



## استخراج ترکیبات ضدانعقادی از تاناکول‌های شقایق دریایی

### *Stichodactyla haddoni* خلیج فارس

مهدیه طهماسبی<sup>۱</sup>، صابر خدابنده<sup>\*۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۱۹ - پذیرش مقاله: ۹۳/۱/۲۰)

#### چکیده

زمینه: موجودات دریایی منابع بی‌نظیر محصولات طبیعی زیست فعال هستند، که ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی آن‌ها در تولیدات طبیعی جانداران خشکی‌زی یافت نمی‌شود. از بین ترکیبات مختلف زیست فعال، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها هستند. هپارین، گلیکوزآمینوگلیکانی به شدت سولفات‌ه است که خاصیت ضد انعقاد طبیعی دارد. ترکیبات هپارینی و شبه هپارینی در بیشتر جنبه‌های پزشکی به‌عنوان داروهای ضدانعقادی استفاده می‌شوند. با این حال، به دو دلیل عمده (۱) آلودگی نمونه‌های هپارین به‌دست آمده از روده خوک یا گاو به پاتوژن‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا (۲) کمبود حجم و هزینه، منبع استفاده از هپارین محدود می‌شود و نیاز زیادی برای ترکیبات جدید از منابع طبیعی وجود دارد. با توجه به اهمیت گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و استفاده گسترده از هپارین در پزشکی، در تحقیق حاضر، به استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی از شقایق دریایی و بررسی خاصیت ضد انعقادی آن روی خون انسان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی از تاناکول شقایق دریایی (*Stichodactyla haddoni*) با استفاده از نمک ستیل پیریدینوم کلراید صورت گرفت. سپس فعالیت ضد انعقادی گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده روی پلاسمای خون انسان به‌صورت دستی و با دو روش زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده (APTT) و زمان پروترومبین (PT) آزمایش شد.

یافته‌ها: مقدار گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده ۲۴ میلی‌گرم از هر گرم وزن خشک تاناکول به‌دست آمد. نتایج بررسی فعالیت ضدانعقادی نشان داد که گلیکوزآمینوگلیکان استخراجی خاصیت ضد انعقادی داشته و در مقایسه با نمونه‌ی شاهد (۳۳ دقیقه) فرایند انعقاد خون را طولانی‌تر نمود. در بررسی خاصیت ضد انعقادی با روش سنجی APTT و PT نیز گلیکوزآمینوگلیکان تاناکولی در مقایسه با شاهد زمان طولانی‌تری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ترکیبات ضد انعقادی در تاناکول شقایق دریایی موجود بوده و اگرچه خاصیت ضدانعقادی ضعیف‌تری را نسبت به هپارین نشان دادند، ولی می‌تواند جایگزین آن حداقل در شرایط آزمایشگاهی گردد.

واژگان کلیدی: هپارین، شقایق دریایی، ترکیبات ضد انعقادی، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها

\* تهران، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی واحد نور، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

## مقدمه

به دلیل شرایط فیزیکی و شیمیایی خاص محیط دریا، تقریباً هر یک از ارگانوسمها، مولکول‌هایی ویژه با ساختار منحصر به فرد تولید می‌کنند، اما فراتر از تنوع شیمیایی، دریا تنوع زیستی منحصر به فردی را نیز فراهم می‌نماید. لذا تنوع زیستی بالاتر در محیط‌های آبی نسبت به محیط‌های خشکی، زمینه مناسب‌تری را برای تولید مواد زیست فعال و در نتیجه توسعه‌ی داروهای زیستی ایجاد می‌کند (۱ و ۲).

