

Effect of Methanolic Extract of Sea Cucumber (*Holothuria leucospilota* Brandt, 1835) on Wound Healing of Rat

اثر عصاره متانولی استخراج‌شده از خیار دریایی (*Holothuria leucospilota* Brandt, 1835) بر ترمیم زخم حاد در موش صحرایی (رت)

Gazaleh Fotouhi¹, Mojtaba Naderi^{2*},
Fatemeh Shahbazi², Mostafa Alinaghizadeh²

1. M.A., Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-3697 Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-3697 Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-3697 Tehran, Iran.

غزاله فتوحی^۱، مجتبی نادری^{۲*}، فاطمه شهبازی^۲،
مصطفی علی‌نقی‌زاده^۲

۱. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷، تهران، ایران.
۲. استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷، تهران، ایران.
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷، تهران، ایران.

(Received: Feb. 27, 2021 - Accepted: Feb. 16, 2023)

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۷)

Abstract

Prolongation of wound healing time can be led to chronic infections. Therefore, to achieve infection preventive methods to accelerate of wound improvement process is one of essential needs of Human. In this study, the effects of methanolic extract of *Holothuria leucospilota* was investigated on restoration of created wound in rat skin. Methanolic extracts of collected sea cucumber from depth of 10 to 15 meters was prepared by rotary. The amount of 0.5 and 1 gr of obtained extraction were added to base ointment. In continuing, 40 rats (average mean of 185±5 gr) were divided into 4 groups which included control, sham (base cream), 0.5% ointment and 1% ointment. Wound (diameter of 6±1 mm) was created on rats' skin by punch biopsy. Each group were treated (1ml) with prepared concentrations ointment during 13 days. On days of 0, 4, 7, 10 and 13, the wound improvement process was investigated and the diameter of the wounds was measured. According to results, accelerate the wound recovery process was more obvious in treated groups with 0.5% and 1% ointment compared to control and sham groups. Also, there was significant different between treated group with 1%, sham and control during days of 7, 10, 13 (P<0.05).

Keywords: Extraction, restoration, sea cucumber, wound.

چکیده

طولانی شدن زمان بهبود زخم، زمینه ایجاد عفونت‌های مزمن را مستعد می‌کند. لذا دستیابی به روش‌هایی پیشگیری‌کننده عفونت به منظور تسریع روند التیام زخم یکی از نیازهای روز بشر محسوب می‌شود. در این مطالعه اثرات عصاره خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* بر روی ترمیم زخم حاد ایجادشده در پوست رت و استار نر بررسی شد. بدین منظور عصاره متانولی از نمونه‌های خیار دریایی جمع‌آوری شده از عمق ۱۰ الی ۱۵ متری سواحل سوزا در جزیره قشم با استفاده از روتاری تهیه شد که در ادامه به منظور تهیه پماد، ۰/۵ و ۱ گرم از عصاره به دست آمده به پماد پایه اضافه شد. سپس ۴۰ عدد رت با میانگین وزنی ۱۸۵±۵ گرم را به چهار گروه شاهد، گروه شم، گروه تیمار شده با پماد ۰/۵ درصد و گروه تیمار شده با پماد ۱ درصد تقسیم شدند. بر روی پوست تمامی رت‌ها زخمی به عمق تمام پوست و قطر ۱±۰/۶ میلی‌متر بوسیله پانچ بیوپسی ایجاد گردید و هر گروه را با دوز پماد تهیه شد به مدت ۱۳ روز و یک نوبت در روز به میزان ۰/۱ سی‌سی تیمار شدند. در روزهای صفر، چهار، هفت، ۱۰ و ۱۳ روند بهبود زخم بررسی و قطر زخم‌ها اندازه‌گیری شد. براساس مشاهدات، سرعت بهبود زخم در گروه‌های تیمار شده با پماد ۱ درصد و ۰/۵ درصد نسبت به گروه شاهد و شم در طی مدت مطالعه بیش‌تر بود. هم‌چنین از نظر آماری بین گروه تیمار شده با پماد ۱، شم و شاهد در روزهای هفت، ۱۰ و ۱۳ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ترمیم، زخم، خیار دریایی، عصاره.

مقدمه

برخوردار هستند، به طوری که ترکیبات ارزشمندی نظیر ویتامین A، تیامین (B1)، ریوفالوین (B2)، نیاسین (B3)، مواد معدنی به‌ویژه کلسیم، منیزیم، آهن و روی در بدن آن‌ها موجود می‌باشد (Chen, 2011; Ridzwan, 2017; Siahaan et al., 2007). خیارهای دریایی از لحاظ بوم‌شناختی و زیست‌شناختی نیز دارای اهمیت هستند و از اعضای مهم زنجیره‌های غذایی در بوم‌سامانه مناطق معتدل و آبسنگ‌های مرجانی مناطق گرمسیری محسوب می‌شوند (Bruckner et al., 2003).

