زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 6، شماره 1، بهار و تابستان 1394

خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های خام مخاط و صفحه دهانی شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni*

سحر شعبانی پنبه چوله[1]، صابر خدابنده[2*]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی واحد نور، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
2- دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی واحد نور، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

[*] نور، صندوق پستی 356- 46414
skhoda@modares.ac.ir
(دریافت مقاله: 93/10/13 پذیرش مقاله: 94/1/16)

چکیده- شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* در مناطق بین جزر و مدی جزیره هرمز به فراوانی دیده می شود. از استرس‌های مهم این مناطق می‌توان به نورخورشید (دارای UV و دمای بالا) اشاره کرد که موجب افزایش اکسیداسیون درون سلولی و در پی آن افزایش رادیکال‌های آزاد می‌شود. پاسخ سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد، افزایش مکانیسم‌های دفاعی از جمله: اندوخته کردن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و دوم داشتن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. نمونه‌برداری از این شقایق، از ناحیه بین جزر و مدی بخش شرقی اسکله شهری جزیره هرمز، انجام گرفت. عصاره‌گیری با استفاده از دو حلال بافرفسفات نمکی (PBS) و متانول 40% بر روی 2 گرم از وزن خشک مخاط با دو تکرار و 10 گرم از وزن تر صفحه دهانی با 6 تکرار از 6 نمونه مجزا به طور جداگانه انجام شد. غلظت‌های متفاوتی از عصاره خام تهیه و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با استفاده از روش‌های خنثی‌کنندگی رادیکال DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن III سنجیده شد. وابستگی غلظت با خاصیت آنتی‌اکسیدانی تمام عصاره‌ها، در هر دو روش مشاهده گردید. در روش DPPH، مقدار IC_{50} برای مخاط عصاره-گیری شده با دو حلال PBS و متانول40% به ترتیب برابر با 0/208± 1/469، 0/016± 1/85 و برای صفحه دهانی عصاره‌گیری شده با دو حلال PBS و متانول 40% به ترتیب 0/06 ± 0/733، 0/036± 0/444 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی صفحه دهانی شقایق دریایی به طور معنی‌داری بیشتر از مخاط است.

کلیدواژگان: شقایق دریایی، موکوس، استرس اکسیداتیو، DPPH.

1- مقدمه

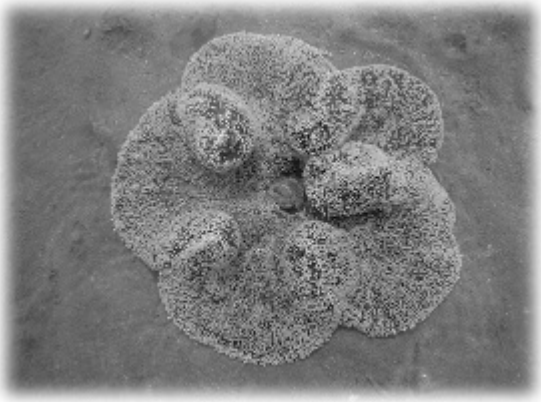
خلیج فارس به دلیل داشتن شرایط طبیعی ویژه و همچنین توسعه‌های ایجاد شده در خطوط ساحلی خود دارای محیط‌زیستی بسیار پراسترس می‌باشد [1]. استخراج نفت و عبور نفت‌کش‌ها، ورود پساب‌های خانگی به طور مستقیم یا از طریق رودخانه‌ها و همچنین تصادفات دریایی و جنگ‌ها از جمله مهم‌ترین عواملی هستند که روی کیفیت آب این خلیج تأثیر می‌گذارند. زیستگاه‌های

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

ساحلی به طور بالقوه تحت تأثیر فعالیت‌های انسانی قرار داشته و بازتاب‌کننده فرایندهای صورت گرفته در سیستم‌های اقیانوسی، اتمسفری و زمینی می‌باشند. اجزای زیستی این زیستگاه‌ها ممکن است به صورت مستقیم یا غیرمستقیم تحت تأثیر این فعالیت‌ها قرار گیرند [2].