از ترکیبات مختلف زیست فعال، به هتروپلی‌ساکاریدهای موجود در بسیاری از آبزیان دریایی می‌توان اشاره کرد. یکی از فراوان‌ترین و شناخته شده‌ترین هتروپلی‌ساکاریدها در آبزیان دریایی، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها<sup>۱</sup> هستند (۳)، که نقش مهمی در رشد سلول، تمایز، مورفوزن، مهاجرت سلول و تهاجم باکتری و ویروس دارند (۴ و ۵). اصلی‌ترین گلیکوزآمینوگلیکان‌ها کندرویتین سولفات، درماتان سولفات، هیالورونیک اسید، هپاران سولفات و هپارین هستند (۶). هپارین، گلیکوزآمینوگلیکانی به شدت سولفات‌ه است که خاصیت ضد انعقاد طبیعی دارد (۷).

در پزشکی از هپارین و مشتقات آن به‌عنوان ضد انعقاد در شرایطی مانند سندروم کرونری حاد، آمبولیسم ریوی، فیبریلاسیون عروقی و ترومبوس عمیق ریوی (۳) و اخیراً برای درمان بیماری عفونی، التهاب و شاهد رشد سلولی در زخم‌ها و شاهد سرطان استفاده می‌شود (۸). اما از آنجایی که استفاده از هپارین به‌دست آمده از بافت پستانداران به دلیل وجود اعتقادات مذهبی - فرهنگی و نگرانی ناشی از ایجاد بیماری جنون گاوی دارای محدودیت می‌باشد و همچنین منابع غیر جانوری هپارین، مانند تولید با روش

شیمیایی، آنزیمی یا هپارین‌های نوترکیب در حال حاضر برای اهداف دارویی در دسترس نیست، این نگرانی‌ها انگیزه قوی برای شناسایی ترکیبات جایگزین شبه هپارین یا هپارینی از منابع دریایی را ایجاد می‌کند (۸). مطالعات زیادی پیرامون استخراج گلیکوزآمینوگلیکان سولفات‌ه از بی‌مهرگان دریایی توسط سایر محققین انجام شده است (۹-۱۲). با توجه به اهمیت استفاده از منابع جایگزین و همچنین استفاده از منابع دریایی برای تأمین دارو و ترکیبات زیست فعال، در تحقیق حاضر از شقایق دریایی برای استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی و بررسی خواص ضدانعقادی آن استفاده شد. برای استخراج این ترکیبات از روش Holick (۱۳) استفاده شد تا ترکیبات هپارینی یا شبه هپارینی با کمترین ناخالصی جداسازی گردد و همچنین خواص ضد انعقادی آن به‌صورت دستی و با دو روش APTT و PT بر روی خون انسان مطالعه شد (۱۴).

## مواد و روش‌ها

نمونه برداری شقایق دریایی از نواحی جزر و مدی سواحل جزیره هرمز انجام شد، بعد از انتخاب سه نمونه صفحه دهانی نمونه‌ها با کاتر برش داده شد و پس از شستشو دادن با آب دریا، در نیتروژن مایع (۱۸۵- درجه سانتی‌گراد) فریز شدند و سپس به آزمایشگاه دانشکده‌ی علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. بعد از دفریز کردن نمونه‌ها، تانتاکول‌ها جدا شده و در داخل پتری دیش در فریز درایر خشک شدند. برای استخراج گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، ۲/۵ گرم از نمونه‌های خشک شده تانتاکولی با ۵۰ میلی‌لیتر سدیم سولفات ۰/۴ مولار در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱

<sup>1</sup> Glycosaminoglycans

گلیکوزآمینوگلیکان به دست آمده وزن شده برای بررسی‌های بیشتر در دسیکاتور نگه‌داری شد. آماده کردن پلاسما: سنجش ضد انعقادی در آزمایشگاه با پلاسما سیترا ته ضعیف پلاکت (PPP)<sup>۳</sup> انجام شد. خون انسان از اهداکنندگان سالم جمع‌آوری و فوراً با تری سدیم سیترات ۳/۸ درصد به نسبت حجمی ۹ به ۱ مخلوط و با دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و برای بررسی سنجش ضد انعقادی به دو صورت زیر مورد استفاده قرار گرفت.

