Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

تغییرات بیانی ژن‌های کلاژن I و III در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان در اثر عصاره ریزجلبک *Chlorella vulgaris* و مقایسه آن با ویتامین C

سودابه عبدالباقیان[۱]
شهلا جمیلی[۲*]
آزاده منایی[۳]
علی ماشینچیان مرادی[٤]

۱، ۴. گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و محیطزیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
shahlajamili45@yahoo.com

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۴۰۷۵۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۶
این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

چکیده

پیری پوست یک فرآیند بیولوژیک ناشی از کاهش تولید کلاژن و نیز افزایش آنزیم‌های متعدد شامل ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) بوده که این آنزیم‌ها نیز باعث تخریب کلاژن می‌شوند. *Chlorella vulgaris* یک ریز جلبک دریایی می‌باشد و اثرات مفیدش بر پوست، آن را به یک ماده مناسب برای استفاده در محصولات ضد پیری تبدیل کرده است. در این پژوهش، تأثیر عصاره جلبک *C. vulgaris* در تولید کلاژن نوع I و III در مقایسه با ویتامین C در سلول‌های فیبروبلاست پوست (Hu02) در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران در شهریور ۱۳۹۷ بررسی شد. عصاره‌گیری از جلبک به روش اولتراسونیک و هیدرولیز آنزیمی انجام و عصاره حاصل در غلظت‌های مختلف برای تأثیر آن بر بیان ژن کلاژن‌های نوع I وIII بر سلول‌های Hu02 اثر داده شد. در ابتدا اثر سمیت سلولی آن بر سلول آزمایش و با تست MTT مشخص شد که عصاره فاقد اثر سمی برای سلول‌های Hu02 است. همچنین با استفاده از qRT-PCR تأیید شد که عصاره باعث افزایش بیان ژن کلاژن نوع I و III در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. عصاره جلبک و ویتامین C با درصد زنده‌مانی (Viability) یکسان (۹۷ درصد) برای تعیین تأثیر عصاره بر بیان ژن‌های کلاژن I و III در مقایسه با ویتامین C استفاده شد. عصاره جلبک و ویتامین C باعث افزایش بیان ژن کلاژن نوع I به ترتیب به میزان ۳/۱۴ برابر و ۱/۴۲ برابر شدند. عصاره جلبک تأثیر بیشتری در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن کلاژن نوع I و ویتامین C تأثیر بیشتری در افزایش بیان ژن کلاژن نوع III در مقایسه با عصاره جلبک داشت و باعث افزایش بیان این ژن به میزان ۲/۱۲ برابر شد. درحالی‌که این مقدار برای عصاره ۱/۱۴ برابر بود. این یافته‌ها نشان داد که عصاره جلبک *C. vulgaris* و ویتامین C باعث تحریک سنتز کلاژن در سلول‌های Hu02 می‌شوند و می‌توانند جایگزین مناسب برای انواع مواد شیمیایی مضری باشند که برای کلاژن سازی در پوست استفاده می‌شوند.

واژگان کلیدی: عصاره کلرلا، ویتامین C، کلاژن، ماتریکس متالوپروتئیناز، سلول‌های فیبروبلاست.

مقدمه

امروزه میکرو جلبک‌ها طیف کاربردی گسترده‌ای در علم فناوری زیستی دارند. ارزش بالای تغذیه‌ای و نیز پتانسیل این فتوسنتز کنندگان میکروسکوپی در تولید ترکیبات فعال زیستی با کاربردهای متنوع دارویی، غذایی و آرایشی–بهداشتی، آن‌ها را در کانون توجه محققین در سراسر دنیا قرار داده است. میکرو جلبک‌ها، میکروارگانیسم‌های فتوسنتز کننده‌ای هستند که انرژی نورانی، آب و دی‌اکسید کربن را به زیست‌توده جلبک تبدیل می‌کنند (Dejoye *et al.*, 2011) و بسیار متنوع می‌باشند. جلبک *Chlorella vulgaris* یک جلبک سبز تک‌سلولی، یوکاریوت و

