

Anticoagulant Properties of Protein Hydrolysates from the Muscle of Sea Cucumber

Samira Besharati¹,
Saber Khodabandeh²

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).

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

سمیرا بشارتی^۱صابر 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 می‌توانند 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 ۱۳۰ و ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان پروترومبین (PT) در چهار غلظت ۹۰۰، ۶۷۰، ۴۴۰ و ۲۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی پلاسما خون انسان انجام شد.

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

استنتاج: می‌توان 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.

واژه‌های کلیدی: خیار دریایی، پروتئین هیدرولیز شده، هپارین

مقدمه

ضد تومور کاربرد 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 می‌باشد (۳). این جانوران از گذشته‌های دور در

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

E-mail: surp78@gmail.com

مؤلف مسئول: صابر خدابنده - نور: بلوار امام رضا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی تربیت مدرس

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

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 الکلایز رسانده شد و آنزیم الکلایز 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 *BCA (Bicin Choninic Asid)* از سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albomin) به عنوان محلول استاندارد و از کیت سنجش پروتئین *BCA* حاوی محلول های *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 پلاسما خون جدا شد (۱۱).
ضمن این که جهت تهیه غلظت های رقیق سازی شده پروتئین هیدرولیز، برای تست *PT* چهار غلظت متفاوت ۹۰، ۶۷۰، ۴۴۰ و ۲۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر و برای تست *APTT* نیز غلظت های 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 بین المللی در یک میلی لیتر، 5000 IU/ML می باشد).

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)

طب سنتی کشورهای آسیایی استفاده شده اند و حدود ۲۸ گونه از این آبی خوراکی هستند که در سواحل ایرانی خلیج فارس بیش تر *Holothuria* می باشد (۴).

پروتئین های موجود در خیار دریایی دارای طیف کامل از اسید آمینه های ضروری و غیر ضروری است. ضمن این که خیار دریایی علاوه بر برخورداری از پروتئین کافی و ارزش غذایی بالا در درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرد (۵). تاکنون فعالیت های بیولوژیک خیارهای دریایی شامل خاصیت ضد سرطانی، ضد انعقاد، ضد التهاب، آنتی اکسیدانی و ضد تومور کشف شده است که دلیل وجود این خواص در خیار دریایی را می توان به حضور موادی مانند گلیکو تریپنئید، کندروکتین سولفات، گلیکوز آمینو گلیکان (GAGs) و اسیدهای چرب ضروری در خیار دریایی نسبت داد (۶).
بیماری ترمبوآمبولیک هم چنان 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 می شود (۷) اما به دلیل عوارض مختلف این گلیکوز آمینو گلیکان سولفات استخراج شده از روده خوک و یا ریه گاو نیاز بزرگی به ترکیبات طبیعی جایگزین وجود دارد و آذربان از منابع طبیعی در دسترس برای استخراج این ترکیبات هستند (۸). در همین راستا هیدرولیز پروتئین می تواند به عنوان یک روش کارآمد برای استخراج ترکیبات طبیعی از توالی های 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.

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 نرم افزار 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

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

جدول شماره ۲: زمان انعقاد تست APTT

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

با توجه به جداول، پروتئین هیدرولیز شده استخراجی در هر دو تست انجام شده خاصیت ضد انعقادی داشته ولی نسبت به هپارین استاندارد کم تر بود. به طوری که در روش PT با کاهش غلظت پروتئین هیدرولیز شده توان ضد انعقادی نیز کاهش می یابد به طوری که زمان تأخیر در انعقاد در غلظت ۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نزدیک به غلظت ۲۵ IU هپارین می باشد (جدول شماره ۱). در روش APTT زمان انعقاد با هپارین بسیار بالا بود ولی پروتئین هیدرولیز شده به

را درون لوله آزمایش ریخته و به آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه مورد نظر (هر کدام از غلظت های تهیه شده و محلول های شاهد) و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پلازما سیترا ته اضافه شد. لوله آزمایش به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 محلول های شاهد) اضافه شد. لوله آزمایش برای مدت زمان ۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از گذشت این زمان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پلازما سیترا ته را به آن اضافه گردید. به محض اضافه کردن پلازما سیترا ته، زمان تشکیل لخته ثبت شد (۱۲).

