مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر مهارکنندگی عصاره‌های خیار دریایی (*Holothuria parva*) بر آنزیم آلفا آمیلاز

نجیبه قناعت‌پیشه[۱]، موسی کشاورز[۱*]، حامد میر[۲]

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

۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی جهرم، جهرم، ایران

*مسئول مکاتبات: m.keshavarz@hormozga.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹

DOI: 10.22034/ascij.2023.1989599.1501

چکیده

مهارکننده‌های آنزیم آلفا آمیلاز از تبدیل پلی‌ساکاریدها به مونوساکاریدها پیشگیری می‌کند. مهار این آنزیم از جذب قندهای ساده دستگاه گوارش و در نتیجه پیشگیری از افزایش سطح گلوکز خون موثر بوده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر عصاره‌های اتیل استات، متانول و آب- متانول از خیار دریایی *Holothuria parva* بر مهار آنزیم آلفا آمیلاز است. در این پژوهش از پوسته و امعاء و احشاء گونه *Holothuria parva* ابتدا عصاره‌گیری براساس افزایش قطبیت انجام گرفت و در مرحله بعد فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در حضور عصاره‌های مختلف تحت شرایط سنجش فعالیت آنزیمی به روش رنگ‌سنجی DNSA تعیین شد و IC_{50} (غلظتی از عصاره‌ها که برای برای مهار ۵۰ درصد فعالیت آنزیم مورد نظر بوده است) بدست آمده و با مقدار آکاربوز به عنوان کنترل مثبت مقایسه شد. در این بررسی نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد مهارکنندگی افزایش یافته و در بین تمام عصاره‌ها بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به آکاربوز در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برابر ۹۶/۹۲ درصد و کمترین مقدار آن مربوط به عصاره آب–متانول پوسته در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برابر با ۶۱/۷۹ درصد بوده و درصد بازدارندگی آکاربوز در هر دو اجزای بدنی نسبت به سایر عصاره‌ها بالاتر است (IC_{50} برابر با ۸۸/۱۸- ۹۱/۷۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر). با توجه به اثر مهاری عصاره‌های استخراج شده از گونه *Holothuria parva* بر آنزیم آلفا آمیلاز در آینده می‌توان در زمینه تولید داروهای ضددیابتی با منشا دریایی با حداقل عوارض جانبی نامطلوب استفاده نمود.

کلمات کلیدی: خیار دریایی، دیابت، خلیج‌فارس، آکاربوز، خارپوستان.

مقدمه

محیط‌های دریایی با سطح پوششی بیش از ۷۰ درصد از سطح کره زمین نه تنها دارای تنوع زیستی غنی بوده (۳۴) بلکه توجه روزافزون به دلیل پتانسیل اقتصادی و تکنولوژیکی آن باعث ایجاد زمینه تحقیقاتی رو به رشد شده که به استفاده از منابع دریایی برای توسعه محصولات، فرآیند و فناوری می‌پردازد در واقع، به‌دلیل اینکه محیط‌های دریایی شرایط منحصر به فردی را ارائه می‌دهند دارای منبعی از ارگانیسم‌های منحصر بفردی بوده که می‌توانند ترکیبات، بیوماکرومولکول‌ها و بیوکاتالیست‌ها با ویژگی‌های منحصربه‌فرد که بسیاری از آن‌ها هیچ همتایان زمینی ندارند، تولید کنند و ترکیبات طبیعی مشتق شده از بی‌مهرگان دریایی سهم قابل توجهی در پزشکی معاصر داشته‌اند (۵۲). آمیلاز متعلق به گلیکوزید هیدرولازها بوده و دارای ساختار سه بعدی است که به‌طور کلاسیک به سه دسته آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1)،

بتا آمیلاز (EC 3.2.1.2) و گاما آمیلاز (EC 3.2.1.3) تقسیم می‌شوند. در میان این دسته‌ها، آلفا آمیلاز اساساً متالوآنزیم‌های کلسیمی بوده (۵۱) و یکی از آنزیم‌های اصلی تولید شده در سلول‌های برون‌ریز پانکراس است که به عنوان یک شاخص برای فعالیت اندام‌ها در هر دو حالت فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی شناخته می‌شود (٦) این آنزیم عنوان رایج‌ترین آنزیم خارج سلولی کلیدی شناخته می‌شود که بستر پلیمری را به الیگومرهای کوتاه‌تر تجزیه کرده به‌طوری که پیوندهای α-4،1 گلیکوزیدی موجود در مولکول‌های نشاسته و گلیکوژن را هیدرولیز می‌کند (۱۹) و محصول تجزیه‌ای مانند مالتوز تولید کرده که به نوبه خود به دو مولکول گلوکز تبدیل می‌شود (٤٥). آمیلاز نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در داخل بدن ایفا می‌کند و بنابراین ژن‌های آلفا آمیلاز را می‌توان در موجودات دریایی مختلف شامل باکتری‌ها (٤٢)، قارچ‌ها (۱۱)، ریزجلبک‌ها (٥٦)، ماکروجلبک‌ها (۳۸)، علفزار دریایی (٢٦)، اسفنج‌ها (٦٣)، مرجان‌ها (٥٩)، پوست ماهی سالمون (٦٥)، روغن ماهی (٥٨) و هم‌چنین ضایعات صدف نرمتنان (۲۰) یافت که در غربالگری آزمایش‌های فعالیت ضدهیپرگلیسمی و ضددیابتی از موجودات دریایی استفاده شده است. دیابت یک بیماری متابولیکی است که در بین مشکلات مداوم و چالش برانگیز سلامت عمومی در سراسر جهان رتبه‌بندی شده و ٤٦٣ میلیون نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا هستند و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰٤٥ به ۷۰۰ میلیون نفر برسد (٢٤). دیابت نوعی اختلال متابولیکی مزمن جدی است که با افزایش سطح گلوکز خون به دلیل ترشح ناقص انسولین و/یا مقاومت به انسولین به همراه اختلال در متابولسیم چربی‌ها و پروتئین‌ها مشخص می‌شود (۱۷). دیابت با درجات متعدد کمبود ترشح انسولین، مقاومت به انسولین و اختلال در ترشح انسولین، شایع‌ترین بیماری متابولیک است که اولین مشخصه آن افزایش غلظت گلوکز در خون است که هیپرگلیسمی نامیده می‌شود و مهار آنزیم‌های گلوکوزیداز و آمیلاز می‌تواند به‌طور قابل توجهی افزایش گلوکز خون پس از غذا را پس از رژیم کربوهیدرات مخلوط کاهش داده و بنابراین می‌تواند یک استراتژی مهم در مدیریت بیماران دیابتی باشد (٦٦). خارپوستان جانورانی قدیمی‌اند و سابقه آن‌ها به دوره کامبرین رسیده و این فون دریایی حدود ۷۰۰۰ گونه زنده و ۱۳۰۰۰ گونه فسیلی بوده و موجودات مناسبی جهت پایش زیستی برای اهداف آزمایشگاهی و اکولوژیکی هستند (٤٤) این جانوران نسبت به تغییرات پارامترهای محیطی حساس بوده و از گونه‌های ساکن در آب‌های ساحلی کم عمق تا اعماق زیاد محسوب می‌شوند (٦٠). این گونه‌ها اعضای اصلی زنجیره غذایی در محیط معتدل و مرجانی هستند و علاوه بر این، تخم‌ها و لاروهای این موجودات به عنوان منبع غذایی مهم برای سایر جانوران دریایی در نظر گرفته می‌شوند (٥). با توجه به اینکه خارپوستان دومین گروه بزرگ دئوتروستومی پس از کورداتا هستند، اما مطالعات محدودی در زمینه شناسایی آمیلاز و خواص زیستی و بیوشیمیایی آن در خارپوستان تاکنون صورت گرفته است (٤٨). خیارهای دریایی متعلق به رده Holothuroidea از خارپوستان در اکوسیستم دریایی در مناطق گرمسیری بوده که حدود ۱۷۰۰ گونه در سرتاسر جهان شناسایی شده (٤٣) و سهم قابل توجهی در بازیافت نوترینت‌ها و تجزیه مواد آلی دارند (۲۹). این گروه از فون دریایی برای قرن‌ها در بسیاری از کشورها به عنوان یک غذای مقوی در زمینه طب سنتی مطرح بوده و در سال‌های اخیر به دلیل عملکردهای زیستی متنوع از جمله ضدسرطان، ضددیابت، ضد التهابی، ضد چاقی، تعدیل‌کننده ایمنی و در صنایع گوناگون پزشکی،

