انتخاب روش بهینه استخراج مایع‌سلومیک توتیای‌دریایی (*Echinometra mathaei*) خلیج‌فارس و شناسایی برخی رنگدانه‌های نفتاکینونی آن

سولماز سلیمانی[۱]، مرتضی یوسف‌زادی[۱*]، سهیلا معین[۲،۳] و نرگس امراللهی بیوکی[۱]

[۱] بندرعباس، دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست‌شناسی‌دریا

[۲] بندرعباس، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

[۳] بندرعباس، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۳۰

چکیده

حفره بدن توتیای‌دریایی با مایع‌سلومیک پرشده که محیط مایع بدن را تشکیل می‌دهد. رنگدانه نفتاکینون موجود در مایع‌سلومیک توتیا، دارای خواص زیستی متعددی ازجمله خاصیت ضدباکتریایی، ضدجلبکی و ضداکسیدانی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، یافتن بهترین روش استخراج مایع‌سلومیک و استخراج سلول‌های آزاد و سلوموسیت‌لیزات از مایع‌سلومیک توتیای‌دریایی گونه *Echinometra mathaei*، شناسایی و سنجش کمی و کیفی رنگدانه‌های نفتاکینونی می‌باشد. استخراج مایع‌سلومیک با چهار روش مختلف انجام شد. کمیت ترکیبات نفتاکینونی هر چهار روش نیز به کمک روش طیف‌سنجی محاسبه و سپس کیفیت آن‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با طیف سنجی جرمی (LC-MS) ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که بهترین روش استخراج مایع‌سلومیک، استفاده از روش بافره است، که می‌توان آن را برای سنجش فعالیت‌های زیستی به کاربرد. هم‌چنین، نتایج حاصل از شناسایی کمی و کیفی رنگدانه‌های موجود در سلول‌های آزاد و سلوموسیت‌لیزات نشان داد که بیش‌ترین رنگدانه‌ها ازنظر کمی، به‌ترتیب، اسپینوکروم A (CF=۱۳/۱، CL=۱۲/۶)، B (CF=۱۱/۲، CL=۱۱/۱)، C (CF=۹/۴، CL=۱۰) و اکینوکروم A (CF=۷/۱، CL=۶/۹) می‌باشند که نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با طیف سنجی جرمی نیز این یافته‌ها را تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: مایع‌سلومیک، سلوموسیت‌لیزات (Coelomocyte Lysate)، سلول‌های آزاد مایع‌سلومیک (Coelomic Fluid)، رنگدانه‌های نفتاکینونی، *Echinometra mathaei*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۸۸۶۱۳۹ ، پست الکترونیکی: Morteza110110@gmail.com

مقدمه

توتیاهای‌دریایی به شاخه خارپوستان (Echinodermata) از بی‌مهرگان دریایی تعلق دارند (۱۷). آن‌ها از موجودات بااهمیت اجتماعات کف دریا هستند (۲) که از منطقه جزرومدی تا اعماق زیاد اقیانوس‌ها گسترش‌یافته‌اند (۱۳) و دارای پنج رده شامل: لاله‌وشان (Crinoidea)، ستاره‌سانان (Asteroidea)، مارسانان (Ophiuroidea)، خارداران (Echinoidea) و خیارسانان (Holothuroidea) هستند (۱) که هریک دارای نقش‌های کلیدی در اکوسیستم‌های دریایی می‌باشند (۵).

خارپوستان دارای اهمیت اقتصادی، تغذیه‌ای–داروئی و بوم‌شناختی می‌باشند (۱). بیش از یک قرن است که توتیاهای‌دریایی به‌عنوان ارگانیسم مدل برای تحقیقات علمی به کار می‌روند. این موجودات به‌طور قابل‌توجهی در بخش‌های علمی مختلف از فرایندهای بیولوژیک، مانند تنظیم بیان ژن، جنین‌شناسی مولکولی، بیولوژی لقاح،

بیولوژی سلولی، بیولوژی تکاملی، ژنتیک جمعیت و سم-شناسی مورداستفاده قرار می‌گیرند. در مقایسه با سایر ارگانیسم‌های مدل بی‌مهره، مثل کرم‌ها (*Caenorhabditis elegan*)، شباهت تاکسونومی توتیای‌دریایی به مهره‌داران ازجمله انسان بسیار قابل‌توجه است (۶).

حفره بدن خارداران با مایع‌سلومیک پرشده که محیط مایع بدن را تشکیل می‌دهد و سلوموسیت‌ها در آن به‌صورت معلق حضور دارند، هم‌چنین این مایع، ارگان‌های داخلی بدن را در برمی‌گیرد. ترکیب مایع‌سلومیک شبیه به آب دریاست و محتوی پروتئین، نمک‌های محلول و دیگر مواد معدنی است (۱۳). واکنش‌های ایمنی این موجودات در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، به‌صورت بروز سلول-های ایمنی و فاکتورهای هومورال در مایع‌سلومیک می‌باشد (۵). در چنین مواقعی مایع‌سلومیک، پاسخ‌های غیرمستقیمی به زخم، عفونت‌های میکروبی، انعقاد، کپسوله کردن و فاگوسیتوز می‌دهد (۱۳).

