

مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت ضدقارچی استروئیدهای استخراج شده از اسفنج *Axinella sinoxea* Alvarez & Hooper, 2009 از خلیج فارس

مریم لوری^۱، ایمان سوری نژاد^{۲*}، ملیکا ناظمی^۳، زهرا قاسمی^۴

DOI:10.22124/japb.2023.23777.1491

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۱

چکیده

یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌های دریایی، استروئیدها هستند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات ضدقارچی ترکیبات استروئیدی استخراج شده از اسفنج *Axinella sinoxea* از آب‌های اطراف جزیره لارک در خلیج فارس است. عصاره‌گیری از اسفنج‌ها با استون انجام شد و جداسازی فرکشن‌ها توسط ستون کروماتوگرافی با سیلیکاژل توسط طیفی از حلال‌ها با قطبیت‌های مختلف انجام شد. با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنجی جرمی، استروئیدها در فرکشن‌های استخراج شده از ستون سیلیکاژل شناسایی شدند. سپس خواص ضدقارچی فرکشن‌ها با روش رقت لوله‌ای به منظور تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت کشندگی بر قارچ *Aspergillus fumigatus* و مخمر *Candida albicans* بررسی شد. استروئیدهای شناسایی شده شامل ترکیباتی از *Stigmasta*، *Ergosta*، *Cholest* و *Norgorgosta* بودند که نتایج متفاوتی را در مهار رشد و کشتن سوبه‌های قارچ و مخمر در غلظت‌های مختلف مورد آزمایش نشان دادند. ترکیب‌های *Stigmasta* و *Ergosta* اثر ضدقارچی بهتری نسبت به بقیه استروئیدها داشتند و *Ergosta* بهترین اثر مهارکنندگی و کشندگی را در مقایسه با استروئیدهای دیگر بر مخمر نشان داد. در مجموع، نتایج امیدوارکننده‌ای در مورد خواص ضدقارچی ترکیبات استروئیدی استخراج شده از اسفنج دریایی *A. sinoxea* به دست آمد که لزوم بررسی بیشتر برای تولید زیست‌داروها را از ترکیبات زیست‌فعال دریایی آشکار می‌سازد.

واژگان کلیدی: اسفنج دریایی، ترکیبات زیست‌فعال، خلیج فارس، فعالیت ضدقارچی.

- ۱- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۳- استادیار پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
- ۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

* نویسنده مسئول: sourinejad@hormozgan.ac.ir

مقدمه

ثانویه یا ترکیبات طبیعی سلاح‌های شیمیایی هستند که جانوران دریایی برای بقا از آنها استفاده می‌کنند (Datta et al., 2015).

اسفنج‌ها از شاخه Porifera با ۱۰۷ جنس و حدود ۱۵ هزار گونه، قدمت بیش از ۵۰۰ میلیون سال دارند و تقریباً ۳۰ درصد ترکیبات طبیعی شناسایی شده از موجودات دریایی، از اسفنج‌ها به دست آمده است (Duckworth, 2009). بررسی‌های انجام شده در رابطه با ویژگی‌های بوم‌شناسی شیمیایی اسفنج‌ها نشان داده است که هرگونه اسفنج بر اساس شرایط محیطی، راهکار خاصی برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارد (Thakur et al., 2005). در میان این ترکیبات طبیعی شناسایی شده از اسفنج‌های دریایی، استروئیدها دارای تنوع ساختاری و فراوانی بسیاری هستند. از استروئیدهای موجود در اسفنج‌ها می‌توان به استروئیدهای چند اکسیژنی با هسته و زنجیره‌های جانبی معمولی، استروئیدها با عوامل سولفیدی، استروئیدها با زنجیره‌های جانبی غیرمعمولی و هسته معمولی و استروئیدها با هسته‌های اصلاح شده اشاره کرد. این ترکیبات استروئیدی در گونه‌های مختلف اسفنج و یا یک گونه اسفنج در زیستگاه‌های مختلف

با توجه به بروز برخی مشکلات مثل مقاومت عوامل بیماری‌زا در مقابل داروهای موجود، گسترش بیماری‌های جدید و بروز تأثیرات سمی و مضر استفاده مداوم از داروهای شیمیایی ضدقارچی و ضدباکتریایی در سال‌های اخیر، نیاز به پژوهش‌های بیشتری برای کشف و تولید داروهای جدید با منشا طبیعی و زیستی (زیست‌داروها) بیش از پیش نمایان می‌شود. دریاها و اقیانوس‌ها منبع عظیمی از ترکیبات طبیعی منحصر به فرد و مواد زیست‌فعال هستند و در سال‌های اخیر ترکیبات زیست‌فعال بسیاری از موجودات دریایی شناسایی و استخراج شده است. امروزه پژوهشگران علم بیوتکنولوژی دریا و داروسازی از این ترکیبات به عنوان منبع منحصر به فرد و غنی به منظور بررسی تولید داروهای جدید استفاده می‌کنند (Gomes et al., 2016; Salari et al., 2017). بی‌مهرگان دریایی در زمینه‌های مطالعاتی مختلف مانند پژوهش‌های زیست‌دارویی، تولیدات زیستی و پژوهش‌های پایه و زیست‌شناسی تکاملی کاربرد دارند. بیشتر ترکیبات طبیعی استخراج شده از بی‌مهرگان دریایی دارای ساختارهای پپتیدی، آلکالوئیدی، ترپنوئیدی و استروئیدی هستند. متابولیت‌های

