Archive of SID

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 5، شماره 1، بهار و تابستان 1393

بررسی خاصیت ضدانعقادی ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی استخراج شده از غضروف کوسه چانه سفید *Carcharhinus dussumieri*

شهلا همتی[1]، صابر خدابنده[2*]، سحر شعبانی پنبه چوله[1]، مریم حامدی[1]

1- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

2- دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

* نور، صندوق پستی 356-46414

skhoda@modares.ac.ir

چکیده- کوسه ماهیان از جانوران بزرگ دریایی هستند که دارای اسکلت غضروفی وسیع می‌باشند. غضروف کوسه به عنوان یک منبع غنی از مولکول‌های زیست فعال، شامل: کلاژن و چند نوع گلیکوزآمینوگلیکان می-باشند. در تحقیق حاضر به‌منظور جداسازی و بررسی خاصیت ضدانعقادی ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی موجود در غضروف کوسه، استخراج از 2/5 گرم وزن خشک غضروف کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*) با استفاده از نمک کاتیونی ستیل پیریدینیوم کلراید انجام شد. از طیف FTIR نیز برای شناسایی و مقایسه ساختاری گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراجی با هپارین استفاده گردید. در نهایت فعالیت ضدانعقادی گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده با روش سنجش ضدانعقادی زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده (APTT) در سه غلظت410، 1250 و 763 میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان پروترومبین (PT) در یک غلظت 1250 میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی پلاسمای خون انسان انجام شد. مقدار کل گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده 42/8 میلی‌گرم برگرم بافت خشک بود. نتایج طیف FTIR نیز حضور ترکیبات شبه هپارینی را اثبات کرد. بررسی خاصیت ضد انعقادی نشان داد که زمان انعقاد پلاسمای انسان 43، 50 و 85 ثانیه به ترتیب در غلظت-های 410، 763 و 1250 میکروگرم بر میلی‌گرم می‌باشد که به ترتیب زمان انعقاد را 1/3، 1/5 و 2/5 برابر شاهد -که 33 ثانیه بود- طولانی کرد.

کلیدواژگان: هپارین، GAGs، غضروف.

1- مقدمه

دریا به عنوان مادر و منشا حیات، به عنوان منبع عظیم ترکیبات طبیعی با خواص مختلف غذایی، دارویی و صنعتی شناخته می‌شود. تنوع زیستی بالا، روابط شیمیایی متنوع بین موجودات، تفاوت در تنش‌ها و شرایط اکوسیستم‌های[1] دریایی نسبت به محیط‌های خشکی، باعث تشکیل منابع نامحدود و منحصر به فردی از مواد

1. Ecosystem

www.SID.ir

Archive of SID

زیست فعال[1] در اقیانوس‌ها و دریاها شده است که خواص شیمیایی و ساختاری بسیاری از آن‌ها در محیط خشکی یافت نمی‌شود. امروزه روش زیست فناوری با بهره گرفتن از روش‌های مختلف علمی به دنبال استفاده صنعتی از موجودات زنده مختلف است. از جمله این ترکیبات طبیعی استخراجی مهم، داروهایی هستند که توانسته‌اند جان میلیون‌ها نفر را نجات دهند [1].

در حال حاضر ترمبوز به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ‌ومیر در بیماری‌های قلبی- عروقی است [2]. بیش از 50 سال است که از هپارین به عنوان داروی ضدانعقاد قوی استفاده می‌شود [3]، که به دلیل عوارض مختلف این گلیکوزآمینوگلیکان سولفاته استخراج شده از روده خوک و یا ریه گاو، تحقیق در مورد منابع جایگزین اجتناب ناپذیر است. آبزیان از منابع در دسترس برای استخراج این ترکیبات‌اند [4]. کوسه‌ها دارای اسکلت غضروفی فراوان هستند. فواید کلینیکی متعددی برای غضروف کوسه مطرح شده است. از جمله برای درمان سرطان‌های مختلف استفاده گسترده دارد [5]. همچنین اثر چشمگیری در درمان استئوآرتریت، آرتریت روماتوئید، اسکلروز سیستمیک پیشرونده و گلوکوم عصبی دارد [7،6]. غضروف نوعی بافت همبند است که از کلاژن، پروتئین‌های دیگر و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها تشکیل شده است [6]. اگرچه بیشتر خواص ذکر شده برای غضروف کوسه می‌تواند مربوط به ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی موجود در آن باشد، ولی مطالعات جامع و غیر آنزیمی در خصوص میزان وجود در این ترکیبات و به‌خصوص خاصیت ضد انعقادی آنها یافت نشد.

