Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Evaluation the cytotoxicity effects of protein hydrolysates prepared from Greater lizardfish (*Saurida tumbil* (Bloch, 1975)) on mouse breast cancer cell lines (4T1)

Somayeh Bahram*

Corresponding Author, Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran. E-mail: bahram.somayeh123@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 03.06.2023
Revised: 04.04.2023
Accepted: 04.08.2023

Keywords:
Breast cancer,
Greater lizardfish,
Protein hydrolysate

ABSTRACT

Today, the attention of researchers is directed to natural sources to discover new anticancer drugs, so that more than 60% of existing anticancer drugs are of natural origin. Bioactive peptides from aquatic protein sources with multiple biological activities, including anticancer activity, are promising in this field. The present study was conducted with the aim of evaluating the cytotoxicity of hydrolyzed protein prepared from Greater lizardfish on breast cancer cells. Greater lizardfish meat was hydrolyzed with enzymatic hydrolysis with alcalase and papain enzymes with ratios of 2 and 4% enzyme to protein and during 90 and 180 minutes. Mouse breast cancer cell lines (4T1) were subjected to protein hydrolysate samples (1 mg/ml) and incubated for 48 and 72 hours, and then cytotoxicity was determined by MTT colorimetric test. The samples hydrolyzed with alcalase enzyme showed strong cytotoxicity in 48 hours (14.19 to 74.54%) and 72 hours (95.51 to 96.14%) incubation. The samples hydrolyzed with papain also showed moderate toxicity in 48-hour incubation (5.72 to 26.56%) and strong toxicity in 72-hour incubation (93.27 to 96.26%). The highest cytotoxicity in 48-hour incubation was observed by the sample hydrolyzed with alcalase at a concentration of 4% for 180 minutes (74.54%), but in 72-hour incubation, all samples showed cytotoxicity above 90%. The protein hydrolysate of Greater lizardfish inhibited the growth of breast cancer cells and probably with more research in the future, it can be used in cancer treatment.

Cite this article: Bahram, Somayeh. 2024. Evaluation the cytotoxicity effects of protein hydrolysates prepared from Greater lizardfish (*Saurida tumbil* (Bloch, 1975)) on mouse breast cancer cell lines (4T1). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (1), 103-112.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.21098.1757
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

ارزیابی اثرات سمیت سلولی پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون *Saurida tumbil* (Bloch, 1975) بر رده سلولی سرطان پستان موش (4T1)

سمیه بهرام*

نویسنده مسئول، استادیار گروه شیلات، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران. رایانامه: bahram.somayeh123@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۱۲/۱٥
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۰۱/۱٥
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۱/۱۹

واژه‌های کلیدی:
پروتئین هیدرولیزه،
سرطان پستان،
ماهی حسون

چکیده

امروزه توجه پژوهش‌گران جهت کشف داروهای ضدسرطان جدید به منابع طبیعی معطوف شده است، به‌طوری‌که بیش از ٦۰ درصد داروهای ضدسرطان موجود منشأ طبیعی دارند. پپتیدهای زیست‌فعال از منابع پروتئینی آبزیان با فعالیت‌های بیولوژیک متعدد از جمله فعالیت ضدسرطانی در این زمینه نویدبخش هستند. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی سمیت سلولی پروتئین هیدرولیز شده ماهی حسون بر سلول‌های سرطانی پستان صورت گرفت. گوشت ماهی حسون با روش هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم‌های الکالاز و پاپائین با نسبت‌های ۲ و ٤ درصد آنزیم به پروتئین و طی زمان‌های ۹۰ و ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز شد. رده سلولی سرطان پستان موش (4T1) در مجاورت نمونه‌های پروتئین هیدرولیز (۱mg/ml) قرار گرفته و به مدت ٤۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس سمیت سلولی توسط تست رنگ‌سنجی MTT تعیین شد. نمونه‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز سمیت سلولی قوی در انکوباسیون ٤۸ ساعته (۱٤/۱۹ تا ۷٤/٥٤ درصد) و ۷۲ ساعته (۹٥/٥۱ تا ۹٦/۱٤ درصد) نشان دادند. نمونه‌های هیدرولیزشده توسط پاپائین نیز سمیت متوسط در انکوباسیون ٤۸ ساعته (٥/۷۲ تا ۲٦/٥٦ درصد) و قوی در انکوباسیون ۷۲ ساعت (۹۳/۲۷ تا ۹٦/۲٦ درصد) نشان دادند. بیش‌ترین سمیت سلولی در انکوباسیون ٤۸ ساعته توسط نمونه هیدرولیزشده با آنزیم آلکالاز در غلظت ٤ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه (۷٤/٥٤ درصد) مشاهده شد، ولی در انکوباسیون ۷۲ ساعته تمامی نمونه‌های سمیت سلولی بالای ۹۰ درصد نشان دادند. پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان گردید و احتمالاً با پژوهش‌های بیش‌تر در آینده، می‌توان از آن در درمان سرطان بهره جست.

