



مقاله پژوهشی

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

سمانه مقدم زادگان، مژگان امتیازجو*، مهنازاسادات صادقی، محمد ربانی

گروه بیوتکنولوژی دریا، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: m_emptiazjoo@iau-tnb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۲

چکیده

بیماری التهابی روده، بیماری مزمن دستگاه گوارش است و درمان قطعی دارویی برای این بیماری وجود ندارد. اگر از پیشرفت این بیماری جلوگیری نشود موجب بروز بیماری‌های خطرناکی از جمله سرطان روده بزرگ می‌شود. سیانوباکتری اسپیرولینا یک منبع منحصر به فرد از مواد زیست‌فعال طبیعی با خواص بالقوه در سلامت‌زایی می‌باشد. هدف مطالعه حاضر، تهیه آنزیم سیستین پروتئاز میوه کیوی و بهینه‌سازی استخراج پپتید زیست فعال اسپیرولینا پلاتنسیس توسط آنزیم سیستین پروتئاز و بررسی خاصیت ضدالتهابی پپتیدهای استخراج شده اسپیرولینا در موش‌های مبتلا به التهاب روده می‌باشد. بدین منظور از روش سطح پاسخ RSM عملکرد بهینه آنزیم مشخص شد 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 نگهداری شد. جهت بررسی اثرات ضدالتهابی در ۲۸ سر موش Balb/C با اسیداستیک چهار درصد التهاب القا گردید. پس از اطمینان از التهاب پپتید با غلظت (۳/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و داروی امپرازول به عنوان کنترل مثبت و آب به عنوان کنترل منفی به موش‌های Balb/C مبتلا به زخم روده، گاوآذ انجام شد. نتایج نشان داد وزن مولکولی آنزیم سیستین پروتئاز ۲۴ کیلودالتون است و بهینه شرایط هیدرولیز آنزیمی سیستین پروتئاز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و pH ۷/۵ بدست آمد. نتایج بافت‌شناسی وجود التهاب در گروه شاهد و در موش‌هایی که پپتید با غلظت ۳/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم بافت روده ترمیم، کریپت و مخاط روده در طول درمان کاملاً بازسازی شده بود را نشان داد. آنزیم آلکالین فسفاتاز در موش‌هایی که پپتید دریافت کردند پایین آمده که نشانه بهبود التهاب در موش‌ها است. در نتیجه پپتیدهای زیست‌فعال اسپیرولینا توانسته التهاب موجود در روده موش‌ها را درمان کند.

کلمات کلیدی: پپتیدهای زیست فعال، التهاب، اسپیرولینا، آنزیم سیستین پروتئاز، موش Balb/C

مقدمه

است (۴، ۱۳). کریپت یا غده روده‌ای، فرورفتگی‌های لوله شکل اپی‌تلیوم در بافت همبند آستر می‌باشند که تا عضلات مخاطی ادامه یافته است. کریپت‌های روده‌ای عامل دیگری برای افزایش سطح روده محسوب می‌گردد. با توجه به وظایف مهم کریپت‌ها

بیماری التهاب روده (IBD) اختلالات التهابی مزمن دستگاه گوارش است. پیش‌بینی این بیماری مزمن دشوار است. التهاب روده بر روی چندین نوع سلول در دستگاه گوارش از جمله سلول‌های اپیتلیال، کریپت، نورون‌های روده‌ای و پلاکت خون تاثیرگذار

میلیون آمریکای شمالی مبتلا به بیماری التهابی روده هستند. در کشورهای تازه صنعتی شده که با تغییرات چشمگیری در رژیم غذایی، از جمله افزایش قرار گرفتن در معرض مواد غذایی فرآوری شده، قندهای تصفیه شده، لبنیات و فیبرهای گیاهی، استرس و سیگار کشیدن شیوع بیماری التهابی روده در حال گسترش است (۹). ترکیبات دارویی عوارض جانبی مانند سردرد، اسهال و حالت تهوع دارند که میتواند به جای بهبود بیمار منجر به بدتر شدن وضعیت آن شود (۶). از آنجا که میزان ابتلا به این بیماری در سراسر جهان در حال افزایش است، تأثیر اقتصادی روز افزونی سنگینی بر دوش سیستم مراقبت‌های بهداشتی و اقتصاد خواهد داشت. بنابراین، مهم است که برنامه‌ریزی برای نیازهای عمده بیماران مبتلا به التهابی روده در کشورهای در حال توسعه، به ویژه با توجه به تشخیص و مراقبت مناسب و با توجه به تأثیر اضافی هزینه‌های بالای درمان‌های دارویی نو ظهور باشد. میزان شیوع بالا در جهان در شرایطی که درمان پزشکی ناموفق است، ممکن منجر به جراحی شود (۱۱).

یکی از شناخته‌شده‌ترین تولیدکنندگان طبیعت سیانوباکترها هستند و یکی از گونه‌های معروف سیانوباکترها، *Spirulina platensis* است. طبق آخرین رده بندی توسط NCBI اسپیرولینا جز سلسله Bacteria، رده Cyanobacteria، راسته Spirulinales و خانواده Spirulinaceae طبقه بندی میشود (۶).