غذایی و آرایشی مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند (۷، ٦۲) که این عملکردهای زیستی خیار دریایی را می‌توان به مجموعه‌ای از ترکیبات زیست‌فعال آنها مانند تری‌ترپن‌ها، لاکتون‌ها، سربروزیدها، اسیدهای آلی و پلی‌ساکاریدها نسبت داد (۱۲، ۵۳). خیارهای دریایی به‌دلیل تحمل محدوده وسیعی از تغییرات اقلیمی، در سراسر جهان از زیستگاه‌های متنوعی پراکنده شده و جزء مهمترین گونه‌های تجاری در سراسر جهان مطرح بوده که به علت محبوبیت فراوان آنها بخصوص در کشورهای آسیایی و اروپایی با افزایش چشمگیر تقاضا روبرو است (۲۸). با وجود گونه‌های بومی فراوان خیار دریایی که در آب‌های ایران، در منطقه جنوب کشور وجود دارد، تحقیقات زیادی در زمینه بررسی خاصیت زیستی این دسته از خارپوستان صورت نپذیرفته است. چندین گونه خیار دریایی از خلیج‌فارس و دریای عمان گزارش شده که *Holothuria parva* (Krauss in Lampert, 1885) یکی از گونه‌های رایج است (١٦). گونه *H. parva* دارای بدنی دوکی شکل، کوچک و سایزی در حد ۱۰ سانتی‌متر بوده و در نمونه‌های زنده مایل به قهوه‌ای و کناره‌های شکمی تا حدی روشنتر از سطح پشتی است. زیستگاه این گونه در مناطق بین جزرومدی سواحل صخره‌ای می‌باشد (۱۰). هدف این مطالعه، استخراج و ارزیابی اثر مهارکنندگی عصاره‌های سلولی استخراجی خیار دریایی *Holothuria parva* از خلیج فارس بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در محیط بیرونی بوده است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی خیار دریایی گونه *H. parva* از سواحل بندر لنگه جمع‌آوری شده و ویژگی‌های مورفولوژیک آن‌ها ملاحظه و اصالت نمونه توسط کلید شناسایی مورد تایید قرار گرفت (١٤). نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از پاک‌سازی از ذرات رسوبی با آب مقطر شستشو و سپس نمونه‌ها در ظروف محتوی یخ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه ابتدا نمونه پوسته و سپس امعاء و احشاء تشریح و جداسازی شدند. نمونه‌ها با آب مقطر شستشو و با کاغذ خشک‌کن آبگیری شدند. در مرحله بعدی نمونه‌ها به قطعات ریز برش داده شدند و در سایه خشک گردید. حلال‌های مورد استفاده در این آزمایش براساس قطبیت به ترتیب شامل اتیل‌استات، متانول و آب–متانول (۵۰– ۵۰ درصد) بود. به منظور تهیه عصاره‌های مختلف ۹۰ گرم از پوسته خشک شده به همراه ۲۷۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر در ارلن ریخته شد و سپس درب آن را توسط پنبه و پارافیلم بسته و با فویل آلومینیومی به طور کامل پوشانیده شد در ادامه به مدت ۲ ساعت روی شیکر قرار داده شده و بمدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. محلول‌های به دست آمده به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ٤۰ صاف و زیر هود قرار داده شد سپس پودر حاصل وزن شده و درون میکروتیوب در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد جهت انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند. مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از روش رنگ‌سنجی (DNSA) براساس میزان کاهش آزادسازی مالتوز از محلول نشاسته و با توجه به روش گزارش شده توسط میلر (۳۳) با تغییرات جزیی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت انجام بررسی واکنش آنزیم آلفا آمیلاز، ٤۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف (۰/۲، ۰/٤، ۰/٦ و ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) که هر کدام از عصاره‌ها را به همراه ۳٦۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷، ۵۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته ۱ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم آلفا آمیلاز درون لوله‌های آزمایش جداگانه ریخته شد و مخلوط را در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام بن‌ماری قرار داده شد. به منظور خاتمه

واکنش و اندازه‌گیری میزان آکاربوز آزاد شده در واکنش، یک میلی‌لیتر معرف دی نیتروسالسیلیک اسید (DNSA) به مخلوط افزوده شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خنک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق، میزان جذب در طول موج ٥٤٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Cecil Ce7500 با سه تکرار خوانش شد. برای تهیه نمونه بلانک ٤٠ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف مهارکننده، ٥٠٠ میکرولیتر نشاسته ۱ درصد و ٤٦٠ میکرولیتر بافر سدیم فسفات مخلوط شد. نمونه بلانک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. به منظور تهیه نمونه کنترل ٤٠ میکرولیتر آنزیم آلفا آمیلاز، ٥٠٠ میکرولیتر نشاسته و ٤٦٠ میکرولیتر بافر فسفات مخلوط شد. در این نمونه از مهارکننده استفاده نشد. نمونه شاهد در تمامی آزمایشات نمونه بلانک که فاقد آلفا آمیلاز است، به عنوان کنترل منفی و نمونه شاهد که فاقد مهارکننده و دارای ۱۰۰ درصد فعالیت آنزیمی می‌باشد به عنوان کنترل کننده مثبت در نظر گرفته شد. به منظور بررسی مهار آنزیم توسط آکاربوز قرص آکارماکس ۱۰۰ محصول شرکت تهران شیمی استفاده شد. آزمایشات مربوط به آکاربوز نیز به طور دقیق مانند عصاره *H. parva* انجام گردید و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (٤٧). نتایج آزمون برحسب درصد واکنش و درصد مهاری آنزیم آلفا آمیلاز بر اساس روابط زیر محاسبه شد: ۱۰۰× (میزان آکاربوز در کنترل/ میزان آکاربوز در نمونه) = درصد واکنش، درصد واکنش − ۱۰۰ = مهار آنزیم. آزمایش سنجش مهار آنزیم آمیلاز به ازای هر کدام از عصاره‌ها سه تکرار انجام شد. مقادیر میانگین و انحراف از استاندارد با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد. مقایسه میانگین توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ٢٦ انجام و مقادیر IC_{50} تعیین شد. IC_{50} نشان‌دهنده غلظتی از عصاره می‌باشد که میزان ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم را مهار می‌کند. قدرت مهارکنندگی عصاره‌ها بر مبنای IC_{50} نسبت به هم مقایسه شد.

