وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان:

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی پلی ساکاریدها و پپتیدهای استخراج شده از میکروجلبک کلرلا ولگاریس بر روی سل لاین سرطانی کولون در شرایط آزمایشگاهی

مجری:
زهرا یعقوب‌زاده

شماره ثبت
٦٥٢١٠

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان طرح/پروژه: بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی پلی‌ساکاریدها و پپتیدهای استخراج شده از میکروجلبک کلرلا ولگاریس بر روی سل لاین سرطانی کولون در شرایط آزمایشگاهی
کد مصوب: ۰۱۰۱۲۰-۰۰۱-۱۲-۷۶-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: زهرا یعقوب‌زاده
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری: زهرا یعقوب‌زاده
نام و نام خانوادگی همکار(ان): رضا صفری، هادی غفاری، عیسی شریف پور، مریم میربخش، آسیه مخلوق، مریم قیاسی، شراره فیروزکندیان، عبدالحمید آذری، مجید ابراهیم زاده، غلامرضا رازقیان رستمی، کورس رادخواه
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): -
محل اجرا: استان مازندران
تاریخ شروع: ۱۴۰۱/۳/۱
مدت اجرا: ۱ سال و ۶ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۳
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیسیتی پلی‌ساکاریدها و پپتید های استخراج شده از میکروجلبک کلرلا ولگاریس بر روی سل لاین سرطانی کولون در شرایط آزمایشگاهی

کد مصوب: ۰۱۰۱۲۰-۰۰۱-۱۲-۷۶-۲

شماره ثبت (فروست) : ۶۵۲۱۰ تاریخ : ۱۴۰۳/۱/۱۸

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم زهرا یعقوب‌زاده دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته میکروبیولوژی است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست‌فناوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۱۴۰۲/۱۲/۲۰ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ■ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۳
۱-۱-فرضیات ۶
۱-۲-اهداف ۶
۱-۳-کلرلا ولگاریس ۶
۱-۴- ترکیبات شیمیایی کلرلا ولگاریس ۹
۱-۴-۱-پروتئین‌های کلرلا ولگاریس ۹
۱-۴-۲-کربوهیدرات های کلرلا ولگاریس ۹
۱-۵- استفاده از کلرلا ولگاریس در آبزی پروری ۹
۱-۶- متابولیت های ثانویه ۹
۱-۷-روش‌های استخراج پپتیدها ۱۱
۱-۸-پلی ساکاریدها ۱۲
۱-۹- پلی ساکاریدهای گیاهی ۱۳
۱-۱۰- فرآیند استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب ۱۴
۱-۱۰-۱- روش آب داغ ۱۴
۱-۱۰-۲- روش قلیایی ۱۴
۱-۱۰-۳- روش اولتراسوند ۱۵
۱-۱۰-۴- روش انجماد و انجمادزدایی ۱۵
۱-۱۱- روش های استخراج پلی ساکارید جلبک کلرلا ۱۵
۱-۱۲- فعالیت‌های زیستی ۱۶
۱-۱۲-۱-آنتی‌اکسیدان‌ها ۱۶
۱-۱۳- آزمون های بررسی فعالیت متابولیک ۱۹
۱-۱۴- IC_{50} (غلظت کشنده 50 درصد) ۲۰
۱-۱۵- فرآیند بیولوژیکی اکسیداسیون ۲۰
۱-۱۶- سرطان ۲۱
۱-۱۷-مروري بر منابع ۲۳

۲ - مواد و روش‌کار ۳۱
۲-۱-آماده سازی و تهیه پودر جلبک کلرلا ولگاریس ۳۱
۲ -۲ -آنالیز ترکیب پودر کلرلا ولگاریس ۳۱
۲ - ۳ - استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب کلرلا ولگاریس با استفاده از تکنیک آب داغ ۳۲
۲-۴- هیدرولیز آنزیمی کلرلا ولگاریس ۳۲
۲-۵- تعیین درجه هیدرولیز (DH) ۳۳
۲-۶- تعیین غلظت پپتید ۳۳
۲-۷- تعیین بازده پروتئین ۳۴
۲-۸-تعیین بازده پروتئین هیدرولیز شده ۳۴
۲-۹-اولترافیلتراسیون Ultrafiltration ۳۴
۲ - ۱۰ - خواص آنتی اکسیدانی جلبک کلرلا ولگاریس ۳۵
۲ - ۱۱-قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH ۳۵
۲ - ۱۲- قدرت احیاءکنندگی یون آهن (III) ۳۶
۲-۱۳-کشت سلولی ۳۷
۲-۱۴- بررسی MTT ۳۷
۲ - ۱۵ -محاسبه IC_{50} ۳۷
۲-۱۶- بررسی مورفولوژیک سل لاین‌های سرطانی ۳۸
۲-۱۷- روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها ۳۹
۳ - نتایج ۴۰
۳ - ۱- آنالیز ترکیب پودر کلرلا ولگاریس ۴۰
۳ - ۲- نتایج خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها ۴۱
۳ - ۲- ۱- قدرت مهار رادیکال آزادDPPH ۴۱
۳ - ۲- ۲-قدرت احیاءکنندگی یون آهن ۴۱
۳ - ۳- نتایج آنتی کنسری پلی ساکاریدها ۴۳
۳-۴- تغییرات مورفولوژیک سلول‌های سرطانی ۴۴
۳-۵- نتایج خواص آنتی اکسیدانی هیدرولیزهای پروتئینی ۴۶
۳-۵- ۱- فعالیت مهار رادیکالDPPH ۴۶

