

مطالعه اثر سیتوتوکسیک عصاره متانولی از تانتاکلهای شقایق موکتی از خلیج فارس بر روی رده سلول های سرطان کولون و مغز انسان در شرایط آزمایشگاهی

Department
of Marine
Biology,
Faculty of
Marine
Sciences and
Technologies
, Science and
Research
Branch,
Islamic Azad
University.
Tehran, Iran

گروه بیولوژی
دریا، دانشکده
علوم وفنون
122 دریایی، دانشگاه
02 علوم و تحقیقات ،
دانشگاه آزاد.
تهران

Moghadasi
, Ziba

550 دانشجو سای ziba_mg2000@yahoo.co
122 ی دکتر ا m
02

مقدسی
1 ،*، زیبا

چکیده:

شقایق موکتی *Stichodactyla haddoni* یک جانور ثابت و ساکن اقیانوس است. زهر شقایق های دریایی می توانند دارای یک منبع قوی از ترکیبات فعال دارویی باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر کشندگی سم خام جدا شده از شقایق دریایی *S. haddoni* از خلیج فارس بر روی میزان مرگ و میر رده های سلولی سرطانی مغز و کولون با استفاده از نمک تترازولیوم در شرایط آزمایشگاهی بود. نمونه های شقایق دریایی از جزیره لارک خلیج فارس از جنوب ایران صید شدند. عصاره گیری متانولی از تانتاکل ها انجام شد. سلولهای سرطانی با غلظتهای مختلف زهر خام به دست آمده از 0/78 - 100 میکروگرم به صورت رقیق سازی در طی زمان 24 ساعت در معرض قرار گرفتند. نتایج آنالیز آماری نشان داد فعالیت ضد سرطانی عصاره روی رده های سلولهای سرطانی تقریباً در همه دوزها فعالیتی مشابه به همدیگر داشتند $Pvalue < 0/001$ زهر خام ، مرگ و میر بیشتری روی سلولهای سرطانی مغز نسبت به سلولهای کولون ایجاد کرد. نتیجه IC50 غلظتهای مختلف زهر خام بر روی رده های سلولی مغز و کولون به ترتیب $(6/58 \mu g, 31/54)$ به دست آمد. پس زهر خام *S. haddoni* می تواند به عنوان یک عامل شیمیایی و جلوگیری کننده ی قوی رشد برای رده های سلولی بخصوص سرطان مغز مطرح باشد.

کلید واژه: *Stichodactyla haddoni* ، اثر سیتوتوکسیک ، سم خام ، حیوانات زهری دریایی .

مقدمه:

سموم تولید شده توسط موجودات آبی می توانند حاوی منابع قوی از مواد فعال باشند که می توان از آنها برای کاربردهای درمانی و پیشرفت داروهای جدید با منشأ طبیعی استفاده کرد. نتایج مطالعه آنها در این چارچوب در سه یا چهار دهه گذشته نشان دادند که هنوز مکانیسمهای عملکردی آنها ناشناخته باقی مانده و تحت بررسی می باشد (Morabito و همکاران، 2012). در طی دهه های گذشته مکانیسم های آسیب سلولی زهر مرجانیان مورد ارزیابی قرار گرفته و برای بررسی بیشتر این ترکیبات پارامترهای اساسی مانند بقاء سلولی ، عملکرد متابولیسم و مکانیسمهای عملکردی آنها مورد آزمایش قرار گرفتند. (Mariottini و Pane، 2014) . نتایج مطالعات سیتوتوکسیسیتهی زهر مرجانیان در طی دهها قرن فعالیت قوی و مهار کنندگی و در نهایت مرگ سلولی را در برابر سلولهای سرطانی تأیید می کنند که ما را برای استفاده از غلظتهای مناسب زهر برای تولید و پیشرفت داروهای شیمی درمانی (کاهش دادن دوز مصرفی و عوارض جانبی آنها) در درمان

سرطانها هدایت می کند (Soletti و همکاران، 2008). یکسری از داروهای ضد سرطانی مانند Cytarabine, Yondelis, Adcetris, Vidarabin, مثالهای قابل توجه و موفق از داروهای مشتق شده از جانوران مهره دار و بی مهره دریایی هستند که به طور رایج در بازار خریداری می شوند.