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

ساکن آب شیرین است که توسط Martinus Willem Beijerinek در سال ۱۸۹۰ به‌عنوان اولین میکرو جلبک با هسته مشخص کشف شد. دانشمندان آلمانی در ابتدای ۱۹۹۰ متوجه محتوای بالای پروتئین در این جلبک شده و آن را به‌عنوان یک منبع غذایی جدید معرفی کردند. به علت خواص دارویی این میکرو جلبک کشور ژاپن از بزرگ‌ترین مصرف‌کنندگان آن می‌باشد (Safi *et al*., 2014) و به‌عنوان مکمل غذایی، افزودنی و امولسیون غذایی به شکل کپسول، قرص، پودر و عصاره عرضه‌شده (Fermandes *et al*., 2012) و برای درمان‌های پزشکی استفاده می‌شود. Chlorella چندین سال است که در زمینه‌های مختلف ازجمله صنعت داروسازی و آرایشی استفاده می‌شود و برای این صنایع بسیار جذاب است (Concalves de Mello *et al*., 2019). این میکرو جلبک یک اثر محافظتی بر سلول‌های فیبروبلاست پوست داشته و باعث کاهش فاکتورهای مؤثر در پیری از طریق افزایش و تولید کلاژن در سلول‌های فیبروبلاست پوست می‌شود (Saberbaghi *et al*., 2013). بنابراین از این جلبک و مواد فعال زیستی موجود در آن می‌توان به‌عنوان فاکتوری برای ترمیم و جوان‌سازی پوست استفاده کرد. در سال‌های اخیر توجه زیادی به‌سلامت و زیبایی پوست شده است. پوست، بدن را از عوامل بیرونی به‌عنوان یک سد محافظت کرده و نقش مهمی در زیبایی دارد. پیری پوست یک فرآیند طبیعی است که به تغییرات در اجزای ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix) مانند کلاژن مربوط می‌شود (Zhang and Duan, 2018)، بنابراین حفظ سطوح کلاژن در درمیس برای حفظ سلامتی پوست مهم است. کلاژن در ECM توسط فیبروبلاست‌های درمی ساخته می‌شود. از بین انواع مختلف کلاژن، کلاژن نوع I و III در پوست بسیار مهم بوده و ۸۰ تا ۹۰ درصد درمیس را تشکیل می‌دهد (Yoon *et al*., 2012). کلاژن نوع I از فراوان‌ترین پروتئین‌ها در بافت همبند پوست می‌باشد که ۸۵ درصد کل کلاژن را تشکیل داده و به پوست خاصیت ارتجاعی، کشش و انعطاف‌پذیری می‌دهد (Chen *et al*., 2011). یکی دیگر از کلاژن‌های مهم در پوست، کلاژن نوع III بوده که همراه با کلاژن نوع I از اجزا اصلی ماتریکس خارج سلولی می‌باشند (Park *et al*., 2009). در طول فرآیند پیری مقدار برخی از آنزیم‌ها مانند ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP_s) افزایش‌یافته و سطوح اجزای ECM ازجمله کلاژن کاهش می‌یابد که باعث کاهش خاصیت ارتجاعی پوست می‌شود. برخی از منابع دریایی ازجمله جلبک‌های دریایی سنتز کلاژن را افزایش داده و برای مبارزه با پیری پوست به‌عنوان یک ماده طبیعی استفاده می‌شوند (Kim *et al*., 2016).

ویتامین C (اسید آسکوربیک) و مشتقات آن نیز در سنتز کلاژن، تقویت بافت پوست و زیبایی نقش مهمی دارند. ویتامین C به‌عنوان یک ویتامین محلول در آب به‌طور گسترده‌ای به شکل محلول در آب یا سایر مشتقات مانند سدیم آسکوربات و آسکوربیل پالمیتات در محصولات آرایشی و زیبایی به‌عنوان یک ماده ضد پیری در نظر گرفته می‌شوند (Tournas *et al*., 2006; Darr *et al*., 1996). این ویتامین با جلوگیری از غیرفعال شدن دو آنزیم مهم برای سنتز کلاژن شامل لیزیل هیدروکسیلاز و پرولیل هیدروکسیلاز، نقش مهمی در نگهداری شبکه کلاژنی پوست دارد (Boyera *et al*., 1998). ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان طبیعی می‌باشد و همچنین دارای اثر محافظتی بر پوست در مقابل نور خورشید بوده و قادر به تحریک سنتز کلاژن می‌باشد (Crisan *et al*., 2015).

با توجه به اهمیت پوست به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اندام‌های بدن و نخستین خط دفاع غیراختصاصی، توجه به‌سلامت محصولات پوستی و آگاهی از مضرات مواد شیمیایی دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. امروزه در ساخت مواد آرایشی- بهداشتی ازجمله محصولات مرتبط با پوست، طیف وسیعی از مواد شیمیایی و مصنوعی به کار می‌روند که برخی از آن‌ها باعث ایجاد اختلالاتی در پوست و بدن می‌شود. در حال حاضر استخراج ترکیبات متنوع از منابع دریایی ازجمله میکرو جلبک‌ها برای مقاصد مختلف مانند تولید محصولات پوستی رو به افزایش است و این مواد به علت داشتن ترکیبات زیستی مفید و سازگاری باپوست به علت طبیعی بودن آن‌ها حائز اهمیت می‌باشند. با توجه به اثرات مثبت میکرو جلبک‌های دریایی ازجمله *C. vulgaris* در تولید کلاژن، پژوهش حاضر باهدف بررسی اثرات عصاره میکرو جلبک ذکرشده در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن‌های کلاژن I و III در سلول‌های فیبروبلاست پوست، انجام شد.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (ایران، تهران) انجام شد. به‌منظور تهیه عصاره جلبک به روش ترکیبی اولتراسونیک و هیدرولیز آنزیمی، ۴ گرم پودر خشک‌شده جلبک *C. vulgaris* که از شرکت ریز جلبکی پارسیان تهیه‌شده بود (ایران، تهران) به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (Elmasonic S 40 H) در معرض امواج فراصوتی قرار گرفت. سپس ۲ میلی‌لیتر از آنزیم پروتئاز همراه با ۲ میلی‌لیتر آنزیم B-(1-3)-D-Glucanase (Sigma-Aldrich, USA) به آن اضافه و عمل هیدرولیز آنزیمی در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت انجام شد (Wang *et al.*, 2015b). به‌منظور جمع‌آوری سطح‌رویی، سانتریفیوژ عصاره به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰×rpm انجام شد، سپس سطح‌رویی (supernatant) لیوفیلیزه شد.