سه دسته از سلوموسیت‌ها در مایع‌سلومیک توتیای‌دریایی مشاهده شده است (۱۳) که شامل ۷۶ درصد آمبوسیت‌ها (amoebocytes)، ۱۲ درصد سلول‌های ارتعاشی (vibratile cells) و ۱۲ درصد گویچه‌های کوچک قرمز و بی‌رنگ (red and uncoloured spherulocytes) می‌باشد. گزارشاتی در خصوص عملکردهای ایمنی آمبوسیت‌ها و گویچه‌های بی‌رنگ وجود دارد. آمبوسیت‌ها و گویچه‌های‌کوچک، عمده سلوموسیت‌ها را تشکیل می‌دهند. به نظر می‌رسد که آن‌ها در مقابل بسیاری از پاسخ‌های ایمونولوژی ازجمله فاگوسیتوز، سمیت‌سلولی، فعالیت آنتی‌باکتریال، واکنش‌های التهابی، فعالیت آنزیم پروفنولوکسیداز و جفت کردن واکنش‌ها مسئولیت دارند (۵). براساس نتایج مطالعات مختلف، می‌توان خواص زیستی گویچه‌های قرمز را به اکینوکروم‌های A موجود در آن نسبت داد (۱۴). رنگدانه‌ها دارای خواص زیستی متعدد ازجمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به‌خصوص توانایی مهار رادیکال‌های آزاد (۷)، خاصیت سیتوتوکسیک (به علت وجود فاگوسیتوزها) (۱۳) و هم‌چنین خاصیت آنتی‌باکتریال در برابر هر دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی می‌باشند. هم‌چنین براساس گزارشات متعدد اکینوکروم A نقش قابل‌توجهی را در ظهور پاسخ ایمنی در توتیای‌دریایی بازی می‌کند (۱۴).

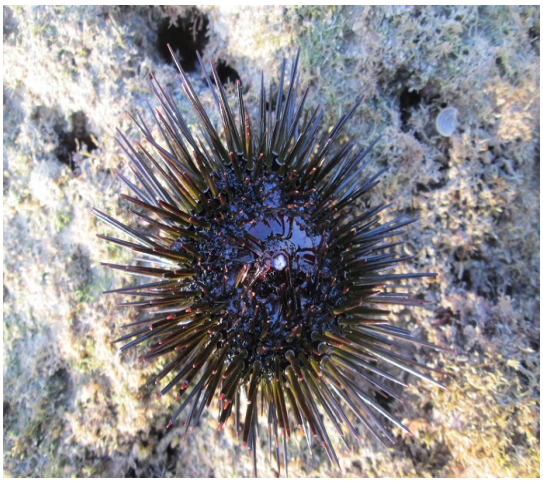
لیدر و گلاسر (۱۹۳۸) برای اولین بار رنگدانه کینوئید (اسپینوکروم‌A) را در خار توتیای‌دریایی (*Paracentrotus lividus*) شناسایی کردند (۹) و از آن زمان به بعد، حدود ۳۰ نوع رنگدانه کینوئید از گونه‌های مختلف توتیای‌دریایی استخراج شد (۱۷). هم‌چنین گزارشاتی در خصوص وجود محدود رنگدانه‌ها، در بخش‌های دیگر بدن آن‌ها مانند مایع‌سلومیک، تخم، تخمدان‌ها و دیگر ارگان‌ها ارائه‌شده است (۴). رنگدانه‌های پلی‌هیدروکسیلات ۱ و ۴ نفتاکینون (PHNQ) موجود در مایع‌سلومیک توتیای‌دریایی، خواص زیستی متعددی ازجمله خاصیت آنتی‌باکتریال، ضدجلبک، ضدبیماری‌های قلبی و آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهند (۱۷). در حالت کلی، به سلول‌های گویچه‌قرمز، آمبوسیت و به سلول‌های گویچه‌کوچک، گرانولوسیت گفته می‌شود. این سلول‌های کوچک، حاوی اکینوکروم A با خاصیت آنتی‌باکتریال هستند (۱۳).

هدف از مطالعه حاضر، یافتن بهترین روش استخراج سلول‌های آزاد و سلوموسیت‌لیزات مایع‌سلومیک توتیای-دریایی گونه *Echinometra mathaei*، شناسایی و سنجش کمی و کیفی رنگدانه‌های نفتاکینونی آن‌ها می‌باشد.

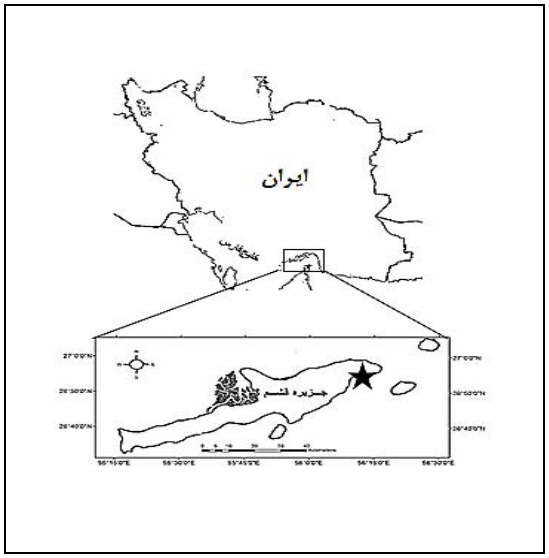
مواد و روشها

توتیاهای‌دریایی گونه *Echinometra mathaei* (شکل۱) در فروردین‌ماه ۱۳۹۳ از ناحیه بین‌جزرومدی ساحل پارک زیتون جزیره قشم واقع در خلیج‌فارس جمع‌آوری گردید (شکل۲). توتیاهای‌دریایی در آب‌دریا با حفظ شرایط بیولوژیک و به‌صورت زنده به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه هرمزگان منتقل شدند.

