



بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی زهر عروس دریایی *Chrysaora hysoscella*

اصغر محمدزاد اصل^{۱*}، حسین ذوالقرنین^۲، سهیلا مطرودی^۳

DOI: 10.22124/japb.2024.26334.1522

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۳

چکیده

برخی گونه‌های عروس دریایی قابلیت تولید زهری را دارند که حاوی ترکیباتی با ویژگی‌های درمانی بالقوه‌ای است. زهر عروس دریایی گونه *Chrysaora hysoscella* دارای خواص مختلفی است که کمتر به آن‌ها پرداخته شده است. در این پژوهش، استخراج و تخلیص زهر عروس دریایی *C. Chrysaora* و خاصیت آنتی اکسیدانی آن بررسی شد. پس از استخراج زهر، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، محدوده‌های آن تخلیص شد. پروتئین‌های تخلیص شده با استفاده از SDS-PAGE ارزیابی شدند. اثر آنتی اکسیدانی محدوده‌ها، با استفاده از سه روش DPPH، ABTS و FRAP مطالعه شد. نتایج به دست آمده نشان داد که زهر خام *C. hysoscella* حاوی ۱۰ محدوده با وزن مولکولی ۱۵ تا ۱۷۰ کیلودالتون بود که از بین آنها، محدوده ۲ جرم مولکولی کمتر از ۱۵ کیلودالتون داشت. نتایج نشان داد که محدوده ۲ به ترتیب در غلظت‌های ۲۱، ۳۱، و ۵۲ میکروگرم در میلی لیتر قادر به مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد بود. با توجه به نتایج مثبت فعالیت آنتی اکسیدانی، شناسایی ترکیبات دیگر موثر موجود در زهر، نیازمند مطالعات بیشتر است.

واژگان کلیدی: زهر عروس دریایی، خاصیت آنتی اکسیدانی، کروماتوگرافی، *Chrysaora hysoscella*.

- ۱- دکتری تخصصی زیست فناوری دریا، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۲- استاد گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۳- استادیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

* نویسنده مسئول: a.mohammadzade218@gmail.com

مقدمه

این صید جانبی می‌تواند دسترسی فراوان و منظم این موجودات را در برخی مناطق دریایی ساحلی تضمین کند تا عروس‌های دریایی برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی مورد بهره‌برداری قرار گیرند (Nisa et al., 2023b).

بر اساس مطالعات Nisa و همکاران (۲۰۲۳b) سموم تولید شده توسط موجودات دریایی یک دارایی طبیعی مفید بوده که حاوی چند ترکیب مفید از نظر دارویی هستند و می‌توانند ارزش درمانی فوق العاده قوی داشته باشند. سال‌های زیادی است که بخش‌هایی از سم‌های موجودات دریایی به نقطه کانونی مطالعات پژوهشگران تبدیل شده‌اند و به خاطر خواص ضدسرطانی متفاوت به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تقریباً نیمی از سم‌های موجودات دریایی، منبع وسیعی از داروهای کشف شده و داروهای جدید ضدسرطان هستند (Maduraiveeran et al., 2021). کیسه‌تنان دارای ساختارهای تخصصی به نام نماتوسیت هستند که زهر مورد استفاده برای شکار موجودات دیگر (عمدتاً پلانکتون) و به عنوان دفاع در برابر شکارچیان بالقوه را تخلیه می‌کنند. زهر ساخته شده توسط کیسه‌تنان بیشتر از پروتئین تشکیل شده است و فسفولیپاز

اقیانوس‌ها منبع تقریباً ناشناخته‌ای از ترکیبات متنوع زیستی و شیمیایی هستند که بر اساس مطالعات انجام شده بیش از ۱۹۴ هزار گونه توصیف شده از باکتری‌ها، گیاهان و جانوران در اقیانوس‌ها زندگی می‌کنند (Blunt et al., 2018). با این حال، تنها تعداد نسبتاً کمی از موجودات دریایی تاکنون مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند (Blunt et al., 2017). عروس‌های دریایی تا مدت‌ها به دلیل تداخل آنها با فعالیت‌های انسانی در دریا (گردشگری، ماهیگیری، کشاورزی، صنایع) و ایجاد بن‌بست در شبکه‌های غذایی دریایی، به عنوان یک مزاحم یا آفت در نظر گرفته می‌شدند، اما نقش آنها در اکوسیستم‌های دریایی به تازگی مورد ارزیابی قرار گرفته است (Graham et al., 2014). فعالیت‌های انسان‌محور مانند صید بیش از حد (Roux et al., 2013)، آبرسانی مناطق ساحلی (Purcell et al., 1999) و تغییرات آب و هوایی (Purcell, 2005) می‌توانند در افزایش جمعیت عروس‌های دریایی نقش داشته باشند (Richardson et al., 2009). عروس دریایی اغلب یک صید جانبی ناخواسته ناشی از فعالیت‌های ماهیگیری منظم است. با این حال،

A2 و متالوپروتئازها رایج ترین اجزای زهر خام هستند (Merquirol et al., 2019).

گونه های جنس *Chrysaora* دارای منابع احتمالی متابولیت های زیست فعال طبیعی هستند که از نظر کاربردهای دارویی مورد توجه قرار گرفته اند. قبلا مشخص شده بود که زهر خام نماتوسیت از *Chrysaora quinquecirrha* نسبت به انواع باکتری های گرم مثبت و گرم منفی فعال است (Suganthi et al., 2012). در این پژوهش، به استخراج و تخلیص زهر عروس دریایی گونه *Chrysaora hysoscella* و بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی آن پرداخته شده است.