گلیکوزآمینوگلیکان‌ها پلی‌ساکاریدهای آنیونی با زنجیرهای مستقیم واحدهای دی‌ساکاریدی تکرارشونده هگزوزآمین (گلوکوزآمین یا گالاکتوزآمین) و یورونیک اسید (گلوکورونیک اسید یا ایدورونیک اسید) می‌باشند [8]. اصلی ترین گلیکوزآمینوگلیکان‌ها کندرویتین سولفات، درماتان سولفات، هیالورونیک اسید، هپاران سولفات و هپارین هستند [9]. هپارین گلیگوزآمینوگلیکانی فعال، به شدت سولفاته و دارای خاصیت ضد انعقاد طبیعی می‌باشد [10]. به دلیل فعالیت ضد انعقادی بالا به صورت گسترده‌ای به عنوان دارو استفاده می شود [12،11].

اما از آنجا که تولید هپارین تجاری متکی بر روده و ریه گاو و خوک، به‌عنوان ماده خام می باشد و با توجه به ظهور بیماری جنون گاوی و ارتباط آن با بیماری پریونی کورتزفلدت جاکوب در انسان، وجود اعتقادات مذهبی - فرهنگی و عدم وجود منابع غیر جانوری هپارین، مانند تولید با روش شیمیایی، آنزیمی یا هپارین‌های نوترکیب برای اهداف دارویی، انگیزه قوی برای شناسایی ترکیبات جایگزین شبه هپارین یا هپارینی از منابع دریایی را ایجاد می‌کند [4]. علی‌رغم استفاده‌های وسیع صنعتی از غضروف کوسه ماهیان در دنیا، در ایران توجه زیادی به این منبع مهم، نه در تحقیقات و نه در صنعت، نشده است. در گزارش های ارائه شده جهانی نیز اگرچه روی خواص ضد سرطانی و ضد آرتورزی غضروف کوسه بحث شده ولی توجه خاصی به استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوکلیکانی و خاصیت ضد انعقادی آن نشده است. لذا با توجه به وجود ذخایر فراوان غضروف کوسه چانه سفید در ایران، تحقیق حاضر با هدف استخراج این ترکیبات انجام گرفت.

2- مواد و روش‌ها

2-1- آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های غضروف کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*) (شکل 1) از مرکز عمل‌آوری ماهیان در دیر (استان بوشهر) خریداری شده و بعد از فریز شدن به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل 1 کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*)

پس از جدا کردن گوشت‌های اضافی، غضروف در فریزدرایر به مدت 48 ساعت خشک و از 2/5 گرم وزن خشک برای استخراج استفاده شد.

2-2- استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی

در ابتدا 2/5 گرم وزن خشک غضروف با 50 میلی‌لیتر سدیم سولفات 0/4 مولار به مدت 1 ساعت در دمای 55 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس pH محلول با استفاده از سدیم هیدروکسید 20 درصد به 11/5 رسانده شد. بعد از انکوباسیون در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه، آلومینیوم سولفات 100 درصد برای کاهش pH به 7/7، اضافه شد و در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت به هم زده شد. سپس نمونه از طریق یک مش پارچه‌ای فیلتر شد و در معرض ستیل پیریدینیوم کلراید[1] (Sigma-Aldrich) قرار گرفت [14،13].

2-3- تیمار با ستیل پیریدنیوم کلراید (CPC)

در این مرحله، به فیلترای جمع‌آوری شده از نمونه‌ها، 10 میلی‌لیتر ستیل پیریدینیوم کلراید، تا زمانی که ذرات معلق سفید رنگ در محلول‌ها مشاهده شوند، اضافه گردید. سوسپانسیون‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 18 ساعت انکوبه شده و در نهایت در دور 7000 rpm (3000g)، به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ[2] شدند. رسوب به‌دست آمده در معرض 30 میلی‌لیتر محلول سدیم کلراید 2 مولار (از قبل حرارت داده شده، 40 درجه سانتی‌گراد) حل شد. ترکیب از طریق کاغذ فیلتر شماره 41 واتمن فیلتر، فیلتر شده و سپس به فیلترا، 3 برابرحجم سدیم کلرید 2 مولار اضافه شده در مرحله قبل، اتانول 95 درصد برای رسوب دادن پلی ساکاریدهای سولفاته خام افزوده شد. به این ترتیب، کمپلکس گلیکوزآمینوگلیکانی با سانتریفیوژ در دور rpm 6000 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه جمع‌آوری شد. رسوب دو بار با متانول 99/9 درصد شسته و سانتریفیوژ (دور rpm 6000 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه) و در فریزدرایر به مدت 2 ساعت خشک شد. گلیکوزآمینوگلیکان به‌دست آمده وزن شده و برای بررسی‌های بیشتر در دسیکاتور نگه‌داری شدند [14،13].

