● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۶، ص ۶۲۸-۶۱۴، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی رنگدانه و مایع سلومیک توتیای دریایی گونه Echinometra mathaei خلیج فارس

سولماز سلیمانی[۱]، مرتضی یوسف زادی[۲*]، سهیلا معین[۳]، نرگس امراللهی بیوکی[۴]

خلاصه

مقدمه: واکنش‌های ایمنی توتیای دریایی (Echinometra matheai) در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به صورت بروز سلول‌های ایمنی و فاکتورهای هومورال در مایع سلومیک است. همچنین، رنگدانه‌های هیدروکسیلات نفتوکینون (Hydroxylated naphthoquinone یا HNQ) توتیای دریایی ارغوانی نیز دارای فعالیت آنتی‌باکتریال، آنتی‌جلبک و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. با توجه به اهمیت بحث سلامت و برخی مضرات آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی موجود، هدف از مطالعه حاضر، بررسی برخی خواص زیستی (آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال و سیتوتوکسیک) مایع سلومیک و رنگدانه‌های استخراج شده از پوسته و خار توتیای دریایی ارغوانی (که بدون هیچ کاربردی دور ریخته می‌شوند) بود.

روش: در این مطالعه آزمایشگاهی، مایع سلومیک با روش بافره و رنگدانه پوسته و خار به کمک کلرید هیدروژن (HCl یا Hydrogen chloride) از توتیای دریایی استخراج شد. سپس خواص آنتی‌اکسیدانی [قدرت احیاکنندگی، مهار رادیکال آزاد DPPH (1, 1-diphenyl 2-picryhydrazyl) و میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی]، آنتی‌باکتریال و سیتوتوکسیک (تست Artemia) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: سلول‌های آزاد مایع سلومیک در تمام روش‌های آنتی‌اکسیدانی بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سلوموسیت لیزات بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریال را داشت. یافته‌ها اختلاف معنی‌داری را در سطح $P < ۰/۰۵$ نشان داد.

نتیجه‌گیری: مایع سلومیک و رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی دارای پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی و توانایی خنثی‌سازی اثر سمیت می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌گردد، پوسته و خار توتیای دریایی که دور ریخته می‌شود، به عنوان منبع جدیدی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال، سیتوتوکسیک، توتیای دریایی، Echinometra mathaei

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران ۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی و گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران ۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** morteza110110@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۹/۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۳/۱۲/۶ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۲۴

مقدمه

محیط دریا منبع استثنایی تولیدات طبیعی از نظر زیستی می‌باشد و بسیاری از خصوصیات ساختمانی و شیمیایی را که در تولیدات طبیعی زمینی یافت نمی‌شود، از خود نشان می‌دهد. این محیط غنی‌ترین منبع و فرصت بزرگی برای کشف ترکیبات فعال زیستی جدید است. امروزه، تکنولوژی‌های مدرن راه تحقیق را برای کشف ترکیبات دارویی زیستی از اقیانوس‌ها و دریاها جهت درمان بیماری‌های کشنده و مهلک باز می‌کند. تعداد تولیدات طبیعی استخراج شده از ارگانیسم‌های دریایی به سرعت در حال افزایش می‌باشد و هر ساله با کشف صدها ترکیب جدید به تعداد آن‌ها افزوده می‌شود (۱).

بیش از یک قرن است که توتیاهای دریایی به عنوان ارگانیسم مدل برای تحقیقات علمی به کار می‌روند. این موجودات به طور قابل توجهی در بخش‌های مختلف علمی مانند فرایندهای بیولوژیک، تنظیم بیان ژن، جنین‌شناسی مولکولی، بیولوژی لقاح، بیولوژی سلولی، بیولوژی تکاملی، ژنتیک جمعیت و سم‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مقایسه با سایر ارگانیسم‌های بی‌مهره مانند کرم‌ها (Caenorhabditis elegan)، شباهت تاکسونومی توتیای دریایی به مهره‌داران از جمله انسان بسیار قابل توجه است (۲).

توتیای دریایی متعلق به شاخه خارپوستان و خانواده اکینوئید (Echinoidea) و از بی‌مهرگان دریایی است (۴، ۳). گونه‌های متنوعی از توتیاهای دریایی به طور وسیعی در اقیانوس‌های جهان و از منطقه جزر و مدی تا اعماق زیاد اقیانوس‌ها گسترده شده‌اند (۶، ۵). تاکنون بیش از ۸۰۰۰ گونه توتیای دریایی یافت شده است (۷) که هر یک دارای نقش‌های اساسی در اکوسیستم دریایی می‌باشند (۳). توتیای دریایی در منطقه کم عمق ساحلی خلیج فارس و دریای عمان و در عمق صفر تا پنج متری پشته‌های مرجانی، بسترهای صخره‌ای- مرجانی و بسترهای ماسه‌ای یافت می‌شود. این گونه دارای بیشترین فراوانی در میان گونه‌های دیگر توتیای دریایی است و بیشتر در ناحیه میانی و پایینی ساحل و کمتر در بالادست ساحل مشاهده می‌شود (۹، ۸). توتیای دریایی بدنی کروی شکل دارد و ارگان‌های داخلی آن در یک پوسته سخت قرار گرفته و به وسیله تعداد زیادی خارهای تیز پوشیده شده است (۴). حفره داخلی بدن اکینودرم‌ها نیز با مایع سلومیک پر شده است که ارگان‌های داخلی را شستشو و محیط مایع را تشکیل می‌دهد (۶).

ترکیب مایع سلومیک شبیه به آب دریا و محتوی پروتئین، نمک های محلول و دیگر مواد معدنی است (۶). واکنش‌های ایمنی این موجودات در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به صورت بروز سلول‌های ایمنی و فاکتورهای هومورال در مایع سلومیک می‌باشد (۳). در چنین مواقعی مایع سلومیک پاسخ‌های غیر مستقیمی به زخم، عفونت های میکروبی، انعقاد، کپسوله شدن و فاگوسیتوز می‌دهد (۶).

