



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

## محتویات کیفی و کمی ساپونین در پنج خیار دریایی از اقیانوس هند

### چکیده :

برای جلوگیری از شکار شدن، holothuroid ها مولکول های ضدغذایی در دیواره بدن و احشاء خود تولید می کنند که ساپونین نام دارند. پنج گونه ی خیار دریایی از خانواده ی Holothuriidae برای مطالعه ی محتوای ساپونین در دو اندام مختلف، دیواره بدن و لوله های Cuvierian بررسی شدند. روش های طیف سنجی جرمی (MALDI و ESI-MS) برای شناسایی و آنالیز ساپونین ها استفاده شدند. کمترین ساپونین ها در *Holothuria atra* مشاهده شد که چهار جزء داشت، سپس *Holothuria leucospilota*. *Pearsonothuria graeffi* و *Actinopyga echinites* به ترتیب با شش، هشت و ده جزء. *Bohadschia subrubra* بیشترین تنوع ساپونین (19 جزء) را دارد. ترکیب های ساپونین نیز بین دو بخش بدن در یک حیوان متفاوت بودند. یک رویکرد نیمه کمی این نتایج را کامل کرد و نشان داد که تنوع زیاد ساپونین ها به طور خاص با غلظت بالای ساپونین همراه نیست. اگرچه پیچیدگی ترکیب های ساپونین، روشن سازی نقش های زیستی آنها را دشوار می کند، مقایسه های بین گونه ها و بین اجزاء بدن درباره ی چگونگی عمل این مولکول ها به عنوان دافع سرخ هایی می دهد.

**کلیدواژه ها:** Holothuriidae؛ گلیکوزیدهای تری ترپنی؛ طیف سنجی جرمی متوالی؛ همولیز؛ واکنش

اورسینول

### 1. مقدمه

Holothurid ها، یا خیارهای دریایی، حیوانات دریایی هستند که با حرکت آهسته و نبود دفاع ساختاری قوی شناسایی می شوند. در نتیجه، در معرض شکار هستند. به عنوان دفاع، بیشتر خیارهای دریایی، در دیواره ی بدن و احشاء خود، متابولیت های ثانویه به نام ساپونین دارند. ساختار آنها بر اساس تری ترپن نوع لانوسترول با حلقه

ی D متمایز دارای اسکلت گاما لاکتون به نام هولوستان و زنجیر کربوهیدرات با حداکثر شش قند مثل گلوکز (Glc)، 3-او-متیل گلوکز (MeGlc)، کوپینوز (Qui) و زایلوز (Xyl) می باشد. به علاوه، در بعضی گونه ها، گروه های سولفات ممکن است در محل های خاص واحدهای قند وجود داشته باشند. چون این ترکیبات گستره ی وسیعی از فعالیت های دارویی را دارند، مطالعات متعدد در حال حاضر برای شناسایی اجزای جدید و منابع طبیعی جدید از ساپونین ها انجام می شوند.

از طرف دیگر، نقش های زیستی ساپونین ها در holothuroid ها هنوز مورد بحث است. در دیواره ی بدن فراوان هستند که علاوه بر نقش آن به عنوان مانع فیزیکی محافظ حیوان، بزرگترین اندام بدن نیز هست. همچنین به نظر می رسد به خصوص در لوله های Cuvierian، یک سیستم دفاعی مخصوص توسعه یافته در بعضی گونه های خیار دریایی از خانواده ی Holothuriidae، متمرکز باشند. این اندام، واقع در بخش خلفی حیوان، چند لوله دارد که می تواند پس از تحریک دفع شود. لوله های دفع شده به رشته های سفید چسبنده تبدیل می شوند که می توانند شکارچی ها را به دام بیندازند. با این وجود، تا به امروز، فقط نویسندگان کمی تفاوت های کیفی و کمی بین ساپونین های دیواره ی بدن و لوله ی Cuvierian را بررسی کرده اند (Kobayashi et al).

مطالعات اخیر نشان داده اند که روش های طیف سنجی جرمی (MS) برای شناسایی ساپونین ها بسیار ارزشمندند. درواقع، با استفاده از روش های MS مثل MALDI-MS (واجذب/یونش لیزری به کمک ماتریس-طیف سنجی جرمی) و LC-MS (کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی)، می توانیم تفاوت های قابل ملاحظه بین ترکیب های ساپونین از دیواره بدن و لوله های Holothuria forskali Cuvierian را روشن کنیم. در این گونه ها، که اولین بار توسط Rodriguez مطالعه شدند، فقط پنج ساپونین بدون نشانه ای از اندام مبدأ توصیف شدند. با استفاده از MS، 12 ساپونین مختلف را در دیواره بدن و 26 تا در لوله های Cuvierian شناسایی کردیم و اجزای ایزومر زیادی را یافتیم. در ادامه ی بررسی گلیکوزیدهای تری ترین از خیارهای دریایی خانواده ی Holothuriidae، مقایسه ی بزرگ مقیاسی روی ساپونین های پنج گونه ی

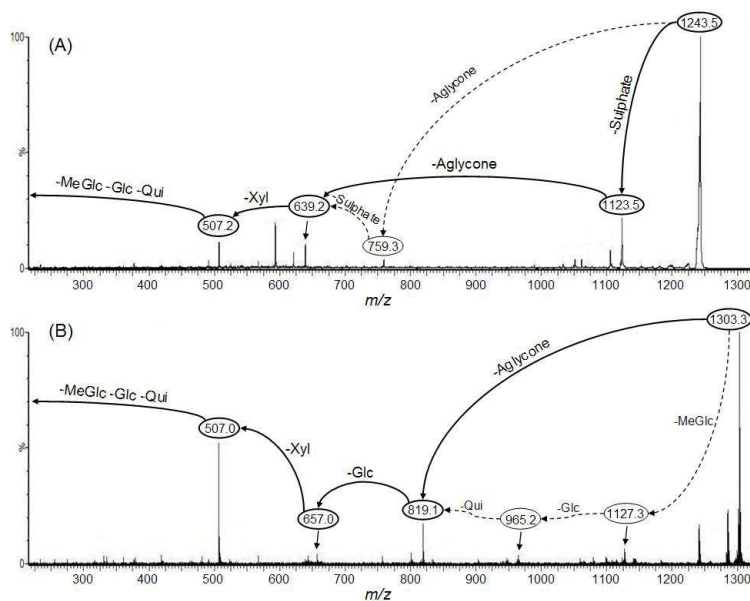
گرمسیری از اقیانوس هند انجام دادیم. روش های MS برای شناسایی و آنالیز ساپونین ها استفاده شدند و مطالعه ی نیمه کمی نیز برای مقایسه ی کل محتویات ساپونین انجام شد. توجه خاص به تفاوت های بین دیواره بدن و لوله های Cuvierian در هر گونه پرداخته شد.

