J Oceanography (JOC). 12(47): 110-119, Autumn 2021

Journal of Oceanography
Homepage: joc.inio.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH PAPER (Marine Science)

Evaluation of Anti-inflammatory Effects of Bioactive Spirulina Platensis Peptides Extracted by Alkaline Protease in Animal Model Balb/C Mice

***Samaneh Moghadamzadegan.*[1], *Mozhgan Emtyazjoo* [2,*], *Mahnazsadat Sadeghi* [3], *Mohammad Rabbani* [3]**

[1] *Graduate Master of Marine Biotechnology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

[2] *Associate Professor, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

[3] *Assistant Professor, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

ARTICLE INFO

Code: A-10-1589-1

Article History:
Received: 15/10/2020
Revised: 11/08/2021
Accepted: 13/08/2021

Keywords:
Bioactive peptides
Inflammation
Spirulina
Alkaline protease enzyme
Balb/C mice

*Corresponding author:
✉ *m_emtyazjoo@iau-tnb.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Objectives: *Spirulina platensis* is one of the most widespread species of cyanobacteria that has been extensively studied in various fields of the food and drug industry. Extensive tests performed on Spirulina show that this cyanobacterium is a unique source of natural bioactive substances with potential healing properties. This study aimed to optimize the extraction of the bioactive peptide Spirulina platensis by the enzyme alkaline protease and investigate the anti-inflammatory properties of the extracted spirulina peptides in mice with intestinal inflammation.

Methods: For this purpose, the RSM response surface methodology determined the optimal performance of the enzyme, and the extracted peptides were dried in a freeze-dried dryer to determine the molecular weight of the peptide by electrophoresis SDS page space. The resulting peptides were stored at -20°C. To evaluate the anti-inflammatory effects in 25 Balb/C mice with inflammation, 4% acetic acid was induced. After ensuring inflammation of peptides with two concentrations (1.6 and 3.8 mg/kg) and omeprazole as positive control and water as a negative control to Balb/C mice with the intestinal ulcer, gavage, and effect, these treatments were evaluated on the repair of inflammation.

Findings: The results showed that the optimal conditions of enzymatic hydrolysis of alkaline protease were obtained at 60°C, 210 minutes, and pH 7.5. Histological results: The presence of inflammation in the control group and mice with peptide at a concentration of 3.8 (mg/kg) intestinal tissue, crypt, and intestinal mucosa was completely regenerated during treatment. In mice treated with peptide at a 1.6(mg/kg) concentration, a relative improvement was achieved, and the crypt was restored, but damage to the intestinal mucosa was still observed. The alkaline phosphatase enzyme is low in mice that receive the peptide, indicating an improvement in inflammation in these mice.

Conclusion: According to the results of this study, the bioactive spirulina peptides were able to treat inflammation in the intestines of mice.

10.52547/joc.12.47.110

©2021 JOC. All rights reserved

NUMBER OF TABLES	NUMBER OF FIGURES	NUMBER OF REFERENCES
1	4	28

مقاله پژوهشی (علوم دریایی)

بررسی اثرات ضد التهابی پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا پلاتنسیس استخراج شده توسط آنزیم آلکالین پروتئاز در مدل حیوانی موش‌های Balb/C

سمانه مقدم زادگان [۱]، مژگان امتیازجو [۲*]، مهنازالسادات صادقی [۳]، محمد ربانی [۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست فناوری دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۳] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۴
تاریخ بازبینی: ۱۴۰۰/۰۵/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲

واژگان کلیدی:
پپتیدهای زیست فعال
التهاب
اسپیرولینا
آنزیم آلکالین پروتئاز
موش Balb/C

*نویسنده مسئول
m_emtyazjoo@iau-tnb.ac.ir

چکیده

پیشینه و اهداف: *Spirulina platensis* یکی از رایج‌ترین و گسترده‌ترین گونه‌های سیانوباکترها است که به طور گسترده در زمینه‌های مختلف صنعت غذا و دارو مورد مطالعه قرار گرفته است. آزمون‌های گسترده‌ای که روی Spirulina انجام شده نشان می‌دهد که این سیانوباکتر یک منبع منحصربه فرد از مواد زیست فعال طبیعی با خواص بالقوه سلامتی بخشی می‌باشد. هدف مطالعه موجود بهینه سازی استخراج پپتید زیست فعال اسپیرولینا پلاتنسیس توسط آنزیم آلکالین پروتئاز و بررسی خاصیت ضدالتهابی پپتیدهای استخراج شده اسپیرولینا در موش‌های مبتلا به التهاب روده می‌باشد.

روش‌ها: بدین منظور از روش سطح پاسخ RSM عملکرد بهینه آنزیم مشخص و پپتیدهای استخراج شده در خشک کن انجمادی خشک و برای تعیین وزن مولکولی پپتید الکتروفورز SDS page space گردید. پپتیدهای حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت بررسی اثرات ضدالتهابی در ۲۵ سر موش Balb/C با اسیداستیک ۴٪ التهاب القا گردید. پس از اطمینان از التهاب پپتیدها با دو غلظت (۱/۶ و ۳/۸ میلی گرم بر کیلوگرم) و داروی امپرازول به عنوان کنترل مثبت و آب به عنوان کنترل منفی به موش‌های Balb/C مبتلا به زخم روده، گاواژ و تأثیر این تیمارها بر ترمیم التهاب مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بهینه شرایط هیدرولیز آنزیمی آلکالین پروتئاز در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و pH ۷/۵ بدست آمد. نتایج بافت شناسی وجود التهاب در گروه شاهد و در موش‌هایی که پپتید با غلظت ۳/۸(میلی گرم بر کیلوگرم) بافت روده‌ترمیم، کریپت و مخاط روده در طول درمان کاملاً بازسازی شده بود. در موش‌های تحت تیمار پپتید با غلظت ۱/۶(میلی گرم بر کیلوگرم) بهبود نسبی حاصل شده و کریپت بازسازی شده اما آسیب در ناحیه مخاط روده کماکان مشاهده گردید. آنزیم آلکالین فسفاتاز در موش‌هایی که پپتید دریافت کردند پایین آمده که این نشانه بهبود التهاب در این موش‌ها است.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا توانسته التهاب موجود در روده موش ها را درمان کند.

مقدمه

باکتری‌ها جلبک‌ها یکی از با ارزش‌ترین منابع دریایی هستند. در واقع می‌توان گفت جلبک‌ها منابع بسیار عالی از متابولیت های ثانویه با فعالیت زیستی هستند که عملکرد مفیدی را می‌توانند القا نمایند [۱-۳]. جلبک‌ها، به عنوان منبع ارزشمندی در جهت تأمین نیازهای صنعتی، دارویی و غذایی هستند. ضمن اینکه سالیانه مبالغ هنگفتی صرف واردات مواد و ترکیبات خام موجود در پیکره جلبک‌ها می‌گردد [۴]. یکی از مطرح‌ترین زیستمندان دریایی اسپیرولینا است. طبق آخرین رده بندی توسط NCBI اسپیرولینا جز سلسله Bacteria، رده Cyanobacteria، راسته *Spirulinales* و خانواده Spirulinaceae طبقه بندی می‌شود [۵].