نمونه‌های جمع‌آوری‌شده جهت شناسایی، به ظروف پلاستیکی محتوی فرمالین ۱۰ درصد منتقل گردید. سپس نمونه‌ها در آزمایشگاه با استفاده از لوپ مورد بررسی و شناسایی قرارگرفتند. سپس مشاهدات حاصل با کلید شناسایی منطقه‌ای مطابقت داده شد (۱۱، ۱۰).



شکل۱- توتیای‌دریایی، گونه مورد مطالعه *Echinometra mathaei*



شکل۲- نقشه مکان نمونه‌برداری که با ستاره سیاه مشخص شده است.

برای استخراج مایع‌سلومیک از توتیای‌دریایی، ابتدا مایع-سلومیک ۳۰ توتیای‌دریایی، پس از برش غشای پریستومیال با استفاده از سرنگ ظریف با سوزن شماره ۱۸، با ۴ روش مختلف به شرح زیر جمع‌آوری و جداسازی گردید و در داخل ظروف استریل ریخته و بلافاصله در یخچال نگه-داری شد.

روش اول: استخراج مایع‌سلومیک بدون استفاده از محلول ایزواسموتیک و ضد انعقاد (۱۶).

روش دوم: استخراج مایع‌سلومیک با استفاده از محلول ایزواسموتیک و ضدانعقاد ۰/۰۵ مولار تریس، ۰/۱۵ مولار سدیم‌کلرید، پی‌اچ برابر با ۸ با نسبت ۱:۲ (۱۵).

روش سوم: استخراج مایع‌سلومیک با استفاده از محلول ایزواسموتیک و ضدانعقاد (ISO-EDTA)۲۰ میلی‌مولار تریس، ۰/۱۵ مولار سدیم‌کلرید، ۷۰ میلی‌مولار EDTA-Na ، پی‌اچ برابر با ۷/۵ با نسبت ۱:۲ (۵).

روش چهارم: استخراج مایع‌سلومیک با استفاده از محلول ایزواسموتیک و ضدانعقاد (ISO-EDTA)۲۰ میلی‌مولار تریس، ۰/۱۵ مولار سدیم‌کلرید، ۷۰ میلی‌مولار EDTA-Na ، پی‌اچ برابر با ۷/۵ و به صورت بافره، که در آن تنها یک بار سرنگ از بافر پر و خالی و یک میلی‌لیتر بافر نیز در ظرف محتوی مایع‌سلومیک ریخته شد.

مایع‌سلومیک بلافاصله پس از استخراج با چهار روش، به مدت ۱۰ دقیقه (با دور ۴۰۰۰ در دقیقه و در ۴ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ و دو فاز (مایع و جامد) تشکیل شد، پس‌ازآن فاز مایع، که درواقع سلول‌های آزاد مایع-سلومیک (CF) هستند از سلوموسیت‌ها (فاز جامد ته‌نشین شده) جدا و در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۵). فاز جامد ته‌نشین شده (پلیت) در مرحله استخراج سلول‌های آزاد مایع‌سلومیک که محتوی سلوموسیت می-باشد، در بافر مربوط به هر روش استخراج، حل شد (پلیت روش اول، در آب دریا فیلتر شده حل شد) و برای ۴ دقیقه در معرض سونیکت در دمای صفر درجه (یک ضربه در ثانیه) قرارگرفت. در این مرحله، سلول‌های درون فاز جامد (پلیت) شکسته شد و محتویات آن‌ها به خارج از سلول ریخته و سپس در دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در

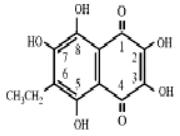
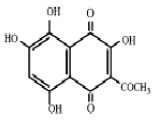
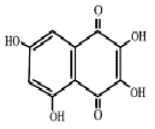
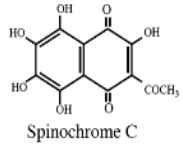
۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در این مرحله نیز دو فاز (مایع و جامد) تشکیل شد. فاز مایع که حاوی محتویات دورن سلول‌ها که همان سلوموسیت‌لیزات (CL) هستند جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فاز جامد در این مرحله نیز حاوی سلول‌های شکسته شده می‌باشد که هیچ استفاده دیگری ندارد و دور ریخته شد (۵ ،۱۶).

شناسایی رنگدانه‌های نفتاکینونی CF و CL ، با استفاده از روش طیف‌سنجی و به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری انجام شد. هم‌چنین میزان هریک از رنگدانه‌ها از طریق ضریب‌خاموشی‌مولی مربوط به آن (جدول۱) مانند، اسپینوکرومA (ε = ۳۳۱۱ در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر)، اسپینوکرومB (ε =۴۸۹۸ در طول‌موج ۴۸۰ نانومتر)، اسپینوکرومC (ε = ۵۸۸۸ در طول‌موج ۴۶۳ نانومتر)، اکینوکرومA (ε = ۷۴۱۳ در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر) و کمیت هر یک از رنگدانه‌ها از طریق فرمول زیر محاسبه گردید (۷).

$$A = \varepsilon cl$$

A میزان نور جذب شده توسط محلول، ε ضریب خاموشی‌مولی (مول بر لیتر بر سانتی‌متر)، c غلظت ماده مورد نظر (مول بر لیتر)، l مسافتی که نور طی می‌کند (قطر کووت، ۱ سانتی‌متر).