شقایق های دریایی متعلق به شاخه مرجانیان و رده آنتوزوا است. این جانوران ترکیبات پیچیده ای از سمهای پروتئینی برای دفاع و گرفتن شکار تولید می کنند که این سمها نتیجه تولیدات ترشحاتی ساخته شده در دستگاه گلژی سلولهای تخصص یافته کیسولی به نام نماتوسیستها می باشند. نماتوسیستها دارای یک رشته مارپیچ، پیچیده و محکم هستند که توسط محرکهای شیمیایی و فیزیکی به درون شکار یا افراد مهاجم تزریق می شود (Ramezani و همکاران، 2012). شقایق های دریایی می توانند سموم سیتو توکسیک مختلفی تولید کنند. مطالعات زیادی نشان داده اند که این پروتئینها دارای فعالیت قوی سیتو توکسیک در برابر سلولهای سرطانی انسان هستند.

اخیراً رمضان پور و همکارانش در سال 2012 اثرات ضد سرطانی زهر شقایق های دریایی *H. magnifica*, *E. quadricolor*, *C. adhaesivum*

H. malu و *H. crispa* در برابر سه ردیف های سلولی سرطانی را گزارش کردند (Ramezani و همکاران، 2012). Monroy-Estrada و همکارانش در سال 2013 اثرات سینیرژیک فراکشنهای جدا شده از شقایق دریایی *Bunodeopsis globulifera* روی سلولهای سرطانی آدنوکارسینومای شش انسان را ثابت کردند (Monroy-Estrada و همکاران، 2013). Soletti و همکارانش در سال 2008 نشان دادند که سیتولایزینها ی مشتق شده از شقایق های دریایی سمیت القا شده توسط دوزهای پایین داروهای شیمیوتراپی را 10 تا 300 برابر افزایش می دهد. (Soletti و همکاران، 2008). برای مطالعه حاضر از میان حیوانات زهری خلیج فارس شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* از خانواده Stichodactylidae برای جستجوی خواص ضد سرطانی بر روی دو رده سلولی سرطان انسان شامل مغز (U87mg) و کولون (SW948) انتخاب شد که می تواند یک منبع قوی از ترکیبات دارویی فعال باشد. بنابر این مطالعه بیشتر در باره این ترکیبات از آن جهت ضرورت پیدا می کنند که می توان برای طراحی داروهای ضد سرطان جدید از آنها استفاده کرد.

مواد و روشها

تهیه نمونه:

نمونه های شقایق دریایی از آبهای خلیج فارس از عمق 20 متری جزیره لارک در خلیج فارس از جنوب ایران صید شد. نمونه در دمای 20- نگه داری شد و به آزمایشگاه ونوم در انیستیتو پاستور ایران انتقال داده شد.



Stichodactyla haddoni
از جزیره لارک در خلیج

شکل 1. A :
جمع آوری شده
فارس، B : تانتاکلها

آماده سازی نمونه و عصاره گیری:

در ابتدا نمونه منجمد شده در دمای اتاق خوب شد و ماده مخاطی ترشح شده بر روی سطح دهانی آن پاک گردید. تانتاکل ها توسط یک اسکالپل استریل به قطعات کوچک خرد شدند و برای عصاره گیری آماده گردیدند. به عصاره گیری 34 میلی لیتر از محلول متانولی 5٪ به 6/16 گرم از تانتاکل ها ی جدا شده اضافه شده و با یک همزن مخلوط شدند. مخلوط به دست آمده در دمای 4 درجه برای 24 ساعت انکوبه شد. مخلوط در دور 12000 برای 10 دقیقه سانتریفوژ (Sigma 1-14, Germany) گردید. سوپرناتانت در دستگاه فریز درایر (Alpha 1-2, LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen Co., Germany) در انجماد خشک شد. پودر به دست آمده با آب مقطر تزریقی استریل حل گردید. استوک محلول در دمای 70- نگه داری شد.

