وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان پروژه تحقیقاتی :

بررسی خواص بیولوژیک (ضدباکتری، ضدقارچ، سیتوتوکسیک و ضدویروس) عصاره اسفنج *Dysideasp.*

مجری :

ملیکا ناظمی

شماره ثبت

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان پروژه : بررسی خواص بیولوژیک (ضدباکتری، ضدقارچ، سیتوتوکسیک و ضدویروس) عصاره اسفنج ***Dysideasp.***

شماره مصوب پروژه : ۸۹۱۶۵-۱۲-۷۵-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : ملیکا ناظمی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : ملیکا ناظمی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عباسعلی مطلبی ، احمد سواری، منصورصدریان، احمد غرقی، رویا صفدری ، شهرام قاسمی، فاطمه پیشه ورزاده ، امید احمدزاده، مرتضی دلیری ، محسن گذری
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : یزدان مرادی

محل اجرا : استان هرمزگان
تاریخ شروع : ۸۹/۱۱/۱
مدت اجرا : ۲ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۳

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : بررسی خواص بیولوژیک (ضدباکتری، ضدقارچ، سیتوتوکسیک و ضدویروس) عصاره اسفنج *Dysideasp.*

کد مصوب : ۸۹۱۶۵-۱۲-۷۵-۲

شماره ثبت (فروست) : **تاریخ :**

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم ملیکا ناظمی دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بیولوژی دریا می‌باشد.
پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در

تاریخ ۹۳/۳/۲۴ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای یا پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز□ ایستگاه

با سمت کارشناس در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

مشغول بوده است.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION -
Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center

Project Title :
Biological activity (Antibacterial, Antifungal, Antiviral and Cytotoxic) of extract from *Dysidea* spp.

Project Researcher :
Melika Nazemi

Register NO.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION –
Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center

Project Title : Biological activity (Antibacterial, Antifungal, Antiviral and Cytotoxic) of extract from *Dysidea* spp.
Approved Number: 2-75-12-89165
Author: Melika Nazemi

Project Researcher : Melika Nazemi
Collaborator(s) : Abbas Ali Motallebi, Ahmad Savari, Ahmad Ghoroghi,Roya Safdari, Shahram Ghasemi, Fatemeh Pishvarzadeh, Omid Ahmadzadeh,Mohsen Gozari,Morteza Daliri, Mansor Sadrian
Advisor(s): -
Supervisor: Yazdan Moradi
Location of execution : Hormozgan province
Date of Beginning : 2011
Period of execution : 2 Years
Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*
Circulation : *20*
Date of publishing : *2014*
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده.....1
فصل اول.....۴
مقدمه.....۴

فصل دوم.....۷
بررسی منابع علمی.....۷
۲-۱- زیست شناسی و فیزیولوژی اسفنج ها ۷
۱-۲-۱- آناتومی و فیزیولوژی اسفنج ها.....۷
زیست شناسی و فیزیولوژی اسفنج ها.....۷
2-۲- متابولیت های ثانویه اسفنج ها..... ۸
۲-۳- ترکیبات طبیعی با خواص دارویی اسفنج ها..... ۱۲
۲-۳-۱- ترکیبات طبیعی و داروهای تولید شده از اسفنج ها ۱۲
۲-۴- خواص سیتوتوکسیک اسفنج ها در راستای تولید داروهای ضدسرطان ۱۹
۲-۵- خواص ضدباکتری اسفنج ها در راستای تولید ۲۱
۲-۶- خواص ضدقارچی اسفنج ها در راستای تولید داروهای ضدقارچ..۲۴
۲-۷- خواص ضدویروس اسفنج ها در راستای تولید داروهای..... ۲۶

فصل سوم..... ۲۷

مواد و روش کار.....۲۷
۳-۱- مواد مصرفی ۲۷
۳-۲- روش کار ۲۷
۱-۳-۲- نمونه برداری و شناسایی نمونه ۲۷
۲-۳-۲-شناسایی نمونه..... ۲۸
۱-۲-۳-۲- هضم توسط ماده سفید کننده..... ۲۸
۲-۲-۳-۲- هضم اسیدی..... ۲۸
۳-۳ - عصاره گیری و شناسایی ترکیبات طبیعی غیر قطبی ۲۹
۱-۳-۳- عصاره گیری ترکیبات طبیعی غیرقطبی و نیمه قطبی ۲۹
۲-۳-۳- عصاره گیری ترکیبات قطبی ۳۰
۳-۴ - بررسی خواص سیتوتوکسیک..... ۳۰
۱-۳-۴ - کشت سلول های سرطانی اپیدرموید دهان و ۳۰
۳-۵ - بررسی خواص ضدباکتریایی ۳۳
۳-۶- بررسی خواص ضد قارچی ۳۸
3-۷- بررسی خواص ضد ویروسی..... ۴۲
۱-۳-۷- سنجش پرولیفراسیون..... ۴۲
۲-۳-۷- پلاسمیدها..... ۴۲
۳-۳-۷- کشت سلول..... ۴۲
۴-۳-۷- ترانسفکشن و تولید ویروس..... ۴۳
۵-۳-۷- ترکیبات و طراحی آزمایشات..... ۴۳

فصل چهارم ۴۵
نتایج ۴۵
۴-۱- شناسایی اسفنج..... ۴۵
۱-۴-۱- اسپیکول های کلسیمی مشاهده شده به روش هضم ۴۵
۲-۴-۱- اسپیکول های سیلیسی مشاهده شده به روش هضم اسیدی..... ۴۵
۴-۲- شناسایی ترکیبات طبیعی موجود در عصاره دی اتیل اتری... ۴۷

۴-۳- بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره های ۵۱
۴-۴- بررسی اثر ضدباکتری عصاره های اسفنج ۶۰
۴-۵- بررسی اثر ضدقارچ عصاره های اسفنج *Dysidea pallescens*..... ۶۵
۴-۶- بررسی اثر ضد ویروس عصاره های اسفنج *Dysidea pallescens* ۶۹

فصل پنجم..... ۷۴
بحث ۷۴

فهرست منابع..... ۹۲

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل ۲-۱-آناتومی اسفنج..... ۸
شکل ۲-۲- متابولیت های ثانویه شناسایی شده..... ۱۲
شکل ۲-۳- B- ترکیبات زیستی، N- ترکیبات طبیعی..... ۱۵
شکل ۲-۴- مراحل تولید دارو از ترکیبات طبیعی مشاهده می شود. ۱۷
شکل ۳-۱- محل نمونه برداری که با علامت قرمز ۲۷
شکل ۳-۲-توزیع سلول های سرطانی به پلیت ۹۶ خانه..... ۳۲
شکل ۳-3-لوله ها با حجم ۲ml، حاوی عصاره های قطبی..... ۳۵
شکل ۳-4-مشاهده کدورت در لوله ها..... ۳۶
شکل ۳-۵- تعیین MBC و MIC برای یک نوع باکتری و یک نوع ۳۷
شکل ۳-۶- مشاهده کدورت در لوله ها..... ۴۰
شکل ۳-۷- تعیین میزان MIC و MFC عصاره های بیولوژیک ۴۱
شکل ۴-۱- اسپیکول های کلسیمی با میکروسکوپ نوری ۴۵
شکل ۴-۲-اسپیکول های سیلیسی مشاهده شده با میکروسکوپ نوری.. ۴۶
شکل ۴-۳-اسفنج *Dysidea pallescens* در عمق ۲۰ متری جزیره هنگام..... ۴۶
شکل ۴-۴- کروماتوگرام گازی عصاره دی اتیل اتری..... ۴۷
شکل ۴-۵- طیف جرم ترکیب Eicosane..... ۴۸
شکل ۴-۶- طیف جرم ترکیب Digitoxin..... ۴۸
شکل ۴-۷- طیف جرم ترکیب Bis (2- Ethylhexyl) phthalate ۴۹
شکل ۴-۸- طیف جرم ترکیب Ricinoleic acid..... ۴۹
شکل ۴-۹- طیف جرم ترکیب Vitamine A aldehyde..... ۵۰
شکل ۴-۱۰- طیف جرم ترکیب Cholesterol..... ۵۰
شکل ۴-۱۱- سلول های KB (a) و HUT-78 (b) قبل از افزودن عصاره... ۵۱

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار ۴-۱. تعیین میزان IC_{50} عصاره دی اتیل اتری اسفنج ۵۴
نمودار ۴-۲. تعیین میزان IC_{50} عصاره متانولی اسفنج ۵۴
نمودار ۴-۳. تعیین میزان IC_{50} ترکیب سیکلوسپورین ۵۵
نمودار ۴-۴. تعیین میزان IC_{50} عصاره دی اتیل اتری اسفنج ۵۸
نمودار ۴-۵. تعیین میزان IC_{50} عصاره متانولی اسفنج ۵۸
نمودار ۴-۶. تعیین میزان IC_{50} ترکیب سیکلوسپورین روی سلول KB.. ۵۹
نمودار ۴-۷. تعیین میزان CC_{50} تعیین شده عصاره دی اتیل اتری... ۷۰
نمودار ۴-۸. تعیین میزان CC_{50} تعیین شده عصاره متانولی اسفنج.. ۷۰
نمودار ۹.۴. تعیین میزان IC_{50} عصاره دی اتیل اتری اسفنج..... ۷۲ نمودار ۴-۱۰. تعیین میزان IC_{50} عصاره متانولی اسفنج..... ۷۲

فهرست جدول ها

عنوان صفحه

جدول ۴-۱- میزان OD تعیین شده توسط دستگاه الایزا ۵۲
جدول ۴-۲- میزان IC_{50} عصاره های اسفنج *Dysidea pallescens* روی سلول.. ۵۳
جدول ۴-۳- میزان OD تعیین شده توسط دستگاه الایزا ۵۶
جدول ۴-۴- میزان IC50 عصاره های اسفنج *Dysidea pallescens* روی ۵۷
جدول ۴-۵- حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری عصاره های. ۶۰
جدول ۴-۶- حداقل کشندگی باکتریایی عصاره های اسفنج ۶۳
جدول ۴-۷- حداقل غلظت ممانعت کنندگی از قارچ عصاره های اسفنج ۶۵
جدول ۴-۸- حداقل کشندگی قارچی عصاره های اسفنج ۶۸
جدول ۴-۹-. میزان CC_{50} تعیین شده عصاره های اسفنج ۶۹
جدول ۴-۱۰- میزان IC_{50} عصاره های اسفنج *Dysidea pallescens* روی سلول.. ۷۱

چکیده

اسفنج ها ساده ترین و قدیمی ترین جانداران پرسلولی می باشند. این موجودات فاقد هر گونه ساختار دفاعی مکانیکی هستند بنابراین برای حفظ بقا، در طی سالیان متمادی توانایی تولید متابولیت های ثانویه ی خود را به عنوان عامل دفاعی شیمیایی تکامل بخشیده اند. یکی از مهمترین کاربردهای متابولیت های ثانویه ی اسفنج ها، استفاده از ترکیبات شیمیایی با خواص بیولوژیک به عنوان دارو می باشد.

در این تحقیق نمونه ای از اسفنج با نام علمی از عمق ۱۵ تا ۲۰ متری جزیرهنگام توسط غواصی جمع آوری شد. به منظور بررسی ترکیبات طبیعی غیر قطبی و نیمه قطبی عصاره دی اتیل اتری تهیه شد و به دستگاه GC/MS تزریق شد. سپس به منظور بررسی خواص بیولوژیک اثرات سیتوتوکسیک، ضدباکتریایی، ضدقارچ و ضدویروس مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی خواص سیتوتوکسیک عصاره های متانولی و دی اتیل اتری با استفاده از آزمون XTT روی سلول های سرطانی اپیدرموییید دهان انسان (KB/ C152) و لنفوسیتی (HUT-78/ C185) انجام گردید،همان طور که نتایج نشان می دهد عصارهٔ دی اتیل اتری دارای اثرات ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد (IC_{50}) برابر ۲۰۰μg/ml و عصاره متانولی ۲۰۰ μg/ml و ترکیب تجاری سیتوتوکسیک سیکلوسپورین برابرμg/ml ۲۷۵ روی سلول های لنفوسیتی می باشد.عصارهٔ دی اتیل اتری دارای اثرات ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد (IC_{50}) برابر ۳۲۵ μg/ml، متانولی ۳۷۵ μg/ml و ترکیب تجاری سیتوتوکسیک سیکلوسپورین برابرμg/ml 135روی سلول های اپیدرموییید دهان انسان می باشد.

بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش براث(Bacterial Broth Dilution Methods) روی سویه های باکتریایی گرم منفی و مثبت (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* , و*subtilis*

Bacillus)انجام گردید و میزان MICو MBC عصاره های دی اتیل اتری، متانولی و آبی تعیین گردید. میزان MIC مشخص نمود که عصاره دی اتیل اتری و متانولی با غلظت ۲۰ mg/ml در باکتری *Escherichia coli*، ۱۰ mg/ml روی باکتری *Bacillus subtilis* و در غلظت ۲mg/ml روی باکتری *Staphylococcus aureus* اثر گذاشته است. حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) عصاره دی اتیل اتری برای باکتری *Bacillus subtilis* برابر ۳۰ mg/ml و ۱۰mg/ml برای باکتری *Staphylococcus aureus* می باشد و سایر عصاره های روی باکتری ها اثر کشندگی از خود نشان ندادند.

بررسی خواص ضدقارچ با استفاده از روش ماکرودایلوشنروی سویه های قارچ و مخمر *Candida albicans* و *Aspergillus fumigatus*انجام گردید. نتایج حاکی از آن است که عصاره آبی در هیچ کدام از غلظت ها روی سویه های قارچ اثرنگذاشته، عصاره متانولی در غلظت ۰/۵ mg/ml از رشد قارچ آسپرژیلوس ممانعت نموده و در غلظت۵ mg/ml سبب مرگ قارچ مورد نظر شده است و عصاره دی اتیل اتری در غلظت ۰/۷۵ mg/ml از رشد مخمر کاندیدا ممانعت نموده در غلظت۵ mg/ml سبب مرگ مخمر مورد نظر شده است.

بررسی خواص ضدویروس عصاره های متانولی و دی اتیل اتری با استفاده از آزمون XTT روی سلول MT-2 انجام گردید، همان طور که نتایج نشان می دهد عصارهٔ دی اتیل اتری دارای اثرات ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد از رشد ویروس ایدز ($IC_{۵۰}$) برابر ۵۰۰μg/ml، و اثر ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد عصاره متانولی برابر ۴۷۵μg/ml می باشد.

کلمات کلیدی: اسفنج، ضدباکتری، ضدقارچ، سیتوتوکسیک، ضدویروس، عصاره متانولی، عصاره دی اتیل اتری، جزیره هنگام، خلیج فارس

فصل اول

۱. مقدمه

زیست فناوری دریایی یکی از راه های توسعه و پیشرفت تولید محصولات جدید از جانداران دریایی می باشد، این تولیدات می تواند در زمینه های متنوع ای مانند سلامت و بهداشت(ترکیبات فعال زیستی با کاربرد دارویی)، غذا و انرژی(آنتی اکسیدان ها) و انرژی صنعتی(سوخت زیستی) کاربرد داشته باشد(Osinga, *et al.*,1999a).یکی از مهمترین کاربردهای زیست فناوری دریا، فناوری سرخ می باشد، که محصولات این گروه در پزشکی و تشخیص های آزمایشگاهی استفاده می شوند و نام کلی بیوفارما یا زیست دارو به آنها داده شده است. هدف محققینی که در این زمینه فعّالیّت می کنند آن است که، متابولیت های ثانویه که در جانداران دریایی سنتز می شود را استخراج و پس از انجام آزمایش های بالینی آن ها را به صورت دارو در اختیار بیماران قرا دهند(Blunt *et al.,* 2007b). هرچند که این علم سابقه ای کمتر از سی سال دارد امّا در این مدّت زمان کم نزدیک به ۱۵۰۰۰ ترکیب طبیعی از جانداران دریایی استخراج و شناسایی شده است که از این تعداد ۴۵ ترکیب با خواص دارویی در مراحل آزمایشی پیش بالینی و بالینی قرار دارند(Newman and Cragg, 2004). بیشترین ترکیبات طبیعی استخراج شده از جانداران دریایی متعلّق به بی مهرگان و در این بین اسفنج ها در مقام اول می باشند.خواص بیولوژیک متابولیت های ثانویه در اسفنج هاضدسرطانی، سیتوتوکسیک، ضدباکتریایی، ضدقارچ، ضدویروسی،ضد مالاریا، ضدالتهابی، آرام بخش، افزایش مقاومت بدن، شل کننده عضلات، و ... می باشد (Sipkema *et al.*,2005).

یکی از بیماری های شایع و علت اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته سرطان است، در سال های اخیر دانشمندان برای درمان این بیماری تلاش های بسیاری انجام داده اند(Kraljevic et al., 2006).بررسی های شیمیایی و

بیولوژیکی دریاها و به ویژه اسفنج ها را منبع غنی از ترکیبات ضدسرطانی نشان داده است(Sipkema *et al*.,2005).پاتوژن ها (قارچ ها و باکتری ها) یکی از عوامل شایع بیماری زا در سرتاسر جهان هستند، که با وجود پیشرفت علم و دانش همچنان عامل بیماری و مرگ و میر می باشند(Dannaoui *et al.,* 2003). به طوری که طی دهه های اخیرشماربیماران مستعد به عفونت با میکروارگانیسم های فرصتطلب به طورقابل توجهی دربسیاری ازکشورها افزایش یافته است. در این راستا مطالعات بسیاری به منظور کشف و بررسی ترکیبات ضدقارچ و ضدباکتری از منابع طبیعی انجام می گیرد و سالانه بسیاری از ترکیبات جدید با خواص ضد میکروبی کشف می شوند، اما از آنجا که پاتوژن ها نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی مقاوم می شوند لذا مطالعه در این راستا به طور پیوسته ادامه دارد. بررسی خواص ضدمیکروبی از منابع دریایی نشان می دهد که نقش اسفنج ها در این زمینه قابل توجه می باشد.

از آنجا که خلیج فارس بستر مناسبی برای زیست بسیار از بی مهرگان مانند اسفنج های دریایی می باشند، هرچند تا کنون در رابطه با ارزیابی ذخایر آن ها در خلیج فارس و دریای عمان گزارشی ارائه نشده است اما مشاهدات غواصان حاکی از آن است تنوع و زیست توده این نمونه در منطقه فراوان است با توجه به برنامه های موجود در سند راهبردی بیوتکنولوژی کشور و اینکه تاکنون تحقیقات انگشت شماری در رابطه با خواص بیولوژیک متابولیت های ثانویه از منابع دریایی، اسفنج ها، انجام گرفته است، در این پژوهش به بررسی خواص بیولوژیک متابولیت های ثانویه اسفنج *Dysidea* spp. از جزیره هنگام پرداخته شده است.

هدف از این تحقیق:

شناسایی ترکیبات نیمه قطبی و غیرقطبی (عصاره دی اتیل اتری) موجود در اسفنج *Dysidea* spp.

بررسی خواص ضدباکتریایی(*Bacillus subtilis Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* و *Pseudomonas aeruginosa*) عصاره های متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Ircina* spp. ومقایسه آن با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری

بررسی خواص ضدقارچ (*Aspergillus* spp. و *Candida dubliniensis*)عصاره های متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Ircina* spp. و مقایسه آن با داروهای ضدقارچ تجاری

بررسی خواص سیتوتوکسیک (کارسینوم اپیتلیوم دهانی (KB) و لنفوسیتی (HUT-78/ C185)عصاره های متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Ircina* spp. و مقایسه آن با داروهای تجاری سیتوتوکسیک می باشد.

بررسی خواص ضدویروس ایدزعصاره های متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Dysidea* spp. می باشد.

امید است تحقیق و مطالعه در این زمینه در آینده ای نه چندان دور منجر به خود کفایی کشور در تولید داروهای طبیعی با منشاء دریایی شود.

فصل دوم

۲. بررسی منابع علمی

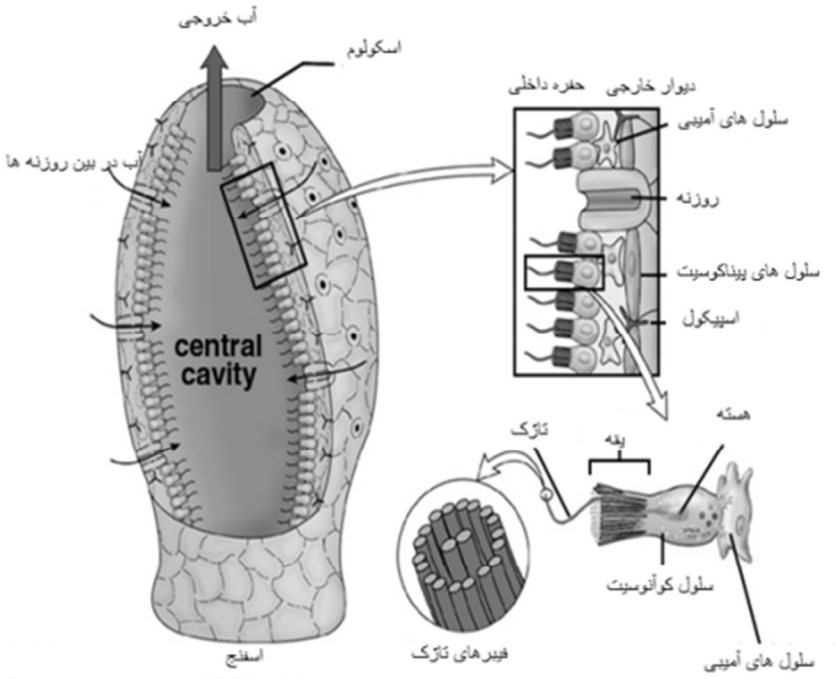
۲-۱- زیست شناسی و فیزیولوژی اسفنج ها

۱-۲-۱- آناتومی و فیزیولوژی اسفنج ها

بدن اسفنج ها شامل مجموعه ای از انواع معدودی از سلول ها می باشد که در ماتریکس ژلاتینی به نام مزوهیل، مزوگلیا و یا مزانشیم قرار گرفته اند. مزوهیل بافت های اسفنج را به هم متّصل کرده و توسط عوامل اسکلتی پشتیبانی می شود. اسکلت در اسفنج ها بسیار متنوع می باشد و در رده بندی بسیار اهمیّت دارند. در تمام بدن اسفنج ها کانال هایی که آب در آن ها جریان دارد وجود دارد، که این امر نشان دهنده پیچیدگی در کانال ها می باشد. کانال ها از طریق منافذ[۱] به سمت خارج باز شده، همانطور که در شکل ۱-۱ مشاهده می گردد، محل ورود آب به داخل بدن اسفنج ها و در نهایت از طریق منافذ ریزی به نام اوستیا[۲] انجام می گردد و محل خروج آب از طریق منفذی که نسبتاً بزرگ می باشد به نام اسکولوم[۳] انجام می گیرد. کانال ها توسط سلول های تاژکداری به نام کوآنوسیت[۴] پوشیده شده اند (Barnes, 1987).

از مهمترین سلول های تشکیل دهنده بدن اسفنج ها پیناکوسیت ها[۵]، کوانوسیت ها[۶]، آمبوسیت ها[۷] را می توان نام برد (بلوچ، ۱۳۸۰).

[1] Pores
[۲] Ostia
[3] Osculum
[4] Choanocytes
[5] Pinacocytes
[6] Choanocytes
[7] Amoebocytes



شکل ۱.۲. آناتومی اسفنج (www.marinespecies.org/porifera/porifera)

2-2- متابولیت های ثانویه اسفنج ها

متابولیت های ثانویه و خواص بیولوژیک اسفنج ها

متابولیت هایی که در موجودات وجود دارد به دو دسته تقسیم می شود:

متابولیت های اولیه[8]، که شامل ترکیبات ضروری برای رشد و ادامه حیات می باشد و اساس سنتز ماکرومولکول هایی نظیر پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدارت ها و لیپیدها می باشد.

[8]Primary metabolites

متابولیت های ثانویه[9]، مانند متابولیت های اولیه برای ادامه حیات ضروری نیستند اما در مسیر تکاملی برای ادامه بقا از متابولیت ها اولیه مشتق شده است(Sigmandur, 1999).

جانداران دریایی برای ادامه حیات و مقابله با سایر مهاجمین و شکارچیان استراتژی های مختلفی دارند:

دفاع شیمیایی[10]، مانند بسیاری از اسفنج ها، مرجان ها، تونیکت ها و....

دفاع ساختمانی[11]، مانند صدف در بسیاری از شکم پایان، خار در بسیاری از خارپوستان و بریوزوآها، اسکلت داخلی در مرجان های سخت، و اسپیکول در اسفنج ها.

بافت سخت[12]، مانند حلزون های دریایی که توسط بافت ضخیمی که اطراف بدنشان را احاطه کرده است آن ها را از نیش و دندان های شکارچیان ایمن نگه داشته.

کاهش ارزش غذایی در بافت[13]، جاندارانی که از این سیستم تدافعی استفاده می کنند از آنجا که در بافت خود مواد غیرقابل هضم را تولید می کنند شکار مناسبی محسوب نمی شوند؛ مانند تجمع آب در مرجان های نرم، کربنات کلسیم در جلبک های سبز و قرمز، سلولز در تونیکت ها و کلاژن در اسفنج ها (Chanas and Pawlik , 1995).

در واقع متابولیت های ثانویه سلاح شیمیایی می باشند که اسفنج ها و سایر جانداران دریایی برای بقا از آن استفاده می کنند. به عبارت دیگر بررسی های انجام شده در رابطه با خصوصیات اکولوژی شیمیایی اسفنج ها نشان داده است که؛ متابولیت های ثانویه در سایر فعالیت های حیاتی آن ها اثر نداشته و در واقع هر گونه اسفنج بر اساس شرایط

[9] Secondary metabolites
[10] Chemical defenses
[11] Structural defenses
[12] Tissue toughness
[13] Reduced tissue food value

محیطی، استراتژی خاصی را جهت تولید متابولیت های ثانویه انتخاب می کند (Muller *et al*., 2004 و Thakur *et al*., 2005).

توانایی تولید چنین ترکیباتی که از لحاظ ماهیت شیمیایی بسیار متنوع می باشند و شامل؛ اسیدهای آمینه[۱۴]، نوکلئوزیدها تا ماکرولیدها[۱۵]، پورفیرین ها[۱۶]، ترپرونیدها تا آلیفالیتک سیکلید پروکسید[۱۷] و استرول ها[۱۸] می باشند(Blunt *et al*., 2007 و Thakur *et al*., 2005)، جانوران و گیاهان دریایی را به منبع ارزشمند ترکیبات طبیعی تبدیل کرده است.

تحقیقات انجام شده نشان می دهد که تعداد بسیاری از هزاران ترکیب استخراج و شناسایی شده (متابولیت های ثانویه) دارای خواص بیولوژیک هستند (Raviña, 2010). به ترکیبات شیمیایی که از رشد موجودی مانند باکتری ها، ویروس ها و بسیاری از جانداران دریایی نظیر بارناکل ها، روی سطح موجودی دیگر ممانعت نموده ترکیبات طبیعی پاک کننده[۱۹] می ّگویند (Wahl *et al.,* 1994). تحقیقات بسیاری در رابطه با جداسازی و شناسایی ترکیبات طبیعی پاک کننده انجام می شود و روزانه در بسیاری از آزمایشگاه های دنیا نتایج جدیدی در رابطه با خواص این ترکیبات کشف می شود، تا کنون نزدیک به ۱۴۵ ترکیب طبیعی پاک کننده شناسایی شده است که بیش از ۵۰ درصد این ترکیبات متعلق به اسفنج ها بوده است. مطالعات بسیار زیادی در رابطه با ترکیبات طبیعی پاک کننده اسفنج ها انجام گرفته است، نتایج این مطالعات نشان می دهد نزدیک به ۱۰۰ گونه از ۱۰۰۰ گونه اسفنج که مورد مطالعه قرار گرفته اند دارای ترکیبات طبیعی پاک کننده می باشند (Raveendran and Limna Mol, 2009).