طبق گزارشات مندرج شده در یونسکو، استفاده از اسپیرولینا به عنوان یک منبع غذایی در بخش‌های مختلف دنیا از قدمت طولانی برخوردار است [۶]. این سیانوباکتر به عنوان یک مکمل غذایی امن (GRAS) بدون ترکیبات سمی شناخته شده است و رسماً توسط سازمان غذا و دارو (FDA)و آژانس مراقبت بهداشتی ملی(ANVISA) تأیید شده است [۷].

کنفرانس مواد غذایی سازمان ملل متحد*Spirulina* را به عنوان بهترین غذا برای آینده اعلام کرده است [۶]. اخیراً، پپتیدهای زیست فعال به دست آمده از اسپیرولینا به علت فعالیت‌های زیستی و مزایای سلامتی بخش مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است [۸، ۹]. پپتید درمانی از زمان ظهور انسولین در دهه ۱۹۲۰ نقش مهمی در علم پزشکی داشته است. پپتیدهای زیست فعال معمولاً حدود ۳-۴۰ آمینو اسید دارند.

پپتیدهای زیست فعال تا زمانی که با دیگر آمینو اسیدهای موجود در ساختار اولیه پروتئین متصل شده‌اند، به‌صورت غیرفعال می‌مانند [۱۰]. شکل آزاد شده این پپتیدها بدلیل داشتن خصوصیات زیست فعال دارای عملکردهای فیزیولوژیک متعددی هستند [۱۱]. این پپتدها طی فرآوری یا هضم آنزیمی توسط آنزیم آزاد می‌شوند. هیدرولیز آنزیمی متداول‌ترین روش مورد استفاده برای استحصال پپتیدهای زیست فعال است [۱].

انتخاب آنزیم مناسب و دستیابی به بهترین شرایط لازم (زمان انکوباسیون، دما، pH و بهینه عملکرد آنزیم‌ها و همچنین نسبت سوبسترا به آنزیم) برای هیدرولیز آنزیمی بسیار مهم است [۹]. بیماری التهاب روده Inflammatory Bowel Disease به گروهی از بیماری‌ها گفته می‌شود که سبب التهاب جدار روده کوچک و بزرگ می‌شود که هر ساله تعداد زیادی از افراد را درگیر می‌کند [۱۲].

بیماری‌های التهابی روده در کشورهای پیشرفته شایع هستند و شیوع آنها درکشورهای درحال توسعه در حال افزایش است. به طوری که از هر ۲۰۰ نفر یک نفر دچار این بیماری هستند [۱۳, ۱۴]. میزان بروز بیماری التهابی روده در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت است.

بالاترین میزان بروز آن در آمریکای شمالی، اروپای شمالی و غربی گزارش شده است با این وجود مطالعات نشان می‌دهد شیوع کولیت اولسراتیو در ایران بالاتر است [۱۵]. با این وجود تا به امروز درمان های پزشکی هم چنان به تسکین علائم از طریق بهبود التهاب ادامه می‌دهند و درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد [۱۳].

کریپت یا غده روده‌ای، فرورفتگی‌های لوله شکل اپی‌تلیوم در بافت همبند آستر می‌باشند که تا عضلات مخاطی ادامه یافته است. کریپت های روده‌ای عامل دیگری برای افزایش سطح روده محسوب می گردد. با توجه به وظایف مهم کریپت ها اگر این سلول‌ها بر اثر التهاب دچار آسیب شوند در واقع عمکرد سلول دچار اختلال می‌شود، بررسی آسیب کریپت ها مشخص می‌کند چه مقدار از روده آسیب دیده و چه میزان از عملکرد روده بر اساس التهاب کاهش یافته است [۱۶]. در این تحقیق برای استحصال پپتیدهای زیست فعال سیانوباکتر اسپیرولینا پلاتنسیس که خاصیت ضدالتهابی دارند از آنزیم آلکالین پروتئاز استفاده گردید.

برای تشخیص بهبود التهاب به بررسی تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز پرداخته شد. آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از آنزیم‌های مهم کبدی است. تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون بیانگر عارضه التهابی روده است و یکی از راه‌های تشخیص بهبود التهاب، بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز خون است. در انتها برای اطمینان در تشخیص و بهبود التهاب به بررسی نتایج بافت شناسی پرداخته شد. با توجه به موارد ذکر شده در پژوهش حاضر به بررسی اثرات ضد التهابی پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا اختصاص یافت.

روش پژوهش

برای انجام این آزمایش پودر سیانوباکتر اسپیرولینا از شرکت آرین گستر تهیه گردید.

آنزیم آلکالین پروتئاز (ALCALASE Enzyme, Bacillus licheniforms 126741EMD millipote) از شرکت سفیر آزما کیان آنزیم تهیه شد.

۱. تهیه پپتید از سیانوباکتر اسپیرولینا

در ابتدا ماسیراسیون اسپیرولینا انجام و سپس از امواج ماوراءصوت در دمای ۴ درجه سانتی گراد، فرکانس ۸۰ هرتز و مدت زمان ۱۵ دقیقه استفاده شد. عصاره را در دور (rpm) ۸۰۰ و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و در مرحله بعد سوپرناتانت با آمونیم سولفات (NH_4SO_4) اشباع شده ۵۰٪ رسوبگیری شد. محلول سوپرناتانت در سرما و در دور (rpm)۱۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و با بافر فسفات ۵ mM با pH ۶/۸ مخلوط شد [۱۷].

استحصال پتید با استفاده از کیسه دیالیز ۱۲ کیلودالتون انجام شد [۱۸]. برای لیوفیلیز کردن پپتید اسپیرولینا از دستگاه خشک کن انجمادی استفاده شد. پودر پپتید لیوفیلیز شده طبق ۱۲ تیمار به دست آمده طبق روش Placket- Burman در نرم افزار Design Expert 16 (در شرایط متفاوت از نظر pH، زمان و دما) بهینه سازی شد (جدول ۱).

در انتها برای بررسی خواص ضدالتهابی پپتید اسپیرولینا بر روی موش‌های نر Balb/c پپتیدها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته نگهداری شد. (برای هر ۱۲ تیمار سه بار تکراردر نظر گرفته شد).

