مجله دیابت و متابولیسم ایران. آذر- دی ۱۳۹۴؛ دوره ۱۵ (شماره۲)۸۳-۷۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره‌های مختلف توتیای دریایی Echinometra mathaei بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز

سولماز سلیمانی[۱]، سهیلا معین[۲و۳*]، مرتضی یوسف زادی[۱]، نرگس امراللهی بیوکی[۱]

چکیده

مقدمه: توتیاهای دریایی به شاخه خارپوستان (*Echinodermata*) از بی‌مهرگان دریایی تعلق دارند که دارای خواص زیستی متعددی می‌باشد. دیابت شیرین، شایع‌ترین بیماری متابولیک در جهان است که شامل گروهی از اختلالات متابولیسمی با درجات متفاوت می‌باشد و اولین مشخصه آن افزایش سطح گلوکز در خون است. هدف از مطالعه پیش‌رو، بررسی خاصیت ضددیابتی به روش ارزیابی مهار فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز توسط ارگان‌های مختلف، مایع سلومیک (CF و CL) و رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی *E. mathaei* می‌باشد.

روش‌ها: در مطالعه آزمایشگاهی، عصاره‌های بافت‌های مختلف (خار، پوسته، گناد و فانوس ارسطو) توتیای دریایی با استفاده از سه حلال ان- هگزان، اتیل‌استات و متانول، براساس افزایش قطبیت جدا گردیدند. مایع سلومیک با روش بافره و رنگدانه پوسته و خار به کمک HCl از توتیای دریایی استخراج شد. سپس فعالیت ضددیابتی با آزمون مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز انجام شد.

یافته‌ها: طبق نتایج به‌دست آمده، سلول‌های آزاد مایع سلومیک، سلوموسیت لیزات و رنگدانه پوسته توتیای دریایی دارای میزان بالایی از مهار آنزیم آلفاآمیلاز می‌باشند. نتایج اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال P<۰/۰۵ را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که توتیای دریایی *E. mathaei* به‌علت دارا بودن فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی و هم‌چنین ترکیبات فلاونوئیدی، دارای اثر مهاری روی آنزیم آلفاآمیلاز می‌باشد.

واژگان کلیدی: مهار آنزیم آلفاآمیلاز، دیابت، ، توتیای دریایی، *Echinometra mathaei*

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- مرکز تحقیقات فراوری گیاهان داروئی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۳- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

***نشانی**: بندرعباس، بلوار امام حسین، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، دانشکده علوم پزشکی،تلفن: ۰۹۱۷۱۱۲۷۵۳۹، پست الکترونیک: Soheila_9@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۲۵ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۴/۱۰/۱۷** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۳**

مقدمه

دیابت شیرین، شایع‌ترین بیماری متابولیک در جهان است که تقریباً شش درصد جمعیت دنیا مبتلا به آن هستند و ۹۰ تا ۹۵ درصد از این افراد از دیابت نوع دو رنج می‌برند [۲-۱]. بی‌گوانیدها، سولفونیل اوره‌ها، تیازولیدین، دیون‌ها و مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز از مهم‌ترین داروهای خوراکی ضد افزایش گلوکز خون هستند که جهت کنترل دیابت نوع دو مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگر چه داروهای نامبرده قادر به کنترل افزایش گلوکز خون هستند، ولی بدن بسیاری از بیماران به استفاده از این داروها مقاومت نشان می‌دهد و حتی بعضی از مبتلایان قادر به تحمل این داروها نیستند و یا با عوارض نامطلوب مواجه می‌شوند [۵-۳].

آنزیم‌آلفاآمیلاز نقش محوری در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها دارد [۸-٦]. از میان مهارکننده‌ها، مهارکننده‌های آنزیم آلفاآمیلاز، از توجه بیش‌تری برخوردارند زیرا به‌نظر می‌رسد عوارض جانبی گوارشی شدید حاصل از مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز را ایجاد نمی‌نمایند [۹،۱۰].

از این‌رو، نگرانی از بروز عوارض جانبی داروهای شیمیایی موجب استفاده نادرست از داروها، عدم پذیرش بیماران و در نتیجه اختلال در کنترل دقیق بیماری می‌گردد. به همین دلیل امروزه نگرشی جدید در مورد محیط زیست دریا به‌وجود آمده و بررسی‌های زیادی برروی ارگانیسم‌های دریایی درحال انجام است.

محیط زیست دریا، به‌عنوان مبدا و خاستگاه زندگی و سرچشمه ترکیبات طبیعی هستند که در بدن موجودات مختلف انباشته شده‌اند. تولیدات طبیعی موجود در جانوران دریایی را می‌توان به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیباتی با کاربرد غذایی، دارویی و پزشکی تقسیم نمود [۱۱]. در بین شاخه‌های زیستی دریایی، بی‌مهرگان، توجه پژوهشگران را به خود جلب نمودند، از این میان توتیای دریایی به‌عنوان ارگانیسم مدل برای تحقیقات علمی به‌کار می‌روند. در مقایسه با سایر ارگانیسم‌های مدل بی‌مهره، شباهت تاکسونومی توتیای دریایی به مهره‌داران از جمله انسان بسیار قابل توجه است [۱۳، ۱۲].