نتایج

میزان عصاره بافت‌های پوسته و امعاء و احشاء خیار دریایی *H. parva* حاصل از سه حلال و رنگ آنها به‌ترتیب در جداول ۱ و ۲ خلاصه شده است. در این مطالعه میزان مهار آنزیم آلفاآمیلاز در حضور عصاره‌های قطبی و غیرقطبی پوسته و امعاء و احشاء گونه *H. parva* مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین و کمترین درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز برای عصاره اتیل‌استاتی پوسته به ترتیب در غلظت‌های ۰/۸ (اثر مهاری ٨٩/٤٤ درصد) و (اثر مهاری ۷۸/۳۲ درصد) ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بوده و همچنین عصاره متانولی نیز با افزایش غلظت میزان مهار آنزیمی افزایش داشته به‌طوری که بیشترین و کمترین درصد مهارکنندگی به ترتیب در غلظت‌های (اثر مهاری ۸۹/۲ درصد) ۰/۸ و (اثر مهاری ٦٨/٠٢ درصد) ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در مقایسه با آکاربوز مشاهده شد و در عصاره آب- متانول پوسته بیشترین و کمترین به ترتیب در غلظت‌های (اثر مهاری ۸۷/۸۷ درصد) ۰/۸ و (اثر مهاری ٦١/٧٩ درصد) ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بوده و نتایج بیانگر تفاوت معنی‌دار مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز توسط عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف بوده است ($p < ۰/۰۵$) (شکل۱ و ۳). مقایسه نتایج میانگین عصاره‌های اتیل‌استات، متانول، آب- متانول و آکاربوز پوسته خیار دریایی مشاهده شد که درصد مهاری با افزایش غلظت به طور مستقیمی افزایش یافته به‌طوری که در بین تمام این عصاره‌ها بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به اتیل‌استات با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر با ٨٩/٤٤ درصد و کمترین درصد مهارکنندگی مربوط به عصاره آب-متانول در غلظت

۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برابر با ۶۱/۷۹ درصد بوده است. در بررسی تمامی غلظت عصاره‌های مختلف مربوط به پوسته بیشترین فعالیت مهارکنندگی به ترتیب به این صورت آکاربوز > اتیل‌استات > متانول > آب- متانول مشاهده شد و عصاره اتیل‌استات نسبت به سایر عصاره‌های پوسته خیار دریایی اثر مهارکنندگی بالاتری داشت. در عصاره‌های پوسته تابع لگاریتمی تمامی عصاره‌ها بین غلظت عصاره‌ها و مقدار IC_{50} یک رابطه مستقیم وجود داشته به طوری که عصاره‌های متانول و آب- متانول به طور مساوی دارای بالاترین مقدار ضریب همبستگی (۰/۹۷) و برای عصاره‌های اتیل‌استات و آکاربوز به‌ترتیب دارای ضریب همبستگی ۰/۹۵ و ۰/۹۴ مشاهده شده و نتایج مقدار IC_{50} آنزیم آلفا آمیلاز بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب در تیمارهای آکاربوز و آب - متانول مشاهده گردید (جدول ۳). در بررسی اثر مهاری آنزیم آلفا آمیلاز امعاء و احشاء گونه *H. parva* بیشترین و کمترین درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز برای عصاره اتیل‌استاتی به ترتیب در غلظت‌های (اثر مهاری ۹۳/۶۱ درصد) ۰/۸ و (اثر مهاری ۷۴/۱ درصد) ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بوده و در عصاره متانولی نیز با افزایش غلظت میزان مهار آنزیمی افزایش داشته به طوری که بیشترین و کمترین درصد مهارکنندگی به‌ترتیب در غلظت‌های (اثر مهاری ۸۳/۰۹ درصد) ۰/۸ و (اثر مهاری ۶۹/۶۵ درصد) ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در مقایسه با آکاربوز مشاهده شد و در عصاره آب-متانول بیشترین و کمترین به‌ترتیب در غلظت‌های (اثر مهاری ۹۱/۹۹ درصد) ۰/۸ و (اثر مهاری ۷۷/۹۲ درصد) ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بوده و نتایج بیانگر تفاوت معنی‌دار مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز توسط عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف بوده است ($p < ۰/۰۵$) (شکل۲ و شکل ۳). مقایسه نتایج میانگین عصاره‌های اتیل‌استات، متانول، آب- متانول و آکاربوز امعاء و احشاء خیار دریایی مشاهده شد که درصد مهاری با افزایش غلظت به طور مستقیمی افزایش داشته است به‌طوری که در بین تمام این عصاره‌ها بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به اتیل‌استات با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر با ۹۳/۶۱ درصد و کمترین درصد مهارکنندگی مربوط به عصاره متانول در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برابر با ۶۹/۶۵ درصد بوده است. در بررسی تمامی غلظت عصاره‌های مختلف مربوط به امعاء و احشاء بیشترین فعالیت مهارکنندگی به‌ترتیب به این صورت آکاربوز > اتیل‌استات > آب- متانول > متانول مشاهده شد و عصاره اتیل‌استات نسبت به سایر عصاره‌های امعاء و احشاء خیار دریایی اثر مهارکنندگی بالاتری داشت. در عصاره‌های امعاء و احشاء تابع لگاریتمی تمامی عصاره‌ها بین غلظت عصاره‌ها و مقدار IC_{50} یک رابطه مستقیم وجود داشته به طوری که عصاره آکاربوز دارای بالاترین مقدار ضریب همبستگی (۰/۹۷) و برای عصاره‌های اتیل‌استات و متانول و آب- متانول به‌ترتیب دارای ضریب همبستگی با مقادیر ۰/۹۵، ۰/۹۲ و ۰/۸۹ مشاهده شده و نتایج مقدار IC_{50} آنزیم آلفا آمیلاز بیشترین و کمترین مقدار به‌ترتیب در تیمارهای آکاربوز و متانول مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۱- وزن خام و عصاره بافت‌های مختلف حاصل از حلال‌های مختلف

