



اثرات ضدسرطانی و مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز عصاره فیلتر شده صفحه دهانی شقایق دریایی (*Stichodactyla haddoni*)

لیلا یآوری^۱، بهروز حیدری^{۱،۲*}، صابر خدابنده^۳، حسین غفوری^۱، مهوش هادوی^۱

^۱ دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، رشت

^۲ دانشگاه گیلان، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، گروه علوم دریایی، رشت

^۳ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۶/۱۱/۲۷

اصلاح: ۹۷/۰۳/۱۱

پذیرش: ۹۷/۰۳/۱۳

کلمات کلیدی:

شقایق دریایی
استیل کولین استراز
کاسپاز
پروتئین

در مطالعه حاضر، اثرات مهارتی استیل کولین استراز و فعالیت کاسپاز ۳ بخش دهانی شقایق دریایی موکتی *Stichodactyla haddoni* بررسی شد. نمونه‌های *S. haddoni* از منطقه بین جزر و مدی جزیره هرمز خلیج فارس تهیه شدند. جهت جداسازی فرکشن با وزن مولکولی ۳۰-۱۰۰ kDa از عصاره خام، اولترا فیلتراسیون میلی پور انجام شد. روش Ellman جهت سنجش مهار استیل کولین استراز استفاده گردید. سنجش فعالیت کاسپاز ۳ با استفاده از کیت کالریمتریک سنجش کاسپاز در سلول سرطانی سینه MCF-7 انجام گرفت. در پایان آزمایش، بیشترین درصد مهار استیل کولین استراز در غلظت ۶ mg/ml از فرکشن ۳۰-۱۰۰ kDa مشاهده شد ($p < 0.05$). میزان فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی MCF-7 تیمار شده با غلظت ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ نشان داد که پروتئین کاسپاز ۳ فعالیت معنی‌داری را پس از طی مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت داشت ($p < 0.05$). غلظت ۶۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در فرکشن ۳۰-۱۰۰ kDa بعد از گذشت هر سه زمان، بیشترین فعالیت کاسپاز را از خود بروز داد. در مجموع می‌توان بیان نمود که سموم پروتئینی *S. haddoni* با وزن مولکولی ۳۰ kDa تا ۱۰۰ می‌توانند اثرات ضد آنزیمی با مهار آنزیم استیل کولین استراز و اثر کشندگی بر سلول سرطانی سینه از طریق فعال کردن کاسپاز ۳ و القای احتمالی آپوپتوز داشته باشند.

مقدمه

شقایق‌های دریایی مانند سایر جانوران دریایی با زندگی ساکن و بدنی نرم، فاقد ابزارهای فیزیکی دفاعی معمول هستند و معمولاً از ترکیبات سمی به‌عنوان سلاح‌های شیمیایی و مهارکننده‌های قوی فیزیولوژیکی برای رقابت، شکار، مقابله با شکارچی و رقبا استفاده می‌کنند (Haefner, 2003). شقایق‌های دریایی دارای تتناکول‌های زیادی در سطح صفحه دهانی و کل بدن هستند که این تتناکول‌ها مجهز به سلول‌های ویژه‌ای به نام نماتوسیت هستند که محل ساخت سموم و ذخیره آن می‌باشند (Smith and Blumenthal, 2007). شقایق‌های موکتی (sea carpets) *Stichodactyla sp.* متعلق به شاخه کیسه‌تنان (Cnidaria) و رده گل‌وشان (Anthozoa) می‌باشند. شقایق‌های دریایی موجوداتی ساکن دریا و بی‌مهرگان ساکن و

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: bheidari@guilan.ac.ir

یکجانشین هستند. پراکنش این گروه از آنتوزواها از حوضچه‌های جزر و مدی تا آب‌های عمیق دور از ساحل را شامل می‌شود (Karthikayalu *et al.*, 2010).

در سال‌های اخیر حدود ۱۸۰۰۰ ترکیب زیست فعال که اغلب سمی هستند از ارگانوسم‌های مختلف دریایی از جمله شقایق‌های دریایی استخراج شده است (Pandey, 2012) و این میزان سریعاً در حال افزایش است. پروتئین‌ها و پپتیدهای موجود در سموم شقایق‌های دریایی در حقیقت ترکیبات زیست فعالی هستند که دارای خواصی مانند سیتولیزینی^۱ با ایجاد حفره در سطح سلول (Anderluh and Maček, 2002)، فسفولیپازی (Grotendorst and Hessinger, 1999)، مهارکننده کانال‌های سدیمی (Bosmans and Tygat, 2007) و پتاسیمی (Minagawa *et al.*, 1998) دیگر نوروٹوکسین‌ها (Garateix *et al.*, 1992) و نیز مهارکنندگان پروتئینازی (Delfin *et al.*, 1994; Antuch *et al.*, 1993) هستند.

استیل کولین (ACh)، نقش مهمی در انتقال پیام بین دو سلول عصبی را به عهده دارد و توسط آنزیمی به نام کولین استراز (AChE) تجزیه می‌شود. استیل کولین استراز آنزیمی در سیستم عصبی جانوران است که با تجزیه‌ی استیل کولین موجب انتقال صحیح پیام‌های عصبی می‌شود. آلزایمر بیماری است که در آن میزان ماده استیل کولین مغز کاهش می‌یابد و موجب ایجاد اختلال در ارسال پیام بین دو سلول عصبی مغز می‌شود (Iran Alzheimer's Association). در بیماران مبتلا به آلزایمر کمک به جلوگیری از کاهش یافتن استیل کولین با استفاده از مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز که یکی از عوامل کاهش این ماده در مغز است، مؤثر خواهد بود (Shekarchi *et al.*, 2013). داروهایی که بتوانند موجب مهار آنزیم کولین استراز و افزایش استیل کولین شوند، از مهم‌ترین داروهایی هستند که در انواع بیماری‌های دمانس و آلزایمر تجویز می‌شوند (Iran Alzheimer's Association). عوارض جانبی و مدت تأثیر کوتاه‌مدت داروهای موجود محققین را بر آن داشته تا به داروهای جدیدی دست یابند که علاوه بر داشتن اثرات بهتر، عوارض جانبی کمتری نیز داشته باشند. جانوران دریایی از جمله منابعی هستند که همواره جهت یافتن داروهای جدید مورد توجه بوده‌اند. بنابراین به نظر می‌رسد با بررسی اثرات مهارکننده‌های استیل کولین استراز (AChEI) در سم جانوران دریایی از جمله شقایق‌های دریایی، مسیر دستیابی به داروهایی جهت درمان آلزایمر هموارتر گردد.