## 2. نتایج

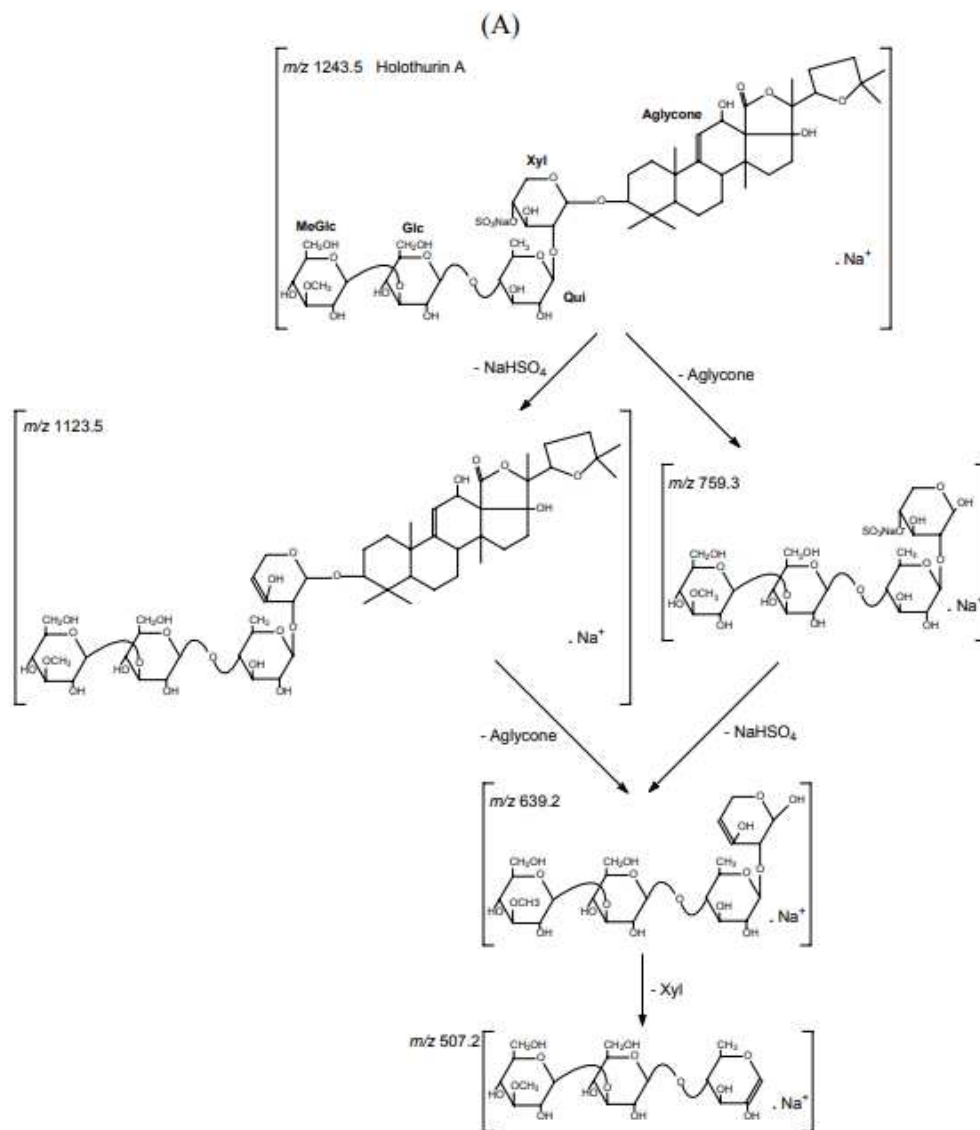
### 2.1 مطالعه ی کیفی

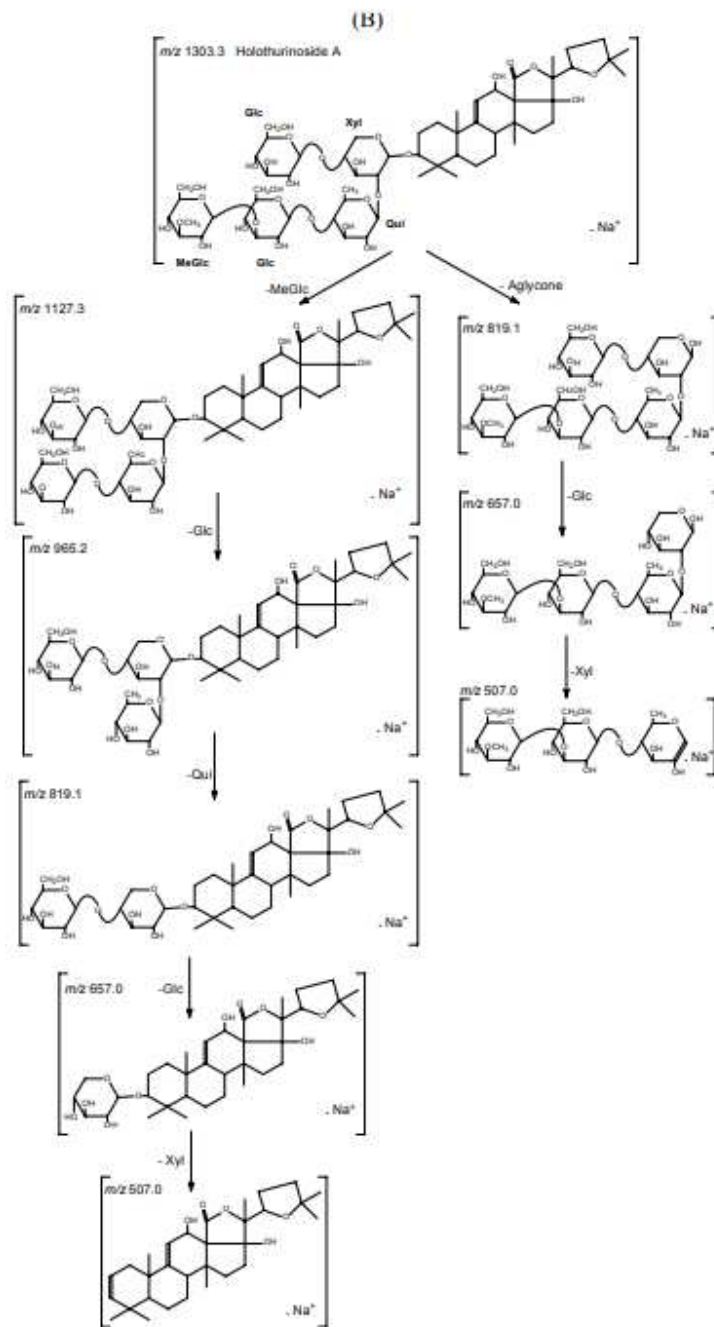
ساپونین های پنج گونه استخراج شدند و با استفاده از MALDI-MS/MS و LC-MS/MS آنالیز شدند. روش MALDI-MS برای شناسایی و آنالیز مستقیم ترکیب های ساپونین استفاده شد، درحالی که روش LC-MS برای جداسازی کروماتوگرافی ایزومرها انجام شد (شکل تکمیلی 1). درواقع، درکار قبلی، وجود ایزومرها را در ترکیب های ساپونین نشان دادیم. همه ی روش های استخراج و تخلیص و آنالیزهای طیف سنجی جرمی مشابه Van Dyck بود.

