دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نوزدهم، شماره ۱، صفحه ۳۶– ۲۷ (فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵)
ISMJ 2016; 19(1): 27-36

بررسی فعالیت لیزکنندگی پروتئین‌های تانتاکولی شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni*

مینا بهارلوئی [۱]، صابر خدابنده [۱*]

[۱] گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۲/۳۰- پذیرش مقاله: ۹۳/۱۲/۶)

چکیده

زمینه: موجودات دریایی از جمله شقایق‌های دریایی منبعی قوی از ساختارهای جدید و ترکیبات‌زیست فعال هستند. تانتاکول‌های این آبزیان انواعی از پپتیدها و پروتئین‌ها را تولید می‌کنند که به عنوان سموم نوروتوکسین و سیتولیزین عمل می‌کنند. سیتولیزین‌ها به دلیل خاصیت لیز کنندگی‌شان و امکان اثر آن‌ها بر روی بافت‌های خاص به عنوان عناصر ضد توموری و حتی ضدانگلی شناخته می‌شوند.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* در آبان ماه سال ۹۱ در یک جزر کامل از منطقه بین جزر و مدی سواحل جزیره هرمز انجام گرفت. نمونه‌ها بعد از فریز شدن به آزمایشگاه منتقل شدند. بخش تانتاکولی نمونه‌ها با استفاده از PBS عصاره‌گیری شد. پپتیدهای پائین و بالای ۱۰ کیلودالتون به وسیله فیلتر MWCO ۱۰۰۰۰ میلی‌پور جدا شد و فعالیت همولیتیک به وسیله متد میکروهمولتیک بر روی گلبول‌های قرمز خون انسان، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* و ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این بررسی، تشکیل سوسپانسیون قرمز رنگ به عنوان همولیتیک مثبت، توصیف شد. عصاره خام، پپتیدهای بالای ۱۰ کیلودالتون و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلودالتون در غلظت‌های مختلف خواص لیزکنندگی را بر روی سلول‌های خونی به صورت متفاوت نشان دادند و از طرفی مقایسه فعالیت لیزکنندگی عصاره خام، پپتیدهای بالا و پائین ۱۰ کیلودالتون بین سه نمونه خونی، فعالیت لیزکنندگی بیشتر را بر روی خون انسان سپس بر روی کپور معمولی و نهایتاً بر روی خون قزل‌آلای رنگین‌کمان ایجاد کردند.

نتیجه‌گیری: عصاره خام PBS و پپتیدهای بالا و پائین ۱۰ کیلودالتون دارای خواص لیزکنندگی بر روی خون انسان و ماهی کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان هستند که این فعالیت همولیزی با توجه به نوع خون متفاوت است و بیشترین فعالیت همولیزی بر روی خون انسان است.

واژگان کلیدی: شقایق دریایی، شقایق فرشی، سیتولیزین، فعالیت لیزکنندگی

[*] مازندران، نور، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران

E-mail:surp78@gmail.com

مقدمه

اقیانوس‌ها منشاء ساختارهای منحصر به فردی از محصولات طبیعی می‌باشند که به‌طور عمده در موجودات زنده انباشته شده‌اند (۱). در این میان به‌ویژه موجودات ناحیه ساحلی متنوع‌تر هستند، زیرا گونه‌های با سازگاری بالا در این محیط به سختی یافت می‌شوند. اکوسیستم‌های دریایی منابعی قوی از هر دو تنوع شیمیایی و بیولوژیک را فراهم می‌کنند (۲).

استخراج و شناسایی تولیدات طبیعی شاخه مرجانیان که اکثراً سمی هستند، در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. شقایق‌های دریایی از رده آنتوزوآ (۳) دارای پلی‌پپتیدها و پروتئین‌های توکسین می‌باشند که در سلول‌های تخصص یافته نماتوسیت تولید می‌شود. تانتاکول‌ها محل ویژه‌ای برای سلول‌های نماتوسیت هستند؛ بنابراین محل سنتز سموم و ذخیره آن می‌باشند (۴). این سموم دارای غلظت بالایی از پلی‌پپتیدها و پروتئین‌ها می‌باشند که به‌عنوان نوروتوکسین، همولیزین و آنزیم عمل می‌کنند (۵). سیتولیزین‌ها، پروتئین و پپتیدهای محلول در آب هستند که سلول‌ها را به‌وسیله تشکیل منافذی در غشا یا به‌وسیله افزایش نفوذپذیری غشایی لیز می‌کنند (۶) بنابراین به‌دلیل خاصیت لیز کنندگی‌شان و امکان اثر آن‌ها بر روی بافت‌های خاص، به‌عنوان عناصر ضد توموری و حتی ضدانگلی مورد توجه هستند (۷).