یافته ها و بحث

هیدرولیز پروتئین

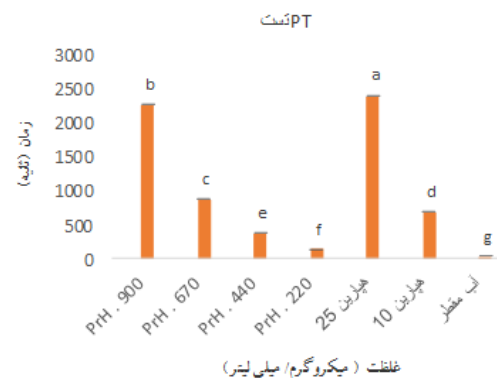
نتایج سنجش مقدار پروتئین کل قبل از هیدرولیز خیار دریایی بر اساس روش سنجش پروتئین BCA نشان داد که در هر ۱ گرم از نمونه خام و تر، مقدار ۱۴/۲ میلی گرم بر گرم پروتئین خام وجود دارد. هم چنین نتایج سنجش پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی *Holothuria parva* نشان داد که در هر ۱ گرم بافت تر آن مقداری برابر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

انعقادی چشمگیر از طریق طولانی تر کردن قابل توجه زمان تست APTT است (۱۳،۷). هم چنین در داخل کشور نیز در زمینه بررسی خاصیت ضدانعقادی گلیکوزآمینو گلیکان‌ها، 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 گلیکوزآمینو گلیکانی و شبه هپارینی را اثبات کرد و نشان داد که این ترکیبات استخراج شده با طولانی تر کردن زمان انعقاد دارای خاصیت ضدانعقادی هستند (۱۵،۱۴).

علاوه بر گلیکوزآمینو گلیکان‌ها، خواص ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده آیزیان 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 به طور قابل توجهی طولانی می‌کند (۱۱). هم چنین 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 طولانی تر 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 خلص سازی پروتئین و سایر روش‌های توالی یابی پپتیدها، از این ترکیب به عنوان یک ترکیب ضد انعقادی مناسب و جایگزین استفاده کرد.

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). هم چنین مقایسه میانگین داده‌های غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده خیار دریایی در هر دو تست PT و APTT اختلاف معنی داری را بین غلظت‌های مختلف با یکدیگر و نمونه کنترل نشان داد ($p < 0/01$) (نمودار شماره ۱).



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

در این مطالعه فعالیت ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده عضله خیار دریایی نشان داد که این ترکیب با طولانی تر کردن زمان انعقاد دارای خاصیت ضد انعقادی است. اما همان طوری که اشاره شد تحقیقات پیشین گزارش داده‌اند که گلیکوزآمینو گلیکان‌های خیار دریایی خاصیت ضد دارد ولی روی پروتئین هیدرولیز شده ی آن تحقیقی یافت نشد به طوری که نتایج مطالعات Luo و همکاران در سال ۲۰۱۳ و chen و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که دو نوع پلی ساکراید کندرویتین سولفات فوکوزاته و فوکان از عضله خیار دریایی استخراج شد که کندرویتین سولفات فوکوزاته دارای فعالیت ضد انعقادی بیش تری حتی در غلظت‌های پایین نسبت به فوکان سولفات بود. این خاصیت ضد

References

1. Blunt J, Buckingham J, Munro MHG. Taxonomy and Marine Natural Products In:

Handbook of marine natural products. Fattorusso E, Gerwick WH, Tagliatalela-

- Scafati O. New Yourk: Springer 2012. p. 128-131.
2. Mayer AMS, Rodriguez AD, Tagliatela-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 industry in 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 purified from fish protein hydrolysate inhibits 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. Structural 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.