2-4- طیف‌سنجی FT- IR

ساختار مواد و شناسایی گروه‌های عاملی روی ترکیبات استخراج شده از طریق طیف‌سنج مادون قرمز (Shimadzo, FTIR 8400S spectrophotometer, Japan) در محدوده طول موج 400 تا $4000cm^{-1}$ صورت گرفت. به این منظور مقدار مشخصی از ماده به‌طور کامل، به صورت قرص با KBr با نسبت وزنی 1:100 مخلوط شد [4].

2-5- سنجش خواص ضدانعقادی گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده

2-5-1- آماده کردن پلاسما سیتراته خون انسان

سنجش ضدانعقادی در آزمایشگاه با پلاسما سیتراته ضعیف پلاکت (PPP[3]) انجام شد. در این روش خون انسان از اهدا کنندگان سالم گرفته شده و فوری با تری سدیم سیترات 3/2 درصد به نسبت حجمی 9 به 1

1. Cetyl pyridinium chloride (CPC)
2. (Z 36 HK HERMLE,German)
3. Citrated human platelet poor plasma

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط (9 سی‌سی خون انسان و 1 سی‌سی سدیم‌سیترات) و چندین بار لوله فالکون محتوی خون و ضد انعقاد تری‌سدیم‌سیترات به آرامی سروته شد و بلافاصله با دور 5000rpm به مدت 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس با سمپلر، پلاسمای خون جدا شد و برای سنجش ضد انعقادی در تمامی مراحل و روش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

2-5-2- سنجش ضدانعقادی با استفاده از معرف

ابتدا از نمونه‌های گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از غضروف کوسه، غلظت 2/5 میلی‌گرم در1000 میکرولیتر به عنوان استوک ساخته شد. سپس به منظور تهیه غلظت-های 410 و 763 میکروگرم بر میلی لیتر به طور جداگانه مقدار 100، 200 میکرولیتر از استوک اولیه با 500 میکرولیتر پلاسما سیتراته مخلوط شد و به منظور تهیه غلظت 1250 میکروگرم بر میلی لیتر، 300 میکرولیتر از استوک اولیه با 300 میکرولیتر پلاسما سیتراته مخلوط گردید و به این ترتیب سه استوک از گلیکوزآمینوگلیکان غضروف کوسه برای استفاده در دو سیستم سنجش ضدانعقادی آماده شدند. برای نمونه شاهد نیز مقدار 100 و 200 میکرولیتر آب با 500 میکرولیتر پلاسما سیتراته مخلوط شده، استوک شاهد برای غلظت‌های 410 و7630 تهیه گردید [4].

3-5-2- سنجش ضدانعقادی با معرف زمان ترومبوپلاستین نسبی (APTT[1])

در ابتدا محلول کلسیم کلرید 0/025 نرمال ساخته و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شد. سپس به صورت جداگانه مقدار 100 میکرولیتر از استوک‌های ساخته شده با غلظت‌های 410، 763 و 1250 میکروگرم بر میلی‌لیتر را در اپندورف ریخته، مقدار 100 میکرولیتر از محلول ترومبوپلاستین نسبی که حاوی مواد فعال کننده است، اضافه شد. پس از 2 دقیقه انکوبه شدن در 37 درجه سانتی‌گراد، مقدار 100 میکرولیتر محلول کلسیم کلرید به هر یک از لوله‌ها اضافه و بلافاصله زمان گرفته شد. با مشاهده تشکیل لخته زمان ثبت شد و برای نمونه شاهد نیز همین کار تکرار گردید [15،16].