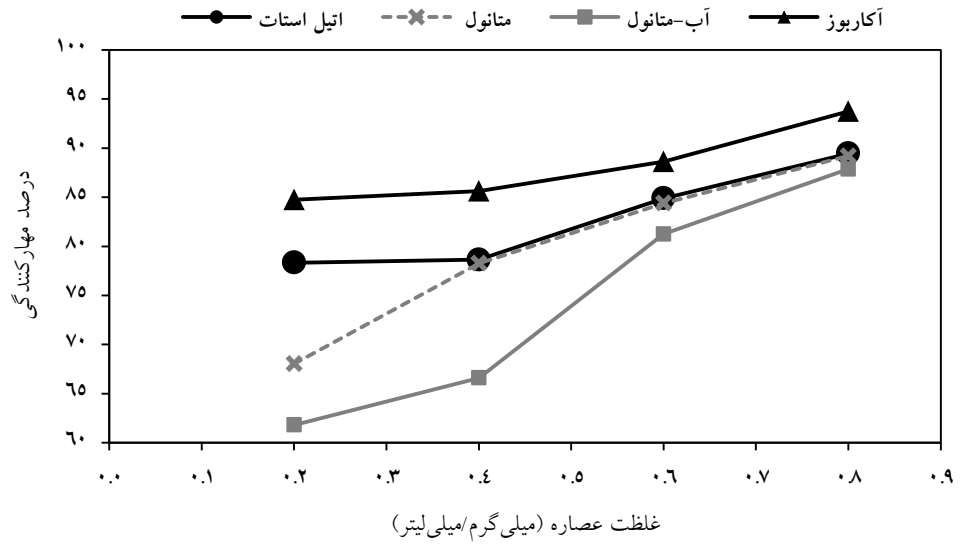
بافت	وزن خام بافت (گرم)	ماده حاصل	وزن عصاره حاصل از حلال‌های مختلف (گرم)		
			اتیل‌استات	متانول	آب-متانول
پوسته	۹۹/۲۰۴	۹۰	۱/۹۸	۷/۲۰	۷/۸۳
امعاء و احشاء	۴۵/۴۳	۴۵	۱/۷۱	۶/۴۵	۲/۸۸

جدول ۲- رنگ عصاره حاصل از بافت پوسته و امعاء و احشاء

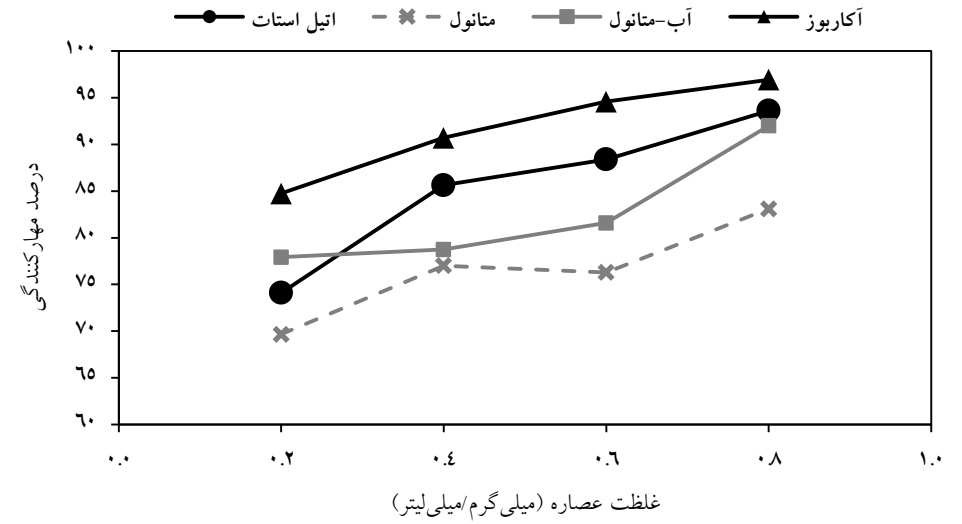
	اتیل‌استات	متانول	آب-متانول
پوسته	قهوه‌ای تیره-عصاره تغلیظ شده	زرد رنگ-پودر	زرد رنگ-پودر
امعاء و احشاء	قهوه‌ای تیره-عصاره تغلیظ شده	قهوه‌ای روشن-عصاره تغلیظ شده	قهوه‌ای روشن -عصاره تغلیظ شده

جدول ۳- مقادیر IC_{50} آنزیم آلفا آمیلاز تحت تاثیر عصاره‌های مختلف (Mean ± SD)

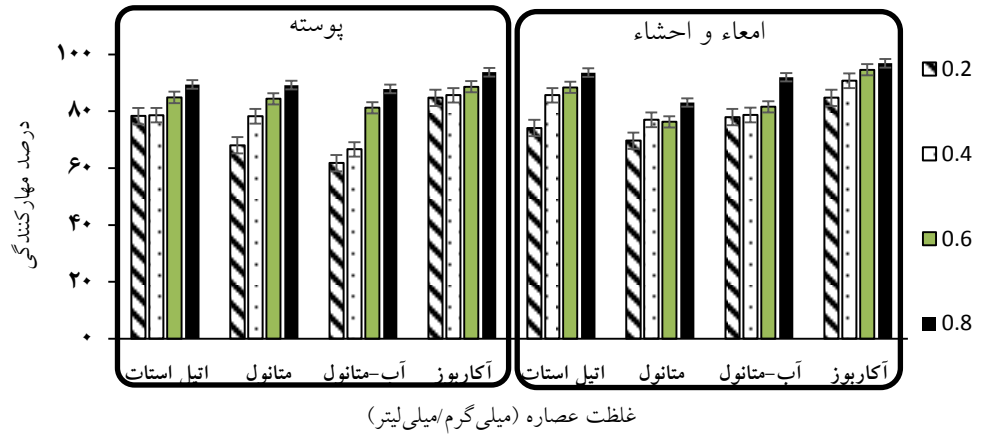
پارامتر	عصاره‌ها	اتیل‌استاتی	متانولی	آب- متانولی	آکاربوز
IC_{50} (mg/ml)	پوسته	۸۲/۸۲ ± ۵/۳٤	۷۹/۹۷ ± ۹/۱۳	۷٤/۳۸ ± ۱۲/۲۲	۸۸/۱۸ ±٤/۰٦
	امعاء و احشاء	۸۵/۳٤ ± ۸/۲۵	۷٦/۵۱ ± ۵/٤۹	۸۲/۵٦ ± ٦/٤۸	۹۱/۷٤ ±۵/۳۲



شکل ۱- تابع لگاریتمی مقادیر IC_{50} آنزیم آلفا آمیلاز تحت تاثیر عصاره‌های مختلف پوسته خیار دریایی



شکل ۲- تابع لگاریتمی مقادیر IC_{50} آنزیم آلفا آمیلاز تحت تاثیر عصاره‌های مختلف امعاء و احشاء خیار دریایی



شکل ۳- بررسی میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتیل‌استات، متانول و آب-متانول و آکاربوز در پوسته و امعاء و احشاء خیار دریایی *H. parva*