مواد و روش ها

استخراج و تخلیص زهر از پودر زهر خام

فرایند به دست آوردن زهر خام از نماتوسیت های *Chrysaora hysoscella* با استفاده از روش های انجماد-ذوب و فراصوت انجام شد. برای انجماد-ذوب، ۰/۱ گرم از پودر لیوفیلیزه نماتوسیت *C. hysoscella* در ۱ میلی لیتر آب حل شد. از نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی گراد) و آب (۲۲-۲۳ درجه سانتی گراد) برای تکرار چرخه انجماد-ذوب به مدت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه استفاده شد. در

فواصل زمانی یاد شده، نمونه زیر میکروسکوپ بررسی شد تا نماتوسیت ها شکسته و زهر جدا شود. پس از افزودن ۲ میلی لیتر آب مقطر به نمونه، در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf, R 5810، آلمان) شد. مایع رویی و رسوب به دست آمده به طور جداگانه، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

روش سونیکاسیون شامل حل کردن ۱/۰۰۹ گرم از پودر لیوفیلیزه به دست آمده از نماتوسیت در ۶ میلی لیتر آب مقطر بود. محلول به دست آمده در مجموع تحت ۲۰ چرخه فراصوت قرار گرفت که هر چرخه ۲ دقیقه طول کشید و پس از آن بررسی میکروسکوپی انجام شد. فرایند سونیکاسیون تا زمانی انجام شد که تجزیه و تحلیل میکروسکوپی نشان دهنده پارگی دیواره نماتوسیت و به دنبال آن آزادسازی زهر باشد. سپس نمونه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. پس از آن، مایع رویی به منظور تعیین کمیت پروتئین، SDS-PAGE و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) جدا شد و مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمایش از روش دوم برای این استفاده شد که موجب استخراج زهر خام بیشتری شد. برای جداسازی

یک مارکر مولکولی ۲۰۰ کیلودالتونی برای تعیین وزن باندها استفاده شد.

سنجش آنتی اکسیدانی به روش DPPH

فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) ارزیابی شد. در ابتدا سوسپانسیون همگن از رقت‌های سریالی با کمک ورتکس تهیه شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل شد. آسکوربیک اسید ۱۰۰ میلی‌مولار به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد انتخاب و در پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت جداگانه ریخته شد. سپس به هر کدام ۱۵۰ میکرو لیتر محلول متانولی ۰/۱ میلی‌مولار از DPPH و ۲ میلی گرم از DPPH با متانول به حجم ۱۰۰ میلی لیتر اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی، جذب نوری در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, 1800، ژاپن) در برابر گروه شاهد (فاقد هرگونه ماده مداخله‌گر) خوانده شد. در این روش از آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس پتانسیل مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) از رابطه ۱ محاسبه و این غلظت تحت عنوان ظرفیت آنتی اکسیدانی آن بیان شد.

محدوده‌های زهر از HPLC استفاده شد. فاز متحرک A: H_2O (0.1% TFA) و B: Acetonitrile (ACN) (0.1 % TFA) بود. از برنامه گرادیانی از ۵ تا ۱۰۰ فاز B در زمان ۶۰ دقیقه و طول موج ۲۸۰ نانومتر برای این منظور استفاده شد.

کروماتوگرافی محدوده خالص شده برای تایید جداسازی انجام شد.

سنجش پروتئین و آنالیز SDS-PAGE

محتوای پروتئین زهر *C. hysoscella* با استفاده از تکنیک برادفورد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976). علاوه بر این، وزن مولکولی پروتئین زهر خام و زهر تخلیص شده نماتوسیت با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد (Uk, 1970). از ژل حل شونده ۱۲ درصد و ژل انباشته ۵ درصد در مطالعه حاضر استفاده شد. پروتئین‌های نماتوسیت در بافر تریس-HCl ۱ درصد (pH ۶/۸)، گلیسرول ۱۰ درصد و بروموفنل ۰/۰۱ درصد حل و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد. نمونه‌های پروتئین دناتوره شده با استفاده از دستگاه SDS-PAGE (Mini-PROTEAN, Bio-Rad, Tetra Cell، آمریکا) الکتروفورز و با ژل کوماسی‌بلو ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شد. از

رابطه ۱:

$$IC_{50} (\%) = [(DO_B - DO_S) / DO_B] \times 100$$

DO_B: جذب بلانک؛ DO_S: جذب نمونه.

برای این که بتوان پیک‌ها را تقسیم کرده و اجزای سم را به صورت جداگانه جمع‌آوری کرد، نسبت دقیق حلال‌ها برای پیک‌ها برآورد شد و شرایط شستشوی گرادیان بهینه شد. محدوده‌های مربوط به ۱۰ پیک به صورت دستی جمع‌آوری و لیوفیلیزه شدند. هر یک از این محدوده‌ها مورد بررسی بر روی رده‌های سلولی قرار گرفتند.

سنجش آنتی اکسیدانی به روش ABTS

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش 2,2'-Azino-bis(3-ethyl) ABTS (benzothiazoline-6-sulfonic acid) انجام گرفت. محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفت. سپس جذب نوری محلول پایه تهیه شده، خوانده شد. محلول پایه با کمک آب مقطر به گونه‌ای رقیق شد که جذب نوری محلول در ۷۳۴ نانومتر معادل ۰/۷ باشد. سپس سوسپانسیون همگن از رقت‌های سریالی با کمک ورتکس تهیه شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از

محلول تهیه شده به تیوب‌های حاوی ۹۵۰ میکرولیتر معرف رقیق شده منتقل شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک به درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. آسکوربیک اسید ۱۰۰ میلی‌مولار به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد استفاده شد و رقت‌های سریالی از آن تهیه و مانند نمونه عمل شد. جذب نوری در طول موج ۷۳۴ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در برابر گروه شاهد (فاقد هرگونه ماده مداخله‌گر) خوانده شد. در این روش از آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. سپس پتانسیل مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد از رابطه ۱ محاسبه و این غلظت تحت عنوان ظرفیت آنتی اکسیدانی آن بیان شد.

سنجش آنتی اکسیدانی به روش FRAP

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش Ferric Reducing (FRAP Antioxidant Power) انجام گرفت. بافرهای پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار (pH ۶/۶) و فری‌سیانید پتاسیم ۱ درصد تهیه شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۷۵ میکرولیتر از بافر پتاسیم فسفات و ۱۲۵ میکرولیتر از بافر

شدند. برای این منظور از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و همچنین تست تعقیبی توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد.

نتایج

جداسازی محدوده موثر از زهر خام

مشخصات کروماتوگرافی اجزای زهر عروس دریایی *C. hysoscella* با استفاده از HPLC، در یک گرادیان خطی از حلال B (استونیتریل/ TFA ۰/۱ درصد) به دست آمد (شکل ۱). مشخص شد که تنها محدوده اثرگذار، محدوده ۲ بود. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، این محدوده دارای جرم مولکولی کمتر از ۱۵ کیلودالتون است. جدول ۱، میزان پروتئین‌های محدوده‌های جداسازی شده را نشان می‌دهد.