اسپیرولینا از قدیمی ترین فتوسنتز کننده های زمین است که تقریباً ۳/۶ میلیارد سال پیش بر روی زمین زیست میکرده است. این سیانوباکتر رشته ای، به طور طبیعی در دریاچه های گرمسیری و نیمه گرمسیری با pH بالا رشد میکند. طبق گزارشات مندرج شده در یونسکو، استفاده از اسپیرولینا به عنوان یک منبع غذایی در بخش‌های مختلف دنیا از قدمت طولانی

اگر این سلول‌ها بر اثر التهاب دچار آسیب شوند در واقع عملکرد سلول دچار اختلال می‌شود، بررسی آسیب کریپت‌ها مشخص می‌کند چه مقدار از روده آسیب دیده و چه میزان از عملکرد روده بر اساس التهاب کاهش یافته است (۷). بیماری‌های التهابی روده، بیماری است که هیچ درمان دارویی دائمی ندارند و می‌توانند منجر به عوارض قابل توجه طولانی مدت شوند. علت دقیق بیماری التهابی روده شناخته شده نیست فاکتورهای مختلفی وجود دارد مانند آلودگی باکتریایی، تغییر در سیستم ایمنی بدن، تغییرات ژنتیکی و عوامل محیطی که فرض می‌شود در بروز این بیماری تأثیر داشته باشد (۶). در مجموع، این شرایط می‌تواند منجر به تضعیف علائم جسمی، روانی، اجتماعی و مالی قابل توجهی همراه با اختلال در کیفیت زندگی مرتبط با سلامتی در این بیماران شود بیشتر هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی ناشی از تامین دارو است (۹، ۱۱). بیماری التهابی روده در کشورهای صنعتی شیوع بیشتری دارند (۶). مدت-هاست که مشکل جوامع غربی با توجه به سبک زندگی غربی است، اکنون در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است و به طور فزاینده ای یک بیماری جهانی نو ظهور محسوب می‌شود. علی‌رغم محدود بودن همه گیری کشورهای در حال توسعه، اکنون روشن است که شیوع بیماری التهابی روده در سراسر جهان در حال افزایش است و جمعیت جوان جوامع بیشتر درگیر این بیماری می‌شوند. همچنین بیماری التهابی روده اگر درمان نشود منجر به افزایش قابل توجهی ابتلای مبتلایان به سرطان روده بزرگ میشود (۱۱). طی دهه گذشته، مطالعات محققین گسترده ای روی ژنوم بیش از ۲۰۰ مکان ژنتیکی مرتبط با بیماری التهابی روده را شناسایی کرده اند که برخی از آنها با سایر بیماری‌های خود ایمنی مزمن مشترک هستند. بیش از ۲ میلیون اروپایی و ۱/۵

ایمنی، ضدسرطانی، ضد میکروبی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، کاهش فشارخون، ضد استرس اکسیداتیو و کاهش کلسترول خون هستند. پپتیدهای زیست فعال به طور عمده از منابع پروتئینی گیاهی و جانوری به دست می‌آیند. جلبک‌ها منابع بسیار عالی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت زیستی هستند که می‌توانند منجر به توسعه اجرای عملکردی مفید شوند (۳۰).

ترکیبات مختلفی برای آزاد کردن ترکیبات محلول از ماتریکس جلبک‌ها استفاده می‌شود. روش پایه برای نمونه‌هایی در مقیاس بالا استخراج پودر جلبک با حلال‌های آبی یا حلال‌های آلی است. حضور پلی ساکاریدهای مختلف با مقادیر زیاد در دیواره سلولی، کارآمدی استخراج را در طی روش‌های عصاره‌گیری کلاسیک را پایین می‌آورد. اخیراً روش‌ها جدیدتری از استخراج مثل هضم آنزیمی و استخراج با کمک امواج میکروویوگسترش یافته است (۱۸). با هضم آنزیمی جلبک‌ها بازه بالاتر و افزایش فعالیت زیستی در مقایسه با استخراج با حلال‌های آلی و آبی به دست می‌آید. لذا استخراج با کمک آنزیم‌ها به عنوان یک روش انتخابی برای به دست آوردن ترکیبات مفید از جلبک‌ها است. هیدرولیز آنزیمی مواد به چندین فاکتور فیزیکی شیمیایی بستگی دارد شامل زمان انکوباسیون، دما، pH و بهینه عملکرد آنزیمها و همچنین نسبت سوبسترا به آنزیم (غلظت آنزیم) از متغیرهای مهم در نظر گرفته شده است (۳۰). یکی از پپتیدهای گیاهی که قدرت هیدرولیز پروتئین برای تولید پپتید را دارد، آنزیم سیستمین پروتئاز میوه کیوی است. کیوی *Actinidia chinensis* میوه بومی جنوب چین است (۲۳). در حال حاضر گستره وسیعی از مزارع پرورشی شمال کشور را به خود اختصاص داده است. در این تحقیق با توجه به اینکه بیماری التهابی روده یک بیماری مزمن است و درمان قطعی ندارد و با در نظر گرفتن اثرات سو داروهای شیمیایی از

برخوردار است. اسپیرولینا در حال حاضر در بیش از ۲۲ کشور جهان تولید و در بیش از ۷۷ کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۵). 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) تایید شده است (۲۲). در حال حاضر اسپیرولینا در بیوتکنولوژی، سوخت‌های زیستی، غذای سالم، مصارف دارویی، مکمل‌های غذایی، محرک‌های زیستی کشاورزی و مواد آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۵). محتوای پروتئین اسپیرولینا در محدوده ۵۵ تا ۷۷ درصد است. که این مقدار پروتئین بیشتر یا معادل پروتئین گوشت گاو، مرغ و دانه‌های سویا است. همچنین مشخص شده است که اسپیرولینا منبع غنی از مواد ضروری و غیرضروری است از جمله اسیدهای آمینه غیرضروری، اسیدگاما-لینولنیک (GLA)، کاروتنوئیدها، اسید لینولنیک، اسید آراشیدونیک، ویتامین‌ها، آهن، کلسیم، فسفر، اسیدهای نوکلئیک RNA و DNA، کلروفیل و فیکوسیانین که طیف گسترده‌ای از سلامتی را ارائه می‌دهد (۲۴). 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 (۱۴)، (۳۲) پپتید درمانی از زمان ظهور انسولین در دهه ۱۹۲۰ نقش مهمی در عمل پزشکی داشته است (۱۲). پپتیدهای زیست فعال معمولاً حدود ۳-۴۰ آمینو اسید دارند (۵). آمینو اسیدهای پپتیدهای زیست فعال تا زمانی که با دیگر آمینو اسیدهای موجود در ساختار اولیه پروتئین متصل شده اند، بصورت غیرفعال می‌مانند. این پپتیدها طی هضم گوارشی، فرآوری یا هضم آنزیمی توسط آنزیم آزاد می‌شوند. شکل آزاد شده این پپتیدها بدلیل داشتن خصوصیات زیست فعال دارای عملکردهای فیزیولوژیک متعددی همانند تحریک