یکی از گونه‌های غالب خیار دریایی موجود در خلیج فارس، گونه *H. leucospilota* می‌باشد (Afkhami et al., 2012). تاکنون مطالعات زیادی در مورد خواص ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد قارچی، ضد سرطان، سمیت سلولی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده از گونه *H. leucospilota* کار شده است (Mashjoor & Yousefzadi, 2018; Mokhlesi et al., 2012; Farjami et al., 2013; Adibpour et al., 2014; Pishevarzad et al., 2014; Bahroodi et al., 2014; Ghafari et al., 2020). این مطالعه برای اولین بار به بررسی عصاره متاتولی استخراج‌شده از گونه *H. leucospilota* بر روند ترمیم زخم ایجادشده روی پوست موش صحرائی نر نژاد ویستار هدف‌گذاری شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خیار دریایی (*H. leucospilota*) در آذرماه سال ۱۳۹۸ از عمق ۱۰ الی ۱۵ متری ساحل سوزا در جزیره قشم از طریق عملیات غواصی جمع‌آوری (شکل ۱) و بلافاصله با ظرف حاوی آب دریا با هوادهی مناسب به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از شست‌وشو دادن نمونه‌ها با آب، دیواره بدن به قطعات کوچک‌تر (۱ الی ۲ سانتی‌متر) تقسیم شد. در ادامه به منظور جداسازی ترکیبات قطبی، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در متانول قرار گرفت سپس پس از سه بار عبور از صافی عصاره‌گیری شدند و عصاره تام با استفاده از دستگاه

زخم به‌عنوان شکاف یا ضایعه‌ای در پوست بر اثر صدمات شناخته می‌شود (Ghaderi, 2010). آسیب‌های پوستی از جمله مسائل تأثیرگذار بر سلامت بدن بوده که بشر را به دلیل آثارهای ناخوشایند در طول تاریخ درگیر خود کرده است. از طرف دیگر طولانی‌شدن زمان بهبود زخم، زمینه انواع عفونت‌های مزمن را مستعد می‌کند (Laastcn, 2010; Faulkner, 2000). بهبود و ترمیم زخم در انسان یک مکانیسم کاملاً پیچیده است که در نتیجه انجام مراحل مختلف نظیر التهاب، تکثیر، ترمیم و بازسازی صورت می‌گیرد و چنانچه زمان‌بندی آن به هر دلیلی تغییر کند، ترمیم پوست دچار اشکال می‌شود (Ghaderi, 2005).

دریاه‌ها و اقیانوس‌ها به‌عنوان خاستگاه حیات و سرچشمه ترکیبات طبیعی مطرح می‌شوند (Castro, 2000). ترکیبات دارای فعالیت‌های زیستی را از گروه‌های مختلف جانوری از جمله مرجان‌ها، خرچنگ‌ها، تونیکت‌ها، خارپوستان، ماهیان و اسفنج‌ها جداسازی نموده‌اند (Kojjoa & Sawangwong, 2004). بررسی‌های انجام‌شده در رابطه با خواص بیولوژیک خارپوستان نشان می‌دهد که بیش‌ترین ترکیبات شیمیایی دارای خواص بیولوژیک متعلق به خیارهای دریایی می‌باشد (Roopesh et al., 2007). خیارهای دریایی گروه فراوان و متنوعی از خارپوستان هستند که دارای بدنی کشیده بوده و معمولاً به‌صورت گوشتی و نرم هستند، این جانداران در اطراف دهان خود دارای ۱۰ شاخک حسی انگشت‌مانند هستند که از قسمت قدامی و خلفی به‌راحتی قابل تشخیص می‌باشد (Castro & Huber, 2000). خیارهای دریایی از آبزیان بسیار ارزشمند تجاری محسوب می‌شوند که به‌صورت تازه یا خشک شده قرن‌هاست که یک غذای آسیایی لذیذ بوده و همچنین در فرمولاسیون داروهای سنتی در شرق آسیا کاربردهای فراوانی دارند (Pangestuti & Arifin, 2007; Zhang et al., 2017; Oh et al., 2018). از طرف دیگر خیارهای دریایی از ارزش غذایی بالایی