4-5-2- سنجش ضدانعقادی با استفاده از معرف زمان پروترومبین (PT[2])

200 میلی‌لیتر از معرف پروترومبین را درون سه لوله اپندورف ریخته و اپندورف‌ها در داخل انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 2 دقیقه نگه داشته و سپس 100 میکرولیتر از استوک‌های با غلظت 410، 763 و 1250 را جداگانه به هر لوله آزمایش حاوی معرف PT افزوده شده و بلافاصله زمان گرفته شده و لحظه انعقاد ثبت شد [15،17].

3- یافته‌ها

1-3- استخراج گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و بازده استخراج

محصول نهایی گلیکوزآمینوگلیکان‌های خام استخراج شده از 2/5 گرم وزن خشک غضروف کوسه 107 میلی گرم بود که برابر با 42/8 میلی‌گرم برگرم بافت خشک می‌باشد.

2-3- شناسایی با طیف FT-IR

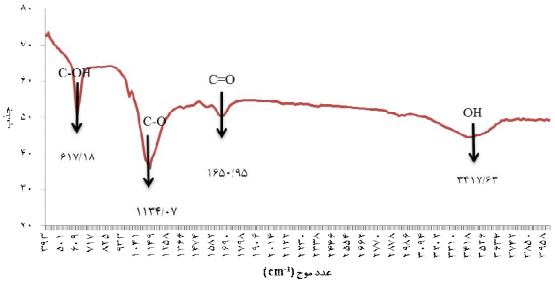
پیک‌های ایجاد شده در گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده خام غضروف کوسه که نشان دهنده حضور ترکیبات هپارینی و شبه هپارینی می‌باشد در شکل 2- الف و همچنین طیف FT-IR هپارین استاندارد در شکل 2- ب آورده شده است.

1. Activated Partial Thromboplastin Time

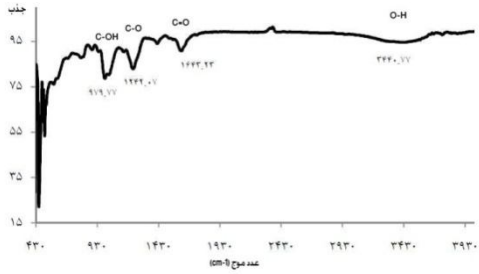
2. ProthrombinTime

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2- الف طیف FT-IR گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده خام غضروف کوسه



شکل 2- ب طیف FTIR مربوط به هپارین استاندارد

نمونه گلیکوزآمینوگلیکان غضروف یک پیک اصلی در محدوده‌ی $1650/95cm^{-1}$ نشان دادند که مسئول گروه‌های گلیکوزآمینوگلیکانی می‌باشند.

3-3- سنجش ضدانعقادی بر روی خون انسان با استفاده از دو معرف APTT و PT

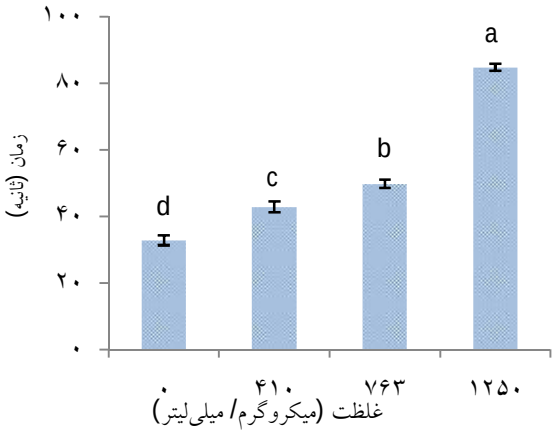
نتایج سنجش خواص ضد انعقادی گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده در جدول 1 آورده شده است.

جدول 1 زمان انعقاد در دو تست APTT و PT

منبع	غلظت (µg/ml)	زمان انعقاد تست APTT (ثانیه)	زمان انعقاد تست PT (ثانیه)
GAGاستخراجی از غضروف کوسه	410	57	-
	763	50	-
	1250	18	17
هپارین	20	900	-

مقادیر طبیعی (نمونه کنترل) APTT و PT برای پلاسمای انسان سالم به ترتیب 33 و 13 ثانیه ثبت شد.

مقاسیه میانگین داده‌های غلظت‌های مختلف ترکیبات گلیکوزآمینوکلیکانی استخراج شده از غضروف کوسه در تست APTT اختلاف معنی‌داری را بین غلظت‌های مختلف با یکدیگر و نمونه کنترل نشان داد ($p<0.05$) (شکل 3). همچنین مقایسه میانگین داده‌ها در تست PT با نمونه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0.05$).