شد. محلول دیالیز شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور (rpm) ۲۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی جدا و در ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

تعیین وزن مولکولی آنزیم سیسبئین پروتئاز به کمک ژل الکتروفورز (PAGE-SDS): با استفاده از روش الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید در ژل جداکننده ۱۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد انجام گرفت. پس از آماده‌سازی ژل و قراردادن آن در تانک الکتروفورز، ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۱۰ میکرولیتر از بافر فسفات، مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و به دنبال آن نمونه‌گذاری و تفکیک انجام گردید. پس از انجام الکتروفورز در ولتاژ ۱۵۰ ولت، ژل با رنگ کوماسی آبی (R-250) رنگ آمیزی شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

تهیه پپتید از سیانوباکتر اسپیرولینا: در ابتدا ماسیراسیون اسپیرولینا در ۲۴ ساعت انجام و سپس از امواج ماوراء صوت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، 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 سانتریفیوژ 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 سانتریفیوژ و با بافر فسفات ۵ mM با $\text{pH} = 7/8$ مخلوط شد (۳). استحصال پتید با استفاده از کیسه دیالیز ۱۲ کیلودالتون انجام شد (۱۶). 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

پپتیدهای زیست فعال سیانوباکتر اسپیرولینا پلاتنسیس که خاصیت ضدالتهابی دارند که به کمک آنزیم سیسبئین پروتئاز استخراج شده از میوه کیوی استحصال شدند، استفاده گردید. برای تشخیص بهبود التهاب به بررسی تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز پرداخته شد. آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از آنزیم های مهم کبدی است. تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون بیانگر عارضه التهابی روده است و یکی از راه های 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 ضدالتهابی پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا اختصاص یافت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش پودر سیانوباکتر اسپیرولینا از شرکت آرین گستر تهیه شد و برای تهیه آنزیم سیسبئین پروتئاز از میوه کیوی پرورش یافته در شمال ایران استفاده شد.

تهیه آنزیم سیسبئین پروتئاز از میوه کیوی: پس از تهیه میوه کیوی ابتدا پوست و دانه ها جدا و بخش گوشتی بصورت یکنواخت مخلوط گردید. عصاره به دست آمده از چند لایه صافی عبور داده شد. به عصاره صاف شده اسید اسکوربیک یک مولار اضافه و مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. عصاره به مدت ۳۰ دقیقه در دور (rpm) ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری گردید. به عصاره سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۹۰ درصد به آرامی و در حال هم زدن اضافه شد. نمونه یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و به رسوب بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با $\text{pH} 5/5$ اضافه و یک شب در مقابل بافر سیترات دیالیز (کیسه دیالیز ۱۲ کیلو دالتون)

سازی شد (جدول ۱). در انتها پپتیدهای اسپیرولینا برای بررسی خواص ضد التهابی بر روی موش‌های Balb/c در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته نگهداری شد.

آماده سازی موش: ۲۸ سر موش نر Balb/C به وزن تقریبی ۱۸-۲۰ 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 ۲۳-۲۵ درجه سانتیگراد در قفس‌های جدا گانه در ۴ گروه ۷ 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 (۲).

القاء التهاب در موش‌ها: به منظور ایجاد التهاب موش‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در حالت روزه‌داری نگه داشته و فقط اجازه مصرف آب داده شد. با استفاده از اسید استیک ۴ درصد (۲ میلی‌لیتر) تزریق درون رکتومی التهاب در موش‌ها القاء گردید. در روز دوم آزمایش برای تایید التهاب در روده موش‌ها، به طور تصادفی از آنها نمونه برداری انجام شد. 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 و این کار به مدت ۴ روز تکرار گردید. گروه ۱- موش‌های کنترل بدون ایجاد بیماری. گروه ۲- موش‌های شاهد دارای زخم روده (بدون تیمار درمانی) که آب مقطر دریافت کردند. گروه ۳- موش‌های دارای التهاب +۳/۸ میلی گرم بر کیلوگرم پپتید زیست فعال خاص از اسپیرولینا دریافت کردند. گروه ۴- موش‌های دارای التهاب که داروی شیمیایی امپرازول دریافت کردند. پپتید حاصله از طریق گاوژ به موش داده شد (۲).

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 ۲۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگهداری شد و پس از لخته شدن خون‌ها، نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت (rpm) ۳۰۰۰ سانتریفیوژ و پس از جدا سازی سرم، غلظت آنزیم آلکالین فسفاتاز به روش الیزا توسط کیت آلکالین فسفاتاز پارس آزمون اندازه گیری گردید (۲۸).