۰/۵ و ۱ درصد عصاره متانولی به صورت روزانه یک نوبت به مقدار ۰/۱ سی سی تیمار شدند. برای محاسبه میزان اندازه زخم از رابطه (۱) استفاده شد:

$$W_s = L \times W \quad (1)$$

که در این فرمول W_s : اندازه زخم، L : طول زخم (بیشترین فاصله)، W : عرض زخم (بیشترین فاصله) هم‌چنین با استفاده از رابطه‌های (۲) و (۳) به ترتیب درصد انقباض زخم و درصد بهبود زخم در فاصله زمانی روزهای صفر، چهار، هفت، ۱۰ و ۱۳ محاسبه شد:

$$W(\%) = \frac{W_x}{W_0} \times 100 \quad (2)$$

که در این فرمول W : درصد اندازه زخم، W_x : اندازه زخم در روز x برحسب میلی‌مترمربع، W_0 : اندازه زخم در روز صفر برحسب میلی‌مترمربع.

$$WH(\%) = \frac{W_0 - W_x}{W_0} \times 100 \quad (3)$$

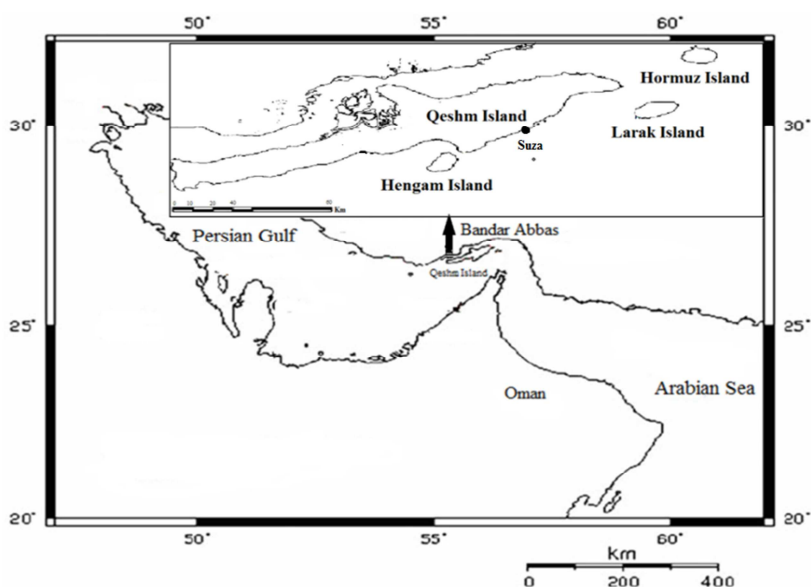
که در این فرمول WH : درصد بهبود زخم، W_x : اندازه زخم در روز x برحسب میلی‌مترمربع، W_0 : اندازه زخم در روز صفر برحسب میلی‌مترمربع.

برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی توکی در نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

روتاری (تبخیرکننده گردان تحت خلأ) کاملاً خشک شد. از پماد پایه (اوسرین شرکت آبی دریا سپاهان) برای ساخت پماد حاوی ۰/۵ درصد و ۱ درصد از عصاره متانولی استخراج شده استفاده شد. موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۴۰ عدد) با میانگین وزنی 185 ± 5 گرم از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شدند. به منظور سازگاری موش‌ها با شرایط موجود، پنج روز در شرایط یکسان آزمایشگاهی (۲۴ درجه سانتی‌گراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت) با رژیم غذایی مناسب نگهداری شدند. در ادامه به چهار گروه؛ گروه شم (تیمار شده با پماد پایه، اوسرین بدون عصاره)، گروه تیمار شده با پماد پایه حاوی غلظت ۰/۵ درصد، گروه تیمار شده با پماد پایه حاوی غلظت ۱ درصد و گروه شاهد (هیچ پمادی دریافت نکردند) تقسیم شدند.

بعد از بی‌هوش کردن موش‌ها و تراشیده شدن موهای پشت، با استفاده از پانچ بیوپسی ۶ میلی‌متر، زخمی به عمق تمام پوست به فاصله ۱/۵ سانتی‌متر سمت راست ستون فقرات ایجاد شد و قطر زخم‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد.

از پماد پایه (اوسرین شرکت آبی سپاهان دریا)، جهت تیمار زخم در گروه شم استفاده شد. گروه‌های دیگر به غیر از گروه شاهد با پمادهای حاوی غلظت






















شکل ۱. محل نمونه‌برداری خیار دریایی گونه *H. Leucospilota* در جزیره قشم.