تحقیقات نشان داده‌اند که مهم‌ترین گروه از سیتولیزین‌های شقایق دریایی، پروتئین‌های با وزن مولکولی حدوداً ۲۰ کیلودالتونی می‌باشند که منافذی را در غشاهای طبیعی و مدل‌های لیپید ایجاد می‌کنند (۸). این سیتولیزین‌ها بدون آسیب به موجود از طریق تحریک مکانیکی یا فشار دادن آرام حیوان و یا با از بین بردن موجود از قسمت‌های مختلف بدن به‌وجود می‌آیند (۳). در بیش از ۳۲ گونه شقایق دریایی فعالیت‌های بیولوژیک متنوع همولیزی و سیتوتوکسیک گزارش شده‌است (۱۱-۹). شقایق‌های دریایی که متعلق به جنس Stichodactyla هستند نمونه‌های بزرگی هستند که در آبسنگ‌های مرجانی آب‌های گرمسیری رایج هستند. سم این گونه‌ها در اصل فعالیت همولتیک بالایی دارند (۱۴-۱۲).*S. haddoni* یک گونه از شقایق دریایی است که چهار سم پپتیدی، SHTX I-III با فعالیت فلجی خرچنگ و SHTX IV با فعالیت کشندگی خرچنگ از آن جدا شده است (۱۵). علی‌رغم تحقیقات مختلف در خصوص شناسایی ترکیبات مختلف زیست فعال و بررسی فعالیت لیزکنندگی آن‌ها در گونه‌های مختلف از چند دهه پیش، هنوز تحقیقات در مراحل اولیه خود بوده و انجام تحقیقات دامنه‌دار را می‌طلبد و روی گونه‌های مختلف خلیج‌فارسی مطالعه‌ای یافت نشد و همچنین در مطالعات پیشین روش استخراج تامپونی و جداسازی پپتیدها با اولترافیلتراسیون مورد توجه قرار نگرفته است؛ لذا در تحقیق حاضر، عصاره‌گیری از تانتاکول‌های شقایق دریایی خلیج‌فارس *S. haddoni* با استفاده از محلول نمکی PBS انجام گرفت و پپتیدهای بالای ۱۰ کیلودالتون و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلودالتون به‌وسیله اولترافیلتر جداسازی شد. از طرفی با توجه به اینکه، این سموم، منافذی را در غشاهای طبیعی و مدل‌های لیپیدی ایجاد می‌کنند. خواص همولیزی آن‌ها بر روی خون‌های مختلفی بررسی شده است اما مطالعه‌ای بر روی سلول‌های خونی ماهیان با توجه به تفاوت‌های از نظر وجود هسته در این موجودات و هماتوکریت کمتر آن‌ها یافت نشده است (۸). لذا در این تحقیق خواص همولیزی به‌روش میکروهمولیتیک بر روی گلبول‌های قرمز انسان، کپور معمولی *C. carpio* و قزل‌آلای رنگین کمان *O. mykiss* مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری شقایق دریایی *S. haddoni* در آبان ماه سال ۹۱ از سواحل جزیره هرمز انجام گرفت. در یک جزر کامل، ۷ نمونه از این گونه شقایق با قطر ۴±۲۰ سانتی‌متر از منطقه بین جزر و مدی پس از برداشت نواحی گلی اطراف آن‌ها، از بستر جدا و جمع‌آوری شدند و در یخ قرار گرفتند. پس از برش قطعات کوچک، نمونه‌ها با تانک ازت به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شناسایی نمونه‌ها در مکان نمونه‌برداری با توجه به اندازه تانتاکول‌ها انجام گرفت و بخش تانتاکولی نمونه‌ها در دمای پایین با یک کاتر تیز بریده شد و در پتری‌دیش قرار گرفت و سپس در دستگاه فریز درایر مدل FDU-7012 خشک شد. به‌منظور رها شدن متابولیت‌های ثانویه از سلول، عصاره‌گیری با استفاده از PBS به‌وسیله هموژنایزر دستی، انجام گرفت و عصاره حاصل هر محلول، با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار مدل Hettich - Universal 320R با دور ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. (دور ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) شد. برای جداسازی اجزاء آن بر اساس قطبیت، عصاره‌گیری با استفاده از ان- هگزان، اتیل استات و ان- بوتانول و آب مقطر ادامه پیدا کرد. ترکیبات با قطبیت کمتر در ان-هگزان و اتیل‌استات و ترکیبات قطبی‌تر در ان- بوتانول و آب حل می‌شوند (۱۶).

شناسایی پروتئین‌ها به روش SDS-PAGE

جداسازی و شناسایی وزن مولکولی پپتیدهای مختلف موجود در عصاره‌ی PBS به وسیله SDS-PAGE روی ژل ۱۲ درصد صورت گرفت و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام شد.