#### الف) سنجش ضد انعقادی به صورت دستی:

محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آب دیونیزه) از گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از تاناکول و نیز هپارین استاندارد<sup>۴</sup> آماده شد. هر غلظت در داخل یک اپندورف جداگانه ریخته و نامگذاری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از پلاسما خون سیترا ته داخل هر اپندورف پیست شد و سپس داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از ۱ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلسیم کلرید اضافه شد و بلافاصله زمان ثبت گردید. برای نمونه شاهد نیز، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر داخل یک اپندورف ریخته و به آن ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما سیترا ته و ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید اضافه شد و بلافاصله زمان ثبت زمان انعقاد گرفته شد. محتوی اپندورف به‌طور مداوم اما به تدریج از حالت عمودی در زمان کوتاهی به حالت افقی مورب شد، تا محتویاتش تا زمانی که ژل در این حالت بدون حرکت باقی بماند، دیده شود.

ساعت انکوبه و سپس pH محلول با سدیم هیدروکسید ۲۰ درصد به ۱۱/۵ رسانده شد. بعد از انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، آلومینیوم سولفات برای کاهش pH به ۷/۷ اضافه و تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت حرارت داده شد. نمونه از طریق یک مش پارچه‌ای فیلتر شد و در معرض ستیل پیریدینیوم کلراید<sup>۲</sup> (Sigma-Aldrich) قرار گرفت. به فیلتر جمع‌آوری شده، ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC) ۳ درصد در سدیم کلراید ۰/۸ مولار) اضافه شد. سوسپانسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد و رسوب سفید رنگ تشکیل شد. سپس محلول را داخل لوله فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و برای جمع‌آوری ترکیب پلی‌ساکاریدی سولفات خام در دور rpm ۷۰۰۰ (۳۰۰۰ g) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی را دور ریخته و برای حذف نمک‌های پیریدینیوم از ترکیب، رسوب به دست آمده در محلول سدیم کلراید ۲ مولار (از قبل حرارت داده شده، ۴۰ درجه سانتی‌گراد) حل شد. ترکیب از طریق کاغذ فیلتر شماره ۴۱ واتمن فیلتر و سپس به فیلتر، ۳ حجم اتانول ۹۵ درصد برای رسوب دادن پلی‌ساکاریدهای سولفات خام افزوده شد و به این ترتیب، ترکیبات مورد نظر با سانتریفیوژ در دور rpm ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد. رسوب دو بار با متانول ۹۹/۹ درصد شسته و سانتریفیوژ (دور rpm ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) شد و در فریز درایر به مدت ۱ ساعت خشک گردید.

<sup>۳</sup> citrated human platelet poor plasma

<sup>۴</sup> Sodium Salt from Porcine Intestinal Mucosa  $\geq 180$  USP, Sigma-Aldrich

<sup>۲</sup> Cetyl pyridinium chloride monohydrate (CPC) Sigma-Aldrich

گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراجی سفید رنگ بودند. میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌های خام در تانتاکول ۲۴ میلی‌گرم/گرم بافت خشک محاسبه شد.

### سنجش ضد انعقادی

نتایج سنجش خواص ضد انعقادی گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده در جدول ۱ آورده شده است. در سه غلظت مختلف (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر)، این ترکیبات بر روی پلازما خون انسان نقش ضد انعقادی داشتند اما این ضد انعقادی نسبت به هپارین استاندارد (۱۸۰ واحد در میلی‌گرم) در غلظت‌های مشابه کمتر بود.