نتایج

همه تیمارها در یک بازه زمانی آزمایش روند کاهشی را در اندازه زخم نشان دادند (شکل ۲). با این حال، بهبود زخم تیمار شده با پماد ۱ درصد تهیه شده از عصاره متانولی خیار دریایی گونه *H. leucopilota* کاهش زخم را با سرعت بیش‌تری در مقایسه با سایر گروه‌ها از روز چهارم نشان داد (شکل ۲). براساس آنالیز آماری بین درصد کاهش زخم و زمان، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در روز چهارم پس از ایجاد

زخم، زخم‌های تیمار شده با پماد حاوی یک درصد عصاره متانولی یک مزیت کاهش قابل توجه زخم را در مقایسه سایر گروه‌ها نشان داد. همچنین گروه تیمار شده با پماد یک درصد اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها در روزهای مختلف آزمایش نشان داد. از طرفی بر اساس مطالعات ماکروسکوپی، این اختلاف بین گروه تیمار شده با پماد ۱ درصد و گروه تیمار شده با پماد ۰/۵ درصد با توجه به سرعت بهبود زخم با تیمار ۱ درصد مشاهده نشد ($P > 0/05$).

گروه روز	۱ (شاهد)	۲ (شم)	۳ (نیم درصد)	۴ (۱ درصد)
صفر				
۱				
۴				
۷				
۱۰				
۱۳				

شکل ۲. روند بهبود و ترمیم زخم ایجاد شده بر سطح پوست موش در گروه‌های مختلف. گروه ۱ (گروه شاهد: بدون پماد؛ گروه ۲) گروه شم: تیمار شده با پماد پایه؛ گروه ۳) تیمار شده با پماد حاوی ۰/۵ درصد عصاره متانولی؛ گروه ۴) تیمار شده با پماد حاوی یک درصد عصاره متانولی.

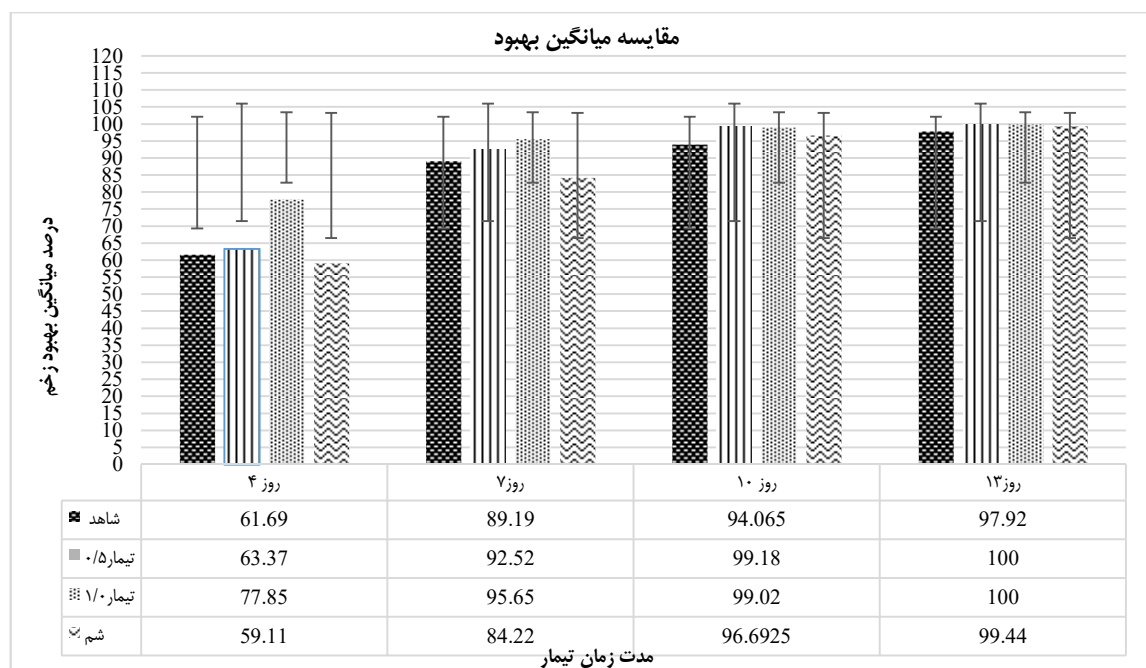
دارویی منحصر به فردی نظیر ضد رگ‌زایی (Tian et al., 2005)، ضد سرطان (Roginsky et al., 2004)، ضد انعقاد خون (Chen et al., 2011)، ضد میکروبی (Beauregard et al., 2001)، آنتی‌اکسیدان (Pishevvarzad et al., 2014)، ضد تومور (Tong et al., 2005) و بهبود زخم (San Miguel-Ruiz & García-Arrarás, 2007) می‌باشند. در حاضر نیز در برخی از کشورها مثل مالزی، جوامع محلی از خیار دریایی برای درمان زخم‌های سطحی استفاده می‌کنند (Mazliadiyana et al., 2017). فرایند ترمیم زخم حاصل سه مرحله اساسی رسوب ماتریس بافت هم‌بند، انقباض و تشکیل اپیتلیوم می‌باشد (Diegelmann & Evans, 2004; Rao et al., 2015).

