

Članak

Netoksična gljiva *Auricularia auricular* sadrži polisaharid sa antikoagulantnim svojstvima posredovanim antitrombinom

Seon-Joo Yoon^{a,b,c}, Myeong-Ae Yu^b, Yu-Ryang Pyun^b, Jae-Kwan Hwang^b, Djong-Chi Chu^c,
Lekh Raj Juneja^c, Paulo A.S. Mourao^{a1*}

^aLaboratorio de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitario Clementino Fraga Filho, and Departamento de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68041, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

^bOdsjek za biotehnologiju i istraživački centar za bioprodukte, Univerzitet Yonsei, Seoul 120-749, Južna Koreja

^cCentralne istraživačke laboratorije, Taiyo Kagaku Co., Ltd., Yokkaichi, Mie 510, Japan

Zaprimljeno 5. augusta 2003.godine; revidirana verzija primljena 10. oktobra 2003.godine; prihvaćeno 14. oktobra 2003.godine

Abstrakt

Acidični polisaharid sa antikoagulantnim aktivnostima je izoliran iz jestive gljive *Auricularia auricular* koristeći vodu, lužine ili ekstrakte kiseline. Ekstrakti kiseline su pokazali najveću antikoagulantnu aktivnost i stoga su dalje pročišćeni koristeći kromatografiju filtriranja gelom. Posebna antikoagulantna aktivnost pročišćenih polisaharida je bila 2IU/mg, a prosječna masa je bila ~ 160 kDa. Polisaharid dobiven iz ove vrste gljiva sadrži većinom manozu, glukozu, glukuronsku kiselinu i ksilozu, ali ne sulfatne estere. Antikoagulantna aktivnost se javila zbog katalize inhibicije trombina antitrombinom, ali ne heparinom kofaktora II. Inhibicija Faktora Xa antitrombinom nije bila katalizirana polisaharidom. Ostaci glukuronske kiseline su bili osnov za antikoagulantna dejstva polisaharida gljive budući da je aktivnost nestala nakon redukcije karboksilnih grupa. U *ex-vivo* testiranju, miševi su hranjeni polisaharidom i primijetili smo inhibijski učinak na agregaciju trombocita kakvo dejstvo ima i aspirin, poznato sredstvo protiv koagulacije. Polisaharidi iz ovih gljiva mogu činiti novi izvor mješavina za borbu protiv koagulacije, agregacije trombocita, i možda čak i tromboze. © 2003 Elsevier Ltd. Sva prava zadržana.

Ključne riječi: antikoagulant; antiagregacija; Antitrombin; polisaharid gljiva

1. Uvod

Koagulacija krvi i agregacija trombocita su glavni događaji patogeneze ishemičkih bolesti. Proces koagulacije rezultira formacijom trombina [1]. Trombociti se lako aktiviraju i skupljaju u reakciji na razne endogene substance, a aktivirani trombociti sudjeluju u propagiranju tromboembolizacije koja dovodi do ishemičkih bolesti. [2]. Nekoliko antitrombotičkih sredstava se koristilo za prevenciju i liječenje tromboemboličkih bolesti. Heparin je bio najčešće korišten antitrombotični lijek [3,4]. Međutim, primjećeno je da heparin može imati neželjene efekte kao što su komplikacije s krvarenjem [5]. Karbohidrati sa antitrombotičnim sredstvima su se istraživali kao moguće zamjene

heparina i među njima su dermatan sulfat [6], sulfatni fukani morskog porijekla [7], i semisintetički sulfatni polisaharid [8].

Sulfatni polisaharidi iz morskih algi imaju razna biološka svojstva, što uključuje i antikoagulantna i antitrombotična svojstva [9-11]. Nedavno smo izjavili da prirodni nesulfatni polisaharidi iz viših biljaka također imaju antikoagulantna svojstva [12]. Sve ove obzervacije su promovisale potragu za alternativnim antikoagulantnim polisaharidima iz raznih prirodnih izvora.

Nekoliko netoksičnih gljiva sadrže biološki aktivne substance. Na primjer, polisaharidi iz gljiva imaju razna biološka svojstva, uključujući to da se mogu boriti protiv raka [13], i također imaju antigenotoksična svojstva [14]. U skorije vrijeme, testirali smo nekoliko jestivih gljiva za nove inhibitore koagulacije krvi. Vrsta *Auricularia auricular* je pokazala jaku antikoagulantnu aktivnost u plazmi. Ta gljiva se često koristi kao medicinski i dodatak hrani u Koreji i Kini. Ekstrakti metanola iz *A. Auricularia* su inhibirali peroksidaciju lipida i smanjili oštećenje jetre kod miševa tretiranih sa benzo[a]pi-renom [15].

* Adresa za korespondenciju : Departamento de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68041, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil. Tel./fax: +55-21-2562-2090.

Ekstrakti metanola iz drugih jestivih gljiva kao što su *Auricularia mesenterica* i *Gyrophora esculenta* su pokazali antitrombotična svojstva [16]. Međutim, prije našeg izvještaja, antikoagulantna aktivnost nije zabilježena kod gljiva. Neki izvještaji korejskih tradicionalnih priča su indicirali da su se ti organizmi koristili za liječenje i prevenciju tromboze [17].

Kako bi se to razjasnilo i kako bi se pružila znanstvena podloga za ova uvriježena vjerovanja, ekstrahovali smo i očistili polisaharid iz *A. Auriculariae*. Na naše iznenađenje, dobili smo nesulfatni antikoagulantni polisaharid koji je katalizirao inhibiciju trombina antitrombinom, ali ne heparinskim kofaktorom II.