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و عصاره‌گیری از اسفنج

نمونه‌های اسفنج دریایی خلیج فارس گونه *Axinella sinoxea* از عمق ۱۵ تا ۲۰ متری آب‌های اطراف جزیره لارک واقع در استان هرمزگان از طریق غواصی جمع‌آوری و درون ظرف حاوی آب دریا به آزمایشگاه شیمی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل شد. سپس برش‌های یک سانتی‌متری از نمونه‌ها برای خشک شدن به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریزدرایر (Operon, FDB-5503, کره جنوبی) در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب به صورت پودر درآورده شدند تا سطح تماس ماده خشک با حلال‌های آلی برای به دست آوردن بیشترین میزان عصاره جهت انجام آزمایش‌ها افزایش یابد. برای عصاره‌گیری، ابتدا ۱۰۰ گرم از پودر تهیه شده به ارلن حاوی ۱۲۰۰ میلی‌لیتر حلال استون منتقل شد و به منظور جداسازی ترکیبات طبیعی، به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه به دور از تابش نور خورشید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۷۲ ساعت محلول به دست آمده با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد تا ذرات معلق اسفنج دریایی از آن جدا شود و آنچه باقی ماند، حلال

تغییرات قابل ملاحظه‌ای در ساختار و خواص زیست‌شناختی از خود نشان می‌دهند (Anuradha et al., 2013) که لزوم مطالعات بیشتر را در زیست‌بوم‌های مختلف آشکار می‌سازد.

با توجه به اهمیت اسفنج‌ها به عنوان منابع مهم متابولیت‌های ثانویه با اثرات زیستی، در بسیاری از کشورهای پیشرفته پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه شناسایی و بررسی متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌ها صورت می‌گیرد. با وجود تنوع بسیار بالای اسفنج‌ها در زیست‌بوم‌های آبی، مطالعات چندانی در مورد ترکیبات طبیعی آنها در سواحل خلیج فارس صورت نگرفته است. از طرف دیگر عوامل بیماری‌زای قارچی در سیستم‌های زیستی و آبی‌پروری شایع و مورد توجه هستند. اسفنج *Axinella sinoxea* Alvarez & Hooper, 2009 از رده *Demospongiae*، راسته *Axinellida*، خانواده *Axinellidae* و جنس *Axinella* است. با توجه به اهمیت و جدید بودن انجام مطالعات در حوزه استخراج متابولیت‌های ثانویه از آبزیان دریایی کشور، هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات ضدقارچی ترکیبات استروئیدی استخراج شده از این گونه مهم اسفنج خلیج فارس است.

استون و ترکیبات آلی موجود در نمونه بود. عصاره به دست آمده به دستگاه روتاری (Heidolph, Laborota 4000، آلمان) منتقل شد تا تحت فشار کم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۴۵ دور در دقیقه، حلال آن تبخیر و جدا شود و تنها عصاره خالص باقی بماند (Qaralleh et al., 2010).

جداسازی و شناسایی استروئیدها با ستون کروماتوگرافی

به منظور تشخیص حضور استروئید در فرکشن‌های استخراج شده، از کروماتوگرافی لایه‌نازک (Thin Layer Chromatography) استفاده شد. شناسایی استروئیدها در فرکشن‌های استخراج شده، با استفاده از کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنجی جرمی (Gas Chromatography -Mass Spectrometry 7000 Series Triple Quad GC/MS، Agilent، آمریکا) (گاز کریر هلیوم ۹۹/۹۹ درصد، آشکارساز C5975، ستون Part Number 19091s-436، طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) صورت گرفت. در نهایت چهار نوع استروئید از اسفنج استخراج و شناسایی شد و اثرات ضد قارچی آنها بررسی شد.

