دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۳، صفحه ۵۱۵ – ۵۰۸ (مرداد و شهریور ۱۳۹۴)
ISMJ 2015; 18(3): 508-515

استخراج ترکیبات ضدانعقادی از تانتاکول‌های شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* خلیج‌فارس

مهدیه طهماسبی [۱]، صابر خدابنده [۱*]

[۱] 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، گلیگوزآمینوگلیکانی 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 ریه 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 تانتاکول شقایق دریایی (***Stichodactlyla 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 تانتاکول 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 تانتاکولی در مقایسه با شاهد زمان طولانی‌تری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ترکیبات ضد انعقادی در تانتاکول 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 زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی واحد نور، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

E-mail: skhoda@modares.ac.ir

مقدمه

به دلیل شرایط فیزیکی و شیمیایی خاص محیط دریا، تقریباً هر یک از ارگانیسم‌ها، مولکول‌هایی ویژه با ساختار منحصر به‌فرد تولید می‌کنند، اما فراتر از تنوع شیمیایی، دریا تنوع زیستی منحصر به‌فردی 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[1] هستند (۳)، که نقش مهمی در رشد سلول، تمایز، مورفوژنز، 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، گلیگوزآمینوگلیکانی به‌شدت 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 آنجایی‌که استفاده از هپارین به‌دست آمده از بافت پستانداران به‌دلیل 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 (۱۲-۹). 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

نمونه‌برداری 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 دفریزکردن 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

[1] Glycosaminoglycans

ساعت انکوبه و سپس pH محلول با سدیم هیدروکسید ۲۰ درصد به ۱۱/۵ رسانده شد. بعد از انکوباسیون در دمای اتاق به‌مدت 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[۲] (Sigma-Aldrich) قرار گرفت. به فیلترا جمع‌آوری شده، ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC ۳ درصد در سدیم کلراید ۰/۸ مولار) اضافه شد. سوسپانسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد و رسوب سفید رنگ تشکیل شد. سپس محلول را داخل لوله فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و برای جمع‌آوری ترکیب پلی‌ساکاریدی سولفات خام در دور ۷۰۰۰ rpm (۳۰۰۰ g) به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. محلول رویی را دور ریخته و برای حذف کردن نمک‌های پیریدینیوم از ترکیب، رسوب به‌دست 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 فیلترا، ۳ حجم اتانول ۹۵ درصد برای رسوب دادن پلی ساکاریدهای سولفاته خام افزوده شدو به این ترتیب، ترکیبات مورد نظر با سانتریفوژ در دور ۶۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد. رسوب دو بار با متانول ۹۹/۹ درصد شسته و سانتریفوژ (دور ۶۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه) شد و در فریز درایر به‌مدت ۱ ساعت خشک گردید. گلیکوزآمینوگلیکان به‌دست آمده وزن شده برای بررسی‌های بیشتر در دسیکاتور نگه‌داری شد.

آماده کردن پلاسما: سنجش ضدانعقادی در آزمایشگاه با پلاسما سیتراته ضعیف پلاکت (PPP)[۳] 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 ۵۰۰۰ rpm به‌مدت 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 به‌صورت دستی:

محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آب دیونیزه) از گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از تانتاکول و نیز هپارین استاندارد[۴] آماده شد. هر غلظت در داخل یک اپندورف جداگانه ریخته و نامگذاری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از پلاسما خون سیتراته داخل هر اپندورف پیپت 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 سیتراته و ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید اضافه شد و بلافاصله زمان برای 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.

[2] Cetyl pyridinium chloride momohydrate (CPC) Sigma-Aldrich

[3] citrated human platelet poor plasma

[4] Sodium Salt from Porcine IntestinalMucosa ≥180 USP, Sigma-Aldrich

ب) سنجش ضد انعقادی با استفاده از دو روش زمان ترومبوپلاستین نسبی (APTT)[5] و زمان پروترومبین (PT)[6]

در این روش محلول‌هایی با دو غلظت (۱۸۸۰ و ۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب دیونیزه) از گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده ساخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما سیتراته به هر غلظت به‌صورت 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 به‌مدت ۱ دقیقه انکوبه شدند، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک‌های ساخته شده (غلظت‌های ساخته شده از گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تانتاکول+ پلاسما 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+ پلاسما سیتراته) در لوله‌ی آزمایش ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۲ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوبه شدن، به‌محض 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. 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 پلاسما 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 پلاسمای خون انسان با استفاده از سه غلظت مختلف گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تانتاکول و هپارین استاندارد

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

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

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

[5] Activated partial thromboplastin time(Fisher Diagnostics)
[6] 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 APTT [7] و PT [8]

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

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 brasiliana* و ۳/۸ میلی‌گرم بر گرم از گونه *Tivela mactroides* استخراج کرد (۱۷). همچنین از صدف‌های دو کفه‌ای *Katelysia 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

[7] Activated partial thromboplastin time
[8] Prothrombin time

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 هرحال، 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، به‌ترتیب 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 شرایط‌های 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 به‌دست آمد.

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 به‌ترتیب 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 به‌دلیل 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.

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: comparativebiochemical 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 brasiliana. Biochim Biophys Acta (BBA) 1985; 843: 1-7.
18.Vijayabaskar P, Balasubramanian T, Somasundaram S. Low-molecular weight molluscan glycosaminoglycan from bivalve *katelysia 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.

ISMJ 2015; 18(3): 508-515

Original Article

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

M. Tahmasebi [1]***, S. khodabandeh*** [1*]

[1] ***Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran***

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

Abstract

Background: The marine environment is anexceptional 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 ofanticoagulant 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