سه دسته از سلوموسیت ها در مایع سلومیک توتیای دریایی مشاهده شده است (۶) که شامل آمبوسیت ها، سلول های ارتعاشی و گویچه های کوچک قرمز و بی رنگ می‌باشد. آمبوسیت‌ها و گویچه‌های کوچک عمده سلوموسیت‌ها را تشکیل می‌دهند و به نظر می‌رسد در مقابل بسیاری از پاسخ های ایمونولوژی مانند فاگوسیتوز، سمیت سلولی، فعالیت آنتی باکتریال، واکنش های التهابی، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و جفت کردن واکنش ها مسؤولیت دارند (۳).

توتیاهای دریایی برای به دست آوردن گناد (که بخش خوراکی توتیا می‌باشد) صید می‌شوند (۱۰). گناد ارگانی زرد تا قهوه‌ایی رنگ و شامل پنج بخش به شکل نیمه ماه می‌باشد و حدود ۱۰ درصد وزن کل جانور را تشکیل می‌دهد. گناد توتیای دریایی به دلیل عطر متمایز و طعم خوب در کشورهای زیادی محبوب است (۷). اگرچه بعد از برداشتن گنادهای خوراکی، باقی‌مانده پوسته‌ها و خارها

دور ریخته می‌شود. این موجودات دارای رنگدانه‌های پلی‌هیدروکسیلات نفتوکینون (Polyhydroxylated naphthoquinone یا PHNQ) متنوعی از اسپینوکروم‌های شناخته شده هستند. همچنین، ترکیبات آن‌ها با اکینوکروم‌ها (که دارای اثر ضد باکتریایی هستند)، قابل مقایسه می‌باشد (۱۰).

وجود رنگدانه‌های نفتوکینون در اکینوئیدها به طور متناوب از سال ۱۸۸۳ به بعد ثبت شد. MacMunn برای اولین بار وجود رنگدانه اکینوکروم را در اکینوس (Echinus) گزارش کرد (۱۱). طی سی سال گذشته به تدریج معلوم شد که رنگدانه‌های متعددی در خارها و پوسته‌های اکینوئیدها وجود دارد. همچنین گزارش‌هایی در خصوص وجود محدود رنگدانه‌ها در بخش‌های دیگر مانند مایع سلومیک، تخم، تخمدان‌ها و دیگر ارگان‌ها ارایه شده است (۱۱). گروه‌های هیدروکسیل فنولیک موجود در رنگدانه‌ها بر نقش آن‌ها در فعالیت آنتی‌اکسیدانی اشاره می‌کند (۱۰). بنابراین، رنگدانه‌های هیدروکسیلات نفتوکینون (Hydroxylated naphthoquinone یا HNQ) توتیای دریایی ارغوانی دارای فعالیت آنتی‌باکتریال، آنتی‌جلبک، ضد قلبی-عروقی و آنتی‌اکسیدانی (۷) همچون فعالیت ضد رادیکالی در برابر DPPH (1, 1-diphenyl 2-picryhydrazyl)، رادیکال آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن است (۴). از این‌رو، پیشنهاد می‌گردد پوسته و خار توتیای دریایی که بعد از خارج کردن گناد بدون استفاده دور ریخته می‌شود، به عنوان یک منبع زیستی فعال جدید و آنتی‌اکسیدان طبیعی (۵) در نظر گرفته شود.

آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که می‌توانند با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، از تخریب جلوگیری کنند (۱۲). رادیکال‌های آزاد یک یا چند الکترون غیر جفت در اوربیتال خالی دارند و شامل آنیون سوپراکسید (O-2)، هیدروکسیل (HO)، پراکسیل (ROO)، آلکوکسی (RO)، پراکسید هیدروژن (H2O2) و نیتریک اکسید (NO) می‌باشد که اکسیژن مرکزی این رادیکال‌های آزاد به عنوان ROS (Reactive oxygen species) شناخته می‌شود (۱۴، ۱۳).

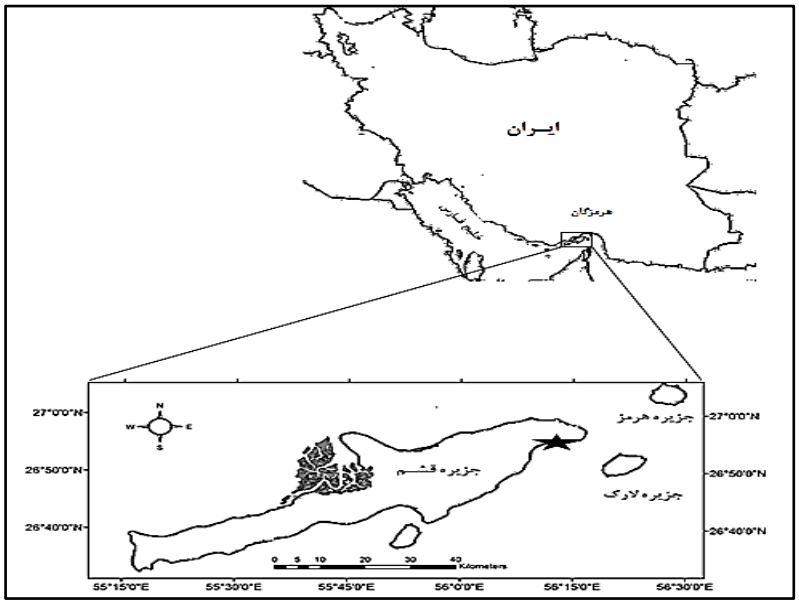
تولید ROS و RNS (Reactive nitrogen species) که می‌تواند باعث آسیب بافت سلولی و آغاز پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاهای زیستی شود، غیر قابل کنترل می‌باشد. بافت آسیب دیده توسط ROS ممکن است باعث تخریب RNA (Ribonucleic acid) و DNA (Deoxyribonucleic acid)، تخریب پروتئین و اکسیداسیون آنزیم‌های مهم در بدن انسان شود (۱۶-۱۴).