آپوپتوز به‌عنوان مکانیسمی است که می‌تواند به‌عنوان یکی از مهم‌ترین راه‌های از بین بردن سلول‌های اضافی در بدن یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها مورد توجه قرار گیرد (Honardoost *et al.*, 2013). اگر سرعت انجام آپوپتوز بیشتر شود و یا از سرعت آن کاسته شود بیماری‌هایی نظیر آلزایمر و پارکینسون حادث می‌شوند (Meier *et al.*, 2000; Cory *et al.*, 1994). شناسایی این فرایند سلولی و راه‌های کنترل آن در دستیابی به داده‌های ضد سرطانی و ضد التهابی راه گشا است (Dlamini *et al.*, 2004).

کاسپازها در حقیقت آنزیم‌های پروتئاز می‌باشند که به‌صورت اختصاصی عمل می‌کنند. این پروتئازها با توجه به توانایی خود، سوبسترای خود را در جایی که نوع خاصی از آسپاراتات وجود دارد، می‌شکنند و موجب تجزیه و تخریب پروتئین‌ها و حتی موجب فعال‌سازی دیگر کاسپازها می‌شوند. همه کاسپازها به‌واسطه پدیده تجزیه شدن با آنزیم پروتئاز فعال می‌گردند. درنهایت کاسپاز فعال‌شده دارای دو زیر واحد بزرگ و دو زیر واحد کوچک است و یک تترامر محسوب می‌شود. (Steller, 1998). کاسپازها مسئول هماهنگ کردن مسیر مرگ هستند و این نقش مهم خود را با تجزیه سوبسترای منحصربه‌فرد خود به انجام می‌رسانند و درنهایت موجب وقوع مرگ سلول می‌شوند (Hay and Kannourakis, 2002; Schwerk and Schulze-Osthoff, 2003). کاسپازها از لحاظ اولویت شرکت در پدیده مرگ سلولی به دو گروه تقسیم می‌شوند؛ کاسپازهای آغازگر دارای عملکرد پیشرو هستند و کاسپازهای اجرایی با تأخیر وارد عمل می‌شوند. کاسپاز ۲، ۸، ۹ و ۱۰ در گروه کاسپازهای آغازگر قرار می‌گیرند و در ابتدای فرایند فعال می‌شوند و کاسپاز ۳، ۶ و ۷ جزء کاسپازهای اجرایی هستند و در مراحل بعد وارد عمل می‌شوند. آن‌ها فعالیت خود را به کمک کاسپازهای آغازگر شروع می‌کنند و توالی از فعالیت کاسپازی را به راه می‌اندازند. (Zimmermann *et al.*, 2001; Steller, 1995).

¹ cytolysin

چندین مطالعه در خصوص اثرات سموم و عصاره‌های جانوران دریایی بر مهار فعالیت استیل کولین استراز و همچنین فعالیت کاسپازی آن‌ها انجام شده است. Ayed و همکاران در سال ۲۰۱۲ فعالیت اثر عصاره خام سم ژله فیش مدیترانه‌ای را روی استیل کولین استراز بررسی کردند. جداسازی و خالص‌سازی مهارکننده استیل کولین استراز از شقایق دریایی *Gyrostoma helianthus* دریای سرخ توسط Gomaa و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام گرفت. همچنین Ramezanpour و همکاران در سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۴ فعالیت کاسپازی و آپوپتوزی سم چندین گونه از شقایق‌های دریایی از جمله *Heteractis magnifica* و *H. magnifica* را مورد بررسی قرار دادند.

با توجه به کشندگی بالقوه‌ای که در سموم شقایق دریایی وجود دارد که حتی می‌تواند جهت مهار رشد بیماری‌های خاص مورد استفاده قرار گیرد و از طرفی دیگر، اکوسیستم خاص خلیج فارس می‌تواند فرصت بسیار مناسبی را جهت مطالعه زیستی جانداران سمی آن‌ها فراهم آورد. از این‌رو، در مطالعه حاضر سعی شده است تا اثرات ضد آلزایمری و فعالیت کاسپازی فرکشن اولترافیلتر شده از عصاره خام شقایق دریایی موجود در خلیج فارس (شقایق موکتی *Stichodactylus haddoni*) مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مکان و روش نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از صفحات دهانی شقایق‌های دریایی در بهمن ماه و از سواحل خلیج فارس (جزیره هرمز) و در زمان جزر انجام گرفت (شکل ۱). شناسایی آن‌ها با استفاده از کلید شناسایی Fautin و همکاران (۲۰۰۸) انجام گرفت. نمونه‌ها پس از صید در تانک ازت قرار گرفتند و پس از انتقال به آزمایشگاه در فریزر 7°C - نگهداری شدند.

تهیه عصاره‌ی بافر فسفات

در هر مرحله عصاره گیری، نمونه‌ها (قطعاتی از صفحات دهانی) با استفاده از دستگاه هموژنایزر برقی (MTOPS R13) کاملاً هموژنه و با نسبت ۱:۵ با بافر فسفات سدیم (Phosphate Buffered Saline) استریل با $\text{pH}=7.4$ (pH خنثی جهت استخراج اغلب ترکیبات پروتئینی است) مخلوط شد. در مرحله بعد به مدت ۲ و نیم ساعت با 90 RPM و در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد در دستگاه انکوباتور شیکردار (Infros, RFI-150) قرار داده شد. پس از طی این مدت مایع روی رسوبات بافتی جدا شد و در دستگاه میکروسانتریفیوژ (Centurion Scientific; England) با 10000 RPM و دمای 4°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ در داخل هر یک از اپندورف‌ها ۳ فاز تشکیل شد که از بالا به پایین شامل: ۱. موم و واکس سفید رنگ و کره‌ای مانند ۲. مایع شفاف نارنجی-زرد رنگ ۳. رسوبات سلولی که فاز دوم آن برای مراحل بعدی استفاده شد.



شکل ۱. نمونه شقایق دریایی مورد استفاده در مطالعه حاضر

جهت نگهداری طولانی مدت عصاره مذکور از دستگاه فریزدرایر (Vacuubrand, Germany) استفاده شد. لازم به ذکر است که تمامی مراحل عصاره گیری، بر روی یخ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (Ghadiri et al., 2018).