استناد: بهرام، سمیه (۱۴۰۳). ارزیابی اثرات سمیت سلولی پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون *Saurida tumbil* (Bloch, 1975) بر رده سلولی سرطان پستان موش (4T1). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۱)، ۱۱۲-۱۰۳.
DOI: 10.22069/japu.2023.21098.1757

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

سرطان‌ها از مهم‌ترین مشکلات سیستم‌های بهداشتی و دومین عامل شایع مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشند که سالانه منجر به مرگ حدود ۱۰ میلیون نفر می‌گردند. در میان انواع سرطان، سرطان پستان با حدود ۲/۲٦ میلیون مورد جدید در سال ۲۰۲۰ شایع‌ترین نوع سرطان در زنان و به‌طورکلی شایع‌ترین سرطان در جهان به‌شمار می‌رود (۱). هر چند میزان سرطان پستان در اروپای غربی و آمریکای شمالی بیش‌تر است، ولی شیوع آن در کشورهای در حال توسعه به دلیل افزایش امید به زندگی، شهرنشینی و پذیرش سبک زندگی غربی به سرعت در حال افزایش است (۲). بر اساس گزارش‌های ثبت ملی سرطان ایران، بروز سرطان پستان در زنان ایرانی نیز روند رو به افزایشی داشته است. علاوه بر این سن بروز سرطان پستان در زنان ایرانی در دهه چهارم و پنجم زندگی است که یک دهه جوان‌تر از سن ابتلای جهانی است (۳).

تاکنون چندین عامل خطر برای سرطان پستان شناسایی شده است: عوامل خطر غیرقابل تغییر عبارتند از: سن بالاتر، استعداد ژنتیکی، قاعدگی زودرس، یائسگی دیررس، سن حاملگی اول بالای ۳۰ سال، ناباروری و بچه‌دار نشدن، استفاده از داروهای ضد بارداری و درمان هورمونی پس از یائسگی (٤). در میان عوامل خطر قابل تغییر می‌توان به عوامل سبک زندگی مانند بی‌تحرکی و الگوهای غذایی ناسالم اشاره نمود که با خطرات مختلفی در بروز و عود سرطان پستان مرتبط است (۵).

ماهی و آبزیان به دلیل دارا بودن مقادیر مفید پروتئین، اسیدهای چرب امگا ۳، ویتامین‌های A و D، مواد معدنی و ریزمغذی‌هایی مانند سلنیوم، روی و ید دارای ارزش غذایی بالایی بوده و می‌توانند به عنوان یکی از اجزای سالم رژیم غذایی در حفظ سلامتی انسان و پیشگیری از بیماری‌های مختلف مؤثر باشد (٦). اثرات مثبت مصرف ماهی و آبزیان در پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی، سندروم متابولیک، دیابت ملیتوس و سرطان به وضوح توسط تعداد زیادی از مطالعات انجام شده در ۳۰ سال گذشته تأیید شده است (۷، ۸، ۹). مطالعات هم‌چنین از اثرات مثبت مصرف ماهی و آبزیان در پیشگیری از سرطان‌های ریه (۱۰)، کولورکتال (۱۱)، کبد (۱۲، ۱۳) و پستان (١٤) پشتیبانی می‌کنند.

از لحاظ تاریخی اثرات سلامتی‌بخش مصرف ماهی و آبزیان به محتوای بالای PUFA[1] امگا ۳ نسبت داده شده است، اما پژوهش‌های روزافزون ثابت می‌کند که سایر مواد مغذی موجود در ماهی از جمله پروتئین نیز اثرات مثبتی بر سلامت انسان دارند (۸). ماهی و آبزیان علاوه بر این که منبع غنی از پروتئین با ارزش بیولوژیکی بالا (غنی از اسیدها آمینه ضروری) هستند، به عنوان ماده اولیه برای تولید پپتیدهایی با اهمیت فیزیولوژیک در انسان نیز به‌کار برده می‌شوند. شواهد علمی روزافزونی وجود دارد که پروتئین‌های هیدرولیز مشتق شده از ماهی و آبزیان حاوی پپتیدهای هستند که سلامتی انسان را ارتقا داده و از بروز بیماری‌ها جلوگیری می‌کنند (٦). برخی از اثرات آن‌ها شامل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضددیابت، ضدفشارخون، ضدهایپرلیپیدمی، تحریک سیستم ایمنی، بهبود عملکرد شناختی و به تاخیر انداختن روند پیری است (۱۵). علاوه بر این فعالیت ضد سرطانی پروتئین‌های هیدرولیزه و پپتیدهای حاصل از چندین گونه ماهی و محصولات جانبی آن‌ها در مطالعات تأیید شده است (۲، ١٦). به‌طور کلی عواملی مانند گونه آبزی، آنزیم مورد استفاده و شرایط هیدرولیز قادرند اندازه، نوع و ترکیب آمینواسیدی پپتیدها در نمونه هیدرولیزشده و در نتیجه