شکل 1. مقایسه بین الگوهای تقسیم در اثر برخورد (A) holothurin A و (B) holothurinoside A. فلش های کامل و نقطه دار دو الگوی تقسیم ممکن هستند (رجوع به شکل 2 برای ساختارهای مولکولی این ساپونین ها و قطعه های آنها).



به عنوان مثال، شکل 1 گستره ی MS متوالی یون های holothurin A (1) و holothurinoside A (10) را نشان می دهد. قابل ذکر است که یون های مشاهده از کاتیونیزاسیون (اتصال یون سدیم) مولکول های خنثی روی ESI یا MALDI به دست می آید. بر اساس گستره ی MS/MS و Van Dyck، ساختارهای مولکولی ساپونین ها با شناسایی انتقال های جرمی بین قله های متوالی تقسیم در اثر برخورد به دست می آید. به عنوان مثال، شکل 1A، دو توالی رقابتی تجزیه را با فلش نشان دهنده ی از دست رفتن پیایی سدیم مونوهیدروژن سولفات (NaHSO<sub>4</sub>)، آگلیکون، زایلوز، کوپینوز، گلوکز و 3-او-متیل گلوکز از یون های holothurin A (1) (1243.5 m/z) نشان می دهد. این توالی تقسیم در شکل 2A آمده است. به طور مشابه، شکل 1B از دست رفتن پیایی آگلیکون، گلوکز و زایلوز و به طور رقابتی کوپینوز، گلوکز و 3-او-متیل گلوکز را نشان می دهد (همچنین شکل 2B). شناسایی این توالی تقسیم باعث شناسایی یون ها با 1303.3 m/z به عنوان کاتیون holothurinoside A (10) می شود.





شکل 2. (A) تقسیم در اثر برخورد کاتیون های  $m/z$  holothurin A 1243.5. (B). تقسیم در اثر برخورد

کاتیون های  $m/z$  holothurin A 1303.3: Glc، گلوکز، MeGlc: 3-او-متیل گلوکز، Qui:

کویینوز، Xyl: زایلوز.

تفاوت اصلی بین هر دو طیف MS/MS وجود گروه سولفات در holothurin A (1) است. وجود گروه سولفات با یون  $m/z$  1123.5 تأیید شد (شکل 1A) که با از دست رفتن 120 amu (واحد جرم اتمی) ( $\text{NaHSO}_4$ ) از یون های اولیه به دست می آید. از دست رفتن 120 amu از یون اولیه به طور قطع نشان دهنده ی وجود گروه سولفات روی ساپونین است. از طرف دیگر، هر دو طیف MS/MS سیگنال کلیدی  $m/z$  507 را به عنوان نشانه ی زنجیره ی اولیگوساکارید MeGlc-Glc-Qui، درواقع [MeGlc-Glc-Qui+Na+] دارند.

آنالیزهای مشابه طیف سنجی جرمی برای همه ی عصاره های ساپونین دیواره بدن و لوله های Cuvierian از پنج گونه ی موردبررسی انجام شدند. برای هر آنالیز، الگوهای تقسیم مشخص شدند و ساختارهای ساپونین روشن یا پیشنهاد شدند. درواقع، در بیشتر موارد، مرور مطالعات باعث شناسایی ساپونین ها شد. وقتی شناسایی ممکن نبود، ساختارهای مولکولی به طور آزمایشی پیشنهاد شدند. با این وجود، بعضی ساپونین های ایزومری شناسایی نشدند و فقط جرم های مولکولی برای بررسی های بعدی گزارش شدند. جدول 1 نتایج این آنالیزها را خلاصه می کند و ساختارهای مولکولی شناسایی و پیشنهاد شده در شکل های 3 تا 5 آمده است.

**جدول 1.** ساپونین های شناسایی شده در دیواره بدن (BW) و لوله های Cuvierian (CT) در پنج گونه ی holothuriidae (S: ساختار مولکولی؛ MW: وزن مولکولی). مولکول های نشان داده شده با ضربدر پررنگ، اجزای اصلی هستند.



Saponin name	MW	S	<i>Actinopyga echinites</i>		<i>Bohadschia subrubra</i>		<i>Holothuria atra</i>	<i>Holothuria leucospilota</i>		<i>Pearsonothuria graeffei</i>		References
			BW	CT	BW	CT	BW	BW	CT	BW	CT	
<b>Non-sulfated saponins</b>												
Holothurinoside C	1102	11								x		[19]
Desholothurin A (Nobiliside 2a)*	1118	15						x	x	x		[19,20]
Holothurinoside K <sub>1</sub> **	1134	20			x							
Holothurinoside E <sub>1</sub>	1264	16						x				[18]
Holothurinoside F	1410	12			x							[18]
Bivittoside C	1410	22				x						[21]
Impatienside A (Marmoratoside A)*	1424	24			X	x						[23,24]
Isomer	1424					x						
Isomer	1424					x						
Bivittoside D	1426	23				X		x	x			[21]
Isomer	1426					x						
Holothurinoside H	1440	13			x	x						[18]
Holothurinoside H <sub>1</sub>	1440	17			X	x						[18]
Isomer	1440				x							
Isomer	1440				x							
Arguside C	1442	21				x						[22]
Holothurinoside I	1456	14			x	x						[18]
Holothurinoside I <sub>1</sub>	1456	18			x	x						[18]
Isomer	1456				x							