سنجش پروتئین :

غلظت پروتئین سم خام به دست آمده توسط روش بیسینکونینیک اسید (BCA) مطابق با دستورالعمل کیت خریداری شده (iNtRON Biotechnology Co. South Korea) اندازه گیری شد. این روش بر تبدیل CU^{+2} به CU^{+} در شرایط بازی استوار می باشد. این واکنش منجر به ایجاد رنگ بنفش تیره با حداکثر جذب در طول موج 562 نانومتر می گردد (Smith, 1985).

:SDS –PAGE

برای تعیین پروفایل پروتئینی زهر خام از روش سدیم دو دسیل آکریل آمید ژل الکتروفورزیس (SDS-PAGE) مطابق با روش استاندارد Laemmli در سال 1970 استفاده شد (Laemmli, 1970). زهر خام به داخل ژل پلی آکریل آمید 12٪ تزریق و با رنگ کوماسی بریلینت بلو رنگ آمیزی شد. برای تعیین وزن مولکولی از یک پروتئین مارکر (8-250 کیلو دالتون) استفاده شد.

کشت سلول:

رده های سلولی سرطان کولون (SW948) و مغز (U87mg) از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید. رده های سلولی در محیط کشت کامل RPMI 1640 (Gibco Company, USA) ، FBS 10٪ (Gibco Company, USA) و 1٪ پنی سیلین/ استرپتومایسین در فلاسکهای کشت سلول پاساژ داده شدند. فلاسکهای پاساژ داده شده در انکوباتور با دمای 37 درجه و 5٪ CO_2 و 80٪ رطوبت انکوبه شدند.

روش سیتوتوکسیسیته:

در این آزمون مبنای سنجش براساس معرض گذاری عصاره با غلظت های مختلف در مجاورت رده سلولی و سنجش تعداد سلول های مرده می باشد. بدین منظور از روش MTT و ایجاد کریستال های بنفش رنگ نامحلول فورمازان استفاده شد (Mosmann, 1983). به همین دلیل در مرحله نخست برای سنجش درصد سلول های زنده برای کنترل تعداد سلول های انتقال یافته شده به پلیت ها از روش تریپان بلو استفاده گردید. سلول ها به تعداد 1×10^4 در چاهک پلیت های 96 خانه ای در 10 میکرولیتر محیط کشت کامل منتقل شدند. بعد از 24 ساعت انکوباسیون (دمای 37 درجه و 5٪ CO_2) 100 میکرولیتر محیط کشت کامل تازه در هر چاهک ریخته شد. سلولها با غلظتهای مختلف زهر خام از 0/78-100 میکروگرم به صورت رقیق سازی در 100 میکرولیتر محیط کشت در طی زمان 24 ساعت معرض قرار گرفتند.

غلظت صفر به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از به اتمام رسیدن زمان انکوباسیون، محلول رویی سلول ها را دور ریخته و به هر چاهک 100 میکرولیتر MTT 10٪ (5 میلی گرم بر میلی لیتر در بافر فسفات) می ریزیم و به مدت 4 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه شد و پس از برداشتن محلول رویی 100 میکرولیتر الکل ایزوپروپانل اضافه گردید. پلیت ها در دمای اتاق به مدت 10 دقیقه در تاریکی شیکر شدند. جذب آنها در طول موج 570 نانومتر در دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. درصد مرگ و میر با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مرگ} = \left[1 - \left(\frac{\text{میانگین OD تست}}{\text{میانگین OD کنترل}} \right) \times 100 \right]$$