سنجش پروتئین و تعیین جرم مولکولی

مقدار پروتئین موجود در زهر با استفاده از آزمایش برادفورد، ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. جرم مولکولی بخش‌های پروتئینی مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی زهر که با استفاده از آنالیز SDS-PAGE ارزیابی شد در شکل ۲ آورده شده است. محدوده ۲ هیچ سیگنالی

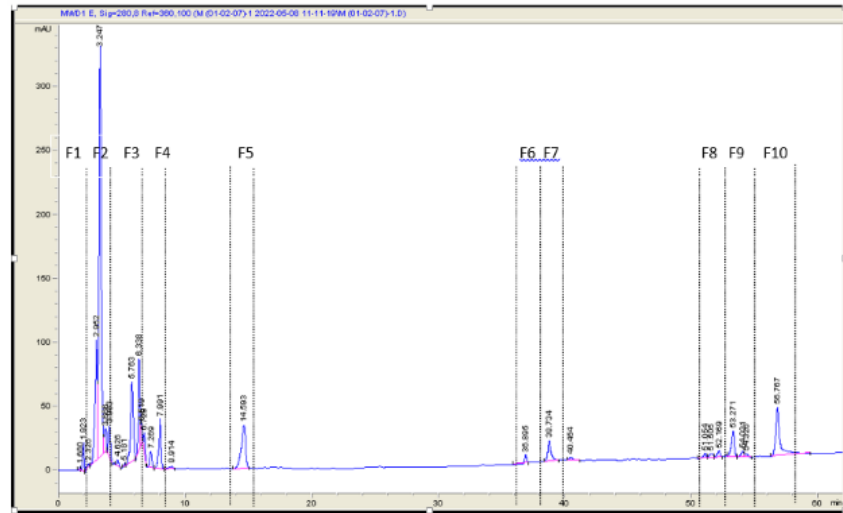
فری‌سیانید پتاسیم مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱۲۵ میکرولیتر محلول TCA ۱۰ درصد به آن افزوده شد و نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. از فاز رویی ۱۲۵ میکرولیتر به ویال جدید منتقل و به آن ۱۲۵ میکرولیتر آب مقطر و ۲۵ میکرولیتر فریک کلرید ۰/۱ درصد اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه ۲۰۰ میکرولیتر از محلول هر ویال به درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. آسکوربیک اسید ۱۰۰ میلی‌مولار به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شد و رقت‌های سریالی از آن تهیه و مانند نمونه عمل شد. جذب نوری در طول موج ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در برابر گروه شاهد (فاقد هرگونه ماده مداخله‌گر) خوانده شد. در این روش از آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. سپس پتانسیل مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد از رابطه ۱ محاسبه و این غلظت به عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

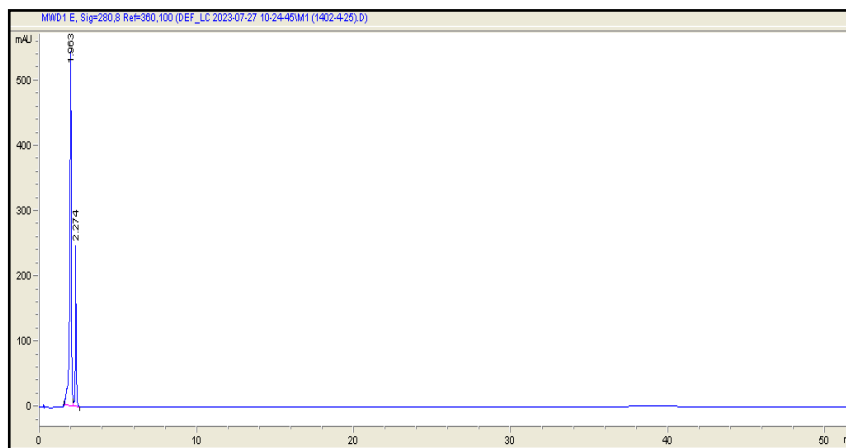
نتایج به دست آمده از آزمون‌های انجام شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS v.23 بررسی

را روی ژل نشان نداد که فرض شد یک محدوده‌های ۲ تا ۱۰ به ترتیب باندهایی با جرم پپتید کوچک (کمتر از ۱۵ کیلودالتون) است. مولکولی ۱۵ تا ۱۷۰ کیلودالتون نشان دادند.

الف

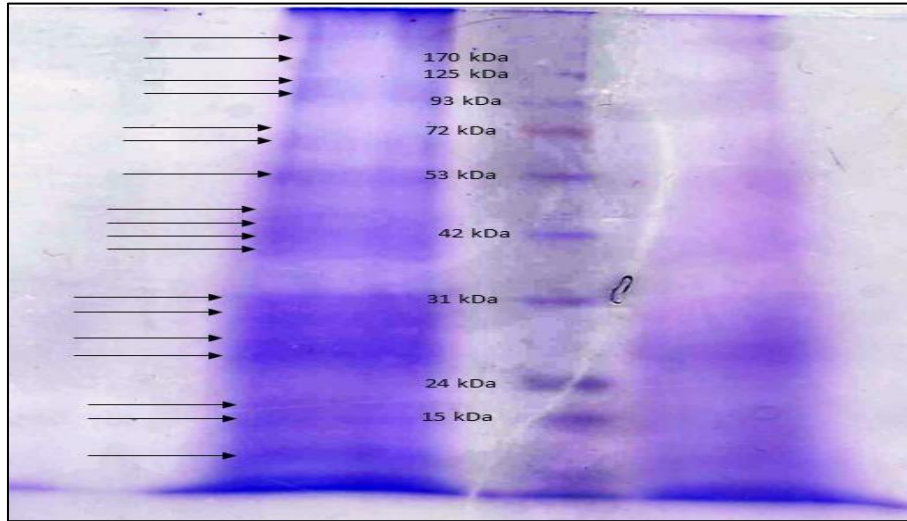


ب

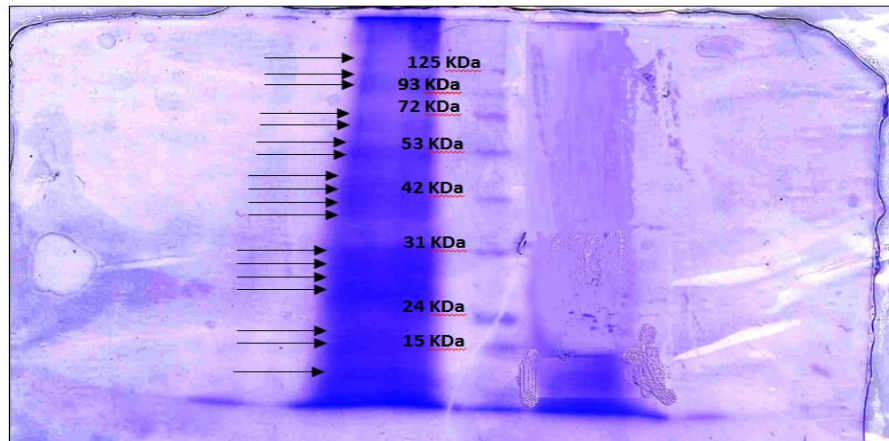


شکل ۱: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC). الف) طیف به دست آمده از HPLC برای زهر خام عروس دریایی *Chrysaora hysoscella* که ۱۰ پیک در آن قابل مشاهده است. ب) کروماتوگرافی محدوده خالص شده برای تایید جداسازی.

