Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:40 +0430 on Wednesday May 31st 2017

BRIEF REPORT

Anticoagulant Properties of Protein Hydrolysates from the Muscle of Sea Cucumber

Samira Besharati[1],
Saber Khodabandeh[2]

[1] MSc Student in Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
[2] Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

(Received April 16, 2016 ; Accepted December 18, 2016)

Abstract

Background and purpose: Biological studies on marine fauna, especially invertebrates, has significantly increased in recent years which led to the identification of many different bioactive compounds. The sea cucumber are echinoderms with a very muscular body wall that contains 70% collagen and is considered a rich source of protein. Based on recent researches on bioactive compounds extracted from sea cucumber, it was found to have cytotoxic, antioxidant, anti-tumor, and anti-coagulation properties.

Materials and methods: In this experimental study, enzymatic hydrolysis method was used to study the anticoagulant properties of hydrolysates protein in muscles of sea cucumber. Finally, the anticoagulant properties of hydrolysates protein on the human blood plasma was examined by the Activated Partial Thromboplastin Time anticoagulant test (APTT) in two concentrations (90 and 130 µg/ml), and Prothrombin Time (PT) in different concentrations (220, 440, 670, and 900 µg/ml).

Results: The total amount of hydrolysates protein was found to be 55.8 mg/g in wet tissue. The results of anti-coagulation assays showed that the hydrolysates protein of the sea cucumber muscle contains anticoagulant properties on human blood plasma and could prolong the clotting time.

Conclusion: Peptides from the hydrolysis in sea cucumber muscle have anticoagulant properties as already reported for heparin-like compounds.

Keywords: heparin, sea cucumber, protein hydrolysates

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26(145): 371-376 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:40 +0430 on Wednesday May 31st 2017

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۵ بهمن سال ۱۳۹۵ (۳۷۶-۳۷۱)

خاصیت ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی *Holothuria parva*

سمیرا بشارتی[۱]
صابر خدابنده[۲]

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر مطالعات زیست فناوری روی جانوران دریایی به خصوص بی‌مهرگان به طور قابل توجهی افزایش یافته و منجر به شناسایی مواد زیست فعال متعددی شده است. در این میان خیار دریایی از جمله خارپوستانی بابدن بسیار عضلانی است که با ۷۰ درصد کلاژن، یک منبع غنی از پروتئین محسوب می‌شود. بر اساس تحقیقات انجام شده روی خواص زیست فعالی ترکیبات استخراج شده از خیار دریایی اثبات شده که خواص سیتوتوکسیک، آنتی اکسیدان، ضد توموری و ضد انعقادی می توانند داشته باشند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی به منظور بررسی خاصیت ضد انعقادی، پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی با روش هیدرولیز آنزیمی به دست آمد و فعالیت ضدانعقادی با روش سنجش ضدانعقادی زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده (APTT) در دو غلظت ۱۳۰و ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان پروترومبین (PT) در چهار غلظت ۹۰۰، ۶۷۰، ۴۴۰ و ۲۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی پلاسمای خون انسان انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که مقدار پروتئین هیدرولیز شده ۵۵/۸ میلی گرم از هرگرم بافت‌تر می‌باشد. نتایج سنجش خاصیت ضد انعقادی نیز نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی دارای خاصیت ضد انعقادی روی پلاسمای انسان بوده و قادر به طولانی تر کردن زمان انعقاد می باشد.

استنتاج: می توان گفت علاوه بر ترکیبات غیرپروتئینی ضد انعقادی موجود در خیار دریایی، پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های عضله خیار دریایی نیز دارای خواص ضد انعقادی شبه گلیکوزآمینوگلیکان‌هایی مثل هپارین می‌باشند.