شکل 3 زمان آزمایش APTT بین غلظت مختلف گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از غضروف کوسه

4- بحث

با وجود تحقیقات صورت گرفته در زمینه استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی از غضروف کوسه، در بیشتر مطالعات صورت گرفته استخراج این ترکیبات با استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک می‌باشد. در تحقیق حاضر از روش شیمیایی برای استخراج این ترکیبات استفاده شد که نسبت به روش آنزیمی سریع‌تر، آسان‌تر و کم هزینه‌تر می‌باشد. همانطوری که در بخش نتایج آورده شد، گلیکوزآمینوگلیکان‌های خام استخراج شده از غضروف کوسه در این تحقیق 42/8 میلی‌گرم بر گرم بافت خشک بود. میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده در تحقیق حاضر نشان دهنده کمپلکسی از ترکیبات

www.SID.ir

Archive of SID

گلیکوزآمینی مختلف موجود در غضروف کوسه است. پژوهش‌های زیادی مربوط به استخراج این ترکیبات از سایر آبزیان انجام گرفته است. که در بیشتر این تحقیقات استخراج این ترکیبات با استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک بوده است. مقدار کندرویتین سولفات استخراج شده توسط Krylov و همکاران در سال 2011 از غضروف 5 گونه ماهی *Somniosus microcephalus*، *salmo salar*، *galeus melastomus*، *Deania calcea*، *Amblyraja hyperborean* به ترتیب برابر با 10/31، 13/96، 7/53، 6/66، 15/51 گرم در صد گرم وزن خشک بود که بیشترین میزان ماده استخراج شده مربوط به غضروف کوسه (15/51) بود [18].

Uchisawa و همکاران در سال2001 از100 گرم وزن تر غضروف ماهی آزاد مقدار 2/8 گرم کندروتین سولفات استخراج کردند و ساختار آن را تعیین کردند [19]. همچنین Krishna و همکاران (2008) از 100 گرم وزن خشک صدف داخلی ماهی مرکب 2 گرم گلیکوزآمینوگلیکان استخراج کردند [4].

نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز نمونه شبه هپارینی استخراج شده از غضروف کوسه و هپارین استاندارد در شکل 2 نشان داده شده است. پیک‌های بین گستره $3640cm^{-1}$ - 3160 مربوط به باند کششی گروه هیدروکسیل‌های آزاد می‌باشد که در نمونه هپارین استاندارد و ترکیبات شبه هپارینی استخراج شده از غضروف کوسه قوی و قابل تشخیص بوده و در هر دو نمونه برابر با $3441/63\ cm^{-1}$ است. باند ظاهر شده بین $1500\ cm^{-1}$ و $1750\ cm^{-1}$ مربوط به باند کششی گروه‌های c=o (گروه آمیدI) می‌باشد که در طیف نمونه استاندارد هپارین با شدت $1643\ cm^{-1}$ در مقایسه با نمونه شبه هپارین $1650/95\ cm^{-1}$ می‌باشد. علاوه براین دو باند دیگر در 1242/07 و 979/77 مشاهده می‌شود که مربوط به گروه‌های کششی C-O و خمشی C-OH در نمونه هپارین استاندارد می‌باشد. باند ظاهر شده بین 1000 و 1200 مربوط به باند خمشی C-O گروه کربونیلی می‌باشد که در نمونه شبه هپارینی غضروف کوسه با شدت $1134/07\ cm^{-1}$ می‌باشد که خیلی قوی‌تر از هپارین استاندارد و مشخص‌ترین باند است. همچنین باند قوی در نمونه شبه هپارینی با شدت $617/18cm^{-1}$ مربوط به گروه C-OH می‌باشد که در هپارین استاندارد کمتر قابل تشخیص می‌باشد [20].

مقایسه طیف FT-IR گلیکوزآمینوگلیکان‌های غضروف کوسه با هپارین استاندارد نشان داد که نمونه گلیکوزآمینوگلیکان غضروف کوسه دارای یک پیک اصلی در محدوده $1650/95\ cm^{-1}$ بوده که مسئول همان گروه‌های گلیکوزآمینوگلیکانی می‌باشد. مشخص‌ترین ویژگی طیف مربوط به حضور پلی‌ساکاریدعای سولفاته در محدوده $1100\text{-}1200\ cm^{-1}$ می‌باشد که ارتعاشات نامتقارن پیوند بین S=O را نشان می‌دهد و در نمونه غضروف کوسه با شدت $134/07\ cm^{-1}$ دیده شد.