1- Poly Unsaturated Fatty acid

فعالیت ضدسرطانی آن را تحت‌تأثیر قرار دهند (٦، ١٥) و مطالعات جهت معرفی نمونه‌هایی با بیش‌ترین فعالیت ضدسرطانی در جریان است.

بر اساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی[1] تولید جهانی آبزیان در سال ۲۰۲۰ حدود ۱۷۰ میلیون تن برآورد شده که از این میزان تقریباً ۱۹ میلیون تن که عمدتاً شامل آبزیان کوچک با قیمت و بازارپسندی پایین بوده است، به مصارف غیرخوراکی مانند تولید آرد و روغن ماهی رسیده است (۱۷). ماهیان کم‌ارزش و مازاد صید می‌توانند به عنوان منبع پروتئینی ارزان در جهت تولید پروتئین‌های هیدرولیزه مدنظر قرار گیرند که این امر سبب ایجاد ارزش افزوده شده و امکان استفاده بهینه از ذخایر آبزیان را فراهم کند (٦). ماهی حسون (*Saurida tumbil*) به‌عنوان یکی از گونه‌های صید کم‌ارزش در آب‌های جنوب کشور محسوب می‌شود که حدود ٣٦ درصد از آبزیان دور ریز شده در تور ترال در سواحل خوزستان را به خود اختصاص می‌دهد (۱۸) و پتانسیل استفاده به‌عنوان بستر پروتئینی جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده را دارا می‌باشد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف تولید پروتئین هیدرولیزه از عضله ماهی حسون و ارزیابی خواص ضدسرطانی آن انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه پروتئین هیدرولیز شده ماهی: مطالعه حاضر در آزمایشگاه پارک علم و فناوری مازندران (ساری) در سال ١٣٩٦ انجام گردید. ماهی‌های حسون (*Saurida tumbil*) با طول متوسط ۳۵ سانتی‌متر از بازار استان بوشهر خریداری شد و پس از انجماد در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) با استفاده از ظروف یونولیتی به آزمایشگاه منتقل و تا زمان شروع آزمایش‌ها در آن‌جا نگهداری شد. پس از انجمادزدایی در یخچال، سرزنی، تخلیه امعاء و احشاء، کندن پوست و استخوان‌گیری ماهی‌ها انجام شد و با آب سرد شست‌وشو داده شد. سپس دو بار با چرخ گوشت چرخ گردید و در بسته‌های پلاستیکی زیپ‌دار تقسیم و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. محتوای نیتروژن نمونه گوشت چرخ شده توسط روش استخراج کلدال تعیین و پروتئین خام از طریق ضریب ٦/٢٥ در محتوای نیتروژن محاسبه شد. جهت هیدرولیز آنزیمی، گوشت چرخ شده منجمد به‌منظور انجمادزدایی در طول شب در یخچال (۸ درجه سانتی‌گراد) گذاشته شد و سپس ۵۰ گرم از آن در ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر نسبت (۲:۱) به ارلن‌مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی (IKA, T25، آلمان) به مدت ۲ دقیقه همگن شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری (رادطب نوین، SL 910، ایران) با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد. در ادامه ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=٨ برای آنزیم الکالاز و pH=٦ برای آنزیم پاپایین) اضافه شد. سپس آنزیم‌ها با نسبت‌های ۲ و ٤ درصد (بر حسب میزان پروتئین نمونه) اضافه شد و در ظروف در دستگاه انکوباتور متحرک (نور صنعت فردوس، SHE، ایران) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۹۰ و ۱۸۰ دقیقه قرار داده شدند تا هیدرولیز صورت گیرد. تیمار دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای غیرفعال‌سازی آنزیم استفاده شده، مورد استفاده قرار گرفت. پس از خنک شدن در دمای اتاق نمونه‌ها در دمای ۱۰ درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه در دور ۷۰۰۰ سانتریفیوژ (Labnet, C6، آمریکا) شدند. مایع رویی جمع‌آوری و در دستگاه خشک‌کن انجمادی (گزلین طب ایران، GTFD-40، ایران) قرار داده شد تا به‌صورت پودر درآیند (۲).