مطالعه بافت‌شناسی: برای تهیه نمونه روده موش‌ها ابتدا موش‌ها با کتامین بیهوش و کشته شدند رفتند سپس برای هر موش، ۵ سانتیمتر بخش انتهایی روده بزرگ خارج گردید. سپس کولون به صورت طولی برش داده شد و روده را به ظرف حاوی فرمالین ۱۰ درصد منتقل گردید. نمونه‌های روده بعد از فیکس شدن در فرمالین ۱۰ درصد، در الکل آبگیری به منظور آبگیری بافت، نمونه‌ها را به ترتیب در الکل ۵۰ درصد، ۷۰ درصد و ۹۰ درصد مطلق قرار داده شد که با این عمل آب بافت، جذب الکل شده و الکل جایگزین آن شد. سپس نمونه را در داخل محلولی به نام گزیلول قرار داده شد که آن نیز جایگزین الکل می‌گردد و سپس در پارافین قرار داده شد نمونه آغشته شده با پارافین در این مرحله، در داخل قالب پر از پارافین مذاب، قرار می‌گیرد. ضمن انجماد پارافین، نمونه نیز در داخل باقی مانده و آماده مقطع گیری می‌گردد. نمونه‌ها همراه با قالب پارافین توسط میکروتوم دوار مقاطع ۵ میکرونی تهیه میشود، برش‌های تهیه شده روی لام حاوی ژلاتین قرار داده شد تا روی لام بچسبد و با هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی گردید. درجه ی آسیب میکروسکوپی کریپت و شدت التهاب به ارزیابی و با توجه به ویژگی‌های زیر برای نمره دهی، آسیب کریپت از ۱ تا ۴ به ترتیب

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.

کرپت سالم (۰)، از بین رفتن یک سوم کرپت (۱)، از بین رفتن دو سوم کرپت (۲)، از بین رفتن کل کرپت‌ها و سالم بودن اپیتلیوم (۳)، از بین رفتن کل کرپت‌ها و اپیتلیوم (۴) نمره‌دهی شد (۷).
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آزمایش با استفاده از طرح فاکتوریل تصادفی انجام شد. ارزیابی نمونه‌ها

جدول ۱: بهینه‌سازی آنزیم سیستین پروتئاز پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا

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

نتایج

بهینه‌سازی آنزیم سیستین پروتئاز: با توجه به جدول ۱ آزمایش به روش Plackett-Burman طراحی و پارامترهای بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی مانند دما، نسبت آنزیم به سویسترا، زمان و pH بررسی گردید. از ماتریس Plackett-Burman ۲۷/۰۲۰ تا ۳۶/۹۰۴ درصد پپتید را بدست آمد. در انتها پپتیدها با ترازو وزن شدند 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

در این پژوهش با توجه به نتایج آزمایش بهینه‌سازی آنزیم سیستین پروتئاز که در محیط Design Expert انجام گرفت، پپتید به دست آمد سیانوباکتر اسپیرولینا و اثرات ضدالتهابی آن بررسی گردید.

وزن مولکولی آنزیم سیستین پروتئاز: در عصاره میوه کیوی پروتئین‌های متنوعی که عمدتاً در محدوده وزنی ۵ تا ۳۴ کیلودالتون قرار دارند، دیده میشود. در شکل ۱ وزن مولکولی آنزیم سیستین پروتئاز توسط ژل الکتروفورز مشخص شده است و در قسمت (A) وزن مولکولی آنزیم سیستین پروتئاز میوه کیوی ۲۴ کیلودالتون مشخص شده است.

ارزیابی کریپت: با توجه به آسیب مشاهده شده در کریپت نمره‌دهی انجام گرفت. در موش‌های گروه کنترل التهاب مشاهده نشد (۰). در موش‌های گروه دریافت‌کننده پپتید با غلظت ۳/۸ (میلی‌گرم بر کیلوگرم) کریپت سالم است (۰). در موش‌های گروه دریافت‌کننده داروی امپرازول التهاب دیده می‌شود و یک سوم کریپت از بین رفته است (۱). موش‌های گروه شاهد التهاب کریپت کاملاً از بین رفته است (۴).
بافت‌شناسی: مشاهدات مرفولوژیک به دست آمده از ارزیابی کریپت‌ها به تنهایی جهت مشخص نمودن بهبود التهاب کفایت نمی‌نماید بدین لحاظ بررسی و مطالعات بافت‌شناسی روده موش‌ها مورد آزمون پرداخته شد. نتایج بدست آمده از برش بافتی در شکل ۳ مشخص شد. با توجه به شکل ۳ 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 ۳-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 تا حدودی زیادی دچار آسیب شده است. در تصویر ۳-ج بافت روده گروه درمان شده با پپتید اسپیرولینا با غلظت ۳/۸ (میلی‌گرم 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 ۳-د بافت روده گروه درمان شده با داروی امپرازول کریپت a التهاب دیده می‌شود و مخاط روده b دچار آسیب است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت پپتیدهای حاصل از سیانوباکتر اسپیرولینا در طول دوره‌ی درمان توانسته اند التهاب موجود روده در موش‌ها را درمان کنند و این در حالی است که داروی امپرازول که یک داروی ضدالتهابی شیمیایی است در طول دوره درمان نتوانسته التهاب را کاملاً کاهش یا

حاصل را با توجه به مدل RSM - CCC در Modde 5.0 بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی توسط ماتریس برنامه‌ریزی 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 (%Y) 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. ارزیابی پپتید در مدل Plackett-Burman، نشان داد بهترین شرایط بهینه سازی آنزیم سیستمین پروتئاز برای هیدرولیز آنزیمی پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا طبق نمودار ۱، 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.