نتایج بررسی طیف FT-IR نشان داد که مواد استخراج شده از غضروف کوسه دارای گروه‌ها و باندهای مشابهی با طیف FTIR هپارین استاندارد (شکل 2- ب) بوده و ترکیبات شبه هپارین متعددی را شامل می‌شود که با نتایج Manjusha، 2001 و Kim و همکاران، 2012 مطابقت داشت [21،12].

در این تحقیق فعالیت ضدانعقادی گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده با روش سنجش ضدانعقادی زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده (APTT) در سه غلظت410، 1250 و 763 میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان پروترومبین (PT) در یک غلظت 1250 میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی پلاسمای خون انسان نشان داد که این ترکیبات به ترتیب انعقاد را 1/3، 1/5 و 2/5 برابر شاهد - که 33 ثانیه بود- طولانی کردند. همچنین در تحقیق Krylov و همکاران 2011 نشان داده شد که در بین 5 گونه ماهی، بیشترین اثر ضد انعقادی مربوط به کندرویتین

www.SID.ir

Archive of SID

سولفات استخراج شده از غضروف کوسه است [18]. دراماتان سولفات و کندرویتین سولفات استخراج شده از پوست کوسه نیز فعالیت ضدانعقادی قوی را نشان داد [22]. گلیکوزآمینوگلیکان های شبه هپارینی ویژگی‌های دارویی مختلفی را بر اساس منشا از خود نشان می‌دهند که بستگی به بعضی از ویژگی‌های ساختاری این ترکیبات مانند، الگوی سولفاته شدن گلوکوزآمین و پراکندگی گلوکورونیک دارد. که ظرفیت اتصال این ترکیبات به آنتی ترومبین را تحت تأثیر قرار می‌دهد [23]. در اینجا سنجش ضد انعقادی با استفاده از معرف، با برهمکنش بین فاکتورهای مسیرهای انعقادی و گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده، اثر تأخیری بر فعالیت این فاکتورها اعمال می‌شود، به همین دلیل افزودن گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده با افزایش زمان انعقادی همراه می‌باشد.

لازم به ذکر است که با توجه به خالص بودن هپارین انتظار اینکه زمان در هردو تست PT و APTT بطور بارزی نسبت به گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از غضروف کوسه بیشتر شود یک امر طبیعی است.

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که با روش CPC می‌توان درصد بالایی از ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی را از غضروف کوسه استخراج کرد. طیف FT-IR شباهت ساختاری ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی استخراج شده را با هپارین استاندارد و کندوتین سولفات استاندارد نشان داد. نتایج سنجش ضد انعقادی با هر دو روش استفاده از معرف (PT و APTT) نشان داد که ترکیبات استخراج شده قادر به طولانی کردن زمان انعقاد پلاسما خون انسان می‌باشند و در نهایت اینکه، با توجه به وجود منبع عظیم کوسه چانه سفید در صیدهای جنوب کشور، غضروف غیر قابل استفاده این ماهی می‌تواند منبع مناسبی برای استخراج این ترکیبات دارویی باشد.

5- سپاسگزاری

با سپاس فراوان از سرکار خانم مهدیه طهماسبی که در انجام مراحل این تحقیق ما را یاری نمودند.

6- منابع

[1] Aneiros, A., Garateix, A. (2004) Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*, 803(1): 41-53.

[2] Fareed, J., Hoppensteadt, D. A., Bick, R. L. (2000) An update on heparins at the beginning of the new millennium. *In Seminars in thrombosis and hemostasis*, 26: 005-022.

[3] Mauro., G. Pavao. (2002) Structure and anticoagulant properties of sulfated glycosaminoglycans from primitive Chordates. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*,74 (1): 105–112.

[4] Krishnaa, C., 2008. Extraction of sulfated polysaccharides from cuttlefish (Sepia sp.) bone. PhD thesis. Department of biotechnology. SRM University.108 p.

[5] Akbulut, M. D., Akgul, E. (2014) Shark Cartilage and Liver Oil Using Possibilities Against to the Cancer Formation. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 7 (1): 42-45.