اندازه‌گیری پروتئین کل با روش BCA

اساس سنجش پروتئین به روش بی سین چونینیک اسید^۲ (BCA) بر مبنای کاهش Cu^{+2} به Cu^{+1} به وسیله پروتئین مجهول در محیط قلیایی و نیز تشخیص رنگ انتخابی کاتیون مس (Cu^{+1}) تشکیل شده توسط بی سین چونینیک اسید است (He, 2011). کمپلکس BCA و مس قابل حل در آب و به رنگ بنفش پررنگ است و دارای جذب خطی قوی در طول موج ۵۶۲ نانومتر می‌باشد که با افزایش غلظت پروتئین این میزان افزایش می‌یابد. برای اندازه‌گیری میزان کمی پروتئین به این روش، ۰/۱ گرم از عصاره خام بافر فسفاتی در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات حل و در ۴ غلظت مختلف طبق پروتکل تهیه شد. به منظور تهیه محلول‌های استاندارد، ۹ غلظت از ۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر پروتئین آلبومین سرم گاوی BSA ساخته شد.

الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE)

روش SDS-PAGE (الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات) برای الکتروفورز پروتئین استفاده شد. با اعمال بعضی تغییرات در روش لاملی (Laemmli, 1970)، ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد در نظر گرفته شد. مدت زمان و ولتاژ لازم برای الکتروفورز در ژل متراکم کننده به ترتیب نیم ساعت و ۵۰ ولت و در ژل جداکننده این میزان ۱/۵ ساعت و ۱۵۰ ولت بود. در نهایت نمونه‌های آماده‌شده با استفاده از بافر نمونه به میزان ۱۵ میکرولیتر برای هر نمونه بر روی ژل بارگذاری شد. برای مقایسه وزن مولکولی نمونه‌های مجهول در ژل و نشانگرهای پروتئینی با وزن مولکولی مشخص، پروتئین‌های اوترانسفرین (۷۸ کیلو دالتون)، آلبومین گاوی (۶۶ کیلو دالتون)، اوآلبومین (۴۴ کیلو دالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلو دالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلو دالتون) و لیزوزیم (۱۴ کیلو دالتون) به کار برده شد. بعد از اتمام الکتروفورز، کوماسی بریلیانت بلو R-250 جهت رنگ‌آمیزی ژل استفاده شد. ضمن آنکه مرحله‌های ثبوت و رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها به‌طور هم‌زمان انجام گرفت. ژل در محلول رنگ به مدت ۱ ساعت قرار گرفت و پس از این مدت در معرض محلول‌های متانول، اسید استیک گلاسیال و آب مقطر به‌عنوان مواد رنگ‌بر قرار گرفت و این مرحله تا زمان روشن شدن زمینه ژل ادامه داشت.

الترافیلتراسیون

جهت جداسازی اجزای مختلف عصاره خام بافر فسفاتی از ۲ فیلتر میلی پور فالكونی (Amicon, Franc) ۳۰ و ۱۰۰ کیلو دالتونی استفاده شد. تعداد ۲ فرکشن پروتئینی با وزن‌های مولکولی بیشتر از ۱۰۰ کیلو دالتون (فرکشن ۱) و بین ۳۰-۱۰۰ کیلو دالتون (فرکشن ۲) توسط فیلترهای میلی پوری تهیه شد. تمامی فیلترها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و RPM 5000 مورد استفاده قرار گرفتند. زمان لازم برای فیلتر ۱۰۰ کیلو دالتونی ۲۰ دقیقه و برای فیلتر ۳۰ کیلو دالتونی، ۱۰ دقیقه بود. از آنجایی که میزان پروتئین کل فرکشن ۳۰-۱۰۰ کیلو دالتونی بیشتر از فرکشن >۱۰۰ کیلو دالتونی بود لذا جهت بررسی فعالیت مهارتی استیل کولین استراز و فعالیت کاسپازی از این فرکشن استفاده شد (Yavari et al., 2018).

مهار آنزیم استیل کولین استراز

شیوه‌های متفاوتی جهت بررسی اثرات مهارکنندگی استیل کولین استراز (AChEI) مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش Ellman از جمله روش‌هایی است که به‌طور معمول برای بررسی اثرات AChEI به کار گرفته می‌شود. استیل کولین یداید (ATCT) به‌عنوان سوبسترا در نظر گرفته می‌شود و پس از اثر مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز (AChEI) بر آن، سرعت تولید تیوکولین به‌عنوان محصول کاتالیز آنزیمی به‌عنوان اساس کار در روش Ellman مورد استفاده قرار می‌گیرد. تیوکولین پس از تولید با دی تیو دی بنزوئیک اسید (DTNB) واکنش می‌دهد تا ۲- نیترو ۵- مرکاپتو بنزوئیک اسید که یک آنیون

² bicinchoninic acid

زردرنگ است ایجاد شود. سرعت ایجاد رنگ در طول موج ۴۰۵ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری می شود (Ellman *et al.*, 1961). در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه، ۱۲۵ میکرولیتر DTNB (۰.۰۳، ۰.۰۳، ۰.۰۳) مولار، ۲۵ میکرولیتر ماده ATCI (۰.۱۵، ۰.۰۳، ۰.۰۳) مولار، ۵۰ میکرولیتر از PBS با (pH ۸) و در نهایت ۲۵ میکرولیتر نمونه فرکشن ۳۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون با غلظت های مختلف ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۶ میلی لیتر اضافه گردید. از آنجایی که اثرات مهاری آنزیم استیل کولین استراز توسط سم گونه مشابهی از شقایق های دریایی تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است لذا انتخاب دوزهای مختلف فرکشن مذکور بر اساس آزمون و خطا بوده است. مقدار جذب هر یک از خانه ها در فواصل ۱۳ ثانیه به مدت ۱۰۴ ثانیه در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه گیری شد. پس از این مرحله به تمامی چاهک ها مقدار ۲۵ میکرولیتر آنزیم AChE (۰/۲۲) واحد در هر میلی لیتر اضافه شد و میکروپلیت داخل دستگاه قرار گرفت و میزان جذب چاهک ها در فواصل ۱۳ ثانیه تا ۱۰۴ ثانیه اندازه گیری شد. در نهایت منحنی میزان جذب در برابر زمان رسم شد و شیب خط به دست آمده که بیانگر میزان فعالیت آنزیم است، محاسبه شد. لازم به ذکر است که در این آزمون، از حلال PBS به عنوان کنترل منفی و از چاهک هایی با حضور فرکشن ۳۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. فعالیت آنزیم مذکور با مقیاس نانومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین نشان داده شد. همچنین با محاسبه درصد مهار آنزیم در حضور غلظت های مختلف فرکشن مورد نظر، غلظتی از فرکشن که توانایی مهار ۵۰ درصدی (IC₅₀) آنزیم استیل کولین استراز را داشت محاسبه و گزارش گردید.

