مقالات سلولی و مولکولی

مجموعه مقالات سلولی و مولکولی

چکیده مقالات

تعیین معیار کمّی برای تشخیص سطح دودمان های ژنتیکی سوسماران خانواده لاسرتیده (**Lacertidae**) با استفاده از ژنوم میتوکندریایی..... ۲
جدا سازی و کلون سازی ژن **MAP30** گیاه **Momordica charantia** در باکتری اشریشیا کلی..... ۴
نقشه برداری اپی توپ از پروتئین **W** غشای خارجی (**OmpW**) آسینتوباکتر بومانی و معرفی یک پپتید مشتق به عنوان نامزد قوی واکسن: رویکردهای **in silico** و **in vitro**..... ۶
بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوذره طلای سنتز شده توسط ***Salvia reuterana*** بر روی ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ***Klebsiella pneumoniae*** و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک **Amikacin**..... ۹
بررسی نقش پلی مورفیسم های ژن **ACE1 (rs4646994, rs1799752)** در بیماران مبتلا به سل فعال مراجعه کننده به بیمارستان دکتر مسیح دانشوری..... ۱۱
بررسی پلی مورفیسم ژن های گیرنده ویتامین **D**، **BgII** و **EcoRV** در بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری..... ۱۴
بررسی نقش پلی مورفیسم ژن **ACE2 rs2285666** در شدت و حساسیت بیماران مبتلا به سل فعال..... ۱۶
تعیین فراوانی آلل ها و بررسی جایگاه ژن ۱۰۸۲ در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس..... ۱۸
مقایسه روش های جدید و قدیمی در تعیین مقاومت دارویی مایکوباکتریوم ها..... ۲۰
بررسی ژن **QUB4156C** در بیماران مبتلا به سل نهفته..... ۲۳
طراحی **Allele-specific PCR** برای غلبه بر مشکلات **PCR-RFLP** در سرعت تشخیص مایکوباکتریوم..... ۲۵
بررسی گروه ژنتیکی **PGG** و تجزیه و تحلیل ژنتیکی آن در مایکوباکتریوم..... ۲۷
ناقل های انتقال ژن غیر ویروسی: در مورد کاربرد گلوکوکورتیکواستروئیدها به عنوان ترکیب های افزایشی..... ۲۹
مشخصات بالینی و آزمایشگاهی کودکان مبتلا به کووید-۱۹ شدید و غیر شدید: مطالعه گذشته نگر در کرمانشاه، غرب ایران..... ۳۳
شیوع آکانتامبا در منابع آب و خاک ایران: سیستماتیک رویو و متاآنالیز..... ۳۷
ارتباط پلی مورفیسم **G894T** موجود در ژن اندوتلیال نیتریک اکساید سنتاز با ریسک ابتلا به پره اکلامپسی..... ۴۱
نقش انواع سلول های بنیادی در بهبود آسیب ناشی از سکته ایسکمیک مغزی..... ۴۳
بررسی بیان **mir-587** در سرطان روده ی بزرگ..... ۴۵
فناوری نوین در ساخت آنزیم تجزیه کننده پلاستیک..... ۴۷
تغذیه در سرطان..... ۴۹
بیان و بارگذاری پروتئین کایمر نوترکیب از باکتری شیگلا در نانوذره **PLGA** و تولید آنتی بادی علیه آن..... ۵۱
بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی پس از دریافت دوزدوم واکسن برکت درافراد بالای ۱۸ سال..... ۵۵
بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی پس از دریافت دوز دوم واکسن آسترازنکا در افراد بالای ۱۸ سال..... ۵۷
شناسایی نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ **B** به روش ساندویچ الایزا..... ۵۹
بیان و بارگذاری پروتئین کایمر نوترکیب از باکتری شیگلا در نانوذره **PLGA** و تولید آنتی بادی علیه آن..... ۶۱
بارگذاری پروتئین **CfaB** از باکتری اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک در نانورذات کیتوزان و ارزیابی ایمنی زائی آن..... ۶۵

بررسی ایمنی زائی نانوذرات **PLGA** دربردارنده پروتئین اینتیمن از باکتری اشرشیاکلی انتروهموراژیک ۶۸
بررسی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب چند اپی توپی علیه گونه‌های بیماریزای شیگلا ۷۲
بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی پس از دریافت دوز دوم واکسن سینوفارم در بالغین ۷۴
نقش اگزوزم ها در پیشرفت سرطان پانکراس ۷۶
بررسی اثرات تیموکینون گیاه سیاه دانه بر ترشح هورمون تستوسترون موش سوری نر تیمار شده با سم کلرپیریفوس ۷۸
دو پپتید مشتق شده از پروتئین **K** غشای خارجی آسینتوباکتر بومانی به عنوان کاندیدای واکسن: مطالعه جامع بیوانفورماتیکی ۸۰
طراحی یک روش رنگ سنجی جدید برای سنجش گلوکز با استفاده از تثبیت آنزیمی ۸۲
تثبیت و تعیین خصوصیت بیوشیمیایی پروتئین آلبومین در نانوساختارهای فلزی ۸۴
تایپینگ مولکولی و تشخیص ژن‌های۱ -**mcr** در سویه‌های مقاوم به کارباپنم کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان های ایران با روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس و **PCR** ۸۶
واریانت تک‌نوکلئوتیدی **CD44- rs9666607A>G** به عنوان یک عامل محافظتی در ابتلا به سقط مکرر جنین در جمعیت مازندران ۸۸
بررسی تغییرات بیان ژن **vtRNA2-1** در آدنوکارسینومای معده ۹۱
بافت هوشمند ۹۳
ژن های درگیر با گیرنده **B2** برادی کینین در ادم مغزی ناشی از بیماری **COVID-19**: یک مطالعه کامپیوتری ۹۵
تهیه سبزنانوذرات اکسید منیزیم با استفاده از عصاره گیاه ***Otostegia persica*** و بررسی خواص آنتی اکسیدان آنها ۹۷
استخراج و شناسایی ترکیبات شیمیایی پودر و روغن هسته خرما از دو نوع خرمای منطقه سراوان ۹۹
درمان های نوین و هدفمند سرطان ۱۰۱
کارایی پرورش به روش تکه تکه شدن برمیزان مرگ و میر، رشد و بازسازی چهار گونه مرجان آبسنگ ساز شاخه ایی **Acropora downingi**، توده ایی **Platygyra daedalea** و انگشتی **Porites harrisoni** و **Porites lutea** ۱۰۳
آنالیز مورفولوژی نانو ذره نقره سنتز شده با عصاره بذر گیاه ***Tribulus terrestris*** ۱۰۶
نوشین بیجاری [*۱]، سارا شریفی [۲] ۱۰۶
غلظت سرمی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی **A (VEGFA)** و بیان **miR-410-3p** در بیماران مبتلا به اندومتریوز ۱۰۸
جداسازی فاژ لیتیک از میکروبیوم سوسک شب‌زی ***Adesmia cancellata* (Coleoptera, Tenebrionidae)** از منطقه دشت کویر ۱۱۰
مرور اثرات هربال تراپی بر آسیب های مغزی ناشی از سکته ایسکمیک ۱۱۲
پیش‌بینی بیوانفورماتیکی**miRNA** هایی که **SETDB1** را هدف قرار می‌دهند. رویکردی برای درمان سرطان پروستات ۱۱۴
تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی **miRNA**هایی که **NRAS** را هدف قرار می‌دهند؛ به‌عنوان یک رویکرد درمانی ممکن در ملانوما ۱۱۷
ارزیابی مقاومت ضدمیکروبی اشرشیاکلی های مولد عفونت ادراری به فلوروکینولون‌ها در شمالغرب کشور ۱۱۹
بررسی و تحلیل ارتباط بین بیان ژن های **PRKAR1A** و **ACLY** در سرطان پانکراس ۱۲۲
نانوحامل هیدروکسید دوگانه لایه‌ای **(LDH)** به منظور رسانش کنترل‌شده دارو: مطالعه درج و رهایش پمترکسد ۱۲۴
تشخیص درمان سرطان پستان به کمک **microRNAs** ۱۲۶
تولید و ارزیابی آنزیم اندولایزین موثر بر پروتئوس ولگاریس ۱۲۸
طراحی واکسن چند اپیتوپی به روش واکسینولوژی معکوس علیه **SARS-COV-2** ۱۳۰

بررسی میزان فاکتور رشد فیبروبلاستیک محلول در سرم خون و بیان **miR-4723-5P** در نمونه های انسانی مبتلا به اندومتریوزیس ۱۳۲
اثرات هربال‌تراپی بر عملکرد و سلامت سیستم تولیدمثل زنان ۱۳۵
بررسی خاصیت ضد میکروبی گیاهان دارویی خرزهره، گوآ، مرزه و خردل سفید بر روی سالمونلا تیفی موریوم ۱۳۷
ارزیابی مصرف سین‌بیوتیک بر سطوح سرمی لپتین، گلوکز، مقاومت به انسولین و پروفایل لیپیدی در موش‌های باردار تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب ۱۳۹
بررسی بیان ترانسکریپت های **ER**، **PR** و **AMHR** در تخمدان موش ۱۴۳
بررسی مقایسه‌ای ساختاری پروتیین تیپ وحشی و جهش یافته‌ی اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس با استفاده از فلورسانس ذاتی و خارجی ۱۴۷
تاثیرآب جوشانده در حضور ظروف یکبار مصرف ساخته شده از پلی پروپیلن ۱۴۹
بر نسبت هسته به هستک در سلول های مریستمی ریشه پیاز ۱۴۹
بررسی ارتباط هورمونهای تیروئیدی با جنسیت و سن در بیماران تالاسمی ماژور ۱۵۱
سیستم‌های کریسپر-کس: سلاحی در برابر پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ۱۵۳
ترکیبات آپتامر-نانومواد برای تشخیص بیماری های عفونی و غیر عفونی ۱۵۵
سیستم ترشحی نوع ۶ در باکتری ویبریو کلرا ۱۵۷
پتانسیل ویرایش ژن با **CRISPR-Cas9** برای درمان بتا تالاسمی ۱۵۹
بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره روغنی سیاه دانه رقم هندی برعلیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی در شرایط آزمایشگاهی ۱۶۱
بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره گیاه آدنیوم آبسئوم بر رده سلولی **Ej138** در شرایط آزمایشگاهی ۱۶۵
گرایش تحقیقات جهانی در زمینه اپی ژنتیک: آنالیز علم سنجی ۱۶۷
بهبود ترمیم زخم با استفاده از پانسمان‌های هیدروژلی حاوی صمغ عربی-سریسین ۱۶۹
بهینه سازی شرایط (غلظت، دما، **pH** و زمان) تشکیل نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه حنا (***Lawsonia inermis***) ۱۷۱
بررسی فعالیت های ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه حنا **(Lawsonia inermis)** ۱۷۳
پیوند پوست سلول زدایی شده ماهی: کلاژن و پتانسیل امیدوارکننده بازسازی پوست انسان ۱۷۵
مهندسی آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس در موقعیت۲۷۹ با استفاده از جهش زایی هدفدار برای بهبود پایداری ۱۷۷
بررسی اثرات ضد تکثیری پپتید **SHK** از سم شقایق دریایی خلیج فارس(***Stichodactyla haddoni***) بر سلول های سرطانی ریه رده **A549** ۱۷۹
فعالسازی مسیر **Wnt** در سلولهای کومولوس تحت درمان توسط **IVF** ۱۸۲
بررسی بیان ژن‌های ***HTR1A***، ***HTR2A*** و ***HTR3A*** در بیماران مبتلا به گلوکوم ۱۸۴
ارزیابی الگوی بیان ژن‌های ***DRD2***، ***DRD3*** و ***DRD4*** در بیماری گلوکوم ۱۸۶
بررسی میزان بیان ژن‌های ***CHD1L***، ***ERCC6*** و ***ITGB7*** در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال ۱۸۸
بررسی میزان بیان ژن‌های ***ERCC3***، ***ERCC4*** و ***ERCC5*** در مبتلایان به سرطان کلورکتال ۱۹۰
بررسی اثرات محافظتی کو آنزیم **Q10** بر عملکرد بافت کلیه در موش سوری دریافت کننده بوسولفان ۱۹۲
بررسی برهمکنش کمپلکس **cis-[Pd(pyrr)2Cl2]** با آلبومین سرم گاوی به کمک طیف سنجی جذب الکترونی ۱۹۶
بررسی اثر عصاره گیاه آدنیوم آبسئوم در القای آپوپتوز در رده سلولی **Ej138** در شرایط آزمایشگاهی ۱۹۹
مطالعه ارتباط ژن **MS4A6A** سیستم ایمنی با امکان بروز آلزایمر ۲۰۳

تجزیه و تحلیل ارتباط پلی مورفیسم های A>G ۱۰۸۲-، T>C ۸۹۱- و A>C ۵۹۲- در ژن اینترلوکین-۱۰ با پره اکلامپسی: یک متا آنالیز ۲۰۵
بررسی سطح بیان فاکتورهای رونویسی **NFATc1** در لنفوسیتهای بیماران مبتلا به **COVID-19** ۲۱۲
بررسی میزان بیان ژن **LncRNAH19** اگزوزومی به عنوان بیومارکر تشخیصی سرطان پستان ۲۱۷
شناسایی جهش **c.C 616T** در ژن **MFSD8** در بیمار مبتلا به **CLN7** ۲۲۵
شناسایی دومین جهش شایع ژن **ALG1** در بیمار مبتلا به اختلال مادرزادی گلیکوزیلاسیون ۲۳۳
طراحی وساخت ناقل نوترکیب **CRISPR** ژن بیماری زای **EscD** باکتری باکتری ***E.coli O157:H7*** ۲۴۲
شناسایی جهش **missense** ژن **TMEM 67** در یک خانواده ایرانی مبتلا به سندرم **COACH** ۲۴۹
سنتز نانوذرات نشاسته اصلاح شده جهت دارورسانی در شرایط دمایی مختلف ۲۵۷
بررسی رهایش داروی دوکسوروبیسین از نانوذرات نشاسته در **pH** های مختلف ۲۶۷
تحول و تکامل در بیوتکنولوژی علم فناوری ۲۷۸
تاثیر عصاره متانولی گیاه مریم نخودی خزری (***Teucrium hyrcanicum***) بر زنده مانی، فعالیت آنزیم **LDH** و القای نکروز در سلول های **PC-3** ۲۹۳
مکانیسم های ملکولی پیری ۳۰۳
شناسایی ژن آنزیم سلولاز از فلور میکروبی منطقه آتشفشانی تفتان و مهندسی منطقی آن به منظور افزایش پایداری حرارتی: یک مطالعه آزمایشگاهی- محاسباتی ۳۱۱
افزایش پایداری آنزیم استیل استراز با استفاده از روش های زیست شناسی محاسباتی ۳۲۳
بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ترکیبات مؤثره عصاره گیاه دارویی اکینوفورا پلتی لوبا (خوشاریزه) ۳۳۴
مطالعه مقایسه ای نانوامولسیون ها و میکروامولسیون ها: تعاریف، روشهای تولید و خواص ۳۴۲
اثر افزایشی ترکیب تیمول با دوستاکسل بر مهار رشد سلول های سرطان پستان ۳۵۱
بررسی داربست های بر پایه پلی آمید۶ و کاربردهای آن در پوشش زخم ۳۶۰
بررسی داربست های بر پایه زئین و کاربردهای آن در ترمیم زخمهای تمام ضخامت پوستی ۳۶۹
استخراج و به کارگیری عصاره گیاه ***Anabasis Setifera*** از منطقه بلوچستان برای احیای پالادیوم به عنوان کاتالیست آندی پیل سوختی اتانولی مستقیم ۳۷۹
مطالعات تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مولکولی ۳۸۹
توصیف یافتههای برخی از پژوهشهای انجام شده پیرامون کنترل سرطان با ژن درمانی ۴۰۰
(با تاکید بر ژنهای P۵۳) ۴۰۰
اندوفیت‌های میکروبی و کاربرد آن‌ها در کشاورزی پایدار ۴۱۴
مهندسی پروتئین، فناوری های نوین در ایجاد آنزیم فیتاز پایدار ۴۲۴
بررسی اثر قارچهای اندوفیت جدا شده از گیاه ***Rhabdociadium aucheri*** بر روی قارچ ***Candida albicans*** ۴۳۵
سنجش میزان بیان **LncRNA UCA1** به عنوان بیومارکرهای تشخیصی سرطان پستان ۴۴۴
حذف بیولوژیک رنگ آزو **Remazol Black-B** با استفاده از باکتری **Streptomyces hygroscopicus** در شرایط مختلف محیطی ۴۵۱
بهینه سازی حذف بیولوژیک رنگ آزو **Remazol yellow** با استفاده از باکتری **Streptomyces hygroscopicus** در شرایط مختلف محیطی ۴۶۲

کاربردها وآیندهنگری **CRISPR-Cas9** در ایمونوتراپی سرطان ۴۷۳
جداسازی باکتریوفاژ لیز کننده باکتری اشریشیا کلی ۴۸۳
سنجش میزان تجزیه فنانترن توسط یک باکتری اکستریم هالوفیل ۴۹۳
کلونینگ مولکول های **shRNA** در وکتور لنتی ویروسی به منظور ممانعت از تکثیر ویروس سپتی سمی خون ریزی دهنده ۴۹۹
پاتوفیزیولوژی بیماری دیابت خودایمن تاخیری در بالغین و مقایسه آن با دیابت نوع ۱ و دیابت نوع ۲ ..... ۵۱۰
استفاده از ترکیبات مستخرج از جانداران دریایی در درمان های مبتنی بر سلول های بنیادی ۵۲۳
جداسازی باکتریوفاژ لیز کننده باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۵۳۰
ارزیابی روش سازگار با محیط زیست با استفاده از میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی ۵۳۹
بررسی فعالیت سیتوتوکسیسیتی عصاره متانولی گیاه ***Teucrium persicum***، تاثیر بر فعالیت آنزیم **LDH** و تولید رادیکال های آزاد در سلول های سرطانی پروستات (**PC-3**) ۵۴۹
استفاده از روش ریز استخراج دوستدار محیط زیست برای آنالیز مالاشیت گرین در نمونه های آبی ۵۶۰
مقایسه تاثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و ترشحات آن بر سیتوکاین تغییر یابنده رشد بتا **(TGF-β)** در رت های دیابتی ۵۷۰
بررسی اثرات ضد باکتریایی گیاه دارویی درمنه کوهی **(*Artemisia aucheri*)** ۵۸۱
مروری بر کاربرد برخی از نانوذرات در سیستم های دارویی نوین ۵۹۰
باکتری‌های محرک رشد گیاه: گزینه ای مناسب برای القای تحمل به خشکی در محصولات زراعی ۶۰۲
سنتز حسگر نورتاب با استفاده از نقاط کربنی مشتق شده از ضایعات زیست توده و چارچوب آلی-فلزی ۱۹۹ برای تشخیص آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ۶۱۲
طراحی و بهینه سازی پرایمر دژنره جهت بررسی تغییرات بیان ژن: ژن **AMPK** کرم خاکی***Eisenia fetida*** ، به عنوان یک گزارش اولیه ۶۲۰
سنتز و شناسایی کمپلکسی جدید از **Pd(II)** با لیگاند پیرولیدین و بررسی برهمکنش آن با **CT-DNA** به کمک طیف سنجی جذب الکترونی ۶۳۰
بررسی راهبردهای مختلف افزودن گلوتارآلدهید در تثبیت **BSA** در دانه‌های کلسیم آلژینات ۶۴۰
بررسی اثر ضد سمیت یک نانو ذره جدید منگنز **(II)** بر روی رده سلولی **A549** ۶۴۹
تهیه و مشخصه یابی دو کمپلکس جدید کمپلکس های یونهای واسطه **Ni(II) , Co(II)** با لیگاند های ۲-امینوبنزامید در حضور آمینواسید گلایسین و بررسی اثر ضد سمیت آنها بر رده سلولی **MCF-7** ۶۵۵
نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول درمانی بیماران کرونایی ۶۶۲
مهندسی نانوذرات و کاربرد آنها در زیستشناسی ۶۷۵
تهیه، مشخصه یابی و مطالعات تئوری کمپلکس های یونهای واسطه **Ni(II) , Co(II)** با لیگاند سیستامین هیدرو کلراید و برهمکنش آنها با **FS- DNA** ۶۸۶
تهیه یک نانو ذره جدید از یتربیوم**(III)** نیترات و برهم کنش آن با **FS- DNA** ۶۹۴
مطالعات تئوری و تعیین نوع برهمکنش آن ۶۹۴
نقش **RNA** های غیرکد کننده در بیماری‌های چشمی ۷۰۱
بررسی اثر گیاه اُزمَک (سوزی) بر روی باکتری استرپتوکوک و درنتیجه درمان گلو درد چرکی ۷۱۳

بررسی اثر سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی بر بازسازی جزایر لانگرهانس پانکراس در رت های دیابتی ۷۲۵
تولید رنگدانه قرمز موناسکوس پورپورئوس در بیوراکتور بسترآکنده آزمایشگاهی ۷۳۳
شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس برگ و پوست میوه پسته وحشی (بنه) لرستان ۷۴۱
بررسی ترکیبات شیمیایی گیاهان اسطوخودوس و بهلیمو به منظور شناسایی کاندید دارویی ضد اضطراب با روش غربالگری مجازی و داکینگ مولکولی ۷۵۲
بررسی ژن ها و **microRNA** های دخیل در مقاومت دارویی چندگانه در درمان سرطان پستان سه گانه منفی ۷۶۹
مقایسه تاثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و ترشحات آن بر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در بهبود زخم در رت های دیابتی ۷۸۶
بررسی مباحث تشریحی روده باریک از دیدگاه طب سنتی و مقایسه تطبیقی با یافته های آناتومی طب نوین ۷۹۷
مطالعه داکینگ مولکولی و **ADMET** ترکیبات فلاونوئیدی به عنوان مهارکننده پروتئاز اصلی کروناویروس ۸۰۷
تهیه و بررسی نانوذرات لیپیدی جامد حاوی ماده مؤثره ی گیاه فلفل قرمز (کپساسین) با روش همگن سازی به کمک هموژنایزر سرعت بالا به همراه پروب اولتراسونیک ۸۲۱
تولید بیوگاز از پسماند گیاهان دارویی و علف های هرز منطقه سیستان ۸۳۱
تجزیه زیستی آنتراسن توسط یک باکتری اکستریم هالوفیل ۸۵۷
بررسی اثر سمیت نانو ذرات سبز بیسموت اکساید بر روی رده سلولی سرطانی **MCF-7** و سلولهای سالم بافت پستان ۸۶۴
بررسی اثرات آلاینده ها بر ژنتیک جانداران دریایی ۸۷۳
کمپلکسی جدید از **Pd(II)** با لیگاند مورفولین و بررسی برهمکنش آن با **CT-DNA** به کمک طیف سنجی جذب الکترونی ۸۷۹
نقش ویروس‌های آنکوژنیک در تومورهای سرطانی: مکانیسم‌های ژنتیکی و مولکولی در تغییرات سلولی ۸۹۱
Evaluating the prognostic value of RUNX3 gene promoter methylation in ovarian cancer ۹۲۱
Investigating the growth and differentiation of mouse osteoblast cells on synthesized bone scaffolds ۹۳۰
Preparation of peppermint essential oil nanoemulsion via sonication and thermal synthesis for potential hydrophobic drug delivery application ۹۴۰
Cobalt nanostructures as potential materials for glucose sensors ۹۴۹
The Role of Microalgae in Drug Delivery ۹۵۶
Investigation of pathogenic molecular mechanisms of alcoholic liver disease through meta-omics analysis ۹۶۱
DNA biosensors based on gold nanostructures ۹۶۵
Low-level laser therapy synergistically improves the effects of natural killer cell-mediated immunotherapy in cancer ۹۷۲
Comparative investigation of the antibacterial effect of the leaf and stem extracts of the Passiflora caerulea by broth microdilution method ۹۸۶
Drug delivery based on bio-based nanostructured materials in coronavirus disease ۹۹۳
The Effects of the COVID-19 Pandemic on Antimicrobial Resistance ۱۰۰۱

مقالات سلولی و مولکولی

چکیده مقالات

تعیین معیار کمّی برای تشخیص سطح دودمان های ژنتیکی سوسماران خانواده لاسرتیده (Lacertidae) با استفاده از ژنوم میتوکندریایی

نیلوفر گنجی کهخا[۱*]، سهیلا شفیعی بافتی[۲*]، سید سعید حسینیان یوسفخانی[۳]، اسماء معین الدینی[۴]

*۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنرکرمان، کرمان، ایران(ganjiniloufar89@gmail.com)

*۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنرکرمان، کرمان، ایران (shafiei@uk.ac.ir)

۳. استادیار، گروه علوم جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، سمنان، ایران

۴. دانش آموخته دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنرکرمان، کرمان، ایران

چکیده

در این مطالعه، ۳۴۷۸ توالی از سه ژن میتوکندریایی 12S rRNA، 16S rRNA و cytb مربوط به گونه های متعلق به ۱۷ جنس از خانواده لاسرتیده (Lacertidae) از بانک ژن (GenBank) استخراج گردید. ابتدا با استفاده از تحلیل بیزین (BI) درخت های تبارزادی هر جنس ترسیم شد، سپس فاصله ژنتیکی اصلاح نشده بین دودمان های ژنتیکی که نماینده گونه واحد بودند، محاسبه گردید و با تعیین کمترین، بیشترین و میانگین فاصله ژنتیکی بین دودمان ها، معیار کمی برای تشخیص سطح دودمان های ژنتیکی سوسماران خانواده لاسرتیده بدست آمد. نتایج نشان داد که حد آستانه ژنتیکی بین دودمان های مورد مطالعه برای ژن 12S rRNA بیش از ۶/۶ و برای ژن 16S rRNA بیش از ۸/۸ و برای ژن cytb بیش از ۱۴/۴ درصد می باشد، بطوریکه آن دودمان های ژنتیکی را می توان در سطح گونه در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: ژن میتوکندری، سوسمار، تاکسونومی.

Quantitative criterion for detecting the level of genetic lineages of Lacertid lizards using mitochondrial genome

Niloufar Ganji Kahkha[1*], Soheila Shafiei Bafti[2*], Seyyed Saeed Hosseinian Yousefkhani[3], Asma Moeinadini[4]

*1. MSc. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran (ganjiniloufar89@gmail.com)
*2. Asst. Prof. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran (shafiei@uk.ac.ir)
3. Asst. Prof. Department of Animal Science, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
4. PhD. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

In this study, 3478 sequences of three mitochondrial genes 12S rRNA, 16S rRNA and cytb related to species belonging to 17 genera of Lacertidae family were extracted from GenBank. First, using Bayesian analysis (BI), genealogical trees of each genus were drawn, then the uncorrected genetic distance between genetic lineages, which considered as distinct species, was calculated, and by determining the minimum, maximum, and average genetic distance between lineages, a quantitative criterion was obtained for detecting the level of genetic lineages on Lacertid lizards. The results showed that the genetic threshold between the studied lineages is more than 6.6% for 12S rRNA gene, more than 8.8% for 16S rRNA gene, and more than 14.4% for cytb gene, so that those genetic lineages can be considered at the species level.

Keywords: Mitochondrial gene, Lizard, Taxonomy

جدا سازی و کلون سازی ژن MAP30 گیاه Momordica charantia در باکتری اشریشیا کلی

نیلوفر گنجی کهخا[1*]

*۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنرکرمان ، کرمان، ایران(ganjiniloufar89@gmail.com)

چکیده

در این مطالعه استخراج DNA از گیاه کارلا به روش دلاپورتا که یک روش ساده و آسان و سریع می‌باشد، صورت پذیرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA برای ژن *MAP30* بر اساس توالی‌های گزارش شده در سایت NCBI پرایمر های اختصاصی طراحی گردید، و ژن به گونه ای تکثیر شد که امکان کلون آن در حامل‌های متعدد بوجود آید. *MAP30* در وکتور pTG19.T کلون و به باکتری اشریشیا کلی سویه DH5α منتقل گردید. تایید ترانسفورماسیون به کمک روش‌های انتخاب آنتی‌بیوتیکی، کلنی‌های سفید و آبی و آنزیم *BamH* 1 صورت پذیرفت. نتایج حاصل از توالی یابی و آزمون‌های تائیدی جداسازی و کلون نمودن صحیح ژن *MAP30* را تائید نمود.

واژگان کلیدی: *MAP30*، کارلا، کلونینگ، اشریشیا کلی

Isolstion and cloning of *MAP30* gene of *Momordica charantia* plant in *Escherichia coli*

Niloufar Ganji Kahkha[1*]

*1. MSc. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, kerman, Iran (ganjiniloufar89@gmail.com)

Abstract

The purpose of this study was to isolate and clone the *MAP30* gene in *E. coli* which can increase the universal expression of the protein MAP30. The product of this gene is used as a anti-cancer and anti-viral molecule in numerous researches. In the study, Karela plant DNA was extracted accoding to delapota *et al.* (1983) which is a feasible and economic method. The quantity and quality of the extracted DNA was evaluated by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis methods. DNA amplification of *MAP30* gene was designed based on the deposited sequences in the NCBI data base and the gene was amplified in such a way that possessing the potential for colonization in several vectores. The *MAP30* gene was cloned in pTG19-T vector and transferred to DH5α *E. coli* competent cell employing heat-shock method. The transformation was confirmed by applying a selective media containing antibiotics. Production of while colonies was the criterium for successful transformation while the blue colonies represent failure in the transformation process. The sequencing data and cloned DNA segments verified the appropriate and functionel insertion of *MAP30* gene in to the *E. coli.* The obtained bacterial clones with *MAP30* gene in their plasmids are preserved for further researches dealing with *MAP30* protein function.

Keywords: *MAP30*, Karela, coloning, E. coli

نقشه برداری اپی توپ از پروتئین W غشای خارجی (OmpW) آسینتوباکتر بومانی و معرفی یک پپتید مشتق به عنوان نامزد قوی واکسن: رویکردهای in silico و in vitro

هنا حیدری نیا[۱]، الهه تاجبخش[۱]*، مصیب رستمیان[۲،۱]*، حسن ممتاز[۱]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

پست الکترونیکی: ee_tajbakhsh@yahoo.com, mosayeb.rostamian@gmail.com

چکیده

مقدمه: پروتئین W غشای خارجی (OmpW) یک آنتی ژن کمتر شناخته شده آسینتوباکتر بومانی با خواص ایمنی بالقوه است. اپی توپ های این پروتئین هنوز به خوبی شناسایی نشده اند. بنابراین، در مطالعه حاضر، اپی توپ‌های سلول B و T از OmpW آسینتوباکتر بومانی با استفاده از مطالعات جامع in silico و تا حدی در شرایط آزمایشگاهی یافت شد. روش کار: با استفاده از چندین ابزار پیش‌بینی، اپی توپ‌های سلول T (هر دو کلاس I و کلاس II) و سلول B (هر دو خطی و ساختاری) از طریق بسیاری از رویکردهای بیوانفورماتیکی از جمله پیش‌بینی تولید IFN-γ، ایمنی‌زایی، سمیت پیش‌بینی وآلرژی زایی و شباهت انسان کلاستربندی و غربالگری شدند.. سپس یک پپتید اپی‌توپیک ۱۵ اسیدآمینه ای حاوی یک سلول B خطی و هر دو کلاس اپی توپ سلول T پیدا شد و برای داکینگ مولکولی ، آنالیزهای بیشتر فیزیکوشیمیایی و ساختاری، سنتز، و سنجش‌های آزمایشگاهی استفاده شد. برای سنجش آزمایشگاهی، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مشتق از بیمار و کنترل سالم با پپتید ۱۵ اسیدآمینه ای، فیتوهماگلوتینین یا محیط به تنهایی تحریک شدند. سنجش تکثیر سلولی و تولید IFN-γ انجام شد. **نتایج**: مطالعات بیوانفورماتیک منجر به معرفی یک پپتید ۱۵ اسیدآمینه ای شد که تخمین زده شد که ایمنی زا است، قادر به القای IFN-γ است و به تعداد زیادی HLA با فرکانس بالا در جهان متصل می شود و میل اتصال مناسبی به HLA ها دارد و غیره و برای انسان سمی یا حساسیت زا نیست. سنجش‌های آزمایشگاهی تا حدی قدرت آن را در تکثیر سلولی نشان داد اما در القای IFN-γ نه، اگرچه پاسخ‌ها خیلی گویا نبودند و با سؤالات یا محدودیت‌هایی مواجه بودند. **بحث**: به طور کلی، در مطالعه حاضر، ما یک پپتید را شناسایی کردیم که به نظر می‌رسد دارای پتانسیل خوبی برای در نظر گرفتن واکسن برای آسینتوباکتر بومانی باشد. با این حال، پاسخ‌های ایمنی القا شده در محیط آزمایشگاهی ما قوی نبودند که نشان می‌دهد پپتید حاضر به یک سری

دستکاری‌های بیوتکنولوژیکی برای استفاده به عنوان واکسن نیاز دارد. مطالعات بیشتر در این زمینه توصیه می شود.

کلمات کلیدی: آسینتوباکتر بومانی، اپی توپ، In silico، In vitro، سلول های تک هسته ای خون محیطی، کاندید واکسن

Epitope mapping of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein W (OmpW) and introducing a derivative peptide as potent vaccine candidate: in silico and in vitro approaches

Hana Heidarinia[1], Elahe Tajbakhsh[1]*, Mosayeb Rostamian[2,1]*, Hassan Momtaz[1]
[1] Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Abstract

Introduction: Outer membrane protein W (OmpW) is a less-known *A. baumannii* antigen with potential immunogenic properties. The epitopes of this protein are not well-identified yet. Therefore, in the present study, B- and T-cell epitopes of *A. baumannii* OmpW were found using comprehensive in silico and partially in vitro studies. **Methods:** Using several prediction tools, the T-cell (both class-I and class-II) and B-cell (both linear and conformational) epitopes were predicted and screened through many bioinformatics approaches including the prediction of IFN-γ production, immunogenicity, toxicity, allergenicity, human similarity, and clustering. Then a single 15-mer epitopic peptide containing a linear B-cell and both classes of T-cell epitopes were found and used for further molecular docking, physicochemical/structural analyses, synthesis, and in vitro assays. For in vitro assays, patient- and healthy control-derived peripheral blood mononuclear cells were stimulated with the 15-mer peptide, Phytohemagglutinin, or medium alone. Cell proliferation assay and IFN-γ production were performed. **Results**: The bioinformatics studies led to introduce a 15-mer peptide which was estimated to be immunogenic, able to induce IFN-γ, bind to a large number of HLAs with a high frequency in the world, have a suitable binding affinity to HLAs, and not be toxic or allergenic to humans. The in vitro assays to some extent showed its potency in cell proliferation but not in IFN-γ induction, although the responses were not very expressive and faced some questions/limitations. **Discussion:** In general, in the current study, we identified a peptide, which seems to have a good potential to be considered as a vaccine candidate against *A. baumannii*. However, the induced immune responses in our in vitro setting were not strong which suggests that the present peptide needs a series of biotechnological manipulations to be used as a vaccine. More studies in this field are recommended.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Epitope, In silico, In vitro, Peripheral blood mononuclear cells, Vaccine candidate

بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوذره طلای سنتز شده توسط *Salvia reuterana* بر روی ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *Klebsiella pneumoniae* و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک Amikacin

سیده پریا نجارحسینی و سید محمد مهدی حمدی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

چکیده

زمینه و هدف: در سال های اخیر، نانوذرات فلزی بخصوص نانوذرات طلا به دلیل داشتن خواص بیولوژیکی توجه پژوهشگران را بخود جلب کرده است. از طرفی ***Klebsiella pneumoniae*** از عوامل مهم بیماری‌زای بیمارستانی است و موجب بیماری‌های شدید و کشنده در سراسر جهان می‌شود.

هدف از این پژوهش بررسی اثرات نانوذره طلا و عصاره *Salvia reuterana* Boiss. بر روی ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک *Klebsiella pneumoniae* و در نهایت مقایسه آن با آنتی بیوتیک Amikacin بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، حداقل غلظت بازدارندگیMIC نانو ذرات طلا بر باکتری کلبسیلا پنومونیه با استفاده از تکنیک میکرودایلوشن تعیین و اثرات نانوذرات طلای سنتز شده از عصاره گیاه *Salvia reuterana*بر روی ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک کلبسیلا پنومونیه و مقایسه آن با آنتی بیوتیک Amikacin مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده ازنرم افزار Spss از anova یک طرفه، تست توکی و ارزش P کمتر از ۰/۰۵ ارزیابی شد.

نتایج: نتایج بدست آمده از تعیین خاصیت ضد باکتریایی نانوذره طلا و عصاره *Salvia reuterana*نشان داد که بین غلظت نانو ذره و درصد حذف باکتری، ارتباط مستقیم وجود دارد که این نتایج از لحاظ آماری معنی دار می باشد ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که سویه باکتری کلبسیلا پنومونیه حساسیت را نسبت به نانوذره طلا و عصاره *Salvia reuterana*از خود نشان داد و می‌توان چنین نتیجه گرفت که از این ماده می‌توان برای مهار رشد این باکتری و کشتن آن استفاده کرد و همچنین آنتی بیوتیک Amikacin نیز می تواند از لحاظ اثر آنتی بیوتیکی در رقابت با نانو ذره طلای سنتز شده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: نانوذرات طلا، کلبسیلا پنومونیه، Amikacin، *Salvia reuterana*

Antimicrobial investigation of gold nanoparticle synthesized by *Salvia reuterana* on Klebsiella pneumonia antibiotic-resistant isolates and its comparison with Amikacin antibiotic.