نتایج این مطالعه مزیت استفاده از پماد تهیه‌شده با عصاره استخراج‌شده از خیار دریایی گونه *H. leucospilota* در بهبود زخم سطحی ایجاد شده را اثبات کرد. به طوری که روند بهبود زخم به طور معنی‌داری قابل مشاهده بود.

شکل ۳ درصد بهبود زخم‌های ایجاد شده در سطح پوست با تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. پس از گذشت چهار روز از ایجاد زخم، بیش‌ترین درصد بهبود به ترتیب مربوط به تیمار ۱ درصد، ۰/۵ درصد، شاهد و شم می‌باشد که از لحاظ آماری تفاوت تنها بین سه تیمار ۱ درصد، شاهد و شم مشاهده شد ($P > 0.05$). در روز ۱۳، زخم‌های تیمار شده با پماد ۰/۵ درصد و ۱ درصد به طور کامل ترمیم شده بودند، در حالی که روند بهبود در گروه شاهد ۹۷ درصد و در گروه شم ۹۹ درصد بود. در روز پایانی آزمایش گروه شاهد با تیمار ۰/۵ درصد و ۱ درصد تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

به تازگی مطالعات زیادی بر روی ترکیبات طبیعی از منابع دریایی با هدف تولید دارو انجام شده است که نتیجه این پژوهش‌ها از سال ۲۰۰۸ تاکنون گزارش بیش از ۱۰۰۰ ترکیب طبیعی از منابع دریایی بوده است (Hu et al., 2015). ترکیبات استخراج‌شده از گونه‌های مختلف خیار دریایی دارای فعالیت‌های



شکل ۳. مقایسه درصد بهبود زخم‌های ایجاد شده بر روی پوست رت‌ها با یکدیگر. در چهار گروه تیمار شده با پماد اوسرین شرکت سپاهان آبی و صفر درصد در گروه شم و ۰/۵ درصد و ۱ درصد در دو گروه تیمار و گروه شاهد که تیمار نشده است.

بهبود زخم وضعیت تغذیه‌ای می‌باشد. کربوهیدرات‌ها و لیپیدها از منابع اولیه انرژی در روند بهبود زخم محسوب می‌شوند. در مطالعه Arfani et al. (2021) سرم تهیه‌شده از عصاره متانولی استخراج‌شده از خیار دریایی (*Actinopyga mauritiana*) تأثیر قابل توجهی در روند بهبود زخم ایجادشده در موش داشت. خیارهای دریایی حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند که رشد و فرایند لخته‌شدن خون را در فرایند بهبود زخم پشتیبانی می‌کنند (Aydin et al., 2011). از طرف دیگر اثرات ضد التهابی قابل توجه عصاره متانولی استخراج‌شده از عضله گونه‌های خیار دریایی *Holothuria Atra*، *H. leucospilota*، *Coscinasterias*، *Leptogorgia ceratophyta* و *Phallusia fumigata tenuispina* در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (Ghafari et al., 2020; Dhinakaran & Lipton, 2014; Herencia et al., 1998) که این موضوع نشان دهنده این است که عصاره متانولی آنزیم ضدالتهابی را با درصد بیش‌تری مهار می‌کند.

براساس نتایج ماکروسکوپی به‌دست‌آمده در این مطالعه، روند ترمیم زخم در گروه تیمار شده با پماد ۱ درصد و گروه تیمار شده با پماد ۰/۵ درصد به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیش‌تر از گروه شاهد و گروه شم بود. از طرف دیگر از لحاظ آماری سرعت ترمیم زخم در موش‌های دریافت‌کننده پماد حاوی غلظت ۱ درصد عصاره نسبت به دو گروه شاهد و شم به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود که دلایلی بر اثبات تأثیرات مثبت عصاره متانولی استخراج‌شده از گونه *H. leucospilota* بر روند التیام زخم می‌باشد. چنین روند مشابهی نیز در مورد عصاره آبی استخراج‌شده از *Stichopus chloronotus* (Mazliadiyana et al., 2017) و روغن استخراج‌شده از *S. horrens* (Barathi et al., 2013) مشاهده شد.