جدول۱- ساختار شیمیایی، وزن مولکولی و طول موج بالاترین جذب رنگدانه‌های عمده نفتاکینون در توتیای‌دریایی‌ارغوانی(۷)

ساختارشیمیایی رنگدانه‌ها	 Echinochrome A	 Spinochrome A	 Spinochrome B	 Spinochrome C
وزن مولکولی	۲۶۶/۰۴	۲۶۴/۰۳	۲۲۲/۰۲	۲۸۰/۰۲
طول‌موج بالاترین جذب(نانومتر)	۴۹۰ ۳۴۳	۵۲۰ ۳۱۷	۴۸۰ ۳۸۵ ۳۲۳	۴۶۳ ۲۸۵

جدول۲-نتایج به‌دست آمده از استخراج مایع سلومیک در روش‌های مختلف آزمایش

	روش اول	روش دوم	روش سوم	روش چهارم
مایع سلومیک	منعقد شد	اندکی منعقد شد (رگه رگه)	منعقد نشد ولی رقیق بود	منعقد نشد و تقریبا غلظتی برابر با روش اول داشت

بعد از اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌ها و شناسایی مقدماتی توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، به منظور تایید وجود رنگدانه‌ها از روش کروماتوگرافی مایع با طیف سنجی جرمی استفاده گردید. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Excel ۲۰۱۰ و SPSS ۱۹ انجام شد. برای تعیین تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌ها از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (در سطح ۹۵ درصد) و آزمون دانکن استفاده گردید.

نتایج

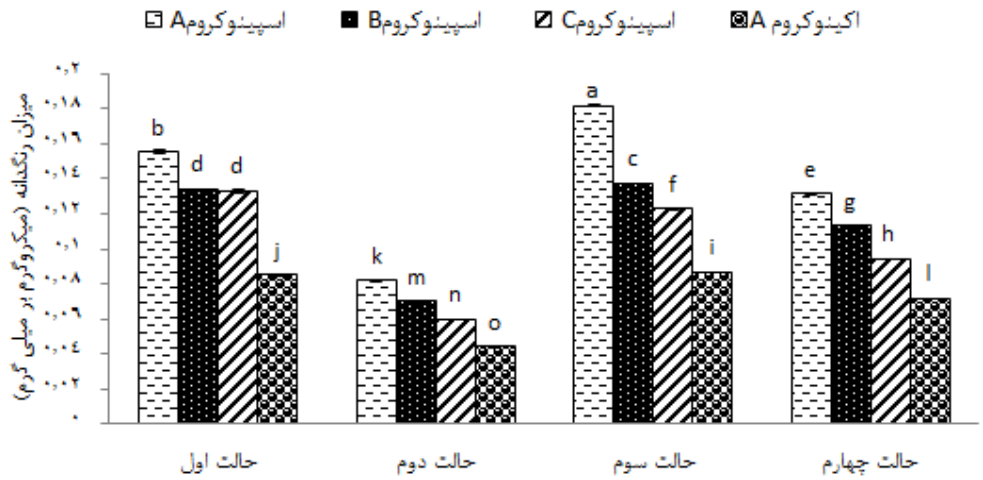
با مقایسه خصوصیات ظاهری توتیای‌دریایی با کلیدهای شناسایی منطقه‌ایی، گونه *Echinometra mathaei* برای نمونه توتیای‌دریایی مورد آزمایش در این مطالعه تشخیص داده شد.

نتایج حاصل از استخراج ۴۰ میلی‌لیتر مایع‌سلومیک توتیای-دریایی *E. mathaei* به‌صورت بافره نشان داد که از این میزان، به ترتیب، ۶۸/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سلول‌های

آزاد مایع‌سلومیک (CF) و ۱۴/۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سلوموسیت‌لیزات (CL) استخراج شد.

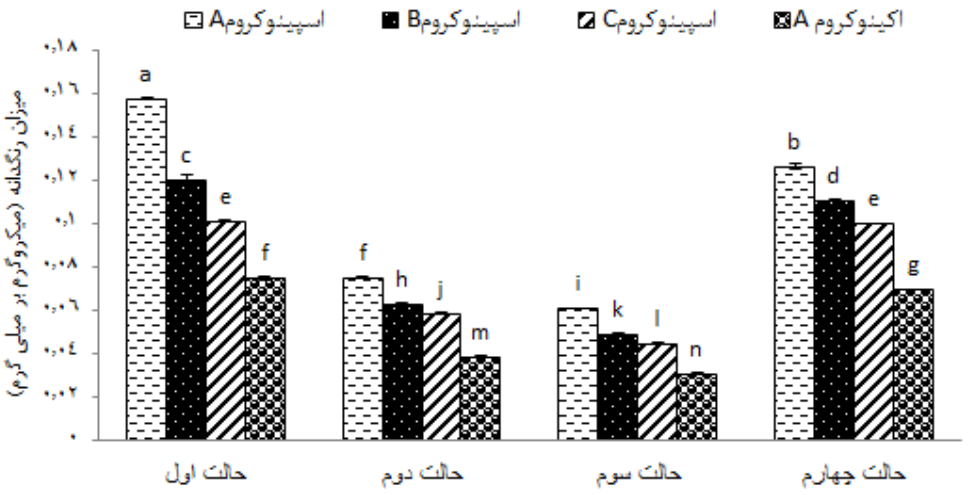
نتایج حاصل از استخراج مایع‌سلومیک در روش‌های مختلف نشان داد که مایع‌سلومیک، در روش اول و دوم منعقد شد. اما این انعقاد در روش دوم کم‌تر و تنها به‌صورت رگه‌هایی مشاهده گردید. درحالی که در مایع‌سلومیک استخراج‌شده با روش‌های سوم و چهارم انعقادی مشاهده نشد. غلظت نهایی آن‌ها، تفاوت این دو روش را نشان می‌دهد، که روش سوم به دلیل استفاده از حجم بیش‌تر بافر (نسبت ۱:۲) نسبت به روش چهارم (یک میلی‌لیتر) رقیق‌تر بود. همان‌طور که از نتایج جدول ۲ مشخص است بهترین روش استخراج، استفاده از روش بافره است.

