

ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی پپتیدهای زیست‌فعال استخراج‌شده از دو گونه دریایی بر روی سلول‌های سرطانی کولون HCT-116

مهسا وهاب زاده حیدرلو^۱، ابراهیم نجدگرمی^۱، صفیه آقازاده^۲ و مهدی نیکو^۳

^۱ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی

^۲ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

^۳ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتیمیا و آبی‌پروری، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۰۶

چکیده

سرطان کولون یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌های گوارشی است که عوامل مختلفی مانند استرس اکسیداتیو و اختلال در تعادل ردوکس در پیشرفت آن نقش دارند. مطالعه حاضر با هدف بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوزی پپتیدهای زیست‌فعال استخراج‌شده از ماهی کفال (*Liza klunzingeri*) و میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) بر سلول‌های سرطانی کولون (HCT-116) طراحی و اجرا شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با آزمون‌های ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) و سنجش نیتریک اکساید (NO^-) و اثرات سیتوتوکسیک با قرمز خنثی (Neutral Red Assay) و تترازولیوم برومید ۳-(۵،۴-دی‌متیل‌تيازول-۲-ایل)-۲،۵-دی‌فنیل MTT Assay بررسی شد. آپوپتوز با آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید و تغییرات ردوکس ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پپتیدهای استخراج‌شده از ماهی کفال فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در آزمون‌های TAC و NO^- نسبت به پپتیدهای میگو داشتند ($p < 0.05$). آزمون‌های MTT و قرمز خنثی کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی را با افزایش غلظت پپتیدها نشان دادند. هر دو پپتید IC_{50} در غلظت ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت نشان دادند. همچنین نتایج نشان داد که پپتیدهای ماهی کفال به طور معناداری سطح NO^- را افزایش داده و در عین حال سطوح گلوکاتیون و فعالیت کاتالاز (CAT) را در سلول‌های سرطانی کاهش دادند ($p < 0.05$). همچنین هر دو نوع پپتید ماهی کفال و میگو موجب القای آپوپتوز در رده سلولی HCT-116 شدند، اما پپتیدهای ماهی کفال اثرات بیشتری نشان دادند ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که با کاهش وضعیت آنتی‌اکسیدانی و نرخ رشد سلول‌های سرطان کولون، پپتیدهای ماهی کفال ممکن است حساسیت سلول‌های سرطانی را نسبت به مکانیزم‌های دفاعی بدن افزایش دهند.

واژه‌های کلیدی: سمیت سلولی، ماهی کفال، میگوی وانامی، پروتئین هیدرولیز شده، آپوپتوز

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: e.gerami@urmia.ac.ir

مقدمه

سرشار از کربوهیدرات در دمای بالا منجر به تولید سم آکریلامید می‌شود که می‌تواند خطر ابتلا به سرطان کولون را افزایش دهد (۴۰). عوامل خطر سرطان کولون به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند: قابل پیشگیری و غیرقابل پیشگیری. بیشتر عوامل خطر قابل پیشگیری، به رژیم غذایی مرتبط

سرطان کولون از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در کشورهای صنعتی و نیمه‌صنعتی است که با عواملی مانند سیگار کشیدن، مصرف الکل، رژیم‌های غذایی پرچرب، بی‌حرکی و عادات تغذیه‌ای ناسالم ارتباط دارد (۱۸). آژانس استانداردهای غذایی بریتانیا (FSA) هشدار داده است که پخت غذاهای

هستند (۱۱). ارتباط میان رژیم غذایی و سرطان کولون مدت‌ها مورد توجه دانشمندان بوده است، چراکه تغییر در سبک زندگی و عادات تغذیه‌ای می‌تواند از ۳۰ تا ۵۰ درصد موارد سرطان کولون جلوگیری کند (۱۴). مطالعات نشان داده‌اند که احتمال ابتلا به سرطان کولون از سن ۴۰ سالگی به ازای هر ده سال افزایش سن، دو برابر می‌شود (۲۳). روش‌های درمانی مختلفی مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی برای مقابله با این سرطان وجود دارد که سلول‌های سرطانی را از بین می‌برند؛ اما این روش‌ها می‌توانند به سلول‌های سالم آسیب زده و مقاومت سلول‌های سرطانی را نیز افزایش دهند (۵). با توجه به معایب و عوارض جانبی این درمان، نیاز به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در روش‌های جایگزین بیش از پیش احساس می‌شود (۲).

محصولات دریایی حاوی پپتیدهای کم‌وزن مولکولی هستند که خواص زیستی متنوعی از جمله تنظیم ایمنی، ضدسرطانی، ضد فشار خون، ضد ترومبوتیک و آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان می‌دهند (۱ و ۵ و ۲۵ و ۳۰ و ۳۶). این پپتیدها بدون ایجاد عوارض جانبی، از منابع مختلفی مانند ماهی، شیر، سویا، تخم‌مرغ، گوشت و جلبک دریایی استخراج می‌شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال، که وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون دارند و از دو تا بیست اسید آمینه تشکیل شده‌اند، به توالی اسید آمینه‌ها و اندازه پپتیدها بستگی دارد (۳ و ۲۶). به دلیل فواید گسترده این ترکیبات برای سلامتی، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان مواد اولیه در تولید غذاهای عملکردی استفاده کرد (۳۴). همچنین ارزش تغذیه‌ای و زیستی پپتیدهای مستخرج از آبزیان موجب شده تا علاقه به توسعه این غذاها افزایش یابد (۲۱). اثرات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال ماهی بر سلول‌های سرطانی در مطالعات مختلف تأیید شده است (۳۴). به گزارش Chi و همکاران (۲۰۱۵)، تری‌پپتید Trp-Pro-Pro استخراج‌شده از عضله *Tegillarca granosa* قادر است رادیکال‌های آزاد (ROS) تولیدشده در شرایط استرس اکسیداتیو را خنثی کند و از گسترش سرطان از طریق کنترل

رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند. یافته‌ها همچنین نشان داد که این تری‌پپتید می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی و عامل ضدسرطان، با القای آپوپتوز در سلول‌های بدخیم و تعدیل رادیکال‌های آزاد عمل کند (۱۲). علاوه بر این، مطالعه‌ای که اثر پپتیدهای غیرقابل هضم پروتئین سویا را بر سلول‌های سرطانی ریه، کبد و کولون بررسی کرده است، نشان می‌دهد که این پپتیدها به‌طور چشمگیری رشد سلول‌های سرطانی در این بافت‌ها را مهار می‌کنند (۳۱).

استفاده از گونه‌های ماهی کمتر بهره‌بردار شده یا محصولات جانبی صنعتی ماهی برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال، امکان بهره‌وری اقتصادی بیشتر از این منابع پروتئینی را فراهم می‌کند (۲۷ و ۳۶). ماهی کفال (*L. klunzingeri*) که عمدتاً برای تولید پودر ماهی استفاده می‌شود، یکی از گونه‌هایی است که کمتر مورد توجه قرار گرفته است. به همین دلیل، استفاده از این ماهی برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال به روشی مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط زیست تبدیل شده است (۳۰). در مقابل، میگوی وانامی (*L. vannamei*) به‌عنوان یکی از محصولات مهم تجاری در صنعت شیلات شناخته می‌شود. محصولات جانبی این میگو، که ۴۵ تا ۴۸ درصد از وزن کل آن را تشکیل می‌دهند، می‌توانند به‌عنوان منبعی غنی از ترکیبات عملکردی مورد استفاده قرار گیرند. تحقیقات نشان داده است که پپتیدهای استخراج‌شده از محصولات جانبی فرآوری میگو با استفاده از آنزیم‌های پروتئازی مختلف، علاوه بر ارزش تغذیه‌ای بالا، فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری نیز دارند (۴ و ۳۰).