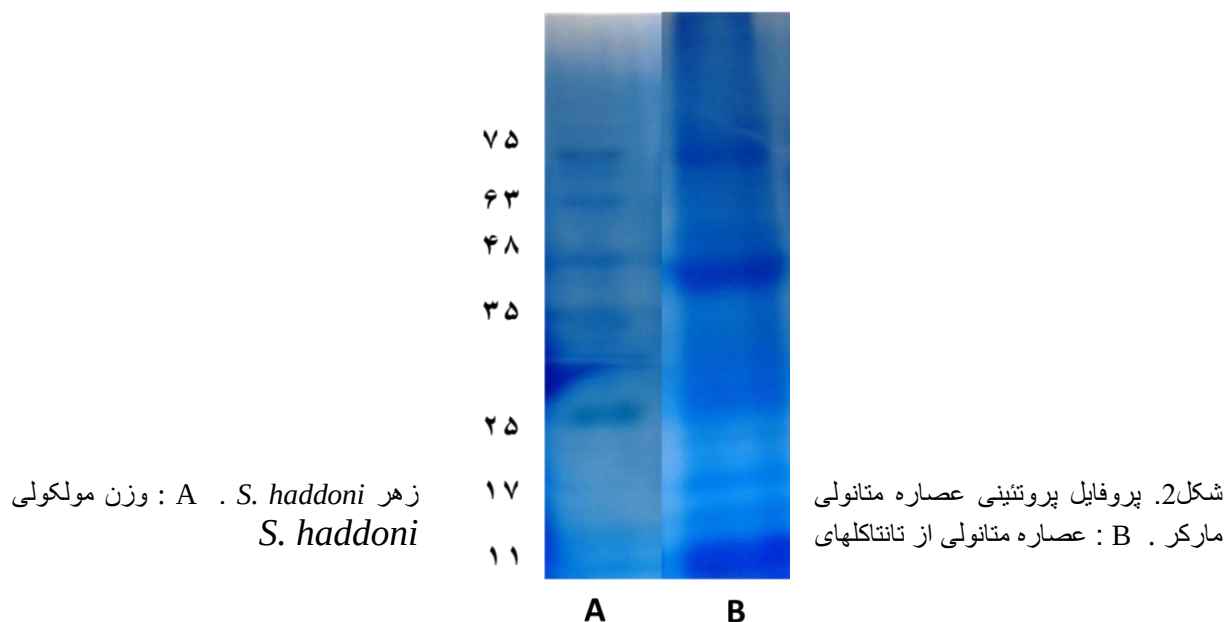
نتایج:

سنجش پروتئین :

میزان جذب نوری مربوط به زهر با نمودار استاندارد مقایسه گردید و تعیین مقدار شد. غلظت زهر استخراج شده با استفاده از کیت BCA ، 8 میکروگرم در میکرولیتر به دست آمد.

:SDS –PAGE

نتیجه SDS-PAGE 5 باند جداگانه واضح نشان داد و وزن مولکولی پروتئین مشاهده شده به طور تقریبی از 11 تا 75 کیلودالتون مشاهده گردید (شکل 2).