Najjar Hosseini Seyedeh Paria and Hamdi Seyed Mohammad Mahdi

Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: In recent years, metal nanoparticles, especially gold nanoparticles, have attracted the attention of researchers due to their biological properties. On the other hand, *Klebsiella pneumoniae* is an important nosocomial pathogen and causes severe and deadly diseases worldwide. The aim of this study was to investigate the effects of gold nanoparticles on *Klebsiella pneumonia* antibiotic-resistant isolates and finally to compare it with amikacin antibiotics.

.**Materials** In this experimental study, the minimum inhibitory concentration of MIC gold nanoparticles on *Klebsiella pneumoniae* was determined using the microdilution technique and the effects of gold nanoparticles synthesized from *Salvia reuterana* Boiss extract on antibiotic-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and its comparison with Aniotic was examined. Data were evaluated using one-way ANOVA, the Tukey test, and a p-value less than 0.05.

Results: The results obtained from determining the antibacterial properties of gold nanoparticles showed a direct relationship between the concentration of nanoparticles and the percentage of bacterial removal, which is statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study show that the bacterium *Klebsiella pneumoniae* is sensitive to gold nanoparticles and it can be concluded that this substance can be used to inhibit the growth of this bacterium and kill it. Also, the antibiotic Amikacin can have a similar function to *gold nanoparticles.*

Keywords: Gold nanoparticles, *Klebsiella pneumonia*, Amikacin, *Salvia reuterana*

بررسی نقش پلی مورفیسم های ژن ACE1 (rs4646994, rs1799752)در بیماران مبتلا به سل فعال مراجعه کننده به بیمارستان دکتر مسیح دانشوری

جعفر آقاجانی[1*]، پریسا فرنیا[1]، سامان ایوبی[1]، پوپک فرنیا[2,1]، جلال الدین غنوی[1]، علی اکبر ولایتی[1]

۱- مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

سمت و ایمیل نویسنده مسئول : جعفر آقاجانی ، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
Jafaraghajani68@gmail.com

چکیده

آنزیم مبدل آنژیوتانسین I (ACE) یک هیدرولاز پپتیدیل دی پپتیدی است که ۲ اسید آمینه را در انتهای کربوکسیل (His-Leu) از آنژیوتانسین I که یک دکاپپتید است جدا می کند و آنژیوتانسین (II، یک اکتاپپتید) تولید می کند. با توجه به اهمیت ACE و مهارکننده های آن در پاتوژنز و درمان بیماری های مختلف، اندازه گیری آن علاوه بر ارزش علمی از اهمیت بالینی و تجاری نیز برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی نقش پلی مورفیسم های ژن ACE1 (rs4646994, rs1799752) در بیماران مبتلا به سل فعال مراجعه کننده به بیمارستان دکتر مسیح دانشوری می باشد. بر اساس این مقاله، در مطالعه حاضر، ACE به عنوان منبع غنی از ACE در ۳ مرحله خالص سازی شد. برای استخراج ACE، پس از همگن سازی، از مواد دترجنت غیریونی Nonidet-P40 استفاده شد، سپس محلول استخراج شده از ماده دترجنت تحت رسوب با سولفات آمونیوم با غلظت های اشباع ۶۰ و ۸۰ درصد قرار گرفت. در مرحله بعد، مایع رویی به دست آمده از طریق تبادل یونی با Q-Sepharose HP کروماتوگرافی شد، سپس نمونه‌هایی که حداکثر فعالیت آنزیمی خاص داشتند، تحت کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون توسط Sepharryl HR S200 قرار گرفتند. پس از این مرحله، خلوص آنزیم توسط SDS-PAGE و PAGE تایید شد و وزن مولکولی آن ۱۸۵ کیلودالتون تعیین شد. فعالیت اختصاصی نهایی به دست آمده برای ACE 39.1 واحد در میلی گرم بود که پس از ۷۵۵ بار خالص سازی به دست آمد و راندمان نهایی فرآیند خالص سازی ۱,۵ درصد بود. پس از خالص سازی آنزیم، Km آن (ثابت michaelis) برای سوبسترا HHL 2.17 میلی مول محاسبه شد. مهارکننده رقابتی کاپتوپریل می تواند تقریباً به طور کامل ACE را در غلظت های ۰,۱ تا ۰,۰۰۱ میلی مولار مهار کند.pH بهینه برای ACE 8.3 محاسبه شد. همچنین بررسی اثر تغییرات دما کاهش معنی داری را در فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر از ۳۷ درجه سانتیگراد نشان داد. کاهش مراحل تصفیه و زمان

مورد نیاز برای آن و همچنین بازدهی مناسب به دست آمده، نتیجه استفاده از رزین های با قدرت جداسازی بهتر و استفاده از سیستم FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) بوده است.

کلمات کلیدی: ACE1، پلی مورفیسم ژن، سل فعال

Investigating the role of ACE1 (rs4646994, rs1799752) gene polymorphisms in patients with active tuberculosis referred to Dr. Masih Daneshvari Hospital

Jafar Aghajani[1*], Parissa Farnia[1], Saman Ayoubi[1], Poopak Farnia[1,2], Jalaledin Ghanavi[1], Ali Akbar Velayati[1]

1- Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Jafar Aghajani

Abstract.

Angiotensin-converting enzyme (ACE) I is a peptidyl dipeptide hydrolase that cleaves 2 amino acids at the carboxyl end (His-Leu) from angiotensin I, which is a decapeptide, and produces angiotensin (II, an octapeptide). Due to the importance of ACE and its inhibitors in the pathogenesis and treatment of various diseases, its measurement has clinical and commercial importance in addition to its scientific value. The aim of this study is to investigate the role of ACE1 (rs4646994, rs1799752) gene polymorphisms in patients with active tuberculosis referred to Dr. Masih Daneshvari Hospital. According to this article, in the present study, ACE as a rich source of ACE was purified in 3 steps. To extract ACE, after homogenization, Nonidet-P40 non-ionic detergent was used, then the solution extracted from the detergent was subjected to precipitation with ammonium sulfate with saturated concentrations of 60% and 80%. In the next step, the supernatant obtained by ion exchange was chromatographed with Q-Sepharose HP, then the samples with maximum specific enzyme activity were subjected to gel filtration chromatography by Sepharryl HR S200. After this stage, the purity of the enzyme was confirmed by SDS-PAGE and PAGE, and its molecular weight was determined to be 185 kilodaltons. The final specific activity obtained for ACE was 39.1 units per mg, which was obtained after 755 times purification, and the final efficiency of the purification process was 1.5%. After purifying the enzyme, its Km (michaelis constant) for HHL substrate was calculated as 2.17 mmol. The competitive inhibitor captopril could almost completely inhibit ACE in concentrations of 0.1 to 0.001 mM. Optimum pH was calculated for ACE 8.3. Also, the examination of the effect of temperature changes showed a significant decrease in enzyme activity at temperatures higher than 37 degrees Celsius. The reduction of the purification steps and the time required for it, as well as the proper efficiency obtained, was the result of using resins with better separation power and the use of the FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) system.

Keywords: ACE1, gene polymorphisms, active tuberculosis

بررسی پلی مورفیسم ژن های گیرنده ویتامین D، BgII و EcoRV در بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری

جعفر آقاجانی[1*]، پریسا فرنیا[1]، سامان ایوبی[1]، پوپک فرنیا[2,1]، جلال الدین غنوی[1]، علی اکبر ولایتی[1]

۱- مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

سمت و ایمیل نویسنده مسئول : جعفر آقاجانی ، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
Jafaraghajani68@gmail.com

چکیده

سل شرایط انجام مطالعات متعددی را در زمینه ژنتیک میزبان در ابتلا به این بیماری فراهم کرده است که از جمله آنها می توان به مطالعات آنتی ژن لکوسیت انسانی و گیرنده ویتامین D اشاره کرد. هدف از این مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژن های گیرنده ویتامین D، BgII و EcoRV در بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به بیمارستان دکتر مسیح دانشوری می باشد. در این مطالعه مورد-شاهدی، پلی‌مورفیسم‌های BgII و EcoRV در ژن گیرنده ویتامین D در ۱۰۰ بیمار مبتلا به سل ریوی و ۱۰۰ فرد سالم به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری در فراوانی ژنوتیپ های پلی مورفیسم BgII و EcoRV در ژن گیرنده ویتامین D بین بیماران مبتلا به سل ریوی و گروه کنترل وجود دارد. مطالعه حاضر نشان داد که پلی‌مورفیسم‌های BgII و EcoRV در ژن گیرنده ویتامین D با بیماران مبتلا به سل ریوی در جمعیت مورد مطالعه مرتبط است.

کلمات کلیدی: گیرنده ویتامین D، BgII، EcoRV، سل، پلی مورفیسم

Investigating polymorphisms of vitamin D receptor, BgII and EcoRV genes in patients with tuberculosis referred to Masih Daneshvari Hospital

Jafar Aghajani[1*], Parissa Farnia[1], Saman Ayoubi[1], Poopak Farnia[1,2], Jalaledin Ghanavi[1], Ali Akbar Velayati[1]

1- Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Jafar Aghajani

Abstract.

Tuberculosis has provided the conditions for numerous studies on the genetics of the host in contracting this disease, among which studies on human leukocyte antigen and vitamin D receptor can be mentioned. The aim of this study is to investigate polymorphisms of vitamin D receptor, BgII and EcoRV genes in patients with tuberculosis referred to Dr. Masih Daneshvari Hospital. In this case-control study, BgII and EcoRV polymorphisms in the vitamin D receptor gene were investigated in 100 patients with pulmonary tuberculosis and 100 healthy individuals by PCR-RFLP method. The results showed that there is a significant difference in the frequency of BgII and EcoRV polymorphism genotypes in the vitamin D receptor gene between patients with pulmonary tuberculosis and the control group. The present study showed that BgII and EcoRV polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with patients with pulmonary tuberculosis in this study population.

Keywords: vitamin D, BgII, EcoRV receptor, tuberculosis, polymorphisms

بررسی نقش پلی مورفیسم ژن ACE2 rs2285666 در شدت و حساسیت بیماران مبتلا به سل فعال

جعفر آقاجانی[1*]، پریسا فرنیا[1]، سامان ایوبی[1]، پوپک فرنیا[2,1]، جلال الدین غنوی[1]، علی اکبر ولایتی[1]

۱- مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

سمت و ایمیل نویسنده مسئول : جعفر آقاجانی ، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
Jafaraghajani68@gmail.com

چکیده

عوامل ژنتیکی در انسان یکی از مهم ترین عوامل در انتقال سل است. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می تواند میزبان را با اتصال به آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2) آلوده کند. بنابراین، روشن کردن فعل و انفعالات سلولی بین M. tuberculosis و میزبان که در طول عفونت رخ می دهد، مهم است. این مطالعه به صورت مورد-شاهدی در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع ملی سل انجام شد. در این مطالعه اثر پلی مورفیسم شایع ژن گیرنده ACE2 در ۱۰۰ بیمار مبتلا به سل ریوی و ۱۰۰ فرد سالم در گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از تکنیک PCR-RFLP اصلاح شده توسط آزمایشگاه ما برای شناسایی پلی مورفیسم های این ژن استفاده شد. برای مقایسه بین بیماران سل ریوی و گروه کنترل سالم از آزمون کای دو استفاده شد. مشخص شد که فراوانی آللی و ژنوتیپی نواحی پلی‌مورفیک ژن ACE2 در گروه‌های بیماران و افراد سالم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. این نتایج نشان دهنده اهمیت غیرمحتمل پلی مورفیسم های ژنتیکی ACE2 در بروز سل در جمعیت ایرانی است.

کلمات کلیدی: ACE2، پلی مورفیسم rs2285666، سل

Investigating the role of ACE2 gene polymorphism rs2285666 in the severity and susceptibility of patients with active tuberculosis

Jafar Aghajani1*, Parissa Farnia1, Saman Ayoubi1, Poopak Farnia1,2, Jalaledin Ghanavi1, Ali Akbar Velayati1

1- Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Jafar Aghajani

Abstract.

Genetic factors in humans are one of the most important factors in the transmission of tuberculosis. Mycobacterium tuberculosis can infect the host by binding to angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). Therefore, it is important to elucidate the cellular interactions between M. tuberculosis and the host that occur during infection. This study was conducted as a case-control study in patients referred to the national tuberculosis reference laboratory. In this study, the effect of 1 common polymorphism of the ACE2 acceptor gene was studied in 100 patients with pulmonary tuberculosis and 100 healthy individuals in the control group. In this study, a PCR-RFLP technique modified by our laboratory was used to detect polymorphisms of this gene. Chi-square test was used to compare between pulmonary tuberculosis patients and healthy control group. It was found that the allelic and genotypic frequencies of the ACE2 gene polymorphic regions in the groups of patients and healthy individuals do not differ significantly from each other. These results show the improbable importance of ACE2 genetic polymorphisms in the incidence of tuberculosis in the Iranian population.

Keywords: ACE2, rs2285666 polymorphisms, tuberculosis

تعیین فراوانی آلل ها و بررسی جایگاه ژن ۱۰۸۲ در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

جعفر آقاجانی[۱]، پریسا فرنیا[۱]، سامان ایوبی[۱*]، پوپک فرنیا[۲،۱]، جلال الدین غنوی[۱]، علی اکبر ولایتی[۱]

۱- مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

سمت و ایمیل نویسنده مسئول : سامان ایوبی ، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
olomtaghzye@gmail.com

چکیده

امروزه ظهور سویه های MDR یک مشکل جدی در برنامه کنترل سل در اکثر کشورها و در سطح جهانی است. از سال ۱۹۹۰، موارد متعددی از شیوع سل MDR در مناطق مختلف جهان گزارش شده است که عمدتاً به دلیل استفاده نامناسب و نادرست از داروهای سل است. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی آلل ها و بررسی محل ژن ۱۰۸۲ در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد. در این مطالعه تست حساسیت دارویی بر روی ۱۰۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مبتلا به سل ریوی انجام شد و تنوع ژنتیکی سویه ها بر اساس جایگاه MIRU-VNTR و موقعیت ژن ۱۰۸۲ محاسبه شد. تفاوت آللی هر مکان با استفاده از فرمول آماری HGDI به دست آمد. بررسی الگوی ژنتیکی سویه های حساس نشان داد که این سویه ها به خانواده های ehli/CAS، LAM، H37RV تعلق دارند. در مورد سویه های مقاوم به دارو مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، الگوی ژنتیکی خانواده هارلم و LAM بیشتر قابل مشاهده است. تفاوت آللی ۱۰۸۲ جایگاه سویه های حساس و مقاوم معنی دار نیست. به طور کلی جایگاه های ۲، ۴، ۲۰، ۲۴، ۲۷ به عنوان کمترین تفاوت آللی در مقدار و جایگاه های ۱۰، ۱۶، ۲۶، ۳۱ و ۴۰ بیشترین تفاوت آللی را در بین جایگاه های سویه های حساس و مقاوم داشتند. نتایج نشان داد که بیشترین تنوع ژنتیکی سویه های حساس به دارو و مقاوم به دارو متعلق به خانواده هارلم و Dhli/CAS بوده و تکنیک MIRU-VNTR مورد استفاده در این مطالعه روشی سریع، دقیق و ارزان برای بررسی موقعیت ۱۰۸۲ سویه مایکوباکتریوم ژنتیکی است و در جمعیت های فراوان شما می توانید به راحتی از این تکنیک بالا استفاده کنید.

کلمات کلیدی: آلل، فراوانی، منبع ژن ۱۰۸۲، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، MDR TB

Determining the frequency of alleles and examining the 1082 gene locus in Mycobacterium tuberculosis

Jafar Aghajani1, Parissa Farnia1, Saman Ayoubi1*, Poopak Farnia1,2, Jalaledin Ghanavi1, Ali Akbar Velayati1

1- Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Saman Ayoubi

Abstract.

Today, the emergence of MDR strains is a serious problem in the control program of tuberculosis in most countries and at the global level. Since 1990, several cases of MDR TB outbreaks have been reported in different regions of the world, mainly due to inappropriate and incorrect use of TB drugs. The purpose of this study is to determine the frequency of alleles and investigate the location of gene 1082 in Mycobacterium tuberculosis. In this study, drug sensitivity tests were performed on 100 strains of Mycobacterium tuberculosis isolated from patients with pulmonary tuberculosis, and the genetic diversity of the strains was calculated based on the MIRU-VNTR loci and gene position 1082. The allelic difference of each locus was obtained using the HGDI statistical formula. Examination of the genetic pattern of sensitive strains showed that these strains belong to the ehli/CAS, LAM, H37RV families. In the case of drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis, the genetic pattern of Haarlem and LAM families is more visible. The allelic difference of 1082 loci of sensitive and resistant strains is not significant. In general, loci 2, 4, 20, 24, 27 were identified as the least allelic differences in the amount and loci 10, 16, 26, 31 and 40 were the most allelic differences in the amount among the loci of sensitive and resistant strains. The results showed that the highest genetic diversity of drug-sensitive and drug-resistant strains belonged to the Haarlem and Dhli/CAS families, and the MIRU-VNTR technique used in this study is a fast, accurate, and cheap method to investigate the genetic position of 1082 mycobacterium strains and in populations with abundance You can easily use this technique above.

Keywords: alleles, frequency, 1082 gene locus, Mycobacterium tuberculosis, MDR TB

مقایسه روش های جدید و قدیمی در تعیین مقاومت دارویی مایکوباکتریوم ها

جعفر آقاجانی[۱]، پریسا فرنیا[۱*]، سامان ایوبی[۱]، پوپک فرنیا[۲،۱]، جلال الدین غنوی[۱]، علی اکبر ولایتی[۱]

۱- مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

سمت و ایمیل نویسنده مسئول : پریسا فرنیا، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
P.farnia1@gmail.com

چکیده

تشخیص مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر اساس روش های مرسوم یا فنوتیپی است. به دلیل عدم توسعه برخی از عوامل، این روش ها برای تشخیص تعدادی از مقاومت های دارویی بسیار دشوار یا غیر ممکن است. با ظهور تکنیک های مولکولی، ارزش تشخیص دارویی مایکوباکتریوم ها تحت تاثیر قرار گرفته است. هدف از این مطالعه مقایسه روش های جدید و قدیمی در تعیین مقاومت دارویی مایکوباکتریوم ها می باشد. طی یک مطالعه توصیفی مقطعی در سال‌های ۱۴۰۲-۱۴۰۰، کلیه نمونه‌های خلط اسمیر مثبت که کشت و آنتی‌بیوگرام آنها در آزمایشگاه ملی سل مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان مسیح دانشوری تهران انجام شد، وارد مطالعه شدند. چک لیست های تهیه شده تکمیل شد. سپس با استفاده از نرم افزار SPSS میزان مقاومت و عوامل موثر بر آن بررسی شد. در این مطالعه میزان مقاومت به داروهایی مانند ایزونیازید ۶ درصد، ریفامپین ۵ درصد، اتامبوتول ۱۰/۰۴ درصد، استرپتومایسین ۱۲/۰۵ درصد، ایزونیازید و ریفامپین (MDR tuberculosis) ۸ درصد بود. میزان بروز مقامت با دو عامل عود و مثبت بودن اسمیر از نظر آماری رابطه نزدیک به معنی داری داشت. نتیجه کشت ۴۰ درصد از کل نمونه ها، مایکوباکتریوم غیر سلی بود. روش‌های تشخیصی سنتی مانند ویژگی‌های فنوتیپی، شیمیایی و سرولوژیکی هنوز برای تشخیص مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شوند. علاوه بر تشخیص مقاومت دارویی، روش‌های مولکولی مختلف می‌توانند فاکتورهای مقاومت دارویی و ژن‌های مقاومت ضد میکروبی را با درجه، حساسیت و دقت بالاتری شناسایی کنند. به نظر می رسد روش های مولکولی پیشرفته

می تواند زمان تشخیص، میزان مرگ و میر و هزینه های تشخیص آزمایشگاهی را کاهش دهد و طول مدت بستری را کوتاه کند.

کلمات کلیدی: مقاومت دارویی، مایکوباکتریوم، سل مقاوم به چند دارو

Comparison of new and old methods in determining the drug resistance of mycobacteria

Jafar Aghajani1, Parissa Farnia1*, Saman Ayoubi1, Poopak Farnia1,2, Jalaledin Ghanavi1, Ali Akbar Velayati1

1- Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Parissa Farnia

Abstract.

Diagnosis of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis is based on conventional or phenotypic methods. Due to the lack of development of some agents, these methods are very difficult or impossible to detect a number of drug resistances. With the advent of molecular techniques, the diagnosis of the medicinal value of mycobacteria has been affected. The purpose of this study is to compare new and old methods in determining the drug resistance of mycobacteria. During a descriptive cross-sectional study in 1400-1402, all smear-positive sputum samples whose culture and antibiogram were performed in the National Tuberculosis Laboratory of the Research Center for Tuberculosis and Pulmonary Diseases, Masih Daneshvari Hospital, Tehran, Iran, were included in the study. The prepared checklists were completed. Then, using SPSS software, the level of resistance and the factors affecting it were checked. In this study, the resistance rate to drugs such as isoniazid 6%, rifampin 5%, ethambutol 10.04%, streptomycin 12.05%, isoniazid and rifampin (MDR tuberculosis) was 8%. Incidence of maqamat with two factors of recurrence and smear positivity had a statistically close to significant relationship. The culture result of 40% of all samples was non-tuberculous mycobacterium. Traditional diagnostic methods such as phenotypic, chemical, and serological characteristics are still used to detect drug resistance in mycobacteria. In addition to drug resistance detection, different molecular methods can detect drug resistance factors and antimicrobial resistance genes in a higher degree, sensitivity and accuracy. It seems that advanced molecular methods can reduce the time of diagnosis, the mortality rate and the costs of laboratory diagnosis and shorten the length of hospitalization.

Keywords: drug resistance, mycobacteria, MDR tuberculosis

بررسی ژن QUB4156C در بیماران مبتلا به سل نهفته

جعفر آقاجانی[۱]، پریسا فرنیا[۱*]، سامان ایوبی[۱]، پوپک فرنیا[۲،۱]، جلال الدین غنوی[۱]، علی اکبر ولایتی[۱]

۱- مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

سمت و ایمیل نویسنده مسئول : پریسا فرنیا، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
P.farnia1@gmail.com

چکیده

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) عامل اصلی سل است که علت اصلی مرگ و میر ناشی از یک عامل عفونی در سراسر جهان است. سازمان بهداشت جهانی تخمین می زند که سالانه حدود هشت میلیون نفر در جهان به سل فعال مبتلا می شوند و نزدیک به دو میلیون نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می دهند. از هر ۱۰ نفر مبتلا به MTB یک نفر ممکن است در طول زندگی خود به عفونت سل فعال مبتلا شود. هدف از این مطالعه بررسی ژن QUB4156C در بیماران مبتلا به سل نهفته است. بدین منظور ۱۰۲ نمونه از بیماران مبتلا به سل نهفته مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع ملی بیمارستان مسیح دانشوری پس از اخذ پرسشنامه و رضایت نامه وارد مطالعه شدند. مایکوباکتریوم با روش های میکروبی و بیوشیمیایی جدا و شناسایی شد. سپس سویه ها از نظر وجود ژن QUB4156C با روش PCR-RFLP مورد ارزیابی قرار گرفتند. سل نهفته برای آزمایش PPD مثبت بود. نتایج آزمایش PCR نشان داد که ۶۶,۶۷ درصد افراد عادی از نظر ژن حدت QUB4156C در بین ۱۰۲ نمونه نهفته بررسی شده مثبت بودند. ژن QUB4156C از جمله ژن های ضروری است. با توجه به نتایج به دست آمده و اهمیت کلی QUB4156C و ارتباط آن با بروز سل فعال در افراد مبتلا به سل نهفته، مطالعه کامل تری در این زمینه ضروری به نظر می رسد.

کلمات کلیدی: ژن QUB4156C، سل نهفته، ژن های ضروری

Examination of QUB4156C gene in patients with latent tuberculosis

Jafar Aghajani1, Parissa Farnia1*, Saman Ayoubi1, Poopak Farnia1,2, Jalaledin Ghanavi1, Ali Akbar Velayati1

1- Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Parissa Farnia

Abstract.

Mycobacterium tuberculosis (MTB) is the main cause of tuberculosis, which is the leading cause of death from an infectious agent worldwide. The World Health Organization estimates that about eight million people in the world are infected with active tuberculosis every year and nearly two million people die from this disease. 1 in 10 people infected with MTB may develop active TB infection during their lifetime. The aim of this study is to investigate the QUB4156C gene in patients with latent tuberculosis. For this purpose, 102 samples of patients referred to the National Reference Laboratory of Masih Daneshvari Hospital suffering from latent tuberculosis were prepared after obtaining a questionnaire and a consent form. Mycobacterium was isolated and identified by microbial and biochemical methods. Then the strains were evaluated for the presence of QUB4156C genes by PCR-RFLP method. Latent tuberculosis was positive for PPD tests. The results of the PCR test showed that 66.67% of the normal individuals were positive for the QUB4156C virulence gene among the 102 latent cells examined. QUB4156C gene is among essential genes. Considering the obtained results and the general importance of QUB4156C and its relationship with the development of active tuberculosis in people with latent tuberculosis, a more complete study in this field seems necessary.

Keywords: QUB4156C gene, latent tuberculosis, essential genes

طراحی Allele-specific PCR برای غلبه بر مشکلات PCR-RFLP در سرعت تشخیص مایکوباکتریوم

جعفر آقاجانی[۱]، پریسا فرنیا[۱]، سامان ایوبی[۱]، پوپک فرنیا[۲،۱*]، جلال الدین غنوی[۱]، علی اکبر ولایتی[۱]

۱- مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

سمت و ایمیل نویسنده مسئول : پوپک فرنیا ، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. farniapoopak@gmail.com

چکیده

در این مطالعه، یک روش مولکولی برای تشخیص سریع مقاومت دارویی در ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر اساس PCR اختصاصی آلل (**Allele-specific PCR**) طراحی و مقایسه شد.100 ایزوله بالینی M. tuberculosis، ۴۰ سویه برای مقایسه تشخیص جهش های مرتبط با مقاومت در ژن gyrA با PCR اختصاصی آلل (PCR-RLFP) استفاده شد. پرایمرهای داخلی ویژه ای برای تشخیص هرگونه تغییر در کدون های ۹۰، ۹۱ و ۹۴ طراحی شدند. برای ارزیابی نتایج به عنوان استاندارد طلایی از روش توالی یابی استفاده شد. روش‌های PCR اختصاصی آلل (Allele-specific PCR) می‌توانند جهش‌ها را با تشکیل یا عدم وجود مرزهای داخلی تشخیص دهند. PCR-RFLP با مکانیسم مشابهی به خوبی کار می کند. در مجموع از ۲۰ سویه مقاوم به دارو از نظر فنوتیپ، ۱۰ سویه جهش یافته و ۵ سویه غیرجهش یافته بودند که به ترتیب دارای حساسیت و ویژگی ۸۶/۱۱ و ۱۰۰ درصد بودند. نتایج توالی یابی با نتایج روش های مولکولی مطابقت داشت. نتایج مطالعه نشان داد که روش‌های PCR اختصاصی آلل (Allele-specific PCR) می‌تواند به عنوان یک آزمایش معمول برای تشخیص سریع مقاومت دارویی در M. tuberculosis استفاده شود.

کلمات کلیدی: طراحی PCR اختصاصی آلل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR-RFLP

Allele-specific PCR design to overcome the problems of PCR-RFLP in the detection speed of mycobacteria

Jafar Aghajani[1], Parissa Farnia[1], Saman Ayoubi[1], Poopak Farnia[1,2*], Jalaledin Ghanavi[1], Ali Akbar Velayati[1]

1- Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Poopak Farnia

Abstract

In this study, a molecular method for rapid detection of drug resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis based on Allele-specific PCR was designed and compared. 100 clinical isolates of M. tuberculosis, 40 strains were used to compare the detection of resistance-related mutations in the gyrA gene with Allele-specific PCR (PCR-RLFP). Specific internal primers were designed to detect any changes in codons 90, 91 and 94. Sequencing methods were used to evaluate the results as the gold standard. Allele-specific PCR (PCR-RLFP) methods can detect mutations with the formation or absence of internal borders. PCR-RFLP works well with a similar mechanism. In total, out of 20 drug-resistant strains in terms of phenotype, 10 were mutated and 5 were non-mutated, which had sensitivity and specificity of 86.11 and 100%, respectively. The sequencing results were consistent with the results of the molecular methods. The results of the study showed that Allele-specific PCR (PCR-RLFP) methods can be used as a routine test for rapid detection of drug resistance in M. tuberculosis.

Keywords: Allele-specific PCR design, Mycobacterium tuberculosis, PCR-RFLP

بررسی گروه ژنتیکی PGG و تجزیه و تحلیل ژنتیکی آن در مایکوباکتریوم

جعفر آقاجانی[۱]، پریسا فرنیا[۱]، سامان ایوبی[۱]، پوپک فرنیا[۲،۱*]، جلال الدین غنوی[۱]، علی اکبر ولایتی[۱]

۱- مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی (MRC)، پژوهشکده ملی سل و بیماری‌های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

سمت و ایمیل نویسنده مسئول : پوپک فرنیا ، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. farniapoopak@gmail.com

چکیده

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می تواند باعث عفونت ریوی، لنفاوی، پوست و بافت نرم در انسان شود. با بررسی گروه های ژنتیکی PGG می توانیم این گروه از باکتری ها را شناسایی کنیم. هدف از این مطالعه بررسی گروه ژنتیکی PGG و تجزیه و تحلیل ژنتیکی آن در مایکوباکتریوم ها می باشد. برای انجام این مطالعه، ابتدا توالی گروه های ژنتیکی PGG برای ۴ سویه مایکوباکتریومی از پایگاه های داده NCBI(مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی) و RDP(پروتکل دسکتاپ از راه دور) به دست آمد. سپس این توالی ها توسط نرم افزار CustalW تراز شدند و درخت فیلوژنیک با استفاده از برنامه MEGA5 ترسیم شد. بر اساس نتایج، الگوی شناسایی و تمایز هر ژن متفاوت بود. ژن SrRNA۱۶ قادر به شناسایی و افتراق مایکوباکتری های بیماری زا نبود. به طور کلی، ژن PGG بهتر از سایر ژن ها عمل کرد. برای شناسایی کامل و صحیح مایکوباکتریوم ها، گروه های ژن PGG باید به طور همزمان مورد مطالعه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: گروه ژنتیکی PGG، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم

Investigation of PGG genetic group and its genetic analysis in mycobacteria

Jafar Aghajani[1], Parissa Farnia[1], Saman Ayoubi[1], Poopak Farnia[1,2*], Jalaledin Ghanavi[1], Ali Akbar Velayati[1]

1- Mycobacteriology Research Center (MRC), National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2-Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Poopak Farnia

Abstract.

Mycobacterium tuberculosis can cause pulmonary, lymphatic, skin and soft tissue infections in humans. We can identify this group of bacteria by examining PGG genetic groups. The purpose of this study is to investigate the PGG genetic group and its genetic analysis in mycobacteria. To conduct this study, first, the sequences of PGG genetic groups for 4 mycobacterial strains were obtained from NCBI (National Center for BiotechnologyInformation) and RDP (RemoteDesktopProtocol) databases. Then these sequences were aligned by CustalW software and the phylogenic tree was drawn using MEGA5 program. Based on the results, the pattern of identification and differentiation of each gene was different. 16SrRNA gene was not able to identify and differentiate pathogenic mycobacteria. In general, the PGG gene performed better than the other genes. In order to fully and correctly identify mycobacteria, PGG gene groups should be studied simultaneously.

Keywords: PGG genetic group, Mycobacterium tuberculosis, mycobacteria

ناقل های انتقال ژن غیر ویروسی: در مورد کاربرد گلوکوکورتیکواستروئیدها به عنوان ترکیب های افزایشی

فرشته کیوانی[۱]، مهدی رضایی[۲،۱] ، سید عباس میرزایی[۲،۱]

۱ گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین ، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

به دلیل پتانسیل بالا در درمان بسیاری از بیماری ها (به ویژه بیماری های مقاوم به درمان)، ژن درمانی یک رویکرد نوظهور در علوم پزشکی و دارویی است. با توجه به ماهیت آسیب پذیر اسیدهای نوکلئیک (NA) در محیط فیزیولوژیکی، قدرت آنها به طور اساسی تحت تأثیر سیستم های تحویل آنها قرار می گیرد که هم به عنوان محافظ و هم به عنوان ناقل عمل می کنند. بنابراین، سیستم های مختلف انتقال ژن غیر ویروسی و ویروسی توسعه یافته است. اگرچه عوامل ویروسی راندمان انتقال NA بالایی دارند، اما استفاده از آنها تا کنون مشکلات زیادی مانند پاسخ‌های ایمونولوژیک و مرگ به دلیل ماهیت آنها ایجاد کرده است. برای غلبه بر مشکلات ایمنی ناقل‌های ویروسی، چندین سیستم انتقال ژن در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی توسعه داده شده‌اند که در میان آنها امیدوارکننده‌ترین سیستم‌ها حامل‌های ژن غیر ویروسی مبتنی بر پلیمرهای کاتیونی(CPs) ، لیپیدها و دندریمرها هستند. سیستم های تحویل غیر ویروسی دارای مزایایی مانند: طراحی منطقی، تولید آسان، سمیت کمتر و عدم خطر عفونت هستند. حامل های مناسبی که از NAs در برابر تخریب آنزیمی محافظت می کنند، زمان گردش خون را پس از تجویز سیستمیک طولانی می کنند و اتصال سلولی و درونی سازی را برای تولید محصولات مبتنی بر NA تسهیل می کنند. بنابراین توجه زیادی به استفاده از سیستم های حامل غیر ویروسی مبتنی بر لیپیدها و پلیمرهای کاتیونی شده است. ناقل های غیر ویروسی با موانع متعدد خارج سلولی و درون سلولی مواجه می شوند که انتقال محموله ژنتیکی به هسته سلول های هدف را محدود می کند. چالش برانگیزترین مرحله برای بیان ژن، محلی سازی هسته NA هدف برای رونویسی به RNA هدف است، زیرا موانع دیگر از جمله غشای پلاسمایی (جذب سلولی) و فرار آندوزومی می توانند توسط پلیمرهای کاتیونی (پلی اتیلنمین) و لیپیدها از طریق برهم کنش با بار منفی غلبه کنند. مولکول ها بر روی غشای سلولی و اثر اسفنج پروتون به ترتیب. به منظور انتقال NAs از سیتوزول به هسته، از برخی پپتیدهای محلی سازی هسته ای و برخی از مواد با گیرنده های هسته ای مانند گلوکوکورتیکوئیدها استفاده شده استGC .های مصنوعی بر اساس ساختار کورتیزول (هیدروکورتیزون) با تغییراتی برای افزایش اثرات ضد التهابی هستند. اعمال فیزیولوژیکی و فارماکولوژیک گلوکوکورتیکوئیدها

پس از اتصال به گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی (GR) انجام می شود که عضوی از خانواده گیرنده های هسته ای فاکتورهای رونویسی وابسته به لیگاند است. تعامل با این گیرنده باعث گسترش کمپلکس منافذ هسته ای (NPC)تا قطر ۶۰ نانومتر و جابجایی هسته ای مجتمع لیگاند/گیرنده می شود. از این خاصیت به خوبی استفاده شده و انواع مختلفی از حامل های غیر ویروسی از جملهCP ، لیپیدها و دندریمرها طراحی شده است که باعث افزایش ترانسفکشن این نانوحامل ها شده است. از سوی دیگر، ماهیت ضد التهابیGC ها باعث کاهش سمیت نانوحامل ها و در نتیجه افزایش کارایی ژن درمانی می شود. بنابراین، در این مطالعه، انواع مختلفGC هایی که در این زمینه مورد استفاده قرار گرفته‌اند و پارامترهای نقش کلیدی آن‌ها که بر قدرت آن‌ها تأثیر می‌گذارد، بررسی می‌شوند.

کلمات کلیدی: ژن درمانی، حامل های انتقال ژن غیر ویروسی، گلوکوکورتیکواستروئیدها

Non-viral gene delivery vectors: regarding the applications of glucocorticosteroids as adducts

Fereshteh Keyvani[1], Mehdi Rezaee[1, 2], Seyed Abbas Mirzaei[1, 2]

[1]Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

[2]Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Abstract

Owing to high potential in the treatment of many diseases (especially refractory ones), gene therapy is an emerging approach in medical and pharmaceutical sciences. Considering the vulnerable nature of nucleic acids (NA) in physiological milieu, their potency is crucially affected by their delivery systems which act as both protectant and vector. Thus, various non-viral and viral gene transfer systems have been developed. Although viral agents have high NA transmission efficiency, their usage has caused many problems hitherto such as immunological responses and death due to their nature. To overcome the safety problems of viral vectors, several gene transfer systems have been developed *in vitro* and *in vivo*, among which the most promising systems are non-viral gene carriers based on cationic polymers (CPs), lipids, and dendrimers. Non-viral delivery systems have some advantages such as: rational design, easy production, less toxicity and no risk of infection. Suitable carriers that protect NAs from enzymatic degradation, prolong circulation time after systemic administration, and facilitate cellular binding and internalization to produce NA-based products. Therefore, much attention has been paid to the use of non-viral carrier systems based on lipids and cationic polymers. Non-viral vectors encounter multiple extracellular and intracellular barriers that limit the transfer of genetic cargo to the nucleus of target cells. The most challenging step for gene expression is nucleus localization of target NA to transcribe to target RNA because the other barriers including plasma membrane (cellular uptake) and endosomal escape could be prevailed upon by cationic polymers (polyethylenimine) and lipids through interacting with the negatively charged molecules on the cell membrane and proton sponge effect, respectively. In order to transport NAs from the cytosol to the nucleus, some nuclear localization peptides and some substances with nuclear receptors like glucocorticoids have been used. Synthetic GCs are based on the structure of cortisol (hydrocortisone) with modifications to enhance anti-inflammatory effects. The physiological and pharmacological actions of glucocorticoids are performed after binding to the glucocorticoid receptor (GR), which is a member of the nuclear receptor family of ligand-dependent transcription factors. Interaction with this receptor causes expansion of the nuclear pore complex (NPC) up to 60 nm in diameter and nuclear translocation of the ligand/receptor complex. This property has been well used and various types of non-viral carriers including CPs, lipids and dendrimers have been designed, which has increased the transfection of these nanocarriers. On the other hand, the anti-inflammatory nature of GCs reduces the toxicity of nanocarriers and thus increases the efficiency of gene therapy. Therefore, in this study, various types of GCs which had been used in this field and their key role parameters, influencing their potency, are reviewed.