توتیاهای دریایی متعلق به شاخه خارپوستان (Echinodermata) بوده [۱٤] و دارای بدنی کروی شکل می‌باشند که توسط تعداد زیادی خار پوشیده شده است [۱۵]. حفره داخلی بدن اکینودرم‌ها نیز با مایع سلومیک پر شده که ارگان‌های داخلی را شستشو و محیط مایع را تشکیل می‌دهد [۱٦].

توتیای دریایی دارای پنج گناد زرد تا قهوه‌ایی رنگ به شکل نیمه ماه بوده که به دیواره داخلی متصل است و شبیه به خوشه انگور می‌باشد [۱٤]. عمده‌ترین قسمت خوراکی توتیای دریایی، گناد می‌باشد. پوسته‌ها محتوی رنگدانه‌های پلی‌هیدروکسیلات ۱ و ٤ نفتاکینون (PHNQ) متنوع هستند [۱۷]. رنگدانه‌های PHNQ در یک ساختار کربنات کلسیمی در پوسته و خار توتیای دریایی محصور شده است. رنگدانه‌های PHNQ توتیای دریایی ارغوانی، فعالیت آنتی‌باکتریال، ضددیابت، ضد قلبی- عروقی و آنتی‌اکسیدانی را نشان داده است [۱٤]. از این رو پیشنهاد می‌شود که پوسته و خار توتیای دریایی که بعد از خارج کردن گناد آن‌ها، بدون استفاده به زباله ریخته می‌شوند، احتمالاً یک منبع زیستی فعال جدید طبیعی باشند [۱۸].

با توجه به خوراکی بودن توتیاهای دریایی به‌ویژه در آسیای شرقی [۱۷] و به‌خاطر فراوانی بی‌نظیری که از نظر مواد زیست فعال دارند، می‌توانند به‌عنوان منبع غذایی سالمی به شمار آیند. بنابراین، این امکان وجود دارد که دارای فعالیت‌های ضداکسیدان، ضددیابت، ضدالتهاب و ضد میکروب و غیره باشند و منبع مناسبی برای مصرف، به‌عنوان غذایی کارآمد و مکمل‌های غذایی و ضددیابت به‌شمار آیند [۱۹، ۱۵، ۱۳] .

تاکنون گزارشی مبنی بر ارزیابی فعالیت ضددیابت، بر روی هیچ‌یک از اندام‌های توتیای دریایی و هم‌چنین گونه‌های نزدیک به آن ارائه نشده و مطالعه حاضر اولین تلاش در خصوص سنجش فعالیت ضددیابتی در ارگان‌های مختلف توتیای دریایی به‌عنوان یک منبع خوراکی می‌باشد. امید است که این پژوهش، توجه روزافزونی را به منابع دریایی و شناسایی ترکیبات فعال زیستی آن‌ها معطوف گرداند.

هدف از مطالعه پیش‌رو، بررسی خاصیت ضددیابتی به روش ارزیابی مهار فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز توسط

ارگان‌های مختلف، مایع سلومیک (CF و CL) و رنگدانه پوسته و خار توتیای دریایی *E. mathaei* می‌باشد.

روش‌ها

نمونه برداری و عصاره‌گیری

توتیاهای دریایی گونه *E. mathaei* در فروردین ماه ۱۳۹۲ از ناحیه بین جزر و مدی ساحل پارک زیتون واقع در جزیره قشم واقع در خلیج فارس جمع‌آوری گردیدند. توتیاهای دریایی در آب دریا با حفظ شرایط بیولوژیک و به‌صورت زنده به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه هرمزگان منتقل شدند. ابتدا نمونه‌ها را با آب مقطر شستشو داده و با اتر بیهوش شدند، سپس نمونه‌های تشریح شده و بافت‌های مورد نظر (گناد، پوسته، خار و فانوس ارسطو) جدا گردیدند. تمام بافت‌ها جهت خشک شدن و گرفتن رطوبت در دستگاه فریزدارير در دمای ٤٠- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

عصاره بافت‌های مختلف (گناد، پوسته، خار و فانوس ارسطو) با استفاده از سه حلال ان- هگزان، اتیل استات و متانول به‌ترتیب افزایش قطبیت جدا گردیدند. عصاره‌ها در دستگاه روتاری در شرایط خلاء تبخیر و پس از حل شدن در DMSO، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. لازم به ذکر است که تمام مراحل عصاره‌گیری در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. بدین ترتیب، طیفی از ترکیبات با درجه قطبیت متفاوت خواهیم داشت.