بر اساس مرور منابع موجود، اطلاعات بسیار محدودی در رابطه با تأثیر پپتیدهای زیست‌فعال استخراج‌شده از عضله ماهی کفال و ضایعات میگوی وانامی بر تحریک یا مهار تکثیر سلول‌های سرطانی مخصوصاً سرطان کولون وجود دارد. از این‌رو، با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثبات‌شده پپتیدهای مشتق‌شده از منابع دریایی، هدف اصلی این مطالعه

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی این پپتیدهای زیست‌فعال به‌طور خاص بر روی سلول‌های سرطان کولون و رده سلولی HCT-116 است.

مواد و روشها

آماده‌سازی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از ماهی کفال و میگوی وانامی

پپتیدهای زیست‌فعال استخراج‌شده از *L. klunzingeri* بر اساس روش ارائه‌شده در مطالعه Rabiei و همکاران (۲۰۲۱) تهیه شدند. در این روش، ۱۰۰ گرم گوشت ماهی کفال با استفاده از آنزیم آلکالاز (Novozymes®, Denmark) (معادل ۵ درصد وزن پروتئین) در شرایط کنترل‌شده شامل دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۸/۰ و به مدت ۳ ساعت هیدرولیز شد. برای متوقف کردن واکنش، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس پس از خنک‌سازی تا دمای محیط (~۲۵ درجه سانتی‌گراد)، مخلوط‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت $8000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی جمع‌آوری و به روش انجماد-خشک‌کن لیوفیلیزه شد. پروفایل وزن مولکولی پپتیدهای زیست‌فعال تولیدشده با آلکالاز از طریق تحلیل SEC-HPLC تعیین شد (۲۹).

همچنین برای تهیه پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از میگوی وانامی، ضایعات آن از شرکت خلیج فارس دریا (بوشهر، ایران) تهیه و به نسبت ۱:۱ با آب مقطر مخلوط شده و با استفاده از چرخ‌گوشت مجهز به صفحه‌ای با سوراخ‌های ۳ میلی‌متری (شرکت پارس خزر، تهران، ایران) خرد شدند. سپس مخلوط به مدت دو دقیقه با سرعت چهار توسط همگن‌ساز (Heidolph DIAX900) (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany) همگن شد. فرآیند هیدرولیز مطابق روش Nikoo و همکاران (۲۰۲۱) انجام گرفت (۲۵). این فرآیند شامل هیدرولیز به مدت سه ساعت در دمای ۴۰

درجه سانتی‌گراد و pH اولیه کمتر از ۷/۱ بود. در طول فرآیند اتولیز، مخلوط به کمک همزن بالاسری به‌طور مداوم هم‌زده شد. واکنش با جوشاندن مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش (~۹۵ درجه سانتی‌گراد) متوقف گردید و مخلوط پس از عبور مخلوط از یک پارچه دو لایه پارچه پنبه با سرعت $4000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی جمع‌آوری و به روش لیوفیلیز خشک شد.

کشت سلولی

در این مطالعه از رده سلولی HCT116 که از موسسه پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده شد. سلول‌ها تحت شرایط خاص در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۵ درصد CO₂ در محیط کشت RPMI 1640 نگهداری شدند. برای ارزیابی اثرات پپتیدهای زیست‌فعال، از دوزهای دارویی نزدیک به IC₅₀ استفاده گردید. سلول‌های بدون درمان به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. به‌منظور تضمین دقت نتایج، هر آزمایش سه بار تکرار شد.

ارزیابی سیتوتوکسیک

برای تعیین بهترین غلظت دارو و میزان بقا سلولی، از آزمون‌های MTT و قرمز خنثی (IC₅₀) استفاده شد. ابتدا پپتیدهای هر دو گونه با غلظت ۲۵ میلی‌گرم پپتید لیوفیلیز شده در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین رقیق شده و سپس با فیلتر ۰/۲ میکرونی استریل شد. پس از کشت ۵۰۰۰ سلول HCT116 در هر چاهک به مدت ۱۸ ساعت، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف پپتید (۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تیمار شدند. ده میکرولیتر از محلول MTT چهار ساعت قبل از برداشت سلول‌ها به محیط کشت اضافه گردید. پس از چهار ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، واکنش با افزودن محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) متوقف شد. رسوب فورمازان بنفش

در سلول‌های نرمال با این محلول‌ها حل شد و سپس از دستگاه ELISA Plate reader برای اندازه‌گیری میزان جذب نور در طول موج ۵۷۰ نانومتر استفاده گردید.

برای آزمون قرمز خنثی، چهار غلظت پپتید مشابه با آزمون MTT به محیط کشت اضافه شد. معرف قرمز خنثی (آرسام فرا زیست، ارومیه، ایران) به نسبت ۱:۱۰ به محیط کشت اضافه گردید و سلول‌ها برای چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پیش از افزودن محلول اسید استیک-اتانول (اتانول ۵۰٪، اسید استیک ۴٪ و آب مقطر ۴۶٪) به محیط کشت، هر چاهک سه بار با PBS شسته شد. سپس میزان جذب نور با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۲).

تهیه سوسپانسیون سلولی

ابتدا سلول‌ها با محلول PBS (Phosphate buffered saline) شسته شدند، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر لیز سلولی برای ۱۰^۶ سلول اضافه شد. نمونه‌ها روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و هر ۱۰ دقیقه یک بار به مدت ۱۵ ثانیه، ورتکس شدند. سپس محلول لیزات به مدت ۵ دقیقه در ۱۳،۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد تا سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری شوند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال ماهی کفال و

میگو در شرایط *In vitro*

خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با استفاده از سه آزمون ظرفیت مهار DPPH، سنجش نیتریک اکساید NO⁻ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری ظرفیت مهار DPPH، ۵۰ میکرولیتر از غلظت مناسب هر دو نوع پپتید که در آزمایش قبلی به دست آمده بود با ۴۵۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات ترکیب و ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. در نهایت، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد.

کاهش جذب در ۵۱۷ نانومتر و تغییر رنگ از بنفش به زرد با توان پروتون‌دهی آنتی‌اکسیدان‌ها ارتباط مستقیم دارد (۲۴). برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)، از روش ABTS (۲،۲-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6) استفاده شد که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند آن را مهار کنند. در حضور اکسیدان مناسب، TAC به ABTS⁺ (سبز) اکسید می‌شود. اندازه‌گیری جذب ABTS⁺ در ۴۱۴ نانومتر برای محاسبه TAC نمونه‌ها استفاده گردید (۲۴). NO⁻ نیز با استفاده از NO₂- که محصول نهایی NO⁻ است، اندازه‌گیری شد. محصول آزو زمانی تشکیل می‌شود که NO₂⁻ با سولفانیل‌امید و N-۱-نفتیل اتیلن‌دی‌آمین دی‌کلرید (NED) در محیط اسیدی (اسید فسفریک) ترکیب شود، که این اساس عملکرد کیت سنجش NO⁻ است (۸).