جدول ۱: بهینه سازی آنزیم آلکالین پروتئاز پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا

Table 1: Alkaline proteinase optimization of spirulina bioactive peptides

پودر اسپیرولینا (گرم)	آنزیم (U/ml)	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی گراد)	pH
۵	۱	۲۱۰	۵۰	۶/۵
۵	۲	۱۵۰	۵۰	۶/۵
۵	۲	۱۵۰	۵۰	۷/۵
۴	۱	۱۵۰	۵۰	۷/۵
۴	۱	۲۱۰	۵۰	۷/۵
۴	۲	۲۱۰	۵۰	۶/۵
۴	۲	۲۱۰	۶۰	۶/۵
۵	۱	۱۵۰	۶۰	۶/۵
۵	۲	۲۱۰	۶۰	۷/۵
۴	۱	۱۵۰	۶۰	۶/۵
۵	۱	۲۱۰	۶۰	۷/۵
۴	۲	۱۵۰	۶۰	۷/۵

۲. آماده سازی موش

۲۵ سر موش نر Balb/c به میزان تقریبی ۲۰-۱۸ گرم و سن ۴ تا ۶ هفته از مرکز تحقیقات انیستیتو پاستور ایران خریداری گردید. در شرایط مناسب دوره روشنایی– تاریکی ۱۲ ساعته و در دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتیگراد در قفس‌های جدا گانه در ۵ گروه ۵ تایی به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند تا با شرایط محیط ساز گاری یابند. طی این دوره غذا و آب به طور کافی در اختیار آنها قرار گرفت. برای تغذیه موش‌ها از غذای استاندارد فشرده شده (Pellet) استفاده گردید [۱۵].

۳. القاء التهاب در موش‌ها

به منظور ایجاد التهاب موش‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در حالت روزه داری نگه داشته و فقط اجازه مصرف آب داده شد. با استفاده از اسید استیک ۴٪ (۲ میلی لیتر از اسید استیک ۴٪ برای هر موش استفاده شد) و تزریق درون رکتومی التهاب در موش‌ها القاء گردید [۱۵].

در روز دوم آزمایش برای تأیید التهاب در روده موش‌ها، به طور تصادفی از آنها نمونه برداری انجام شد (از هر گروه از موش‌ها یک فرد به طور تصادفی انتخاب شد و با تشریح و مشاهده روده مشخص شد روده کاملاً ملتهب (ورم کرده و قرمز) بود و در گروه کنترل (موش‌های سالم) روده کاملاً سالم و بدون التهاب بود و در مجموع ۵ موش مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اطمینان از ایجاد التهاب موش‌ها در گروه‌های زیرتقسیم بندی شدند.

در تمام طول مطالعه موش‌ها با حجم یکسان و شرایط مشابه غذا و آب دریافت کردند واین کار به مدت ۱۴ روز تکرار ۱۴ روز گاواژ پپتید در ۲ غلظت و داروی امپرازول و در گروه کنترل (موش‌های سالم) آب به موش‌ها خورانده گردید [۱۲].

گروه ۱- موش‌های کنترل بدون ایجاد بیماری.

گروه ۲- موش‌های شاهد دارای زخم روده بدون تیمار درمانی (دریافت دارو) که آب مقطر دریافت کردند.

گروه ۳- موش‌های دارای التهاب + ۱/۶ میلی گرم بر کیلوگرم پپتید زیست فعال حاصل از اسپیرولینا دریافت کردند.

گروه ۴- موش‌های دارای التهاب +۳/۸ میلی گرم بر کیلوگرم پپتید زیست فعال حاص از اسپیرولینا دریافت کردند.

گروه ۵- موش‌های دارای التهاب که داروی شیمیایی امپرازول دریافت کردند.

پپتید حاصله از طریق گاواژ به موش داده شد. برای اطمینان از دریافت کامل پپتید، داروی امپرازول و آب در گروه‌ها شاهد سالم توسط موش‌ها پپتید، داروی امپرازول و آب به صورت پپتید به موش ها خورانده شد.

۴. سنجش آلکالین فسفاتاز

دو هفته بعد از خوراندن پپتید، موش‌ها با اتر بیهوش و به وسیله سرنگ انسولین از قلب خونگیری و وارد یک لوله آزمایش استریل شد. نمونه‌های خون به مدت ۳۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگهداری شد و پس از لخته شدن خون‌ها، نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و پس از جدا سازی سرم، غلظت آنزیم آلکالین فسفاتاز به روش الایزا توسط کیت آلکالن فسفاتاز پارس آزمون اندازه گیری گردید [۱۵].

۵. مطالعه بافت‌شناسی

برای مطالعات بافت شناسی ابتدا موش‌ها با کتامین بیهوش و کشته شدند. با یک برش طولی شکم موش‌ها باز گردید و انتهای روده بزرگ هر موش به طول ۵ سانتی متر خارج شد سپس یک برش عرضی ایجاد و بعد از شست و شو با سرم فیزیولوژی روده به ظرف حاوی فرمالین ۱۰٪ منتقل شد.

نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ تثبیت گردید، جهت آب گیری به ترتیب از الکل ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد استفاده شد. و پس از قالب گیری با پارافین برش بافتی توسط میکروتوم انجام شد ولام ها با

هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی گردید [۱۶]. درجه‌ی آسیب میکروسکوپی کریپت و شدت التهاب به روش مورتی ارزیابی و نمره دهی گردید. با توجه به ویژگی‌های زیر برای نمره دهی، آسیب کریپت از ۱ تا ۴ نمره دهی شد.

کریپت سالم (۰)، از بین رفتن یک سوم کریپت (۱)، از بین رفتن دو سوم کریپت (۲)، از بین رفتن کل کریپت ها و سالم بودن اپیتلیوم (۳)، از بین رفتن کل کریپت ها و اپیتلیوم (۴) [۱۹].

۶. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش با استفاده از طرح فاکتوریل تصادفی انجام شد. ارزیابی نمونه‌ها آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. آنالیز آماری با نرم افزار SPSS:16 و رسم نمودارها با Excel(2019) انجام شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش با توجه به نتایج آزمایش بهینه سازی آنزیم آلکالین پروتئاز که در محیط Design Expert انجام گرفت و پپتید به دست آمد و اثرات ضدالتهابی آن بررسی گردید.