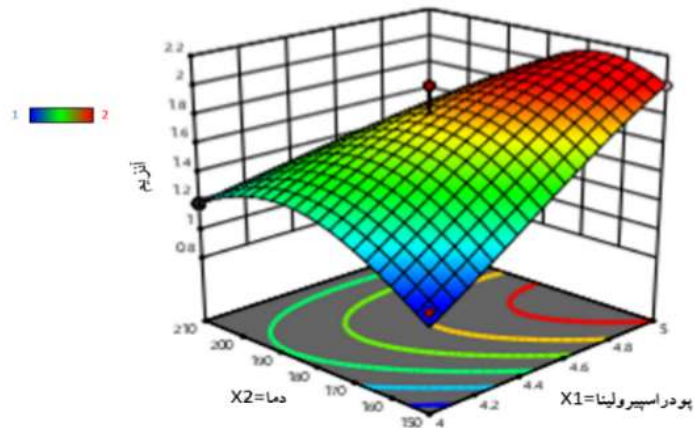
وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال سیانوباکتر اسپیرولینا: پپتیدهای زیست فعال سیانوباکتر *Spirulina peltansis* در SDS-PAGE در محدوده ۵ تا ۱۶۶ کیلو دالتون بررسی شد و مشخص شد پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا دارای وزن مولکولی ۵، ۱۲ و ۱۴ کیلو دالتون هستند.

اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز: میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز خون تیمارهای مورد مطالعه در روز اول و چهاردهم ورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفت (نمودار ۲). کاهش آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون یکی از نشانه‌های کاهش التهاب در روده 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 و در موش‌های گروه‌های دریافت‌کننده داروی امپرازول، پپتید با غلظت ۳/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش چشمگیری ($p < 0/05$) نسبت به گروه شاهد التهابی داشته است.

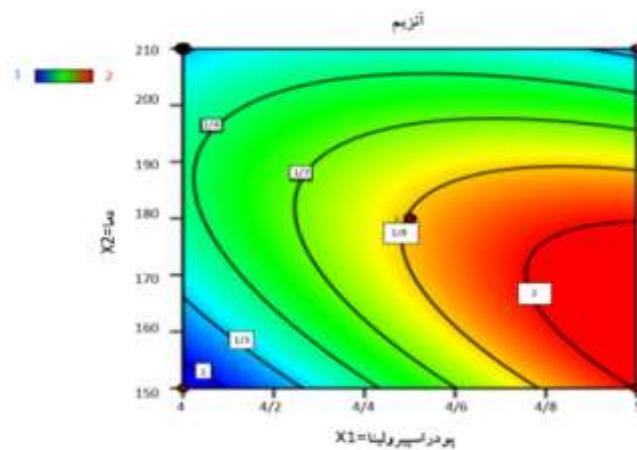
بهبود دهد. در نتیجه پتیدهای زیست فعال اسپیرولینا دارای خاصیت ضدالتهابی است.



شکل ۱- الکتروفورز آنزیم سیستئین پروتئاز میوه کیوی. A آنزیم سیستئین پروتئاز



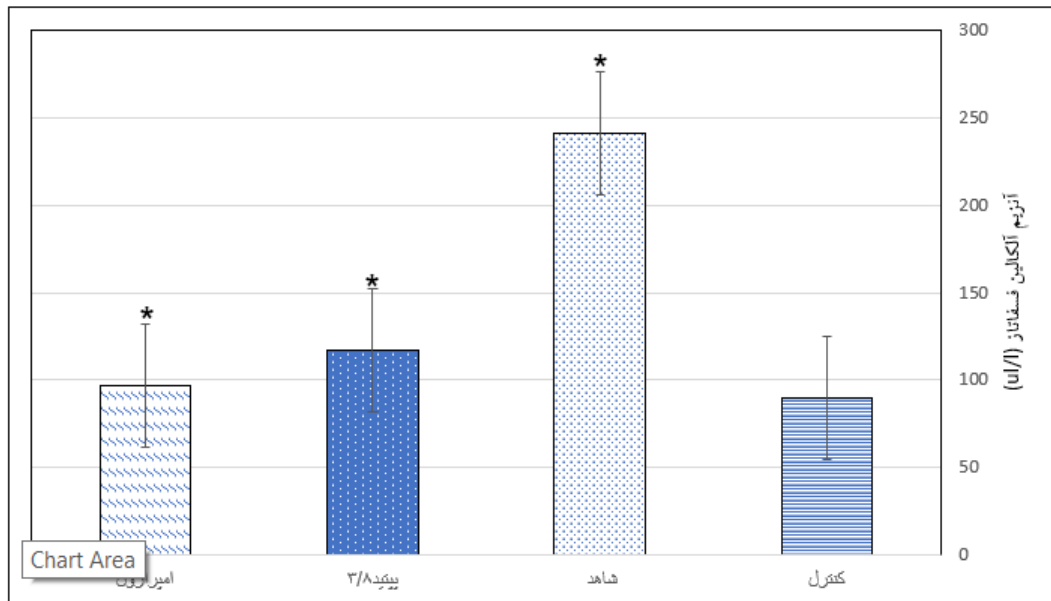
(الف)



(ب)