تغییرات وضعیت ردوکس در سلول‌های سرطانی HCT116 در حضور پپتیدهای زیست‌فعال ماهی کفال و

میگو

پس از ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال در شرایط *In vitro*، تغییرات وضعیت ردوکس در رده سلولی HCT116 نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، سنجش NO⁻، کاهش گلوتاتیون (GSH)، کاتالاز (CAT) و مالون دی‌آلدئید (MDA) در غلظت پپتید ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد (۶). این آزمایش‌ها با استفاده از کیت‌های پروتکل موجود از شرکت آرسام فرازیست (ارومیه، ایران) انجام گردید. گلوتاتیون احیا (GSH) با استفاده از محتوای تیول (رنگ زرد) در گلوتاتیون اندازه‌گیری شد که با واکنش با معرف دی‌نیتروتیوسیانات‌بنزن (DNTB) باعث تولید نیتروتیوبنزوات (TNB) می‌شود. تغییر رنگ زرد حاصل در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. ارتباط مستقیمی بین مقدار تیول احیا و شدت رنگ مشاهده شد. روش مستقیم کمی برای ارزیابی MDA آزمایش TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) است. در دمای ۹۵ درجه

استفاده از آزمون تمیز دانکن از یکدیگر تفکیک شدند. همچنین برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از کفال و میگو از آزمون Independent T-test استفاده شد.

نتایج

ترکیب پپتیدهای زیست‌فعال مورد استفاده در این تحقیق در هیدرولیزات‌های آلکالاز عضله ماهی کفال، درصد بالایی از پپتیدهای بزرگ مشاهده شد. دی‌پپتیدها و تری‌پپتیدها (با وزن مولکولی ۱۸۰-۵۰۰ دالتون) بین ۱۰ تا ۱۷ درصد از کل فراکسیون‌های پپتیدی را تشکیل دادند، در حالی که محتوای آمینواسیدهای آزاد ($MW < 180$ دالتون) ۳۰٫۲ درصد بود. همچنین، پپتیدهای با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰ کیلو دالتون بین ۲۵ تا ۴۳ درصد از کل فراکسیون‌های پپتیدی را شامل شدند. در مجموع، تقریباً ۹۵ درصد از پپتیدها وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون داشتند (شکل ۱). همچنین نتایج حاصل از هیدرولیز ضایعات میگو نشان داد که فرآیند اتولیز پپتیدهایی با طول زنجیره‌های متفاوت تولید کرده است و بر اساس داده‌های ارائه‌شده، قله‌های اصلی در محدوده‌های مختلف وزن مولکولی توزیع شده‌اند. در این نمودار، پپتیدهایی با وزن مولکولی بالا (حدود ۱۶،۲۹۹ دالتون) در زمان بازداری ۱۲،۰۰۳ دقیقه مشاهده شده‌اند، که نشان‌دهنده حضور پروتئین‌ها یا پپتیدهای بزرگ‌تر است. همچنین، فراکسیون‌هایی با وزن مولکولی متوسط (حدود ۵،۱۰۷ دالتون و ۳،۰۰۸ دالتون) در بازه‌های ۱۳،۲۴۹ تا ۱۴،۸۷۶ دقیقه مشاهده شده‌اند. علاوه بر این، بخش قابل توجهی از پپتیدها در محدوده وزن مولکولی پایین‌تر (۱۰۰۰ دالتون و کمتر، مانند ۴۹۸ دالتون) در زمان‌های بالاتر (حدود ۱۸ تا ۱۹ دقیقه) مشاهده می‌شود، که نشان‌دهنده حضور دی‌پپتیدها، تری‌پپتیدها و پپتیدهای کوتاه‌تر است. اوج اصلی در حدود ۲۰ دقیقه نشان‌دهنده حضور مقادیر بالای پپتیدهای کوچک است که از نظر زیستی فعال‌تر محسوب می‌شوند.

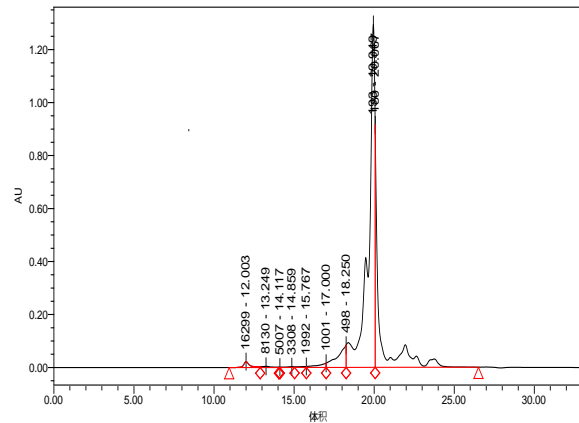
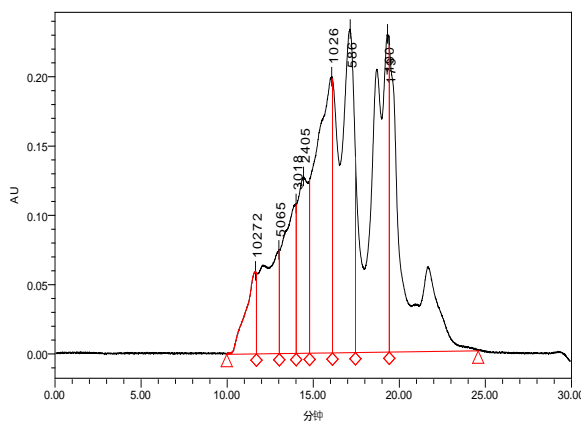
سانتی‌گراد، نمونه‌های حاوی MDA و استانداردهای آن با TBA واکنش می‌دهند. پس از مدت کوتاهی انکوباسیون، نمونه‌ها و استانداردها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شدند. نمونه‌های ناشناخته MDA با استفاده از منحنی استاندارد MDA (nmol/mg pr) ارزیابی شدند. میزان نیتریک اکساید در سوپرناتانت سلولی با روش ذکر شده در بخش قبلی اندازه‌گیری شد. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از فعالیت پراکسیداسیون آنزیم و تبدیل متانول به فرمالدهید بر اساس کیت آرسام فرا زیست انجام شد. طبق این کیت فرمالدهید تشکیل شده با معرف کروموزن پرپالد واکنش داده و ترکیب رنگی بنفش را ایجاد می‌کند که در ۵۵۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است.

رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید برای مشاهدات مورفولوژیکی آپوپتوز

پپتیدها (۱/۲ میلی گرم در میلی لیتر) به ۵۰،۰۰۰ سلول کشت‌شده در پلیت‌های ۱۲ خانه اضافه شدند و به مدت یک روز تحت تیمار قرار گرفتند. پس از جمع‌آوری سلول‌ها، پلت‌های سلولی در محلول فسفات سالین قرار گرفتند تا رنگ‌آمیزی با آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید انجام شود. برای این رنگ‌آمیزی، ۱۰۰ میکروگرم از هر یک از رنگ‌های آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید در ۱ میلی‌لیتر PBS حل شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید به‌سبب سلولی اضافه شد و سلول‌ها پس از قرار گرفتن روی لام، تحت میکروسکوپ فلورسانس با بزرگنمایی 400 X مورد بررسی قرار گرفتند. برای محاسبه کمی سلول‌های سالم نسبت سلول‌های آپوپتوتیک، حداقل ۵۰۰ سلول در هر میدان دید شمارش شد.