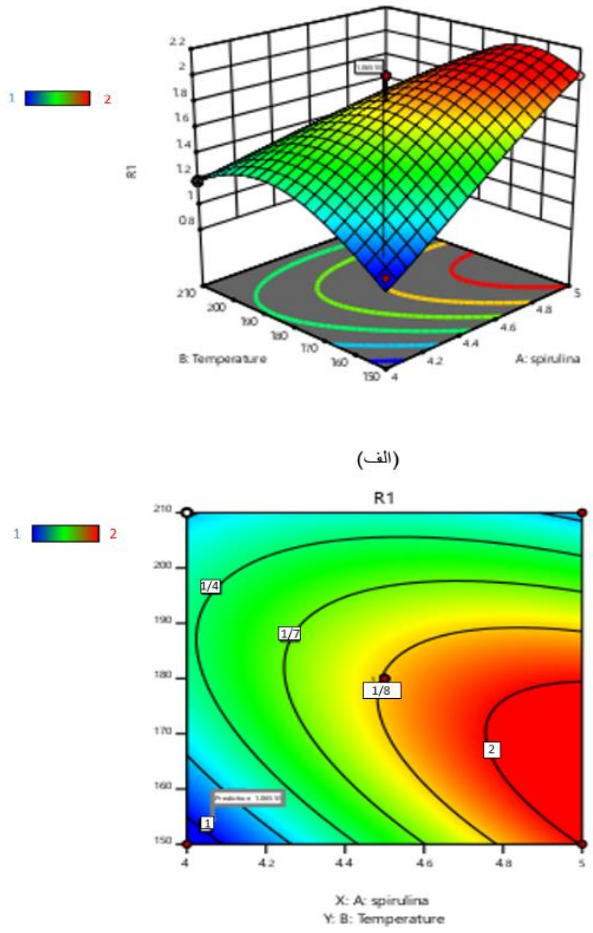
۱. بهینه سازی آنزیم آلکالین پروتئاز

با توجه به جدول ۱ آزمایش به روش Placket-Burman طراحی و پارامترهای بهینه سازی هیدرولیز آنزیمی مانند دما، نسبت آنزیم به سوبسترا، زمان، pH بررسی گردید.

از ماتریس Plackett - Burman ۲۷/۰۲۰٪ تا ۳۶/۹۰۴٪ پپتید بدست آمد. در انتها پپتید بدست آمده توزین شد و با توجه به وزن اولیه پودر اسپیرولینا در ابتدا آزمایش درصد پپتید موجود در پودر اسپیرولینا محاسبه شد. از جمله عوامل تأثیرگذار، دما بیشترین تأثیر را در بهبود هیدرولیز آنزیمی پپتید دارد.

با توجه به نتایج دو فاکتور دما و وزن اسپیرولینا، وزن پپتید حاصل را با توجه به مدل RSM - CCC در Modde 5.0 بهینه سازی هیدرولیز آنزیمی توسط ماتریس برنامه ریزی گردید و آزمایش در دو عامل اسپیرولینا (X1) و دمای هیدرولیز (X2) انجام گردید و قاعده این تأثیرات را برای آنزیم هیدرولیز کننده پپتید اسپیرولینا (۷٪) ترسیم گردید. در این آزمایش ۱۲ حالت مورد ارزیابی قرار گرفت که برای تأیید اهمیت این نسبت‌ها در معادله رگرسیون به صورت سه برابر انجام گرفت. (سه بار تکرار برای هر ۱۲ حالت انجام شد.)

بازیابی پپتید در مدل Plackett-Burman، نشان داد بهترین شرایط بهینه سازی آنزیم آلکالین پروتئاز برای هیدرولیز آنزیمی پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا طبق نمودار ۱، بهینه شرایط استفاده از آنزیم آلکالین پروتئاز برای هیدرولیز پپتید اسپیرولینا در شرایط دما ۶۰ درجه سانتیگراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و pH ۷/۵، وزن ۵ گرم اسپیرولینا و آنزیم ۲ میلی مول به دست آمد.



(الف)

(ب)

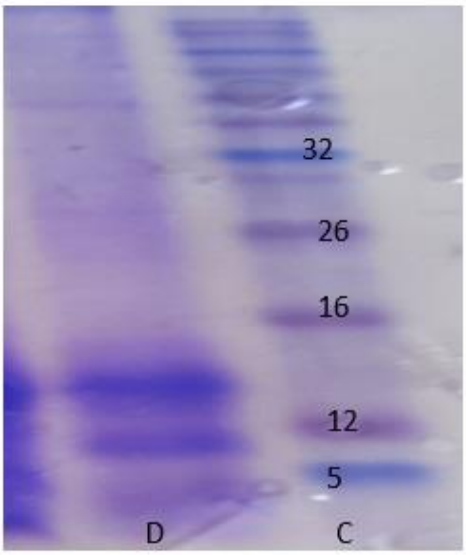
نمودار ۱: نمودار RSM شرایط بهینه سازی آنزیم آلکالین پروتئاز (تغییرات دما، زمان و PH بر هیدرولیز آنزیمی)

(الف) نمودار سطح پاسخ سه بعدی، (ب) کانتور دوبعدی تغییرات آنزیم آلکالین پروتئاز A اسپیرولینا، B دما و R آنزیم آلکالین پروتئاز

Graph 1: RSM diagram of alkaline protease optimization conditions (temperature, time and pH changes on enzymatic hydrolysis) three-dimensional response surface diagram, two-dimensional contour of alkaline protease enzyme changes
A spirulina, B temperature and R alkaline protease enzyme

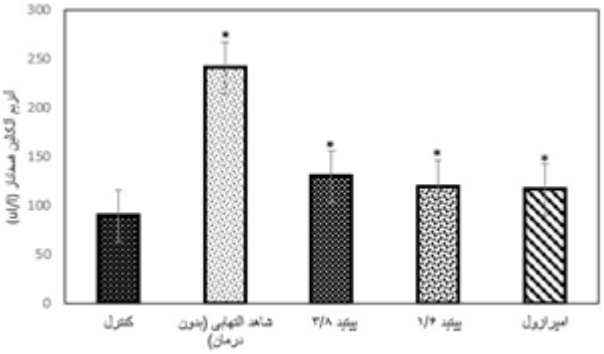
۲. بررسی وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال سیانوباکتر اسپیرولینا

پپتیدهای زیست فعال سیانوباکتر Spirulina *peltansis* در SDS-PAGE در محدوده ۵ تا ۱۶۶ کیلو دالتون بررسی شد و مشخص شد پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا که هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالین پروتئاز، دارای وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون هستند.