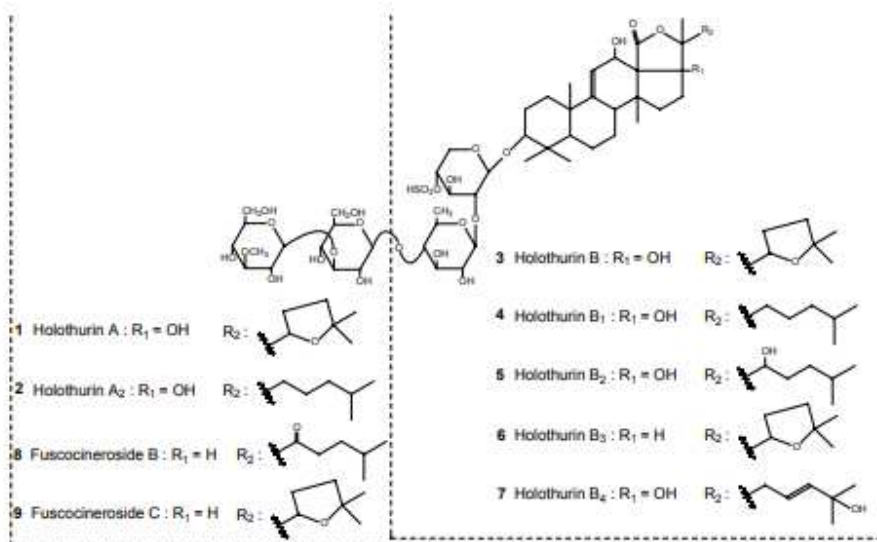
Isomer	1456				x							
Isomer	1456				x							
Holothurinoside J <sub>1</sub> **	1472	19			x	x						
<b>Sulfated saponins</b>												
Holothurin B <sub>3</sub>	866	6	x				x	x	x			[28]
Holothurin B <sub>1</sub>	868	4	X				x					[26]
Holothurin B/B <sub>4</sub> ***	882	3/7	X				X	X	x	x	x	[27,28]
Holothurin B <sub>2</sub>	884	5	x				x					[28]
Isomer	884		x									
Fuscocineroside B/C***	1204	8/9	x	X						x	x	[29]
Isomer	1204		x							x		
Isomer	1204		x									
Holothurin A <sub>2</sub>	1206	2	x							X	x	[26]
Isomer	1206										x	
Holothurin A	1220	1	x	X					X	X	X	[25]

\* Different names for the same structure.

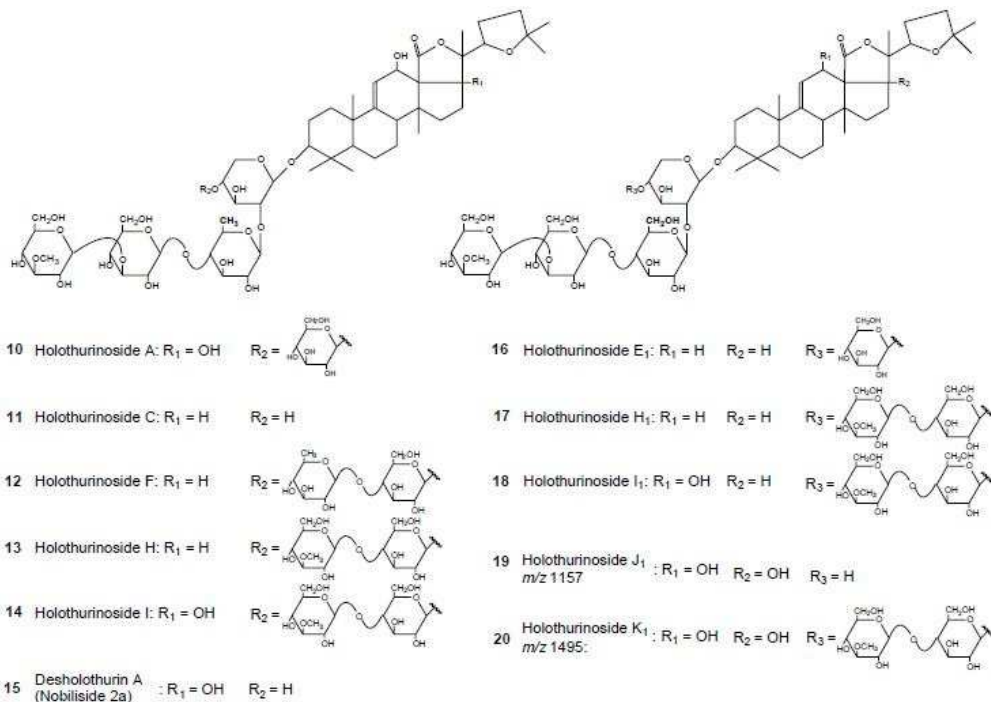
\*\* New saponins.

\*\*\* Isomeric saponins.

شکل 3. ساختار مولکولی holothurin ها و fuscocineroside ها

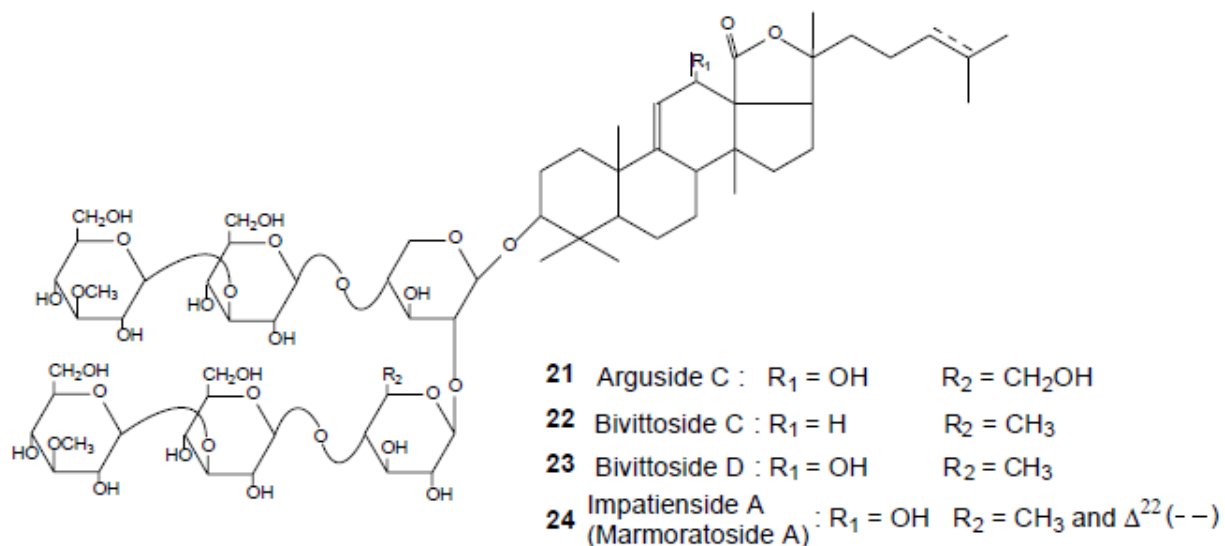


شکل 4. ساختارهای مولکولی holothurinosid ها، desholothurin A و ساختار پیشنهادی ساپونین ها با  $m/z$  1157 و 1495 (به ترتیب holothurinoside J1 و K1).



