شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲
صفحات ۴۰۷-۳۹۷

استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی از تنتاکول‌های ماهی مرکب *Sepia pharaonis* و بررسی خاصیت ضد انعقادی این ترکیبات

سحر شعبانی پنبه چوله[۱]، صابر خدابنده[۲]*، مهدیه طهماسبی[۱]، شهلا همتی[۱]، مریم حامدی[۱]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی واحد نور، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی واحد نور، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۶

چکیده

در سال‌های اخیر بسیاری از ترکیبات زیست‌فعال مانند پلی‌ساکاریدهای سولفاته با ساختارهای جدید از سرپایان استخراج، خالص‌سازی و توصیف شده است. بنابراین، بررسی خاصیت ضدانعقادی گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از تنتاکل‌های ماهی مرکب *Sepia pharaonis*، در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. بخش انتهایی تانتاکول‌ها جدا و مقدار ۲۱ گرم وزن تر به روش انجماد خشک شد. استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی با استفاده از ۵ گرم وزن تر و ۴ گرم وزن خشک به صورت جداگانه با استفاده از نمک کاتیونی ستیل پیریدینیوم کلراید انجام شد. از طیف FTIR برای شناسایی و مقایسهٔ ساختاری گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراجی با هپارین، و از روش‌های زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال‌شده (APTT) و زمان پروترومبین (PT) جهت سنجش خاصیت ضد انعقادی روی پلاسمای خون انسان استفاده گردید. نتایج نشان داد که ۵ گرم وزن تر و ۴ گرم وزن خشک از تنتاکول‌ها، به‌ترتیب حاوی ۲۵۰ و ۸۰۰ میلی گرم گلیکوزآمینوگلیکان‌اند. نتایج طیف FTIR نیز تأییدکنندهٔ حضور ترکیبات شبه هپارینی در بین گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده بود. بررسی خاصیت ضد انعقادی نشان داد که ترکیبات استخراج شده خاصیت ضد انعقادی داشته و با افزایش غلظت، زمان انعقاد به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در نتیجه تانتاکول‌های ماهی مرکب حاوی گلیکوزآمینوگلیکان‌های قابل استخراجی است که می‌توانند شبیه هپارین عمل کنند، ولی قدرت ضد انعقادی آن‌ها به‌صورت معنی‌داری نسبت به هپارین کمتر است.

واژگان کلیدی: سرپایان، GAGs، هپارین، ضد انعقاد، کندرویتین سولفات

* نویسنده مسئول: صابر خدابنده
Email: skhoda@modares.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 76, No. 3, Autumn 2023
pp. 397-407

Extracting Glycosaminoglycan compounds from *Sepia pharaonis* Squid's tentacles and Examining their Antithrombotic Property of these compounds

Sahar Shabani Panbeh Choleh[1], Saber Khodabandeh[2*], Mahdyeh Tahmasbi[1], Shahla Hemmati[1], Maryam Hamedi[1]

1. M.Sc. student, Department of Marin Biology, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
2. Associate professor, Department of Marin Biology, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Received: 17-Dec-2022 **Accepted: 28-Aug-2023**

Abstract
In recent years, many bioactive compounds has been extracted, described and purified from cephalopods. These invertebrates are a very rich source of sulfated polysaccharides with new structures. The aim of this study was investigation of anticoagulant Glycosaminoglycans extracted from Sepia Pharaonis tentacles. Following the separation of their tentacles terminal portion, 21g of the wet weight was freeze-dried. First, glycosaminoglycans were extracted using 5g wet weight and 4g dry weight, separately, by Cetyl Piridinium Chloride cationic salt. In order to do identification of extracted glycosaminoglycans and compare with heparin, the FTIR spectrum was used. Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) and the Prothrombin Time (PT) methods were used for anticoagulation properties. Results showed that 5g (wet weight) and 4 g (dry weight) of tentacles contain 250 and 800 mg of the Glycosaminoglycan, respectively. Also, the FTIR spectrum results confirmed the presence of heparin-like compositions among extracted glycosaminoglycans. Investigating the anticoagulation properties indicated that the extracted compositions have this property and increasing concentration enhance the clotting time of the human blood, significantly. According to the present study results, squid tentacles contain glycosaminoglycans which could act like heparin but significantly weaker antithrombotic feature than heparin.