استخراج رنگدانه پوسته و خار

جداسازی رنگدانه‌های پوسته و خار توتیای دریایی طبق متد kuwahara و همکاران (۲۰۰۹) صورت پذیرفت [۱۸- ١٤]. ابتدا نمونه‌ها تشریح و ارگان‌های داخلی آن‌ها برداشته شد. سپس پوسته‌های توتیای دریایی با آب مقطر سرد شسته و برای دو روز در تاریکی و در دمای٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. خارهای توتیای دریایی نیز با آب مقطر سرد شسته و به‌مدت ٢٤ ساعت در فریزدرایر قرار گرفتند. سپس به ۲۰ گرم از پوسته و خار توتیای دریایی به‌صورت جداگانه، ۱۰۰ میلی‌لیتر HCl ۰/٦ مولار (در دمای آزمایشگاه) اضافه گردید (HCl باعث شکستن ساختار کربنات کلسیمی و آزادسازی رنگدانه‌های محصور شده در آن می‌گردد). سپس دی‌اتیل‌اتر با حجمی برابر با میزان HCl، به آن اضافه شد. به‌دلیل چگالی متفاوت دی‌اتیل‌اتر و هیدروکلریک اسید، دو فاز مجزا تشکیل شد. پس از گذشت زمان، رنگدانه‌ها در دی‌اتیل‌اتر حل گردیدند، سپس فاز دی‌اتیل‌اتر را جدا کرده و به آن، جهت خنثی نمودن اسید، NaCl ۵٪ با حجمی برابر با دی‌اتیل‌اتر اضافه گردید. مخلوط حاضر نیز دو فاز مجزا را تشکیل داده که دی‌اتیل‌اتر به‌دلیل چگالی کمتر، فاز رویی را تشکیل داده و به‌راحتی می‌توان آن را جدا نمود. سپس به کمک دستگاه روتاری و در شرایط خلاء، دی‌اتیل‌اتر تبخیر شد و پس از حل شدن رنگدانه‌ها در DMSO (Dimethyl sulphoxide)، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

استخراج مایع‌سلومیک

مایع‌سلومیک توتیای‌دریایی، پس از برش غشای پریستومیال با استفاده از سرنگ ظریف با نیدل شماره ۱۸، جمع‌آوری و در داخل ظروف استریل ریخته و بلافاصله در یخچال نگه‌داری شد. مایع‌سلومیک با استفاده از محلول ایزواسموتیک و ضد انعقاد ۲۰ میلی‌مولار Tris، ۰/۱۵ مولار NaCl، ۷۰ میلی‌مولار EDTA-Na، pH=۷/۵ و به‌صورت بافره استخراج شد که در آن تنها یک بار سرنگ از بافر پر و خالی و یک میلی‌لیتر بافر نیز در ظرف محتوی مایع سلومیک ریخته شد. مایع سلومیک بلافاصله پس از استخراج، به‌مدت ۱۰ دقیقه (با دور ٤٠٠٠rpm و در ٤ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ (شرکت سیگما، آلمان) شد و پس از آن فاز مایع، که در واقع سلول‌های آزاد مایع سلومیک (CF) بودند از سلوموسیت‌ها (فاز جامد ته نشین شده) جدا شد. پلیت محتوی سلوموسیت در بافر حل شد و برای ٤ دقیقه در معرض سونیکاتور (WiseClean، کره جنوبی) در دمای صفر درجه (یک ضربه در ثانیه) قرار گرفت و سپس در دور ١٢٠٠٠rpm برای ۲۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس فاز مایع جدا (CL) و در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد [۲۰].

ارزیابی مهار فعالیت آلفا آمیلاز

ارزیابی مهار فعالیت آلفا آمیلاز طبق روش Ademiluyi و همکاران (۲۰۱٤) با اندکی تغییر انجام شد [۲۱]. در این روش، ۰/٥٦ میلی‌لیتر از مخلوط عصاره- نشاسته (غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۰/۰٤ میلی‌لیتر آنزیم (۲٥۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ٤ unit/mL) مخلوط شد و برای ۱٥ دقیقه در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، ۰/٦ میلی‌لیتر DNSA (۳ و ٥- دی- نیتروسالسیلیک اسید ۹٦ میلی‌مولار، سدیم پتاسیم تارتارات ٥/۳۱ مولار و سود ۲ مولار) به‌عنوان معرف به مخلوط واکنش اضافه گردید (DNSA باعث متوقف شدن واکنش می‌گردد) و در حمام آب ۸٥ درجه سانتی‌گراد برای ۱٥ دقیقه انکوبه شد. بعد از خنک شدن، فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ٥٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بلانک برای هرعصاره به‌صورت جداگانه و به‌منظور اصلاح جذب نمونه و از بین بردن رنگ عصاره مورد استفاده قرار گرفت، که در آن به‌جای آنزیم از محلول بافر استفاده شد. کنترل که نشان دهنده ۱۰۰ درصد فعالیت آنزیم می‌باشد که فاقد عصاره بوده و به‌جای محلول عصاره- نشاسته از نشاسته یک درصد استفاده می‌شود. آکاربوز نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یک نمودار استاندارد در برابر میزان مالتوز آزاد شده، که توانایی ساختن میزان مالتوز آزاد شده در طول ارزیابی آلفا آمیلاز را نشان می‌دهد، رسم شد.