رده سلولی و کشت سلول

جهت بررسی فعالیت کاسپازی فرکشن مورد نظر شقایق دریایی از رده سلول سرطان سینه انسانی MCF7 (C135) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. محیط کشت سلول ها شامل RPMI 1640 (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum; Gibco, NY, USA) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین (Sigma Aldrich, USA) بود. جهت اطمینان از عدم وجود هرگونه آلودگی باکتریایی و قارچی، سلول های کشت داده شده با رنگ تریپان بلو رنگ آمیزی شد؛ سپس شمارش و نهایتاً با میکروسکوپ فاز متضاد مشاهده شدند.

فعالیت کاسپازی

سلول های MCF7 به تعداد تقریبی 1×10^6 سلول در فلاسک های ۲۵ سی سی کشت داده و به هر یک ۳ میلی لیتر محیط کشت کامل اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت رویی فلاسک تخلیه و به میزان ۳ میلی لیتر از فرکشن ۳۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون با غلظت های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر و به تعداد ۳ تکرار به ازای هر تیمار اضافه گردید و به انکوباتور CO₂ با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد. به منظور کمی نمودن میزان فعالیت کاسپاز ۳ عصاره سلول های تیمار شده با فرکشن مورد نظر شقایق دریایی از کیت کالریمتریکی سنجنش کاسپاز (Annexin-FITC, Abnova, Taiwan) استفاده شد.

به این ترتیب که بر اساس دستورالعمل پیشنهادی کیت، پس از تیمار سلول ها به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط کشت روی سلول ها خارج گشته و سلول ها تریپسینه شدند. پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰ RPM، رسوب سلولی دو بار با ۱ میلی لیتر PBS سرد با ۱۵۰۰ RPM شست و شو داده شد و پس از هر بار شست و شو مجدداً سانتریفیوژ انجام شد و مایع رویی تخلیه شد. به رسوب سلول های نشین شده ۵۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در یخ انکوبه شدند. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۱۰۰۰۰ RPM، سوپرناتانت حاصل به یک میکرو تیوب جدید در یخ منتقل شد تا جهت اندازه گیری میزان پروتئین کل به روش BCA و سپس سنجنش فعالیت کاسپاز مورد استفاده قرار گیرد. پس از تعیین میزان پروتئین کل هر نمونه به روش BCA، ۲۰۰ میکروگرم پروتئین سنجنش شده از هر نمونه محاسبه و در بافر لیز کننده به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رقیق گردید و نهایتاً به داخل یکی از چاهک های پلیت ۹۶ خانه منتقل شد. همچنین ۵۰ میکرو لیتر بافر واکنش (2X Reaction Buffer) حاوی DTT ۱۰ میلی مولار و سپس ۵ میکرولیتر سوپسترای DEVD-pNA با غلظت ۴ میلی مولار به هر چاهک اضافه گردید. به این ترتیب محلول سنجنش برای هر نمونه با حجم نهایی ۱۰۵ میکرولیتر برای هر چاهک تهیه شد.

در سنجش کالریمتریک کاسپاز، فعالیت پروتئازی کاسپاز بر اساس شناسایی و شکست توالی آمینواسیدی سوبسترای کالریمتریک ویژه هر کاسپاز اندازه‌گیری می‌شود. pNA (p-Nitroanilide) به محض شکسته شدن توسط کاسپاز، نور زردرنگی تولید می‌کند که در طول موج ۴۰۵ نانومتر می‌تواند آشکار گردد. سرانجام پلیت ۹۶ خانه حاوی محلول‌های سنجش برای نمونه‌های مختلف به مدت ۲ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد CO₂ قرار داده شد. میزان جذب نمونه‌های موجود در پلیت توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت کاسپاز نیز با مقایسه نتایج با جذب نمونه‌های کنترل تعیین گردید.

آنالیز آماری

در این پژوهش برای تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۷ و Microsoft Office Excel 2010 استفاده شد. پس از تعیین نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیروف، از آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف بین داده‌های به‌دست‌آمده از شقایق دریایی استفاده شد و در صورت معنادار بودن، پس‌آزمون Duncan مورد استفاده قرار گرفت. تمامی داده‌ها به شکل میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

نتایج

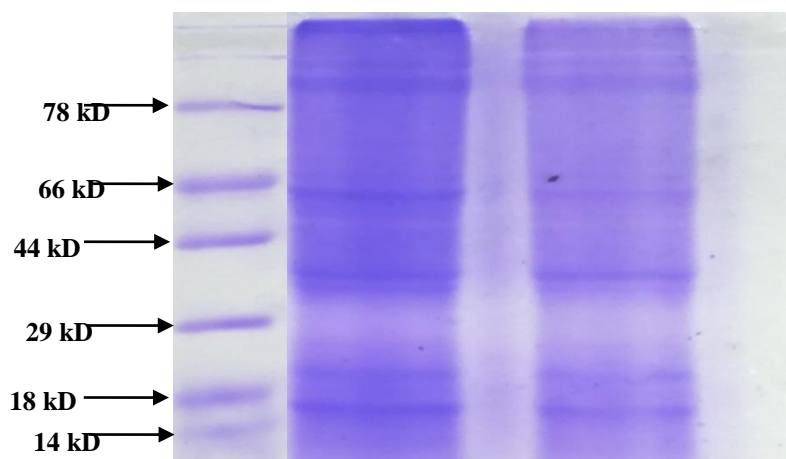
اندازه‌گیری پروتئین کل بر اساس غلظت‌های مختلف محلول‌های استاندارد، میزان جذب و منحنی استاندارد میزان پروتئین کل در فرکشن‌های مختلف در جدول ۱ قابل مشاهده است. از آنجایی که بیشترین میزان پروتئین در فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتونی به دست آمد لذا از این فرکشن جهت بررسی اثرات مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز و نیز سنجش فعالیت کاسپاز ۳ استفاده شد.