Keywords: Cephalopods, GAGs, Heparin, Anticoagulant, Chondroitin sulfate

* Corresponding author: Saber Khodabandeh Email: skhoda@modares.ac.ir

۱. مقدمه

اقیانوس‌ها با بیشترین فعالیت‌های زیستی، دارای تنوع زیستی غنی و مخزنی استثنایی از محصولات طبیعی زیست‌فعال، در سیارهٔ زمین هستند. محصولات طبیعی زیست‌فعال آن‌ها دارای خواص شیمیایی و ساختاری مهمی‌اند که اغلب در اکوسیستم خشکی یافت نمی‌شوند (Kijjoa and Sawangwong, 2004). موجودات دریایی به‌منظور اهدافی چون تولیدمثل، ارتباط، دفاع در برابر شکارچی، عفونت و رقابت و سایر مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک، این ترکیبات زیست‌فعال را تولید می‌کنند .در سال‌های اخیر، بسیاری از ترکیبات زیست‌فعال از سرپایانی مثل ماهی مرکب، استخراج، توصیف و خالص‌سازی شده است (Falshaw *et al.*, 2000). مطالعات نشان داده است که گونه‌های بی‌مهرگان یک منبع غنی از پلی‌ساکاریدهای سولفاته با ساختارهای جدیدلند (Manjusha, 2012). از جمله این ترکیبات زیست‌فعال، پلی‌ساکاریدهای گلیکوزآمینوگلیکان (GAGs)، مثل کندرویتین سولفات‌هایی (CS) با الگوهای متفاوت سولفاته‌شدن و سطوحی از جایگزینی با قندهای خنثی را می‌توان نام برد (Karamanos *et al.*, 1992; Karamanos *et al.*, 1995).گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، پلی‌ساکاریدهای آنیونی با زنجیره‌های مستقیم‌اند که بخش مهمی از ماتریکس خارج سلولی بافت‌های همبند و همچنین سطح سلولی انواعی از سلول‌ها و گرانول‌های داخل سلولی را تشکیل می‌دهند (Yamada andSugahara, 2008). این ترکیبات از واحدهای دی‌ساکاریدی تکرارشوندهٔ هگزوزآمین (گلوکوزآمین یا گالاکتوزآمین) و یورونیک اسید (گلوکورونیک اسید یا ایدورونیک اسید) تشکیل شده‌اند (Esko *et al.*, 2009). در حالی‌که وزن مولکولی کندرویتین سولفات‌های جدا شده از پستانداران در محدودهٔ ۵۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ دالتون قرار می‌گیرد (Falshaw *et al.*, 2000). وزن مولکولی کندرویتین سولفات‌های جداشده از ماهی مرکب، به‌طور کلی بالاتر از پستانداران است، به‌طوری‌که وزن مولکولی ۱۱۰۰۰۰ و ۴۳۰۰۰ دالتون از این ترکیبات در پوست (Karamanos *et al.*, 1992) و ۷۳۰۰۰ دالتون از قرنیهٔ ماهی مرکب جدا شده است (Karamanos *et al.*, 1991).

هپارین به‌دلیل فعالیت ضدانعقادی بالا به‌صورت گسترده به‌عنوان دارو در صنعت پزشکی جهت درمان ترومبوز وریدی و آمبولیسم ریوی، انفارکتوس میوکارد، آنژین ناپایدار و در حفظ جریانات خارج بدنی در طول عمل جراحی قلب باز و دیالیز کلیوی استفاده می‌شود (Hirsh *et al.*, 2001; Manjusha, 2012). استفاده از هپارین با منشاء حیوانی (ریه و رودهٔ خوک و گاو) محدودیت‌های مصرف (به‌علت افزایش خطر ابتلا به انسفالوپاتی) و مذهبی دارد (Volpi, 2005). بنابراین، پیدا کردن مواد شبه‌هپارینی از منابع دیگر از جمله منابع دریایی از سال‌ها پیش مورد توجه محققین قرار گرفته است (Dietrich *et al.*, 1985 ; Ray, 2008).

حضور گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته در ۱۳ شاخه از بی‌مهرگان گزارش شده است (Medeiros *et al.*, 2000). در بین نرم‌تنان، هپارین جدا شده از برخی صدف‌های دوکفه‌ای، ویژگی‌های ساختاری و فعالیت ضد انعقادی یکسانی با هپارین جدا شده از پستانداران، از خود نشان داده است، اگرچه دارای وزن مولکولی متفاوتی است (Pejler *et al.*, 1987). بسیاری از محققین از جمله Manjusha (۲۰۱۲)، از قسمت‌های متفاوت دو گونه از سرپایان، *Loligo duvauceli* و *Sepia pharaonis* ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی را استخراج کرده‌اند. بنابراین، با توجه به وجود ذخایر مناسب از ماهی مرکب در کشور و در دسترس بودن آن، در تحقیق حاضر استخراج ترکیبات جایگزین هپارین یا شبه هپارینی از تنتاکول‌های این آبزی مورد توجه قرار گرفت و بعد از استخراج برای اطمینان از ساختار آن از FTIR استفاده شد و توان ضد انعقادی محصول تولیدی، روی خون انسان مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های تازه بعد از فریزشدن به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شدند. بخش انتهایی تنتاکول جدا و با خردکن ریز شدند. بخشی از هموژن حاصل (۲۱ گرم) در فریز درایر در مدت ۴۸ ساعت خشک شد و بخشی (۵ گرم) به‌همان شکل تر جهت استخراج استفاد شد (Ebada *et al.*, 2008)