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

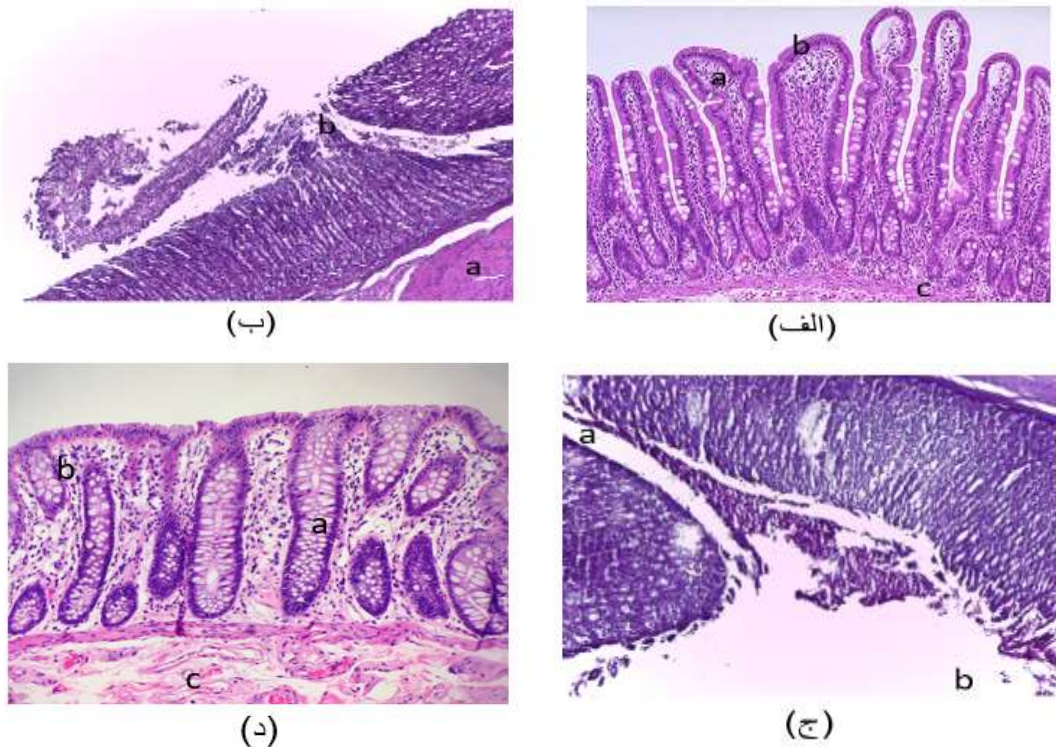
(الف) نمودار سطح پاسخ سه بعدی، (ب) کانتور دوبعدی تغییرات آنزیم سیستئین پروتئاز



نمودار ۲- میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز خون موش های تحت تیمار با پپتید زیست فعال حاصل از اسپیرولینا پلاتنسیس در طول گاوژ. * نشان دهنده افزایش معنی دار غلظت آنزیم در گروه دارای التهاب (شاهد التهابی) در مقایسه با گروه کنترل و کاهش معنی دار در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد التهابی ($p < 0/05$)



شکل ۲- پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا هیدرولیز شده توسط آنزیم سیستئین پروتئاز در ژل الکتروفورز نشان دهنده وزن مولکول در ژل الکتروفورز است و A وزن پپتیدهای سیانوباکتر اسپیرولینا را نشان میدهد



شکل ۳- نتایج اثرات ضد التهابی روده پپتید اسپیرولینا پلاتنسیس در موش‌های مبتلا به التهاب

A: کریپ روده، b: قسمت مخاط روده و c: بافت همبند روده

(الف) ساختمان بافتی روده بزرگ در گروه کنترل. رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگ نمایی $40\times$ (ب) ساختمان 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 کریپت a و مخاط روده b و بافت همبند روده c. (ج) ساختمان بافتی روده بزرگ دارای التهاب درمان شده با پپتید با غلظت $3/8$ (میلی گرم بر کیلوگرم) (د) ساختمان بافتی روده گروه دارای التهاب درمان شده با داروی امپرازول همانطور که مشاهده می‌گردد مخاط روده آسیب پیدا کرده است و بهبود نیافته است. a: کریپت، b: مخاط روده، c: بافت همبند روده.

بحث

آنزیم سیستئین پروتئاز در محدوده ۰ تا $pH=14$ مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد محدوده فعالیت آنزیم سیستئین پروتئاز در pH ۳ تا ۸ است و بیشترین فعالیت آنزیم در pH برابر ۷/۵ است (۱۰). طبق نتایج Popovic و همکاران بهترین شرایط فعالیت آنزیم سیستئین پروتئاز کیوی در pH برابر ۷/۴ است (۱۷). نتایج به دست آمده آزمایش حاضر برای بهینه سازی آنزیم سیستئین پروتئاز مطابق با نتایج محققین دیگر است و بهینه pH آنزیم سیستئین پروتئاز ۷/۵ است.

وزن مولکولی آنزیم سیستئین پروتئاز میوه کیوی در ژل (SDS) ۲۴ کیلودالتون است. در نتایج آزمایش Katamura و همکاران وزن مولکولی آنزیم سیستئین پروتئاز تهیه شده از میوه کیوی در ژل الکتروفورز ۲۴ کیلو دالتون است. نتایج کار ما و پژوهشگران دیگر مطابقت دارد (۱۰). هینه میزان فعالیت آنزیم سیستئین پروتئاز برای هیدرولیز پپتید اسپیرولینا در شرایط دما 60° درجه سانتیگراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و pH ۷/۵ است. نتایج آزمایش و Katamura همکاران بر روی فعالیت

شاهد سالم) داشته، در موش‌های گروه‌های دریافت کننده داروی امپرازول و پیتید با غلظت ۳/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش چشمگیری ($p < 0/05$) (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 سامانی جهرمی 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 ($p < 0/05$) 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 (۲۰). در آزمایشی که توسط حمایت‌خواه بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بعنوان معیاری از التهاب و آسیب بافتی در موش‌های سوری انجام گرفت مشخص شد فعالیت این آنزیم در موش‌های گروه کولیت (زخم) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته در حالی که در گروه‌های دریافت‌کننده سیلی‌مارین کاهش معنی‌دار نسبت به گروه زخم داشته است (۸). نتایج آزمایش حاضر مطابق با نتایج آزمایش‌های محققین دیگر است.