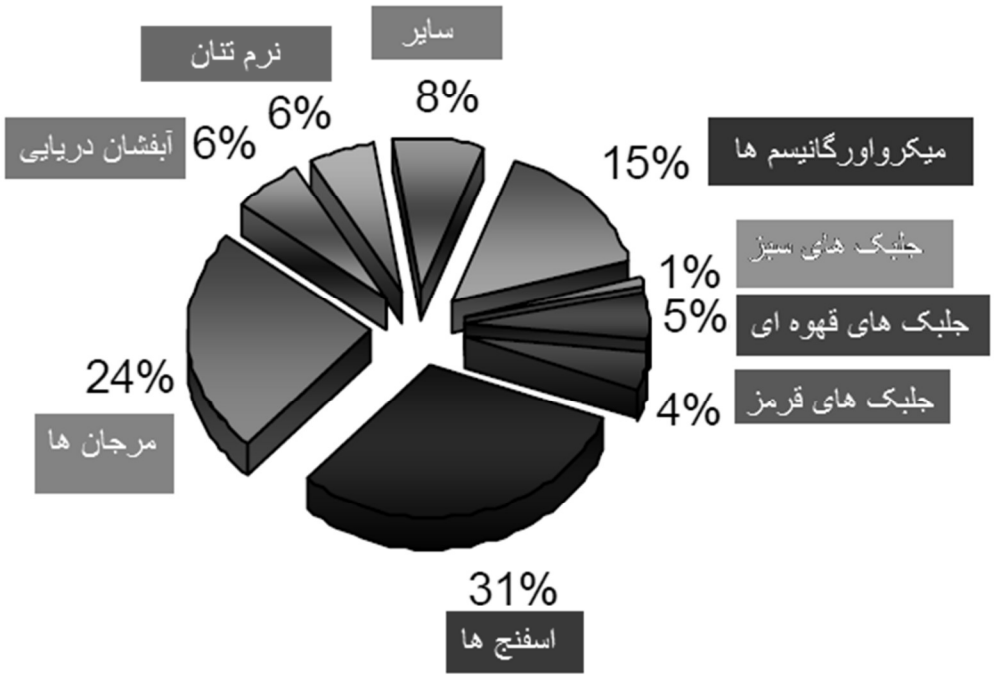
اسفنج ها یکی از منابع غنی تولید کننده متابولیت های ثانویه و ترکیبات شیمیایی هستند (Kijjoa and Sawangwong, 2004). در شکل شماره ۱-۲ متابولیت های ثانویه شناسایی شده از جانداران دریایی که دارای خواص

[14] Amino acids
[15] Nucleosides to Macrolides
[16] Porphyrins
[17] Terpenoids to Aliphatic cyclic peroxides
[18] Sterols
[19] Natural Product Antifoulants, (NPAs)

بیولوژیک می باشند طی سال های ۱۹۶۵ تا ۲۰۰۳ مشاهده می گردد (Blunt *et al*., 2007)، همانگونه که از این نمودار برداشت می شود بیشترین متابولیت ثانویه با خواص بیولوژیک به اسفنج ها متعلق است.

دلیل تولید چنین ترکیباتی دفاع در برابر شکارچیان، مقابله با جاندارانی که روی سطح اسفنج ها قرار گرفته و حیات آن ها را تهدید نموده و همچنین کنترل باکتری های داخلی که بیش از ۵۰ درصد توده زیستی اسفنج ها را شامل شده، می باشد (Blunt *et al*., 2007).

آزمایش ها و بررسی های انجام شده نشان می دهد که خواص؛ ضدتومور، سیتوتوکسیک، نوروتوکسیک، ضدباکتری، ضدویروس، ضدقارچ، مهار کننده تقسیم میتوز، ضدپروتوزوآ، ضدالتهاب، ضدپیری، ممانعت کننده بیماری آیزایمر، ضد مالاریا از بیشترین خواص بیولوژیک متابولیت های ثانویه اسفنج ها می باشد (Newman and Cragg, 2004).



شکل ۲-۲- متابولیت های ثانویه شناسایی شده از جانداران دریایی با خواص بیولوژیک،طی سال های ۱۹۶۵ تا ۲۰۰۳(Blunt *et al.*, 2007).

2-3- ترکیبات طبیعی با خواص دارویی اسفنج ها

2-3-1- ترکیبات طبیعی[20] و داروهای تولید شده از اسفنج ها

اصطلاح " ترکیبات طبیعی" معمولا به مواد شیمیایی طبیعی گفته می شود که خواص دارویی دارند. این واژه معمولا برای متابولیتهای ثانویه تولید شده توسط موجودات زنده می باشد .چنین ماده ای به عنوان یک محصول طبیعی در نظر گرفته که می توان آن را تهیه و سنتز کرد (Sipkema *et al*.,2005).

[20] Natural Products

استفاده از اسفنج ها به عنوان دارو به رم باستان و دوران پزشکی الکساندر[۲۱] باز می گردد، در آن زمان از اسفنج ها در درمان بسیاری از بیماری ها استفاده می شد؛ به عنوان مثال اسفنج را در محلول یدی قرار می دادند و به عنوان ماده منعقد کننده خون استفاده می کردند، همچنین از ترکیب عصاره اسفنج به همراه عصاره های گیاهی به عنوان ماده بیهوشی استفاده می شد. از دیگر کاربردهای اسفنج ها در آن زمان این بود که اسفنج را در شراب خالص قرار داده و برای افرادی که بیماری قلبی داشتند به صورت مرهم در قسمت سمت چپ سینه می گذاشتند تا درد بیمار التیام پیدا کنند، اسفنج را در ادرار می گذاشتند و از عصاره آن در درمان سم زدگی استفاده می کردند! در رابطه با کاربرد دارویی اسفنج ها در زمان رم باستان بسیار نقل شده است که به طور کلی می توان به درمان گرمازدگی، مرهم زخم، شکستگی استخوان، خیز و یا ورم، معده درد، بیماری های عفونی و سرطان بیضه اشاره نمود (Sipkema *et al*.,2005).

در اواخر قرن ۱۸، اوکراینی ها[۲۲]، روسی ها[۲۳] و پزشکان لهستانی[۲۴] از پودر خشک نوعی اسفنج آب شیرین به عنوان دارو برای درمان بیماران ریوی و یا بیمارانی که از ناحیه پا آسیب دیده بودند استفاده می کردند، امروز نمونه ای جدید از نسل داروی فوق که به عنوان پودر اسفنج روسی[۲۵] معروف است و ترکیبی از چند نوع اسفنج آب شیرین با نام های علمی (*Euspongilla lacustris, Ephydatia fluviatilis, Spongilla fragilis* و *Carterius stepanowi*) می باشد تولید می شود، این دارو به شکل پودر است که در محل آسیب دیده مالیده می شود و در التیام جراحات بسیار مفید می باشد، باید این نکته را مد نظر قرار داد که تولید هیچیک از داروهای فوق بر پایه علمی نبوده است. (Sipkema *et al*.,2005).

اولین استخراج بر پایه علمی از ترکیبات طبیعی موجودات دریایی توسط ریچارد[۲۶] در سال ۱۹۰۷ با آزمایش روی اسفنج حمّام انجام گردید، پس از آن بررسی خواص بیولوژیک عصاره استخراج شده را روگر[۲۷] روی بیماری

[21] Alexandraian physicians
[22] Ukarainian
[23]Russian
[24]Polish physicians
[25] Badiaga Russian
[26]Richter

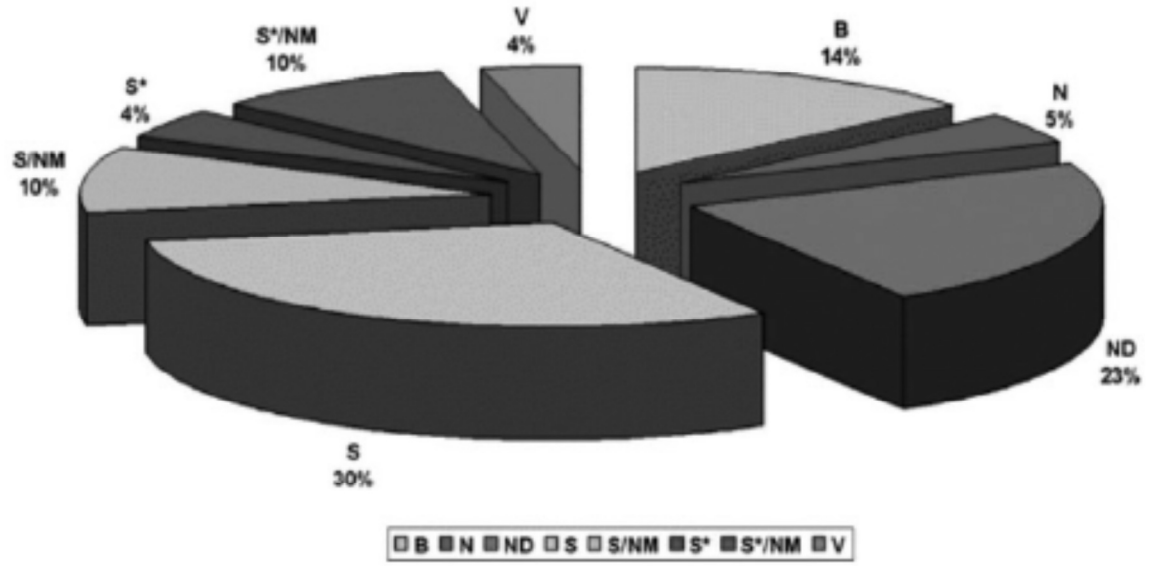
گواتر انجام شد، که جلوگیری از رشد و پیشرفت بیماری را مشاهده نمود. مطالعات گسترده تر و جامع تر در مورد اسفنج ها توسط فنسی و برگمن[۲۸] در سال ۱۹۴۹ با مطالعه روی گونه *Cryptotethya crypta* از دریای کارائیب انجام گردید، بدین ترتیب اولین قدم های زیست فناوری دریایی با هدف تولید دارو پایه گذاری شد (Thakur *et al.*, 2004و Bergmann and Feeney, 1950).

یکی از اهداف زیست فناوری دریایی ابداع روش هایی به منظور تولید فرآورده های جدید از جانداران دریایی مانند؛ فرآورده هایی به منظور کمک به حفظ سلامت و درمان (ترکیبات فعال زیستی با کاربرد دارویی)، غذا و تغذیه صنعتی (آنتی اکسیدان ها) و انرژی صنعتی (سوخت زیستی) است (Osinga *et al.*, 1999a).

در عصر حاضر ترکیبات طبیعی نقش بسیار زیادی در علوم پزشکی و دارویی ایفا می نمایند، در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی در سال های اخیر بسیار حائز اهمیت می باشد. به نظر می رسد وجود ترکیباتی با ساختار استروژنی و اتم های هیدروژن که به دلیل محیط زیست جانداران دریایی، آب، چنین ساختارهایی شکل می گیرد آن ها را از سایر ترکیبات طبیعی متمایز می نماید(Mancini *et al.*, 2007). شاید دلیل چنین امری این باشد که؛ حیات در اقیانوس ها بیش از ۳/۵ میلیون سال قدمت دارد، بنابراین زمانی که ترکیبات طبیعی سنتز شده توسط آبزیان با جانداران خشکی زی مقایسه می شود ترکیبات بیشتر و متکامل تری با خواص بیولوژیک یافت می گردد، که علت چنین پدیده ای فرصت تکاملی بیشتری است که آبزیان نسبت به جانداران خشکی زی از آن برخوردار بوده اند (Jimeno *et al*., 2004). با وجود آنکه کمتر از چهار دهه از تلاش دانشمندان در رابطه با خواص زیستی ترکیبات شیمیایی جانداران دریایی می گذرد اما تعداد این ترکیبات نسبت به سایر منابع بسیار بیشتر است (Munro *et al*., 1999). در یک بررسی آماری از ۱۹۸۱ تا ۲۰۰۶

[27] Roger
[28] Bergmann and Feeney

مشخص شده که؛ ۴۸٪ داروهای تولید شده به طور انحصاری از ترکیبات طبیعی مشتق شده اند، درنموار۲.۱ درصد منابع دارویی مختلف مشاهده می شود (Bulter, 2007):



شکل ۲-۳- **B**- ترکیبات زیستی، **N**- ترکیبات طبیعی، **ND**- ترکیبات مشتق شده از ترکیبات طبیعی، **S**-ترکیبات مصنوعی، ***S**- ترکیبات مصنوعی که از ترکیبات طبیعی مشتق شده اند، **V**- واکسن، **S/NM**- ترکیبات مصنوعی که از ساختارهای طبیعی الهام گرفته شده، **S*/NM**- ترکیبات مصنوعی نسخه برداری شده از ترکیبات طبیعی (Bulter, 2007).

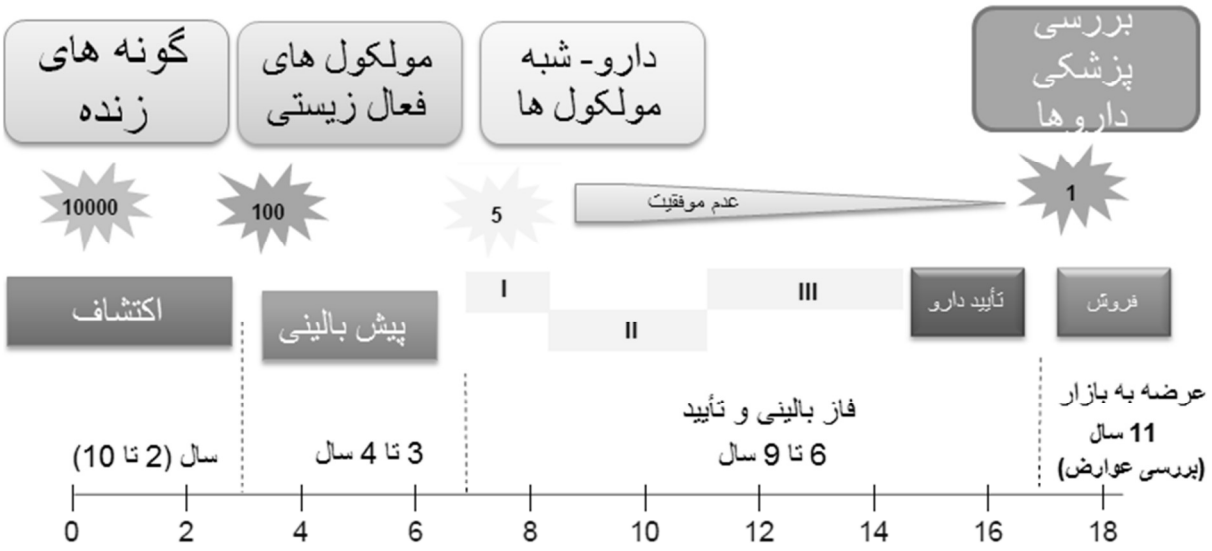
تنوع زیستی موجود در محیط های دریایی نیز دلیل دیگری برای گوناگونی ترکیبات طبیعی استخراج شده از این اکوسیستم می باشد، از ۳۶ شاخه زیستی شناسایی شده ۳۴ شاخه، با بیش از ۳۰۰۰۰۰ گونه گیاهی و جانوری در محیط های دریایی شناسایی شده است (Pomponi, 1999). تا کنون بیشتر مطالعات انجام شده بر جلبک ها، اسفنج ها، نرم تنان، آبفشان ها، مرجان ها، سخت پوستان و باکتری ها و قارچ های همزیست آن ها انجام شده است (Mancini *et al.*,

(2007). بسیاری از آن ها خواص زیستی در شرایط vitro و in vivo (آزمایشگاهی) را نشان داده اند (Newman and Cragg, 2004).

تا کنون نزدیک به ۱۵۰۰۰ ترکیب طبیعی از جانداران دریایی استخراج و شناسایی شده است که از این تعداد ۴۵ ترکیب با خواص دارویی در مراحل آزمایشی پیش بالینی و بالینی قرار دارند (Newman and Cragg, 2004). بسیاری از این ترکیبات استخراج شده که دارای خواص دارویی هستند از اسفنج ها و میکرواورگانیسم های همزیست آن ها جداسازی شده اند (Piel, 2006). در مطالعه انجام شده توسط مولر و همکاران در سال ۲۰۰۴ مشخص شد که طی چهار دهه اخیر از ۵۰۰ گونه اسفنج که مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته بودند بیش از ۵۰۰۰ ترکیب با خواص بیولوژیک جداسازی و شناسایی شده است (Muller *et al*., 2004).

با توجه به مطالعات و بررسی های انجام شده، پتانسیل های دارویی اسفنج ها اثبات شده است و از هم اکنون باید به فکر تأمین این منابع ارزشمند بود. شناسایی و انتقال ژن های سنتز کننده مواد موثره به میزبان مناسب، کشت میکرواورگانیسم های همزیست اسفنج های تولید کننده مواد بیولوژیک و کشت سلولی اسفنج ها از راه های مؤثر در تهیه و تولید ترکیبات طبیعی با خواص بیولوژیک است (Sipkema *et al*.,2005).

بنابراین تولید دارو از ترکیبات طبیعی دریایی مسئله ای مشکل و پیچیده نیست، اما نیازمند زمان و هزینه است. بررسی های انجام شده از سال ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۰ نشان می دهد که برای تولید دارو از این ترکیبات ۳۰ تا ۵۰ سال زمان لازم است (Salomon *et al.*, 2004). در نمودار شماره ۱.۱ مراحل تولید دارو از ترکیبات طبیعی مشاهده می شود.



شکل ۲-۴- مراحل تولید دارو از ترکیبات طبیعی مشاهده می شود (Blunt *et al.*, 2007).

جدول شماره ۲-۱- ترکیبات استخراج شده با خواص دارویی از اسفنج ها که در فازهای بالینی و پیش بالینی قرار دارند.

گونه اسفنج	ترکیب شیمیایی	مرحله تولید دارو	نوع اثر/ مکانیسم	منابع
Agelas mauritianus	KRN-7000(از مشتقات (Agelasphin	فاز I بالینی	ضسرطان	Salomon *et al.,* 2004
Cymbastella sp.	HTI-286 (از مشتقات (Hemiasterlin	فاز I بالینی	ضدسرطان/ ممانعت از سنتز میکروتوبولین ها	Jordan *et al.,* 2011
Cacospongia mycofijiensis	Laulimalide	فاز پیش بالینی	ضدسرطان / ممانعت از سنتز توبولین ها	Liu *et al.,* 2007
Cryptotethya crypta	Ara- C	تولید تجاری شرکت Pharmacia and Upjohn Company	ضدسرطان / ممانعت از تقسیم سلول	Thakur *et al., 2005*
Cryptotethya crypta	Ara- A	تولید تجاری شرکت Pharmacia and Upjohn Company	ضد ویروس/ تخریب DNA	Thakur *et al., 2005*
Cymbastella sp.	HTI-286 (از مشتقات (Hemiasterlin	فاز I بالینی	ضسرطان	Salomon *et al.,* 2004
Dictyodendrilla verongiformis	Dictyodendrins	فاز پیش بالینی	ضدسرطان / جلوگیری از عملکرد آنزیم تلومراز	Warabi *et al.,2003*
Didemnum sp.	Ascididemin	فاز پیش بالینی	ضدسرطان / تخریب	Guittat *et al., 2005*

			اسید آمینه های میتوکندری	
Discodermia dissolute	Discodermolide	فاز I بالینی	ضدسرطان / ممانعت از سنتز میکروتوبولین ها	Dabydeen, 2004
Dysidea avara	Avarol	فاز I بالینی	ضدسرطان / ضدویروس و ضدباکتری	Simone *et al.,2005*
Halichondria okadai	E7389 (از مشتقات Halichondrin B	فاز I بالینی	ضدسرطان / ممانعت از سنتز توبولین ها	Choi *et al.,* 2003
Haliclona sp.	Salicylihalimides A and B	فاز پیش بالینی	ضدسرطان / ممانعت از سنتز میکروتوبولین ها	Erickson *et al., 1997*
Jaspis digonoxea	LAF-389 (از مشتقات (Bengamide B	فاز I بالینی	ضدسرطان ممانعت از سنتز میکروتوبولین ه	Jordan *et al.,* 2011
Kirkpatrickia variolosa	Variolins	فاز پیش بالینی	ضدسرطان / ممانعت از تقسیم سلولی	Simone *et al.,2005*

Jordan *et al.,* 2011	ضدسرطان / ممانعت از سنتز میکروتوبولین ها	فاز I بالینی	Halichondrin B	*Lyssodendoryx sp.*
Remiszewski, 2003	ضدسرطان / ممانعت از سنتز میکروتوبولین ها	فاز پیش بالینی	Peloruside A	*Mycale hentscheli*
Remiszewski, 2003	ضدسرطان / تخریب DNA	فاز I بالینی	NVP-LAQ824	*Psammaplysilla* sp
Salomon *et al.,* 2004	ضد التهاب و آسم	فاز II بالینی	IPL-512602	*Petrosia contignata*
Salomon *et al.,* 2004	ضد التهاب	فاز I بالینی	IPL-550260	*Petrosia contignata*
Salomon *et al.,* 2004	پسوریازیس	فاز II بالینی	IPL-576092	*Petrosia contignata*
D'Ambrosio *et al.,* 1987	ضدسرطان / ممانعت از سنتز میکروتوبولین ها	فاز پیش بالینی	Sarcodictyin	*Sarcodictyon roseum*

2-4- خواص سیتوتوکسیک[29] اسفنج ها در راستای تولید داروهای ضدسرطان

آمار نشان می دهد که سرطان عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته است، در سال های اخیر دانشمندان برای درمان این بیماری تلاش های بسیاری انجام داده اند (Kraljevic *et al*., 2006).

بررسی های شیمیایی و بیولوژیکی دریاها را منبع غنی از ترکیبات ضدسرطانی نشان داده است (Sipkema *et al*.,2005). به عنوان مثال؛ از آنجایی که اسفنج ها برای ادامه حیات نیاز به پمپ کردن آب دارند و از طرفی توانایی تصفیه بیوفیلم و یا دور کردن بارناکل ها، خزه ها و مرجان هایی که سطح آن ها را بپوشاند و سبب مرگشان می شود را ندارند، در روند تکاملی برای ادامه حیات موادی را از خود ترشح می کنند که خواص سیتوتوکسیک دارند. به این ترتیب آن ها توانسته اند با جانداران مهاجمی که سطح آن ها را پوشانده و به نحوی مانع عمل فیلتر آب شده، مقابله کنند و در رقابت بر سر حیات پیروز شوند، امروز با پیشرفت علم از این ترکیبات شیمیایی که خاصیت از بین بردن سلول های زنده را دارد به عنوان داروهای ضدسرطانی استفاده می شود (Raveendran and Limna Mol, 2009). تحقیقات انجام شده نشان می دهد که بیش از ۱۰ درصد از گونه های اسفنج که مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند خواص سیتوتوکسیک از خود نشان می دهند (Zhang *et al.,* 2003). ذکر این نکته شایان توجه است که بیشترین تحقیقات انجام شده در رابطه با خواص سیتوتوکسیک و ضدسرطان از جانداران دریایی در اطریش، استرالیا، برزیل، کانادا، انگلیس، فرانسه، آلمان، یونان، اندونزی، ایتالیا، ژاپن، نیوزیلند، روسیه، اسپانیا، کره جنوبی، سوئیس، تایوان، هلند و آمریکا انجام شده است (Joseph and Sujatha, 2011).

در یک بررسی آماری در ایالت متحده آمریکا که توسط وزارت غذا و دارو[30] انجام گرفت مشخص شد که از سال ۱۹۶۰ تا کنون پنجاه درصد داوهای ضدسرطانی از منابع طبیعی، گیاهان خشکیزی، تولید شده اند و از سال ۱۹۹۶ تا

[29] Cytotoxicity
[30] United States Food and Drug Administration

کنون پنجاه درصد تحقیقات انجام شده در رابطه با خواص ضدسرطانی[۳۱] و سیتوتوکسیک تولیدات طبیعی مربوط به دریاها و اقیانوس ها، و بخش اعظم آن از اسفنج ها و مرجان ها می باشد (Alejandro, 1999 و Flam, 1994). بررسی های انجام شده آزمایشگاهی روی موش و رده های سلولی سرطانی نشان می دهند که ۱۲۴ ترکیب از جانداران دریایی خواص ضدسرطان از خود نشان داده اند (Joseph and Sujatha, 2011). در جدول شماره ۲.۱ به تعدادی از ترکیبات استخراج شده از اسفنج ها که خواص سیتوتوکسیک و ضدسرطان دارند اشاره شده است.

جدول شماره ۲-۲- ترکیبات استخراج شده با خواص سیتوتوکسیک و ضدسرطان از اسفنج ها.

گونه اسفنج	ترکیب شیمیایی	ساختار شیمیایی	رده سلولی/ سرطان	منابع
Agelas dendromorpha	Agelastatin	آلکالوئید	سرطان استخوان	Dickson and Wardrop, 2010
Chondrilla nucula	lectin	گلیکوپروتئین	سرطان پوست، ریه و تیروئید	Blackburn *et al.*, 1999
Dysidea sp.	Bolinaquinone	ترپنیل گواینون[۳۲]	HCT-116/ سرطان روده	Barrero *et al.*, 1999
Fasciospongia sp.	Mamanuthaquinone	ترپن	سرطان روده بزرگ	Takahashi *et al.*,2010
Haliclona sp.	Adociasulfates	ترپنیل گواینون	سرطان بافت های نرم و سخت	Blackburn *et al.*, 1999

[31] Anticancer
[32] Terpenylquinones

Hippospongia sp.	5-epi-ilimaquinone	سکویترپن[۳۳]	HL-60, NCI-H460, HepG2	Liu *et al.,* 2006
Hyrtios sp.	Hyrtinadine A	حلقه پیرامیدین[۳۴]	کارسینوم اپیتلیوم دهانی	Endo *et al.,* 2007
Hyrtios erecta	Sesterstatine	ترپن	سرطان ریه، روده، معده، کلیه، تخمدان و پروستات	Iwashima *et al.,*2002
Jaspis stellifera	Stelletin	تری ترپنتوئید[۳۵]	سرطان خون، رده سلولیP388 موش	Su *et al.,* 1994
Polyfibrospongia australis	polyfibrospongols	ترپنیل گواینون	تومورهای مختلف بافت نرم	Motti *et al.,* 2007
Smenospongia aurea	*ent*-chromazonarol	ترپنیل گواینون	P-388, A-549, HT-29	Djura *et al.,* 1980

2-5- خواص ضدباکتری اسفنج ها در راستای تولید آنتی بیوتیک ها

استفاده از ترکیبات طبیعی با اثر ضدباکتریایی به کشف پنی سیلین توسط فلمینگ[۳۶] در سال **۱۹۲۸** باز می گردد، با این وجود پس از گذشت سال ها از آن زمان محققین در کشورهای توسعه یافته به دنبال ترکیبات با خواص آنتی بیوتیک هستند. هرچند که مطالعه و آزمایش در رابطه با ترکیبات ضدویروس و ضدسرطان در اولویت است، اما می توان

[33] Sesquiterpene
[34] Pyrimidine ring
[35] Triterpenoid
[36] Fleming

اظهار نمود که تحقیقات در مورد ترکیبات ضدباکتری ها و مایکوباکترها نیز به موازات آن ها پیش می رود (Harold, 1992). زیرا بررسی های انجام شده نشان می دهد که عوامل میکروبی یکی از شایع ترین عوامل بیماریزایی در عصر حاضر برای انسان است، که به منظور مهار و از بین بردن آن ها باید از آنتی بیوتیک ها که هرکدام با مکانیسم های متفاوتی وارد عمل می شوند استفاده نمود (Andersson, 2003). از طرف دیگر باکتری های پاتوژن پس از مدتی نسبت به آنتی بیوتیک خاص مقاوم شده، بنابراین تحقیق و بررسی به منظور کشف آنتی بیوتیک های جدید باید ادامه داشته باشد(Cohen, 1992).

اسفنج ها فراوان ترین و متنوع ترین جانداران بسترهای سخت دریایی؛ صخره های مرجانی، صخره ها و غارها، می باشند (Cohen, 1992). از آنجا که اغلب این مناطق به ویژه اکوسیستم های مرجانی تولیدات و بیوماس بالایی دارند بنابراین میزان باقیمانده های غذایی در این مناطق بسیار بالاست، از طرف دیگر موکوس تولید شده حاصل از متابولیت های صخره های مرجانی منبع دیگری از مواد آلی می باشند، که تمام عوامل فوق بستر بسیار مناسبی را برای رشد باکتری ها فراهم می نماید (Richman *et al.,* 1975). بنابراین یکی از تهدید کنندگان اسفنج ها میکرواورگانیسم ها به ویژه باکتری ها می باشد (Faulkner *et al.*,۲۰۰۰)، به همین دلیل آن ها متابولیت های ثانویه متعددی با با خاصیت ضد باکتریایی تولید می نمایند (Zaro, 1982).

بررسی های انجام شده نشان می دهد که بیش از ۶۰ درصد ترکیبات ضدباکتریایی منشاء طبیعی دارد، بر اساس یک برآورد اقتصادی در آمریکا سالانه مبلغی بیش از ۲۰ میلیون دلار صرف تولید ترکیبات ضدباکتریایی می شود (Harvey, 2001).

بررسی های انجام شده روی بی مهرگان دریایی نشان می دهد که ترکیبات طبیعی استخراج شده از آن ها با ساختار شیمیایی پپتیدی[37] دارای خواص آنتی بیوتیکی هستند (Tincu and Steven,2004). تا کنون بیش از ۸۰۰ متابولیت ثانویه با خواص ضدباکتریایی از اسفنج های دریایی استخراج و شناسایی شده است (Timm *et al.*, 2008). در جدول شماره 3.1 برخی از ترکیبات استخراج شده با خواص آنتی بیوتیکی مشاهده می گردد.

جدول شماره ۲-۳- ترکیبات استخراج شده با خواص آنتی بیوتیکی از اسفنج ها.

گونه اسفنج	ترکیب شیمیایی	ساختار شیمیایی	باکتری	منابع
Acanthella cavernosa	Kalihinol Y and X	ترپن	*B. subtilis*	Bugni, *et al.*, 2004
Aka coralliphaga	Corallidictyals A-D	هیدروکوینون	*S. aureus*	Grube *et al.*, 2007
Agelas sp	Agelasine C, D, E	ترپن	*Mycobacterium tuberculosis*	Mancini *et al.*, 2007
Agelas sp.	Nagelamide A	آلکالوئید	*M. luteus, B. subtilis , E. coli*	Endo *et al.*, 2004 a
Aplysina cavernicola	Dibromoverongiaquinol	مشتقات تیروزین	*S. aureus , Vibrio anguillarum* (پاتوژن ماهی)	Mancini *et al.*, 2007
Arenosclera brasiliensis	Arenosclerins A-C	آلکالوئید	*S. aureus , P. aeruginosa*	Torres *et al.*, 2002
Axinella sp.	Axinellamine A-D	آلکالوئید	*Helicobacter pylori*	Mancini *et al.*, 2007

[37] Peptides

Mancini *et al.,* 2007	*Enterococcus, S. aureus*	گلیوکولیپید	Caminoside A	***Caminus sphaeroconia***
Ankisetty *et al.,* 2004	*S. aureus , E. coli*	ترپن	Membranolides C and D	***Dendrilla membranosa***
Mancini *et al.,* 2007	*Rhodospirillum salexigens*	اسپیروایزوز ولین	Zamamistatin	***Ircinia felix***
Mancini *et al.,* 2007	*Micrococcus luteus, B. subtilis , E.coli Pseudomonas sp. Enterobacter aerogenes*	فورانوترپن	Variabilin	***Ircinia variabilis***
Gul *et al.,* 2007.	*M. tuberculosiss*	ترپنوئید	(S)-(+)-curcuphenol	***Myrmekioderma styx***
Chelossi, *et al.*, 2006	*S. aureus, E.coli, Salmonella*	آلکالوئید پریدینیوم	Poly-APS	***Reniera sarai***
Mancini *et al.,* 2007	*B. subtilis, S. aureus*	گوانیدین آلکالوئید	Palau'amine	***Stylotella aurantium***
Yang *et al.,* 2003	*S. aureus*	آلکالوئید	Ptilocaulis guanidine	***Topsentia sp***

2 –6– خواص ضدقارچی اسفنج ها در راستای تولید داروهای ضدقارچ

قارچ ها یکی از عوامل شایع بیماری زا در سرتاسر جهان هستند، که با وجود پیشرفت علم و دانش همچنان عامل بیماری و مرگ و میر می باشند (Dannaoui *et al.*, 2003). به طوری که طی دهه های اخیر شمار بیماران مستعد به عفونت با میکروارگانیسم های فرصت طلب از قبیل سوش های کاندیدا، به خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی، به

طور قابل توجهی در بسیاری از کشور ها افزایش یافته است و همچنین نشان داده شده است که مخمرهای پاتوژن مقاومت ذاتی یا اکتسابی نسبت به داروهای ضد قارچی دارند (Ramani and Chaturvedi, 2003).

سالانه بسیاری از افراد با عوامل قارچی به ویژه *Candida*، *Aspergillus* و *Cryptococcus* آلوده می گردند، که در این میان بیشترین آمار متعلق به بیماران آلوده با *Candida albicans* می باشند (Wey *et al*., 1988). در این راستا مطالعات بسیاری به منظور کشف و بررسی ترکیبات ضدقارچ از منابع طبیعی خشکی و دریایی انجام می گیرد و سالانه بسیاری از ترکیبات جدید با خواص ضدقارچ کشف می شوند، که نقش اسفنج های دریایی در این راستا قابل توجه می باشد. اما از آنجا که ترکیبات ضدقارچ به دلیل اثرات سمی که روی انسانها و حیوانات دارند، روند متفاوتی را نسبت به مواد ضدقارچی طی می کنند بنابراین نسبت به سایر ترکیبات ضد میکروبی بسیار محدودتر می باشند (Nakagawa *et al.,* 1995). در جدول شماره ۴.۱ برخی از ترکیبات استخراج شده از اسفنج ها با خواص ضدقارچ مشاهده می گردد.

جدول شماره ۲-۴- ترکیبات استخراج شده با خواص ضدقارچی از اسفنج ها.

گونه اسفنج	ترکیب شیمیایی	ساختار شیمیایی	قارچ	منابع
Dysidea arenaria	Sterol	ترپنوئید	*C. albicans*	Jacob *et al*., 2003
Hippospongia communis	Utenospongin B	دی ترپنوئید	*C. tropicales and F. oxysporum*	Rifai *et al*., 2004
Leucetta chagosensis	Naamine G	آلکالوئید	*C. herbarum*	Hassan *et al*., 2004
Stylissa sp.	Massadine	آلکالوئید	*C. albicans*	Nishimura *et al.*, 2003
Topsentia sp.	Astroscleridae sterol	سولفات استرول	*S. cerevisiae*	Yang *et al.,* 2003

2-7- خواص ضدویروس اسفنج ها در راستای تولید داروهای ضدویروس

ویروس HIV-۱ یا ویروس نقص ایمنی انسان[۳۸] که سبب ایجاد بیماری ایدز[۳۹] یا بیماری نقص ایمنی اکتسابی در انسان می‌شود، ویروسی است که تا به حال چیزی حدود **۳۳.۲** میلیون نفر را به این بیماری دچار کرده است. با توجه به شیوع این بیماری در سطح جهان وعدم موفقیت محققین در کنترل و درمان این بیماری هر روزه تعداد زیادی از انسان‌ها بر اثر ابتلا به این ویروس جان خود را از دست می‌دهند.

اسنفج ها منبع غنی از ترکیبات با خواص ضد ویروسی به ویژه روی ویروس های عامل بیماری ایدز می باشند، در جدول ۵-۱ برخی از ترکیبات استخراج شده از اسفنج ها با خواص ضدویروس مشاهده می گردد(Newman and Cragg, 2004).

جدول شماره ۲-۵- ترکیبات استخراج شده از اسفنج ها با خواص ضدویروس.

گونه اسفنج	ترکیب شیمیایی	ساختار شیمیایی	ویروس	منابع
***Halicortex* spp.**	Dragmacidin F	ایندول آلکالوئید	HIV	Cutignano *et al.,* 2000
Theonella mirabilis	Papuamides C and D	پپتیدهای حلقوی	Antiviral (HIV-1)	Ford *et al.,* 1999
***Xestospongia* spp.**	Haplosamates A and B	استروئیدهای سولفیدی	Antiviral (HIV-1)	Faulkner ,2000

[۳۸] Human immunodeficiency virus

[۳۹] Acquired immune deficiency syndrom

Wellington *et al.*, 2000	*Herpes* and *Polio*	فنل ماکرولیدی	Hamigeran B	***Hamigera tarangaensis***
Wellington *et al.*, 2000	Antiviral (feline leukemia, mouse influenza, mouse corona) (Sun *et al.*, 1991)	استروئیدهای سولفیدی	Weinbersterols A and B	***Petrosia weinbergi***
Muller *et al.*,1987	Antiviral (HIV-1)	سسکویترپنوئید	Avarol	***Dysidea avara***

فصل سوم

مواد و روش کار

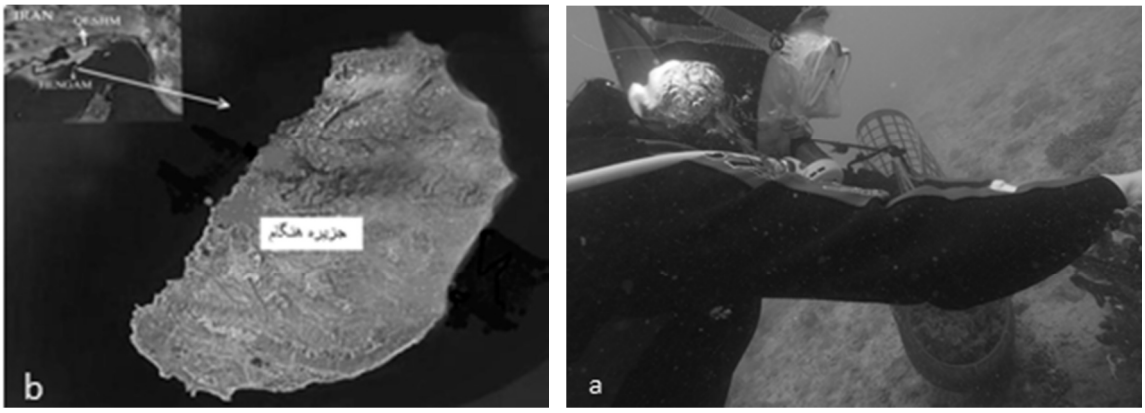
۳-۱- مواد مصرفی

به منظور انجام آزمون ها، مواد مصرفی بسیاری به کاربرده شده است که کلیه مواد شیمیایی از نوع مرک آلمان می باشد.

۳-۲- روش کار

۱-۳-۲- نمونه برداری و شناسایی نمونه

نمونه های اسفنج .*Dysidea* spp، که در شکل ۱.۳ مشاهده می گردد، در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۰ از عمق ۱۵ تا ۲۰ متر از شمال جزیره هنگام، واقع در خلیج فارس با موقعیت جغرافیایی″۵۵°۵۴′۵۵ - ″۵۵°۵۴′۴۰ شرقی و ″۲۶°۴۱′۱۵ - ″۲۶°۳۶′۴۳ شمالی که در شمال آن جزایر قشم قرار دارد توسط غواصی و از بسترهای سنگی تهیه شدند، سپس به صورت منجمد با هواپیما به آزمایشگاه منتقل گردیدند.



شکل ۳-۱- محل نمونه برداری که با علامت قرمز مشخص شده است (**b**)، نمونه برداری اسفنج ***Dysidea spp.*** در عمق ۲۰ متری جزیره هنگام(**a**).

۲-۳-۲-شناسایی نمونه

۱-۲-۳-۲- هضم توسط ماده سفید کننده[۴۰]

این روش برای تهیه سریع اسپیکول های اسفنج مفید می باشد. هرچند که نمونه های تهیه شده مانند روش هضم اسیدی شفاف نمی باشند، اما اسفنج هایی که اسپیکول های کلسیمی دارند به طور معمول از این روش آماده سازی می شوند. به منظور آماده سازی نمونه ها برش های کوچکی از بافت که شامل تکه هایی از سطح و قسمت های عمقی اسفنج است در یک لوله آزمایش قرار داده شدند. مقداری از ماده فعّال سفید کننده هیپوکلرید سدیم خالص را به برش ها اضافه شده و پس از زمان کوتاهی ترکیبات آلی غیر محلول جدا شدند و تنها اسکلت های معدنی باقی ماندند. سپس

[40] Bleach digestion

محلول سفید کننده به دقّت رقیق شده و چندین بار شست و شو داده شدند، ابتدا چندین بار با آب و سپس با اتانول شست و شو این عمل انجام شد. در نهایت اسپیکلول های جدا شده به توسط پیپت به لام های شیشه ای منتقل گشته و فرصت داده شد تا اتانول تبخیر گردد(Hooper, 2000). اسپیکول های کلسیمی پس از خشک و خنک شدن توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۲-۳-۲- هضم اسیدی[41]

با این روش نمونه های پردوام تر و شفاف تر را تهیه می گردد، در این روش از اسید نیتریک به جای ماده سفید کننده استفاده شد. برش های اسفنج بر روی لام شیشه ایی قرار داده شدند، سپس چند قطره اسید روی برش ها ریخته شد، به آرامی روی شعله حرارت داده شدند تا اسید به جوش آمد و این کار آن قدر تکرار گردید تا تمام مواد آلی هضم شدند(Hooper, 2000). اسپیکول های سیلیسی پس از خشک و خنک شدن توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفتند.

۳-۳ - عصاره گیری و شناسایی ترکیبات طبیعی غیر قطبی

۱-۳-۳- عصاره گیری ترکیبات طبیعی غیرقطبی و نیمه قطبی

عصاره گیری با استفاده از روش Bligh and Dyer در سال ۱۹۵۹انجام شد، ابتدا اسفنج ها شسته شدند و سپس با استفاده از قیچی در اندازه های ۱ سانتی متری بریده شدند، نمونه های خرد شده، یک کیلو گرم وزن تر اسفنج، به ارلن حاوی ۲۰۰۰ میلی لیتر دی اتیل اتر منتقل گردید، سپس با استفاده از پنبه و فویل در ارلن به خوبی بسته شد و به مدّت ۲۴ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (25^oC) قرار داده شد.

[41] Acid digestion

پس از ۲۴ ساعت محلول به دست آمده از صافی عبور داده شد تا ذرات اسفنج از آن جدا شده و آنچه باقی ماند، حلال دی اتیل اتری و ترکیبات آلی موجود در اسفنج بود. عصاره غیرقطبی به دست آمده را به دستگاه روتاری وارد نموده، در دمای ^{o}C ۴۰ و دور ۱۴۵، تا حلال(دی اتیل اتر) تبخیر شود، مدت زمان تبخیر با محاسبه میانگین روزی ۶ ساعت دو ماه به طول انجامید، سپس به منظور آنالیز ترکیبات عصاره تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت تا دو فاز چرب و غیر چرب از یکدیگر جدا شدند. در نهایت عصاره غیر چرب توسط ستون سیلیکاژل با ان- هگزان شست و شو داده شد سپس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی الگوی شیمادز مدل GC-17A مجهز به ستون CP-Sil ترکیبات موجود در عصاره شناسایی گردیدند.

۲-۳-۳- عصاره گیری ترکیبات قطبی

به منظور بررسی ترکیبات قطبی، به اسفنج های خرد شده (یک کیلو گرم وزن تر) ۲۰۰۰ میلی لیتر متانول افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق(۲۵^{o}C) قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت محلول به دست آمده را از صافی گذرانده تا ذرات اسفنج از آن جدا شده و آنچه باقی ماند، حلال متانولی و ترکیبات آلی موجود در اسفنج بود. عصاره قطبی به دست آمده به دستگاه روتاری منتقل گردید، در دمای ^{o}C ۴۰ و دور ۱۴۵، وارد شد تا حلال(متانول) تبخیر شود، مدت زمان تبخیر با محاسبه میانگین روزی ۶ ساعت چهار ماه به طول انجامید. از آنجایی که تبخیر متانول بسیار به زمان بر بود به منظور تسریع کار به محلول مقداری تتراکلرید کربن اضافه شد.

سپس هم حجم نمونه به دست آمده (۷۵ cc) اتر اضافه کرده، دو فاز آبی و اتری تشکیل شد. توسط دکانتور دو فاز فوق جدا شده و به فاز آبی به طور هم حجم n- بوتانول اضافه شد و تکان داده شد تا ترکیب شوند، سپس فاز رویی که حاوی عصاره آبی بود[۴۲] از فاز متانولی جدا شد.

۴-۳ - بررسی خواص سیتوتوکسیک:

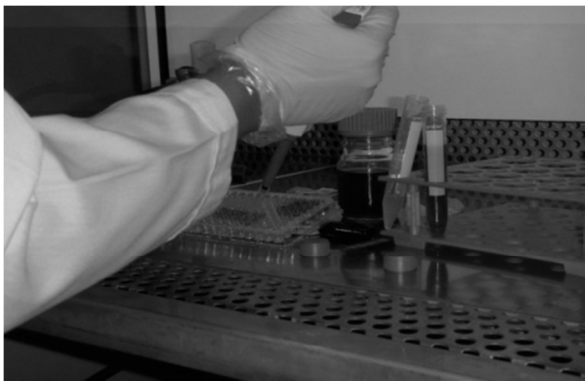
۴-۳-۱ - کشت سلول های سرطانی اپیدرموئید دهان و لنفوسیت انسانی

سلول های سرطانی اپیدرموئید دهان انسان (KB/ C152) و لنفوسیتی (HUT-78/ C185) از بخش کشت سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت فلاسک تهیّه شدند و به محیط کشت روزلت پارک مدیوم انستیتو ۱۶۴۰- RPMI منتقل شد. ابتدا محیط کشت ۱۶۴۰- RPMI در pH ۷/۳ تهیّه گردید و توسط فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون استریل شد. سپس به محیط کشت به نسبت ۲۰۰ µg/ml پنی سیلین G و ۸۰ µg/ml جنتامایسین و نیز به نسبت ۱۰ درصد سرم جنین گاو فیلتر شده به محیط اضافه شد. روزانه سلول های اپیدرموئید دهان و لنفوسیت انسانی به وسیلهٔ میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند تا سرعت رشد، سلامت، آلودگی سلول ها در محیط کشت تازه منتقل شده به منظور ادامه آزمایش مورد تأیید قرار گیرد. پس از آن که تعداد سلول ها (فلاسک های کشت سلولی) افزایش داده شد به منظور بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره های متانولی، دی اتیل اتری و آبی از روش XTT استفاده گردید (Roehm, *et al.*, 1991).

برای آزمون XTT ابتدا توسط عمل تریپنیزاسیون سلول های اپیدرموئید دهان و لنفوسیت انسانی از سطح فلاسک جدا شده و به مدّت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس سلول ها با تراکم 25×103 در هر کدام از پلیت های ۹۶ حفره ای کشت سلولی توزیع گردیدند و از محیط کشت ۱۶۴۰- RPMI به مقدار ۲۰۰ میلی لیتر به هر حفره اضافه شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلول های در میکروپلیت ها رشد نمایند، در طول این

[42] Water extract

مدّت تراکم سلولی توسّط میکروسکوپ معکوس بررسی شده و بعد از ۴۸ ساعت که سلول ها رشد کردند و به دیواره پلیت متّصل شدند محیط کشت سلول ها عوض شد و محیط کشت جدید به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره های دی اتیل اتری و متانولی و آبی با غلظت های ۱، ۲، ۴، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ µg/ml اضافه گردید و آزمون سه بار تکرار شد. به منظور شاهد منفی در تعدادی از چاهک ها محیط کشت RPMI -۱۶۴۰ بدون ترکیب افزودنی اضافه شد. در این آزمون از ترکیب سیکلوسپورین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.



شکل ۳-۲-توزیع سلول های سرطانی به پلیت ۹۶ خانه.

۲-۳-۴ - ارزیابی میزان سمّیت با استفاده از آزمون XTT:

ابتدا نمک XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide) به میزان ۵۰ µl به هر خانه اضافه نموده رنگ محیط کشت متمایل به زرد شد، سپس به مدّت ۴ ساعت در انکوباتور دی اکسید کربن قرار داده شد. سپس مراحل فیکس کردن و لیز شدن سلول را به شرح زیر انجام داده شد:

محلول فیکس کننده را به نسبت مساوی از کلرید کلسیم ۱٪ ($CaCl_2$) و فرمالدهید۰/۵٪ در pH ۷/۲ تهیه نموده، و پس از آنکه محلول حاوی نمک را از پلیت ها خالی نموده به میزان ۱۵۰ میکرولیتر از محلول فیکس کننده افزوده شده و پس از چند ثانیه خالی شد.

به منظور لیز نمودن سلول ها، محلول لیز کننده را با استفاده از اتانول ۵۰٪ به نسبت ۵۰میلی لیتر، اسید استیک خالص به نسبت ۱میلی لیتر و آب مقطر به نسبت ۴۹ میلی لیتر آماده نموده و به مقدار ۲۵۰ میکرولیتر به پلیت ها افزوده و پس از چند دقیقه یک مایع رنگی ایجاد می شود. به منظور تعیین OD با استفاده از سمپلر محلول حاوی سلول ها را به پلیت ها محدّب منتقل نموده و در طول موج ۴۹۰ نانومتر و ۶۹۰ نانومتر نتایج را خوانده. اساس کار آزمون XTT بر مبنای میتوکندری های فعال داخل سلول های زنده می باشند، میتوکندری که در سلول های زنده وجود دارد دهیدروژناز شده و حلقه تترازولیوم را از نمک XTT حذف می نماید به این ترتیب رنگ محلول به نارنجی تغییر می کند. سپس با استفاده از دستگاه الایزا ریدر[۴۳] مدل (Bio-Tek ELx 800) در طول موج ۴۹۰ نانومتر و ۶۹۰ نانومتر میزان OD خوانده شد. میزان OD[۴۴] به دست آمده نشانگر مقدار رنگ جذب شده توسّط سلول های زنده می باشد. هر چه تعداد سلول های سرطانی زنده بیشتر باشد OD به دست آمده نیز بالاتر است. OD خالص برای هر نمونه به صورت : OD زمینه– OD اولیّه = OD خالص می باشد. میزان IC۵۰ (میزان ممانعت از رشد سلول های سرطانی) ۵۰٪ از سلول های بر اساس درصد کشندگی محاسبه شد (Roehm, *et al*., 1991).

$$\text{درصد کشندگی} = \frac{\text{OD نمونه} - \text{OD کنترل منفی}}{\text{OD کنترل منفی}} * ۱۰۰$$

۳-۵ – بررسی خواص ضدباکتریایی:

بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش براث (Bacterial Broth Dilution Methods) و بر اساس سه بار تکرار به شرح زیر انجام گرفت(Rosenblatt, 1991):

[43] ELISA reader
[44] Oxygen Dissolve

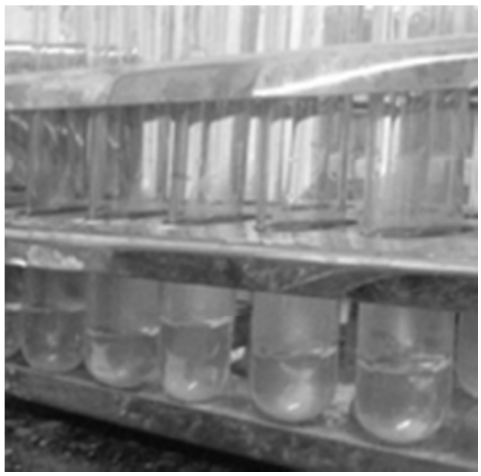
سویه های باکتری *Escherichia coli* ATCC[45]۱۵۲۲۴, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC۲۵۶۱۹, *Staphylococcus aureus aureus* ATCC۱۷۶۴ و *Bacillus subtilis spizizenii* ATCC۶۶۳۳ از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد، سپس هر کدام از سویه ها در محیط کشت حاوی ۵ گرم پپتون، ۳ گرم عصاره گوشت، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر، کشت اولیه داده شدند و به مدّت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بر اساس میزان سرعت رشد باکتری ها در دمای $37\ ^{o}C$ در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلونی های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود.

پس از رشد باکتری ها آن ها از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس از کلونی های تک ایجاد شده به محیط براث که حاوی؛ ۱گرم پپتون، ۱ گرم گلوکز، ۲ گرم عصاره مخمر، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۵ میلی لیتر فسفات بافر۷-۶ اتوکلاو شده بود، در لوله های آزمایش وارد نموده، این کار را آن قدر تکرار شد تا کدورت محیط براث با کدورت لوله مک فارلند ۰/۵(McFarland 0.5) (۰.۵ میلی لیترکلرور باریوم دهیدراته ۱٪ و ۹۹.۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱٪) یکسان شد. اشاره به این نکته لازم می باشد که تعداد باکتری های موجود در لوله مک فارلند۰/۵ برابر ۱/۵*۱۰ ۸CFU/ml می باشد، در حالی که در آزمایش مذکور تعداد باکتری ها برابر۶ ۱۰*۱/۵می باشد. به این منظور با رقّت دادن تعداد باکتری ها به رقم مورد نظر رسانده شد. مایع تلقیحی تهیه شده باید بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت تا در فاصله زمانی پس از استاندارد کردن، تکثیر صورت نگیرد.

از لوله فوق که حاوی ۶ ۱۰*۱/۵باکتری بود به مقدار ۱ میلی لیتر به هرکدام از لوله های استریل اضافه شد، سپس از عصاره های متانولی، دی اتیل اتری و آبی با غلظت های ۰/۰۱ mg/ml تا ۵۰۰ mg/ml که در محیط براث حل شده بود به مقدار ۱ میلی لیتر به لوله های فوق افزوده شد(حجم لوله ها به ۲ میلی لیتر رسانده شد، شکل ۷.۳). برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و آمپی سیلین، با غلظت های فوق استفاده شد و به عنوان شاهد

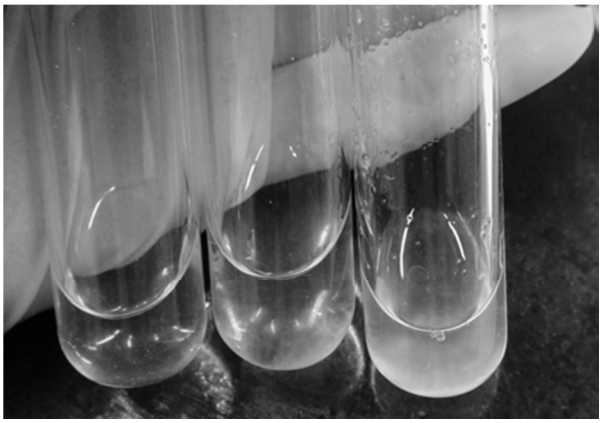
[45]American Type Culture Collection

منفی به یکی از لوله ها ماده فعّال بیولوژیک اضافه نگردید. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده موثره و باکتری قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. سپس سر تمام لوله ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای 37^oC به مدّت ۲۴ ساعت قرار داده شد.