شکل ۱: SDS-PAGE پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا هیدرولیز شده توسط آلکالین پروتئاز در ژل الکتروفورز
ستون c شامل مارکرهای وزنی به ترتیب ۲۳،۲۶،۱۶،۱۲،۵ کیلو دالتون و ستون D وزن پپتیدهای سیانوباکتر اسپیرولینا

Fig. 1: SDS-PAGE of spirulina bioactive peptides hydrolyzed by alkaline protease in gel electrophoresis
Column c contains weight markers 23, 26, 16, 12, 5 kDa and column D, weight of cyanobacterium spirulina peptides, respectively



نمودار ۲: میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز خون موش‌های تحت تیمار با پپتید زیست فعال حاصل از اسپیرولینا پلاتنسیس در طول گاواژ تیمار نسبت به گروه شاهد التهابی در سطح احتمال (P < ۰/۰۵)
* نشان دهنده افزایش معنی دار غلظت آنزیم در گروه دارای التهاب (شاهدالتهابی) در مقایسه با گروه کنترل و کاهش معنی دار در گروه دریافت کننده پپتید

Graph 2: Alkaline phosphatase enzyme levels in the blood of mice treated with bioactive peptide derived from Spirulina platensis during treatment gavage compared to the inflammatory control group at the probability level (P < 0.05)
* Shows a significant increase in enzyme concentration in the inflammatory group (inflammatory control) compared to the control group and a significant decrease in the peptide group

۳. نتایج اندازه گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز

میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز خون تیمارهای مورد مطالعه در روز اول و چهاردهم مورد ارزیابی وآزمایش قرار گرفت (نمودار ۲).

کاهش آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون یکی از نشانه‌های کاهش التهاب است. نتایج نشان داد که میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به موش‌های گروه شاهد التهابی بدون درمان افزایش معناداری (P<0/05) نسبت به موش‌های گروه کنترل (گروه شاهد سالم) داشته، در موش‌های گروه‌های دریافت کننده داروی امپرازول، دریافت کننده پپتید با غلظت ۱/۶ (میلی گرم بر کیلوگرم) و پپتید با غلظت ۳/۸ (میلی گرم بر کیلوگرم) کاهش چشم گیری (P<0/05) نسبت به گروه شاهد التهابی بدست آمد.

۴. نتایج ارزیابی کریپت

در موش‌های کنترل (شاهد سالم) التهاب در بافت روده مشاهده نشد (۰). در موش‌های دریافت کننده پپتید با غلظت ۳/۸ (میلی گرم بر کیلوگرم) کریپت سالم است (۰). در موش‌های دریافت کننده پپتید با غلظت ۱/۶ (میلی گرم بر کیلوگرم) کریپت سالم است (۰). در موش‌های دریافت کننده داروی امپرازول التهاب دیده می‌شود و یک سوم کریپت از بین رفته است (۱). موش‌های شاهد التهاب کریپت کاملاً از بین رفته است (۴).

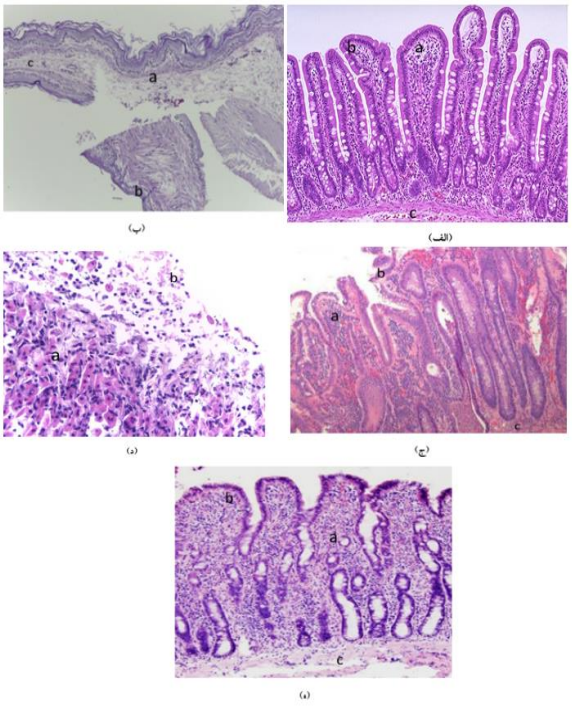
۵. نتایج بافت شناسی

مشاهدات مرفولوژیک به دست آمده از ارزیابی کریپت ها به تنهایی جهت مشخص نمودن بهبود التهاب کفایت نمی‌نماید بدین لحاظ بررسی و مطالعات بافت شناسی روده موش‌ها مورد آزمون پرداخته شد. نتایج بدست آمده از برش بافتی در شکل ۲ مشخص شد.

با توجه به شکل ۲ بافت دیواره روده در موش‌های سالم در قسمت الف بیانگر سلامت کامل ساختاری و کریپت در ناحیه a، مخاط روده ناحیه b و بافت همبند در قسمت c است. در شکل ۲-ب، که بافت روده در موش‌ها با بیماری التهاب بدون درمان است کریپت a و مخاط روده b کاملاً آسیب دیده و بافت همبند روده c هم تاحدودی زیادی دچار آسیب شده است. در تصویر ۲-ج، بافت روده گروه درمان شده با پپتید اسپیرولینا با غلظت ۳/۸ (میلی گرم بر کیلوگرم) کریپت a و مخاط روده b در طول درمان کاملاً بازسازی شده است و هیچگونه التهاب و آسیبی قابل مشاهده نیست.

در شکل ۲-د، بافت روده درمان شده با پپتید اسپیرولینا با غلظت ۱/۶(میلی گرم بر کیلوگرم) کریپت a بازسازی شده و در ناحیه مخاط روده b مقدار کم التهاب قابل مشاهده است. ۲-ه، بافت روده گروه درمان شده با داروی امپرازول کریپت a التهاب دیده می‌شود ودر مخاط روده b آسیب مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت پپتیدهای زیست فعال حاصل از سیانوباکتر اسپیرولینا در طول دوره‌ی تیمار اثر بخشی مطلوبی در بهبود التهاب در موش‌ها در دوز ۳/۸ میلی گرم بر کیلوگرم را نشان داد و این در حالی است که داروی امپرازول که یک داروی ضدالتهابی شیمیایی شناخته شده است اثر بخشی محدودی در مقایسه با پپتید زیست

فعال حاصل از اسپیرولینا داشته است که این می‌تواند مربوط به طول مدت تیمار، دوز وپریود مصرف این دارو باشد.



شکل ۲: نتایج بافت شناسی اثرات ضد التهابی پپتید زیست فعال اسپیرولینا پلاتنسیس در موش‌های Balb/C مبتلا به شده به التهاب با اسید استیک رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین–ائوزین، بزرگ نمایی :x۴۰۰
a کریپ روده، b قسمت مخاط روده و c بافت همبند روده
(الف) برش بافتی روده بزرگ در گروه کنترل (ب) برش بافتی روده گروه شاهد التهابی که هیچگونه درمانی دریافت نکرده است. همانطور که مشاهده می‌گردد کریپت و مخاط روده آسیب شدید پیدا کرده است به گونه‌ای که قابل تشخیص نیست (ج) برش بافتی روده بزرگ دارای التهاب تیمار شده با غلظت ۳/۸ (میلی گرم بر کیلوگرم) (د) برش بافتی روده بزرگ دارای تیمار شده با غلظت ۱/۶ (میلی گرم بر کیلوگرم) پپتید (ه) برش بافتی روده تیمار شده با داروی امپرازول همانطور که مشاهده می‌گردد مخاط روده آسیب پیدا کرده است و بهبود نیافته است.