2. Materijali i metode

2.1. Ekstrakcija i frakcije antikoagulantnih polisaharida iz jestivih gljiva

A. auricula je kupljena na lokalnoj tržnici u Seulu, Koreja. Isprva je osušena u pećnici na 70°C i izmrvljena koristeći mikser za hranu (model DS2200, Daesung Electronics, Seoul, Koreja). Sasušeni prah (10 g) se otopio u 1 litri absolutnog metanola i prelijevao 2 sata na 76°C. Taj proces se ponovio dva puta i nakon toga se rastvor filtrirao na papiru Whatman No.2 kako bi se uklonili materijali rastvorljivi u metanolu kao što su obojeni materijali i fenolične mješavine. Ostatak se pokupio, potopio u 1 l destilovane vode, 0.1 N HCl, ili 0.1 N NaOH rastvora, prelijevao 2 sata na 97°C i čisti supernatant se skupio nakon centrifuge na 6500 rpm u trajanju od 15 minuta na 4 °C. Ta procedura ekstrakcije se ponovila tri puta i dobiveni supernatanti su ujedinjeni. Ekstrakti kiselina i lužina su neutralizirani sa 1 M NaOH, odnosno 1 M HCl i supernatanti su koncentrisani u kružnom evaporatoru pod smanjenim pririskom. Nakon što su se odstranili materijali koji se ne mogu raztvoriti u vodi filtracijom na papiru Whatman No.2, grubi polisaharidi su taloženi na koncentrirani supernatant uz četiri zapremine absolutnog etanola i održavani na 4°C 24 sata. Rezultirajući talog je filtriran na papiru Whatman No.2, opran sa 80% etanolom, osušen na sobnoj temperaturi, rastvoren u destilovanoj vodi, i dializiran na tekućoj vodi 48 sati. Nedializirani dio se centrifugirao kao što je iznad opisano kako bi se otklonili nerastvorivi materijali i supernatant je liofiziran. Takva priprema je denominirala grube polisaharide iz jestivih gljiva.

2.2. Filtracija gelom polisaharida iz *A. Auriculariae* na Sephacryl S-400

Frakcija grubih polisaharida iz *A. Auricula* (35 mg), dobivena procedurom gore opisanom, je rastvorena u 3.5 ml destilovane vode i primjenjena na Sephacryl S-400 HR koloni (1.5 C 170 cm) ekvilibriranoj sa 0.2 M amonij bikarbonata (pH 7.0). Kolona je isprana istim buferom uz mlaz od 28 ml/h i alikvoti od 4 ml su skupljeni. Te frakcije su analizirane za heksoze i heksouronsku kiselinu kao što će biti opisano u narednoj sekciji. Trakcije su podijeljene u četiri grupe i liofizirane. Kolona je kalibrirana korištenjem plavog dekstrana (prosječna Mr= 2000 kDa, za Vo),

kresol crvena (Mr=108 daltona, za Vt) i dekstran sulfatima za različite molekulske mase.

2.3. Hemijske analize

Sastojci heksoze i heksouronske kiseline su se odredili uz pomoć Duboisetal [18], odnosno karbazol reakcija [19]. Heksoza i heksouronska kiselina su analizirane korištenjem galaktoze, odnosno, glukurinske kiseline, po standardima. Nakon kiselinske hidrolize polisaharida (5.0 M trifluorkiselinska kiselina 5 sati na 100°C), procenat različitih heksoza u kiselinskim hidrolisatima su procijenjeni kromatografijom gasa odgovarajućih acetiliranih, borohidrat-smanjenih alditol acetata [20] i sulfati su se mjerili BaCl₂/želatinskom metodom [21] i HPLC sistemom, DIONEX modelom Bio-Lc, sa kolonom anijonske izmjene (AS12A, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) kao što je opisano [22]. Provodnost HPLC sistema se mjerila korištenjem uređaja baziranog na membrani koji supresuje elektrolite (ASRS; Dionex) kao što je opisano [23]. Infracrveni spektri aktivnih frakcija su zabilježeni Perkin-Elmer infracrvenim spektrometrom (model 298).

2.4. Analiza antikoagulantnih svojstava

Aktivirano djelomično vrijeme tromboplastina (APTT), pro-trombin vrijeme (PT) i trombin vrijeme (TT) analize zgrušavanja su izvršene koristeći normalnu ljudsku plazmu kao što je opisao Anderson et al. [24]. Vrijeme zgrušavanja je zabilježeno koagulometrom (model KC4A, Amelung, Njemačka). Tri različite analize su mjerile APTT, PT i TT i izvršene su da bi se analiziralo na kojem su stupnju zgrušavanje krvi inhibira. Antikoagulantna aktivnost je izražena kao vrijeme zgrušava ili IU/mg korištenjem paralelne standardne krivulje bazirane na 4. Međunarodnom standardu za Heparin (193 IU/mg).

2.5. Životinje

Sprague-Dawley (SD) mužjaci miševa, težine 200-250 grama su korišteni za ovu studiju. O miševima se brinulo koristeći smjernice Državnog instituta za zdravlje [25]; tj. pohranjeni su i zbrinuti na 24± 1 °C uz stalnu vlažnost od 55%. Miševi su imali slobodan pristup hrani i vodi do početka eksperimenta. Nakon posta od 24 sata, miševi su korišteni za *ex-vivo* eksperimente. Miševi su mogli piti vodu tokom posta.