محاسبات آماری

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و با سطح اطمینان ۹۵ درصد تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر میانگین با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه مقایسه گردید و میانگین‌های معنادار با



شکل ۱- توزیع وزن مولکولی (MWD) پپتیدهای زیست‌فعال استخراج‌شده از ماهی کفال (چپ) و میگو (راست) را نشان می‌دهد. هیدرولیز با آنزیم آلکالاز انجام شد و نسبت آنزیم به زیرلایه ۵٪ به مدت ۱۸۰ دقیقه بود. محور عمودی در نمودارها درصد فراوانی نسبی هر کسر مولکولی و محور افقی وزن مولکولی پپتیدها بر حسب دالتون (Da) را نشان می‌دهد.

میزان بقای سلولی کاهش می‌یابد. این نتایج نشان داد که پپتیدهای استخراج‌شده از میگو و ماهی کفال در غلظت ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نزدیک به ۵۰ درصد مهار زنده مانی را داشته است به همین دلیل، این غلظت برای انجام آزمایش‌های بیشتر انتخاب شد.

بنابراین، این آنالیز نشان می‌دهد که هیدرولیزات‌های تهیه‌شده از ضایعات میگو حاوی طیف گسترده‌ای از پپتیدها با وزن‌های مولکولی مختلف هستند که بر اساس محاسبات ریاضی سطح زیر منحنی حدود ۴۵ درصد آنها کمتر از ۵۰۰ دالتون وزن دارند (شکل ۱).

تغییرات وضعیت ردوکس‌ده سلولی سرطانی HCT116 در حضور پپتیدهای زیست‌فعال از ماهی کفال و میگو

نتایج آزمایش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی (NO، CAT، GSH، MDA) پپتیدهای زیست‌فعال استفاده‌شده در این تحقیق در شکل ۴ ارائه شده است. این نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال استخراج‌شده از کفال و میگو تأثیر معناداری بر فعالیت GSH و CAT در رده سلولی داشت ($P < 0.05$). با این حال، در مورد فعالیت کاتالاز، تفاوت معناداری بین گروه میگو و گروه کنترل مشاهده نشد ($P > 0.05$)، که نشان‌دهنده عدم اثر قابل توجه پپتیدهای میگو بر این پارامتر است. همچنین، نتایج آزمایش NO نشان داد که پپتیدهای استخراج‌شده از میگو و کفال به‌طور قابل توجهی غلظت NO را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دادند ($P < 0.05$). تفاوت معناداری در غلظت NO بین پپتیدهای

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال در شرایط *In vitro*

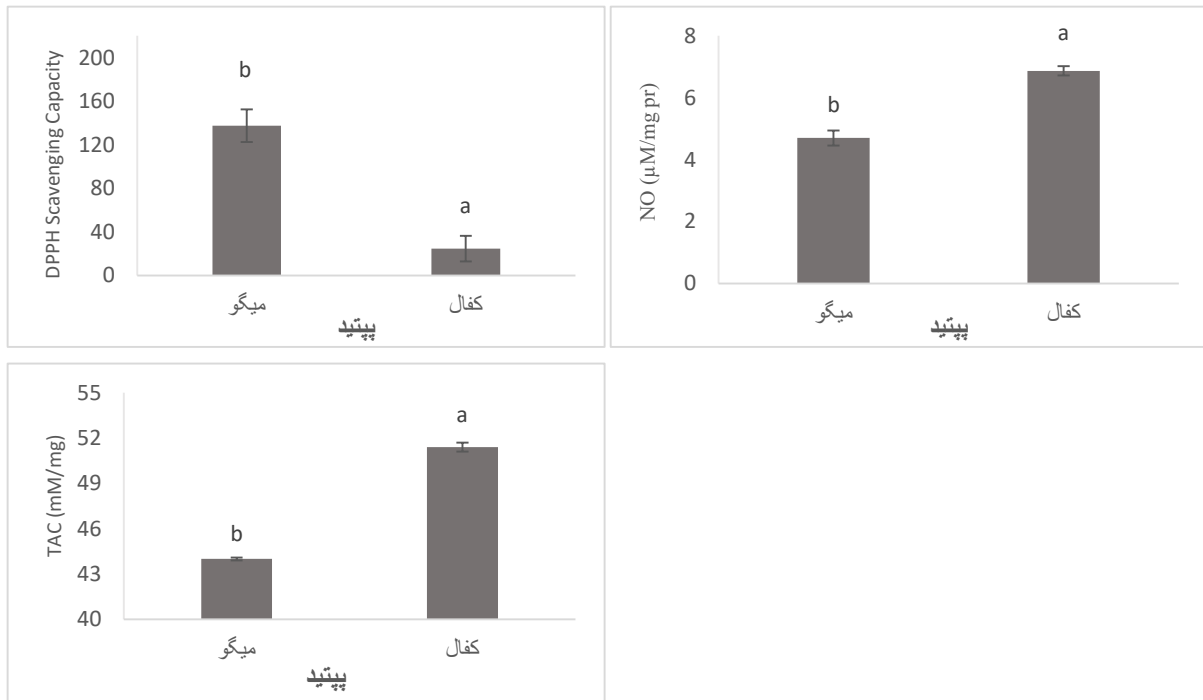
شکل ۲ نتایج مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال در شرایط *In vitro* را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که پپتیدهای استخراج‌شده از ماهی کفال از نظر NO و TAC بالاتر از پپتیدهای استخراج‌شده از ضایعات میگو بودند ($P < 0.05$). تفاوت معناداری ($P < 0.05$) در ظرفیت رادیکال DPPH بین پپتیدهای استخراج‌شده از ضایعات میگو و پپتیدهای استخراج‌شده از ماهی کفال مشاهده شد.