در این میان، موجودات ناحیه ساحلی، گونه‌هایی با سازگاری بالا هستند که در این محیط پراسترس یافت می‌شوند. عامل سازگاری به این محیط‌های پراسترس سبب شده است که اکوسیستم‌های دریایی منابعی قوی از ترکیبات شیمیایی و زیستی را فراهم کرده و دریا به عنوان یک منبع عظیم از ترکیبات زیست فعال جدید شناخته شود [4،3]. به دلیل اینکه در هر شرایط فیزیکی و شیمیایی در محیط زیست دریایی، تقریباً در هر کلاس از موجودات دریایی انواعی از مولکول‌ها با ویژگی‌های ساختاری منحصربه‌فرد یافت می‌شود، اهمیت جانداران دریایی به عنوان یک منبع از مواد جدید در حال رشد، یک واقعیت است. موجودات دریایی از نظر بیوشیمیایی تکامل یافته‌اند و دارای مکانیسم‌های فیزیولوژیک خاصی‌اند که مواد زیست فعالی را برای مقاصدی مانند تولیدمثل، ارتباطات و محافظت در برابر شکارگری، عفونت و رقابت و... از خود تولید می‌کنند [5]. این مواد زیست فعال طیف وسیعی از ترکیبات مختلف را در بر می‌گیرد [6]. از بین این تنوع زیستی دریایی، بی‌مهرگان دریایی چسبیده، همانند شقایق‌دریایی، اسفنج‌ها و مرجان-های نرم، تعداد زیادی از متابولیت‌های ثانویه زیست فعال را که شامل مواد ضدمیکروبی، ضدتومور، ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدان، آنزیم‌های بازدارنده تقسیم سلولی، سیتوتوکسیک و همچنین موادی با ویژگی‌های کنترل مکانیسم‌های قلبی عروقی و غیره است را فراهم می‌کنند [7].

شقایق‌های دریایی در (شاخه Cnidaria و رده Anthozoa) به‌طور عمده ساکن کف، منزوی و کم‌تحرک هستند که به یک بستر سخت با استفاده از اندام شبیه به آلت مکنده متصل می‌شوند. همچنین تانتاکول‌هایی دارند که حفره دهانی را احاطه کرده و برای گرفتن و انتقال طعمه به دهان استفاده می‌شوند [8]. شقایق دریایی در مناطق جزر و مدی تا عمقی که نور کافی وجود داشته باشد و ستون آن بتواند در رسوب نرم پنهان شود، حضور دارد [9]. این گونه در مناطق بین جزر و مدی جزیره هرمز به فراوانی دیده می‌شود. شکل 1 شقایق دریایی را در ناحیه جزر و مدی جزیره هرمز نشان می‌دهد.



شکل 1 یک نمونه شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni*

از استرس‌های مهم زیست محیطی در این مناطق می‌توان به نورخورشید (دارای اشعه فرابنفش و دمای بالا) اشاره کرد. یکی از عوارض افزایش تابش UV و دما در جانوران افزایش اکسیداسیون درون سلولی و افزایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد.

ROS (Reactive oxygen species) و Reactive nitrogen species) RNS) به ترتیب مشتقات فعال اکسیژن و نیتروژن می‌باشند که دائماً در شرایط فیزیولوژیک و در نتیجه استرس اکسیداتیو در سلول‌ها تولید می‌شوند [10]. از جمله مشتقات فعال اکسیژنی می‌توان به سوپراکسید ($O_2^{-\cdot}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و هیدروکسیل (OH) و اکسیژن تک الکترونی(O) اشاره کرد [11].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

پاسخ سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد، افزایش مکانیسم‌های دفاعی است [12]. مکانیسم‌های دفاعی علیه رادیکال‌های آزاد به علت استرس اکسیداتیو، مشتمل بر مکانیسم‌های پیشگیری کننده، مکانیسم‌های تعمیری، مکانیسم‌های فیزیکی و مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. تحقیقات نشان داده که استرس اکسیداتیو در بسیاری از مراحل پاتولوژیک نقش دارد [13].

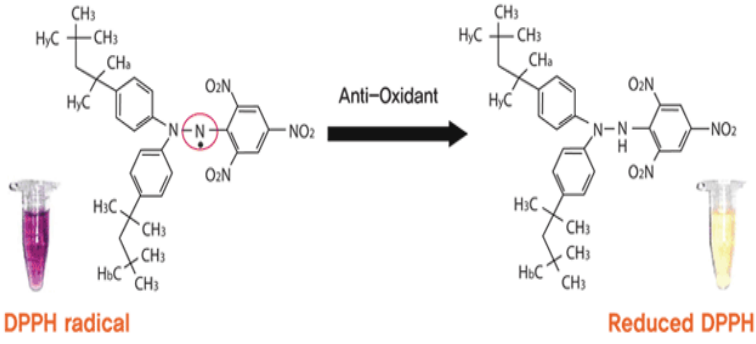
از جمله اثرات مخرب استرس اکسیداتیو در مرجان‌ها، سفیدشدگی و در نهایت نابودی آن‌ها می‌باشد، که بیش‌تر در مرجان‌های سخت گزارش شده است، اما گزارش‌هایی نیز وجود دارد که این استرس با ایجاد اختلال در مکانیسم عمل جلبک‌های همزیست با شقایق‌های دریایی می‌توانند سبب مرگ آن‌ها نیز شود [14]. دو راه عمومی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد، شامل اندوخته کردن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و دوم داشتن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است. آنتی‌اکسیدان‌ها به موادی گفته می‌شوند، که باعث کند کردن و توقف فرایندهای اکسیداسیون در آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شوند [15]. آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز است [13].