2.6. Davanje inhibitora agregacije trombocita miševima

Sprague-Dawley (SD) mužjaci miševa su podijeljeni u tri grupe od 10 miševa, za kontrolu, liječenje polisaharidom i aspirinom. Prije davanje testnih lijekova miševima, pod anestezijom je uzet uzorak od 4.5 ml krvi iz srca miševa korištenjem šprica mjerila 26 koje su sadržavale 3.8% sodij citrata. Alikvot cjelokupne krvi (450 µl) se koristio za analizu agregacije trombocita cjelokupne krvi, kao što će biti opisano u sljedećoj sekciji. Nakon posta od 24 sata, miševi u svakoj grupi su nasilno hranjeni korištenjem Zonde punjene sa 50% DMSO za kontrolu, grubim polisaharida iz gljiva ili aspirina u 50% DMSO uz doziranje od 300 i 100 mg/kg tjelesne, odnosno, težina/dan, četiri uzastopne sedmice prije nego što se krv

uzela na analizu. Jedan sat prije zadnjeg hranjenja, uzorci krvi su uzeti iz srca miševa pod anestezijom, kao što je prethodno opisano, i utvrdilo se vrijeme zgrušavanja cijelokupne krvi i agregacija trombocita.

2.7. Analiza agregacije trombocita cijelokupne krvi

Uzorci krvi uzeti prije liječenja i poslije zadnjeg hranjenja su korišteni da se otkrije vrijeme zgrušavanja cijelokupne krvi. Uzorci krvi miševa (450 μ l) su prebačeni u silikonske plastične kivete koje su sadržavale 450 μ l 0.15 M NaCl i magnetni mješač. Kivete su stavljenje u reakcijsku odaju agregometra (Chrono-Log, Havertown, PA) i miješane na 1200 opm na 37°C najmanje 10 minuta, 5 μ l 1 mg/ml rastvora kolagena je dodano kako bi se izazvala agregacija trombocita. Krivulje agregacije su se dobile za vrijeme od 12 minuta nakon dodavanja kolagena. Opseg impedancije (Ω) je generiran kao rezultat agregacije trombocita i računao se iz maksimalne visine. Opseg impedancije (Ω) se automatski posmatrao ličnim računalom. Antitrombocitna aktivnost se računala sljedećom jednačinom:

Antitrombocitna aktivnost cijelokupne krvi (%)

$$= \frac{\Omega \text{ prije administracije} - \Omega \text{ nakon administracije}}{\Omega \text{ prije administracije}} \times 100$$

2.8. Analiza vremena zgrušavanja cijelokupne krvi

Uzorci krvi dobiveni nakon zadnjeg hranjenja su korišteni da se odredi vrijeme zgrušavanja cijelokupne krvi. Alikvoti od 250 μ l uzoraka krvi su se prebacili u začepljenu tubu, prethodno ugrijanu na 37°C. Dok su se tube rotirale, jednaka zapremina 0.15 M CaCl₂ se dodala kako bi se potaklo zgrušavanje ćelija i vrijeme je postavljeno kao nulto vrijeme. Sve vrijeme zgrušavanja krvi se nadziralo i bilježilo.

2.9. Inhibicija trombina ili faktora Xa antitrombinom i heparinskim kofaktorom II u prisustvo antikoagulantnih polisaharida

Ti eksperimenti su zasnovani na analizama amidolične aktivnosti trombina ili faktora Xa korištenjem kromogeničkih substrata, kao što je opisano [26]. Konačne koncentracije reaktanata su uključile 68 nM heparinskog kofaktora II ili 50 nM antitrombina, 15 nM trombina ili faktora Xa (svi iz Diagnostica Stago, Asmeres, Francuska), i 0-50 μ g/ml ekstrakta antikoagulanta u 0.02 Tris/HCl, 0.15 M NaCl i 1.0 mg/ml polietilen glikola (pH 7.4) (TS/PEG bufer). Trombin ili faktor Xa se dodao zadnji kako bi prouzrokovao reakciju. Nakon 60 s inkubacije na sobnoj temperaturi, 500 μ l 100 μ M kromogenskog substrata S-2238 za tmbin ili S-2765 za faktor Xa (Chromogenix, Molndal, Švedska) u TS/PEG buferu su dodane, i uvećanje od 405 nm se bilježilo 100 s. Prosjek promjene upijanja je bio proporcionalan trombinu ili aktivnosti faktora Xa preostalog u inkubaciji. Nikakva inhibicija se nije desila u kontrolnim eksperimentima u kojima su trombin ili faktor Xa inkubirani sa antitrombinom ili heparinskim kofaktorom

II u nedostatku polisaharida. Inhibicija se nije desila ni kada su trombin ili faktor Xa inkubirani sa samo polisaharidom kroz razne koncentracije koje su testirane.

3. Rezultati

3.1. In vitro antikoagulantna aktivnost

Nekoliko ekstrakta *A. Auricula* su pripremljeni sa destilovanom vodom, rastvorima kiselina ili lužina, te je njihova inhibicijorna aktivnost protiv zgrušavanja krvi analizirana. Svi ti ekstrakti su odgodili vrijeme zgrušavanja kao što je naglašeno APTT testovom ali ekstrakti lužina su pokazali veći učinak (podaci nisu prikazani). Na osnovu tih rezultata, lužinski ekstrakt *A. Auricula* je korišten u pokušaju da se izdvoje antikoagulantne substance. Ekstrakt lužina je taložen sa četiri zapremine absolutnog etanola i antikoagulantna aktivnost preostalog taloga, imenovanog grubi polisaharid je analizirana korištenjem analiza zgrušavanja (Tabela 1). Vrijeme zgrušavanja je značajno odgođeno kako se koncentracija čvrstih polisaharida povećala, što je prouzrokovalo skoro dvostruki porast na 1.0 mg/ml polisaharida. Polisaharidi nisu djelovali na TT na 0.3 mg/ml, ali su se povećali oko dva puta na 1.0 mg/ml. To sugeriraju da bi mogla postojati minimalna inhibitorska koncentracija na 0.3 mg/ml. PT se povisio sa inkrementima koncentracije polisaharida, iako manje nego što je bilo za APTT. Sveukupno, rezultati predlažu da polisaharidi iz *A. Auricula* mogu inhibirati nekoliko predmeta povezanih sa unutrašnjim ili uobičajenim putem sa manje inhibicije u vanjskim putevima zgrušavanja krvi.