۲.۲. استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی

از روش Holick و همکاران (۱۹۸۵) برای استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی از تنتاکول‌های ماهی مرکب استفاده شد. در ابتدا ۴ گرم وزن خشک (الف) و ۵ گرم وزن تر (ب) از بخش انتهایی تنتاکول ماهی مرکب به‌ترتیب با ۸۰ و ۵۰ میلی لیتر سدیم سولفات ۰/۴ مولار در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت انکوبه شد و سپس pH محلول با استفاده از سدیم هیدروکسید ۲۰ درصد به ۱۱/۵ رسانده شد. بعد از انکوباسیون در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه، آلومینیوم سولفات ۱۰۰درصد برای کاهش pH به ۷/۷ ، اضافه و تا دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت حرارت داده شد و هم‌زمان به آرامی به‌منظور اختلاط بهتر، تکان داده شد. سپس نمونه از طریق یک منفذ پارچه‌ای صاف شد و در معرض ستیل پیریدینیوم کلراید[1](Sigma-Aldrich) قرار گرفت (Holick *et al.*, 1985).

۲.۳. تیمار با ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC)

در این مرحله، به فیلترای جمع‌آوری شده از نمونه‌های الف و ب، به‌ترتیب، ۲۰ و ۱۰ میلی‌لیتر ستیل پیریدینیوم کلراید، تا زمان مشاهده ذرات معلق سفید رنگ در محلول‌ها، اضافه گردید. برای جمع‌آوری ترکیب پلی‌ساکاریدی سولفات خام، سوسپانسیون‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد و در نهایت در دور ۷۰۰۰ rpm (۳۰۰۰ g)، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Z 36 HK HERMLE,German) شدند. پس از تخلیهٔ محلول رویی، جهت حذف نمک‌های پیریدینیوم از ترکیب، رسوب به‌دست آمده به‌ترتیب با ۵۰ و ۳۰ میلی‌لیتر محلول سدیم کلراید ۲ مولار (از قبل حرارت داده شده، ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد) حل شدند. ترکیب از طریق کاغذ فیلتر شمارهٔ ۴۱ واتمن، فیلتر شد و سپس به بخش فیلتر شده، ۳ برابر حجم سدیم کلرید ۲ مولار اضافه شده در مرحلهٔ قبل، اتانول ۹۵ درصد برای رسوب‌دادن پلی‌ساکاریدهای سولفاته خام افزوده شد. به این‌ترتیب، کمپلکس گلیکوزآمینوگلیکانی با سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد. رسوب دو بار با متانول ۹۹/۹ درصد شسته و سانتریفیوژ (دور۶۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه) و در فریز درایر به‌مدت ۲ ساعت خشک شد. گلیکوزآمینوگلیکان به‌دست آمده وزن شد و برای بررسی‌های بیشتر، در دسیکاتور نگه‌داری شد (Holick *et al.*, 1985).

۲.۴. طیف‌سنجی FTIR

ساختار مواد و شناسایی گروه‌های عاملی روی ترکیبات استخراج شده از طریق طیف‌سنج مادون قرمز (Shimadzo, FTIR 8400S spectrophotometer, Japan) در محدودهٔ طول موج ۴۰۰ تا $۴۰۰۰cm^{-1}$ صورت گرفت. بدین‌منظور مقدار مشخصی از ماده به‌طور کامل، به‌صورت قرص با KBr با نسبت وزنی ۱:۱۰۰ مخلوط شد (Ko *et al.*, 2012).

[1] Cetylpyridinium chloride momohydrate (CPC)

۲.۵. سنجش خواص ضد انعقادی گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده

۲.۵.۱. آماده کردن پلاسما سیتراتهٔ خون انسان

سنجش ضدانعقادی در آزمایشگاه با پلاسما سیتراتهٔ ضعیف پلاکت (PPP)[1] انجام شد. در این روش خون انسان از اهداءکنندگان سالم گرفته شد و فوراً با تری‌سدیم‌سیترات ۳/۲ درصد به نسبت حجمی ۹ به ۱ مخلوط (۹ سی‌سی خون انسان و ۱ سی‌سی سدیم‌سیترات) و چندین بار لولهٔ فالکون محتوی خون و ضد انعقاد تری‌سدیم‌سیتراته آرامی سروته شد و بلافاصله با دور ۵۰۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس با سمپلر، پلاسمای خون جدا شد و برای سنجش ضد انعقادی به دو صورت زیر مورد استفاده قرار گرفت.