استرس اکسیداتیو تولید شده به وسیله ROS، نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌های مزمن و مخرب (۱۷) همچون سرطان، بیماری‌های کبدی، آلزایمر، آرتریت، پارکینسون، بیماری‌های قلبی و عروقی و ایدز (۱۶)، پیری سلولی، جهش (۱۳)، بیماری کرونر قلبی، التهاب، سکته، دیابت شیرین (۱۴)، بیماری‌های مخرب سیستم عصبی (۱۷) و بیماری‌های خودایمنی (۱۲) ایفا می‌کند. بنابراین، انتظار می‌رود آنتی‌اکسیدان‌هایی که می‌توانند ROS را مهار کنند، بتوانند این اختلالات را نیز بهبود بخشند (۱۸) و این امر می‌تواند منجر به یک تحول عظیم در علم پزشکی شود (۱۲). به هر حال، توجه به اهمیت سلامتی و آگاهی از مصرف مضر آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی مانند BHT (Butylated hydroxytoluene) و BHA (Butylated hydroxyanisole) و ... منجر به افزایش تقاضا برای مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شده است (۱۶، ۱۵).

با توجه به اهمیت بحث سلامت و برخی مضرات آنتی اکسیدان های مصنوعی موجود، هدف از مطالعه حاضر بررسی برخی خواص زیستی (آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریال و سیتوتوکسیک) مایع سلومیک و رنگدانه‌های استخراج شده از پوسته و خار توتیای دریایی ارغوانی (که بدون هیچ کاربردی برای آینده دور ریخته می‌شوند) بود.

روش بررسی

توتیاهای دریایی گونه E. mathaei در فروردین ماه سال ۱۳۹۲ از ناحیه بین جزر و مدی ساحل پارک زیتون واقع در جزیره قشم خلیج فارس جمع‌آوری شد (شکل ۱) و با حفظ شرایط بیولوژیک و به صورت زنده در آب دریا به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه هرمزگان منتقل گردید.



شکل ۱. مکان نمونه‌برداری توتیای دریایی در جزیره قشم خلیج فارس

مایع سلومیک توتیای دریایی پس از برش غشای پریستومیال (Peristomial)، با استفاده از سرنگ ظریف (سوزن شماره ۱۸)، جمع آوری و در داخل ظروف استریل در یخچال نگهداری شد. مایع سلومیک با استفاده از محلول ایزواسموتیک و ضد انعقاد ۲۰ میلی مولار Tris، ۰/۱۵ مولار NaCl (کلرید سدیم) و ۷۰ میلی مولار EDTA-Na (Ethylenediaminetetraacetic acid-Na) در pH = ۷/۵ به صورت بافر استخراج گردید که در آن تنها یک بار سرنگ از بافر پر و خالی و یک میلی لیتر بافر نیز در ظرف محتوی مایع سلومیک ریخته شد. مایع سلومیک بلافاصله پس از استخراج به مدت ۱۰ دقیقه (با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد) سانتریفوژ (شرکت سیگما، آلمان) و پس از آن فاز مایع که در واقع سلول‌های آزاد مایع سلومیک (Coelomic fluid یا CF) بودند، از سلوموسیت‌ها (فاز جامد ته‌نشین شده) جدا گردید. پلیت محتوی سلوموسیت در بافر حل شد و برای ۴ دقیقه در معرض سونیکت (WiseClean، کره جنوبی) در دمای صفر درجه سانتی‌گراد (یک ضربه در ثانیه) قرار گرفت و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس فاز مایع جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۳).

جداسازی رنگدانه‌های پوسته و خار توتیای دریایی طبق روش Kuwahara و همکاران صورت پذیرفت (۷، ۵). ابتدا نمونه‌ها تشریح و ارگان‌های داخلی آن‌ها برداشته شد. سپس پوسته‌های توتیای دریایی با آب مقطر سرد شسته و برای دو روز در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. خارهای توتیای دریایی نیز با آب مقطر سرد شسته و به مدت ۲۴ ساعت در فریز دراير قرار گرفت. سپس به

پوسته و خار توتیای دریایی به صورت جداگانه ۱۰۰ میلی‌لیتر کلرید هیدروژن ۰/۶ مولار (در دمای آزمایشگاه) اضافه و اندکی بعد دی‌اتیل اتر با حجمی برابر با میزان کلرید هیدروژن به آن اضافه شد. سپس فاز دی‌اتیل اتر را جدا کرده، به آن کلرید سدیم ۵ درصد با حجمی برابر با دی‌اتیل اتر اضافه گردید. در نهایت، دی‌اتیل اتر به کمک دستگاه روتاری و در شرایط خلأ تبخیر شد. رنگدانه ها پس از حل شدن در DMSO (Dimethyl sulfoxide)، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمایش حاضر بر مبنای احیا کردن کلرید آهن III (سه ظرفیتی) به کلرید آهن II (دو ظرفیتی) توسط عصاره‌ای که دارای قدرت احیایی است، مورد ارزیابی قرار گرفت. تبدیل رنگ زرد به سبز یا آبی تیره مبنای سنجش بود.

توانایی عصاره‌ها برای احیای آهن سه ظرفیتی طبق روش Duan و همکاران تعیین شد (۱۵). در این روش، ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH = ۶/۶) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم (۱ درصد) مخلوط شد و برای ۲۰ دقیقه در حمام آب (Wise Bath، کره جنوبی) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط را برداشته، ۱/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (۱۰ درصد)، ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲۵ میلی‌لیتر کلرورفریک (۰/۱ درصد) به آن اضافه گردید. بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. افزایش جذب نمونه‌ها به معنی افزایش قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها می‌باشد. از آب مقطر به عنوان بلانک و از اسکوربیک اسید نیز به عنوان استاندارد استفاده گردید.

DPPH یک رادیکال آزاد است که در وجود مواد دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و با گرفتن الکترون تغییر رنگ می‌دهد. تغییر رنگ آن از بنفش به زرد مبنای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدان می‌باشد.

توانایی مهار رادیکال آزاد طبق روش معین و همکاران انجام شد (۱۹). به طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف (۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ میلی‌مولار DPPH (حل شده در متانول) مخلوط شد و بعد از ورتکس، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی نگهداری گردید. جذب نمونه در دستگاه ELISA reader و در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در کنترل، متانول به جای محلول عصاره و در بلانک، متانول به جای DPPH استفاده شد. در نهایت، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد مهار رادیکال آزاد ۱ - = (As-A0/A) × ۱۰۰

که در آن، As جذب مخلوط واکنش، A0 جذب بلانک و A جذب کنترل می‌باشد. BHT نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها طبق روش Vijayabaskar و همکاران تعیین شد (۲۰). 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 گردید و با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از محلول معرف مخلوط شد و پس از ورتکس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. افزایش جذب نمونه‌ها به معنی افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها می‌باشد. آب مقطر به عنوان بلانک و اسکوربیک اسید نیز به عنوان استاندارد استفاده گردید.