الف



ب



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز زهر عروس دریایی. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE محدوده‌ها و محدوده ۲ به دست آمده از زهر خام عروس دریایی *Chrysaora hysoscella*. الف) زهر خام عروس دریایی. ب) زهر خالص شده.

جدول ۱: میزان پروتئین‌های محدوده‌های جداسازی شده

محدوده	میزان جذب	میزان پروتئین (μg/mL)
F1	۰	۰
F2	۰/۰۵۲	۰/۸۴
F3	۰/۰۴۰	۰/۴۳
F4	۰/۰۶۳	۱/۲۱
F5	۰/۰۶۸	۱/۳۷
F6	۰/۰۶۲	۱/۱۷
F7	۰/۰۵۵	۰/۹۴
F8	۰/۰۶۹	۱/۴۱
F9	۰/۰۶۰	۱/۱۱
F10	۰/۰۷۰	۱/۴۴

سنجش آنتی اکسیدانی

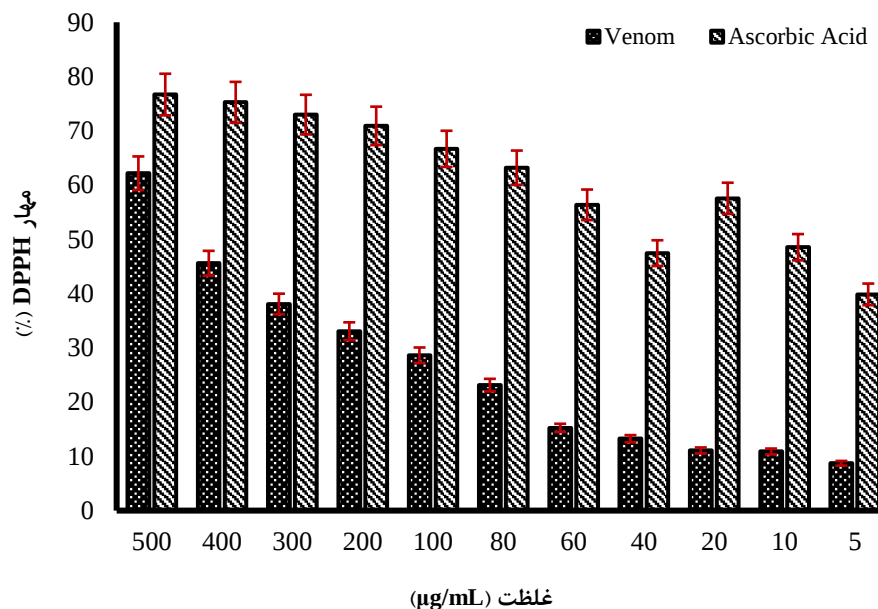
سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی محدوده زهر *C. hysoscella* با سه روش DPPH (شکل ۳)، ABTS (شکل ۴) و FRAP (شکل ۵) انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که از میان محدوده‌های تخلیص شده از زهر، محدوده ۲ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بود. نتایج هر سه آزمون نشان‌دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت بود و مشخص شد که خاصیت آنتی اکسیدانی محدوده ۲، در غلظت‌های بالاتر به طور قابل توجهی بیشتر از غلظت‌های کمتر بود.

در آزمون DPPH مشخص شد که محدوده

۲ در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توانست تا ۶۲ درصد DPPH را مهار کند. این مقدار برای آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد، ۷۶ درصد برآورد شد. نتایج آزمون ABTS نشان داد که محدوده ۲ دارای اثر مهار بر تولید رادیکال‌های آزاد بود و با افزایش غلظت آن، این اثر مهار افزایش یافت. مهار آنتی اکسیدانی محدوده ۲ و آسکوربیک اسید در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب برابر با ۵۶ و ۷۳ درصد بود. از مقادیر FRAP برای غلظت‌های مختلف محدوده ۲ مشخص شد که این ترکیب با افزایش تولید فروس-TPTZ از

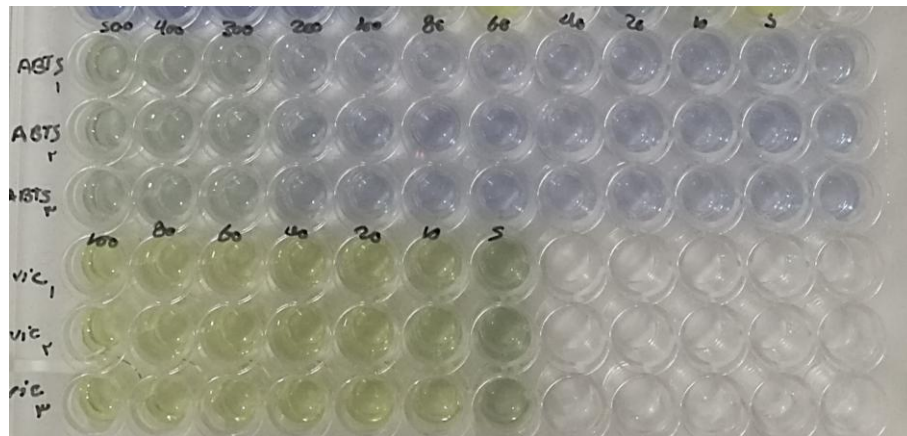
آمده، نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید در هر سه روش مطالعه، به طور معناداری بیشتر از محدوده ۲ است. با این حال بر اساس آزمون‌های DPPH، ABTS و FRAP، محدوده ۲ به ترتیب در غلظت‌های ۲۱، ۳۱ و ۵۲ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد بود که تایید کننده خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن است.