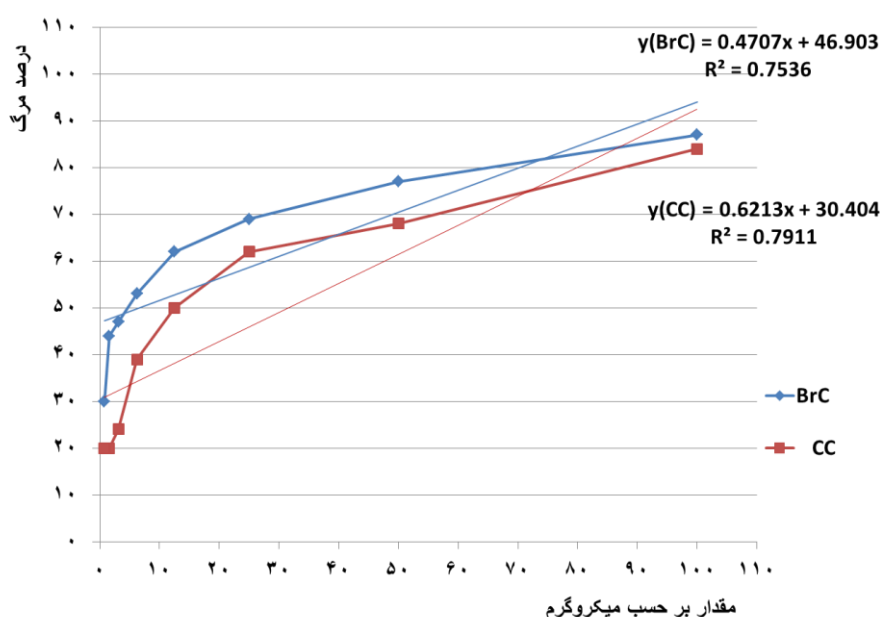


خام در برابر سلول های

ارزیابی فعالیت ضد سرطانی عصاره

سرطانی:

آنالیز واریانس برای فعالیت ضد سرطانی زهر خام روی ردیف سلولی های سرطان مغز (BrC) و کولون (CC) نشان داد که تقریباً در همه دوزها فعالیتی مشابه به همدیگر داشتند $P < 0/001$. مقایسه فعالیت های ضد سرطانی زهر خام بین ردیف سلولی های BrC و CC با آزمون دو طرفه t-test ($P \text{ value} < 0/002$) اختلاف معنی داری را نشان داد. زهر خام، مرگ و میر بیشتری روی سلول های سرطانی BrC نسبت به سلول های CC ایجاد کرد. بر اساس آنالیز رگرسیون خطی، مقایسه دو به دو فعالیت ضد سرطانی زهر خام بین ردیف های سلولی BrC و CC ارتباط معنی داری را نشان داد ($R^2 = 0/944$). این نتیجه یک مکانیسم مرگ و میر مشابه مشخص میکند. آنالیز رگرسیون خطی ارتباط معنی داری بین فعالیت ضد سرطانی زهر خام روی ردیف سلولی های BrC و CC و دوزهای آزمایش شده نشان داد $R^2_{BrC} = 0/754$ ، $R^2_{CC} = 0/791$ ، این شباهت اشاره میکند به اینکه مرگ و میر در هر دو ردیف سلولی سرطان از روندی وابسته به دوز برخوردار می باشد. نتیجه IC_{50} غلظت های مختلف زهر خام بعد از گذشت 24 ساعت بر روی ردیف های سلولی BrC و CC به ترتیب $6/58 \mu g$ ، $31/54 \mu g$ به دست آمد. نتایج به دست آمده نشان می دهند که با افزایش غلظت عصاره میزان مرگ و میر در هر دو ردیف سلول های سرطانی افزایش می یابد.



شکل 3 . میانگین درصد مرگ سلولهای U87mg ، SW948 . بر اثر زهر خام *S. haddoni* . IC50 غلظتهای مختلف زهر خام بر روی ردیف های سلولی BrC و CC به ترتیب (6/58 ، 31/54) می باشد. آنالیز رگرسیون خطی ارتباط معنی داری بین فعالیت ضد سرطانی زهر خام روی ردیف های سلولی BrC و CC و دوزهای آزمایش شده نشان داد ($R^2_{BrC} = 0/754$ ، $R^2_{CC} = 0/791$). سرطان مغز (BrC)، سرطان کولون (CC).

