

# KEGUNAAN ANTIKOAGULAN HIRUDIN DARI LINTAH DALAM PERUBATAN

FAZILAH ABDUL LATIF

NORIZAH SALIM

Jabatan Kejuruteraan Bioproses

Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Sumber Asli

Universiti Teknologi Malaysia

Jalan Semarak

54100 Kuala Lumpur

## **Abstrak**

*Lintah (Hirudo medicinalis) boleh mengeluarkan bahan hirudin, iaitu sejenis protein yang berfungsi sebagai agen anti-pembekuan darah semulajadi. Protein ini dirembeskan keluar dari kelenjar liurnya semasa menggigit mangsa. Dari beberapa penyelidikan [4,5,8,9,11,13], telah dibuktikan bahawa hirudin boleh menyekat pembentukan thrombus bagi menghalang pembekuan darah. Penulenan protein hirudin akan dapat membantu ahli perubatan dalam kajian penyakit-penyakit thrombotik oleh kerana hirudin tidak toksik berbanding dengan heparin atau bahan sintetik lain yang lebih mahal. Dengan penggunaan kaedah-kaedah terkini dalam bidang bioteknologi, biologi molekul dan teknik DNA-rekombinan, protein hirudin boleh dihasilkan dengan skala besar di peringkat industri.*

## **1. Latar Belakang Lintah**

Sehingga kini, kajian mengenai protein hirudin adalah dari lintah Eropah iaitu *Hirudo medicinalis*. Lintah ini adalah haiwan invertebrata dari order Arhynchobdellida kelas Hirudenia, dalam filum Annelida [ 3 ]. Haiwan hermaphrodit (mempunyai kedua-dua organ seks jantan dan betina) ini menjalani kehidupan semiparasitik yang menghisap darah dari haiwan vertebrata. Semasa menghisap darah, lintah melekatkan dirinya kepada mangsa dengan pelekap posterior dan melukakan kulit mangsa dengan bantuan tiga set rahang yang terdapat pada bahagian dalam pelekap anterior. Lintah kemudiannya menyedut darah mangsa sehingga usus pencernaannya penuh. Usus pencernaan lintah mengandungi banyak saku-saku lateral yang boleh menyimpan darah selama beberapa bulan (ada juga lintah yang berupaya menyimpannya sehingga 12 bulan) untuk kegunaan lintah tersebut [15]. Kelenjar liur lintah menghasilkan hirudin, protein yang menyekat koagulasi (pembekuan darah) semasa ia menggigit mangsa [ 9 ]. Inilah sebabnya mengapa luka gigitan lintah terus berdarah selepas beberapa jam (sehingga 4 jam) terkena gigitan [ 13 ].

## **2. Hirudin**

Hirudin yang dikeluarkan oleh lintah adalah perencat thrombin yang sangat spesifik [ 1 ]. Nilai KI (nilai keafinan) hirudin terhadap thrombin adalah serendah  $0.82 \times 10^{-12}$  mol/l [ 5 ]. Thrombin adalah enzim yang merangsang pembekuan darah. Apabila thrombin direncat oleh hirudin maka pembekuan darah tidak boleh terjadi. Hirudin adalah protein yang sangat stabil terhadap suhu dan pH yang tinggi, mengandungi 65 atau 66 jujukan asid amino dengan 3 ikatan disulfida [ 8 ]. Ketiga-tiga ikatan disulfida itu terletak dalam kawasan 39 residu pertama di terminal amino. Terminal karboksil pula sangat asidik dengan 5 asid amino yang asidik: 4 Glutamine dan 1 Tyr-SO<sub>3</sub>H, di 9 residu yang terakhir. Tapak aktif adalah di mana



residu Lysine diapit oleh 2 Proline. Struktur seperti inilah yang dikatakan memainkan peranan penting dalam interaksi hirudin-thrombin [ 4 ].