برای کشت سلول، سلول‌های Hu02 (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) در محیط Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS: Sigma-Aldrich, USA)، ۲ میلی مولارگلوتامین و ۱۰۰ u/ml پنی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از رسیدن تراکم سلولی به ۸۰-۷۰ درصد سلول‌ها مورداستفاده قرار گرفتند (Chen *et al.*, 2011).

برای بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره جلبک و ویتامین C بر سلول‌های پوستی (Hu02) تست MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) انجام شد، در این روش نمک تترازولیوم توسط سلول‌های فعال (ازلحاظ متابولیکی) و دهیدروژنازها احیاشده و با تولید NADH و NADPH منجر به تشکیل رسوب ارغوانی رنگ فورمازون می‌شوند (Grela *et al.*, 2018). بدین منظور سلول‌ها با چگالی 10^4 cells/well درون هر چاهک ظرف ۹۶ خانه‌ای کاشته شدند و توسط عصاره جلبک با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (هر غلظت با سه تکرار)، ویتامین C با غلظت‌های ۰/۵۴، ۰/۲۸ و ۰/۱۴ میلی مولار (هر غلظت سه تکرار) کنترل مثبت با ۱۰ درصد DMSO (Dimethyl sulfoxide) و کنترل منفی بدون هیچ ماده‌ای به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها با ۱۰ میکرو لیتر (µl) از معرف MTT به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس حضور رسوبات ارغوانی رنگ با میکروسکوپ موردبررسی قرار گرفت و محتویات خانه‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرو لیتر محلول DMSO به‌عنوان حلال بلورهای فورمازون (محصول حاصل از متابولیزه شدن MTT) به هر چاهک ریخته شد. جذب خانه‌ها در طول‌موج ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها با نسبت جذب سلول‌های تیمار شده به جذب سلول‌های تیمار نشده محاسبه گشت (Wachesk *et al.*, 2013).

به‌منظور تیمار سلول‌های فیبروبلاست پوست با عصاره جلبک و ویتامین C، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) انکوبه شدند. جهت بررسی تأثیر عصاره جلبک در مقایسه با ویتامین C در تولید کلاژن، سلول‌ها با ویتامینC با غلظت ۰/۱۴ میلی‌مولار (۹۷ درصد viability) و عصاره با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۹۷ درصد viability) تیمار شدند. برای انجام واکنش Real-Time PCR، جداسازی RNA از سلول‌ها با معرف TRIzol (Sigma-Aldrich, USA) انجام و به‌عنوان الگو برای سنتزcDNA با استفاده از پرایمر oligo(dT) (Takara Bio Inc, Japan) استفاده شد. برای بررسی بیان ژن‌ها، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر متشکل از ۱۰ میکرو لیتر از مسترمیکس کیت، ۲میکرو لیتر محلول cDNA، ۰/۸ میکرو لیتر پرایمرهای پیشرو و پسرو و ۶/۴ میکرو لیتر آب انجام شد. آماده‌سازی مخلوط واکنش PCR به روی یخ انجام و نمونه‌ها در دستگاه ABI مدل Step one قرار داده شد. برنامه استفاده‌شده برای انجام qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) به‌صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ چرخه تکثیری متشکل از ۵ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، آنیلینگ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و طویل سازی (elongation) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انتخاب شد (دو بار تکرار ریل تایم برای هر نمونه). در هر بار انجام فرایند PCR، برای هر جفت پرایمر یک نمونه‌ی فاقد cDNA درون دستگاه قرار داده شد تا از عملکرد

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

صحیح واکنش اطمینان حاصل شود. پرایمرها ابتدا در سایت NCBI طراحی شدند و پس از دادن اطلاعات در primer blast، در نرم‌افزار gene runner ازلحاظ دایمر و ساختار ثانویه بررسی شدند. توالی پرایمرهای مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده‌شده است.