واژه های کلیدی: خیار دریایی، پروتئین هیدرولیز شده، هپارین

مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعات روی جانوران دریایی به خصوص بی‌مهرگان به طور قابل توجهی افزایش یافته که منجر به شناسایی ترکیبات زیست فعال شده است(۱). امروزه ترکیبات زیست فعال به دست آمده از خارپوستان با خواص بیولوژیک از قبیل ضد انعقاد، ضد عفونت و ضد تومورکاربرد گسترده‌ای در درمان بسیاری از بیماری‌ها دارند(۲). در این میان خیار دریایی از جمله بی‌مهرگان دریایی و متعلق به گروه خارپوستان است که با بدن کشیده و بدون اسکلت مشخص دارای دیواره بدن بسیار عضلانی می باشد(۳). این جانوران از گذشته‌های دور در

مولف مسئول: صابر خدابنده– نور: بلوار امام رضا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی تربیت مدرس E-mail: surp78@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، شهر نور، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، شهر نور، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۳/۱۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۹/۲۸

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:40 +0430 on Wednesday May 31st 2017

طب سنتی کشورهای آسیایی استفاده شده اندو حدود ۲۸ گونه از این آبزی خوراکی هستند که در سواحل ایرانی خلیج فارس بیش‌تر Holothuria می باشد(۴).

پروتئین‌های موجود در خیاردریایی دارای طیف کامل از اسیدآمینه‌های ضروری و غیر ضروری است. ضمن این که خیار دریایی علاوه بر برخورداری از پروتئین کافی و ارزش غذایی بالا در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد(۵). تاکنون فعالیت‌های بیولوژیک خیارهای دریایی شامل خاصیت ضد سرطانی، ضد انعقاد، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدانی و ضد تومور کشف شده است که دلیل وجود این خواص در خیار دریایی را می‌توان به حضور موادی مانند گلیکوترپنوئید، کندروکتین سولفات، گلیکوزآمینوگلیکان (GAGs) و اسیدهای چرب ضروری در خیار دریایی نسبت داد(۶). بیماری ترمبوآمبولیک هم‌چنان به عنوان علت مرگ و میر در سرتاسر جهان است. به دلیل پیری و شیوع بالای ترومبوز (لخته شدن خون)، بیش از ۵۰ سال است که از هپارین به عنوان داروی ضدانعقاد قوی و سنگ بنای اصلی در درمان و پیشگیری ضد ترومبوز استفاده می‌شود(۷) اما به دلیل عوارض مختلف این گلیکوزآمینوگلیکان سولفاته استخراج شده از روده خوک و یا ریه گاو نیاز بزرگی به ترکیبات طبیعی جایگزین وجود دارد و آبزیان از منابع طبیعی در دسترس برای استخراج این ترکیبات هستند(۸). در همین راستا هیدرولیز پروتئین می‌تواند به عنوان یک روش کارآمد برای استخراج ترکیبات طبیعی از توالی‌های منابع پروتئینی باشد. با توجه به وجود گونه های مختلف خیار دریایی در سواحل جنوبی کشور (خلیج فارس)، در این مطالعه تلاش شد اثرات ضد انعقادی پروتئین عضله خیار دریایی گونه *H.parva* (هیدرولیز آنزیمی) بررسی شود.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر به روش تجربی بوده است.

هیدرولیز آنزیمی

از نمونه خیار دریایی (*Holothuria parva*) به صورت چرخ شده استفاده شد. با اضافه کردن آب مقطر به نسبت ۱:۱ به نمونه با استفاده از اولترا هموژنایزر کاملاً هموژن شد. سپس pH و دمای محلول به حالت بهینه آنزیم الکالاز رسانده شد و آنزیم آلکالاز به نسبت (۱/۵) به محلول اضافه شد و به مدت سه ساعت پروتئین هیدرولیز شد. در نهایت نمونه سانتریفیوژ گردید و لایه پروتئین هیدرولیز شده جمع آوری شد(۹).

سنجش پروتئین به روش (Bicin Choninic Asid) BCA

از سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albomin) به عنوان محلول استاندارد و از کیت سنجش پروتئین BCA حاوی محلول‌های B و Reagent A برای سنجش میزان پروتئین هیدرولیز شده استفاده گردید(۱۰).

سنجش خاصیت ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده

سنجش ضدانعقادی در آزمایشگاه با پلاسما سیتراته ضعیف پلاکت (Citrated human platelet poor plasma) انجام شد. در این روش خون سالم انسانفوری با تری سدیم سیترات ۳/۲ درصد به نسبت حجمی ۹:۱ مخلوط و بلافاصله سانتریفیوژ شد و سپس پلاسمای خون جدا شد(۱۱).