1- Food and Agriculture Organization

سنجش فعالیت سیتوتوکسیک با روش MTT[1]: تست MTT یک روش رنگ‌سنجی می‌باشد که برای بررسی میزان تکثیر سلول‌ها و اثرات سایتوتوکسیک داروها استفاده می‌شود. در این تست فعالیت آنزیم‌های سلولی در تبدیل ماده تترازولیوم زردرنگ (MTT) به فورمازان بنفش‌رنگ ارزیابی می‌شود. ماده تترازولیوم محلول در آب است که توسط میتوکندری سلول‌های زنده احیاشده و به نمک فورمازان غیرمحلول در آب تبدیل می‌شود. سلول‌های رده موشی 4T1 سرطان پستان از بانک سلولی انستیتوپاستور تهیه و در فلاسک‌های کوچک کشت داده شد. بعد از رسیدن سلول‌ها به فراوانی موردنظر، سلول‌ها از کف فلاسک توسط EDTA-Tripsin جدا شدند. سپس با استفاده از لام هموسایتومتر تعداد سلول‌ها شمارش گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰۳*۱۵ سلول به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید و هم‌چنین یک گروه به‌عنوان کنترل مشخص گردید. در مرحله بعد سلول‌ها به‌صورت تریپلیکت با استفاده پروتئین هیدرولیز در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون کل محیط داخل چاهک‌ها خارج شد و ٦۰ میکرولیتر محلول MMT (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS[2]) به هر چاهک اضافه شد. سپس سلول‌ها به‌مدت ٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون، محیط داخل چاهک‌ها خارج شد و ۱۵۰ میکرولیتر از DMSO[3] به هر چاهک اضافه شد. در نهایت پلیت‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در جای تاریک انکوبه شدند و جذب پلیت‌ها توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. درصد سمیت سلولی توسط رابطه زیر حساب شد (۲).

$$\text{درصد سمیت سلولی} = \left[1 - \frac{\text{جذب بلانک} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب بلانک} - \text{جذب کنترل}}\right] \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

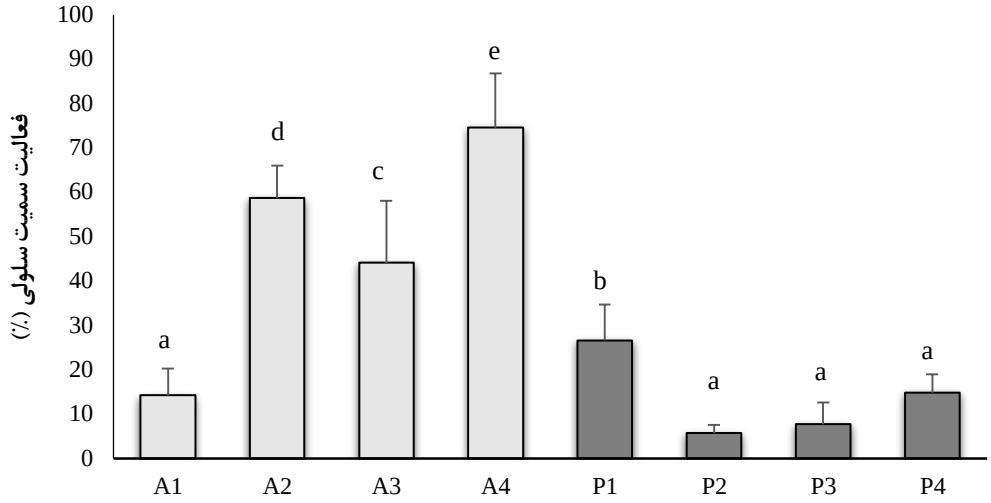
آنالیز آماری: داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون‌های آماری تی و آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها بر حسب میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