از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گزارش شده در شقایق دریایی، حضور رنگدانه‌هایی از قبیل کاروتنوئیدها می‌باشند که از طریق فرآیند اکسیداسیون نوری از حذف رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند [16]. همچنین مایکوسپورین‌ها به عنوان ترکیبات ضدآفتاب و جلوگیرنده از آسیب اشعه فرابنفش که به عنوان مولکول‌های آنتی اکسیدانی جهت زدودن رادیکال‌های سمی اکسیژن شناخته می‌شوند که در کورال‌ها نیز گزارش شده‌اند [17].

2و2-دی‌فنیل-1-پیکریل‌هیدرازیل یا DPPH یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش می‌باشد که با احیا شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن (ترکیبات آنتی اکسیدانی) به دی فنیل پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می‌شود. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این تست با میزان بی رنگ کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد که در شکل 2 نشان داده شده است [18].

روش قدرت احیاکنندگی آهن (III) بر مبنای توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها به کاهش آهن فریک اندازه‌گیری می‌شود [19].

در مطالعه‌ای Suganthi و همکاران (2012) فعالیت آنتی-اکسیدانی سم عروس دریایی *Chrysaora quinquecirrha* را در حالت پروتئین خام استخراج شده، با استفاده از روش DPPH سنجیدند. پروتئین نماتوسیست‌های این عروس دریایی فعالیت قدرتمند مهار رادیکال DPPH را نشان دادند [20].



شکل 2 فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات مختلف با استفاده از رادیکال DPPH را نشان می‌دهد. رادیکال DPPH (بنفش رنگ) با گرفتن الکترون و یا هیدروژن از ترکیبات در نهایت به شکل احیا (زرد رنگ) تبدیل می‌شود.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

با توجه به توضیحات آورده شده می‌توان گفت که استراتژی شقایق‌های دریایی منطقه بین جزر و مدی جزیره هرمز در برابر استرس‌های مختلف محیطی از جمله دما و UV با توجه به شاخص‌های فعالیت ترکیبات آنتی-اکسیدانی موجود در مخاط و عصاره‌ی خام صفحه دهانی می‌تواند بیانگر نحوه سازش و مقابله این بی‌مهره در برابر استرس‌ها باشد. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی مخاط و صفحه دهانی شقایق دریایی *S. haddoni* مورد ارزیابی قرار گرفت.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مکان و روش نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از شقایق دریایی در فصل زمستان (در ماه بهمن) سال 1392 انجام شد. با توجه به بازدیدهای صورت گرفته بیشترین تراکم شقایق‌های فرشی در ناحیه شرقی ایستگاه اسکله شهری هرمز دیده شد. لذا در یک جزر کامل 10 نمونه علامت‌گذاری شده و از نمونه‌ها عکس گرفته شد. شناسایی نمونه‌ها در مکان نمونه‌برداری و با استفاده از کلید شناسایی انجام گرفت [21]. سپس نمونه‌ها را از قسمت ستون بدن، به طوری که صفحه دهانی موجود را به صورت کامل در اختیار داشته باشیم با کاتر جدا و قطعه قطعه و به تانک ازت وارد شد. نمونه-ها بعد از اتمام نمونه‌برداری از تانک ازت خارج و با شرایط مناسب قرارگیری در یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای 80- نگهداری شد.

2-2- عصاره‌گیری

از 10 نمونه شقایق دریایی جمع آوری شده، به طور تصادفی 6 نمونه انتخاب، مخاط آن‌ها در دمای پایین (با استفاده از ظرفی از یخ) جدا و در فریز دراير -FDU) (7012, Koreaدر دمای 60- درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت در شرایط خلاء، خشک شد. سپس عصاره‌گیری از 2 گرم وزن خشک مخاط و 10 گرم از وزن تر صفحه دهانی به منظور دناتوره کردن پروتئین‌های سلولی (آنزیم‌ها) و رها شدن متابولیت‌های ثانویه از سلول با استفاده از دو حلال بافرفسفات نمکی (PBS) و متانول40%، بطور مجزا، استخراج عصاره خام انجام گرفت [22].