جدول۱: توالی پرایمرهای موردبررسی در Real-Time PCR (۳'→۵').

primer name	Sequence (5'→3')	Product length
Collagen I (forward)	CTCCCCAGCCACAAAGAGTC	171
Collagen I (reverse)	CCGTTCTGTACGCAGGTGAT	171
Collagen III (forward)	AGCTGGCTACTTCTCGCTCT	98
Collagen III (reverse)	TCCGCATAGGACTGACCAAGA	98
GAPDH (forward)	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	113
GAPDH (reverse)	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	113

ثبت داده‌ها در نرم‌افزار Excel (Microsoft, 2013) انجام گرفت و از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها استفاده شد. پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها به‌وسیله آزمون Kolmogrov-Smirnov از آزمون One-Way ANOVA استفاده و از تست LSD برای سطح معنی‌داری استفاده شد. مقدار $p < ۰/۰۵$ به‌عنوان سطح خطا در نظر گرفته شد (سطح اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد) و نتایج به‌صورت mean $\pm$ SD گزارش‌شده است.

نتایج

تست MTT جهت بررسی اثرات سایتوتوکسیتی عصاره جلبک بر سلول‌های Hu02 استفاده شد. در شکل ۱ نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره بر زنده‌مانی سلول‌های Hu02 نمایش داده‌شده است. سلول‌های تیمار شده با عصاره جلبک در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأثیر مشابهی بر زنده‌مانی سلول‌ها با سلول‌های تیمار نشده (بدون عصاره) داشت و اثر سایتوتوکسیتی معناداری بین سلول‌های تیمار شده با عصاره جلبک در غلظت‌های مختلف با سلول‌های تیمار نشده، مشاهده نشد که نشان‌دهنده غیر سمی بودن عصاره بر سلول‌های Hu02 می‌باشد (شکل ۱).

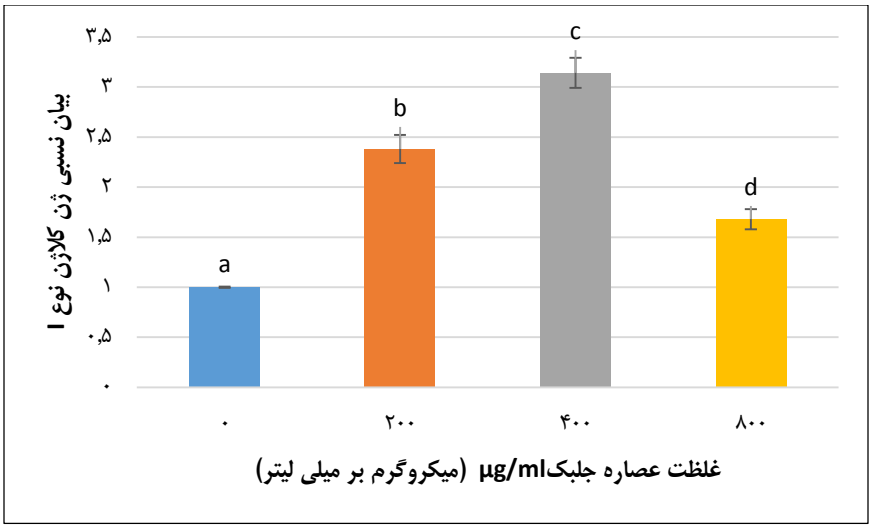
www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

شکل ۱: اثر سایتوتوکسیتی عصاره جلبک *Chlorella vulgaris* بر سلول‌های Hu02 (سال ۱۳۹۷).

(میزان زنده‌مانی سلول‌ها با تست MTT تعیین شد و میله‌ها با حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد).

کلاژن یکی از اجزای مهم بافت همبند پوست می‌باشد که با افزایش سن تجزیه‌شده و منجر به پیری پوست می‌شود. برای بررسی اثر عصاره جلبک *C. vulgaris* بر بیان ژن‌های کلاژن I و III در سلول‌های Hu02، qRT-PCR انجام شد و نتایج نشان داد که بیان ژن کلاژن نوع I و III پس از تیمار سلول‌ها با عصاره جلبک در غلظت‌های مختلف ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل (بدون عصاره) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). تأثیر عصاره جلبک بر بیان ژن کلاژن‌ها در مورد کلاژن نوع I مشهودتر بود و عصاره باعث افزایش بیشتر بیان ژن کلاژن نوع I در مقایسه با کلاژن نوع III شد (شکل ۲).



