

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 بابتن 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 پلاسمای 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 پلاسمای 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 گلیکوز آمینو گلیکان‌هایی 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 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

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 الکالاز رسانده شد و آنزیم الکالاز 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 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 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر، ۵۰۰۰ 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)

طب سنتی کشورهای آسیایی استفاده شده اندو حدود ۲۸ گونه از این آبی خوراکی هستند که در سواحل ایرانی خلیج فارس بیش تر *Holothuria* می باشد (۴). پروتئین‌های موجود در خیاردریایی دارای طیف کامل از اسید آمینه‌های 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 گلیکوترپنئید، کندروکتین سولفات، گلیکوز آمینو گلیکان (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 گلیکوز آمینو گلیکان سولفات‌ها استخراج شده از روده خوک و یا ریه گاو نیاز بزرگی به ترکیبات طبیعی جایگزین وجود دارد و آبی‌زان 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 گونه‌های 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 روش‌ها

مطالعه حاضر به روش تجربی بوده است.

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 سیترا ته 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 غلظت‌های 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 سیترا ته را به آن اضافه گردید. به محض اضافه کردن پلاسما سیترا ته، 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 acid) 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 (میکرو گرم 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 (میکرو گرم 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

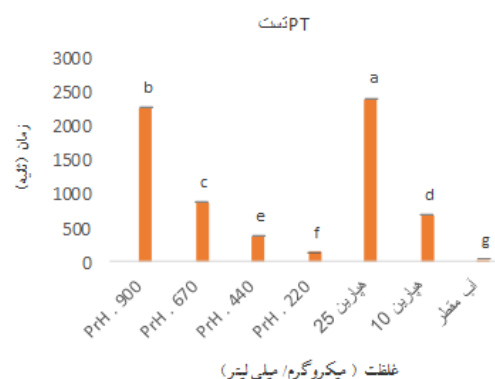
با توجه به جداول، پروتئین هیدرولیز شده استخراجی در هر دو تست انجام شده خاصیت ضد انعقادی داشته ولی نسبت به هپارین استاندارد کم تر بود. به طوری که در روش PT با کاهش غلظت پروتئین هیدرولیز شده توان ضد انعقادی نیز کاهش می‌یابد به طوری که زمان تأخیر در انعقاد در غلظت ۹۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نزدیک به غلظت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

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 گلیکان ها، طهماسبی و همکاران در سال ۱۳۹۴ از تانتاکول های 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 آن ها 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 گلیکان ها، خواص ضد انعقادی پروتئین هیدرولیز شده آبریان مورد توجه بوده است. به گونه ای که Rajapakse و همکاران در سال ۲۰۰۵ با روش هیدرولیز عضله کفشک ماهی زرد باله (Yellowfin) با آنزیم های مختلف از جمله آلکالاز موفق به شناسایی پروتئین ضد انعقادی جدیدی شده اند که زمان APTT را به طور قابل توجهی طولانی می کند (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 می باشد (۱۶).

در مطالعه حاضر نیز نتایج بیان گر عملکرد تقریباً مشابه ترکیب شبه هپارینی استخراج شده از عضله خیار دریایی با هپارین استاندارد می باشد. بنابراین می توان با خلص سازی پروتئین و سایر روش های 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 داده های غلظت های مختلف پروتئین هیدرولیز شده خیار دریایی در هر دو تست PT و APTT اختلاف معنی داری را بین غلظت های مختلف با یکدیگر و نمونه کنترل نشان داد ($p < 0.01$) (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 طولانی تر کردن زمان انعقاد دارای خاصیت ضد انعقادی است. اما همان طوری که اشاره شد تحقیقات پیشین گزارش داده اند که گلیکوزآمینو گلیکان های 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 ساکارید کندرویتین سولفات فوکوزاته و فوکان از عضله خیار دریایی استخراج شد که کندرویتین سولفات فوکوزاته دارای فعالیت ضد انعقادی بیش تری حتی در غلظت های پایین نسبت به فوکان سولفات بود. این خاصیت ضد

References

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

- 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 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 sulfate 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, Hamed-Shahraki M. Examining Antithrombotic Property of Extracting 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, Bougateg A, Nedjar-Arroume N, Dhulster P, Gargouri J, et al. Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chem* 2002; 133(3): 835-841.