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در مطالعه حاضر (جدول ۱) که از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی محسوب می‌شوند، از مؤسسه پاستور تهران تهیه شدند.

جدول ۱. باکتری‌های استفاده شده در آزمایش

نام باکتری	واکنش گرم
Bacillus subtilis	گرم مثبت
Bacillus pumilus	گرم مثبت
Staphylococcus aureus	گرم مثبت
Vibrio alginolyticus	گرم منفی
Vibrio logei	گرم منفی
Serratia marcescens	گرم منفی
Escherichia coli	گرم منفی

از تمام سویه‌های باکتری با روش خطی پلیت تهیه شد. سپس در شرایط استریل و در کنار شعله، از پلیت کشت باکتری تک کلونی برداشته و در لوله‌های حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لاکتوز براث کشت داده شد. جهت رشد باکتری، لوله‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت، میزان کدورت محیط حاوی باکتری در حال رشد با استاندارد McFarland standard ۰/۵- مقایسه گردید که این سوسپانسیون محتوی حدود ۱۰۸ × ۱/۵ واحد کلونی باکتری در میلی‌لیتر بود.

در مطالعه حاضر، جهت تعیین کمترین غلظت بازدارنده (Minimum inhibitory concentration یا MIC) رشد باکتری‌ها توسط مایع سلومیک و رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی، از لوله‌های آزمایش به شکل رقت سریال شش‌تایی استفاده گردید؛ به طوری که در هر لوله ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به همراه غلظت‌های مناسب از عصاره‌ها (برای رنگدانه‌ها ۱۰۰۰-۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای مایع سلومیک ۴۰۰-۱۲/۵ میکرولیتر) وجود داشته باشد. استوک تهیه شده از باکتری (دارای غلظت برابر با استاندارد McFarland standard ۰/۵-) با استفاده از محیط کشت مایع، ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. سپس مقدار یک میلی‌لیتر به تمام لوله‌ها (به استثنای لوله‌های کنترل) اضافه گردید. در مرحله آخر، لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای تعیین مقدار MIC، اولین لوله‌ای که کدورتی ندارد و به بیان دیگر، رشد باکتری در آن مشاهده نمی‌شود، به عنوان عدد MIC منظور می‌گردد (۲۱).

در این روش سه کنترل «کنترل محتوی محیط کشت و باکتری جهت تعیین کدورت باکتری، کنترل محتوی محیط کشت و عصاره جهت حذف رنگ عصاره و کنترل محتوی محیط کشت جهت اطمینان از عدم آلودگی در محیط کشت» در نظر گرفته شد.

ابتدا ۱ گرم از سیست خشک Artemia به مدت یک ساعت در ۳۰ سی‌سی آب لوله‌کشی هیدراته شد. سپس با کاغذ صافی از آب جدا و به ظرف استوانه‌ای شکل حاوی ۵۰۰ سی‌سی آب دریای مصنوعی با شوری ppm ۳۵ و دمای ۱ ± ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. ظرف حاوی آب دریا و سیست به مدت ۲۸ ساعت هوادهی و نوردهی (نور فلورسنت با شدت ۱۰۰ mE/m2/s) شد (۲۲). پس از ۲۸ ساعت سیست‌ها Hatch شدند. در این مرحله، هوادهی و نوردهی قطع شد و با استفاده از نورگرایی نقطه‌ای، لاروهای تازه Hatch شده در مرحله اینستار I از سیست‌ها جدا شده و به ظرف جداگانه‌ای منتقل شدند.

ارزیابی سمیت عصاره‌ها بر روی Artemia salina طبق روش Ferreira و همکاران با اندکی تغییر انجام شد (۲۳). در این روش ابتدا محلول‌های استوک رنگدانه‌های پوسته و خار در DMSO آماده شد؛ در حالی که مایع سلومیک به دلیل مایع بودن نیازی به حل شدن نداشت. سپس غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای رنگدانه‌ها و حجمی برابر با این غلظت‌ها برای مایع سلومیک استفاده شد. این تست در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای انجام

شد. به این ترتیب که در هر چاهک از هر غلظت ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد (برای مایع سلومیک حجمی برابر با غلظت‌ها) و در نهایت، حجم هر چاهک به کمک آب دریا محتوی لارو تازه Hatch شده Artemia به یک میلی‌لیتر رسانده شد. به دلیل سمی بودن DMSO، به همان میزان (۱۰۰ میکرولیتر) برای رنگدانه‌ها و بافر (بافر استفاده شده در مرحله استخراج مایع سلومیک) حجمی برابر با مایع سلومیک به کار رفته در تست، در کنترل ریخته شد. در آخر میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و پس از آن تعداد Artemia زنده و تعداد کل آن‌ها در هر چاهک شمارش گردید. درصد سمیت از فرمول زیر محاسبه شد:

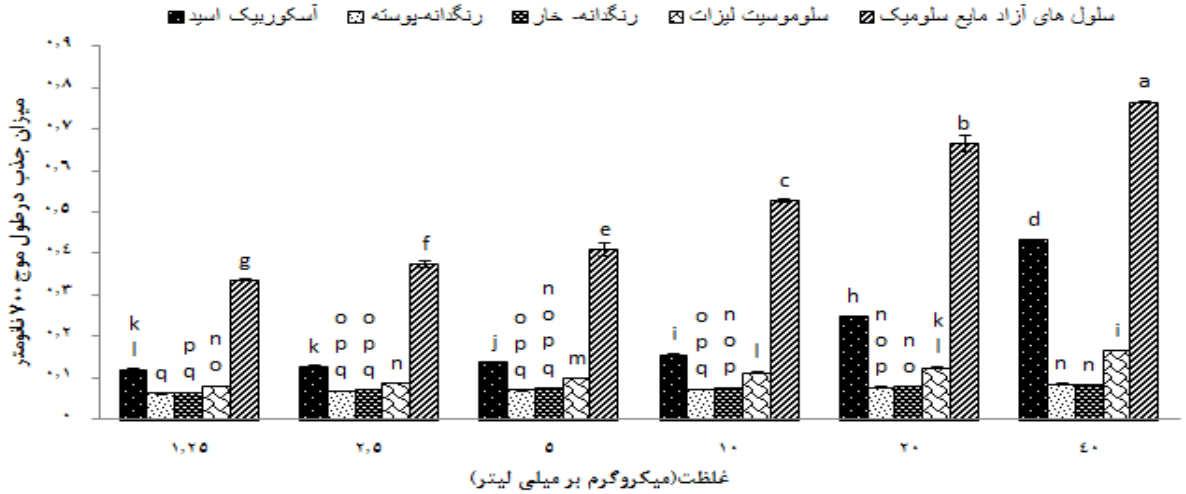
۱۰۰ × [(تعداد لارو زنده در کنترل/ (تعداد لارو زنده در Artemia – تعداد لارو زنده در کنترل)]