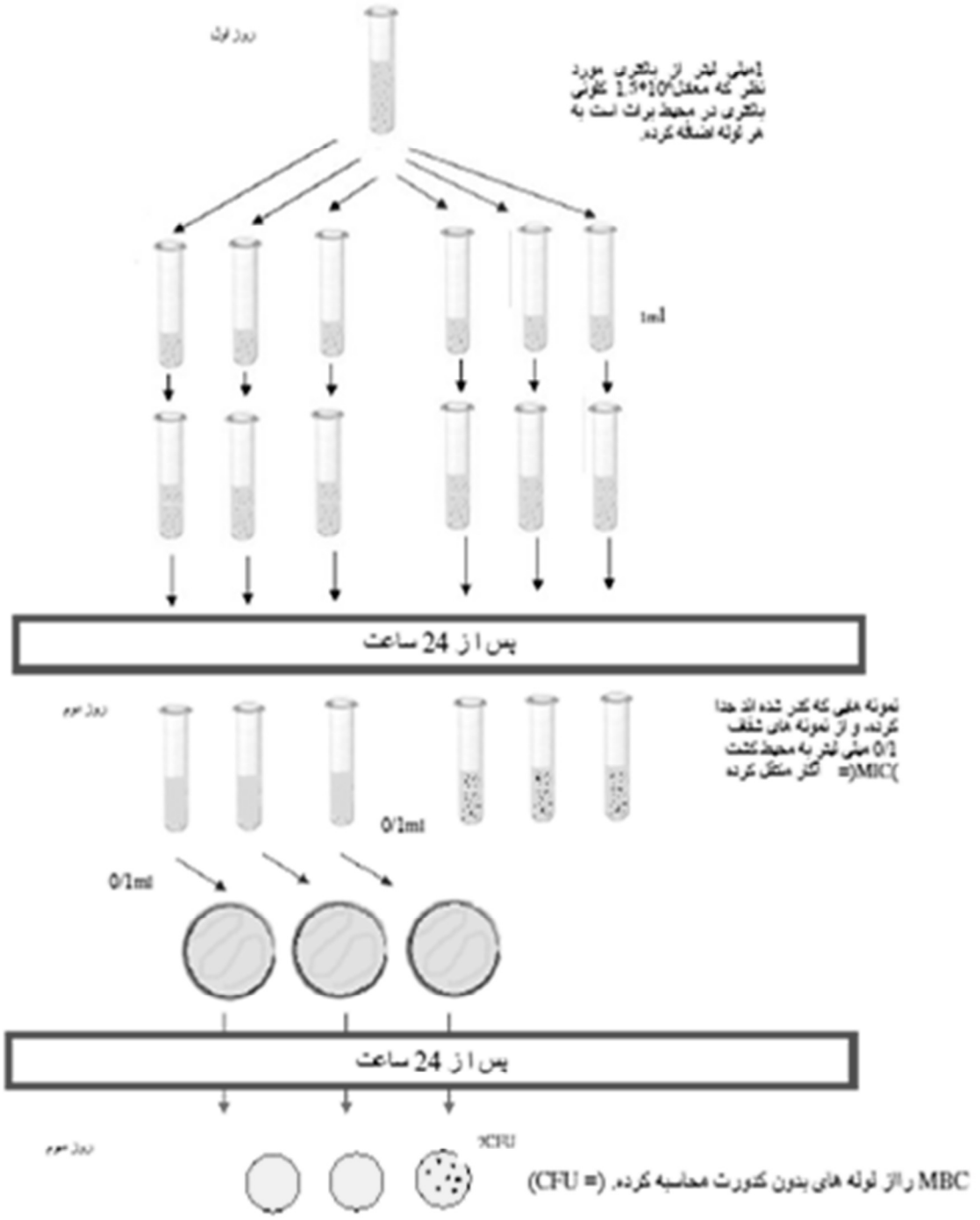
شکل ۳-3-لوله ها با حجم **2ml**، حاوی عصاره های قطبی، غیرقطبی و آبی اسفنج که به محیط براث حاوی باکتری اضافه شد.

پس از ۲۴ ساعت لوله های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آن ها را مورد بررسی قرار گرفت. لوله کنترل که فاقد ترکیبات فعّال بیولوژیک بوده بسیار کدر شده بودند. برای ادامه کار سایر لوله ها با لوله مذکور به صورت چشمی مقایسه شدند که میانگینی از 3 مرتبه آزمایش برای هرگونه باکتری بود مقایسه کرده، مطابق شکل ۳-۸، و لوله هایی را که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله هایی که در آن کدورت ایجاد نشده بود به منظور ادامه کار جدا شدند. لازم به ذکر است غلظت مواد مصرفی در لوله های بدون کدورت میزان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) که به معنای ممانعت از رشد و افزایش تعداد باکتری ها می باشد را نشان داد(Rosenblatt, 1991).



شکل ۳-4-مشاهده کدورت در لوله ها.

در ادامه آزمایش به منظور تعیین توانایی عصاره های مورد نظر در از بین بردن باکتری ها از لوله هایی که در آن ها کدورت مشاهده نشده بود به مقدار ml ۰/۱ به پلیت های استریل تزریق نموده و محیط نوترینت آگار به آن اضافه شد(کشت پورپلیت). سپس پلیت ها را به انکوباتور منتقل شد و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدّت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت پلیت ها خارج شدند و تعداد کلونی های تشکیل شده (CFU) شمرده شد. در پلیت هایی که باکتری رشد کرده بود حاکی از آن است که عصاره مورد نظر تنها توانایی مهار رشد و تکثیر باکتری را دارد، مانند شکل ۹.۳ ، امّا در پلیت هایی که هیچ گونه کلونی مشاهده نشد نشان دهنده آن است که ماده مورد نظر سبب مرگ باکتری شده است؛ که این مقدار برابر با MBC(Minimum Bactericidal Concentration) می باشد(Rosenblatt, 1991).



شکل ۳-۵- طرح شماتیک تعیین **MIC** و **MBC** برای یک نوع باکتری و یک نوع آنتی بیوتیک

۳-۶- بررسی خواص ضد قارچی

بررسی خواص ضد قارچی با استفاده از روش ماکرودایلوشن به شرح زیر انجام گرفت(Green *et al.*, 1994):

سویه های قارچ و مخمر *Candida albicans* ATCC10231 و *Aspergillus fumigatus* PTCC[۴۶]5009 از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد، سپس هر کدام از سویه ها به شرح زیر کشت اولیه داده شدند.

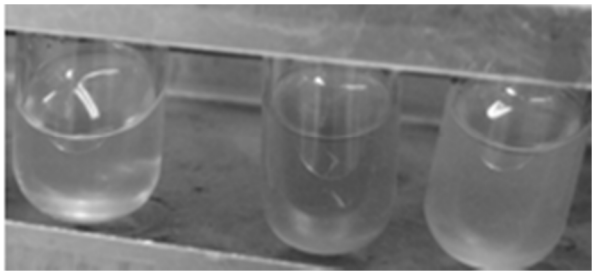
مخمر *Candida albicans* در محیط کشت حاوی ۲۰ گرم آگار، ۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم پپتون، ۳ گرم عصاره مخمر در یک لیتر آب مقطر با pH 6.2 ± 0.2 کشت اولیه داده شدند و به مدّت ۲۴ ساعت در دمای $25\ ^{o}C$ در انکوباتور قرار داده شد تا از کلونی های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود. قارچ *Aspergillus fumigatus* در محیط کشت حاوی ۲۰ گرم عصاره سیب زمینی، ۲۰ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر با pH 6.2 ± 0.2 کشت اولیه داده شدند و به مدّت ۷۲ ساعت در دمای $۲۶\ ^{o}C$ در انکوباتور قرار داده شد تا از کلونی های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود.

پس از رشد قارچ و مخمر آن ها از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس از کلونی های تک ایجاد شده به محیط ماکرودیلوشن براث در لوله های آزمایش وارد نموده، سوسپانسیون حاصل در طول موج 530 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری دارای عبور نوری % 90 است اندازه گیری شد، که تقریباً معادل 106 سلول قارچی در هر میلی لیتر می باشد. مایع تلقیحی تهیه شده باید بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت تا در فاصله زمانی پس از استاندارد کردن، تکثیر صورت نگیرد.

[46]Persian Type Culture Collection

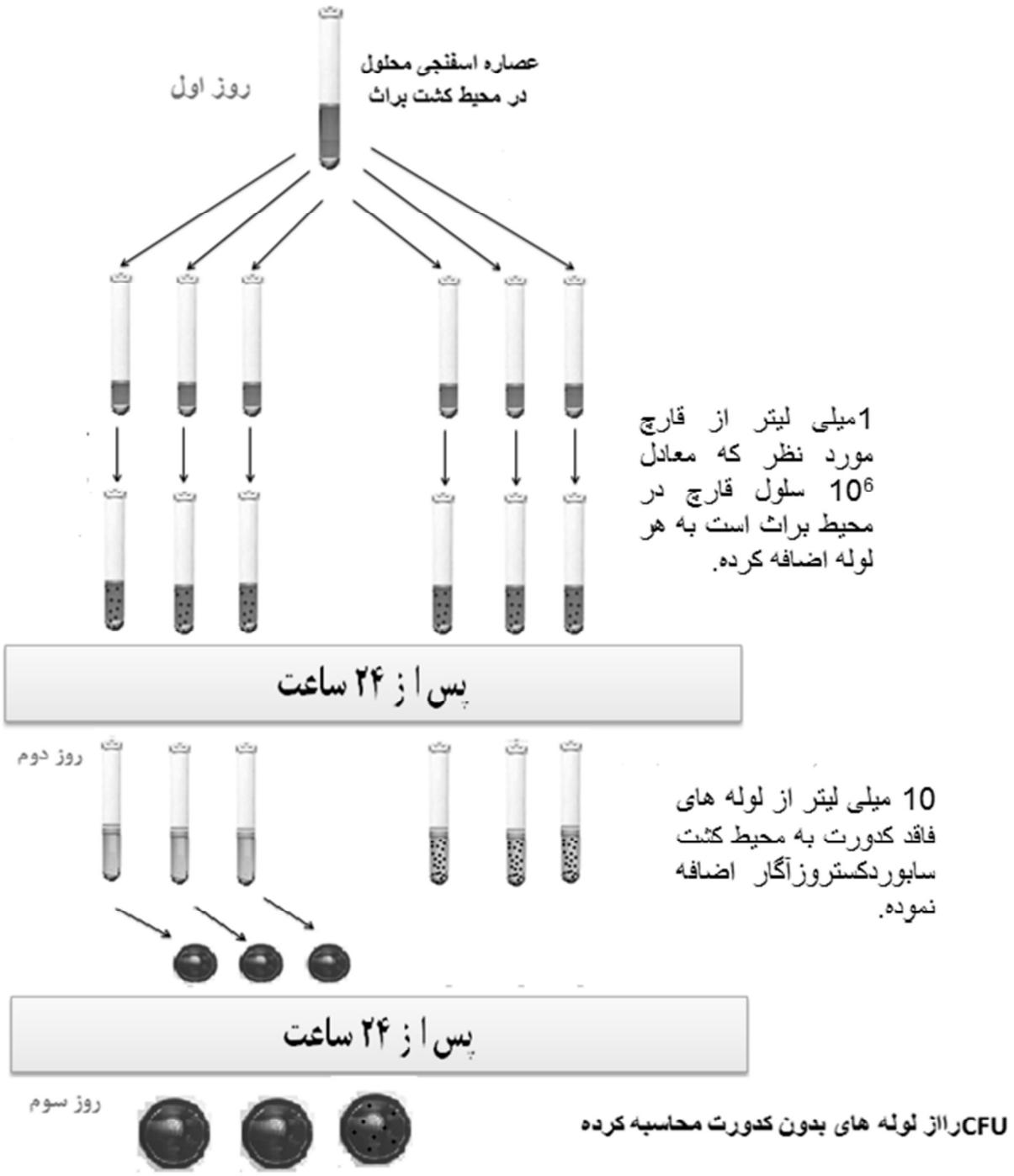
از لوله فوق که حاوی ۶ ۱۰ سلول قارچی بود به مقدار ۱ میلی لیتر به هرکدام از لوله های استریل اضافه شد، سپس از عصاره های متانولی، دی اتیل اتری و آبی با غلظت های mg/ml ۰/۰۱ تا mg/ml ۵۰۰ که در محیط ماکرودیلوشن براث حل شده بود به مقدار ۱ میلی لیتر به لوله های فوق افزوده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از داروی ضد قارچ نیاسین، با غلظت های فوق استفاده شد و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله ها ماده فعّال بیولوژیک اضافه نگردید. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده موثره و قارچ قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. سپس سر تمام لوله ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای ۲۵ و ۲۶ درجه سانتی گراد به مدّت ۲۴ ساعت قرار داده شد.

پس از ۲۴ ساعت لوله های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آن ها را مورد بررسی قرار گرفت. لوله کنترل که فاقد ترکیبات فعّال بیولوژیک بوده بسیار کدر شده بودند. برای ادامه کار سایر لوله ها را با لوله مذکور به صورت چشمی مقایسه شدند که میانگینی از 3 مرتبه آزمایش برای هرگونه قارچی بود، شکل ۱۱.۳، و لوله هایی را که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله هایی که در آن کدورت ایجاد نشده بود به منظور ادامه کار جدا شدند. لازم به ذکر است غلظت مواد مصرفی در لوله های بدون کدورت میزان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) که به معنای ممانعت از رشد و افزایش تعداد قارچ ها می باشد.



شکل ۳-۶- مشاهده کدورت در لوله ها.

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی مقدار 10 میکرولیتر از هرکدام از لوله هایی که رشدی در آن مشاهده نشده بود، به محیط سابوردکستروزآگار اضافه گردید. سپس پلیت ها را به انکوباتور منتقل شد و در دمای ۲۵ تا ۲۶ درجه سانتی گراد به مدّت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. کمترین غلظت که در آن سبب مرگ قارچ شده به عنوان MFC (Minimum fungicidal Concentration) منظور گردید (Green *et al.,* 1994).



شکل ۳-۷- طرح شماتیک تعیین میزان **MIC** و **MFC** عصاره های بیولوژیک.

۳-۷- بررسی خواص ضد ویروسی

۱-۳-۷- سنجش پرولیفراسیون:

برای سنجش میزان پرولیفراسیون سلولها از متد XTT (Roche) استفاده شد(Morgan *et al,* ; Cavrois *et al,* 2004 1995). به این منظور آماده سازی محلول XTT تهیه گردید. به منظور کاهش خطای آزمایش برای سنجش پرولیفراسیون از محیط بدون فنول رد استفاده شد. پس از اضافه کردن 50µl از محلول XTT به هر چاهک، سلولها برای ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار داده شدند. پس از پیتاژ کردن چاهک‌ها، 450 nm OD محیط سلول ها با OD رفرنس 630 nm به وسیله دستگاه ELISA Reader خوانده شد.

۲-۳-۷- پلاسمیدها:

برای تولید ویریون‌های HIV SCR از پلاسمید بیان کننده(pSPAX.2(gag-pro-pol استفاده شد که gag-pro-pol HIV-1 را کد نمود. پلاسمید دیگری که برای تولید ویروین‌های SCR استفاده شد، پلاسمید pmzNL4-3 بود که حاوی پروویروس HIV به همراه جهش حذفی در توالی کد کننده آنزیم‌های RT وIN بود (Rezaei *et al,* 2007). از پلاسمید pMD2.G نیز برای تولید گلیکوپروتئین سطحی ویروسی وزیکولار استوماتیت (VSVG) استفاده شد. پلاسمید p7HX نیز کد کننده گلیکوپروتئین سطحی ویروس HIV (ENV) بود و در این مطالعه برای تولید ویریون‌های GFP Reporter استفاده خواهد شد. پلاسمید pWPXL برای تولید پروویروس GFP Reporter استفاده گردید.

۳-۳-۷- کشت سلول:

در این مطالعه سلول‌های HEK293T ،MT-2 کشت داده شدند. سلول‌های HEK در محیط DMEM به همراه ۱۵٪ FBS به همراه L-Glutamine ، پنی سیلین و استرپتومایسین نگهداری شدند. در مرحله ترانسفکشن به محیط سلول‌های HEK ، HEPES اضافه شد. سلولهای MT-2 در محیط RPMI به همراه ۱۵٪ FBS ، L-Glutamine و پنسیلین–استرپتومایسین کشت داده شدند. تمامی سلول‌ها در انکوباتور CO_2 تحت فشار ۵٪ CO_2 و دمای $37^{\circ}C$ نگهداری شدند.

۴-۳-۷- ترانسفکشن و تولید ویروس:

برای تولید ویریون‌های SCR HIV سودوتایپ شده با VSVG ، پلاسمیدهای pSPAX.2 و pmzNL4-3 و pMD2.G با نسبت‌های مشخص، همزمان به سلولهای HEK293T ترانسفکت شد. ترانسفکشن توسط لیپوفکت (Qiagene) انجام شد. در مرحله ترانسفکشن ، HEPES به میزان 25mM به محیط سلول‌ها اضافه شد. سوپ‌های حاوی ویروس در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ جمع آوری و محیط تازه به سلول‌ها اضافه گردید. (Campbell *et al*,2007). برای تغلیظ ویروس‌ها، سوپ حاوی ویروس فیلتر و برای ۲ ساعت با نیروی g 103 × 60 و در دمای 4°C سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ سوپ روی پلیت ویروسی برداشته واین پلت در RPMI با نسبت 1ml به 30ml سوپ اولیه قرار داده شد. پلت ویروس‌ها در RPMI توسط gentle vortex در یک شب در دمای 4°C باز شد.

۵-۳-۷- ترکیبات و طراحی آزمایشات:

تمامی ترکیبات با غلظت‌های مختلف ۰/۰۱ mg/ml تا ۵۰۰ mg/ml در dimethyl sulfoxide (DMSO) حل شدند. نویراپین (NVP) محلول در DMSO که از قرص های کلینیکال استخراج شده است به عنوان کنترل مثبت بازدارندگی ویروس و DMSO با غلظت نهایی ۱٪ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. تمامی آزمایشات به شکل سه تایی انجام شدند. سمیت ترکیبات روی سلول‌های MT-2 به طور جداگانه بررسی شد. بر اساس این بررسی CC_{50} (cytotoxicity capacity

(50% محاسبه شد. CC_{50} در واقع غلظتی از ترکیب را نشان می‌دهد که برای سلول‌های هدف 50% سمیت داشته است. بر اساس این بررسیها (IC_{50} (inhibitory capacity 50% برای ترکیبات محاسبه شد. IC_{50} در واقع غلظتی از ترکیب را نشان می‌دهد که تا حد 50% اثر بازدارندگی روی ویروس داشته است. با انجام محاسبه ریاضی شامل تقسیم CC_{50} بر IC_{50} شاخص TI(therapeutic index) و یا SI(Selectivity Index) بدست خواهد آمد (CC_{50}/IC_{50}=TI or SI). بر اساس شاخص TI یا SI اثر ضد ویروسی عصاره‌های مختلف بررسی و باهم مقایسه خواهد شد (Zhao *et al*, 2005; Georgiou *et al,* 2000).

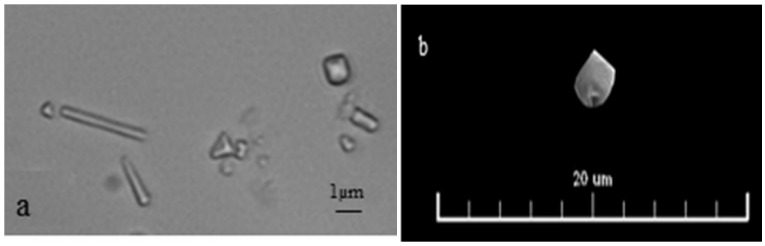
فصل چهارم

نتایج

۴-۱- شناسایی اسفنج:

۴-۱-۱- اسپیکول های کلسیمی مشاهده شده به روش هضم توسط ماده سفید کننده:

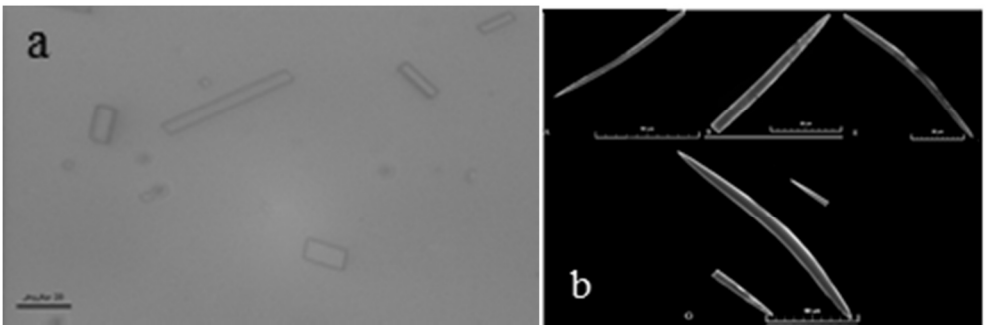
در لام های تهیه شده به منظور مشاهده اسپیکول های کلسیمی تعداد اسپیکول های مشاهده شده بسیار اندک و همان طور که در شکل ۲ مشاهده می گردد در گروه میکرواسکلر به نام رابد در اندازه ۱ تا ۲ میکرومتر و میکرواسکلرهای سوزنی در اندازه های ۴ تا ۸ میکرومتر مشاهده می گردد.



شکل ۴-۱- اسپیکول های کلسیمی با میکروسکوپ نوری (**a**)، اسپیکول های کلسیمی با میکروسکوپ الکترونی (**b**).

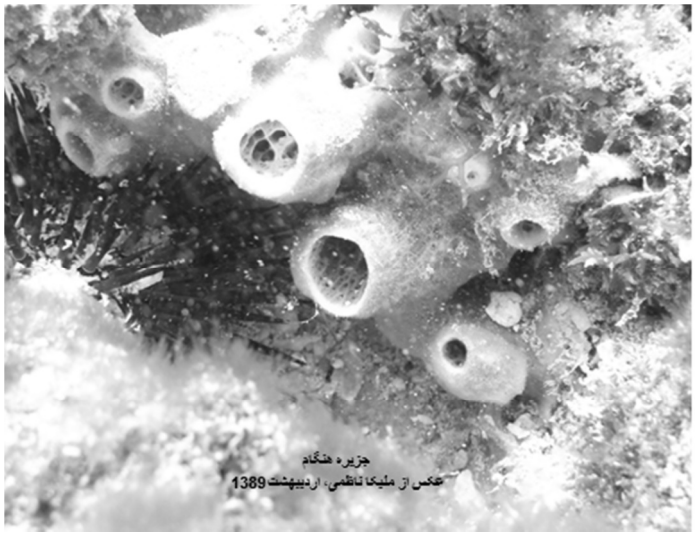
۴-۱-۲- اسپیکول های سیلیسی مشاهده شده به روش هضم اسیدی:

اسپیکول های مونوآکسون که در گروه مگااسکر قرار می گیرند، از لحاظ اندازه در گروه های ۳۰ تا ۵۰ میکرومتر، ۵۰ تا ۷۰ میکرومتر و ۹۰ تا ۱۲۰ میکرومتر طبقه بندی شدند. همان طور که در شکل ۳. مشاهده می گردد در لام های بررسی شده تعداد اسپیکول های مشاهده شده نسبت به اسپیکول های کلسیمی بسیار بیشتر بودند.



شکل ۴-۲-اسپیکول های سیلیسی مشاهده شده با میکروسکوپ نوری (**a**)، اسپیکول های سیلیسی با میکروسکوپ الکترونی (**b**).

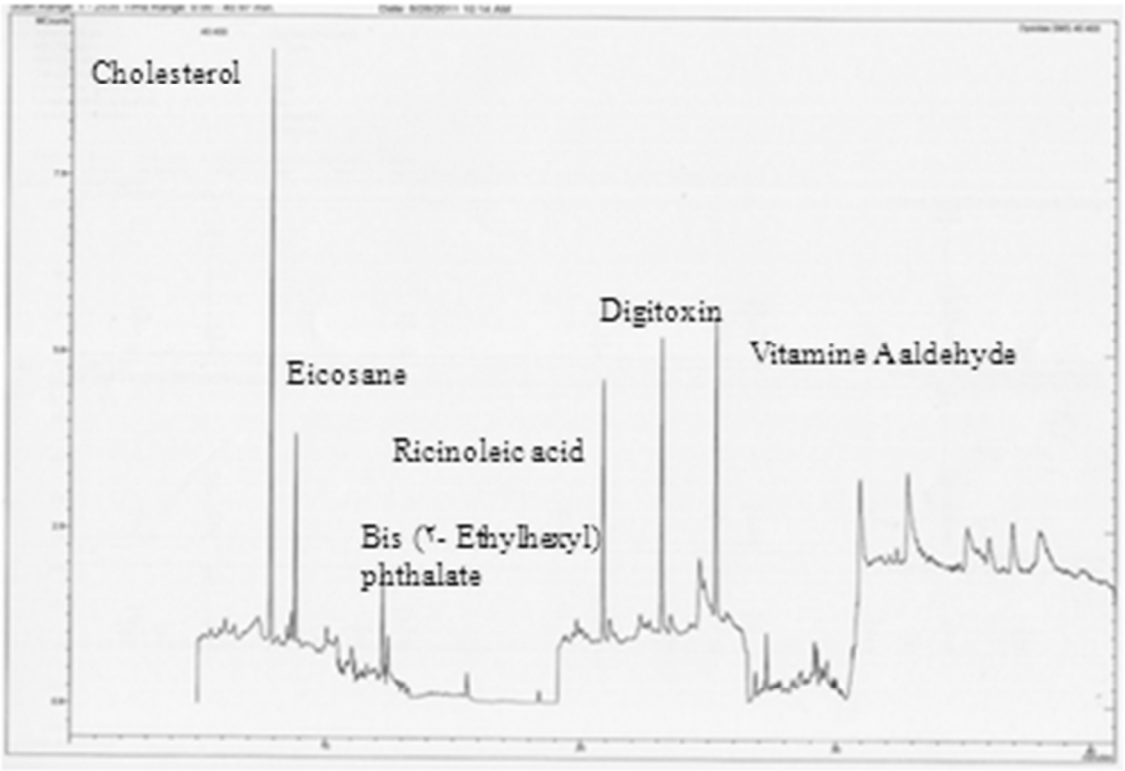
با استفاده از کلید شناسایی هوپر در سال ۲۰۰۰ و با توجه به اسپیکول های جداسازی شده و مرفولوژی اسفنج؛ رنگ صورتی متمایل به بنفش نمونه، بافت انعطاف پذیر و اسکلوم های بزرگ مشخص گردید که نمونه به گونه *Dysidea pallescens* متعلق می باشد.



شکل ۴-۳-اسفنج ***Dysidea pallescens*** در عمق ۲۰ متری جزیره هنگام.

۴-۲- شناسایی ترکیبات طبیعی موجود در عصاره دی اتیل اتری

نتایج و ترکیبات موجود در عصاره دی اتیل اتری که با استفاده از اطّلاعات داده شده توسط دستگاه GC/MS می باشد به شرح زیر شناسایی شده است:

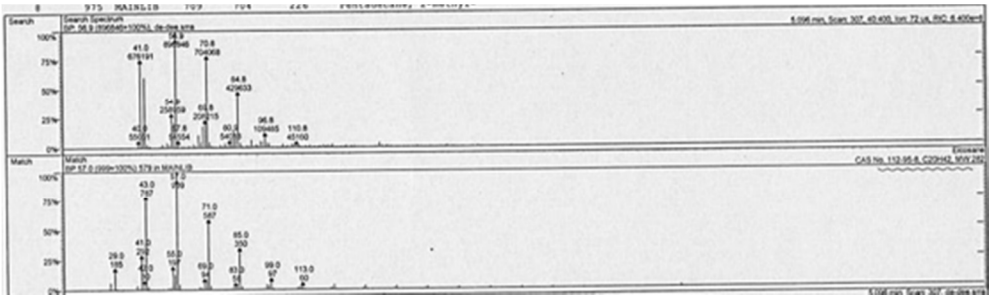


شکل ۴-۴- کروماتوگرام گازی عصاره دی اتیل اتری

اسفنج ***Dysidea pallescens***

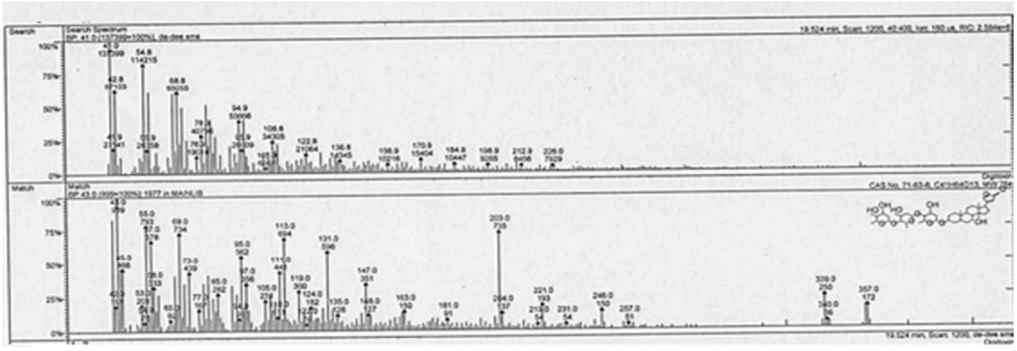
چ

۱. ترکیب Eicosane (IUPAC= Icosane)، به مقدار ۷/۸۴٪ و با کیفیت ٪۹۸ در عصاره مورد نظر سنجیده شده است.