بحث

امروزه میزان مرگ‌ومیر ناشی از بیماری دیابت به سرعت افزایش یافته است (٦٤). در بیماران دیابتی آنزیم‌هایی موثر مانند آلفا آمیلاز و آلفا گلیکوزیداز به‌طور گسترده به عنوان یک هدف دارویی برای جلوگیری از افزایش قند خون پس از غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۹). در سال‌های اخیر، محصولات طبیعی جانوران دریایی منابع غنی از ترکیبات با کاربردهای تغذیه‌ای، دارویی و پزشکی بوده و علاقه شدیدی به کشف این محصولات به منظور کاربرد در زمینه پزشکی دریایی وجود داشته (۲۷) و می‌توانند در آینده به عنوان داروخانه‌های طبیعی نقش ایفا خواهند نمود. محیط زیست دریایی عامل وجود ترکیباتی با ساختار استروژنی و اتم‌های هیدروژن بوده که آن‌ها را از سایر ترکیبات طبیعی متمایز می‌نماید. از آنجایی که آبزیان نسبت به جانداران خشکی‌زی از فرصت تکاملی بیشتری برخوردار بوده و این امر می‌تواند ترکیبات سنتز شده توسط آنها، با خواص زیستی دارای عملکرد پیچیده‌تری باشد، سنتز نمایند (۲۱). استفاده از گونه‌های مختلف خارپوستان به عنوان یکی از اعضای اکوسیستم محیط دریایی جهت دستیابی به پیش ماده‌های داروهای زیستی، می‌تواند مسیر مناسبی برای توسعه صنعت داروسازی باشد. صرف نظر از وجود داروهای ضددیابت، غربالگری برای منابع جدید ضددیابتی از محصولات طبیعی هم‌چنان جذاب است، زیرا ترکیبات طبیعی جایگزین مناسبی برای درمان دیابت بوده و خطر بیماری را به حداقل می‌رسانند (۹). در تحقیق حاضر درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتیل‌استاتی، متانولی و متانولی- آبی و آکاربوز در خیار دریایی *Holothuria parva* ارزیابی و نتایج بر اساس درصد مهاری در غلظت مشخص از نمونه و نیز شاخص IC_{50} با یکدیگر مقایسه شد. در این بررسی درصد مهاری آلفا آمیلاز در غلظت‌های ۰/۲ تا ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بررسی گردید که در پوسته بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به آکاربوز و عصاره اتیل‌استاتی در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر ۹۳/۷٤ و ۸۹/٤٤ درصد و کمترین مقدار این پارامتر مربوط به عصاره آب - متانول در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برابر ٦۱/۷۹ درصد و در عصاره‌های امعاء و احشاء بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به آکاربوز و عصاره اتیل‌استاتی در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر ۹٦/۹۲ و ۹۳/٦۱ درصد و کمترین مقدار این پارامتر مربوط به عصاره

آب – متانول در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر برابر ٦٩/٦٥ درصد به ثبت رسید و نتایج همچنین نشان داد که همواره با افزایش غلظت نمونه‌ها میزان مهار آنزیمی در تمام عصاره‌ها افزایش یافته که این روند با نتایج سایر بررسی‌ها مطابقت داشته است (۳۸). در مطالعات مشابهی که بر توتیای دریایی *Echinometra mathaei*، از خارپوستان بومی خلیج‌فارس صورت گرفته نشان داد که مهارکنندگی عصاره‌های n هگزانی گناد (۸٤/۷±۲/۹ درصد) و عصاره متانولی پوسته (۷٤/۷±۰/٦٤ درصد) به ترتیب بیشترین اثر مهاری آلفا آمیلازی داشته و بیشترین و کمترین فعالیت مهاری آلفا آمیلاز در غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره n هگزانی گناد و غلظت ۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر مربوط به عصاره اتانولی فانوس ارسطو مشاهده گردید (٥٤). در بررسی مهارکنندگی آنزیم آلفا گلوکوزیداز دو گونه خیار دریایی *Stichopus hermanni* و *Holothuria leucospilota* از خلیج‌فارس مشخص شد که عصاره درخت تنفسی گونه‌های *S. hermani* و *H. leucospilota* به‌ترتیب ۳٤ و ٤۰ درصد اثر مهاری بر فعالیت آلفا گلوکوزیداز نشان داده و عصاره‌های متانولی و دی کلرومتانی درخت تنفسی در مقایسه با سایر اجزای بدنی، بیشترین فعالیت بازدارندگی آنزیمی داشته است (۱). در بررسی ترکیبات فعال زیستی گلیکوزیدهای تری‌ترپنوئید جدا شده از خیار دریایی *Holothuria thomasi* به‌طور قابل توجهی سطوح گلوکز و فعالیت آلفا آمیلاز را در رت‌های دیابتی کاهش داد (۱٥). در بررسی دو گونه خارپوست اثر مهاری قابل توجهی را روی آلفا آمیلاز داشته و فعالیت ضددیابتی جالبی نشان داده به‌طوری که در گونه‌های *Astropecten irregularis* و *Luidia sarsi* اثر مهاری IC_{50} به‌ترتیب ۱٤۷/۰۸ و ۱٥۰/٥۲ میکروگرم/میلی‌لیتر بوده که نشان دهنده اثربخشی بالای آنها بوده است (۳۱). بررسی اثر نانوذرات نقره بر مهار آنزیم آلفا آمیلاز در *Holothuria parva* نشان داده با افزایش غلظت نانوذرات نقره، فعالیت آنزیم به طور موازی مهار شده به طوری که نانوذرات نقره با IC_{50} برابر ۰/۸٦ میلی-گرم/میلی‌لیتر بالاترین مهار آنزیمی را نشان دادند و نانوذرات نقره در صورت تجویز می‌تواند به عنوان یک داروی مکمل جدید، فعالیت مهاری آلفا آمیلاز را نشان دهد و توانایی کاهش جذب گلوکز روده‌ای را در افراد دیابتی داشته باشد (۱۳). عصاره‌های آبی خیار دریایی گونه‌های مختلف *Holothuria scabra*، *Holothuria leucospilota* و *Stichopus chloronotus* توانایی مهار رادیکال‌های آزاد بیشتری را در عصاره آبی نسبت به عصاره ارگانیک نشان داده است (٤). ترکیبات مهارکننده آنزیم آلفا آمیلاز به سه دسته کلی ترکیب‌های پروتئینی، شبه قندی و پلی‌فنلی تقسیم می‌شوند (۸). از این رو موجوداتی که دارای ترکیبات پلی‌فنلی از جمله فلاونوئیدی باشند، در مدل حیوانی دیابتی به عنوان داروی کاهش دهنده قند و لیپید خون شناخته شده‌اند (۳٦). وجود آلکالوئیدها، پروتئین‌ها، تانن‌ها، گلیکوزیدهای قلبی، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و استروئیدها را به عنوان ترکیبات بازدارنده احتمالی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز اعلام شده است (٤٦). بنابراین اثر مهارکنندگی عصاره خیار دریایی *H. parva* احتمالا به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه در عصاره است. محققان با ارزیابی عصاره‌های آبی و الکلی دو گونه خیار دریایی *Stichopus horrens* و *Holothuria eduli* تاثیر بالاتر عصاره‌های قطبی آب دوست را نسبت به عصاره‌های آلی نشان دادند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت (۳). مطالعات متعددی در زمینه خاصیت مهار آنزیم آلفا آمیلاز توسط سایر منابع دریایی تاکنون گزارش شده است (۳٦) که به عنوان مثال اثر بازدارندگی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در اسیدین *Phallusia nigra* نشان داد که