میزان رنگدانه‌های موجود در CF و CL در هریک از حالات استخراج مایع‌سلومیک نیز به ترتیب در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۱- میزان رنگدانه‌های سلول‌های آزاد مایع‌سلومیک (CF) استخراج شده با روش‌های مختلف از مایع‌سلومیک (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ ≥ P است.



نمودار ۲- میزان رنگدانه‌های سلوموسیت‌های (CL) استخراج شده با حالات مختلف از مایع سلومیک (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ ≥ P است.

بیش‌ترین میزان رنگدانه اسپینوکروم A و B در CF حاصل از روش سوم استخراج، مشاهده شد. درحالی‌که کم‌ترین میزان رنگدانه اسپینوکروم A و B در CF روش دوم اندازه-گیری شد. همان‌گونه که از نمودار ۱ برمی‌آید، در CF حاصل از روش اول استخراج نیز، رنگدانه اسپینوکروم B قابل‌توجهی مشاهده شد که براساس شاخص‌های آماری نیز تفاوت معنی‌داری بین دو روش وجود ندارد. بیش‌ترین میزان اسپینوکروم C درروش اول و کم‌ترین میزان آن درروش دوم نشان داد. CF حاصل از روش سوم دارای بیش‌ترین میزان رنگدانه اکینوکروم A بوده است و کم‌ترین میزان این رنگدانه در روش دوم مشاهده گردید. براساس نتایج حاصل از میزان رنگدانه‌ها (نمودار ۱)، اختلاف معنی‌داری بین میزان رنگدانه‌ها در روش‌های مختلف استخراج مایع‌سلومیک مشاهده شد (P≤ ۰/۰۵).

CL استخراج‌شده از مایع‌سلومیک درروش اول، دارای بیش‌ترین میزان رنگدانه اسپینوکروم A بوده است درحالی که کم‌ترین میزان این رنگدانه درروش سوم مشاهده شد. در خصوص رنگدانه اسپینوکروم B نیز بیش‌ترین میزان در روش اول و کم‌ترین آن در روش سوم اندازه‌گیری شد. هم‌چنین، CL حاصل از روش اول دارای بیش‌ترین میزان اسپینوکروم C است درصورتی‌که کم‌ترین میزان رنگدانه اسپینوکروم C درروش سوم دیده می‌شود. براساس نتایج، روش چهارم نیز دارای میزان قابل ملاحظه‌ایی اسپینوکروم C می‌باشد که در مقایسه با روش اول تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

نتایج حاصل در مورد استخراج رنگدانه اکینوکروم A نشان داد که بیش‌ترین میزان این نوع رنگدانه در CL استخراج‌شده از روش اول و کم‌ترین میزان آن درروش سوم وجود دارد. براساس نتایج درروش کلی، میزان رنگدانه‌های استخراجی از مایع‌سلومیک در روش‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌داری هستند (P≤ ۰/۰۵)(نمودار ۲).

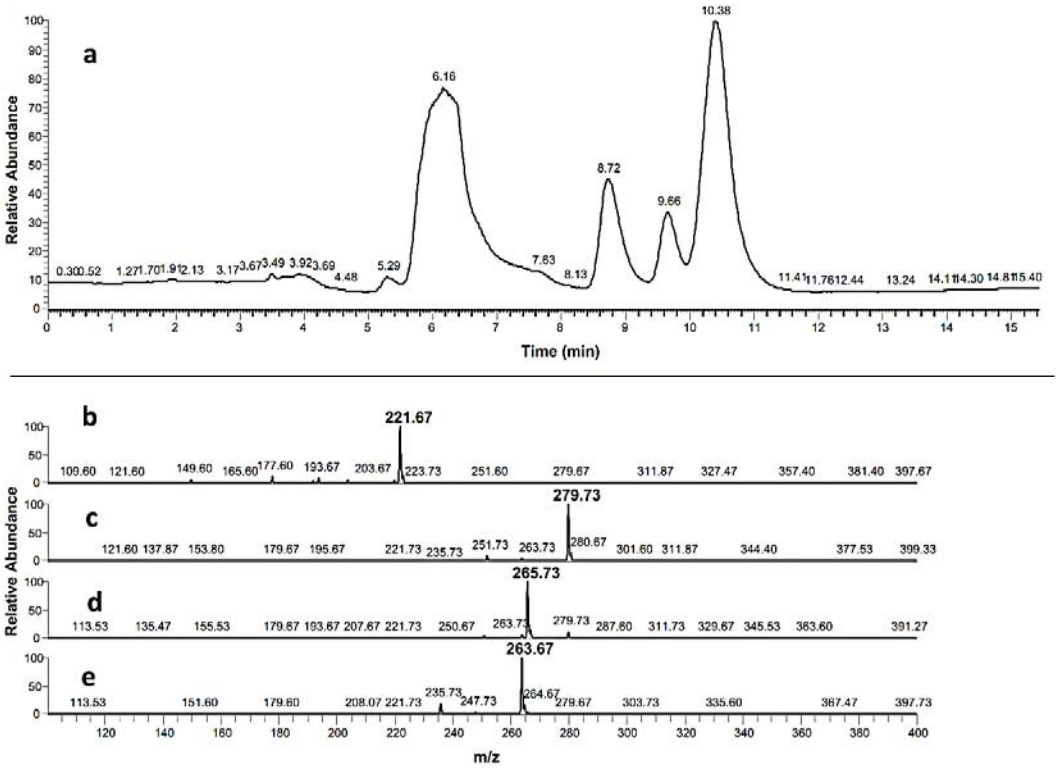
میزان درصد هریک از رنگدانه‌ها در CL و CF حاصل از چهار روش استخراج مایع سلومیک، در حجمی برابر با ۱ میلی‌لیتر، در جدول ۳ نشان داده‌شده است.