فعالیت لیزکنندگی

فعالیت همولتیک عصاره خام، پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلو دالتون به‌وسیله متد میکروهمولتیک مورد ارزیابی قرارگرفت. پس از خون‌گیری از دو گونه ماهی و انسان، نمونه‌ها بلافاصله با دور ۵۰۰۰ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و ماده‌رویی تخلیه شد. سلول‌های خونی با سرم فیزیولوژی به‌منظور شستشو سه بار دیگر نیز با دور ۵۰۰۰ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و نهایتاً خون رقیق شده ۲ درصد تهیه شد و در آزمایش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر نمونه‌ی خونی ۲ درصد به هر چاهک، پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و غلظت‌های ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین محلول از عصاره خام، پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلو دالتون تهیه شد و به مقدار ۶۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و خاصیت همولیزی برای خون انسان و دو گونه ماهی به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس ماده رویی به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر جدا شد و ۱۵۰ میکرولیتر از محلول برادفورد به این نمونه‌ها اضافه شد و جذب آن‌ها در دستگاه الیزا ریدر مدل Biotec-Epoch در طول موج ۵۹۰ نانومتر خوانده شد (۱۷).

برای مشاهده فعالیت همولیزی، گسترش خونی از نمونه کنترل و نمونه تحت تیمار تهیه شد و رنگ‌آمیزی گسترش خونی با رنگ گیمسا صورت گرفت. از میکروسکوپ نوری مدل Nikon3200 مجهز به

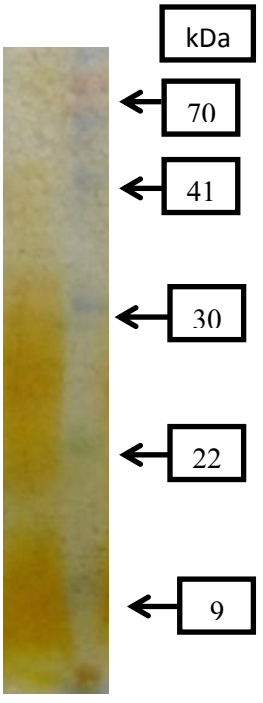
دوربین Olympus DP72 برای عکس گرفتن از گسترش خونی استفاده شد (۱۸).

آنالیز آماری

پردازش داده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc، Chicago، Il، USA) ویرایش ۱۶ انجام شد. آنالیز داده‌ها با تجزیه واریانس یک طرفه (One way-ANOVA) و تجزیه واریانس دو طرفه (Two way-ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت (P<۰/۰۵).

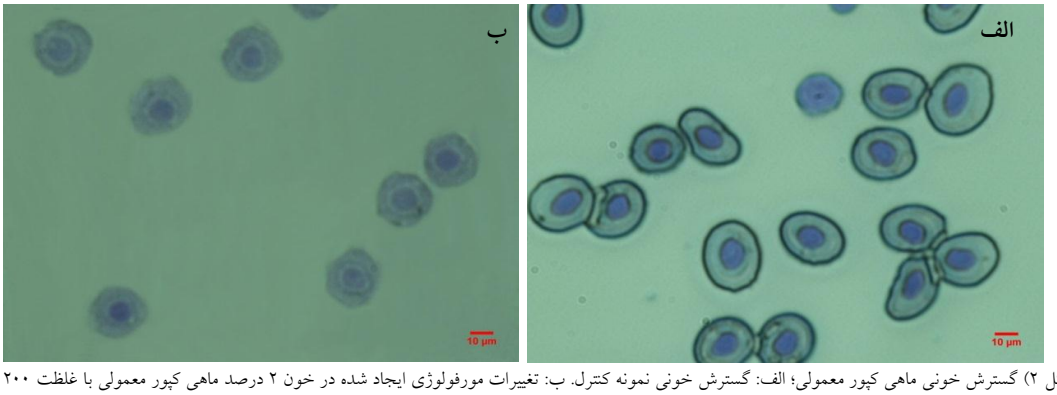
یافته‌ها

نتایج محتوای پروتئینی برای عصاره‌ی PBS، ۴۱/۹۴ میلی‌گرم در یک گرم بافت خشک دیده شد، که مقدار آن در مسیر جداسازی با حلال‌های آلی ان- هگزان، اتیل استات و ان- بوتانول به‌ترتیب ۱۹/۴۰،۷۰/۲۰ و ۱۷/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاهش یافت. از طرفی الگوی پروتئین عصاره PBS باندهای مختلف را به‌وسیله SDS-PAGE، روی ژل ۱۲ درصد نشان داد که در محدوده ۸ تا ۱۷ کیلودالتون و ۲۰ تا ۳۲ کیلودالتون برای پروتئین‌های سیتولیزن توصیف شد (شکل ۱).