در بین تمام عصاره‌ها بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به آکاربوز در غلظت ۰/۰۰۰۱ میکروگرم/میلی-لیتر برابر ۶۹/۶۵ درصد و کمترین مقدار آن مربوط به عصاره آب- متانول در غلظت ۵۰۰ میکروگرم/میلی-لیتر برابر ۱۵/۳۹ درصد بوده و ترتیب بیشترین فعالیت مهارکنندگی به‌صورت آکاربوز> اتیل استات> متانول > آب- متانول مشاهده شد و هم چنین نتایج نشان داد که بین میزان مهارکنندگی آنزیم و غلظت عصاره‌ها رابطه مستقیم وجود داشته و عصاره اتیل‌استاتی بیشترین اثر مهاری آنزیم آلفا آمیلاز IC_{50} برابر ۱۳۲۷/۲۴۴ میکروگرم/میلی‌لیتر را داشت (۵۷). در بررسی ضایعات کیتینی دریایی برای تولید مهارکننده‌های آلفا آمیلاز از طریق تخمیر میکروبی بر هفت سویه باکتریایی اثر آنتی‌آمیلازی نشان داده که محدوده مهاری بین ۸۹-۴۷ درصد بوده و سویه‌های *Bacillus cereus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *B. atrophaeus* بیشترین مقدار مهارکنندگی حدود ۹۰ درصد نشان دادند (۳۷) که در مقایسه با نتایج این مطالعه که بیشترین اثر مهاری بالای ۹۳ درصد دیده شد، همخوانی داشته است. در بررسی مولکول‌های فنلی که برای مهار آنزیم آلفا آمیلاز مورد بررسی قرار گرفته است، نمایه مهاری مقادیر IC_{50} را در محدوده ۶۲۶/۱۷۵- ۵۸/۰۱ نانومولار بدست آمده و مطرح شد که این مولکول‌ها می‌توانند مهارکننده‌های انتخابی آنزیم‌های آلفا گلیکوزیداز و آلفا آمیلاز به عنوان عوامل ضددیابتی باشند (۱۸). اختلافات بین نتایج به‌دست آمده را می‌توان علاوه بر نوع نمونه جهت عصاره‌گیری، نوع حلال، ترکیبات فعال زیستی و سایر شرایط زیستی گونه نیز مرتبط دانست (۵۰). رژیم‌های غذایی که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند، زمینه بروز بیماری‌های مرتبط با اکسیدان مانند دیابت را کاهش می‌دهند (۲۲). عصاره‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی که رادیکال‌های آزاد مانند سوپراکسید و هیدروکسیل را مهار می‌کنند، می‌توانند در مهار آلفا آمیلاز مؤثر باشند (۴۰،۲۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا در خیار دریایی تحت تأثیر ترکیبات زیست فعالی است که در موجود یافت می‌شود که می‌توان به لکتین‌ها (۳۵)، استرول‌ها، تری‌ترپن گلیکوزیدها (۵۵)، کندرویتین، کندرویتین سولفات E (۲۳)، استروئیدها (۳۲) ویتامین‌های B_1، B_2، B_6، A، C، D و E، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب میریستیک، پالمیتیک، استئاریک، دوکوزاهگزئانوئیک اسید (DHA)، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA)، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و پلی‌فنل‌ها اشاره نمود (۴۱). علاوه بر خارپوستان از سایر موجودات دریایی نیز اثر مهاری آمیلازی گزارش شده به عنوان مثال اثر مهاری آلفا آمیلاز را در مایع ارغوانی آزاد شده از خرگوش دریایی *Dolabella auricularia* گزارش شده است (۲). فعالیت مهاری آلفا آمیلازی در عصاره استونی دو گاسترپود دریایی، *Hemifusus pugilinus* و *Natica didyma* را معادل ۷۲ درصد گزارش شده است (۴۲). اثر ضدهیپرگلیسمی عصاره خام دوکفه‌ای *Scapharca inaequivalvisin* در موش صحرایی نشان داده شده است (۵۹). بالاترین درصد مهار آلفا آمیلاز توسط عصاره متانولی خام *Champia parvula* (۰/۰۲ ± ۹۸/۵۰ میکروگرم/گرم) در غلظت ۹۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بوده و به‌طور مشابه، بالاترین درصد مهار آلفا گلوکوزیداز توسط عصاره متانولی خام *Champia parvula* (۰/۰۲ ± ۹۱/۴۸ میکروگرم/گرم) در ۹۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بود، با این وجود مقدار IC_{50} آلفا آمیلاز دو برابر بیشتر از آلفا گلوکوزیداز نشان می‌دهد (۶۱).

نتیجه‌گیری

بنابراین از منظر اهمیت و ضرورت تحقیق با توجه به اثرات جانبی و مصرف طولانی مدت داروهای

شیمیایی بر بیماران دیابتی این مطالعه می‌تواند به شناسایی ترکیبات اثربخش، در دسترس و با عوارض جانبی کمتر برای مهار آلفا آمیلاز با منشا دریایی کرده و می‌تواند قدمی موثر در مسیر افزایش دانش و شناخت این مسیر باشد. در سال‌های اخیر، تحقیقات در زمینه استفاده از محصولات دریایی به عنوان عوامل دارویی به‌طور پیوسته در حال افزایش است. در مورد عملکردهای درمانی بیماری دیابت، اثر بازدارنده بالقوه آلفا آمیلاز با منشا از موجودات دریایی یکی از مهمترین پارامترها در این زمینه محسوب میشود. گزارشات محدودی درباره مهار آلفا آمیلاز توسط ترکیبات استخراجی از خیار دریایی *H. parva* وجود داشته و این بررسی به عنوان نخستین مطالعه بر خیار دریایی غالب در منطقه خلیج‌فارس مطرح می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق فعالیت مهارکنندگی آلفا آمیلاز توسط عصاره‌های مختلف اتیل‌استات، متانول و آب- متانول پوسته و امعاء و احشاء خیار دریایی گونه *H. parva* را نشان داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدینوسیله از واحد آزمایشگاهی بیوشیمی معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی جهرم که زمینه انجام کار تحقیقاتی را فراهم آوردند، کمال تشکر دارند.

منابع

1. Abbasi H., Moein S., Ehsanpoor M. 2019. α-Glucosidase Inhibition and Antioxidant Activities of Respiratory Tree, Gonad, and Body Wall Extracts of Two Species of Sea Cucumbers (*Holothuria leucospilota*, *Stichopus hermanni*) from Persian Gulf: Bioactivities of respiratory tree extracts of two species of sea cucumbers. *Trends in Peptide and Protein Sciences*, 4:1-6 (e9).

2. Abirami P., Arumugam M., Ajithkumar T.T., Balasubramanian T. 2011. Isolation and characterization of 37 kDa heparinase from the purple fluid of *Dolabella auricularia*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 40(1):112-116.

3. Althunibat O., Ridzwan B., Taher M., Daud J., Jauhari Arief Ichwan S., Qaralleh H. 2013. Antioxidant and cytotoxic properties of two sea cucumbers, *Holothuria edulis* Lesson and *Stichopus horrens* Selenka. *Acta Biologica Hungarica*, 64(1):10-20.