۲.۵.۲. سنجش ضدانعقادی با استفاده از معرف

ابتدا از نمونه‌های گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تنتاکول ماهی مرکب، غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان حجم ساخته شد. سپس به‌منظور تهیهٔ غلظت های ۴۱۰ و ۷۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور جداگانه مقدار ۱۰۰، ۲۰۰ میکرولیتر از حجم اولیه با ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما سیتراته مخلوط شد و به‌منظور تهیهٔ غلظت ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۳۰۰ میکرولیتر از حجم اولیه با ۳۰۰ میکرولیتر پلاسما سیتراته مخلوط گردید و بدین‌ترتیب سه حجم از گلیکوزآمینوگلیکان تنتاکولی برای استفاده در دو سیستم سنجش ضد انعقادی آماده شدند. برای نمونهٔ شاهد نیز مقدار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر آب با ۵۰۰ میکرولیتر پلاسما سیتراته مخلوط شد، بدین‌ترتیب حجم شاهد برای غلظت‌های ۴۱۰ و ۷۶۳ تهیه گردید (Krishnaa, 2008).

۲.۵.۳. سنجش ضد انعقادی با معرف زمان ترومبوپلاستین نسبی (APTT)[2]

در ابتدا محلول کلسیم کلرید ۰/۰۲۵ نرمال ساخته و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شد. سپس به‌صورت جداگانه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از حجم‌های ساخته شده با غلظت‌های ۴۱۰، ۷۶۳ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در اپندورف ریخته شد، و به آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ترومبوپلاستین نسبی و حاوی مواد فعال‌کننده، اضافه شد. پس از ۲ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلسیم کلرید به هر یک از لوله‌ها اضافه و بلافاصله زمان لخته شدن ثبت شد. برای نمونهٔ شاهد نیز همین کار تکرار شد (Rajapakse *et al.*, 2005).

۲.۵.۴. سنجش ضد انعقادی با استفاده از معرف زمان پروترومبین (PT)[3]

با استفاده از سمپلر ۲۰۰ میلی‌لیتر از معرف پروترومبین را درون سه لوله اپندورف ریخته و اپندورف‌ها در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه نگه داشته شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از حجم‌های با غلظت ۴۱۰، ۷۶۳ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، جداگانه به هر لولهٔ آزمایش حاوی معرف PT افزوده شد و بلافاصله زمان انعقاد ثبت شد (Rajapakse *et al.*, 2005).

۲.۶. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 انجام شد. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده شد. مقایسهٔ میانگین‌ها از طریق تجزیه واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA و تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون آماری Duncan در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد، استفاده شد.

[1] Citrated human platelet poor plasma
[2] Activated partial thromboplastin time
[3] Prothrombin time

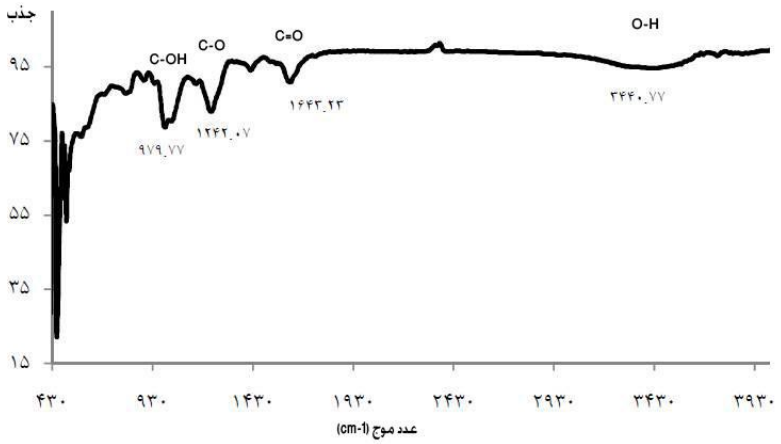
۳. نتایج

۳.۱. استخراج گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و بازدهٔ استخراج

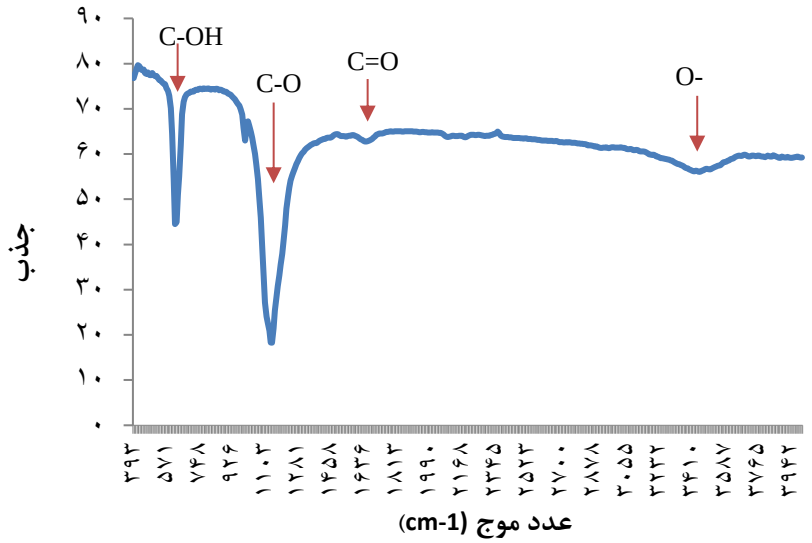
محصول نهایی گلیکوزآمینوگلیکان‌های خام استخراج شده از ۵ گرم وزن تر و ۴ گرم وزن خشک تنتاکول ماهی مرکب، به‌ترتیب ۲۵۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بود که برابر با ۵۰ میلی‌گرم گلیکوزآمینوگلیکان در یک گرم وزن تر تنتاکول ماهی مرکب و ۲۰۰ میلی‌گرم گلیکوزآمینوگلیکان در یک گرم وزن خشک تانتاکول ماهی مرکب بود.