Keywords: Gene therapy, Non-viral gene delivery vectors, Glucocorticosteroids

مشخصات بالینی و آزمایشگاهی کودکان مبتلا به کووید-۱۹ شدید و غیر شدید: مطالعه گذشته نگر در کرمانشاه، غرب ایران

رویا چگنه لرستانی[۱]، سمیه جعفری[۲]، فاطمه نعمتی زرگران[۳]، مصیب رستمیان [۴]، سعید علیمرادی[۵]، شهاب رضائیان[۶]، عترت جوادی راد[۷]، هاجر معتمد[۸]، الهام رستمی[۹]، کیقباد قدیری[۱۰]

[۱] کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل:lorestani25@gmail.com

[۲] کارشناس ارشد میکروبیولوژی پزشکی، مرکز توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.ایمیل: bartar2004@yahoo.com

[۳] کارشناس ارشد ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، پژوهشکده سلامت ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل: nematif92@gmail.com

[۴] استادیار گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، موسسه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل:mosayeb.rostamian@gmail.com

[۵] کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی، مرکز توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان طالقانی و امام علی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران. ایمیل:sdalimoradi@gmail.com

[۶] استادیار گروه اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، پژوهشکده سلامت ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل:shahab.rezayan@gmail.com

[۷] استادیار پاتولوژی، مرکز توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان‌های امام خمینی و محمد کرمانشاهی و فارابی و امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل: pathologist84@yahoo.com

[۸] استادیار پاتولوژی، گروه آسیب شناسی، بیمارستان کودکان دکتر محمد کرمانشاهی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل: motamedhajar@gmail.com

[۹] کارشناسی ارشد پرستاری، مرکز توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان‌های امام خمینی و محمد کرمانشاهی و فارابی و امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

[۱۰] استاد بیماری های عفونی کودکان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، موسسه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل:k_ghadiri@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: این مطالعه با هدف مقایسه یافته‌های اپیدمیولوژیک،بالینی، آزمایشگاهی بین کودکان مبتلا به کووید-۱۹ شدید و غیر شدید در شهر کرمانشاه انجام شد.

روشها: این مطالعه بر روی ۵۰۰ کودک مبتلا به کووید ۱۹ بستری در بیمارستان‌های محمد کرمانشاهی شهر کرمانشاه انجام شد. تایید کووید-۱۹ در کودک از طریق آزمایش RT-PCR ترشحات تنفسی، یافته‌های مثبتی برای COVID-19 نشان دادند. سوابق پزشکی بررسی شد و اطلاعات مربوط به مشخصات دموگرافیک، بیماری‌های زمینه‌ای، .تظاهرات بالینی، یافته‌های آزمایشگاهی و تصاویر سی‌تی قفسه سینه همگی از پرونده‌های پزشکی الکترونیکی و کاغذی استخراج شد. بیماران از نظر شدت بیماری به سه گروه تقسیم شدند. یافته های آزمایشگاهی و بالینی بین گروه ها باهمدیگر مقایسه گردید. سپس داده ها توسط روشهای آماری تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: از ۵۰۰ بیمار،۲۸۶ بیمار(57.2%) پسر و ۲۱۴ بیمار (42.8%)دختر بودند. میانگین سنی بیماران 3.85±4.48 سال بود. ۳۲۱(64.2%) بیمار مبتلا به کووید ۱۹ و ۱۷۹(۳۵,۸٪) بیمار مبتلا به MIS-C بودند. میانگین سنی بیماران مبتلا به کووید-۱۹، 3.85±4.48 و بیماران مبتلا به MIS-C، 3.1±3.5 بود. تب، سرفه و اختلال قلبی شایع ترین علائم به ترتیب در بیماران مبتلا به کووید ۱۹ و MIS-C بود. از نظر شدت بیماری، ۲۴۶(76.6%) بیماری خفیف، ۱۹(5.9%) بیماری متوسط و ۵۶(۱۷,۴٪) بیماری شدید داشتند. در بیماران شدید، میانگین تعداد WBC بالاتر، میانگین تعداد لنفوسیتها کمتر و میانگین سنی بیماران کمتر و بیشتر آنها دیسترس تنفسی داشتند. در بیماران خفیف بیشتر سرفه، اسهال و استفراغ مشاهده شد.

بحث: نتایج مطالعه ما نشان داد فاکتورهای آزمایشگاهی همچون تعداد WBC، تعداد لنفوسیت، یافته های CT ، دیسترس تنفسی، سرفه، اسهال و استفراغ می توانند برای ارزیابی شدت بیماری کووید-۱۹ در کودکان مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: کووید-۱۹، کودکان، یافته‌های آزمایشگاهی

Clinical and laboratory characteristics of children with severe and non-severe COVID-19: a retrospective study in Kermanshah, west of Iran

Roya Chegene Lorestani1, Somayeh Jafari[2], Fatemeh Nemati Zargaran[3], Mosayeb Rostamian [4,] Saeed Alimoradi[5], Shahab Rezaeian[6], Etrat Javadirad[7], Hajar Motamed[8], Elham Rostami[9], Keyghobad Ghadiri[10]

[1]MSc Medical Microbiology, Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email:lorestani25@gmail.com

[2]Assistant Professor of pathology, Clinical Research Development Center, Imam Reza Hospitals, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email: bartar2004@yahoo.com

[3]MSc of Medical Genetic, Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email: nematif92@gmail.com

[4]Assistant Professor of Biotechnology, Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email:mosayeb.rostamian@gmail.com

[5]MSc of Medical Parasitology, Clinical Research Development Center, Taleghani and Imam Ali Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah,Iran. sdalimoradi@gmail.com

[6]Assistant Professor of Epidemiology, Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email:shahab.rezayan@gmail.com

[7] Assistant Professor of pathology, Clinical Research Development Center, Imam Khomeini and Mohammad Kermanshahi and Farabi and Imam Reza Hospitals, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email:pathologist84@yahoo.com

[8] Assistant Professor of pathology, Department of Pathology, Dr. Mohammad Kermanshahi Children's Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email:-motamedhajar@gmail.com

[9]MSc of Nursing, Clinical Research Development Center, Imam Khomeini and Mohammad Kermanshahi and Farabi and Imam Reza Hospitals, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

[10]Professor of Pediatric Infectious Disease, Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email:k_ghadiri@yahoo.com

Address correspondence: Keyghobad Ghadiri, Infectious Diseases Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences Kermanshah, Iran;, P.O. Box: 6714415333, Tel/Fax: 0884262252; E-mails: k_ghadiri@yahoo.com

Abstract

Background and Aims: The study aimed to collect and compare clinical and laboratory findings of children with severe and non-severe COVID-19 in Kermanshah City, located in the west of Iran.

Methods: The study was conducted on 500 children with COVID-19 hospitalized in Mohammad-Kermanshahi Hospital in Kermanshah City. Pediatric COVID-19 was confirmed by RT-PCR test using respiratory secretion samples. Medical records were reviewed and information related to demographic characteristics, underlying diseases, clinical manifestations, laboratory findings, and chest computed tomography (CT) scans were all extracted from electronic and paper records. Patients were divided into three groups according to the severity of the disease: mild, moderate, and severe. Clinical and laboratory findings were compared between the groups and the collected data were analyzed by statistical methods.

Results: Out of 500 patients, 286 were boys and 214 were girls. Of the patients, 321 cases were only COVID-19, while 179 patients were diagnosed as Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) positive. The average age of COVID-19 patients was 3.85 ±4.48 and of MIS-C patients was 3.1±3.5. In order, fever, cough, and heart disorders were the most common symptoms in patients with COVID-19 and MIS-C, respectively. In terms of disease severity, 246 patients had mild disease, 19 patients had moderate disease, and 56 patients had severe disease. In severe patients, the average number of white blood cells (WBC) was higher, while the average number of lymphocytes was lower. Also, in these patients, the average age was lower, and most of them had respiratory distress. In mild patients, often cough, diarrhea, and vomiting were observed.

Conclusion: The results of our study showed that laboratory factors such as WBC count, lymphocyte count, CT findings, Respiratory distress, cough, diarrhea and vomiting can be used to evaluate the severity of COVID-19 in children.

Keyword: COVID-19, Children, Laboratory findings

شیوع آکانتامبا در منابع آب و خاک ایران: سیستماتیک رویو و متاآنالیز

رویا چگنه لرستانی[۱]، کیقباد قدیری[۲]، سمیه جعفری[۳]، سعید علیمرادی[۴]، آرزو بزرگ امید[۵]

[1]کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل: lorestani25@gmail.com

[2]استاد عفونی اطفال، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی، پژوهشکده سلامت ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل: k_ghadiri@yahoo.com

[3]کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، مرکز توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل: bartar2004@yahoo.com

[4]کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی، مرکز توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان طالقانی و امام علی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل:sdalimoradi@gmail.com

[5]استادیار گروه انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، پژوهشکده سلامت ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ایمیل: arezoobozorgomid@yahoo.com

آدرس مکاتبه: آرزو بزرگ امید، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران؛ کد پستی: ۶۷۱۴۴۱۵۳۳۳ تلفن/فکس: ۰۸۸۴۲۶۲۲۵۲; ایمیل: arezoobozorgomid@yahoo.com

چکیده

گونه های آکانتامبا آمیب زنده آزاد هستند که معمولاً در منابع محیطی مانند آب، خاک و هوا پراکنده اند. این آمیب ها که در همه جا حاضر هستند عامل ایجاد کراتیت آمیبی و آنسفالیت کشنده هستند .هدف از این مطالعه مروری و متاآنالیز سیستماتیک، بررسی شیوع و ژنوتیپ گونه های آکانتامبا جدا شده از منابع مختلف آب و خاک در ایران بود.

مواد و روش‌ها: مطالعات منتشر شده در مورد شیوع گونه‌های آکانتامبا از منابع مختلف آب و خاک در ایران در MEDLINE/PubMed ، ScienceDirect، Web of Science، Scopus، Google Scholar، SID،

Magiranو IranDoc و فهرست‌های رفرنس مقالات بازیابی شده تا اول فروردین ۱۴۰۲ جستجو شد. مطالعات واجد شرایط با استفاده از معیارهای ورود و خروج انتخاب شدند. داده های استخراج شده با استفاده از فراتحلیل اثر تصادفی و تجزیه و تحلیل شدند

نتایج: برای این متاآنالیز، در مجموع ۷۶ مطالعه واجد شرایط ورود به مطالعه بودند. شیوع جهانی ایزوله های آکانتامبا از منابع مختلف آب و خاک ۳۸٪ (۹۵٪ فاصله اطمینان: ۴۳-۳۳٪) تخمین زده شد که در منابع خاک ۴۴٪ (۹۵٪ فاصله اطمینان: ۵۹-۲۹٪) نسبت به منابع آب شیوع بیشتری دارد ۳۷٪ (۹۵٪ فاصله اطمینان: ۴۲-۳۱٪) .نتایج ژنوتیپ ایزوله های آکانتامبا نشان داد که T4 سویه غالب در ایران است .همچنین سایر ژنوتیپ‌هایT2 ، T3، T4، T5، T6، T11، T13، T15، T3/T4، T2/T6، T4/T15وT4/T2/T6 در نمونه‌های محیطی به دست آمد

نتیجه گیری: این مطالعه یک مطالعه مروری سیستماتیک و متاآنالیز به روز شده درباره ی شیوع و فراوانی ژنوتیپ آکانتامبا در منابع مختلف زیست محیطی ایران بود .آگاهی از توزیع گسترده آکانتامبا سویه T4 در منابع محیطی می تواند به پزشکان در مدیریت بیماران و افراد مستعد در ایران کمک کند

واژه‌های کلیدی: آکانتامبا، آب، ژنوتیپ، خاک، مرور سیستماتیک، ایران

Prevalence of Acanthamoeba in water and soil sources of Iran: systematic review and meta-analysis

Roya Chegene Lorestani[1], Keyghobad Ghadiri[2], Somayeh Jafari[3], Saeed Alimoradi[4], Arezoo Bozorgomid[5]

[1]MSc Medical Microbiology, Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
Email:lorestani25@gmail.com
[2]Professor of Pediatric Infectious Disease, Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
Email:k_ghadiri@yahoo.com

[3]MSc Microbiology, Clinical Research Development Center, Imam Reza Hospitals, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email: bartar2004@yahoo.com

4MSc of Medical Parasitology, Clinical Research Development Center, Taleghani and Imam Ali Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah,Iran. sdalimoradi@gmail.com

5Assistant Professor of Parasitology, Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email: arezoobozorgomid@yahoo.com

Address correspondence: Arezoo Bozorgomid, Infectious Diseases Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences Kermanshah, Iran;, P.O. Box: 6714415333, Tel/Fax: 0884262252; E-mails: arezoobozorgomid@yahoo.com

Abstract

Background: *Acanthamoeba* spp. is free-living amoebae commonly distributed in the environmental sources such as water, soil, and air. This ubiquitous amoeba is the causative agent of amoebic keratitis and fatal encephalitis. The aim of this systematic review and meta-analysis was to investigate the prevalence and genotyping of *Acanthamoeba* spp isolated from different water and soil sources in Iran.
Methods: Published studies on the prevalence of *Acanthamoeba* spp from different water and soil sources in Iran were searched in the MEDLINE/PubMed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus, Google Scholar, SID, Magiran, and IranDoc the reference lists of the retrieved articles until February 20, 2023. The eligible studies were selected using inclusion and exclusion criteria. The extracted data were verified and analyzed using the random-effect meta-analysis.

Result: For this meta-analysis, 76 eligible studies were included. The global prevalence of *Acanthamoeba* spp from different water and soil sources was estimated at 38% (95%CI, 33–43%), with more prevalent in water sources (37%, 95%CI 31–42%) than in soil sources (44%, 95% CI: 29–59). The genotyping results of the *Acanthamoeba* isolates showed that T4 was a predominant strain in Iran. In addition, other genotypes, T2, T3, T4, T5, T6, T11, T13, T15, mixed T3/T4, mixed T2/T6, mixed T4/T15 and mixed T4/T2/T6 were obtained in the environmental samples of Iran.

Conclusion: This study was an updated systematic review and meta-analysis of *Acanthamoeba* prevalence and genotyping in different environmental sources of Iran. Knowledge about wide distribution of *Acanthamoeba* T4 in the environmental sources may help physicians to manage the patients and susceptible persons in Iran.

Keywords: *Acanthamoeba*, water, genotype, soil, systematic review, Iran

ارتباط پلی مورفیسم G894T موجود در ژن اندوتلیال نیتریک اکساید سنتاز با ریسک ابتلا به پره اکلامپسی

محمد کریمیان[1*]، سحر یعقوبی[1]، زهرا کریمیان[2]

۱ گروه زیست شناسی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲ گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. آدرس ایمیل: mdkarimian@gmail.com

چکیده

پره اکلامپسی (PE) یکی از علل اصلی مرگ و میر مادر در سراسر جهان است و شامل اختلال عملکرد اندوتلیال عروقی است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم G894T موجود در ژن اندوتلیال نیتریک اکساید سنتاز (eNOS) با ریسک ابتلا به پره اکلامپسی می باشد. در یک مطالعه مورد-شاهدی، ۳۰۰ نفر شامل ۱۳۵ زن باردار مبتلا به پره اکلامپسی و ۱۶۵ زن باردار سالم وارد مطالعه شدند. پس از جمع آوری نمونه های خون از افراد شرکت کننده در مطالعه، ژنوم آنها توسط یک کیت تجاری استخراج DNA، ایزوله شد. ژنوتیپ پلی مورفیسم G894T با روش PCR-RFLP تعیین شد. داده های ما نشان داد که ژنوتایپ TT از پلی مورفیسم G894T با افزایش خطر پره اکلامپسی مرتبط است (OR= 3.23, 95%CI= 1.09-9.53, P= 0.034). اما ژنوتایپ CT و همچنین آلل T با ریسک ابتلا به پره اکلامپسی ارتباط نداشت. بر اساس نتایج، پلی مورفیسم فوق ممکن است یک عامل خطر برای پره اکلامپسی باشد و می تواند یک بیومارکر مولکولی بالقوه برای غربالگری افراد مستعد در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: پره اکلامپسی، eNOS، پلی مورفیسم ژنتیکی، PCR-RFLP

The relationship between the G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of preeclampsia

Mohammad Karimian[1*], Sahar Yaqubi[1], Zahra Karimian[2]

[1]Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
[2]Department of Midwifery, Faculty of Nursing and Midwifery, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

***Corresponding author:** Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416-95447, Iran. E-mail address: mdkarimian@gmail.com

Abstract

Preeclampsia (PE) is a leading cause of maternal mortality worldwide and involves vascular endothelial dysfunction. The aim of this study is to investigate the relationship between the G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and the risk of preeclampsia. In a case-control study, 300 people including 135 pregnant women with preeclampsia and 165 healthy pregnant women were included in the study. After collecting blood samples from study participants, their genomes were isolated by a commercial DNA extraction kit. The genotype of G894T polymorphism was determined by the PCR-RFLP method. Our data showed that the TT genotype of G894T polymorphism is associated with an increased risk of preeclampsia (OR=3.23, 95%CI=1.09-9.53, P=0.034). However, the CT genotype and the T allele were not associated with the risk of preeclampsia. Based on the results, the above polymorphism may be a risk factor for preeclampsia and can be considered a potential molecular biomarker for screening susceptible individuals.

Keywords: Preeclampsia; eNOS; Genetic polymorphism; PCR-RFLP

نقش انواع سلول های بنیادی در بهبود آسیب ناشی از سکته ایسکمیک مغزی

محمد کریمیان[۱*]، سحر یعقوبی[۱]

۱ گروه زیست شناسی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. آدرس ایمیل: mdkarimian@gmail.com

چکیده

سکته ی مغزی به عنوان یک اختلال چندعاملی، دومین دلیل شایع مرگ و میر و علت عمده ی ناتوانی دراز مدت است که یک سوم افراد از اختلالات عملکردی و نورولوژیکی آن رنج می برند. سکته مغزی نتیجه انسداد یا پارگی عروق خونی می باشد و تقریبا بیش از ۸۰ درصد همه موارد سکته از نوع ایسکمیک هستند که به طور معمول از انسداد شریان مغزی میانی ایجاد می شوند. یکی از رویکرد های درمانی نوین سکته مغزی ایسکمیک، استفاده از سلول های بنیادی می باشد. مطالعات متعددی به ارزیابی پتانسیل انواع مختلف سلول‌های بنیادی مانند Embryonic Stem Cells، Inducible Pluripotent Stem Cells، Neural Stem Cells و Mesenchymal Stem Cells به عنوان درمان‌هایی برای سکته مغزی ایسکمیک اختصاص یافته است. درمان با سلول های بنیادی برای سکته مغزی را می توان به طور کلی به عنوان بازسازی کننده عصبی، کاهش از دست دادن نورون های ناشی از سکته و محافظت عصبی و عمل در فاز حاد سکته برای محدود کردن گسترش آسیب تعریف کرد. درمان با سلول های بنیادی در زمینه های تحقیقاتی به عنوان یک راه بازسازی کننده امیدوارکننده برای آسیب مغزی ناشی از انواع مختلف سکته در نظر گرفته شده است. با اینحال مکانیسمهایی که توسط آن، سلول های بنیادی پیوند شده اعمال خود را انجام می دهند تا حد زیادی ناشناخته هستند.

کلمات کلیدی: سکته مغزی ایسکمیک، سلول درمانی، سلول های بنیادی، بازسازی عصبی

The role of various types of stem cells in the improvement of damage caused by cerebral ischemic stroke

Mohammad Karimian1*, Sahar Yaqubi1

1Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

*Corresponding author: Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416-95447, Iran. E-mail address: mdkarimian@gmail.com

Abstract

Stroke, as a multifactorial disorder, is the second most common cause of death and the main cause of long-term disability, that one-third of people suffering from functional and neurological disorders. Stroke is the result of blockage or rupture of blood vessels, and almost more than 80% of all stroke cases are ischemic, which are usually caused by middle cerebral artery blockage. One of the new treatment approaches for ischemic stroke is the use of stem cells. Several studies have been devoted to evaluating the potential of different types of stem cells such as Embryonic Stem Cells, Inducible Pluripotent Stem Cells, Neural Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells as treatments for ischemic stroke. Stem cell therapy for stroke can be broadly defined as neuroregenerative, reducing stroke-induced neuronal loss and neuroprotection, and acting in the acute phase of the stroke to limit the spread of damage. Stem cell therapy has been considered in research fields as a promising regenerative way for brain damage caused by various types of stroke. However, the mechanisms by which transplanted stem cells exert their effects are largely unknown.

Keywords: Ischemic stroke, Cell therapy, Stem cells, Neuroregeneration

بررسی بیان mir-587 در سرطان روده ی بزرگ

سمانه نجفی[۱*]. دکتر زیور صالحی[۲]. دکتر حمید سعیدی ساعدی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه گیلان، samane13560@gmail.com
۲. استاد/ دکتری ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳. دانشیار/ انکولوژی رادیوتراپی، گروه پزشکی داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

چکیده

سرطان کولورکتال (CRC) به رشد سرطانی در سلول های بافت پوششی روده بزرگ و راست روده اشاره دارد. مطالعات اخیر اثرات تنظیم کننده RNA های غیر کدکننده را در پاتوژنز این سرطان نشان داده است. miRNA ها گروهی از RNA های غیر کد شونده هستند که به ناحیه ی ترجمه نشده ی ۳´ mRNA های هدف متصل می شوند که منجر به تخریب یا سرکوب ترجمه ی آن ها می شود. در نتیجه تولید پروتئین و بیان ژن را کنترل می کنند. mir-587 نوعی miRNA است که دارای جایگاه ژنی 6q21 و حاوی ۱ اگزون می باشد. هدف ما در این تحقیق بررسی تغییرات بیان mir-587 در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ و مقایسه آن با افراد سالم می باشد. تشخیص اولیه بیماری توسط متخصص گوارش و تایید تشخیص بیماری توسط آسیب شناسی نمونه های بافتی انجام شد. RNA کل از ۱۰۰ نمونه خون با استفاده از TRIZol استخراج و با استفاده از UV اسپکتروفتومتر تعیین کیفیت شد. بازده RNA در محدوده تقریباً ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بود. پس از سنتز cDNA، پرایمرهای اختصاصی طراحی شدند. سپس بیان ژن مورد نظر با Real-time PCR ارزیابی شد. ژن U6 به عنوان کنترل داخلی در Real-time PCR استفاده شد. در نهایت داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار SPSS و ONE WAY ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت. ما یک افزایش قابل توجه ۱,۷۵ برابری در سطح بیان miR-587 را در بیماران مبتلا به CRC در مقایسه با گروه شاهد مشاهده کردیم (p < ۰,۰۰۰۱). در نتیجه ممکن است miR-587 در ابتلای افراد به CRC دخیل باشد.

کلمات کلیدی: سرطان کلورکتال، mir-587، بیان ژن، Real-time PCR

Analysis of *mir-587* expression in colorectal cancer

Samaneh Najafi[1*], Dr. Zivar Salehi1[2], Dr. Hamid Saidi Saedi[3]

[1]*Master's student in genetics, Guilan University, samane13560@gmail.com

[2] Professor/Ph.D. in molecular genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[3] Associate Professor/Radiotherapy Oncology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Abstract:
Colorectal cancer (CRC) refers to cancerous growth in the lining tissue cells of the colon and rectum. Recent studies have shown the effects of non-coding RNA regulation in the pathogenesis of this cancer. miRNAs are a group of non-coding RNAs that bind to the 3′ untranslated region (3′UTR) of their target mRNAs, leading to degradation or suppression of their translation; As a result, they control protein production and gene expression. One of the miRNAs is mir-587, which is located on chromosome 6q21 and contains 1 exon. In this research, our purpose is to evaluate mir-587 expression changes in patients suffering from CRC and compare them with healthy individuals. The initial diagnosis of the disease was given by a gastroenterologist and the confirmation of the disease diagnosis was done by the pathology of tissue samples. Total RNA was extracted from 100 blood samples, by TRIzol and quantified using UV-spectrophotometer. The RNA yield was in the range of approximately 50–100 ng. After cDNA synthesis, specific primers were designed. Then, intended gene expression was assessed with Real-time PCR. The *U6* gene was used as an internal control in real-time PCR. Finally, the obtained data were evaluated by SPSS software and ONE-WAY ANOVA. We observed a significant 1.75-fold increase in *miR-587* expression levels in the patients with CRC *vs* controls ($p < 0.0001$). In conclusion, this result suggested that miR-587 may confer individuals' genetic susceptibility to CRC. However, further population-based study is needed to consolidate our findings.

Keywords: colorectal cancer; mir-587; gene expression; Real-time PCR

فناوری نوین در ساخت آنزیم تجزیه کننده پلاستیک

محمد کردکتولی[1*]، سید ابولقاسم محمدی بندارخیلی[2]

۱.باشگاه پژوشگران جوان و نخبگان، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.
۲.گروه زیست شناسی، واحد گرگان ، دانشگاه آزاد اسلامی ، گرگان ، ایران .
mohammad.kordkatouli@outlook.com

چکیده

پلاستیک ها پلیمر آلی ارزان قیمت که در سالها اخیر زندگی روزمره بسیار مورد استفاده است . این در حالی هست طی تحقیقات صورت گرفته در سال ۲۰۱۹ تولید پلاستیک در جهان به ۳۶۸۰۰۰۰۰۰ تن رسیده است .با توجه به این مسئله که بیشتر پلاستیک ها مصرف شده بازیافت نمی شود بلکه به صورت مستقیم به محل دفن زباله ها در اقیانوس ها یا خشکی انتقال می یابد . از انجایی که پلاستیک با سختی زیاد تجزیه می شود،در حالی بعضی از محققان ادعا کردند که هنوز اولین پلاستیک ساخته شده بشر هنوز به صور کامل تجزیه نشده است . آلودگی های بوجود امده بسیار جبران ناپذیر بوده در حدی که باعث تغیرات اقلیمی جبران ناپذیر همچون گرم شدن زمین یا تغییرات قابل ملاحظه در خاک همچون تراکم ، رطوبت ، محتویات مغذی و میکروارگانسیم های موجود در خاک شده است. که می توانیم از کرم های به نام Zaphobas morio , Tenebrio molitorاستفاده کرد. که قابلیت تجزیه پلی استر را دارد استفاده کرد. طی مطالعات انجام شده در این مقاله مروری ضمن برسی تغییرات زیست محیطی و راهکار های برای برای تجزیه پلاستیک به وسیله مهندسی ژنتیکی بر روی آن گونه کرمها باعث تولید موثر بر تجزیه پلاستک در مجلات معتبر علمی به تجزیه تحلیل آن پرداخته شده است. در این مطالعه صورت گرفته توسط محققان به این نتیجه رسیدن که می توانن با تغییراتی در ساختار ژنتیکی آن یا میکروبیوم روده بتوانیم ساختار آنزیمی آن را تغییر داد که بتوانند پلی استر به عنوان ماده غذایی بشناسد این کار باعث می شود توسط میکروبیوم های روده انزیم تجزیه کننده ان را تولید کنند. با پشرفت های اخیر بشر هنوز موضوع الودگی زیست محیطی توسط پلاستیک مطرح هست که با این روش می توانند امیدی برای آیندگان باشد

کلمات کلیدی: پلاستیک، آنزیم،مهندسی ژنتیک، Tenebrio molitor، Zaphobas morio

New technology in making plastic degradation enzyme

Mohammad Kordkatouli[1*], Seyed Abolghasem Mohammadi Bondarkhilli[2]
1.Young Researchers and Elite Club, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
2. Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
mohammad.kordkatouli@outlook.com

Abstract

Plastics are cheap organic polymers that have become very popular in everyday life in recent years. Meanwhile, according to research done in 2019, the production of plastic in the world has reached 368,000 tons. Due to the fact that most of the used plastics are not recycled but directly sent to landfills in the oceans or on land. Finds . Since plastic is decomposed with great difficulty, some researchers claim that the first plastic made by mankind has not yet been completely decomposed. The resulting pollution has been irreparable to the extent that it has caused irreparable climatic changes such as warming the earth or significant changes in the soil such as density, humidity, nutrient contents, and microorganisms in the soil. that we can use worms called Zaphobas morio and Tenebrio molitor, which have the ability to decompose polyester. During the studies carried out in this review article, while examining the environmental changes and strategies for plastic decomposition by means of genetic engineering on those kinds of worms that cause effective production of plastic decomposition, they have been analyzed in reputable scientific journals. In this study, the researchers came to the conclusion that by making changes in its genetic structure or intestinal microbiome, we can change its enzyme structure so that it can recognize polyester as food. produce it. With the recent progress of mankind, the issue of environmental pollution by plastic is still raised, and with this method, there can be hope for future generations.

Key words: Plastic,Enzyme,Genetic Engineering, Zaphobas morio , Tenebrio molitor

تغذیه در سرطان

*آتنا کرجی بانی، سارا حسن پوری، بیتا ضامن
دانشجوی کارشناسی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.
E-mail: atena.karaji@gmail.com

مقدمه

سرطان یک مشکل عمده بهداشتی در سراسر جهان و یکی از علل اصلی مرگ و میر است. علت آن رشد کنترل نشده سلولی است که می تواند به سایر قسمت های بدن گسترش یابد .تغذیه نقش مهمی در توسعه، پیشگیری و کنترل سرطان دارد .لذا در این مقاله مروری، رابطه بین تغذیه و سرطان را بررسی خواهیم کرد.

روش کار :

این مطالعه به صورت مروری با جستجو در پایگاه های اطلاعاتی علمی مانندISC ، Pubmed، Google Scholarو Springer انجام شد .کلیه مقالات مرتبط با مراقبت های تغذیه ای در سرطان جمع آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها:

یافته‌ها نشان داد که اضافه وزن یا چاقی می تواند خطر ابتلا به انواع سرطان از جمله سرطان سینه، کولورکتال و پروستات را افزایش دهد .لذا حفظ وزن با رعایت یک رژیم غذایی سالم و فعالیت بدنی منظم می تواند در پیشگیری و کاهش خطر ابتلا به سرطان کمک کند . همچنین، درمان‌های سرطان مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌توانند عوارض جانبی مانند حالت تهوع، استفراغ و از دست دادن اشتها ایجاد کنند ..مصرف غذاهای با هضم آسان ، وعده های غذایی کوچک و مکرر می تواند به کنترل این علائم کمک کند.

نتیجه گیری:

تغذیه نقش مهمی در پیشگیری و درمان سرطان دارد .یک رژیم غذایی سالم شامل مصرف میوه، سبزیجات، غلات کامل و حبوبات می تواند خطر ابتلا به سرطان را کاهش دهد .

کلید واژه ها : تغذیه، سرطان، سلول

Nutrition in Cancer

*Atena Karajibani , Sara Hassanpoori, Bita Zamen
Bachelor's student, Department of cellular and Molecular Biology, Sistann &Baluchistan University, Zahedan, Iran. E-mail: atena.karaji@gmail.com

Introduction:
Cancer is a major health concern globally, and it is one of the leading causes of death. It is characterized by uncontrolled cell growth that can spread to other parts of the body. Nutrition plays a crucial role in the development, prevention, and management of cancer. Thus, in this review article, we will explore the relationship between nutrition and cancer.

Method:
The study was conducted as a review by searching scientific databases such as ISC, Pubmed, Google Scholar, and Springer. All articles related to nutritional care in cancer were collected and analyzed.

Results:
The findings showed that overweight or obesity can increase the risk of developing various types of cancer, including breast, colorectal and prostate cancer. Therefore, maintain weight with compliance. A healthy diet and regular physical activity can help prevent and reduce the risk of cancer. Also, cancer treatments such as chemotherapy and radiation can cause side effects such as nausea, vomiting and loss of appetite. Consuming easily digestible foods, small and frequent meals can help control these symptoms.

Conclusion:
Nutrition plays an important role in the prevention and treatment of cancer. A healthy diet including fruits, vegetables, whole grains and legumes can reduce the risk of cancer.

Key words: Nutrition, Cancer, Cell

بیان و بارگذاری پروتئین کایمر نوترکیب از باکتری شیگلا در نانوذره PLGA و تولید آنتی بادی علیه آن

علیرضا فعله گری[۱] ، شهرام نظریان*[۲]، مجتبی ظفرمند ثمرین[۳] ، امیر نامور وانسفلی[۴]

۱- پژوهشگر، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳-کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۴- پژوهشگر، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

ایمیل نویسنده مسئول: nazarian56@gmail.com

چکیده

مقدمه: باکتری‌های جنس شیگلا از خانواده انتروباکتریاسه بوده و برخی از گونه‌های آن مانند شیگلا دیسانتری باعث بروز بیماری شیگلوز می‌شوند. فاکتورهای تهاجمی،پروتئین‌های سیستم ترشحی نوع III و توکسین مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی باکتری می‌باشند. مقابله با این باکتری و درمان آسیب‌های ناشی از آن از طریق روش‌های مرسوم همچون آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به مقاوم شدن و همه‌گیری‌های آن می‌گردد. از سوی دیگر امروزه استفاده از سامانه‌های کنترلی انتقال و رهایش دارو بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته و در این میان نانوذرات به دلیل ویژگی‌های مطلوب نقش پررنگی در این حوزه پیدا کرده‌اند.

روش کار: باکتری E.coli BL21(DE3) که دارای سازه ژنی کایمر در بردارنده ایمونوژن های Ipad-StxB-IpaB-VirG از جنس شیگلا در وکتور pET32a(+) کلون شده و جهت تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت. باکتری در محیط کشت LB به صورت ۵ ساعته کشت داده و پس از رسیدن OD به 0.6 به آن IPTG القاء شده تا پروتئین کایمر بیان شود و سپس سانتریفیوژ می شود و رسوب باکتری به‌کمک اوره ۸ مولار لیز شده و محلول رویی شفاف حاصل از آن برای تخلیص پروتئین کایمر در ستون Ni-NTA به دست می‌آید. حضور پروتئین به کمک SDS-PAGE و آنالیز وسترن بلات تایید شد. و پس از تخلیص به کمک ستون کروماتوگرافی تمایلی در نانوذره بارگذاری گردید. پس از بررسی خواص فیزیک و شیمیایی پروتئین بارگذاری شده، و تزریق آن به حیوان آزمایشگاهی به صورت آنتی ژن تنها، آنتی ژن مخلوط با ادجونت فروند و بارگذاری شده در در نانوذره به شکل زیر جلدی انجام شد. پس از بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی

پروتئین بارگذاری شده ، تزریق آنتی‌ژن به حیوان آزمایشگاهی، بررسی تیتر آنتی بادی تولیدی و توانایی آن در خنثی سازی باکتری ؛ حیوانات ایمن شده مورد چالش قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری: اندازه نانوذرات واجد پروتئین بارگذاری شده تقریبا میانگین ۱۹۵ نانومتر تعیین گردید. راندمان و بازده بارگذاری نانوذرات به ترتیب حدودا ۸۵ درصد محاسبه شد. و میزان زنده مانی موش‌های ایمن در چالش باکتری *شیگلا* در مقایسه با نمونه کنترل افزایش ۵۰ درصدی نشان داد. از این رو پروتئین نوترکیب BDSV، با هدف قرار دادن شاخصه‌های اصلی تهاجم و اتصال باکتری *شیگلا* می‌تواند به عنوان کاندید ایمونوژن مناسب مطرح گردد. مقایسه تیتر آنتی بادی گروه های مختلف حاکی از آن بود که بهترین پاسخ ایمنی در گروه آنتی ژن بارگذاری شده در نانوذره PLGA بدست آمده است.

کلمات کلیدی: *شیگلا*،پروتئین کایمر ، نانوذره PLGA، کاندید واکسن ، ایمونوژن

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

Expression and loading of recombinant chimeric protein from Shigella bacteria in PLGA nanoparticles and production of antibodies against it

Alireza Felegary[1], Shahram Nazarian[*2], Mojtaba Zafarmand Samarin[3], Amir Namvar Vansofla[4]

1.Researcher, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3.Master of Science, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
4.Researcher, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Corresponding Author's Email: nazarian56@gmail.com

Abstract

Introduction: Shigella bacteria belong to the Enterobacteriaceae family, and some of its species, such as Shigella dysentery, cause shigellosis. Invasive factors, proteins of type III secretion system and toxin are the most important pathogenic factors of bacteria. Dealing with this bacterium and treating the damage caused by it through conventional methods such as antibiotics leads to its resistance and epidemics. On the other hand, today, the use of control systems for drug delivery and release has received more attention, and in the meantime, nanoparticles have found a prominent role in this field due to their favorable characteristics.

