جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

استخلاص وتنقية Lovastatin من عزلة محلية جديدة للفطر *Laetiporus sulphureus* ودراسة تطبيقاته الطبية الحيوية

عثمان اكرم محمود قاسم

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بأشراف

الأستاذ

الدكتورة شمال يونس عبدالهادي

١٤٤٣هـ ٢٠٢١م

الخلاصة

إنّ ضآلة قائمة الفطريات الكبيرة المكتشفة في العراق تبين الطريق الذي يجب علينا المضي فيه، ولإخراج عالم الفطريات الى الأضواء أُجريت رحلات مسحية دامت خمس اشهر في عمق غابات الموصل ومناطق متفرقة من مدينة الموصل وأقضيتها ونواحيها، اثبتت جدواها إذ تم الحصول على 78 جسم ثمري تعود لأجناس مختلفة من الفطريات البازيدية والكيسية أعطيت رموز علمية متسلسلة. أُخضعت العزلات المستحصل عليها للتنقية والغربلة الأولية وتبين ان العزلة بالكود العلمي Ot23 الأكثر إنتاجا للوفاستاتين بدلالة قطر هالة التحلل (34 ملم) تجاه خميرة *Candida albicans* لذا أُنتخبت لإكمال تجارب الدراسة. أمكن بتفاعل البلمرة المتسلسل تضخيم الحامض النووي للعزلة المنتقاة وبعد اجراء عملية الاصطفاف للتتابعات النيوكليوتيدية مقابل قاعدة بيانات بنك الجينات تم التوصل الى عائديتها للنوع *Laetiporus sulphureus*.

بدا واضحاً من مخرجات نتائج دراسة الظروف الزرعية المثلى لإنتاج اللوفاستاتين من العزلة المنتقاة ان مدة التحضين 7 ايام أعطت أعلى إنتاج للوفاستاتين بلغ 266.5 مايكروغرام/ مل، Carboxymethyl cellulose (CMC) بوصفه مصدر كاربوني و Yeast extract مصدر للنيتروجين وبأس هيدروجيني 6.5 ودرجة حرارة 30 °م وباستخدام وسط M-4 المدعم بفيتامين Thiamine (B1)و Pyridoxine (B6) على الترتيب. بينت مخرجات تنقية اللوفاستاتين بنظام المذيبات مختلفة القطبية باستخدام عمود الفصل الكروماتوكرافي عن الكشف عن اربع حزم ثبت بتقنية كروماتوكرافيا السائل عالي الاداء ان الحزمة F-2 تمثل اللوفاستاتين المنقى بدلالة فعاليته وظهور حزمة واحدة.

بالاعتماد على التوصيف الكيموحيوي للوفاستاتين المنقى كشف عن بقعة واحدة بلون اصفر باهت بقيمة Retardation factor (Rf) مقدارها 0.55 تماثل قيمة (Rf) للوفاستاتين القياسي بتقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography واختيار نظام المذيبات Dichloromethane:Ethyl acetate، وكشف عن المجاميع الفعالة للوفاستاتين المنقى بطيف الاشعة تحت الحمراء في حين كشف عن البنية التركيبية له باستعمال طيف الرنين النووي المغناطيسي Proton nuclear magnetic resonance (H-NMR) وبدرجة انصهار 175.5 °م و Ethyl acetate كأفضل مذيب لإذابة اللوفاستاتين. افاد تحليل البيانات المستقاة لتقييم فعالية اللوفاستاتين المنقى تجاه أنواع مختلفة من البكتريا الممرضة للإنسان ان

بكتريا *Staphylococcus aureus* الأكثر تحسسا بدلالة قطر هالة منطقة التثبيط والتي بلغت 38 ملم عند التركيز 100مايكروغرام / مل، كما كشف عن إمتلاكه فعالية مضادة للجذور الحرة باستعمال تقنية 2,2-Diphenyl-1-Pecril Hydrazine (DPPH).

وفي تجربة تحطم الدهشة تحت عنوان السمية الخلوية للوفاستاتين المنقى باختبار 3-(4,5- Dimethythiazol-2-yl)-2,3-Diphenyl Tetrazolium Bromide(MTT) على خط خلايا سرطان الكبد Hep-G2 ظهرت أعلى نسبة تثبيط عند التركيز 800 مايكروغرام/مل وبلغت 57±1.20 %، كما افادت نتائج تقييم السمية الخلوية بتقنية High Content Screening (HCS) والتي شملت بعض المؤشرات الخلوية ومنها نفاذية غشاء الخلية وحيويتها والكثافة النووية فضلا عن نفاذية غشاء المايتوكندريا وتحرر سايتوكروم C على خط خلايا سرطان الكبد وخط الخلايا الطبيعية، والتي اظهرت وجود فروقات معنوية على معظمها بتأثير الجرعة المستخدمة وتركيز اللوفاستاتين المنقى مما يؤكد موت الخلايا المبرمج بعملية Apoptosis.

ولأن الاصابة بمرض لا يجب ان تكون عائقا أمام طموحات المرء العلمية، ولحل مشكلة الكولسترول تبنت الأهداف متابعة تأثير اللوفاستاتين على معالجة فرط الكولسترول في الدم في الجرذان البيض السويسرية، برهن اللوفاستاتين المنقى انه يمتلك القدرة على خفض مستوى الكولسترول الكلي والدهون الثلاثية وكذلك البروتين الدهني منخفض الكثافة والبروتين الدهني منخفض الكثافة جدا في الدم من جهة ورفع مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة في الدم من جهة أخرى في الجرذان التي جرعت بمزيج من اللوفاستاتين المنقى (0.4 ملغم/ يوم) مع زيت جوز الهند (1.5 مل/ يوم) على الترتيب مقارنة مع اللوفاستاتين القياسي.

بدت النتائج التي تم التوصل اليها واعدة وتمثل خطوة مهمة يحتفى بها في مجال البحوث الطبية الحيوية وما هي إلا بدايات كبيرة تتمتع بكل ما يلزم لترى النور، وتعد الأحدث في سلسلة طويلة من العقاقير الحيوية لعلاج فرط الكولسترول الذي يوهن ويضعف صحة وحياة الكثيرين.

الكلمات المفتاحية: لوفاستاتين، فطريات كبيرة، *Laetiporus sulphureus*، كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء، كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة، طيف الرنين النووي المغناطيسي، فعالية مضادة للبكتريا، فعالية مضادة للأكسدة، فعالية مضادة للسرطان، جرذان البيض.

ABSTRACT

The purpose of the macro fungi which discovered in Iraq shows the way we should follow, in order to bring the world of fungi into the limelight, search operations were occurred that lasted for five months deep into the Mosul forests and separate areas of Mosul city and its districts and suburbs, it proved its feasibility, as 78 fruiting bodies belonging to different genera of Basidiomycota and Ascomycota were obtained. Thy were given serial scientific code. The obtained isolates were subjected to preliminary purification and screening, and it was found that the isolate with scientific code Ot23 had the highest yield of lovastatin in terms of the diameter of the inhibition zone 34mm towards *Candida albicans* so I was elected to complete the study experiments. By polymerase chain reaction, the DNA of the selected isolate was amplified after lining up the nucleotide sequences against the Gene Bank database, it was found that they are specific to *Laetiporus sulphureus.*

It was clear from the outputs of the results of the study of the optimal cultivation conditions for the production of lovastatin from the selected isolate, that a period of 7 days gave the highest production of lovastatin reached 266.5 µg/ml, Carboxymethyl cellulose (CMC) as Carbon source, Yeast extract as Nitrogen source, pH6.5, temperature 30°c, using M-4 medium fortified with vitamin Thiamine (B1), Pyridoxine (B6) respectively. The results of purification of lovastatin using a different polarity solvent system using column chromatography were shown in the detection of four bands, it was established by high performance liquid chromatography that the F-2 bundle represents the purified lovastatin in terms of its potency and appearing one bundle.

Depending on the biochemical characterization of purified lovastatin, a single pale yellow spot was revealed with an Retardation factor (Rf) value of 0.55, which is identical to the Retardation factor

(Rf) value of standard lovastatin by thin layer chromatography technique and the choice of solvent system Dichloromethane: Ethyl acetate , the effective aggregates of the purified lovastatin were detected by infrared spectrum, while the structural structure of it was detected using nuclear magnetic resonance spectroscopy with an melting point of 175.5°c and ethyl acetate as the best solvent for lovastatin .

The obtained data analysis was reported to evaluate the efficacy of purified lovastatin against different types of human pathogenic bacteria revealed that *Staphylococcus aureus* bacteria were most sensitive in terms of the diameter of the inhibition zone, which was 38mm at the concentration of 100µg/ml, it was also revealed that it has anti-free radical activity using 2,2-Diphenyl-1- pecril hydrazine (DPPH) technology.

In a surprise crash experiment in title of cellular toxicity by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test for purified lovastatin on the liver cancer cell line Hep-G2 the highest inhibition was shown at the concentration of 800µg/ml and it reached 57±1.20 %, the results of cytotoxicity assessment using High Content Screening (HCS) technique were also reported, which included some cellular indicators, including cell membrane permeability, vitality, nuclear density, as well as mitochondrial membrane permeability and cytochrome C release on liver cancer cell line and normal cell line, which showed significant differences in most of them with the effect of dose used and the concentration of purified lovastatin, which confirms the programed cell's death by apoptosis process.

And because disease should not be an obstacle to one's scientific ambitions, to solve the cholesterol problem, the objectives adopted follow-upthe effect of lovastatin on the treatment of hypercholesterolemia in white Swiss rats, the purified lovastatin showed that it has the ability to

reduce the level of total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein and very low density lipoprotein in the blood on the one hand and raise the level of beneficial cholesterol in the blood on the other hand in rats that were dosed with a mixture of purified lovastatin (0.4mg/day) with coconut oil (1.5ml/day) respectively compared with lovastatin standard.

The results that were reached seemed promising and represent an important and celebrated step in the field biomedical research and are only great beginnings that have everything necessary to see the light, and it is the latest in a long series of vital drugs to treat hypercholesterolemia that weakens and impairs the health and life of many.

Key words: Lovastatin, Macrofungi, *Laetiporus sulphureus,* High performance liquid chromatography, Thin layer chromatography, Nuclear magnetic resonance spectrum, Antibacterial, Antioxidant, Anticancer, White rats.

University of Mosul
College of Education for
Pure Science

Extraction and Purification of Lovastatin from a New local Isolation of Fungus *Laetiporus sulphureus* and Study of Its Biomedical Applications

Othman Akram Mahmoud

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised by

Prof.

Dr. Shimal Younis Abdel-Hadi

2021A.D **1443A.H**