ضمن این که جهت تهیه غلظت‌های رقیق‌سازی شده پروتئین هیدرولیز، برای تست PT چهار غلظت متفاوت ۹۰۰، ۶۷۰، ۴۴۰ و ۲۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای تست APTT نیز غلظت‌های ۱۳۰ و ۹۰ میکروگرم بر میلی لیتر از استوک اصلی پروتئین هیدرولیز شده تهیه شد. شاهد اول آب مقطر بود اما شاهد دوم هپارین تزریقی بود. (هر آمپول هپارین حاوی ۵۰۰۰ واحد بین‌المللی در یک میلی لیتر، 5000 IU/ML می‌باشد).

سنجش خاصیت ضد انعقادی با استفاده از معرف زمان ترومبوپلاستین نسبی (APTT)

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول معرف APTT (Assay kit from Pacific Hemostasis APTT-XL)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:40 +0430 on Wednesday May 31st 2017

را درون لوله آزمایش ریخته و به آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر (هر کدام از غلظت‌های تهیه شده و محلول‌های شاهد) و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پلاسما سیتراته اضافه شد. لوله آزمایش به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از گذشت این زمان، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلراید ۰/۰۲۵ نرمال به لوله آزمایش اضافه شد. به محض اضافه کردن کلسیم کلراید، زمان تشکیل لخته ثبت شد(۱۱).

سنجش خاصیت ضد انعقادی با استفاده از معرف زمان پروترومبین (PT):

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول معرف PT (Assay kit from Pacific Hemostasis Thromboplastin-D) را درون لوله آزمایش ریخته سپس به آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر (هر کدام از غلظت های تهیه شده و محلول‌های شاهد) اضافه شد. لوله آزمایش برای مدت زمان ۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از گذشت این زمان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پلاسما سیتراته را به آن اضافه گردید. به محض اضافه کردن پلاسما سیتراته، زمان تشکیل لخته ثبت شد(۱۲).

یافته ها و بحث

هیدرولیز پروتئین

نتایج سنجش مقدار پروتئین کل قبل از هیدرولیز خیار دریایی براساس روش سنجش پروتئین BCA نشان داد که در هر ۱ گرم از نمونه خام و تر، مقدار ۱۴/۲ میلی‌گرم بر گرم پروتئین خام وجود دارد. هم چنین نتایج سنجش پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی *Holothuria parva* نشان داد که در هر ۱ گرم بافت تر آن مقداری برابر با ۵۵/۸ میلی‌گرم بر گرم پروتئین وجود دارد. سنجش درجه هیدرولیز که بر مبنای TCA ۱۰ درصد (Tri Chloro Acetic asid) است نیز نشان داد که با فراهم کردن شرایط بهینه مورد نیاز آنزیم آلکالاز، این آنزیم توانسته ۵۲/۴ درصد از پروتئین‌های عضله خیار دریایی را در مدت زمان سه ساعت هیدرولیز کند.

سنجش ضد انعقادی روی خون انسان با استفاده از دو معرف PT و APTT

تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام شده است و داده‌ها همراه با میانگین گزارش شده است. هم چنین آزمون نرمال بودن داده‌ها (کولموگرو اسمیرنوف) و آزمون معناداری بین داده‌ها (one way anova) با استفاده از نرم‌افزار Spss ورژن ۱۶ صورت پذیرفت. نتایج سنجش خواص ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده در جداول شماره ۱ و ۲ آورده شده است.

جدول شماره ۱: زمان انعقاد تست PT

منبع	غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	زمان انعقاد (ثانیه)
پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی	A1 ۹۰۰	۲۲۶۷
پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی	A2 ۶۷۰	۸۶۴
پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی	A3 ۴۴۰	۳۶۵
پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی	A4 ۲۲۰	۱۳۰
آب مقطر (شاهد اول)	----	۲۲
هپارین ۱ (شاهد دوم)	۲۵ IU	۲۴۰۰
هپارین ۲ (شاهد دوم)	۱۰ IU	۶۸۰

جدول شماره ۲ : زمان انعقاد تست APTT

منبع	غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	زمان انعقاد (ثانیه)
پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی	A1 ۱۳۰	۲۴۱۲
پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی	A2 ۹۰	۸۶۲
آب مقطر (شاهد اول)	----	۷۶
هپارین (شاهد دوم)	۱۰ IU	۹۳۰۰