تحلیل آماری داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس‌ها (ANOVA) و همچنین مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه ای Duncan در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) استفاده شد.

نتایج

مقایسه توانایی قدرت احیاکنندگی مایع سلومیک و رنگدانه خار و پوسته توتیای دریایی با اسکوربیک اسید به عنوان استاندارد در شکل ۲ نشان داده شده است.

بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی در برابر اسکوربیک اسید به عنوان استاندارد در سلول‌های آزاد مایع سلومیک در حجم ۴۰۰ میکرولیتر و کمترین میزان در رنگدانه پوسته در غلظت ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده گردید؛ این در صورتی است که رنگدانه خار در غلظت ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و رنگدانه پوسته و خار در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز دارای میزان قابل توجهی قدرت احیاکنندگی بودند که در مقایسه با قدرت احیاکنندگی در رنگدانه پوسته در غلظت ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تفاوت معنی داری وجود نداشت. اختلاف معنی داری بین مایع سلومیک و رنگدانه خار و پوسته در غلظت‌های مختلف مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$).

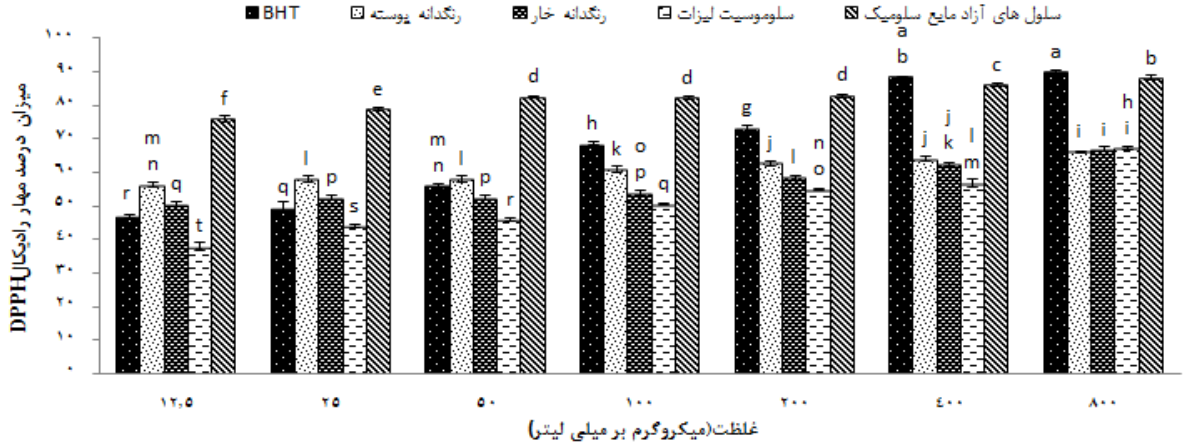


شکل ۲. مقایسه قدرت احیاکنندگی رنگدانه و مایع سلومیک توتیای دریایی با اسکوربیک اسید به عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف (برابر با ۱/۱۰ حجم‌های استفاده شده برای سلول‌های آزاد مایع سلومیک و سلوموسیت لیزات)

حروف غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است.

نتایج به دست آمده از میزان کاهش جذب محلول DPPH در حضور غلظت های مختلف رنگدانه های خار و پوسته، همچنین مایع سلومیک، در شکل ۳ مشاهده می گردد.

بالاترین میزان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، در سلول‌های آزاد مایع سلومیک در حجم ۸۰۰ میکرولیتر مشاهده شد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر BHT نیز به میزان قابل توجهی باعث مهار رادیکال آزاد شد، اما بر اساس شاخص‌های آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. حجم ۱۲/۵ میکرولیتر سلوموسیت لیزات، پایین‌ترین میزان درصد مهار رادیکال آزاد را نشان داد. نتایج آزمون ANOVA نشان داد که مایع سلومیک و رنگدانه پوسته و خار و غلظت هر یک از آن‌ها در سطح اطمینان $P < ۰/۰۵۰$، تأثیر معنی‌داری بر روی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH داشت.



شکل ۳. مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف رنگدانه پوسته و خار و BHT به عنوان استاندارد (برابر با حجم‌های استفاده شده در مایع سلومیک)

حروف غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است.

: 1, 1-diphenyl 2-picryhydrazyl; BHT: Butylated hydroxytolueneDPPH

میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع سلومیک و رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی با اسکوربیک اسید به عنوان استاندارد مقایسه شد که در شکل ۴ نشان داده شده است.

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، سلول‌های آزاد مایع سلومیک و رنگدانه‌های خار و پوسته، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به اسکوربیک اسید به عنوان استاندارد داشتند؛ این در حالی است که سلوموسیت لیزات دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به اسکوربیک اسید می‌باشد. با مقایسه همه عصاره‌ها مشخص شد که سلول‌های آزاد مایع سلومیک، بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر نشان دادند و همچنین کمترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز در سلوموسیت لیزات در حجم ۵۰ میکرولیتر مشاهده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌داری در سطح $P < ۰/۰۵$ بود.

شکل ٤. مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه و مایع سلومیک توتیای دریایی با اسکوربیک اسید به عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف (برابر با حجم‌های استفاده شده برای سلول‌های آزاد مایع سلومیک و سلوموسیت لیزات)

حروف غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵$ است.

نتایج حاصل از بررسی خواص ضد باکتریایی مایع سلومیک و رنگدانه‌های پوسته و خار توتیای دریایی با استفاده از تعیین کمترین غلظت بازدارندگی در جدول ۲ ارایه شده است.

از بین عصاره‌های مورد مطالعه، کمترین غلظت بازدارندگی در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر سلوموسیت لیزات بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری‌های گرم منفی ویبریو آلجینولیتیکوس، ویبریو لوجی، سراشیا مارسنس و اشرشیاکلی مشاهده گردید؛ در حالی که رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی اثر ضد باکتریایی ضعیفی را بر باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس نشان دادند و کمترین غلظت بازدارندگی آن‌ها ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین، نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که به طور کلی باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت حساسیت بیشتری را به عصاره‌های مورد مطالعه نشان می‌دهند.

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره‌ها بر روی برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

باکتری / عصاره	Bacillus subtilis	Bacillus pumulis	Staphylococcus aureus	Vibrio alginolyticus	Vibrio logei	Serratia marcescens	Escherichia coli
رنگدانه پوسته	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰*	–	–	–	–	–
رنگدانه خار	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	–	–	–	–	–
سلول‌های آزاد مایع سلومیک	>۴۰۰	>۴۰۰**	–	–	–	–	–
سلوموسیت لیزات	۱۰۰	۲۰۰	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵

غلظت رنگدانه پوسته و خار بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر و حجم مایع سلومیک بر حسب میکرولیتر محاسبه گردید.
– باکتری‌هایی که مورد آزمایش قرار نگرفتند.
*غلظت بیشتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آزمایش نگردید.
**حجم بیشتر از ۴۰۰ میکرولیتر آزمایش نشد.

جدول ۳ نتایج حاصل از درصد سمیت هر یک از عصاره‌ها را نشان می‌دهد. درصد سمیت در تمامی عصاره‌ها به استثنای سلوموسیت لیزات در حجم‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر منفی بود. منفی بودن اعداد به این معنی است که تعداد افراد مرده در کنترل بیشتر از تیمار می‌باشد. بنابراین، این ترکیبات برای رشد و زنده‌مانی Artemia تأثیر مثبتی دارند و هیچ سمیتی ندارند.

جدول ۳. درصد سمیت غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر روی Artemia

غلظت (میکرولیتر) / عصاره	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵
رنگدانه پوسته	-۱۲/۰۷	-۲/۰۵	-۵۵/۵	-۵/۰۷
رنگدانه خار	-۳/۷۳	-۲۷/۱۵	-۳۳/۸۲	-۳۱/۲۹
سلول‌های آزاد مایع سلومیک	-۴/۰۷	-۴/۵۸	-۴/۵۸	-۴/۰۷
سلوموسیت لیزات	۱۰۰	۱۰۰	-۶/۴۸	-۶/۴۸

بحث

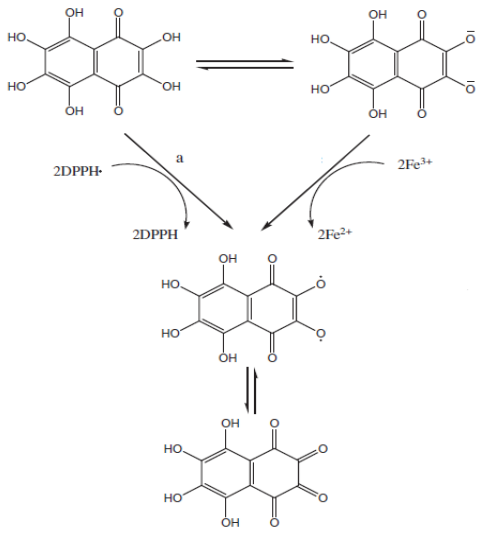
عوامل احیا کننده می‌توانند رادیکال‌های آزاد را به وسیله انتقال الکترون‌های آن‌ها دفع کنند. پتانسیل اهدایی الکترون ترکیبات (که به عنوان ظرفیت احیایی شناخته می‌شوند) ممکن است به عنوان نماینده این پتانسیل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی را نشان دهد (۷). گزارش‌های متعددی در خصوص ارزیابی آنتی‌اکسیدانی رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی ارایه شده است. Zhou و همکاران قدرت احیاکنندگی رنگدانه خار توتیای دریایی Strongylocentrotus nudus را مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که قدرت احیایی رنگدانه وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، میزان قدرت احیایی نیز افزایش می‌یابد. همچنین، آن‌ها بیان نمودند که رنگدانه خار، قدرت احیایی کمتری نسبت به اسکوربیک اسید به عنوان استاندارد دارد (۷). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی Echinometra mathaei قدرت احیاکنندگی کمتری نسبت به اسکوربیک اسید دارد و همچنین با افزایش غلظت، قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها افزایش می‌یابد.

رادیکال آزاد DPPH با گرفتن یک اتم هیدروژن از گروه هیدروکسیل PHNQ، به حالت پایدار می‌رسد. سپس دو اتم هیدروژن به طور متوالی از PHNQ دریافت می‌کند که ممکن است به نفتاسمی‌کینون به‌عنوان یک محصول واسطه و در نهایت، نفتاتتراکینون به عنوان محصول نهایی واکنش تبدیل شود (۷) (شکل ۵، قسمت a).

رنگدانه‌های PHNQ ممکن است دو الکترون را به طور متوالی به آهن فریک انتقال دهند و به نفتاتتراکتون به عنوان محصول نهایی واکنش تبدیل شوند (۷) (شکل ۵، قسمت b).

ترکیبات ضد اکسیدانی می‌توانند با انتقال یک الکترون و به دنبال آن پروتون، DPPH را از حالت آزاد به حالت پایدار تبدیل کنند و رنگ آن را از بنفش به زرد تغییر دهند که همین تغییر رنگ، مبنای ارزیابی قرار می‌گیرد. نتایج مطالعات Kuwahara و همکاران (۵) بر روی رنگدانه پوسته توتیای دریایی Anthocidaris crassispina و همچنین Zhou و همکاران (۷) بر روی رنگدانه خار توتیای دریایی Strongylocentrotus nudus نشان داد که این رنگدانه‌ها دارای توانایی بسیار بالایی برای مهار رادیکال آزاد DPPH

می‌باشند؛ در حالی که گزارشی مبنی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مایع سلومیک ارایه نشده است و مطالعه حاضر اولین تلاش در خصوص نشان دادن فعالیت آنتی‌اکسیدانی مایع سلومیک می‌باشد. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های آزاد مایع سلومیک دارای توانایی بالایی برای مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به رنگدانه‌های پوسته و خار می‌باشند.