ارزیابی اثرات ضدقارچی استروئیدهای *Axinella sinoxea*

تعیین کمترین غلظت بازدارندگی بررسی خواص ضدقارچی اسفنج با استفاده از روش ماکرودیلوشن انجام شد (Galeano and Martinez, 2007). سویه‌های قارچ *Candida albicans* و مخمر *Aspergillus fumigatus* از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه

از عصاره استونی تهیه شده از اسفنج دریایی به شرح زیر برای جداسازی ترکیبات طبیعی با استفاده از ستون سیلیکاژل استفاده شد (Khakshoor and Pazooki, 2014). مقدار مشخصی از عصاره استونی اسفنج تغلیظ شده روی ستون سیلیکاژل قرار گرفت و سپس به منظور جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده، ستون با حلال کاملاً غیرقطبی n-هگزان خالص شستشو داده شد. در ادامه قطبیت حلال شوینده با اتیل‌استات افزایش یافت و از سیستم حلالی n-هگزان-اتیل‌استات استفاده شد و در نهایت به منظور جداسازی کامل ترکیبات، ستون با سیستم حلالی اتیل‌استات-متانول شستشو داده شد که منجر به جمع‌آوری ۱۱۹ فرکشن شد.

شد. سپس از عصاره‌های استروئیدی با غلظت‌های ۲، ۴، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که در محیط براث حل شده بودند به مقدار یک میلی‌لیتر به لوله‌های فوق با سه تکرار افزوده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از داروی ضدقارچ نیستاتین بر اساس میزان ماده موثره در هر گرم از قرص، غلظت‌های فوق تهیه شد و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها عصاره استروئیدی اضافه نشد. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد عصاره استروئیدی و قارچ قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص شود. سپس سر تمام لوله‌ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد.

پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شد و کدورت آنها مورد بررسی قرار گرفت. لوله شاهد که فاقد ترکیبات فعال عصاره استروئیدی بود بسیار کدر شده بود. برای ادامه کار لوله‌های دیگر با لوله شاهد به صورت چشمی مقایسه شدند که میانگینی از سه مرتبه آزمایش برای هرگونه قارچی و مخمر بود. لوله‌هایی که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله‌هایی که در آن کدورت ایجاد نشده

تهیه و کشت اولیه داده شدند. مخمر *C. albicans* در محیط کشت حاوی ۲۰ گرم آگار، ۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم پپتون، ۳ گرم عصاره مخمر در یک لیتر آب مقطر با pH برابر با $6/2 \pm 0/2$ کشت اولیه داده شد، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و از کلونی تک به منظور انجام آزمایش استفاده شد. قارچ *A. fumigatus* در محیط کشت حاوی ۲۰ گرم عصاره سیب‌زمینی، ۲۰ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر با pH برابر با $6/2 \pm 0/2$ کشت اولیه داده شد، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و از کلونی تک به منظور انجام آزمایش استفاده شد. قارچ و مخمر پس از رشد از انکوباتور خارج شدند و با استفاده از آنس کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط ماکرودیولوشن براث در لوله‌های آزمایش وارد شدند. سوسپانسیون به دست آمده در طول موج ۵۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil, CE 2501, Instruments، بریتانیا) دارای عبور نوری ۹۰ درصد استاندارد اندازه‌گیری شد که معادل 10^6 سلول قارچ در هر میلی‌لیتر است. از لوله‌ای که حاوی 10^6 سلول قارچی بود به مقدار یک میلی‌لیتر به هر کدام از لوله‌های استریل اضافه

«Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3 β -24Z)»
 و «Cholest-8(14)-en-3-ol,(3 β .5 α)»
 «Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3 β ,22E,24S)»
 از اسفنج *A. sinoxea* در مطالعه حاضر
 استخراج و شناسایی شدند.

بررسی اثر ضدقارچی استروئید Norgorgosta
 مقدار MIC استروئید Norgorgosta بر
 قارچ *A. fumigatus* برابر با ۲۰۰ میکروگرم در
 میلی‌لیتر و بر مخمر *C. albicans* برابر با
 ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. مقدار MFC
 این استروئید بر قارچ برابر با ۵۰۰ میکروگرم در
 میلی‌لیتر بود و بر مخمر هیچگونه اثر کشندگی
 نداشت (جدول ۱).

بررسی اثر ضدقارچی استروئید Stigmasta
 مقدار MIC استروئید Stigmasta بر قارچ
A. fumigatus برابر با ۵۰۰ میکروگرم در
 میلی‌لیتر و بر مخمر *C. albicans* برابر با ۲۰۰
 میکروگرم در میلی‌لیتر بود. مقدار MFC بر قارچ
 برابر با ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بر مخمر
 برابر با ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود
 (جدول ۲).

بود به منظور ادامه کار جدا شدند. یادآوری
 می‌شود که غلظت مواد مصرفی در لوله‌های
 بدون کدورت میزان MIC (Minimum
 Inhibitory Concentration) که به معنای
 ممانعت از رشد و افزایش تعداد قارچ‌ها است را
 نشان می‌دهد.