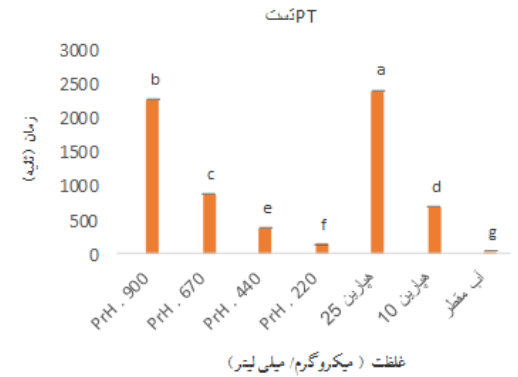
با توجه به جداول، پروتئین هیدرولیز شده استخراجی در هر دو تست انجام شده خاصیت ضد انعقادی داشته ولی نسبت به هپارین استاندارد کم‌تر بود. به طوری‌که در روش PT با کاهش غلظت پروتئین هیدرولیز شده توان ضد انعقادی نیز کاهش می‌یابد به طوری که زمان تأخیر در انعقاد در غلظت ۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نزدیک به غلظت 25 IU هپارین می‌باشد (جدول شماره ۱). در روش APTT زمان انعقاد با هپارین بسیار بالا بود ولی پروتئین هیدرولیز شده به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:40 +0430 on Wednesday May 31st 2017

دست آمده نیز توانسته بود در غلظت ۱۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر انعقاد را نسبت به آب مقطر ۳۰ برابر افزایش دهد (جدول شماره ۲). هم‌چنین مقاسیه میانگین داده‌های غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده خیار دریایی در هر دو تست PT و APTT اختلاف معنی‌داری را بین غلظت‌های مختلف با یکدیگر و نمونه کنترل نشان داد ($p < ۰/۰۱$) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: زمان آزمایش PT بین غلظت های مختلف پروتئین هیدرولیز شده خیار دریایی

در این مطالعه فعالیت ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی نشان داد که این ترکیب با طولانی‌تر کردن زمان انعقاد دارای خاصیت ضد انعقادی است. اما همان طوری‌که اشاره شد تحقیقات پیشین گزارش داده‌اند که گلیکوزآمینوگلیکان‌های خیار دریایی خاصیت ضد دارد ولی روی پروتئین هیدرولیز شده ی آن تحقیقی یافت نشد به طوری که نتایج مطالعات Luo و همکاران درسال ۲۰۱۳ و chen و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که دو نوع پلی ساکارید کندرویتین سولفات فوکوزاته و فوکان از عضله خیار دریایی استخراج شد که کندروتین سولفات فوکوزاته دارای فعالیت ضد انعقادی بیش‌تری حتی در غلظت‌های پایین نسبت به فوکان سولفاته بود. این خاصیت ضد انعقادی چشمگیر از طریق طولانی‌تر کردن قابل توجه زمان تست APTT است(۱۳،۷). هم‌چنین در داخل کشور نیز در زمینه بررسی خاصیت ضدانعقادی گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، طهماسبی و همکاران در سال ۱۳۹۴ از تانتاکول‌های شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* خلیج فارس، همتی و همکاران در سال ۱۳۹۳ از غضروف کوسه چانه سفید *Carcharhinus dussumieri* ترکیبات ضد انعقادی استخراج کردند و نتایج مطالعات آن‌ها با استفاده از روش سنجی APTT و PT حضور ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی و شبه هپارینی را اثبات کرد و نشان داد که این ترکیبات استخراج شده با طولانی ترکردن زمان انعقاد دارای خاصیت ضدانعقادی هستند(۱۵،۱۴).

علاوه بر گلیکوزآمینو گلیکان ها، خواص ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده آبزیان مورد توجه بوده است. به گونه‌ای که Rajapakse و همکاران در سال ۲۰۰۵ با روش هیدرولیز عضله کفشک ماهی زرد باله (Yellowfin) با آنزیم‌های مختلف از جمله آلکالاز موفق به شناسایی پروتئین ضد انعقادی جدیدی شده‌اند که زمان APTT را به‌طور قابل توجهی طولانی می‌کند(۱۱). هم‌چنین Nasri و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ با بررسی فعالیت ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده عضله ماهی گوبی (Zosterisessor ophiocephalus) با استفاده از هیدرولیز آنزیمی آلکالاز نشان دادند که فعالیت ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده وابسته به غلظت است و قادر به طولانی‌تر کردن زمان APTT می‌باشد(۱۶).