درصد مهار آلفا آمیلاز طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$I_{\alpha\text{-amylase}}\% = ((\Delta A_{cotrol} - \Delta A_{sample}) / \Delta A_{control}) \times 100$$

$$\Delta A_{control} = A_{test} - A_{blank}$$
$$\Delta A_{sample} = A_{test} - A_{blank}$$

لازم به ذکر است که پس از به دست آوردن ΔA کنترل و نمونه ابتدا آن‌ها را در معادله خط مالتوز گذاشته و عدد حاصل از آن را در فرمول جایگزین نمودیم.

آنالیز آماری

آنالیز آماری این مطالعه شامل تجزیه واریانس داده‌ها و هم‌چنین مقایسه میانگین به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ٥ درصد بود که توسط نرم‌افزار آماری SPSS ۱۹ و آزمون ANOVA انجام پذیرفت. هم‌چنین برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۰ استفاده شد.

یافته‌ها

میزان مهارآنزیم آلفاآمیلاز در سوبسترای نشاسته در حضور عصاره‌های بخش‌های مختلف توتیای دریایی در جدول ۱ نشان داده شده است.

از مقایسه بین عصاره بخش‌های مختلف توتیای دریایی، مشاهده گردید که گناد، پوسته وعصاره ان هگزان خاروعصاره اتیل‌استات فانوس ارسطو ، دارای بیش‌ترین میزان درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز می‌باشند که در شکل ۱ نشان داده شده است.

همان‌گونه که شکل ۱ نشان می‌دهد، عصاره ان هگزان گناد بیش‌ترین میزان درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز (٤۸/۷±۲/۹۲) در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره- نشاسته را دارا می‌باشد. این در حالی است که کم‌ترین میزان درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز در عصاره اتیل‌استاتی فانوس ارسطو در غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره- نشاسته مشاهده گردید. براساس نتایج کلی به‌دست آمده از این مطالعه، میزان درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز در سوبسترای نشاسته توسط عصاره‌ها در دو غلظت یاد شده، دارای تفاوت معنی‌داری هستند (۰/۰٥ $\geq P$).

جدول ۱- میزان درصد مهار آنزیم آلفاآمیلاز توسط عصاره‌های مختلف توتیای دریایی

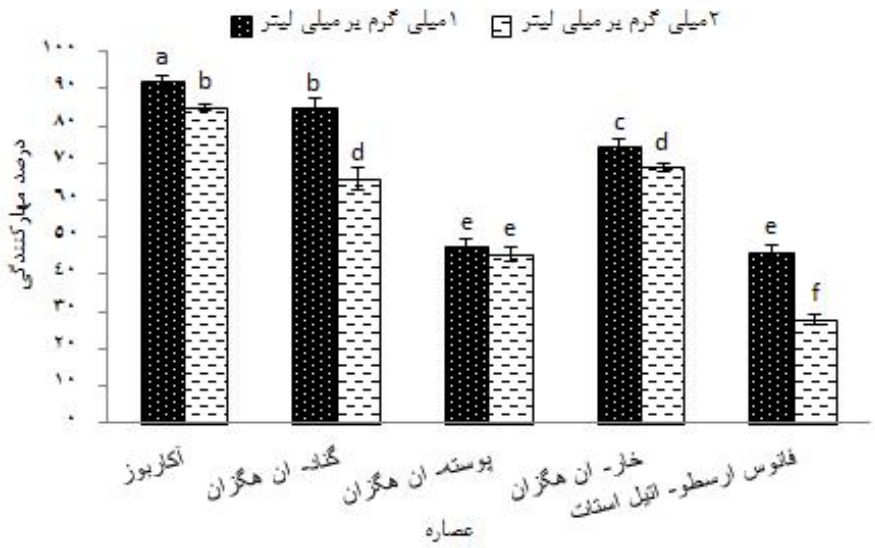
غلظت / عصاره	۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
آکاربوز	۸۵/۰۱±۰/۷۶	۹۱/۷۸±۱/۶۳*
گناد- متانول	۲۴/۱۷±۳/۵*	۲۹/۹۷±۲/۹۴*
گناد- اتیل‌استات	۴/۵۹±۱/۱۹*	۱۰/۸۱±۱/۰۵*
گناد- انهگزان	۶۵/۶۸±۲/۹۲*	۸۴/۷±۲/۹۲
آکاربوز	۸۵/۰۱±۰/۷۶*	۹۱/۷۸±۱/۶۳*
پوسته- متانول	۳۹/۹۶±۲/۸۱*	۷۴/۷۳±۰/۶۴*
پوسته- اتیل‌استات	۴/۶۱±۲/۳۷	۷/۶۷±۲/۳۷
پوسته- انهگزان	۴۵/۴۷±۱/۸۱	۴۷/۲۹±۲/۴۷
آکاربوز	۸۵/۰۱±۰/۷۶*	۹۱/۷۸±۱/۶۳*
خار- متانول	۱۱/۴۹±۰/۴۳	۱۴/۹۲±۰/۸۵
خار- اتیل‌استات	۳۲/۸۹±۳/۳۲*	۵۵/۰۰±۲/۵۸*
خار- انهگزان	۶۸/۷۶±۱/۱۹*	۷۴/۱۶±۲/۱۵*
آکاربوز	۸۵/۰۱±۰/۷۶*	۹۱/۷۸±۱/۶۳*
فانوس ارسطو- متانول	۶/۷۳±۳/۱۳*	۱۲/۴۸±۱/۹۸*
فانوس ارسطو- اتیل استات	۲۷/۹۲±۱/۲۷*	۴۵/۹۸±۱/۹۸*
فانوس ارسطو- انهگزان	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰

جامعه آماری: ۳۰ توتیای دریایی حجم نمونه: ۳۰ توتیای دریایی

اعداد به‌صورت (انحراف معیار± میانگین) درج شده‌اند

*معنی‌داری نسبت به استاندارد در هر بافت ($P\leq ۰/۰۵$)

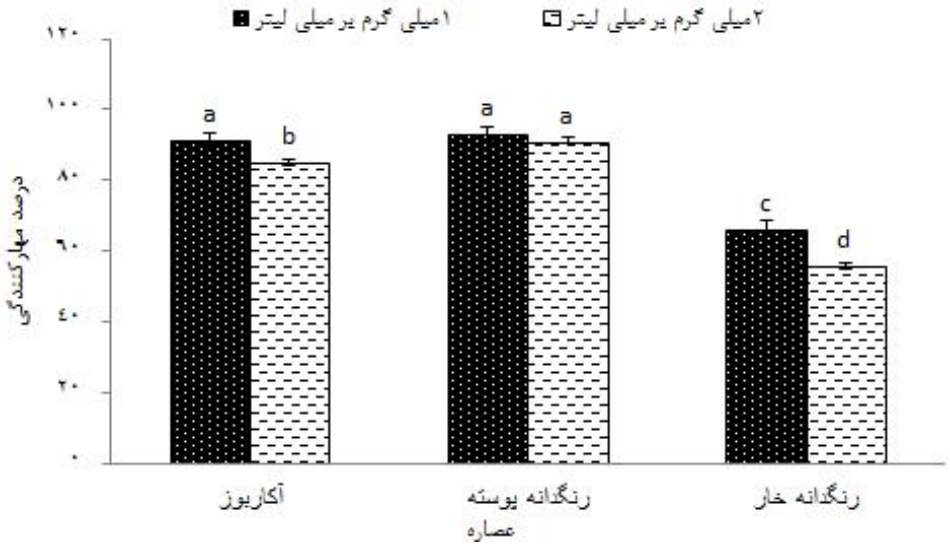
مقادیر P-value برای مقایسه متغیرها با استفاده از One way-ANOVA



شکل ۱- مقایسه درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز در سوبسترای نشاسته توسط قوی‌ترین عصاره‌های توتیای دریایی در برابر آکاربوز به‌عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف عصاره- نشاسته (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $P\leq ۰/۰۵$ است.

نتایج به‌دست آمده از میزان درصد مهار آنزیم آلفاآمیلاز، در حضور رنگدانه‌های پوسته و خار توتیای دریایی در شکل ۲ نشان داده شده است. بالاترین میزان درصد مهار آنزیم آلفاآمیلاز در برابر آکاربوز به‌عنوان استاندارد، در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره- نشاسته از رنگدانه پوسته مشاهده گردید. همان‌گونه که از نمودار برمی‌آید، غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره- نشاسته مخلوط عصاره رنگدانه پوسته نیز، دارای میزان قابل توجهی از درصد مهار آنزیم آلفاآمیلاز می‌باشد که براساس شاخص‌های آماری نیز تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد. غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره رنگدانه خار_نشاسته، پایین‌ترین میزان درصد مهار آنزیم آلفاآمیلاز را نشان داد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می‌دهد که رنگدانه پوسته و خار تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال P≤۰/۰۵ بر روی مهار آنزیم آلفاآمیلاز دارند.



شکل ۲- مقایسه درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز در سوبسترای نشاسته توسط رنگدانه‌های پوسته و خار توتیای دریایی در برابر آکاربوز به‌عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف عصاره- نشاسته (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ است.