شکل ۵. مکانیسم‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌هیدروکسیلات نفتوکینون

توتیای دریایی دارای فعالیت آنتی‌باکتریال طبیعی در برابر باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس در سلوموسیت لیزات و سلول‌های آزاد مایع سلومیک می‌باشد (۳). همچنین گزارش‌هایی مبنی بر فعالیت آنتی‌باکتریال بیشتر مایع سلومیک در برابر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت بیان شده است (۲۴). در پژوهش Stabili و همکاران، CF و CL توتیای دریایی Paracentrotus lividus در برابر باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس مورد آزمایش قرار گرفت و این نتیجه به دست آمد که هر دو بخش (CF و CL) در پاسخ میزبان به باکتری دخالت دارد (۲۴). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز با نتایج تحقیقات پیشین (۲۴، ۳) مطابقت دارد. مطالعه Smith و همکاران نشان داد که فعالیت آنتی‌باکتریال مایع سلومیک به رنگدانه‌های موجود در آن به خصوص اکینو کروم A ارتباط دارد (۲۵). مطالعه حاضر نشان داد که سلوموسیت لیزات، رنگیزه‌های بیشتری (اکینو کروم A) نسبت به سلول‌های آزاد مایع سلومیک دارد که جدول ۲ همه این احتمالات را تأیید می‌کند.

Artemia یک ارگانیسم دریایی نیست، بلکه گونه‌ای یوری هالین می‌باشد. بر اساس تحقیقات منتشر شده، این گونه کمتر در آب‌هایی با شوری زیر ۴۵ درصد یافت می‌شود. بنابراین، با توجه به موقعیت Artemia در زنجیره غذایی و همچنین شباهت‌هایی مانند RNA پلیمراز وابسته به DNA، پمپ Na+K+–ATPase (Adenosine triphosphate–Na+K+) و... به پستانداران بسیار نزدیک می‌باشد (۲۶). به همین دلیل می‌تواند به عنوان مدل مناسبی برای استانداردسازی تست‌های سمیت بر روی ارگانیسم‌های دریایی به کار گرفته شود (۲۷).

همان‌طور که از در جدول ۳ نشان داده شده است و در نتایج نیز بیان شد، منفی بودن اعداد به معنی این است که

تعداد افراد مرده در کنترل بیشتر از تیمار می‌باشد؛ در واقع اثر کشندگی هم در تیمار و هم در کنترل، تنها ناشی از تأثیر DMSO بوده که به منظور محلول‌سازی رنگدانه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است و رنگدانه‌ها نه تنها اثر سمیت و استرس حلال شیمیایی را تشدید نمی‌کند، بلکه آن را تا حد قابل توجهی کاهش می‌دهد. با توجه به این نکته که توتیاهای دریایی منبعی سرشار از ترکیبات فعال زیستی از جمله فنل و فلاونوئید (۱۰)، کاروتنوئید (۲۸)، اسیدهای چرب (۱)، آنزیم (۱۶) و پروتئین و مواد معدنی (۴) هستند، می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیبات باعث خنثی‌سازی اثر نامطلوب حلال شده، مرگ و میر لاروها را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهند. همچنین به دلیل تغذیه توتیا از جلبک‌های دریایی، وجود ترکیبات مذکور در آن‌ها تشدید می‌شود (۲۸) و این احتمال وجود دارد که به دلیل پتانسیل بالای عصاره‌های به کار رفته در آزمایش حاضر برای مهار رادیکال آزاد، ترکیبات فعال زیستی می‌توانند با خنثی کردن اثر سمیت رابطه مستقیمی داشته باشند.

نتیجه‌گیری

مطالعات متعددی مبنی بر وجود ترکیبات فعال زیستی قوی در توتیای دریایی به سبب دارا بودن پتانسیل دارویی انجام شده‌اند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که مایع سلومیک و رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی دارای پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی و همچنین توانایی خنثی‌سازی اثر سمیت می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد می‌شود که پوسته و خار توتیای دریایی که به عنوان زباله دور ریخته می‌شود، می‌توانند منبع جدیدی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد. همچنین، پیشنهاد می‌شود ضمن تلخیص ترکیبات و شناسایی و تعیین نقش اختصاصی هر یک از آن‌ها، برای ساخت ترکیبات دارویی و پزشکی اقدام گردد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه هرمزگان با شماره ۹۳/۲۰۰/۷٤ انجام گرفته است.

References

1. Bragadeeswaran S, Sri Kumaran N, Prasath Sankar P, Prabahar R. Bioactive potential of sea urchin Temnopleurus toreumaticus from Devanampattinam, Southeast coast of India. *J Pharm Altern Med* 2013; 2(3): 9-17.
2. Bodnar A. Proteomic profiles reveal age-related changes in coelomic fluid of sea urchin species with different life spans. *Experimental Gerontology* 2013; 48(5): 525-30.
3. Arizza V, Giaramita FT, Parrinello D, Cammarata M, Parrinello N. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of Paracentrotus lividus coelomocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 147(2): 389-94.
4. Amarowicz R, Synowiecki J, Shahidi F. Chemical composition of shells from red (Strongylocentrotus franciscanus) and green (Strongylocentrotus droebachiensis) sea urchin. *Food Chemistry* 2012; 133(3): 822-6.
5. Kuwahara R, Hatate H, Yuki T, Murata H, Tanaka R, Hama Y. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin Anthocidaris

crassispina. *LWT - Food Science and Technology* 2009; 42(7): 1296-300.