جدول ۱) مقایسه زمان انعقاد پلازما خون انسان با استفاده از سه غلظت مختلف گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تانتاکول و هپارین استاندارد

شماره	غلظت (میکروگرم/میلی‌لیتر)	زمان انعقاد (دقیقه)	
		گلیکوزآمینوگلیکان استخراجی	هپارین استاندارد
	۷۵۰	۹۱	>۲۴۸
۳۳	۵۰۰	۷۳	۲۴۸
	۲۵۰	۳۸	۱۱۰

سنجش ضد انعقادی با استفاده از دو روش زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده (APTT) و زمان پروترومبین (PT)

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده، زمان انعقاد در تیمارهای گلیکوزآمینوگلیکان استخراجی از تانتاکول شقایق دریایی در مقایسه با نمونه‌های شاهد طولانی‌تر بود. به طوری که مقادیر طبیعی (نمونه شاهد) APTT و PT برای پلازما سالم انسان ۴۰ و ۱۳ ثانیه ثبت شد. در حالی که زمان APTT تیمار گلیکوزآمینوگلیکان طولانی شد و به ۶۰ ثانیه در

ب) سنجش ضد انعقادی با استفاده از دو روش زمان ترومبوپلاستین نسبی (APTT)<sup>۵</sup> و زمان پروترومبین (PT)<sup>۶</sup>

در این روش محلول‌هایی با دو غلظت (۱۸۸۰ و ۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب دیونیزه) از گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده ساخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر پلازما سیتراته به هر غلظت به صورت جداگانه افزوده شد و برای سنجش ضدانعقادی با استفاده از دو روش PT (Fisher Diagnostics) و APTT (Fisher Diagnostics) آماده شدند.

**سنجش PT: ۲۰۰** میکرولیتر معرف PT در دو عدد لوله آزمایش ریخته و در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۱ دقیقه انکوبه شدند، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک‌های ساخته شده (غلظت‌های ساخته شده از گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تانتاکول+ پلازما سیتراته) را به هر لوله آزمایش اضافه و فوراً زمان انعقاد ثبت شد.

**سنجش APTT: ۱۰۰** میکرولیتر معرف APTT و ۱۰۰ میکرولیتر استوک‌های ساخته شده (غلظت‌های ساخته شده از گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تانتاکول+ پلازما سیتراته) در لوله‌ی آزمایش ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوبه شدن، به محض افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید به محتویات هر لوله، زمان شروع شد.

### یافته‌ها

استخراج گلیکوزآمینوگلیکان‌های شبه هپارینی گلیکوزآمینوگلیکان‌ها از تانتاکول شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* استخراج شدند.

<sup>۵</sup> Activated partial thromboplastin time (Fisher Diagnostics)

<sup>۶</sup> Prothrombin time (Fisher Diagnostics)

غلظت ۱۸۷۹ (میکروگرم/ میلی‌لیتر) رسید که تقریباً ۱/۵ برابر در مقایسه با گروه شاهد بود.

جدول ۲) زمان انعقاد پلاسمای انسانی در حضور و عدم حضور گلیکوزآمینوگلیکان‌های تانتاکولی شقایق دریایی با استفاده از دو روش <sup>۷</sup> APTT و <sup>۸</sup> PT

زمان انعقاد (ثانیه)				نمونه
سنجش PT (میکروگرم/ میلی‌لیتر)		سنجش APTT (میکروگرم/ میلی‌لیتر)		
۶۲۵	۱۸۷۹	۶۲۵	۱۸۷۹	گلیکوزآمینوگلیکان استخراجی شاهد
۳۲	۳۳	۵۲	۶۰	
	۱۳		۴۰	

### بحث

در بیشتر مقالات منتشر شده ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی با آنزیم‌های پروتئولیتیک استخراج شده‌اند. اما روش استفاده شده در تحقیق حاضر نسبتاً سریع‌تر، ساده‌تر و همچنین هزینه‌ی بالای آنزیم‌های پروتئولیتیک را ندارد. در مطالعه حاضر، میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌های خام در تانتاکول ۲۴ میلی‌گرم/گرم بافت خشک محاسبه شد. تاکنون هیچ گزارشی در ارتباط با استخراج گلیکوزآمینوگلیکان‌ها از شقایق دریایی به جز یک مورد یافت نشد، اما پژوهش‌های زیادی مربوط به استخراج این ترکیبات از سایر منابع جانوری انجام گرفته است. در مطالعات قبلی، طبق همین روش شیمیایی (۱۵) ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی با بازده ۹/۸۵ میلی‌گرم/گرم وزن خشک از گونه *Meretrix casta* استخراج گردید. از گونه *Donax incarnates* نیز مقدار ۶/۴۸ میلی‌گرم