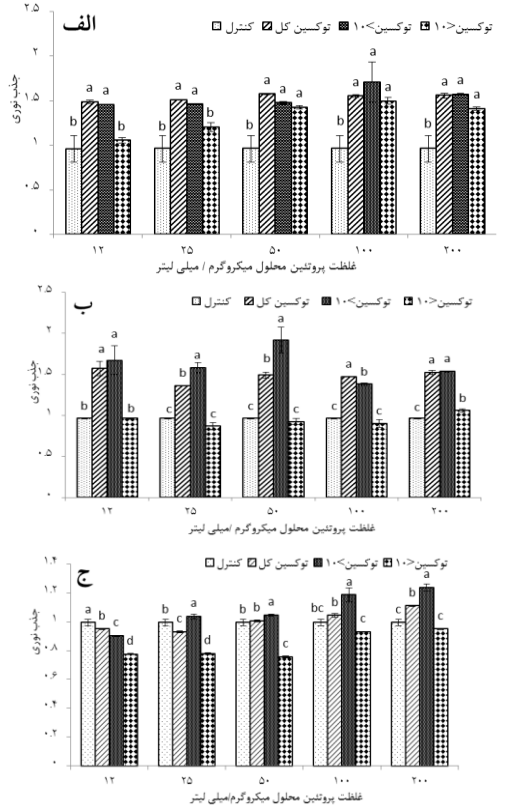
شکل ۱) آنالیز SDS-PAGE، عصاره خام PBS گونه شقایق دریایی *S. haddoni*

مطالعه میکروسکوپیک سلول‌های قرمز خون، در گسترش خونی ماهی کپور معمولی که در معرض ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره خام PBS گونه شقایق دریایی *S. haddoni* بود، تغییرات مورفولوژی از جمله چروکیدگی را در سلول‌های خونی نشان داد (شکل ۲).



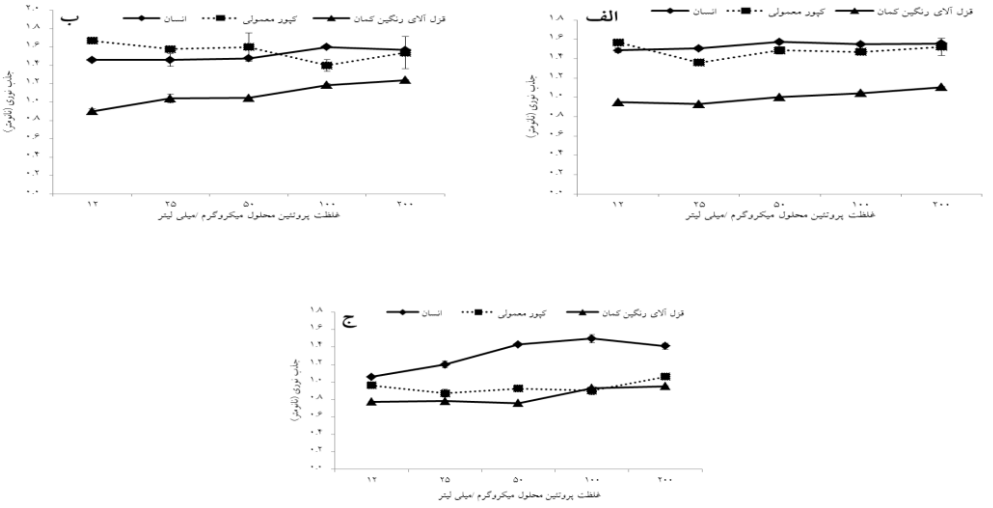
شکل ۲) گسترش خونی ماهی کپور معمولی؛ الف: گسترش خونی نمونه کنترل. ب: تغییرات مورفولوژی ایجاد شده در خون ۲ درصد ماهی کپور معمولی با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره خام *S. haddoni*. سلول‌ها برای مدت ۴ ساعت در معرض عصاره خام قرار گرفتند. تغییرات مورفولوژی ایجاد شده به‌وسیله میکروسکوپ نوری نیکون عکس‌برداری شد.