Tabela 1

Antikoagulatna aktivnost grubih polisaharida ovisnih o koncentraciji dobivenih iz lužinskih ekstrakta *A. auricula*

Polisaharid ^a (mg/ml)	Vrijeme zgušavanja (s) ^b		
	APTT	TT	PT
0	43 F 0.7	41 F 2.0	39 F 2.0
0.3	59 F 0.5*	42 F 2.5	41 F 3
0.5	67 F 0.8*	49 F 3.2**	42 F 3.5
1.0	87 F 0.6*	91 F 2.5*	54 F 4.5*

^a Liofizirani grubi saharid je rastvoren u ljudskog plazmi koja je siromašna trombocitima (hPPP) za svaku prikazanu koncentraciju.

^b Svaki podatak predstavlja prosjek trostrukih eksperimenata korištenjem ljudske plazme siromašne trombocitima (hPPP). Podaci su prikazani kao značajke F SD u sekundama. * $p \leq 0.01$ i ** $p \leq 0.05$ su naznačene za različita vremena zgušavanja u odsustvu i prisutvu različitih koncentracija polisaharida.

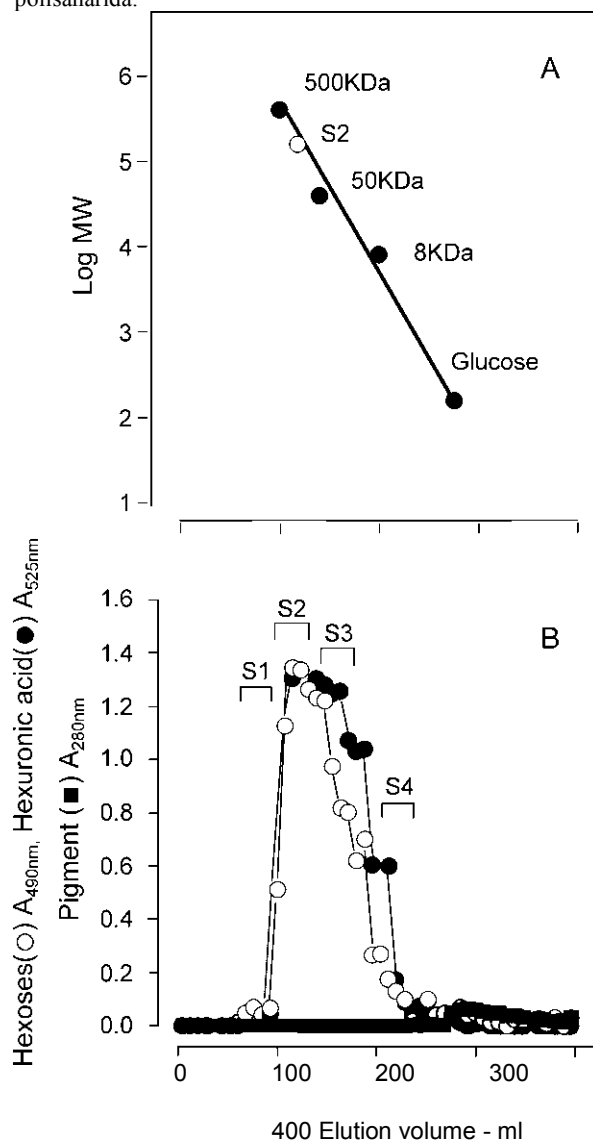
3.2. Čišćenje antikoagulantnih polisaharida iz gljive *A. auricula*

Rezultati prikazani u Tabeli 1 su dobiveni uz grubo pripremanje polisaharida, bez ikakvog daljnjeg čišćenja. Stoga, moguće je dovesti u pitanje da li je antikoagulantna aktivnost zapravo potekla iz polisaharida ili kontaminantom iako su neki kontaminanti ostranjeni tokom prvog koraka vađenja sa metanolom. U početku, podijelili smo grube polisaharide na kolonu Sephacryl S-400, prethodno kalibriranu korištenjem dekstrana uz različite molekularne mase (Slika 1A). Jedan vrh sadrži heksozu i heksauronsku kiselinu kao što je primjećeno, što predlaže da je polisaharid glavna mješavina (Slika 1B). Taj vrh se podijelo na četiri subfrakcije, nazvane S1, S2, S3 i S4. Kada su analizirane korištenjem APTT sistema za zgušavanje, antikoagulantna aktivnost se većinom koncentrisala na subfrakciju S2, koja se nalazila na centru vrha filtriranog gelom (Slika 2A). Aktivna frakcija nije zamrljana ne-polisaharidnim kontaminantima kao što su obojeni materijali i fenolske mješavine jer nismo zapali nikakvo upijanje na 280 nm (Slika 1B). Rezultati potvrđuju antikoagulantnu aktivnost koja je odlika polisaharida izoliranih iz jestivih gljiva.