میزان درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلازتوسط مایع سلومیک (CF و CL) در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها در جدول ۲ نشان می‌دهد که بیش‌ترین میزان درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز در برابر آکاربوز به‌عنوان استاندارد، در سلوموسیت‌لیزات (CL) و در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره- نشاسته مشاهده گردید. براساس نتایج به‌دست آمده، سلول‌های آزاد مایع سلومیک (CF) در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره- نشاسته نیز دارای میزان قابل توجهی از میزان درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز می‌باشد که در مقایسه با همین غلظت از سلوموسیت‌لیزات تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. این در حالی است که کم‌ترین میزان درصد مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز در سلول‌های آزاد مایع سلومیک در غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره- نشاسته دیده می‌شود. همان‌گونه که از نمودار بر می‌آید، غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره- نشاسته سلوموسیت‌لیزات نیز، دارای میزان قابل توجهی از مهار آنزیم آلفاآمیلاز می‌باشد که براساس شاخص‌های آماری نیز تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد. براساس نتایج کلی این مطالعه، اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌های موجود در جدول ۲ و غلظت‌های مختلف مورد آزمایش مشاهده گردید (P ≤۰/۰۵).

جدول ۲- میزان درصد مهار آنزیم آلفاآمیلاز توسط مایع سلومیک (CF و CL) توتیای دریایی

عصاره / غلظت	آکاربوز	سلول‌های آزاد مایع سلومیک	سلوموسیت‌لیزات
۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۷۱/٤٥±۳/٦۱*	۷/۱٥±۰/۸٤	۹/۰۲±۰/۲۲
۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۸۱/۳٤±۲/٥۲*	۱٤/۸٦±۲/٦۷	۱۹/٤٦±۲/۲٦

جامعه آماری: ۳۰ توتیای دریایی حجم نمونه: ۳۰ توتیای دریایی

اعداد به صورت (انحراف معیار± میانگین) درج شده‌اند

*معنی‌داری نسبت به استاندارد در هر بافت (P≤ ۰/۰٥)

مقادیر P-value برای مقایسه متغیرها با استفاده از One way-ANOVA

بحث

آنزیم آلفاآمیلاز به‌عنوان آنزیم مهمی در مجاری گوارشی انسان شناخته شده است که پلی‌ساکاریدهای موجود در غذا را هیدرولیز و تبدیل به قندهای ساده قابل جذب به بدن می‌کند [۲۲]. مهار این آنزیم نقش مهمی در کاهش جذب قند غذایی موجود در مجاری گوارشی انسان دارد [۲۳]. دلیل مهار این آنزیم توسط توتیای دریایی هنوز مشخص نیست. ولی گزارش شده است که ترکیباتی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند با مهار رادیکال آزاد اکسیژن موجب مهار آنزیم آلفاآمیلاز می‌شوند [۲٤].

افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها از علل اصلی مشکلات افراد مبتلا به بیماری دیابت می‌باشد [۲٥]. مطالعات مختلفی بیان کردند که عصاره‌هایی که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی از جمله توانایی مهار رادیکال‌های آزاد همچون، سوپراکسید و هیدروکسیل می‌باشند، می‌توانند در مهار آنزیم آلفاآمیلاز موثر باشند. لذا اثرات ترمیمی و پایین آورندگی قندخون در حیوانات دیابتی را می‌توان به این مساله نیز ربط داد که البته نیاز به تحقیقات بیشتری دارد [۲۷-۲٥].

از این‌رو، خواص آنتی‌اکسیدانی توتیای دریایی در گزارش‌های متعددی ارائه شده است [۱۸ ،۱۷ ،۱٤]. هم‌چنین، خواص آنتی‌اکسیدانی بخش‌های مختلف توتیای دریایی که در مطالعات پیشین ما انجام شد، به اثبات رسیده است [۲۸] . ولی تاکنون گزارشی برای اثبات رابطه بین خواص آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم آلفاآمیلاز توتیای دریایی منتشر نشده است و مطالعه حاضر اولین تلاش در خصوص وجود توانایی مهار آنزیم آلفاآمیلاز توسط توتیای دریایی می‌باشد.

آلفاآمیلاز یکی از آنزیم‌های هیدرولیزکننده است که پیوند گلیکوزیدی موجود در نشاسته و پلیمرهای مشابه آن را می‌شکند [۲۹]. ترکیباتی که به‌عنوان مهارکننده آلفاآمیلاز ذکر شده‌اند به سه دسته کلی ترکیب‌های پروتئینی، شبه قندی و پلی‌فنلی تقسیم می‌شوند [۷]. از این‌رو، موجوداتی که دارای ترکیبات پلی‌فنلی از جمله فلاونوئیدی باشند، در مدل حیوانات دیابتی به‌عنوان داروی کاهش دهنده قند و لیپید خون شناخته شده‌اند [۳۰-۲۷].

توتیاهای دریایی به خودی خود جزء تولیدکنندگان ترکیبات فلاونوئیدی نمی‌باشند. مطالعات متعددی بیان کردند که توتیای دریایی دارای مقدار محدودی از ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. مطالعات پیشین ما نیز نشان داد عصاره اتیل‌استاتی فانوس ارسطو دارای بیش‌ترین میزان فلاونوئید می‌باشد [۲۸] ، بنابراین به میزان قابل توجهی باعث مهار آنزیم آلفاآمیلاز می‌گردد.