بافت روده گروه دریافت‌کننده پیتید اسپیرولینا با غلظت ۳/۸ (میلی‌گرم بر کیلوگرم) 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 مطالعه ای که توسط تخشید و همکاران جهت ایجاد کولیت

طبق نتایج به دست آمده آزمایش حاضر وزن پپتیدهای زیست فعال اسپیرولینا (در طی الکتروفورز) دارای وزن مولکولی ۵، ۱۲ و ۱۴ کیلودالتون هستند. در آزمایش که Tejano و همکاران برای تعیین وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال جلبک سبز *Chlorella sorokiniana* که جلبک آب شیرین است انجام دادند مشخص شد، پیتید زیست فعال کلرلا در تمام باندهای انتخاب شده در SDS-PAGE در محدوده ۱۰ تا ۲۵۰ کیلودالتون شناسایی شده است و هر کدام از این پپتیدها دارای خواص سلامتی بخش برای انسان است (۲۹). نتایج آزمایش Xia و همکاران در مورد تعیین وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال جلبک *Dunaliella salina* مشخص کرد وزن مولکولی این پپتیدها در SDS-PAGE در محدوده ۰/۵ تا ۳ کیلودالتون است و پپتیدها با وزن مولکولی ۱ کیلودالتون در دونالیلا دارای خواص سلامتی بخش برای انسان‌ها است (۳۱). طبق نتایج این آزمایش و بررسی آزمایشات محققین دیگر می‌توان نتیجه گرفت جلبک-ها از جمله سیانوباکترها و جلبک‌های سبز با توجه به منبع پروتئینی قابل توجه دارای پپتیدهای زیست فعال هستند، که وزن این پپتیدها برای هر گونه متفاوت است و نکته قابل توجه خواص سلامتی بخشی است که این پپتیدهای زیست فعال برای انسان‌ها دارند از جمله خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدانی و... در نتیجه میتوان امیدوار بود در آینده نزدیک پپتیدهای زیست فعال سیانوباکترها از جمله اسپیرولینا و جلبک‌های سبز در درمان بیماری‌ها نقش مهمی داشته باشند و کمک به سزایی به انسان‌ها کنند.

نتایج بررسی مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز بیانگر این است که میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به موش-های گروه شاهد التهابی بدون درمان افزایش معناداری ($p < 0/05$) نسبت به موش‌های گروه کنترل (گروه

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 (۱). نتایج به دست آمده آزمایش حاضر برای بررسی خاصیت ضدالتهابی سیانوباکتر اسپیرولینا بر روده ملتهب موش های سوری مطابق با نتایج آزمایش های محققین دیگر است.

نتیجه‌گیری

پپتیدهای زیست فعال سیانوباکتر اسپیرولینا با وزن مولکولی در محدوده ۵-۱۴ کیلودالتون دارای خواص ضدالتهابی بوده و می‌توانند در درمان بیماری التهاب روده کمک کنند. 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 سیستئین پروتئاز در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و pH برابر ۷/۵ است و مشخص شد وزن مولکولی آنزیم سیستئین پروتئاز ۲۴ کیلو دالتون است. با توجه به نتایج به دست آمده در بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز خون هم نمایانگر این است که موش های دریافت کننده پپتید با غلظت ۳/۸ میلی گرم بر کیلو گرم، کاهش چشم گیری نسبت به گروه شاهد التهابی ($p < 0/05$) داشته است، کاهش آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون بیانگر بهبود التهاب روده است. در نتیجه پپتیدهای استحصال شده از سیانوباکتر اسپیرولینا را می توان به عنوان یک ضد التهاب قوی در برابر التهاب روده معرفی کرد.

منابع

1. Abdel-Daim M., Farouk S., Madkour F., Azab S. 2015. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Spirulina

اولسراتیو تجربی حاد از روش تزریق درون رکتومی اسیداستیک ۴ درصد 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 (۲۶). در آزمایشی که توسط حمایت خواه بر روی موش‌های سوری برای ایجاد کولیت (زخم) روده با کمک اسیداستیک ۴ درصد انجام گرفته است. درجه ی 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 (۸). نتایج به دست آمده آزمایش حاضر برای بررسی کریپت ها مطابق با نتایج آزمایش های محققین دیگر است و در نتایج بافت شناسی میزان التهاب در روده موش های بدون تیمار درمانی که توسط اسید استیک ۴٪ ایجاد شده است کاملاً قابل مشاهده است.

با توجه به نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت پپتیدهای حاصل از سیانوباکتر اسپیرولینا با دوز مصرفی ۳/۸ میلی گرم بر کیلوگرم در طول دوره ی درمان توانسته اند التهاب موجود روده در موش ها را درمان کنند. (این دوز بیشینه میزان پپتید مورد استفاده با توجه به وزن موش های سوری در این آزمایش است) در مطالعه صورت گرفته توسط Rezaei و همکاران بر روی خواص ضدالتهاب پودر اسپیرولینا و غسل بر روی موش مشخص شد خواص ضدالتهابی غسل و اسپیرولینا کاملاً مشهود است ولی در موش هایی که غسل و اسپیرولینا به طور هم زمان استفاده کرده اند نتایج بهبود التهاب بیشتر است و طبق نتایج بافت شناسی در این موش ها التهاب به میزان بیشتری بهبود یافته است (۱۹). طی آزمایش انجام گرفته