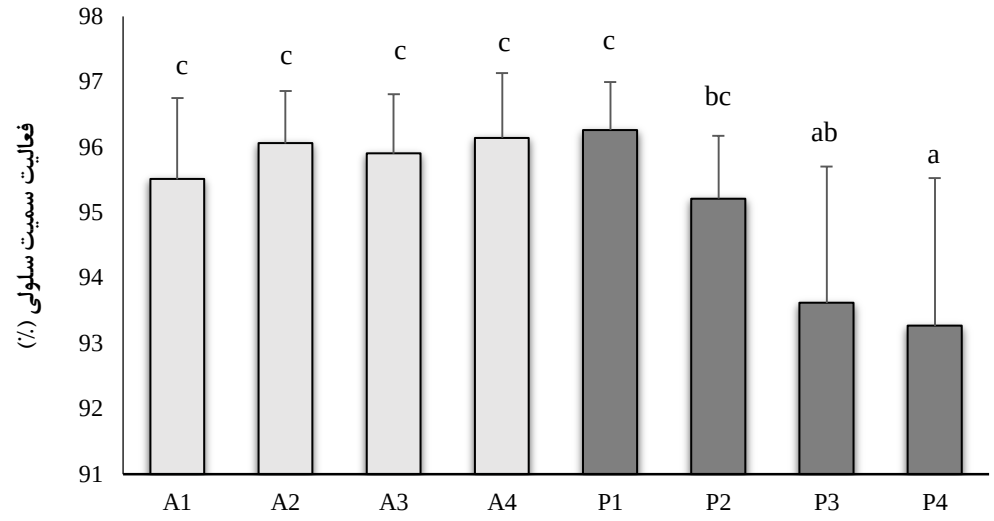
همان‌طور که در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است، نمونه‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز سمیت سلولی قوی در برابر رده سلولی سرطان پستان 4T1 در مدت انکوباسیون ٤۸ ساعت (۱٤/۱۹ تا ۷٤/۵٤ درصد) و ۷۲ ساعت (۹۵/۵۱ تا ۹٦/۱٤ درصد) نشان دادند. نمونه‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم پاپائین نیز سمیت سلولی متوسط در مدت انکوباسیون ٤۸ ساعت (۵/۷۲ تا ۲٦/۵٦ درصد) و قوی در مدت انکوباسیون ۷۲ ساعت (۹۳/۲۷ تا ۹٦/۲٦ درصد) نشان دادند.

نتایج شکل ۱ مربوط به انکوباسیون ٤۸ ساعته نشان می‌دهد که در نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم آلکالاز با افزایش غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز فعالیت سمیت سلولی افزایش معنی‌داری داشته است، به‌طوری‌که بیش‌ترین سمیت سلولی توسط نمونه هیدرولیزشده با غلظت ٤ درصد آنزیم به مدت ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد (۷٤/۵٤ درصد). در رابطه با نمونه‌های هیدرولیزشده توسط پاپائین چنین روندی مشاهده نشد و بیش‌ترین سمیت مربوط به نمونه هیدرولیزشده توسط غلظت ۲ درصد آنزیم به مدت ۹۰ دقیقه بود. در انکوباسیون ۷۲ ساعته تمامی نمونه‌های هیدرولیزشده توسط آلکالاز و نمونه هیدرولیزشده توسط آنزیم پاپائین در غلظت ۲ درصد به مدت ۹۰ دقیقه سمیت مشابهی (بالای ۹۰ درصد) نشان دادند.

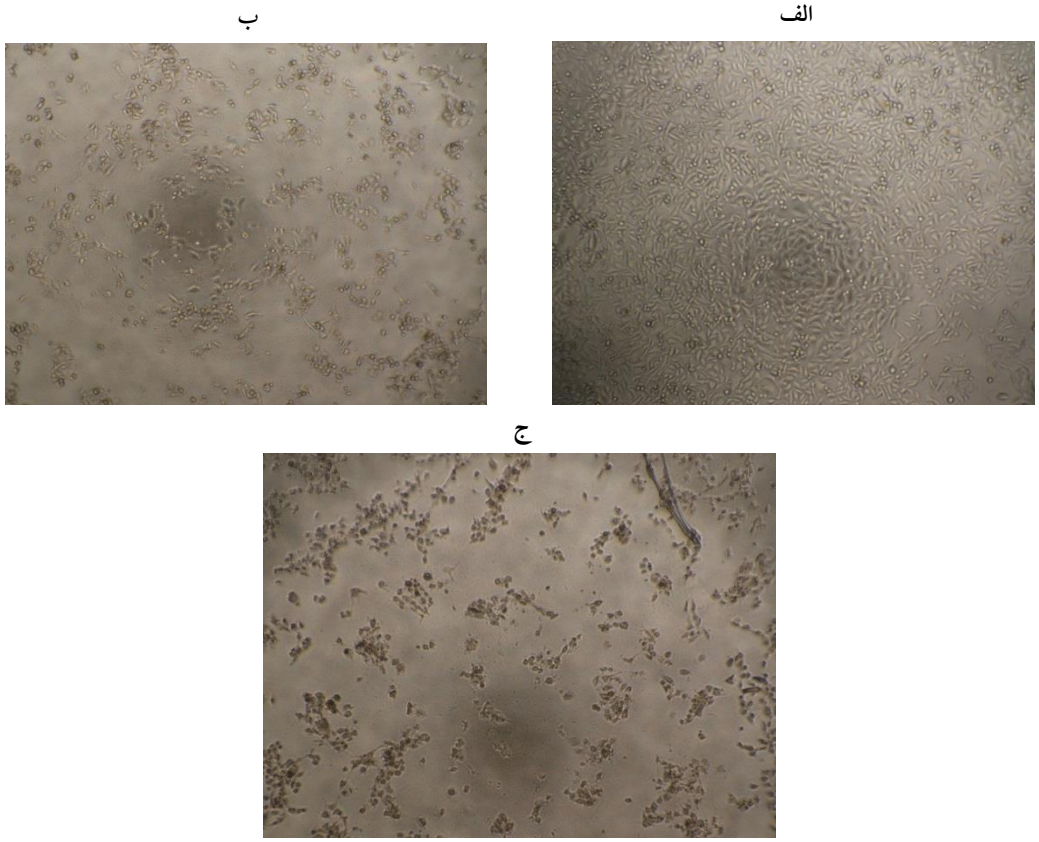
1- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide or MTT
2- Phosphate-buffered Saline
3- Dimethyl Sulfoxide