۳.۲. شناسایی با طیف FTIR

پیک‌های ایجاد شده در گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از تانتاکول‌های ماهی مرکب، نشان‌دهندهٔ حضور ترکیبات هپارینی و شبه هپارینی بود (شکل ۱)، همچنین طیف FTIR هپارین استاندارد در شکل ۲ آورده شده است. براساس نتایج، نمونهٔ گلیکوزآمینوگلیکان تنتاکول ماهی مرکب یک پیک اصلی در محدودهٔ ۱۶۵۰/۹۵ cm^{-1} را نشان داد که مسئول گروه‌های گلیکوزآمینوگلیکانی بود.



شکل ۱- نمودار طیف FTIR مربوط به هپارین استاندارد.



شکل ۲- نمودار طیف FT-IR گلیکوزآمینوگلیکان‌های خام استخراج شده از تنتاکول‌های ماهی مرکب.

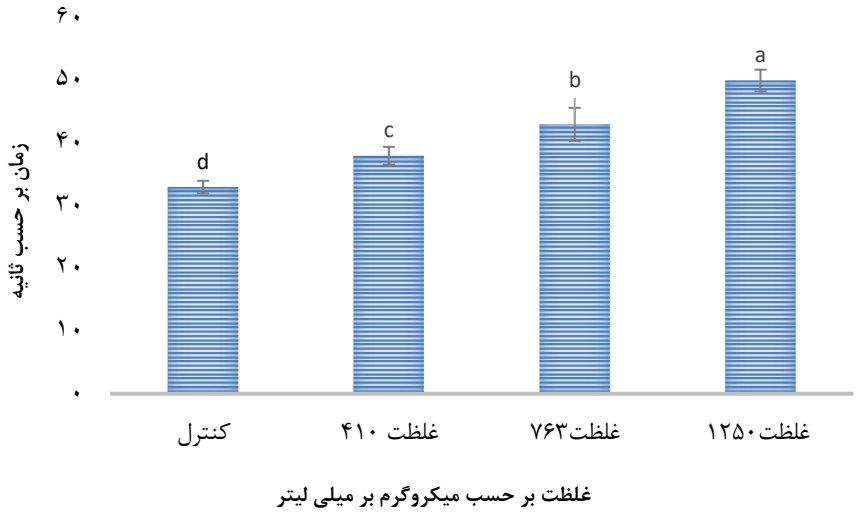
۳.۳. سنجش ضدانعقادی روی خون انسان با استفاده از دو معرف زمان ترومبوپلاستین نسبی (APTT) و معرف زمان پروترومبین (PT)

نتایج سنجش خواص ضد انعقادی گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده در جدول ۱ ارائه شده است. مقادیر طبیعی (نمونهٔ کنترل) APTT و PT برای پلاسما سالم انسان به‌ترتیب ۳۳ و ۱۳ ثانیه ثبت شد.

مقایسهٔ میانگین داده‌های غلظت‌های مختلف ترکیبات گلیکوزآمینوکلیکانی استخراج شده از بخش انتهایی تنتاکول ماهی مرکب، در تست APTT اختلاف معنی‌داری را بین غلظت‌های مختلف با یکدیگر و نمونهٔ کنترل نشان داد ($P<۰/۰۵$، شکل ۳). همچنین مقایسهٔ میانگین داده‌ها در تست PT با نمونهٔ کنترل اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱- زمان انعقاد در دو سنجش ضد انعقادی با استفاده از معرف زمان ترومبوپلاستین نسبی (APTT) و معرف زمان پروترومبین(PT)

منبع	غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	زمان انعقاد با استفاده از معرف زمان ترومبوپلاستین نسبی (ثانیه)	زمان انعقاد با استفاده از معرف زمان پروترومبین (ثانیه)
گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراجی از تنتاکول‌های ماهی مرکب	۴۱۰	۳۸	-
	۷۶۳	۴۳	-
	۱۲۵۰	۵۰	۱۷
هپارین	۲۰	۹۰۰	-



شکل ۳- نمودار زمان انعقاد با استفاده از معرف زمان ترومبوبلاستین نسبی فعال شده (APTT) در غلظت‌های مختلف گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از تانتاکول‌های ماهی مرکب