فریک-TPTZ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. میزان مهار FRAP برای محدوده ۲ و آسکوربیک اسید در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۴۴ و ۷۷ درصد برآورد شد. پتانسیل مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد برای محدوده ۲ و آسکوربیک اسید در هر سه آزمون DPPH، ABTS و FRAP محاسبه و این غلظت به عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها در نظر گرفته شد (شکل ۶). نتایج به دست

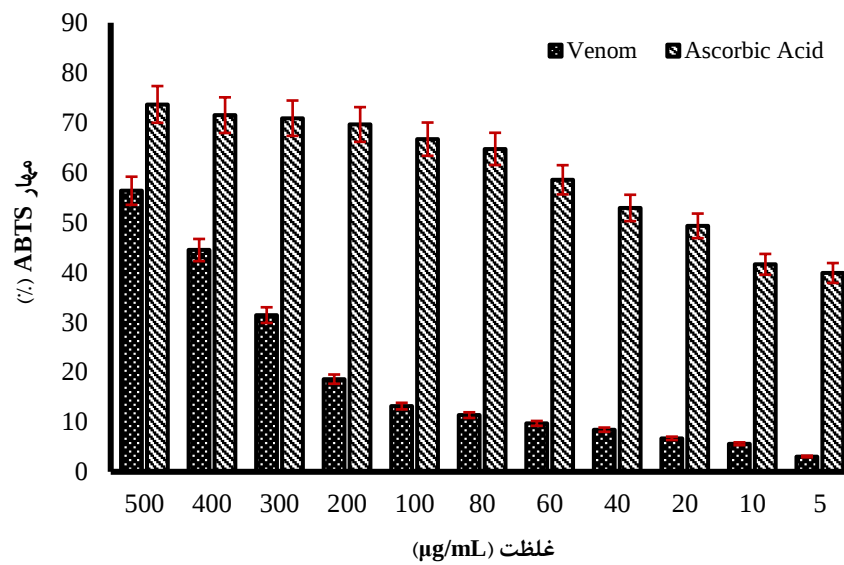


شکل ۳: بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی محدوده ۲ از زهر عروس دریایی *Chrysaora hysoscella* نسبت به آسکوربیک اسید با استفاده از آزمون DPPH (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

الف

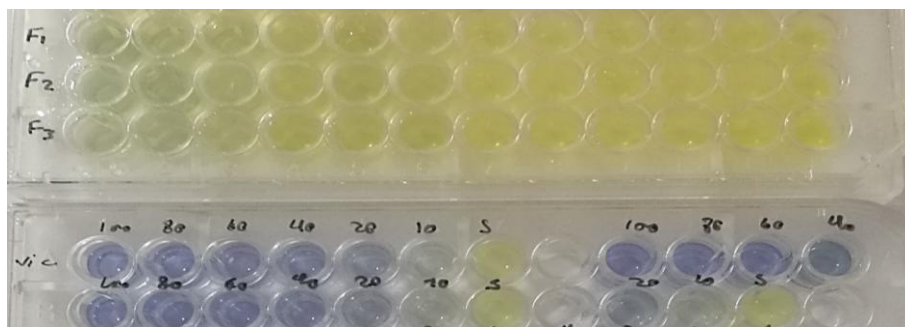


ب

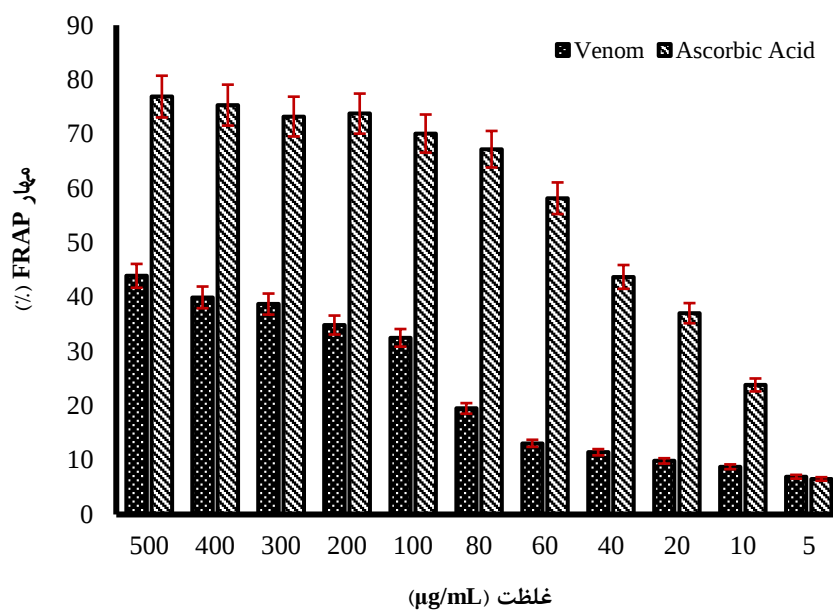


شکل ۴: بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی محدوده ۲ از زهر عروس دریایی *Chrysaora hysoscella* نسبت به آسکوربیک اسید با استفاده از تست ABTS. الف) تصویر پلیت مورد استفاده برای آزمون ABTS و نتایج به آن. ب) مقادیر محاسبه شده به عنوان مهار ABTS (میانگین $\pm$ انحراف معیار).