شکل 5. ساختارهای مولکولی C argucide، C bivittoside و D و A impatienside

(A marmoratoside).



جدول 1 نشان می دهد که هرگونه و در هرگونه هر بخش بدن ترکیب ساپونین خود را دارد. چند ساپونین به طور گسترده بین گونه ها وجود دارند، مثل holothurin A (1) و desholothurin A (15)، در مقایسه با بقیه که به ندرت دیده می شوند (به عنوان مثال، ساپونین شناسایی شده در 1495 m/z (ترکیب 19) که فقط در B. subrurba شناسایی شد). در بعضی موارد، روش مورداستفاده برای شناسایی دقیق ساختارهای مولکولی کافی نبود و چند امکان در مطالعات ارائه شده بود. در واقع، اختلافات بین ساپونین های ایزومری همیشه با روش MS مورداستفاده قابل شناسایی نبود که فقط به تقسیم های در اثر برخورد با انرژی سینتیک پایین (انرژی پایین CID) تکیه دارد. به عنوان مثال، ساپونین شناسایی شده در 1227 m/z مطابق fuscocineroside B (8) یا C (9)، دو مولکول متفاوت در سطح زنجیر جانبی آگلیکون، نبود (شکل 3). همین مسأله برای holothurin های B (3) و B4 (7) وجود داشت (شکل 3). روشن سازی ساختار کامل ساپونین های شناسایی شده با LC-MS به همین دلایل ممکن نبود.

گونه های *A. echinites* 10 ساپونین سولفات‌ها در دیواره بدن خود داشتند، *holothurin* های A, A2, B1, B2, B3, B/C, *fuscocineroside* و سه ایزومر (جدول 1)، ولی فقط دو تا در لوله های *Cuvierian* (*holothurin A* و *fuscocineroside B/C*). *B. subrubra* 12 ساپونین غیرسولفات‌ها در هر بخش از بدن داشت. شش تا از آنها در هر دو اندام مشترک هستند (*holothurinoside* های H, H1, I, J1, *impatienside A* (*marmoratoside A*) و ساپونین شناسایی نشده در 1495 m/z) درحالی که بقیه خاص اندام بودند: *holothurinoside F*، چهار ایزومر و ساپونین شناسایی نشده در 1157 m/z در دیواره بدن و *arguside C*، *bivittoside* های C و D و سه ایزومر در لوله های *Cuvierian*. ساختارهایی به طور آزمایشی برای دو ساپونین شناسایی نشده *holothurinoside* های J1 و K1 (19 و 20 در شکل 4) پیشنهاد شدند. *H. atra* چهار ساپونین سولفات‌ها داشت، *hothurin* های B1, B/B4, B2 و B3 (جدول 1). *H. leucospilota* و *P. graeffei* هر دو ساپونین های متنوع سولفات‌ها و غیرسولفات‌ها داشتند. دو بخش بدن *H. leucospilota*، *bivittoside D* و *holothurin* های B و B3 داشت، لوله های *Cuvierian* همچنین *P. graeffei*، *desholthurin A* (*nobiliside 2a*)، *holothurin A* و *holothurinoside E1* داشت. در پایان، *P. graeffei*، *desholthurin A* (*nobiliside 2a*)، *holothurin* های A, A2, B و *fuscocineroside* B/C در دیواره بدن و لوله های *Cuvierian* داشت. همچنین دیواره بدن *holothurinoside C* و یک ایزومر و لوله های *Cuvierian* نیز یک ایزومر داشتند (جدول 1).

## 2.2 مطالعه ی نیمه کمی

رویکرد نیمه کمی برای به دست آوردن داده درباره ی کل محتوای ساپونین گونه های مختلف انجام شد. هدف از این رویکرد کمی سازی غلظت ترکیب ساپونین به طور کل برای هر بخش بدن و برای هر گونه بود. دو روش مکمل بر اساس ساختارها و ویژگی های ساپونین ها استفاده شدند. از طرفی، واکنش اورسینول محتوای گلیکوزید عصاره های مختلف را ارزیابی کرد؛ از طرف دیگر، اندازه گیری فعالیت همولیتیک سه عصاره اثربخشی ترکیب ساپونین را برای لیز اریتروسیت های خون گاو نشان داد. اندازه گیری های طیف سنجی نوری به دست

آمده با این آزمایش ها به ترتیب به میلی گرم گلیکوزید در گرم بافت و میلی گرم ساپونین گیاهی در گرم بافت با استفاده از وزن خالص بخش های بدن تبدیل شد (جدول 2).

اگرچه دو روش یک ویژگی نمونه را اندازه نمی گیرند، رابطه ی معنی داری بین نتایج آنها وجود داشت (آزمایش همبستگی پیرسون:  $r=0.902, p<0.001, n=31$ ). در بسیاری از موارد، تنوع بین فردی زیاد بود (جدول 2). با این وجود، به همان نسبت، برای یک گونه، غلظت ساپونین همیشه در لوله های *cuvierian* بیشتر از دیواره بدن بود. نرخ غلظت بین دو اندام از 9 تا 11 برابر در *A. echinites*، 2 تا 7 برابر در *P. graeffei*، 1.5 تا 2.5 برابر در *B. subrubra* و 1 تا 4 برابر در *H. leucospilota* متغیر بود (جدول 2). لوله های *Cuvierian* *A. echinites* بیشترین محتوای ساپونین را دارند، سپس *P. graeffei*، *B. subrubra* و *H. leucospilota* مستقل از روش مورد استفاده. نتایج برای ساپونین های دیواره بدن گیج کننده تر هستند. اختلافات بین پنج گونه در این بخش بدن کمتر هستند و دو روش رتبه بندی های کمی متفاوتی دادند (جدول 2).

**جدول 2.** محتوای ساپونین در دیواره بدن و لوله های *Cuvierian* پنج گونه *Holothuriidae* با اندازه گیری

فعالیت همولیتیک و واکنش اورسینول. مقادیر میانگین ( $\pm SD$ ) هستند، اعداد داخل پرانتز تعداد نمونه های

موردآزمایش را نشان می دهند.