تعیین کمترین غلظت کشندگی

برای تعیین کمترین غلظت کشندگی
 Minimum Fungicidal Concentration:) (MFC
 مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر کدام
 از لوله‌هایی که رشدی در آنها مشاهده نشده
 بود، بر روی پلیت‌های محیط Sabouraud
 Dextrose آگار کشت خطی داده شد. سپس
 پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند و در دمای ۲۶
 درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری
 شدند. کمترین غلظتی که در آن سبب مرگ
 قارچ *A. fumigatus* و مخمر *C. albicans*
 شده بود و پلیت‌ها فاقد کلونی بودند به عنوان
 MFC منظور شد (Putra and Hadi, 2017).

نتایج

استروئیدهای شناسایی شده

چهار ترکیب استروئیدی «33-

«Norgorgosta-5-24(28)-dien-3-ol(3 β)»

جدول ۱: کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی استروئید *Norgorgosta* بر قارچ و مخمر

MFC	غلظت استروئید (µg/mL)							نمونه‌ها
	۲۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰	۱۰	
۵۰۰	-	-	-	*_	+	+	+	<i>Aspergillus fumigatus</i>
-	*_	+	+	+	+	+	+	<i>Candida albicans</i>

+ : نمونه‌های دارای کدورت؛ - : نمونه‌های فاقد کدورت؛ * : کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)؛ MFC : کمترین غلظت کشندگی.

جدول ۲: کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی استروئید *Stigmasta* بر قارچ و مخمر

MFC	غلظت استروئید (µg/mL)							نمونه‌ها
	۲۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰	۱۰	
۲۰۰۰	-	-	*_	+	+	+	+	<i>Aspergillus fumigatus</i>
۱۰۰۰	-	-	-	*_	+	+	+	<i>Candida albicans</i>

+ : نمونه‌های دارای کدورت؛ - : نمونه‌های فاقد کدورت؛ * : کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)؛ MFC : کمترین غلظت کشندگی.

بررسی اثر ضدقارچی استروئید **Cholest** میکروگرم در میلی لیتر بود. مقدار MFC بر قارچ برابر با ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و بر مخمر *Aspergillus fumigatus* برابر با ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و بر مخمر *C. albicans* برابر با ۱۰۰۰ (جدول ۳).

جدول ۳: کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی استروئید **Cholest** بر قارچ و مخمر

MFC	غلظت استروئید (µg/mL)							نمونه‌ها
	۲۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰	۱۰	
۵۰۰	-	-	-	*_	+	+	+	<i>Aspergillus fumigatus</i>
۲۰۰۰	-	*_	+	+	+	+	+	<i>Candida albicans</i>

+ : نمونه‌های دارای کدورت؛ - : نمونه‌های فاقد کدورت؛ * : کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)؛ MFC : کمترین غلظت کشندگی.

بررسی اثر ضدقارچی استروئید *Ergosta* مقایسه فعالیت ضدقارچی استروئیدهای
 مقدار MIC استروئید *Ergosta* بر قارچ A. استخراج شده
fumigatus برابر با ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر جمع بندی فعالیت ضدقارچی استروئیدهای
 و بر مخمر *C. albicans* برابر با ۲۰۰ میکروگرم استخراج شده در جدول ۵ و مقایسه فعالیت
 در میلی لیتر بود. مقدار MFC بر قارچ برابر با ضدقارچی استروئیدها در شکل های ۱ و ۲ ارائه
 ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و بر مخمر برابر با شده است.
 ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود (جدول ۴).

جدول ۴: کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی استروئید *Ergosta* بر قارچ و مخمر

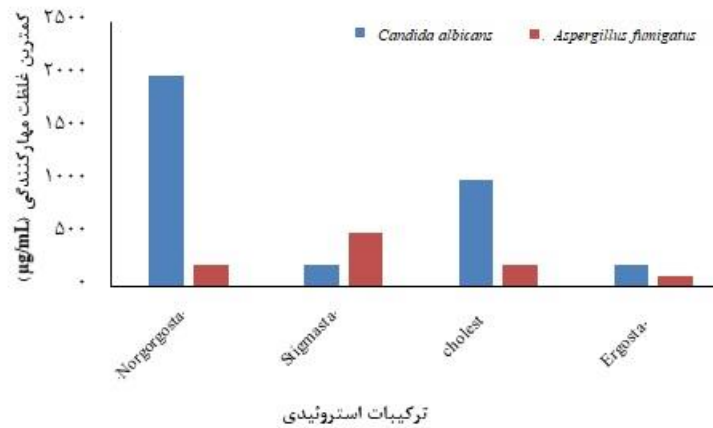
MFC	غلظت استروئید (µg/mL)								نمونه‌ها
	۲۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰	۱۰		
۲۰۰	-	-	-	-	* ₋	+	+		<i>Aspergillus fumigatus</i>
۵۰۰	-	-	-	* ₋	+	+	+		<i>Candida albicans</i>

+ : نمونه‌های دارای کدورت؛ - : نمونه‌های فاقد کدورت؛ * : کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)؛ MFC : کمترین غلظت کشندگی.