Fig. 2: Histological results of the anti-inflammatory effects of the bioactive peptide Spirulina platensis in Balb/C mice Inflammatory with hematoxylin-eosinstained acetic acid, magnification: x 400
a intestinal creep, b intestinal mucosa and c intestinal connective tissue.
(A) Tissue incision of the colon in the control group (B) Tissue incision of the inflammatory control group that has not received any treatment. As can be seen, the crypt and intestinal mucosa are severely damaged so that it is not detectable. (C) Inflammatory tissue incision of the colon with a concentration of 3.8 (mg/kg) Contained with a concentration of 1.6 (mg/kg) peptide (E) in the tissue section of the intestine treated with omeprazole, as can be seen, the intestinal mucosa was damaged and did not heal.

بهینه میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز برای هیدرولیز پپتید اسپیرولینا در شرایط دما ۶۰ درجه سانتیگراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و pH ۷/۵ است. طبق نتایج Sharma و همکاران بهینه میزان فعالیت آنزیم آلکالاز در pH ۸ و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد است [۴].

نتیجه آزمایش Al-Zubaidy و همکاران در بهینه سازی فعالیت آنزیم اکتیدین در pH ۷، زمان ۳۰ دقیقه است [۲۰]. این در حالی است که این محققین فقط از عداد صحیح برای تعین pH استفاده کرده‌اند و در آزمایش ما با توجه به استفاده کردن از اعشار برایpH, بهینه فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز ۷/۵ است. در آزمایشی که توسط Minh برای بهینه سازی آنزیم آلکالاز انجام شد، شرایط بهینه استفاده از آنزیم آلکالاز دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، pH ۷/۵ و زمان ۱۸۰ دقیقه است [۲۱].

نتایج به دست آمده آزمایش حاضر برای بهینه سازی آنزیم آلکالین پروتئاز مطابق با نتایجی است که از آزمایش Minh به دست آمده است و تفاوت در زمان هیدرولیز آنزیمی است که بهینه زمان مناسب برای آنزیم آلکالین پروتئاز ۲۱۰ دقیقه است. در واقع بهینه شرایط pH آنزیم بین ۷ تا ۸ است و طبق نتایج بهترین pH ۷/۵ است. بیشترین تأثیر گذاری به واسطه دما اتفاق می افتد و pH از تأثیر گذاری کمتری نسبت به دما در بهینه سازی آنزیم برخوردار است.

طبق نتایج به دست آمده آزمایش حاضر وزن پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا (در طی الکتروفورز) دارای وزن مولکولی ۱۲ کیلودالتون هستند. طی آزمایشی که Tejano و همکاران برای تعیین وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال جلبک سبز Chlorella *sorokiniana* انجام دادند مشخص شد، پپتید زیست فعال کلرلا در تمام باندهای انتخاب شده در SDS-PAGE در محدوده ۱۰ تا ۲۵۰ کیلو دالتون شناسایی شده است که دارای خواص سلامتی بخش متنوعی بودند [۲۲]. نتایج آزمایش Xia وهمکاران در مورد تعیین وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال جلبک *Dunaliella salina* مشخص شد وزن مولکولی این پپتیدها در SDS-PAGE در محدوده ۰/۵ تا ۳ کیلو دالتون است و پپتیدها با وزن مولکولی ۱ کیلو دالتون در دونالیلا دارای خواص سلامتی بخش بود [۲۳]. همانگونه که مشخص است جلبک‌ها و سیانوباکتری ها بعنوان منابع غنی پروتینی، گزینه‌های مناسبی برای تولید پپتیدهای زیست فعال می‌باشند. که بر اساس نوع و وزن پپتید دارای خواص سلامتی بخشی گسترده نظیر اثرات ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضد ویروسی، آنتی اکسیدانی و... می‌باشند. بگونه ای که در حال حاضر در صنعت غذا بعنوان عوامل پیشگیری از بیماری در تولید فراورده‌های فراسودمند کاربری گسترده‌ای یافته‌اند.

نتایج به دست آمد از بررسی مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز بیانگر این است که میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به موش‌های گروه شاهد التهابی بدون درمان افزایش معناداری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به موش‌های گروه کنترل (گروه شاهد سالم) داشته، در موش‌های گروه‌های دریافت کننده داروی امپرازول، دریافت کننده پپتید با غلظت ۱/۶(میلی گرم بر کیلوگرم) و پپتید با غلظت ۳/۸(میلی گرم بر کیلوگرم) کاهش چشم گیری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به گروه شاهد التهابی داشته است. کاهش آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون یکی از

نشانه‌های کاهش التهاب در روده است. در مطالعه انجام شده توسط Samani Jahromi و همکاران نتایج در بررسی تغییرات فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بین گروه‌های مورد بررسی نشان داد که میانگین تغییرات فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروهی که التهاب در آنها کاهش یافته، افزایش معناداری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل داشته و در سایر گروه‌ها نسبت به گروه کنترل تغییر معناداری مشاهده نشد. در نتیجه تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز با میزان التهاب رابطه مستقیم دارد و بهبود التهاب باعث کاهش آنزیم آلکالین فسفاتاز نسبت به شاهد التهابی می‌شود [۲۴]. در آزمایشی که توسط Hemayatkhaah بر فعالیت آنزیم آلکالن فسفاتاز بعنوان معیاری از التهاب و آسیب بافتی در موش‌های سوری انجام گرفته است. نتایج نشان داد فعالیت این آنزیم در موش‌های گروه کولیت (زخم) افزایش معنی داری ($P < ۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل داشته در حالی که در گروه‌های دریافت کننده سیلی مارین کاهش معنی دار ($P < ۰/۰۵$) نسبت به گروه زخم است [۱۵]. نتایج آزمایش حاضر مطابق با نتایج آزمایش‌های محققین دیگر است.

در شکل ۲ بافت روده گروه دریافت کننده پپتید اسپیرولینا با غلظت ۳/۸(میلی گرم بر کیلو گرم) کریپت و مخاط روده در طول درمان کاملاً بازسازی شده است و هیچگونه التهاب و آسیبی قابل مشاهده نیست و بیشترین آسیب در بافت روده در موش‌ها با بیماری التهاب بدون درمان است که کریپت و مخاط روده کاملاً آسیب دیده و بافت همبند روده هم تاحدودی زیادی دچار آسیب شده است. در مطالعه‌ای که توسط Takhshid و همکاران جهت ایجاد کولیت اولسراتیو تجربی حاد از روش تزریق درون رکتومی اسیداستیک ۴٪ استفاده گردید. نمرات آسیب میکروسکوپی کولون در گروه کولیت در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد.