6. Smith LC, Ghosh J, Buckley KM, Clow LA, Dheilly NM, Haug T, et al. Echinoderm immunity. *Adv Exp Med Biol* 2010; 708: 260-301.
7. Zhou DY, Qin L, Zhu BW, Wang XD, Tan H, Yang JF, et al. Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin Strongylocentrotus nudus. *Food Chemistry* 2011; 129(4): 1591-7.
8. Khaleghi M, Owfi F. Identification of Echinoidea species in the intertidal zones of Chabahar Bay. *Journal of Animal Environment* 2010; 2(4): 31-6. [In Persian].
9. Mahdavi Shahri N, Khazaei Z, Karamzadeh S. Reproductive cycle of the sea urchin echinometra mathaei (Echinodermatidea: Echinoidea) in Bostaneh, Persian Gulf, Iran. *Journal of Biological Sciences* 2008; 8(7): 1138-48.
10. Kuwahara R, Hatate H, Chikami A, Murata H, Kijidani Y. Quantitative separation of antioxidant pigments in purple sea urchin shells using a reversed-phase high performance liquid chromatography. *LWT - Food Science and Technology* 2010; 43(8): 1185-90.
11. Anderson HA, Mathieson JW, Thomson RH. Distribution of spinochrome pigments in echinoids. *Comp Biochem Physiol* 1969; 28(1): 333-45.
12. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113(3): 189-207.
13. Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L. in vitro. *J Agric Food Chem* 2004; 52(16): 5032-9.
14. Wu SJ, Ng LT. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (Momordica charantia Linn. var. abbreviata Ser.) in Taiwan. *LWT - Food Science and Technology* 2008; 41(2): 323-30.
15. Duan X, Zhang WW, Li XM, Wang BG. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, Polysiphonia urceolata. *Food Chemistry* 2006; 95(1): 37-43.
16. Zhou D, Qin L, Zhu B, Li D, Yang J, Dong X, et al. Optimisation of hydrolysis of purple sea urchin (Strongylocentrotus nudus) gonad by response surface methodology and evaluation of in vitro antioxidant activity of the hydrolysate. *J Sci Food Agric* 2012; 92(8): 1694-701.
17. Fu L, Xu BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, Xia EQ, et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* 2011; 129(2): 345-50.
18. Shankarlal S, Prabu K, Natarajan E. Antimicrobial and antioxidant activity of purple sea urchin shell (Salmacis virgulataL. Agassiz and Desor 1846). *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 2011; 6(3): 178-81.
19. Moein MR, Moein S, Ahmadizadeh S. Radical scavenging and reducing power of Salvia mirzayanii subfractions. *Molecules* 2008; 13(11): 2804-13.

20. Vijayabaskar P, Vaseela N, Thirumaran G. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae Sargassum swartzii. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2012; 10(6): 421-8.

21. Yousefzadi M, Riahi-Madvar A, Hadian J, Rezaee F, Rafiee R, Biniaz M. Toxicity of essential oil of Satureja khuzistanica: in vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. *J Immunotoxicol* 2014; 11(1): 50-5.

22. Sorgeloos P, van der Wielen CR, Persoone G. The use of Artemia nauplii for toxicity tests--a critical analysis. *Ecotoxicol Environ Saf* 1978; 2(3-4): 249-55.

23. Ferreira CS, Nunes BA, Henriques-Almeida JM, Guilhermino L. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae Tetraselmis chuii and to the crustacean Artemia parthenogenetica. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007; 67(3): 452-8.

24. Stabili L, Pagliara P, Roch P. Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin Paracentrotus lividus. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996; 113(3): 639-44.

25. Smith LC, Rast JP, Brockton V, Terwilliger DP, Nair SV, Buckley KM, et al. The sea urchin immune system. *ISJ* 2006; 3: 25-39.

26. Gorospe J, Nakamura K. Associated bacterial microflora in artemia-rice bran culture. *Isr J Aquacult* 1996; 48: 99-107.

27. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with Artemia nauplii. *Ecotoxicol Environ Saf* 1981; 5(3): 382-7.

28. Mamelona J, Pelletier E, Girard-Lalancette K, Legault J, Karboune S, Kermasha S. Antioxidants in digestive tracts and gonads of green urchin (Strongylocentrotus droebachiensis). *Journal of Food Composition and Analysis* 2011; 24(2): 179-83.

Antibacterial and Antioxidant Characteristics of Pigments and Coelomic Fluid of Sea Urchin, Echinodermata Mathaei Species, from the Persian Gulf

Soolmaz Soleimani, M.Sc.[1], Morteza Yousefzadi, Ph.D.[2*], Soheila Moein, Ph.D.[3], Narges Amrollahi-Bioki, Ph.D.[4]

1. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
2. Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
3. Associate Professor, Molecular Medicine Research Center AND Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
4. Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran

* Corresponding author; e-mail: morteza110110@gmail.com

(Received: 23 Nov. 2014 Accepted: 14 March 2015)

Abstract

Background & Aims: Sea urchin immune responses are directly exposed to potentially pathogenic microorganisms and develop defence responses mainly based on immunocytes and humoral factors contained in the coelomic fluid. In addition, the polyhydroxylated 1, 4-naphthoquinone pigments are found to possess excellent antimicrobial, antialgal and antioxidant activities. The present research aimed to study the bioactive potentials (antioxidant, antibacterial and cytotoxic) of coelomic fluid and pigments shells and spines of sea urchin, Echinodermata mathaei species.

Methods: The coelomic fluid and pigments shell and spine of sea urchin were isolated using buffered mode and hydrogen chloride (HCl), respectively. Then, antioxidant [reducing power, DPPH radical (1, 1-diphenyl 2-picryhydrazyl) scavenging, and total antioxidant capacity), antibacterial (minimum inhibitory concentration or MIC) and cytotoxic potentials were evaluated.

Results: The free cells of the coelomic fluid had the highest activity in the all antioxidant methods, and the coelomocyte lysate had the highest antibacterial activity. All the differences were significant at the level of $P < 0.05$.

Conclusion: The result of this research indicated that coelomic fluid and pigments shell and spine of sea urchin, Echinodermata mathaei species, have potent antioxidant activity and the ability for scavenging cytotoxic effects. This suggests that sea urchin shells and spines, most of which are discarded as waste after removal of gonads, would be a new bioresource for natural antioxidants.

Keywords: Antioxidant, Antibacterial, Cytotoxic, Sea urchin, Echinometra mathaei

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(6): 614-628