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

مقدار گلیکوزآمینوگلیکان‌های استخراج شده از تنتاکول‌های ماهی مرکب در این تحقیق در مقایسه با مقدار گزارش شده از بافت‌های مختلف این آبزی (بالله، پوست، اسکلت داخلی، تانتاکول و مانتل) توسط Manjusha (۲۰۱۲) متفاوت بود. مقدار گلیکوزآمینوگلیکان به‌دست

آمده در این تحقیق ۲۰۰ (میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک) بود که میزان آن از میزان گلیکوزآمینوگلیکان‌های موجود در اندام‌های باله، پوست و اسکلت داخلی به‌ترتیب ۱۷۵/۶، ۱۹۲/۸ و ۱۵۶/۴ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، بیشتر است و تقریباً مشابه با مقدار گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تنتاکول ۲۰۲/۱ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک) و از مقدار استخراج شده از مانتل ۲۰۷/۸ (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، کمتر بود (Manjusha, 2012). به‌طور کلی روش استخراج گلیکوزآمینوگلیکان‌ها به دو صورت شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد (Silva, 2006). تحقیقات پیشین مبتنی بر روش آنزیمی بود ولی در تحقیق حاضر از روش شیمیایی استفاده شد. روش‌های شیمیایی نسبت به روش‌های آنزیمی نسبتاً سریع‌تر، ساده‌تر و همچنین کم‌هزینه‌تراند (Arumugam *et al.*, 2009). در روش شیمیایی چون گلیکوزآمینوگلیکان‌ها به‌طور طبیعی شدیداً دارای بار منفی هستند، با مواد شیمیایی باردار مثبت، ترکیبات آمونیومی چهار جزئی، مانند ستیل پیریدینیوم کلراید و یا ستیل آمونیوم بروماید و لتانول در حضور سدیم یا پتاسیم استات رسوب داده می‌شوند (Taniguchi, 1982). مقایسهٔ نتایج تحقیقات نشان داد که مقدار گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تنتاکول ماهی مرکب با استفاده از روش شیمیایی (CPC) در تحقیق حاضر، مشابه با میزان گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده از تانتاکول ماهی مرکب توسط Manjusha (۲۰۱۱) با استفاده از روش آنزیمی (هضم با پاپایین) است. بنابراین با استفاده از روش شیمیایی می‌توان از تنتاکول ماهی مرکب خلیج فارس ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی استخراج کرد.

نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز نمونهٔ شبه هپارینی استخراج شده از بخش انتهایی تانتاکول ماهی مرکب و هپارین استاندارد بیانگر پیک‌های بین گسترهٔ ۳۶۴۰-۳۱۶۰cm^{-1} مربوط به باند کششی گروه هیدروکسیل‌های آزاد بود که در نمونهٔ هپارین استاندارد و ترکیبات شبه هپارینی استخراج شده از بخش انتهایی تنتاکول ماهی مرکب قوی و قابل تشخیص و به‌ترتیب برابر با ۳۴۴۰/۷۷cm^{-1} و ۳۴۱۷/۶۳cm^{-1} بود. باند ظاهر شده بین ۱۵۰۰cm^{-1} و ۱۷۵۰cm^{-1} مربوط به باند کششی گروه‌های C=O (گروه آمید CONH2,I) است که در طیف نمونه استاندارد هپارین با شدت ۱۶۴۳cm^{-1} قابل مقایسه با نمونهٔ شبه هپارین ۱۶۴۳/۲۴cm^{-1} است. علاوه بر این، دو باند دیگر در ۱۲۴۲/۰۷ و ۹۷۹/۷۷ مشاهده شد که مربوط به گروه‌های کششی C-O و خمشی C-OH در نمونهٔ هپارین استاندارد بودند. باند ظاهر شده بین ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ مربوط به باند خمشی C-O گروه کربونیل است که در نمونهٔ شبه هپارینی بخش انتهایی تنتاکول ماهی مرکب با شدت ۱۱۳۴cm^{-1} است که خیلی قوی‌تر از هپارین استاندارد و مشخص‌ترین باند است. همچنین باند قوی در نمونهٔ شبه هپارینی با شدت ۶۱۷/۱۸cm^{-1} مربوط به گروه هیدروکسیل C-OH است که در هپارین استاندارد کمتر قابل تشخیص است (Karthikeyan *et al.*, 2012).