Species	Body compartment	Hemolytic activity (mg eq./g*)	Orcinol reaction (mg glycoside/g)
<i>Actinopyga echinites</i>	Body wall	1.239 (1)	0.025 (1)
	Cuvierian tubules	11.359 (1)	0.278 (1)
<i>Bohadschia subrubra</i>	Body wall	1.789 (1)	0.064 (1)
	Cuvierian tubules	4.724 (1)	0.094 (1)
<i>Holothuria atra</i>	Body wall	$0.973 \pm 1.846$ (4)	$0.040 \pm 0.045$ (4)
<i>Holothuria leucospilota</i>	Body wall	$0.324 \pm 0.173$ (5)	$0.039 \pm 0.032$ (5)
	Cuvierian tubules	$1.377 \pm 0.864$ (5)	$0.040 \pm 0.053$ (5)
<i>Pearsonothuria graeffei</i>	Body wall	$2.404 \pm 0.506$ (4)	$0.026 \pm 0.012$ (4)
	Cuvierian tubules	$5.361 \pm 6.759$ (5)	$0.189 \pm 0.177$ (4)

\* Milligram equivalents of plant saponins by gram of tissue (wet weight).

### 3. بحث

پنج گونه ی گرمسیری خیار دریایی از خانواده ی *Holothuriidae* برای بررسی محتوای ساپونین در دو اندام مختلف، دیواره بدن و لوله های *Cuvierian* مطالعه شدند. پس از استخراج و تخلیص، ساپونین ها با استفاده از روش های *MS* (*MALDI* و *ESI*) شناسایی شدند. این تکنیک ها داده های قبلی را تقویت می کنند، وجود و ساختارهای ساپونین زیادی را تأیید می کنند، ولی همچنین باعث شناسایی چند ساپونین جدید در پنج گونه شدند. کمترین ساپونین ها در *H. atra* مشاهده شدند که چهار جزء سولفات داشته است. از این بین، دو تا در مطالعات گزارش شده بودند. با این وجود، برخلاف بعضی نویسندگان، ما *holothurin* های *A* و *A2* را در *H. atra*. *B. subrubra* شناسایی نکردیم، ولی، بیشترین تنوع ساپونین را یافتیم (12 غیرسولفات در هر بخش بدن). تا جایی که ما می دانیم، گزارشی درباره ی ساپونین ها از این گونه وجود ندارد. بخش های بدن *holothurin* *A. echinies* 10 ساپونین سولفات داشته است. در مطالعات، فقط چهار ساپونین گزارش شده بودند: *holothurin* های *A* و *B* و *holothurin* های *A2* و *B1* (*echinoside* های *A* و *B* در متن). هردوی *H. leucospilota* و *P. graeffei* ترکیب ساپونین های سولفات و غیرسولفات را داشتند، با شش جزء در اولی و هشت جزء در دومی. همچنین، نتایج ما مطالعات را کامل می کند، زیرا *holothurin* های *A* و *B* در *H. leucospilota* و *H. leucospilota* های *A*، *A2* و *B* در *P. graeffei* شناسایی شده بودند. این ساپونین ها همه سولفات هستند. اخیراً، دو گلیکوزید تری تریپن جدید در *H. leucospilota* به نام *leucospilotaside* *A* و *C* شناسایی شدند که در نمونه های ما یافت نشدند.

با توجه به اطلاعات به دست آمده، می توان ساپونین ها را به دو گروه بر اساس داشتن یا نداشتن گروه سولفات (ساپونین های سولفات و غیرسولفات) تقسیم کرد. از بین گونه های مورد بررسی، *A. echinies* و *H. atra* فقط ساپونین های سولفات دارند، در حالی که فقط اجزای غیرسولفات در *B. subrubra* یافت دند. این تقسیم بندی با داده های گزارش شده در مطالعات همخوانی دارد که نشان می دهد گلیکوزیدهای تری تریپن از جنس *Bohadschia* گروه سولفات ندارند، در حالی که جنس *Actinopyga* و *Holothuria* (به جز *H. forskali*)

و *Pearsonothuria* این گروه را دارند. با این وجود، طبق نتایج MS، *H.leucospilota* و *P.graeffeii* هر دو نوع ساپونین را دارند، با اینکه ساپونین های سولفات بهیشتند. این وضعیت را پیچیده تر می کند. می توان بررسی کرد که آیا توزیع ساپونین های سولفات و غیرسولفات در شاخه ی خانواده ی *Holothuriidae* برقرار است.

مطالعه ی نیمه کمی نیز انجام شد تا اختلافات در غلظت های ساپونین بین بخش های بدن و بین گونه ها روشن شود. با این وجود، تنوع زیاد در محتوای ساپونین بین افراد مختلف از یک گونه مقایسه را دشوار می کند. علاوه براین، برای دیواره بدن، دو روش مورد استفاده (فعالیت همولیتیک و واکنش اورسینول) نتایج همگرا ندادند. ولی برای لوله های *cuvierian*، هر دو روش نشان دادند که گلیکوزیدهای تری تریپن در *A.echinites* بیشتر هستند، سپس *P.graeffeii* و *B.subrubra* و در پایان *H.leucospilota*. به علاوه، برای همه ی گونه ها، ساپونین ها همیشه در لوله های *Cuvierian* بیشتر از دیواره بدن بودند. فقط *Matsuna and Ishida* محتوای لوله های *cuvierian* را با دیواره بدن در گونه های *H.leucospilota* مقایسه کردند. نرخ غلظت آنها (2 تا 3 برابر) در محدوده ی اندازه گیری ما (1 تا 4 برابر) بود. در مطالعه ی ما، بیشترین نرخ (11 برابر) در *A.echinites* مشاهده شد. می دانیم که گونه های جنس *Actinopyga* لوله های *Cuvierian* غنی از ساپونین دارند.

علاوه بر این اختلافات کمی، اختلافات کیفی نیز بین ترکیب های ساپونین دو بخش بدن شناسایی شد. بعضی گونه ها ساپونین بیشتری در لوله های *Cuvierian* نسبت به دیواره بدن دارند (*H.leucospilota*)، بعضی کمتر (*A.echinites*) و بعضی تقریباً در هر دو اندام به یک تعداد ساپونین دارند (*B.subrubra*) و *P.graeffeii*. با این وجود، لوله های *Cuvierian* همه ی گونه ها (به جز *A.echinites*) حداقل یک ساپونین خاص دارد. اختلافات مشابه در توزیع ساپونین ها گزارش شده است.