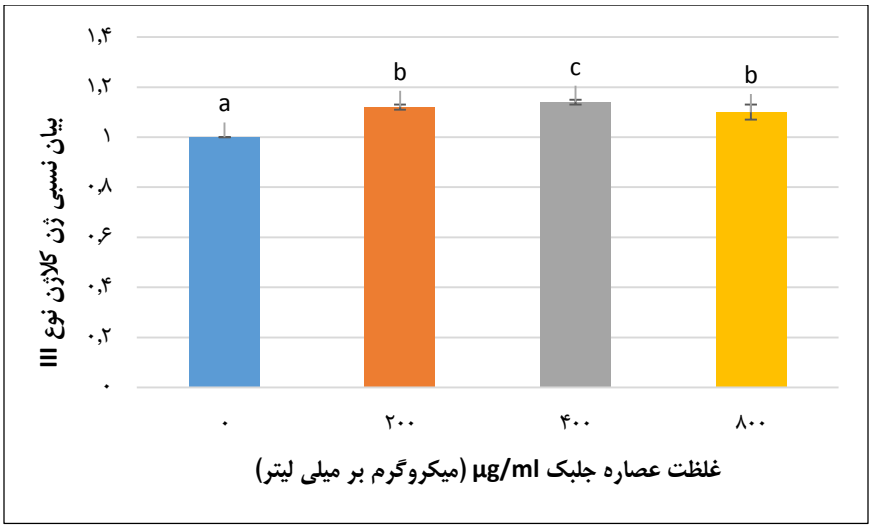
شکل ۲: بررسی بیان ژن کلاژن نوع I با qRT-PCR در جلبک *Chlorella vulgaris* (سال ۱۳۹۷).

(میله‌ها با حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار می‌باشد ($P < 0/05$)).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

با توجه به شکل ۲ و ۳، عصاره جلبک با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را بر بیان ژن کلاژن نوع I (۱۵/۰ ± ۳/۱۴) و نوع III (۰۱/۰ ± ۱/۱۴) در مقایسه با سایر تیمارها و کنترل داشته است. بین تیمار غلظتی ۲۰۰ (۰۱/۰± ۱/۱۲) و ۸۰۰ (۰۱/۰± ۱/۱۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جلبک، تفاوت معناداری بر بیان ژن کلاژن نوع III مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۳).



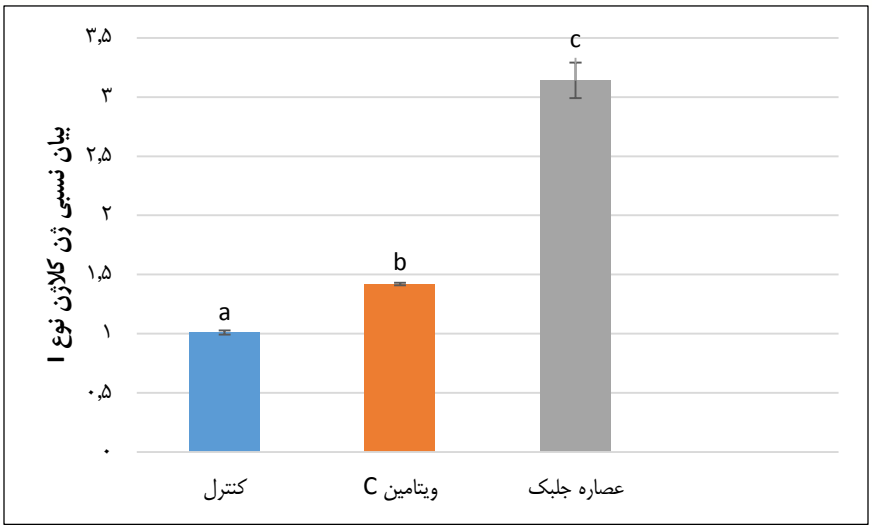
شکل ۳: بررسی بیان کلاژن نوع III با qRT-PCR در جلبک *Chlorella vulgaris* (سال ۱۳۹۷).

(میله‌ها با حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار می‌باشد (P < ۰/۰۵)).

عصاره جلبک با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (درصد زنده‌مانی ۹۷ درصد) و ویتامین C با غلظت ۰/۱۴ میلی‌مولار (درصد زنده‌مانی ۹۷ درصد) برای بررسی تأثیر عصاره در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن‌های کلاژن I و III استفاده شد (با استفاده از تست MTT، غلظتی از عصاره و ویتامین C جهت مقایسه تأثیر آن‌ها در بیان ژن‌های مربوطه انتخاب شد که میزان زنده‌مانی یا اثر سایتوتوکسیتی یکسانی بر سلول داشته باشند). بیان هر دو ژن کلاژن I و III در تیمار سلول‌ها با ویتامین C و عصاره جلبک، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (p<۰/۰۵). ویتامین C و عصاره جلبک باعث افزایش بیان ژن کلاژن نوع I به ترتیب به میزان ۰۱/۰± ۱/۴۲ برابر (۰/۴۲ برابر بیشتر در مقایسه با گروه کنترل) و ۱۵/۰± ۳/۱۴ برابر (۲/۱۴ برابر بیشتر در مقایسه با گروه کنترل) شدند. با توجه به شکل‌های ۴ و ۵، عصاره جلبک تأثیر بیشتری در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن کلاژن نوع I و ویتامین C تأثیر بیشتری در افزایش بیان ژن کلاژن نوع III در مقایسه با عصاره داشت و باعث افزایش بیان ژن کلاژن نوع III به میزان ۱/۰± ۲/۱۲ برابر شد، درحالی‌که این مقدار برای عصاره جلبک ۰۱/۰± ۱/۱۴ برابر بود.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020



شکل٤ : تأثیر عصاره جلبک *Chlorella vulgaris* در مقایسه با ویتامین C در بیان ژن کلاژن I در سلول‌های Hu02 (سال ۱۳۹۷).