نتایج مطالعات ما نیز در این تحقیق نشان داد که سلول‌های آزاد مایع سلومیک، سلوموسیت لیزات و رنگدانه پوسته توتیای دریایی که طبق مطالعات پیشین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی در مهار رادیکال آزاد می‌باشند، دارای میزان بالایی از مهار آنزیم آلفاآمیلاز نیز می‌باشند.

به‌علاوه، مطالعات متعددی بیان نمودند که عصاره‌های غیرقطبی بیش‌ترین فعالیت را در مهار آنزیم دارند [۳۲]. نتایج حاصل از این مطالعه نیز تایید می‌کند که از بین تمام عصاره‌های مورد مطالعه در این تحقیق، عصاره غیرقطبی انهگزانی توتیای دریایی دارای بیش‌ترین مهار آنزیم آلفاآمیلاز می‌باشد.

ترکیبات را از طریق تغذیه به ویژه جلبک ها قهوه ای بدست می آورند[31]. رنگدانه پوسته بیش‌ترین فعالیت مهار آلفاآمیلاز را داشته و احتمالاً حاوی بیش‌ترین ترکیبات با خواص مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز می‌باشد. تحقیقات بیش‌تری لازم است تا این اثرات در شرایط درون‌تنی در حیوانات آزمایشگاهی و انسان به اثبات برسد. آزمایش‌های برون‌تنی و درون‌تنی جهت شناسایی دیگر اثرات احتمالی عصاره توتیا در کاهش گلوکز خون ضروری به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان با شماره طرح ۹۲۶۶ صورت گرفته است.

مآخذ

1. Shane-McWhorter L. Botanical dietary supplements and the treatment of diabetes: What is the evidence? *Curr. Diab. Rep* 2005; 5: 391 - 8.
2. Kasper DL, Braunwald EAB, Fauci AS. Harrison's principles of internal medicine. 16th Edn. Mcgraw Hill Companes/Mcgraw-Hill. 2005, pp: 2152 - 80.
3. Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC, Marinopoulos S. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med* 2007; 147: 386 - 99.
4. Wiener RS, Wiener DC, Larson RJ. Benefits and risks of tight glucose control in critically ill adults: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 300: 933 - 44.
5. Numao S, Damager I, Li C, Wrodnigg TM, Begum A, Overall CM, et al. In Situ Extension as an Approach for Identifying Novel alpha Amylase Inhibitors. *J Biological Chemistry* 2004, 279: 48282-48291.
6. Qian M, Nahoum V, Bonicel J, Bischoff H, Henrissat B, Payan F. Enzyme-Catalyzed Condensation Reaction in a Mammalian Alpha-Amylase. High-Resolution Structural Analysis of an Enzyme-Inhibitor Complex *Biochemistry* 2001; 40. 7700-7709.
7. Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi- de- sa MF. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with Insect α- amylases, structure, function and potential for crop protection, *European Journal of Biochemistry* 2002; 269: 397-412.
8. Strobl S, Maskos K, Betz M, Wiegand G, Huber R, Gomis-Ruth FX, et al. Crystal structure of yellow meal worm α-amylase at 1.64A0 resolution, *Journal of Molecular Biology* 1998; 278: 617-628.
9. Aoki K, Muraoka T, Ito Y, Togashi Y, Terauchi Y. Comparison of adverse gastrointestinal effects of acarbose and miglitol in healthy men: a crossover study. *Intern Med* 2010; 49: 1085-7.
10. Randhir R, Shetty K. Improved K-amylase and Helicobacter pylori inhibition by fenugreek extracts derived via solid-state bioconversion using Rhizopus oligosporus. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16: 382-392.
11. Villasin C, pomory M. Antibacterial activity of extracts from the body wall of *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea). *Fish & Shellfish Immunology* 2000; 10: 465-46.
۱۲. نبی‌پور ا؛ نجفی ا، بوالخیر ا. نرمتنان دارویی خلیج فارس. *دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر* ۱۳۸۹; چاپ اول: ٦٨-٧٢.
13. Bodnar A. Proteomic profiles reveal age-related changes in coelomic fluid of sea urchin species with different life spans. *Experimental Gerontology* 2013; 48: 525–530.
14. Zhou DY, Qin L, Zhu BW, Wang XD, Tan H, Yang JF, et al. Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin Strongylocentrotus nudus. *Food Chem* 2011; 129:1591–1597.
15. Amarowicz R, Synowiecki J, Shahidi F. Chemical composition of shells from red (Strongylocentrotus franciscanus) and green (Strongylocentrotus droebachiensis) sea urchin. *Food Chem* 2012; 133:822–826.
16. Smith LC, Ghosh J, Buckley KM, Clow LA, Dheilly NM, Haug T, et al. Echinoderm Immunity. In: Soderhall, K, editors. Handbook of Invertebrate Immunity. *Landes Bioscience and Springer* 2010; 260-270.
17. Kuwahara R, Hatate H, Chikami A, Murata H, Kijidani Y. Quantitative separation of antioxidant pigments in purple sea urchin shells using a reversed-phase high performance liquid chromatography. *LWT - Food Science and Technology* 2010; 43: 1185-1190.
18. Kuwahara R, Hatate H, Yuki T, Murata H, Tanaka R, Hama Y. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *LWT - Food Science and Technology* 2009; 42: 1296-1300.
19. Bragadeeswaran S, Kumaran N, Sankar P, Prabahar R. Bioactive potential of sea urchin *Temnopleurus toreumaticus* from