غلظت های بالای ساپونین و ترکیب های خاص معمولاً همراه با عملکرد دفاعی لوله های *Cuvierian* هستند. با این وجود، در *Holothuriidae* این اندام ها از نظر مورفولوژی و حالت عملکرد بسیار متفاوتند. متداول ترین

نوع لوله شامل زوائد کوچک سفید و نرم است، در جنس *Holothuria*, *Bohadschia* و *Pearsonothuria*. در دوتای اول، وقتی حیوان موردحمله قرار می گیرد این لوله ها از طریق مقعد خارج می شوند، در آب دریا بلند می شوند و در تماس با شکارچی چسبنده می شوند. در *Pearsonothuria graeffei*، لوله ها هرگز خارج نمی شوند بلکه به صورت دستی بلند و سپس چسبنده می شوند. در پایان، در جنس *Actinopyga*، لوله ها کوچک و بسیار منشعب هستند و سطح آنها لوبوله است. این لوله ها هرگز خارج یا چسبنده نمی شوند و اگر به صورت دستی کشیده شوند، به آسانی می شکنند. غلظت های زیاد ساپونین اندازه گیری شده در لوله های *Pearsonothuria graeffei* Cuvierian و *Actinopyga echinites* جابجایی از سازوکار دفاعی چسبنده به سازوکار سمی را در این گونه ها نشان می دهد. همچنین، لوله های آنها بیشتر ساپونین های سولفات دارند که هیدروفیل تر هستند و بنابراین با نرخ بالاتری در آب دریا نفوذ می کنند (Kalinin et al). با این وجود، نوع لوله های Cuvierian مشاهده شده در *Actinopyga* به عنوان سازوکار دفاعی عمل می کند، با توجه به اینکه holothuroid می تواند آنها را در معرض شکارچی قرار دهد. رفتاری که در آن لوله ها از طریق مقعد بدون خارج شدن و سپس جمع شدن به حفره ی بدن عرضه می شوند، در گونه های جنس *Actinopyga*, *Bohadschia* و *Holothuria* وجود دارد.

در پایان، چند گونه در جنس *Holothuria* هستند که به طور کامل لوله های Cuvierian را ندارند که اهمیت این اندام را به عنوان سیستم دفاعی زیرسؤال می برد. در این زمینه، مقایسه بین *H.leucospilota* و *H.atra* جالب است. در واقع، این دو گونه همجا هستند، در یک آشیان زندگی می کنند (زیر صخره ها روی تاج صخره) و شکل، اندازه و رنگ مشابه دارند. با این وجود، فقط *H.leucospilota* لوله های Cuvierian دارد. از نظر غلظت، تفاوتی در محتوای ساپونین دو گونه وجود ندارد؛ *H.atra* نبود لوله های Cuvierian را با غلظت بالاتر ساپونین در دیواره بدن جبران نمی کند. ولی از نظر تنوع ساپونین، دو گونه فقط دو جزء دارند: holothurin های B/B4 و B3. برخلاف *H.leucospilota* که ترکیب ساپونین های سولفات و غیرسولفات را دارد، *H.atra* فقط گلیکوزیدهای تری ترین سولفات دارد. ساپونین های سولفات در آب دریا قابل نفوذتر و به



عنوان سم قوی تر هستند. بیشترین ساپونین های غیرسولفات در لوله های *H.leucospilota Cuvierian* وجود دارند. طبق *Hamel and Mercier*، لوله های *Cuvierian* در این گونه ها به عنوان سازوکار دفاعی نه ابزار تهاجمی استفاده می شود، سمیت آنها به عنوان دافع عمل می کند، بدون خطر برای سلامت ماهی های شکارچی. ساپونین های غیرسولفات کمتر محلول بیشتر در بافت لوله باقی می ماند و بنابراین به عنوان دافع مؤثرترند.

مطالعه ی محتوای ساپونین پنج گونه ی دریایی باعث شد داده های قبلی کامل شوند و تعداد زیاد و تنوع بالای ساپونین ها در *Holothuriidae* روشن شود. رویکرد نیمه کمی این نتایج را کامل کرد و نشان داد که تنوع بالای ساپونین ها به طور خاص با غلظت بالای ساپونین همراه نیست. اگرچه پیچیدگی ترکیب های ساپونین، روشن سازی نقش های زیستی آنها را دشوار می کند، مقایسه بین گونه ها و بین بخش های بدن درباره ی چگونگی عمل این مولکول ها به عنوان دافع شکارچی سرخ هایی می دهد. مطالعه ی بیشتر باید روی محل یابی بافتی ساپونین ها و نیز کارآیی در برابر شکارچی در غلظت های طبیعی انجام شود تا نقش زیستی آنها تأیید شود.

#### 4. بخش آزمایشگاهی

##### 4.1. نمونه برداری

گونه های *Actinopyga echinites* (Jaeger, 1833) و *Pearsonothuria graeffei* (Semper, 1868) در عمق بین 10 تا 30 متر با غواصی در نقطه ی جنوبی تپه ی بزرگ تولیارا (ماداگاسکار) جمع آوری شدند. نمونه های *Bohadschia subrubra* (Quoy and Gaimard, 1833) و *Holothuria atra* (Jaeger, 1833) و *H.leucospilota (brandt, 1835)* به صورت دستی در جریان پایین تاج تپه ی بزرگ تولیارا جمع آوری شدند. همه ی حیوانات به "Institut Halieutique et des Sciences de la Mer" (تولیارا) منتقل شدند و در آب دریایی مجهز به سیستم آب دریایی چرخنده نگهداری شدند (28 درجه، 31٪).

شوری). گونه ها سپس تشریح شدند و دیواره بدن و لوله های Cuvierian به طور جداگانه در 70٪ اتانول در - 20 درجه تا زمان استفاده ذخیره شدند.

## 4.2 استخراج و تخلیص ساپونین ها

روش های استخراج و تخلیص ساپونین ها از Campagnuolo et al و Garneau et al گرفته شد و با جزئیات در مقاله ی قبلی ما آمده است. دیواره بدن و لوله های Cuvierian روش استخراج مشابه داشتند که معمولاً روی چند نمونه تکرار شد. به طور خلاصه، بافت هموزن دوبار با اتانول-آب (70 به 30) و سپس فیلتراسیون استخراج شد. سپس عصاره در فشار پایین در ظرف دوتایی در 30 درجه با استفاده از تبخیرکننده ی دوار بخار شد (Laborata 4001 efficient, Heidolph). عصاره ی خشک در 90٪ متانول حل شد و با آن-هگزان (v/v) جدا شد. محتوای آب فاز هیدرومتانولیک به 20٪ (v/v) و سپس به 40٪ (v/v) رسانده شد، این محلول ها به ترتیب با  $CH_2Cl_2$  و  $CHCl_3$  جدا شدند. در پایان، محلول هیدرومتانولی بخار شد و در آب حل شد تا تخلیص کروماتوگرافی انجام شود. عصاره ی آبی کلی روی ستون Sigma-) Amberlite XAD-4 (Aldrich, St. Louis, MO) قرار گرفت. شستشوی ستون با آب، نمک های غیرآلی را پاک کرد و شستشوی بعدی با متانول، ساپونین ها را بازیابی نمود. سپس فاز متانولی بخار شد و عصاره ی خشک در آب حل شد تا آخرین جداسازی با ایزو-بوتانول (v/v) انجام شود. بخش بوتانولی شامل ساپونین های خالص بود.