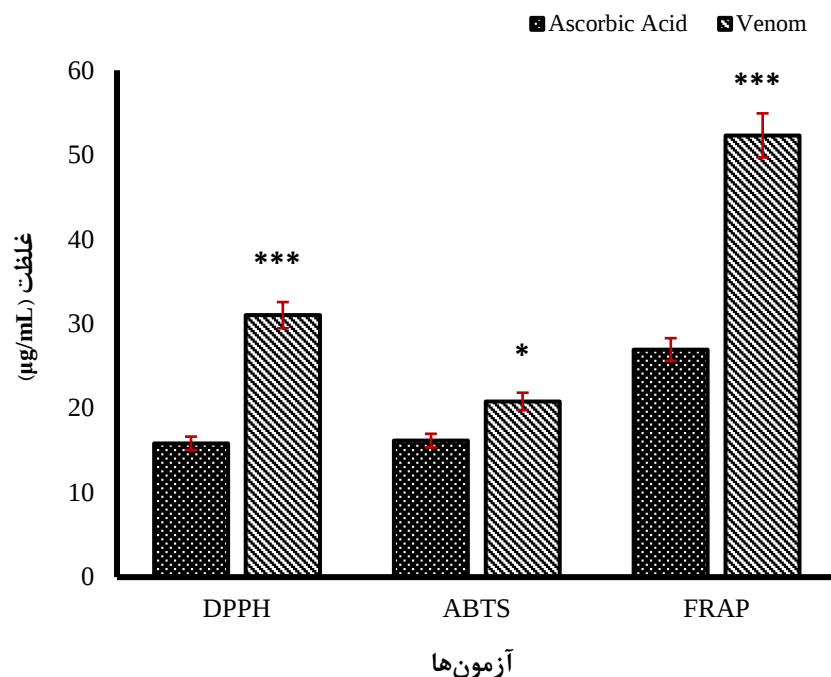
الف



ب

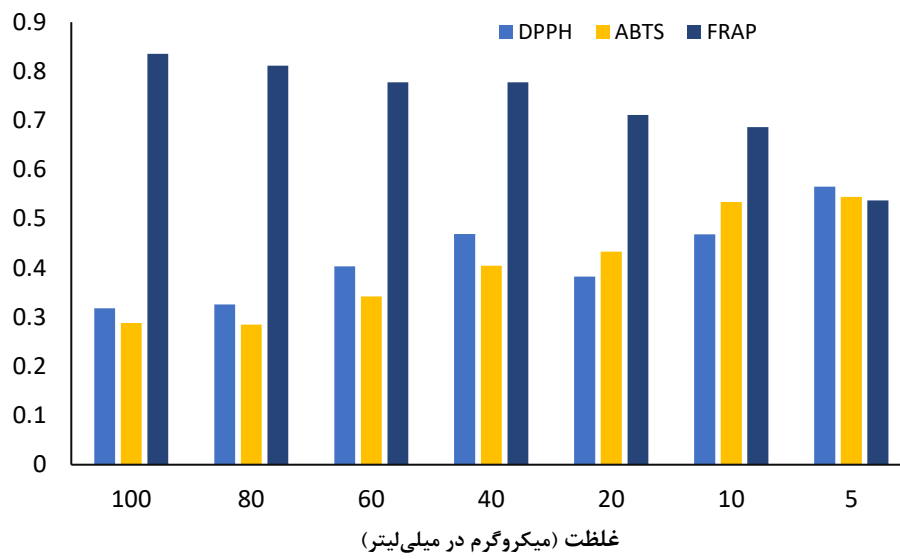


شکل ۵: بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی محدوده ۲ از زهر عروس دریایی *Chrysaora hysoscella* نسبت به آسکوربیک اسید با استفاده از آزمون FRAP. الف) پلیت مورد استفاده برای آزمون FRAP و نتایج آن. ب) مقادیر محاسبه شده به عنوان مهار FRAP (میانگین $\pm$ انحراف معیار).

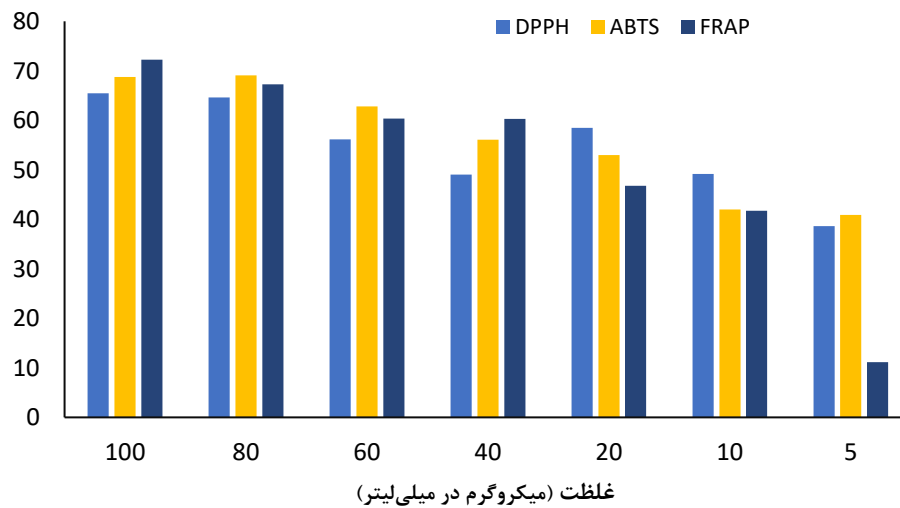


شکل ۶: مقادیر پتانسیل مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد برای محدوده ۲ و آسکوربیک اسید در آزمون‌های DPPH، ABTS و FRAP (میانگین $\pm$ انحراف معیار). در هر آزمون، علامت «*» روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو گروه است. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

در شکل ۷ تاثیر ویتامین C بر محدوده ۲ ۸ نیز تاثیر ویتامین C بر آسکوربیک اسید برحسب شاخص IC_{50} نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، روش DPPH توانسته است در غلظت‌های بالا مثل ۱۰۰ میکروگرم، بیشترین میزان شاخص IT_{50} را بر اساس محدوده ۲ به دست آورد. ضمناً در شکل



شکل ۷: بررسی تاثیر ویتامین C بر محدوده ۲ برحسب شاخص IC_{50}



شکل ۸: بررسی تاثیر ویتامین C بر آسکوربیک اسید برحسب شاخص IC_{50}

بحث

ترکیب زهرهای کیسه‌تنان عمدتاً حاوی انواع پروتئین‌ها (پپتیدها، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و مهارکننده‌های پروتئیناز) همراه با ترکیبات غیرپروتئینی (پورین‌ها، ترکیبات آمونیوم چهارتایی، آمین‌های بیوژنیک و بتائین‌ها) است (Frazao et al., 2012; Mariottini and Pane, 2013; Mariottini, 2014; Jouiaei et al., 2015). بیشترین جرم مولکولی اجزای اصلی زهر شناسایی شده ۲۲۰ کیلودالتون است (Nevalainen et al., 2004) که دارای فعالیت‌های زیستی برای کاربردهای دارویی احتمالی هستند (Kawabata et al., 2013). در مطالعه حاضر به تخلیص پروتئین‌های زهر خام *C. hysoscella* و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن پرداخته شد و نتایج به دست آمده تاییدکننده فعالیت آنتی‌اکسیدانی یکی از محدوده‌های تخلیص شده از زهر بود.