شکل ۱- فعالیت سمیت سلولی نمونه‌های پروتئین هیدرولیزه بر سلول‌های سرطانی 4T1 طی انکوباسیون ٤٨ ساعته.
A1: آلکالاز ۲ درصد به مدت ۹۰ دقیقه، **A2**: آلکالاز ۲ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه، **A3**: آلکالاز ٤ درصد به مدت ۹۰ دقیقه، **A4**: آلکالاز ٤ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه.
P1: پاپایین ۲ درصد به مدت ۹۰ دقیقه، **P2**: پاپایین ۲ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه، **P3**: پاپایین ٤ درصد به مدت ۹۰ دقیقه، **P4**: پاپایین ٤ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه.
حروف **a**، **b**، **c**، **d** و **e** بالای هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$.



شکل ۲- فعالیت سمیت سلولی نمونه‌های پروتئین هیدرولیزه بر سلول‌های سرطانی 4T1 طی انکوباسیون ۷۲ ساعته.
A1: آلکالاز ۲ درصد به مدت ۹۰ دقیقه، **A2**: آلکالاز ۲ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه، **A3**: آلکالاز ٤ درصد به مدت ۹۰ دقیقه، **A4**: آلکالاز ٤ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه.
P1: پاپایین ۲ درصد به مدت ۹۰ دقیقه، **P2**: پاپایین ۲ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه، **P3**: پاپایین ٤ درصد به مدت ۹۰ دقیقه، **P4**: پاپایین ٤ درصد به مدت ۱۸۰ دقیقه.
حروف **a**، **b**، **c**، **d** بالای هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$.



شکل ۳- تصویر مربوط به اثر پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون (*Saurida tumbil*) بر سلول‌های سرطانی 4T1.
الف) کنترل، ب) مواجهه شده با نمونه پروتئین هیدرولیزه (A4) طی انکوباسیون ٤٨ ساعته، ج) ٧٢ ساعته.

بحث

جانوران دریایی که حدود نیمی از تنوع زیستی جهان را تشکیل می‌دهند، منبع ارزشمندی از ترکیبات دارویی و زیست‌فعال هستند. یک نمونه مهم از ترکیبات زیست‌فعال، پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین این موجودات می‌باشد که فعالیت‌های بیولوژیک متعددی مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضددیابت، ضدفشارخون، ضدهایپرلیپیدمی، ضدسرطان و ... نشان می‌دهند (١٥). هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم‌های به‌دست آمده از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی رایج‌ترین روش تولید پپتیدها می‌باشد و براساس خواص کاتالیزوری آنزیم، شرایط هیدرولیز و ویژگی سوبسترا، پپتیدهای مختلفی با خصوصیات منحصر به فرد به‌دست می‌آیند (٦، ١٥). آلکالاز یک پروتئاز است که از باکتری *Bacillus licheniformis* به دست می‌آید، در حالی‌که پاپائین یک سیستئین پروتئاز است که از منابع گیاهی لاتکس و میوه پاپایا تهیه می‌شود. هر دو آنزیم در هیدرولیز آنزیمی استفاده می‌شوند و هر کدام اثر متفاوتی را در طول فرآیند هیدرولیز نشان می‌دهند (١٩). در مطالعه حاضر فعالیت سمیت سلولی پروتئین هیدرولیزه تهیه شده از این دو آنزیم فوق و تأثیر شرایط هیدرولیز بر فعالیت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که نمونه‌های پروتئین هیدرولیز تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز سمیت سلولی قوی در برابر رده سلولی سرطان سینه 4T1 در مدت انکوباسیون ٤٨ ساعت (١٤/١٩ تا ٧٤/٥٤ درصد) و ٧٢ ساعت (٩٥/٥١ تا ٩٦/١٤ درصد) نشان می‌دهند

ولی نمونه‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم پاپائین سمیت سلولی ضعیف تا متوسط در مدت انکوباسیون ٤٨ ساعت (٥/٧٢ تا ٢٦/٥٦ درصد) و سمیت سلولی قوی در مدت انکوباسیون ٧٢ ساعت (٩٣/٢٧ تا ٩٦/٢٦ درصد) نشان دادند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که پپتیدهای تولیدشده توسط آنزیم آلکالاز دارای ویژگی‌های به‌خصوصی از نظر وزن مولکولی، توالی و ... هستند که سبب شده فعالیت سمیت سلولی قوی‌تری را در زمان کوتاه نشان دهند.