بر گرم وزن خشک ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی به‌دست آمد (۱۶). به‌طور مشابه (۱۴) مقدار ۱۱/۲ میلی‌گرم/گرم وزن خشک گلیکوزآمینوگلیکان را از *Conus betulinus* استخراج کردند. همچنین از وزن تر برخی از جانداران ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی با بازده متفاوتی استخراج شد مانند ترکیبات شبه هپارینی با مقدار ۲/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر از گونه *Anomalocardia brasiliensis* و ۳/۸ میلی‌گرم بر گرم از گونه *Tivela mactroides* استخراج کرد (۱۷). همچنین از صدف‌های دو کفه‌ای *Katylisia opima* و *Donax cuneatus* به‌ترتیب ۵/۴ و ۴/۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی استخراج شد (۱۸).

نتایج مطالعه حاضر به روشنی نشان می‌دهد که مقدار گلیکوزآمینوگلیکان‌های شبه هپارینی در تانتاکول شقایق دریایی به مراتب بیشتر از گزارشات قبلی بوده است. از این رو، می‌توان چنین برداشت کرد که شقایق‌های دریایی نیز می‌توانند به‌عنوان منبعی برای استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی شبه هپارینی باشند. البته بایستی اشاره شود که تفاوت در مقدار گلیکوزآمینوگلیکان استخراجی در آبزیان مختلف می‌تواند به‌دلیل تفاوت در محل نمونه برداری موجود، روش استخراج، خلوص و نوع عصاره گلیکوزآمینوگلیکانی نیز باشد.

به‌طور کلی نقش بیولوژیک هپارین در بی‌مهرگان مبهم باقی مانده است. اما به‌نظر می‌رسد که با توجه به اینکه سخت پوستان، و نرم‌تنان و مرجانیان دارای سیستم گردش خون مشابه پستانداران و سایر مهره‌داران نیستند، بنابراین حضور ترکیباتی که به‌صورت ویژه بر روی پروتئین‌های سیستم انعقادی خون آن‌ها عمل کنند قابل توجه به نظر می‌رسد (۱۹). ارزیابی شکل

<sup>7</sup> Activated partial thromboplastin time  
<sup>8</sup> Prothrombin time

همان‌طور که در جدول نشان داده شده، گلیکوزآمینوگلیکان‌های تانتاکولی زمان APTT را طولانی و به ۵۲ و ۶۰ ثانیه در دو غلظت ۱۸۷۹ و ۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب رساندند که تقریباً ۱/۵ برابر در مقایسه با زمان شاهد بود. همچنین گلیکوزآمینوگلیکان‌های تانتاکولی در سنجش PT، ۳۳ ثانیه زمان انعقاد را طولانی‌تر کرد.

پیش‌بینی می‌شود گلیکوزآمینوگلیکان‌ها روی سنجش APTT اثر می‌گذارند، زیرا گروه‌های سولفات برای ایجاد اثرات ضد انعقادی و فعالیت‌های ضد انعقادی پلی‌ساکاریدها لازم و ضروری هستند، فعالیت ضدانعقادی نه تنها به محتوای سولفات بلکه به موقعیت گروه‌های سولفات نیز بستگی دارد (۲۰ و ۲۱). فعالیت ضد انعقادی هپارین از گونه‌ای به گونه دیگر به دلیل برهمکنش با آنزیم‌ها و مهارکننده‌های سیستم انعقادی متفاوت است (۲۲).