(میله‌ها با حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار بین گروه‌ها می‌باشد).

با توجه به شکل ۵، تأثیر ویتامین C در افزایش بیان ژن کلاژن نوع III به‌طور معنی‌داری از عصاره جلبک بیشتر است، هرچند که عصاره جلبک در مقایسه با گروه کنترل، بیان ژن کلاژن III را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($P<۰/۰۵$).

شکل ٥ : تأثیر عصاره جلبک *Chlorella vulgaris* در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن کلاژن نوع III در سلول‌های Hu02 (سال ۱۳۹۷).

(میله‌ها با حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار بین گروه‌ها می‌باشد).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش تأثیر عصاره جلبک *C. vulgaris* در تحریک تولید کلاژن در سلول‌های فیبروبلاست پوست موردبررسی قرار گرفت. ابتدا بررسی شد که آیا عصاره جلبک در غلظت‌های مختلف (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باعث ایجاد سمیت در سلول Hu02 می‌شود. نتایج نشان داد که عصاره فاقد اثر سایتوتوکسیتی (اثر سمیت) بر سلول‌های Hu02 بوده، درنتیجه برای سلول‌های پوستی موردنظر غیر سمی می‌باشد. پوست به‌عنوان یکی از اندام‌های بدن، نقش مهمی در بسیاری از عملکردهای فیزیکی دارد. پیری پوست فرآیند پیچیده‌ای است که موجب تغییرات زیادی مانند نازک شدن، خشکی، شکنندگی و تشکیل خطوط ظریف و چین‌وچروک می‌شود (Wang *et al*., 2015a) و تلاش‌های بسیاری برای جلوگیری از پیر شدن پوست صورت گرفته است. پیری پوست ناشی از عوامل درونی و بیرونی است. عوامل درونی به دلیل کاهش در سطوح ترکیبات ECM مانند کلاژن می‌باشد. برای جلوگیری از فرآیند پیری پوست باید از تجزیه کلاژن که ترکیب غالب در درمیس است، جلوگیری شود. مکانیسم‌های مولکولی پیری پوست می‌تواند منجر به تحریک پروتئین AP-1 (activator protein 1) شود که درنتیجه بیان متالوپروتئیناز (MMPs: MMP-1, MMP-3, MMP-9) افزایش‌یافته و کلاژن تخریب می‌شود (Chen *et al*., 2011).

تجزیه کلاژن که به علت عوامل مختلفی روی می‌دهد منجر به تشکیل چین‌وچروک و پیر شدن پوست می‌شود (Varani *et al*., 2000). در این پژوهش عصاره جلبک *C. vulgaris* باعث افزایش بیان ژن کلاژن نوع I و III شد. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره جلبک موردنظر سنتز کلاژن (نوع I و III) را افزایش می‌دهد. در ارتباط با اثر عصاره جلبک گونه *C. vulgaris* بر تولید کلاژن I و III در سلول‌های پوستی مطالعات محدودی وجود دارد و بیشتر مطالعات درباره گونه‌های مختلف Chlorella و دیگر جلبک‌های دریایی می‌باشد که تعدادی از آن‌ها برای اثرات ضد پیری بر پوست شامل ضد پیری زودرس، ضد رادیکال‌های آزاد و سنتز کلاژن موردبررسی قرارگرفته‌اند. پپتید جلبک *Pyropiya yezoensis* (PYP 1-5) با فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF/Bsmad، باعث سنتز کلاژن می‌شود (Kim *et al*., 2016). Porphyra-334 استخراجی از *P. yezoensis* که یک ترکیب طبیعی موجود در انواع مختلف ارگانیسم‌ها می‌باشد، باعث افزایش سطوح پروکلاژن و کلاژن نوع I شده و بیان MMP_s را پس از تابش اشعه UVA مهار می‌کند (Ryu *et al*., 2014). تیمار فوکسترول بر HaCaT (ترکیب استرولی طبیعی از جلبک‌های قهوه‌ای) باعث افزایش تولید پروکلاژن نوع I می‌شود و همچنین تولید MMP_s را کاهش می‌دهد (Kim *et al*., 2013). گونه‌های مختلف جلبک Chlorella نیز دارای خصوصیات ضد پیری بوده و نقش قابل‌توجهی در تولید کلاژن دارند. جلبک Chlorella به دلیل سنتز کلاژن، از تشکیل چروک‌های پوست با تأثیر بر اپیدرمیس و رفع عیوب انسدادی جلوگیری می‌کند (Berthon *et al*., 2017). علاوه بر این کلرلا حاوی B-1, 3-glucan بوده که یک ترکیب ضد رادیکال آزاد می‌باشد (Iwamoto *et al*., 2004). و از مهم‌ترین پلی ساکاریدهای موجود در *C. vulgaris* بوده که در سال‌های اخیر به علت ارزش‌های غذایی و دارویی نقش مهمی در ارتقا سلامت انسان داشته است. کلروفیل II موجود در *C. vulgaris* دارای خواص تحریک نوسازی در بافت‌ها بوده و باعث تسریع روند بهبود زخم به میزان بیش از ۲۵ درصد می‌شود. این میکرو جلبک به علت دارا بودن ویژگی تحریک‌کننده بافتی در محصولات زیبایی و پوستی از کارایی بسیار بالایی برخوردار است و باعث افزایش سنتز کلاژن و کاهش چروک‌های پوستی می‌شود (Kai Ru *et al*., 2020). در پژوهش انجام‌شده توسط Chen و همکاران (۲۰۱۱) مشخص شد که پپتید استخراجی از کلرلا دارای یک اثر محافظتی در برابر اشعه UVB بر فیبروبلاست‌های پوست انسان می‌باشد.