Material and Method: E.coli BL21(DE3) bacterium, which has a chimeric gene structure carrying Ipad-StxB-IpaB-VirG immunogens from the genus Shigella, was cloned in (+)pET32a vector and used to produce recombinant protein. The bacteria were cultured in LB culture medium for 5 hours and after OD reached 0.6, IPTG was induced into it to express the chimeric protein, and then it was centrifuged, and the bacterial sediment was lysed with the help of 8 M urea and the resulting clear supernatant was obtained. It is obtained from it to purify the chimeric protein in the Ni-NTA column. The presence of protein was confirmed by SDS-PAGE and western blot analysis. And after purification, it was loaded into nanoparticles with the help of affinity chromatography column. After checking the physical and chemical properties of the loaded protein, and injecting it into the laboratory animal in the form of antigen alone, antigen mixed with Freund's adjuvant and loaded in the nanoparticle was done subcutaneously. After checking the physical and chemical properties of the loaded protein, injecting the antigen into the laboratory animal, checking the produced antibody titer and its ability to neutralize bacteria; Immunized animals were challenged.

Discussion and conclusion: The average size of nanoparticles containing loaded protein was determined to be approximately 195 nm. The efficiency and loading efficiency of nanoparticles were calculated to be about 85%, respectively. And the survival rate of immune mice in Shigella bacteria challenge showed a 50% increase compared to the control sample.

Therefore, BDSV recombinant protein, by targeting the main indicators of invasion and attachment of Shigella bacteria, can be proposed as a suitable immunogen candidate. Comparison of the antibody titer of different groups indicated that the best immune response was obtained in the group of antigen loaded in PLGA nanoparticles.

Key words: Shigella, protein chimera, PLGA nanoparticle, vaccine candidate, immunogen

بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی پس از دریافت دوزدوم واکسن برکت درافراد بالای ۱۸ سال

الهام حیدری[۱]،ملیحه محمدی[۱*]،سید محمد ریاحی[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان.
۲. گروه پزشکی اجتماعی و خانواده، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند.

*ایمیل نویسنده‌ی مسئول: mmohammadi@science.usb.ac.ir

چکیده

مقدمه: این مطالعه با هدف بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی و عوامل تاثیرگذار بر آن، پس از تزریق دوز دوم و سوم واکسن برکت و بررسی میزان مرگ‌ومیر ناشی از کرونا در افرادی که دو یا سه دوز واکسن را دریافت کرده بودند، در شهرستان بیرجند انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه‌ی مقطعی روی ۱۰۰۰ فرد بالای ۱۸ سال واکسینه شده با دو دوز واکسن برکت، که حداقل ۶ ماه از تزریق دوز دوم آنها گذشته بود، انجام گرفت. اطلاعات دموگرافیک و بالینی با استفاده از پرسشنامه جمع‌آوری شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $P < ۰/۰۵$ سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد.

نتایج: نتایج نشان داد که در مجموع ۱۷۴ نفر (۱۷/۴٪) افراد پس از تزریق دوز دوم واکسن و در مجموع ۱۵۲ نفر (۲۵/۰٪) پس از تزریق دوز سوم به کروناویروس مبتلا شده‌اند. ابتلا به کروناویروس پس از دوز دوم با سن کمتر، نوع گروه خونی، ابتلا به بیماری کلیوی و اشتغال در خارج از منزل همراهی داشته است. همچنین ابتلا به کروناویروس پس از دوز سوم با جنس زن، فقدان تحصیلات دانشگاهی، ابتلا به کم‌کاری تیروئید و سابقه‌ی ابتلا به کروناویروس پس از دوز دوم ارتباط معنی‌داری داشته است.

بحث: اثربخشی واکسن برکت در پیشگیری از ابتلا به کروناویروس پس از دو دوز واکسن بیش از ۸۰/۰٪ بود و پس از سه دوز کاهش یافت. به‌نظر می‌رسد تزریق دوز سوم این واکسن تاثیر مثبتی در جلوگیری از ابتلا به کروناویروس نداشته است.

کلمات کلیدی: COVID-19، پاندمی، واکسیناسیون، برکت، ویروس SARS-COV-2

Investigating the COVID-19 infection after the second dose of COVIran Barekat in people over 18 years old

Heydari Elham [1], Mohammadi Malihe [1]*, Riahi Seyed Mohammad [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan.
[2] Department of Family and Community Medicine, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand.
*Corresponding email address: mmohammadi@science.usb.ac.ir

Abstract:

Introduction: This study aimed to investigate the rate of probable and definite COVID-19 and the effective factors after injecting the second and third doses of COVIran Barekat vaccine and to investigate the COVID-19 mortality in those who received two or three doses of the vaccine in Birjand city.

Methods: This cross-sectional study included 1000 people aged 18 years old or more who were vaccinated with two doses of COVIran Barekat vaccine at least six months after the second dose. Demographic and clinical information was collected using a questionnaire. The data were analyzed using SPSS software and $P<0.05$ was selected as a significant level.

Results: The results revealed that 174 people (17.4%) were infected with the coronavirus after the second dose of the vaccine and 152 people (25.0%) after the third doses of the vaccine. COVID-19 after the second dose of the vaccine was associated with younger age, blood group, kidney disease, and working outside the home. Also, a significant relationship was found between COVID-19 after the third dose of the vaccine and the female sex, lack of university education, hypothyroidism, and history of COVID-19 after the second dose of the vaccine.

Conclusion: The effectiveness of the COVIran Barkat vaccine in COVID-19 prevention was more than 80.0% after two doses of the vaccine and decreased after three doses. It seems that the injection of the third dose of this vaccine did not have a positive effect in preventing the corona virus.

Keywords: COVID-19, Pandemics, Vaccination, COVIran Barekat, SARS-CoV-2.

بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی پس از دریافت دوز دوم واکسن آسترازنکا در افراد بالای ۱۸ سال

شهربانو صدیق سارونی[۱]، ملیحه محمدی[۱*]، سید محمد ریاحی[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان.
۲. گروه پزشکی اجتماعی و خانواده، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند.
ایمیل نویسنده‌ی مسئول: mmohammadi@science.usb.ac.ir

چکیده

هدف: این مطالعه با هدف بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی و عوامل تاثیرگذار بر آن پس از تزریق دوز دوم و سوم واکسن آسترازنکا و بررسی میزان مرگ‌ومیر ناشی از کرونا در افرادی که دو یا سه دوز واکسن را دریافت کرده‌اند، در شهرستان بیرجند انجام شد.

روش‌کار: ۱۰۰۰ فرد واکسینه شده با دو دوز واکسن آسترازنکا، بالای ۲۰ سال که حداقل ۶ ماه از تزریق دوز دوم آنها گذشته بود، برای این مطالعه مقطعی انتخاب شدند. اطلاعات دموگرافیک و بالینی افراد با استفاده از پرسشنامه جمع‌آوری شد. دادها با نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد و $P < ۰/۰۵$ سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در مجموع ۳۵۵ نفر (۳۵/۶٪) افراد پس از تزریق دوز دوم واکسن و ۲۶ نفر (۸/۳٪) پس از تزریق سه دوز واکسن به کروناویروس مبتلا شده‌اند. ابتلا به بیماری کروناویروس پس از دوز دوم واکسن با سن کمتر، جنس زن و ابتلا به بیماری زمینه‌ای (به ویژه دیابت و پرفشاری خون) همراهی داشته است. همچنین ابتلا به کروناویروس پس از دوز سوم واکسن تنها با سابقه‌ی ابتلا به بیماری کلیوی و سابقه‌ی ابتلا به کروناویروس پس از دوز دوم واکسن ارتباط معنی‌داری داشته است.

بحث : اثربخشی واکسن آسترازنکا در پیشگیری از ابتلا به بیماری کروناویروس پس از دو دوز واکسن بیش از ۶۰٪ بود و پس از تزریق دوز سوم افزایش بیشتری یافته است. بنابراین، تزریق دوز سوم این واکسن برای جلوگیری از ابتلا به بیماری کروناویروس توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی : بیماریCOVID-19 ، پاندمی، واکسیناسیون، آسترازنکا، ویروس SARS-COV-2

AstraZeneca vaccine in people over 18 years old

Sedigh Sarooni Shahrbanoo [1], Mohammadi Malihe [1]*, Riahi Seyed Mohammad [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan.
[2] Department of Family and Community Medicine, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand.
*Corresponding email address: mmohammadi@science.usb.ac.ir

Abstract:

Introduction: This study aimed to investigate the rate of probable and definite COVID-19 and the effective factors after injecting the second and third doses of AstraZeneca vaccine and to investigate the COVID-19 mortality in those who received two or three doses of the vaccine in Birjand city.

Methods: This cross-sectional study was conducted on 1000 people aged 18 years old or more who were vaccinated with two doses of the AstraZeneca vaccine at least six months after the second dose. Demographic and clinical information was collected using a questionnaire. The data were analyzed using SPSS software and $P<0.05$ was considered as statistically significant.

Results: The results showed that 355 people (35.6%) were infected with the coronavirus after the second dose of the vaccine and 26 people (8.3%) after the third dose of the vaccine. COVID-19 after the second dose was associated with younger age, female sex, and underlying diseases (especially diabetes mellitus and hypertension). Also a significant relationship was found between COVID-19 after the third dose of the vaccine and kidney disease and a history of COVID-19 after the second dose of the vaccine.

Conclusion: The effectiveness of the AstraZeneca vaccine in COVID-19 prevention was more than 60.0% after two doses of the vaccine and it increased even more after the third dose. Therefore, it is recommended to inject the third dose of this vaccine to prevent coronavirus disease.

Keywords: COVID-19, Pandemics, Vaccination, AstraZeneca, SARS-CoV-2.

شناسایی نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ B به روش ساندویچ الایزا

مجتبی ظفرمند ثمرین[۱]، شهرام نظریان*[۲]، علیرضا فعله گری[۳]، حسین سمیعی ابیانه[۴]

۱- گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

۲- گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

۳- گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

۴- گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

*ایمیل نویسنده مسئول : nazarian56@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: سموم تولید شده توسط کلستریدیوم بوتولینوم یکی از کشنده ترین ترکیبات شناخته شده است که باعث بوتولیسم می شود. در حال حاضر، تشخیص BoNTs در مواد غذایی با استفاده از سنجش زیستی بر روی موش های آزمایشگاهی یک روش بسیار حساس با محدوده تشخیص $20\ pg.mL-1$ تا ۷ است. با این حال، سنجش زیستی برای موش زمان‌بر است. این روش سریع، بسیار خاص و حساس به آزمایش روی موش است. هدف از این مطالعه استفاده از روش اصلاح شده ساندویچ الایزا برای تشخیص سم BoNT/B بود.

مواد و روش‌ها: پروتئین نوترکیب ۳۷۰ اسید آمینه از انتهای کربوکسیل قسمت اتصال سم BoNT/B با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون به عنوان آنتی‌ژن بیان و با کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA خالص‌سازی شد. آنتی بادی های IgG از سرم موش و خرگوش توسط کروماتوگرافی میل پروتئین G جدا شد. حساسیت و ویژگی روش طراحی شده برای تشخیص آنتی ژن نوترکیب BoNT/B-HcC و سم بوتولینوم نوع B مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها و نتیجه گیری: غلظت آنتی‌بادی خالص موش و خرگوش به ترتیب ۳ و ۴,۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم بود. حداقل غلظت پروتئین قابل تشخیص با روش الایزای غیرمستقیم با آنتی‌بادی‌های موش و خرگوش خالص‌شده در 475 و ۱۱۸ pg تعیین شد. با بهینه سازی روش الایزا ساندویچ، حداقل ۳۰ نانوگرم آنتی ژن نوترکیب BoNT/B-HcC و ۱۴۶ پیگم از BoNT/B بسیار اختصاصی شناسایی شد.روش الایزا ساندویچ می‌تواند برای شناسایی دقیق و حساس سم بوتولینوم کلستریدیوم نوع B مورد استفاده قرار گیرد. ارزیابی اثربخشی این روش در آینده برای تشخیص سم بوتولینوم در نمونه‌های محیطی و غذایی ضروری است.

کلمات کلیدی: ساندویچ الایزا، آنتی بادی، سم بوتولینوم نوع B، کلستریدیوم بوتولینوم

Detection of Clostridium botulinum type B neurotoxin by sandwich ELISA method

Mojtaba Zafarmand Samarin[1], Shahram Nazarian[*2], Alireza Felegary[3], Hossein Samiei Abianeh[4]

1. Department of Biology. Faculty of Basic Sciences. Imam Hossein University. Tehran. Iran
2. Department of Biology. Faculty of Basic Sciences. Imam Hossein University. Tehran. Iran
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
4. Department of Biology. Faculty of Basic Sciences. Imam Hossein University. Tehran. Iran

*Corresponding Author's Email: nazarian56@gmail.com

Abstract

Introduction: The toxins produced by Clostridium botulinum are one of the most lethal compounds known to cause botulism. Currently, the detection of BoNTs in food using bioassays on laboratory mice is a very sensitive method with a detection range of 7 to 20 pg.mL-1. However, mouse bioassays are time-consuming. This method is fast, highly specific and sensitive to test in mice. The aim of this study was to use the modified sandwich ELISA method to detect BoNT/B toxin.

Materials and methods: The recombinant protein of 370 amino acids from the carboxyl end of the binding part of BoNT/B toxin with a molecular weight of 45 kDa was expressed as an antigen and purified by Ni-NTA affinity chromatography. IgG antibodies were isolated from mouse and rabbit sera by protein G affinity chromatography. The sensitivity and specificity of the method designed for the detection of recombinant antigen BoNT/B-HcC and botulinum toxin type B were evaluated.

Results and discussions: The pure antibody concentration of mouse and rabbit was 3 and 4.5 mg/ml of serum, respectively. The minimum detectable protein concentration was determined by indirect ELISA with purified mouse and rabbit antibodies at 475 and 118 pg. By optimizing the sandwich ELISA method, at least 30 ng of BoNT/B-HcC recombinant antigen and 146 pigmes of highly specific BoNT/B were identified. ELISA sandwich method can be used for accurate and sensitive detection of Clostridium botulinum toxin type B. It is necessary to evaluate the effectiveness of this method in the future to detect botulinum toxin in environmental and food samples.

Key words: sandwich ELISA, antibody, botulinum toxin type B, Clostridium botulinum

بیان و بارگذاری پروتئین کایمر نوترکیب از باکتری شیگلا در نانوذره PLGA و تولید آنتی بادی علیه آن

علیرضا فعله گری[۱] ، شهرام نظریان*[۲]، مجتبی ظفرمند ثمرین[۳] ، امیر نامور وانسفلی[۴]

۱- پژوهشگر، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳-کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۴- پژوهشگر، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

ایمیل نویسنده مسئول: nazarian56@gmail.com

چکیده

مقدمه: باکتری‌های جنس شیگلا از خانواده انتروباکتریاسه بوده و برخی از گونه‌های آن مانند شیگلا دیسانتری باعث بروز بیماری شیگلوز می‌شوند. فاکتورهای تهاجمی،پروتئین‌های سیستم ترشحی نوع III و توکسین مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی باکتری می‌باشند. مقابله با این باکتری و درمان آسیب‌های ناشی از آن از طریق روش‌های مرسوم همچون آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به مقاوم شدن و همه‌گیری‌های آن می‌گردد. از سوی دیگر امروزه استفاده از سامانه‌های کنترلی انتقال و رهایش دارو بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته و در این میان نانوذرات به دلیل ویژگی‌های مطلوب نقش پررنگی در این حوزه پیدا کرده‌اند.

روش کار: باکتری E.coli BL21(DE3) که دارای سازه ژنی کایمر در بردارنده ایمونوژن های Ipad-StxB-IpaB-VirG از جنس شیگلا در وکتور pET32a(+) کلون شده و جهت تولید پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت. باکتری در محیط کشت LB به صورت ۵ ساعته کشت داده و پس از رسیدن OD به 0.6 به آن IPTG القاء شده تا پروتئین کایمر بیان شود و سپس سانتریفیوژ می شود و رسوب باکتری به‌کمک اوره ۸ مولار لیز شده و محلول رویی شفاف حاصل از آن برای تخلیص پروتئین کایمر در ستون Ni-NTA به دست می‌آید. حضور پروتئین به کمک SDS-PAGE و آنالیز وسترن بلات تایید شد. و پس از تخلیص به کمک ستون کروماتوگرافی تمایلی در نانوذره بارگذاری گردید. پس از بررسی خواص فیزیک و شیمیایی پروتئین بارگذاری شده، و تزریق آن به حیوان آزمایشگاهی به صورت آنتی ژن تنها، آنتی ژن مخلوط با ادجونت فروند و بارگذاری شده در در نانوذره به شکل زیر جلدی انجام شد. پس از بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی

پروتئین بارگذاری شده ، تزریق آنتی‌ژن به حیوان آزمایشگاهی، بررسی تیتر آنتی بادی تولیدی و توانایی آن در خنثی سازی باکتری ؛ حیوانات ایمن شده مورد چالش قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری: اندازه نانوذرات واجد پروتئین بارگذاری شده تقریبا میانگین ۱۹۵ نانومتر تعیین گردید. راندمان و بازده بارگذاری نانوذرات به ترتیب حدودا ۸۵ درصد محاسبه شد. و میزان زنده مانی موش‌های ایمن در چالش باکتری *شیگلا* در مقایسه با نمونه کنترل افزایش ۵۰ درصدی نشان داد. از این رو پروتئین نوترکیب BDSV، با هدف قرار دادن شاخصه‌های اصلی تهاجم و اتصال باکتری *شیگلا* می‌تواند به عنوان کاندید ایمونوژن مناسب مطرح گردد. مقایسه تیتر آنتی بادی گروه های مختلف حاکی از آن بود که بهترین پاسخ ایمنی در گروه آنتی ژن بارگذاری شده در نانوذره PLGA بدست آمده است.

کلمات کلیدی: *شیگلا*،پروتئین کایمر ، نانوذره PLGA، کاندید واکسن ، ایمونوژن

Expression and loading of recombinant chimeric protein from Shigella bacteria in PLGA nanoparticles and production of antibodies against it

Alireza Felegary[1], Shahram Nazarian[*2], Mojtaba Zafarmand Samarin[3], Amir Namvar Vansofla[4]

1.Researcher, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3.Master of Science, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
4.Researcher, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Corresponding Author's Email: nazarian56@gmail.com

Abstract

Introduction: Shigella bacteria belong to the Enterobacteriaceae family, and some of its species, such as Shigella dysentery, cause shigellosis. Invasive factors, proteins of type III secretion system and toxin are the most important pathogenic factors of bacteria. Dealing with this bacterium and treating the damage caused by it through conventional methods such as antibiotics leads to its resistance and epidemics. On the other hand, today, the use of control systems for drug delivery and release has received more attention, and in the meantime, nanoparticles have found a prominent role in this field due to their favorable characteristics.

Material and Method: E.coli BL21(DE3) bacterium, which has a chimeric gene structure carrying Ipad-StxB-IpaB-VirG immunogens from the genus Shigella, was cloned in (+)pET32a vector and used to produce recombinant protein. The bacteria were cultured in LB culture medium for 5 hours and after OD reached 0.6, IPTG was induced into it to express the chimeric protein, and then it was centrifuged, and the bacterial sediment was lysed with the help of 8 M urea and the resulting clear supernatant was obtained. It is obtained from it to purify the chimeric protein in the Ni-NTA column. The presence of protein was confirmed by SDS-PAGE and western blot analysis. And after purification, it was loaded into nanoparticles with the help of affinity chromatography column. After checking the physical and chemical properties of the loaded protein, and injecting it into the laboratory animal in the form of antigen alone, antigen mixed with Freund's adjuvant and loaded in the nanoparticle was done subcutaneously. After checking the physical and chemical properties of the loaded protein, injecting the antigen into the laboratory animal, checking the produced antibody titer and its ability to neutralize bacteria; Immunized animals were challenged.

Discussion and conclusion: The average size of nanoparticles containing loaded protein was determined to be approximately 195 nm. The efficiency and loading efficiency of nanoparticles were calculated to be about 85%, respectively. And the survival rate of immune mice in Shigella bacteria challenge showed a 50% increase compared to the control sample.

Therefore, BDSV recombinant protein, by targeting the main indicators of invasion and attachment of Shigella bacteria, can be proposed as a suitable immunogen candidate. Comparison of the antibody titer of different groups indicated that the best immune response was obtained in the group of antigen loaded in PLGA nanoparticles.

Key words: Shigella, protein chimera, PLGA nanoparticle, vaccine candidate, immunogen

بارگذاری پروتئین CfaB از باکتری اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک در نانورذات کیتوزان و ارزیابی ایمنی زائی آن

شهرام نظریان*[۱]، امیر نامورانسفلی[۲]، مجتبی ظفرمند ثمرین[۳]،علیرضا فعله گری[۴]

۱-دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲-پژوهشگر، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۳-کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۴-پژوهشگر، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: nazarian56@gmail.com

چکیده

مقدمه:سویه های بیماریزای *اشرشیاکلی* از عوامل شایع اسهال می باشد. ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک یکی از بزرگترین تهدیدات سلامت جهانی است. بر این اساس تولید یک واکسن ایمنوژن موثر علیه باکتری های بیماری زا ضروری است. بارگذاری ایمنوژن های نوترکیب در نانو حاملها، سبب ایمنی‌زایی موثر ایمنوژن‌ها می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی ایمنی زائی پروتئین CfaB بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان و ارزیابی پاسخ ایمنی علیه عفونت *EHEC* بود.

موادوروش‌ها: بیان پروتئین نوترکیب CfaB، در میزبان بیانی در*E.coli* BL21 DE3 با استفاده از IPTG القا شد. پروتئین نوترکیب بوسیله ستون نیکل تخلیص و از روش وسترن بلات برای ارزیابی پروتئین نوترکیب استفاده شد. نانوذرات کیتوسانی به روش ژلاسیون یونی و از طریق میانکنش کیتوسان با اتصال دهنده تری پلی فسفات (TPP) تهیه شد. نانوژل ها با پروتئین نوترکیب بارگذاری و خصوصیات ساختاری آن ها با SEMو DLS بررسی شد.ایمنی زایی زیرپوستی موش ها انجام و تیترآنتی بادی توسط ELISA تعیین شد. و در نهایت ممانعت سرم از اتصال باکتری *ETEC*به سلول Caco2بررسی شد.

یافته ها و نتیجه گیری: آنالیزSDS-PAGE بیان پروتئین با وزن۱۹کیلو دالتون را نشان داد. پروتئین نوترکیب توسط وسترن بلات تایید شد. ظرفیت بارگذاری پروتئین در نانوذرات کیتوزان، ۸۵ درصد بود. متوسط اندازه نانوذرات ۲۳۰ نانومتر بود. تیتر پایانی الیزا برای پاسخ هومورال به پروتئین بارگذاری شده ۲۵۶۰۰ بود. سرم موش های ایمن اتصال باکتری *ETEC* به سلول های Caco2را ۶۰٪ کاهش داد:.نتایج

مطالعه نشان داد که بارگذاری پروتئین نوترکیب CfaB در نانوذرات کیتوزان پاسخ ایمنی هومورال علیه باکتری *ETEC* را تحریک می کند.

کلمات کلیدی: کیتوزان ، نانوذرات ، اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک ،**CfaB**، ایمنی زائی

Loading of CfaB protein from enterotoxigenic Escherichia coli bacteria in chitosan nanoparticles and evaluation of its immunogenicity

Shahram Nazarian[*1], Amir Namvar Vansofla[2], Mojtaba Zafarmand Samarin[3], Alireza Felegary[4]

1-Associate professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

2- Researcher, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

3- Master of Science, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

4- Researcher, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: nazarian56@gmail.com

Abstract

Introduction: Pathogenic strains of *Escherichia coli* are common causes of diarrhea. the emergence of antibiotic resistant strains is one of the biggest threats to global health. Based on this, it is necessary to produce an effective immunogenic vaccine against pathogenic bacteria. The purpose of this research was to investigate the immunity of recombinant protein CfaB encapsulated in PLGA nanoparticles against *EHEC* infection.

Material and methods: The expression of the CfaB recombinant protein in *E.coli* BL21 DE3 was induced using IPTG. The protein was purified using a nickel column and the western blot method was used to evaluate the expression of the recombinant protein. Chitosan nanoparticles were prepared by ionic gelation method and through the interaction of chitosan with tripolyphosphate (TPP) linker. the recombinant protein CFaB encapsulated in Chitosan nanoparticles and their structures were characterized by SEM and DLS. Subcutaneous immunizations of mice were performed and antibody titers were determined by ELISA. Finally, serum inhibition of *ETEC* bacteria binding to Caco2 cells was investigated.

Results and discussions: SDS-PAGE analysis showed expression of Recombinant protein with 19 kDa Molecular weight. The recombinant protein was confirmed by western blotting. Encapsulation efficiency of recombinant protein in PLGA nanoparticles was 85٪. The average particle size was 230 nm. ELISA titer for humoral response to loaded protein was 25600. The Serum of immunized mice reduced the binding of *ETEC* bacteria to Caco2 cells by 60%. The results of the study showed that the loading of recombinant protein CfaB in chitosan nanoparticles stimulates the humoral immune response against *ETEC* bacteria

Key words: Chitosan, Nanoparticles, *Enterotoxigenic Escherichia coli*, Colonization factor, CfaB, Immunization

بررسی ایمنی زائی نانوذرات PLGA دربردارنده پروتئین اینتیمن از باکتری اشرشیاکلی انتروهموراژیک

شهرام نظریان*[۱]، امیر ناموروانسفلی[۲]، علیرضا فعله گری[۳]، مجتبی ظفرمند ثمرین[۴]

۱-دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲-پژوهشگر، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۳-پژوهشگر، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۴-کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: nazarian56@gmail.com

چکیده

مقدمه:سویه های بیماری زای *اشرشیاکلی* از عوامل شایع اسهال می باشد. باکتری *انتروهموراژیک اشرشیاکلی*(*EHEC*) باعث اسهال و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان‌ها می شود . یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های بیماریزایی*EHEC*، اتصال به سلول‌های اپیتلیالی روده در میزبان است. اینتمین در شروع چسبندگی *EHEC* به سلول میزبان مور نیاز است. با توجه به خطرات ناشی از درمان آنتی بیوتیکی در عفونت *EHEC*، واکسن ها روشی امید بخش برای پیشگیری از عفونت را ارائه می کنند. هدف از این مطالعه بررسی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب Intimin بارگذاری شده در نانوذرات PLGA در برابر عفونت باکتری *EHEC* بود.

مواد وروشها:در این مطالعه تحقیقی، بیان پروتئین نوترکیبIntimin، درE.coli BL21 DE3 با IPTG القا شد. پروتئین نوترکیب با وسترن بلات ارزیابی و کروماتوگرافی تمایلیNi-NTAتخلیص گردید. نانوذرات PLGAبه روش امولسیون دوگانه تهیه و خصوصیات ساختاری با SEMو DLSبررسی گردید. ایمنی زایی زیرپوستی موش ها انجام و تیترآنتی بادی ها توسط ELISAتعیین شد. موش ها با خوراندن باکتری بیماریزا و ریزش باکتری در موش ها بررسی گردید.

یافته ها و نتیجه گیری :آنالیزSDS-PAGE بیان مناسبی از پروتئین نوترکیب را نشان داد. پروتئین نوترکیب توسط وسترن بلات تایید شد. ظرفیت بارگذاری پروتئین در نانوذرات PLGA، ۸۹ درصد بود. متوسط اندازه نانوذرات ۲۱۰ نانومتر بود. تیتر پایانی الیزا برای پاسخ هومورال به پروتئین بارگذاری شده ۱۲۸۰۰ بود. ریزش باکتری در موش های ایمن تا۱۰۴ cfu/ml کاهش یافت.

نتایج نشان داد که پاسخ ایمنی علیه پروتئین Intimin بارگذاری شده در نانوذرات PLGA باعث حفاظت حیوان در چالش با *EHEC* می شود.

کلمات کلیدی: PLGA، نانوذرات ، اشرشیاکلی انتروهموراژیک ، اینتیمین ، ایمنی زائی

Investigating the immunogenicity of PLGA nanoparticles containing intima protein from enterohemorrhagic Escherichia coli bacteria

Shahram Nazarian[1*], Amir Namvar Vansofla[2], Alireza Felegary[3], Mojtaba Zafarmand samarin[4]

1-Associate professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

2- Researcher, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

3- Researcher, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

4- Master of Science, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: nazarian@ihu.ac.ir

Introduction: Pathogenic strains of *Escherichia coli* are common causes of diarrhea. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (*EHEC*) causes diarrhea and hemolytic uremic syndrome in humans. One of the important pathogenic mechanisms of *E. coli* is binding to intestinal epithelial cells in the host. Intimin is the adhesin protein required for intimate adherence of *EHEC* to host cells. according to the dangers of antibiotic treatment in *EHEC* infection, vaccines offer a promising method to prevent infection. The aim of this study was to investigate the immunity of the recombinant protein Intimin encapsulated in PLGA nanoparticles against *EHEC* infection.

Material and Methods : In this study, Expression of intimin recombinant protein in *E.coli* BL21 DE3 was induced with IPTG. The recombinant protein was purified using affinity chromatography and evaluated by Western Blotting analysis. PLGA nanoparticles containing recombinant protein were prepared by double emulsion method and their structures were characterized by SEM and DLS. Subcutaneous immunizations of mice were performed and antibody titers was determined by ELISA. The mice were infected with pathogenic bacteria, and then bacterial shedding in the mice were evaluated.

Results and Discussion: SDS-PAGE analysis showed that the Recombinant protein had a suitable expression. Western blotting analysis confirmed the expression of the recombinant protein. Encapsulation efficiency of recombinant of recombinant protein in PLGA nanoparticles was 85%. The average particle size was 210 nm. ELISA titer for humoral response to loaded protein was 12800. Bacterial shedding was reduced by 104 cfu/ml in immunized mice.

The results showed that the immune response against Intimin protein loaded in PLGA nanoparticles protects the animal in the challenge with EHEC.

Key Words: PLGA, Nanoparticles, Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (*EHEC*) , Intimin , Immunization.

بررسی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب چند اپی توپی علیه گونه‌های بیماریزای شیگلا

امیر نامور وانسفلی[۱]، عباس حاجی‌زاده*[۲]، شهرام نظریان[۳]، مجتبی ظفرمند ثمرین[۴]

۱- پژوهشگر، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۳--دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران
*ایمیل نویسنده مسئول:abbashajizade@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: شیگلوزیس، یک عفونت روده ای است که در اثر تهاجم به روده توسط گونه‌های بیماریزای *شیگلا* ایجاد می‌شود، این بیماری یکی از مشکلات بهداشت جهانی است که توسط گونه‌های بیماری‌زای جنس *شیگلا* در انسان اتفاق می‌افتد. تولید یک واکسن مقرون‌به‌صرفه و محافظت‌کننده علیه گونه‌های بیماری‌زای این باکتری می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی بر سلامت عمومی داشته باشد. هدف از این تحقیق، بیان و بررسی ایمنی‌زایی و محافظت یک پروتئین چند اپی‌توپی بعنوان یک کاندید واکسن برابر گونه‌های بیماری‌زای جنس شیگلا در موش است.

مواد و روش‌ها: بیان پروتئین چند اپی توپی با استفاده از IPTG القاء گردید و پروتئین موردنظر به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی تخلیص شد. درنهایت ایمنی‌زایی و محافظت این پوتروئین نوترکیب در موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: آنالیز بیان ژن نشان داد که پروتئین مورد نظر بیان مناسبی دارد. آنالیز ایمنی‌زایی با استفاده از الایزا تولید تیتر آنتی‌بادی مناسب در گروه‌های تزریقی به صورت زیر جلدی را در موش تائید کرد. در نهایت، حفاظت کاندید واکسن علیه گونه های بیماریزای شیگلا با انجام تست چالش موشی تایید شد.

تیجه‌گیری: این کاندید واکسن با توجه داشتن حفاظت در برابر گونه‌های بیماری زایی *شیگلا* و همچنین به دلیل داشتن اپی توپ‌های اصلی آنتی‌ژن‌های مشترک بین گونه‌های بیماری‌زای جنس شیگلا می‌تواند به عنوان کاندید واکسن مناسب برای پیشگیری از عفونت توسط گونه‌های بیماری‌زای جنس شیگلا مورد بررسی و ارزیابی مجدد قرارگیرد.

کلمات کلیدی: پروتئین نوترکیب ، مولتی اپی‌توپ ، شیگلا ، ایمنی زائی

Immunogenic evaluation of multiepitope recombinant protein against pathogenic *shigella* species

Amir Namvar Vansofla[1] , Abbas Hajizade[2*], Shahram Nazarian[3], Mojtaba Zafarmand Samarin[4]

1- Researcher, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3- Associate professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran
4- Master of Science, Department of Biology, Faculty of Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: abbashajizade@gmail.com

Introduction: Shigellosis is a intestinal infection caused by *Shigella* species. This disease is one of the global health problems that occur in human by pathogenic species of *Shigella*. The production of a cost-effective and protective vaccine against these bacteria could have a significant impact on public health. The aim of this research was express and investigate the immunogenicity and protection of a multi-epitope protein as a candidate vaccine against *Shigella* pathogenic species in mice.

Material and Method: The expression of the multi-epitope protein was induced using IPTG and the desired protein was purified by affinity chromatography. Finally, the immunogenicity and protection of this protein was investigated in mice.

Results: Gene expression analysis showed that the desired protein had a suitable expression. ELISA assay results confirmed a suitable serum antibody levels against the protein in mice after each Subcutaneous injection. Finally, the protection of the vaccine candidate against Shigella pathogenic species was confirmed by performing the mouse challenge test.

This vaccine candidate with regard to protection as well having the main epitopes of the common antigens of pathogenic Shigella species can be considered as a vaccine candidate against shigellosis.

Key words:Recombinant protein ، Multi epitope ، *Shigella* ، Immunization

بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی پس از دریافت دوز دوم واکسن سینوفارم در بالغین

زهرا استوان[۱]، ملیحه محمدی[۱*]،سید محمد ریاحی[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان.

۲. گروه پزشکی اجتماعی و خانواده، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند.

ایمیل نویسنده‌ی مسئول: mmohammadi@science.usb.ac.ir

چکیده

هدف: این مطالعه با هدف بررسی میزان ابتلا به کرونای محتمل و قطعی و عوامل موثر بر آن پس از تزریق دوز دوم و سوم واکسن سینوفارم و بررسی میزان مرگ‌ومیر ناشی از کرونا در افرادی که دو دوز یا سه دوز واکسن را دریافت کرده‌اند، در شهرستان بیرجند انجام شد.

روش‌کار: ۱۰۰۰ فرد واکسینه شده با دو دوز واکسن سینوفارم، بالای ۲۰ سال که حداقل ۶ ماه از تزریق دوز دوم آنها گذشته بود، برای این مطالعه مقطعی انتخاب شدند. اطلاعات دموگرافیک و بالینی شرکت-کنندگان با استفاده از پرسشنامه جمع‌آوری شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد و $P < ۰/۰۵$ سطح معناداری آماری در نظر گرفته شد.

نتایج: نتایج نشان داد که در مجموع ۱۶۵ نفر (۱۶/۵٪) افراد پس از تزریق دوز دوم واکسن و ۶۲ نفر (۹/۰٪) پس از تزریق دوز سوم به کروناویروس مبتلا شده‌اند. ابتلا به کروناویروس پس از دوز دوم واکسن با داشتن تحصیلات دانشگاهی، نوع گروه خونی، ابتلا به کرونا قبل از واکسن و اشتغال در خارج از منزل ارتباط داشته است. همچنین ابتلا به کروناویروس پس از دوز سوم واکسن با BMI بالاتر، جنس زن، گروه خونی و ابتلا به بیماری قلبی‌عروقی ارتباط معنی‌داری داشته است.

بحث: اثربخشی واکسن سینوفارم در پیشگیری از ابتلا به بیماری کروناویروس پس از دو دوز واکسن بیش از ۸۰/۰٪ بوده که پس از تزریق دوز سوم افزایش بیشتری نشان داد. بنابراین تزریق دوز سوم این واکسن برای جلوگیری از ابتلا به بیماری کروناویروس توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی : بیماری کووید-۱۹، پاندمی، واکسیناسیون، سینوفارم، ویروس

Investigating the COVID-19 infection after the second dose of Sinopharm vaccine in adult people

Ostovan Zahra[1]; Mohammadi Malihe[1]*; Riahi, Seyed Mohammad[2]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan.
[2] Department of Family and Community Medicine, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand.
*Corresponding email address: mmohammadi@science.usb.ac.ir

Abstract:

Introduction: The purpose of this study was to investigate the rate of probable and definite COVID-19 and the effective factors after injecting the second and third doses of Sinopharm vaccine and to investigate the COVID-19 mortality in those who received two or three doses of the vaccine in Birjand city.

Methods: This cross-sectional study was performed on 1000 adult people aged 18 years old or more who were vaccinated with two doses of Sinopharm vaccine at least six months after the second dose. Demographic and clinical information was collected using a questionnaire. The data were analyzed using SPSS software and $P<0.05$ was considered as statistically significant.

Results: The results showed that 165 people (16.5%) were infected with the coronavirus after the second dose of the vaccine and 62 people (9.0%) after the third dose. COVID-19 after the second doses of the vaccine was associated with having university education, blood group type, COVID-19 before vaccination, and working outside the home. Also, a significant relationship was found between COVID-19 after the third dose and higher BMI, female sex, blood group and cardiovascular diseases.

Conclusion: The effectiveness of the Sinopharm vaccine in COVID-19 prevention was more than 80.0% after the second dose of the vaccine and it increased even more after the third dose. Therefore, the third dose of this vaccine seems to be helpful in COVID-19 prevention.