جدول ۱. میزان پروتئین کل در دو فرکشن به‌دست‌آمده از عصاره خام بخش دهانی شقایق دریایی *S. haddoni*

نوع ماده	غلظت پروتئین کل (µg/ml)
فرکشن ۱ (وزن مولکولی >۱۰۰ kD)	۲۷±۱۳۰۵
فرکشن ۲ (وزن مولکولی ۱۰۰-۳۰ kD)	۱۵±۲۱۵۴

الکتروفورز پروتئین SDS-PAGE

الکتروفورز عصاره خام بافر فسفاتاتی در ژل پلی‌اکریل‌امید در حضور سدیم دو دسیل سولفات SDS-PAGE ۱۲٪ تریس گلیسین نشان‌دهنده تعداد زیادی باند واضح و پررنگ به‌خصوص در ناحیه ۳۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون بود (شکل ۲).

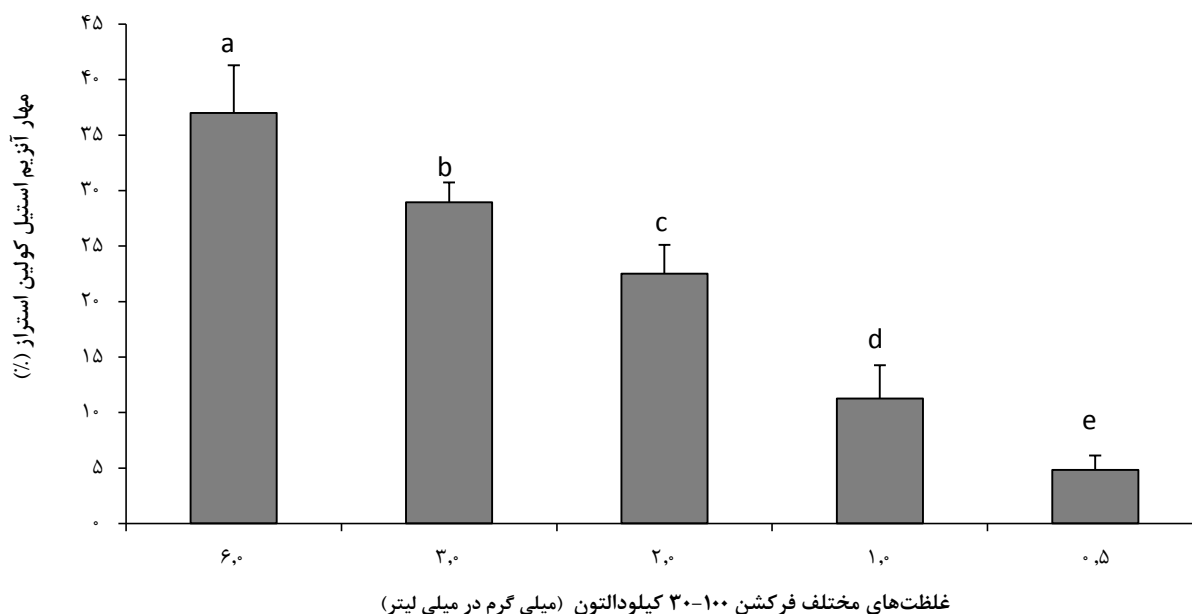


شکل ۲. باندهای پروتئینی مشاهده شده بر روی ژل الکتروفورز پلی‌اکریل‌امید ۱۲٪ تریس گلیسین مربوط به عصاره خام بافر فسفاتاتی تهیه شده از صفحه دهانی شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* اوترانسفرین (۷۸ کیلو دالتون)، آلبومین گاوی (۶۶ کیلو دالتون)، اوآلبومین (۴۴ کیلو دالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلو دالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلو دالتون) و لیزوزیم (۱۴ کیلو دالتون).

اثرات مهاری آنزیم استیل کولین استراز

فرکشن تهیه شده از عصاره خام بافر فسفات‌ی صفحه دهانی شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* دارای پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بین ۳۰ و ۱۰۰ کیلو دالتون با غلظت‌های ۰/۵ تا ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای اثرات مهاری بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بود. نتایج نشان داد افزایش غلظت فرکشن مذکور موجب افزایش مهار و کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد (شکل ۳). بیشترین درصد مهار آنزیم (۳۶/۹±۴/۳ درصد) در حضور غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فرکشن موردنظر بوده است (جدول ۲). درحالی‌که کمترین درصد مهار آنزیم استیل کولین استراز (۴/۸±۱/۳) در حضور غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از فرکشن مورد آزمایش قرار گرفته بود (جدول ۲). روند صعودی افزایش مهار آنزیم استیل کولین استراز به‌صورت معنادار برای هر ۵ غلظت (۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۶ میلی‌لیتر بر میلی‌گرم) فرکشن با وزن مولکولی بین ۳۰ و ۱۰۰ کیلو دالتون مشاهده گردید (شکل ۳). ضمن آنکه میزان IC₅₀ فرکشن ۳۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون که نشان‌دهنده غلظتی است که موجب مهار ۵۰ درصدی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد، ۸/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