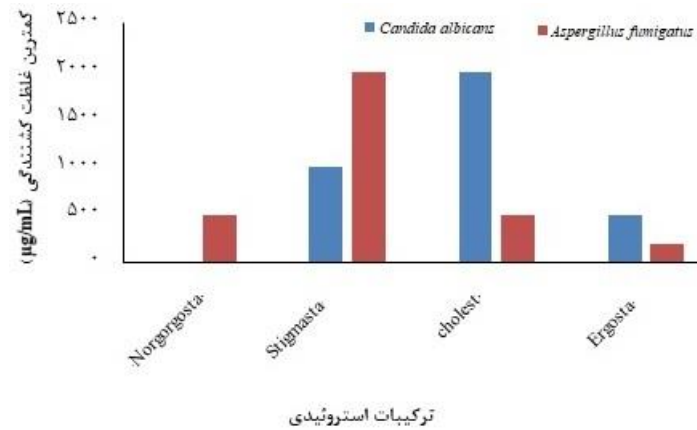
جدول ۵: جمع بندی فعالیت ضدقارچی استروئیدهای استخراج شده از اسفنج *Axinella sinoxea*

Ergosta	Cholest	Stigmasta	Norgorgosta	استروئید	
۱۰۰	۲۰۰	۵۰۰	۲۰۰	<i>Aspergillus fumigatus</i>	(µg/mL) MIC
۲۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰	۲۰۰۰	<i>Candida albicans</i>	
۲۰۰	۵۰۰	۲۰۰۰	۵۰۰	<i>Aspergillus fumigatus</i>	(µg/mL) MFC
۵۰۰	۲۰۰۰	۱۰۰۰	-	<i>Candida albicans</i>	

MIC : کمترین غلظت بازدارندگی؛ MFC : کمترین غلظت کشندگی؛ - : بدون اثر کشندگی.



شکل ۱: مقایسه کمترین غلظت مهارکنندگی استروئیدهای اسفنج دریایی *Axinella sinoxea*



شکل ۲: مقایسه کمترین غلظت کشندگی استروئیدهای اسفنج دریایی *Axinella sinoxea*

همان گونه که در شکل ۱ مشخص است Ergosta در کمترین غلظت بیشترین اثر مهارکنندگی را بر قارچ نشان داد. استروئیدهای Stigmasta و Ergosta در غلظت یکسان منجر به مهار مخمر شدند. همان طور که شکل ۲ نشان می‌دهد ترکیب استروئیدی Ergosta بر قارچ در کمترین غلظت بیشترین اثر کشندگی را نشان داد. استروئیدهای Cholest و Norgorgosta در غلظت یکسان موجب از بین بردن قارچ *A. fumigatus* شدند. ترکیب

Norgorgosta بر مخمر خاصیت کشندگی نشان نداد.

بحث

در سال‌های اخیر بروز برخی مشکلات مثل مقاومت عوامل بیماری‌زا در مقابل داروهای موجود، گسترش بیماری‌های جدید، ناشناخته و غیرقابل علاج و بروز تاثیرات سمی و مضر استفاده مداوم از داروهای شیمیایی ضدقارچی و ضدباکتریایی نیاز به پژوهش‌های بیش‌تر را برای کشف و تولید داروهای جدید با منشا طبیعی بیش از پیش نمایان می‌سازد (Blunt et al., 2011). با توجه به کاربرد مواد شیمیایی برای بین بردن این عوامل مخاطره‌آمیز که منجر به ایجاد بیماری‌هایی در انسان و موجودات دیگر شده‌اند و به دلیل حضور عواملی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها و تخریب‌کنندگان سلولی که بافت‌ها را به سمت سرطانی شدن و القای تومور سوق می‌دهند، باید به زیست داروها توجه جدی شود. در اسفنج‌های دریایی ترکیباتی که به منظور سازگاری با شرایط محیطی تولید می‌شوند به عنوان متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند. اسفنج‌ها یکی از منابع غنی تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات طبیعی هستند. دلیل تولید چنین ترکیباتی دفاع در

برابر شکارچیان، مقاله با جانورانی که روی سطح اسفنج‌ها قرار گرفته و حیات آنها را تهدید می‌کنند و همچنین کنترل باکتری‌های داخلی که بیش از ۵۰ درصد توده زیستی اسفنج‌ها را شامل می‌شوند، است. از اسفنج‌های دریایی، استروئیدها با تنوع ساختاری بیشتری نسبت به هر گونه جاندار دیگری گزارش شده است.