Keywords: COVID-19, Pandemics, Vaccination, Sinopharm, SARS-CoV-2.

نقش اگزوزم ها در پیشرفت سرطان پانکراس

،سکینه حیدری[۲]*محمد امیر پروین[۱]

۱.دانشجوی دکتری گروه سلولی مولکولی،پردیس بین المللی کیش دانشگاه تهران،کیش، ایران

۲.گروه پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

پست الکترونیکی: dr.heidari.sakineh@gmail.com

مقدمه: سرطان پانکراس یکی از مرگبارترین سرطان ها در دنیا می باشد در ایالات متحده آمریکا دهمین سرطان از نظر شیوع و سومین سرطان از لحاظ مرگ و میر می باشد.میزان بقای ۵ ساله سرطان پانکراس تقریبا ۱۰ درصد میباشد و میانگین زندگی افراد ۱۲ ماه و کمتر می باشد.در این مطالعه، نقش اگزوزوم ها در پیام رسانی در جهت پیشرفت سرطان پانکراس مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: از پایگاه داده PubMed برای مطالعه و تحقیق در مورد نقش اگزوزوم ها در پیشرفت سرطان پانکراس استفاده شده است.

یافته ها : با در نظر گرفتن حضور اگزوزوم ها در فرایند آنژیوژنز ، متاستاز ، تاثیر در فعالیت سیستم ایمنی و مقاومت دارویی تومور آنها می توانند نقش مهمی در پیشرفت سرطان پانکراس ایفا کنند.

نتیجه گیری: به نظر می رسد با مهارکننده ها اگزوزوم ها پیشرفت سرطان پانکراس را کنترل کرد.

کلمات کلیدی: سرطان پانکراس، اگزوزوم ها، پیام رسانی

The Role of Exosomes in the Progression of Pancreas Cancer

Mohammad Amir Parvin[1]*, Sakineh Heidari[2]

1.PhD student, Department of Cell and Molecular Biology, Kish International Campus, University of Tehran, Kish, IRAN

2.Department of medicine, Shiraz university of medical sciences ,Shiraz, Iran, dr.heidari.sakineh@gmail.com

Introduction: Pancreas cancer is one of the deadliest cancers in the world. In the United States, pancreatic cancer is tenth Pancreatic cancer prevalent cancer that is third most common cancer in terms of mortality. The survival rate of patients in 5 years after diagnosis is 10 percent and the average life expectancy of the individuals is 12 months or less. In this study, the role of exosomes will be examined in signaling the progression of pancreatic cancer.

Methodology: PubMed data base search was used to examine the studies on the role of exosomes in the progression of pancreatic cancer.

Results: Due to the presence of exosomes in angiogenesis processes, metastases, the impacts on the activity of the immune system and drug resistance of the tumor, they can play an important role in the progression of pancreatic cancer.

Conclusion: It seems that by inhibiting exosomes by inhibitors, the progression of cancer can be controlled.

Key Words:

Pancreatic Cancer , Exosomes , Signaling

بررسی اثرات تیموکینون گیاه سیاه دانه بر ترشح هورمون تستوسترون موش سوری نر تیمار شده با سم کلرپیریفوس

آزیتا نوزاد*[۱]، پریچهر حناچی[۲]، شهرداد محب علی[۳]

۱* کارشناسی ارشد بیوشیمی، تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی
۲ دانشیار، Ph.D. بیوشیمی، تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی
۳ Ph.D. زیست سلولی تکوینی، تهران، دانشگاه آزاد- واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
نویسنده مسئول: آزیتا نوزاد، azita.nozad69@gmail.com

چکیده

گیاه دارویی سیاه دانه *Nigella sativa* دارای ترکیبی مهم بنام تیموکینون با اثرات درمانی مهم می باشد. با توجه به اهمیت توانایی تولید مثل و عوارض منفی سموم کشاورزی، در این پژوهش اثرات درمانی تیموکینون بر آسیب های ناشی از مسمومیت های سم کلروپیریفوس مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش تجربی بر روی ۳۶ سر موش سوری نر در شش گروه بمدت ۱۴ روز انجام شد. تیموکینون در دو دوزmg/kg ۵ و ۱۰ و سم کلروپیریفوس در دوز mg/kg ۱۲ بصورت تزریق داخل صفاقی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از پایان دوره تیمار موش ها میزان ترشح هورمون تستوسترون با خون گیری از سیاهرگ باب کبدی و از طریق تست الایزا مورد بررسی قرار گرفت. سم کلروپیریفوس ترشح هورمون تستوسترون را بطرز معنی داری کاهش داد ($p< 0.01$) اما تزریق تیموکینون موجب رفع اثر منفی سم در هر دو دوز تیموکینون شد در حدی که اختلاف معنی دار آماری در این دو گروه با گروه کنترل دیده نشد. با توجه به نتایج، اثرات درمانی تیموکینون بر بهبود اثرات ناشی از سم کلروپیریفوس همسو با دوز مصرفی مشاهده گردید. ازین رو استفاده از تیموکینون با دوز مصرفی mg/kg ۱۰ برای التیام مسمومیت های ناشی از سموم و همچنین بهبود شاخصه های جنسی پیشنهاد می شود.

کلمات کلیدی: تیموکینون، سیاه دانه، هورمون، تستوسترون، موش سوری

Investigating the effects of thymoquinone from black seed plant on testosterone hormone secretion in male mice treated with chlorpyrifos.

Azita Nozad[*1], Parichehr Hanachi[2], Shahrdad Mohebali[3]

1* Master of Biochemistry, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran
2 Associate Professors, Ph.D. Biochemistry, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran
3 Ph.D. Developmental cell biology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Azad University, Tehran, Iran

Correspondence: Azita Nozad, azita.nozad69@gmail.com

Abstract

Black seed medicinal plant *Nigella sativa* has an important compound called thymoquinone with important therapeutic effects. Considering the importance of reproductive ability and negative side effects of agricultural toxins, in this research, the therapeutic effects of thymoquinone on the injuries caused by chlorpyrifos poisoning were investigated. This experimental research was conducted on 36 male mice in six groups for 14 days. Thymoquinone in two doses of 5 and 10 mg/kg and chlorpyrifos in a dose of 12 mg/kg were used as intraperitoneal injection. After the end of the treatment period of the mice, the level of testosterone secretion was checked by taking blood from the portal vein of the liver and through the ELISA test. Chlorpyrifos poison significantly reduced the secretion of testosterone hormone ($p<0.01$), but thymoquinone injection eliminated the negative effect of the poison in both doses of thymoquinone to the extent that no statistically significant difference was seen in these two groups with the control group. According to the results, the therapeutic effects of thymoquinone on improving the effects caused by chlorpyrifos poison were observed in line with the dosage. Therefore, the use of thymoquinone with a dosage of 10 mg/kg is suggested to cure poisoning caused by toxins and also to improve sexual characteristics.

Key words: Thymoquinone, Black Seed, Hormone, Testosterone, Mouse

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

دو پپتید مشتق شده از پروتئین K غشای خارجی آسینتوباکتر بومانی به عنوان کاندیدای واکسن: مطالعه جامع بیوانفورماتیکی

حنا حیدری نیا[۱]، الهه تاجبخش[۱*]، مصیب رستمیان[۲،۱*]، حسن ممتاز[۱]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، پژوهشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

پست الکترونیکی: mosayeb.rostamian@gmail.com و mosayeb.rostamian@kums.ac.ir

چکیده

فقدان واکسن های مناسب مانعی برای مدیریت موثر عفونت های آسینتوباکتر بومانی است. واکسن‌های پپتیدی می‌توانند استراتژی‌های پیشگیرانه جذاب و امیدوارکننده‌ای را علیه آسینتوباکتر بومانی ارائه دهند. هدف: در اینجا، اپی توپ‌های سلول T اختصاصی پروتئین K غشای خارجی آسینتوباکتر بومانی(OMPK) با استفاده از بیوانفورماتیک جامع و تجزیه و تحلیل دقیق اتصال مولکولی پیدا شد. روش‌ها: هر دو اپی توپ سلول T کلاس I و کلاس II از OMPK آسینتوباکتر بومانی با سه ابزار IEDB، SYFPEITHI و ProPred پیش‌بینی شدند. اپی توپ‌های پیش‌بینی‌شده از طریق چندین تجزیه و تحلیل مانند امتیازدهی پیش‌بینی، خوشه‌بندی، حذف شباهت انسانی، در نظر گرفتن ایمنی‌زایی و تولید سیتوکین، و حذف اپی توپ‌های سمی و/یا آلرژن در فهرست نهایی قرار گرفتند. پپتیدهای اپی‌توپی با امتیازهای پیش‌بینی بالا و خواص مناسب که شامل هر دو اپی توپ سلول T کلاس I و کلاس II بودند، انتخاب شدند. دو تا از این پپتیدهای اپی‌توپی کلاس I/II برای مطالعات اتصال مولکولی و ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی آنها به عنوان کاندیدای واکسن انتخاب شدند. یافته‌ها: نتایج نشان داد که تعداد زیادی اپی توپ سلول T از OMPK را می‌توان از نظر ایمنی‌زایی احتمالی ارزیابی کرد. دو تا از این اپی توپ ها (شامل هر دو اپی توپ کلاس I و II) امتیازهای پیش بینی بالایی داشتند، توسط چندین ابزار پیش بینی می شدند، به چندین HLA متصل می شدند و بهترین امتیاز اتصال را داشتند (به طور موثر به HLA های خاص خود متصل می شوند). آنها خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی داشتند و در بین گونه های اسینتوباکتر حفظ شدند. بحث: ما اپی‌توپ‌های سلول T با ایمنی‌زایی بالا کلاس I و کلاس IIآسینتوباکتر بومانی را شناسایی کردیم و دو پپتید با ایمنی‌زایی بالا امیدوارکننده را به‌عنوان نامزد واکسن معرفی کردیم. توصیه می شود که یک بررسی in vitro/in vivo از این پپتیدها برای تعیین کارایی و کارایی واقعی آنها انجام شود.

کلمات کلیدی: آسینتوباکتر بومانی، اپی توپ، In silico، داکینگ مولکولی، پروتئین K غشای خارجی

Two peptides derivate from *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein K as vaccine candidates: A comprehensive in silico study

Hana Heidarinia[1], Elahe Tajbakhsh[1]*, Mosayeb Rostamian[2,1]*, Hassan Momtaz[1]
[1] Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Infectious Diseases Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Abstract
Background: The lack of appropriate vaccines is an obstacle to the effective management of *A. baumannii* infections. Peptide vaccines can provide attractive and promising preventive strategies against *A. baumannii*. **Objective**: Here, specific T cell epitopes of *A. baumannii* outer membrane protein K (OMPK) were found using comprehensive bioinformatics and detailed molecular docking analysis. **Methods:** Both class-I and class-II T cell epitopes of *A. baumannii* OMPK were predicted by three tools namely IEDB, SYFPEITHI, and ProPred. The predicted epitopes were shortlisted via several analyses such as prediction scoring, clustering, human similarity exclusion, considering immunogenicity and cytokine production, and removing toxic and/or allergen epitopes. The epitopic peptides with high prediction scores and appropriate properties that contained both class-I and class-II T cell epitopes were selected. Two of these class I/II epitopic peptides were chosen for molecular docking studies and assessing their physicochemical properties as vaccine candidates. **Results:** The results showed many T-cell epitopes of OMPK that could be evaluated for possible immunogenicity. Two of these epitopes (containing both class-I and II epitopes) had high prediction scores, predicted by several tools, attached to several HLAs, and had the best docking score (bind efficiently to their specific HLAs). They had different physicochemical properties and were conserved among Acinetobacter species. **Discussion:** We identified the *A. baumannii* OMPK high immunogenic class-I and class-II T cell epitopes and introduced two promising high immunogenic peptides as vaccine candidates. It is recommended to do an in vitro/in vivo investigation of these peptides to determine their true efficacy and efficiency.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Epitope, In silico, Molecular docking, Outer membrane protein K

طراحی یک روش رنگ سنجی جدید برای سنجش گلوکز با استفاده از تثبیت آنزیمی

سمیرا ایران منش[۱]، ارسطو بدویی دلفارد*[۲]، زهرا کرمی[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲-استاد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۳-دانشیار بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

پست الکترونیکی: badoei@uk.ac.ir

چکیده

با توجه به اهمیت سنجش گلوکز در حوزه‌های مختلف مانند صنایع غذایی، بیوتکنولوژی و نیز جهت کنترل سطح گلوکز خون در بیماران دیابتی، تاکنون ابزارها و حسگرهای زیستی مختلفی برای دست‌یابی به این هدف طراحی شده است. از طرفی محدوده طبیعی گلوکز خون ۷۰-۹۹ میلی‌گرم در دسی لیتر می‌باشد. افزایش یا کاهش گلوکز خون در خارج از محدوده نرمال عواقب وخیمی برای سلامتی انسان دارد. هدف از این پروژه طراحی روش جدیدی بر پایه رنگ سنجی برای سنجش گلوکز است. در این پروژه، هیبرید آلی – معدنی گلوکز اکسیداز با تثبیت بر روی فلزات دوظرفیتی سنتز شد. هیبرید حاصل، بعنوان بستری برای نگهداشت و پایدارسازی آنزیم نیز عمل می کند. در اثر فعالیت آنزیمی و با تجزیه گلوکز گلوکونیک اسید و هیدروژن پراکسید تولید می‌شود. در اثر فعالیت شبه پراکسیدازی هیبرید، هیدروژن پراکسید تجزیه شده و منجر به اکسید شدن TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) و تولید رنگ می‌شود که با توجه به شدت رنگ می‌توان به میزان گلوکز پی برد. پارامترهای مختلف از جمله مقدار آنزیم، غلظت فلزات، زمان انکوباسیون و دما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بهترین سیستم فعالیت آنزیمی در غلظت‌های نهایی ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر آنزیم، ۱۳ میلی‌مولار فلزات پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. همچنین، کمپلکس آنزیمی حاصل پایداری قابل توجهی را در محدوده دمایی از ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که این حسگر زیستی می‌تواند به عنوان ابزاری کارآمد جهت سنجش گلوکز به کار برده شود.

کلمات کلیدی : گلوکز، سنجش رنگ سنجی، تثبیت آنزیمی، هیبرید آلی-معدنی

Designing a new colorimetric method for glucose detection using enzyme immobilization

Samira Iranmanesh [1], Arastoo Badoei-Dalfard * [2], Zahra Karami [3]

1-M.Sc. of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2- Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3- Associate professor of Biophysics, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

According to the importance of glucose detection in various fields such as food industry, biotechnology and also to control the blood glucose level in diabetic patients, various devices and biosensors have been designed for this purpose. On the other hand, the normal range of blood glucose is 70-99 mg/dL. An increase or decrease in blood glucose outside the normal range has serious consequences for human health. In this study a new colorimetric method for glucose detection was designed. Organic-inorganic glucose oxidase hybrid was synthesized by its immobilization on bivalent metals. The resulting hybrid also acts as a support for maintaining and stabilizing the enzyme. As a result of enzymatic activity and glucose decomposition, gluconic acid and hydrogen peroxide are produced. Owing to the peroxidase-like activity of the hybrid, hydrogen peroxide is broken down, leading to the oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) and producing color. According to the intensity of the produced color, glucose level can be detected. Various parameters including enzyme amount, metal concentration, incubation time, and temperature were investigated. The results showed that the best enzyme activity system was obtained in the final concentrations of 0.15 mg/ml of enzyme and 13 mM of metals after 30 minutes of incubation at 40° C. Also, the resulting enzymatic complex showed significant stability in the temperature range from 20 to 50 °C. These results show that the designed biosensor can efficiently be used in glucose detection.

Keywords: Glucose, Colorimetric assay, Enzyme immobilization, Organic-inorganic hybrid

تثبیت و تعیین خصوصیت بیوشیمیایی پروتئین آلبومین در نانوساختارهای فلزی

سمیرا ایران منش[۱]، ارسطو بدویی دلفارد*[۲]، زهرا کرمی[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲-استاد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۳-دانشیار بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

پست الکترونیکی: badoei@uk.ac.ir

چکیده

آلبومین بیش از ۶۰ درصد پروتئین‌های پلاسما را تشکیل می‌دهد و برای حمل بیلی‌روبین، کلسیم، هورمون پروژسترون و انواع مختلفی از داروها در بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه براین، آلبومین تعادل مایعات را در بدن حفظ کرده و به ترمیم بافت و رشد بدن نیز کمک می‌کند. از میان روش‌های متعدد تثبیت و به دام انداختن بیومولکول‌ها در نانوساختار های گوناگون که به منظور افزایش پایداری و کارایی بیومولکول ها طراحی شده اند، اخیرا سنتز هیبرید های آلی- معدنی به عنوان روشی موثر ارائه شده است که می‌تواند بر مشکلات سایر روش‌های تثبیت غلبه کند. از این رو، هدف از این پروژه سنتز هیبرید آلی- معدنی آلبومین است که از پروتئین آلبومین و فلزات دو ظرفیتی مس و روی استفاده شده است. بازده کپسوله شدن در شرایط مختلف محیطی از جمله مقدار پروتئین، غلظت فلزات، زمان انکوباسیون و دما مورد بررسی قرار گرفت. سنجش غلظت پروتئین نیز با روش بردفورد و با رسم منحنی استاندارد آلبومین انجام شد. نتایج نشان داد که شرایط بهینه در غلظت‌های نهایی آلبومین ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر و ۲۰ میلی‌مولار فلزات پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به دست آمد و بیشترین درصد کپسوله شدن پروتئین آلبومین در هیبرید سنتز شده، ۸۲ درصد محاسبه شد. نتایج کلی نشان می‌دهد که استفاده همزمان از دوفلز می‌تواند باعث افزایش میزان بارگذاری پروتئین و بهبود پایداری ساختار شود. این ساختار هیبریدی پایدار می‌تواند در زمینه‌های مختلف به جای پروتئین آلبومین آزاد مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: تثبیت، هیبرید آلی- معدنی، آلبومین، پایداری،

Immobilization and biochemical characterization of albumin protein on metal nanostructures

Samira Iranmanesh [1], Arastoo Badoei-Dalfard * [2], Zahra Karami [3]

1-M.Sc. of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2- Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3- Associate professor of Biophysics, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

Albumin makes up more than 60% of plasma proteins and is used to carry bilirubin, calcium, progesterone hormone, and various types of drugs in the body. Additionally, albumin maintains the balance of fluids in the body and helps tissue repair and body growth. Among various methods for biomolecule entrapment and immobilization which are designed for increasing their stability and efficiency, organic-inorganic hybrids have been presented as an effective method and can overcome the problems of other immobilization methods. Accordingly, in this study organic-inorganic albumin hybrid is synthesized in which albumin protein and bivalent metals such as copper and zinc have been used. The encapsulation yield was investigated in different environmental conditions including protein amount, metal concentration, incubation time, and temperature. The protein concentration was also determined through the Bradford assay and by plotting the albumin standard curve. The results showed that the optimal conditions were obtained in the final albumin concentrations of 0.15 mg/ml and 20 mM of metals after 48 hours of incubation at 4° C. The highest albumin encapsulation yield in the synthesized hybrid was calculated as 82%. Results show that the simultaneous use of two metals can increase the protein loading capacity and improve the structural stability. This stable hybrid structure can be used in different fields instead of free albumin protein.

Keywords: Immobilization, Organic-inorganic hybrid, Albumin, Stability

تایپینگ مولکولی و تشخیص ژن‌های۱ -mcr در سویه‌های مقاوم به کاربا‌پنم کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیمارستان های ایران با روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس و PCR

ندا رضوی داودی[۱]؛ ندا سلیمانی* [۲] ؛ مرجان رهنمای فرزامی [۳]

۱- گروه میکروبیولوژی.، دانشکده علوم و فناوری زیستی.، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۲- گروه میکروبیولوژی.، دانشکده علوم و فناوری زیستی.، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۳- مرکز تحقیقات آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران
Email: N_soleimani@sbu.ac.ir

چکیده

مقاومت به کاربا‌پنم در بین ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو (MDR)، یک نگرانی جهانی در حال افزایش در مراکز بهداشتی است. کلبسیلا پنومونیه یکی از مهم ترین علل عفونت های بیمارستانی است. کلیستین به عنوان آخرین راه حل برای مقابله با کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو ، در سطح جهان گزارش شده است. هدف از این مطالعه شناسایی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بررسی ژن‌های *mcr* و ارتباط کلونال این ایزوله ها به روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس (PFGE) می باشد. ۵۰ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کاربا‌پنم از سه بیمارستان در ایران جمع‌آوری شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله ها با روش انتشار دیسک ارزیابی شد. ژن های *mcr-۱* با روشPCR بررسی شدند. ارزیابی ویژگی‌های ژنومی این ایزوله ها با استفاده از پالس فیلد ژل الکتروفورزیس انجام شد. همه ایزوله ها به مروپنم مقاوم بودند و نتایج نشان داد که همه ایزوله ها XDR بودند. از مجموع این ایزوله ها ۳۸ درصد به عنوان مقاوم در برابر کلیستین شناسایی شدند. همچنین ژن‌های *mcr-1* در ۶ درصد از ایزوله ها شناسایی شد. تمامی ایزوله ها در چهار خوشه (A-D) گروه بندی شدند. خوشه اصلی مربوط به خوشه C شامل ۲۳ ایزوله بود. کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کلیستین در حال تبدیل شدن به یک تهدید مهم در بیماران بستری در بیمارستان است که گزینه های درمانی را محدود می کند. بنابراین جهت کاهش انتشار سویه‌های مقاوم به کلیستین در بیمارستان‌ها و متعاقباً انتقال عفونت به بیماران، نیازمند اجرای یک سیستم کنترل عفونت موثر و نظارت دقیق می باشیم.

کلمات کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی بیوتیکی، *mcr-۱* ، PFGE

Molecular typing and detection of *mcr*-1 genes in carbapenem-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Iranian hospitals by pulse field gel electrophoresis and PCR methods

Neda Razavi Davoodi[1], Neda Soleimani [2*], Marjan Rahnamaye-Farzami[3]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran
[2]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran

[3] Research Center of Health Reference Laboratory, Ministry of Health and Medical Education, Tehran

Email: N_soleimani@sbu.ac.ir

Abstract

Carbapenem resistance among multidrug-resistant (MDR) *K. pneumoniae* is a growing global concern among healthcare systems. *Klebsiella pneumoniae* is one of the most important causes of nosocomial infections. Colistin is considered as the last-resort therapeutic agents against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, has been reported globally. The purpose of this study was to identify antibiotic resistance patterns, to investigate *mcr* genes and the clonal relationship of these isolates by Pulsed Field Gel Electrophoresis method (PFGE). Fifty clinical isolates of the carbapenem-resistant *K. pneumoniae* were collected from three hospitals in Iran. Antibiotic resistance of the isolates was assessed by the disk diffusion method, the presence of *mcr-1* genes was done by PCR. PFGE was used to assess the genomic features of the bacterial isolates. We identified all of the isolates were resistant to meropenem and results showed that all of them are XDR phenotype. Among the total isolates 38% were identified as colistin-resistant by colistin disk elution. Additionally, The *mcr-1* genes were detected in 6% of isolates. All isolates were grouped under four clusters (A-D). The major cluster was related to the C cluster with 23 isolates. Colistin resistant *K.pneumoniae* is becoming an emerging threat in hospitalized patients ,limiting further treatment options. Therefore, hospitals need to implement an effective infection control system and stringent surveillance to prevent the outbreak of colistin-resistant isolates and decrease the spreading of these strains within the hospitals and subsequently the transmission of the infection to patients.

Keywords: *Klebsiella pneumonia*, Antibiotic resistance, *mcr-1* , PFGE

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ISC ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

واریانت تک‌نوکلئوتیدی CD44- rs9666607A>G به عنوان یک عامل محافظتی در ابتلا به سقط مکرر جنین در جمعیت مازندران

یگانه مومنی[۱]؛ اباصلت حسین‌زاده کلاگر[۲*]، محمدکاظم حیدری[۳*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۲. استادتمام گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۳. دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

*ایمیل نویسندگان مسئول مکاتبات: ahcolagar@umz.ac.ir; mohamadkazem_hs@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سقط مکرر خودبخودی (Recurrent spontaneous abortion/RSA) از جمله مشکلات متداول در سنین باروری است که به حداقل سه بارداری ناموفق قبل از هفته‌ی بیستم گفته می‌شود. واریانت‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNV) از ژن‌های درگیر در اتصالات سلولی می‌توانند (مانند ژن‌های لامینین‌ها، اینتگرین‌ها، کلاژن‌ها و *CD44*) به عنوان عوامل مهم اپی‌ژنتیک در ایجاد این عارضه باشند. پروتئین CD44، به عنوان یک گلیکوپروتئین سطح غشایی می‌تواند به لیگاندهای متعددی در ماتریکس خارج‌سلولی متصل شود.

هدف: تعیین ژنوتیپ‌های *CD44*-rs9666607 A>G با استفاده از تکنیک *tetra*-ARMS PCR و بررسی ارتباط آن‌ها با RSA در جمعیت استان مازندران در یک مطالعه‌ی موردی-شاهدی است.

روش کار: استخراج DNAی ژنومی از نمونه‌های خون وریدیِ ۲۴۰ فرد (۱۲۰ فرد سالم و ۱۲۰ فرد بیمار) صورت گرفت. تعیین ژنوتیپ‌ها پس از الکتروفورز محصولات تکثیری با استفاده از تکنیک *tetra*-ARMS PCR با دو جفت پرایمر شامل یک جفت خارجی (*OF:* 5'-GAATTCATCAGCTATGGTCTGC و *OR:* 5'-TCAATGTCCTCAATGTCTACCG)، جهت تکثیر قطعه ۴۷۲ جفت بازی در برگیرنده SNV، پرایمرهای داخلی *inF:* 5'- GGGATATCGCCAAACACCCAC برای شناسایی آلل G و پرایمر *inR:* 5'- TGTTGTCGAATGGGAGTCTTCTT جهت شناسایی آلل A، انجام شد. سپس تایید ژنوتیپ‌ها با استفاده از تعیین توالی مستقیم انجام شد و در ادامه تجزیه و تحلیل آماری آنها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 26 صورت گرفت.

نتایج و بحث: نتایج تجزیه و تحلیل ژنوتیپ‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های GG و AG+GG، و آلل G (به ترتیب با p-value برابر با ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۱) دارای ارتباط معنی‌داری با RSA ولی با ضریب بتا منفی است در حالی که ژنوتیپ AG (p-value= ۰/۷۲۵) فاقد هرگونه ارتباط آماری بود. نتایج حاصل از این یافته‌ها احتمال محافظتی‌بودنِ اللِ G در ابتلای به RSA در جمعیت مورد مطالعه را افزایش می دهد،

بطوریکه در افراد دارای ژنوتیپ AA نسبت به افراد با ژنوتیپ GG احتمال بروز RSA بیشتری وجود دارد. با این حال برای دست‌یابی به نتایج دقیق‌تر، نیاز به ارزیابی این واریانت ها در جمعیت های بزرگتر با نمونه بیشتر و مطالعه فراتحلیلی است.

کلمات کلیدی: ژن CD44؛ سقط مکرر خودبخودی؛ واریانت‌های تک نوکلئوتیدی؛rs9666607؛ tetra-ARMs

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Single Nucleotide Variant *CD44*-rs9666607 A>G as a Protective Factor Against Induced Abortion in Mazandaran

Yeganeh Momeni[1], Abasalt Hosseinzadeh Colagar[2]*, Mohammadkazem Heydari[3]*

1. MSc. student, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2. Full professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
3. PhD. student, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

***Co-corresponding authors e-mails:** ahcolagar@umz.ac.ir; mohamadkazem_hs@yahoo.com

Introduction: Recurrent spontaneous abortion (RSA) is one of the common problems in reproductive age, which is defined as at least three unsuccessful pregnancies before the 20th week. Single nucleotide variants (SNV) of genes involved in cell junctions (such as laminins, integrins, collagens, and *CD44* genes) can be important epigenetic factors in the development of this condition. CD44 protein, as a membrane surface glycoprotein, can bind to several ligands in the extracellular matrix.
Purpose: The purpose of this study is to determine *CD44*-rs9666607A>G genotypes using the *tetra*-ARMS PCR technique and investigate their relationship with RSA in the population of Mazandaran province in a case-control study.
Methods: Genomic DNA was extracted from the venous blood samples of 240 people (120 healthy people and 120 patient). Determination of genotypes after electrophoresis of amplification products using the *tetra*-ARMS PCR technique with two pairs of external primers (including: *OF*: 5'-GAATTCATCAGCTATGGTCTGC and *OR*: 5'-TCAATGTCCTCAATGTCTACCG), which amplified a 472 bp SNV flanked fragment, and two internal primers of *inF*: 5'- GGGATATCGCCAAACACCCAC (for detection of G allele) and inR: 5'- TGTTGTCGAATGGGAGTCTTCTT (for detection of A allele). Then, the genotypes were confirmed by direct sequencing, and their statistical analysis was done using SPSS ver. 26 software.
Results and discussion: The results of genotype analysis showed that GG and AG+GG genotypes, and G allele (with a p-value= 0.001, 0.002, and 0.001, respectively) have a significant relationship with RSA. But its beta coefficient is negative. While the AG genotype (p-value= 0.725) did not have any statistical relationship. The results of these findings increase the possibility of the G allele being protective in RSA in the studied population so that people with AA genotype are more likely to have RSA than people with GG genotype. However, to obtain more accurate results, there is a need to evaluate these variants in larger populations with more samples and meta-analysis studies.

Keywords: *CD44* gene; Recurrent spontaneous abortion; SNV; rs9666607; *tetra*-ARMs PCR.

بررسی تغییرات بیان ژن vtRNA2-1 در آدنوکارسینومای معده

فائزه باوفا*[۱]، دکتر زیور صالحی[۲]، دکتر حمید سعیدی ساعدی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، رشت، ایران
۲. استاد ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳. دانشیار رادیوتراپی/انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک. faeze.bavafa1995@gmail.com

چکیده

یک زیر گروه از RNA های غیرکدکننده، RNA های vault هستند که ابتدا به عنوان اجزای کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی به نام « vault » کشف شدند. در انسان، چهارvtRNA وجود دارد که تغییرات بیان آنها اغلب در انواع سرطان ها گزارش شده است. vtRNA2-1، آخرین ncRNA کوچکی بود که به عنوان رونوشت مرتبط با ذرات vault شناسایی شد و به نظر می رسد نقش سرکوبگر تومور را دارد. vtRNA2-1 آپوپتوز و تکثیر را از طریق تداخل با پروتئین کینازR (PKR) که یک فاکتور پیش برنده آپوپتوز است، تنظیم می کند. PKR قادر است فاکتور شروع eIF2α را فسفریله کند و از ترجمه mRNA های بیشتر جلوگیری کند. هدف ما در این مطالعه بررسی تغییرات بیان *vtRNA2-1* در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم معده در مقایسه با افراد سالم بود. RNA کل از خون ۵۰ بیمار و ۵۰ فرد سالم با استفاده از TRIZol استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتر UV و الکتروفورز ژل بررسی شد. پس از سنتز cDNA، پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر توالی هدف طراحی شدند. بیان ژن نسبی *vtRNA2-1* با Real-time PCR ارزیابی شد. از U6 به عنوان ژن کنترل استفاده شد. داده های به دست آمده توسط نرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج کاهش معناداری در میزان بیان *vtRNA2-1* در بیماران نسبت به نمونه های شاهد نشان داد (۰/۱۶±۳/۹۹ در مقابل ۰/۳۶±۴/۵۵، p<۰/۰۰۰۱). با این حال، ارتباط معنی داری بین سطح بیان vtRNA2-1 و مرحله سرطان وجود نداشت. در نتیجه، کاهش بیان vtRNA2-1 در آدنوکارسینوم معده ممکن است با پاتوژنز بیماری مرتبط باشد.

کلمات کلیدی: vtRNA2-1 ; vault; آدنوکارسینومای معده; بیان ژن; سرکوبگر تومور

Evaluation of *vtRNA2-1* expression in gastric adenocarcinoma

Faezeh Bavafa[1*], Dr. Zivar Salehi[2], Dr. Hamid Saidi Saedi[3]

[1]*Master's student in genetics, University of Guilan, faeze.bavafa1995@gmail.com

[2] Professor in molecular genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

[3] Associate Professor in Radiotherapy/ Oncology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Abstract:

Recent studies revealed a class of highly conserved small noncoding RNAs, namely vault RNAs, as regulators of several cellular homeostasis mechanisms and tumorigenesis. In human genome, four vtRNAs are encoded on chromosome 5q31. vtRNA2-1 was the last small ncRNA to be identified as a vault particle-associated transcript and its role as a tumor suppressor has been reported in previous studies. It regulates apoptosis and proliferation by interfering with the protein kinase R (PKR), which is a pro-apoptosis factor. Active PKR is able to phosphorylate the initiation factor eIF2α, thereby inhibiting further mRNAs translations. vtRNA2-1 directly binds PKR, competing for its activation. The purpose of this study was to evaluate *vtRNA2-1* expression level in patients suffering from gastric adenocarcinoma compare with healthy individuals. Total RNA was extracted from 50 cases and 50 controls blood samples by TRIzol and quantified using UV-spectrophotometer as well as gel electrophoresis. After cDNA synthesis, specific primers were designed for target sequence amplification. The relative vtRNA2-1 gene expression was assessed with Real-time PCR and normalized to *U6* as a house keeping gene. Finally, the obtained data were evaluated by SPSS software. The results showed that vtRNA2-1 exhibited significantly decreased expression in cases relative to the control samples (3.99±0.16 vs 4.55±0.36, $p<0.0001$). However, there was no significant correlation between vtRNA2-1 expression level and stage of cancer. In conclusion, down regulation of vtRNA2-1 in gastric adenocarcinoma may be related to the pathogenesis of the disease.

Keywords: *gastric cancer; vtRNA2-1; gene expression; vault; tumor suppressor*

بافت هوشمند

محمدرضا عشائری[۱*]، امین هراتیان[۲] ، محمد درودیان[۳]

۱. زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه خوارزمی تهران، Mohammadreza.ashayeri@gmail.com
۲. زیست شناسی سلولی مولکولی دانشگاه خوارزمی تهران، ایران، aamin.haratian@gmail.com
۳. دانشکده علوم زیستی، استادیار گروه علوم زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران، mddian@yahoo.com

چکیده

بافت‌های هوشمند، بافت‌هایی هستند که مجهز به سیستم‌های الکترونیکی و حسگرهایی هستند که این بافت‌ها را قادر می سازند تا به پیرامون خود و واکنش‌های مختلف بدن، واکنش نشان دهند. بافت‌های هوشمند از دو بخش اساسی تشکیل شده‌اند: بخش الکترونیکی و بخش بافتی. بخش الکترونیکی شامل حسگرها، فرستنده‌ها، پردازنده‌ها و منبع تغذیه است، درحالی که بخش بافتی شامل سلول‌ها، بافت‌های مختلف و فضای خالی بین سلول‌ها است.

برای ساخت این بافت ابتدا باید حسگرها و فرستنده‌ها را درون بافت قرار داد که می‌تواند به دو روش بدون درد و با درد انجام شود. در روش اول، سلول‌های بافتی به کمک یک محلول الکترولیتی که شبیه به مایع بدن است، از هم جدا شده و با استفاده از تکنیک‌هایی مانند نانوتکنولوژی و میکروفلوئیدیکس، حسگرها و فرستنده‌ها درون آن‌ها قرار می‌گیرند. در روش با درد از روش‌های جراحی مانند برش، کراتاکتومی استفاده می‌شود تا بافت‌ها به دقت لایه به لایه از بین رفته و حسگرها و فرستنده‌ها درون آن‌ها قرار گیرند.

اگر بافت بدن آسیب ببیند، بافت‌های هوشمند می توانند به دقت بسیار بالا محل آسیب را تشخیص داده و به شکل هوشمندانه و اتوماتیک واکنش نشان دهند. بافت‌های هوشمند وظیفه نظارت و تشخیص زود هنگام بیماری‌ها را نیز به عهده می‌گیرند. بافت‌های هوشمند قابلیت شناسایی و جذب مواد شیمیایی خطرناک از بدن را دارند و به ساخت بافت‌های مصنوعی با خصوصیات کاملاً شبیه به بافت‌های زنده کمک می کند.

درکل، بافت‌های هوشمند از هر نوع بافتی که دارای قابلیت هوشمندی و قابلیت ارتباط با دنیای خارج از خود دارند، ساخته شوند.

کلمات کلیدی: بافت هوشمند، حسگر، تشخیص پزشکی

Smart Textiles

Mohammadreza Ashayeri [1*], Amin Haratian[2], Mohammad Doroudian [3]

1. Cellular and Molecular Biology student, Kharazmi University, Tehran, Iran

mohammadreza.ashayeri01@gmail.com

2. Cellular and Molecular Biology student, Kharazmi University, Tehran, Iran, aamin.haratian@gmail.com

3. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

mddian@yahoo.com

Abstract

Smart textiles are fabrics equipped with electronic systems and sensors that enable them to react to their surroundings and various bodily responses. Smart textiles are composed of two essential parts: the electronic component and the textile component. The electronic component includes sensors, transmitters, processors, and power sources, while the textile component consists of cells, various tissues, and empty spaces between cells.

To create these textiles, sensors and transmitters must be placed inside the fabric, which can be done in two ways: painlessly or with pain. In the first method, tissue cells are separated using an electrolytic solution that is similar to bodily fluids, and sensors and transmitters are placed inside them using techniques such as nanotechnology and microfluidics. In the pain method, surgical techniques such as incision and keratectomy are used to remove tissue layers precisely and place sensors and transmitters inside them.