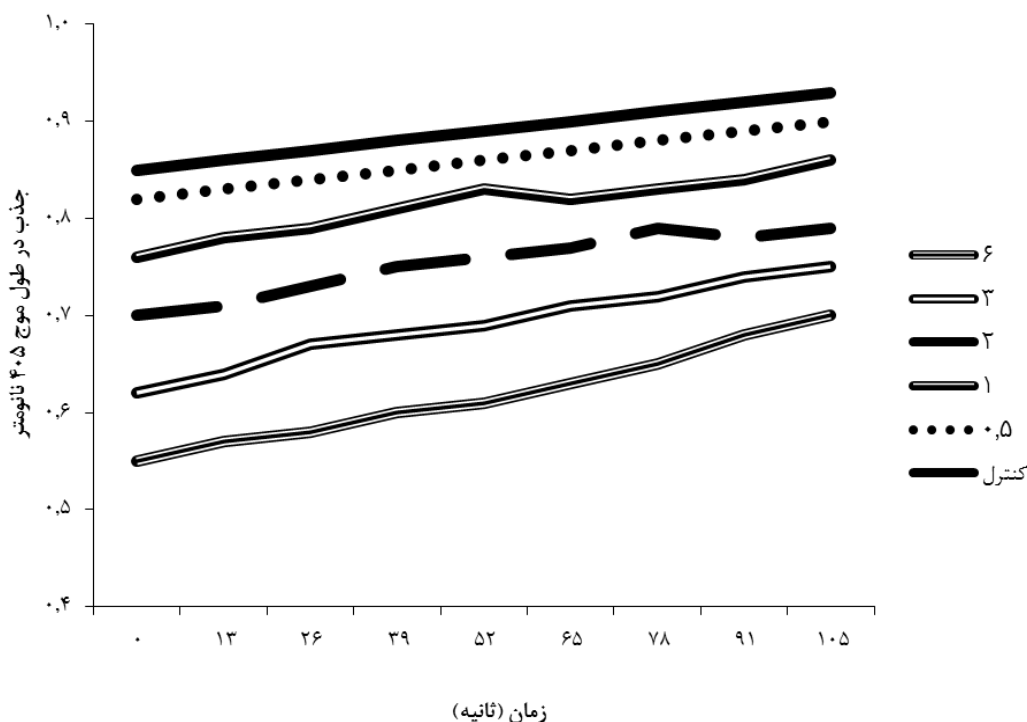
میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر در حضور غلظت‌های مختلف فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتون نشان داد در تمامی تیمارها با افزایش زمان میزان جذب افزایش یافت (شکل ۴). درمجموع میزان جذب با افزایش غلظت فرکشن مذکور کاهش یافت. بیشترین میزان جذب در تیماری مشاهده شد که به‌عنوان کنترل و بدون حضور فرکشن ۱۰۰-۳۰ بود. پس از کنترل، به ترتیب بیشترین میزان جذب در تیمارهایی با حضور فرکشن ۱۰۰-۳۰ با غلظت‌های ۶، ۳، ۲، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۴).



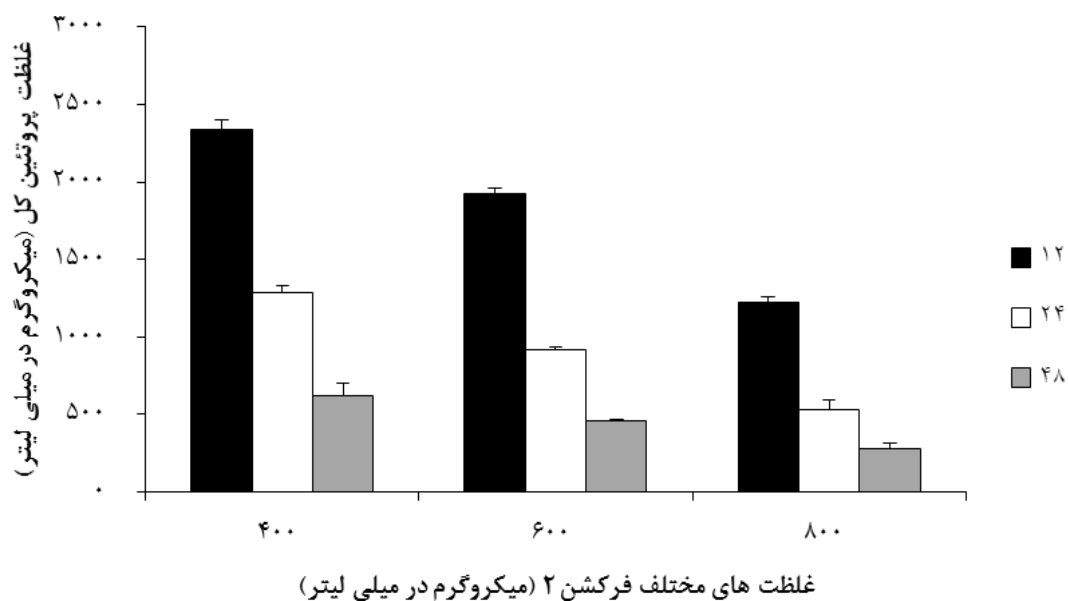
شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتون بخش دهانی شقایق دریایی *S. haddoni* بر مهار آنزیم استیل کولین استراز.

جدول ۲. درصد مهار آنزیم استیل کولین استراز در حضور فرکشن تهیه شده از عصاره خام بافر فسفات‌ی

درصد مهار AChE	غلظت‌های مختلف فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتون (mg/ml)
^a ۱/۳±۴/۸	۰/۵
^b ۳/۰±۱۱/۲	۱
^c ۲/۶±۲۲/۵	۲
^d ۱/۸±۲۸/۹	۳
^e ۴/۳±۳۶/۹	۶



شکل ۴. میزان جذب در غلظت‌های مختلف فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتون بخش دهانی شقایق دریایی *S. haddoni* و کنترل با گذشت زمان.