از یافته‌های پژوهش حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که عصاره حاصل از جلبک C. vulgaris با توجه به افزایش بیان ژن کلاژن I که از مهم‌ترین کلاژن‌های موجود در پوست بوده و برای حفظ خاصیت ارتجاعی پوست لازم می‌باشد و همچنین افزایش کلاژن نوع III، می‌تواند اثرات مفیدی بر جلوگیری از روند پیری پوست داشته باشد. پروتئین کلاژن از مهم‌ترین پروتئین‌های موجود در بدن بوده که مسئول بسیاری از عملکردهای بیولوژیکی ازجمله حمایت ساختاری بافت‌ها و اندام‌هایی مانند پوست و ماهیچه می‌باشد. کلاژن به‌ویژه نوع I و III باعث حفظ خاصیت ارتجاعی پوست شده و بدن انسان به‌طور طبیعی قادر به ساخت آن‌ها می‌باشد ولی با افزایش سن میزان تولید این پروتئین‌ها کاهش‌یافته، درنتیجه به علت

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

کم شدن خاصیت ارتجاعی، چین‌وچروک بر پوست ایجاد می‌شود. استفاده از عصاره جلبک ذکرشده به علت افزایش کلاژن نوع I و III می‌تواند برای تقویت بافت پوست مفید باشد. همچنین به علت اثر غیر سمی عصاره جلبک بر سلول‌ها می‌تواند به‌عنوان یک ماده جایگزین طبیعی برای محصولات ضد پیری شیمیایی باشد. با توجه به اینکه ترکیبات موجود در عصاره میکرو جلبک‌ها دارای ارزش بیولوژیکی و اقتصادی بیشتری نسبت به زیست‌توده خشک می‌باشد (Barkia *et al*., 2019)، بنابراین، این نتایج می‌تواند جهت تولید محصولات متنوع آرایشی–بهداشتی ازجمله محصولات مرتبط با پوست با استفاده از عصاره جلبک موردنظر مفید باشد.

منابع

Barkia, I., Saari, N. and Manning, S. R., 2019. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. Marine Drugs, 17 (5): 304.

Berthon, J. Y., Nachat-kappes, R., Bey. M., Cadoret, J. P., Renimel, I. and Filaire, E., 2017. Marine algae as attractive source to skin care. Free Radical Research, 51 (6): 555-567.

Boyera, N., Galey, L. and Bernard, B. A., 1998. Effect of vitamin C and its derivative on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblassts. International Journal of Cosmetic Science, 20(3): 151-8.

Chen, C., Liou, S., Chen, S. and Shih, M., 2011. Protective effects of Chlorella – derived peptide on UVB-induced Production of MMP-1 and degradation of procollagen genes in human skin fibroblasts. Regulatory Toxicology and pharmacology, 60, (1): 112-119.

Concalves de Melo, R., Frazao de Andrade, A., Bezerra, R. P., Viana Marques, D., Tavares Paz, S., Luiz de Lima Filho, J. and Figueiredo Porto, A. L., 2019. Hydrogel-based *Chlorella vulgaris* extracts: a new topical formulation for wound healing treatment. Journal of Applied Phycology, 31: 3653-3663.

Crisan, D., Roman, I., Crisan, M., Scharffetter-Kochanek, K. and Badea, R., 2015. The role of vitamin C in pushing back the boundaries of skin aging: an ultrasonographic approach. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 8: 463-470.

Darr, D., Dunston, S., Faust, H. and Pinnell, S., 1996. Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoporotectants. Acta Dermato- Venereological, 76 (4) 4: 264-268.