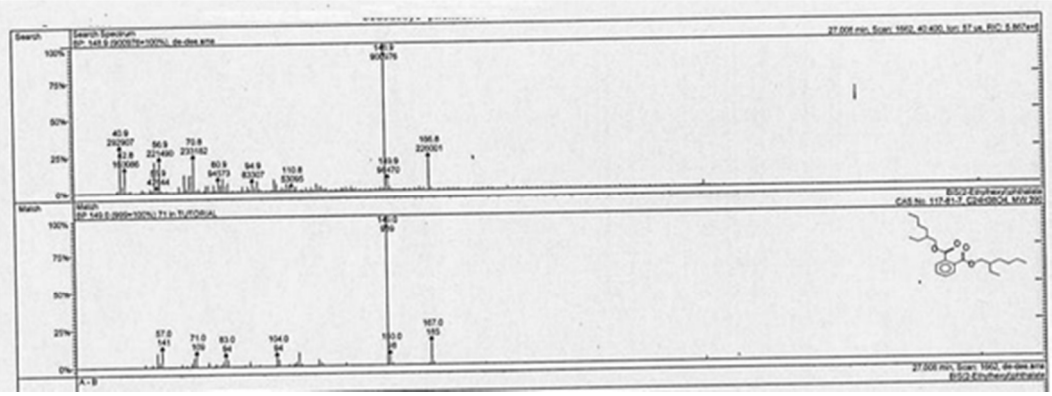
شکل ۴-۵- طیف جرم ترکیب **Eicosane**.

۲. ترکیب Digitoxin (3β,5β)-3-[(O-2,6-dideoxy- β-D-ribo-hexapyranosyl-(1->4)-2,6-dideoxy-β-D-ribo-hexopyranosyl)oxy]- 14-hydroxycard-20(22)-enolide)، به مقدار ۲۰/۵۶٪ و با کیفیت ۹۹٪ در عصاره مورد نظر سنجیده شده است.



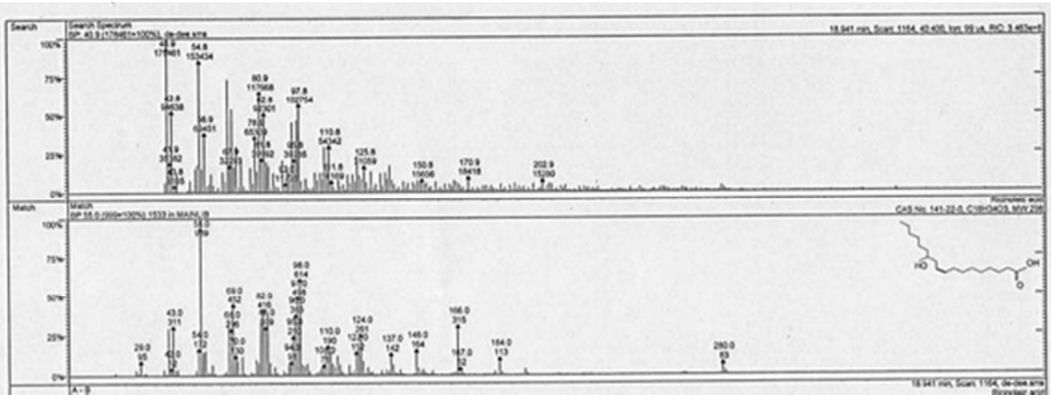
شکل ۴-۶- طیف جرم ترکیب **Digitoxin**.

۳. ترکیب Bis (2- Ethylhexyl) phthalate (IUPAC= Bis(2-ethylhexyl))، به مقدار ۲/۶۳٪ و با کیفیت ۹۸٪ در عصاره مورد نظر سنجیده شده است.



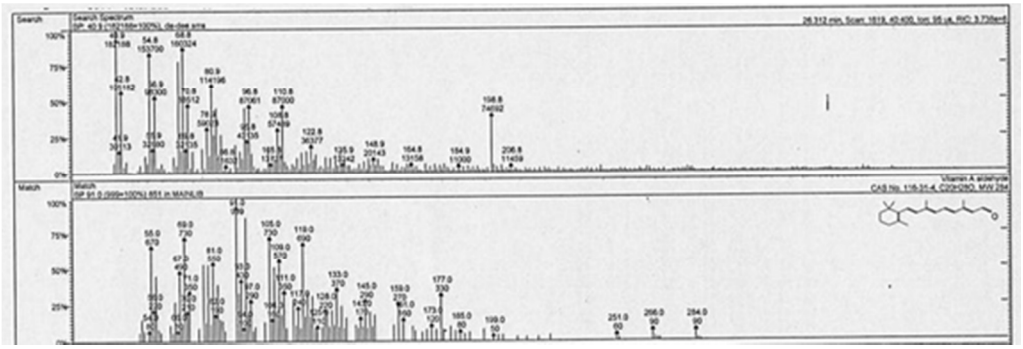
شکل ۴-۷- طیف جرم ترکیب **Bis (2- Ethylhexyl) phthalate** .

۴. ترکیب **Ricinoleic acid** (**IUPAC= (9Z,12R)-12-Hydroxyoctadec-9-enoic acid**)، به مقدار ۱۸/۶۳٪ و با کیفیت ۹۹٪ در عصاره مورد نظر سنجیده شده است.



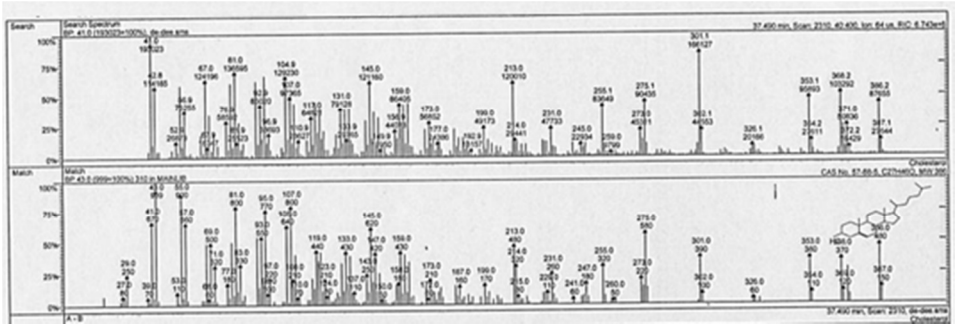
شکل ۴-۸- طیف جرم ترکیب **Ricinoleic acid**.

۵. ترکیب Vitamine A aldehyde (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenal =IUPAC) ، به مقدار ۲۸/۴۲٪ و با کیفیت ۹۹٪ در عصاره مورد نظر سنجیده شده است.



شکل ۴-۹- طیف جرم ترکیب **Vitamine A aldehyde**.

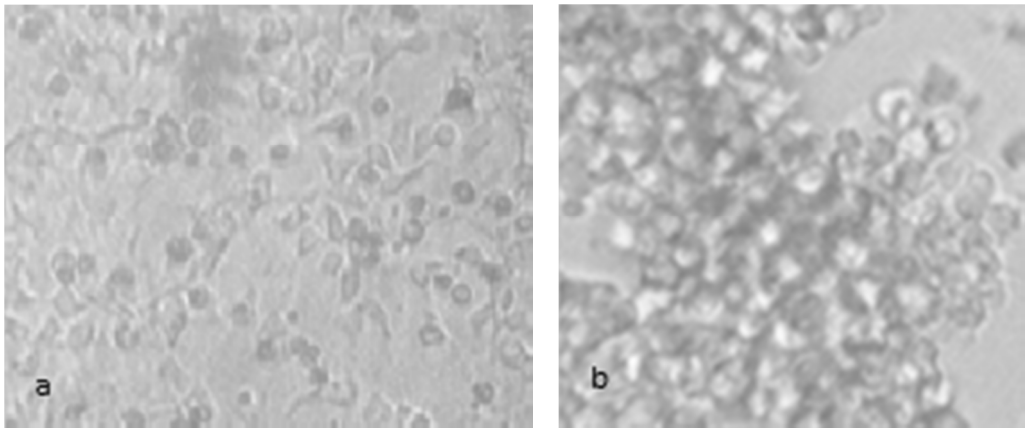
۶. ترکیب Cholesterol (IUPAC= (3β)-cholest-5-en-3-ol) با فرمول شیمیایی C27H46O، به مقدار ۲۹/۱۶٪ و با کیفیت ۹۹٪ در عصاره مورد نظر سنجیده شده است.



شکل ۴-۱۰- طیف جرم ترکیب **Cholesterol**.

۴-۳- بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens***

در شکل ۳-۱۱ سلول های طبیعی سرطانی اپیدرموئید دهان انسان (KB/ C152) و لنفوسیتی (HUT-78/ C185) که توسط میکروسکوپ اینورت بررسی شدند، مشاهده می گردد.



شکل ۴-۱۱- سلول های **KB** (**a**) و **HUT-78** (**b**) قبل از افزودن عصاره.

نتایج OD خوانده شده توسط دستگاه الایزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر و ۶۹۰ حاصل از آزمون آزمون XTTروی سلول های سرطانی اپیدرموئید دهان انسان (KB/ C152) و لنفوسیتی (HUT-78/ C185) با غلظت های مختلف عصاره های اسفنج *Dysidea pallescens* در جداول ۳-۲ و ۳-۳ نشان داده شده است.

جدول ۴-۱- میزان **OD** تعیین شده توسط دستگاه الایزا عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens***

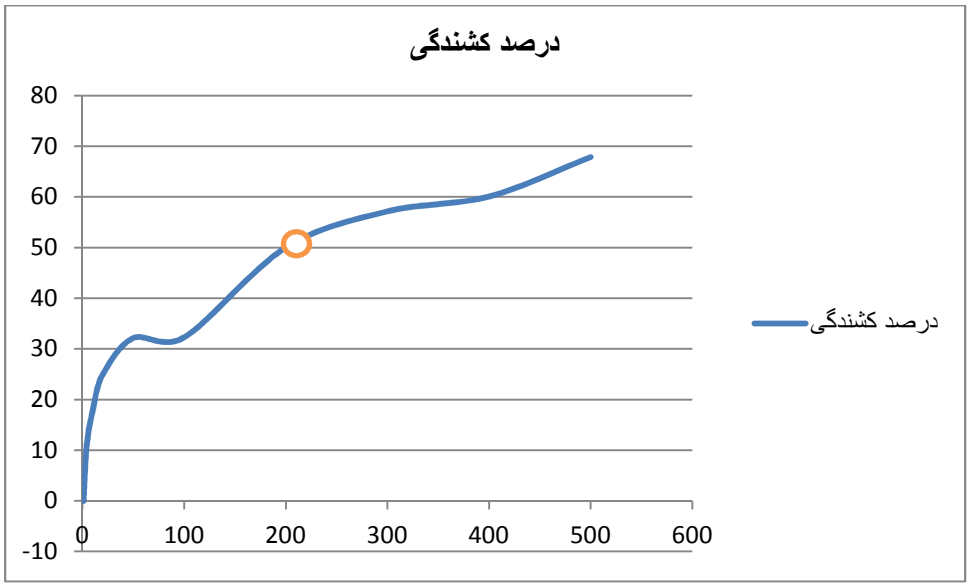
ماده موثر	**OD** در طول موج **nm** ۵۴۰	ماده موثر	**OD** در طول موج **nm** ۵۴۰
دی اتیل اتری µg/ml ۰ (شاهد منفی)	۲/۸	متانول ۵۰µg/ml	۲/۲
دی اتیل اتری ۱µg/ml	۲/۸	متانول ۱۰۰µg/ml	۲/۱

دی اتیل اتری ۴µg/ml	۲/۵	متانول ۲۰۰µg/ml	۱/۷
دی اتیل اتری ۱۰µg/ml	۲/۳	متانول ۳۰۰µg/ml	۱/۵
دی اتیل اتری ۲۰ µg/ml	۲/۱	متانول ۴۰۰µg/ml	۱/۳
دی اتیل اتری ۵۰µg/ml	۱/۹	متانول ۵۰۰ µg/ml	۱/۲
دی اتیل اتری ۱۰۰µg/ml	۱/۷	سیکلوسپورین ۱µg/ml	۲/۵
دی اتیل اتری ۲۰۰µg/ml	۱/۴	سیکلوسپورین ۴µg/ml	۲/۴
دی اتیل اتری ۳۰۰µg/ml	۱/۲	سیکلوسپورین ۱۰µg/ml	۲/۲
دی اتیل اتری ۴۰۰µg/ml	۱/۱	سیکلوسپورین ۲۰ µg/ml	۲/۱
دی اتیل اتری ۵۰۰µg/ml	۰/۹	سیکلوسپورین ۵۰µg/ml	۱/۹
متانول ۰ µg/ml (شاهد منفی)	۲/۸	سیکلوسپورین ۱۰۰µg/ml	۱/۶
متانول ۱µg/ml	۲/۸	سیکلوسپورین ۲۰۰µg/ml	۱/۳
متانول ۴µg/ml	۲/۶	سیکلوسپورین ۳۰۰µg/ml	۱/۱
متانول ۱۰µg/ml	۲/۶	سیکلوسپورین ۴۰۰µg/ml	۰/۹
متانول ۲۰ µg/ml	۲/۴	سیکلوسپورین ۵۰۰µg/ml	۰/۷

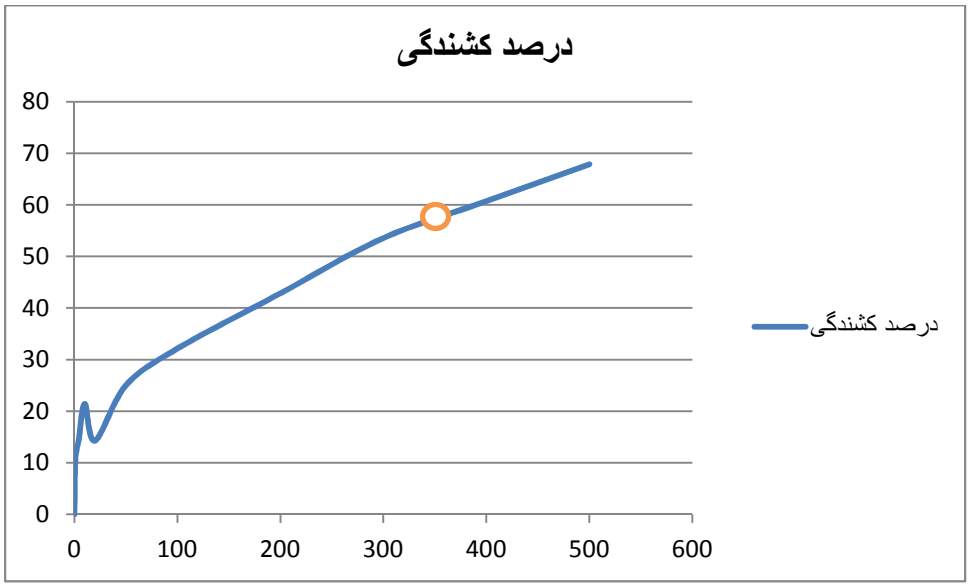
جدول ۴-۲- میزان IC_{50} عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens***

روی سلول **HUT-78/ C185**.

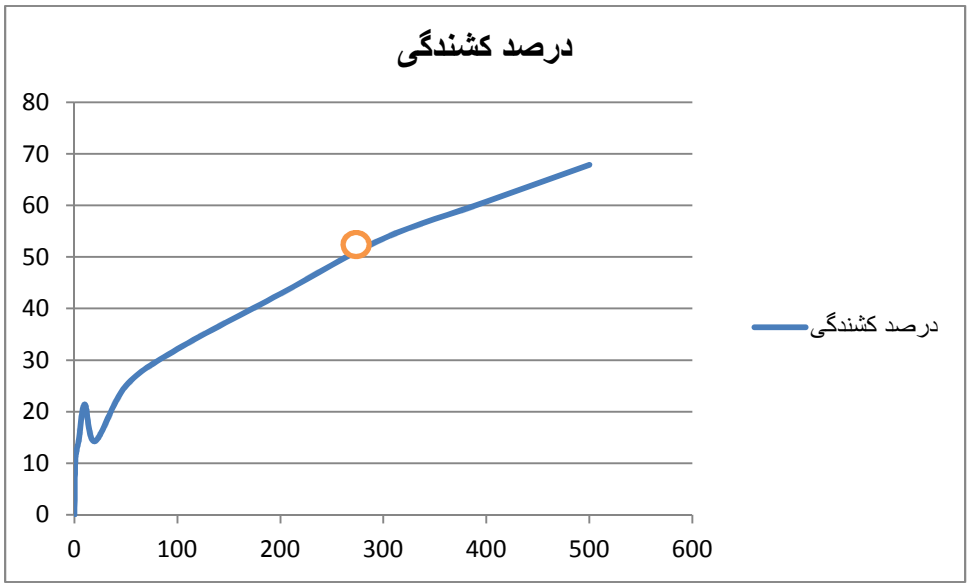
ماده موثر	درصد کشندگی (IC_{50})	ماده موثر	درصد کشندگی (IC_{50})
دی اتیل اتری ۰ µg/ml (شاهد منفی)	۰	متانول ۵۰ µg/ml	۲۱/۴۲
دی اتیل اتری ۱µg/ml	۰	متانول ۱۰۰µg/ml	۲۵
دی اتیل اتری ۴µg/ml	۱۰/۷۱	متانول ۲۰۰µg/ml	۳۹/۲۸
دی اتیل اتری ۱۰µg/ml	۱۷/۸۵	متانول ۳۰۰µg/ml	۴۶/۴۲
دی اتیل اتری ۲۰ µg/ml	۲۵	متانول ۴۰۰µg/ml	۵۳/۵۷
دی اتیل اتری ۵۰µg/ml	۳۲/۱۴	متانول ۵۰۰ µg/ml	۵۷/۱۴
دی اتیل اتری ۱۰۰µg/ml	۳۹/۲۸	سیکلوسپورین ۱µg/ml	۱۰/۷۱
دی اتیل اتری ۲۰۰µg/ml	۵۰	سیکلوسپورین ۴µg/ml	۱۴/۲۸
دی اتیل اتری ۳۰۰µg/ml	۵۷/۱۴	سیکلوسپورین ۱۰µg/ml	۲۱/۴۲
دی اتیل اتری ۴۰۰µg/ml	۶۰/۰۷	سیکلوسپورین ۲۰ µg/ml	۱۴/۲۸
دی اتیل اتری ۵۰۰µg/ml	۶۷/۸۵	سیکلوسپورین ۵۰µg/ml	۲۵
متانول ۰ µg/ml	۰	سیکلوسپورین ۱۰۰µg/ml	۳۲/۱۴
متانول ۱µg/ml	۰	سیکلوسپورین ۲۰۰µg/ml	۴۲/۸۵
متانول ۴µg/ml	۷/۱۴	سیکلوسپورین ۳۰۰µg/ml	۵۳/۵۷
متانول ۱۰ µg/ml	۷/۱۴	سیکلوسپورین ۴۰۰µg/ml	۶۰/۷۱
متانول ۲۰µg/ml	۱۴/۲۸	سیکلوسپورین ۵۰۰µg/ml	۶۷/۸۵



نمودار ۴-۱. تعیین میزان IC_{50} عصاره دی اتیل اتری اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول **HUT-78**.



نمودار ۴-۲. تعیین میزان IC_{50} عصاره متانولی اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول **HUT-78**.



نمودار ۴-۳. تعیین میزان IC_{50} ترکیب سیکلوسپورین روی سلول **HUT-78**.

همان طور که نتایج نشان می دهد عصارهٔ دی اتیل اتری دارای اثرات ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد (۵۰ IC) برابر ۲۰۰µg/ml، متانولی ۳۳۵µg/ml و اثر ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد (۵۰ IC) ترکیب تجاری سیتوتوکسیک سیکلوسپورین برابر ۲۷۵ µ g/ml می باشد.

جدول ۴-۳- میزان **OD** تعیین شده توسط دستگاه الایزا عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens*** در طول موج ۴۹۰- ۶۹۰ نانومتر روی سلول **KB**.

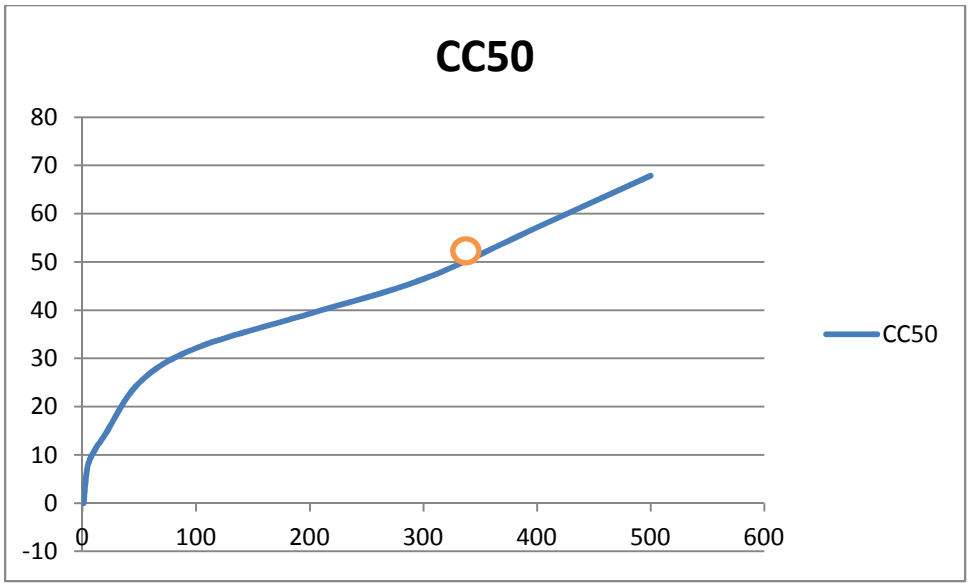
ماده موثر	OD در طول موج nm ۵۴۰	ماده موثر	OD در طول موج nm ۵۴۰
دی اتیل اتری µg/ml ۰ (شاهد منفی)	3	متانول ۵۰µg/ml	۲/۴
دی اتیل اتری ۱µg/ml	3	متانول ۱۰۰µg/ml	۲
دی اتیل اتری ۴µg/ml	۳	متانول ۲۰۰µg/ml	۱/۹
دی اتیل اتری ۱۰µg/ml	2/8	متانول ۳۰۰µg/ml	۱/۶
دی اتیل اتری ۲۰ µg/ml	۲/۶	متانول ۴۰۰µg/ml	۱/۴
دی اتیل اتری ۵۰µg/ml	2/3	متانول ۵۰۰ µg/ml	۱/۱
دی اتیل اتری ۱۰۰µg/ml	2/1	سیکلوسپورین ۱µg/ml	۲/۹
دی اتیل اتری ۲۰۰µg/ml	۱/۹	سیکلوسپورین ۴µg/ml	۲/6

دی اتیل اتری ۳۰۰µg/ml	۱/۶	سیکلوسپورین ۱۰µg/ml	۲/4
دی اتیل اتری ۴۰۰µg/ml	۱/۲	سیکلوسپورین ۲۰ µg/ml	2/2
دی اتیل اتری ۵۰۰µg/ml	۱/۱	سیکلوسپورین ۵۰µg/ml	1/9
متانول ۰ µg/ml (شاهد منفی)	3	سیکلوسپورین ۱۰۰µg/ml	1/7
متانول ۱µg/ml	3	سیکلوسپورین ۲۰۰µg/ml	1/3
متانول ۴µg/ml	2/9	سیکلوسپورین ۳۰۰µg/ml	1
متانول ۱۰µg/ml	2/9	سیکلوسپورین ۴۰۰µg/ml	0.8
متانول ۲۰ µg/ml	۲/۷	سیکلوسپورین ۵۰۰µg/ml	0.6

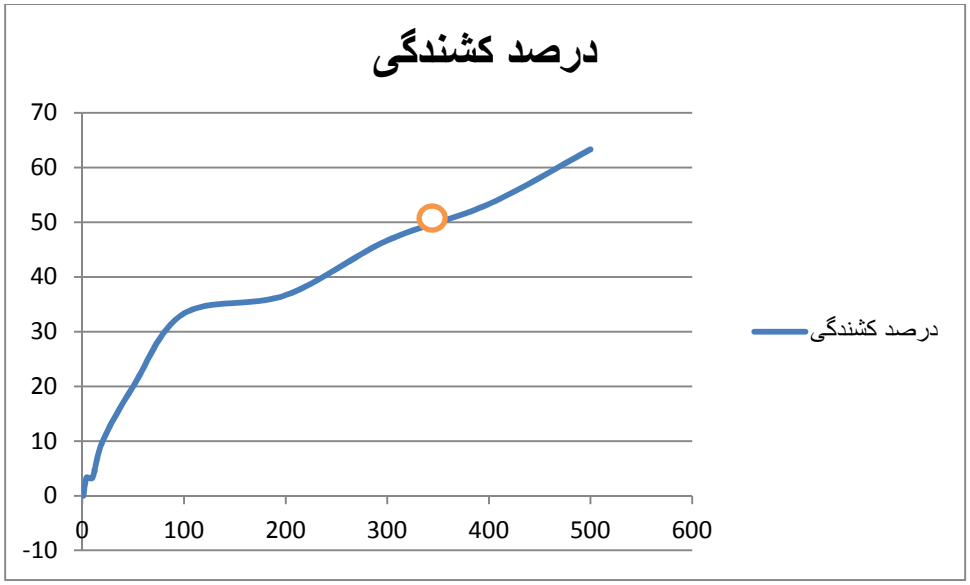
جدول ۴-۴- میزان **IC50** عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول **KB**.

ماده موثر	درصد کشندگی (IC_{50})	ماده موثر	درصد کشندگی (IC_{50})
دی اتیل اتری ۰ µg/ml (شاهد منفی)	۰	متانول ۵۰µg/ml	۲۰
دی اتیل اتری ۱µg/ml	۰	متانول ۱۰۰µg/ml	۳۳/۳۳
دی اتیل اتری ۴µg/ml	۰	متانول ۲۰۰µg/ml	۳۶/۶۶
دی اتیل اتری ۱۰µg/ml	۶/۶۶	متانول ۳۰۰µg/ml	۴۶/۶۶
دی اتیل اتری ۲۰ µg/ml	۱۳/۳۳	متانول ۴۰۰µg/ml	۵۳/۳۳

دی اتیل اتری ۵۰µg/ml	۲۳/۳۳	متانول ۵۰۰ µg/ml	۶۳/۳۳
دی اتیل اتری ۱۰۰µg/ml	۳۰	سیکلوسپورین ۱µg/ml	3/33
دی اتیل اتری ۲۰۰µg/ml	۳۶/۶۶	سیکلوسپورین ۴µg/ml	13/33
دی اتیل اتری ۳۰۰µg/ml	۴۶/۶۶	سیکلوسپورین ۱۰µg/ml	20
دی اتیل اتری ۴۰۰µg/ml	۶۰	سیکلوسپورین ۲۰ µg/ml	26/67
دی اتیل اتری ۵۰۰µg/ml	۶۳/۳۳	سیکلوسپورین ۵۰µg/ml	36/67
متانول ۰ µg/ml (شاهد منفی)	۰	سیکلوسپورین ۱۰۰µg/ml	43/33
متانول ۱ µg/ml	۰	سیکلوسپورین ۲۰۰µg/ml	56/67
متانول ۴µg/ml	3/33	سیکلوسپورین ۳۰۰µg/ml	66/67
متانول ۱۰µg/ml	3/33	سیکلوسپورین ۴۰۰µg/ml	70/33
متانول ۲۰ µg/ml	۱۰	سیکلوسپورین ۵۰۰µg/ml	80

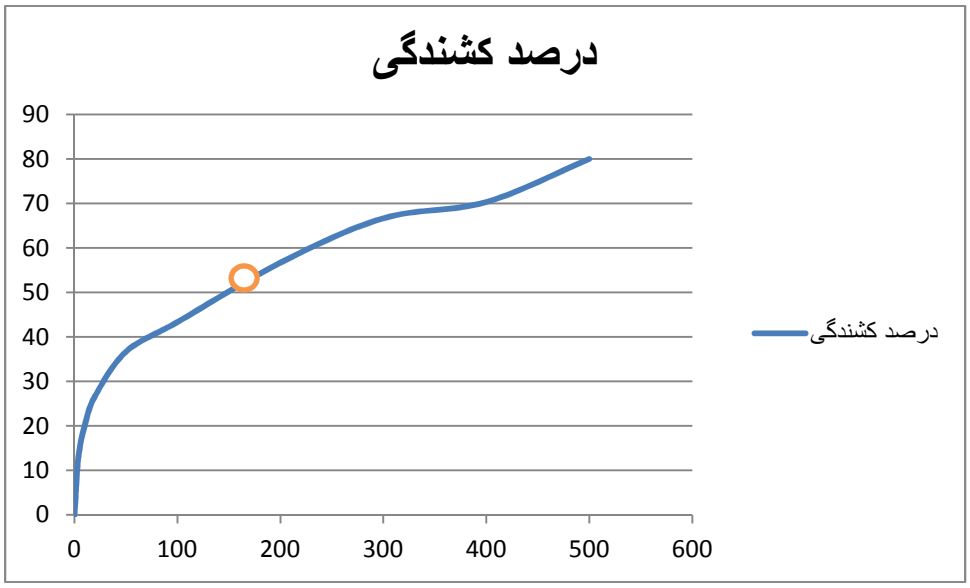


نمودار ۴-۴. تعیین میزان IC_{50} عصاره دی اتیل اتری اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول **KB**.