مقایسه نمرات آسیب کریپت در گروه‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان آسیب مربوط به گروه کولیت بود [۲۵]. در آزمایشی که توسط Hemayatkhaah و همکاران بر روی موش‌های سوری برای ایجاد کولیت (زخم) روده با کمک اسیداستیک ۴٪ انجام گرفته است. درجه‌ی آسیب میکروسکوپی کریپت و شدت التهاب به روش مورتی مشخص گردید. مقایسه نمره درجه آسیب و التهاب کریپت در گروه‌های مختلف نشان داد که بالاترین نمره مربوط به گروه دارای زخم بدون درمان است [۲۶]. نتایج به دست آمده آزمایش حاضر برای بررسی کریپت ها مطابق با نتایج آزمایش‌های محققین دیگر است. و در نتایج بافت شناسی میزان التهاب در روده موش‌های بدون تیمار درمانی که توسط اسید استیک ۴٪ ایجاد شده است کاملاً قابل مشاهده است.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت پپتیدهای حاصل از سیانوباکتر اسپیرولینا در طول دوره‌ی درمان توانسته‌اند التهاب موجود روده در موش‌ها را درمان کنند و دوز بهینه در ۳/۸ میلی گرم بر کیلوگرم است. در مطالعه صورت گرفته توسط Rezaei و همکاران بر روی خواص ضدالتهاب پودر اسپیرولینا و عسل بر روی موش مشخص شد خواص ضدالتهابی عسل و اسپیرولینا کاملاً مشهود است ولی در موش‌هایی که عسل و اسپیرولینا به طور هم زمان استفاده کرده‌اند نتایج بهبود التهاب بیشتر است و طبق نتایج بافت شناسی در این موش‌ها التهاب به میزان بیشتری بهبود یافته است [۲۷].

طی آزمایش انجام گرفته توسط Abdel-Daim و همکاران روی خواص ضدالتهابی اسپیرولینا و دونالیلا بر روی موش رت مشخص شده هر دو دارای خواص ضدالتهابی در روده موش هستند، اما سیانوباکتر اسپیرولینا دارای اثر درمانی بیشتری است [۲۸]. نتایج به دست آمده آزمایش حاضر برای بررسی خاصیت ضدالتهابی سیانوباکتر اسپیرولینا بر روده ملتهب موش‌های سوری مطابق با نتایج آزمایش‌های محققین دیگر است و تفاوت نتایج آزمایش ما در این است که موش‌ها پس از دریافت پپتید اسپیرولینا بهبودی کامل دریافت کرده‌اند این در حالی است که در کار پژوهشگران دیگر بهبودی نسبی برای موش‌های دریافت کننده پودر سیانوباکتر اسپیرولینا گزارش شده است و با توجه به اینکه در ایران اولین بار به بررسی پپتیدهای ضدالتهابی سیانوباکتر اسپیرولینا پرداخته شده می توان گفت پپتیدهای زیست فعال حاصل از اسپیرولینا خاصیت ضدالتهابی دارند.

نتیجه‌گیری

پپتیدهای زیست فعال سیانوباکتر اسپیرولینا با وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون دارای خواص ضدالتهابی بوده و می‌توانند در بهبود بیماری التهاب روده مؤثر باشند. که طی این آزمایش مشخص شد بهترین دوز مصرفی با توجه به نتایج بافت شناسی غلظت ۳/۸ میلی گرم بر کیلو گرم است که التهاب در بافت روده مشاهده نمی‌شود. دستیابی به پپتید نیازمند هیدرولیز آنزیمی است که شرایط بهینه هیدرولیز آنزیمی، آنزیم آلکالین پروتئاز در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و pH ۷/۵ است. با توجه به نتایج به دست آمده در بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز خون هم نمایانگر این است که موش‌های دریافت کننده پپتید با غلظت ۳/۸ میلی گرم بر کیلوگرم، کمترین میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون قابل تشخیص است که خود بیانگر بهبود التهاب روده است. در نتیجه پپتیدهای استحصال شده از سیانوباکتر اسپیرولینا را می‌توان به عنوان یک ضد التهاب بالقوه در برابر التهاب روده معرفی کرد.

مشارکت نویسندگان

در نگارش این مقاله نویسندگان سهم یکسانی داشتند.

تشکر و قدردانی

بخشی از آزمایش‌های این پژوهش در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام شد و مجموعه آزمون‌های درون تنی

در آزمایشگاه آروین زیست پویان انجام گرفت. بدین‌وسیله از پرسنل محترم این آزمایشگاه‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

«هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.»