Terdapat sekurang-kurangnya 2 jenis protein hirudin yang boleh diekstrak dari lintah iaitu hirudin dari kepala lintah dan pseudohirudin (hirudin PA) dari badan lintah (Lampiran 1). Pseudohirudin adalah protein yang tidak menunjukkan sifat antithrombin walaupun berat molekul dan jujukan asid aminonya hampir menyerupai hirudin dari kepala lintah [ 4 ]. Jujukan hirudin daripada kepala lintah di terminal amino bermula dengan valine dan valine. Jujukan pseudohirudin daripada badan lintah pula bermula dengan isoleucine dan threonine. Perbezaan susunan asid amino juga terdapat pada jujukan asid amino yang ke 24, 33, 35, 36, 53, 58, 62, 63 dan dua asid amino yang terakhir pada terminal karboksil iaitu Leucine dan Glutamine pada hirudin manakala Asid Aspartik dan Asid Glutamik pada pseudohirudin [ 6 ]. Bilangan asid amino pada hirudin adalah 65 dan pada pseudohirudin adalah 66 [ 12 ].

### 3. Kepentingan Perubatan

Dari segi perubatan hirudin adalah sangat penting kerana protein hirudin yang tulen tidak merangsang penghasilan antibodi di dalam haiwan kajian (tikus dan monyet). Selepas beberapa kali suntikan hirudin pada manusia dan monyet, didapati tidak menunjukkan tindakbalas imun. Ini menunjukkan bahawa hirudin adalah imunogen yang sangat lemah dan tindakbalas allergik tidak berlaku dalam keadaan normal [ 10 ]. Kajian terhadap manusia menunjukkan hirudin tulen yang disuntik secara subkutaneous dan intravena sebanyak 1000 unit antithrombin/kg tidak memberi sebarang kesan sampingan. Selain dari itu didapati nilai LD50 hirudin pada tikus adalah 500 000 unit antithrombin/kg. Malah pembuangan hirudin dari sistem darah adalah sangat cepat, dalam masa 24 jam sahaja separuh dari hirudin yang disuntik telah dibuang oleh buah pinggang melalui urin [ 2 ].

Berbeza dengan bahan antikoagulan yang lain seperti heparin, di mana ia memberi kesan sampingan seperti pendarahan dan thrombocytopenia jika digunakan dalam rawatan penyakit thrombotik [ 14 ]. Heparin juga memerlukan kofaktor antithrombin III (AT III) untuk bertindak ke atas thrombin manakala hirudin bertindak secara langsung terus kepada thrombin semasa proses merencat pembekuan darah [ 11 ]. Antikoagulan sintetik yang biasa digunakan adalah sulfonat polistirena dan sulfonat polietilena yang mempunyai aktiviti seperti heparin yang memerlukan antithrombin III untuk bertindakbalas dengan thrombin [ 7 ].

### 4. Perkembangan Terkini

Oleh kerana hirudin adalah sangat penting kepada bidang perubatan maka penghasilannya secara skala besar adalah amat diperlukan supaya banyak kajian dan rawatan terhadap penyakit thrombotik dan jantung dapat dilakukan. Kajian terhadap penulenan hirudin dan pengklonan untuk penghasilannya dalam skala besar sedang pesat dilakukan di negara-negara Eropah dan Amerika Syarikat di mana syarikat-syarikat farmasi yang besar seperti Pentapharm (Switzerland), Plantorgan (Germany), Mitsui Toatsu (Jepun), Farmitalia Carlo Erba (Itali), Merrel Dow Research Institute (Amerika Syarikat) dan BioPharm (United Kingdom) ada menjalankan kajian terhadap hirudin dan protein yang berkaitan dengan antikoagulan [ 13 ]. Di Universiti Teknologi Malaysia, kajian hirudin dilakukan ke atas lintah tempatan (*Hirudinaria manillensis*) atau lebih dikenali sebagai lintah kerbau. Adalah sangat menarik untuk membuat perbandingan aktiviti, struktur dan kespesifikan terhadap thrombin berbanding dengan hirudin dari lintah Eropah (*Hirudo medicinalis*). Jikalau aktiviti hirudin dari lintah tempatan adalah lebih baik, maka pengklonan hirudin untuk penghasilan pada skala besar boleh dijalankan.