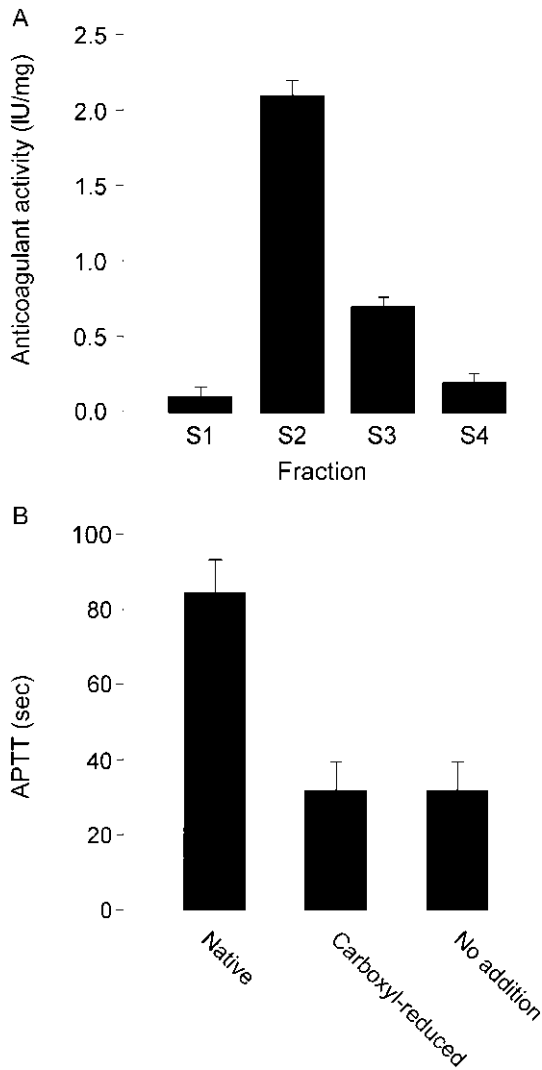
3.3. Hemijska analiza

Hemijska analiza očišćenih polisaharida iz *A. Auricula* (subfrakcija S2) je indikovala da su manozna, glukoza, ksiloza i heksauronska kiselina osnovni čečeri u molarnom odnosu 0.35:0.26:0.25:0.14. Male količine fruktoze i galaktoze su zabilježeni u polisaharidima. Ostaci heksauronske kiseline, koji predstavljaju 14% ukupnog taloga šećera se sastoji većinom od glukuronske kiseline, budući da se nakon redukcije karboksilnih grupa

polisaharida zamijećeno je smanjenje sadržaja heksauronske kiseline i proporcionalni porast količine glukoze (podaci nisu prikazani). Nije zamijećeno prisustvo sulfatnog estera u polisaharidima jestivih gljiva korištenjem hemijske analize ili infracrvene spektroskopije (podaci nisu prikazani). Međutim, antikoagulantna aktivnost je skoro nestala nakon redukcije karboksilnih grupa (Slika 2A). Stoga, ostaci glukuronske kiseline su neophodni za antikoagulantnu aktivnost polisaharida.



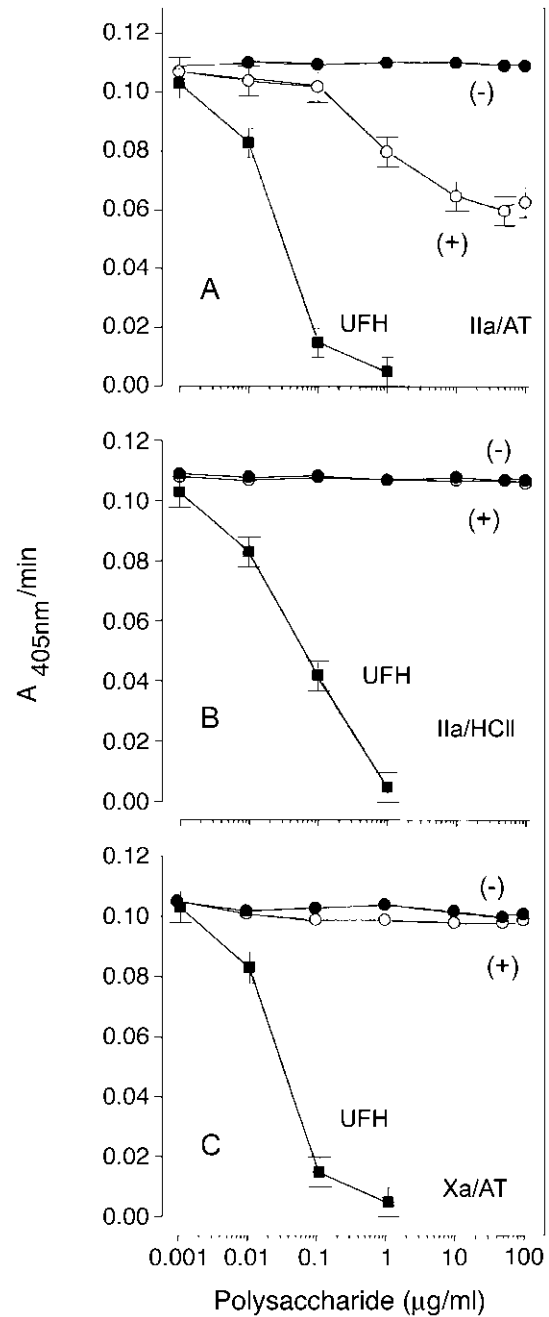
Slika 1. Kromografija filtracije gelom polisaharida iz gljive *A. Auricula* na Sephacryl S-400. Kolona Sephacryl S-400 (1.5 x 170 cm) je kalibrirana sa dekstran sulfatima na različitim molekularnim masama (A). Na ovu kolonu, grubi preparat polisaharida iz *A. Auricula* (35 mg) je dodan (B) i rastvoren sa 0.2 M amonij bikarbonata (pH 7.0) u mlazu od 28m/h. Frakcije 4ml su pokupljene i analizirane za heksozu(○), heksauronsku kiselinu (●) i za prisustvo pigmenta upijanja na 280 nm(E). Frakcije su podijeljene u četiri grupe, kao što je pokazano horizontalnim crticama na panelu i imenovane prema subfrakcijama S1, S2, S3 i S4.