4. Althunibat O.Y., Hashim R.B., Taher M., Daud J.M., Ikeda M.A., Zali B.I. 2009. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *European Journal of Scientific Research*, 37 (3):376-387.

5. Bruckner A.W., Johnson K.A., Field J.D. 2003. Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 18(1):24-33.

6. Burski K., Ueland T. Maciejewski R. 2004. Serum amylase activity disorders in the course of experimental diabetes in rabbits. *Veterinarni Medicina*, 49(6):197.

7. Cao R.A., Surayot U. You S. 2017. Structural characterization of immunostimulating protein-sulfated fucan complex extracted from the body wall of a sea cucumber, *Stichopus japonicus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99:539-548.

8. Ceriello A., Davidson J., Hanefeld M., Leiter L., Monnier L., Owens D., Tajima N. Tuomilehto J. 2006. Postprandial hyperglycaemia and cardiovascular complications of diabetes: an update. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(7):453-456.

9. Coman C., Rugina O.D., Socaciu C. 2012. Plants and natural compounds with antidiabetic action. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1):314-325.

10. Dabbagh A.R., Keshavarz M. 2011. three sea cucumbers from the Bandar-e Bosthaneh coast (Persian Gulf IRAN). *World Applied Sciences Journal*, 13(8):1933-1937.

11. Debbab A., Aly A.H., Lin W.H., Proksch P. 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microbial Biotechnology*, 3(5):544-563.

12. Duan J., Ishida M., Aida K., Tsuduki T., Zhang J., Manabe Y., Hirata T. Sugawara T. 2016. Dietary cerebroside from sea cucumber (*Stichopus japonicus*): absorption and effects on skin barrier and cecal short-chain fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(37):7014-7021.

13. Edrispour Z., Homaei A. 2022. Exploring in vitro effect of silver nanoparticles and *Holothuria parva* extracts on kinetics and stability of α-amylase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(2): 885-894.

14. Eisapour M., Salari Aliabadi M.A., Salamat N., Nafisi Bahabadi M., Salati A.P. 2022. Identification and taxonomy of sea cucumbers (Holothuria) in Persian Gulf. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 21(1):63-81.

15. El Barky A.R., Ali E.M.M., Mohamed T.M. 2017. Marine sea cucumber saponins and diabetes. *Austin Pancreat Disorders*, 1(1):1-7.

16. Fatemi S.M.R., Ghavam Mostafavi P., Hamiz Z. 2011. Identifcation of sea cucumbers of genus *Holothuridae* from intertidal zone of Gheshm, Persian Gulf, Iran. *Iran Journal Oceanography*, 7(2):57-65. (In Persian).

17. Goldenberg R., Punthakee Z. 2013. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*, 37:8-11.

18. Gulçin İ., Taslimi P., Aygün A., Sadeghian N., Bastem E., Kufrevioglu O.I., Turkan F., Şen F. 2018. Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α-glycosidase, α-amylase and human glutathione S-transferase enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119:741-746.

19. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11):1599-1616.

20. Harnedy P.A., FitzGerald R.J. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1):6-24.

21. Jimeno J., Faircloth G., Sousa-Faro J.F., Scheuer P., Rinehart K. 2004. New marine derived anticancer therapeutics- a journey from the sea to clinical trials. *Marine Drugs*, 2(1):14-29.

22. Jo S.H., Ka E.H., Lee H.S. 2009. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α-glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 2:52-60.

23. Kariya Y., Watabe S., Hashimoto K., Yoshida K. 1990. Occurrence of chondroitin sulfate E in glycosaminoglycan isolated from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(9):5081-5085.

24. Kaur N., Kumar V., Nayak S.K., Wadhwa P., Kaur P., Sahu S.K. 2021. Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review. *Chemical Biology & Drug Design*, 98(4):539-560.

25. Kermasha S. 2011. Antioxidants in digestive tracts and gonads of green urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2):179-183.

26. Krish S., Das A. 2014. In-vitro bioactivity of marine seaweed, *Cladophora rupestris*. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5:898-908.

27. Kumar S., Khare S.K. 2015. Chloride activated halophilic α-amylase from *Marinobacter* sp. EMB8: Production optimization and nanoimmobilization for efficient starch hydrolysis. *Enzyme Research*, 2015:1-9.

28. Li W., Dai R.J., Yu Y.H., Li L., Wu C.M., Luan W.W., Meng W.W., Zhang X.S., Deng Y.L. 2007. Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT-4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(6):1123-1129.

29. Mac Tavish T., Stenton-Dozey J., Vopel K., Savage C. 2012. Deposit-feeding Sea cucumbers enhance mineralization and nutrient cycling in organically-enriched coastal sediments. *PloS one*, 7(11): e50031.

30. Mamlona J., Pelletier É., Girard-Lalancette K., Legault J., Karboune S.

40. Ojewole J.A. 2002. Hypoglycaemic effect of *Clausena anisata* (Willd) Hook methanolic root extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2):231-237.

41. Padauleng N., Nurhidayati N. 2016. *Holothuria scabra* memperbaiki fibrosis hepar pada tikus yang diinduksi karbon tetraklorida. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 29: 139-142.

42. Pandey S., Sree A., Dash S.S., Sethi D.P., Chowdhury L. 2013. Diversity of marine bacteria producing beta-glucosidase inhibitors. *Microbial Cell Factories*, 12:1-7.

43. Paulay G. 2014. Holothuroidea. World Register of Marine Species. Retrieved on, 2

44. Pawson D.L. 2007. Phylum echinodermata. *Zootaxa*, 1668: 749-764.

45. Peyrot des Gachons C., Breslin P.A. 2016. Salivary amylase: digestion and metabolic syndrome. *Current Diabetes Reports*, 16:1-7.

46. Ponnusamy S., Ravindran R., Zinjarde S., Bhargava S., Ravi Kumar, A. 2010. Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect *in Vitro*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011:1-10.

47. Prabhu A.S., Ananthan G. 2014. Alpha-amylase inhibitory activities of ascidians in the reatment of diabetes mellitus. *Bangladesh Pharmacological Society*, 9(4):498-500.

48. Rasyid A., Yasman Y., Putra M.Y. 2021. Current prospects of nutraceutical and pharmaceutical use of sea cucumbers. *Pharmacia*, 68(3):561-572.

49. Ravi C., Karthiga A. Venkatesan V. 2012. Isolation and biomedical screening of the tissue extracts of two marine gastropods *Hemifusus pugilinus* (Born, 1778) and *Natica didyma* (Roding, 1798). *Asian Fisheries Science*, 25:158-169.

50. Rodeiro I., Olguín S., Santes R., Herrera J.A., Pérez C.L., Mangas R., Hernández Y., Fernández G., Hernández I., Hernández-Ojeda S., Camacho-Carranza R., Valencia-Olvera A., Espinosa-Aguirre J.J. 2015. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of *Ulva fasciata* (green seaweed) extract and evaluation of its cytoprotective and Kermasha S. 2011. Antioxidants in digestive tracts and gonads of green urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2):179-183.