جدول ۳- درصد رنگدانه‌ها در CL و CF روش‌های مختلف استخراج مایع‌سلومیک در یک میلی‌لیتر

	اسپینوکروم A	اسپینوکروم B	اسپینوکروم C	اکینوکروم A
CF روش اول	۱۵/۵	۱۳/۳	۱۳/۲	۸/۴
CL روش اول	۱۵/۷	۱۲/۰	۱۰/۱	۷/۵
CF روش دوم	۸/۱	۶/۹	۵/۹	۴/۴
CL روش دوم	۷/۵	۶/۳	۵/۸	۳/۸
CF روش سوم	۱۸/۱	۱۳/۶	۱۲/۲	۸/۶
CL روش سوم	۶/۱	۴/۸	۴/۴	۳/۰
CF روش چهارم	۱۳/۱	۱۱/۲	۹/۴	۷/۱
CL روش چهارم	۱۲/۶	۱۱/۱	۱۰/۰	۶/۹

کروماتوگرافی هریک از رنگدانه‌ها در رایج‌ترین طول‌موج آن‌ها (۲۸۵، ۳۱۷، ۳۲۳ و ۳۴۳ نانومتر به ترتیب برای اسپینوکروم C، اسپینوکروم A، اسپینوکروم B و اکینوکروم A) ثبت شد. ازآنجایی‌که آن‌ها به‌طور کامل در طیف‌ها و طول‌موج‌های مختلف قرار دارند هریک از رنگدانه‌ها حضور خود را در رنگدانه‌های پلی‌هیدروکسیلات نفتاکینون تأیید می‌کنند.

برای تأیید بیش‌تر با استفاده از کروماتوگرافی مایع در حالت منفی انجام شد. شکل ۳ کل یون کروماتوگرام را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده‌شده است، با استفاده از HPLC-DAD چهار قله به دست آمد. ازآنجایی‌که در طیف‌سنج جرمی در حالت منفی، همه رنگدانه‌ها در یون [M–H] ظاهر شد. درنتیجه، یون‌ها در M/Z ۲۲۱، ۲۷۹، ۲۶۵ و ۲۶۳ به ترتیب، اسپینوکروم B، اسپینوکروم C، اکینوکروم A و اسپینوکروم A را نشان داد.



شکل ۳- (a) LC-ESI-MS کل یون (TIC، در حالت منفی) رنگدانه‌های PHNQ و مشخصات رنگدانه‌های PHNQ مورد مطالعه و (b، c، d و e) طیف آن‌ها؛ b، c، d و e به‌ترتیب، با اسپینوکروم B، اسپینوکروم C، اکینوکروم A و اسپینوکروم A متناظر است.

بحث

در مطالعه حاضر، در استخراج مایع‌سلومیک با روش اول، مایع‌سلومیک به سرعت منعقد شد که این مسئله باعث بروز مشکلاتی در جداسازی CF و CL می‌گردد. این در حالی است که استبیلی و همکاران (۱۹۹۶) مایع‌سلومیک توتیای‌دریایی *Paracentrotus lividus* را بدون استفاده از بافر استخراج و خاصیت آنتی‌باکتریال آن را مورد بررسی قراردادند (۱۶). در استخراج مایع‌سلومیک با روش دوم، مایع‌سلومیک به میزان اندکی منعقد شد. درحالی‌که استبیلی و همکاران (۱۹۹۲)، مایع‌سلومیک را مطابق با روش دوم استخراج نمودند و فعالیت همولیتیک آن را آزمایش کردند (۱۵). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که استخراج مطلوب مایع‌سلومیک، با استفاده از بافر روش سوم و چهارم می‌باشد. هم‌چنین، مطالعات آریزا و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان داد که استخراج مایع‌سلومیک توتیای-دریایی با استفاده از بافر روش سوم جهت سنجش فعالیت سیتوتوکسیک و کشت سلوموسیت‌ها مناسب است (۵).