Devanampattinam, Southeast coast of India. *J Pharmacy and Alternative Medicine* 2013; 3: 9-17.
20. Arizza V, Giaramita T, Parrinello D, Cammarata M, Parrinello N. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of Paracentrotus lividus coelomocytes. *CBP* 2007; 147: 389–394.
21. Ademiluyi AO, Oboh G, Boligon AA. Effect of fermented soybean condiment supplemented diet on α-amylase and α-glucosidase activities in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Functional foods* 2014; 9: 1–9.
22. Rhabasa-Lhoret R, Chiasson JL. Alphaglucosidase inhibitors (3rd ed.). In Defronzo R A, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P. International textbook of diabetes mellitus UK: *John Wiley* 2004.
23. Yee HS, Fong NT. A review of the safety and efficacy of acarbose in diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 1996; 16: 792 - 805.
24. Jo SH, Ka EH, Lee HS, Apostolidis E, Jang HD, Kwon YI. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α-glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. Int. J. Applied Res. *Natural Products* 2010; 2: 52 - 60.
25. Jakus, V. 2000. The Role of Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidant System in Diabetic Vascular Disease. Bratisl Lek Listy. 101: 541-551.
26. Ojewole AO. Hypoglycemic effect of Clausena anisata Hook methanolic root extract in rats. *J. Ethnopharmacol* 2002; 8: 231-7.
27. Li W, Dai R, Yu YH, Li L, Wu CM, Luan WW. Anti hyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT-4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. *Biol Pharm Bull* 2007; 30:1123-9.
۲۸. سلیمانی س، یوسف‌زادی م، معین س، امراللهی بیوکی ن، کشاورز م، اصلیان ح. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوای پلی‌فنلی توتیای دریایی Echinometra mathae خلیج‌فارس. زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ۱۳۹٤، شماره ۲: ۷۰-۸۰
29. Minami Y, Kenjiro T, Takamatsu K, Matsouka T. Inhibition of α-amylase and α-glucosidase by flavonoids. *Nutr Sci Vitaminol* 2005; 52: 149-53.
30. Sharma B, Balomajumder C, Roy P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from Eugenia jambolana seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2376-83.
31. Mamelona J, Pelletier E, Girard-Lalancette K, Legault J, Karboune S, Kermasha S. Antioxidants in digestive tracts and gonads of green urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Food Composition and Analysis* 2011; 24:179–183.
۳۱. شکرچی م، حاجی مهدی‌پور هـ نقیبی ف؛ آرا ل، موذنی ذ. بررسی فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز عصاره برخی گونه‌های جنس *Ferula*. *فصلنامه گیاهان دارویی* ۱۳۹۲، شماره ٤٦: ۱۱۲-۱۰٦.

EFFECT OF SEA URCHIN ECHINOMETRA MATHAEI EXTRACTION ON THE A-AMYLASE ENZYME ACTIVITY

Soolmaz Soleimani[1], Soheila Moein[2,3*], Morteza Yousefzadi[1], Narges Amrollahi Bioki[1]

1. *Department Of Marine Biology, Faculty Of Science, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran*
2. *Medicinal Plants Processing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*
3. *Department Of Biochemistry, Faculty Of Medicine, Hormozgan University Of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran*

ABSTRACT

Background: sea urchins belonging to phylum echinoderms of marine invertebrates them found to possess excellent. Diabetes mellitus, metabolic diseases most prevalent in the world with a group of metabolic disorders characterized by different degrees is the first increase in blood glucose levels. The aim of the present research was undertaken to study the anti- diabetes activity of different extracts, coelomic fluid and pigments shells and spines of sea urchin of Echinodermata mathaei.
Methods: Isolation of different tissues extracts (spine, shell, gonad and aristotol lantern) sea urchin by three solvents (n- hexan, ethyl acetate, and methanol). Isolation coelomic fluid by buffered mode and pigments shell and spine by HCl of sea urchin anti-diabetes activity investigated through inhibition α-Amylase enzyme.
Results: According to the results of the study, coelomic fluid (CF), coelomocyte lysate and shell pigment of sea urchin highest activity in the anti-diabetes methods. Significant differences were observed at $P<0.05$.
Conclusion: The result of this research indicated that sea urchin of E. mathaei due to the high antioxidant activity, as well as, flavonoid compounds, have anti- diabetes activities too.

Keywords: α- Amylase enzyme, diabetes, enzyme inhibition, sea urchin, Echinometra mathaei

[*]Emam Hossein Blvd, Hormozgan University Of Medical Sciences, Bandar Abbas, Postal code:7919693116, Tell: 09171127539, Email: Soheila_9@yahoo.com