چنین تأثیری را می‌توان به‌دلیل دامنه وسیع از وجود ترکیبات زیست‌فعال نظیر گلیکوزیدهای تری‌ترپنی (ساپونین) (Aminin et al., 2010)، کندرویتین‌سولفات (Vieira et al., 1991)، گلیکوزآمینوگلیکان (Pacheco et al., 2000)، پلی‌ساکاریدسولفات (Mourao et al., 1999)، استرول (Goad et al., 1985)، پپتیدها (Mojica et al., 2004) و لکتین‌ها (Rafiuddin et al., 2005) نسبت داد. با توجه به مطالعات Chaphalkar et al. (2017) و Mazliadiyana et al. (2017)، ترکیبات اسیدهای چرب موجود در بدن خیار دریایی (نظیر پالمیتیک‌اسید، استئاریک‌اسید، لنئوتیک‌اسید، اولیک‌اسید، ایکوزاپنتانویک‌اسید، آراکیدونیک‌اسید) نقش مهمی در روند بهبود زخم را دارد. در این مطالعه از عصاره متانولی استخراج‌شده از خیار دریایی گونه *H. leucospilota* برای روند بهبود زخم استفاده شد. براساس مطالعات انجام‌شده، عصاره متانولی استخراج‌شده از *H. leucospilota* خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان داده است (Pishevvarzad et al., 2014; Bahroodi et al., 2014). با توجه به این‌که عوامل میکروبی یکی از اصلی‌ترین دلایل بیماری و به‌دنبال آن عفونت‌های حاصله می‌باشد (Andersson et al., 1981)، عصاره‌های متانولی استخراج‌شده از گونه‌های مختلف خیار دریایی اثرات ضدقارچ و ضد میکروبی بالایی را از خود نشان داده‌اند (Ridzwan et al., 2001; Fredalina et al., 2008; Chludil, 2002; Ismail et al., 1999). فعالیت‌های ضد میکروبی و ضدقارچی عصاره‌های استخراج‌شده از خیارهای دریایی به‌دلیل وجود ساپونین‌های استروئیدی موجود در بدن آن‌ها می‌باشد (Abraham et al., 2002)، که با کاهش التهاب و عفونت، روند بهبود زخم را تسریع می‌بخشند. از دیگر پارامترهای تأثیرگذار در روند

REFERENCES

- Adibpour, N.; Nasr, F.; Nematpour, F.; Shakouri, A.; & Ameri, A. (2014). Antibacterial and antifungal activity of *Holothuria leucospilota* isolated from Persian Gulf and Oman Sea. *Jundishapur Journal of Microbiology*; 7: 1-4.
- Abraham, T.J.; Nagarajan, J.; & Shanmugam, S.A. (2002). Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurians species. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*; 31: 161-164.
- Afkhami, M.; Ehsanpour, M.; Khazaali, A.; Kamrani, E.; Mokhlesi, A.; & Darvish Bastami, K. (2012). Sea cucumber fisheries of Qeshm Island, Persian Gulf. *Beche-de-mer Information Bulletin*; 60-61.
- Aminin, D.L.; Chaykina, E.L.; Agafonova, I.G.; Avilov, S.A.; Kalinin, V.I.; & Stonik, V.A. (2010). Antitumor activity of the immunomodulatory lead Cumaside. *International Immunopharmacology*; 10: 648-654. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.03.003.
- Andersson, L.; Bohlin, L.; Lorizzi M.; Riccio, R.; Minale, L.; & Moreno-López, W. (1989). Biological activity of sea cucumber and saponinlike compounds from starfish and brittlestars. *Toxicon*; 27: 179-188. DOI: 10.1016/0041-0101(89)90131-1.
- Arfani, A.; Raif, A.; Ginting, C.N.; Ikhtari, R. (2021). Evaluation of wound healing potential of a sea cucumber (*Actinopyga mauritiana*) extract in mice (*Mus musculus*). *Jurnal Natural*; 21: 168-174. DOI: 10.24815/jn.v21i3.19953.
- Aydin, M.; Sevgili, H.; Tufan, B.; Emre, Y.; & Köse, S. (2011). Proximat composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*; 46: 500-508. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02512.x.
- Bahroodi, S.; Nematollahi, M.A., Aghasadeghi, M.R., Nazemi, M.; & Behroz, B. (2014). In vitro cytotoxic and anti-cancer effects of body wall for sea cucumber (*Holothuria leucospilota*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*; 23 (3):11-19
- Barathi, S.S.; Arul, A.; Prathibha, M.D.A.; & Arunkumar, H.D. (2013). Efficacy of gamat extract in wound healing in albino wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*; 20:142-145.
- Beauregard, K.A.; Truong, N.T.; Zhang, H.; Lin, W.; & Beck, G. (2001). The detection and isolation of a novel antimicrobial peptide from the echinoderm, *Cucumaria frondosa*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 484: 55–62. DOI: 10.1007/978-1-4615-1291-2_5.
- Bruckner, A.W.; Johnson, K.A.; & Field, J.D. (2003). Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade?. *Beche-de-mer Information Bulletin*; 18: 24- 33.
- Castro, P.; & Huber, M.E. (2000). Marine biology. 3edition. McGraw-Hill Higher Education, p 444.
- Chaphalkar, R.; Apte K. G.; Talekar, Y.; Ojha, S. K.; & Nandave, M. 2017. Antioxidants of *Phyllanthus emblica* L. Bark extract provide hepatoprotection against ethanol-induced hepatic damage: a comparison with silymarin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-11. DOI: 10.1155/2017/3876040.
- Chen, S.; Xue, C.; Yin, L.; Tang, Q.; Yu, G.; & Chai, W. (2011). Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. *Carbohydrate Polymers*; 83: 688-696. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.08.040.