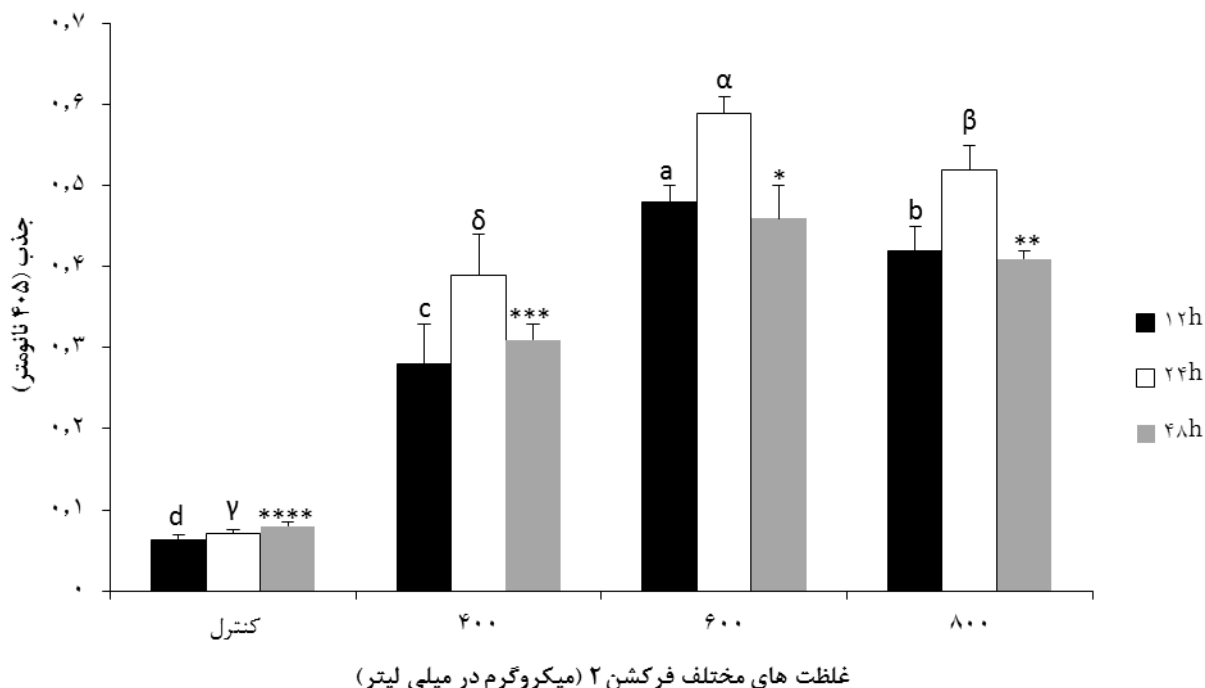


شکل ۵. میزان پروتئین کل در غلظت‌های مختلف فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلودالتونی شقایق دریایی *S. haddoni*

اثرات کاسپازی

میزان پروتئین کل حاصل از لیز شدن سلول سرطانی MCF7 تیمار شده به‌وسیله غلظت‌های مختلف فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتونی شقایق دریایی *S. haddoni* در زمان‌های مختلف در شکل ۵ آورده شده است. نتایج بررسی میزان فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی MCF7 تیمار شده با غلظت ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتون صفحه دهانی *S. haddoni* نشان داد که پروتئین کاسپاز ۳ فعالیت معنی‌داری را در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد تیمار

سلول MCF7 از خود نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۶). غلظت ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در فرکشن موردنظر بعد از گذشت هر سه زمان، بیشترین فعالیت کاسپازی را از خود بروز داد ($P < 0.05$) (شکل ۵). همچنین بعد از گذشت ۲۴ ساعت تیمار سلول MCF7، بیشترین فعالیت کاسپازی در مقایسه با دو زمان دیگر در هر سه غلظت دیده شد ($P < 0.05$) (شکل ۶).



شکل ۶. میزان فعالیت کاسپازی فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتون صفحه دهانی شقایق دریایی *S. haddoni* در زمان‌های مختلف.

بحث

در تحقیق حاضر، فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلودالتونی به‌دست‌آمده از عصاره خام صفحه دهانی شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* باعث مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و فعالیت معنادار کاسپاز ۳ در سلول سرطانی سینه MCF7 شده است. مطالعات اندکی در این زمینه انجام گرفته است و نتایج حاصل از آن‌ها با آنچه در پژوهش حاضر به اثبات رسیده است همخوانی دارد. طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ به‌وسیله Ayed و همکاران بر روی ژله فیش مدیترانه‌ای به نام *Pelagia noctiluca* انجام گرفت نشان داد که سم این جانور به‌صورت خام فعالیت آنزیم *(BuChe) antitubetylcholinestrasic* را در سه غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۹/۵، ۲۹/۵ و ۵۶/۴ درصد کاهش داد و فعالیت ضد آنزیمی و ضد آلرژیکی آن گزارش شد. در همین مطالعه فرکشن‌های ۱ و ۲ تهیه شده از سم خام این جانور به ترتیب موجب مهار آنزیم *BuChe* به ترتیب ۱۰/۲، ۲۴ و ۵۴/۱ درصد و از تأثیر فرکشن ۲ موجب مهار ۱، ۴۴/۵، ۵۹/۴ و ۶۷/۵ درصدی گردید. در مطالعه دیگری *Gomaa* و همکاران در سال ۲۰۱۵، سم حاصل از شقایق دریایی گونه *Gyrostoma helianthus* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد عصاره خام سم و فرکشن‌های ۱/۵، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ کیلو دالتونی حاصل از آن دارای اثرات مهاری آنزیم استیل کولین استراز بود و فرکشن ۰/۵ کیلو دالتونی دارای بیشترین درصد مهاری (۴۳/۳٪) بود. در تحقیق حاضر، غلظت ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از فرکشن ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتون شقایق دریایی دارای بیشترین مهار (۳۶/۹ درصد) آنزیم استیل کولین استراز بود. به نظر می‌رسد مهار آنزیم استیل کولین استراز به‌وسیله سم گونه مورد تحقیق، توسط اثر مستقیم سم بر روی ساختار آنزیم از طریق اتصال به جایگاه فعال آنزیم موجب اختلال در عملکرد آنزیم شده است. گزارشی مبنی بر چگونگی مکانیسم عمل اثر مستقیم سم شقایق‌های دریایی و یا سایر مرجانیان بر روی ساختار آنزیم استیل کولین استراز موجود نیست. از آنجایی‌که نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین نشان‌دهنده مهار فعالیت کانال‌های سدیمی، پتاسیمی و کلسیمی تیمار با سموم استخراج شده از انواع شقایق‌های دریایی است، لذا با توجه به وابستگی فعالیت آنزیم استیل کولین

استراز و کانالهای یونی از جمله کانال کلسیمی به نظر می‌رسد مهار کانال‌های یونی موجب مهار آنزیم استیل کولین استراز گردیده است.

درباره فعالیت کاسپازی می‌توان اشاره نمود که بر اساس گزارش Ramezanzpour و همکاران در سال ۲۰۱۴ سم *Holothuria magnifica* توانست با فعال کردن مسیر کاسپاز موجب القا مرگ در سلول شود. سم *H. magnifica* به‌طور مشخص سطح کاسپاز ۳/۷ در لاین‌های سلولی T47D و MCF7 را افزایش داد و موجب القا آپوپتوز شود. همچنین Ramezanzpour و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند سم *H. magnifica* به‌وسیله از دست دادن پتانسیل غشای میتوکندری سلول‌های ریه انسان A549 منجر به آپوپتوز می‌شود. از طرفی، گزارش شده است که سلول‌های MCF7 در پاسخ به تیمار با داروی ضد سرطانی افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در سطح کاسپاز و نیز افزایشی در فاز sub-G1 ۳ نشان ندادند (Lu et al., 2005; Jänicke et al., 1998). در مطالعه حاضر، سموم پروتئینی شقایق دریایی در محدوده ۱۰۰-۳۰ کیلو دالتون توانستند فعالیت کاسپازی قابل‌ملاحظه‌ای را در مقایسه با کنترل، بعد از گذشت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار سلول سرطانی سینه MCF7 نشان دهند. در غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و زمان ۲۴ ساعت، بهترین عملکرد معنادار کاسپازی سم پروتئینی شقایق دریایی *S. haddoni* دیده شد.