2 گرم از وزن خشک مخاط با 2 تکرار و 10 گرم از وزن تر صفحه دهانی با 6 تکرار از 6 نمونه مجزا با 20 میلی لیتر از بافرفسفات نمکی (PBS) یا متانول40% با استفاده از هموژنایزر دستی (Thomas, Phila, USA) در ظرفی از یخ هموژن شده و در دو مرحله سانتریفیوژ (Z 36 HK HERMLE, Germany) (در دور 10000 rpm و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد) شد. سوپرناتانت سانتریفیوژ (در دور 15000 rpm و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد) شد و سپس در فریز درایر خشک و توزین شد. میزان عصاره خام بدست آمده با استفاده از حلال PBS به طور میانگین در مخاط و صفحه دهانی به ترتیب 0/561 گرم در یک گرم وزن خشک و 0/0948 گرم در یک گرم وزن تر و با استفاده از حلال متانول 40% در مخاط و صفحه دهانی به ترتیب 0/212 گرم در یک گرم وزن خشک و 0/0427 گرم در یک گرم وزن تر مشاهده شد. سپس به همه عصاره‌ها به صورت جداگانه 5 میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و این محلول به عنوان استوک اولیه برای ساختن غلظت‌های متفاوت از نمونه برای آزمایش‌های آنتی-اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. غلظت استوک اولیه عصاره خام مخاط و صفحه دهانی عصاره‌گیری شده با حلال PBS به ترتیب 172 و 186 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و با حلال متانول 40% به ترتیب 85 و 85 میلی‌گرم بر میلی-لیتر بود [23].

2-3- توان خنثی کنندگی رادیکال آزاد DPPH :

ابتدا غلظت‌های متفاوتی از عصاره‌ها ساخته شد. سپس با

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

استفاده از آزمون و خطای بسیار، بطور تجربی غلظت‌های مناسب انتخاب گردید. غلظت‌های 85، 63/75، 42/5، 21/25، 10/625، 5/312، 2/656، 1/328، 0/664، 0/332 و 0/166 میلی گرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های خام مخاط و صفحه دهانی عصاره‌گیری شده با حلال متانول 40% و غلظت‌های 172، 129، 86، 43، 21/5، 10/75، 5/375، 2/687، 1/343، 0/671، 0/335 و 0/167 میلی-گرم بر میلی‌لیتر برای مخاط عصاره‌گیری شده با حلال PBS و غلظت‌های 186، 139/5، 93، 46/5، 23/25، 11/625، 5/812، 2/906، 1/453، 0/726، 0/363 و 0/181 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای صفحه‌دهانی عصاره-گیری شده با حلال PBS انتخاب شد. 300 میکرولیتر از محلول 0/16 میلی مولار DPPH (در متانول) به 300 میکرولیتر نمونه اضافه شد. ترکیب حاصل ورتکس شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق (2±30 درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی انکوبه (نگه‌داری) شد. در نهایت جذب همه نمونه‌ها در طول موج 517 نانومتر با دستگاه الایزا (Biotec – Epoch, USA) خوانده شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول (1) محاسبه گردید [24].

= درصد خنثی کنندگی رادیکال آزاد (%)

$$(A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100 \quad (1)$$

در این فرمول A_{blank} میزان جذب نوری کنترل منفی که تمامی مواد به استثنای عصاره‌ها را دارا می‌باشد (300 میکرولیتر محلول DPPH و 300 میکرولیتر آب مقطر)، نشان می‌دهد و A_{sample} بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره‌ها می‌باشد. پس از آن غلظتی از عصاره که دارای درصد مهار رادیکالی 50 درصد بود یا (IC_{50}) توسط نمودار محاسبه گردید. بدیهی است که هر چه این عدد کوچکتر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر می‌باشد. تمام آزمایش‌ها سه بارتکرار شدند.

2-4- قدرت احیا کنندگی آهن III

ابتدا غلظت‌های 23/25، 11/625، 5/812، 2/906، 1/453، 0/726، 0/363 و 0/181 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای صفحه دهانی عصاره‌گیری شده با حلال PBS و غلظت‌های 21/5، 10/75، 5/375، 2/687، 1/343، 0/671، 0/335 و 0/167 میلی گرم بر میلی‌لیتر برای مخاط عصاره‌گیری شده با حلال PBS انتخاب شد. سپس 200 میکرولیتر از نمونه با 500 میکرولیتر بافر فسفات 0/2 مولار (6/6 =pH) و 500 میکرولیتر فری سیانید پتاسیم 1 درصد (potassium ferricyanide) ترکیب شد. ترکیب حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و بعد از آن 500 میکرولیتر تری‌کلرو استیک اسید 10 درصد (TCA 10% w/v) به آن اضافه شد. سپس ترکیب با دور g 1650 به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت به 500 میکرولیتر از فاز بالائی، 500 میکرولیتر آب مقطر و 100 میکرولیتر فریک کلراید (کلرید آهن III) 0/1 درصد اضافه شد. پس از 10 دقیقه (به منظور ایجاد تغییر رنگ)، میزان جذب محلول نهائی در طول موج 700 نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان جذب بالاتر نشان‌دهنده قدرت احیا (کاهندگی) بیشتر است. از بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT) هم به‌عنوان استاندارد استفاده شد. غلظت‌های در نظر گرفته شده برای BHT، 200، 400، 600 و 800 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [19].

2-5- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 16 انجام شد و برای رسم نمودارها از برنامه Excel 2013 استفاده شد. برای مقایسه اختلاف معنی‌دار بین داده‌های مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مخاط و صفحه دهانی در این موجود از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و از آزمون آماری Duncan در سطح اعتماد 0/05 درصد استفاده شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

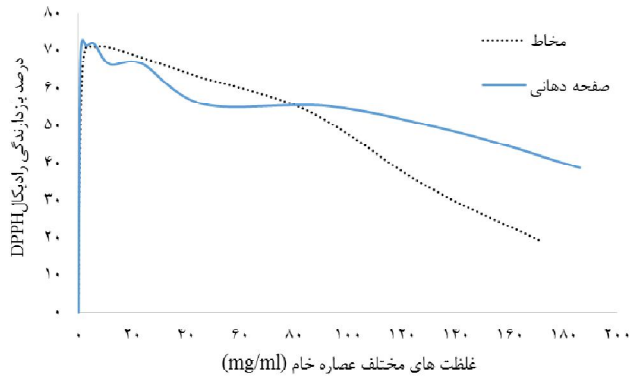
3- یافته‌ها

3-1- درصد بازدارندگی (مهار) رادیکال‌های آزاد DPPH

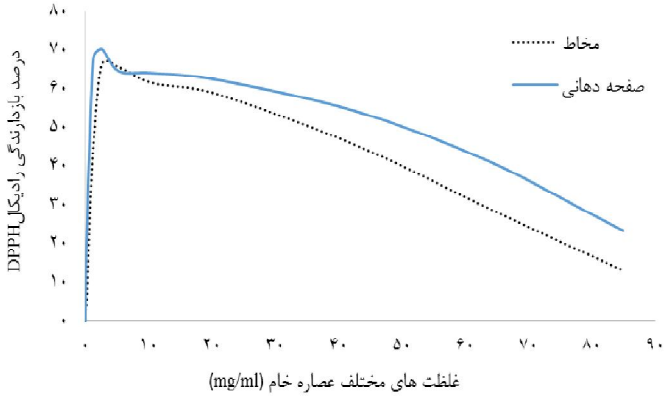
درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد DPPH نمونه‌ها محاسبه شد و نمودار غلظت عصاره‌ها و درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در هر دو عصاره صفحه دهانی و مخاط مربوط به هر دو استخراج با PBS و متانول40% رسم شد (نمودارهای 1 و 2). بالاترین درصد بازدارندگی رادیکال DPPH برای صفحه دهانی و مخاط عصاره‌گیری شده با حلال PBS به ترتیب 73% و 71% به ترتیب در غلظت‌های 1/453 و 5/375 میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

بالاترین درصد بازدارندگی رادیکال DPPH برای صفحه دهانی و مخاط عصاره‌گیری شده با حلال متانول40% به ترتیب 70% و 66% به ترتیب در غلظت‌های 1/32 و 2/656 میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی چندین مرتبه انجام و IC_{50} عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. IC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌شود که موجب 50 درصد بازدارندگی می‌شود که در جدول 1 نشان داده شده است. IC_{50} معیار مناسبی برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مختلف می‌باشد، زیرا مقایسه غلظت‌های مختلف و تحلیل اختلاف معنی-داری بین آن‌ها کار دشواری است.



نمودار 1 مقایسه درصد بازدارندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های صفحه‌دهانی و مخاط عصاره‌گیری شده با حلال PBS



نمودار 2 مقایسه درصد بازدارندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌های صفحه دهانی و مخاط عصاره‌گیری شده با حلال متانول40%

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

جدول 1 مقدار IC_{50} در مخاط و صفحه دهانی عصاره‌گیری شده با دو حلال مختلف

حلال	ناحیه	IC_{50} (mg/ml)
PBS	صفحه دهانی	$0/733 \pm 0/06^{c}$
PBS	مخاط	$1/469 \pm 0/208^{b}$
متانول40%	صفحه دهانی	$0/444 \pm 0/036^{d}$
متانول40%	مخاط	$1/85 \pm 0/016^{a}$

هر چه عدد IC_{50} کمتر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر است، در واقع IC_{50} کمتر نشان می‌دهد که نمونه در غلظت پایین‌تری باعث 50 درصد بازدارندگی می‌شود. بنابراین مخاط استخراج شده با حلال متانول40% دارای کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و صفحه دهانی استخراج شده با حلال متانول40% دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است.

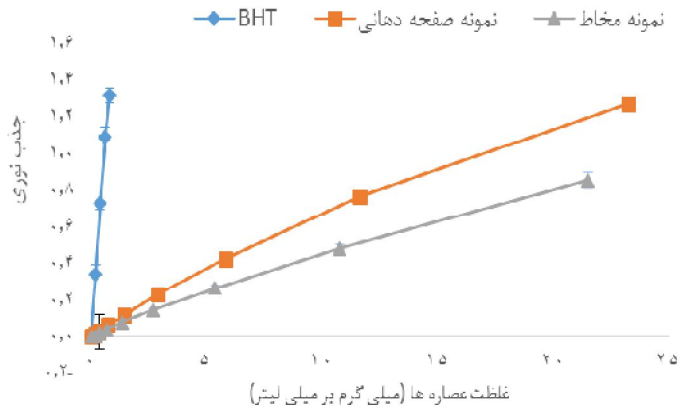
3-2- قدرت احیا کنندگی آهن III

نمودار 3، غلظت و جذب عصاره‌های خام مخاط و صفحه دهانی عصاره‌گیری شده با حلال PBS را نشان می‌دهد.

در این روش، احیای آهن III به‌عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به کار می‌رود. در این سنجش، تغییر رنگ زرد محلول حاوی عصاره به رنگ سبز به قدرت احیاکنندگی ترکیبات موجود در عصاره بستگی دارد. حضور مواد احیاکننده در محلول به احیای کمپلکس Fe^{3+}/ فری سیانید به Fe^{2+} منجر می‌شود. بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) نیز به‌عنوان کنترل مثبت به کار برده شده است. افزایش در جذب مخلوط واکنش، حاکی از قدرت احیاکنندگی بالای نمونه‌هاست. قدرت احیاکنندگی عصاره خام مخاط و صفحه دهانی عصاره-گیری شده با حلال PBS با افزایش غلظت افزایش یافت. مقایسه میانگین میزان جذب در همه‌ی غلظت‌های مورد بررسی نشان داد که آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بیشترین قدرت احیاکنندگی را دارد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که در غلظت‌های بالا، اختلاف معنی‌داری میان تمام عصاره‌ها وجود دارد ($P<0/05$).

4- بحث

از جمله موجوداتی که به دلیل داشتن ترکیبات زیست‌فعال با خواص مختلف دارویی در عرصه پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند، بی‌مهرگان دریایی هستند. اغلب در بررسی-های محیطی نیز، استفاده از موجودات بی‌مهره و کفزی توصیه می‌شود. چون قادر به فرار از متغیرهای مخرب نیستند، پس باید خود را تنظیم کنند یا از بین بروند.



نمودار 3 نمودار غلظت و جذب عصاره‌های خام مخاط و صفحه دهانی عصاره‌گیری شده با حلال PBS

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

موجوداتی که در مصب‌ها و مناطق جزر و مدی زندگی می‌کنند، دامنه وسیعی از نوسانات را تجربه کرده و اغلب طیف وسیعی از مقاومت‌های فیزیولوژیک را نسبت به عوامل استرس‌زا از خود نشان می‌دهند. محدوده مقاومت در این موجودات وسیع‌تر است که این ویژگی می‌تواند در تشخیص حالات استرس نسبت به جانورانی که دامنه مقاومت محدودتری دارند مفیدتر باشد [25]. به دلیل اینکه شرایط اکولوژیک مختلف، روی میزان و تنوع ترکیبات زیست فعال در موجود مؤثر است، امروزه شناسایی این بی‌مهرگان و همچنین ترکیبات زیست فعالشان بسیار مهم است. با توجه به اینکه موجودات دریایی در معرض استرس‌های متعددی هستند، لذا ترکیبات ضداسترس مختلفی در آن‌ها تولید و ذخیره می‌شود. از جمله این استرس‌ها خطر اکسیداتیو می‌باشد. خطر اکسیداتیو، در نتیجه عدم تعادل پرو-اکسیدان و آنتی‌اکسیدان‌ها در موجودات زنده شکل گرفته و امروزه به عنوان یک پدیده مهم در بیماری‌های مزمن شناخته می‌شود [26]. از این رو تلاش برای یافتن ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی، به طور ویژه در موجودات دریایی، که به عنوان منبعی از مولکول‌های خاص هستند، به شدت رو به افزایش است [27].

از بین تحقیقات انجام گرفته، Valentin و همکاران (2011) درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اسفنج *Dendrilla nigra* را با استفاده از روش DPPH، 50/83 درصد بدست آوردند که در مقایسه با خواص آنتی-اکسیدانی BHT (استاندارد) با فعالیت 100 درصد، قابل توجه بود [28]. همچنین در بین بی‌مهرگان دریایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی سم نماتوسیت‌های عروس دریایی که به صورت پروتئین خام استخراج شده بود، در غلظت-های 120-20 میکروگرم بر میلی‌لیتر به روش DPPH، بررسی شده و نتایج نشان داده است که درصد مهاری رادیکال DPPH پروتئین خام، 15 تا 92 درصد بوده و تابع غلظت پروتئین می‌باشد [20].

در سال (2014)، Sadhasivam و همکاران فعالیت آنتی-اکسیدانی عصاره متانولی تعدادی شکم پا، دوکفه‌ای و خارپوست را با استفاده از روش DPPH مورد سنجش قرار داده، آن‌ها تفاوت معنی‌داری را در فعالیت‌های آنتی-اکسیدانی عصاره‌های گرفته شده از گونه‌های مختلف گزارش کردند. در میان نمونه‌های مورد سنجش، عصاره گونه *Meretrix meretrix* و*Perna viridis* از دوکفه‌ای‌ها دارای بالاترین اثر بازدارندگی رادیکال DPPH، به ترتیب 74/52 و 74/52 درصد را داشته و کمترین اثر بازدارندگی رادیکال DPPH 23/54 درصد مربوط به گونه *Turitella attenuate* از شکم پایان بود [27].

در تحقیق حاضر بیشترین مقدار درصد بازدارندگی رادیکال DPPH مربوط به عصاره خام صفحه دهانی و مخاط عصاره‌گیری شده با استفاده از حلال PBS به ترتیب 73 و 71 درصد در غلظت‌های 1/453 و 5/375 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد که تقریباً مشابه با عصاره خام پروتئین‌های سم عروس دریایی با فعالیت آنتی-اکسیدانی 92 درصد در 120 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. ولی به این دلیل که عصاره تحقیق حاضر عصاره خام بوده و هیچ فرایندی برای جداسازی ترکیبات مختلف صورت نگرفته است، لذا در غلظت‌های بالاتری نسبت به عصاره خام پروتئین سم عروس دریایی فعالیت آنتی-اکسیدانی را نشان می‌دهد. بیشترین مقدار درصد بازدارندگی رادیکال DPPH مربوط به عصاره خام صفحه دهانی و مخاط عصاره‌گیری شده با استفاده از حلال متانول 40 درصد نیز به ترتیب 70 و 66 درصد در غلظت‌های 1/32 و 2/656 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد که از مقدار گزارش شده در اسفنج *D.nigra*، 50/83 درصد، بیشتر بود. همچنین درصد بازدارندگی رادیکال DPPH در دو عصاره خام مخاط و صفحه دهانی قابل مقایسه با نتایج تحقیقات پیشین می‌باشد [27-29].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی چندین مرتبه انجام و IC50 عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. تمام نمونه‌های آزمایش شده، وابستگی‌شان به غلظت و توانایی‌شان به گیر انداختن رادیکال‌های بیشتر با افزایش غلظت را نشان داد که این نتایج همسو با نتایج انجام گرفته روی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کد می‌باشد اما این روند تا غلظتی که واکنش منحرف نشود ادامه خواهد یافت، در واقع بعد از اینکه غلظت عصاره از حد خاصی فراتر رود ممکن است واکنش به دو یا چند مسیر منحرف شود و خاصیت آنتی-اکسیدانی در غلظت‌های بالا کاهش یابد [29].

علاوه بر روش DPPH، از روش احیای آهن نیز برای محاسبه خاصیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. این روش توسط Griffin و Bhagooli در سال (2004)، با هدف تعیین تغییرات پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در مرجان *Pocillopora damicornis* و *Pocillopora meandrina* به درجه حرارت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت و مشاهده شد که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در میزبان‌های مرجانی با افزایش دما و زمان، افزایش، و در برخی موارد کاهش یافته است و علت کاهش به دلیل ضعف در قدرت دفاعی ذکر شده است [30].

این خاصیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان علاوه بر حضور ترکیبات آنتی اکسیدانی، به حضور آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی در عصاره خام صفحه دهانی و مخاط نیز نسبت داد [31].

5- نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان گفت که عصاره خام مخاط و صفحه دهانی شقایق دریایی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی صفحه دهانی در هر دو حلال PBS و متانول40% به طور معنی‌داری بیشتر از مخاط است و از آنجایی که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره خام شقایق دریایی می‌توانند شامل مایکوسپورین‌ها، انواع پپتیدها و رنگدانه‌هایی مختلف نظیر کارتنوییدها و غیره باشند، لذا نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری است که در دست انجام می‌باشد.

6- منابع

[1] Tolosa, I., De Mora, S. J., Fowler, S. W., Villeneuve, J. P., Bartocci, J., Cattini, C. (2005) Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman. *Marine pollution bulletin*. 50(12):1619-1633.

[2] Mclachlan, A., Brown, A. (1990) *Ecology of Sandy Shore*. 2rd ed. New York; Elsevier Science Publishers.

[3] Aneiros, A., Garateix, A. (2004) Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*. 803(1):41-53.

[4] Devi, N. K. A., Rajendran, R., Sundaram, S. K. (2011) Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2 (1):59-64.

[5] Kijjoa, A., Sawangwong, P. (2004) Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*; 2(2):73-82.

