



مقاله پژوهشی

اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و سمیت سلولی دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* خلیج فارس

طیبه نامی^۱، سولماز سلیمانی^۲، نرگس امراللهی بیوکی^{۳*}، مرتضی یوسف‌زادی^۴، موسی کشاورز^۳

تاریخ دریافت: مهر ۹۷

تاریخ پذیرش: دی ۹۷

چکیده

فرآورده‌های زیستی و طبیعی از دوران باستان به عنوان مهمترین منبع تهیه داروها مورد توجه بوده‌اند. این مطالعه نیز با هدف بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی و سمیت سلولی ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* انجام گرفت. عصاره‌های دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده با استفاده از سه حلال ان‌هگزان، اتیل‌استات و متانول به دست آمد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر یک از عصاره‌ها، با استفاده از روش‌های قدرت احیاکنندگی و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی سنجیده شد. میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نیز به روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اثر ضدباکتریایی سه سویه باکتری گرم مثبت و یک سویه باکتری گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت. آزمون سمیت سلولی با استفاده از لارو آرتمیا صورت پذیرفت. عصاره متانولی در هر دو روش بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بود و عصاره اتیل‌استاتی بازوی ستاره شکننده و عصاره متانولی دیسک مرکزی به ترتیب بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* و *Serratia marcescens* داشتند. نتایج اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). همچنین عصاره اتیل‌استاتی بازوی ستاره شکننده و عصاره متانولی دیسک مرکزی به ترتیب در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین سمیت بودند. یافته‌ها حاکی از آن است که ستاره شکننده مورد مطالعه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و سمیت سلولی است. از این رو، خالص‌سازی و شناسایی این ترکیبات پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، سمیت سلولی، ستاره شکننده، *Ophiocoma erinaceus*

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

* نویسنده مسئول: amrollahi@hormozgan.ac.ir

مقدمه

از میان موجوداتی که به دلیل داشتن ترکیبات زیست‌فعال با خواص مختلف دارویی در عرصه پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند می‌توان به بی‌مهرگان دریایی از جمله ستاره شکننده اشاره کرد (Abubakar et al., 2012). ستاره‌های شکننده دارای شکل بدن به صورت صفحه دیسک مانند هستند که معمولا پنج عدد بازو به آن اتصال دارد. اسکلت بدن در ناحیه دیسک منقطع و ناپیوسته است و تنها پوسته سختی را در جهت بازوها به وجود می‌آورد. آن‌ها فاقد رشته‌های آبششی جلدی هستند، شیار آمبولاکرال بسته و توسط صفحات اسکلتی پوشیده شده است، پاهای لوله‌ای فاقد بادکش و آمپول هستند، اگرچه پاهای لوله‌ای در تغذیه و تنفس نقش دارند ولی در حرکت نقش کمتری دارند (Gomes et al., 2014).

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، در پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی و برخی اشکال سرطان اهمیت داشته باشند (Ferreira et al., 2007). رادیکال‌های آزاد، گونه‌های مولکولی بسیار واکنشگر با یک یا چند الکترون جفت نشده هستند (Zhang, 1990). آن‌ها برای

در عصر حاضر، ترکیبات طبیعی نقش موثری در علوم پزشکی و دارویی ایفا می‌کنند، در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشا دریایی بسیار حائز اهمیت است. وجود ترکیباتی با ساختار استروئیدی و اتم‌های هیدروژن، به دلیل محیط زیست جانداران دریایی که محیطی مملو از آب است، ساختارهای ویژه‌ای را شکل می‌دهد و آن‌ها را از سایر ترکیبات طبیعی متمایز می‌کند و منبعی غنی و فرصتی بزرگ را برای کشف ترکیبات فعال زیستی جدید به وجود می‌آورد (Zhou et al., 2011; Bragadeeswaran et al., 2013). نیاز به یافتن ترکیبات جدید دارویی همواره احساس می‌شود چرا که هنوز درمان قطعی برای برخی از بیماری‌ها (مثل سرطان، ایدز، آلزایمر، آرتریت روماتیسمی و غیره) وجود ندارد (نبی‌پور، ۱۳۸۷). بیماری‌های کشنده و مهلک همواره نیاز به کشف داروهای جدید را بیش از پیش نمایان می‌کند. توسعه فناوری‌های اخیر توانسته‌اند راهی برای کشف ترکیبات دارویی جدید از اقیانوس‌ها و دریاها باشند. بی‌مهرگان دریایی صرفا بر مکانیسم‌های ایمنی ذاتی تکیه دارند (Abubakar et al., 2012).

مدت زمان کوتاهی پیش از این که با سایر مولکول‌ها واکنش نشان دهند و الکترون گرفته یا از دست بدهند و پایدار شوند، تشکیل می‌شوند. تنها راهی که به وسیله آن یک رادیکال آزاد می‌تواند خاموش شود و این واکنش را خاتمه دهد، آن است که هنگامی که الکترون‌های جفت نشده توانایی جفت شدن با یک یا چند مولکول را داشته باشند، دو رادیکال با هم واکنش دهند. این امر به علت پایین بودن نیمه عمر رادیکال‌های آزاد منفرد و غلظت پایین رادیکال‌ها در بافت، نادر است (Murray, 2009). ترکیباتی که مانع اثر مخرب رادیکال‌های آزاد می‌شوند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نامیده می‌شوند. این ترکیبات وقتی در غلظت‌های کمتری نسبت به سوبسترای قابل اکسید شدن ظاهر می‌شوند، به طور قابل توجهی اکسیداسیون آن سوبسترا را به تاخیر می‌اندازند و یا مهار می‌کنند. این ترکیبات با توجه به نقشی که ایفا می‌کنند در سلامت بدن مفید هستند چرا که مانع آسیب رادیکال‌ها آزاد به مولکول‌های مهم بدن می‌شوند و می‌توانند هم در پیشگیری و هم در درمان بیماری‌های حاصل از آسیب‌های مواد اکسیدان استفاده شوند (Ratnam et al., 2006). این ترکیبات در صنایع آرایشی و غذایی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی شناخته شده مانند ویتامین‌های آسکوربیک اسید و آلفا توکوفرول هستند. در کنار آن‌ها ترکیباتی مثل لیکوپن، کوئرستین، Ellagic acid, Genistein، یوبی‌کینول، Indole-3 corbinol و EGCG5 نیز برای پیشگیری و درمان بیماری‌های خاص استفاده می‌شوند (Ratnam et al., 2006). با توجه به اهمیت ذکر شده برای آنتی‌اکسیدان‌ها و نیاز بدن به تامین آن‌ها از منابع خارجی، می‌توان به دنبال آنتی‌اکسیدان‌های جدیدی بود.

فنل‌ها آنتی‌اکسیدان‌های موثری به ویژه در برابر اسیدهای چرب غیراشباع هستند (Power et al., 2013). در موجودات دارای ترکیبات فنلی، به نظر می‌رسد این ترکیبات هستند که آن‌ها را از آسیب در مقابل اشعه UV محافظت می‌کنند و خواص پاک‌سازی رادیکال آزاد را ایجاد می‌کنند (Zubia et al., 2007). ترکیبات پلی‌فنلی به راحتی یک هیدروژن را به سیکل لیپید پروکسیل منتقل کرده، یک هیدروکسیل ایجاد می‌کنند که این هیدروکسیل به یک رادیکال دیگر می‌پیوندد و زنجیره ایجاد رادیکال‌های آزاد متوقف می‌شود (Athukorala et al., 2006). ترکیبات فنلی

شکننده اجتناب‌ناپذیر است (Paital and Chai, 2013). افزایش تقاضا برای تشخیص آنتی‌اکسیدانی طبیعی وجود دارد تا اثرات جانبی حاصل از داروهای صنعتی کاهش یابد. گزارش‌ها و پژوهش‌های انجام شده در خارپوستان Ophiuroide تمرکز بیشتری بر ریخت‌شناسی، طبقه‌بندی، بازسازی در سطح گونه و بررسی در زمینه‌های زیست‌محیطی دارند. با وجود گونه‌های متعدد از ستاره شکننده در خلیج فارس و دریای عمان، گزارشی درباره خواص زیستی آن‌ها بیان نشده است. در این راستا معرفی ستاره‌های شکننده خلیج فارس امکان استخراج آنتی‌اکسیدان‌ها و تعیین خواص زیستی و دارویی طبیعی آن‌ها را فراهم می‌آورد. از این رو تلاش برای یافتن ترکیبات با خواص طبیعی، به طور ویژه در موجودات دریایی که کمتر مورد پژوهش قرار گرفته‌اند، به عنوان منبعی از مولکول‌های ویژه، به شدت رو به افزایش است. این پژوهش نیز با هدف بررسی خواص زیستی (آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و سمیت سلولی) دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* انجام شد.

مواد و روش‌ها

در غلظت‌های بالاتر به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. توانایی و مهارکنندگی فنل‌ها به دلیل گروه‌های هیدروکسیل ($-OH$) در مولکول‌ها است. گروه‌های قابل تعویض متوکسی ($-OCH_3$) در مولکول‌ها است (Cai et al., 2006). این در حالی است که پژوهشگران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی را با میزان بالای فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره‌ها مرتبط دانستند. در بین ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری محسوب می‌شوند (Koda et al., 2008). به دلیل قطبی بودن ترکیبات فنلی، انتظار می‌رود حلالیت این ترکیبات در حلال‌های قطبی نیز بیشتر باشد (زارعی جلیانی و همکاران، ۱۳۹۶).

در حال حاضر شواهدی از حضور ترکیبات زیستی همچون ترپن‌ها، استرول‌ها و پروپانیود فنیل با اثر ضدسرطانی و ضدباکتریایی در ستاره شکننده مشاهده شده است (Ratnam et al., 2006)، اما اهمیت آن‌ها در سلامت انسان تاکنون گزارش نشده است، بنابراین غربال‌گری برای کشف متابولیت‌های ستاره

جمع‌آوری نمونه‌ها و عصاره‌گیری

نمونه‌برداری از ستاره‌های شکننده (*Ophiocoma erinaceus*) در شرایط جزر از خط ساحلی بندرلنگه در بهمن ماه ۱۳۹۳ صورت پذیرفت. حدود ۶۰ نمونه ستاره شکننده با میانگین وزنی ۱۶/۴ گرم از میان صخره‌ها و سنگ‌ها جمع‌آوری و با حفظ شرایط زیستی و به صورت زنده به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه هرمزگان منتقل شد. ستاره‌های شکننده به کمک متخصصین زیست‌شناس شناسایی شدند. پس از شستشوی نمونه‌ها با آب مقطر، برای آماده‌سازی و انجام عمل عصاره‌گیری، بخش‌های دیسک مرکزی و بازوهای ستاره شکننده به دقت بعد از بیهوشی جدا شدند. سپس برای گرفتن رطوبت اضافی، اندام‌ها در دستگاه فریزدرایر (Edwards، انگلیس) با دمای ۴۵- درجه سانتی‌گراد خشک شدند.

به منظور تهیه عصاره‌ها ۵۰ گرم از پودر خشک شده هر یک از بافت‌ها به ترتیب افزایش قطبیت به حلال‌های آن‌هگزان، اتیل‌استات و متانول اضافه شد و در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی قرار داده شدند. سپس عصاره‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و در دستگاه روتاری

(Strike102، ایتالیا) در شرایط خلا تغلیظ شدند و پس از حل شدن در دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند. بدین ترتیب، طیفی از ترکیبات با درجه قطبیت متفاوت به دست آمد.

ارزیابی قدرت احیاکنندگی

اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس احیای کلرید آهن III (سه ظرفیتی) به کلرید آهن II (دو ظرفیتی) مورد ارزیابی قرار گرفت. توانایی عصاره‌ها برای احیای آهن سه ظرفیتی طبق روش Duan و همکاران (۲۰۰۶) تعیین شد. در این روش، ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۱/۹۵، ۷/۸۱، ۳۱/۲۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به دست آمده از هر یک از حلال‌ها با ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار؛ pH ۶/۶) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم (۱ درصد، وزنی- حجمی) مخلوط شد. آنگاه مخلوط‌ها، برای ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط را برداشته، به آن ۱/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (۱۰ درصد، وزنی- حجمی) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و در نهایت ۰/۲۵

در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Vijayabaskar et al., 2012).

اندازه‌گیری محتوی کل ترکیبات فنلی

میزان کل ترکیبات فنلی طبق روش Fu و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. ابتدا غلظت‌های مختلفی از اسیدگالیک (۰/۰۰۰۳-۰/۰۲۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به عنوان استاندارد تهیه شد. ۰/۱۵ میلی‌لیتر از غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها با ۰/۷۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتو (۱ به ۱۰ رقیق شده با آب مقطر) مخلوط شد. بعد از گذشت ۳ دقیقه، ۰/۶ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات (۷/۵ درصد وزنی- حجمی) به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها پس از ورتکس ۶۰ دقیقه (برای نمونه استاندارد به دلیل بالا بودن توانایی، این زمان به ۳۰ دقیقه کاهش یافت) در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی قرار داده شدند. سپس میزان جذب نمونه‌ها را در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Fu et al., 2011).

میزان کل ترکیبات فنلی (C_p) موجود در عصاره‌ها طبق رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$C_p \text{ (mg/g)} = (C_{GA} \times V) / m$$

میلی‌لیتر کلرور فریک (۱ درصد، وزنی- حجمی) اضافه شد. بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO، آمریکا) خوانده شد. در این آزمایش از آب مقطر به عنوان بلانک و از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد (Duan et al., 2006).

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (Total Antioxidant Capacity: TAC) عصاره‌ها طبق روش Vijayabaska و همکاران (۲۰۱۲) تعیین شد. برای تهیه محلول TAC به عنوان معرف ۷/۴۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید (۰/۶ مولار)، ۰/۹۹ گرم سولفات سدیم و ۱/۲۳ گرم آمونیوم مولیبدات مخلوط و با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده (۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از محلول معرف TAC مخلوط شد. نمونه‌ها پس از ورتکس (Sigma، آمریکا) ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر

منحنی استاندارد کوئرستین به دست آمد (Soleimani et al., 2017).

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار

دیسک

در این مطالعه سوبه‌های باکتریایی استاندارد که باکتری‌های بیماری‌زای انسانی محسوب می‌شدند شامل باکتری‌های گرم مثبت (*Bacillus subtilis* ATCC 465)، (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) و باکتری گرم منفی (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 85327) و (*Serratiamarcescens* ATCC 13880)، از موسسه پاستور تهران تهیه شدند. برای تهیه کشت تازه از باکتری‌های یاد شده، یک کلنی باکتری بر روی محیط جامد مولر هینتون آگار (Merck، آلمان) منتقل شد و در ادامه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. یک لوپ از کلنی باکتری به یک میلی‌لیتر محیط نوترینت برات (Merck، آلمان) انتقال یافت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. همچنین غلظت سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک‌فارلند ($10^8 \times 1/5$) باکتری در میلی‌لیتر) تعیین شد. برای بررسی اثر

C_{GA} : غلظت معادل اسیدگالیک (mg/ml) که از منحنی استاندارد به دست می‌آید؛ V: حجم عصاره (mL)؛ m: میزان عصاره به دست آمده از یک گرم بافت (g).

اندازه‌گیری محتوی کل ترکیبات فلاونوئیدی

میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها با روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید و طبق روش Zou و همکاران (۲۰۰۴) با اندکی تغییر، اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، ابتدا غلظت‌های مختلفی از کوئرستین (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به عنوان استاندارد تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. پس از گذشت ۳ دقیقه، ۰/۱۵ میلی‌لیتر سدیم نیتريت ۵ درصد (وزنی-حجمی) و ۰/۱۵ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد (وزنی-حجمی) به آن‌ها اضافه شد. بعد از ۶ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۴ درصد (وزنی-حجمی) به مخلوط واکنش اضافه و سپس حجم آن را با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. آنگاه مخلوط ورتکس شد و ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید نمونه‌ها با استفاده از

برای کشت سیست *Artemia salina* در محیط حاوی آب دریا و تفریح و تبدیل شدن به لارو فعال، یک گرم از سیست خشک آرتیمیا ابتدا به مدت یک ساعت در ۳۰ میلی‌لیتر آب لوله‌کشی هیدراته شد. سیست‌های آرتیمیا سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک از آب جدا شده، به ظرف استوانه‌ای شکل شیشه‌ای حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب با شوری ۳۵ppm و دمای 1 ± 30 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و به مدت حداقل ۲۴ ساعت در محیط آب دریا با هوادهی و نوردهی (لامپ فلورسنت ۴۰ وات) قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، ناپلئوس‌ها از سیست‌ها خارج شدند و با توجه به نورگرایی مثبت آن‌ها، در بالا و گوشه‌ای از ظرف استوانه‌ای شکل تجمع یافتند.

بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر روی لارو *A. salina* طبق روش Ferreira و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی تغییر انجام شد. به این ترتیب که در یک میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای، در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دیسک مرکزی و بازوهای ستاره شکننده ریخته شد. همچنین به علت سمی بودن، DMSO به عنوان شاهد در چاهکی جداگانه به همان میزان (۱۰۰

ضدباکتریایی در روش انتشار دیسک، محلول حاوی سوسپانسیون میکروبی بر روی پلیت‌های مولر هینتون آگار با سوپ استریل شده در کنار شعله به صورت یکنواخت کشت داده شد. دیسک‌های آماده استریل (پادتن طب، ایران) توسط پنس استریل شده روی محیط کشت باکتریایی قرار داده شدند. ۲۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (وزنی-حجمی) با سه بار تکرار به دقت به دیسک‌های بلانک (با قطر ۶ میلی‌متر) تزریق شد. در ادامه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و با کمک خط کش Hi Antibiotic Zone Scale قطر هاله ممانعتی رشد در باکتری‌های مختلف بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است به منظور کنترل نتایج آزمون انتشار دیسک و مقایسه نتایج آن‌ها از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. دیسک‌هایی نیز به DMSO خالص به عنوان شاهد آغشته شد (آرمان و همکاران، ۱۳۹۴).

ارزیابی فعالیت سمیت سلولی با استفاده از لارو میگوی آب شور *Artemia salina*

جدول ۱ مقایسه توانایی احیاکنندگی یون آهن کلرید را توسط عصاره‌های بخش‌های مختلف دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* در غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد.

از مشاهده جدول ۱ می‌توان نتیجه گرفت که از بین عصاره بخش‌های مختلف ستاره شکننده، عصاره متانولی دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده دارای بیشترین قدرت احیاکنندگی بود. همان طور که از شکل ۱ برمی‌آید، بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی در برابر آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد در عصاره متانولی دیسک مرکزی در غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. این در حالی است که غلظت ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر همین عصاره و غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بازوی متانولی نیز میزان قابل توجهی قدرت احیاکنندگی از خود نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد.

کمترین میزان قدرت احیاکنندگی در عصاره متانولی بازوی ستاره شکننده با غلظت ۷/۸۱ و ۱/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملاحظه شد. به طور کلی در این مطالعه، اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌های متانولی دیسک

میکرولیتر) ریخته شد. در نهایت حجم هر چاهک به کمک آب دریا محتوی لارو تازه تفریخ شده آرتمیا به یک میلی‌لیتر رسانده شد. از هر کدام از غلظت‌ها حداقل سه تکرار در نظر گرفته شد. میزان اثر سمیت، با شمارش لاروهای زنده در هر غلظت و در شاهد، سنجیده شد. میزان درصد سمیت عصاره‌ها (CT) از رابطه ۲ محاسبه شد (Ferreira et al., 2007).

رابطه ۲:

$$CT(\%) = [(L_C - L_T) / L_C] \times 100$$

L_C : تعداد لارو زنده در شاهد؛ L_T : تعداد لارو زنده در تیمار.

آزمون‌های آماری

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 استفاده شد. نتایج نیز به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند.

نتایج

ارزیابی قدرت احیاکنندگی

مرکزی و بازو در غلظت‌های مختلف عصاره
ملاحظه شد ($P \leq 0/05$).

غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. نتایج به
دست آمده از مقایسه قوی‌ترین ظرفیت
آنتی‌اکسیدانی حلال‌های آلی دیسک مرکزی و
بازوی ستاره شکننده در حضور غلظت‌های
مختلف در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

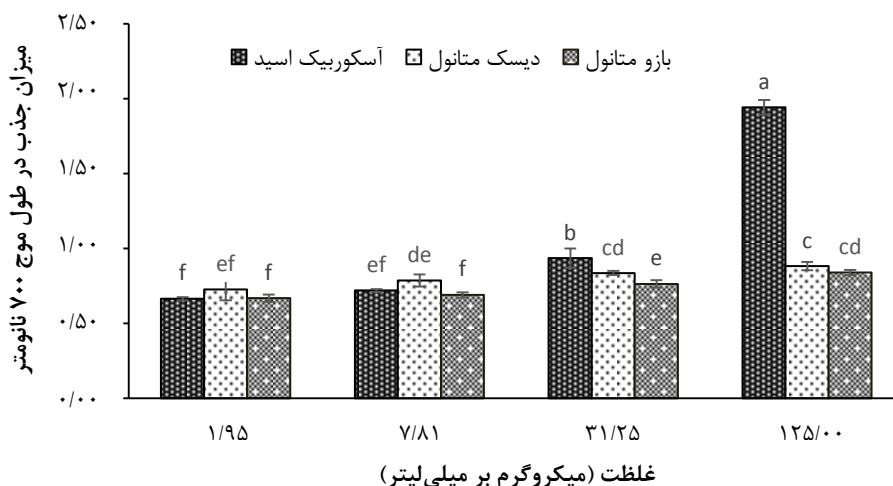
ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

جدول ۲ مقایسه توانایی ظرفیت
آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های بخش‌های مختلف
دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده در

جدول ۱: توانایی احیاکنندگی یون آهن کلرید توسط بخش‌های مختلف ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* (میانگین \pm انحراف معیار)

تیما	غلظت عصاره ($\mu\text{g/mL}$)	۱۲۵	۳۱/۲۵	۷/۸۱	۱/۹۵
شاهد آسکوربیک اسید		۱/۹۴۲ \pm ۰/۰۴۹ ^a	۰/۹۳۶ \pm ۰/۰۶۴ ^b	۰/۷۲۰ \pm ۰/۰۰۹ ^{ghi}	۰/۶۶۵ \pm ۰/۰۱۱ ^{ij}
دیسک ان‌هگزان		۰/۸۱۳ \pm ۰/۰۱۲ ^{de}	۰/۷۶۱ \pm ۰/۰۲۴ ^{efg}	۰/۷۲۶ \pm ۰/۰۲۸ ^{fgh}	۰/۶۵۳ \pm ۰/۰۱۶ ^j
اتیل‌استات		۰/۷۴۱ \pm ۰/۰۱۳ ^{fgh}	۰/۷۳۰ \pm ۰/۰۲۵ ^{fgh}	۰/۷۲۹ \pm ۰/۰۰۶ ^{fgh}	۰/۶۸۶ \pm ۰/۰۱۳ ^{hij}
متانول		۰/۸۸۲ \pm ۰/۰۲۷ ^{bc}	۰/۸۳۶ \pm ۰/۰۱۳ ^{cd}	۰/۸۱۰ \pm ۰/۰۳۲ ^{def}	۰/۸۱۳ \pm ۰/۰۴۱ ^{fgh}
شاهد آسکوربیک اسید		۱/۹۴۲ \pm ۰/۰۴۹ ^a	۰/۹۳۶ \pm ۰/۰۶۴ ^b	۰/۷۲۰ \pm ۰/۰۰۹ ^{def}	۰/۶۶۵ \pm ۰/۰۱۱ ^{gh}
بازو ان‌هگزان		۰/۷۱۶ \pm ۰/۰۰۴ ^{efgh}	۰/۷۱۳ \pm ۰/۰۰۳ ^{defg}	۰/۶۸۴ \pm ۰/۰۳۳ ^{efgh}	۰/۶۹۲ \pm ۰/۰۱۹ ^{efgh}
اتیل‌استات		۰/۷۲۹ \pm ۰/۰۱۰ ^{de}	۰/۷۱۰ \pm ۰/۰۱۶ ^{efgh}	۰/۶۸۱ \pm ۰/۰۰۶ ^{efgh}	۰/۶۵۸ \pm ۰/۰۳۷ ^h
متانول		۰/۸۵۴ \pm ۰/۰۱۰ ^c	۰/۷۶۴ \pm ۰/۰۲۴ ^d	۰/۶۹۱ \pm ۰/۰۱۷ ^{efgh}	۰/۶۶۸ \pm ۰/۰۲۵ ^{fgh}

حروف غیرمشابه در هر بافت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

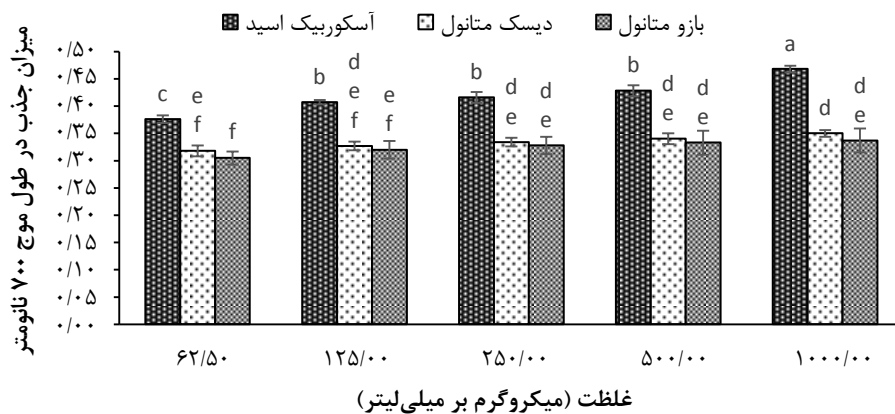


شکل ۱: مقایسه قدرت احیاکنندگی حلال‌های آلی متانولی دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* در مقایسه با آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف (میانگین \pm انحراف معیار). حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

جدول ۲: میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های بخش‌های مختلف ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* (میانگین \pm انحراف معیار)

تیماز	غلظت عصاره ($\mu\text{g/mL}$)	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵
شاهد	آسکوربیک اسید	0.468 ± 0.06^a	0.428 ± 0.10^b	0.416 ± 0.15^{bc}	0.407 ± 0.04^c	0.376 ± 0.07^d
دیسک	ان‌هگزان	0.325 ± 0.07^{fgh}	0.321 ± 0.04^{gh}	0.320 ± 0.06^{gh}	0.313 ± 0.10^{hi}	0.301 ± 0.09^i
	اتیل‌استات	0.278 ± 0.11^j	0.242 ± 0.12^k	0.218 ± 0.08^l	0.187 ± 0.10^m	0.154 ± 0.04^n
	متانول	0.350 ± 0.06^e	0.340 ± 0.10^{ef}	0.334 ± 0.08^{efg}	0.327 ± 0.08^{fgh}	0.318 ± 0.10^{gh}
شاهد	آسکوربیک اسید	0.468 ± 0.06^a	0.428 ± 0.10^b	0.416 ± 0.15^b	0.407 ± 0.04^b	0.376 ± 0.07^c
بازو	ان‌هگزان	0.327 ± 0.07^{def}	0.320 ± 0.05^{def}	0.318 ± 0.06^{defg}	0.311 ± 0.10^{efgh}	0.296 ± 0.13^{gh}
	اتیل‌استات	0.327 ± 0.07^{def}	0.322 ± 0.04^{def}	0.317 ± 0.08^{defg}	0.307 ± 0.14^{fgh}	0.293 ± 0.16^h
	متانول	0.337 ± 0.022^d	0.333 ± 0.022^{de}	0.328 ± 0.16^{def}	0.320 ± 0.16^{def}	0.305 ± 0.12^{fgh}

حروف غیرمشابه در هر بافت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).



شکل ۲: مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حلال‌های آلی متانولی، دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* در مقایسه با آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف (میانگین \pm انحراف معیار). حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

متانولی دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده تاثیر معنی‌داری بر خاصیت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی داشتند ($P \leq 0.05$).

اندازه‌گیری محتوی کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

محتوای فنلی کل و فلاونوئیدی در بخش‌های مختلف ستاره شکننده در غلظت‌های مختلف در جدول ۳ قابل ملاحظه است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین ترکیبات فنلی مربوط به عصاره متانولی بازوی ستاره شکننده و کمترین آن مربوط به عصاره متانولی دیسک مرکزی بود. بیشترین میزان محتوی فلاونوئیدی در عصاره اتیل‌استاتی بازوی ستاره شکننده و کمترین میزان آن در عصاره اتیل‌استاتی دیسک مرکزی بود.

بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اشاره شده، در عصاره متانولی دیسک مرکزی در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. این در حالی است که غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر همین عصاره نیز میزان قابل توجهی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی داشت، علاوه بر آن غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی دیسک مرکزی به میزان چشمگیری دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود. نتایج اختلاف معنی‌داری را بین غلظت‌های مختلف نشان نداد. همان‌طور که از نمودار شکل ۲ برمی‌آید، غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره اتیل‌استاتی دیسک مرکزی پایین‌ترین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که عصاره‌های

جدول ۳: میزان کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌های بخش‌های مختلف ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* (میانگین \pm انحراف معیار)

حلال	اندام	فنل (میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره)	فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره)
متانول	دیسک	0.008 ± 0.0004^b	-
	بازو	0.037 ± 0.0020^a	-
اتیل‌استات	دیسک	-	0.00 ± 0.0000^b
	بازو	-	0.500 ± 0.0710^a

حروف غیرمشابه در هر حلال بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی
 نتایج به دست آمده از بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف استخراجی، با استفاده از حلال‌های آلی ان‌هگزان، اتیل‌استات و متانولی از بخش‌های مختلف دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده با استفاده از آزمون انتشار دیسک در جدول ۴ آمده است. همان طور که از جدول ۴ برمی‌آید عصاره متانولی دیسک مرکزی استخراج شده از ستاره شکننده، بیشترین اثر ضدباکتریایی را بر

باکتری گرم منفی *Serratia marcescens*
 نسبت به سایر عصاره‌ها نشان داد. همچنین این عصاره اثر ضدباکتریایی بیشتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین دارا بود. عصاره اتیل‌استاتی بازوی ستاره شکننده اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* از خود نشان داد. اثر عصاره‌های بخش‌های مختلف بر باکتری *P. aeruginosa* اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۴: اثر ضدباکتریایی حلال‌های آلی بخش‌های مختلف ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* (میانگین \pm انحراف معیار)

قطر هاله عدم رشد باکتری (میلی‌متر)*				تیما
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	
۱۰±۰/۰۵ ^b	۱۰±۰/۰۶ ^{ab}	۱۳±۰/۰۴ ^a	۱۴±۰/۰۴ ^a	شاهد آمپی‌سیلین**
۷±۰/۰۳ ^d	۹±۰/۱۰ ^{ab}	۱۰±۰/۰۵ ^b	۸±۰/۰۳ ^c	دیسک ان‌هگزان
۸±۰/۱۰ ^c	۸±۰/۰۵ ^b	۶±۰/۰۶ ^e	۶±۰/۰۵ ^e	اتیل‌استات
۱۱±۰/۱۰ ^a	۹±۰/۱۰ ^{ab}	۱۰±۰/۱۰ ^b	۷±۰/۰۵ ^{cd}	متانول
۷±۰/۰۳ ^d	۹/۵±۰/۰۵ ^{ab}	۹±۰/۰۵ ^{bc}	۶±۰/۰۵ ^e	بازو ان‌هگزان
۷/۵±۰/۰۵ ^c	۱۰±۰/۰۵ ^a	۱۰±۰/۰۵ ^b	۷±۰/۰۳ ^d	اتیل‌استات
۷±۰/۰۳ ^d	۹±۰/۰۵ ^{ab}	۸±۰/۰۳ ^d	۶±۰/۰۵ ^e	متانول

* قطر هاله عدم رشد قطر دیسک (۶ میلی‌متر) را نیز شامل می‌شود.

** آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰ میکروگرم به ازای هر دیسک مورد استفاده قرار گرفت.

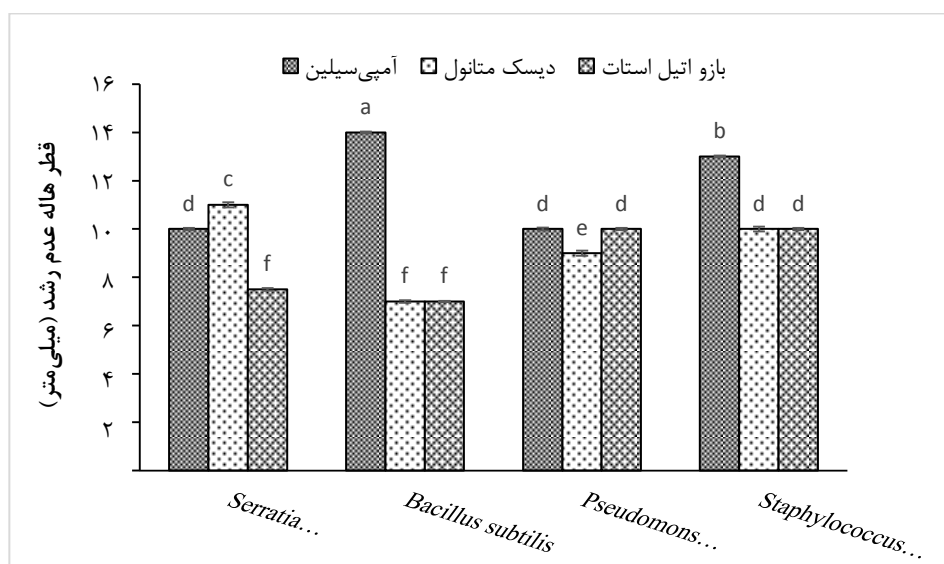
حروف غیرمشابه در هر بافت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

این در حالی است که عصاره اتیل‌استاتی بازوی ستاره شکننده در مقابل باکتری گرم منفی *S. marcescens* کمترین میزان قطر هاله عدم رشد باکتری را داشت.

ارزیابی سمیت سلولی

جدول ۵ درصد مرگ و میر ناپلئوس آرتمیا (*Artemia salina*) را در غلظت‌های مختلف عصاره‌های استخراجی آن‌هگزان، اتیل‌استات و متانول بازو و دیسک مرکزی ستاره شکننده نشان می‌دهد.

نتایج به دست آمده از مقایسه قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط حلال‌های آلی دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده در حضور باکتری‌های مختلف در شکل ۳ مشاهده می‌شود. بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری در عصاره متانولی دیسک مرکزی در باکتری گرم منفی *Serratia marcescens* مشاهده شد. عصاره‌های متانولی دیسک مرکزی و اتیل‌استاتی بازوی ستاره شکننده دارای کمترین قطر هاله عدم رشد باکتری در مقابل باکتری گرم مثبت *Bacillus subtilis* بودند.



شکل ۳: مقایسه قطر هاله عدم رشد حلال‌های آلی متانولی دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده در مقایسه با آمی سیلین به عنوان استاندارد (میانگین \pm انحراف معیار). حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

جدول ۵: تعیین سمیت سلولی *Artemia salina* در غلظت‌های مختلف عصاره‌های استخراجی از ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* (میانگین \pm انحراف معیار)

تیماژ	غلظت عصاره ($\mu\text{g/mL}$)			
	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
دیسک ان‌هگزان	$0.0 \pm 1/93^f$	$0.0 \pm 1/32^f$	$0.0 \pm 2/53^f$	$0.0 \pm 2/70.9^f$
اتیل‌استات	$88/47 \pm 2/49^c$	$96/58 \pm 0/49^b$	$100/00 \pm 0/00^a$	$100/00 \pm 0/00^a$
متانول	$59/26 \pm 2/18^e$	$71/09 \pm 1/88^d$	$96/47 \pm 1/97^a$	$97/83 \pm 1/35^a$
بازو ان‌هگزان	$0.0 \pm 2/47^c$	$0.0 \pm 2/99^c$	$0.0 \pm 2/71^c$	$0.0 \pm 1/83^c$
اتیل‌استات	$0.0 \pm 2/83^c$	$0.0 \pm 1/73^c$	$0.0 \pm 2/81^c$	$0.0 \pm 2/73^c$
متانول	$91/18 \pm 2/37^b$	$100/00 \pm 0/00^a$	$100/00 \pm 0/00^a$	$100/00 \pm 0/00^a$

حروف غیرمشابه در هر بافت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

نشان نداد. همان طور که در جدول مشخص است، عصاره متانولی بازوی ستاره شکننده با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین میزان کشندگی را نشان داد. عصاره‌های ان‌هگزان و اتیل‌استات بازوی ستاره شکننده کمترین میزان کشندگی را نشان دادند.

بحث

توجه به مطالعات فعالیت زیستی، تولیدات طبیعی و بررسی پتانسیل خواص دارویی زمینهای را برای تولید دارو از منابع دریایی فراهم می‌کند. از این رو، در سال‌های اخیر این موضوع مورد توجه بسیاری از پژوهشگران در زمینه شیمی بوده است. ترکیبات ثانویه تولید شده از ارگانسیم‌های دریایی می‌توانند به عنوان

همان طور که در جدول ۵ ملاحظه می‌شود، عصاره اتیل‌استاتی دیسک مرکزی بالاترین میزان کشندگی را در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. علاوه بر این در عصاره متانولی دیسک مرکزی با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز میزان بالایی از کشندگی مشاهده شد. عصاره اتیل‌استاتی دیسک مرکزی بالاترین میزان کشندگی را در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. علاوه بر این در عصاره متانولی دیسک مرکزی با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز میزان بالایی از کشندگی مشاهده شد. عصاره ان‌هگزانی دیسک مرکزی با غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی از خود

منبع مواد زیست‌فعال عمل کنند و در مدل‌سازی ساختار داروها مورد استفاده قرار گیرند (Bhosale et al., 1999). مطالعه در مورد سنجش اثر آنتی‌اکسیدانی در موجودات مختلف دریایی از جمله خارپوستان با وجود این که تنها چند دهه از پژوهش و بررسی در این زمینه می‌گذرد، به علت ویژگی‌های زیستی و نیاز بشر به منظور دسترسی به منابع دارویی و پزشکی نوین به صورت بی‌سابقه‌ای توسط پژوهشگران رو به افزایش است. مطالعات نشان داده‌اند خارپوستان در مقایسه با دیگر موجودات دریایی از جمله اسفنجیان، مرجان‌ها، بربوزوا، نرم‌تنان و کرم‌های حلقوی دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی است (Zhang, 1990). نتایج مطالعه حاضر نشان داد تمامی عصاره‌های آن‌هگزان، اتیل‌استات و متانولی دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده *Ophiocoma erinaceus* دارای توان آنتی‌اکسیدانی ولی با درجات متفاوت بودند. آنتی‌اکسیدان‌ها قادر هستند با رادیکال‌های آزاد وارد واکنش شوند و این ترکیبات خطرناک را به مولکول‌های بی‌ضرر تبدیل کنند (Wang et al., 2004). در شرایط عادی، انواع واکنش دهنده‌های اکسیژن (ROS) و رادیکال‌های آزاد به خوبی توسط سیستم‌های دفاعی

آنتی‌اکسیدانتی مانند آنزیم‌های ضداکسایشی و عوامل غیرآنزیمی حذف می‌شوند، ولی در شرایط پاتولوژیکی، توازن بین تولید و حذف ROS از بین می‌رود. در نتیجه ماکرومولکول‌های زیستی مانند DNA، لیپیدهای غشایی و پروتئین‌ها توسط استرس اکسایشی واسطه‌های ROS صدمه می‌بینند. بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی در توتیای دریایی *Echinometra mathaei* که از خارپوستان خلیج فارس است در سلول‌های آزاد مایع سلومی گزارش شد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۴ الف). این در حالی است که بیشترین توانایی احیاکنندگی در مطالعه حاضر در عصاره‌های متانولی استخراجی مشاهده شد. نتایج مطالعات Fu و همکاران (۲۰۱۱) و Ferreira و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که عصاره‌های مورد آزمایش به عنوان عاملی احیاکننده، توانستند Fe^{3+} را به Fe^{2+} تبدیل کنند. همچنین آن‌ها بیان کردند که میزان قدرت احیاکنندگی با افزایش غلظت رابطه مستقیم دارد (Ferreira et al., 2007; Fu et al., 2011). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نیز تمام نتایج گزارش‌های پیشین را تایید کرد. همچنین Ferreira و همکاران (۲۰۰۷) و Fu و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند

ستاره شکننده *O. erinaceus* خاصیت ضدباکتریایی داشتند. سلیمانی و همکاران (۱۳۹۴ب) در پژوهشی که بر توتیای دریایی *E. mathaei* انجام دادند، بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را به سلوموسیت لیزات نسبت دادند. خواص ضدباکتریایی عصاره خارپوستان به طور عمده بر اجزای گلیکوزیدی و ساپونین و بخش قطبی تمرکز دارد. مطالعات Ivanchina و همکاران (۲۰۱۱)، Avilov و همکاران (۲۰۰۷)، Maier و همکاران (۲۰۰۱) نیز همین نتایج را نشان داد. در مطالعات انجام شده بر ستاره شکننده *O. marmorata*، عصاره اتانولی آن بیشترین هاله مهار رشد را در برابر *Staphylococcus aureus* نشان داد (Bragadeeswaran et al., 2013). اما در پژوهش حاضر، عصاره متانولی دیسک مرکزی بیشترین هاله مهار رشد را در باکتری *Serratiamarcescens* نشان داد.

در مطالعه حاضر مشخص شد که عصاره ان‌هگزانی (غیرقطبی) خاصیت ضدباکتریایی قابل توجهی داشت، اما در مطالعات Uma و Parvathavarthini (۲۰۱۰) عصاره هیدروالکی (قطبی) توتیای دریایی *Temnopleurus alexandri* دارای خاصیت ضدباکتریایی قابل توجهی بود و آنالیز شیمیایی

که با افزایش غلظت، میزان قدرت احیاکنندگی نیز افزایش می‌یابد. بنابراین، می‌توان قدرت احیاکنندگی را به ترکیبات زیستی شرکت کننده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی نسبت داد (Ghorbel-Bellaaj et al., 2012). وجود گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت‌های ۵ و ۸ و گروه‌های اورتودی فنل در ساختار فلاونوئیدها، به آن‌ها امکان مهار رادیکال‌های آزاد را می‌دهد. افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل، با قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارد (Manach et al., 2004).

توسعه ایمن و موثر داروهای ضد میکروبی از ۷۰ سال پیش تاکنون رواج یافته است (Franklin and Snow, 2005). اگرچه استفاده همه‌گیر از آنتی‌بیوتیک‌ها احتمال مقاومت عوامل بیماری‌زا را در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش داده است (Normark and Normark, 2002). توسعه و رواج استفاده از داروهای مقاوم در مقابل عوامل بیماری‌زای انسانی، اهمیت پژوهش و بررسی در زمینه تولید داروهای ضد میکروبی جدید را از سایر منابع شامل منابع طبیعی از هر منبعی و یا منابع دریایی بیش از پیش نمایان می‌کند (Blunt et al., 2008). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیسک مرکزی و بازوهای

بر اساس مطالعات منتشر شده کمتر در آب‌هایی با شوری زیر ۴۵ درصد یافت می‌شود. با توجه به موقعیت آرتمیا در زنجیره غذایی و همچنین شباهت‌هایی مانند RNA پلیمراز وابسته به DNA، پمپ سدیم-پتاسیم و غیره، به پستانداران بسیار نزدیک است (Gorospe, 1996). از این رو، از آرتمیا در آزمون‌های سمیت سلولی (Cytotoxicity) استفاده می‌شود. آزمون‌های سمیت سلولی به دلیل سرعت بخشیدن به روال پژوهش و صرف هزینه‌های کمتر برای جستجوی ترکیبات سیتوتوکسیک به کار گرفته می‌شوند. یکی از معتبرترین این آزمون‌ها، آزمون سمیت میگوی آب شور یا سمیت لارو میگوی آب شور است که توسط انستیتو ملی سرطان در آمریکا ارائه شده است. در مطالعه حاضر، برای این آزمون از لارو میگوی آب شور استفاده می‌شود (علیشاهی و حیدری، ۱۳۹۰). این گونه می‌تواند به عنوان مدل مناسب برای استانداردسازی آزمون‌های سمیت بر روی ارگانیسم‌های دریایی استفاده شود (Vanhaecke et al., 1981). این احتمال وجود دارد که عصاره‌های به کار رفته در پژوهش حاضر به دلیل پتانسیل بالا برای مهار رادیکال آزاد، می‌توانند با خنثی کردن اثر

حضور استرول‌ها را تایید کرد (Uma and Parvathavarthini, 2010). این احتمال وجود دارد که در ستاره شکننده نیز استرول‌ها نقش تعیین کننده‌ای در خاصیت ضدباکتریایی داشته باشند. فعالیت ضدباکتری تشخیص داده شده ممکن است به دلیل مکانیسم ایمنی ذاتی باشد. همچنین ممکن است به علت همزیستی باکتریایی در موجود زنده بوده باشد (Strahl et al., 2002). علاوه بر آن ممکن است فعالیت ضدباکتریایی با رژیم غذایی در ارتباط باشد (Haug et al., 2002). از عوامل موثر در فعالیت‌های ضد میکروبی در موجودات دریایی علاوه بر مکانیسم ایمنی ذاتی و همزیستی باکتریایی، لیزوزوم‌ها نیز ممکن است نقش مهمی را در مکانیسم دفاعی در خارپوستان ایفا کنند. فعالیت بالای شبه لیزوزومی در عصاره طبیعی مایع سلومی با داشتن خاصیت ضدباکتریایی در چندین گونه از خارپوستان گزارش شده است (Canicatti and Roch, 1989; Stabili and Pagliara, 1994; Stabili et al., 1996; Strahl et al., 2002).

آرتمیا (میگوی آب شور) یک ارگانیسم دریایی نیست، بلکه گونه‌ای یوری هالین است و

بسیاری از موجودات دریایی سرشار از ترکیبات سودمندی از جمله ترکیبات ضدتومور و آنتی‌اکسیدان هستند و بدین ترتیب گونه‌های جدیدی به فهرست منابع زیست‌فناوری دریایی افزوده می‌شود. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان می‌دهد دیسک مرکزی و بازوی ستاره شکننده *O. erinaceus* دارای پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضدباکتریایی و همچنین توانایی خنثی‌سازی اثر سمیت سلولی هستند. این ترکیبات منابع امیدوار کننده‌ای از مواد زیست‌فعال هستند و نظر به اهمیت بحث سلامت و برخی مضرات آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی موجود، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در زمینه استخراج، خالص‌سازی و کاربرد عصاره‌های ستاره شکننده برای تهیه فرآورده‌های زیست‌فناوری دریایی برای ساخت ترکیبات دارویی و پزشکی انجام گیرد.

سمیت رابطه مستقیم داشته باشند. نتیجه این مطالعه مستلزم جستجوی ترکیبات فعال زیستی و غربالگری میکروبی‌های بیماری‌زا از منابع مختلف است. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بی‌مهرگان دریایی دارای خواص ضد میکروبی و سیتوتوکسیک در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و میگوی آب شور *A. salina* است. مطالعات نشان داده است که بسیاری از این موجودات دریایی متابولیت‌های ثانویه متفاوتی را تولید می‌کنند که می‌تواند مورد توجه صنعت داروسازی باشد (Prabhu and Bragadeeswaran, 2013).

مطالعات و پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه اکتشاف داروها از محیط‌های دریایی صورت گرفته است. تا پیش از این گیاهان تنها منابع شناخته شده آنتی‌اکسیدانی بودند، اما در سال‌های اخیر مطالعات نشان داده‌اند که

منابع

- آرمان م.، سلیمانی س.، زارعی ز.، سهرابی پور ج. و اسدزاده م. ۱۳۹۴. ارزیابی اثرات ضدباکتریایی برخی از ماکرو جلبک‌های دریایی علیه پاتوژن‌های انسانی. بوم‌شناسی آبزیان، ۱۳۹-۱۴۴: (۲)۵.
- زارعی جلیانی ز.، مشجور س.، سلیمانی س.، پیریان ک.، صداقت ف. و یوسفزادی م. ۱۳۹۶. فعالیت ضداکسیدانی و سمیت سلولی عصاره‌های آلی حاصل از سه گونه ماکرو جلبک سبز از خانواده Ulvaceae از خلیج فارس. زیست‌فناوری تربیت مدرس، ۹(۱): ۶۷-۵۹.
- سلیمانی س.، یوسفزادی م.، معین س. و امراللهی بیوکی ن. ۱۳۹۴ الف. بررسی اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی رنگدانه و مایع سلومیک توتیای دریایی گونه خلیج
- فارس. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۲۲(۶): ۶۲۸-۶۱۴.
- سلیمانی س.، یوسفزادی م.، معین س.، امراللهی بیوکی ن.، کشاورز م. و اصلیان ح. ۱۳۹۴ ب. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوی پلی‌فنلی توتیای دریایی خلیج فارس. مجله زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس، ۶(۲): ۲۳-۱۷.
- علیشاهی م. و حیدری ب. ۱۳۹۰. بررسی سمیت نانوذرات نقره در ناپلی آرتمیای دریاچه ارومیه. مجله پژوهش‌های نوین دامپزشکی، ۸(۲): ۴۹-۵۴.
- نبی پور آ. ۱۳۸۷. پزشکی دریایی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بوشهر. ۱۱۳ ص.
- Abubakar L.A., Mwangi C.M., Uku J.U. and Ndirangu S.N. 2012.** Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). African Journal of Pharmacology and Therapeutics, 1(1): 124-131.
- Athukorala Y., Kim K.N. and Jeon Y.J. 2006.** Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. Food and Chemical Toxicology, 44(7): 1065-1074.
- Avilov S.A., Kalinin V.I., Silchenko A.S., Aminin D.L., Agafonova I.G., Stonik V.A., Collin P.D. and Woodward C. 2007.** Process for isolating sea cucumber saponin Frondoside A, and immunomodulatory methods of use. United States Patent, No.: US 163, 702 B1. 18P.
- Bhosale S., Jagtap T. and Naik C. 1999.** Antifungal activity of some marine organisms from India, against food spoilage *Aspergillus* strains. Mycopathologia, 147(3): 133-138.
- Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H., Northcote P.T. and Prinsep M.R. 2008.** Marine