یافته‌های مطالعه حاضر هم‌چنین نشان داد که در نمونه‌های هیدرولیزشده با آنزیم آلکالاز با افزایش غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز فعالیت سمیت سلولی افزایش معنی‌داری داشته است، به‌طوری‌که بیش‌ترین سمیت سلولی توسط نمونه هیدرولیزشده با غلظت ٤ درصد آنزیم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد. با این‌حال در رابطه با نمونه‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم پاپائین چنین روندی مشاهده نشد و بیش‌ترین سمیت مربوط به نمونه هیدرولیزشده توسط غلظت ۲ درصد آنزیم به مدت ۹۰ دقیقه بود. در مطالعه ربیعی و همکاران (۲۰۱۹) روی نمونه‌های پروتئین هیدرولیز تهیه شده با آنزیم آلکالاز مشاهده شد که سمیت سلولی نمونه‌های هیدرولیزشده با غلظت‌های ۳ و ۵ درصد آنزیم بیش‌تر از غلظت ۱ درصد می‌باشد و بیش‌ترین سمیت مربوط به نمونه حاوی مقادیر کم‌تر پپتیدهای HMW[1] (وزن مولکولی بیش‌تر از ۵۰۰۰ دالتون) بوده است (۲) که یافته‌های آن‌ها همسو با یافته‌های مطالعه حاضر در رابطه با نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز است. هم‌چنین ربیعی و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه دیگری بر روی پروتئین هیدرولیزشده ماهی کفال تهیه شده با آنزیم پاپائین نیز نتایج مشابهی گزارش کردند. در مطالعه این پژوهش‌گران نیز فعالیت سمیت سلولی نمونه‌های پروتئین هیدرولیزه با افزایش مدت زمان هیدرولیز کاهش داشت و نمونه‌ای که برای مدت بیش‌تری هیدرولیزشده بود، کم‌ترین فعالیت سمیت سلولی را نشان داد که پژوهش‌گران این امر را به حضور مقادیر بالای پپتیدهایی با وزن مولکولی کم‌تر از ۵۰۰ دالتون (٦٤ درصد) در این نمونه نسبت دادند (۲). این‌طور به‌نظر می‌رسد که آنزیم پاپائین در غلظت‌های بالاتر و طی مدت طولانی‌تر هیدرولیز، سبب تولید مقادیر بالای اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای خیلی کوچک می‌شود که دارای سمیت سلولی کمی هستند، ولی آنزیم آلکالاز در غلظت‌های بالاتر و زمان هیدرولیز طولانی‌تر سبب تولید پپتیدهای با وزن مولکولی متوسط و سمیت سلولی بالا می‌شود، هر چند نیاز است درستی این ادعا با ارزیابی وزن مولکولی پپتیدها در مطالعات آتی تأیید گردد. پژوهش‌گران دیگری نیز ارتباط معنی‌داری بین وزن مولکولی پپتیدها و فعالیت سمیت سلولی آن‌ها را گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال Sheih و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه بر روی پروتئین هیدرولیز جلبک گزارش کردند که نمونه حاوی پپتیدهایی با وزن مولکولی ۲۰۰–۲۰۰۰ دالتون (۹۰ درصد پپتیدهای نمونه) بیش‌ترین فعالیت سمیت سلولی را بر سلول‌های AGS نشان می‌دهند (۲۰). در مطالعه صورت گرفته بر روی پروتئین هیدرولیز برنج نیز مشاهده شده که فرکشن حاوی پپتیدهایی با وزن مولکولی کم‌تر از ۵۰۰۰ دالتون در مقایسه با فرکشن‌های حاوی پپتیدهایی با وزن مولکولی بالاتر، فعالیت سمیت سلولی بیش‌تری بر سلول‌های سرطانی کبد و کولون نشان می‌دهد (۲۱). در مطالعه صورت گرفته بر روی اثرات سمیت سلولی فراکنش‌های مختلف پروتئین هیدرولیز مارماهی فراکشن‌های حاوی پپتیدهایی با وزن مولکولی کم‌تر از ۳ کیلودالتون فعالیت سمیت سلولی قوی‌تری بر رده سلولی MCF-7 نشان دادند (۲۲). با این‌حال

1- High Molecular Weight

پژوهش‌گران دیگری بیان کرده‌اند که فعالیت سیتوتوکسیک پپتیدهای زیست‌فعال علاوه بر وزن مولکولی تحت‌تأثیر نوع و توالی آمینواسیدها نیز قرار می‌گیرد (۲۳).