بحث:

امروزه تولیدات طبیعی نقش مثبتی در درمان سرطان بازی می کنند . عوامل ضد سرطان استفاده شده در کلینیک به صورت طبیعی یا مشتق شده از تولیدات طبیعی از منابع گوناگون مخصوصا موجودات دریایی وجود دارند. تحقیق برای پیشرفت داروهای جدید شیمی درمانی با اثرات جانبی کمتر و با بازده درمانی بالاتر هنوز مهم است . مطالعه روی پتانسیل دارویی زهر شقایق های دریایی به طور ضعیف انجام شده است. در مطالعات وجود پروتئینها در عصاره متانولی زهر شقایق به روش SDS-PAGE محرز شده است که ساختار شیمیایی این پروتئینها می تواند در درمان بیماریهای مختلف از جمله سرطان مفید باشند (Malve ، 2016 ؛ Cheung R C ؛ و همکاران، 2015). در تحقیق حاضر نیز با استفاده از روش SDS-PAGE باندهای پروتئینی واضحی از زهر با وزن مولکولی 11 ، 25 ، 48 ، 75 کیلو دالتون مشاهده شد . Veeruraj و همکارانش در سال 2007 باندهای پروتئینی به دست آمده به روش SDS-PAGE از زهر *S. haddoni* در آبهای ساحلی هند با وزن مولکولی 103 ، 82 ، 63 کیلو دالتون را گزارش کردند (Veeruraj و همکاران، 2007). با مقایسه نتایج ما و مطالعه Veeruraj می توان این تفاوت در پروتئینها را به خاطر تاثیرات اکولوژی بر پروتئینها بیان کرد. فعالیت ضد سرطانی مشابه زهر خام *S. haddoni* ، روی رده های سلولی BrC و CC مطابق با آنالیز واریانس ($P < 0/001$) ، این شباهت قابل ملاحظه نه تنها ممکن است شانس برای پیدایش یک فراکشن با این ویژگی می دهد بلکه ممکن هست یک شانس برای پیدا کردن یک عامل ضد سرطان با دوزهایی کمتر به ما دهد یا مانع از سمیت بر روی سلولهای نرمال شود. نتایج مقایسه دو به دو فعالیت ضد سرطانی زهر خام بر روی سلولهای سرطانی BrC و CC ، این دو رده سلولی حساسیت متفاوتی در معرض مقدار مساوی از زهر خام از خود نشان دادند. زهر خام مرگ بیشتری را روی سلولهای BrC نسبت به سلولهای سرطانی CC القا کرد. با مقایسه ارتباط معنی داری بین فعالیت ضد سرطانی زهر خام روی رده های سلولی BrC و CC مکانیسم مشابهی در ایجاد سمیت را نشان می دهند. EqTx-II جدا شده از *Actinia equina* برای فعالیت سیتوتوکسیک در برابر رده های سلولی گلیوبلاستومای انسان U87 و A172 مطالعه شد. بعد از 24 ساعت از درمان ، 10 mg/ml از EqTx-II نشان داد که به طور قابل توجهی سیتوتوکسیک بوده و قابلیت زنده بودن سلولهای U87 و A172 را به ترتیب تا 60٪ و 48٪ کاهش داد اما 10 mg/ml از سلولهای نرمال قابلیت زنده بودن را تا 80٪ کاهش داد (Soletti و همکاران ، 2008) . تحقیق حاضر فعالیت ضد سرطانی زهر خام *S. haddoni* در برابر سرطان مغز انسان (U87) را اثبات می کند . داده های حاصل از این تحقیق با نتایج Soletti و همکارانش در سال 2008 هم خوانی دارد. Cline و همکارانش در سال 1995 نشان دادند زهر خام شقایق دریایی *Urticina piscivora* توانسته است که 50٪ از سلولهای سرطانی اپیدرموئید دهانی انسان (KB) ، سلولهای لوکمی (L1210) ، سلولهای دیپلوئید جنینی شش انسان (HEL299) را به ترتیب در مقدارهای 6/54 mg/ml ، 10/07 ، و 2/34 مهار کند (Cline و همکاران، 1995). زهر خام جدا شده از شقایق های دریایی *H. malu* ، *C. adhaesivum* و *E. quadricolor* یک اثر مهار کننده قابل توجه ای روی سرطان پوست A431 داشت. بعلاوه ، *H. malu* و *C. adhaesivum* یک اثر مهار کننده قابل توجه ای روی رده سلولی T47D ، سرطان سینه به مقدار 40 µg/ml داشت (Ramezanpour و همکاران، 2012). Cline و همکارانش در سال 1995 اثر ضد سرطانی یک پروتئین طراحی شده UpI و جدا شده از شقایق دریایی *Urticina piscivora* را مشخص کرد و نشان داد که رشد 50٪ از سلولهای سرطان اپیدرموئید انسان (KB) ، سلولهای لوکمیای لنفوشیت موش (L1210) ، سلولهای دیپلوئید شش جنینی انسان (HEL299) ، به ترتیب در مقدارهای 40/32 mg/ml ، 29/99 ، و 29/74 می باشد (Cline و همکاران، 1995). در مطالعه Jiang و همکارانش ، یک پروتئین recombinant شده ، Src I از شقایق دریایی *Sagartia rosea* 50٪ فعالیت سیتوتوکسیک را روی رده های سلولی انسانی شامل آستروسیتوما (U251) (3/5 µg/ml) ، سرطان شش (NSCLC) (2/8 µg/ml) ، سرطان کبد (BEL-7402) (3/6 µg/ml) ، آدنوکارسینوما معده (BGC-823) (7/4 µg/ml) ، سلولهای جنین موشی NIH سویس (NIH/3T3) (3/4 µg/ml) مهار کرد (Jiang و همکاران، 2003). Avila و همکارانش در سال 1988 یک سم از شقایق دریایی *Stoichactis helianthus* جدا کرد که سمیت را بر روی سلولهای لوکمیای میلوسیت انسان HL-60 مهار کرد (Avila و همکاران، 1988). Fedorov و همکارانش در سال 2010 یک پروتئین ضد سرطانی RTX-A از شقایق دریایی *Heteractis crista* جدا کرد. RTX-A زنده بودن سلولهای MDA-MB-231 ، Hela ، THP-1 ، JB6 P+ Cl41 و snu-c4 انسان را کاهش داد (Fedorov et al. ، 2010). سیتولایزین EqTX-I از شقایق دریایی *Actinia equina* همچنین یک کاهش در زنده بودن سلولهای A V-79-379 (دیپلوئید شش فیبروبلاست از هامستر چینی) در یک رفتار وابسته به دوز را القا می کند (Batista و همکاران ، 1990). نتایج ما نیز همچنین فعالیت ضد سرطانی زهر خام *S. haddoni* را در برابر رده های سلولی سرطان مغز و کولون ثابت کرد. مطابق با نتایج به دست آمده ، برای پیدا کردن پتانسیل دارویی با ارزش با فعالیت ضد سرطانی از زهر *S. haddoni* ، در مدل حیوانی پیشنهاد می شود.