تشکیل سوسپانسیون قرمز رنگ، به‌عنوان همولیتیک مثبت توصیف شد، ابتدا مقایسه فعالیت همولیزی در غلظت‌های مختلف عصاره خام، پپتیدهای بالای ۱۰ کیلودالتون و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلودالتون بر روی هر نوع از سلول‌های خونی انجام شد. عصاره خام، پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلودالتون گونه *S. haddoni* خواص لیزکنندگی را در غلظت‌های مختلف ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر بر روی سلول‌های خون انسان نشان دادند (نمودار ۱–الف). برای ماهی کپور معمولی غلظت‌های مختلف عصاره خام و پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون و فقط غلظت ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر از پپتیدهای پائین ۱۰ کیلو دالتون فعالیت لیزکنندگی را نشان دادند (نمودار ۱–ب) در حالی که در قزل‌آلای رنگین کمان پپتیدهای پائین ۱۰ کیلودالتون در هیچ غلظتی فعالیت لیزکنندگی را نشان ندادند (نمودار ۱–ج). پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون در غلظت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و عصاره خام در تمام غلظت‌ها فعالیت لیزکنندگی را نشان دادند. در نمونه‌های شاهد سلول‌های اریتروسیت بدون تغییر در کف چاهک‌ها رسوب کردند. به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که پپتیدهای پائین ۱۰ کیلودالتون در غلظت‌های بالا فعالیت همولیزی بیشتری را بر روی خون انسان و کپور معمولی ایجاد کردند که البته این نیز بسته به نوع خون موجود، متفاوت بود. از طرفی بر روی خون قزل‌آلای رنگین‌کمان فعالیت همولیزی دیده‌نشد در حالی که عصاره خام بر روی هر سه نوع خون و پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون نیز فعالیت همولیزی قابل قبولی را بر روی خون انسان و کپور معمولی ایجاد کردند.



نمودار ۱) فعالیت همولیزی عصاره خام، پپتیدهای بالای کیلودالتون۱۰ و پائین ۱۰ کیلودالتون گونه شقایق دریایی *S. haddoni* در غلظت‌های ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر روی گلبول‌های قرمز انسان (الف)، کپور معمولی (ب) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (ج). نتایج در مقایسه با نمونه کنترل به‌صورت mean ± SEM..(n=۳) ،(P<۰/۰۵) بیان شده است.

با مقایسه فعالیت لیزکنندگی بین سه گروه خونی نتایج مشاهده شده چنین بود؛ مقایسه فعالیت لیز کنندگی عصاره خام و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلو دالتون بین خون انسان، کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان در غلظت‌های گفته شده فعالیت همولیزی بیشتری را در هر سه نمونه خونی برروی خون انسان و سپس به‌ترتیب بر روی خون کپور و قزل‌آلا نشان داد (نمودار ۲ الف، ج) در حالی که پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون بیشتر فعالیت لیز کنندگی را بر روی کپور معمولی و سپس خون انسان و قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند (نمودار ۲ ب) و به‌طور کلی می‌توان مشاهده کرد که با افزایش غلظت پروتئین محلول میزان فعالیت لیزکنندگی سموم افزایش یافته است.



نمودار ۲) فعالیت همولیزی عصاره خام (الف)، پپتیدهای بالای ۱۰ کیلودالتون (ب) و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلودالتون از گونه شقایق دریایی *S. haddoni* بین خون انسان، کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین کمان مقایسه شده است. نتایج در مقایسه با نمونه کنترل به‌صورت (n=۳) ، mean ± SEM بیان شده است.

نتایج همچنین در جدول ۱ نشان داد گونه و غلظت و اثر متقابل آن‌ها با هم بر روی فعالیت همولیزی عصاره خام و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلو دالتون تأثیر دارد، از طرفی برای پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون نیز چنین مشاهده شد به جز اینکه اثر غلظت در فعالیت لیزکنندگی پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون معنی‌دار نبود.

جدول۱) اثر گونه و غلظت و تأثیر متقابل این دو بر روی فعالیت همولیزی عصاره خام، پپتیدهای بالاتر و پایین‌تر از ۱۰ کیلودالتون (به ترتیب تیمارهای۱، ۲، ۳)

	Df			SS			Ms		
	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
گونه	۲	۲	۲	۲/۵۳۹	۲/۴۸۷	۱/۹۱۷	**۱/۲۶۹	**۱/۲۴۳	**/۹۵۸
غلظت	۴	۴	۴	۰/۰۸۲	۰/۱۲۴	۰/۳۱۲	**۰/۰۲۰	۰/۰۳۱n.s	**۰/۰۷۸
گونه غلظت*	۸	۸	۸	۰/۰۶۹	۰/۶۹۹	۰/۲۶۳	**/۰۰۹	**۰/۰۸۷	**۰/۰۳۳
خطا	۳۰	۳۰	۳۰	۰/۶۸	۰/۶۷۳	۰/۰۶۹	۰/۰۰۲	۰/۰۲۲	۰/۰۰۲
کل	۴۵	۴۵	۴۵	۸۳/۷۰۴	۹۳/۶۴۵	۵۰/۵۹۱			

**نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۱) n.s عدم معنی‌داری

بحث

به‌دلیل حضور بیشتر نماتوسیت‌ها در تانتاکول‌ها، مطابق بسیاری از مطالعات انجام شده، تانتاکول‌ها به‌عنوان منبعی برای عصاره‌گیری و بررسی اثرات سیتولیزی استفاده شد (۱۸). جداسازی اجزا مطابق با پروتکل جداسازی ترکیبات زیست فعال از موجودات دریایی انجام گرفت (۱۶) که مشاهده شد در مسیر جداسازی میزان پروتئین کاهش یافت و شناسایی پروتئین‌ها با SDS-PAGE حضور سیتولیزین‌های با وزن ملکولی ۲۰ کیلو دالتون را در عصاره خام نشان داد. به‌طور کلی در این تحقیق استخراج تامپونی و جداسازی پپتیدها با اولترافیلتراسیون صورت گرفت و فعالیت همولیزی فراکشن‌های اولیه به دست آمده با عصاره خام مورد بررسی قرار گرفت در حالی که در مطالعات پیشین این

روش کمتر مورد توجه قرار گرفته است و طی خالص‌سازی به‌وسیله روش‌های همچون ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تغییر یونی، فعالیت همولیزی اجزاء به‌دست آمده، بررسی شده است (۹ و ۱۹). از طرفی در این مطالعه نمونه‌برداری شقایق دریایی از منطقه بین جزرومدی با نواحی گلی انجام گرفت در حالی که در بیشتر مطالعات نمونه‌برداری از نواحی صخره‌های مرجانی صورت گرفته است (۹ و ۱۴) بنابراین با توجه به این شرایط اکولوژیکی و ویژگی‌های خاص خلیج‌فارس این ترکیبات نیز می‌توانند متفاوت باشند.

فعالیت لیزکنندگی با تشکیل سوسپانسیون قرمز رنگ در نمونه‌ها بررسی شد. علاوه بر این، در تصاویر میکروسکوپی هم چروکیدگی سلولی مشاهده شد. عصاره خام و پپتیدهای بالای ۱۰ کیلودالتون در هر سه نمونه خونی فعالیت لیزکنندگی را نشان دادند که همچنین نسبت به پپتیدهای پائین ۱۰ کیلودالتون بیشتر بود که قابل مقایسه با مطالعه لاگوس (Lagos) و همکاران (۲۰۰۱) بود که پپتیدهای با وزن ملکولی ۸ تا ۱۸ کیلو دالتون فعالیت همولیزی را بر روی گلبول‌های قرمز موش نشان داد (۹). در مطالعه‌ی هیروشی (Hiroshi) و همکاران (۲۰۰۲) نیز سیولیزین PsTX-20A با وزن ملکولی ۲۰ کیلودالتون و فعالیت همولیتیک و کشندگی از تانتاکول‌های شقایق دریایی گونه *Phyllodiscus semoni* جداسازی و مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰). از طرفی توکسین‌های زیر ۱۰ کیلو دالتون فعالیت همولیزی کمی را نشان دادند به طوری که در بررسی آنیروس (Aneiros) و همکاران (۲۰۰۴) به فعالیت آنتی‌هیستامینی این گروه از سیتولیزین‌ها اشاره شد (۸)، به‌طور کلی بیان می‌شود، سیتولیزین‌های ۸-۵ کیلودالتون دارای فعالیت همولیزی کمتری نسبت به سیتولیزین‌های با وزن مولکولی بالا هستند و این سیتولیزین‌ها بیشتر فعالیت آنتی‌هیستامینی نشان می‌دهند (۳ و ۱۱).

در این تحقیق فعالیت لیزکنندگی عصاره خام و پپتیدهای استخراجی بر روی سلول‌های خونی انسان و دو گونه ماهی به عنوان مدلی از موجودات دریایی، فعالیت همولیزی بیشتر را بر روی خون انسان و سپس کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد. در مطالعه‌های مشابه همچنین تفاوت بسیار زیاد در فعالیت لیزکنندگی بسته به گونه شقایق دریایی و نوع خون مشاهده شد؛ راویندران (Ravindran) و همکاران (۲۰۱۰)، مشاهده کردند که عصاره خام سه گونه *S. haddoni*، *Paracodylacti sinensis* و *Heteracti smagnifica* فعالیت همولیتیکی را در سطوح بسیار متفاوت بر روی سلول‌های خونی جوجه، بز و انسان ایجاد می‌کنند (۱۷). مطالعه‌ی تانگاراج (Thangaraj) و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره آبی گونه‌های *Stichodactyla mertensii* و *Stichodactyla gigantea* بر روی سلول‌های خونی جوجه، بز، گاو و انسان فعالیت لیز کنندگی متفاوتی ایجاد می‌کنند به‌طوری که پروتئین خام *S. mertensii* ماکزیمم فعالیت همولیتیکی32HU[1] را برای خون جوجه و این عصاره مینیمم فعالیت همولیتیکی 4HU را برای خون گاو نشان داد، فعالیت همولیتیک عصاره خام گونه *S. gigantean* تأثیر متفاوتی را با توجه به نوع خون داشت به طوری که برای خون جوجه، بز و گروه‌های خونی O و B، 16HU و برای خون گاو 8HU دیده شد (۲۱). در مطالعه کانگ (Kang) و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت لیز کنندگی عصاره ژله ماهی *Nemopilema nomurai* بر روی گلبول‌های قرمز