بر اساس مطالعات پیشین، Viegemann و همکاران در سال ۲۰۱۴ به استخراج و شناسایی استروئیدها از اسفنج دریایی *Haliclona simulans* پرداختند که منجر به استخراج سه نوع استروئید با ماهیت مشابه با مطالعه حاضر شد. ترکیب «Cholest-8(14)-en-3-ol, (3 β .5 α)» یکی از مشتقات استروئیدی است که در این مطالعه از عصاره استونی *A. sinoxea* شناسایی شد. Aknin و همکاران در سال ۲۰۱۰ عصاره کلروفرم- متانولی استخراج شده از اسفنج دریایی *Fascaplysinopsis* sp. را مورد بررسی قرار دادند و ترکیب Cholest را شناسایی کردند که شامل انواع «Cholesta-5,7-dien-3 β -ol»، «Cholesta-5,22E-dien-3 β -ol» و «Cholest-7-en-3 β -ol» بود. Paula و همکاران در سال ۲۰۱۵ عصاره خام استونی از پنج گونه اسفنج دریایی شامل *Chondrosia*

همکاران در ۲۰۱۶ عصاره استونی از اسفنج دریایی *Xestospongia testudinaria* را مورد بررسی قرار دادند که طی این مطالعه ترکیب ergosta-22,25-diene شناسایی شد.

دلایل پیچیده بودن ترکیبات استروئیدی، توانایی قابل توجه اسفنج‌های دریایی در تبدیل استروئیدهای رژیم غذایی است. علاوه بر این، تغییر در ترکیبات رژیم غذایی و ریزمغذی‌ها در محل‌های مختلف موجب تغییر در ترکیبات استروئید همان گونه در مکان‌های مختلف می‌شود. طیف وسیعی از تغییرات در فعالیت ضدقارچی گونه‌های مختلف اسفنج گزارش شده است که احتمالاً منعکس کننده تفاوت در ترکیبات شیمیایی و متابولیت‌های موجود در گونه‌های مختلف است (Qaralleh et al., 2010; Khakshoor and Pazooki, 2014).

در مطالعه حاضر به بررسی اثر ضدقارچی استروئیدهای استخراج شده از اسفنج دریایی گونه *A. sinoxea* بر قارچ *A. fumigatus* و مخمر *C. albicans* پرداخته شد. ترکیبات استروئیدی در اسفنج‌های با گونه‌های مختلف و در گونه‌های یکسان در زیستگاه‌های مختلف تغییرات قابل ملاحظه‌ای را در ساختار و خواص زیستی از خود نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر، کمترین غلظت مهارکنندگی ترکیب استروئیدی

Tethya ignis, *Tethya rubra*, *reniformis* و *Mycale angulosa* را در برزیل و اسپانیا مورد بررسی قرار دادند و ترکیب Cholest را در عصاره زیست‌فعال این اسفنج‌های دریایی یافتند که شامل « 3β)-cholest-5-en-3-ol» در *M. angulosa* و *T. ignis* و *T. rubra*, *reniformis* ۹۳ درصد و «(20R)-cholesta-3,5-diene» در *C. reniformis* با مقدار ۹۶ درصد بود و ترکیبات استروئیدی به دست آمده در این اسفنج‌ها با ترکیبات استروئیدی به دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد.

ترکیب « 3β)-Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol» یک استروئید است که در این مطالعه از عصاره استونی *A. sinoxea* شناسایی شد. در سال ۲۰۱۵، Paula و همکاران عصاره استونی اسفنج دریایی *M. angulosa* را مطالعه کرده و ترکیب‌های Stigmasta شامل « 3β)-stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol» به مقدار ۸۵ درصد و «stigmasta-3,5-dien-7-one» به مقدار ۹۳ درصد را شناسایی کردند. ترکیب Ergosta-5,22-dien-3-ol, (3 β ,22E,24S)- یک استروئید است که در این مطالعه از عصاره استونی *A. sinoxea* شناسایی شد. He و

شدند، در حالی که *Norgorgosta* در غلظت‌های به کار گرفته شده اثر کشندگی نداشت. در مجموع ترکیب *Ergosta* بهترین اثر مهارکنندگی و کشندگی را در مقایسه با استروئیدهای دیگر بر مخمر نشان داد.