## 4.3 طیف سنجی جرمی

همه ی آزمایش های MS با طیف سنج جرمی Waters QToF Premier در حالت یون مثبت با استفاده از منبع MALDI یا ESI انجام شد. منبع MALDI لیزر نیتروژن با عمل در 337 نانومتر با بیشینه خروجی 500 مگاوات به نمونه در پالس های 4 نانوثانیه ای در 20 هرتز داشت. همه ی نمونه ها با استفاده از محلول 10 میلی گرم/میلی لیتر آلفا-سیانو-4-هیدروکسی-سینامیک اسید در استون به عنوان ماتریس آماده شدند. محلول ماتریس (1 میکرولیتر) روی استیل ضدزنگ قرار گرفت و در هوا خشک شد. سپس، 1 میکرولیتر از هر بخش

بوتانولی به نقاط کریستال ماتریس اضافه شد و در هوا خشک شد. در پایان، قطره های 1 میکرولیتری از محلول NaI (2 میلی گرم/میلی لیتر در استونیتریل) به نقاط روی صفحه اضافه شد. شرایط معمول ESI: ولتاژ کاپیلاری، 3.1 کیلووات؛ ولتاژ مخروطی، 50 وات؛ دمای منبع، 120 درجه؛ دمای حلال زدایی، 300 درجه. نیتروژن خشک به عنوان گاز ESI استفاده شد.

برای ثبت طیف MALDI-ESI-MS یا ESI-MS یک مرحله ای، چهار قطبی (فقط حالت rf) تنظیم شد تا یون ها را بین 50 و 1500 عبور دهد و همه ی یون ها به منطقه ی فشار آنالیزور زمان پرواز منتقل شدند و با زمان ادغام 1 ثانیه آنالیز شدند. برای آزمایش های MALDI-ESI-MS/MS CID یا ESI-MS/MS، یون های موردنظر با فیلتر جرمی چهار قطبی انتخاب شدند. سپس یون های انتخاب شده برای برخورد با آرگون در سلول برخورد موج T ارسال شدند (فشار تخمینی 0.9 تا 1 میلی بار) و انرژی جنبشی چارچوب آزمایشگاه برای تولید سیگنال های یونی قوی انتخاب شد. همه ی یون ها در خروج از سلول برخورد، چه یون های حاصل چه یون های پیش ساز جدا نشده، با آنالیزور oa-ToF اندازه گیری شدند. آنالیزهای جرمی زمان پرواز در حالت reflectron با قدرت تفکیک 10000 انجام شدند.

برای آنالیزهای همزمان LC-MS/MS، دستگاه کروماتوگرافی مایع Waters Alliance 2695 استفاده شد. دستگاه HPLC با طیف سنج جرمی QToF Premier (Waters) همراه شد و پمپ خلأ، پمپ چهارتایی و نمونه بردار خودکار داشت. حجم نمونه ی 20 میکرولیتر تزریق شد. جداسازی کروماتوگرافی روی ستون غیرقطبی (Symmetry C18, 4.6×150 mm, Waters) در دمای 27 درجه انجام شد. فاز متحرک (1 میلی لیتر/دقیقه) برنامه ی گرادیان غیرخطی از متانول (شوینده ی A) و آب (شوینده ی B) بود. برنامه ی گرادیان: 10٪ شوینده ی A در شروع، 0 تا 6 دقیقه 10 تا 60٪ A، 6 تا 13 دقیقه 60 تا 95٪ A و 13 تا 15 دقیقه 10٪ شوینده ی A. جریان فاز متحرک (1 میلی لیتر/دقیقه) قبل از تزریق در منبع ESI (200 میکرولیتر/دقیقه) جدا شد.

#### 4.4. مطالعه ی نیمه کمی

دو روش مکمل، اندازه گیری فعالیت همولیتیک و تخمین محتوای کربوهیدرات با واکنش اورسینول، برای تخمین تنوع محتوای ساپونین بین گونه ها و بین بخش های بدن در یک گونه استفاده شدند.

**فعالیت همولیتیک:** روش از Kalinin et al و Mackie et al گرفته شد. خون سیتراته از گاو در این آزمایش استفاده شد. اریتروسیت ها با سانتریفیوژن در 1000 جی به مدت 15 دقیقه رسوب شدند و سه بار در بافر PBS سرد شستشو و سانتریفیوژ شدند ( 140 mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) تا وقتی مایع رویی شفاف و بی رنگ شد. دو میلی لیتر سلول بسته بندی شده در 100 میلی لیتر از همان بافر حل شد. 20 میکرولیتر از هر عصاره ی ساپونین به 1980 میکرولیتر از سوپانسیون اریتروسیت در میکروتیوب اضافه شد. سوسپانسیون ها با سروته کردن مخلوط شدند، به مدت 1 ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و در پایان سانتریفیوژ شدند. از بین رفتن مایع رویی قرمز در 540 نانومتر با استفاده از طیف سنج جرمی Labsystem multiscan اندازه گیری شد. محلول 10 میلی گرم در میلی لیتر از ساپونین های گیاهی (از quillaja bark, S 4521, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) در PBS به طور استریل حل شد تا منحنی استاندارد رسم شود.

**واکنش اورسینول:** این روش از Kabat and Mayer گرفته شد. عصاره های ساپونین، 1.6٪ محلول اورسینول آبی و 60٪ محلول سولفوریک اسید به نسبت 1:1:7.5 (v/v) مخلوط شدند. محلول حاصل در حمام آب 80 درجه به مدت 15 دقیقه انکوبه شد، سپس در آب شیر خنک شد تا واکنش متوقف شود و جذب آن در 540 نانومتر اندازه گیری شد. محلول 10 میلی گرم/میلی لیتر دی-زایلوز (Merck, Darmstadt, Germany) در آب به طور استریل حل شد تا منحنی استاندارد رسم شود.

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی