

تاثیر هیدرولیز اسیدی بر قابلیت تحریک سلول‌های ماکروفاژ RAW264.7 و ویژگی‌های ضد اکسایشی گالاتوفوکان گیاه *Azolla filiculoides*

مرضیه رضانی شماسی^۱، مهدی طبرسا^{*۱}

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۴

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶

*نویسنده مسول:

m.tabarsa@modares.ac.ir

پلی ساکاریدها از جمله ماکرومولکول‌های زیستی هستند که علاوه بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد، توانایی بروز خواص زیست فعالی امیدوارکننده‌ای با توجه به ساختار شیمیایی خود دارند. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تاثیر وزن مولکولی پلی ساکارید گالاتوفوکان استخراج شده از گیاه آب شیرین *Azolla filiculoides* بر قابلیت آن در تحریک سلول‌های ماکروفاژ RAW264.7 و ممانعت از واکنش ضد اکسایشی می‌باشد. پلی ساکارید گالاتوفوکان در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت در آب مقطر استخراج و بازیابی پلیمرها با استفاده از ۷۰ درصد اتانول انجام شد. هیدرولیز پلی ساکاریدها توسط ۰/۰۱ نرمال اسید هیدروکلرید در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه صورت پذیرفت. پلی ساکارید خام و هیدرولیزات به طور عمده از قندهای خنثی (۶۷/۴۶-۶۸/۰۲ درصد) و مقادیر کمتری یورونیک اسید (۴/۴۸-۴/۵۳ درصد) تشکیل شده و در محدوده وزن مولکولی $10^3 \times 783/99 - 0/4$ گرم/مول قرار داشتند. پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات فاقد سمیت سلولی بوده و هیدرولیز ۱۵ با بیشترین تحریک پاسخ پیش التهابی در سلول‌های RAW264.7 سبب رهاسازی میزان قابل توجهی از نیتریک اکسید (۵۵/۶ میکرومول) به محیط کشت شد. هیدرولیز ۱۵ توانست منجر به بالاترین سطح از مهار رادیکال آزاد DPPH (۶۵/۲ درصد) و کاهش یون آهن Fe^{3+} (جذب ۰/۵) شود. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که پلی ساکاریدهای گالاتوفوکان دارای قابلیت تقویت سیستم ایمنی و مهار واکنش‌های اکسایشی هستند و کاهش وزن مولکولی تا محدوده مشخص می‌تواند سبب افزایش قابل توجه فعالیت زیستی شود.

کلید واژه‌ها: پلی ساکارید، گالاتوفوکان، *A. filiculoides*، ضد اکسایش، تقویت کننده سیستم ایمنی

مقدمه

منابع آبی به دلیل گسترش وسیع به عنوان یک منبع مهم جهت تامین نیازهای تغذیه‌ای انسان مطرح می‌باشند. در این میان گیاهان آبی نیز به عنوان منبعی بسیار غنی از ترکیبات زیست فعال که مزایای درمانی فراوانی را دارا می‌باشند اخیراً مد نظر پژوهشگران قرار گرفته‌اند. پلی ساکاریدها یکی از این ترکیبات زیست فعال می‌باشند که به فراوانی در دیواره سلولی جلبک‌های دریایی و گیاهان آبی یافت می‌شوند و توانسته‌اند مسیر خود را به صنایع مختلف غذایی و دارویی باز نمایند. استخراج این پلی ساکاریدها از آبزیان و تعیین ساختار شیمیایی و فعالیت‌های زیستی آنها توجه بسیاری را به خود معطوف نموده است^[۱،۲]. شناخته شده ترین پلی ساکاریدهای منابع آبی عبارتند از فوکوئیدان جلبک‌های قهوه‌ای، کاراگینان و

آگار جلبک‌های قرمز و اولون جلبک‌های سبز [۳،۴،۵]. تا کنون، این پلی‌ساکاریدها ویژگی‌های زیستی متنوعی از جمله ضد التهابی، ضد سرطانی و تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی را نشان داده اند [۶،۷].

در درمان بیماری‌های مختلف خصوصاً انواع سرطان، یکی از مهمترین شیوه‌های درمان مکمل، استفاده از تنظیم‌کننده‌های ایمنی به منظور افزایش پاسخ دفاعی میزبان می‌باشد [۸]. تا کنون، چندین نوع تنظیم‌کننده سیستم ایمنی شامل پروتئین‌های پستانداران نظیر اینترفرون گاما، فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت‌ها و فاکتور محرک کلونی ماکروفاژها مشخص شده است [۹]. در سال‌های اخیر، پلی‌ساکاریدهای به دست آمده از منابع خشکی و دریایی شامل قارچ‌ها، جلبک‌ها، باکتری‌ها و گیاهان عالی توانسته اند به میزان زیادی توجه محققان را به ویژگی‌های تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی خود جلب نمایند [۸]. در حالی که همچنان دانش و فهم محققان از چگونگی مکانیسم اثر این پلی‌ساکاریدها در حال توسعه می‌باشد، به نظر می‌رسد که یکی از مکانیسم‌های اولیه تحریک غیراختصاصی سیستم ایمنی می‌باشد [۸]. در واقع، مکانیسم اصلی تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی انسان، فعالیت ضد سرطانی و ضد باکتریایی پلی‌ساکاریدها از طریق تحریک و تنظیم سلول‌های ماکروفاژی است [۱۱]. اخیراً، علاوه بر پلی‌ساکاریدهای با منشأ گیاهان دارویی و قارچ‌ها، توجه پژوهشگران به پلی‌ساکاریدهای به دست آمده از آبزیان نیز جهت تقویت سیستم ایمنی از طریق فعال سازی سلول‌های ماکروفاژ نیز جلب شده است [۱۲،۱۳]. در این راستا، می‌توان از مطالعه‌ای که Lei ro و همکاران [۱۴] بر روی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از جلبک *Ulva rigida* انجام دادند نام برد. پلی‌ساکارید بدست آمده در این بررسی دارای دی‌ساکاریدهای گلوکرونیک اسید و رامنوز بوده و نشان دادند که در صورت تماس با سلول‌های ماکروفاژ موش رده RAW264.7 می‌توانند سبب تحریک سلولی و در نتیجه رهاسازی نیتریک اکسید و پروستاگلاندین E_2 شوند. بر اساس یافته‌های بدست آمده، پلی‌ساکاریدهای آبزیان نه تنها قادر به مقابله با سرطان از طریق القای آپوپتوز، جلوگیری از متاستاز و تقویت سیستم ایمنی هستند، بلکه می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و با غیر فعال کردن آن‌ها از بروز سرطان پیشگیری نمایند. توانایی فوکوئیدان‌های به دست آمده از جلبک‌های مختلف در غیر فعال کردن یون‌های هیدروکسیل، سوپراکسید، DPPH و همچنین شلاته کردن یون‌های آهن گزارش شده است [۱۵،۱۶]. بررسی گزارش‌های مرتبط حاکی از آن است که میزان سولفات، نسبت مولی سولفات به فوکوز، نسبت مولی سولفات به میزان قند کل و وزن مولکولی فوکوئیدان عوامل تعیین‌کننده در قدرت و نوع فعالیت زیستی آن است [۱۷].

تا کنون، در بین گونه‌های مختلف گیاهان آبزی به ترکیبات زیست فعال آزولا (*Azolla filiculoides*) کمتر توجه شده است. آزولا که معروف به سرخس آبی است متعلق به خانواده Azollaceae با ساقه‌های ریزومی منشعب، برگ‌های کوچک ۲ تا ۵ سانتی متر بوده و از سازگاری و سرعت تکثیر بالایی برخوردار می‌باشد [۱۸]. آزولا در آب‌های راکد مانند رودخانه‌ها، برکه‌ها، کانال‌ها و شالیزارها رشد می‌کند [۱۸]. در مدت زمان کوتاه پس از استقرار سطح آب را به نحوی می‌پوشاند که نور خورشید قادر به نفوذ به اعماق نیست. عدم نفوذ نور به لایه‌های زیرین آب موجب توقف و یا کاهش رشد گیاهان غوطه ور و در نتیجه تغییر در زیست بوم آبگیر می‌گردد [۱۹]. تاکنون از آزولا برای غنی سازی خاک‌های نابارور و همچنین به عنوان مکمل غذایی دام، طیور و آبزیان [۲۰]، تصفیه فاضلاب‌ها [۲۱] و بهبود سطح کشاورزی پایدار [۲۲] استفاده شده است. در مطالعه پیشین، یافته‌های گروه حاضر نشان داد که *A. filiculoides* حاوی یک گالاکتوفوکان اسیدی است که قادر به تحریک سلول‌های ماکروفاژ RAW264.7 از طریق مسیرهای سیگنالینگ NF- κ B و MAPKS و در نتیجه رهاسازی سیتوکین‌های پیش التهابی می‌باشند. در این مطالعه، بیشترین قابلیت تحریک سلولی در فراکسیون پلی‌ساکاریدی مشاهده شد که پس از تخلیص به دست آمده و دارای کمترین وزن مولکولی بود. اگرچه فرضیه تاثیر کاهش وزن مولکولی در بهبود فعالیت زیست فعالی نیازمند انجام تحقیقات بیشتر جهت تایید می‌باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر، تولید هیدرولیزات با وزن‌های مولکولی متفاوت از پلی‌ساکارید خام *A. filiculoides* و بررسی امکان بهبود قابلیت آن در تحریک سلول‌های ماکروفاژ و مهار واکنش‌های اکسایشی به منظور استفاده در صنایع غذایی به عنوان یک افزودنی با ویژگی‌های تغذیه‌ای و درمانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه

گونه *A. filiculoides* از شالیزارهای شهر نور در اردیبهشت ۱۳۹۵ جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه فرآوری دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده با آب شیر شستشو شد و به وسیله آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ روز کاملاً خشک و کاملاً آسیاب شدند. این نمونه‌ها در داخل پلاستیک‌های درب دار تا زمان استخراج گالاکتوفوکان در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

استخراج پلی ساکارید

ابتدا ۲۰ گرم نمونه در ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۵ درصد به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق همراه با همزن مکانیکی جهت حذف رنگدانه‌ها، چربی‌ها و ترکیبات با وزن مولکولی کم قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ (۱۰ درجه سلسیوس، ۹۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه) به منظور جداسازی کامل رنگدانه‌ها، نمونه سه بار با اتانول تازه و استون شستشو و پودر در دمای اتاق خشک گردید. سپس، ۲۰ گرم از پودر خشک با ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت غوطه‌ور شد. عصاره‌ها در ۹۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ و مایع روماندر در ۶۰ درجه سلسیوس تغلیظ شد. در انتها، پلی‌ساکاریدها با افزودن اتانول ۹۹ درصد به مایع روماندر تا دستیابی به غلظت نهایی ۷۰ درصد رسوب داده شد. پلی‌ساکاریدها پس از سانتریفیوژ (۱۰ درجه سلسیوس، ۹۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه) جداسازی و با اتانول ۹۹ درصد و استون چندین مرتبه شسته شد و سپس در دمای اتاق خشک گردید.

آماده‌سازی هیدرولیزات

بمنظور دستیابی به پلی ساکاریدهایی با وزن‌های مولکولی متفاوت، در ابتدا ۲۰ میلی‌گرم از پلی ساکارید خام در ۱ میلی‌لیتر از ۰/۰۱ نرمال اسید هیدروکلریک حل و سپس هیدرولیز در آب جوش به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه به صورت ریفلاکس انجام شد. واکنش‌دهنده‌ها بلافاصله خنک و با ۱ میلی‌لیتر از سود ۰/۰۱ نرمال خنثی شدند. تمام محلول‌ها در کیسه دیالیز ۵۰ میلی لیتر (#3247027, Spectrum Laboratories, Compton, CA, USA) با آب مقطر دیالیز و در نهایت لیوفیلیزه شد.

تعیین ترکیب شیمیایی

کربوهیدرات کل توسط روش فنول-سولفوریک اسید با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد تعیین شد^[۳۳]. میزان پروتئین توسط معرف فولین-فنول با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد^[۳۴]. میزان یورونیک اسید با روش Filisetti-Cozzi و Carpita^[۳۵] توسط ام‌هیدروکسی‌دی‌فنیل با استفاده از گلوکرونیک اسید به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

تعیین وزن مولکولی

به طور خلاصه، غلظت ۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر پلی‌ساکارید خام و هیدرولیزات در آب مقطر حل شد و به مدت ۳۰ ثانیه در مایکروویو قرار گرفت تا حداکثر میزان حلالیت حاصل شود. نمونه‌ها بلافاصله از طریق یک غشای سلولزی فیلتر و به سیستم تفرق نور لیزر ایستا چند زاویه‌ای (MALLS)، سیستم آشکار کننده ضریب شکست (RI) و ستون کروماتوگرافی BioSep-SEC-s2000 (BioSep, 300 × 7.8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) جهت تجزیه و تحلیل ویژگی‌های مولکولی استفاده شد. همچنین از یک محلول آبی متشکل از

۰/۱۵ مولار NaNO_3 و ۰/۰۲ درصد NaN_3 به عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۰/۴ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد. نرم افزار ASTRA 5.3 برای محاسبه میانگین وزنی وزن مولکولی (M_w) و شعاع چرخش (R_g) توزیع چندگانه بکار گرفته شد. حجم مخصوص چرخش (SV_g) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$SV_g = 4/3 \times (R_g \times 10^8)^3 / (M_w/N) = 2/522 R_g^3/M_w$$

که در آن N عدد آواگادرو و واحدهای SV_g ، M_w و R_g به ترتیب سانتیمتر مکعب/ گرم، گرم/ مول و نانومتر می باشد.

تکثیر ماکروفاژها RAW264.7 و سنجش میزان نیتریک اکسید

رده سلولی ماکروفاژ RAW264.7 (ATCC) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر با تراکم 1×10^4 سلول/چاهک در یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ اف بی اس (FBS) کشت داده شد. سلول‌ها همراه با ۱۰۰ میکرولیتر محلول پلی ساکارییدی در سه غلظت ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/ میلی لیتر انکوبه شد. انکوباسیون کشت سلولی در اتمسفر مرطوب حاوی ۵٪ CO_2 در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. سپس محلول WST-1 (۲۰ میکرولیتر) به چاهک‌ها اضافه شد و مجدداً به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از خوانشگر میکروپلیت (EL-800; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) اندازه‌گیری شد.

نسبت تکثیر ماکروفاژها (%) = جذب نمونه / جذب کنترل $\times 100$

نیتریک اکسید رها شده توسط سلول‌های ماکروفاژ به درون محیط کشت به عنوان شاخص تحریک کنندگی سیستم ایمنی اندازه‌گیری شد. سلول‌های ماکروفاژ RAW264.7 با تراکم 1×10^4 سلول/چاهک در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و سپس با غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/ میلی لیتر پلی ساکاریدها یا ۱ میکروگرم/ میلی لیتر لیپوپلی ساکارید باکتریایی (LPS) در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد. از معرف گریس برای تعیین مقدار تولید نیتریک اکسید استفاده شد [۲۶]. از NaNO_2 (۱-۲۰۰ میکرومولار در محیط کشت) به عنوان استاندارد برای تعیین مقدار نیتریک اکسید تولید شده توسط ماکروفاژها استفاده شد.

سنجش قابلیت مهار رادیکال DPPH

پتانسیل پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیز شده در مهار رادیکال آزاد DPPH بر طبق روش Brand-Williams و همکاران [۲۷] با کمی تغییر انجام شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه‌های پلی ساکارییدی (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) یا اسید آسکوربیک (۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) به ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۲،۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) اضافه شد. سپس مخلوط حاصل در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر میکروپلیت ثبت شد. درصد مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

فعالیت خنثی کنندگی رادیکال آزاد DPPH (%) = (کنترل - نمونه) / کنترل $\times 100$

قدرت کاهندگی یون آهن Fe^{3+}

جهت اندازه‌گیری قابلیت پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات در کاهش یون آهن Fe^{3+} از روش Oyaizu [۲۸] استفاده شد. ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های پلی ساکارییدی (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) یا اسید آسکوربیک (۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات

سدیم ۰/۲ مولار (pH ۶/۶) و ۵۰۰ میکرولیتر از فری سیانات پتاسیم ۱٪ مخلوط شد. انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس انجام شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ اضافه و مخلوط حاضر به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در ادامه، ۱ میلی‌لیتر از مایع رومانند با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر کلرید آهن ۰/۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج آزمایشات، در ابتدا تاثیر غلظت‌های مختلف پلی‌ساکارید بر فعالیت زیستی با استفاده از تحلیل واریانس یکطرفه بررسی شد. در صورت معنی‌دار بودن، از آزمون دانکن به منظور مقایسه میانگین‌ها استفاده و بهترین غلظت انتخاب شد. جهت انجام تحلیل‌های آماری نرم افزار SPSS ۲۰ و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Sigmaplot ۱۲ بکار گرفته شد.

نتایج

ترکیب شیمیایی

ترکیب شیمیایی پلی‌ساکاریدهای خام و هیدرولیزات *A. filiculoides* در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که پلی‌ساکارید خام به طور عمده از قندهای خنثی (۶۸/۰۲ درصد) به همراه مقادیر کمتری از قندهای اسیدی (۴/۵۴ درصد) تشکیل شده است. به علاوه، در ساختار عصاره استخراج شده مقادیر اندکی از پروتئین (۱۹/۷ درصد) نیز مشاهده شده است. همچنین میزان ترکیبات شیمیایی در پلی‌ساکاریدهای هیدرولیز شده مورد سنجش قرار گرفت و بررسی‌ها نشان داد مقدار قندهای خنثی (۶۶/۸۲-۶۷/۷۴ درصد)، یورونیک اسید (۴/۴۸-۴/۵۴ درصد) و پروتئین (۱۹/۴۱-۱۹/۵۸ درصد) تفاوت معنی‌داری با ترکیب پلی‌ساکارید خام ندارند ($P > 0.05$).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی عصاره خام و هیدرولیزات *A. filiculoides*

پلی‌ساکارید خام	قندهای خنثی (%)	پروتئین (%)	یورونیک اسید (%)
۶۸/۰±۲/۱۷ ^a	۱۹/۰±۷/۰۷ ^a	۴/۰±۵۴/۴۸ ^a	
۶۷/۰±۷۴/۴۱ ^a	۱۹/۰±۵۸/۱ ^a	۴/۰±۵۲/۳۸ ^a	
۶۶/۰±۸۲/۳۲ ^a	۱۹/۰±۷۴/۲۱ ^a	۴/۰±۴۸/۳۹ ^a	
۶۷/۰±۴۶/۱۶ ^a	۱۹/۰±۰۴۱/۱۴ ^a	۴/۰±۵۴۰/۴۵ ^a	

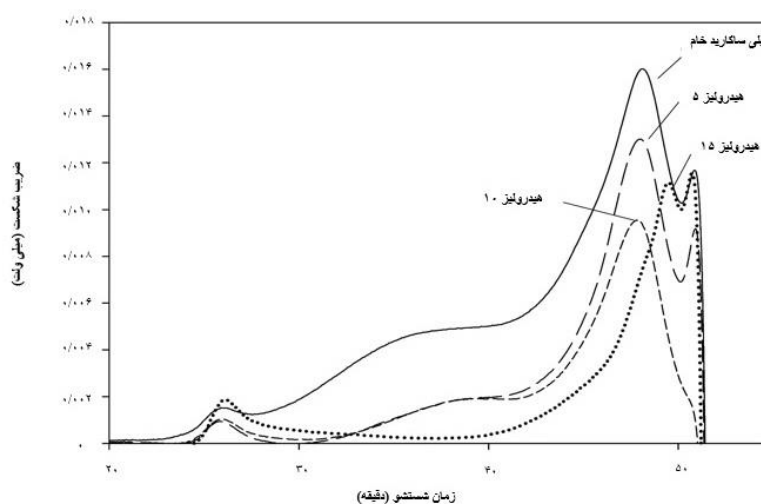
a, b, c نشانگر وجود اختلاف معنی‌درا در بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

وزن مولکولی

نمودار شویس پلی‌ساکاریدهای خام و هیدرولیزات بر روی ستون کروماتوگرافی BioSep-SEC-s2000 در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به نمودار، پلی‌ساکارید خام در فاصله زمانی ۲۵ تا ۴۸ دقیقه به صورت یک پیک پهن از ستون خارج شد که حضور پلیمرهایی با دامنه وسیع وزن مولکولی را نشان می‌دهد. پس از آن که پلی‌ساکارید خام به مدت ۵ دقیقه تحت هیدرولیز قرار گرفت، نمودار شویس پلیمرهای آن دچار تغییرات معنی‌داری شد و با حرکت به سمت راست در فاصله زمانی ۳۲ تا ۴۸ دقیقه در غالب یک پیک باریکتر و با پراکنش محدودتر وزن مولکولی از ستون خارج شد. همچنین، نمودار ضریب شکست پلی‌ساکاریدهای هیدرولیز شده به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه نیز دستخوش تغییرات جدی شدند و در زمان‌های ۴۰ و ۴۱ دقیقه از ستون خارج شدند که شامل پیک‌هایی باریکتر از نظر دامنه پراکنش وزن مولکولی بودند. میانگین وزن مولکولی پلی‌ساکارید خام توسط سیستم MALLS به میزان $۱۰^۳ \times ۷۸۳$ گرم/مول اندازه‌گیری شد (جدول ۲). بعد از ۵ دقیقه هیدرولیز اسیدی، وزن مولکولی به مقدار چشمگیری کاهش یافت و به $۱۰^۳ \times ۴۲۶/۵$ گرم/مول رسید ($p < 0.05$). هیدرولیز پلی‌ساکارید به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه

سبب کاهش قابل توجه وزن مولکولی به $10^3 \times 319/6$ و $10^3 \times 99/4$ گرم/مول کاهش یافت ($p < 0.05$). شعاع چرخش مولکولی که بیانگر اندازه تقریبی یک مولکولی می باشد نیز از $45/7$ نانومتر در پلی ساکارید خام به $39/4$ نانومتر در هیدرولیز ۱۵ کاهش یافت ($p < 0.05$). حجم ویژه چرخش در پلی ساکارید خام $0/30$ سانتی متر مربع/گرم محاسبه شد که با گذشت زمان هیدرولیز افزایش و پس از ۱۵ دقیقه به $1/55$ سانتی متر مربع/گرم رسید ($p < 0.05$).

شکل ۱- نمودار شویش پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات *A. filiculoides* بر روی ستون کروماتوگرافی BioSep-SEC-s2000



جدول ۲. میانگین وزن مولکولی (M_w)، شعاع چرخش (R_g) و حجم ویژه چرخش (SV_g) پلی ساکاریدهای خام

و هیدرولیزات *A. filiculoides*

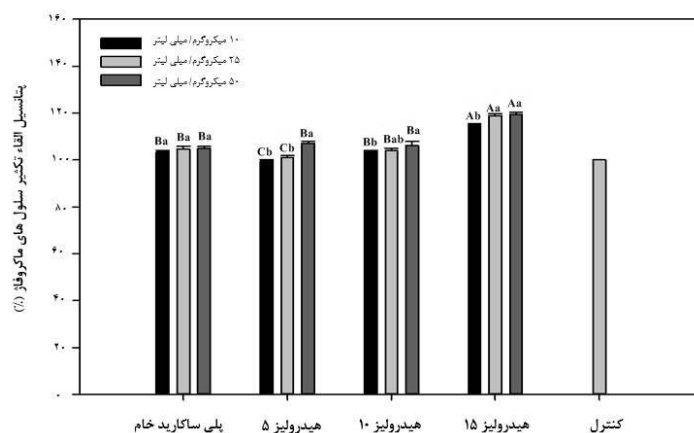
نمونه	وزن مولکولی $\times 10^3$ (گرم بر مول)	شعاع چرخش (نانومتر)	حجم ویژه چرخش (سانتی متر مکعب بر گرم)
پلی ساکارید خام	$784/4 \pm 0/24$ a	$45/0 \pm 7/56$ a	$0/30$
هیدرولیز ۵	$426/3 \pm 5/53$ b	$44/0 \pm 8/42$ a	$0/53$
هیدرولیز ۱۰	$319/2 \pm 6/33$ c	$42/0 \pm 8/28$ b	$0/61$
هیدرولیز ۱۵	$99/0 \pm 4/42$ d	$39/1 \pm 4/13$ c	$1/55$

a, b, c نشانگر وجود اختلاف معنی در بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

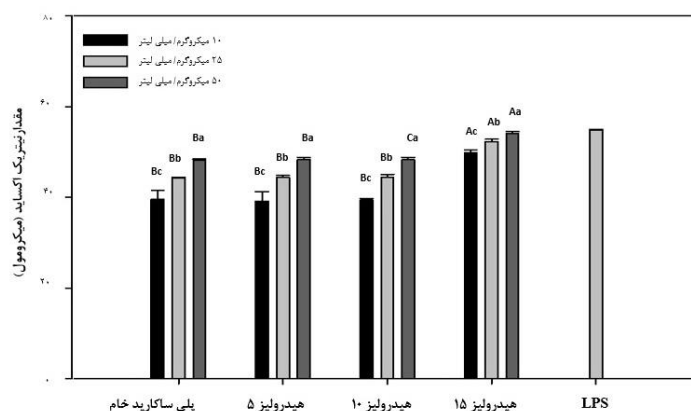
آزربایی سمیت سلولی و تحریک رهاسازی نیتریک اکسید

بمنظور بررسی سمیت سلولی پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات به دست آمده از سلول های ماکروفاژ رده سلولی RAW264.7 استفاده شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود پلی ساکارید خام در غلظت های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر نسبت به نمونه کنترل فاقد سمیت سلولی بود. هیدرولیزات به دست آمده پس از ۱۰ و ۱۵ دقیقه نیز هیچگونه سمیتی نسبت به سلول های RAW264.7 نشان نداد. نه تنها نمونه های تولید شده فاقد سمیت سلولی بودند، بلکه هیدرولیزات به دست آمده پس از ۱۵ دقیقه هیدرولیز اسیدی قادر به القای افزایش تکثیر سلول های ماکروفاژ بودند ($p < 0.05$). همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است پلی ساکاریدهای خام در غلظت های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم/میلی لیتر سبب تحریک سلول های RAW264.7 به رهاسازی نیتریک اکسید به محیط کشت تا $45/5$ میکرومول گردید ($p < 0.05$). میزان رهاسازی نیتریک اکسید در سلول های RAW264.7 انکوبه شده با هیدرولیزات ۵ و ۱۰ دقیقه با سطحی برابر با پلی ساکارید خام اندازه گیری شد. البته،

هیدرولیز ۱۵ دقیقه توانست به میزان قابل توجهی تحریک سلولی را افزایش داده و سطح ترشح نیتریک اکسید را تا ۵۵/۶ میکرومول افزایش دهد ($p < 0.05$).



شکل ۲- پتانسیل القاء تکثیر سلول های ماکروفاژ توسط پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات *A. filiculoides*. حروف A, B, C نشانگر وجود اختلاف معنی دار پلی ساکارید خام و هیدرولیزات در هر غلظت می باشد ($p < 0.05$). حروف a, b, c نشانگر اختلاف معنی دار بین غلظت های پلی ساکارید خام و هیدرولیزات می باشد ($p < 0.05$).



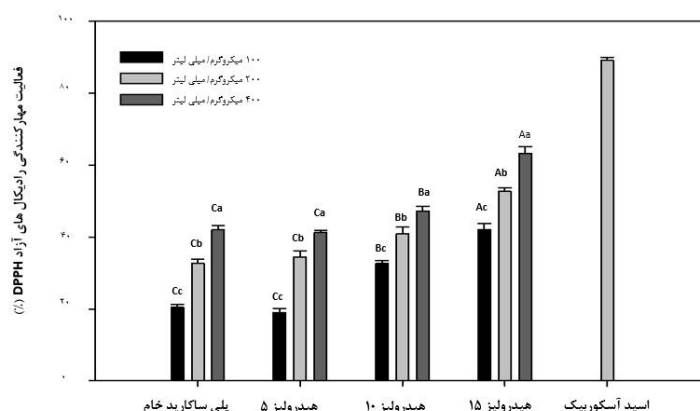
شکل ۳- پتانسیل تحریک سلول های ماکروفاژ توسط پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات *A. filiculoides*. حروف A, B, C نشانگر وجود اختلاف معنی دار پلی ساکارید خام و هیدرولیزات در هر غلظت می باشد ($p < 0.05$). حروف a, b, c نشانگر اختلاف معنی دار بین غلظت های پلی ساکارید خام و هیدرولیزات می باشد ($p < 0.05$).

توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و کاهش یون آهن (Fe^{3+})

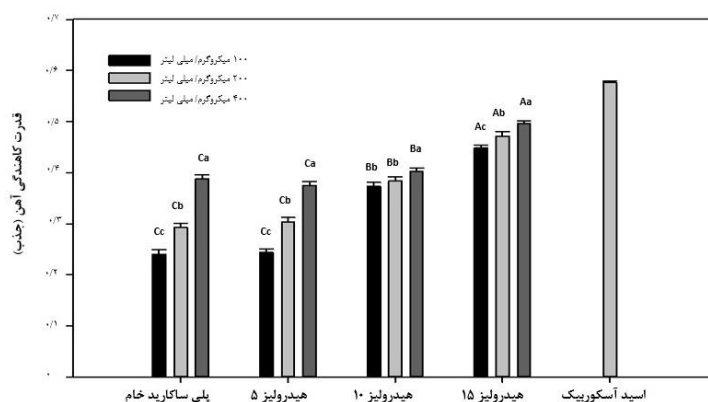
پتانسیل پلی ساکاریدی خام و مشتقات هیدرولیز شده در مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود نتایج حاکی از آن است که مهار رادیکال های آزاد در تمام پلی ساکاریدها تابع غلظت بوده، به طوری که در رابطه مستقیمی با غلظت افزایش یافت ($p < 0.05$). در این بین، پلی ساکارید خام دارای حداقل توانایی مهارکنندگی بود و بیشینه مقدار آن در غلظت ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر برابر با ۴۱/۴ درصد بود. همچنین پلی ساکاریدهای هیدرولیز شده به مدت ۵ دقیقه عملکردی مشابه پلی ساکاریدهای خام داشتند. اما پلی ساکاریدهای هیدرولیز شده به مدت ۱۰ (۵۳/۶ درصد) و ۱۵ (۶۵/۲ درصد) دقیقه قدرت مهارکنندگی

بیشتری را نشان دادند ($p < 0.05$). با این حال توانایی پلی ساکاریدهای مورد مطالعه در مهار رادیکال های آزاد نسبت به اسید آسکوربیک کمتر بود.

قابلیت پلی ساکاریدها در کاهش یون های آهن سه ظرفیتی (Fe^{3+}) به آهن دو ظرفیتی (Fe^{2+}) در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می شود حداقل توانایی در کاهش یون های آهن (جذب ۰/۲۳) در پلی ساکاریدهای خام مشاهده شد ($p < 0.05$). هیدرولیز پلی ساکاریدها در زمان های متفاوت توانست قابلیت کاهندگی پلی ساکاریدها (جذب ۰/۵) را به میزان معنی داری در هیدرولیز ۱۵ دقیقه افزایش دهد ($p < 0.05$). قابلیت پلی ساکاریدهای هیدرولیز شده در کاهش یون های آهن قابل مقایسه با میزان فعالیت اسید آسکوربیک (غلظت ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) بود.



شکل ۴- مهار رادیکال های آزاد DPPH توسط پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات *A. filiculoides*. حروف A, B, C نشانگر وجود اختلاف معنی دار پلی ساکارید خام و هیدرولیزات در هر غلظت می باشد ($p < 0.05$). حروف a, b, c نشانگر اختلاف معنی دار بین غلظت های پلی ساکارید خام و هیدرولیزات می باشد ($p < 0.05$).



شکل ۵- قدرت کاهندگی آهن (Fe^{3+}) پلی ساکاریدهای خام و هیدرولیزات *A. filiculoides*. حروف A, B, C نشانگر وجود اختلاف معنی دار پلی ساکارید خام و هیدرولیزات در هر غلظت می باشد ($p < 0.05$). حروف a, b, c نشانگر اختلاف معنی دار بین غلظت های پلی ساکارید خام و هیدرولیزات می باشد ($p < 0.05$).

بحث

در میان پلی ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی جلبک‌ها و گیاهان آبزی، فوکوئیدان شبیه ترین ساختار شیمیایی را به گالاکتوفوکان استخراج شده از *A. filiculoides* دارا می‌باشد. فوکوئیدان که در جلبک‌های قهوه‌ای یافت می‌شود، یک نام عمومی برای پلی ساکاریدهای حاوی فوکوز است و شامل مقادیر قابل توجهی از گالاکتوز و گروه‌های استر سولفات می‌باشد. تا کنون مقادیر مختلفی از قندهای خنثی در فوکوئیدان جلبک‌های قهوه‌ای *S. tenerrimum* (۲۶/۲۷ درصد)، *S. wightii* (۳۵/۲۷ درصد)، *Padina tetrastromatica* (۵۰/۰ درصد) و *Turbinaria conoide* (۶۲/۰ درصد) گزارش شده است^[۲۹]. میزان قندهای اسیدی نیز در فوکوئیدان جلبک‌های قهوه‌ای متفاوت و محتوای یورونیک اسید در *Turbinaria ornate* و *Saccharina longicuris* بین ۳/۲ تا ۲۲/۰ درصد اندازه گیری شد^[۳۰،۳۱]. پلی ساکارید استخراج شده در مطالعه حاضر نیز در حقیقت یک پلیمر اسیدی می‌باشد که دارای بار الکتریکی منفی ناشی از وجود گروه‌های کربوکسیل بوده و استرهای سولفات در ساختار آن حضور ندارد^[۳۲]. ترکیب شیمیایی در مشتقات هیدرولیزی تولید شده تغییر معنی داری با پلی ساکارید خام نداشت و نشان داد که به کارگیری هیدرولیز شیمیایی با استفاده از اسید هیدروکلریدریک ۰/۰۱ مولار قادر به تولید پلی ساکاریدهایی با ترکیبات شیمیایی مشابه می‌باشد. همچنین، نه تنها شرایط هیدرولیز اسیدی حاضر توانست ترکیب شیمیایی هیدرولیزات را بدون تغییر نگهدارد بلکه سبب تولید مشتقاتی با وزن‌های مولکولی مختلف جهت ارزیابی بهتر فعالیت زیستی شود. حجم ویژه چرخش که رابطه عکس با فشردگی مولکولی دارد و نشان دهنده صورتبندی فضایی یک مولکول می‌باشد با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش وزن مولکولی کاهش یافت. نتایج حاصل حاکی از آن است که در طی هیدرولیز پلیمرهایی با وزن‌های مولکولی کمتر و ساختاری منبسط بوجود می‌آید، به نحوی که زنجیره پلیمرهای تولید شده پس از ۱۵ دقیقه هیدرولیز دیگر تراکم اولیه را نداشته و صورتبندی فضایی گسترده تری را دارا هستند.

مطالعات نشان داده است که در پلی ساکاریدها ارتباط تنگاتنگی بین ویژگی‌های ساختاری شامل نوع مونوساکاریدها، چگونگی اتصال پیوندهای گلیکوزیدی، خطی یا منشعب بودن پلیمرها، میزان سولفات، حضور گروه‌های کربوکسیل و وزن مولکولی با نوع و قدرت فعالیت زیستی آن‌ها وجود دارد^[۱۷]. در این میان، اندازه مولکولی ترکیبات پلی ساکاریدی از جمله فوکوئیدان از اهمیت ویژه‌ای در فراهم کردن امکان مداخله مثبت این ترکیبات در واکنش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی برخوردار بوده و در پلی ساکاریدهای مختلف تعیین کننده می‌باشد. البته نتایج نشان داده است که در صورت اثرگذاری، نوع تغییر فعالیت زیستی بسته به ساختار شیمیایی پلی ساکارید و واکنش بیوشیمیایی می‌تواند متفاوت باشد^[۳۳،۳۴]. پیش از این، فوکوئیدان با وزن مولکولی پایین (> ۱۰ کیلودالتون) از *Undaria pinnatifida* نشان داده است که می‌تواند در غلظت ۱-۵۰ میکروگرم/میلی لیتر سبب بروز پاسخ پیش التهابی در سلول‌های RAW264.7 و در نتیجه رهاسازی نیتریک اکسید، اینترلوکین-۶ و TNF- α از طریق مسیرهای سیگنالینگ NF- κ B و MAPKS شود^[۳۳]. در مطالعه‌ای دیگری که بر روی دو نوع فوکوئیدان با وزن مولکولی پایین (۳۰ کیلو دالتون) و وزن مولکولی بالا (۱۳۰ کیلو دالتون) از *U. pinnatifida* انجام شد، در حالی که پلیمرهای بزرگتر فاقد سمیت سلولی بوده و توانست سلول‌های اسپلنوسیت را تحریک به رهاسازی مقادیر قابل توجهی از اینترفرون گاما و نیتریک اکسید نماید، پلیمرهای کوچکتر محرک سلولی ضعیف تری بوده و دارای سمیت سلولی بود^[۳۴]. بروز ویژگی‌های زیستی متفاوت در فوکوئیدان‌های به دست آمده از یک گونه جلبکی می‌تواند به دلیل تفاوت‌های ساختاری دیگر نظیر بارالکتریکی، ترکیب قندی و صورتبندی فضایی باشد. در مطالعه حاضر، تمامی پلی ساکاریدهای خام و مشتقات هیدرولیزی نه تنها فاقد هر گونه سمیت سلولی در غلظت‌های مورد آزمایش بودند بلکه توانستند به میزانی قابل مقایسه با لیپوپلی ساکارید باکتریایی سبب تحریک سلول‌های RAW264.7 به ترشح نیتریک اکسید شوند. نتایج نشان داد که کاهش وزن مولکولی از 1.0×10^3 تا $783/0$ به $319/6 \times 10^3$ تغییر معنی داری در پتانسیل تحریک سلولی ایجاد نمی‌کند و بهبود فعالیت زیستی مستلزم کاهش اندازه مولکول تا 0.3×10^3 تا $99/4$ گرم/مول می‌باشد.

فعالیت ضد اکسایشی نیز از جمله ویژگی های پلی ساکاریدها می باشد که میزان و نوع آن با توجه به ساختار شیمیایی می تواند متغییر باشد. توانایی فوکوئیدان های به دست آمده از جلبک های *Sargassum sp.* و *S. binderi* و *S. cristaeifolium* در غیرفعال کردن یون های هیدروکسیل، سوپراکسید، DPPH و همچنین شلاته کردن یون های آهن پیش از این گزارش شده است [۱۵ و ۱۶]. در طی یک بررسی، Yuan و همکاران [۳۵] اقدام به استخراج فوکوئیدان از گونه *A. nodosum* با استفاده از امواج مایکروویو در دما و زمان های مختلف نمودند نتایج بیانگر آن بود که بیشترین فعالیت ضد اکسایشی در مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهش یون های آهن در فوکوئیدان استخراج شده در دمای ۹۰ درجه سلسیوس اتفاق افتاد. در همین راستا، یافته های حاصل از آنالیز ترکیبات شیمیایی نشان داد که با افزایش دمای استخراج میزان وزن مولکولی (۴۰ به ۱/۳ کیلو دالتون) پلیمرهای استخراج شده کاهش یافت و در نتیجه فعالیت ضد اکسیدانی نیز دچار کاهش شد. البته، در مطالعه ای که پیش تر بر روی فوکوئیدان حاصل از *L. japonica* صورت پذیرفت، نویسندگان جهت بررسی رابطه متقابل وزن مولکولی و فعالیت ضد اکسایشی اقدام به هیدرولیز پلیمرهای به دست آمده توسط پراکسید هیدروژن در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت نمودند [۳۶]. نتایج نشان داد که پلیمرهای حاصل از هیدرولیز در عین حال که ساختار کلی خود را حفظ نمودند، وزن های مولکولی متفاوت داشتند و فعالیت ضد اکسایشی آن ها به طور معنی داری با یکدیگر متفاوت بوده و رابطه بین وزن مولکولی و فعالیت ضد اکسایشی به صورت خطی نبود.

نتیجه گیری

بمنظور ارزیابی اثر اندازه وزن مولکولی بر قابلیت گالاکتوفوکان استخراج شده از *A. filiculoides* می توان با استفاده از هیدرولیز اسیدی ملایم اقدام به تولید مشتقات با درجه های پلیمریزاسیون مختلف بدون تغییر معنی دار ترکیب شیمیایی نمود. دستکاری شیمیایی این پلی ساکارید سبب تولید ترکیبات ناخواسته با عوارض سمیت سلولی نشد و تمامی مشتقات به دست آمده به طور قابل توجهی همانند پلی ساکارید خام قادر به تحریک بروز پاسخ پیش التهابی در سلول های RAW264.7 و مداخله مثبت در واکنش های اکسایشی شدند. کاهش وزن مولکولی در پلی ساکارید گالاکتوفوکان تنها در اندازه $0.3 \times 99/4$ گرم/مول منجر به بهبود عملکرد زیستی مشتقات تولیدی شد. بطور کلی، نتایج حاضر نشان داد که اولاً پلی ساکاریدهای این گیاه آبی دارای قابلیت منحصر به فردی در تقویت سیستم ایمنی و جلوگیری از واکنش های ضد اکسایشی هستند و ثانیاً می توان با کاهش وزن مولکولی اثربخشی گالاکتوفوکان را بدون انجام فرآیند هزینه بر و طولانی تخلیص و تنها با دستکاری شیمیایی جهت تولید در مقیاس صنعتی افزایش داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه تربیت مدرس بواسطه حمایت مالی از پایان نامه کارشناسی ارشد و دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی واحد نور به جهت تامین زیرساخت آزمایشگاهی و فنی تشکر و قدردانی می گردد

منابع

- 1- Tseng CK. Algal biotechnology industries and research activities in China. Journal of applied phycology. 2001 Aug;13(4):375-80.
- 2- Wijesekara I, Kim SK. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. Marine drugs. 2010 Apr;8(4):1080-93.
- 3- Mao WJ, Fang F, Li HY, Qi XH, Sun HH, Chen Y, Guo SD. Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*. Carbohydrate polymers. 2008 Nov 21;74(4):834-9.