نمودار ۴-۵. تعیین میزان IC_{50} عصاره متانولی اسفنج ***Dysidea pallescens***

روی سلول **KB**.



نمودار ۴-۶. تعیین میزان IC_{50} ترکیب سیکلوسپورین روی سلول **KB**.

همان طور که نتایج نشان می دهد عصارهٔ دی اتیل اتری دارای اثرات ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد (۵۰ IC) برابر ۳۲۵µg/ml، متانولی ۳۷۵µg/ml و اثر ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد (۵۰ IC) ترکیب تجاری سیتوتوکسیک سیکلوسپورین برابر µg/ml 135 می باشد.

۴-۴- بررسی اثر ضدباکتری عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens***

در جدول ۵.۴ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری های (MIC) و در جدول ۶.۴ حداقل غلظت کشندگی باکتری ها (MBC) مورد آزمایش عصاره های اسفنجی فصل تابستان مشاهده می گردد.

جدول ۴-۵- حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens*** ((-) نمونه های فاقد کدورت،(+) نمونه هایی که کدورت در آن ها مشاهده شده).

عصاره اسفنج	***Escherichia coli***	***Pseudomonas aeruginosa***	***Staphylococcus aureus***	***Bacillus subtilis***
متانولی ۰/۰۱ **mg/ml**	+	+	+	+
متانولی ۰/۰۵ **mg/ml**	+	+	+	+
متانولی ۰/۱ **mg/ml**	+	+	+	+
متانولی ۰/۵ **mg/ml**	+	+	+	+
متانولی ۰/۷۵ **mg/ml**	+	+	+	+
متانولی ۱/۵ **mg/ml**	+	+	+	+

متانولی ۲ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۳ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۵ mg/ml	+	+	+	+
متانولی ۱۰ mg/ml	+	+	+	–
متانولی ۲۰mg/ml	–	+	+	–
متانولی ۳۰ mg/ml	–	+	+	-
متانولی ۴۰ mg/ml	–	+	+	-
متانولی ۵۰ mg/ml	–	+	+	-
دی اتیل اتری ۰/۰۱ mg/ml	+	+	+	+
دی اتیل اتری ۰/۰۵ mg/ml	+	+	+	+
دی اتیل اتری ۰/۱ mg/ml	+	+	+	+
دی اتیل اتری ۰/۵ mg/ml	+	+	+	+
دی اتیل اتری ۰/۷۵ mg/ml	+	+	+	+
دی اتیل اتری ۱/۵ mg/ml	+	+	+	+
دی اتیل اتری ۲ mg/ml	+	+	-	+
دی اتیل اتری ۳ mg/ml	+	+	-	+
دی اتیل اتری ۵ mg/ml	+	+	-	+
دی اتیل اتری ۱۰ mg/ml	+	+	-	-
دی اتیل اتری ۲۰mg/ml	-	+	-	-
دی اتیل اتری ۳۰ mg/ml	-	+	-	-
دی اتیل اتری ۴۰ mg/ml	-	+	-	-

دی اتیل اتری ۵۰ mg/ml	-	+	-	-
آبی ۰/۰۱ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۰/۰۵ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۰/۱ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۰/۵ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۰/۷۵ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۱/۵ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۲ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۳ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۵ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۱۰ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۲۰mg/ml	+	+	+	+
آبی ۳۰ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۴۰ mg/ml	+	+	+	+
آبی ۵۰ mg/ml	+	+	+	+
آمپی سیلین ۰/۰۱ mg/ml	+	+	+	+
آمپی سیلین ۰/۰۵ mg/ml	+	+	+	+
آمپی سیلین ۰/۱ mg/ml	+	+	+	+
آمپیسیلین ۰/۵ mg/ml	+	+	+	+
آمپی سیلین ۰/ ۷۵mg/ml	-	+	-	+
آمپی سیلین ۱/۵ mg/ml	-	-	-	-

آمپی سیلین ۲ mg/ml	-	-	-	-
آمپی سیلین ۳ mg/ml	-	-	-	-
آمپی سیلین ۵ mg/ml	-	-	-	-
آمپی سیلین ۱۰ mg/ml	-	-	-	-
آمپی سیلین ۲۰ mg/ml	-	-	-	-
آمپی سیلین ۳۰ mg/ml	-	-	-	-
آمپی سیلین ۴۰ mg/ml	-	-	-	-
آمپی سیلین ۵۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۰/۰۱ mg/ml	+	+	+	+
تتراسایکلین ۰/۰۵ mg/ml	+	+	+	+
تتراسایکلین ۰/۱mg/ml	+	+	+	+
تتراسایکلین ۰/۵ mg/ml	+	+	+	+
تتراسایکلین ۰/۷۵mg/ml	-	+	-	+
تتراسایکلین ۱/۵ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۲ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۳ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۵ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۱۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۲۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۳۰ mg/ml	-	-	-	-
تتراسایکلین ۴۰ mg/ml	-	-	-	-

تتراسایکلین **۵۰ mg/ml**	-	-	-	-

همان طور که از جدول ۵.۴. برداشت می شود؛ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری (MIC) عصاره های دی اتیل اتری و متانولی برای باکتری *Escherichia coli* برابر ۲۰ mg/ml می باشد و عصاره آبی نسبت به باکتری مذکور هیچ گونه اثری را از خود نشان نداده اند. آنتی بیوتیک های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت mg/ml ۰/۷۵ از رشد باکتری ها جلوگیری نموده اند.

حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری (MIC) عصاره دی اتیل اتری و متانولی برای باکتری *Bacillus subtilis* برابر ۱۰ mg/ml می باشد، اما عصاره آبی نسبت به باکتری مذکور هیچ گونه اثری را از خود نشان نداده اند. آنتی بیوتیک های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۱/۵ mg/ml از رشد باکتری ها جلوگیری نموده اند.

حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری (MIC) عصاره دی اتیل اتری برای باکتری *Staphylococcus aureus* برابر ۲ mg/ml می باشد، و عصاره های متانولی و آبی نسبت به باکتری مذکور هیچ گونه اثری را از خود نشان نداده اند. آنتی بیوتیک های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ mg/ml از رشد باکتری ها جلوگیری نموده اند.

عصاره های متانولی و دی اتیل اتری هیچ گونه اثری روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* از خود نشان نداده اند، آنتی بیوتیک های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۳mg/ml اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده اند.

جدول ۴-۶- حداقل کشندگی باکتریایی عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens***.

تعداد کلونی	باکتری	غلظت عصاره اسفنجی (**MBC**)
0	*Staphylococcus aureus*	دی اتیل اتری ۱۰ mg/ml
0	*Bacillus subtilis*	دی اتیل اتری ۳۰ mg/ml
0	*Escherichia coli*	آمپی سیلین ۱/۵ mg/ml
0	*Staphylococcus aureus*	آمپی سیلین ۱/۵ mg/ml
۰	*Bacillus subtilis*	آمپی سیلین ۲ mg/ml
۰	*Pseudomonas aeruginosa*	آمپی سیلین ۳ mg/ml
0	*Escherichia coli*	تتراسایکلین ۱/۵ mg/ml
0	*Staphylococcus aureus*	تتراسایکلین ۱/۵ mg/ml
۰	*Bacillus subtilis*	تتراسایکلین ۲ mg/ml
۰	*Pseudomonas aeruginosa*	تتراسایکلین ۳ mg/ml

همان طور که از جدول ۶.۴. برداشت می شود؛ حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) عصاره دی اتیل اتری برای باکتری*Bacillus subtilis* برابر ۳۰ mg/ml می باشد، اما عصاره های متانولی و آبی اثر باکتریوسیدی از خود نشان نداده اند. آنتی بیوتیک های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۲mg/ml اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده اند.

حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) عصاره دی اتیل اتری برای باکتری *Staphylococcus aureus* برابر ۱۰mg/ml می باشد، اما عصاره های متانولی و آبی اثر باکتریوسیدی از خود نشان نداده اند. آنتی بیوتیک های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۱/۵ mg/ml اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده اند.

عصاره های متانولی و دی اتیل اتری هیچ گونه اثری روی باکتری های *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* از خود نشان نداده اند، آنتی بیوتیک های مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۳mg/ml و ۱/۵mg/ml اثر باکتریوسیدی از خود نشان داده اند.

۴-۵- بررسی اثر ضدقارچ عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens***

در جدول ۷.۴ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ (MIC) و در جدول ۸.۴ حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) مورد آزمایش عصاره های اسفنجی فصل تابستان مشاهده می گردد.

جدول ۴-۷- حداقل غلظت ممانعت کنندگی از قارچ عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens*** ((-) نمونه های فاقد کدورت،(+) نمونه هایی که کدورت در آن ها مشاهده شده).

عصاره اسفنج	*Candida albicans*	*Aspergillus fumigatus*

متانولی ۰/۰۱ mg/ml	+	+
متانولی ۰/۰۵ mg/ml	+	+
متانولی ۰/۱ mg/ml	+	+
متانولی ۰/۵ mg/ml	+	-
متانولی ۰/۷۵ mg/ml	-	-
متانولی ۱/۵ mg/ml	-	-
متانولی ۲ mg/ml	-	-
متانولی ۳ mg/ml	-	-
متانولی ۵ mg/ml	-	-
متانولی ۱۰ mg/ml	-	-
متانولی ۲۰mg/ml	-	-
متانولی ۳۰ mg/ml	-	-
متانولی ۴۰ mg/ml	-	-
متانولی ۵۰ mg/ml	-	-
دی اتیل اتری ۰/۰۱ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۰/۰۵ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۰/۱ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۰/۵ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۰/۷۵ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۱/۵ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۲ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۳ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۵ mg/ml	+	+

دی اتیل اتری ۱۰ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۲۰mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۳۰ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۴۰ mg/ml	+	+
دی اتیل اتری ۵۰ mg/ml	-	+
آبی ۰/۰۱ mg/ml	+	+
آبی ۰/۰۵ mg/ml	+	+
آبی ۰/۱ mg/ml	+	+
آبی ۰/۵ mg/ml	+	+
آبی ۰/۷۵ mg/ml	+	+
آبی ۱/۵ mg/ml	+	+
آبی ۲ mg/ml	+	+
آبی ۳ mg/ml	+	+
آبی ۵ mg/ml	+	+
آبی ۱۰ mg/ml	+	+
آبی ۲۰mg/ml	+	+
آبی ۳۰ mg/ml	+	+
آبی ۴۰ mg/ml	+	+
آبی ۵۰ mg/ml	+	+
نیاسین ۰/۰۱ mg/ml	+	+
نیاسین ۰/۰۵ mg/ml	+	+
نیاسین ۰/۱ mg/ml	+	+

نیاسین ۰/۵ mg/ml	-	-
نیاسین ۰/ ۷۵mg/ml	-	-
نیاسین ۱/۵ mg/ml	-	-
نیاسین ۲ mg/ml	-	-
نیاسین ۳ mg/ml	-	-
نیاسین ۵ mg/ml	-	-
نیاسین ۱۰ mg/ml	-	-
نیاسین ۲۰ mg/ml	-	-
نیاسین ۳۰ mg/ml	-	-
نیاسین ۴۰ mg/ml	-	-
نیاسین ۵۰ mg/ml	-	-

همان طور که از جدول ۷.۴. برداشت می شود؛ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ (MIC) عصاره متانولی برای قارچ *Aspergillus fumigatus* برابر ۰/۵ mg/ml می باشد، و عصاره های متانولی و آبی نسبت به قارچ مذکور هیچ گونه اثری را از خود نشان نداده اند. ترکیب ضدقارچ مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۵ mg/ml از رشد قارچ ها جلوگیری نموده است.

حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ (MIC) عصاره دی اتیل اتری برای مخمر *Candida albicans* برابر ۵۰ mg/ml می باشد، و عصاره های متانولی برابر ۰/۷۵ mg/ml می باشد، اما عصاره آبی نسبت به قارچ مذکور هیچ گونه

اثری را از خود نشان نداده اند. ترکیب ضدقارچ مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۵ mg/ml از رشد قارچ ها جلوگیری نموده است.

جدول ۴-۸- حداقل کشندگی قارچی عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens***.

تعداد کلونی	قارچ	غلظت عصاره اسفنجی (**MFC**)
0	*Aspergillus fumigatus*	متانولی ۵ mg/ml
0	*Candida albicans*	متانولی ۱/۵ mg/ml
0	*Aspergillus fumigatus*	نیاسین ۰/۷۵ mg/ml
0	*Candida albicans*	نیاسین ۰/۷۵ mg/ml

همان طور که از جدول ۸.۴ برداشت می شود؛ حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره متانولی برای قارچ *Aspergillus fumigatus* برابر ۵ mg/ml می باشد، اما عصاره های دی اتیل اتری و آبی اثر قارچ کشی از خود نشان نداده اند. نیاسین مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ mg/ml اثر قارچ کشی از خود نشان داده اند.

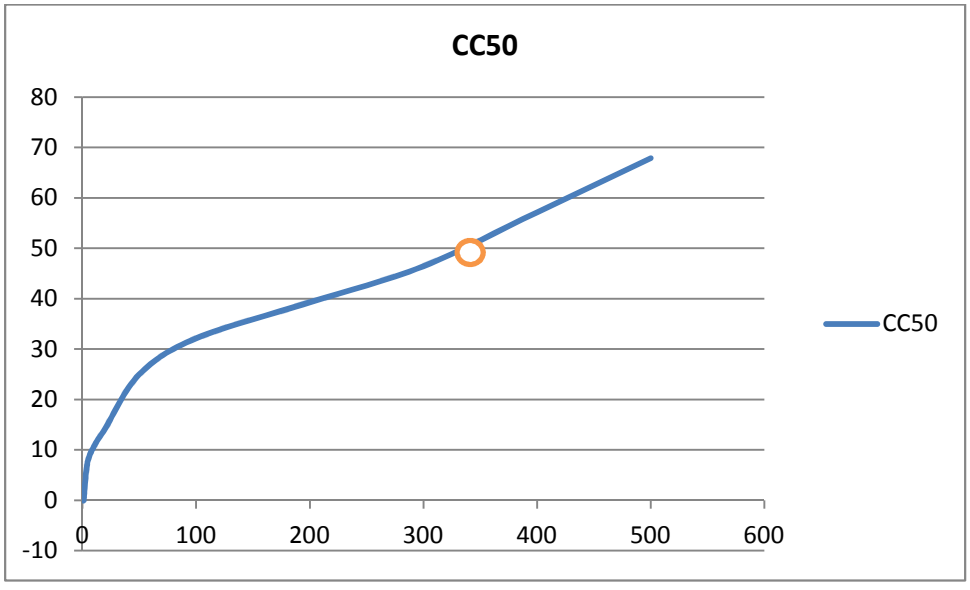
حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره متانولی برای مخمر *Candida albicans* برابر ۱/۵ mg/ml می باشد، اما عصاره های دی اتیل اتری و آبی اثر قارچ کشی از خود نشان نداده اند. نیاسین مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ mg/ml اثر قارچ کشی از خود نشان داده اند.

۴-۶- بررسی اثر ضد ویروس عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens***

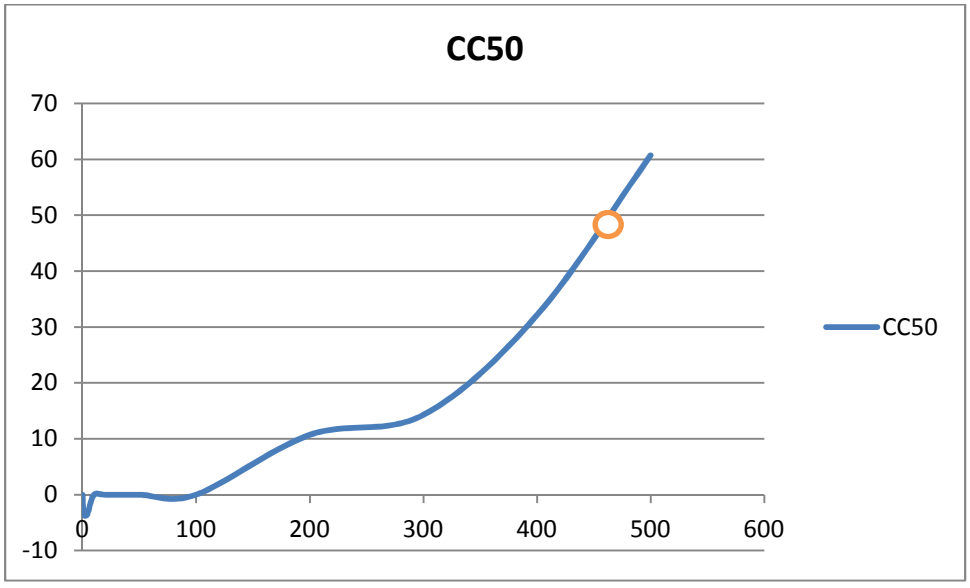
جدول ۴-۹-. میزان CC_{50} تعیین شده عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول های **MT-2**.

ماده موثر	CC_{50}	ماده موثر	CC_{50}
دی اتیل اتری ۰ µg/ml (شاهد منفی)	۰	متانول ۱ µg/ml	۰
دی اتیل اتری ۱µg/ml	۰	متانول ۴µg/ml	-۳/۵۷
دی اتیل اتری ۴µg/ml	۷/۱۴	متانول ۱۰µg/ml	-۳/۵۷
دی اتیل اتری ۱۰µg/ml	۱۰/۷۱	متانول ۲۰ µg/ml	۰
دی اتیل اتری ۲۰ µg/ml	۱۴/۲۹	متانول ۵۰µg/ml	۰
دی اتیل اتری ۵۰µg/ml	۲۵	متانول ۰ µg/ml (شاهد منفی)	۰

دی اتیل اتری ۱۰۰µg/ml	۳۲/۱۴	متانول ۱۰۰µg/ml	۰
دی اتیل اتری ۲۰۰µg/ml	۳۹/۲۹	متانول ۲۰۰µg/ml	۱۰/۷۱
دی اتیل اتری ۳۰۰µg/ml	۴۶/۴۳	متانول ۳۰۰µg/ml	۱۴/۲۸
دی اتیل اتری ۴۰۰µg/ml	۵۷/۱۴	متانول ۴۰۰µg/ml	۳۲/۱۴
دی اتیل اتری ۵۰۰µg/ml	۶۷/۸۶	متانول ۵۰۰ µg/ml	۶۰/۷۱



نمودار ۴–۷. تعیین میزان CC_{50} تعیین شده عصاره دی اتیل اتری اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول های **MT-2.**

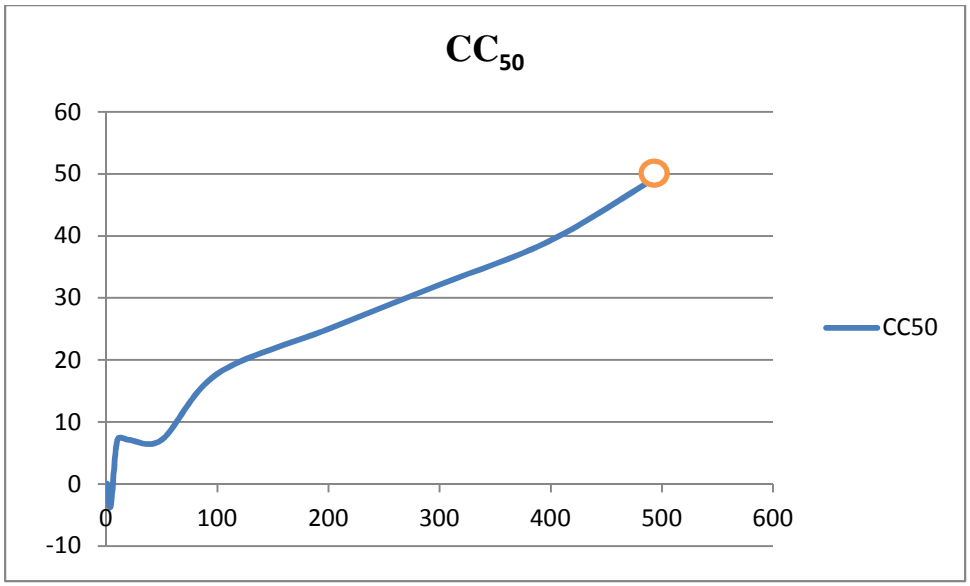


نمودار ۴–۸. تعیین میزان CC_{50} تعیین شده عصاره متانولی اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول های **MT-2.**

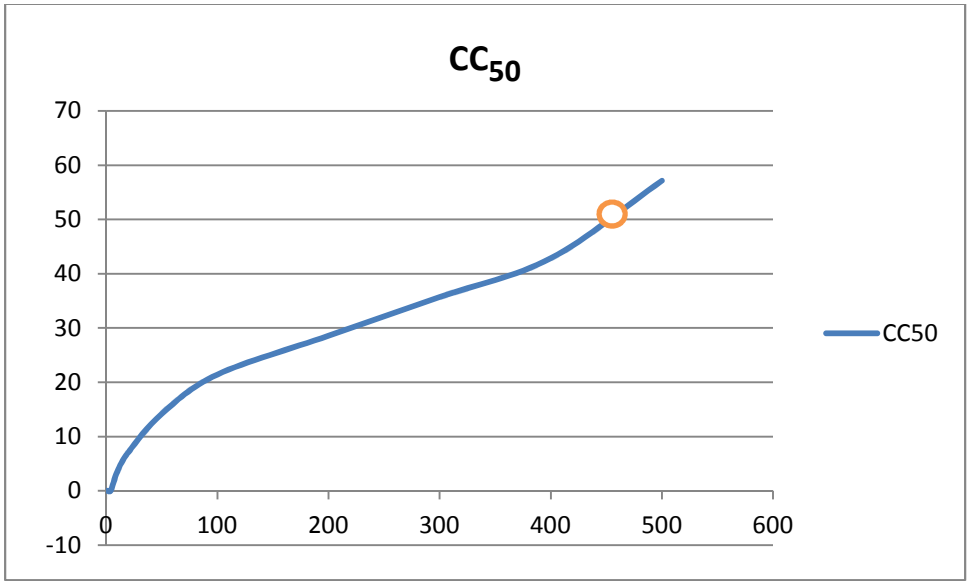
همان طور که نتایج نشان می دهد عصارهٔ دی اتیل اتری فصل دارای اثرات ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد ($CC_{۵۰}$) برابر **۳۲۵**µg/ml، و اثر ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد عصاره متانولی برابر **۳۶۴**µg/ml می باشد.

جدول ۴-۱۰- میزان IC_{50} عصاره های اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول های **MT-2**.

ماده موثر	درصد کشندگی (IC_{50})	ماده موثر	درصد کشندگی (IC_{50})
دی اتیل اتری µg/ml ۰ (شاهد منفی)	۰	متانول µg/ml ۰ (شاهد منفی)	۰
دی اتیل اتری ۱µg/ml	۰	متانول ۱ µg/ml	۰
دی اتیل اتری ۴µg/ml	-۳/۵۷	متانول ۴µg/ml	۰
دی اتیل اتری ۱۰µg/ml	۷/۱۰	متانول ۱۰µg/ml	۳/۵۷
دی اتیل اتری ۲۰ µg/ml	۷/۱۴	متانول ۲۰ µg/ml	۷/۱۴
دی اتیل اتری ۵۰µg/ml	۷/۱۴	متانول ۵۰µg/ml	۱۴/۲۹
دی اتیل اتری ۱۰۰µg/ml	۱۷/۸۶	متانول ۱۰۰µg/ml	۲۱/۴۳
دی اتیل اتری ۲۰۰µg/ml	۲۵	متانول ۲۰۰µg/ml	۲۸/۵۷
دی اتیل اتری ۳۰۰µg/ml	۳۲/۱۴	متانول ۳۰۰µg/ml	۳۵/۷۱
دی اتیل اتری ۴۰۰µg/ml	۳۹/۲۹	متانول ۴۰۰µg/ml	۴۲/۸۶
دی اتیل اتری ۵۰۰µg/ml	۵۰	متانول ۵۰۰ µg/ml	۵۷/۱۴



نمودار ۹.۴. تعیین میزان IC_{50} عصاره دی اتیل اتری اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول های **MT-2**.



نمودار ۴-۱۰. تعیین میزان IC_{50}عصاره متانولی اسفنج ***Dysidea pallescens*** روی سلول های **MT-2**.

همان طور که نتایج نشان می دهد عصارهٔ دی اتیل اتری فصل دارای اثرات ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد (IC_{50}) برابر 500µg/ml، و اثر ممانعت کنندگی از رشد پنجاه درصد عصاره متانولی برابر 475µg/ml می باشد.

همان طور که نتایج نشان می دهد عصارهٔ دی اتیل اتری فصل SI برابر 65/.، و عصاره متانولی برابر 1/30می باشد.

فصل پنجم

بحث

تا کنون ترکیبات بسیاری با خواص بیولوژیک از موجودات دریایی نظیر؛ مرجان ها، خرگوش دریایی، خیار دریایی، خارپوستان، آب فشان های دریایی، کوسه ها و ... استخراج شده است(Faulkner, 2001). بررسی های انجام شده در رابطه با متابولیت های ثانویه آبزیان نشان می دهد که بی مهرگان و در بین آن ها جانداران چسبیده به بستر[۴۷] به ویژه اسفنج ها بیشترین متابولیت های ثانویه با خواص دارویی را از خود ترشح می کنند(West *et al*., 2000). از آنجا که اسفنج ها توان جابجایی و مقابله با عوامل مهاجم را ندارند، لذا باید طوری عمل نمایند که بتواند در مقابل عوامل خارجی مانند باکتری ها، قارچ های و سایر پاتوژن ها مقاومت نماید، بنابراین آن ها با تولید متابولیت های ثانویه مجهز به یک سیستم ایمنی بسیار شگفت انگیز شده اند (Blunt *et al*., 2007)، که بشر امروزه از این ترکیبات شیمیایی استخراج و شناسایی شده از جانداران دریایی که شامل ترکیبات ساده و پیچیده شیمیایی هستند به عنوان ترکیبات دارویی استفاده می نماید.

اولین گزارش از استخراج ترکیبات دریایی در اوایل دهه ۱۹۵۰ منتشر شد و به دنبال آن بررسی در رابطه با فعالیت ها بیولوژیک متابولیت های ثانویه ادامه یافت، تعداد بسیار زیادی از این ترکیبات که دارای فعالیت های زیستی می باشند به اسفنج ها متعلق بوده و برخی از آن ها به عنوان ترکیبات دارویی انتخاب شده در حال سپری نمودن مراحل آزمایشی هستند(Faulkner, 2001 و Munro *et al*., 1999). در این پژوهش به شناسایی متابولیت های ثانویه محلول در دی

[47] sessile

اتیل اتر اسفنج *Dysidea pallescens* و بررسی خواص بیولوژیک عصاره های متانولی و دی اتیل اتری و آبی پرداخته شد، و در بررسی ها و مطالعات انجام شده مشخص گردید که تا کنون مطالعه ای در رابطه با بررسی ترکیبات و بررسی خواص خواص بیولوژیک این گونه از اسفنج انجام نشده است.

در کار حاضر شناسایی ترکیبات عصاره دی اتیل اتری اسفنج *Dysidea pallescens* با استفاده از GC-MS مشخص شد ترکیبات غیر قطبی شامل؛ ۷/۸۴ درصد آلکان ها، ۲۸/۴۲ درصد ویتامین ها، ۲۰/۵۶ درصد گلیکوزید قلبی، ۱۸/۶۳ درصد اسیدهای چرب غیر اشباع، ۲۹/۲۶ درصد کلسترول و ۲/۶۳ درصد استرها می باشد.