Gharibi و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی ویژگی‌ها و فعالیت‌های دارویی عروس دریایی *C. hysoscella* صید شده در بندر بوشهر پرداختند. زهر *C. hysoscella* صید شده در منطقه جوفره بندر بوشهر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مشخصات الکتروفوریتیک توسط SDS-PAGE ارزیابی شد و نمونه خام با

استفاده از HPLC فاز معکوس بررسی شد. در این مطالعه پس از جداسازی شاخک‌ها و نماتوسیت‌های آنها، سه جزء پروتئینی اصلی مختلف در ۲۵۰-۷۲ کیلودالتون با SDS-PAGE آشکار شد که نشان‌دهنده وجود پپتید در زهر آن بود. دو پیک اصلی در ۸/۶۲ و ۱۱/۲۳ دقیقه در HPLC فاز معکوس زهر خام نشان دهنده هویت ساختاری پپتید پروتئاز بود. این اولین گزارش از بررسی ساختاری عروس دریایی در خلیج فارس بود (Gharibi et al., 2016). در مطالعه حاضر نیز پس از مشخص شدن آن که زهر خام *C. hysoscella* دارای ۰/۸۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین است، گروه‌های پپتیدی مختلف با استفاده از SDS-PAGE ارزیابی شدند و نتایج به دست آمده نشان‌دهنده ۹ باند مجزا با جرم مولکولی ۱۵ تا ۱۷۰ کیلودالتون بود. هر پپتید با استفاده از HPLC تخلیص شد و مشخص شد که از ۱۰ محدوده به دست آمده، تنها محدوده ۲ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و جرم مولکولی آن کمتر از ۱۵ کیلودالتون بود. این محدوده خود از دو جزء پپتیدی تشکیل شده بود.

رادیکال‌های آزاد، به عنوان محصولات جانبی متابولیسم یا توسط فاگوسیتوز، به طور مداوم در سلول‌ها تولید می‌شوند. در یک مطالعه

قدرت آنتی‌اکسیدانی محدوده تخلیص شده در مطالعه حاضر بیشتر از پروتئین‌های مطالعه مشابه بود.

آزمون دیگری که برای ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد، FRAP بود. سنجش FRAP، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل را ارزیابی می‌کند. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان مهار FRAP توسط غلظت‌های ۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محدوده ۲ زهر *C. hysoscella* از ۶/۹ تا ۴۳/۹ درصد بود. مطالعه مشابهی که به بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی زهر *C. hysoscella* با استفاده از روش FRAP پرداخت، یافت نشد.

وزن مولکولی، نقش مهمی در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیست‌فعال دارد. مشاهده شده است که اثر مواد شیمیایی زیست‌فعال با کاهش اندازه ذرات، افزایش می‌یابد (Prasedya et al., 2021). محدوده ۲ کمترین وزن مولکولی را در میان محدوده‌های به دست آمده از زهر *C. hysoscella* نشان داد. نشان داده شده است که مولکول‌های با وزن مولکولی پایین دارای خواص زیست‌فعال بیشتری هستند (Vincent, 1999; Fernandes et al., 2009; Bhardwaj et al., 2015).

فعالیت مهار DPPH توسط زهر پنج گونه مختلف *Chrysaora* اندازه‌گیری شد. پروتئین‌های زهر نماتوسیت فعالیت مهاری قابل توجهی را نشان دادند. یکی از گونه‌های مورد مطالعه آنها *C. hysoscella* بود که فعالیت مهار DPPH آن در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، از ۸/۶ تا ۴۵/۷ درصد گزارش شد (Nisa et al., 2023a). در مطالعه حاضر غلظت‌های ۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ارزیابی شد و مهار DPPH از ۷/۸ تا ۶۲/۲ درصد مشاهده شد که بیشتر از مقدار مشاهده شده در مطالعه قبل (Nisa et al., 2023a) بود.

روش ABTS به طور گسترده‌ای برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبی آنتی‌اکسیدان‌های زنجیره‌شکن و اهداکننده هیدروژن استفاده می‌شود (Ferdous et al., 2023). در یک مطالعه مشابه، فعالیت مهار ABTS پروتئین‌های زهر *C. hysoscella* در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، از ۷/۷۵ تا ۳۹/۳۱ درصد گزارش شد (Nisa et al., 2023a). در مطالعه حاضر میزان مهار ABTS توسط غلظت‌های ۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محدوده ۲ زهر *C. hysoscella* از ۳/۰۷ تا ۵۶/۳ درصد بود. در این آزمون نیز

آزمون DPPH، ABTS و FRAP تایید شد. همچنین در مقایسه با مطالعه مشابه، محدوده تخلیص شده در مطالعه حاضر قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشت. از آنجایی که رادیکال‌های آزاد می‌توانند منشا بیماری‌های مختلفی باشند، ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی از اهمیت بسیاری برخوردار هستند. محیط‌های دریایی دارای موجوداتی است که ترکیبات طبیعی دارای خواص مختلف را تولید می‌کنند و مطالعه و کشف این محیط می‌تواند در راستای یافتن ترکیبات درمانی، موثر واقع شود. این مطالعه نشان داد که زهر عروس دریایی گونه *C. hysoscella* حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است.

چندین مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی زهر عروس‌های دریایی را گزارش کرده‌اند و بیان شده است که زهر این موجودات دریایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت دارد (Suganthi et al., 2012; Maduraiveeran et al., 2021; Zare et al., 2023). با این حال مطالعه بر روی زهر *C. hysoscella* بسیار اندک است و به جز مواردی که به آنها اشاره شد، جستجو در پایگاه‌های داده مورد دیگری را نشان نداد.

در مجموع، در مطالعه حاضر پس از تخلیص محدوده‌های مختلف از زهر *C. hysoscella* با استفاده از تکنیک HPLC، مشخص شد که یکی از محدوده‌ها، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است. این ویژگی با استفاده از سه

منابع

- Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhiman S. and Sharma P. 2015.** Pyrrole: A resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. *RSC Advances*, 5: 15233–15266. doi: 10.1002/chin.201518314
- Blunt J.W., Carroll A.R., Copp B.R., Davis R.A., Keyzers R.A. and Prinsep M.R. 2018.** Marine natural products. *Natural Product Reports*, 35: 8–53. doi: 10.1039/c7np00052a
- Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H. and Prinsep M.R. 2017.** Marine natural products. *Natural Product Reports* 34: 235–394. doi: 10.1039/c5np00156k
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Ferdous U.T., Nurdin A., Ismail S. and Yusof Z.N.B. 2023.** Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of crude extracts from marine *Chlorella* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47: 1025–1051. doi: 10.1016/j.bcab.2022.102551
- Fernandes A., Fernandes I., Cruz L., Mateus N., Cabral M. and De Freitas V. 2009.** Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 11154–11160. doi: 10.1021/jf902093m
- Frazao B., Vasconcelos V. and Antunes A. 2012.** Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An overview. *Marine Drugs*, 10: 1812–1851. doi: 10.3390/md10081812
- Gharibi S., Nabipour I., Kim E., Ghafari S.M., Hoseiny S.M., Kamyab M. and Seyedian R. 2016.** Characterization and pharmacological activities of jellyfish, *Chrysaora hysoscella* captured in Bushehr Port, Iran. *Iranian Journal of Toxicology*, 10: 7–10. doi: 10.29252/arakmu.10.5.7
- Graham W.M., Gelcich S., Robinson K.L., Duarte C.M., Brotz L., Purcell J.E., Madin L.P., Mianzan H., Sutherland K.R. and Uye S.I. 2014.** Linking human well-being and jellyfish: Ecosystem services, impacts, and societal responses. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12: 515–523. doi: 10.1890/130298
- Jouiaei M., Yanagihara A.A., Madio B., Nevalainen T.J., Alewood P.F. and Fry B.G. 2015.** Ancient venom systems: A review on cnidaria toxins. *Toxins*, 7: 2251–2271. doi: 10.3390/toxins7062251