- Chludil, H.; Muniain, C.; & Maier, M.S. (2002). Cytotoxic and Antifungal Triterpene Glycosides from the Patagonian Sea Cucumber *Hemoiedema spectabilis*. *Journal of Natural Products*; 65: 860-5. DOI: 10.1021/np0106236.
- Dhinakaran, D.I.; & Lipton, A.P. (2014). compounds from *Holothuria atra* of Indian ocean. *SpringerPlus*; 3: 1-10.
- Diegelmann, R.F.; & Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*; 9: 283-289. DOI: 10.2741/1184.
- Farjami, B.; Nematollahi, M.A.; Moradi, Y.; Irajian, G.R.; Nazemi, M.; Ardebili, A.; & Pournajaf, A. (2013). Antibacterial activity of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*; 1: 225-230.
- Fredalina, B.D.; Ridzwan, B.H.; Abidin, A.A.; Kaswandi, M.A.; Zaiton, H.; Zali, I.; Kittakoop, P.; & Jais, A.M. (1999). Fatty acid compositions in local sea cucumber. *Gen Pharmacol*; 33: 337-340. DOI: 10.1016/s0306-3623(98)00253-5.
- Ghaderi, R. (2005). Efficacy of epigluce, suture, honey and animal oil in accelerating healing of full thickness wound of skin in mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 17th The annual congress of the European Academy of Dermatology Venereology, 17-21 September 2008, Paris. France.
- Ghaderi, R.; Afshar, M.; Akhbarie, H.; & Golalipour, M.J. (2010). Comparison of the Efficacy of Honey and Animal Oil in Accelerating Healing of Full Thickness Wound of mice skin. *International Journal of Morphology*; 28:193-198.
- Gafari, H.; Moradi, Y.; Nazemi, M.; & Safari, R. (2020). Evaluation of anti-inflammatory effects of methanolic extract of Persian Gulf sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) on rats. *Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources)*; 73: 91-100.
- Goad, L.J.; Garneau, F.X.; Simard, J.L.; ApSimon, J.W.; and Girard, M. (1985). Isolation of 9(11)-sterols from the sea cucumber. Implications for holothurin biosynthesis. *Tetrahedron Letters*; 26: 3513-3516.
- Herencia, F.; Ubeda, A.; Ferrándiz, M.L.; Terencio, M.C.; Alcaraz, M.J.; García-Carrascosa, M.; Capaccioni, R.; & Payá, M. (1998). Anti-inflammatory activity in mice of extracts from mediterranean marine invertebrates. *Life Science* 62, 115-120.
- Hu, Y.; Chen, J.; Hu, G.; Yu, J.; Zhu, X.; Lin, Y.; Chen, S.; & Yuan, J. (2015). Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine Drugs*; 13: 202-221.
- Ismail, H.; Lemriss, S.; Aoun, Z.B.; Mhadhebi, L.; Dellai, A.; Kacem, Y.; Boirom, P.; & Bouraoui, A. (2008). Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. *Journal of Medical Mycology*; 18: 23-26. DOI: 10.1016/j.mycmed.2008.01.002
- Kojjoa, A.; & Sawangwong, P. (2004). Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*; 2: 73-82. 7382. DOI: 10.3390/md202073.
- Mazliadiyana, M.; Nazrun, A.S.; & Isa, N.M. (2017). Optimum Dose of Sea Cucumber (*Stichopus Chloronotus*) Extract for Wound Healing. *Medical and Health Journal*; 12: 83-89. DOI: 10.17576/MH.2017.1201.09.
- Mokhlesi, A.; Saeidnia, S.; Gohari, A.R.; Shahverdi, A.R.; Nasrolahi, A.; Farahani, F.; Khoshnood, R.; & E'shaghi, N. (2012). Biological activities of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*; 7: 243-249. DOI: 10.3923/ajava.2012.243.249
- Mojica, E.R.E.; & Merca, F.E. (2005). Biological properties of lectin from sea cucumber (*Holothuria scabra*). *Journal of Biological Sciences*; 5: 472-477. DOI: 10.3923/jbs.2005.472.477.