Slika. 2. Antikoagulantna aktivnost purificirane subfrakcije gljive *A. Auricula* na Sephacryl S-400 i učinci karboksilne grupe glukuronske kiseline na antikoagulantna svojstva. (A) Antikoagulantna aktivnost ovih subfrakcija se odredila na osnovu analize APTT i izražena je u IU/mg korištenjem paralelne standardne krivulje bazirane na 4. Međunarodnom standardu za Heparin (193 IU/mg). (B) Redukcija karboksilnih grupa glukuronske kiseline u subfrakcijama S2 je vršena kao što je opisano u sekciji Materijali i metodi. Antikoagulantna aktivnost bezazlenih i karboksi-reduciranih polisaharida je određena APTT analizom i izražena kao vrijeme koagulacije (s) uz koncentraciju od 50 μ g polisaharida/90 μ l plazme.

3.4. Antikoagulantna aktivnost polisaharida gljiva je većinom posredovana antitrombinom

Za detaljniju analizu antikoagulantne aktivnosti polisaharida gljiva, frakcija S2 se proučavala i direktno su se mjerili njeni učinci na katalizu inhibicije trombina antitrombinom, ili aktivnost trombina inhibiranim heparinskim kofaktorom II (Slika 3). Mješavina nije pokazala inhibicijske učinke na trombin u nedostatku antitrombina (zatvoreni krugovi na slici 3A). Međutim, ako se antitrombin dodao u mješavinu koja je inkubirana (otvoreni krugovi na slici 3A), polisaharidi gljiva su povećali inhibiciju trombina prouzrokovanu plazma kofaktorom iako su potrebne



Slika. 3. Ovisnost koncentracije o polisaharidima za inaktivaciju trombina (A i B) ili faktora Xa (C) heparinskim kofaktorom II (B) ili antitrombinom (A i C). Heparinski kofaktor II (68 nM) ili antitrombin (50 nM) su inkubirani zajedno sa trombinom (15 nM) ili faktorom Xa (15 nM) u prisustvu raznih koncentracija polisaharida očišćenih iz gljiva *A. auricula* (O) ili heparina (■). Nakon 60 s, aktivnost preostalog trombina ili faktora Xa se odredila kromogenim substratom (A_{405}/min). Podaci prikazani sa (•) ukazuju na inkubaciju biljaka polisaharidom iz trombina ili faktorom Xa u prisustvu kofaktora (heparinski kofaktor II ili antitrombin). Paneli prikazuju rezultate dobivene iz 3 različita eksperimenta. HClII, heparinski kofaktor II, AT, antitrombin, Ila, trombin Xa, faktor Xa, UFH, nefrakcionirani heparin.

mnogo veće koncentracije od heparina da bi se proizvela ista inhibicija trombina (zatvoreni kvadrati na Slici 3A). Dodatno, ukupna inhibicija trombina nije postignuta polisaharidima gljiva. Kada smo zamijenili antritrombin sa heparinskim kofaktorom II, polisaharidi gljiva nisu počeli inhibiciju trombina (Slika 3B). Inhibicija nije zabilježena kada je faktor Xa, umjesto trombina korišten za analizu bilo u prisustvu ili odsustvu antitrombina (Slika 3C). Također smo testirali veće koncentracije serpina (do 1 μ M) ali nikakav učinak polisaharida gljiva nije zabilježen na trombin i aktivnosti faktora Xa posredovane heparinskim kofaktorom II, odnosno antritrombinom. Na osnovu tih rezultata, zaključili smo da je antikoagulantna aktivnost polisaharida gljiva posredovana katalizom inhibicije trombina antritrombinom, ali ne heparinskim kofaktorom II. Šta više, inhibicija Xa antitrombinom nije promijenjena ekstraktom katalizirane gljive.

Također smo testirali inhibicijski učinak polisaharida gljiva na agregaciju trombocita u *ex-vivo* analizi korištenjem Sprague-Dawley (SD) mužjaka miševa. Eksperimenti se nisu vršili sa očišćenom S2 frakcijom zbog manjka materijala. Umjesto toga smo koristili preparat grubih polisaharida. Trombociti kontrolnih miševa su normalno agregirani kada su inkubirani sa kolagenom. Budući da su se trombociti miševa hranjenih samo DMSO agregirali na isti način kao trombociti miševa hranjenih destiliranom vodom, DMSO nije inhibirao reakciju trombocita na kolagen. S druge strane, i aspirin i grubi polisaharidi su pokazali visoka inhibitorska svojstva na agregaciju trombocita, uz relativne aktivnosti od 38.1%, odnosno 39.6%, u poređenju sa kontrolnim uzrocima (podaci nisu prikazani). Učinak grubih polisaharida na vrijeme zgrušavanja je također određen *ex-vivo* eksperimentima. Vrijeme zgrušavanja krvi za miševe hranjene grubim polisaharidima je 252 s, što je približno 1.7 puta duže od kontrolnih miševa. Iako nismo mogli testirati pročišćenu S2 frakciju u *in vivo* analizama zbog manjka materijala, pretpostavili smo da se većina aktivnosti može pripisati toj molekuli, budući da čini glavnu antikoagulantnu mješavinu pripremanja grubih polisaharida.

4. Diskusija

Antikoagulantna aktivnost ekstrakta jestive gljive *A. Auricula* je analizirana u ovoj studiji. Lužinski ekstrakt *A. Auricula* pripremljen sa 0.1 N NaOH je pokazao veću antikoagulantnu aktivnost nego ekstrakti vode i kiseline. Lužinski ekstrakt je dalje podijeljen korištenjem taloženja sa etanolom kako bi se izolirala i označila antikoagulantna supstanca. Talog, nazvan grubi polisaharid, je imao veća antikoagulantna svojstva nego lužinski ekstrakt *in vitro* testiran sa APTT, TT i PT. APTT ljudske plasme sa manjkom trombocita se povećao proporcionalno količini grubih polisaharida, dok je 1 mg/ml bila minimalna koncentracija koja je proizvela i TT i PT (Tabela 1). Produživanje APTT je primjećeno prije nego produživanje TT i PT. Međutim, TT se povećao dva puta na koncentraciji od 1.0 mg/ml u polisaharidima gljiva. Primjećeno je da je glukan male molekularne težine imao mali učinak na TT, ali da je pokazao veliku aktivnost u APTT [27]. PT se povećao 1.4 puta uz dodatak grubog polisaharida (konačne koncentracije od 1.0 mg/ml). Dalja purifikacija aktivnih polisaharida filtracijom gelom je potvrdila da je aktivnost povezana sa polisaharidima (Slika 1B).