نتیجه گیری: عصاره متانولی زهر شقایق دریایی *S. haddoni* خلیج فارس می تواند دارای یک عامل ضد سرطانی قوی با فعالیت قابل قبول در برابر دو نوع رده سلولی سرطانی باشد.

In vitro study on cytotoxic effect of methanolic extract from carpet anemone tentacles against brain and colon cell lines

Abstract:

Carpet anemone, *Stichodactyla haddoni* is an ocean resident sedentary animal. The venom of sea anemones could be a potential source of bioactive pharmaceutical compounds. The main goal of this research was to study the killing effects of the methanol extract tentacles from the Persian Gulf sea anemone, *S. haddoni* against Brain and colon cell lines in vitro using tetrazolium salt. The specimens were collected from coastal waters of Lark, island Persian Gulf (south of Iran). From tentacles methanol extract was performed. These cells were exposing in presence of different Serial dilution 100 to 0.78 µg of venom extract in during 24 hour. In this study statistical analysis showed that activity was similar to in almost all doses (Pvalue <0.001).The extraction induced more lethality on brain cell line than the other cancer cell lines. IC50 of crude venom against brain and colon cell lines was observed at 6.58, 31.54µg respectively during of 24 hour. Therefore, *Stichodactyla* crude can be considered as a strong agent of growth inhibitor against cancer cell lines especially brain cancer.