- Kawabata T., Lindsay D.J., Kitamura M., Konishi S., Nishikawa J., Nishida S., Kamio M. and Nagai H. 2013.** Evaluation of the bioactivities of water-soluble extracts from twelve deep-sea jellyfish species. *Fisheries Science*, 79: 487–494. doi: 10.1007/s12562-013-0612-y
- Maduraiveeran H., Raja K. and Chinnasamy A. 2021.** Anti-proliferative and antioxidant properties of nematocysts crude venom from jellyfish *Acromitus flagellatus* against human cancer cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 1954: 28–61. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.12.047
- Mariottini G.L. 2014.** Hemolytic venoms from marine cnidarian jellyfish- An overview. *Journal of Venom Research*, 5: 22–32.
- Mariottini G.L. and Pane L. 2013.** Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins*, 6: 108–151. doi: 10.3390/toxins6010108
- Merquiol L., Romano G., Ianora A. and D'Ambra I. 2019.** Biotechnological applications of Scyphomedusae. *Marine Drugs*, 17: 604–616. doi: 10.3390/md17110604
- Nevalainen T.J., Peuravuori H.J., Quinn R.J., Llewellyn L.E., Benzie J.A., Fenner P.J. and Winkel K.D. 2004.** Phospholipase A2 in cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)*, 139: 731–735. doi: 10.1016/J.CBPC.2004.09.006
- Nisa S.A., Govindaraju K., Vasantharaja R., Kannan M. and Raja K. 2023a.** Jellyfish *Acromitus flagellatus* (Maas) nematocyst venom-mediated biogenic synthesis of gold nanoparticles and its anti-proliferative effects. *Aquaculture International*, 31(4): 1–10. doi: 10.1007/s10499-023-01081
- Nisa S.A., Vasantharaja R. and Govindaraju K. 2023b.** Anti-oxidant and anticancer activities of nematocyst venom protein of five scyphozoan *Chrysaora* jellyfish's species from the coastal waters of Tamil Nadu, India. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(8): 1–11. doi: 10.1007/s13399-023-04206-9
- Prasedya E., Frediansyah A., Martyasari N.W.R., Ilhami B., Abidin A.S., Padmi H., Fahrurrozi Juanssilfero A.B., Widyastuti S. and Sunarwidhi A. 2021.** Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant properties of *Sargassum cristaefolium* ethanol extract. *Scientific Reports*, 11: 178–196. doi: 10.1038/s41598-021-95769-y
- Purcell J.E. 2005.** Climate effects on formation of jellyfish and ctenophore blooms: A review.

- Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 85: 461–476. doi: 10.1017/S0025315405011409
- Purcell J.E., Malej A. and Benovic A. 1999.** Potential links of jellyfish to eutrophication and fisheries. Ecosystems at the Land-Sea Margin: Drainage Basin to Coastal Sea, 55: 241–263. doi: 10.1029/CE055p0241
- Richardson A.J., Bakun A., Hays G.C. and Gibbons M.J. 2009.** The jellyfish joyride: Causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. Trends in Ecology and Evolution, 24: 312–322. doi: 10.1016/j.tree.2009.01.010
- Roux J.P., Van Der Lingen C.D., Gibbons M.J., Moroff N.E., Shannon L.J., Smith A.D. and Cury P.M. 2013.** Jellyfication of marine ecosystems as a likely consequence of overfishing small pelagic fishes: Lessons from the Benguela. Bulletin of Marine Science, 249: 84–89. doi: 10.5343/bms.2011.1145
- Suganthi K., Bragadeeswaran S., Kumaran N.S., Thenmozhi C. and Thangaraj S. 2012.** In vitro antioxidant activities of jelly fish *Chrysaora quinquecirrha* venom from southeast coast of India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2: 347–351. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60186-5
- Uk L. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Vincent J.B. 1999.** Mechanisms of chromium action: Low-molecular-weight chromium-binding substance. Journal of the American College of Nutrition, 18: 6–12. doi: 10.1080/07315724.1999.10718821
- Zare A., Afshar A., Khoradmehr A., Baghban N., Mohebbi G., Barmak A., Daneshi A., Bargahi A., Nabipour I. and Almasi-Turk S. 2023.** Chemical compositions and experimental and computational modeling of the anticancer effects of cnidocyte venoms of jellyfish *Cassiopea andromeda* and *Catostylus mosaicus* on human adenocarcinoma A549 cells. Marine Drugs, 21: 168–175. doi: 10.3390/md21030168



Research Paper

Investigating the antioxidant properties of jellyfish *Chrysaora hysoscella* venom

Asghar Mohammadzadeh Asl^{1*}, Hossein Zolgharnain², Soheila Matroodi³

DOI: 10.22124/japb.2024.26334.1522

Received: January 2024

Accepted: March 2024

Abstract

Some jellyfish species can produce venom containing compounds with potential therapeutic properties. The venom of the jellyfish *Chrysaora hysoscella* possesses various properties that have been less studied. In this research, the extraction and purification of *C. hysoscella* venom and its antioxidant activity were investigated. After venom extraction, its fractions were purified using high-performance liquid chromatography (HPLC). The purified proteins were evaluated using SDS-PAGE. The antioxidant activity of the fractions was studied using three methods: DPPH, ABTS and FRAP. The results showed that the crude venom of *C. hysoscella* contained 10 fractions with molecular weights ranging from 15 to 170 kilodaltons, among which fraction 2 had a molecular weight of less than 15 kilodaltons. The results demonstrated that fraction 2 was capable of inhibiting 50% of free radicals at concentrations of 21, 31 and 52 µg/mL, respectively. Given the positive results of the antioxidant activity, identification of other effective compounds in the venom requires further studies.

Key words: Jellyfish Venom, Antioxidant Property, Chromatography, *Chrysaora hysoscella*.

1- Ph.D. in Marine Biotechnology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

2- Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

*Corresponding Author: a.mohammadzade218@gmail.com