If the body's tissue is damaged, smart textiles can detect the site of the injury with extremely high accuracy and respond in a smart and automatic manner. Smart textiles are also responsible for monitoring and diagnosing diseases at an early stage. They have the ability to identify and absorb dangerous chemicals from the body and help create artificial tissues with properties that are very similar to living tissues.

In general, smart textiles can be made from any type of fabric that has smart and communicative capabilities with the outside world.

Keywords: Smart tissue, Sensor, Medical diagnosis

ژن های درگیر با گیرنده B2 برادی کینین در ادم مغزی ناشی از بیماری COVID-19: یک مطالعه کامپیوتری

محمدرضا حسین زاده [۱]؛ عباس نیکویی [۲]، محمدکاظم حیدری [۳*]

۱. دانشجوی کارشناسی گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۳. دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: mohamadkazem_hs@yahoo.com

چکیده

مقدمه: بیماری کرونا یا COVID-19، که توسط ویروس SARS-CoV-2 ایجاد می شود، پستانداران از جمله انسان ها را درگیر می‌کند. گزارشات قبلی افزایش بیان برخی از ژن ها از جمله پروتئین گیرنده B2 برادی کینین (BDKRB2) را در ایجاد ادم مغزی، که از عوارض این بیماری است، در افراد مبتلا نشان می دهد.

هدف: بررسی ژن های درگیر با BDKRB2 در بیماری ادم مغزی ناشی از بیماری COVID-19 با استفاده از مطالعات کامپیوتری است.

روش کار: در این مطالعه از پایگاه های داده مختلف برخط از جمله سایت NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) و MalaCards (https://www.malacards.org) و GeneMANIA (https://genemania.org) استفاده شد.

نتایج و بحث: مطالعات ما نشان داد که ژن IL6 نیز با BDKRB2 هم بیانی دارد. از طرف دیگر IL6 با آنزیم cyclic GMP-AMP synthase (CGAS) و آنزیم تراغشایی سرین پروتئاز۲ (TMPRSS2) نیز هم بیانی دارند. لذا افزایش بیان ژن IL6 علاوه بر اینکه خود باعث ایجاد اختلال در عملکرد سد اندوتلیال می شود سبب افزایش نفوذپذیری اندوتلیال نیز می گردد که ممکن است تحت شرایط مختلف به ایجاد ادم کمک کند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد مطالعه مهار ادم مغزی با مهار بیان IL6 در افراد مبتلابه Covid 19 به عنوان یک استراتژی در مدیریت کنترل و پیشگیری از بروز عوارض ادم مغزی مورد توجه محققین قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ادم مغزی؛ اینترلوکین۶؛ بیماری کرونا؛ تجزیه تحلیل کامپیوتری؛ گیرنده B2 برادی کینین

Genes Involved in Bradykinin Receptor B2 in Cerebral Edema Caused by COVID-19 Disease: A Computational Study

Mohammadreza Hosseinzadeh[1], Abbas Nikoei[2], Mohammadkazem Heydari[3]*

1. BSc. student, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2. MSc. student, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
3. PhD. student, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

*Corresponding author e-mail: ahcolagar@umz.ac.ir

Abstract

Introduction: Corona disease or COVID-19, which is caused by the SARS-CoV-2 virus, affects mammals, including humans. Previous reports show the increased expression of some genes, including bradykinin B2 receptor protein (BDKRB2), in the development of brain edema, which is one of the complications of this disease, in affected people.

Purpose: Using computational methods to look into the genes associated with BDKRB2 in the COVID-19-induced cerebral edema illness.

Methods: In this study, various online databases including the NCBI website (https://www.ncbi.nlm.nih.gov), MalaCards (https://www.malacards.org), and GeneMANIA (https://genemania. org) were used.

Results and discussion: Our research revealed that IL6 and BDKRB2 have co-expression. On the other hand, IL6 co-expresses with serine protease 2 (TMPRSS2) and cyclic GMP-AMP synthase (CGAS). Therefore, the increase in IL6 gene expression, in addition to disrupting the function of the endothelial barrier, also causes an increase in endothelial permeability, which may contribute to the development of edema under different conditions. Therefore, it is suggested that the study of inhibiting cerebral edema by inhibiting the expression of IL6 in people suffering from Covid 19 should be considered by researchers as a strategy in the management, control, and prevention of complications of cerebral edema.

Keywords: Cerebral edema; Interleukin 6; Coronavirus disease; Computational study; Bradykinin B2 receptor

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

تهیه سبزنانوذرات اکسید منیزیم با استفاده از عصاره گیاه *Otostegia persica* و بررسی خواص آنتی اکسیدان آنها

فاطمه ریگی* [۱]

۱. استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان
rigi.fatemeh625@gmail.com

چکیده

گیاه *Otostegia persica* با نام محلی گلدر از خانواده Labiateae ،گیاهی بومی و دارویی منطقه بلوچستان در ایران است. این گیاه به دلیل خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد دیابتی به طور محلی-سنتی برای درمان بیماری های مختلف مانند دیابت، سرماخوردگی، روماتیسم و ناراحتی های معده استفاده می شود. بسیاری از انواع ترکیبات آلی همچون ترپنوئیدها، فنل ها و فلاونوئیدها در این گیاه دارویی گزارش شده است.

نانوذره اکسید منیزیم یک نانوذره مهم صنعتی با خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد مانند هدایت حرارتی و پایداری بالا، ضریب شکست خوب و مقاوم در برابر خوردگی است. به علت این خواص منحصر به فرد، این نانوذرات به عنوان جاذب آلاینده های فاضلاب، حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی، کاتالیزور در واکنش های آلی و مواد نیمه رسانا استفاده می شود. چندین روش فیزیکی و شیمیایی برای تهیه نانوذرات اکسید منیزیم (MgO-NPs) تاکنون گزارش شده است. اما این روش ها برای آماده‌سازی (MgO-NPs) به انرژی بالا و تجهیزات قوی نیاز دارند. در سال‌های اخیر، به دلیل رویکرد پردازش اقتصادی و سازگار با محیط‌زیست، محققان برای تهیه نانوذرات منیزیم از عصاره گیاهان قبلی متمرکز شده‌اند.

در این تحقیق، نانوذرات منیزیم توسط عصاره الکلی-آبی گیاه گلدر(*Otostegia persica*) در دمای ۶۰ درجه تهیه شدند. ساختار نانوذرات تهیه شده با روش های دستگاهی شامل FT-IR، XRD، FESEMو EDX شناسایی شدند. نتایج نشان داد که اندازه متوسط نانوذرات تهیه شده با استفاده از گیاه گلدر بین ۲۰ تا ۳۰ نانومتر و کروی شکل است. در ادامه فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات منیزم با استفاده از روش رادیکال DPPHتعیین شد. این روش تایید کرد که نانوذرات منیزیم تهیه شده خواص آنتی اکسیدانی بسیار خوبی همچون عصاره گیاه *Otostegia persica* از خود نشان می دهند.

کلمات کلیدی: نانوذرات، شیمی سبز، اکسید منیزیم، عصاره گیاه

Green fabrication of MgO nanoparticles using *Otostegia persica* plant extract and their antioxidant activities

Fatemeh Rigi [a*]

[a] *Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, Higher Education Complex of Saravan*

[*]rigi.fatemeh625@gmail.com

Abstract

Otostegia persica belongs to the Labiateae family and is a native and medicinal plant in Baluchestan region of Iran. Due to the antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-diabetic properties of the *Otostegia persica*, it has been traditionally used for treating different diseases, such as diabetes, colds, rheumatism, and gastric discomforts. Many types of organic compounds, terpenoids, phenols, and flavonoids have been reported in phytochemical investigations of this medicinal plant.

Magnesium oxide (MgO) is an industrially important nanoparticle with exclusive physicochemical behaviors such as high thermal conductivity, stability, flame-resistance, outstanding refractive index, and excellent corrosion resistance. MgO nanoparticles (MgO-NPs) are used as the sorbent for contaminants from wastewater, electrochemical biosensors, catalyst in organic transformations, and semi-conducting materials. Several physical and chemical techniques have been applied for the preparation of MgO-NPs. However, these techniques need high energy and solidly built equipment to prepare the MgO-NPs. In recent years, researchers have been focused on the plant-mediated synthesis of MgO-NPs instant of previous methods, because of the economical and environmentally-friendly processing approach.

In this work, MgO-NPs were synthesized by the ethanolic extract of *Otostegia persica* plant and characterized by FT-IR, XRD, FESEM, and EDX. The results showed that the average size of MgO nanoparticles were found to be 20-30 nm. The antioxidant activity of biosynthesized MgO NPs was determined by means of the test using the DPPH radical method. This method confirmed that the MgO-NPs exhibit very good antioxidant properties as well as *Otostegia persica* plant extract.

Keywords: Nanoparticles, Green Chemistry, Magnesium oxide, Plant extract

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

استخراج و شناسایی ترکیبات شیمیایی پودر و روغن هسته خرما از دو نوع خرمای منطقه سراوان

فاطمه ریگی*[۱]

۱.. استادیارگروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان
, f.rigi@saravan.ac.irrigi.fatemeh625@gmail.com

چکیده

گزارش های مختلفی در مورد کاربردهای گسترده هسته خرما (Phoenix dactylifera)و روغن هسته خرما وجود دارد. این روغن به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنلی، اسیدهای چرب و آنتی اکسیدان ها با پایداری اکسیداتیو و حرارتی بالا، یکی از با ارزش ترین روغن های گیاهی محسوب می شود. در این تحقیق روغن از دو رقم هسته خرما (ربی و مضافتی) در سراوان (منطقه بلوچستان) استخراج شد. برای استخراج روغن از سه روش سوکسله، فراصوت و خیساندن استفاده شد و نتایج به‌دست‌آمده با هم مقایسه شدند. اثر اندازه ذرات پودرهسته خرما بر بازده روغن استخراج شده مشهود بود. هرچه اندازه ذرات پودرهسته خرما کوچکتر باشد بازده روغن بدست امده بیشتر است در روش سوکسله بالاترین بازده روغن اما با مقدار حلال بیشتر بدست آمد. در روش فراصوت زمان روغن گیری (۱ ساعت) نسبت به روش سوکسله (۶ ساعت) و خیساندن (۳ روز) کاهش یافت اما مقدار حلال کمتری نسبت به روش سوکسله استفاده شد. مقادیر بدست امده بعد از توزین دو رو غن هسته خرمای ربی و مضافتی نشان داد، ماکزیمم بازده روغن بدست آمده برای هسته خرمای ربی ۱۲ درصد و برای هسته خرمای مضافتی حاوی ۸/۵ درصد است. روغن استخراج شده با طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه FT-IR و UV-Vis مشخص شد. ترکیبات اسیدهای چرب روغن هسته خرما با روش کروماتوگرافی گازی-جرمی (GC-MS) شناسایی شد. نتایج GC-MS نشان داد اسید اولئیک با محتوای ۴۳ درصد جزء اصلی اسیدهای چرب در هر دو نوع نخل خرما است. همچنین پودرهای هسته خرما با تکنیک های FT-IR و SEM مشخص شدند.

کلمات کلیدی: روغن هسته خرما، کروماتوگرافی، اسید چرب، استخراج

Extraction and characterization of the chemical composition of date palm (*Phoenix dactylifera*) kernel and date palm kernel oil from two date palm cultivars growing in the Saravan region

Fatemeh Rigi [1, *]

[1] Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, Higher Education Complex of Saravan, Saravan, Iran

[*] rigi.fatemeh625@gmail.com

Abstract

There are various reports on the extensive applications to date palm kernels and date palm kernel oil. This extracted oil is considered one of the most valuable vegetable oils due to its richness in phenolic compounds, fatty acids, and antioxidants with oxidative and high thermal stability.

In this work, the oil was extracted from the two date palm kernel cultivars (Rabbi and Mazafati) growing in Saravan (Baluchestan region of Iran). The three methods such as Soxhlet, sonication, and maceration were used for the extraction of oil and the obtained results were compared. the effect of particle size on the yield of oil was clear and the decrease in particle size led to an increase in oil yield. In the Soxhlet method, the highest oil yield was obtained with a higher amount of solvent. In the ultrasonic method, the oil extraction time (1 hour) was reduced compared to the Soxhlet method (6 hours) and soaking (3 days), but a smaller amount of solvent was used than the Soxhlet method. The values obtained after weighing the oils showed that the maximum yield of oil obtained for the Rabi and the Mozafati are 12% and 8.5% respectively. The extracted oil was characterized by FT-IR and UV-Vis spectroscopy. The fatty acid compositions of the date palm kernel oil were detected by the GC-MS technique. GC-MS results showed oleic acid with contents of 43% is the main component among fatty acids in both variety of date palms. Also, Date palm kernel powders were characterized by FT-IR and SEM techniques.

Keywords: Date Palm, Oil, Fatty Acid, Extraction

درمان های نوین و هدفمند سرطان

محمد کردکتولی[1*]، سید ابولقاسم محمدی بندارخیلی[2]

۱.باشگاه پژوشگران جوان و نخبگان، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.
۲.گروه زیست شناسی، واحد گرگان ، دانشگاه آزاد اسلامی ، گرگان ، ایران .
mohammad.kordkatouli@outlook.com

چکیده

سرطان بیماری هست که سالها هست میزان شیوع آن رو به افزایش هست .بیماری سرطان در رتبه دوم مرگ میر جهان است.در بیماری سرطان عوامل ژنتیکی ، اپی ژنتیکی و محیطی موثر است. همچنین میزان پیشرفت بیماری به عواملی همچون ایمنی شناختی ، ژنتیکی و محیطی تاثیرگزار هست. سلول های سرطانی از قانون موجود در سلول های انسانی تبعیت نمی کنند و آنها را نقض می کنند . برای درمان سرطان می توانم از RNAهای غیر کد شوند استفاده کرد که بدین ترتیب از بیان ژن های سلولی سرطانی را مهار می کنند . در این مقاله مروری به درمان های نوین و هدفمند سرطان در مجله های معتبر علمی خارجی و داخلی مورد تحلیل و تجزیه قرار گرفته است. در درمان سرطان می توانیم از IncRNA، siRNA و microRNA استفاده کرد که به ترتیب طول تقریبی آن حدود ۲۰۰ نوکلوتئید ، ۲۱-۲۳ نوکلئوتید ، ۲۱-۱۹ نکلوتئید که نقش های مشابه هم دارند هر سه آنها در بیان ژن نقش دارند ولی بیشتر نقش را microRNAها دارند البته می توان گفت siRNAها هم جزو microRNA ها هستند که غیر کد شونده هستند که می توانند از بیان ژن سلول های سرطان جلوگیری کنند برای انتقال RNA های غیر کد شونده به دنبال سنتز آنها می توانیم از نانو کمپلکس های که خاصیت ضد سرطانی دارند مثل طلا،الماس، نقره و پلاتین استفاده کرد که سه هدف مهم در بر دارد۱-حفظ انها از تخریب ۲- افزایش انها تراکم انها در اندام هدف و ۳- تسهیل جذب سلولی انها خواهد بود. در این مقاله مروری به پشرفت های نوین بشر در درمانهای هدفمند سرطان و کمپلکس سازی انها در سالهای اخیر پرداخته شد. ولی همچنان نیاز به مطالعات بیشتر خواهد بود

کلمات کلیدی: siRNA، microRNA، IncRNA، کمپلکس سازی، درمان هدفمند

New and targeted cancer treatments

Mohammad Kordkatouli[1*], Seyed Abolghasem Mohammadi Bondarkhilli[2]
1.Young Researchers and Elite Club, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
2. Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
mohammad.kordkatouli@outlook.com

Abstract

Cancer is a disease that has been increasing for years. Cancer is the second-leading cause of death in the world. Genetic, epigenetic, and environmental factors are effective in the occurrence of cancer. Also, the progression of the disease is influenced by factors such as cognitive, genetic, and environmental immunity. Cancer cells do not follow the rules of human cells and violate them. Non-coding RNAs can be used to treat cancer by preventing the expression of cancer cell genes. In this article, a review of new and targeted cancer treatments in reputable foreign and domestic scientific journals has been analyzed and investigated. IncRNA, siRNA, and microRNA can be used in cancer treatment; their approximate lengths are about 200 nucleotides, 21–23 nucleotides, and 19–21 nucleotides, respectively, and they have similar roles. All three of them play a role in gene expression, but mostly microRNAs, although we can say that siRNAs are also non-coding microRNAs that can prevent gene expression in cancer cells. To transfer non-coding RNAs, following their synthesis, we can use nanocomplexes that have anticancer properties. It is used like gold, diamond, silver, and platinum, which have three important purposes: 1) protecting them from degradation; 2) increasing their density in the target organ; and 3) facilitating their cellular absorption. In this article, an overview of modern advances in targeted cancer treatments and their complexity in recent years is discussed. But more studies are still needed.

Key words: siRNA,microRNA,IncRNA,complexification,Targeted therapy

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

کارایی پرورش به روش تکه تکه شدن برمیزان مرگ و میر، رشد و بازسازی چهار گونه مرجان آبسنگ ساز شاخه ایی Acropora downingi ، توده ایی Platygyra daedalea و انگشتی Porites harrisoni و Porites lutea

علیرضا فانی [*۱] ، محمدرضا شکری [۲]

۱- علیرضا فانی، دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۲- محمد رضا شکری، دانشیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

علیرضا فانی: a.fani@mail.sbu.ac.ir

چکیده

آبسنگ های مرجانی یکی از مولد ترین و متنوع ترین اکوسیستم های بیولوژیکی در جهان در بیش از ۱۰۰ کشور و منطقه وجود دارند. در حالی که آبسنگ های مرجانی تنها ۰/۲٪ از بستر اقیانوس ها را پوشش می دهند، با این حال حداقل ۲۵٪ از گونه های دریایی را پشتیبانی می کنند و زیربنای ایمنی، حفاظت از ساحل، رفاه، امنیت غذایی و اقتصادی صدها میلیون نفر هستند. با این حال، صخره‌های مرجانی یکی از آسیب‌پذیرترین اکوسیستم‌های روی کره زمین در برابر فشارهای طبیعی و انسانی از جمله تهدیدات ناشی از تغییرات جهانی آب و هوا و اسیدی شدن اقیانوس‌ها، اثرات محلی ناشی از آلودگی‌های خشکی مانند ورودی مواد مغذی و رسوبات حاصل از کشاورزی، آلودگی هایی دریایی، صید بی‌رویه و شیوه های ماهیگیری مخرب هستند. آبسنگ های مرجانی خلیج فارس نیز مانند سایر مرجانهای جهان در معرض تخریب و نابودی هستند. بنابراین نیاز است تا این اکوسیستم ها از روش های متفاوت احیا و بازسازی شوند. امروزه روش های متعددی برای احیای آبسنگ های مرجانی در حال توسعه و تحقیق هستند که تکثیر به روش جنسی و غیر جنسی را شامل میشود. مطالعه حاضر به بررسی میزان کار آمدی تکثیر غیر جنسی مرجان های سخت به روش تکه تکه کردن در آب های جزیره قشم در خلیج فارس پرداخته است. در طی این مطالعه چهار گونه مرجان آبسنگ ساز شاخه ایی *Acropora downingi*، توده ایی *Platygyra daedalea* و انگشتی *Porites harrisoni* و *Porites lutea* در طی ۱۲ ماه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مقایسه رشد وزنی نمونه های اولیه و وزن نهایی نمونه ها نشان داد که بیشترین میزان رشد متعلق به مرجان شاخه ای *A. downingi* با رشد ۱۹۰٪ ، سپس *P. lutea* با رشد ۸۵٪ و به ترتیب دو گونه ی *P. daedalea* و *P. harrisoni* با رشد ۸۱٪ و۷۱٪ است. با توجه به اینکه هیچ مرگ میری در طی این پژوهش در مرجان های

مورد مشاهده نشد و بررسی های سلامتی مرجان ها به وسیله ی چارت Coral Watch نشان از سلامت کامل نمونه ها داشت میتوان این روش را یک روش مناسب جهت احیا و تکثیر مرجان ها در آب های خلیج فارس دانست.

کلمات کلیدی : تکه تکه شدن؛ رشد مرجان؛ تولید مثل غیرجنسی؛ احیای مرجان سخت

The efficiency of cultivation through the method of macro-fragmentation on the mortality rate, growth, and regeneration of four species of branching coral, *Acropora downingi*, massive *Platygyra daedalea*, and finger corals *Porites harrisoni* and *Porites lutea*

Alireza Fani [1*], Mohammad Reza Shokri [2]

1- Alireza Fani, Marine Biology MSc student, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran
2- Mohammad Reza Shokri, Associate Professor, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University

Alireza Fani: a.fani@mail.sbu.ac.ir

Abstract:

Coral reefs are one of the most productive and diverse biological ecosystems in the world and exist in more than 100 countries and regions. While coral reefs cover only 0.2% of the oceans seabed, they support at least 25% of marine species and underpin the safety, coastal protection, well-being, food, and economic security of hundreds of millions of people. Yet, coral reefs are one of the most vulnerable ecosystems on the planet to natural and anthropogenic pressures, including threats from global climate change and ocean acidification, local impacts from land-based pollution such as the input of nutrients and sediments from agriculture, marine pollution, overfishing and destructive fishing practices. The coral reefs of the Persian Gulf, like other corals in the world, are subject to degradation. Therefore, it is necessary to restore and rehabilitate these ecosystems in different ways. Currently, several methods are being developed and researched to restore coral reefs, which include sexual and asexual reproduction. The present study investigated the effectiveness of the asexual reproduction of hard corals by fragmentation method in the waters of Qeshm Island in the Persian Gulf. During this study, four species of corals, branching *Acropora downingi*, massive *Platygyra daedalea*, and submassive *Porites harrisoni* and *Porites lutea* were investigated for 12 months. The results of comparing the weight growth of the initial samples and the final weight of the samples showed that the highest growth rate belongs to the branching coral *A. downingi* with a growth of 190%, then *P. lutea* with a growth of 85% and two species *P. daedalea* and *P. harrisoni* with the growth of 81% and 71%, respectively. Considering that no mortality was observed in the corals during this study and the health checks of the corals using the Coral Watch chart showed that the samples were completely healthy, this method can be considered a suitable procedure for rearing and restoring corals in the Persian Gulf.

Keywords: Macro-fragmentation ؛Coral growth ؛Asexual reproduction ؛Coral restoration

آنالیز مورفولوژی نانو ذره نقره سنتز شده با عصاره بذر گیاه *Tribulus terrestris*

نوشین بیجاری [*۱]، سارا شریفی [۲]

۱.استادیار - گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲. استادیار - گروه زیست شناسی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاداسلامی، کرمانشاه، ایران
[*] E-mail: n.bijari@semnan.ac.ir

چکیده

مقدمه: تکنولوژی های مبتنی بر ساخت مواد در ابعاد نانو امکان ساخت و طراحی موادی را فراهم می کنند که دارای خواص و ویژگی های جدید بوده و اندازه آن ها در مقیاس 1 تا 100 نانومتر می باشد. بسیاری از نانوذرات به روش های شیمیای یا فیزیکی تهیه می شوند، اما به دلیل استفاده از ترکیبات شیمیایی خطرناک، سمی و تاثیرات نامطلوب زیست محیطی نگرانی های زیادی را ایجاد کرده است. امروزه روش سنتز سبز نانوذرات به دلیل زیست سازگار بودن، هزینه پایین و کاهش سمیت تاحد زیادی مورد توجه قرار گرفته اند.

روش کار: خصوصیات مورفولوژیکی نانوذرات نقره سنتز شده، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی Scanning Electron Microscopy, SEM آنالیز شد. ۱۰۰میکرولیتر از نانوذره سنتز شده روی صفحاتی از جنس پلاتین قرار داده شد و نمونه ها پس از خشک شدن با استفاده از دستگاه مدل (FEl XL30) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث: میکروسکوپ الکترونی روبشی، از مناسب‌ترین متد های در دسترس برای آنالیز مورفولوژی نانو ساختارها و شناسایی ترکیبات شیمیائی است. توانائی SEM برای بررسی سطح مواد بی نظیر بوده و امتیازات فراوان آن نسبت به میکروسکوپ‌های نوری قابل توجه است. تصاویر میکروسکوپ الکترون روبشی گسیل میدانی SEM از نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بذر*Tribulus terrestris* ، با بزرگنمایی ۱ µm تهیه شد و اندازه ذرات در حدود ۱۰۰ نانومتر گزارش شد، از طرفی تصویر SEM نشان دهنده ابعاد نانومتری ذرات نقره بوده و بیانگر شکل تقریبا کروی می باشد.

کلمات کلیدی: نانوذرات، میکروسکوپ الکترونی روبشی، زیست سازگار.

Morphological analysis of synthesized $AgNO_3$ nanoparticles according to plant seed extract of *Tribulus terrestris*

Nooshin Bijari *[1], Sara Sharifi[2]

[1] Assistant professor- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Semnan University, Semnan, Iran

[1] Assistant professor- Department of Biology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

* E-mail: n.bijari@semnan.ac.ir

Abstract

Introduction: Technologies based on the production of materials in nano dimensions provides the possibility of making and designing materials that have new properties and characteristics. Their size is on the scale of 1 to 100 nanometers. Nanoparticle synthesis can be performed by various methods such as physical, chemical, and biological approaches., but the use of hazardous and toxic chemicals and negative environmental effects have raised many concerns.. Today green synthesis method of nanoparticles is due to its biocompatibility, low cost and reducing toxicity has been extensively considered.

Method: The morphological characteristics of synthesized silver nanoparticles were analyzed using Scanning Electron Microscopy (SEM), 100 ml of synthesized nanoparticles were placed on platinum plates and after drying, the samples were examined using the SEM (FEl XL30).

Results and discussion: SEM is one of the most appropriate methods for analyzing nanostructure morphology and identifying chemical compounds. SEM's ability to examine the surface of materials is unique and has many benefits compared to optical microscopes. SEM images of silver nanoparticles synthesized with *Tribulus terrestris* seed extract were prepared and the size of the particles was reported to be about 100 nm and shows an almost spherical shape.

Key Words*:* Nanoparticles, Scanning Electron Microscopy, Biocompatible.

غلظت سرمی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی A (VEGFA) و بیان miR-410-3p در بیماران مبتلا به اندومتریوز

نیلوفر فردی باغی [۱*] ، فرهاد مشایخی [۲]، الهام هادی پور زیارتگاه [۳]

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

zzm98034@gmail.com*

چکیده

آندومتریوز به عنوان یک بیماری چند عاملی، تحت تأثیر عوامل هورمونی، ایمنی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی در نظر گرفته می شود. امروزه نقش miRNA ها و ژن های مختلف به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه و اثرگذار در اندومتریوز شناسایی شده اند. عروقی شدن یک علامت اصلی در پاتوژنز آندومتریوز است و از میان انواع سیستم های سیگنالینگ موثر در رگزایی، VEGFA/VEGFR فاکتور اصلی در تنظیم تکثیر و مهاجرت سلول های اندوتلیال و در نتیجه اتساع و نفوذپذیری عروق است. هدف از این مطالعه بررسی بیان miR-410-3pدر بافت اندومتریوم و همچنین یکی از ژنهای هدف آنها یعنی VEGFA موجود در خون، در دو گروه بیماران مبتلا به اندومتریوز و کنترل است.

تعداد ۱۰ نمونه بافت اندومتریوم بیماران مبتلا به اندومتریوز و نرمال همسان با سن، دریافت و Total RNA از آنها استخراج شد. سپس سنتز cDNA انجام پذیرفته و تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز کمی برای تعیین بیان miR-410-3p صورت گرفت. همچنین از سرم خون بیماران و گروه کنترل، تست الایزا انجام شد.

بررسی ها نشان داد که تفاوت میزان بیان ژن در دو گروه بیمار و کنترل، معنا دار بوده و نشان از تغییرات در بیان ژنی ست.

نتیجه‌گیری می‌شود که بیان ژن miR-410-3p در اندومتر و VEGFA در سرم بیماران مبتلا به آندومتریوز نسبت به گروه کنترل تغییر می‌کند، بنابراین پیشنهاد می‌شود که ممکن است عوامل کاندید برای پاتوژنز آندومتریوز باشند.

کلید واژه ها: اندومتریوز؛ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی؛miR-410-3p ؛ ریل تایم پی سی آر؛ الایزا

Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) serum concentration, miR-410-3p expression in patients with endometriosis

Niloofar Fardi Baghi [*1], Farhad Mashayekhi [2], Elham Hadipour Ziaratgah [3]

1. *M. S.* , Department of Biology, Faculty of Science, Gilan University, Rasht, Iran

2. *Ph.* , Department of Biology, Faculty of Science, Gilan University, Rasht, Iran

3.Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Gilan University, Rasht, Iran

zzm98034@gmail.com*

Abstract

Endometriosis is considered as a multifactorial disease, influenced by hormonal, immune, genetic and epigenetic factors. Nowadays, the role of miRNAs and different genes have been identified as potential and effective biomarkers in endometriosis. Angiogenesis is a main symptom in the pathogenesis of endometriosis, and among the types of signaling systems effective in angiogenesis, VEGFA/VEGFR is the main factor in regulating the proliferation and migration of endothelial cells and, as a result, the expansion and permeability of blood vessels. The aim of this study is to investigate the expression of miR-410-3p in endometrial tissue and also one of their target genes, VEGFA in blood, in two groups of patients with endometriosis and controls.

10 age-matched endometrial tissue samples from endometriosis and normal patients were obtained and total RNA was extracted from them. Then, cDNA synthesis was performed and quantitative polymerase chain reaction technique was used to determine the expression of miR-410-3p. Also, ELISA test was performed from blood serum of patients and control group.

Investigations showed that the difference in gene expression in both patient and control groups was significant and indicated changes in gene expression.

It is concluded that the expression of miR-410-3p gene in the endometrium and VEGFA in the serum of patients with endometriosis changes compared to the control group, so it is suggested that they may be candidate factors for the pathogenesis of endometriosis.

Keywords: Endometriosis; Vascular endothelial growth factor; miR-410-3p; Real-Time PCR; ELISA

جداسازی فاژ لیتیک از میکروبیوم سوسک شب‌زی *Adesmia cancellata* (Coleoptera, Tenebrionidae) از منطقه دشت کویر

مبینا شجاعی شاه آباد[۱]، مهدی گلستانی نسب*[۲] ، شکیبا درویش علیپور آستانه[۳]
۱.دانشجو، پردیس علوم و فناوری های نوین، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲. *استادیار گروه آموزشی زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سمنان، ایران
۳. استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده زیست فناوری، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
*E-mail: mgolestaninasab@semnan.ac.ir

چکیده

افزایش شمار باکتری‌های مقاوم به دارو و عدم توسعه کافی کلاس‌های جدید آنتی‌بیوتیک، سبب توجه محققان به باکتریوفاژهای مشتق‌شده از منابع طبیعی شده است که دارای طیف گسترده‌ای از خواص زیستی و دارویی جهت فاژدرمانی هستند. این مطالعه با هدف استخراج فاژهای لیتیک از میکروبیوم روده سوسک Adesmia cancellata Solier, 1835 متعلق به خانواده Tenebrionidae انجام گرفت. در این پژوهش ۱۳ سوسک *A.cancellata* از زیستگاه کویری جاده سلامت سمنان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. در ابتدا حشرات با دی‌اتیل‌اتر بیهوش، پس از جداسازی روده، نمونه ها به نسبت وزن:حجم (۱:۱) با سرم فیزیولوژی به خوبی همگن و پس از سانتریفیوژ و فیلتراسیون در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. وجود فاژ با استفاده از آگار دولایه برروی محیط کشت تریپتون‌سوی آگار تأیید و طیف میزبانی در رابطه با باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Salmonella typhimurium* و *Shigella flexneri* مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه غنی‌سازی فاژ با پلی‌اتیلن‌گلیکول انجام گرفت و ضریب عفونت فاژ (MOI) محاسبه گردید. در این مطالعه، پلاک فاژ به قطر ۱ میلی‌متر و با شکل دایره‌ای شفاف با هاله‌ای در اطراف آن مشاهده شد که *Pseudomonas aeruginosa* را به صورت اختصاصی لیز کرده و در شرایط دمایی ۴- تا ۴۵+ درجه سلسیوس و pH ۳-۱۰ پایدار می‌باشد. تعداد فاژها بعد از غنی‌سازی، هفت برابر معادل 4.32×10^{10} Pfu/ml افزایش داشت. ضریب عفونت فاژ ۶,۷ به‌دست آمد که در مقایسه با مطالعات مشابه مقدار قابل‌توجهی به شمار می‌رود. بنابراین، عملکرد اختصاصی باکتریوفاژ استخراج‌شده از *A. cancellata* در برابر *Pseudomonas aeruginosa* می‌تواند کاندید مناسبی جهت فاژدرمانی باشد و با بهینه‌سازی روش‌های استخراج می‌تواند از پتانسیل مطلوبی برای مقابله با AMR برخوردار باشد.

کلمات کلیدی: باکتریوفاژ، فاژدرمانی، *Pseudomonas aeruginosa*، Tenebrionidae

Isolation of lytic phage from microbiome of the darkling beetle *Adesmia cancellata* (Coleoptera, Tenebrionidae) from Dasht Desert

Mobina Shojaie Shahabad[1], Mehdi Golestaninasab[2*], Shakiba Darvishalipour Astaneh[3]

1. Student, Campus of New Sciences and Technologies, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran

*2. Assistant Professor of the Department of Biology, Faculty of Sciences, Semnan University, Semnan, Iran

3. Assistant Professor of the Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran

*E-mail: mgolestaninasab@semnan.ac.ir

Abstract

Increasing of the drug-resistant bacteria and inadequate development of new classes of antibiotics led researchers to pay attention to bacteriophages derived from natural sources, which have a wide range of biological and medicinal properties in phage therapy. The present study aimed to investigate the isolation of lytic phages from the intestinal microbiome of the darkling beetle *Adesmia cancellata* Solier, 1835 (Coleoptera: Tenebrionidae). A total of 13 *A. cancellata* were collected from the desert area of Salamat Road around Semnan and transported to the laboratory.

At first, the insects were anesthetized with diethyl ether, and after dissection of the intestine, the samples were homogenized with physiological serum in ratio (1:1) weight/volume. After centrifugation and filtration, samples were preserved at 4ºC. The presence of phage was acknowledged using double agar layer assay in tryptone soy agar and its possible host range was evaluated against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. Thereafter, the phages were enriched by means of polyethylene glycol and the phage infectivity coefficient (MOI) was calculated. The resulted clear, circular, halo plaques, with an average diameter of 1 mm, were able to specifically lyse *Pseudomonas aeruginosa*. Such plaques were stable in the temperature range of -4 to 45 °C and pH 3-10. The number of phages increased seven times after enrichment and reach to 4.32×10^{10} Pfu/ml, with a MOI of 6.7 which is a significant level comparing to the similar researches. Thereafter, the specific function of the bacteriophage obtained from the intestine of *A. cancellata* against *Pseudomonas aeruginosa* can be a suitable candidate for phage therapy and improving its isolation methods has promising potential to overcome AMR.

Key words: bacteriophage, phage therapy, *Pseudomonas aeruginosa*, *Adesmia cancellata*

مرور اثرات هربال تراپی بر آسیب های مغزی ناشی از سکته ایسکمیک

سحر یعقوبی[۱]، محمد کریمیان[۱*]

[۱] گروه زیست شناسی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. آدرس ایمیل: saharyaqubi2000@gmail.com

چکیده

سکته مغزی ایسکمیک شایعترین نوع سکته مغزی است که علت اصلی مرگ و ناتوانی در جهان محسوب می شود. ایسکمی مغزی اغلب به دلیل کاهش گذرا یا دائمی جریان خون مغزی ناشی از انسداد شریانی ترومبوتیک یا ترومبوآمبولیک ایجاد می شود. از جمله این پیامدهای سکته مغزی می توان به تولید گونه های فعال اکسیژن، آسیب سلولی اکسیتوتوکسیک و التهاب، که در نهایت منجر به آسیب برگشت ناپذیر مغزی می شود، اشاره کرد. با این وجود روش های درمانی کمی برای درمان این بیماری وجود دارد. بسیاری از تحقیقات علمی نشان داده اند که داروهای گیاهی مانند گیاهان حاوی ترکیبات فنولی، ساپونین ها، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها می توانند پیشرفت قابل توجهی در درمان ایسکمی مغزی ایجاد کنند. ویژگی های فوق العاده داروهای گیاهی مانند خواص ضد آپوپتوز، ضد التهاب، آنتی اکسیدان ممکن است یک رویکرد درمانی نهایی برای سکته مغزی باشد. ترکیبات فعال داروهای گیاهی نتایج امیدوارکننده‌ای را در مطالعات پیش بالینی نشان دادند. اما داروهای گیاهی هنوز در آزمایشات بالینی سکته مغزی بصورت گسترده ای توسعه نیافته است و این مسئله یک چالش اساسی محسوب می شود. همچنین سمیت، جذب غیراختصاصی و پاسخ ایمنی ناخواسته به نانوذرات حاوی ترکیبات گیاهی پس از تجویز سیستمیک ممکن است مانع پیشرفت داروهای هربال در داخل بدن شود.

کلمات کلیدی: سکته مغزی ایسکمیک، آسیب سلولی اکسیتوتوکسیک، التهاب، هربال تراپی

Reviewing the effects of herbal therapy on brain injuries caused by ischemic stroke

Sahar Yaqubi1*, Mohammad Karimian1

1. Department of Molecular and Cell Biology, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran

* saharyaqubi2000@gmail.com

Abstract

Ischemic stroke is the most common type of stroke, which is the main cause of death and disability in the world. Cerebral ischemia is often caused by a transient or permanent decrease in cerebral blood flow caused by thrombotic or thromboembolic arterial occlusion. Among these consequences of stroke, we can mention the production of reactive oxygen species, excitotoxic cell damage and inflammation, which ultimately leads to irreversible brain damage. However, there are few therapeutic methods to treat this disease. Many scientific researchers have shown that herbal medicines such as plants containing phenolic compounds, saponins, terpenoids and alkaloids can make a significant improvement in the treatment of cerebral ischemia. The extraordinary properties of herbal medicines such as anti-apoptotic, anti-inflammatory, antioxidant properties may be a final therapeutic approach for stroke. The active compounds of herbal medicines showed promising results in preclinical studies. But herbal medicines have not yet been widely developed in stroke clinical trials, and this issue is considered a major challenge. Also, toxicity, non-specific absorption and unwanted immune response to nanoparticles containing herbal compounds after systemic administration may hinder the progress of herbal medicines inside the body.

Keywords: Ischemic stroke, Excitotoxic Cell Damage, Inflammation, Herbal Therapy

پیش‌بینی بیوانفورماتیکی miRNA هایی که SETDB1 را هدف قرار می‌دهند. رویکردی برای درمان سرطان پروستات

غزاله فرازنده[۱]، محبوبه شیخ بهائی [۱] صادق باباشاه[۱]

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

مقدمه: بیوانفورماتیک علمی است که اخیراً توسعه یافته است که از فناوری اطلاعات برای درک پدیده های بیولوژیکی استفاده می کند. این علم به طور گسترده شامل ابزارها و روش های محاسباتی است که برای مدیریت، تجزیه و تحلیل و پردازش حجم زیادی از داده های بیولوژیکی استفاده می شود. MicroRNA ها RNA (miRNAs)های درون زای کوچکی هستند که بیان ژن را پس از رونویسی تنظیم می کنند. اختلال در تنظیم miRNA ها یک ویژگی مشترک در بسیاری از سرطان ها است. SET domain bifurcated 1 (SETDB1) یک هیستون H3 لیزین ۹ متیل ترانسفراز (H3K9) است که اثرات مهمی بر تنظیم ژن اپی ژنتیکی دارد. تری متیلاسیون نابجا در H3K9 به دلیل تقویت، جهش یا حذف *SETDB1* ممکن است منجر به سرکوب رونویسی ژن های مختلف سرکوب کننده تومور و سایر ژن های مرتبط در سلول های سرطانی شود. به عنوان یک انکوژن، *SETDB1*نقش کلیدی در ترویج سرطان پروستات دارد. بنابراین، شناسایی miRNAهای دخیل در تنظیم *SETDB1* در یافتن یک رویکرد درمانی برای سرطان پروستات مفید خواهد بود.

روش‌ها: پایگاه‌های داده miRtargetlink و targetscan برای تعیین miRNA هایی که با *SETDB1* تعامل دارند، استفاده شد. تعامل هر یک از miRNA های پیش بینی شده با SETDB1 3'UTR توسط RNAhybridتجزیه و تحلیل شد. در نهایت، Diana miRpathv3برای یافتن مسیرهای متابولیکی و سیگنالینگ مربوط به این miRNA ها استفاده شد.

یافته ها: پس از تجزیه و تحلیل miRNA های پیش بینی شده برای *SETDB1* توسط RNAhybrid ، miRNAهایی که رابطه قوی تری با *SETDB1* نشان دادند انتخاب شدند که عبارتند از hsa-miR-29a-3p ، hsa-miR-29b-3p، hsa-miR-29c-3p با توجه به داده های به دست آمده از ابزار Diana ، یک رابطه قوی بین hsa-mir-29b-3p و has-mir-29c-3p در ECM و مسیرهای سیگنال دهی سرطان به عنوان مثال PI3K مشاهده شد.

نتیجه گیری: مطالعات نشان داده اند که بیان بالای *SETDB1* با پیشرفت سرطان پروستات مرتبط است. از آنجایی که بیان بالای *SETDB1* با کاهش امید به زندگی بیماران سرطان پروستات مرتبط است، تعدیل بیان miRNA های ذکر شده در بالا می تواند یک رویکرد درمانی برای جلوگیری از پیشرفت سرطان پروستات باشد.

کلمات کلیدی: سرطان پروستات، *SETDB1*، MicroRNA

Bioinformatic prediction of miRNAs targeting *SETDB1*. An approach to the treatment of prostate cancer

Ghazaleh Farazandeh[1], Mahboobeh Sheikhbahaei [1]Sadegh Babashah[1]

Department of Genetics, Faculty of Biological sciences ,Tarbiat Modares University

Abstract

Background: Bioinformatics is a recently developed science that uses information technology to understand biological phenomena. Bioinformatics broadly includes computational tools and methods used to manage, analyze, and process large volumes of biological data. MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous RNAs that regulate gene-expression post-transcriptionally. Dysregulation of miRNAs is a common characteristic of many cancers. SET domain bifurcated 1 (SETDB1) is a histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase that exerts important effects on epigenetic gene regulation. aberrant trimethylation at H3K9 due to amplification, mutation or deletion of SETDB1 may lead to transcriptional repression of various tumor-suppressing genes and other related genes in cancer cells. As an oncogene, SETDB1 plays a key role in prostate cancer promotion. Therefore, identifying miRNAs involved in SETDB1 regulation will be useful in finding a therapeutic approach for prostate cancer.

Methods: The miRtargetlink and targetscan databases were used to determine miRNAs that interact with *SETDB1* . The interaction of each predicted miRNAs with *SETDB1* 3´UTR was analyzed by RNAhybrid. Finally, Diana miRpathv3 was used to find the metabolic and signaling pathways related to these miRNAs.

Results: After analyzing the predicted miRNAs for SETDB1 by RNAhybrid, the miRNAs that showed a stronger relationship with SETDB1 were selected, which are hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p. According to the data obtained from the Diana instrument, a strong relationship between hsa-mir-29b-3p and has-mir-29c-3p in ECM and cancer signaling pathways (e .g , PIK) was observed.

Conclusion: Studies have shown that high expression of SETDB1 is associated with the progression of prostate cancer. Since high expression of SETDB1 is associated with decreased life expectancy of prostate cancer patients, modulating the expression of the above-mentioned miRNAs could be a therapeutic approach to prevent prostate cancer progression.

Keywords: Prostate Cancer , *SETDB1*, MicroRNAs

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی miRNAهایی که NRAS را هدف قرار می‌دهند؛ به‌عنوان یک رویکرد درمانی ممکن در ملانوما

مهدیه نوروزی مقدم[۱]، محبوبه شیخ‌بهایی[۱]، صادق باباشاه[۱]

[۱]گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

مقدمه: ملانوما شکل مرگبار سرطان پوست است که درمان آن با روش‌های سنتی درمانی دشوار بوده است. تحقیقات اخیر بر نقش miRNAها در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در ایجاد ملانوم متمرکز شده است. در این مطالعه، ژن *NRAS* به‌عنوان یک هدف بالقوه برای درمان مبتنی‌بر miRNA در ملانوما شناسایی شد.

مواد و روش‌ها: فهرستی از miRNAهایی که رونوشت *NRAS* را هدف قرار می‌دهند را می‌توان در پایگاه‌های داده mirTargetLink 2.0 و TargetScan یافت. توالی miRNAها و توالی ۳'UTR ژن *NRAS* به‌ترتیب توسط پایگاه‌های داده miRbase و NCBI تعیین شدند. از میان این miRNAها، ۵ نامزد براساس تعامل قوی با *NRAS* که توسط RNAhybrid نشان داده شده بود، انتخاب شدند. علاوه‌براین، پایگاه داده dianaTools می‌تواند مسیرهای سیگنالینگ مربوط به این miRNAها را ارائه دهد.

نتایج: miR-145-5p، miR-214-3p، miR-5585-3p، miR-124-3p، miR-320a-5p انتخاب شدند. داده‌های به‌دست آمده از dianaTools نشان می‌دهد که miR-145-5p، miR-214-3p، miR-124-3p در مسیر سرطان نقش دارند. miR-214-3p و miR-124-3p در مسیر سیگنالینگ GnRH و مسیر سیگنالینگ نوروتروفین، همچنین miR-124-3p در مسیر سیگنالینگ ErbB نقش دارند. miR-145-5p در Toollike receptor و miR-320a-5p در مسیر سیگنالینگ PI3K-Akt نقش دارد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه پتانسیل درمان‌های مبتنی‌بر miRNA را به‌عنوان یک رویکرد امیدوارکننده برای درمان ملانوم برجسته می‌کند. شناسایی miRNAهایی که *NRAS* را هدف قرار می‌دهند، راه جدیدی برای توسعه درمان‌های موثر برای این بیماری کشنده ارائه می‌دهد. مطالعات بیشتری برای ارزیابی این miRNAها به‌عنوان عوامل درمانی در ملانوم موردنیاز است.

کلمات کلیدی: *NRAS*، ملانوما، miRNA، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

Bioinformatic analysis of miRNAs targeting *NRAS*; as a possible therapeutic approach in melanoma

Mahdiyeh Norouzi Moghaddam[1], Mahboubeh Sheykhbahaei[1], Sadegh Babashah[1]

[1]Department of Genetics, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University

Abstract

Background: melanoma is a deadly form of skin cancer that has been difficult to treat using traditional treatment methods. Recent research has focused on the role of miRNAs in regulating the expression of genes involved in the development of melanoma. In this study, the *NRAS* gene was identified as a potential target for miRNA-based therapy in melanoma.

Materials and methods: A list of miRNAs targeting *NRAS* transcript can be found in mirTargetLink 2.0 and TargetScan databases. miRNAs' sequences and 3'UTR sequence of *NRAS* gene determined by miRbase and NCBI databases, respectively. Among these miRNAs, 5 candidates had been chosen based on their strong interaction with *NRAS* demonstrated by RNAhybrid. Furthermore, dianaTools database can provide signaling pathways related to these miRNAs.

Results: miR-5585-3p, miR-214-3p, miR-145-5p, miR-124-3p and miR-320a-5p were selected. The data obtained from DianaTools show that miR-145-5p, miR-214-3p, miR-124-3p are involved in the pathway in cancer. miR-214-3p and miR-124-3p are involved in GnRH signaling pathway and neurotrophin signaling pathway, also miR-124-3p is involved in ErbB signaling pathway. miR-145-5p is involved in Toll-like receptor and miR-320a-5p is involved in PI3K-Akt signaling pathway.

Conclusion: The findings of this study highlight the potential of miRNA-based therapies as a promising approach for the treatment of melanoma. Identification of miRNAs that target *NRAS* provides a new way to develop effective treatments for this fatal disease. More studies are needed to evaluate these miRNAs as therapeutic agents in melanoma.

Key words: *NRAS*, Melanoma, miRNA, Bioinformatics analysis.

ارزیابی مقاومت ضدمیکروبی اشرشیاکلی های مولد عفونت ادراری به فلوروکینولون‌ها در شمالغرب کشور

آیسان رضانژاد[۱]، نیما رستمی[۲]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه
[۲]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی،مرند، ایران

چکیده:

زمینه و هدف: اشرشیاکلی یک باکتری گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که مسئول ۹۰ درصد عفونت های مجاری ادراری-تناسلی در زنان جوان می باشد. در دو دهه اخیر افزایش مقاومت دارویی این باکتری پاتوژن به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها درمان آن را با چالش جدی روبرو کرده و همین امر پروسه درمان آن را با به طور نگران کننده ای تحت تاثیر قرار داده است. در این مطالعه الگوی مقاومت دارویی این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک رایج در درمان به روش انتشار دیسک مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: نمونه های ادرار بصورت تصادفی از ۴۵۰ نفر از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا(ع) تبریز تهیه شد. کلیه ی نمونه ها ابتدا توسط روش های بیوشیمیایی و سپس روش واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد تایید قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها بر روی محیط کشت EMB کشت داده شدند و مقاومت داروئی آنها با دیسک گذاری به روش دیسک دیفیوژن مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: بیشترین میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها به ترتیب مربوط به مروپنم، کلرامفنیکل، سفپیم، ایمی‌پنم، سفتازیدیم و آمیکاسین به ترتیب با ۹۴/۹۳٪، ۸۰/۶، ۷۷/۶، ۷۶/۱، ۷۴ و ۷۱/۱۹ درصد گزارش گردید. همچنین، کمترین میزان مقاومت داروئی سویه‌ها به ترتیب مربوط به آموکسی‌سیلین ۳۱/۶۵٪، نالیدیکسیک اسید ۳۵/۴۸٪، کوتریماکسازول ۴۱/۸۵٪، پیپراسیلین ۴۲/۵۵٪ و توبرامایسین ۵۹/۳۴٪ گزارش گردید.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از بررسی الگوی مقاومت ضدمیکروبی در جدایه های این پروژه تحقیقاتی بیانگر افزایش سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین می‌باشد. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد میشود پزشکان محترم در مواجهه با سویه های اشرشیاکلی مولد عفونت های مجاری ادراری و تناسلی، نتایج ارزیابی مقاومت داروئی را مورد توجه قرار دهند چراکه افزایش فراوانی ژن‌های مقاومت در جامعه میکروبی، درمان رژیم های درمانی را با چالش جدی مواجه کرده و علاوه بر تحمیل هزینه های درمان بر بیماران، موجب افزایش طول دوره درمان خواهد شد.

کلمات کلیدی: اشرشیاکلی، مقاومت ضد میکروبی، فولوروکینولون ها، شمالغرب کشور

Evaluation of Antimicrobial Resistance of Escherichia coli causing urinary tract infections to fluoroquinolones in the northwest of iran

Abstract:

Background: Escherichia coli is a gram-negative bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family, which is responsible for 90% of urinary-genital tract infections in young women. In the last two decades, the increase in drug resistance of this pathogenic bacterium to all kinds of antibiotics has made its treatment a serious challenge, and this has alarmingly affected the treatment process. In this study, the drug resistance pattern of Escherichia coli to common antibiotics in the treatment by disc diffusion method has been studied and evaluated.

Materials and methods: Urine samples were collected randomly from 450 patients referred to Imam Reza Tabriz Hospital. All samples were first confirmed by biochemical methods and then by polymerase chain reaction method. Then the samples were cultured on EMB culture medium and their drug resistance was studied by disc diffusion method.

Result: The highest amount of antibiotic sensitivity of the strains was reported for meropenem, chloramphenicol, cefepime, imipenem, ceftazidime and amikacin with 94.93, 80.6, 77.6, 76.1, 74 and 71.19 respectively. Also, the lowest amount of drug resistance of the strains was reported for amoxicillin 31.65, nalidixic acid 35.48,cotrimoxazole 41.85, piperacillin 42.55 and tobramycin 59.34 respectively.

Conclusion: The results of examining the pattern of antimicrobial resistance in the isolates of this research project indicate an increase in ciprofloxacin resistant strains. According to the results of this research, it is suggested that respected doctors pay attention to the results of drug resistance evaluation when faced with Escherichia coli strains that cause urinary and genital tract infections. Because the increase in the frequency of resistance genes in the microbial community, the treatment of treatment regimes will face a serious challenge and in addition to imposing treatment costs on patients, it will increase the length of the treatment period.

Key words: Escherichia coli, Antimicrobial Resistance, Fluoroquinolones, northwest of Iran

بررسی و تحلیل ارتباط بین بیان ژن های PRKAR1A و ACLY در سرطان پانکراس

فرانه اقایی[۱]، سمانه رئیس زاده جهرمی[۲*]

۱-فرانه اقایی ، زاهدان - ایران

۲- سمانه رئیس زاده جهرمی(استادیار). گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران،ایمیل :s.reiszadeh@science.usb.ac.ir

چکیده

سرطان لوزالمعده (پانکراس) یک بیماری بسیار کشنده است که میزان مرگ و میر آن تقریباً مشابه میزان بروز آن است. اگرچه تحقیقات نشان داده است که بیان ژن های بسیاری دربیماری زایی سرطان لوزالمعده نقش دارند ولی تاکنون اطلاعاتی درباره ی رابطه بین بیان ژنهای *PRKAR1A* و*ACLY* در مسیر لیپوژنز گزارش نشده است. جهت بررسی رابطه بین تغییرات بیان ژنهای *PRKAR1A* و *ACLY* در سرطان لوزالمعده از داده های TCGA که توسط پایگاه داده ONCODB ارائه شده است استفاده شد. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن *ACLY* (log FC=1.77 و FDR=0.01) و ژن *PRKAR1A* (logFC=2.21 و FDR =0.01) در نمونه های سرطانی در مقایسه با نمونه های نرمال افزایش پیدا کرده است . همچنین مطالعات نشان داد که این دو ژن در ارتباط با یکدیگر به طور معناداری افزایش پیدا می کنند. (R=0.7944 و-P=5.89e expression correlation:40) همچنین تحقیقات نشان داده است که مسیرهای سیگنالینگ انکوژنیک، بیان آنزیم های لیپوژنیک را فعال می کنند. مانند مرحله اول سنتز اسیدهای چرب، که توسط آنزیمی به نام ATP-سیترات لیاز (*ACLY*) اغاز می شود که فعالیت و شروع این انزیم توسط مسیر سیگنالینگ PKA regulatory subunit type 1 توسط *PRKAR1A* که یکی از ژن های این زیر واحد می باشد کنترل می شود. عملکرد نادرست این مسیر منجر به فعال سازی نابجای سنتز اسید های چرب می شود و باعث بهم ریختگی مسیر لیپوژنز می شود که در نهایت باعث رشد سلول های سرطانی می شود . در نتیجه این دو ژن در ارتباط با یکدیگر عمل می کنند و هم رفتار هستند.

کلمات کلیدی: پانکراس، لیپوژنز، اسیدهای چرب

Expression correlation analysis between PRKAR1A and ACLY genes in pancreatic cancer

Faraneh aghaei [1], Samaneh reiszadeh jahromi [2]

1-Faraneh aghaei, Zahedan, Iran.

2-Samaneh reiszadeh jahromi (Ph.D). Department of Biology, Faculty of Basic Science, Sistan and Baluchestan University, Zahedan, Iran; Email: s.reiszadeh@science.usb.ac.ir

Abstract

Pancreatic cancer is a very deadly disease whose death rate is almost the same as its incidence rate. Although research has shown that the expression of many genes play a role in the pathogenesis of pancreatic cancer, so far no information has been reported about the relationship between the expression of *PRKAR1A* and *ACLY* genes in the lipogenesis pathway .TCGA data provided by ONCODB database was used to investigate the relationship between PRKAR1A and ACLY gene expression changes in pancreatic cancer. The results showed that the expression level of ACLY gene (logFC=1.77 and FDR=0.01) and PRKAR1A gene (logFC=2.21 and FDR=0.01) increased in cancer samples compared to normal samples. Also, studies showed that these two genes increase significantly in relation to each other. (R=0.7944 and P=5.89e-40: expression correlation) .Research has also shown that oncogenic signaling pathways activate the expression of lipogenic enzymes. Like the first stage of fatty acid synthesis, which is initiated by an enzyme called ATP-citrate lyase (ACLY), the activity and initiation of this enzyme is controlled by the signaling pathway of regulatory subunit type 1 *PKA* by *PRKAR1A*, which is one of the genes of this subunit.Improper functioning of this pathway leads to inappropriate activation of fatty acid synthesis and disrupts the lipogenesis pathway, which ultimately causes the growth of cancer cells. As a result, these two genes act in relation to each other and are the same behavior.

Keywords :Pancreatic,lipogenesis,fatty acids

نانوحامل هیدروکسید دوگانه لایه‌ای (LDH) به منظور رسانش کنترل‌شده دارو: مطالعه درج و رهایش پمترکسد

کورش جهانبان[۱]، معصومه جدیدی‌نژاد[۲]، شیرین شاهنگیان[۱*]، رضا حسن‌ساجدی[۳]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲-گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳-گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[*]استادیار، آدرس ایمیل: Shahangian@guilan.ac.ir

چکیده

امروزه، شیوع روزافزون بیماری‌هایی همچون سرطان، همراه با تحولات اجتماعی-اقتصادی و سبک زندگی مدرن، اهمیت پیشگیری، تشخیص زودهنگام و درمان موثر را برجسته کرده‌است. نانوتکنولوژی، بویژه در زمینه دارورسانی، توجه زیادی را در مواجهه با این چالش‌ها به خود جلب کرده‌است. هیدروکسید دوگانه لایه‌ای (LDH)، نانوساختاری دو-بعدی متشکل از یون‌های فلزی، به عنوان یک پلتفرم چندکاره برای کاربردهایی مانند رسانش ژن، طراحی حسگر زیستی و دارورسانی پدیدار شده‌است. در این مطالعه، تمرکز بر اندازه‌گیری مقدار بارگذاری دارو و سرعت رهایش پمترکسد در حالت درج‌شده در حاملی از نوع LDH بود. انواع مختلفی از LDHها سنتز شدند و FeMn LDH به عنوان حامل داروی بهینه برای درج دارو انتخاب شد. مقدار بارگذاری دارو و سرعت رهاسازی در دو pH مختلف ارزیابی شد. مشخصه‌یابی LDH و کمپلکس دارو-LDH با استفاده از تکنیک‌های FT-IR و FE-SEM انجام شد. درصد بارگذاری دارو در PXD-FeMn LDH، ۱۸/۷ درصد تعیین شد. علاوه بر این، رهاسازی دارو از آن حامل فرآیند آهسته و کنترل‌شده‌ای را در pH ۷/۴ نشان داد، که در یک دوره هشت روزه با رهایش ۷۴/۸۶ درصد بود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که دارویی که در ساختار هیدروکسید دوگانه لایه‌ای قرار می‌گیرد، آزادسازی کنترل‌شده و پایدار را امکان‌پذیر می‌کند، در نتیجه نویدبخش درمان‌های مؤثرتر است. درج داروها در LDH ابزاری برای دستیابی به رهایش کنترل‌شده و پایدار دارو ارائه می‌دهد که به طور بالقوه باعث بهبود نتایج درمانی می‌شود. استفاده از نانوتکنولوژی در سیستم‌های دارورسانی مانند LDH، پتانسیل زیادی در زمینه پزشکی دارد و پیشرفت‌هایی را در زمینه پیشگیری، تشخیص و درمان ممکن می‌سازد.

کلیدواژه: نانوذرات هیدروکسید دوگانه لایه‌ای (LDH)، رسانش کنترل‌شده دارو، رهایش و بارگذاری دارو، پمترکسد

Layered Double Hydroxide (LDH) Nanocarrier for Controlled Drug Delivery: Intercalation and Release Study of Pemetrexed

Koorosh Jahanban[1], Masoomeh Jadidi Nezhad[2], Shirin Shahangian[1*], Reza H.Sajedi[3]

1- Biology group, science faculty, Guilan university, Rasht, Iran
2- Chemistry group, basic sciences faculty, Tarbiat modares university, Tehran, Iran
3- Biochemistry group, biological sciences faculty, Tarbiat modares university, Tehran, Iran
[*]associate professor, E-mail address: Shahangian@guilan.ac.ir

Abstract

Today, the increasing prevalence of diseases like cancer, coupled with socioeconomic developments and modern lifestyles, has underscored the importance of prevention, early diagnosis, and effective treatment. Nanotechnology, particularly in the field of drug delivery, has gained significant attention in addressing these challenges. Layered Double Hydroxide (LDH), a two-dimensional nanostructure composed of metal ions, has emerged as a versatile platform for applications such as gene delivery, biosensor design, and drug delivery. In this study, the focus was on measuring the drug loading amount and release rate of Pemetrexed when intercalated into a LDH carrier. Different types of LDHs were synthesized, and FeMn LDH was selected as the optimal drug carrier for intercalation. The drug loading amount and release rate were evaluated at two different pH levels. Characterization of LDH and the drug-LDH complex was performed using FT-IR and FE-SEM techniques. The drug loading percentage in PXD-FeMn LDH was determined to be 18.7%. Furthermore, the release of the drug from its carrier exhibited a slow and controlled process at pH 7.4, with PXD-FeMn LDH achieving a release rate of 74.86% over an eight-day period. These findings suggest that the drug intercalated into the layered double hydroxide complex enables a controlled and sustained release, thereby holding promise for more effective treatments. In conclusion, the incorporation of drugs into LDH offers a means of achieving controlled and sustained drug release, potentially enhancing therapeutic outcomes. The use of nanotechnology in drug delivery systems, such as LDH, holds great potential in the field of medicine, enabling advancements in prevention, diagnosis, and treatment.

Keywords: Layered Double Hydroxide (LDH) Nanoparticles, Controlled Drug Delivery, Drug Loading and Release, Pemetrexed

تشخیص درمان سرطان پستان به کمک microRNAs

محمد کردکتولی*[۱]، سید ابولقاسم محمدی بندارخیلی[۲]

۱-باشگاه پژوشگران جوان و نخبگان، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.
۲-گروه زیست شناسی، واحد گرگان ، دانشگاه آزاد اسلامی ، گرگان ، ایران .
mohammad.kordkatouli@outlook.com

چکیده

سرطان یک بیماری بسیار شایع در جهان است. به طوری که در رده دوم مرگ و میر جهان قرار گرفته است. عوامل زیادی در آن همچون عوامل ژنتیکی و محیطی در آن نقش به سزایی دآرد . سرطان پستان رایج ترین سرطان بین زنان هست بر اساس آمار سازمان جهانی بهداشت از هر۸تا ۱۰ نفر زن ۱ نفر مبتلا به سرطان پستان هستند.میزان سن ابتلا به سرطان پستان در کشور ایران ده سال پایین تر از میانگین جهانی به شمار می آیید.برای درمان این گونه سرطان می توانیم از microRNAکه با بیان آن ویژگی های بیولوژیک خاص سرطان پستان را شناسایی کنیم که روش نوین در علم بیولوژی می باشد. در این مقاله ضمن برسی روش نوین درمان و تشخیص سرطان به عوامل اپیدومولوژی سرطان پستان و عوامل ایجاد و گیرنده های های آن در مجله های معتبر علمی به تجزیه و تحلیل پرداخته شد. microRNAها RNAهای کوتاه زنجیر که ۲۵-۱۹ نوکلئوتید طول دارد و قابلیت کدشدن را ندارد بدین ترتیب می توانند بافت های عادی و سرطانی را هم از هم جدا کرده و نتایج به دست آماده از تحقیقات محققان و دانشمندان به این نتیجه رسیدند که ما می‌توانم ویژگی های بیولوژیک سرطان پستان همچون گیرنده های استروژن و پروژستورن ، مرحله بیماری، تهاجم ها وبا شاخص تکثیر را مشخص کنیم . در این مقاله به برسی پیشرفت های چند سال اخیر محققان و دانشمند در تشخیص و درمان سرطان پستان پرداخته شد . ولی همچنان نیازمند مطالعات بیشتر محققان می باشد.

کلمات کلیدی :سرطان،microRNA ، سرطان پستان ،تشخیص سرطان، درمان سرطان

Diagnosis and treatment of breast cancer with the help of microRNAs

Mohammad Kordkatouli[1*], Seyed Abolghasem Mohammadi Bondarkhilli[2]
1.Young Researchers and Elite Club, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
2. Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
mohammad.kordkatouli@outlook.com

Abstract

Cancer is a very common disease around the world. So that it has been placed in the second category of deaths in the world. Many factors, such as genetic and environmental factors, play a significant role in it. Breast cancer is the most common cancer among women; according to the statistics of the World Health Organization, 1 out of every 8 to 10 women is diagnosed with breast cancer. The age of breast cancer in Iran is ten years lower than the world average. For this kind of cancer, we can identify the special biological features of breast cancer using microRNA, which is a new method in biological science. In this article, while examining the new method of cancer treatment and diagnosis, the epidemiology factors of breast cancer and its causes and receptors were analyzed in reputable scientific journals. MicroRNAs are short-chain RNAs that are 19–25 nucleotides long and do not have the ability to be coded; thus, they can separate normal and cancerous tissues, and the results of the research of researchers and scientists concluded that we can To determine the biological factors of breast cancer, such as estrogen and progesterone receptors, disease stage, invasions, and proliferation index. In this article, the progress of researchers and scientists in the diagnosis and treatment of breast cancer in recent years is discussed. But it still needs more studies by researchers.

Key words: cancer ,microRNA, Breast Cancer , Cancer diagnosis, cancer treatment

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

تولید و ارزیابی آنزیم اندولایزین موثر بر پروتئوس ولگاریس

پگاه عبداللهی[۱]، شمس الضحی ابوالمعالی[۲] ، شکیبا درویش علیپور آستانه[۳*]

۱. دانشجو؛ پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه سمنان، سمنان
۲ استادیار گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده زیست شناسی،دانشگاه سمنان، سمنان.
۳. *استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه سمنان
Darvishalipour@semnan.ac.ir

چکیده

یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک‌ها حائز اهمیت است. یکی از این ترکیبات اندولایزین‌ها هستند. اندولایزین‌ها در انتهای چرخه لیتیک تولید و توانایی تخریب لایه پپتیدوگلیکان باکتری‌ها را دارند. در این مطالعه از آنزیم اندولایزین بدست آمده از باکتریوفاژهای موثر بر باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* استفاده شد. برای تولید آنزیم تعداد PFU/ml $۳/۵\times۱۰^{۱۱}$ باکتریوفاژ به ۱۰۰ میلی لیتر از کشت *سودوموناس آئروجینوزا* اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت گرماگذاری گردید. از کشت *سودوموناس آئروجینوزا* بدون افزودن باکتریوفاژ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در ادامه سوسپانسیون سانتریفیوژ و مایع رویی آن فیلتر و اندولایزین با استفاده از ایزوپروپانول سرد تغلیظ گردید. وجود اندولایزین جذب نوری آنزیم در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس تاثیر آنزیم قبل و بعد از تغلیظ و در حالت خشک شده در خلأ علیه *پروتئوس ولگاریس* مورد ارزیابی قرار گرفت. جذب نوری آنزیم و کنترل به ترتیب ۰/۱۸ و ۰/۰۵ بود. در واکنش آنزیمی، آنزیم با غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست در مدت یک ساعت کدورت باکتری را از ۰/۴ به ۰/۳ کاهش دهد. آنزیم قبل از تغلیظ هاله‌ای به قطر ۹ و بعد از تغلیظ هاله‌ای به قطر ۵ میلیمتر بر روی پلیت باکتری مرده *پروتئوس ولگاریس* ایجاد کرد. اندازه تقریبی اندولایزین با استفاده از الکتروفرز عمودی و مقایسه کنترل و آنزیم ۳۵ کیلو دالتون تخمین زده شد.

کلمات کلیدی: اندولایزین، *پروتئوس ولگاریس*، فاژ درمانی، *سودوموناس آئروجینوزا*

Production and evaluation of an endolysin with impact on *Proteus vulgaris*

Pegah Abdollahi[1], Shamsozoha Abolmaali [2]*, Shakiba Darvish Alipour Astaneh [3]

1. Student, Campus of New Sciences and Technologies, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran
*2. Assistant Professor of the Department of Biology, Faculty of Sciences, Semnan University, Semnan, Iran
3. Assistant Professor of the Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran

Darvishalipour@semnan.ac.ir

Abstract

It is important to find new antimicrobials replacing with antibiotics. Endolysins are one of these antimicrobials. Endolysins destroy the peptidoglycan layer of bacteria and are produced at the end of the lytic cycle. In this study, production of endolysin from *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages was aimed. 3.5×10^{11} PFU/ml of bacteriophage was added to 100 ml culture *of Pseudomonas aeruginosa* followed by incubation at 37 °C for 16 hours. *Pseudomonas aeruginosa* culture with no infection of bacteriophage was used as a negative control. Then the suspension was centrifuged and the supernatant was filtered. Endolysin was concentrated using cold isopropanol. The presence of endolysin was measured at 280 nm. *Proteus vulgaris* was subjected to the endolysin, the concentrated endolysin as well as the lyophilized enzyme followed by evaluation of enzyme impact. The optical absorbance of the enzyme and the control were 0.18 and 0.05 respectively. In the enzymatic assay, the enzyme with a concentration of 0.3 µg/ml was able to reduce the turbidity of bacteria from 0.4 to 0.3 in one hour. The enzyme showed a halo with a diameter of 9 mm. A halo with a diameter of 5 mm on the plate of dead *Proteus vulgaris* was detected for the concentrated endolysin. The endolysin was 35 kDa in mass.

Key word: Endolysin, Phage therapy, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*

طراحی واکسن چند اپی‌توپی به روش واکسینولوژی معکوس علیه SARS-COV-2

محمد استیری[۱]، شکیبا درویش علیپور آستانه[۲]، شمس الضحی ابوالمعالی[۳*]
۱.. دانشجو؛ پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه سمنان، سمنان
۲.استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه سمنان
۳. *استادیار گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده زیست شناسی،دانشگاه سمنان، سمنان
S_abolmaali@semnan.ac.ir

چکیده

وقوع جهش‌ها در ژنوم جدایه اولیه SARS-CoV-2 سبب به وجود آمدن واریانت‌های نگران‌کننده (VOCs) شد. بطوریکه تعداد مبتلایان به COVID-19 در چین از هفته چهارم نوامبر ۲۰۲۲ افزایش یافت. در این پژوهش با استفاده از روش واکسینولوژی معکوس یک واکسن زیرواحد چند اپی‌توپی جهت مقابله با VOCs طراحی شد. پروتئوم جدایه اولیه SARS-CoV-2 (شناسه پروتئوم: UP000464024) شامل ۱۷ پروتئین از پایگاه داده Uniprot و پروتئوم واریانت‌های نگران‌کننده (VOCs) شامل سویه‌های B.1.1.7، B.1.351، P.1، B.1.617.2 و B.1.1.529 از پایگاه داده NCBI دریافت و پس از ۸ مرحله غربالگری، پروتئین‌های S، ORF8 و ORF7a به انتخاب شدند. این ۸ مرحله شامل مکان‌یابی زیرسلولی، پیش‌بینی تعداد هلیکس‌های تراغشایی، بررسی میزان شباهت پروتئین‌های ویروسی با پروتئین‌های میزبان، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، پیشگویی ساختار دوم و انحلال پذیری، دارابودن سیگنال پپتید، بررسی ایمنی زایی و حساسیت زایی و موتیف‌های BetaWrap است. پس از غربالگری اپی‌توپ‌های MHC I، MHC II و لنفوسیت های B در پپتیدهای کاندید بررسی شد. ده اپی‌توپ HTL، ۶ اپی‌توپ لنفوسیت B، ۱۱ اپی‌توپ CTL حفاظت شده از پروتئین‌های S، ORF7a و ORF8 انتخاب و به کمک لینکرهای AAY، GPGPG و KK به یکدیگر متصل شدند. توالی β-defensin و Pan-HLA DR به انتهای N و سپس توالی TAT به انتهای C پپتید اضافه شدند. در انتها پپتیدی با طول ۴۸۴ آمینواسید، فاقد حساسیت زایی به دست آمد. امتیاز این پپتید در ابزار آنلاین Qmean برابر ۰/۲۶ است. بنابراین پپتید موردنظر میتواند در برابر VOCs ایمنی زایی داشته باشد.

کلمات کلیدی: کووید-۱۹، واریانت‌های نگران کننده، واکسن چند اپی‌توپی زیرواحدی، واکسینولوژی معکوس

Designing a multi-epitope subunit vaccine by reverse vaccinology method against SARS-COV-2

Mohammad Estiri[1], Shakiba Darvish Alipour Astaneh [2], Shamsozoha Abolmaali[3]*

1. Student, Campus of New Sciences and Technologies, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran
2. Assistant Professor of the Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran
*3. Assistant Professor of the Department of Biology, Faculty of Sciences, Semnan University, Semnan, Iran
S_abolmaali@semnan.ac.ir

The occurrence of mutations in the genome of the primary isolates of SARS-CoV-2 caused the emergence of variants of concern (VOCs). So that the people infected with COVID-19 in China has increased since the fourth week of November 2022. In this study, a multi-epitope subunit vaccine was designed using the reverse vaccinology method against VOCs.

The proteome of the primary isolates of SARS-CoV-2 (proteome ID: UP000464024) including 17 proteins was obtained from the Uniprot database. The Proteome of variants of concern (VOCs) including strains B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2 and B.1.1.529 was obtained from NCBI database. With eight steps of screening, including subcellular localization, prediction the number of transmembrane helixes, the similarity of viral proteins to host proteins, physical and chemical properties, prediction secondary structure and solubility, prediction signal peptide, immunogenicity and allergenicity, and prediction of BetaWrap motifs, S proteins, ORF8 and ORF7a were selected as the potential candidates. After screening, MHC I, MHC II and B lymphocytes epitopes were predicted in the candidate proteins.

Ten conserved HTL epitopes, 6 conserved B lymphocyte epitopes, and 11 conserved CTL epitopes selected from S, ORF7a and ORF8 proteins and linked to each other with the using of AAY, GPGPG and KK linkers. β-defensin and Pan-HLA DR sequences were added to the N terminal and then TAT sequence to the C terminal of the peptide. Finally, a peptide with a length of 484 amino acids was obtained with no allergenicity. The score of this peptide in Qmean online tool was 0.26. It is supposed to that the vaccine is immunogenic against VOCs.