[6] Fqntenele, J. B., Araujo, G. B., de Alencar, J. W. (1997) The Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Shark Cartilage Are Due to a Peptide Molecule and Are Nitric Oxide (NO) System Dependent. *Biol. Pharm. Bull*, 20(11): 1151-1154.

[7] Sculti, L. (1994). Arthritis benefits from shark cartilage therapy. *Alternative and Complementary Therapies*, 1(1): 35-37.

[8] Esko, JD., Kimata, K., Lindahl, U. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki, A, Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart ,G.W., Etzler, M.E., Esko, J.D., Kimata, K (2009) Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 16

[9] Pomin, VH. (2012) Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820: 1971-9.

[10] Nader, HB., Lopes, CC., Rocha, HA., Santos, EA., Dietrich, CP.(2004) Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. *Curr Pharm Des*, 10: 951-66.

www.SID.ir

Archive of SID

[11] Hirsh, J., Anand, S. S., Halperin, J. L., Fuster V. (2001) Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin: a Statement for Health Care Professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 103(24): 2994-3018.

[12] Manjusha, K., 2012. Isolation and characterization of glycosaminoglycans and a study of its bioactive potential in two commercially important species of Cephalopods, *Loligo duvauceli* and *Sepia pharaonis*.PhD thesis. School of Industrial Fisheries. Cochin University of Science and Technology. 262 p.

[13] Holick, MF., Judkiewicz, A., Walworth, N., Wang, M. (1985) Recovery of heparin from fish wastes.11 Biotechnology of marine polysaccharides, (Eds) Colwell RR, Pariser ER, Sinskay AJ,

[14] *Hemisphere Publishing Corporation New York*: 389-97.

[15] Periyasamy, N., Srinivasan, M., & Balakrishnan, S. (2012) Antimicrobial activities of the tissue extracts of *Babylonia spirata* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Gastropoda) from Thazhanguda, southeast coast of India. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(1), 36-40.

[16] Rajapakse و N., Jung, W. K., Mendis, E., Moon, S. H., Kim, S. K. (2005) A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, 76(22): 2607-2619.

[17] Dellias, J. M., Onofre, G. R., Werneck, C. C., Landeira-Fernandez, A. M., Melo, F. R., Farias, W. R., & Silva, L. C. F. (2004) Structural composition and differential anticoagulant activities of dermatan sulfates from the skin of four species of rays, *Dasyatis americana, Dasyatis gutatta*, *Aetobatus narinari* and *Potamotrygon motoro*. *Biochimie*, 86(9), 677-683.

[18] . Athukorala, Y., Jung, W. K., Vasanthan, T., Jeon, Y. J. (2006) An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of Ecklonia cava. *Carbohydrate Polymers*, 66(2): 184-191.

[19] . Krylov, V. B., Grachev, A. A., Ustyuzhanina, N. E., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., Kozlova, N. I., Nifantiev, N. E. (2011) Preliminary structural characterization, anti-inflammatory and anticoagulant activities of chondroitin sulfates from marine fish cartilage. *Russian Chemical Bulletin*, 60(4): 746-753.

[20] . Uchisawa, H., Okuzaki, B. I., Ichita, J., Matsue, H. (2001) Binding between calcium ions and chondroitin sulfate chains of salmon nasal cartilage glycosaminoglycan. *In International Congress Series*, 1223: 205-220.

[21] . Karthikeyan, V., Gopalakrishnan, A., Vijayakumar, R., & Bharathirajan, P. (2012) Anticoagulant activity of marine bivalve *Donax incarnates* Lin, 1758 Collected from Thazhanguda, Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(3), S1798-S1801.

[22] . Kim, S. B., Ji, C. I., Woo, J. W., Do, J. R., Cho, S. M., Lee, Y. B., ... & Park, J. H. (2012) Simplified purification of chondroitin sulphate from scapular cartilage of shortfin mako shark (Isurus oxyrinchus). *International Journal of Food Science & Technology*, 47(1), 91-99.

[23] . Nandini, C. D., Itoh, N., & Sugahara, K. (2005). Novel 70-kDa chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains with a unique heterogenous sulfation pattern from shark skin, which exhibit neuritogenic activity and binding activities for growth factors and neurotrophic factors. *Journal of Biological Chemistry*,280(6), 4058-4069.

[24] . Brito, A. S., Arimatéia, D. S., Souza, L. R., Lima, M. A., Santos, V. O., Medeiros, V. P., Chavante, S. F. (2008)Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(21), 9588-9595.

www.SID.ir