[6] Bhakuni, D. S., Rawat, D. D. S. (2005) *Bioactive marine natural products*. Anamaya Publishers. New Delhi, India, 382.

[7] Devi, K. N., Kumar. T. T., Dhayanithi, N. B., Kathiresan, K. (2012) Isolation of pigments from sea anemones, *Heteractis magnific*, (Quoy and Gaimard, 1833) and *Stichodactyla haddoni* (Kent, 1893) and their effects against aquatic and human bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(1): S323-S328.

[8] Ghosh, S., Ajith Kumar, T. T., Balasubramanian, T. (2011) Characterization and antimicrobial properties from the sea anemones (*Heteractics magnifica* and *Stichodactyla mertensii*) toxins. *Archives of Applied Science Research*. 3(4):109-117.

[9] Fautin, D. G., Tan, S. H., Tan, R. (2009) Sea aneamones (cnidaria: actiniaria) of singapore: abundant and well-known shallow-water species. *Raffles Bulletin of Zoology*. 2009; 121-143.

[10] Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y.(2003) Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*. 23(12): 1719-1726.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

[11] Krishnamurthy, P., Wadhwani, A. (2012). Antioxidant enzymes and human health. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Antioxidant Enzyme". 978-953.

[12] Higuchi, T., Fujimura, H., Arakaki, T., Oomori, T. (2008) Activities of antioxidant enzymes (SOD and CAT) in the coral *Galaxea fascicularis* against increased hydrogen peroxide concentrations in seawater. In Proceeding of the 11th International Coral Reef Symposium. July.

[13] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1):44-84.

[14] Downs, C. A., Fauth, J. E., Halas, J. C., Dustan, P., Bemiss, J., Woodley, C. M. (2002) Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(4): 533-543.

[15] Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O. I. (1995) The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 33(7):601-617.

[16] Roy, S. *Strategies for the minimisation of UV-induced damage, The effects of UV radiation in the marine environment.* In: Mora S, Demers S, Vernet M. (2000) published by the press syndicate of the university of Cambridge. 177-205.

[17] Yakovleva, I., Bhagooli, R., Takemura, A., Hidaka, M. (2004) Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine, Comparative Biochemistry and Physiology Part B. *Biochemistry and Molecular Biology*. 139(4):721-730.

[18] Burits, M., Bucar, F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research.* 14: 323-328.

[19] Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

[20] Suganthi, K., Perumal, P. (2012) Biological activities of nematocysts extract of Jelly fish *chrysaora quinquecirrha* (Desor1848) from velar estuary, southeast coast of India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 4(4).

[21] Häussermann, V. (2004) Identification and Taxonomy of Soft-Bodied Hexacorals Exemplified by Chilean Sea Anemones; Including Guidelines for Sampling, Preservation and Examination, *Journal of the Marine Biological Association of the UK*84 (05):931-936.

[22] Khodabandeh, S., Fouchereau-Peron, M. (2010). Evidence for the presence of CGRP-like molecules in the Artemia urmiana. *Journal of Biotechnology*, (150), 129.

[23] Khosravi, S., Khodabandeh, S., Agh, N. (2012) Effects of Salinity and Ultraviolet Radiation on Bioaccumulation of Mycosporines-Like Amino Acids in *Artemia urmiana* and Parthenogenetic Artemia. *Photochemistry and Photobiology*. 12 (45):1245-1251.

[24] Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Sokmen, A. (2006) Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey. *Food Chemistry*. 95(2):200-204.

[25] نوری موگهی، م. ح.، نبوی، م. ب.، طاهری میرقائد، ع.، حیدری، ز.، سواری، ا.، چوبینه، ح.، قرائی، ا.، (1391). اکوفیزیولوژی جانوران آبزی، انتشارات جهاد دانشگاهی، ص. 388.

[26] Urquiaga, I. N. E. S., Leighton, F. (2000) Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological research. 33: 55-64

[27] Sadhasivam, G., Sankar, V. J. V., Sridhar, N., Kumar, M. (2014) In vitro antioxidant activity of different gastropods, Bivalves and Echinoderm by solvent extraction method. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 5: 6.

[28] Valentin, B. B., Vinod, V., Beulah, M. C. (2011) Biopotential of secondary metabolites isolated from marine sponge, *Dendrilla nigra*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 1(4): 299-303.

[29] Sabeena Farvin, K. H., Andersen, L. L., Nielsen, H. H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., et al. (2014) Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*. 149: 326-334.

[30] Griffin, S. P., Bhagooli, R. (2004) Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 201-211.

[31] Moraes, T. B., Ribas Ferreira, J. L., da Rosa, C. E., Sandrini, J. Z., Votto, A. P., Trindade, G. S., et al. (2006) Antioxidant properties of the mucus secreted by Laeonereis acuta (*Polychaeta, Nereididae*): A defense against environmental pro-oxidants?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 142(3): 293-300.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]