- natural products. *Natural Product Reports*, 25(1): 35–94.
- Bragadeeswaran S., Sri Kumaran N., Prasath Sankar P. and Prabahar R. 2013.** Bioactive potential of sea urchin *Temnopleurus toreumaticus* from Devanampattinam, Southeast coast of India. *Journal of Pharmacy and Alternative Medicine*, 2(3): 9–18.
- Cai Y.Z., Sun M., Xing J., Luo Q. and Corke H. 2006.** Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25): 2872–2888.
- Canicatti C. and Roch P. 1989.** Studies on *Holothuria polii* (Echinodermata) antibacterial proteins. I. Evidence for and activity of a coelomocyte lysozyme. *Experientia*, 45(8): 756–759.
- Duan X.J., Zhang W.W., Li X.M. and Wang B.G. 2006.** Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95(1): 37–43.
- Ferreira I.C., Baptista P., Vilas-Boas M. and Barros L. 2007.** Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100(4): 1511–1516.
- Franklin T.J. and Snow G.A. 2005.** *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action*. Springer US. 182P.
- Fu L., Xu B.T., Xu X.R., Gan R.Y., Zhang Y., Xia E.Q. and Li H.B. 2011.** Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129(2): 345–350.
- Ghorbel-Bellaaj O., Younes I., Maalej H., Hajji S. and Nasri M. 2012.** Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5): 1196–1201.
- Gomes A.R., Freitas A.C., Rocha-Santos T.A. and Duarte A.C. 2014.** Bioactive compounds derived from echinoderms. *RSC Advances*, 4(56): 29365–29382.
- Gorospe J. 1996.** Associated bacterial microflora in Artemia-rice bran culture. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 48(2): 99–107.
- Haug T., Kjuul A.K., Styrvold O.B., Sandsdalen E., Olsen O.M. and Stensvag K. 2002.** Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(2): 94–102.
- Ivanchina N.V., Kicha A.A. and Stonik V.A. 2011.** *Steroid*

- glycosides from marine organisms. *Steroids*, 76(5): 425–454.
- Koda T., Kuroda Y. and Imai H. 2008.** Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. *Nutrition Research*, 28(9): 629–634.
- Maier M.S., Roccatagliata A.J., Kuriss A., Chludil H., Seldes A.M., Pujol C.A. and Damonte E.B. 2001.** Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*. *Journal of Natural Products*, 64(6): 732–736.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L. 2004.** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5): 727–747.
- Murray R.K. 2009.** Harper's Illustrated Biochemistry. McGraw-Hill, USA. 693P.
- Normark B.H. and Normark S. 2002.** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*. 252(2): 91–106.
- Paital B. and Chainy G. 2013.** Seasonal variability of antioxidant biomarkers in mud crabs (*Scylla serrata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87(2): 33–41.
- Power O., Jakeman P. and FitzGerald R. 2013.** Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3): 797–820.
- Prabhu K. and Bragadeeswaran S. 2013.** Biological properties of brittle star *Ophiocnemis marmorata* collected from Parangipettai, Southeast coast of India. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 5(10): 110–118.
- Ratnam D.V., Ankola D., Bhardwaj V., Sahana D.K. and Kumar M.R. 2006.** Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 113(3): 189–207.
- Soleimani S., Moein S., Yousefzadi M. and Bioki N.A. 2017.** Determination of in vitro antioxidant properties, anti-inflammatory effects and A-amylase inhibition of purple sea urchin extract of *Echinometra mathaei* from the Persian Gulf. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12(3): 1–7 (e36547).
- Stabili L. and Pagliara P. 1994.** Antibacterial protection in *Marthasterias glacialis* eggs: Characterization of lysozyme-like activity. *Comparative Biochemistry*

- and Physiology (B), 109(4): 709–713.
- Stabili L., Pagliara P. and Roch P. 1996.** Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part (B), 113(3): 639–644.
- Strahl E., Dobson W. and Lundie Jr L. 2002.** Isolation and screening of brittlestar-associated bacteria for antibacterial activity. Current Microbiology, 44(6): 450–459.
- Uma B. and Parvathavarthini R. 2010.** Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin, *Temnopleurus alexandri* (Bell, 1884). International Journal of PharmTech Research, 2(3): 1677–1680.
- Vanhaecke P., Persoone G., Claus C. and Sorgeloos P. 1981.** Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. Ecotoxicology and Environmental Safety, 5(3): 382–387.
- Vijayabaskar P., Vaseela N. and Thirumaran G. 2012.** Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. Chinese Journal of Natural Medicines, 10(6): 421–428.
- Wang W.H., Hong J.K., Lee C.O., Cho H.Y., Shin S. and Jung J.H. 2004.** Bioactive metabolites from the brittle star *Ophioplocus japonicus*. Natural Product Sciences, 10(6): 253–261.
- Zhang E. 1990.** Chinese Medicated Diet. Publishing House of Shanghai College of Traditional Chinese Medicine, China. 753P.
- Zhou D.Y., Qin L., Zhu B.W., Wang X.D., Tan H., Yang J.F., Li D.M., Dong X.P., Wu H.T. and Sun L.M. 2011.** Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. Food Chemistry, 129(4): 1591–1597.
- Zou Y., Lu Y. and Wei D. 2004.** Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(16): 5032–5039.
- Zubia M., Robledo D. and Freile-Pelegrin Y. 2007.** Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. Journal of Applied Phycology, 19(5): 449–458.



Research Paper

Antioxidant, antibacterial and cytotoxic characteristics of disk and arms of brittle star *Ophiocoma erinaceus* from the Persian Gulf

Tayebeh Nami¹, Soolmaz Soleimani², Narges Amrollahi Biuki^{3*}, Morteza Yousefzadi⁴,
Musa Keshavarz³

Received: October 2018

Accepted: January 2019

Abstract

Biological and natural products have been considered as the most important source of medicines from ancient times. The aim of this study was to evaluate the antioxidant, antibacterial and cytotoxicity properties of brittle star *Ophiocoma erinaceus*. Extracts of brittle star central disk and arms were separated by using three solvent types, n-hexane, ethyl acetate, and methanol. The antioxidant activity of each of the extracts was assessed via measuring of reducing power and total antioxidant capacity. Total phenolic and flavonoid contents were also measured spectrophotometrically. The antibacterial effect against three strains of Gram-positive and one Gram-negative bacteria were also investigated. Cytotoxicity test was carried out using the *Artemia* larvae. Methanolic extracts were found to have the highest antioxidant activity via both methods, and ethyl acetate extract of arms and methanolic extract of the central disk showed the highest antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*, respectively ($P < 0.05$). The highest toxicity level was also observed for extracts of 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ concentration respectively. The findings suggest that this species has antioxidant, antibacterial and toxicity properties. Therefore purification and identification of these effective compounds are proposed.

Key words: *Antioxidant, Antibacterial, Cytotoxicity, Brittle Star, Ophiocoma erinaceus.*

1- M.Sc. in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Ph.D. Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

4- Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding Author: amrollahi@hormozgan.ac.ir