در مطالعه انجام شده که توسط رانی و سلوین در سال ۲۰۱۲ که روی شناسایی ترکیبات غیر قطبی و نیمه قطبی اسفنج گونه *Axinella donani* با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی انجام شد مشخص گردید که این ترکیبات شامل پنتادکان[۴۸] ، دودکان[۴۹]، ام دی ترت بوتیل بنزن[۵۰]، ۲، ۳، ۷- تری متیل دکان[۵۱]، ۵- ایزوبوتیل نونان[۵۲]، نونان[۵۳]، ۵-(۲-متیل پروپیل) اکتان[۵۴]، ۴- بوتیل-۲- متیل- دکان[۵۵]، ۳، ۷- دی متیل- دکان[۵۶]، اسید سولفروس[۵۷]، ۲- اتیل هگزیل ایزوهگزیل اتر[۵۸]، هپتادکان[۵۹]، ۳- اتیل- ۳ متیل دکان[۶۰]، نونادکان[۶۱] و تترادکان[۶۲] می باشند.

[48] Pentadecane
[49] Dodecane
[50] m- Di-tert-butylbenzene
[51] 2,3,7-Trimethyldecane
[52] 5-Isobutylnonane
[53] Nonane
[54] 5-(2-methylpropyl)- CAS) Octane
[55] 4-Butyl-2-methyl- decane
[56] 3,7-Dimethyl - Decane
[57] Sulfurous acid
[58] 2-ethylhexyl isohexyl ester
[59] Heptadecane
[60] 3-Ethyl-3-methyldecane
[61] Nonadecane
[62] Tetradecane

در مطالعه دیگری که در ارتباط با عصاره دی اتیل اتری اسفنج *Iophon laevistylus* از جزیره فارور در خلیج فارس انجام گردید مشخص شد که ۹۵٪ ترکیبات غیرقطبی موجود در این اسفنج به گروه ترپن ها[۶۳] و هیدارت های کربن متعلق می باشد و سایر ترکیبات در گروه اسیدهای چرب قرار می گیرند. بیشترین ترکیبات موجود در عصاره دی اتیل اتری نمونه مذکور تری دکان به مقدرا ۷/۷۶ درصد و نرمال تترادکان[۶۴] به مقدار ۷/۴۷ درصد گزارش شده است(Nazemi *et al*., 2010).

بررسی های فوق نشان می دهد که ترکیبات غیرقطبی و نیمه قطبی موجود در اسفنج ها شامل آلکان ها، الکل های چرب، اسید های چرب، ترپنوئیدها، هیدرات های کربن، ویتامین ها، استرها و ... می باشد، تحقیق انجام شده در این پروژه در رابطه با اسفنج *Dysidea pallescens* نیز نشان می دهد که ترکیبات موجود در عصاره دی اتیل اتری شامل آلکان ها ویتامین های دی، گلیکوزید قلبی، اسیدهای چرب و استرها می باشد.

بررسی آماری که در رابطه با متابولیت های ثانویه استخراج شده از گونه های مختلف اسفنج در نقاط مختلف دنیا انجام شد نشان می دهد که ترکیبات غیرقطبی موجود در آن ها به گروه ترپن ها و هیدرات های کربن به میزان ۵۰ درصد، اسیدهای چرب به میزان ۲۵٪ و مابقی این ترکیبات به گروه پلیکتیدها[۶۵]، آلکان ها و ... متعّلق می باشند. ترکیبات قطبی نیز در گروه های استری، آمیدی[۶۶]، اسیدی[۶۷]، کتونی[۶۸] و ... قرار می گیرند(Hann *et al*, 2007). در واقع این ترکیات شیمیایی از اسفنج ها دربرابر شکارچیان محافظت می کند، و سسب شده تا تعدادکمی از جانداران دریایی

[63] Terpenes
[64] n-Tetradecane
[65] Polketid
[66] Amid
[67] Acid
[68] Ketone

مانند؛ لاک پشت های منقاردار و برخی از ماهی های استخوانی از اسفنج ها تغذیه کنند، از طرف دیگر متابولیت های ثانویه از رشد باکتری ها، قارچ ها و انگل جلوگیری می نماید(Becerro *et al*, 1997 و Meylan, 1909).

نتایج آزمایش های انجام شده در این رابطه نشان می دهد که خواص بیولوژیک اسفنج ها بسیار گسترده بوده که در این میان می توان به مهم ترین آن ها که شامل؛ ضد ویروسی، سیتوتوکسیک، ضد تومور، ضد التهاب، ضد مالاریا، ضدباکتری، ضدقارچ و .... می باشد اشاره نمود(Carte, 1996 و Sipkema *et al.*,2005).

یکی از خواص بیولوژیک متداول موجود در ترکیبات طبیعی اسفنج ها، سیتوتوکسیک، است. قرار گرفتن بسیاری از موجودات زنده دریایی، مانند بنتوزها، برای ادامه حیات روی اسفنج ها مستقر می گردند از آنجا که اسفنج ها هیچ نوع مکانیسم دفاعی و فرار نداشته لذا در طی مسیر تکاملی و به منظور ادامه بقا تولید ترکیبات شیمیایی که خاصیت از بین بردن سلول های زنده را دارد ترشح نموده (Raveendran and Limna Mol, 2009).

به همین منظور در این تحقیق علمی این اثر بیولوژیک (سیتوتوکسیک) در رابطه با عصاره های دی اتیل اتری، متانولی و آبی اسفنج *Dysidea pallescens* با استفاده از روش XTT روی سلول های سرطانی اپیدرموید دهان انسان (KB/ C152) و لنفوسیتی (HUT-78/ C185) انجام گردید.

نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره دی اتیل اتری استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* در غلظت ۲۰۰µg/ml منجر به مرگ پنجاه درصد سلول های HUT-78 و در غلظت ۳۲۵µg/mlمنجر به مرگ پنجاه درصد سلول های KB شده است. عصاره های متانولی تهیه شده از اسفنج *Dysidea pallescens* در غلظت ۳۳۵ µg/ml منجر به مرگ پنجاه درصد سلول های HUT-78 و در غلظت ۳۷۵µg/ml منجر به مرگ پنجاه درصد سلول های KB شده است.

لازم به ذکر است که عصاره های آبی روی هیچ یک از سلول های سرطانی مورد بررسی اثر سیتوتوکسیک از خود نشان نداده است.

در بسیاری از مطالعات انجام شده که بر روی عصاره های استخراج شده از سایر اسفنج ها انجام شده است، غلظت های پایین خواص سیتوتوکسیک از خود نشان نداده اند. هرچند که گزارشی در رابطه با خواص سیتوتوکسیک اسفنج *Dysidea pallescens* به دست نیامده است، امّآ بررسی های انجام شده بر روی سایر نمونه ها نشان می دهد که درغلظت های پایین ترکیبات خالص استخراج شده از عصاره ها که مورد آزمایش قرار گرفته اند خواص سیتوتوکسیک را از خود نشان می دهند.

بر اساس آزمایش انجام شده که با استفاده از آزمون MTT assay روی سلول‌های کارسینوم اپیتلیوم دهانی انسان (KB) توسط عصاره های متانولی و دی اتیل اتری و آبی تهیه شده از اسفنج *Iophon sp.* اجرا شد، مشخص گردید که عصارهٔ متانولی دارای IC_{50} = ۱۷۵ µg/ml، عصاره دی اتیل اتری دارای IC_{50} = ۱۳۵ µg/ml می باشد، اما عصاره آبی اثر سیتوتوکسیک از خود نشان نمی دهد (ناظمی و همکاران، ۱۳۹۰).

بررسی خواص سیتوتوکسیک عصاره آبی- متانولی اسفنج های جمع آوری شده از پارک دریایی پدرا دی ریسکا دی میو[۶۹] برزیل روی سلول های سرطانی روده (HCT- 8)، خون (Hl-60)، سینه(MDA- MB435) و گلیوبلاستوما(SF-295) با استفاده از آزمون MTT نشان می دهد که عصاره اسفنج *Agelas clathrodes* و *Hyattella intestinalis* در غلظت µg/ml ۲۳/۴۶ و ۶۳/۳۶ روی سلول های گلیوبلاستوما، µg/ml ۵۸/۰۱ و ۳۷/۸۲ روی سلول های سرطان سینه، µg/ml ۴۸/۵۱ و ۱۶/۹۹ روی سلول های سرطانی خون و در غلظت µg/ml ۴۶/ ۸۵ و ۱۸/۹۷ روی سلول های سرطان روده منجر به مرگ ۵۰ درصد (IC_{50}) این سلول ها می گردد (Ferreira *et al.*, 2007).

[69] Pedra da Risca do Meio

به نظر می رسد ترکیب یا ترکیبات اصلی سیتوتوکسیک اسفنج *Dysidea pallescens* تهیه شده از جزیره هنگام از نوع غیرقطبی بوده که به میزان بیشتری در حلال دی اتیل اتری وارد شده است . با توجه به نتایج به دست آمده عصارهٔ دی اتیل اتری به میزان قابل توجّهی دارای مقادیر ترکیبات سیتوتوکسیک می باشد. نتایج فوق نشان می دهد که عصارهٔ دی اتیل اتری می تواند به عنوان داروهای ضد سرطانی استفاده شود و جهت مراحل آتی خالص سازی و تعیین ساختار ترکیب فعّال این عصاره و بررسی اثر آن برروی موجودات آزمایشگاهی انجام گردد.

یکی دیگر از خواص بیولوژیک موجود در اسفنج ها خواص ضدباکتریایی می باشد، به همین منظور در این تحقیق علمی این اثر بیولوژیک در رابطه با عصاره های دی اتیل اتری، متانولی و آبی اسفنج *Dysidea pallescens* با استفاده از روش براث انجام گردید. نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره دی اتیل اتری و متانولی استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* در غلظت 20 mg/ml اثر باکتریواستاتیک روی باکتری *Escherichia coli* از خود نشان می دهد اما اثر ثر باکتریوسیدی از خود نشان نداده است. عصاره آبی فصل تابستان و زمستان اسفنج *Dysidea pallescens* نسبت به باکتری اشرشیاکلای اثر ضدباکتریایی از خود نشان ندادند.

در آزمایشی که توسط داراه و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی باکتری *Escherichia coli* از عصاره خشک متانولی اسفنج *Haliclona* spp. انجام شد مشخص گردید که عصاره متانولی اثر ضدباکتریایی از خود روی باکتری اشرشیاکلای نشان نمی دهد.

آزمایشی که توسط تادس و همکاران روی عصاره های قطبی اسفنج های منطقه شمالی نروژ انجام شده نشان داد که عصاره استونیتریل که بیشترین قطبیت را داشت از اسفنج های *Geodia barretti*، *Haliclona spp. 1*، *Haliclona*

rosea، *Myxilla incrustans*، *Polymastia spp.* و *Alcyonium digitatum* هیچ گونه اثری روی باکتری اشرشیاکلای از خود نشان نمی دهد و تنها عصاره اسفنج *Haliclona spp. 2* در غلظت ۵mg/ml اثر باکتریواستاتیک از خود نشان داده است.

در آزمایش انجام شده روی عصاره های متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Iophon laevistylus* از جزیره فارور در خلیج فارس مشخص گردید که عصاره غیرقطبی در غلظت ۲ mg/ml و عصاره قطبی در غلظت ۱/۵ mg/ml از رشد باکتری اشرشیاکلای ممانعت به عمل نموده و هر دو عصاره در غلظت ۳mg/ml سبب مرگ باکتری مذکور می گردند(ناظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

یکی دیگر از باکتری های گرم منفی که مورد بررسی عصاره های آبی، متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Dysidea pallescens* قرار گرفت باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بود. همان طور که نتایج آزمایش ها نشان می دهند هیچ کدام از عصاره های فوق که روی باکتری مذکور اثر ضدباکتریایی از خود نشان نداده اند.

در آزمایشی که روی عصاره های اتانولی و کلروفرمی اسفنج های دریای سرخ از عمق ۱ تا ۲ متر با استفاده از روش دیسک با غلظت ۱۰۰ میکرولیتر در دیسک انجام گردید، نشان داده شد که عصاره کلروفرمی اسفنج های *Spongia officinalis* و *Hippospongia communis* تا فاصله ۴/۵۹ میلی متر، اسفنج *Cacospongia* spp. تا فاصله ۲/۰۴ میلی متر و اسفنج *Spongia zimocca* تا فاصله ۳/۴۵ میلی متر از رشد باکتری *P. aeruginosa* ممانعت می نماید، اما عصاره اتانولی هیچ گونه اثری از خود نشان نداده است(Gehan *et al*., 2009).

در تحقیقی که روی باکتری *P. aeruginosa* از عصاره خشک متانولی اسفنج *Haliclona* spp. جمع آوری شده از جزیره کرا در مالزی انجام شد مشخص گردید که عصاره متانولی اثر ضدباکتریایی از خود نشان نمی دهد(*et al*., 2011 .(Darah

آزمایش دیگری که از عصاره های متانولی، ان هگزانی و اتیل استاتی اسفنج های .*Gelliodes* spp، *Gelliodes nossibea*، *Ircinia echinata* و *Spheciospongia* spp.1 از خلیج نای بند خلیج فارس روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا انجام گردید هیچ کدام از عصاره های مذکور در غلظت 1mg/ disk ازخود اثر ضدباکتریایی نشان نداده اند اما عصاره های متانولی و ان- هگزانی اسفنج های *Spheciospongia* spp.*2* و*Spheciospongia inconstans* در غلظت یاد شده تا فاصله ۸/۴ میلی متر و عصاره اتیل استاتی در غلظت ۷/۴ و ۸/۴ میلی متر اثر ضدباکتریایی روی باکتری مورد آزمایش از خود نشان داده اند(Safaeian *et al*., 2009).

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره های آبی، متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Iophon laevistylus* از جزیره فارور واقع در خلیج فارس که توسط ناظمی و همکاران توسط روش براث روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا انجام شده بود، نشان داد که هیچ کدام از عصاره های مورد آزمایش خواص باکتریواستاتیک و باکتریوسید از خود نشان نمی دهند(Nazemi *et al*., 2010).

مطالعات انجام شده در رابطه با اثر ضدباکتریایی عصاره اسفنجی نسبت به باکتری سودوموناس آئروجینوزا نشان می دهد که این باکتری گرم منفی نسبت به عصاره های مورد آزمایش بسیار قوی عمل نموده به طوری که در موارد اندکی عصاره های مورد بررسی اثر ضدباکتریایی نسبت به این باکتری را از خود نشان می دهد. همان طور که در تحقیق انجام عصاره های تهیه شده اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیک روی باکتری *P. aeruginosa* از خود نشان نداده است.

در این تحقیق علمی اثر بیولوژیک ضد باکتری، عصاره های دی اتیل اتری، متانولی و آبی اسفنج *Dysidea pallescens* با استفاده از روش براث، روی باکتری های گرم مثبت *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* نیز انجام گردید. نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره دی اتیل اتری استخراج شده از این در غلظت mg/ml ۱۰ اثر

باکتریواستاتیک روی باکتری *Bacillus subtilis* از خود نشان می دهد و در غلظت mg/ml ۳۰ اثر باکتریوسیدی دارد. عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* روی باکتری گرم مثبت *Bacillus subtilis* انجام گردید، نشان داده شد که در غلظت mg/ml ۱۰ اثر باکتریواستاتیک از خود نشان می دهند اما اثر باکتریوسیدی از خود نشان نمی دهند.

بررسی عصاره های خشک استخراج شده از اسفنج *Iophon laevistylus* روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس که با استفاده ه از روش براث انجام گردید نشان می دهد که عصاره دی اتیل اتری در غلظت mg/ml۲ و عصاره متانولی در غلظت mg/ml۳ اثر باکتریواستاتیک را ایجاد نموده و اثر باکتریوسیدی این دو عصاره روی باکتری مذکور به میزان mg/ml۳ مشخّص شد، که نشان می دهد در باکتری *Bacillus subtilis* هر دو عصاره دی اتیل اتری و متانولی به یک میزان اثر کشندگی خود را القا نموده اند(Nazemi *et al*., 2010). نتایج این آزمایش بسیار نزدیک به تحقیق انجام شده از اسفنج *Dysidea pallescens* که عصاره های متانولی و دی اتیل اتری در یک غلظت اثر باکتریواستاتیک را ایجاد نموده اند، می باشد.

در تحقیق دیگری که به بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره متانولی و ان- هگزانی اسفنج های سواحل اسپرینگ[۷۰] استرالیا روی نمونه های؛ *Flavoparmelia rutidota*، *Steginoporella truncat*، *Dendrilla rosea* و *Parerythropodium membranecium* با استفاده از روش دیسک روی باکتری *B. subtilis* انجام گردید مشخص شده که بیشترین اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی مربوط به اسفنج گونه *F. rutidota* و سپس *S. truncat* و *D. rosea* می باشد در حالی که عصاره ان- هگزانی هیچ گونه اثر باکتریوسیدی را از خود نشان نداده است(Hann *et al*.,2005).

[70] Spring beach

در تحقیق دیگری که در رابطه با خواص ضدباکتریایی عصاره های خشک متانولی و دی کلرومتانی اسفنج های سواحل موروکان[۷۱] واقع در اقیانوس اطلس با استفاده از روش دیسک روی باکتری *B. subtilis* انجام گردید؛ مشخص شد که عصاره خشک متانولی اسفنج های *Haliclona mediterranea*، *Haplosclerida sp9*، *Cinachyrella tarentine*، *Ircinia oros*، *Cliona celata*، *Axinella polypoides*، *Haplosclerida spp*، *Haplosclerida sp3*، *Haplosclerida adocia* و *Cliona viridis* روی باکتری مورد آزمایش اثری نداشته است. در این آزمایش عصاره های خشک دی کلرومتانی اسفنج های *C. viridis*، *Haplosclerida sp3* و *H. viscosa* تا فاصله ۱۱ میلی متر، *H. adocia*، *A. polypoides*، *I. dendroides* و *C.celata*، *I. oros* تا فاصله ۸ میلی متر، *Haplosclerida sp4*، *I. spinulosa* و *H. mediterranea* تا فاصله ۷ میلی متر و *C. tarentine* تا فاصله 12 میلی متر و عصاره های خشک متانولی اسفنج های *I. spinulosa* تا فاصله 7 میلی متر، *I. dendroides* تا فاصله ۱۱ میلی متر و *H. viscosa* تا فاصله ۱۲ میلی متر از رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس جلوگیری نموده اند(*et al.*, Amraouia 2010).

باکتری گرم مثبت دیگری که در این تحقیق مورد مطالعه اثر ضدباکتریایی عصاره های دی اتیل اتری، متانولی و آبی اسفنج *Dysidea pallescens* قرار گرفت *Staphylococcus aureus* بود. نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره دی اتیل اتری استخراج شده از این اسفنج در در غلظت mg/ml ۲ اثر باکتریواستاتیک روی باکتری *S. aureus* از خود نشان می دهد و در غلظت mg/ml ۱۰ اثر باکتریوسیدی دارد. عصاره متانولی فصل تابستان استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* اثر باکتریواستاتیک و باکتریوسیدی از خود نشان نداده است.

[71] Moroccan

در آزمایشی که از عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *Dysidea* spp. با استفاده از روش دیسک انجام گردید مشخص شد که این عصاره تا فاصله ۷ میکرومتر روی باکتری *S. aureus* اثر مهار کننده از خود نشان داده است(Ciavatta *et al*., 2007).

بررسی عصاره های متانولی، آبی و دی اتیل اتری و متانولی استخراج شده از اسفنج *I. laevistylus* روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که عصاره متانولی با غلظت ۱/۵ mg/ml و عصاره دی اتیل اتری با غلظت ۳mg/ml اثر باکتریواستاتیکی از خود نشان می دهد، امّا عصاره های یاد شده هیچ گونه خواص باکتریوسیدی از خود نشان نداده اند(Nazemi *et al*., 2010).

در تحقیق دیگری که روی باکتری *S. aureus* با استفاده از روش براث از عصاره های هگزانی و دی کلرومتانی اسفنج های دریای آنادام تایلند انجام شده مشخص گردید که اسفنج های *Axinyssa* spp.، *Chondrosia reticulata*، *Chondrosia* spp.، *Gelliodes petrosiodes*، *Psammoclrma ramosum*، *Xestospongia* spp. ، *Halichondria* spp. و *Ircinia mutans* روی باکتری مورد آزمایش اثری از خود نشان نمی دهند اما عصاره هگزانی اسفنج های *Axinyssa* spp.، *Axinella* spp. و *Phakellia ventilabrum* در غلظت ۱۰µg/ml و اسفنج *Ptilocaulis* spp. در غلظت ۱۱µg/ml و *Sigmosceptrella* spp. در غلظت ۱۲µg/ml و عصاره دی کلرومتانی اسفنج های Oceanapia spp.، *Phkellia ventilabrum* و *Ptilocaulis* spp در غلظت ۱۰µg/ml و *Theonella* spp. در غلظت ۱۲µg/ml از رشد باکتری مورد آزمایش جلوگیری می نماید(Patchra, *et al*., 2010).

مطالعات انجام شده نشان می دهد که از سال ۱۹۰۷ تا دهه گذشته ۱۳۱ ترکیب از جانداران دریایی با اثر ضدباکتریایی شناسایی شده است که این تعداد ۵۲ درصد از مولکول های ضدعفونی کننده و ۱۴ درصد شامل ترکیبات

سنتز شده در سال ۲۰۰۰ را در بر می گیرد. در حالی که در دهه اخیر ۲۵۲ ترکیب استخراج شده از جانداران دریایی و ۷۳ ترکیب سنتز شده از آن ها با اثر ضد باکتریایی شناسایی شده است، ارقام فوق نشان دهنده اهمیت آبزیان دریایی در خواص ضد باکتریایی و ضد عفونی کننده ها می باشد(Mancini et al., 2007). آزمایش های انجام شده نشان می دهد که باکتری های گرم مثبت از باکتری های گرم منفی نسبت به ترکیبات طبیعی دریایی حساسیت بیشتری از خود نشان می دهند، مطالعات انجام شده توسط بورخولدر در سال ۱۹۶۸ که روی ۷۷۷ گونه از اسفنج های دریای کارایب انجام شده، نشان می دهد که ۳۷ درصد گونه های اسفنج اثر ضدباکتریایی در باکتری های گرم مثبت و ۱۵ درصد آن ها خواص ضدباکتریایی در باکتری های گرم منفی ایجاد می نمایند(Burkholder, 1968).

از نتایج آزمایش های انجام شده توسط سایر محققین و نتایج حاصل در این تحقیق که اثر ضدباکتریایی اسفنج *Dysidea pallescens* روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار داده است چنین برداشت می شود که اثر ضدباکتریایی عصاره های تهیه شده از این اسفنج مانند سایر اسفنج ها روی باکتری های گرم مثبت قوی تر عمل نموده (در غلظت پایین تر اثر نموده است) و از آنجا که باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری باسیلوس سوبتیلیس ضعیف تر می باشد عصاره دی اتیل اتری در غلظت پایین تری از رشد آن جلوگیری نموده است. اثر ضدباکتریایی عصاره های مورد آزمایش در باکتری های گرم منفی کمتر بوده است و تنها عصاره غیرقطبی دی اتیل اتری اثر ضدباکتریایی از خود نشان داده است.

از مقایسه نتایج اثر ضدباکتریایی عصاره های متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Dysidea pallescens* با داروهای آنتی بیوتیک آمپی سیلین و تتراسایکلین، به ویژه عصاره دی اتیل اتری و با توجه به اینکه عصاره در این آزمایش مورد

بررسی گرفته که حاوی ناخالصی های زیادی است، با تخلیص ماده مؤثره اسفنج *Dysidea pallescens* و انجام تحقیقات بیشتر، به ترکیبی با اثرات ضد باکتری قابل قبول و عوارض جانبی کم برای درمان عفونت های باکتریایی دست یافت.

یکی از خواص بیولوژیک موجود در اسفنج ها خواص ضدقارچ می باشد، به همین منظور در این تحقیق علمی این اثر بیولوژیک در رابطه با عصاره های دی اتیل اتری، متانولی و آبی اسفنج *Dysidea pallescens* با استفاده از روش براث روی قارچ *Aspergillus fumigatus* و مخمر *Candida albicans* انجام گردید. نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* در غلظت ۰/۵ mg/ml از رشد قارچ *A. fumigatus* جلوگیری نموده و در غلظت ۵ mg/ml سبب مرگ قارچ مذکور شده است. عصاره دی اتیل اتری استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* در هیچ کدام از غلظت های مورد بررسی از رشد قارچ ممانعت ننموده است.

در آزمایشی که با استفاده از عصاره های متانولی و کلروفنلی اسفنج جنس *Haliclona* spp. از سواحل صخره ای مالزی روی قارچ *A. fumigatus* انجام گردید مشخص شد که هیچ کدام از عصاره های مورد آزمایش از رشد قارچ جلوگیری نمی نمایند(Darah *et al*., 2011).

در تحقیق دیگری که از اثر ضدقارچ عصاره کلروفرم- متانولی اسفنج *Dysidea herbacea* با استفاده از روش براث روی قارچ آسپرژیلوس فوماگاتوس انجام گردید مشخص که در غلظت ۷/۸ µg/ml از رشد قارچ جلوگیری نموده و در غلظت ۱۵/۶۲ µg/ml سبب مرگ قارچ مورد آزمایش می گردد(Sionov *et al*., 2005).

در بررسی اثر ضدقارچ عصاره های آبی و کلروفرمی اسفنج گونه .*Callyspongia* spp از سواحل ماندابام[72] هند که با استفاده از روش دیسک روی سویه قارچ *Aspergillus niger* با غلظت های ۵mg/ml و ۱۰mg/ml انجام شد مشخص شد که هیچ کدام از عصاره های مورد آزمایش اثر ضدقارچی از خود نشان نداده اند(Dhanalakshmi *et al*., 2012).

همان طور که بررسی های انجام شده نشان می دهند بررسی خواص ضدقارچ عصاره های اسفنجی روی جنس آسپرژیلوس بسیار محدود می باشد، بسیاری از عصاره های اسفنجی از رشد این قارچ جلوگیری نمی نمایند و اثر ضد قارچ از خود نشان نمی دهند و آزمایش هایی که اثر ضدقارچ از خود نشان می دهند در غلظت های بالا موثر بوده اند اما عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* در غلظت ۰/۵mg/ml از رشد قارچ جلوگیری نموده و در غلظت mg/ml ۵ سبب مرگ قارچ شده است، که نشان می دهد این اسفنج دارای اثر ضدقارچ قوی است و می تواند به عنوان نمونه ای مناسب برای سایر آزمایش های تکمیلی معرفی گردد.

اثر ضد قارچ عصاره های دی اتیل اتری، متانولی و آبی اسفنج *Dysidea pallescens* با استفاده از روش براث روی مخمر *Candida albicans* نیز انجام گردید.

نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* در غلظت mg/ml ۰/۷۵ از رشد مخمر *C. albicans* جلوگیری نموده و در غلظت mg/ml ۱/۵ سبب مرگ مخمر مذکور شده است. عصاره دی اتیل اتری استخراج شده ۱ در غلظت mg/ml ۵۰ از رشد مخمر *C. albicans* جلوگیری نموده اما در هیچ کدام از غلظت های مورد بررسی سبب مرگ مخمر نشده است.

[72] Mandabam

اثر ضدقارچ عصاره های اسفنجی خلیج نای بند واقع در خلیج فارس روی گونه *C. albicans* با استفاده از روش دیسک مورد بررسی قرار گرفت، نتایج این آزمایش نشان داد که عصاره های متانولی، اتیل استاتی و ان- هگزانی *Gelliodes* spp. تا فاصله ۸/۴ میلی متر از رشد این مخمر جلوگیری نموده، عصاره متانولی اسفنج *Gelliodes nossibea* تا فاصله ۸/۴ میلی متر از رشد این مخمر جلوگیری نموده اما سایر عصاره های مورد آزمایش از این اسفنج هیچ گونه اثر ضدقارچی از خود نشان نداده است. عصاره های متانولی و اتیل استاتی اسفنج *Ircinia echinata* تا فاصله ۷/۴ میلی متر از رشد قارچ ممانعت نموده اما عصاره ان- هگزانی اسفنج مذکور هیچ گونه اثر ضدقارچ از خود نشان نداده است، همچنین در این آزمایش مشخص شد که هیچ کدام از عصاره های تهیه شده از اسفنج *Spheciospongia* spp.2 اثر ضدقارچ از خود نشان نمی دهند (Safaeian *et al*., 2009).