## Rujukan

- [1] Baskova I.P., et al., 1983, Large Scale Preparation of Hirudin. *Thrombosis Res.* 2, 229-38
- [2] Bichler, J., et al., 1988, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hirudin in man after single subcutaneous and intravenous administration. *Arzneim.-forsch.* 38(5): 704-10
- [3] Buchsbaum, R., 1976, *Animals without backbone*. 2nd Edition. The University of Chicago Press. Chicago. m.s. 233-5
- [4] Chang J.-Y., 1983, The Functional Domain of Hirudin, a Thrombin-specific Inhibitor, *FEBS LETT.*, V. 164 #2, 307-13
- [5] Dodt J., et al., 1984, The Complete Amino Acid Sequence of Hirudin, a Thrombin Specific Inhibitor. *FEBS. LETT.*, v. 165 #2, 180-3
- [6] Dodt J., et al., 1986, Isolation and Characterization of Hirudin Isoinhibitors and Sequence Analysis of Hirudin PA, *Biol. Chemistry*, vol. 367, 803-811
- [7] Fougnot, C., 1979, New Heparin-like Insoluble Materials: part 1 *Annals of Biomedical Engineering*. v. 7, 429-39
- [8] Harvey R.P., et al., 1986, Cloning and Expression of a cDNA Coding for the Anticoagulant Hirudin from the Bloodsucking Leech, *Hirudo medicinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 83, 1084-8
- [9] Joseph G.E. & Robert W.H., 1981, *Invertebrate Zoology*, Mac Millan Publishing Co. New York. Klocking, H.P., et al., 1988, Toxicological Studies with Recombinant Hirudin. *folia Haematol.* 115, 75-82
- [10] Markwardt, F., 1988, The Comeback of Hirudin : an old established anticoagulant agent. *Folia Haematol* 115, 10-23
- [11] Riehl-Bellon, N., 1989, Purification and Biochemical Characterization of Recombinant Hirudin Produced by *Saccharomyces cerevisiae*., *Biochemistry*, 28, 2941-2949.
- [12] Sawyer R.T., 1991, Thrombolytics and Anticoagulants from Leeches, *Bio/Technology* v. 9, 513-8
- [13] Walenga, J.M., et al., 1990, Recombinant Hirudin as an Antithrombotic Agent. *Drugs of the Future* 15(3), 267-80
- [14] 406th Medical Laboratory Special Report on Blood Sucking Asian Leeches of Families Hirudidae & Haemadipsidae, July 1968. United States Army Medical Command, Japan.

### Lampiran 1

	(A)	(B)	(C)		(A)	(B)	(C)		(A)	(B)	(C)
1	V	V	I*	23	G	G	G	45	T	T	Y*
2	V	V	T*	24	Q	Q	K*	46	P	P	P
3	Y	Y	Y	25	G	G	G	47	K	K	K
4	T	T	T	26	N	N	N	48	P	P	P
5	D	D	D	27	K	K	K	49	Q	Q	Q
6	C	C	C	28	C	C	C	50	S	S	S
7	T	T	T	29	I	I	I	51	H	H	H
8	E	E	E	30	L	L	L	52	B*	N	N
9	S	S	S	31	G	G	G	53	B*	D	Q
10	G	G	G	32	S	S	S	54	B*	G	G
11	Q	Q	Q	33	D	D	Q*	55	G*	D	D
12	N	N	N	34	G	G	G	56	F	F	F
13	L	L	L	35	E	E	K*	57	E	E	E
14	C	C	C	36	K	K	D*	58	E	E	P*
15	L	L	L	37	N	N	N	59	I	I	I
16	C	C	C	38	Q	Q	Q	60	P	P	P
17	E	E	E	39	C	C	C	61	E	E	E
18	G	G	G	40	V	V	V	62	E	E	D*
19	S	S	S	41	T	T	T	63	Y	Y	A*
20	N	N	N	42	G	G	G	64	L	L	Y*
21	V	V	V	43	E	E	E	65	Q	Q	D*
22	C	C	C	44	G	G	G	66			E*

Rajah 1 : Jujukan Asid Amino Bagi Hirudin  
 A : Chang J.-Y., 1983 (hirudin)  
 B : Dodt J. et al., 1984 (hirudin)  
 C : Dodt J. et al., 1986 (hirudin PA)