استخراج مطلوب مایع‌سلومیک، در روش سوم و چهارم به علت حضور EDTA-Na در بافر مربوطه اتفاق می‌افتد که مانع از انعقاد مایع‌سلومیک می‌شود. در مقایسه این دو روش، بهترین روش استخراج، مربوط به روش چهارم می باشد که در آن انعقادی صورت نمی‌گیرد و محلول یکنواختی مشاهده می‌شود. هم‌چنین، به علت استفاده از تنها، یک میلی‌لیتر بافر مربوطه، مایع‌سلومیک استخراج‌شده در این روش غلظت خود را حفظ می‌نماید و برای سنجش ترکیبات و فعالیت‌های زیستی مناسب است.

رنگدانه‌های بررسی‌شده در این مطالعه، ترکیبی از هیدروکسیلات نفتاکینون است که احتمالاً داری چندین گروه هیدروکسیل در مولکول می‌باشد. بنابراین، میزان درصد هریک از رنگدانه‌های اسپینوکروم A، B، C و اکینوکروم A موجود در سلول‌های آزاد مایع‌سلومیک و سلوموسیت‌لیزات در حجم یک میلی‌لیتر محاسبه گردید که در جدول ۳ مشاهده شد. هم‌چنین، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این جدول می‌توان با اطمینان بیش‌تری بیان کرد که محتویات موجود در مایع‌سلومیک استخراج‌شده با روش‌های اول و چهارم تقریباً برابر است.

کواهارا و همکاران (۲۰۰۹) رنگدانه اسپینوکروم A را در پوسته توتیای‌دریایی ارغوانی (*Anthocidaris crassispina*) شناسایی کردند و میزان این رنگدانه را نسبت به وزن خشک اولیه پوسته، ۰/۱ درصد بیان نمودند (۸). این درحالی است که گزارش دیگری درباره کمیت رنگدانه‌ها مطرح نشده است. به‌علاوه، تاکنون گزارشی از شناسایی رنگدانه‌های موجود در مایع‌سلومیک ارائه نشده و مطالعه حاضر اولین تلاش در خصوص شناسایی و بیان کمیت رنگدانه‌های موجود در مایع‌سلومیک می‌باشد.

نتایج LC-MS نیز تأیید می‌کند که این‌گونه از توتیای‌دریایی (*E. mathaei*) حاوی رنگدانه پلی‌هیدروکسیلات نفتاکینون (PHNQ) مشابه با دیگر توتیاهای‌دریایی است. درواقع، اسپینوکروم‌های اصلی و اکینوکروم‌های مشتق شده در توتیاهای‌دریایی ارغوانی *Stronglycentrotus nudus* (۱۷) و *Anthocidaris crassipina* (۷) به رنگدانه‌های شناسایی‌شده در گونه مورد مطالعه در این تحقیق شبیه بود. بنابراین، انتظار نمی‌رود که میزان رنگدانه‌های شناسایی‌شده در توتیاهای‌دریایی قرمز- قهوه‌ای *Psammechinus miliaris* (۹) و *Stronglycentrotus franciscanus* (۳) و توتیاهای‌دریایی سبز *Stronglycentrotus droebachiensis* (۱۱،۳) و این‌گونه توتیای‌دریایی ارغوانی متفاوت باشند.

درواقع تفاوت در ترکیب رنگدانه پلی‌هیدروکسیلات نفتاکینون در گونه‌های مختلف توتیای‌دریایی بارنگ‌های متفاوت بیان‌شده است، که احتمالاً علت آن، تفاوت در نمک‌های تشکیل‌دهنده رنگدانه، کلسیم یا منیزیم موجود در پوسته و خار و یا اختلاف پی‌اچ به وجود آمده باشد (۳).

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه و هم‌چنین گزارشات پیشین، بهترین روش استخراج مایع‌سلومیک، استفاده از روش بافره است که می‌توان جهت بررسی خواص بیولوژیک از آن استفاده کرد. هم‌چنین، بیش‌ترین میزان رنگدانه‌ها، در CF و CL تمام حالات استخراج مایع-سلومیک، به‌ترتیب، اسپینوکروم A، B، C و اکینوکروم A می‌باشد که با توجه به نقش و کاربرد رنگدانه‌های موجود در مایع‌سلومیک، پیشنهاد می‌شود ضمن تخلیص رنگدانه‌ها و تعیین نقش اختصاصی هریک از آن‌ها، برای ساخت ترکیبات از این مواد اقدام شود.

نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که مایع‌سلومیک توتیای‌دریایی *E. mathaei* به علت دارا بودن رنگدانه‌های مختلف و با توجه به نقش هریک از آن‌ها، می‌تواند در صنایع دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه هرمزگان با شماره قرارداد ۹۳/۲۰۰/۷۴ صورت گرفته است.

منابع

۱- خالقی، م.، صفاهیه، ع.، سواری، الف.، دوست‌شناس، ب.، و عوفی، ف.، ۱۳۹۱. بررسی تراکم و الگوی پراکنش و پایداری توتیای-دریایی (Echinoidea: *Stomopneustes variolaris*) در نواحی بین جزرومدی خلیج چابهار، مجله اقیانوس شناسی، شماره ۹، صفحات ۱۵-۹.

۲- شکوری، آ.، نبوی، س.م.، کوچنین، پ.، سواری، الف.، و صفاهیه، ع.، ۱۳۹۱. بررسی الگوی پراکنش و پایداری خیارهای دریایی در ناحیه شرقی خلیج چابهار، مجله اقیانوس‌شناسی، شماره ۱۲، صفحات ۱۸-۱۱.