- Mourao, P.A.S.; & Pereira, M.S. (1999). Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends in Cardiovascular Medicine*; 9: 225-232. DOI: 10.1016/s1050-1738(00)00032-3.
- Oh, G.W.; Ko, S.C.; Lee, D.H.; Heo, S.J.; & Jung, W.K. (2017). Biological activities and biomedical potential of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): a review. *Fisheries and Aquatic Sciences*; 20: 1-17. DOI: 10.1186/s41240-017-0071-y.
- Pacheco, R.G.; Vicente, C.P.; Zancan, P.; & Mourão, P.A.S. (2000). Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*; 11: 563-573. DOI: 10.1097/00001721-200009000-00009.
- Pangestuti, R.; & Arifin, Z. (2018). Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 8: 341-351. DOI: 10.1016/j.jtcm.2017.06.007.
- Pishehvarzad, F.; Yousefzadi, M.; Kamrani, E.; Moini Zanjani, T.; Ali Ahmadi, A.; & keshavarz, M. (2014). Antioxidant activity of extracts of two species of Sea Cucumber *Holothuria parva* and *Holothuria leucospilota* from the Persian Gulf, Iran. *Journal of Aquatic Ecology*; 4 (1): 34-29.
- Rafiuddin, A.M.; Venkateshwarlu, U.; & Jayakumar, R. (2004). Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair. *Biomaterials*; 25: 85-94. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.075.
- Rao, A.B.; Prasad, E.; Deepthi, S.S.; Haritha, V.; Ramakrishna, S.; Madhusudan, K.; & Rao, Y. S.R.V. (2015). Wound healing: a new perspective on glucosylated tetrahydrocurcumin. *Drug Design, Development and Therapy*; 9: 3579-3588. DOI: 10.2147/DDDT.S85041.
- Ridzwan, B.H.; Zarina, M.Z.; Kaswandi, M.A.; Nadirah, M.; & Shamsuddin, A.F. (2001). The antinociceptive effects of extracts from *Stichopus chloronotus* Brandt. *Pakistan Journal Biological Sciences*; 4: 244-246. DOI: 10.3923/pjbs.2001.244.246.
- Ridswan, B.H.; Leong, T.C.; & Idid, S.Z. (2003). The antinociceptive effects of sea cucumbers *Holothuria leucospilota* Brandt, *Bohadschia marmorata vitiensis* Jeager and coelomic Fluid from *Stichopus hermannii*, Jour. *Pakistan Journal Biological Sciences*; 6: 2068- 2072.
- Roginsky, A.; Singh, B.; Ding, X.Z.; Collin, P.; Woodward, C.; Talamonti, M.S.; Bell, R.H.; & Adrian, T.E. (2004). Frondanol®-A5p from the sea cucumber, *Cucumaria frondosa* induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Pancreas*; 29: 335. DOI: 10.1097/00006676-200411000-00048.
- Roopesh, J.; & Archana, T. (2007). Sponge: An invertebrate of bioactive potential. *Current Science*; 93: 444-445.
- San Miguel-Ruiz, J.E; and García-Arrarás, J.E. (2007). Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *BMC Developmental Biology*; 7: 115. DOI: 10.1186/1471-213X-7-115.
- Siahaan, E. A.; Pangestuti, R.; Munandar, H.; & Kim, S.K. (2017). Cosmeceuticals properties of sea cucumbers: prospects and trends. *Cosmetics*; 4: 1-12. DOI: 10.3390/cosmetics4030026
- Tian, F.; Zhang, X.; Tong, Y.; Yi, Y.; Zhang, S.; Li, L.; Sun, P.; Lin, L.; & Ding, J. P. (2005). PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities in vitro and in vivo. *Cancer biology and therapy*; 4: 874-882. DOI: 10.4161/cbt.4.8.1917.
- Vieira, R.P.; Mulloy, B.; & Mourão, P.A. (1991). Structure of a fucose-branched chondroitin sulphate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-D-glucuronosyl residues. *Journal of biological chemistry*; 21:13530-13536.

Zhang, S.Y.; Khon, A.; & Shahidi, F. (2007). Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed seacucumber (*Cucumaria*

frondosa). *Agriculture Food Chemistry*; 55: 1188-1192. DOI: 10.1021/jf063085h