[1] Hemolytic Unit

سگ، موش، گربه، خرگوش و انسان بسته به گونه در سطوح متفاوت بود که با افزایش غلظت فعالیت لیزکنندگی افزایش یافت (۲۲). در رابطه با فعالیت لیزکنندگی گونه‌های شقایق دریایی بر روی خون موجودات دریایی مطالعه‌ای یافت نشد.

از جمله دلایل فعالیت همولیزی متفاوت نیز بین خون انسان و دو گونه ماهی، می‌توان به این نکته اشاره کرد که از آنجا که سیتولیزین عملکرد خود را از طریق تعامل با لیپیدهای غشایی از جمله اسفنگومیلین‌ها، فسفاتیدیل‌کولین و کلسترول اعمال می‌کنند، بنابراین ترکیب لیپیدی متفاوت غشای سلولی، سلول‌های خونی انسان و دو گونه ماهی می‌تواند این عملکرد و فعالیت همولیزی را تحت تأثیر قرار دهد که در مطالعه‌ی دی لوس‌ریوس (De los Rios) و همکاران (۱۹۹۸) بیان شد که عملکرد سموم سیتولیزی شقایق‌های دریایی به ترکیب لیپیدی غشایی بستگی دارد (۲۳). از دلایل دیگر نیز می‌توان به تفاوت در وجود هسته در گلبول‌های قرمز ماهیان، حجم هماتوکریت و غلظت هموگلوبین بین انسان و دو گونه ماهی اشاره کرد و مهم‌تر از همه فعالیت همولیزی کمتر قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌توان به این نکته اشاره کرد که حجم هماتوکریت قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به ماهیان تلوئست دیگر (کمتر از ۲۰ درصد) کمتر است بنابراین یک ماهی کم خونی در نظر گرفته می‌شود (۲۴)، پس این موضوع نیز می‌تواند شدت تاثیر توکسین را بر روی سلول‌های خونی این گونه تحت تأثیر قرار دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره خام، پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون و پپتیدهای پائین ۱۰ کیلو دالتون در غلظت‌های مختلف تأثیر همولتیک بر روی سه نوع خون دارند به‌طوری که عصاره خام و پپتیدهای بالای ۱۰ کیلو دالتون فعالیت همولیزی بیشتری را نسبت به پپتیدهای پائین ۱۰ کیلو دالتون نشان می‌دهند از طرفی در مقایسه فعالیت همولیزی بر روی سه نوع خون، به‌طور کلی خون انسان نسبت به خون دو گونه ماهی بیشتر تحت تأثیر این سموم قرار گرفتند، بنابراین با توجه به این ویژگی‌ها و تأثیر متفاوت این سموم با توجه به ترکیب لیپیدی متفاوت سلولی، در مطالعات آتی می‌توان خواص ضد توموری و ضد انگلی آن‌ها را بیشتر بررسی نمود.

References:

1.Ely R, Supriya T, Naik C. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the Coast of South East India. J Exp Mar Biol Ecol 2004; 309: 121-127.
2.Devi NA, Rajendran R, Sundaram SK. Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria. Indian J Nat Prod Resour 2011; 2: 59-64.
3.Frazão B, Vasconcelos V, Antunes A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An Overview. Mar Drugs 2012; 10: 1812-1851.
4.Belmonte G, Pederzolli C, Maček P, et al. Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. J Membr Biol 1993; 131: 11-22.
5.Mariottini GL, Pane L. Mediterranean jellyfish venoms: a review on Scyphomedusae. Mar Drugs 2010; 8: 1122-1152.
6.Anderluh G, Dalla Serra M, Viero G, et al. Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar lipid structures. J Biol Chem 2003; 278: 45216-45223.