References

1. Rabiei S, Nikoo M, Rezaei M, Rafieian-Kopaei M. A review on therapeutic effects of marine bioactive peptides in animal models and human. (Persian). *IranJPP*. 2018;**2**(4):213-201.
2. Wijesinghe WA, Jeon YJ. Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. *Fitoterapia*. 2012;**83**(1):6-12. **doi:** 10.1016/j.fitote.2011.10.016 **pmid:** 22061659
3. Zia al-Dini M, Baskaleh G, Zahedi Dizaji M. Optimization of extraction of total phenolic compounds of two types of seaweed Sargassum (Sargassum sp.) and lettuce (Ulva sp.) In Chabahar coastal waters by ultrasonic method. (Persian). *J Oceanogr*. 2019;**10**(38):1-10. **doi:** 10.29252/joc.10.38.1
4. Rafiee F, Nejatkhah Manavi P, Salmanzadeh N. Evaluation of salinity, ammonium and cytokinin changes on biomass and the amount of red algae agar Gracilaria corticate. (Persian). *J Oceanogr*. 2015;**6**(21):107-115.
5. Sharma N, Tiwari P, Tripathi K, Rai A. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *J Appl Phycol*. 2011;**23**(6):1059-1081. **doi:** 10.1007%2Fs10811-010-9626-3
6. Soni R, K. S, Rana R. Spirulina From growth to nutritional product. Trends Food Sci. *Technol*. 2017;**69**(1):157-171. **doi:** 10.1016/j.tifs.2017.09.010
7. Seghiri R, Kharbach M, Essamri A. Functional Composition, Nutritional Properties, and Biological Activities of Moroccan Spirulina Microalga. *J Food Qual*. 2019;**3**:1-11. **doi:** 10.1155/2019/3707219
8. Lisboa C, Pereira A, J. C. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of Spirulina sp. *Afr J Microbiol Res*. 2016;**10**(3):79-86. **doi:** 10.5897/AJMR2015.7760
9. Yücetepe A, Özçelik B. Bioactive Peptides Isolated from Microalgae Spirulina platensis and their Biofunctional Activities. *Akademik Gıda*. 2016;**14**(4):412-417.
10. Liu J, Yang K, Xiao W, Le Y, Lang S, Zhang J, et al. GLP-1 receptor agonists stimulate ANGPTL8 production through the PI3K/Akt pathway in a GLP-1 receptor-dependent manner. *Peptides*. 2018;**106**:83-90. **doi:** 10.1016/j.peptides.2018.07.001 **pmid:** 30003931
11. Deng R, Chow TJ. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovasc Ther*. 2010;**28**(4):e33-45. **doi:** 10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x **pmid:** 20633020
12. Toneedeh N, Lashkarpoor H, Daneshchi S, Asadi Yousefabad S, Koohi-Hossein Abadi O, Hosseinzadeh M. Restorative effect of Teucrium on acetic acid-induced colitis L. in male rats. (Persian). *YUMSJ*. 2018;**2**(13):29-41.
13. Rashid S, Javadi G, Asadzadeh Aghdaei H. Evaluation of gene expression (ANRIL lncRNA) in patients with inflammatory bowel disease. (Persian). *J nums*. 2018;**6**(3):63-75.
14. Bagherian-Sararoudi R, Adibi P, Askari K, Rumi H, Sajjadinejad M, Zargar F. Comparison of psychological adjustment and personality type in patients with ulcerative colitis and healthy people. (Persian). *jtbcp*. 2018;**12**(47):14-26.
15. Hemayatkhaah V. The Investigation of silymarin effect on colon ulcer induced acetic acid in mice. (Persian). *jct*. 2011;**1**(2):21-28.
16. Hajrezaie M, Shams K, Moghadamtousi SZ, Karimian H, Hassandarvish P, Emtyazjoo M, et al. Chemoprevention of Colonic Aberrant Crypt Foci by Novel Schiff Based Dichlorido(4-Methoxy-2-{[2-(Piperazin-4-Ium-1-Yl)Ethyl]Iminomethyl}Phenolate)Cd Complex in Azoxymethane-Induced Colorectal Cancer in Rats. *Sci Rep*. 2015;**5**:12379. **doi:** 10.1038/srep12379 **pmid:** 26201720
17. Al Hinai M, Al Kalbani A, Al Rubkhi B, Al Kalbani U, Walke S. Protein Extraction from Spirulina Platensis. *IJITEE*. 2019;**8**(12):1524-1530. **doi:** 10.35940/ijitee.L3110.1081219
18. Mostafaie A, Chalabi M. Kiwifuit Actinidin: Its Purification and Eeamination of Amount In Different Varieties. (Persian). *JWSS*. 2006;**10**(3):223-230.
19. Sahebi Z, Emtyazjoo M, Mostafavi PG, Bonakdar S. Promising Chemoprevention of Colonic Aberrant Crypt Foci by Portunus segnis Muscle and Shell Extracts in Azoxymethane-Induced Colorectal Cancer in Rats. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020;**20**(17):2041-2052. **doi:** 10.2174/1871520620666200612144912 **pmid:** 32532197
20. Al-Zubaidy M. Optimizing Extraction Conditions of Actinidin from Kiwifruit (Actinidia deliciosa). *IRAQI*. 2017;**28**(3):61-67. **doi:** 10.23851/mjs.v28i3.57
21. Minh N. Alcalase and Protamex Hydrolysis of Bioactive Peptides from Soybean. *J URL*. 2015;**4**(7):132-143.
22. Tejano LA, Peralta JP, Yap EES, Panjaitan FCA, Chang YW. Prediction of Bioactive Peptides from Chlorella sorokiniana Proteins Using Proteomic Techniques in Combination with Bioinformatics Analyses. *Int J Mol Sci*. 2019;**20**(7). **doi:** 10.3390/ijms20071786 **pmid:** 30978907
23. Xia E, Zhai L, Huang Z, Liang H, Yang H, Song G, et al. Optimization and Identification of Antioxidant Peptide from Underutilized Dunaliella salina Protein: Extraction, In Vitro Gastrointestinal Digestion, and Fractionation. *Biomed Res Int*. 2019;**2019**:6424651. **doi:** 10.1155/2019/6424651 **pmid:** 31531361
24. Samani Jahromi E, Zolghadri Jahromi S, Kargar Jahromi H. Histopathological investigation of the effect of alkaline phosphatase on adult male rats' liver tissue based on enzyme inhibition]. (Persian). *Pars J Med Sci*. 2014;**12**(3):59-65. **doi:** 10.29252/jmj.12.3.59
25. Takhshid M, Rosta A, Tavasoli A, Khebaz Z. [Impact of silymarin induced by acetic acid in rats]. (Persian). *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2011;**21**(84):51-63.

26. Hemayatkhaah V, Johary H. The effect of silymarin on acetic acid-induced colon ulcer in Balb/C mice. (Persian). *ASCIJ*. 2010;**3**(1):43-50.
27. Rezaei N, Eftekhari M, Tanideh N, Mokhtari M, Bagheri Z. The Protective Effects of Honey and Spirulina Platensis on Acetic Acid-Induced Ulcerative Colitis in Rats. *Iran Red Crescent Med J*. 2019;**8**:1095-1104. **doi:** 10.31661/gmj.v8i0.1095
28. Abdel-Daim MM, Farouk SM, Madkour FF, Azab SS. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Spirulina platensis in comparison to Dunaliella salina in acetic acid-induced rat experimental colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;**37**(2):126-139. **doi:** 10.3109/08923973.2014.998368 **pmid:** 25567297

AUTHOR(S) BIOSKETCHES

Moghadamzadegan, S., Graduate Master of Marine Biotechnology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

✉ *samanmoghadamzadegan@gmail.com*

Emtyazjoo, M., Associate Professor, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

✉ *m_emtyazjoo@iau-tnb.ac.ir*

Sadeghi, M., Assistant Professor, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

✉ *mahnaZ_Sadat_Sadeghi@yahoo.com.au*

Rabbani, M., Assistant Professor, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

✉ *mhd_rabani@yahoo.com*

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Citation (Vancouver) *Moghadamzadegan S, Emtyazjoo M, Sadeghi M, Rabbani M. Evaluation of Anti-inflammatory Effects of Bioactive Spirulina Platensis Peptides Extracted by Alkaline Protease in Animal Model Balb/C Mice. J Oceanography. 2021; 12(47): 110-119.*

http://doi.org/10.52547/joc.12.47.110

http://joc.inio.ac.ir/article-1-1597-fa.html

https://orcid.org/0000-0002-8311-5238

COPYRIGHTS

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.