Keywords: *Stichodactyla haddoni*, Cytotoxic effect, Crude venom, Venomous marine animals.

منابع

1. **Avila, A.D.; Mateo de Acosta, C. and Lage, A., 1988.** A new immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. Int. J. Cancer. 42, PP: 568–571.
2. **Batista, U.; Macek, P. and Sedmak, B., 1990.** The cytotoxic and cytolytic activity of Equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina*. Cell Biol Int Rep. Vol.14, No.11, pp:1013–1024.
3. **Cheung, R.C.F.; Ng, T.B. and Wong, J.H., 2015.** Marine Peptides: Bioactivities and Applications. Mar. Drugs. 13, pp: 4006–4043.
4. **Cline, E.I.; Wiebe, L.I.; Young, J.D. and Samuel, J., 1995.** Toxic effects of the novel protein UpI from the sea anemone *Urticina piscivora*. Pharmacol. Res. Vol. 32, No. 5, pp: 309–314.
5. **Fedorov, S.; Dyshlovoy, S.; Monastyrnaya, M.; Shubina, L.; Leychenko, E.; Kozlovskaya, E.; Jin, J.O.; Kwaj, J.Y.; Bode, A.M.; Dong, Z. and Stonick V., 2010.** The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (=Radianthus macrodactylus). Toxicon. Vol. 55, No. 4, pp: 811–817.
6. **Jiang, X.; Chen, H.; Yang, W.; Liu, Y.; Liu, W.; Wei, J.; Tu, H.; Xie, X.; Wang, L. and Xu, A., 2003.** Functional expression and characterization of an acidic actinoporin from sea anemone *Sagartia rosea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 312, pp: 562–570.
7. **Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, pp: 680–685.

8. **Malve, H., 2016.** Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. J Pharm Bioallied Sci.Vol. 8, No. 2, pp: 83–91.

9. **Mariottini, G.L. and Pane, L., 2014.** Cytotoxic and Cytolytic Cnidarian Venoms. A Review on Health Implications and Possible Therapeutic Applications. Toxins. 6, pp: 108-151.

10. **Monroy-Estrada, H.; Chirino, Y.; Soria-Mercado, I.E. and Sánchez-Rodríguez, J., 2013.** Toxins from the Caribbean sea anemone *Bunodeopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 19, pp:12.

11. **Morabito, R.; Condello, S.; Currò, M.; Marino, A.; Ientile, R. and La Spada, G., 2012.** Oxidative stress induced by crude venom from the jellyfish *Pelagia noctiluca* in neuronal-like differentiated SH-SY5Y cells. Toxicol. In Vitro. 26, pp: 694–699.

12. **Mosmann, T., 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. Vol. 65, No. 1- 2, pp : 55-63.

13. **Ramezanpour, M.; Burke da Silva, K. and Sanderson, B.J.S., 2012.** Differential susceptibilities of human lung, breast and skin cancer cell lines to killing by five sea anemone venoms. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases . Vol. 18, No. 2, pp : 157-163.

14. **Smith,P.K., et al.,1985.** Measurment of protein using bicinchoninic acide. Anal. Biochem.Vol.150, No. 1, pp : 76-85.

15. **Soletti, R.C.; de- Faria, G.P.; Vernal, J.; Terenzi, H.; Anderluh, G.; Borges, H.L.; Moura-Neto, V. and Gabilan NH., 2008.** Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. Anticancer Drugs. Vol. 19, No. 5 , pp :517–525.

16. **Veeruraj, A.; Arumugam, M.; Ajithkumar, T. and Balasubramanian. T., 2007.** Isolation And Biological Properties Of Neurotoxin From Sea Anemone (*Stichodactyla mertensii*, *S. haddoni*). The Internet Journal of Toxicology. Vol. 5, No. 2.