۳-۵- ۲- قدرت کاهندگی آهن ۴۹
۳-۶-نتایج سیتوتوکسیک پروتئین هیدرولیزشده ۵۱
۳-۷-نتایج مورفولوژی سلولی با هیدرولیزهای پپسین ۵۴
۳-۸-نتایج مورفولوژی سلولی با هیدرولیزهای پرومود ۵۶
۴ - بحث ۵۸
پیشنهادها ۶۵
منابع ۶۶
چکیده انگلیسی ۷۱

چکیده

میکروجلبک‌ها منابع غنی از متابولیت‌های فعال بیولوژیکی هستند. امروزه بخشی از تمرکز صنایع داروئی استفاده از متابولیت‌های ثانویه با منشا گیاهی است. کلرلا ولگاریس ریز جلبک با ارزش اقتصادی است که دارای درصد پروتئینی بالا و مواد موثره و پلی‌ساکاریدهای قابل ملاحظه ای می باشد. از اینرو می توان از این ریزجلبک بعنوان مکمل خوراکی و داروئی استفاده کرد. در این بررسی ابتدا پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از کلرلا ولگاریس و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس مهار رشد سلول‌های سرطانی کولون سنجش گردید. در این راستا استخراج پلی‌ساکارید کلرلا ولگاریس به روش آب داغ انجام شد. جهت استخراج پروتئین کلرلا ولگاریس از روش هیدرولیز آنزیمی با آنزیم‌های پروتئولیتیک پپسین و پرومود (پروتئاز باکتریایی باسیلوس سوبتیلیس) انجام شد. سه فرکشن از هیدرولیز های پپسین و پرومود به ترتیب (Pep1,Pep2,Pep3) و (Pro1,Pro2,Pro3) به روش اولترافیلتراسیون با سه وزن مولکولی متفاوت (Mw < 3 kDa, 3 kDa < Mw < 10 kDa, Mw > 10 kDa) جدا شدند. خواص آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها و پپتیدهای استخراج شده، با استفاده از روش‌های قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی (FRAP)در غلظت‌های مختلف ۶ - ۰/۳۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد ارزیابی قرار گرفتند و اثرات سیتوتوکسیسیتی پلی ساکاریدها و پپتیدهای استخراج شده با روش MTT در غلظت‌های مختلف ۱۰۰۰- ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی رده سلولي سرطان کولون موش CT-26 بررسی و درصد زنده مانی سلول‌ها محاسبه گردید. نتایج نشان داد بازده پلی‌ساکارید خام ۰/۱۵±۵/۰۶ درصد وزن خشک ریزجلبک به دست آمد. بالاترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و بالاترین قدرت کاهندگی FRAP در غلظت ۶ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۱۵/۹۱ درصد و ۰/۷۸۱ بوده است ($P<0.05$). مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی آنتی‌اکسیدان شیمیایی BHA در غلظت ۰/۰۳۱ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۰/۰۲۸ درصد و ۳/۸۱ بوده است ($P<0.05$). مقدار IC_{50} برای مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی پلی‌ساکارید های کلرلا ولگاریس به ترتیب ۲۲/۳۴ درصد و ۱۸۷/۴۷ میلی گرم بر میلی لیتر بود. پلی‌ساکاریدهای بدست آمده اثرات سیتوتوکسیسیتی مشخصی را در برابر رده سلولی CT-26 با مقادیر IC_{50} ۴۸۱/۵۳ میکروگرم بر میلی لیتر پس از در معرض قرار گرفتن به مدت ۴۸ ساعت القا کردند. هیدرولیزهای پروتئینی پپسین و پرومود توان مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی را داشتند. با اینکه درجه هیدرولیز پپسین بیشتر از پرومود بود، اما هیدرولیزهای پروتئینی پرومود قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی بالاتری را نشان داد ($P<0.05$). هیدرولیزهای پروتئینی آنزیم‌ها با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب ۱۳/۴۹ و ۱۴/۰۷ درصد بودند ($P<$

0.05). نتایج نشان داد هیدرولیزهای پروتئینی پپسین Pep1، Pep2 و Pep3 با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرمبر میلی لیتر به ترتیب ۲۴/۳۴ ، ۳۶/۰۰ و ۴۰/۰۸ درصد زنده مانی رده سلولی سرطان کولون CT-26 راکاهش دادند و هیدرولیزهای پروتئینی پرومود Pro1، Pro2 و Pro3 به ترتیب۲۶، ۳۵/۹۱ و۳۷/۱۳ درصد رده سلولی CT-26 کاهش دادندPep1 وPro1 بیشترین اثرات سیتوتوکسیسیتی را دارا بودند($P < 0.05$). نتایج بررسی نشان داد که پپتیدهای زیست فعال کلرلا ولگاریس ممکن است ترکیبات عملکردی مفیدی در پیشگیری از سرطان‌ها داشته باشند.

کلمات کلیدی: میکرو جلبک کلرلا ولگاریس، آنتی‌اکسیدانی، سیتوتوکسیسیتی، سل لاین سرطانی