3- Amarowicz, R., Synowiecki, J., and Shahidi, F., 2012. Chemical composition of shells from red (*Strongylocentrotus franciscanus*) and green (*Strongylocentrotus droebachiensis*) sea urchin. Food Chemistry, 133, PP: 822–826.

4- Anderson, H.A., Mathieson, J.W., and Thomson, R.H., 1969. Distribution of Spinochrome Pigments in Echinoids. Comparative Biochemistry and Physiology, 28, PP: 333- 345.

5- Arizza, V., Giaramita, F.T., Parrinello, D., Cammarata, M., and Parrinello, N., 2007. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. Comparative Biochemistry and Physiology, 147, PP: 389–394.

6- Bodnar, A., 2013. Proteomic profiles reveal age-related changes in coelomic fluid of sea urchin species with different life spans. Experimental Gerontology, 48, PP: 525–530.

7- Kuwahara, R., Hatate, H., Chikami, A., Murata, H., and Kijidani, Y., 2010. Quantitative separation of antioxidant pigments in purple sea urchin shells using a reversed-phase high performance liquid chromatography. LWT-Food Science and Technology, 43, PP: 1185-1190.

8- Kuwahara, R., Hatate, H., Yuki, T., Murata, H., Tanaka, R., and Hama, Y., 2009. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina*. LWT - Food Science and Technology, 42, PP: 1296–1300.

9- Lederer, E., Glaser, R., 1938. Sur l'echinochrome et le spinochrome. C R Hebd Seanc Acad Sci Paris 207:454–456.

10- Powell, C., Hughes, A.D., Kelly, M.S., Conner, S., and McDougall, G.J., 2014. Extraction and identification of antioxidant polyhydroxynaphthoquinone pigments from the sea urchin, *Psammechinus miliaris*. LWT - Food Science and Technology, 59, PP: 455-460.

11- Price, A.G., 1983. Fauna of Saudi Arabia, Echinoderms of Saudi Arabia, Echinoderms of the Persian Gulf coast of Saudi Arabia, 28, PP: 29-109.

12- Price, A.G., 1986. A field guide to the sea shores of Kuwait and the Persian Gulf, Phylum Echinodermata. Blandrdford Press, 32, PP: 16-95.

13- Smith, L.C., Ghosh, J., Buckley, K.M., Clow, L.A., Dheilly, N.M., Haug, T., Henson, J.H., Li, C., Lun, C.M., Majeske, A.J., Matranga, V., Nair, S.V., Rast, J.P., Raftos, D.A., Roth, M., Sacchi, S., Schrankel, C.S., and Stensvag, K., 2010. Echinoderm Immunity. Söderhäll, K., (ED). Handbook of Invertebrate Immunity. Landes Bioscience and Springer+Business Media. McGraw−Hill, PP: 260-274.

14- Smith, L.C., Rast, J.P., Brockton, V., Terwilliger, D.P., Nair, S.N., Buckley, K.M., and Majeske, A.J., 2006. The sea urchin immune system. Invertebrate Survival Journal, 3, PP: 25-39.

15- Stabili, L., Pagliara, P., Metrangolo, M., and Canicatti, C., 1992. Comparative aspects of echinoidea cytolysins: The cytolytic activity of *Spherechinus Granularis* (echinoidea) coelomic fluid. Comparative Biochemistry and Physiology. A,101, PP: 553-556.

16- Stabili, L., Pagliara, P., and Roch, P.h., 1996. Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Comparative Biochemistry and Physiology. B,113, PP: 639-644.

17- Zhou, D.Y., Qin, L., Zhu, B.W., Wang, X.D., Tan, H., Yang, J.F., Li, D.M., Dong, X.P., Wu, H.T., Sun, L.M., Li, X.L., and Murata, Y., 2011. Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. Food Chemistry, 129, PP: 1591–1597.

Selection Optimization Extract Coelomic fluid of Sea urchin (*Echinometra mathaei*) from the Persian Gulf and Identification Naphtaquinone Pigments

Soleimani S.[1], Yousefzadi M.[1], Moein S.[2,3] and Amrollahi Bioki N.[1]

[1] Marine Biology Dept., Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, I.R. of Iran

[2] Molecular Medicine Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, I.R. of Iran

[3] Biochemistry Dept., Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, I.R. of Iran

Abstract

The body cavity of sea urchin is filled with coelomic fluid, which forms the body's fluid medium. The naphthoquinone pigments were found to possess excellent antimicrobial, antialgal and antioxidant activitiespo. The aim of the present research was undertaken to study the find optimization of coelomic fluid isolation, extraction of free cells and coelomocyte lysate and also identification qualitative and quantitative of pigments of coelomic fluid *Echinometra mathaei*. Coelomic fluid was isolated by four types, The amount of quantity and quality of pigments Measured in the four types using a spectrophotometer and LC-MS. According to the results of the study, optimization extract of coelomic fluid, buffered mode, which it can be used to measure the biological activity. With regard to this, the result showed that pigments of free cells and coelomocyte lysate were Spinochorome A, B, C and Echinochorome A, respectively. Also, The results of LC-MS confirmed these findings.

Key word: Coelomic fluid, Coelomocyte lysate (CL), free cells (CF), naphthoquinone pigments, *Echinometra mathaei*