Šta više, redukcija karboksilnih grupa glukuronske kiseline je ukinula antikoagulantnu aktivnost (Slika 2B). Dodatno, polisaharid nije sadržavao sulfatni ester (hemijska analiza i infracrvena spektroskopija nisu prikazane), ali je sadržavao glukuronsku kiselinu. Već smo zamijetili pojavljivanje prirodnih nesulfatnih polisaharida kod viših biljaka koje su ispoljavale antikoagulantnu aktivnost. U ovom slučaju, ostaci galakturonske kiseline su neophodne za aktivnost [12]. Nasuprot našim trenutnim opažanjima gljiva, antikoagulantna aktivnost polisaharida viših biljaka je većinom posredovana heparinskim kofaktorom II, a ne antitrombinom.

Korištenjem purificiranih proteina u enzimatičkoj analizi je procijenilo da li su polisaharidi gljiva katalizirali inhibiciju trombina (Slika 3). Dokazali smo da, dok je manje učinkovit od heparina, polisaharid povećava inhibiciju trombina antitrombinom (Slika 3A). Nije jasno da li polisaharid gljiva posebno inhibira koagulaciju krvi radnjama na nekoliko mjesta procesa zgrušavanja. Stoga, potreba su dalja istraživanja kako bi se pojasnilo da je ovaj antikoagulantni polisaharid utječe na inhibiciju drugih koraka procesa koagulacije.

GC je analizirao kompoziciju šećera antikoagulantnog polisaharida. Manoza, glukoza i ksiloza su bili glavni sastojci

šećera. Na osnovu hemijskog sastava, antikoagulantni polisaharid iz gljiva je strukturno različit od glikosaminoglikanskih-nalike mješavina tkiva bezkičmenjaka [28,29], sulfatnih polisaharida koji sadrže fukoze morskih algi [30], heparinoida [31] koji imaju antikoagulantna ili antitrombotična svojstva.

Ukupna inhibicija trombina nije postignuta polisaharidima gljiva čak ni na najvećim koncentracijama. U našoj prethodnoj studiji sa fukosilatnim kondroitin sulfatom iz morskog krastavca, također smo primjetili odsustvo totalne inhibicije trombina u sličnim krivuljama korištenjem antitrombina [29]. Iako je neophodna veća koncentracija polisaharida gljiva nego heparina da se postigne učinak antikoagulacije, ovaj polisaharid ima prednost oralnog uzimanja, kao što je naglašeno našom preliminarnom studijom, dok se trenutno heparin daje intravenozno ili podkožno.

Arterijska tromboza je proces ovisan o trombinu i trombocitima i kao takav je podstakao naše trenutno istraživanje koje se fokusira na inhibiciju agregacije trombocita i/ili aktivnosti trombina. Aspirin, inhibitori trombina, GPIIb/IIIa antagonisti su korišteni da bi se izbjegla agregacija trombocita [32-34]. Aspirin, koji se često koristi u ovu svrhu, nepotpuno blokira aktivaciju trombocita podstaknutu kolagenom ili trombinom [35]. To ograničenje je dovelo do istraživanja novih zamjenskih antitrombotična uz poboljšani učinak. *A. Auricula* je inhibirala agregaciju trombocita, i odgodila zgrušavanje u *ex-vivo* životinjskim studijama. Ne možemo odbaciti mogućnost da je polisaharid gljiva možda prebačen *in vivo* da prouzokuje antikoagulantnu ili antiagregacijsku aktivnost. Bez obzira na to, naši rezultati ukazuju da se grubi polisaharidi *A. Auricula* jestive gljive, mogu razviti kao dodaci hrani uz moguća antikoagulantna i antiagregacijska svojstva.

Način na koji taj polisaharid inhibira agregaciju trombocita je još uvijek nejasno. Heparin uništava agregaciju trombocita prouzrokovanu trombinom, i sprječava vezanje trombina za receptor [36,37]. U slučaju kolagen prouzrokovane agregacije trombocita, polisaharidi gljiva mogu imati direktni učinak na trombocite. Zapravo, zabilježeno je da polisaharidi imaju direktan učinak na same trombocite, tako što sprečavaju ili pospješuju agregaciju [38].

U zaključku, nesulfatni polisaharid dobiven iz jestive gljive, *A. Auricula* katalizira inhibiciju trombina antritrombinom i uz oralnu primjenu kod miševa, inhibira agregaciju trombocita i zgrušavanje krvi *ex-vivo*. Stoga, jestiva gljiva *A. Auricula* može postati novi izvor antikoagulantne mješavine. Procjena polisaharida gljiva je novi alternativni sastojak terapije tromboze koji zahtjeva dalje studije karakterizacije antikoagulantne prirode i mogućih učinaka eksperimentalnih modela tromboze.

Priznanja

Ovo istraživanje je dijelom pomognuto grantovima Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: FNDCT, PADCT, and PRONEX), Fundag ao de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), i the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) kroz Bioproducts Research Center of Yonsei University. Paulo A.S. Mourao je član John Simon Guggenheim Memorial Foundation.