در مطالعه حاضر نیز نتایج بیان گر عملکرد تقریباً مشابه ترکیب شبه هپارینی استخراج شده از عضله خیار دریایی با هپارین استاندارد می‌باشد. بنابراین می‌توان با خالص سازی پروتیئن و سایر روش‌های توالی یابی پپتیدها، از این ترکیب به عنوان یک ترکیب ضد انعقادی مناسب و جایگزین استفاده کرد.

References

1. Blunt J, Buckingham J, Munro MHG. Taxonomy and Marine Natural Products In: Handbook of marine natural products. Fattorusso E, Gerwick WH, Taglialetela-

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:40 +0430 on Wednesday May 31st 2017

Scafati O. New Yourk: Springer 2012. p. 128-131.

2. Mayer AMS, Rodriguez AD, Taglialatela-Scafati O, Fusetani N. Marine compounds with anti-bacterial, anti-diabetic, anti-fungal, anti-inflammatory, anti-portozoal, anti-tuberculosis and anti-viral activities; affecting the immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. Mar Drugs 2003; 11(7): 2510-2573.
3. Hamel JF, Mercer A. Evidence of chemical communication during the Gametogenesis of Holothuroids. Journal of Ecology 1996; 77(5): 1600-1616.
4. Yokoyama H. Growth and food source of the sea cucumber Apostichopus japonicus cultured below fish cages-potential for integrated multi-trophic aquaculture. Aquaculture 2013; 372-375: 28-38.
5. Chen J. Present status and prospects of sea cucumber industryin China. In: Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. Lovatelli A, Conand C, Purcell S, Uthicke J, F, Hamel A. Mercier. Rome: FAO; 2005. p. 25-38.
6. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods. Mar Drugs 2011; 9(10): 1761-1805.
7. Luo L, Wu M, Xu L, Lian W, Xiang J, Lu F, et al. Comparison of Physicochemical Characteristics and Anticoagulant Activities of Polysaccharides from Three Sea Cucumbers. Mar Drugs 2013; 11(12): 399-417.
8. Krishnaa C. Extraction of sulfated polysaccharides from cuttlefish (Sepia sp.) bone. PhD thesis. Department of biotechnology. SRM University 2008.
9. Ramakrishnan VV, Ghaly AE, Brooks MS, Budge SM. Extraction of oil from mackerel fish processing waste using alcalase Enzyme. Enz Eng 2013; 2(115): 1-10.
10. Khodabandeh S, Fouchereau-Peron M. Evidence for the presence of CGRP-like molecular in the Artemia urmiana (Crustacean, Anostraca) Protein Journal 2012; 150: 129.
11. Rajapakse N, Jung WK, Mendis E, Moon SH, Kim SK. A novel anticoagulant purifired from fish protein hydrolysate inibitis factor XIIa and platelet aggregation. Life Science 2005; 76(22): 2607-2619.
12. Dellias GM, Onofre GR, Werneck CC, Landeira- Fernandez AM, Melo FR, Farias WR, Silva LCF. Stractural composition and differential anticoagulant activities of dermatan sulfat from the skin of for species of rays. Biochimie 2004; 85(9): 677-683.
13. Chen SH, Xue CH, Yin L, Tang Q, Yu G, Chai W. Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. Carbohydr Polym 2011; 83(2): 688-696.
14. Tahmasebi M, Khodabandeh S. Extraction of Anticoagulant Compound from Persian Gulf sea anemone Stichodactyla haddoni. Iranian South Medical Journal 2015; 18(3): 508-515 (Persian).
15. Hemati SH, Khodabandeh S, Sha'abani Panbeh-choleh S, Hamedi-Shahraki M. Examining Antithrombotic Property of Extarcting Glycosaminoglycan Compositions from Carcharhinus dussumieri Whitecheek Shark's Cartilage. Biothecnology Tarbiat Modares University 2014; 5(1): 60-70 (Persian).
16. Nasri R, Ben Amor I, Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Dhulster P, Gargouri J, et al. Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. Food Chem 2002; 133(3): 835-841.

www.SID.ir