Dejoye, C., Vian, M. A., Lumia, G., Bouscarle, C., chartan, F. and Chemat, F., 2011. Combined extraction processes of lipid from *Chlorella vulgaris* Microalgae: Microwave prior supercritical carbon dioxide extraction. International Journal of molecular science, 12 (12) 12: 9332-9341.

Fermandes, B., Dragone, G., Abreu, A. P., Geada, P., Theixeire, J. and Vicent, A., 2012. Starch determination in *Chlorella vulgaris*-a comparison between acid and enzymatic methods. Journal of applied phycology, 24 (5): 1203-1208.

Grela, E., Koztowska, J. and Grabowiecka, A., 2018. Current methodology of MTT assay in bacteria- A review. Acta Histochemica, 120 (4): 303-311.

Iwamoto, H., 2004. Industrial production of microalgae cell mass and secondary product major industrial species. Hand book of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell, Australia. pp. 270-281.

Kai Ru, I. T., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Abdul Wahid, M. E. and Nagappan, T., 2020. *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. Journal of applied Phycology, DOI: 10.1080/26388081.2020.1715256.

Kim, C. R., Kim, Y. M., Lee, M. K., Kim, I. H., Choi, Y. H. and Nam, T. J., 2016. *Pyropia yezeonsis* peptide promotes collagen synthesis by activating the TGF-B/Smad signaling pathway in the human dermal fibroblast cell line Hs27. International Journal Molecular Medicine, 39: 31-38.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

Kim, M. S., Oh, G. H., Kim, M. J. and Hwang, J. K., 2013. Fucosterol inhibits matrix metalloproteinase expression and promotes type-1 procollagen production in UVB-induced HaCaT cells. Photochemistry and photobiology, 89:911-918.

Park, H. J., Cho, D. H., Kim, H. J., Lee, J. Y., Cho, B. K., Bang, S., Song, S.V., Yamasaki, K., Nard, A. D. and Gallo, R.L., 2009. Collagen synthesis is suppressed in dermal fibroblasts by human antimicrobial peptide LL-37. Journal of Investigative Dermatology, 129 (4): 843-850.

Ryu, J., Park, S. J., Kim, I. H., Choi, Y. H. and Nam, T. J., 2014. Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. International journal of Molecular Medicine, 34:796-803.

Saberbaghi, T., Abbasian, F., Mohdyusof, Y. and Makpols, S., 2013. Modulation of cell cycle profile by *Chlorella vulgaris* Prevents Replicative Senescence of human Diploid Fibroblasts. Evidence Based complementary and alternative medicine, DOI: 10.1155/2013/780504.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., pontalier, P.Y. and Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, Composition, Production and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable energy reviews, 35: 265- 278.

Saranya, N., Devi, P., Nithiyanantham, S. and Jeyalaxmi, R., 2014. Cells Disruption by Ultrasonication. BioNanoScience, 4 (4): 335-337.

Tournas, J. A., Lin, F. H., Burch, J. A., Selim, M. A., Monteiro-Riviere, N. A., Zielinski, J. E. and Pinnel, S. R., 2006. Ubiquinone, idebenone, and kinetin provide ineffective photoprotection to skin when compared to a topical antioxidant combination of vitamin C and E with ferulic acid. Journal of Investigative Dermatology. 126: 1185-7.

Varani, J., Warner, R. L., Gharaee- Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J. H., Wang, Z. Q., Datta, S.C., Fisheri, G.J. and Voorhees, J.J., 2000. Vitamin A antagonized decreased cell growth and elevated matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation naturally aged human skin. Journal Investigative of Dermatology, 114 (3) 3: 480-486.

Wachesk, C. C., Pires, C. A. F., Ramos, B. C., Trava-Airoldi, V. J., Lobo, A. O., Pacheco-Soares, C., Marciano, F. R. and Da-Silva, N. S., 2013. Cell viability and adhesion on diamond-like carbon films containing titanium dioxide nanoparticles. Applied Surface Science, 266: 176-181.

Wang – H.M.D., Chen, C., Huych, P. and Chang, J., 2015a. Exploring the potential of using algae in cometics. Bioresource Technology, 184: 355- 362.

Wang, D., Li, Y., Hu, X., Su, W. and Zhong, M., 2015b. Combinedenzymatic and mechanical cell disruption and lipid extraction of green algae *Neochloris oleoabundans*. International Journal of Molecular Science, 16 (4): 7707-7722.

Yoon, J. H., Kim, J., Lee, H., Kim, S. Y., Jang, H. H., Ryu, S. H., Kim, B. J. and Lee, T. G., 2012. Laminin peptide YIGSR induces collagen synthesis in Hs27 human dermal fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communication, 428: 416-421.

Zhang, S. and Duan, E., 2018. Fighting against Skin Aging. Cell Transplantation, 27 (5): 729-738.

www.SID.ir