31. Marmouzi I., Tamsouri N., El Hamdani M., Attar A., Kharbach M., Alami R., EI Jemli M., Cherrah Y., Ebada S.S., Faouzi M.E.A. 2018. Pharmacological and chemical properties of some marine echinoderms. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28:575-581.

32. Meydi, Suwandi R., Suptijah P. 2016. Isolation of Compounds of Steroids Teripang Gamat (*Stichopus variegatus*) with Various Types of Solvents. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 19(3):362-369.

33. Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428.

34. Mohebbi G.H., Nabipour I., Vazirizadeh A. 2014. The Sea, the future pharmacy. *Iranian South Medical Journal*, 17(4):748-788. (In Persian)

35. Mojica E.R.E., Merca F. E. 2005. Biological properties of lectin from sea cucumber (*Holothuria scabra* Jäger). *Journal of Biological Sciences*, 5(4):472-477.

36. Nagy M.A., Ewais M.M. 2014. Antidiabetic and antioxidative potential of *Cystoseira myrica*. *Amrican Journal Biochemistery*, 4:59-67.

37. Nguyen T.H., Wang S.L., Nguyen A.D., Doan M.D., Tran T. N., Doan C.T., Nguyen V.B. 2022. Novel α-amylase inhibitor hemi-pyocyanin produced by microbial conversion of chitinous discards. *Marine Drugs*, 20(5): 283.

38. Nwosu F., Morris J., Lund V.A., Stewart D., Ross H.A. McDougall G.J. 2011. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*, 126(3):1006-1012.

39. Ogunyemi O.M., Gyebi G.A., Ibrahim I.M., Esan A.M., Olaiya C.O., Soliman M.M., Batiha G.E.S. 2022. Identification of promising multi-targeting inhibitors of obesity from *Vernonia amygdalina* through computational analysis. *Molecular Diversity*, 27(1):1-25.

antihyperglycemic activity in few marine flora and fauna. *Indian Journal of Science and Technology*, 1:1-5.

60. Uthicke S., Schaffelke B., Byrne M. 2009. A boom-bust phylum? Ecological and evolutionary consequences of density variations in echinoderms. *Ecological Monographs*, 79(1):3-24.

61. Vinoth Kumar R., Murugesan S., Shettu N. 2017. Anti-diabetic potential of marine red alga *Champia parvula* (*C. agardh*) by inhibiting key metabolic enzymes. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(10):1466-1474.

62. Wei C.Y., Liao N.B., Zhang Y., Ye X.Q., Li S., Hu Y.Q., Liu D.H., Linhardt R.J., Wang X., Chen S.G. 2017. In vitro fermentation behaviors of fucosylated chondroitin sulfate from *Pearsonothuria graeffei* by human gut microflora. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102:1195-1201.

63. Yamazaki H., Sumilat D.A., Kanno S., Ukai K., Rotinsulu H., Wewengkang D.S., Ishikawa M., Mangindaan R.E., Namikoshi M. 2013. A polybromodiphenyl ether from an Indonesian marine sponge *Lamellodysidea herbacea* and its chemical derivatives inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, an important target for diabetes treatment. *Journal of Natural Medicines*, 67:730-735.

64. Zarei M.A., Poursharifi M. 2015. Searching for alpha-glucosidase inhibitory activity in hexane extracts by some plants from Kurdistan province. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 3(3):291-296.

65. Zhu C.F., Li G.Z., Peng H.B., Zhang F., Chen Y., Li Y. 2010. Effect of marine collagen peptides on markers of metabolic nuclear receptors in type 2 diabetic patients with/without hypertension. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23(2):113-120.

66. Zinjarde S.S., Bhargava S.Y., Kumar A. R. 2011. Potent α-amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:1-10.

antigenotoxic effects. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015:1-11.

51. Samrot A., Vijay A. 2008. α-Amylase activity of wild and mutant strains of *Bacillus* sp. *The Internet Journal of Microbiology*, 6(2):1-4.

52. Sigwart J.D., Blasiak R., Jaspars M., Jouffray J.B., Tasdemir D. 2021. *Natural Product Reports*, 38:1235-1242.

53. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Chingizova E.A., Minin K.V., Stonik, V.A. 2016. Structures and biogenesis of fallaxosides D4, D5, D6 and D7, trisulfated non-holostane triterpene glycosides from the sea cucumber *Cucumaria fallax*. *Molecules*, 21:939.

54. Soleimani S., Moein S., Yousefzadi M., Amrollahi Bioki N. 2017. Determination of in vitro antioxidant properties, anti-inflammatory effects and A-amylase inhibition of purple sea urchin extract of *Echinometra mathaei* from the Persian Gulf. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12:e36547.

55. Stonik V.A. 1986. Some terpenoid and steroid derivatives from echinoderms and sponges. *Pure and Applied Chemistry*, 58:423-436.

56. Sun Z., Chen F. 2012. Evaluation of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* for management of diabetes. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(1):246-249.

57. Tajik A., Keshavarz M., Homaei A. 2022. Inhibitory effect of *Phallusia nigra* (Savigny, 1816) extract on activity of Alpha –Amylase. *Journal of Animal Biology*, 14:1-15 (In Persian)

58. Taouis M., Dagou C., Ster C., Durand G., Pinault M., Delarue J. 2002. N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *American Journalof Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 282:664-671.

59. Tiwari P., Rahuja N., Kumar R., Lakshmi V., Srivastava M.N., Agarwal S.C., Raghubir R., Srivastava A.K. 2008. Search for

Inhibitory Effect of Sea Cucamber, *Holothuria parva* Extract on Activity of Alpha -Amylase

Najibeh Ghenaat Pisheh[1], Mousa Keshavarz[1*], Hamed Mir[2]

1- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
2- Jahrom University of Medical Sciences and Health Services, Jahrom, Iran

Abstract

Alpha-amylase enzyme inhibitors prevent the conversion of polysaccharides into monosaccharides. Inhibiting this enzyme from the absorption of simple sugars in the digestive system and thus preventing the increase in blood glucose levels has been effective. The purpose of this study is to investigate the effect of ethyl acetate, methanol and water-methanol extracts of *Holothuria parva* on alpha-amylase enzyme inhibition. In this research, first extraction was done from the body wall, intestines and viscera of *Holothuria parva* based on increasing polarity, and in the next step, alpha-amylase enzyme activity was determined in the presence of different extracts under enzyme activity measurement conditions by DNSA colorimetric method, and IC_{50} were obtained and compared with the amount of acarbose as a positive control. In this study, the results showed that the percentage of inhibition increased with the increase in the concentration of the extracts and among all the extracts, the highest inhibitory percentage related to acarbose at a concentration of 0.8 mg/ml equals 96.92% and the lowest amount related to the water-methanol extract of the body wall at a concentration of 0.2 mg/ml equals 61.79% and the inhibition percentage of acarbose in both body parts is higher than other extracts (IC_{50}=88.18-91.74 mg/ml). Considering the inhibitory effect of extracts extracted from *Holothuria parva* species on alpha-amylase enzyme, in the future, it can be used in the field of producing antidiabetic drugs of marine origin with minimal adverse side effects.

Keywords: Sea Cucamber, Diabetes, Persian Gulf, Acarbose, Echinodermat.