مقایسهٔ طیف FTIR گلیکوزآمینوگلیکان‌های بخش انتهایی تنتاکول ماهی مرکب با هپارین استاندارد نشان داد که نمونهٔ گلیکوزآمینوگلیکانی بخش انتهایی تانتاکول ماهی مرکب، دارای یک پیک اصلی در محدودهٔ ۱۶۶۶cm^{-1} است که مسئول همان گروه‌های گلیکوزآمینوگلیکانی است. مشخص‌ترین ویژگی طیف مربوط به حضور پلی‌ساکاریدهای سولفاته در محدودهٔ ۱۲۰۰-۱۱۰۰cm^{-1} قرار داشت که ارتعاشات نامتقارن پیوند بین S=O را نشان می‌دهد و در نمونهٔ بخش انتهایی تنتاکول ماهی مرکب با شدت ۱۱۳۴cm^{-1} دیده شد. سنجش ضدانعقادی با استفاده از معرف نشان داد که با برهمکنش بین عوامل در مسیرهای انعقادی و گلیکوزآمینوگلیکان‌های تنتاکولی استخراج شده از ماهی مرکب، اثر تأخیری بر فعالیت این فاکتورها اعمال می‌شود، به‌همین دلیل افزودن گلیکوزآمینوگلیکان استخراج شده با افزایش زمان انعقادی همراه است. با توجه به خالص بودن هپارین، انتظار اینکه زمان در انجام هر دو آزمایش PT وAPTT، نسبت به گلیکوزآمینوگلیکان‌های کل استخراج شده از تنتاکول ماهی مرکب ما بیشتر شود یک امر طبیعی است. در شرایط آزمایشگاهی پتانسیل ضد

انعقادی و سطوح فاکتورهای انعقادی در نمونهٔ پلاسمای طبیعی خون انسان را با آزمایش PT وAPTT مورد سنجش قرار دادند و مشاهده کردند که فعالیت انعقادی با اضافه کردن نمونه در پلاسمای سیتراته کاهش پیدا می کند (Krishnaa, 2008). مقایسهٔ میان خاصیت ضدانعقادی ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی استخراج شده تانتاکولی و اسکلت داخلی (Krishna, 2008) این نتیجه را می‌دهد که این ترکیبات دارای خاصیت ضد انعقادی ضعیفی نسبت به هپارین هستند. گلیکوزآمینوگلیکان‌های شبه هپارینی ویژگی‌های دارویی مختلفی را براساس منشاء از خود نشان می‌دهند که بستگی به بعضی از ویژگی‌های ساختاری این ترکیبات مانند، الگوی سولفاته‌شدن گلوکوزآمین و پراکندگی گلوکورونیک دارد. که ظرفیت اتصال این ترکیبات به آنتی‌ترومبین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Brito *et al.*, 2008). گلیکوزآمینوگلیکان‌ها روی سنجش APTT اثر گذاشتند، زیرا گروه‌های سولفات برای ایجاد اثرات ضد انعقادی و فعالیت‌های ضد انعقادی پلی‌ساکاریدها ضروری هستند و فعالیت ضد انعقادی نه تنها به محتوای سولفات بلکه به موقعیت گروه‌های سولفات نیز بستگی دارد (Luo *et al.*, 2013).

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی در تنتاکول ماهی مرکب وجود دارد و همچنین استفاده از روش شیمیایی برای استخراج ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی از این گونه مناسب‌تر است. باندهای به‌دست آمده از ترکیبات استخراج شده، از طیف FTIR شباهت ساختاری ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکانی تنتاکولی را با هپارین استاندارد نشان داد. نتایج سنجش ضد انعقادی با هر دو روش استفاده از معرف (PT و APTT) نشان داد که ترکیبات استخراج شده قادر به طولانی کردن زمان انعقاد پلاسما خون می‌باشند که می‌توانند شبه هپارین عمل کنند ولی قدرت ضد انعقادی ضعیفی نسبت به آن دارند.

تشکر و قدردانی

از کارشناس محترم آزمایشگاه زیست‌شناسی دریا، جناب آقای حسینی بابت تمام همکاری و زحماتشان سپاسگزاریم.

۶. منابع

References

Arumugam, M., Garg, H., Ajithkumar, T., Shanmugam, A., 2009. Antiproliferative heparin (glycosaminoglycans) isolated from giant clam *(Tridacna maxima*) and green mussel (*Perna viridis*). *African Journal of Biotechnology* 8(10), 2394-2396.

Brito, A.S., Arimatéia, D.S., Souza, L.R., Lima, M.A., Santos, V.O., Medeiros, V.P., Ferreira, P.A., Silva, R.A., Ferreira, C.V., Justo, G.Z., Leite, E.L., 2008. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. *Bioorganic & medicinal Chemistry* 16(21), 9588-9595. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.09.020

Dietrich, C.P., de Paiva, J., Moraes, C.T., Takahashi, H.K., Porcionatto, M.A., Nader, H.B., 1985. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from Anomalocardia brasiliana. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 843(1-2), 1-7. DOI: 10.1016/0304-4165(85)90041-8

Ebada, S.S., Edrada, R.A., Lin, W., Proksch, P., 2008. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols* 3(12), 1820-1831. DOI: 10.1038/nprot.2008.182