Reference

- [1] Epstein FH. Vascular-bed: specific hemostasis and hypercoagulable states. *New Engl J Med* 1999;340:1555-64. [2] Kenneth GM. Thrombosis: theoretical considerations. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1657-64.
- [3] Nader HB, Dietrich CP. Natural occurrence and possible biological role of heparin. In: Lane DA, Lindahl U, editors. Heparin: chemical and biological properties—clinical application. London: Auckland; 1989. p. 81.
- [4] Jaques LB. Heparin: an old drug with a new paradigm. *Science* 1979;206:528-33.
- [5] McGinnis DM, Otschoorn AS. Problems of component activities of heparin. *Pharmacop Forum* 1991;5:2438-41. [6] Merton RE, Thomas DP. Experimental studies on the relative efficacy of dermatan sulphate and heparin as antithrombotic agents. *Thromb Haemost* 1987;8:839-42.
- [7] Minix R, Doctor VM. Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res* 1997;87: 419 -29.
- [8] Nilsson M, Rothman U, Stenberb P, Frohm B, Persson HA. A novel semisynthetic sulphated polysaccharide with potent antithrombin activity. *Br J Haematol* 1982;50:335-43.
- [9] Nishino T, Aizu Y, Nagumo T. The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thromb Res* 1991; 64:723-31.
- [10] Pereira M, Mulloy B, Mourao PAS. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. *J Biol Chem* 1999;274:7656-67.
- [11] Mauray S, Sternberg C, Theveniaux J, Millet J, Tapon-Bretraudiere J, Fisher AM. Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. *Thromb Haemost* 1995;74:1280-5.
- [12] Yoon SJ, Pereira MS, Pavao MSG, Hwang JK, Pyun YR, Mourao PAS. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. *Thromb Res* 2002;106:51-8.
- [13] Lee SA, Jung KS, Shim MJ, Choi OC, Kim PK. The study on anticancer component of Korea Basidiomycetes (II), *Schizophyllum* and *Auricularia auricula-judae-judae*. *Korean Soc Mycol* 1981;9: 25 -32.
- [14] Ham SS, Kim DH, Choi KP, Lee DS. Antigenotoxic effects of methyl alcohol extracts from *Auricularia auricula* and *Gyrophora esculenta*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1997;26:57-62.
- [15] Chang JS, Kim HJ, Bae JT, Park SH, Kim SE, Kim OM, et al. Inhibition effects of *Auricularia auricula-judae-judae* methanol extract on lipid peroxidation and liver damage in benzo(a)pyrene-treated mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1998;27:712-7.
- [16] Ham SS, Kim DS, Lee DS. Antimutagenic effect of methyl alcohol extracts from *Auricularia auricula* and *Gyrophora esculenta*. *Korean J Food Sci Technol* 1997;29:1281-7. [17] Kim SS, Kim YP. In: Kim SS, Kim YP, editors. Korean mushrooms. Seoul, Korea: Yu-Pung Co., Ltd.; 1995. p. 321. [18] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;175:595-603. [19] Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acid. *J Biol Chem* 1947;167:189-98.
- [20] Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr Res* 1983;113:291 -9.
- [21] Saito A, Yamagata T, Suzuki S. Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfate. *J Biol Chem* 1968;243:1536-42.
- [22] Gerhard A, Ruitter D, Brian R. Carrageenan biotechnology. *Trends Food Sci Technol* 1997;8:389-95.
- [23] Rabin S, Stillian J, Barreto V, Friedman K, Toofan M. New membrane-based electrolytic suppressor device for suppressed conductivity detection in ion chromatography. *J Chromatogr* 1993;640:97-109.

- [24] Anderson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Simes GEC. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. *Thromb Res* 1976;9:575-80.
- [25] National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals: Animal environment, housing and management. Institute of Laboratory Animal Resource, Commission on Life Sciences. Washington, DC: National Academy Press; 1985. p. 85-123.
- [26] PavaoMSG, Mourao PAS, Mulloy B, Tollefsen DM. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian: its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem* 1995;270:31017-36. [27] Alban S, Franz G. Anticoagulant activity of curdlan sulfates in dependence on their molecular weight. *Pure Appl Chem* 1994;66: 2403 -6.
- [28] Pereira MS, Melo FR, Mourao PAS. Is there a correlation between structure and anticoagulant activity of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology* 2002;12:573-80.
- [29] Pacheco RG, Vicente CP, Zancan P, Mourao PAS. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagul* 2000;11:563-73.
- [30] Nishino T, Nagumo T. Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurom*. *Thromb Res* 1991;62: 765-73.
- [31] Pires L, Gorin PAJ, Reicher F, Sierakowski MR. An active heparinoids obtained by sulfation of a galactomannan extracted from the endo-sperm of *Senna macranthera* seeds. *Carbohydr Polym* 2001;46: 165 - 9.
- [32] Collier BS. GPIIb/IIIa antagonists: pathophysiologic and therapeutic insights from studies of c7E3 Fab. *Thromb Haemost* 1997;78: 730-5.
- [33] Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary artery stents. *New Engl J Med* 1996;334:1084-9.
- [34] Weitz JI, Hirsh J. New anticoagulant strategies. *J Lab Clin Med* 1993;122:364-74.
- [35] Bates SM, Weitz JI. Prevention of activation of blood coagulation during acute coronary ischemic syndromes: beyond aspirin and heparin. *Carbohydr Res* 1999;41:418-32.
- [36] Soslau G, Class R, Morgan DA, Foster C, Lord ST, Marchese P, et al. Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 2001;276:21173-83.
- [37] Rajtar G, Marchi E, de Gaetano G, Cerletti C. Effects of glycosaminoglycans on platelet and leucocyte function: role of α -sulfation. *Biochem Pharmacol* 1993;46:958-60.
- [38] Farias WRL, Nazareth RA, Mourao PAS. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2001;86:1540-6.