در تحقیق دیگری که در رابطه با خواص ضدقارچ عصاره های خشک متانولی و دی کلرومتانی اسفنج های سواحل موروکان واقع در اقیانوس اطلس با استفاده از روش دیسک با غلظت ۵ میلی گرم روی مخمر C. albicans انجام گردید؛ مشخص شد که هیچ کدام از عصاره های اسفنج های *Haplosclerida adocia*، *Haplosclerida spp.4*، *Haplosclerida spp.3*، *Axinella polypoides*، *Ircinia oros*، *Cliona celata*، *Cinachyrella tarentine*، *Haplosclerida spp.9*، *Ircinia spinulosa*، *Ircinia dendroides* و *Haliclona mediterranea* روی مخمر مورد آزمایش اثر ضدقارچ از خود نشان نداده است. عصاره دی کلرومتانی اسفنج *Cliona viridis* و *Haliclona viscosa* تا فاصله ۱۱ و ۱۰میلی متر و عصاره های متانولی اسفنج *Cinachyrella tarentine* تا فاصله ۱۴ میلی متر از رشد مخمر مذکور جلوگیری نموده اند(*et al.,* 2010 Amraouia).

مطالعاتی که تا کنون روی خواص ضدقارچ اسفنج ها انجام شده است نشان می دهد تعداد اندکی از اسفنج ها اثر ضدقارچ از خود نشان می دهند، بر اساس آزمایش های انجام شده توسط برخلودر در سال ۱۹۶۸ که به بررسی اثر ضدقارچ و مخمر عصاره های تهیه شده از ۷۷۷ گونه اسفنج پرداخته است مشخص شد که تنها ۱۰ درصد آن ها اثر ضد قارچ از خود نشان می دهند. در این میان اسفنج هایی که دارای تعداد بیشتری باکتری های همزیست هستند اثر ضدقارچ ضعیف تری از خود نشان می دهند(Amade *et al*., 1987).

یکی از خواص بیولوژیک موجود در اسفنج ها خواص ضدویروس می باشد، به همین منظور در این تحقیق علمی این اثر بیولوژیک در رابطه با عصاره های دی اتیل اتری ومتانولی اسفنج *Dysidea pallescens* با استفاده از روش XTT روی سلول های MT-2 آلوده به ویروس ایدز (HIV) انجام گردید. نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *Dysidea pallescens* در غلظت µg/ml ۴۷۵ و عصاره دی اتیل اتری در غلظت µg/ml ۵۰۰ از رشد ویروس جلوگیری نموده است.

بررسی های انجام شده در رابطه با خواص ضدویروس اسفنج ها روی ویروس عامل بیماری ایدز بیشتر شامل ترکیبات جداسازی شده؛ آوارول و آوارون استخراج شده از اسفنج Dysidea avara می باشد(Simone *et al*.,2005). به عنوان مثالر در آزمایش انجام شده توسط اسکوردر و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان داده شد که ترکیب آوارول در غلظت ۰.۳ تا ۰.۹ میکروگرم خاصیت ممانعت از رشد ویروس و کشندگی ویروس را موجب می گردد.

مطالعات انجام شده نشان می دهد عصاره های متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *Dysidea pallescens* از جزیره کیش دارای ترکیبات با اثرات بیولوژیک ضدقارچ، ضدباکتری، سیتوتوکسیک و ضدویروس می باشد و می تواند به

عنوان انتخاب مناسبی در شناسایی و جداسازی ترکیبات به منظور تولید داروهای آنتی بیوتیکی و ضدسرطان مورد استفاده قرار بگیرد. بنابراین میتوان با شناسایی و جداسازی این ترکیبات با ارزش در ضمن ایجاد جهش در صنت داروسازی از منابع طبیعی که امروزه بیشترین تمرکز روی ترکیبات دریایی است می توان گامی موثر در زمینه بهداشت، سلامت و اقتصاد کشور بر اساس و پایه علوم دریایی و شیلاتی برداشت. از آنجا که روند تولید دارو فرآیندی زمان بر و طولانی خواهد بود لذا هرچه زودتر در این زمنیه اقدامات و مطالعات اساسی انجام پذیرد هرچند که نتایج تمام آزمایش ها آن طور که مورد انتظار است نباشد اما حرکت اصلی به سمت تولید داروهای طبیعی که مطالعات نشان می دهند نسبت به ترکیبات شیمیایی در ضمن اثر درمانی بیشتر، موثرتر و ماندگار تر هستند عوارض کمتری را هم برای بیمار دارند برداشته خواهد شد. در ضمن آنکه از واردات ترکیبات موثره دارویی به کشور نیز ممانعت به عمل خواهد آمد.

فهرست منابع:

بلوچ، م، ۱۳۸۲، جانورشناسی ۱، جلد اول،تهران، دانشگاه پیام نور.

ناظمی، م، غرقی، الف، مطلبی، ع و خوشخو، ژ، ۱۳۸۹، سنجش میزان اثرات باکتریواستاتیکی و باکتریوسیدی عصاره‌های بیولوژیک اسفنج متعلق به گونه .Iophon sp. شانزدهمین کنگره دامپزشکی ایران.

ناظمی، م، احمدی، م، پیشه ورزاده، ف و احمد زاده، الف، ۱۳۹۰، بررسی خواص سیتوتوکسیک متابولیت های ثانویه اسفنج .*Iophon* spp. مجله علوم زیستی زنجان.

Amade, P.; Charroin, C.; Baby. C.; and Vacelet, J. 1987. Antimicrobial activities of marine sponges from the Mediterranean Sea. Marine biology. Vol 94(2), PP: 271-275.

Amraouia, B. El.;. Biardb, J. F.; Urizc, M.J.; Rifaia, S.; and Fassouane, A. 2010. Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts. Mycology Medical. Vol 20, PP 70- 74.

Andersson, D. L. 2003. Persistence of antibiotic resistent bacteria. Current Opinion Microbial. Vol 6, PP 452- 456.

Ankisetty, S.; Amsler, C.D.; McClintock, J.B.; Baker, B.J. 2004. Further membranolide diterpenes from the Antarctic sponge *Dendrilla membranosa*. Natural Products. Vol67, PP:1172–1174.

Barnes Robert D. 1987. Invertebrate Zoology, 5th edition. Saunders College Publishing, USA.

Becerro, M. A.; Turon, X.; and Uriz, M. J. 1997. Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. Chemical Ecology. Vol 23, PP: 1527–1547

Barrero, A.J.; Alvarez-Manzaneda, E.J.; Chahboun, R.; Cortes, M.; Armstrong, V. 1999. Synthesis and antitumoral activities of puupehedione and related compounds. Tetrahedron. Vol 55, PP: 15181–15191.

Bergmann, W.; Feeney, R. J. 1950. The Isolation of a New Thymidine Pentoside from Sponges. Chemistry. Vol 70, PP 2809-2810.

Blackburn, C.L.; Hopmann, C.; Sakowicz, R.; Berdelis, M.S.; Goldstein, L.S.B.; Faulkner, D.J. 1999. Adociasulfates 1–6, inhibitors of kinesin motor proteins from the sponge *Haliclona (aka Adocia) sp*. Organ Chemical. Vol 64, PP: 5565–5570.

Bligh. E. G. and Dyer. W. J. ۱۹۵۹. A rapid method of total lipid extraction, Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. Vol ۳۷, PP: ۹۱۱- ۹۱۷.

Blunt J. W.; Copp B. R.; Hu W. P.; Munro M. H.; Northcote P. T., and Prinsep M. R. 2007. Marine natural products. Natural Products. Vol 24, PP: 31-86.

Burkholder P. R. 1968. Antimicrobial substances from the sea. In: Freudenthal, H. D. (eds). Drugs From The Sea. Marine Technology Society. Washington, D. PP: 11- 87.

Bugni, T.S.; Singh, M.P.; Chen, L.;Arias, D.A.; Harper, M.K.; Greenstein, M.; Maiese, W.M.; Concepcion, G.P.; Mangalindan, G.C., and Ireland, C.M. 2004. Kalihinols from two *Acanthella cavernosa* sponges: inhibitors of bacterial folate biosynthesis. Tetrahedron. Vol 60, PP: 6981–6988.

Bulter. M. S. 2007. The role of natural product chemistry in drug discovery. Natural products. Vol 67, PP: 2141- 2153.

Campbell EM, Perez O, Melar M, and Hope TJ. 2007. Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell. Virology. Vol 360(2), PP: 286-93.

Carte, B.K. 1996. Biomedical potential of marine natural products. Bioscience. Vol46, PP: 271- 286.

Chanas Barian and Pawlik Joseph R. 1995. Defenses of Caribbean sponges against Predatory reef fish.II. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. Marine Ecology. Vol 127, PP: 71-86.

Chelossi, E.; Mancini, I.; Sepcic, K.; Turk, T. and Faimali, M. 2006. Comparative antibacterial activity of polymeric 3-alkylpyridinium salts isolated from the Mediterranean sponge *Reniera sarai* and their synthetic analogues. Biomolecular. Vol 23, PP: 317-323.

Choi H.; Demeke D.; Kang F.; 2003. Synthetic studies on the marine natural product halichondrins. Pure Application Chemistry. Vol 75, PP: :1–17.

Ciavatta, M. L.; Gresa, M. P. L.; Gavagnin, .; Ronero, V.; Melck, D.; Manzo, E.; Gue, Y. W.; Van soest, R.; and Cimio, G. 2007. Studies on puupehenone metabolites of *Dysidea sp*.: structure and biology activity. Tetrahedron. Vol 63, PP 1380- 1384.

Cohen, M. L. 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. Science. Vol 257, PP:1050-1055.

Cutignano, A., Bifulco, G., Bruno, I., Casapullo, A., Gomez- Paloma, L., Riccio, R. (2000) Dragmacidin F: a new antiviral bromoindole alkaloid from the Mediterranean sponge Halicortex sp. Tetrahedron. Vol 56, PP: 3743– 3748.

Dabydeen D.; Florence G.; Paterson I.; Hamel E. A. 2004. Quantitative evaluation of the effects of inhibitors of tubulin assembly on polymerization induced by discodermolide, epothilone B, and paclitaxel. Cancer Chemotherapy Pharmacology. Vol 53, PP:397–403.

D'Ambrosio, M.; Guerriero, A. and Pietra, F. 1987. Sacrodyctin A and Sacrodyctin B, novel dieterpenoic alcohols esterified by (E)- N(1)- methylurocanic acid. Isolation from the Mediterranean stolonifier *Sarcodictyon roseum.* Chemistary. Vol 70, PP: 2019- 2027.

Dannaoui, E.; Lortholary O, and Dromer,F. 2003. Technique des associations d'antifongiques in vitro et in vivo chez l'animal. Mycology Medical. Vol 13, PP: 73–85.

Darah, I.; Lim, C. L.; Nurul Aili, Z.; Nor Afifah, S.; and Shaida Fariza. S. 2011. Effects of methanolic extract of a soft sponge, *Haliclona sp.* on bacterial cells: structural degeneration study. International journal of comprehensive pharmacy. Vol 7 (3), PP: 1-6.

Dickson David P. and Wardrop Duncan J. 2010. Total Synthesis of (±)-Agelastatin A, A Potent Inhibitor of Osteopontin–Mediated Neoplastic Transformations. PubMed Central. Vo. 11, PP: 1341-1344.

Dhanalakshmi, J.; Biwott, F. K.; and Selvi, S. 2012. An invitro antimicrobial activity and bioactivities of Protein Isolated from Marine Sponge – *Callyspongia spp.* Research in Pharmacy. Vol 2(1), PP: 36-41.

Djura, P.; Stierle, D.B.; Sullivan, B.; Faulkner, D.J. 1980. Some metabolites of the marine sponges *Smenospongia aurea* and *Smenospongia (Polyfibrospongia) echina*. Organ Chemical. Vol 45, PP:1435–1441.

Endo, T.; Tsuda, M.; Okada, T.; Mitsuhashi, S.; Shima, H.; Kikuchi, K.; Mikami, Y.; Fromont, J. and Kobayashi, J. 2004. Nagelamides A–H, new dimeric bromopyrrole alkaloids from marine sponge Agelas species. Natural Products.Vol 67, PP: 1262–1267.

Endo, T.; Tsuda, M.; Fromont, J.; Kobayashi, J. 2007. Hyrtinadine A, a bis-indole alkaloid from a marine sponge. Natural Products. Vol 70, PP: 420- 423.

Erickson Karen L.; X Beutler Karen L.; Cardellina John H., Boyd Michael R. 1997. Salicylihalamides A and B, Novel Cytotoxic Macrolides from the Marine Sponge *Haliclona sp.* Organ Chemical. Vol 62, PP 8188- 8192.

Faulkner, D. J.; Harper, M.K., Haygood, M. G., Salomon, E., and Schmidt, E. W. 2000. Symbiotic bacteria in ponges: sources of bioactive substances. In: *N. Fusetani*, Editor, Drugs from the sea. PP:107–119.

Faulkner, D.J. (2001): Marine natural products. Natural Product Reports. Vol?, PP: 18:1-49.

Ferreira Elthon, G.; Wilke Diego, V.; Jimenez Paula, C.; Portela Tiago, A.; Silveira Edilberto, R.; Eduardo, H.; Cláudia, P.; Manoel, O. de Moraes.; and Letícia, V. (2007). Cytotoxic activity of hydroethanolic extracts of sponges (Porifera) collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park, Ceará State, Brazil. Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. Vol ?, PP: 313- 318.

Ford, P. W., Gustafson, K. R., McKee, T. C., Shigematsu, N., Maurizi, L. K., Pannell, L. K., Williams, D. E., De Silva, E. D., Lassota, P., Alien, T. M., Van Soest, R., Andersen, R. J., Boyd, M. R. (1999). Papuamides A–D, HIV-inhibitory and cytotoxic depsipeptides from the sponges Theonella mirabilis and Theonella swinhoei collected in Papua New Guinea. Chemical Science. Vol 121, PP: 5899–5909.

Gehan, M. A.; Hanan, A.; Hassan A. H.; and Okbah, M. A. 2009. Marine Natural Products and Their Potential Applications as Anti-Infective Agents. World Applied Sciences. Vol 7 (7), PP: 872-880.

Green, L.; Petersen, B.; and Steimel, L. 1994. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. Clinical Microbiology. Vol 32, PP: 1088-91.

Grube, A.; Assmann, M.; Lichte, E.; Sasse, F.; Pawlik, J.R. and Kock, M. 2007. Bioactive Metabolites from the Caribbean Sponge Aka coralliphagum. Natural Products. Vol 70, PP: 504-509.

Gul, W.; Hammond, N. L.; Yousaf, M.; Peng, J.; Holley, A. and Hamann, M.T. 2007. Chemical transformation and biological studies of marine sesquiterpene (S)-(+)-curcuphenol and its analogs. Biochim Biophys Acta. Vol 1770(11), PP: 1513- 1519.

Guittat Lionel, Cian Anne De, Rosu Frédéric, Gabelica Valérie, Pauw Edwin De, Delfourne Evelyne and x Mergny Evelyne. 2005. Ascididemin and meridine stabilise G-quadruplexes and inhibit telomerase in vitro. Biochimica and Biophysica Acta. Vol 1724, PP: 375- 384.

Hann Rebecca de, Nai Yi Hang Ryan, Poynter Samuel. 2007. Extraction and analysis of bioactive agents from Tasmanian marine organisms. Undergraduate science engineering and technology. Vol?. PP 1- 8.

Harold Neu. 1992. The crisis in antibiotic resistance. Science. Vol 257, PP:1064-1073.

Harvey, A. 2001. The continuing value of natural products to drug discovery. GIT Labratiry. Vol 5(6), PP: 284–285.

Hooper J.N.A. 2000. Guide to Sponge Collection and Identification, Queensland Meuseum. PP1-138.

Iwashima, M.; Terada, I.; Iguch, K.; Yamori, T. 2002. New biological active marine sesquiteroenoid and steroid from Okinawan sponge of genus *Axinyssa*. Chemical Pharmacology Bulletin. Vol 50, PP: 1286- 1289.

Jimeno, J.; Faircloth, G.; Fernández Sousa-Faro, J. M.; Scheuer, P. and Rinehart, K. 2004. New marine derived anticancer therapeutics- Ajouney from the sea to clinical trials. Marine Drugs. Vol 2, PP :14-29.

Jordan Mary Ann; Kamath Kathryn; X Manna Kathryn; Okouneva Tatiana; Miller Herbert P.; Davis Celia; Littlefield Celia and Wilson Leslie. 2011. The primary antimitotic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. Molecular Cancer Therapeutic. Vol 10, PP: 23-38.

Joseph B., and Sujatha S. 2011. Pharmacologically Important Natural products from Marine ponges. Natural Products. Vol 4, PP: 5-12.

Kijjoa, A., and Sawangwong, P. 2004. Drugs and cosmetics from the sea., Marine Drugs. Vol 2, PP: 73–82.

Kraljevic, S.; Sedic, M.; Scott, M.; Gehrig, P., Schlapbach R.; Pavelic, K. 2006. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: what can be seen from the proteomics point of view? Cancer Treatment Reviews. vol 32, PP: 619–629.

Liu, H.; Wang, G.; Namikoshi, M.; Kobayashi, H.; Yao, X.; Cai, G. 2006. Sesquiterpene quinones from a marine sponge *Hippospongia sp.* that inhibit maturation of starfish oocytes and induce cellcycle arrest with HepG2 cells. Pharmcology. Vol 44, PP:522–527.

Liu J.; Towle M. J.; Cheng H.; Saxton P.; Reardon C.; Wu J.; Murphy E. A.; Kuznetsov G.; Johannes C. W.; Tremblay M. R.; Zhao H.; Pesant M.; Fang F. G.; Vermeulen M. W.; Gallagher BM Jr. , and Littlefield B. A. 2007. In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic (-)-laulimalide, a marine natural product microtubule stabilizing agent. Anticancer research. Vol 27, PP: 1509- 1518.

Mancini, I.; Defant, A.; and Guella, G. 2007. Recent Synthesis of Marine Natural Products with Antibacterial Activities. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry. Vol 17, PP: 17-47.

Meylan, A. 1990. Nutritional characteristics of the sponges in the diet of the hawksbill turtle, In: new Perspectives in Sponge Biology, Ru¨ tzler K, ed. Washington, DC: Smithsonian, Institution Press. PP: 472–477.

Motti, C.A.; Bourguet-Kondracki, M.-L.; Longeon, A.; Doyle, J.R.; Llewellyn, L.E.; Tapiolas, D.M.; Yin, P. 2007. Comparison of biological properties of several marine sponge-derived sesquiterpenoid quinines. Molecules. Vol 12, PP: 1376–1388.

Muller, W. E. G., Zahn, R. K., Kurelec, B., Lucu, C., Muller, I., Uhlenbruck, G. (1981). Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. Bacterial. Vol, 145, PP: 548–558

Muller, W.E.; Grebenjuk, W.E.; Le Pennec, G.; Schroeder, H.; Brummer, F., and Hentschel, I. 2004. Sustainable production of bioactive compounds by sponges-cell culture and gene cluster approach: a review. Marine Biotechnology. Vol 6, PP:105–117.

Munro, M. H. G.; Blunt, J. W., Dumdei. E. J.; Hickford, S. J. H.; Lill, R. E.; Li, S.; Battershill, C. N.; Duckworth, A. R. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. Biotechnology. Vol 70, PP: 15-25.

Nazemi, M.; Khoshkhoo, Z.; Motalebi, A.; Karimi, F. H.; and Pishehvarzad, F. 2010. Identification nonpolar component and antibacterial activities of *Iophon laevistylus* from Persian Gulf. International Journal of Environmental Science and Development. Vol 1, PP 107- 110.

Newman, D.J. and Cragg, G.M. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. Journal Natural Products. Vol 67, PP: 1216–1238.

Osinga, R.; Beukelaer, P.B.; Meijer, E.M. 1999a. Marine bioprocess engineering: from ocean to industry. Trends Biotechnol. Vol 17, PP: 303–304.

Patchra, P.; Wanlapa, M.; Venna, N.; and Udomska, D. 2010. Biological activites of extracts from Anadam Sea sponges, Thailand. EurAsian Journal of Bioscience. Vol 4, PP:l 63- 69.

Piel, A. J. 2006. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate- derived pharmaceuticals. Medical Chemistry . Vol 13, PP: 39–50.

Pomponi, S. A. 1999. Sponge as drugs. Biotechnology. Vol 70, PP: 5–13.

Rani Juneius, C. E.; and Selvin, J. 2012. *Axinella donani* : A marine sponge, as potential source of Therapeutic compounds. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. Vol 2(1), PP: 223- 234.

Raveendran, T.V., and Limna Mol, V.P. 2009. Natural product antifoulants. Science. Vol 97, PP 508–520.

Raviña, E. 2010. The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs; Wiley-WCH: Weinheim, Germany.

Remiszewski S.W. 2003. The discovery of NVP-LAQ824: from concept to clinic. Current Medical Chemistary. Vol 10, PP:2393–402.

Rezaei A, Zabihollahi R, Salehi M, Moghim Sh, Tamizifar H ,Yazdanpanahi N and Amini G. 2007. esigning a non-virulent HIV-1 strain: potential implications for vaccine and experimental research. J Research in Medical Sciences. 12(5):227-234.

Richman, S., Loya, Y., and Slobodkin, L. B. (1975). The rate of mucus production by corals and its assimilation by the coral reef copepod *Acartia negligens.* Limnology oceanography. Vol 20, PP: 918- 923.

Roehm, N. W.; Rodgers, G. H.; Glasebrook, A. L.; and Hatfield, S. M. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. Immunology Methods. Vol 142(2), PP: 257-265.

Rosenblatt JE 1991. Laboratory Tests Used to Guide Antimicrobial Therapy. Mayo Clin Proc. Vol 66, PP 942-948.

Safaeian, S.; Hosseini, H.; Abbas Pour Asadolah A.; and Farmohamadi, F. 2009. Antimicrobial activity of marine sponge extracts of offshore zone from Nay Band Bay, Iran. de Mycologie Médicale. Vol 19, PP: 11-16.

Salomon Christine E.; Magarvey Nathan A., and Sherman David H. 2004. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. Natural Products. Vol 21, PP: 105- 121.

Sigmandur Gudbjarnason. 1999. Bioactive marine natural products. Rit Fiskideildar. Vol 16, PP 107-110.

Simone M.; Erba E, Damia G, Vikhanskaya F, Di Francesco AM, Riccardi R, Bailly C, Cuevas C, Fernandez Sousa-Faro JM, D'Incalci M. 2005. Variolin B and its derivate deoxy-variolin B: new marine natural compounds with cyclin-dependent kinase inhibitor activity. Cancer. Vol 41, PP: 2366- 2377.

Sipkema Detmer; Maurice C.R.; Franssen, Ronald Osinga, and Johannes Tramper. 2005. Marine Sponges as Pharmacy. Marine Biotechnology. Vol 7, PP 142-162.

Sionov, E.; Dalit, R.; Sandovsky-Losica, H.; Kashman, Y.; Rudi, A.; Liat, R.; and Segal, R. 2005. Antifungal effect and possible mode of activity of a compound from the marine sponge *Dysidea Herbacea*. Journal of Infection. Vol 50, PP: 453- 460.

Su, J.Y.; Meng, Y.H.; Zeng, L.M., Fu, X.; Schmitz, F.J. 1994. Stellettin A, a new triterpenoid pigment from the marine sponge Stelletta tenuis. Natural Products. Vol 57, PP:1450–1451.

Tadesse, M.; Gulliksen, B.; Strøm, B.C.; Styrvold, O. B.; and Haug, T. 2008. Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic. Invertebrate pathology. Vol 99(3), PP:286-93.

Thakur Narsinh, L.; Thakur Archana, N., and Muller Warner, E. 2005. Marine natural products In drug discovery. Natural Products Radiance. Vol 4, PP: 471-477.

Timm, C.; Volk, C.; Sasse, F., and Köck, M. 2008. The first cyclic monomeric 3-alkylpyridinium alkaloid from natural sources: identification, synthesis, and biological activity. Bimolecular Chemical .Vol 6, PP: 4036–4040.

Takahashi, Y.; Ushio, M.; Kubota, T.; Yamamoto, S.; Fromont, J.; Kobayashi, J. 2010. Nakijiquinones J–R, Sesquiterpenoid quinones with an qmine residue from Okinawan marine sponges. Natural Products. Vol *73*, PP:467–471

Tincu, J. A., and Steven, W. 2004. Antimicrob. Agents Chemoth. Vol 48, PP: 3645- 3654.

Torres, Y.R.; Berlink, R.G.S.; Nascimento, G.G.F.; Fortier, S.C.; Pessoa, C. and Moraes, M.O. 2002. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge Arenosclera brasiliensis. Toxicon. Vol 40(7), PP: 885-891.

Wahl, M.; Jensen, P.R., and Fenical, W. 1994. Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians, Marine Ecology. Vol 110, PP: 45–57.

Wellington, K. D., Cambie, R. C., Rutledge, P. S., Bergquist, P. R. (2000). Chemistry of sponges. Novel bioactive metabolites from *Hamigera tarangaensis*. Natural Products. Vol 63, PP: 79–85.

Warabi Kaoru; Matsunaga Shigeki; Van Soest Rob W. M., and Nobuhiro Fusetani. 2003. Dictyodendrins A–E, the First Telomerase-Inhibitory Marine Natural Products from the Sponge Dictyodendrilla verongiformis. Organ Chemistry. Vol 68, PP: 2765- 2770.

West, L.M.; Northcote, P.T.; and Hood, K.A. (2000). Mycalamide D, a new cytotoxic amide from the New Zealand marine sponge *Mycale* species. Natural Products. Vol 63, PP:707–709.

Yang, S.W.; Buivich, A.; Chan, T.M.; Smith, M.; Lachowicz, J.; Pomponi, S.A.; Wright, A.E.; Mierzwa, R.; Patel, M.; Gullo, V., and Chu, M. 2003. A new sterol sulfate, Sch 572423, from a marine sponge, *Topsentia sp*. Bioorganic Medical Chemistry. Vol13, PP: 1791–1794.

Zaro, B. A. 1982. Marine sponges: a source of novel antibiotics,.roceedings of the Western Pharmacological Society. Vol 25, PP: 11–13.

Zhang, W.; Zhang, X.; Cao, J., and Zhao, Xu. Q. 2003. Optimizing the formation of in vitro sponge primmorphs from the Chinese sponge *Stylotella agminata*. Biotechnology. Vol 100, PP: 161–168.

Abstract

Sponges are the most primitive of the multicellular, These organisms don't have any mechanical defense system, so their early appearance in evolution has given them alot of time for the development of advanced secondary metabolites as chemical defense system. Sponges have the potential to provide drugs from chemical components against diseases. In this investigation the sponge samples, which it is *Dysidea* spp. **,** were collected at depth of 15- 20 meter, from locations on the coastline of Island Hengam in Persian Gulf of Iran. For identifying natural components, methanolic and diethyletter were used as extraction solvents, after removal of the solvents, the GC/MS spectra of the fraction were obtained. Then in vitro cytotoxic, antimicrobial, antifungal and antiviral activities were identified.

In vitro cytotoxity screening, by XTT assay, against KB/ C152 and HUT-78/ C185 cell line, was conducted in this study in 1 - 500 µg/ml . IC50 for diethyletter and methanolic extract was 200 µg/ml in HUT-78 , IC50 for diethyletter extract was 325µg/ml and methanolic extract 325µg/ml in KB.

In vitro antimicrobial activity by Broth Dilution Methods against clinical gram-positives and gram negatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*، *subtilis Bacillus*). The results conducted that the MIC values of methanol and diethyletter extract for *Escherichia coli* 20mg/ml, *Bacillus subtilis* 10mg/ml and 2mg/ml for *Staphylococcus aureus*. The MBC values of the diethyletter extracts for *Bacillus subtilis* 30 mg/ml) and *S. aureus aureus* 10mg/ml.

In vitro antifungal activity by Broth Dilution Methods against clinical pathogens; *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. The results conducted that the aqueous extracts didn't have any antifungal activities on pathogens, minimum inhibitor concentrations (MIC) of the diethyletter extract on *C. albicans* 0/75mg/ml, MFC 5 mg/ml and methanolic extract ۰/۵ mg/ml and MFC 5 mg/ml on *A. fumigatus*

In vitro antiviral activities by XTT assay against MT-2 cell line. The results conducted that IC50 for diethyletter extract 500µg/ml and methanolic extract 475 µg/ml.

Keywords: Sponge, cytotoxic, antimicrobial, antifungal, antiviral, methanolic extract, diethyletter extract, Hengam Island, Persian Gulf.