Esko, J D., Kimata, K., Lindahl, U., 2009. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart ,G.W., Etzler, M.E., Esko, J.D., Kimata, K., 2009. *Essentials of Glycobiology*. (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Falshaw, R., Hubl, U., Ofman, D., Slim, G.C., Tariq, M.A., Watt, D.K., Yorke, S.C., 2000. Comparison of the glycosaminoglycans isolated from the skin and head cartilage of Gould's arrow squid (Nototodarus gouldi). *Carbohydrate Polymers* 41(4), 357-364. DOI: 10.1016/S0144-8617(99)00103-4

Hirsh, J., Anand, S.S., Halperin, J.L., Fuster, V., 2001. Guide to anticoagulant therapy: Heparin: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 103(24), 2994-3018.. DOI: 10.1161/01.CIR.103.24.2994

Holick, M.F., Judkiewicz, A., Walworth, N., Wang, M.H., 1985. Recovery of heparin from fish wastes. *Biotechnology of marine polysaccharides,(Eds.) Colwell RR, Pariser ER, Sinskay AJ, Hemisphere Publishing Corporation, New York*, pp. 389-397.

Karamanos, N.K., Hjerpe, A., Aletras, A., Tsegenidis, T., Anastassiou, E.D., Antonopoulos, C.A., 1995. Antibodies to three chondroitin sulfate-containing proteoglycans in squid skin recognize hexa-or longer chondroitin oligosaccharides as major antigenic determinants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316(1), 100-109. DOI: 10.1006/abbi.1995.1015

Karamanos, N.K., Manouras, A., Tsegenidis, T. and Antonopoulos, C.A., 1991. Isolation and chemical study of the glycosaminoglycans from squid cornea. *The International Journal of Biochemistry* 23(1), 67-72. DOI: 10.1016/0020-711x(91)90010-k .

Karamanos, N.K., Aletras, A.J., Tsegenidis, T., Tsiganos, C.P., Antonopoulos, C.A., 1992. Isolation, characterization and properties of the oversulphated chondroitin sulphate proteoglycan from squid skin with peculiar glycosaminoglycan sulphation pattern. *European Journal of Biochemistry* 204(2), 553-560. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16667.x

Karthikeyan, V., Gopalakrishnan, A., Vijayakumar, R., Bharathirajan, P., 2012. Anticoagulant activity of marine bivalve Donax incarnates Lin, 1758 Collected from Thazhanguda, Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(3), S1798-S1801. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60497-3

Kijjoa, A., Sawangwong, P., 2004. Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs* 2(2), 73-82. DOI: 10.3390/md202073

Ko, C.L., Tien, Y.C., Wang, J.C. and Chen, W.C., 2012. Characterization of controlled highly porous hyaluronan/gelatin cross-linking sponges for tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 14, 227-238. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.06.019

Krishnaa, C., 2008. Extraction of sulfated polysaccharides from cuttlefish (Sepia sp.) bone. PhD thesis. Department of biotechnology. SRM University.108 p.

Luo, L., Wu, M., Xu, L., Lian, W., Xiang, J., Lu, F., Gao, N., Xiao, C., Wang, S. and Zhao, J., 2013. Comparison of physicochemical characteristics and anticoagulant activities of polysaccharides from three sea cucumbers. *Marine Drugs* 11(2), 399-417. DOI: 10.3390/md11020399

Manjusha, K., 2012. Isolation and characterization of glycosaminoglycans and a study of its bioactive potential in two commercially important species of Cephalopods, *Loligo duvauceli* and *Sepia pharaonis*.PhD thesis. School of Industrial Fisheries. Cochin University of Science and Technology. 262 p.

Medeiros, G.F., Mendes, A., Castro, R.A., Baú, E.C., Nader, H.B., Dietrich, C.P., 2000. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subject* 1475(3), 287-294. DOI: 10.1016/S0304-4165(00)00079-9

Rajapakse, N., Jung, W.K., Mendis, E., Moon, S.H., Kim, S.K., 2005. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life sciences* 76(22), 2607-2619. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.12.010

Ray, J., 2008. Isolation and characterisation of heparin and heparin-like glycosaminoglycans from Cynoglossus semifasciatus and Conus betulinus. 66 p.

Pejler, G., Danielsson, A., Björk, I., Lindahl, U., Nader, H.B., Dietrich, C.P., 1987. Structure and antithrombin-binding properties of heparin isolated from the clams Anomalocardia brasiliana and Tivela mactroides. *Journal of Biological Chemistry* 262(24), 11413-11421. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)60822-1

Silva, L.C.F., 2006. Isolation and purification of chondroitin sulfate. *Advances in Pharmacology* 53, 21-31. DOI: 10.1016/S1054-3589(05)53002-3

Taniguchi, N., 1982. Isolation and analysis of glycosaminoglycans. In *Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Physiological and Pathological Processes of Body Systems* (pp. 20-40). Karger Publishers. DOI: 10.1159/000406273

Volpi, N., 2005. Occurrence and structural characterization of heparin from molluscs. *Invertebrate Survival Journal* 2(1), 6-16.

Yamada, S., Sugahara, K., 2008. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Current Drug Discovery Technologies* 5(4), 289-301.