نتایج سمیت سلولی بر اساس رنگ‌آمیزی قرمز خنثی و MTT

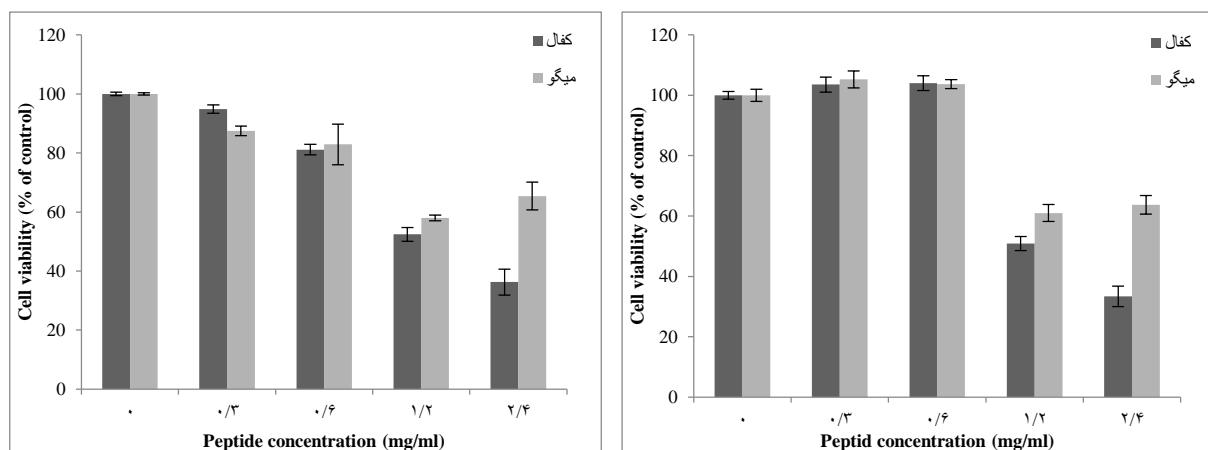
شکل ۳ نتایج سمیت سلولی پپتیدهای زیست‌فعال استفاده‌شده در این تحقیق را نشان می‌دهد. برای بررسی سمیت پپتیدها، چهار غلظت مختلف در محیط کشت سلولی استفاده شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پپتیدها،

مقایسه با نمونه کنترل نداشتند و تفاوت معناداری در این خصوص مشاهده نشد ($P > 0.05$).

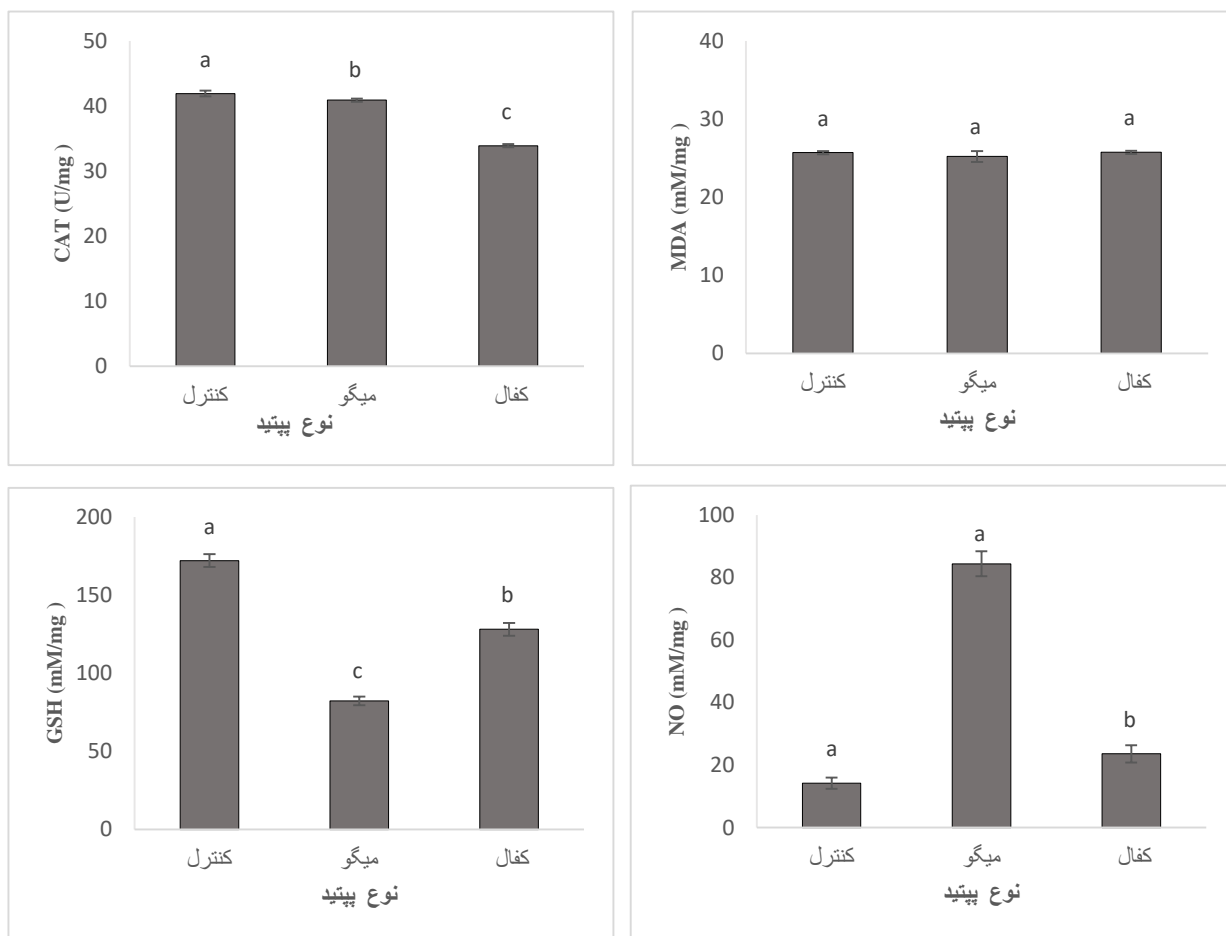
میگو و کفال مشاهده شد که پپتیدهای کفال غلظت بالاتری داشتند ($P < 0.05$). در عین حال، پپتیدهای زیست‌فعال میگو و کفال هیچ تأثیری بر MDA در کشت‌های میگو و کفال در



شکل ۲ - فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال استخراج شده از کفال و میگو در شرایط *In vitro*. حروف کوچک تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها را نشان می‌دهند ($P < 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از استاندارد آورده شدند و از طریق Independent T-test آنالیز شدند ($n = 3$).



شکل ۳ - نتایج مهار رشد سلولی پپتیدهای زیست‌فعال میگو و کفال استفاده شده در این مطالعه بر اساس روش‌های MTT (چپ) و Neutral Red (راست). داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از استاندارد آورده شدند و از طریق آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی دانکن آنالیز شدند ($n = 3$).



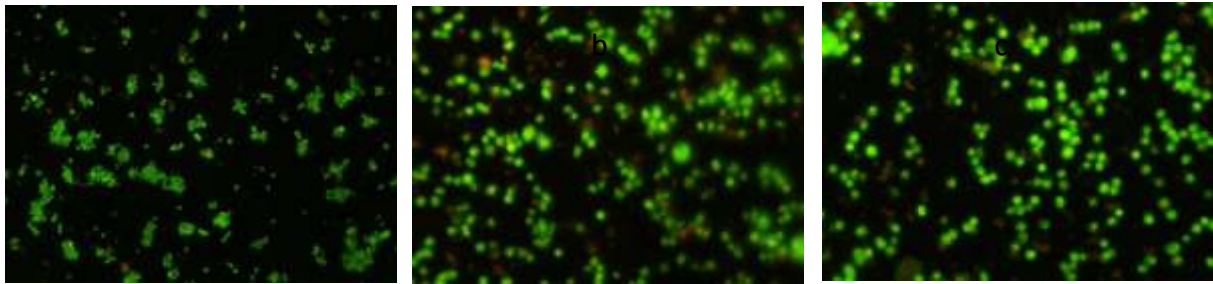
شکل ۴- نتایج فعالیت کاتالاز، GSH، NO و غلظت MDA در خط سلولی سرطانی HCT116 که در معرض پپتیدهای زیست‌فعال استخراج شده از کفال و میگو قرار گرفته‌اند. حروف کوچک تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها را نشان می‌دهند ($P < 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از استاندارد آورده شدند از طریق آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی دانکن آنالیز شدند ($n = 3$).