برای مقایسه نتایج، منابع کمی در زمینه استخراج ترکیبات طبیعی از اسفنج‌های خلیج فارس و بررسی خواص ضدقارچی آنها وجود دارد. در یکی از مطالعات، اثر ضدقارچ متابولیت‌های ثانویه نیمه قطبی- غیرقطبی اسفنج *Ircinia mutans* از جزیره کیش خلیج فارس در دو فصل تابستان و زمستان بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج در فصل تابستان در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از رشد قارچ *A. fumigatus* جلوگیری کرد و در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سبب مرگ این قارچ شد. عصاره دی‌اتیل اتری استخراج شده از اسفنج در فصل تابستان در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از رشد قارچ جلوگیری کرد، اما در هیچ کدام از غلظت‌های مورد بررسی سبب مرگ قارچ نشد. عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج یاد شده، در فصل زمستان در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر از رشد قارچ جلوگیری کرد و در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر سبب مرگ قارچ شد. عصاره دی‌اتیل

Ergosta برابر با ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که دارای بهترین اثر ضدقارچی در مقایسه با دیگر استروئیدهای مورد مطالعه در این بررسی بر قارچ *A. fumigatus* بود. علاوه بر این، *Ergosta* در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر کشندگی بر قارچ نشان داد. ترکیب‌های *Cholest* و *Norgorgosta* در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث مهار و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث اثر کشندگی بر قارچ شدند. بنابراین ترکیب «*Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S)*» بهترین اثر مهارکنندگی و کشندگی را در مقایسه با استروئیدهای دیگر بر قارچ *A. fumigatus* نشان داد.

طبق نتایجی که با بررسی اثر ضدقارچ بر مخمر *C. albicans* به دست آمد، کمترین غلظت مهارکنندگی *Ergosta*، *Cholest*، *Norgorgosta* و *Stigmasta* به ترتیب برابر با ۲۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد، بنابراین ترکیب‌های استروئیدی *Ergosta* و *Stigmasta* اثر ضدقارچ بهتری را نسبت به بقیه استروئیدها بر مخمر نشان دادند. علاوه بر این ترکیب‌های *Ergosta*، *Cholest* و *Stigmasta* به ترتیب در غلظت ۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۱۰۰۰ منجر به کشندگی مخمر

شده از اسفنج دریایی *A. sinoxea* جزیره لارک و دیگر مطالعات انجام شده در رابطه با اسفنج‌های دریایی مناطق دیگر دنیا نشان می‌دهد که فرکشن‌های استخراج شده دارای اثرات بالقوه ضدقارچی بوده و به عنوان یک ترکیب خالص‌سازی شده در غلظت پایین بر سویه‌های قارچی اثرگذار است. بنابراین استروئیدهای اسفنج‌های دریایی می‌توانند انتخاب‌های مناسبی برای ساخت زیست‌داروها از ترکیبات زیست‌فعال دریایی باشند.

اتری استخراج شده از اسفنج در فصل زمستان در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از رشد قارچ جلوگیری کرد، اما در هیچ کدام از غلظت‌های مورد بررسی سبب مرگ قارچ نشد (Nazemi et al., 2013). با توجه به این که در مطالعه حاضر خواص ضدقارچی عصاره‌های اسفنج مورد بررسی گرفت که حاوی ناخالصی‌های زیادی بود، با تخلیص ماده موثره اسفنج و انجام مطالعات جامع‌تر، می‌توان به ترکیباتی با اثرات ضدقارچ قابل قبول و عوارض جانبی کم برای درمان عفونت‌های قارچی دست یافت.

در مجموع، مطالعه انجام شده در مورد اثرات ضدقارچی فرکشن‌های استروئیدی استخراج

منابع

- Aknin M., Gros E., Vacelet J., Kashman Y. and Gauvin-Bialecki A. 2010.** Sterols from the Madagascar sponge *Fascaplysinopsis* sp. *Marine Drugs*, 8: 2961–2975. doi: 10.3390/md8122961
- Anuradha V., Byiu K., Emilda R., Aun G., Nair S.M., Chandramohanakumar N., Prashob Peter K.J., Gireesh Kumar T.J. and Vasunchara G. 2013.** In silico biological activity of steroids from the marine sponge *Axinella carteri*. *Medicinal Chemistry Research*, 22: 1142–1146. doi: 10.1007/s00044-012-0119-6
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.J., Northeote P.T. and Prinsep M.R. 2011.** Marine natural products. *Natural Product Reports*, 28: 196–268. doi: 10.1039/C005001F
- Datta D., Talapatra S.N. and Swarnakar S. 2015.** Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines- An overview. *International Letters of Natural Sciences*, 34: 42–61. doi: 10.56431/p-i22ej9
- Duckworth A. 2009.** Farming sponges to supply bioactive metabolites and bath sponges: A review. *Journal of Marine Biotechnology*, 11: 669–679. doi: 10.1007/s10126-009-9213-2
- Galeano E. and Martinez A. 2007.** Antimicrobial activity of marine sponges from Uraba Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal of Medical Mycology*, 17(1): 21–24. doi: 10.1016/j.mycmed.2006.12.002
- Gomes N.G., Dasari R., Chandra S., Kiss R. and Kornienko A. 2016.** Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the “supply problem”. *Marine Drugs*, 14(5): 1–39 (98). doi: 10.3390/md14050098
- He W.F., Xue D.Q., Yao L.G., Li J., Liu H.L. and Guo U.V. 2016.** A new bioactive steroidal ketone from the South China Sea sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 18(2): 195–199. doi: 10.1080/10286020.2015.1056521
- Khakshoor M.S. and Pazooki J. 2014.** Bactericidal and fungicidal activities of different crude extracts of *Gelliodes carnosus* (sponge, Persian Gulf). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(3): 776–784. doi: 20.1001.1.15622916.2014.13.3.20.4
- Nazemi M., Motallebi A.A., Jamili S., Mashinchian A., Gavam Mostaavi P. and Ahmadzadeh O. 2013.** Comparison of antifungal activities of semipolar- nonpolar

