriguez, J.; Zugasti, A.; Santamaria, A.; Galván-Arzate, S. and Segura-Puertas, L., 2006. Isolation, partial purification and characterization of active polypeptide from the sea anemone *Bartholomea annulata*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. Vol. 99, pp: 116-121.
19. Smith, P.K., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. Vol. 150, No. 1, pp: 76-85.
20. Subramanian, B.; Sangappellai, T.; Rajak, C.R. and Diraviam, B., 2011. Pharmacological and biomedical properties of sea anemones *Paracondactylis indicus*, *Paracondactylis sinensis*, *Heteractis magnifica* and *Stichodactyla haddoni* from East coast of India. *Asian Pacific Journal of tropical medicine*. pp: 722-726.
21. Sudharsan, S.; Seedei, P.; Kanagarajan, U.; Dalvi, S.R.; Guptha, S.; Poojary, N.; Shanmugam, V.; Srinivasan, A. and Shanmugam, A., 2013. Analgesic and neuromodulatory effects of sea anemone *Stichodactyla mertensii* methanolic extract from southeast coast of India. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Vol. 7, pp: 2180-2200.
22. Thangaraj, S. and Bragadeeswaran, S., 2012. Assessment of biomedical and pharmacological activities of sea anemones *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Gulf of Mannar Biosphere Reserve, southeast coast of India. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. Vol. 18, pp: 53-61.
23. Wang, L.; Ou, J.; Peng, L.; Zhong, X.; Du, J. and Liu, Y., 2004. Functional expression and characterization of four novel neurotoxins from sea anemone *Anthopleura sp.* *Biochem. Biophys. Res. Commun*. Vol. 313, pp: 163-170.

فعالیت ادماتوژنیک زهر خام از *P. sinensis* و *S. haddoni* جمع آوری شده از ساحل هند را در مدت زمان ۲ ساعت نشان دادند. Thangaraj و Bragadeeswaran (۲۰۱۲) با مطالعه بر روی زهر خام شقایق‌های دریایی جمع آوری شده *Stichodactyla mertensii*, *Stichodactyla gigantea* از ساحل هند فعالیت ضد التهابی آن را بیان کردند. در صورتی که *S. haddoni* خلیج فارس التهاب و تورم شدید و ماندگاری را نشان داد. Romero و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت ادماتیک آنزیم فسفولیپاز جداسازی شده از زهر خام (CgPLA2) شقایق دریایی *Condylactis gigantea* ساحل کوبا را ثابت کردند. یک فعالیت درمونکروتیک با فعالیت خیلی سریع در مدت ۳ ساعت بعد از تزریق زیر جلدی به مقدار ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر از فراکشن‌های (F1, F3, F4) جداسازی شده از زهر مشاهده شد. این اولین گزارش یک نکروز پوستی سریع توسط زهر *S. haddoni* است. ما فعالیت نکروتیک آن در برابر تومورهای پوستی مانند ملانوما را پیشنهاد می‌کنیم. مطالعه مشابه مبنی بر فعالیت درمونکروتیک در شقایق‌های دریایی وجود ندارد پس مطالعات اثرات زهر آن‌ها بر ارگان‌های مختلف بدن را بیان می‌کنیم. Ramkumar و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه سمیت عصاره آبی زهر و فراکشن‌های جدا شده از شقایق دریایی *Anthopleura asiatica* از ساحل هند نکروز مغزی، همولیز در قلب، انسداد با لخته خون، نکروز در کلیه و همولیز در سیاهرگ مرکزی کبد را ثابت کردند. در مطالعه دیگر Mizuno و همکاران (۲۰۰۰) علت نارسایی حاد کلیوی توسط زهر شقایق دریایی *Phyllodiscus semoni* را بیان کردند. در مطالعات قبلی سم‌های شقایق دریایی دارای فعالیت همولایتیکی، سمیت قلبی، نوروتوکسین و نفروتوکسیتی را نشان دادند (Bunc و همکاران، ۱۹۹۹؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۴؛ Kawai و همکاران، ۲۰۰۴؛ Mizuno و همکاران، ۲۰۰۷؛ Bruhn و همکاران (۲۰۰۱) پلی‌پپتید نوروتوکسین از زهر شقایق دریایی را بیان کردند. Luciano و همکاران (۲۰۰۴) آسیب کبدی از زهر شقایق دریایی را نشان دادند. Ravindran و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعه سمیت بر روی عصاره متانولی و فراکشن‌های جدا شده از شقایق‌های دریایی *Heteractis magnifica* و *Stichodactyla haddoni* از ساحل هند اثرات نوروتوکسیک، کاردیوتوکسیک، نفروتوکسیک و هیپاتوتوکسیک را نشان دادند. *S. haddoni* مطالعه ما نیز اثر سمیت را نشان داد. یک فعالیت ادماتوژنیک ماندگار بعد از نیش زدن توسط *S. haddoni* خلیج فارس می‌تواند اتفاق بیافتد. ادم ماندگار و فعالیت درمونکروتیک سریع بعد از تزریق زیر پوستی زهر پدیده قابل توجهی هستند. مطابق با نتایج، آن اولین گزارش روی ادماتوژنیک ماندگار، فعالیت درمونکروتیک سریع از زهر شقایق دریایی *S. haddoni* خلیج فارس است. داده‌ها شبیه‌سازی نیش زدن شقایق دریایی مورد مطالعه ما را نتیجه می‌دهد که برای مدیریت کلینیکی و هم به دنبال آن برای استراتژی درمان ارزش خواهند داشت.



Separate and the survey of biological activity from fractions of venom the Persian Gulf *Stichodactyla haddoni*

- **Ziba Moghadasi***: Department of biology, Farhangian University, Tehran, Iran
: Laboratory of Venom and Biotherapeutics Molecules, Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: July 2019

Accepted: October 2020

Key words: *Stichodactyla haddoni*, Venom, Biologic activity, HPLC, Venomous marine animal

Abstract

S. haddoni is one of the venomous animals of Persian Gulf and characterization of its biological activity and toxicity are of great value concerning discovery of new potential pharmaceutical agents as well as study of toxicity of the crude venom. The main goal of this study was to survey biological activities fractions isolated from methanol extract of tentacles from the Persian Gulf sea anemone. LD₅₀ of isolated fractions venom of *S. haddoni* was recorded on Balb/c mice with intravenous injection. Edematogenic activity of isolated fractions from venom was performed by injection into the sub plantar region of the left hind paw male Balb/c mice (average weight 20–22 g) in tetra plicate. Dermonecrosis activity of the venom was checked on male New Zealand rabbit's skin (3kg). LD₅₀ of F1 was recorded at 38.8 mg/ml. The highest edematogenic activity was seen just two hours after injection 5mg/ml from F4 (179.4 %) and decreased up to 70.5% during 10day. 30mg/ml of F1, F3 and F4 fractions made necrosis area 4, 3, 5mm respectively after 3 hours. Instant potent edema and rapid dermonecrotic activity are significant phenomena after injection of intradermal. This is the first report on instant edematogenic and rapid dermonecrotic activities of the Persian Gulf Sea Anemone venom, *Stichodactyla haddoni*. The results would also be of high value to better management of clinical conditions and follow up treatment strategies as well.

* Corresponding Author's email: Ziba_mg2000@yahoo.com