7.Jiang X, Chen H, Yang W, et al. Functional expression and characterization of an acidic actinoporin from sea anemone Sagartia rosea. Biochem Biophys Res Comm 2003; 312: 562.
8.Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 803: 41-53.
9.Lagos P, Duran R, Cervenansky C, et al. Identification of hemolytic and neuroactive fractions in the venom of the sea anemone Bunodosoma cangicum. Braz J Med Biol Res 2001; 34: 895-902.
10.Bellomio A, Morante K, Barlič A, et al. Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone Actinia fragacea. Toxicon 2009; 54: 869-880.
11.Anderluh G, Maček P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). Toxicon 2002; 40: 111-124.
12.Devlin J P. Isolation and Partial Purification of Hemolytic Toxin from Sea Anemone, Stoichactis helianthus. J Pharm Sci 1974; 63: 1478-1480.
13.Michaels DW. Membrane Damage by a Toxin from the Sea Anemone Stoichactis helianthus. I. Formation of Transmembrane Channels in Llipid. Bilayers. Biochim Biophys Acta 1979; 555: 67-78.
14.Varanda W, Finkelstein A. Ion and Nonelectrolyte Permeability Properties of Channels Formed in Planar Lipid Bilayer Membranes by the Cytolytic Toxin from the Sea Anemone, Stoichactis helianthus. J Membr Biol 1980; 55: 203-211.
15.Honma T, Kawahata S, Ishida M, et al. Novel peptide toxins from the sea anemone Stichodactyla haddoni. Peptides 2008; 29: 536-544.
16.Ebada SS, Edrada RA, Lin W, et al. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. Nat protoc 2008; 3: 1820-1831.
17.Ravindran VS, Kannan L, Venkateshvaran K. Biological activity of sea anemone proteins: II. Cytolysis and cell line toxicity. Indian J Exp Biol 2010; 48: 1233-1236.
18.Hu B, Guo W, Wang LH, et al. Purification and Characterization of Gigantoxin-4, a New Actinoporin from the Sea Anemone Stichodactyla gigantea. Int J Biol Sci 2011; 7: 729-739.
19.Lanio ME, Morera V, Alvarez C, et al. Purification and characterization of two hemolysins from Stichodactyla helianthus. Toxicon 2001; 39: 187-194.
20.Nagai H, Oshiro N, Takuwa-Kuroda K, et al. A new polypeptide toxin from the nematocyst venom of an Okinawan sea anemone Phyllodiscus semoni (Japanese name "unbachi-isoginchaku"). Biosci Biotechnol Biochem 2002; 66: 2621-2625.
21.Thangaraj S, Bragadeeswaran S. Assessment of biomedical and pharmacological activities of sea anemones Stichodactyla mertensii and Stichodactyla gigantea from Gulf of Mannar Biosphere Reserve, southeast coast of India. JVATiTD 2012; 18: 53-61.
22.Kang C, Munawir A, Cha M, et al. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfishNemopilema nomurai (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2009; 150: 85-95.
23.De los Rios V, Mancheño JM, Lanio ME, et al. Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone Stichodactyla helianthus. Eur J Biochem 1998; 252: 284-289.
24.Farrell AP. Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment: Academic Press; 2011.

ISMJ 2016; 19(1): 27-36

Orginal Article

Assessment of hemolytical activity of proteins from tentacles of sea anemone, *Stichodactyla haddoni*

***M. Baharloei* [1], *S. khodabandeh* [1*]**

[1] ***Department of Marine Biology, faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran***

(Received 20 May, 2014 Accepted 25 Feb, 2015)

Abstract

Background: Sea anemone is ocean dwelling and typically organisms sessile. These tentacles produce a variety of peptides and proteins that act as, neurotoxins and cytolysins toxins. Cytolysins due to their effect on specific tissue and lysing properties are known as antiparasitic or antitumor compounds.

Materials and Methods: Sea anemone *Stichodactyla haddoni* were collected from the coast of Hormuz Island in November 2012 and tentacles extraction was performed by using of saline PBS solvents. Peptides above 10kDa and peptides below 10kDa were separated by amicon® Ultra-15 10K device. The hemolytic activity was assessed by the micro hemolytic method for human, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and common carp *Cyprinus carpio* erythrocytes.

Results: Uniform red color suspension in the wells considered as positive hemolysis. The crude extracts, peptides above 10kDa and peptides below 10kDa at various concentrations were showed hemolytic effect on human, common carp *Cyprinus carpio*and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* erythrocytes.

Conclusion: The crude extract, peptides above 10kDa and peptides below 10kDa have a hemolytic effect on human erythrocytes and two species of fish. The venoms showed the most hemolytic activities on human blood among others.

Key words: Sea anemone, *Stichodactyla haddoni,* Cytolysin, Hemolytic activity

***Address for correspondence*: Mazandaran, Nour, Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares Uniersity, IRAN; E.mail: surp78@gmail.com