قرمز بودند و نواحی سبز و نارنجی از کروماتین ضخیم یا شکسته در هسته‌های سلول‌های آپوپتوتیک مشخص می‌شدند (شکل ۵). نرخ‌های آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با پپتیدهای میگو و کفال با سلول‌های کنترل مقایسه شد و نتایج نشان داد که پس از تیمار با پپتیدها، نرخ آپوپتوز به ترتیب ۴۸٪ و ۸۴٪ افزایش یافته است (جدول ۱).

ارزیابی تغییرات مورفولوژیکی درده سلولی HCT116

تیمار شده با پپتیدهای میگو و کفال

تیمار سلول‌ها با پپتیدها باعث تغییراتی در شکل، اندازه و جدا شدن سلول‌ها از سطح شد که این‌ها همگی نشانه‌های آشکار مرگ سلولی بودند. تجزیه و تحلیل کمی آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی Acridine Orange/Ethidium Bromide (Ao/EtBr) و میکروسکوپ فلورسانس انجام شد. هسته‌های سلول‌های زنده که به‌طور پیوسته سبز روشن بودند، نشان‌دهنده سلول‌های زنده بودند. از سوی دیگر، سلول‌های نکروتیک با هسته‌هایی که به‌طور یکنواخت نارنجی



شکل ۵- ارزیابی مکانیسم‌های مرگ سلولی القا شده توسط پپتیدهای کنترل (a)، کفال (b)، و میگو (c) در خط سلولی HCT116 بر اساس رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج - اتیودیوم بروماید (۴۰۰×).

می‌شوند، در درمان سلول‌های سرطانی به کار می‌روند. در میان این آنتی‌اکسیدان‌ها، پپتیدهای زیست‌فعال به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی گزارش شده خود در مطالعات مختلف، توجه زیادی را جلب کرده‌اند (۲۰ و ۲۲ و ۲۷).

در این تحقیق، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال استخراج شده از ماهی کفال و ضایعات میگوی وانامی ارزیابی شد. بر اساس این نتایج، پپتیدهای استخراج شده از میگو پتانسیل بالاتری برای مهار DPPH نسبت به پپتیدهای استخراج شده از کفال دارند، در حالی که پپتیدهای کفال دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری بودند. بر اساس نتایج عددی حاصل از این مطالعه، پپتیدهای استخراج شده از میگو پتانسیل بالاتری برای مهار DPPH (۱۵٪) نسبت به پپتیدهای کفال (۱۱٫۸٪) نشان دادند. با این حال، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) پپتیدهای کفال (۶٫۸۷ mM/mg) بالاتر از پپتیدهای میگو (۴٫۷ mM/mg) بود. این نتایج با مطالعات قبلی روی منابع دیگر ماهیان همخوانی دارد. به عنوان مثال، پپتیدهای استخراج شده از عضله ماهی کراکر (*Tegillarca granosa*) ظرفیت مهارکنندگی DPPH برابر با ۱۳٫۴٪ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برابر با ۵٫۹ mM/mg داشتند (۱۲). همچنین، پپتیدهای استخراج شده از احشاء ماهی ماکرل (*Magalaspis cordyla*) ظرفیت مهارکنندگی DPPH برابر با ۱۲٫۶٪ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برابر با ۵٫۲ mM/mg نشان دادند (۳۳). در مورد پپتیدهای استخراج شده از پروتئین میوفیبریل ماهی پاتینا (*Pangasius sutchi*)، ظرفیت

بحث و نتیجه گیری

سرطان کولون می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله مواد شیمیایی، سرطان‌زایی، تابش، ویروس‌ها یا ژن‌های جهش یافته ارثی ایجاد شود.

جدول ۱- ارزیابی مکانیسم‌های مرگ سلولی القا شده توسط پپتیدهای کفال و میگو در خط سلولی HCT116 بر اساس رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/اتیودیوم بروماید.

	Normal	Necrosis	Apoptosis
کنترل	96.11	0.98	2.91
کفال	8.33	6.97	84.7
میگو	46.31	5.62	48.07

• نتایج رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/اتیودیوم بروماید را برای ارزیابی مکانیسم‌های مرگ سلولی القا شده توسط پپتیدهای استخراج شده از کفال و میگو در رده سلولی HCT116. سلول‌ها به سه گروه تقسیم شدند: کنترل (بدون تیمار)، تیمار با پپتیدهای کفال، و تیمار با پپتیدهای میگو. درصد سلول‌های زنده (Normal)، آپوپتوز (Apoptosis) و نکروز (Necrosis) در هر گروه گزارش شده است. نتایج نشان می‌دهند که پپتیدهای کفال و میگو به طور معناداری باعث القای آپوپتوز و نکروز در مقایسه با گروه کنترل شدند، که نشان‌دهنده اثرات ضدسرطانی این پپتیدهاست.

این مواد با القای استرس اکسیداتیو در سلول‌های بسیاری از ارگان‌ها می‌توانند میزان تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش دهند که به نوبه خود می‌تواند سطح تهاجمی سرطان در بدن را کاهش دهد (۳۸ و ۱۶). امروزه، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که معمولاً به عنوان مواد غذایی عملکردی دسته‌بندی

مهارکنندگی DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به ترتیب ۱۴٫۲٪ و ۶٫۱ mM/mg گزارش شده است (۲۳). این مقایسه نشان می‌دهد که پپتیدهای استخراج‌شده از کفال و میگو در محدوده عملکردی پپتیدهای استخراج‌شده از منابع دیگر قرار دارند و می‌توانند به عنوان منابع بالقوه آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرند. این مواد با استفاده از روش‌های مختلفی مانند مهار رادیکال‌های آزاد، کلاته‌سازی، مسدود کردن فعالیت برخی آنزیم‌ها، تولید محصولات پایدار با اهداکنندگان الکترون و در نهایت، افزایش بیان برخی ژن‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو، سطح استرس سلولی را کاهش می‌دهند (۱۰ و ۱۳ و ۳۵ و ۳۷).

سمیت سلولی پپتیدها در این مطالعه با استفاده از آزمون‌های MTT و قرمز خنثی بررسی شد. این تکنیک‌ها یکپارچگی غشاء سلولی و فعالیت میتوکندریایی سلول‌های مورد بررسی را ارزیابی می‌کنند. طبق یافته‌های ما، زنده‌مانی رده سلولی HCT116 با افزایش غلظت پپتید کاهش می‌یابد؛ پس از ۲۴ ساعت، کمترین زنده‌مانی سلولی در بالاترین غلظت (۲٫۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که سمیت سلولی پپتیدها در کشت‌های سلولی سرطانی مختلف، بستگی به غلظت پپتیدها و مدت زمان قرارگیری آنها در معرض سلول‌ها دارد (۱۷ و ۳۸). پپتیدهای کفال و میگو فعالیت سمی سلولی را در رده سلولی HCT116 با مقادیر IC50 برابر ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت نشان دادند. در این مطالعه، فعالیت ضدسرطانی پپتیدهای آزمایش‌شده مشابه پپتیدهای استخراج‌شده از گونه *Styela clava* (۱~ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (۸) بود، در حالی که پپتیدهای استخراج‌شده از دانه‌های لونگان (>۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (۳۰) و اویستر *Saccostrea cucullata* (۳~۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (۷) اثربخشی ضدسرطانی قوی‌تری نسبت به پپتیدهای مورد بررسی در این مطالعه داشتند.