در مجموع می‌توان بیان نمود که بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر، سموم پروتئینی شقایق دریایی حاضر در خلیج فارس *S. haddoni* به خصوص با وزن مولکولی ۱۰۰-۳۰ کیلودالتونی ممکن است در کنترل بیماری آلزایمر با مهار فعالیت استیل کولین استراز و القا آپوپتوز در سلول سرطانی MCF7 با توجه به فعالیت کاسپازی آن، مؤثر باشند.

منابع

- Anderluh, G., Maček, P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*. 40(2): 111-124.
- Antuch, W., Berndt, K.D., Chavez, M.A., Delfin, J., Wuthrich, K. 1993. The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *The FEBS Journal*. 212(3): 675-684.
- Ayed, Y., Dellai, A., Mansour, H.B., Bacha, H., Abid, S. 2012. Analgesic and antibutyrylcholinesterase activities of the venom prepared from the Mediterranean jellyfish *Pelagia noctiluca* (Forsskal, 1775). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 11(15): 1-8.
- Bosmans, F., Tytgat, J. 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon*. 49(2): 142-158.
- Cory, S., Strasser, A., Jacks, T., Corcoran, L.M., Metz, T., Harris, A.W., Adams, J.M. 1994. Enhanced cell survival and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 59: 365-75.
- Delfin, J., Gonzalez, Y., Diaz, J., Chavez, M. 1994. Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: purification, characterization and immobilization. *Archives of Medical Research*. 25(2): 199-204.
- Dlamini, Z., Mbita, Z., Zungu, M. 2004. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacology and Therapeutics*. 101(1): 1-15.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J.R., Feather-Stone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7(2): 88-90.
- Fautin, D.G., Crowther, A.L., Wallace, C.C. 2008. Sea anemones (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) of Moreton Bay. In: Davie, P.J.F., Phillips, J.A. (eds.). *Proceedings of the Thirteenth International Marine Biological Workshop, the Marine Fauna and Flora of Moreton Bay, Queensland*. Memoirs of the Queensland Museum. Nature. 54(1): 35-64.
- Garateix, A., Castellanos, M., Hernández, J., Más, R., Menendez, R., Romero, L., Chaves, M. 1992. Effects of a high molecular weight toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* on

- cholinergic responses. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology*. 103(2): 403-409.
- Ghadiri, M., Kazemi, S., Heidari, B., Rassa, M. 2018. Bioactivity of aqueous and organic extracts of sea cucumber *Holothuria leucospilota* (Brandt 1835) on pathogenic *Candida* and *Streptococci*. *International Aquatic Research*. 10(1): 31-43.
- Gomaa, M.N., Farag, A.M., Ayesh, A.M., Embaby, M.A. 2015. Isolation and structure elucidation of acetyl cholinesterase inhibitor from *Gyrostoma helianthus* of the Red Sea. *Journal of Cell and Animal Biology*. 9(2): 16-25.
- Grotendorst, G.R., Hessinger, D.A. 1999. Purification and partial characterization of the phospholipase A 2 and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon*. 37(12): 1779-1796.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*. 8(12): 536-544.
- Hay, S., Kannourakis, G. 2002. To kill: viral manipulation of cell death program. *Journal of General Virology*. 83(7): 1547-1564.
- He, F. 2011. BCA (bicinchoninic acid) protein assay. *Bio-protocol*. e44.
- Honardoost, M., Soleiman Jahi, H., Rajaii, F. 2013. Apoptosis: programmed cell death. *Journal Qazvin University of Medical Sciences*. 17(3): 48-57.
- Iran Alzheimer's Association. 2016. Available from <http://iranalz.ir>.
- Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 9357-9360.
- Karthikayalu, S., Rama, V., Kirubakaran, R., Venkatesan, R. 2010. Characterization, purification and phylogenetic analysis of a cytolysin from the sea anemone *Heteractis magnifica* of the Indian Ocean. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 16(2): 223-240.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- Lu, K.H., Lue, K.H., Chou, M.C., Chung, J. 2005. Paclitaxel induces apoptosis via caspase-3 activation in human osteogenic sarcoma cells (U-2 OS). *Journal of Orthopaedic Research*. 23: 988-989.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. 2000. Apoptosis in development. *Nature*. 12(407): 769-801.
- Minagawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K. 1998. Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *FEBS Letter*. 427(1): 149-151.
- Pandey, K. 2012. Potent bioactive compounds from the ocean: some interesting aspects and applications. *Pharmacognosy Journal*. 4(27): 1-5.
- Ramezani, M., da Silva K.B., Sanderson, B.J.S. 2014. Marine bioactive products as anti-cancer agents: effects of sea anemone venom on breast and lung cancer cells. *Cancer Cell and Microenvironment*. 1: 14-16.
- Ramezani, M., da Silva, K.B., Sanderson, B.J.S. 2012. Differential susceptibilities of human lung, breast and skin cancer cell lines to killing by five sea anemone venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 18: 157-163.
- Ramezani, M., da Silva, K.B., Sanderson, B.J.S. 2014. Venom present in *Heteractis magnifica* induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria-mediated pathway. *Biotechnology Letters*. 36(3): 489-495.
- Schwerk, C., Schulze-Osthoff, K. 2003. Non apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical Pharmacology*. 66(8): 1453-1458.
- Shekarchi, M., Hajimehdipour, H., Naghibi, F., Ara, L., Moazzeni Zehan, H. 2013. Investigating acetylcholinesterase inhibitory effects of some *Ferula* species. *Journal of Medicinal Plants*. 2(46): 106-112. (in Persian)
- Smith, J.J., Blumenthal, K.M. 2007. Site-3 sea anemone toxins: molecular probes of gating mechanisms in voltage-dependent sodium channels. *Toxicon*. 49(2): 159-170.
- Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 276(5203): 1445-1449.

- Steller, H. 1998. Artificial death switches: induction of apoptosis by chemically induced caspase multimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(10): 5421-5422.
- Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology and Therapeutics*. 92(1): 57-70.
- Yavari, L., Heidari, B., Khodabandeh, S., Hadavi, M. 2018. Inhibitory effects of crude and filtered extracts from oral disk of sea anemone (*Stichodactyla haddoni*) on MCF-7 cell line. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. (in press)