- arguta). *The Open Biochemistry Journal*, 13: 54-63.
11. Koma j. 2013. Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem. *Clin Med Insights Gastroenterol*, 6: 33-47.
 12. Lau J., Dunn M. 2018. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(10): 2700-2707.
 13. Li Y., Aiello G., Bollati C., Bartolomei M., Arnoldi A., Lammi C. 2020. Phycobiliproteins from *Arthrospira Platensis* (Spirulina): A New Source of Peptides with Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity. *Nutrients Journal*, 12(794): 2-11.
 14. Lisboa C., Pereira A., Costa J. 2016. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. *African Journal of Microbiology Research*, 10(3): 79-86.
 15. Minh N. 2015. Alcalase hydrolysis of bioactive peptides from soybean. *International Journal Pure & Applied Bioscience*, 3(2): 19-29.
 16. Mostafaie A., Chalabi M. 2006. Purification and achievement of its of value in internal. *Natral resources and science Journal*, 10(3): 223-230. [In Persian]
 17. Popovic M., Andjelkovic U., Grozdanovic M., Aleksic L., Gavrovic-Jankulovic M. 2013. In Vitro Antibacterial Activity of Cysteine Protease Inhibitor from Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Indain Journal Microbial*, 53(1): 100-105.
 18. Rabiei S., Nikoo M., Rezaei M., Rafieian-Kopaei M. 2017. A review on therapeutic effects of marine bioactive peptides in animal models and human. *Iranian Journal of Physiology and Pharmacology*, 4(2): 201-213. [In Persian]
 19. Rezaei N., Eftekhari M., Tanideh N., Mokhtari M., Bagheri Z. 2019. The platensis in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2: 1-14.
 2. Agliano F., Karlinsey K., Ragazzi M., Ménoret A., Vella A. 2020. A benzimidazole inhibitor attenuates sterile inflammation induced in a model of systemic autoinflammation in female mice. *Scientific Reports*, 10(256): 1-16.
 3. Al-Zubaidy M. 2017. Optimizing Extraction Conditions of Actinidin from Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 28(3): 61-67.
 4. Conrad M., Rosh J. 2017. Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr Clin*, 64, 577-591.
 5. Deng R., Chow T. 2010. Hypolipidemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of microalgae spirulina. *Author manuscript*, 28(4): 33-45.
 6. Fakhoury M., Negrulj R., Mooranian A., Al-Salam H. 2014. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of Inflammation Research*, 4(7): 113-120.
 7. Guerrero F., Mercadob J., Zentenoc N., Garfiasa Y. 2020. Comparative analysis of inflammatory response in the BALB/c and C57BL/6 mouse strains in an endotoxin-induced uveitis model. *Journal of Immunological Methods*, 476: 1-6.
 8. Heayatkhaah V. 2011. The Investigation of silymarin effect on colon ulcer induced acetic acid in mice. *Journal of cell and tissue reserch*, 1(2): 21-28. [In Persian]
 9. Jairath V., Feagan B. 2019. Global burden of inflammatory bowel disease. *Published Online*, 19: 1253 -2468.
 10. Katamura S., Wada M., Kozuka M., Sakaue T., Yamane T., Suzuki J., Arakawa Y., Ohkubo L. 2019. Purification and Biochemical Characterization of Cysteine Protease from Baby Kiwi (*Actinidia*

- product. *Trends in food Science & Technology*, 69: 157-171.
26. Verma S., Dixit R., Panday K. 2016. Cysteine Proteases Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in Pharmacology*, 7: 1-12.
27. Takhshid M., Rosta A., Tavasoli A., Khebaz Z. 2010. Impact of silymarin induced by acetic acid in rats. *University of Medical Sciences Mazandaran Journal*, 21(84): 51-63.
28. Tang Z., Chen H., He H., Ma C. 2019. Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113: 32-43.
29. Tejano L., Peralta J., Yap E., Crista F., Panjaitan A., Chang Y. 2019. Prediction of Bioactive Peptides from *Chlorella sorokiniana* Proteins Using Proteomic Techniques in Combination with Bioinformatics Analyses. *Intertional Journal of Molcular Sciences*, 1: 1-16.
30. Wijesinghe W., Jeon Y. 2012. Enzyme assistant extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds. *Fitoterapia*, 83(1): 6-12.
31. Xia E., Zhai L., Huang Z., Liang H., Yang H., Song G., Li W., Tang H. 2019. Optimization and Identification of Antioxidant Peptide from Underutilized *Dunaliella salina* Protein: Extraction In Vitro Gastrointestinal Digestion and Fractionation. *Biomed Res International*, 1: 1-9.
32. Yüçetepe A., Özçelik B. 2016. Bioactive Peptides Isolated from Microalgae *Spirulina platensis* and their Biofunctional Activities. *Akademik Gıda*, 14 (4): 412-417.
- Protective Effects of Honey and *Spirulina Platensis* on Acetic Acid-Induced Ulcerative Colitis in Rats. *Iranian Red Crescent Medical Journal InPress*, 8: 1-11.
20. Samani Jahromi E., Zolghadri Jahromi S., Kargar Jahromi H. 2014. Histopathological investigation of the effect of alkaline phosphatase on adult male rats' liver tissue based on enzyme inhibition. *Pars Journal of Medical Sciences*, 12(3): 59-65.
21. Sasso G., Khachatryan L., Kondylis A., Battey J., Sierro N., Danilova N., Grigoryeva T., Markelova M., Khusnutdinova D., Laikov A., Salafutdinov L., Romanova Y., Siniagina M., Vasiliev Y., Boulygina E., Solovyeva V., Garanina E., Kitaeva V., Ivanov V., Chulpanova S., Kletenkov S., Valeeva A., Maria O., Abdulkhakov R., Ivanov N., Peitsch M., Hoeng J., Abdulkhakov S. 2020. Inflammatory Bowel Disease-Associated Changes in the Gut: Focus on Kazan Patients. *Original Research Article-Basic Science*, 188: 1-16.
22. Seghiri R., Kharbach M., Essamri A. 2019. Functional Composition, Nutritional Properties, and Biological Activities of Moroccan *Spirulina* Microalga, *Journal of Food Quality*, 3: 1-11.
23. Sharma N., Tiwari P., Tripathi K., Rai A. 2018. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Appl Phycol*, 1: 1059-1081.
24. Singh S., Dwivedi V., Sanya D., Dasgupta S. 2020. Therapeutic and Nutritional Potential of *Spirulina* in Combating COVID-19 Infection, *AIJR Preprints*, 49(1): 2-8.
25. Soni R., Sudhakar K., Rana R. 2017. *Spirulina* From growth to nutritional