نتایج استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال در رده سلولی HCT116 نشان داد که پپتیدهای کفال به طور قابل توجهی

رادیکال‌های NO را نسبت به پپتیدهای میگو افزایش می‌دهند. همچنین، همراه با افزایش رادیکال‌های NO در کفال، میزان GSH و فعالیت کاتالاز (CAT) در سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد که این تغییرات نشان‌دهنده نقش این پپتیدها در مهار رادیکال‌های آزاد است. به این ترتیب، سلول‌های سرطانی HCT116 نسبت به سیستم ایمنی و مکانیسم‌های دفاعی سلول آسیب‌پذیرتر شده و نرخ رشد آنها کاهش می‌یابد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که پپتیدهای زیست‌فعال علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ممکن است از طریق تأثیر بر تعادل اکسیداتیو-آنتی‌اکسیدانی و القای استرس اکسیداتیو، منجر به کاهش بقای سلول‌های سرطانی شوند. با توجه به نتایج آزمایش‌های انجام‌شده، پپتیدهای کفال به دلیل افزایش تولید NO و کاهش GSH و فعالیت CAT، اثرات قوی‌تری نسبت به پپتیدهای میگو در مهار رشد سلول‌های سرطانی نشان دادند. این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل بالقوه پپتیدهای زیست‌فعال در تعدیل مکانیسم‌های دفاعی سلول‌های سرطانی از طریق تغییر در تعادل اکسیداتیو است. علاوه بر این، با توجه به یافته‌های ارائه شده در شکل ۱، می‌توان استنباط کرد که ۹۵٪ از پپتیدهای کفال و ۴۰٪ از پپتیدهای میگو وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون دارند. طبق مطالعات Aleman و همکاران (۲۰۱۱)، پپتیدهایی که وزن مولکولی کمتری دارند، فعالیت شلاته‌سازی قوی‌تری نسبت به پپتیدهای با وزن مولکولی بزرگتر نشان می‌دهند (۶). از سوی دیگر نتایج Bamdad و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که پپتیدهای با وزن مولکولی بزرگتر، با به دام انداختن رادیکال‌های آزاد در زنجیره‌های پپتیدی خود، فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تقویت می‌کنند (۹). یافته‌های متناقض پپتیدهای زیست‌فعال نشان می‌دهند که فعالیت اکسیداتیو یا آنتی‌اکسیدانی یک اسید آمینه ممکن است تحت تأثیر نوع آن، توالی آن در زنجیره پپتیدی و محل قرارگیری آن در رابطه با دم‌های C و N باشد. بنابراین، نمی‌توان از وزن مولکولی برای پیش‌بینی فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده کرد (۱۵).

فعالیت‌های زیست‌عملکردی در نظر گرفته شوند. بر اساس نتایج TAC، GSH و DPPH، هر دو پپتید فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی نشان دادند و بقا رده سلولی HCT116 با افزایش غلظت پپتیدها کاهش یافت. با وجود وزن مولکولی پایین‌تر پپتیدهای کفال و خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتر، بالاترین غلظت NO^- در پپتیدهای کفال مشاهده شد و رده سلولی HCT116 در مواجهه با پپتیدهای کفال بیشتر آسیب‌پذیر بود تا پپتیدهای میگو. نتایج نشان می‌دهند که پپتیدهای کفال می‌توانند به‌عنوان یک ترکیب جدید در توسعه غذاهای عملکردی با قابلیت‌های ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی مفید در نظر گرفته شوند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از آزمایشگاه مرکزی دانشگاه ارومیه به‌خاطر فراهم آوردن امکانات برای انجام این تحقیق تشکر می‌کنند.

علاوه بر این، نتایج نشان داد که پپتیدهای استخراج‌شده از میگو و کفال می‌توانند باعث آپوپتوز در رده سلولی HCT116 شوند. پپتیدهای استخراج‌شده از کفال نرخ بالاتری از آپوپتوز را نشان دادند که با محتوای NO^- در محیط کشت سلول‌های ماهی کفال هماهنگ است. پپتیدهای کفال باعث افزایش NO^- شده و میزان بیشتر NO^- می‌تواند به‌عنوان عاملی برای القای آپوپتوز در آزمایش ما در نظر گرفته شود، طبق داده‌های آنتی‌اکسیدانی. سطوح بالاتر NO^- منجر به تولید محصولات واکنشی خطرناکی مانند پراکسی‌نیتريت یا دی‌نیتروزن تری‌اکسید می‌شوند که باعث آپوپتوز و مرگ سلولی می‌گردند (۱۹). نتایج ما با مطالعاتی که گزارش کرده‌اند، پپتیدهای زیست‌فعال استخراج‌شده از منابع دریایی و سایر منابع پروتئینی موجب آپوپتوز و سرکوب سلول‌های سرطانی می‌شوند هم راستا هست (۲۸).

نتایج این مطالعه فرضیه‌ای را تایید می‌کند که پپتیدهای زیست‌فعال استخراج‌شده از *L. klunzingeri* و *L. vannamei* می‌توانند به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مبتنی بر

منابع

- ۱- حیدری، شعله، حسین نجدگرامی، ابراهیم و نیکو، مهدی (۱۳۹۶). تاثیر مخلوط پپتیدهای زیست‌فعال ماهی ساردین، بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم، پراکسیداسیون چربی‌ها و فراسنجه‌های خونی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ویستار تحت استرس بی‌حرکتی. *مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)* (علمی) ۳۰(۳): ۲۷۹-۲۸۱.
- ۲- حیدریه، نسرين و فرجی، مریم (۱۳۹۳). بررسی اثر عصاره اتانولیک زنجبیل بر وزن بدن و رشد تومور در سرطان پستان موش ماده BALB/C. *مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)* (علمی) 27(4), 487-497. doi: 2746
3. Aluko R. Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Elsevier; 2015. p. 105-40.
4. Ambigaipalan P, Shahidi F. Bioactive peptides from shrimp shell processing discards: Antioxidant and biological activities. *Journal of Functional Foods*. 2017; 34:7-17.
5. Ansari D, Fugelsang JA, Dhital B, Venkatraman V. Dissociating response conflict from numerical magnitude processing in the brain: An event-related fMRI study. *NeuroImage*. 2006;32(2):799-805.
6. Alemán A, Giménez B, Pérez-Santín E, Gómez-Guillén M, Montero P. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*. 2011;125(2):334-41.
7. Alemán A, Gómez-Guillén M, Montero P. Identification of ACE-inhibitory peptides from squid skin collagen after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*. 2013;54(1):790-5.
8. Azadi N, H Najdegerami E, Imani M, Nikoo M. Bioactive peptides from the Pacific white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induce apoptosis and anticancer activities in HCT-116 colon cancer cell line. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2022;21(5):1180-91.
9. Bamdad F, Wu J, Chen L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant

- activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science*. 2011;54(1):20-8.
10. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. 2009;114(4):1198-205.
 11. Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L. Harrison's principles of internal medicine 15th. NY: McGraw-Hill Book Company. 2001.
 12. Chi C-F, Hu F-Y, Wang B, Li T, Ding G-F. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*. 2015; 15:301-13.
 13. Erdmann K, Cheung BW, Schröder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008;19(10):643-54.
 14. Fernandez E, La Vecchia C, Talamini R, Negri E. Joint effects of family history and adult life dietary risk factors on colorectal cancer risk. *Epidemiology*. 2002;13(3):360-3.
 15. Harnedy PA, FitzGerald RJ. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*. 2012;4(1):6-24.
 16. Huang S-L, Jao C-L, Ho K-P, Hsu K-C. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*. 2012;35(1):114-21.
 17. Jumeri, Kim SM. Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). *Food Science and Biotechnology*. 2011;20: 1075-85.
 18. Keyghobadi N, Lotfi MH, Fallahzadeh H, Akhondi M. Nutritional factors related to colorectal cancer in the residents of Yazd City, Iran. *Health and Development Journal*. 2013;2(3):171-81.
 19. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *International Immunopharmacology*. 2001;1(8):1421-41.
 20. Kouhhabibidehkordi G, Kheiri S, Karimi I, Taheri F, Bijad E, Bahadoram M, et al. Effect of white tea (*Camellia sinensis*) extract on skin wound healing process in rats. *World Journal of Plastic Surgery*. 2021;10(1):85.
 21. Le Gouic AV, Harnedy PA, FitzGerald RJ. Bioactive peptides from fish protein by-products. *Bioactive Molecules in Food*. 2018:1-35.
 22. Mendoza FJ, Espino PS, Cann KL, Bristow N, McCrea K, Los MJ. Anti-tumor chemotherapy utilizing peptide-based approaches-apoptotic pathways, kinases, and proteasome as targets. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2005;53(1):47-60.
 23. Najafian L, Babji AS. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification of antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*. 2014; 9:280-9.
 24. Nikoo M, Benjakul S, Ehsani A, Li J, Wu F, Yang N, et al. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods*. 2014; 7:609-20.
 25. Nikoo M, Xu X, Regenstein JM, Noori F. Autolysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing by-products: Enzymatic activities, lipid and protein oxidation, and antioxidant activity of hydrolysates. *Food Bioscience*. 2021;39: 100844.
 26. Nuchprapha A, Paisansak S, Sangtanoo P, Srimongkol P, Saisavoey T, Reamtong O, et al. Two novel ACE inhibitory peptides isolated from longan seeds: Purification, inhibitory kinetics and mechanisms. *RSC Advances*. 2020;10(22):12711-20.
 27. Okeke ES, Okagu IU, Chukwudozie K, Ezike TC, Ezeorba TPC. Marine-Derived Bioactive Proteins and Peptides: A Review of Current Knowledge on Anticancer Potentials, Clinical Trials, and Future Prospects. *Natural Product Communications*. 2024;19(3).
 28. Pan MH, Ghai G, Ho CT. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008;52(1):43-52.
 29. Rabiei S, Rezaei M, Nikoo M, Khezri M, Rafieian-Kopai M, Anjomshoaa M. Antioxidant properties of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) protein hydrolysates prepared with enzymatic hydrolysis using a commercial protease and microbial hydrolysis with *Bacillus licheniformis*. *Food Science and Technology International*. 2022;28(3):233-46.
 30. Rayaprolu SJ, Hettiarachchy NS, Chen P, Kannan A, Mauromostakos A. Peptides derived from high oleic acid soybean meals inhibit colon, liver, and lung cancer cell growth. *Food Research International*. 2013;50(1):282-8.
 31. Repetto G, Del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 2008;3(7):1125-31.
 32. Raucher D, Moktan S, Massodi I, Bidwell III GL. Therapeutic peptides for cancer therapy. Part II—cell cycle inhibitory peptides and apoptosis-inducing peptides. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009;6(10):1049-64.
 33. Sampath Kumar N, Nazeer R, Jai Ganesh R. Functional properties of protein hydrolysates from different body parts of horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012;5: 105-10.
 34. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 2010;31(10):1949-56.
 35. Sun X, Acquah C, Aluko RE, Udenigwe CC. Considering food matrix and gastrointestinal effects in enhancing bioactive peptide absorption and

- bioavailability. *Journal of Functional Foods*. 2020; 64:103680.
36. Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G., Balasubramanian, T., 2014. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4, 343-353.
37. Vázquez, J.A., Fraguas, J., Mirón, J., Valcárcel, J., Pérez-Martín, R.I., Antelo, L.T., 2020. Valorisation of fish discards assisted by enzymatic hydrolysis and microbial bioconversion: Lab and pilot plant studies and preliminary sustainability evaluation. *Journal of Cleaner Production* 246, 119027.
38. Wong, B., Ching, C., Lam, S., Li, Z., Chen, B., Li, Y., Liu, H., Liu, J., Wang, B., Yuan, S., 1998. Differential north to south gastric cancer-duodenal ulcer gradient in China. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 13, 1050-1057.
39. Xie, J., Ye, H., Du, M., Yu, Q., Chen, Y., Shen, M., 2019. Mung bean protein hydrolysates protect mouse liver cell line Nctc-1469 cell from hydrogen peroxide-induced cell injury. *Foods* 9, 14.

Evaluation of antioxidant and anti-cancer properties of bioactive peptides extracted from two marine species on colon cancer HCT-116 cell line

Vahabzadeh heydarlou M.¹, Najdegerami E.¹, Aghazadeh S.² and Nikoo M.³

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

² Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

³ Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Colon cancer is one of the most common types of gastrointestinal malignancies, with oxidative stress and redox imbalance playing critical roles in its progression. This study investigates the antioxidant properties and cytotoxic and apoptotic effects of bioactive peptides derived from mullet fish (*Liza klunzingeri*) and Vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on colon cancer cells (HCT-116). The antioxidant activity of peptides was evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, total antioxidant capacity (TAC), and nitric oxide (NO-) measurement, while cytotoxic effects were assessed using the Neutral Red Assay and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Apoptosis was evaluated using acridine orange/ethidium bromide staining, and redox changes were assessed. The results demonstrated that peptides derived from mullet exhibited significantly higher antioxidant activity in terms of TAC and NO levels compared to shrimp-derived peptides ($p < 0.05$). Cytotoxicity assays revealed a dose-dependent reduction in cancer cell viability, with an IC₅₀ value of 1.2 mg/mL after 24 hours, indicating potent cytotoxic and apoptotic effects. Furthermore, mullet-derived peptides significantly elevated NO levels while reducing glutathione content and catalase (CAT) activity in cancer cells ($p < 0.05$). Both mullet and shrimp peptides induced apoptosis in HCT-116 cells, with mullet peptides exerting a more pronounced effect ($p < 0.05$). These findings suggest that by reducing antioxidant capacity and inhibiting the proliferation of colon cancer cells, mullet-derived peptides may enhance the susceptibility of cancer cells to endogenous defense mechanisms.

Key words: Cytotoxic, mullet fish, whiteleg shrimp, protein hydrolysates, apoptosis