- 4- Karnjanapratum S, You S. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. *International journal of biological macromolecules*. 2011 Mar 1;48(2):311-8.
- 5- Pengzhan Y, Ning L, Xiguang L, Gefei Z, Quanbin Z, Pengcheng L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacological research*. 2003 Dec 1;48(6):543-9.
- 6- de Sousa AP, Torres MR, Pessoa C, de Moraes MO, Rocha Filho FD, Alves AP, Costa-Lotufo LV. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Carbohydrate polymers*. 2007 May 1;69(1):7-13.
- 7- Zhou G, Sheng W, Yao W, Wang C. Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. *Pharmacological research*. 2006 Feb 1;53(2):129-34.
- 8- Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical microbiology reviews*. 2000 Oct 1;13(4):523-33.
- 9- Hamilton JA, Anderson GP. Mini Review GM-CSF Biology. Growth factors. 2004 Dec 1;22(4):225-31.
- 10- Paulsen B. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Current organic chemistry*. 2001 Sep 1;5(9):939-50.
- 11- Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Lee SS, Shiao MS, Ho CK. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International journal of cancer*. 1997 Mar 17;70(6):699-705.
- 12- Alavi M, Tabarsa M, You S, Gavlighi HA. Structural characteristics, molecular properties and immunostimulatory effects of sulfated polysaccharide from freshwater *Myriophyllum spicatum* L. *International journal of biological macromolecules*. 2020 Jun 15;153:951-61.
- 13- Tabarsa M, Dabaghian EH, You S, Yelithao K, Cao R, Rezaei M, Alboofetileh M, Bitra S. The activation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways of RAW264. 7 murine macrophages and natural killer cells by fucoidan from *Nizamuddinina zanardinii*. *International journal of biological macromolecules*. 2020 Apr 1;148:56-67.
- 14- Leiro JM, Castro R, Arranz JA, Lamas J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International immunopharmacology*. 2007 Jul 1;7(7):879-88.
- 15- Lim BO, Yamada K, Cho BG, Jeon T, Hwang SG, Park T, Kang SA, Park DK. Comparative study on the modulation of IgE and cytokine production by *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice, *Phellinus linteus* and germinated brown rice in murine splenocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2004;68(11):2391-4.
- 16- Hifney AF, Fawzy MA, Abdel-Gawad KM, Gomaa M. Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum* sp. and its potential antioxidant and emulsifying activities. *Food hydrocolloids*. 2016 Mar 1;54:77-88.
- 17- Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Song H, Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International journal of biological macromolecules*. 2010 Jan 1;46(1):6-12.
- 18- Singh PK. Use of *Azolla* in Asian agriculture. *Applied agricultural research (USA)*. 1989.
- 19- Arora A, Saxena S, Sharma DK. Tolerance and phytoaccumulation of chromium by three *Azolla* species. *World journal of microbiology and biotechnology*. 2006 Feb;22(2):97-100.

- 20- Hussner A. Nobanis–Invasive alien species fact sheet–Azolla filiculoides. From: online database of the North European and Baltic Network on Invasive Alien Species–NOBANIS www.nobanis.org. 2010.
- 21- Zazouli MA, Mahdavi Y, Bazrafshan E, Balarak D. Phytodegradation potential of bisphenolA from aqueous solution by Azolla Filiculoides. Journal of environmental health science and engineering. 2014 Dec;12(1):1-5.
- 22- Yadav RK, Abraham G, Singh YV, Singh PK. Advancements in the utilization of Azolla-Anabaena system in relation to sustainable agricultural practices. InProc. Indian Natl. Sci. Acad 2014 Jun (Vol. 80, No. 2, pp. 301-316).
- 23- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry. 1956 Mar 1;28(3):350-6.
- 24- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry. 1951;193:265-75.
- 25- Filisetti-Cozzi TM, Carpita NC. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Analytical biochemistry. 1991 Aug 15;197(1):157-62.
- 26- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Analytical biochemistry. 1982 Oct 1;126(1):131-8.
- 27- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology. 1995 Jan 1;28(1):25-30.
- 28- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese journal of nutrition and dietetics. 1986;44(6):307-15.
- 29- Manoj SG, Mahesh KP, Vasanthi M, Anant A. Anticoagulant property of sulphated polysaccharides extracted from marine brown algae collected from Mandapam Island, India. African journal of biotechnology. 2013;12(16).
- 30- Rioux LE, Turgeon SL, Beaulieu M. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. Carbohydrate polymers. 2007 Jun 25;69(3):530-7.
- 31- Thanh TT, Tran VT, Yuguchi Y, Bui LM, Nguyen TT. Structure of fucoidan from brown seaweed *Turbinaria ornata* as studied by electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS) and small angle X-ray scattering (SAXS) techniques. Marine drugs. 2013 Jul;11(7):2431-43.
- 32- Shemami MR, Tabarsa M, You S. Isolation and chemical characterization of a novel immunostimulating galactofucan from freshwater *Azolla filiculoides*. International journal of biological macromolecules. 2018 Oct 15;118:2082-91.
- 33- Bi D, Yu B, Han Q, Lu J, White WL, Lai Q, Cai N, Luo W, Gu L, Li S, Xu H. Immune activation of RAW264. 7 macrophages by low molecular weight fucoidan extracted from New Zealand *Undaria pinnatifida*. Journal of agricultural and food chemistry. 2018 Sep 27;66(41):10721-8.
- 34- Jang JY, Moon SY, Joo HG. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. Food and chemical toxicology. 2014 Jun 1;68:234-8.
- 35- Yuan Y, Macquarrie D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. Carbohydrate polymers. 2015 Sep 20;129:101-7.

- 36- Hou Y, Wang J, Jin W, Zhang H, Zhang Q. Degradation of *Laminaria japonica* fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights. Carbohydrate Polymers. 2012 Jan 4;87(1):153-9.

Effect of acidic hydrolysis on RAW264.7 macrophage cells stimulation and antioxidant properties of galactofucan from plant *Azolla filiculoides*

Marzieh Ramzani Shemami¹, Mehdi Tabarsa^{1*}

1- Department of Seafood Processing, Faculty of Natural Resources and marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

ABSTRACT

Polysaccharides are one of biomacromolecules that, in addition to their peculiar physicochemical properties, possess promising biological capabilities depending on chemical structure. The objective of the present study was to evaluate the effect of molecular weight of galactofucan polysaccharides from freshwater plant *Azolla filiculoides* on its ability to stimulate RAW264.7 macrophage cells and inhibition of oxidation reactions. Galactofucan polysaccharide was extracted by distilled water at 65°C for 2 hours and recovered using 70% ethanol. Polysaccharide hydrolysis was performed using 0.01N HCl at 100°C for 5, 10 and 15 minutes. Crude and hydrolyzed polysaccharides were mainly composed of neutral sugars (67.46-68.02%), lower amounts of uronic acids (4.48-4.53%) and ranged in the molecular weight of 99.4-783.0 × 10³ g/ mol. Crude and hydrolyzed polysaccharides were non-toxic and hydrolysis 15 resulted in the greatest stimulation of proinflammatory response in RAW264.7 macrophage cells releasing a considerable amount of nitric oxide (55.6 μmol) into culture medium. Hydrolysis 15 led to the highest DPPH radical scavenging (65.2%) and Fe³⁺ reducing power (0.5 Abs). Overall, the present findings indicated that galactofucan polysaccharides have the ability to boost immune system and inhibit oxidation reactions and that molecular weight reduction to specific levels could improve the biological activities.

KEYWORDS: Polysaccharide, Galactofucan, *A. filiculoides*, Antioxidant, Immunostimulant

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 19 February 2021

Accepted: 22 May 2021

ePublished: 28 August 2021

* Corresponding Author:

Email address: m.tabarsa@modares.ac.ir

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513