همان‌طور که مشاهده شد به طور کلی ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی استخراج شده در تحقیق حاضر خاصیت ضد انعقادی کمتری را در مقایسه با هپارین استاندارد نشان دادند، که دلیل منطقی برای چنین تفاوتی در فعالیت این نمونه‌ها، عملکرد مقدار ناخالصی غیر ضد انعقادی می‌تواند باشد که همراه با محصول استخراج شده‌اند. با این وجود، به نظر می‌رسد با خالص‌سازی بیشتر ترکیبات استخراجی در تحقیق حاضر بتوان پتانسیل ضد انعقادی آن را افزایش داد.

انعقاد باید بر اساس سادگی و سرعت پایه‌گذاری شود که به اندازه کافی حساس و قابل تجدید برای ارزیابی مراحل اصلی در هموستازی باشد. در هر حال، استاندارد سازی این تست‌ها ضروری است.

در تحقیق حاضر برای ارزیابی ضد انعقادی از روش‌های دستی و روش‌های معتبر PT و APTT استفاده گردید. عصاره‌های پلی‌ساکاریدی شقایق دریایی زمان انعقاد خون را طولانی کردند. فعالیت ضدانعقادی گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تانتاکولی (روی خون انسان) در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب برابر با ۳۸، ۷۸ و ۹۱ دقیقه دیده شد. طبق این نتایج، اگرچه خاصیت ضد انعقادی گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از تانتاکول شقایق دریایی نسبت به هپارین استاندارد کمتر بود ولی خاصیت ضد انعقادی قابل توجه‌ای را نشان داد. با توجه به این نتایج می‌توان اشاره کرد که با جداسازی دقیق‌تر و خالص‌سازی بیشتر می‌توان این فعالیت ضد انعقادی را بیشتر کرده و این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان ترکیب ضد انعقادی جایگزین هپارین، حداقل در شرایط آزمایشگاهی، استفاده گردد. همان‌طوری که در روش‌ها گفته شده از روش‌های متداول کلنیکی نیز برای بررسی خواص ضد انعقادی ترکیبات استخراجی پرداخته شد. مقدار طبیعی APTT و PT برای پلاسمای خون انسان در ۴۰ و ۱۳ ثانیه به دست آمد.

## References

1. Kijjoa A, Sawangwong P. Drugs and cosmetics from the sea. *Mar Drugs* 2004; 2: 73-82.
2. Ely R, Supriya T, Naik C. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *J Exp Mar Biol Ecol* 2004; 309: 121-7.
3. Manjusha KP. Isolation and characterization of glycosaminoglycans and a study of its bioactive potential in two commercially important species of Cephalopods, *Loligo duvauceli* and *Sepia pharaonis* [dissertation]. India: Cochin Univ Sci Technol 2011, 262 p.
4. Yamada S, Sugahara K. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan

- sulfate. *Curr Drug Discov Tech* 2008; 5:289-301.
5. Sugahara K, Mikami T, Uyama T, et al. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struc Biol* 2003; 13: 612-20.
  6. Pomin VH. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 2012; 1820: 1971-9.
  7. Nader HB, Lopes CC, Rocha HA, et al. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 951-66.
  8. Volpi N. Occurrence and structural characterization of heparin from mollusks. *ISJ* 2005; 2: 6-16.
  9. Yamada S, Sugahara K, Özbek S. Evolution of glycosaminoglycans: comparative biochemical study. *Commun Integr Biol* 2011; 4: 150-8.
  10. Cavalcante MC, de Andrade LR, Santos-Pinto CDB, et al. Colocalization of heparin and histamine in the intracellular granules of test cells from the invertebrate *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). *J Struct Biol* 2002; 137: 313-21.
  11. Santos JC, Mesquita JM, Belmiro CL, et al. Isolation and characterization of a heparin with low antithrombin activity from the body of *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). Distinct effects on venous and arterial models of thrombosis. *Thromb Res* 2007; 121: 213-23.
  12. Medeiros GF, Mendes A, Castro RA, et al. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 2000; 1475: 287-94.
  13. Holick MF, Judkiewicz A, Walworth N, et al. Recovery of heparin from fish wastes. *Biotech of marine polysac*. New York: Hemisphere Pub Co 1985, 389-97.
  14. Ray J. Isolation and characterisation of heparin and heparin-like glycosaminoglycans from *cynoglossus semifasciatus* and *conus betulinus* 2008, 66 p.
  15. Vidhyanandhini R, Saravanan R, Vairamani S, et al. The anticoagulant activity and structural characterization of fractionated and purified glycosaminoglycans from venerid clam *Meretrix Casta* (Chemnitz). *J Liq Chromatogr Related Technol* 2014; 37: 917-29.
  16. Karthikeyan V, Gopalakrishnan A, Vijayakumar R, et al. Anticoagulant activity of marine bivalve *Donax incarnates* Lin, 1758 Collected from Thazhanguda, Southeast coast of India. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: S1798-801.
  17. Dietrich CP, de Paiva J, Moraes CT, et al. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliiana*. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1985; 843: 1-7.
  18. Vijayabaskar P, Balasubramanian T, Somasundaram S. Low-molecular weight molluscan glycosaminoglycan from bivalve *katelaysia opima* (gmelin). *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2008; 30: 175-80.
  19. Dietrich CP, Nader HB, de Paiva JF, et al. Heparin in molluscs: chemical, enzymatic degradation and  $C^{13}$  and  $H^1$  nmr spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. *Int J Biol Macromol* 1989; 11: 361-6.
  20. Linhardt RJ, Gunay NS. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*; 1999: New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, c1974-. p. 5-16.
  21. Luo L, Wu M, Xu L, et al. Comparison of physicochemical characteristics and anticoagulant activities of polysaccharides from three sea cucumbers. *Mar Drugs* 2013; 11: 399-417.
  22. Mulloy B. High-field NMR as a technique for the determination of polysaccharide structures. *Mol Biotechnol* 1996; 6: 241-65.

Original Article

# Extraction of Anticoagulant Compound from Persian Gulf sea anemone *Stichodactyla haddoni*

*M. Tahmasebi*<sup>1</sup>, *S. khodabandeh*<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*

(Received 10 December , 2013      Accepted 9 April, 2014)

*Abstract*

**Background:** The marine environment is an exceptional reservoir of bioactive natural products, many of them exhibit structural/chemical features that not found in terrestrial natural products. Glycosaminoglycans are one of this various bioactive compounds. Heparin, as a well known glycosaminoglycan, is a sulfated glycosaminoglycan that has natural anticoagulant properties. Heparin and heparin-like compounds are used as anticoagulants in many aspects of medicine. However, for two main reasons: 1. Contamination in heparin samples obtained from pig intestine or bovine lung pathogens and other pathogens, 2. resource for use of heparin is limited and there are a lot of requirements for new compounds from natural resources. According to GAGs importance and widespread using of heparin in medicine, in the present study, GAGs compounds extracted from sea anemones and anticoagulant properties of the human blood is investigated.

**Materials and Methods:** GAGs compound was extracted by using cetylpyridinium chloride. Anticoagulation activity of extracted GAGs (the extracted tentacle) was tested in human blood plasma, using manual procedures, and assay system, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT).

**Results:** In this study the amount of the crude GAGs was 24 mg per gram of tentacle dry weight. The results of anticoagulant activity extracted on human blood plasma showed that these compounds prolonged clotting time compared to the control. In APTT and PT assay of the extracted GAGs from the sea anemone also clotting time prolonged in compared to the control.

**Conclusion:** The results demonstrated that anticoagulant compounds existed in the tentacle of the sea anemone, and although their effects is weaker than the heparin, but they can be substituted for heparin, at least in laboratory conditions.

**Key words:** Heparin, Sea anemone, Anticoagulant compounds, Glycosaminoglycans

\*Address for correspondence: Department of Marine Biology, Tarbiat Modares University, Faculty of Marine Sciences, Noor, IRAN, E.mail: skhoda@modares.ac.ir