نتیجه‌گیری کلی

پروتئین هیدرولیزه ماهی حسون تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و پاپائین سمیت سلولی متوسط تا قوی در برابر رده سلولی سرطان پستان موش نشان دادند و بیش‌ترین فعالیت توسط نمونه تولیدشده با آنزیم آلکالاز در غلظت ٤ درصد به‌مدت ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد. بنابراین با انجام پژوهش‌های بیش‌تر در آینده، شاید بتوان از پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون در درمان سرطان بهره جست.

منابع

1. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*. 149 (4), 778-789.
2. Rabiei, S., Rezaei, M., Asgharzade, S., Nikoo, M., & Rafieia-kopai, M. (2019). Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55.
3. Otaghvar, H. A., Hosseini, M., Tizmaghz, A., Shabestanipour, G., & Noori, H. (2015). A review on metastatic breast cancer in Iran. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*. 5 (6), 429-433.
4. Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., & Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*. 13 (11), 1387.
5. Kellen, E., Vansant, G., Christiaens, M. R., Neven, P., & Van Limbergen, E. (2009). Lifestyle changes and breast cancer prognosis: a review. *Breast cancer research and treatment.* 114 (1), 13-22.
6. Rabiei, S., Nikoo, M., Rezaei, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). Marine-Derived Bioactive Peptides with Pharmacological Activities-A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 11 (10), 1-6.
7. Domingo, J. L. (2016). Nutrients and chemical pollutants in fish and shellfish. Balancing health benefits and risks of regular fish consumption. *Critical reviews in food science and nutrition*. 56 (6), 979-988.
8. Khalili Tilami, S., & Sampels, S. (2018). Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins, and minerals. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*. 26 (2), 243-253.
9. Mendivil, C .O. (2021). Fish consumption: a review of its effects on metabolic and hormonal health. *Nutrition and Metabolic Insights*. 14, 11786388211022378.
10. Song, J., Su, H., Wang, B. L., Zhou, Y. Y., & Guo, L. L. (2014). Fish consumption and lung cancer risk: systematic review and meta-analysis. *Nutrition and cancer*. 66 (4), 539-549.
11. Wu, S., Feng, B., Li, K., Zhu, X., Liang, X., Liu, X., Han, S., Wang, B., Wu, K., & Miao, D. (2012). Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of medicine*. 125 (6), 551-559. e555.
12. Yu, X. F., Zou, J., & Dong, J. (2014). Fish consumption and risk of gastrointestinal cancers: a meta-analysis of cohort studies. *World journal of gastroenterology: WJG*. 20 (41), 15398.
13. Gao, M., Sun, K., Guo, M., Gao, H., Liu, K., Yang, C., Li, S., & Liu, N. (2015). Fish consumption and n-3 polyunsaturated fatty acids, and risk of hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes & Control*. 26 (3), 367-376.

14. Kim, J., Lim, S. Y., Shin, A., Sung, M. K., Ro, J., Kang, H. S., Lee, K. S., Kim, S. W., & Lee, E. S. (2009). Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. *BMC cancer*. 9 (1), 1-10.
15. Kim, S. K. (2013). Marine proteins and peptides: biological activities and applications, John Wiley & Sons.
16. Khositanon, P., Inpratom, D., Somwang, T., Iawsipo, P., Roytrakul S., & Choksawangkarn, W. (2018). Antibacterial and anticancer activities of protein hydrolysate from fish sauce byproduct. 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. June.
17. Stankus, A. (2021). State of world aquaculture 2020 and regional reviews: FAO webinar series. *FAO Aquaculture Newsletter*. 63, 17-18.
18. Bahram, S., Khezri, M., & Javadian, S. R. (2020). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of hydrolyzed protein of Saurida tumbil. *Experimental animal Biology*. 9 (2), 23-35.
19. Nadzri, F. A., Tawalbeh, D., & Sarbon, N. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activity of enzymatic hydrolysed chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein as influence by alcalase and papain enzyme. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. N.36: 102131.
20. Sheih, I. C., Fang, T. J., Wu, T. K., & Lin, P. H. (2010). Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58 (2), 1202-1207.
21. Kannan, A., Hettiarachchy, N., Johnson M. G., & Nannapaneni, R. (2008). Human colon and liver cancer cell proliferation inhibition by peptide hydrolysates derived from heat-stabilized defatted rice bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (24), 11643-11647.
22. Halim, N. R. A., Azlan, A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2018). Antioxidant and anticancer activities of enzymatic eel (Monopterus sp) protein hydrolysate as influenced by different molecular weight. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 16, 10-16.
23. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. Journal of AOAC international. 91(4): 914-931.