secondary metabolites of *Ircinia mutans* extracts in two different seasons from Kish Island, Persian Gulf. Iranian Scientific Fisheries Journal, 22(1): 129–138.

Paula J.C.D., Desoti V.C., Sampiron E.G., Martins S.C., Ueda-Nakamura T., Ribeiro S.M., Bianco E.M., Silva S.D.O., Oliveira G.G. and Nakamura C.V. 2015. Trypanocidal activity of organic extracts from the Brazilian and Spanish marine sponges. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 25: 651–656. doi: 10.1016/j.bjp.2015.08.011

Putra M.Y. and Hadi T. 2017. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antiplasmodial activities of three sponges from Buton Islands, Indonesia. Indonesian Journal of Marine Sciences, 22(3): 147–154. doi: 10.14710/jis.%25v.%25i.%25Y.551-563

Qaralleh H., Idid S., Saad S., Susanti D., Taher M. and Khleifat K. 2010. Antifungal and

antibacterial activities of four Malaysian sponge species (Petrosiidae). Journal de Mycologie Medicale, 20(4): 315–320. doi: 10.1016/j.mycmed.2010.10.002

Salari Z., Sourinejad I., Nazemi M. and Yousefzadi M. 2017. Qualitative survey of the extracted saponin from the Persian Gulf sea cucumber *Stichopus hermani*. Aquatic Physiology and Biotechnology, 5(1): 21–35. doi: 10.22124/JAPB.2017.2327

Thakur N.L., Thakur A.N. and Muller W.E. 2005. Marine natural products in drug discovery. Natural Products Radiance, 4: 471–477.

Viegelmann C., Parker J., Ooi T., Clements C., Abbott G., Young L., Kennedy J., Dobson A.D.W. and Edrada-Ebel R. 2014. Isolation and Identification of antitrypanosomal and antimycobacterial active steroids from the sponge *Haliclona simulans*. Marine Drugs, 12(5): 2937–2952. doi: 10.3390/md12052937



Research Paper

Investigating the antifungal effects of the steroids extracted from the sponge *Axinella sinoxea* Alvarez & Hooper, 2009 from the Persian Gulf

Maryam Loori¹, Iman Sourinejad^{2*}, Melika Nazemi³, Zahra Ghasemi⁴

DOI:10.22124/japb.2023.23777.1491

Received: February 2023

Accepted: March 2023

Abstract

One of the most important secondary metabolites of the marine sponges are steroids. The aim of this study is to investigate the antifungal activity of the steroidal fractions derived from the sponge *Axinella sinoxea* from the waters around Lark Island in the Persian Gulf. Extraction from sponges was done with acetone and separation of fractions was done by column chromatography with silica gel using a range of solvents with different polarity. Identification of steroidal fractions were done by thin layer chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry. Then, antifungal properties of the steroids were investigated through determining the minimum inhibition concentration and minimum fungicidal concentration by tubular dilution method against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. The identified steroids included compounds of Stigmasta, Ergosta, Cholest and Norgorgosta, which showed different results regarding the growth inhibition and killing of fungi and yeast strains at different experimental doses. Stigmasta and Ergosta showed more antifungal effects against *A. fumigatus* compared with the other steroids and Ergosta caused the best inhibitory and killing effects against *C. albicans* compared with the other steroids. In conclusion, promising results were found regarding the antifungal effects of the extracted steroids of the marine sponge *A. sinoxea*, revealing the necessity of more comprehensive investigations for the synthesis of biomedicines from the marine bioactive compounds.

Key words: *Marine Sponge, Bioactive Compounds, Persian Gulf, Antifungal Activity.*

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

2- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

3- Assistant Professor in Persian Gulf and Oman Sea Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institution, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Bandar Abbas, Iran.

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

*Corresponding Author: sourinejad@hormozgan.ac.ir