Key words: COVID-19, Multi-epitope subunit vaccine, Reverse vaccinology, VOC_s

بررسی میزان فاکتور رشد فیبروبلاستیک محلول در سرم خون و بیان miR-4723-5P در نمونه های انسانی مبتلا به اندومتریوزیس

سارا حاجی زاده*[۱]، فرهاد مشایخی[۲]، الهام هادی پور زیارتگاه[۳]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، دانشجو کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و تکوینی

۲.گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، استاد بیولوژی سلولی و تکوینی

۳.گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، استادیار فیزیولوژی جانوری

hajizadehsara760@gmail.com*

چکیده

اندومتریوز یک بیماری چند عاملی است و ایجاد آن به عوامل ایمنی، هرمونی، ژنتیکی و محیطی بستگی دارد. رگ زایی یک فرایند مهم در رشد ضایعات اندومتریوز و ایجاد چسبندگی می باشد و گمان می شود که FGF-1 در فعال سازی سلول های اپی تلیالی و تهاجم سلولی نقش دارد. همچنین miRNA نقش متنوعی در تنظیم ژن ایفا می کند که شواهد نشان داده اند که miRNA ها در فرآیندهای سلولی متعددی از جمله تمایز، آپوپتوز، رگزایی و پاسخ های ایمنی نقش دارد به طوری که یک miRNA منفرد می‌تواند صدها mRNA را مورد هدف قرار دهد. با توجه به اطلاعات بدست آمده میدانیم کهFGF-1 هدف miR-4723-5P می باشد پس به بررسی میزان فاکتور رشد فیبروبلاستیک محلول در سرم خون و بیان miR-4723-5P در نمونه های انسانی مبتلا به اندومتریوزیس پرداختیم. تعداد ۲۰ نمونه خون و بافت را از بیماران مبتلا به اندومتریوزیس و افراد سالم تهیه کرده و به بررسی میزان غلظت فاکتور رشد FGF-1 توسط تکنیک الایزا در سرم خون و تغییرات کمی بیان miR-4723-5P را در بافت اندومتر با کمک روش Real-Time PCR پرداخته شد. در نهایت به بررسی آماری نتایج بدست آمده به کمک نرم افزار های SPSS و EXCEL می پردازیم. با توجه به اهمیتFGF-1 در رگ زایی و پیشرفت بیماری اندومتریوزیس و نقش miR-4723-5P به

عنوان عوامل تنظیم کننده در بیان فاکتور FGF-1، بیان FGF-1 تحت تاثیر miR-4723-5P تغییر کرده است. می توان نتیجه گرفت که miR-4723-5P و FGF-1 ممکن است در پاتوژنز و روش های درمانی اندومتریوز موثر باشند.

کلید واژه:

اندومتریوزیس، فاکتور رشد فیبروبلاست، miR-4723-5P ، ریل تایم پی سی آر، الایزا

Fibroblastic Growth Factor1 (FGF1) serum level, miR-4723-5P expression in patients with endometriosis

Sara Hajizadeh[*1], Farhad mashayekhi[2], Elham Hadipour Ziaratgah[3]

1.Department of Biology, Facuality of basic sience, Guilan university, Rasht, Iran, MSc student

2. Department of Biology, Facuality of basic sience, Guilan university, Rasht, Iran, Professor in cell and Developmental Biology Assistant Professor in animal Physiology

3. Department of biology, facuality of basic sience, Guilan university, Rasht, Iran

Hajizadehsara760@gmail.com[*]

Abstract

Endometriosis is a multifactorial disease and its development depends on immune, hormonal, genetic and environmental factors. Angiogenesis is an important process in the growth of endometriosis lesions and the formation of adhesions, and it is believed that FGF-1 plays a role in the activation of epithelial cells and cell invasion. Also, miRNA plays a diverse role in gene regulation, evidence has shown that miRNAs play a role in many cellular processes, including differentiation, apoptosis, angiogenesis, and immune responses, so that a single miRNA can target hundreds of mRNAs. According to the obtained information, we know that FGF-1 is the target of miR-4723-5P, so we investigated the amount of soluble fibroblast growth factor in blood serum and the expression of miR-4723-5P in human samples with endometriosis. 20 blood and tissue samples were obtained from patients with endometriosis and healthy individuals, and the concentration of growth factor FGF1 was investigated by ELISA technique in blood serum and quantitative changes in the expression of miR-4723-5P in endometrial tissue with the help of Real-Time method. PCR was performed. Finally, we will analyze the results obtained with the help of SPSS and EXCEL software. Considering the importance of FGF1 in angiogenesis and progression of endometriosis and the role of miR-4723-5P as regulatory factors in the expression of FGF1 factor, the expression of FGF1 has changed under the influence of miR-4723-5P. It can be concluded that miR-4723-5P and FGF1 may be effective in the pathogenesis and therapeutic methods of endometriosis.

Key words: Endometriosis; Fibroblastic growth factor; miR-4723-5P; Real-Time PCR; Elisa

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

اثرات هربال‌تراپی بر عملکرد و سلامت سیستم تولیدمثل زنان

سیده جلاله زارع احسان بخش[۱]، فرشته میرمحمد رضایی[۱*]، اکبر حاجی زاده مقدم[۱]، محمد کریمیان[۲*]

[۱]گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
[۲]گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

*نویسندگان مسئول
محمد کریمیان: گروه زیست شناسی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
آدرس ایمیل: mdkarimian@gmail.com
فرشته میرمحمدرضایی: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران؛
fereshteh.mmrezaei@gmail.com

چکیده

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان انواع بیماری‌ها از گذشته تا به امروز در سرار جهان مرسوم بوده است. از محبوبیت‌های این روش درمانی، میتوان به دسترسی آسان و ارزان به گیاهان دارویی و عوارض جانبی محدودتر آنها نسبت به داروهای آلوپاتیک اشاره کرد. گیاهان دارویی به عنوان منبع سرشاری از متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند که قادرند عملکردهای مهمی را در داخل بدن مدیریت کنند. برخی از این گیاهان از مواد فعال بیولوژیکی تشکیل شده‌اند که برای درمان اختلالات دستگاه تولیدمثل بخصوص در زنان استفاده می‌شوند. باروری یکی از اصلی‌ترین عملکردهای سیستم تولیدمثل زنان است. عارضه‌های مختلفی مانند اندومتریوز و سندروم تخمدان پلی‌کیستیک و همچنین اختلال در مکانیسم‌های مهمی مانند فولیکولوژنز و استروئیدوژنز می‌توانند برای سیستم تولیدمثلی زنان مشکل ایجاد کنند و در نتیجه زمینه‌ساز بروز ناباروری باشند. بنابراین با توجه به پتانسیل درمانی این گیاهان در عارضه‌های سیستم تولیدمثل زنان، امروزه تلاش می‌شود تا اجزای موثر آن‌ها شناسایی و مسیرهای عملکردی این گیاهان در بهبود سلامت سیستم تولیدمثلی رصد شود. شناسایی دقیق اجزای تاثیرگذار این گیاهان به بهینه‌سازی مصرف آن‌ها و نتیجه‌ی موثرتر در درمان می‌انجامد چرا که ممکن است حذف ترکیبات مضر این گیاهان مانع ایجاد سمیت و بروز عوارض جانبی برای مصرف‌کنندگان باشد.

کلمات کلیدی: سیستم تولیدمثل زنان، ناباروی زنان، هربال تراپی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی

The effects of herbal therapy on the performance and health of the female reproductive system

Seyedeh Jalaleh Zare EhsanBakhsh[1], Fereshteh Mir Mohammadrezaei[1*], Akbar Hajizadeh Moghaddam [1], Mohammad Karimian[2*]

[1]Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

[2]Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

***Corresponding authors**
Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416-95447, Iran. E-mail address: mdkarimian@gmail.com
Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416-95447, Iran. E-mail address: fereshteh.mmrezaei@gmail.com

Abstract
The use of medicinal plants for the treatment of various diseases has been common worldwide from the past till now. Among the popularity of this treatment method, we can mention the easy and cheap access to medicinal plants and their limited side effects compared to allopathic medicines. Medicinal plants are known as a rich source of secondary metabolites that are able to manage important functions in the body. Some of these plants consist of biologically active substances that are used to treat disorders of the reproductive system, especially in women. Fertility is one of the main functions of the female reproductive system. Various complications such as endometriosis and polycystic ovary syndrome and also disruption of important mechanisms such as folliculogenesis and steroidogenesis can cause problems for the reproductive system of women and as a result cause infertility. Therefore, considering the therapeutic potential of these plants in the impairments of the female reproductive system, today efforts are being made to identify their effective components and investigate the functional pathways of these plants in improving the health of the reproductive system. The accurate identification of the effective components of these plants leads to the optimization of their consumption and a more effective results in the treatment, because the removal of the harmful compounds of these plants may prevent toxicity and the occurrence of side effects for consumers.

Keywords: Female reproductive system, Women infertility, Herbal therapy, Secondary plant metabolites

بررسی خاصیت ضد میکروبی گیاهان دارویی خرزهره، گوآ، مرزه و خردل سفید بر روی سالمونلا تیفی موریوم

فرشته جوادیان

دانشجوی دکتری زیست تکوین ، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

چکیده

مقدمه: سالمونلوز یکی از مهمترین بیماریهای مشترک انسان و دام که در سراسر جهان شیوع دارد و در انسان سبب مسمومیت غذایی، گاستروآنتریت، تب روده ای و باکتریمی میشود. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضد میکروبی گیاهان دارویی خرزهره، گوآ، مرزه و خردل سفید بر روی سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از مدفوع است.

مواد و روش کار: نمونه های سالمونلا تیفی موریوم از مدفوع طیور جداسازی گردید، عصاره گیاهان خرزهره، گوا، مرزه و خردل سفید با استفاده از دستگاه روتاری تهیه گردید و حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی با روش میکرودایلوشن تعیین گردید و همچنین قطر هاله مهاری با روش چاهک به دست آمد.

نتایج: نتایج حاصل از بررسی قطر هاله مهاری عصاره های گیاهی نشان داد که بیشترین و کمترین قطر هاله مهاری عصاره گیاه گوا برابر با ۸ و ۱ میلی متر بوده است و بیشترین و کمترین قطر هاله مهاری عصاره گل خرزهره ۱۵ و ۱ میلی متر بوده است. بیشترین و کمترین قطر هاله مهاری عصاره خردل سفید بر روی سالمونلا تیفی موریوم برابر با ۱۲ و ۱ میلی متر بوده و همچنین کمترین و بیشترین قطر هاله مهاری عصاره مرزه بر روی سالمونلا تیفی موریوم برابر با ۱ و ۴ میلی متر بوده است و نتایج نشان داد که کمترین قطر هاله مهاری مربوط به عصاره مرزه بوده است.

بحث: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گیاهان دارویی اثرات مهار خوبی بر روی سالمونلا تیفی موریوم از خود نشان داده اند.

کلمات کلیدی: گیاهان دارویی، فعالیت ضد میکروبی، سالمونلا تیفی موریوم، طیور

Investigating the antimicrobial properties of the medicinal plants Psidium guajava, Nerium oleander, Sinapis alba, Satureja hortensis against Salmonella typhimurium

Fereshteh Javadian

Medicinal Plant Research Center, Zabol University of Medical Sciences,Zabol, Iran.

Abstract:

Salmonellosis is one of the most important common diseases of humans and animals worldwide, which causes food poisoning, gastroenteritis, enteric fever and bacteremia in humans. The purpose of this study is to investigate the antimicrobial properties of the medicinal plants Psidium guajava, Nerium oleander, Sinapis alba, Satureja hortensis on Salmonella Typhimurium.

Materials and methods: Salmonella typhimurium samples were isolated from poultry feces, extracts of Psidium guajava, Nerium oleander, Sinapis alba, Satureja hortensis plants were prepared using a rotary device, and the minimum inhibitory concentration and the minimum lethal concentration were determined by the microdilution method, and the diameter of the inhibition zone was determined by the well method.

Results: The results of the investigation of the inhibition halo diameter of plant extracts showed that the maximum and minimum inhibition halo diameters of P.guajava plant extract were 8 and 1 mm, and the maximum and minimum inhibition halo diameters of N.oleander flower extract were 15 and 1 mm. The maximum and minimum diameters of the inhibition zone of S.alba extract on Salmonella typhimurium were 12 and 1 mm, and the minimum and maximum diameters of the inhibition zone of S.hortensis extract on Salmonella typhimurium were 1 and 4 mm, and the results showed that that the smallest diameter of the inhibition halo was related to the salty extract.

Discussion: The results of this study showed that medicinal plants have shown good inhibitory effects on Salmonella Typhimurium.

Keywords: medicinal plants, antimicrobial activity, Salmonella typhimurium, poultry

ارزیابی مصرف سین‌بیوتیک بر سطوح سرمی لپتین، گلوکز، مقاومت به انسولین و پروفایل لیپیدی در موش‌های باردار تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب

منصور کرجی بانی*۱، آتنا کرجی بانی۲، مهرداد نقی زاده۳، فرزانه منتظری فر۴، حامد فنایی ۵

۱ مرکز تحقیقات ارتقاء سلامت، گروه تغذیه ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران ، نویسنده مسئول

۲دانشجوی کارشناسی ، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

۳ گروه تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان ، ایران

۴ مرکز تحقیقات سلامت بارداری، گروه تغذیه ،دانشگاه علوم پزشکی زاهدان ، ایران.

۵ مرکز تحقیقات سلامت بارداری ،گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان ، ایران

چکیده

زمینه و هدف: به موازات مصرف سین بیوتیک مشخص شده است که لپتین نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی چاقی و اختلالات متابولیک دارد. این مطالعه به منظور ارزیابی تاثیر مکمل سین بیوتیک بر سطوح لپتین، پروفایل لیپیدی، گلوکز و مقاومت به انسولین در موش های باردار تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب (HFD) طراحی شده است.

مواد و روش ها: مطالعه حاضر بر روی ۳۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار انجام شد. حیوانات به سه گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل ،گروه HFD و گروه HFD + سین بیوتیک تقسیم شدند. تمام موش ها وزن شده و با موش های نر برای القای بارداری جفت شدند. سطوح سرمی لپتین، گلوکز خون، کلسترول تام (TC) ، تری گلیسیرید (TG)، LDL ، HDL، انسولین و لپتین توسط کیت های تجاری اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که وزن تولد فرزندان در گروه HFD + سین بیوتیک کمتر از گروه HFD بود ($P < ۰/۰۵$). سطوح سرمی لپتین، انسولین، مقاومت به انسولین، TG، TC، LDL و HDL در گروه HFD+ سین بیوتیک کمتر از گروه HFD بود($P < ۰/۰۵$). غلظت لپتین سرم در گروه HFD بیشتر از گروه کنترل ($P < ۰/۰۰۱$) و مقدار لپتین در گروه سین بیوتیک HFD+ نسبت به گروه HFD کاهش داشت ($P < ۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: بطور کلی مکمل سین‌بیوتیک باعث افزایش وزن در دوران بارداری، وزن نوزاد هنگام تولد، FBS، TG، TC، HDL، LDL و مقاومت به انسولین شده است. برخی از این فواید مکمل سین بیوتیک را می توان بدلیل کاهش سطح لپتین سرم برشمرد.

کلمات کلیدی: لپتین، سین بیوتیک، چاقی، بارداری

The evaluation of synbiotic consumption on serum levels of leptin, glucose, insulin resistance, and lipid profile in pregnant rats fed a high-fat diet

Mansour Karajibani*1, Atena Karajibani2, Mehrdad Naghizade3, Farzaneh Montazerifa4, Hamed Fanae 5

1Health Promotion Research Center, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

2BSc Student, Department of Cellular and Molecular Biology.Systan & Baluchistan University.Zahedan, Iran

3Department of Nutrition, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

4Pregnancy Health Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

5Department of Physiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

*Correspondence author: Mansour karajibani, PhD, professor, Nutrition Department, Medical school, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran. E-mail: mkarajibani@yahoo.com Tel: +98-54-33295717-20, Fax: +98-54- 33295728, Postal code: 9816743181

Abstract

Background & aim: In parallel to consumption of synbiotic It has been found that leptin has an important role in the pathophysiology of obesity and metabolic disorders. This study designed to assess the impact of synbiotic supplementation on the levels of leptin, lipid profile, glucose, and insulin resistance in pregnant rats fed a high-fat diet (HFD).

Material & methods: The present study was conducted on 30 adult female Wistar rats The animals were divided into three groups (n= 10) including control group (fed a lab chow), HFD group, and HFD + synbiotic group. All rats were weighed and mated with male rats to

induce pregnancy. Serum leptin, blood glucose, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), LDL, HDL, insulin, and leptin levels were measured by commercial kits.

Results: The results showed that the birth weight of offspring in the HFD + synbiotic group was lower than the HFD group ($P < 0.05$). Serum leptin, insulin, insulin resistance, TG, TC, LDL, and HDL levels in the HFD + symbiotic group were lower than the HFD group ($P < 0.05$). Serum leptin concentration in the HFD group was higher than the control group ($P < 0.001$). Leptin decreased in the HFD+ synbiotic group to compared the HFD group ($P < 0.01$).

Conclusion: Totally, synbiotic supplementation improves weight gain during pregnancy, pup birth weight, FBS, TG, TC, HDL, LDL, and insulin resistance. Some of these advantages of synbiotic supplementation could be mediated by reducing serum leptin levels.

Keywords: Leptin, synbiotic, obesity, pregnancy

بررسی بیان ترانسکریپت های ER، PR و AMHR در تخمدان موش

سحر حسین پور[۱] ، فرشته میرمحمد رضایی[۱*] ، محمد کریمیان[۲*]

[۱]گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
[۲]گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

*نویسندگان مسئول
محمد کریمیان: گروه زیست شناسی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
آدرس ایمیل: mdkarimian@gmail.com
فرشته میرمحمدرضایی: گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران؛
fereshteh.mmrezaei@gmail.com

چکیده

هورمون های اصلی تخمدان شامل استروژن و پروژسترون می باشد که فرآیندهای تولید فولیکول، تکثیر، آپوپتوز و تخمک گذاری را کنترل می‌کنند. این دو هورمون به صورت چرخه ای در زنان در سنین باروری آزاد می شوند. هورمون آنتی مولرین (AMH) یکی دیگر از هورمونهای زنانه می باشد که توسط سلول های گرانولوزای فولیکول های ثانویه ترشح می شود و نقش مهمی در انتخاب فولیکول غالب در تخمدان دارد. هورمون‌های تخمدانی استروئیدهایی هستند که با گیرنده‌های خاصی تعامل دارند و طیف وسیعی از اثرات ژنومی آهسته و غیر ژنومی سریع را القا می‌کنند. اثرات فیزیولوژیکی هورمون استروژن توسط گیرنده‌های هسته‌ای ERα و ERβ انجام می‌شود. پروژسترون ها هم اثرات خود را توسط PRها که اعضایی از خانواده هورمون‌های استروئیدی و گیرنده‌های هسته ای هستند اعمال می‌کنند. مسیر سیگنالینگ AMH هم توسط دو گیرنده هترومریک سرین/ترئونین کیناز کنترل می شود. هدف از این مطالعه بررسی بیان گیرنده هورمون های استروژن، پروژسترون، آنتی مولرین در سطح mRNA و در بافت تخمدان موش می باشد. در این مطالعه تخمدان های ۵۶ سر موش ماده را بعد از نگهداری در شرایط نرمال آزمایشگاهی، نمونه برداری و جهت انجام مراحل بیان ژن فریز کردیم. سپس RNAی کل موجود در نمونه ها به صورت جداگانه و توسط کیت استخراج RNA، ایزوله شد. تمام RNAهای استخراج شده توسط یک کیت تجاری اختصاصی به cDNA تبدیل شدند. سپس بیان ژن‌های هدف با کمک پرایمرهای اختصاصی و توسط تکنیک PCR ارزیابی شدند. در مرحله استخراج RNA، با توجه به مشاهده باندهای واضح rRNA 28s و rRNA 18s در الکتروفورز ژل آگارز، مشخص شد که فرایند استخراج RNA به درستی انجام شده است. بعد از انجام PCR

با کمک پرایمرهای اختصاصی و مشاهده باندهای موردنظر روی ژل آگارز، مشخص شد که هر سه ژن ER، PR و AMHR در بافت تخمدان موش بیان دارد. با توجه به داده های حاصل از این آزمایش و حضور ترانسکریپت های سه ژن ER، PR و AMHR در تخمدان موش، می توان تغییر بیان هر سه ژن را در شرایط مختلف ارزیابی کرد.

کلمات کلیدی: تخمدان، استروژن، پروژسترون، آنتی مولرین هورمون، بیان ژن

Evaluation the expression of ER, PR and AMHR transcripts in mouse ovary

Sahar Hoseinpour[1], Fereshteh Mir Mohammadrezaei[1*], Mohammad Karimian[2*]

[1]Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
[2]Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

***Corresponding authors**
Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416-95447, Iran. E-mail address: mdkarimian@gmail.com
Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416-95447, Iran. E-mail address: fereshteh.mmrezaei@gmail.com

Abstract

The main ovarian hormones include estrogen and progesterone, which control the processes of follicle production, proliferation, apoptosis, and ovulation. These two hormones are released cyclically in women of reproductive age. Anti-Müllerian hormone (AMH) is another female hormone that is secreted by the granulosa cells of the secondary follicles and plays an important role in the selection of the dominant follicle in the ovary. Ovarian hormones are steroids that interact with specific receptors and induce a wide range of slow genomic and fast non-genomic effects. The physiological effects of the estrogen hormone are carried out by ERα and ERβ nuclear receptors. Progesterone exerts its effects through PRs, which are members of the family of steroid hormones and nuclear receptors. AMH signaling pathway is controlled by two heteromeric serine/threonine kinase receptors. The purpose of this study is to investigate the expression of estrogen, progesterone, and anti-Müllerian receptors at the mRNA level in rat ovary. In this study, we took the ovaries of 56 female mice after keeping them under normal laboratory conditions, taking samples, and freezing them for gene expression. Then, the total RNA in the samples was isolated separately by the RNA extraction kit. All extracted RNAs were converted to cDNA by a dedicated commercial kit. Then, the expression of the target genes was evaluated with the help of specific primers and by PCR technique. In the RNA extraction stage, according to the observation of clear bands of 28s rRNA and 18s rRNA in agarose gel electrophoresis, it was determined that the process of RNA extraction was done correctly. After performing PCR with the help of specific primers and observing the desired bands on agarose gel, it was found that all three ER, PR, and AMHR genes are expressed in mouse ovarian tissue. According to the data obtained from this experiment and the presence of the transcripts of three ER, PR, and AMHR genes in the

mouse ovary, it is possible to evaluate the expression change of all three genes in different conditions.

Keywords: Ovary, Estrogen, Progesterone, Anti-Müllerian hormone, Gene expression

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی مقایسه‌ای ساختاری پروتیین تیپ وحشی و جهش یافته‌ی اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس با استفاده از فلورسانس ذاتی و خارجی

زهرا ویسی[۱]، باقر سید علیپور[۱*]، مهدی ایمانی[۲]

۱ : گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران
۲: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
ایمیل *:b.seyedalipour@umz.ac.ir

چکیده

آنزیم اوریکاز که از خانواده‌ی اکسیدوردوکتازهاست کریستال‌های اسیداوریک محلول که توسط آنزیم گزانتین اکسیداز در مسیر متابولیسم پورین‌ها تولید می شود را به آلانتوئین محلول تبدیل می‌کند. اوریکاز یک آنزیم دارویی دارای کاربردهای درمانی ازجمله کاهش اورات سمی بوده و در درمان نقرس، نفروپاتی و هایپراوریسمی استفاده می‌شود. علیرغم داشتن تمایل بالا در تبدیل سوبسترا به محصول، پایداری کم آن در برابر حرارت، کاربرد آن با محدودیت مواجه است. برای حل این چالش میتوان به مهندسی پروتئین و دستکاری ژنتیکی اشاره کرد. برای این منظور جهش زایی هدف دار به روش Quick-change PCR و انتقال پلاسمید به باکتری E.coli به روش شوک حرارتی صورت گرفت. به منظور بررسی مطالعات ساختاری، از فلورسانس ذاتی و خارجی با استفاده از ANS استفاده شد. اسیدآمینه‌های تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین موجود در پروتئین‌ها به قطبیت محیط حساس بوده، پس تغییر در ساختار پروتئین منجربه تغییر محیط اطراف این اسیدآمینه‌ها و طیف نشری آن‌ها می‌شود. به منظور حذف اثرات اسیدآمینه‌های تیروزین و فنیل‌آلانین، تهییج در ناحیه nm۲۹۵ انجام شد، که طیف‌های به‌دست آمده تنها مربوط به اسیدآمینه تریپتوفان می‌باشد. شدت فلورسانس ذاتی آنزیم جهش‌یافته در مقایسه با آنزیم وحشی افزایش یافته که نشاندهنده قرارگیری اسیدآمینه تریپتوفان در محیط آبگریز است. همچنین در پروتیین جهش‌یافته نسبت به پروتیین وحشی نشر فلورسانس بیشتری از ANS مشاهده شد که نشان‌دهنده افزایش سطح آبگریزی و فشردگی بیشتر آنزیم می‌باشد که حاکی از افزایش پایداری آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس و ایجاد یک آنزیم جهش یافته با ویژگی‌های بهبود یافته برای تولید پروتئین‌های مقاوم‌تر به حرارت و آنزیم دارویی پایدارتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: اوریکاز، فلورسانس ذاتی، فلورسانس خارجی، پایداری ساختاری

A comparative study of the structure of wild-type and mutant Aspergillus flavus uricase protein using intrinsic and extrinsic fluorescence.

Zahra veisi[1], Bagher Seyedalipour[1*], Mahdi imani[2]

1: Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Mazandaran, Iran
2: Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail*: b.seyedalipour@umz.ac.ir

Abstract

Uricase enzyme, which belongs to the family of oxidoreductases, converts soluble uric acid crystals produced by xanthine oxidase enzyme in the course of purine metabolism into soluble allantoin. Uricase is a medicinal enzyme with therapeutic applications, including the reduction of toxic urate, and is used in the treatment of gout, nephropathy, and hyperuricemia. Despite having a high tendency to convert the substrate into a product, its low stability against heat, its application is limited. To solve this challenge, protein engineering and genetic manipulation can be mentioned. For this purpose, targeted mutagenesis was done by Quick-change PCR method and plasmid transfer to E.coli bacteria was done by heat shock method. In order to investigate structural studies, intrinsic and extrinsic fluorescence were used using ANS. The amino acids tryptophan, tyrosine and phenylalanine in proteins are sensitive to the polarity of the environment. So, the change in the protein structure leads to the change of the surrounding environment of these amino acids and their emission spectrum. In order to eliminate the effects of tyrosine and phenylalanine amino acids, excitation was performed at 295 nm. The intrinsic fluorescence intensity of the mutant enzyme increased compared to the wild enzyme, which indicates the placement of the amino acid tryptophan in the hydrophobic environment. In the mutant protein, compared to the wild protein, there is more fluorescence emission from ANS, which indicates an increase in the level of hydrophobicity and the higher compression of the enzyme indicates the increase in the stability of Aspergillus flavus uricase enzyme and the creation of a mutated enzyme with improved properties to produce more heat-resistant proteins and more stable medicinal enzyme.

Keywords: Uricase, Intrinsic fluorescence, Extrinsic fluorescence, Structural stability

تاثیرآب جوشانده در حضور ظروف یکبار مصرف ساخته شده از پلی پروپیلن بر نسبت هسته به هستک در سلول های مریستمی ریشه پیاز

زهرا ستونی [۱]، زهرا زنده بودی [۱] *

[۱] گروه زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه شیراز، شیراز ۱۳۵۶۵-۷۱۴۶۷، ایران

zahrazendehboody@yahoo.com

چکیده

پلی پروپیلن یک پلیمر ترموپلاستیک با طیف وسیعی از کاربردها می‌باشد. محصولات ساخته شده از این ماده در اقیانوس ها دور ریخته می‌شوند و اکوسیستم را تهدید می‌کنند.۲،۱ شکل، تعداد و اندازه هستک ها در هسته در شرایط استرس تغییرمی‌کند و در بیماری، مورفولوژی هستک که نشان دهنده عملکرد آن است می‌تواند تغییرکند.۳ هدف از این مطالعه بررسی اثر آب جوشانده شده در حضور ظروف یکبار مصرف ساخته شده از پلی پروپیلن بر تعداد هستک و نسبت هسته به هستک در سلول های مریستمی ریشه پیاز مورد می باشد. پس از ریشه زایی، ریشه پیازها به مدت ۴۴ ساعت در معرض آب جوشانده شده در حضور ظروف یکبار مصرف ساخته شده از پلی پروپیلن قرار گرفت و برای نمونه کنترل از آب مقطر استفاده شد. برای هر کدام از گروه های تیمار و کنترل سه پیاز مورد آزمایش قرار گرفت و پس از رنگ آمیزی ریشه، از منطقه مریستم اسلاید تهیه شد. در هر نمونه ۵۰ سلول بررسی و مساحت هسته و هستک با استفاده از نرم افزار Image J اندازه گیری و تعداد هستک ها نیز در هر نمونه محاسبه گردید. نتایج نشان داد نسبت مساحت هسته به هستک در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش ($P = 0.036$) و تعداد هستک در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل بطور معناداری افزایش یافته است ($P = 0.046$). نتایج حاضر نشان دهنده اثر محتمل ظروف ساخته شده از پلی پروپیلن بر القا کاهش نسبت مساحت هسته به هستک و افزایش تعداد هستک می باشد.

کلمات کلیدی: پلی پروپیلن،پیاز، هستک

The effect of boiled water in the presence of disposable containers made from polypropylene on the ratio of nucleus to nucleolus in onion root meristem cells

Zahra setooni [1] ,Zahra zendehboody [1] *

[1] Department of Biology, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz 71467-13565, Iran.
*zahrazendehboody@yahoo.com

Abstract

Polypropylene is a thermoplastic polymer with a wide range of applications. Products made from this material are dumped in the oceans and threaten the ecosystem.1,2 In stress, the shape, number, and size of the nucleolus in the nucleus change, and in disease, the morphology of the nucleolus, which indicates its function, can change.3 The aim of this study was to investigate the effect of boiled water in the presence of disposable containers made from polypropylene on the number of nucleolus and the ratio of nucleus to nucleolus in the meristematic cells of onion root. After rooting, onion roots were exposed to the boiled water in the presence of disposable containers made from polypropylene for 44 hours, and distilled water was used for control. Three onions were tested in each of the treated and control groups, and after root staining, slides were prepared from the meristematic zone. In each sample, 50 cells were examined and the areas of nucleus and nucleolus were evaluated using Image J software and the number of nucleolus in each sample was calculated. The results showed that the ratio of nucleus to nucleolus area in the treated group compared to the control group significantly decreased (P = 0.036) and the number of nucleolus in the treated group compared to the control group significantly increased (P = 0.046). The present results indicate the possible effect of containers made of polypropylene on inducing a decrease in the ratio of nucleus to nucleolus area and an increase in the nucleolus number.

Keywords: Polypropylene, onions, nucleolus

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی ارتباط هورمون‌های تیروئیدی با جنسیت و سن در بیماران تالاسمی ماژور

*راشین فروغی اردکان[۱]، پریچهر حناچی[۲]، آزیتا آذرکیوان[۲]، علی عرب خزائلی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران،ایران
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲. استاد مرکز تحقیقات، موسسه عالی تحقیقات و آموزش، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
۳. استادیار مرکز تحقیقات، موسسه عالی تحقیقات و آموزش، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
* دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشمی rashin_foroughi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: تالاسمی از شایعترین بیماری‌های ژنتیکی ایران است که درمان آن وابسته به تزریق خون مکرر است. اگرچه تزریق خون برای بیماران حیات‌بخش محسوب می‌شود، اما عوارض متعددی از جمله انباشته شدن آهن در غدد درون‌ریز را به دنبال دارد که می‌تواند منجر به کم‌کاری تیروئید شود. هدف این مطالعه بررسی ارتباط هورمون‌های تیروئیدی با جنسیت و سن در این بیماران است تا با تعیین قطعی این ارتباط، بتوان به جلوگیری یا بهبود این عارضه کمک کرد. **روش‌کار:** این مطالعه مقطعی روی ۲۳۲ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور درمانگاه تالاسمی تهران انجام شد. اطلاعات اولیه بیماران از طریق پرسشنامه ثبت و جهت اندازه‌گیری سطح سرمی هورمون‌های تیروئیدی، نمونه‌گیری خون انجام شد. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS26 انجام گردید. **نتایج:** بیماران مورد مطالعه با میانگین سنی ۹/۰۲±۴۰/۷۹ سال در ۴ گروه سنی طبقه‌بندی شدند که ۱۴۵ نفر(۶۲/۵٪) زن و ۸۷ نفر(۳۷/۵٪) مرد بودند. بین سطح هورمون‌های تیروئیدی با گروه‌های مختلف سنی بیماران ارتباط معناداری مشاهده نشد($P<0/05$) اما بالاترین سطح هورمون TSH و پایین‌ترین سطح هورمون T4 مربوط به گروه سنی بالای ۵۰ سال بود. همچنین سطح هورمون TSH در مردان بطور معناداری ($P>0/05$) بالاتر از زنان بود، درحالیکه این نتیجه در مورد هورمون T4 برعکس یافت شد. **بحث:** با توجه به افزایش سن و فراوانی بیشتر هیپوتیروئیدی و اثر مستقیمی که بر عملکرد قلب دارد، پایش منظم بیماران تالاسمی از نظر عملکرد تیروئید با آزمایش‌های دوره‌ای، مهمترین روش تشخیص زودرس و درمان این بیماری می‌باشد.

کلمات کلیدی: تالاسمی، هیپوتیروئیدیسم، هورمون تیروئیدی

Investigating the relationship of thyroid hormones with gender and age in thalassemia major patients

❊Rashin foroughi Ardakan[1], Parichehr Hanachi[2], Azita Azarkeivan[2], Ali Arabkhazaeli[3]

1. Master's student in Biochemistry, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. Professor of Research Center, Higher Institute of Research and Education, Iran Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran
3. Assistant Professor of Research Center, Higher Institute of Research and Education, Iran Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran

❊ Master's student in Biochemistry rashin_foroughi@yahoo.com

Abstract

Introduction: Thalassemia is one of the most common genetic diseases in Iran. The treatment of this disease depends on frequent blood transfusions. Although this is life-giving for patients, it has many side effects, including accumulation of iron in the endocrine glands, which can lead to hypothyroidism. The purpose of this study is to investigate the relationship between thyroid hormones and gender and age in these patients so that by determining this relationship, we can help prevent or improve this complication. **Methodology:**This cross-sectional study was conducted on 232 patients with thalassemia major at the thalassemia clinic in Tehran. The basic information of the patients was recorded through a questionnaire and blood sampling was done to measure the serum levels of thyroid hormones. Statistical calculations were performed by SPSS26. **Results:**The studied patients with an average age of 40.79±9.02 years were classified into 4 age groups, 145(62.5%) were women and 87(37.5%) were men. No significant relationship(P<0.05) was observed between the level of thyroid hormones and different age groups, but the highest level of TSH and the lowest level of T4 were related to the age group above 50 years. The level of TSH was significantly higher(P>0.05) in men than in women, while this result was found to be the opposite in the case of T4. **Discussion:**Considering the increasing age and frequency of hypothyroidism and its direct effect on heart function, regular monitoring of thalassemia patients in terms of thyroid function with periodic tests is the most important method for early diagnosis and treatment of this disease.

Keywords: Thalassemia, Hypothyroidism, Thyroid hormones

سیستم‌های کریسپر-کس: سلاحی در برابر پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک

معین ایرانمنش[۱]، مصطفی زارع[۱]، محسن یعقوبی[۱]، محمد پورقاسم ۲، عباس حاجی زاده[۱*]
[۱] مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین، تهران، ایران
۲ گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، لنگرود، ایران
* آدرس ایمیل نویسنده مسئول: abbashajizade@gmail.com

خلاصه

از زمان کشف آنتی بیوتیک ها در سال ۱۹۲۸، آنها جهشی در پزشکی مدرن داشته اند. استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها در قرن گذشته منجر به تکامل پاتوژن های مقاوم به آنتی بیوتیک ها شده است. ژن‌های مقاومت ضد میکروبی بین پاتوژن‌های باکتریایی عمدتاً از طریق انتقال افقی ژن (HGT) روی عناصر ژنتیکی متحرک (MGEs) به اشتراک گذاشته می‌شوند، در نتیجه گسترش مقاومت ضد میکروبی (AMR) را تسریع می‌کنند و بار مقاومت دارویی را افزایش می‌دهند. استراتژی‌های مختلفی برای مبارزه با این پاتوژن‌ها معرفی شده‌اند، از جمله آنتی‌بیوتیک‌های جدید، آنزیم‌ها/پپتیدهای مشتق شده طبیعی که به طور خاص پاتوژن‌ها را هدف قرار می‌دهند، و باکتریوفاژهایی که این پاتوژن‌ها را لیز می‌کنند. اخیراً، سیستم تکرارهای کوتاه پالیندرومیک (CRISPR)/CRISPR مرتبط (CRISPR/Cas)، که یک فناوری ویرایش ژنوم است، تقریباً در تمام زمینه‌های زیست‌شناسی، از جمله باکتری‌شناسی و عفونت‌های مرتبط با باکتری، متحول شده است. توسعه داروهای جدید درمانی و ضد میکروبی یکی از کاربردهای مهم این سیستم است. سیستم‌های CRISPR-Cas را می‌توان به‌عنوان ضدمیکروبی‌های قوی و قابل برنامه‌ریزی معرفی کرد، که راه‌های جدیدی را برای توسعه ابزارهای مبتنی بر CRISPR برای حذف انتخابی پاتوژن‌های باکتریایی، به‌ویژه پاتوژن‌های مقاوم به چند دارو (MDR) و تغییر دقیق ترکیب میکروبیوم باز می‌کند. این سیستم را می توان به گونه ای طراحی کرد که بتواند بین میکروارگانیسم های مفید (سلول های باکتریایی حساس کننده به آنتی بیوتیک ها) و میکروارگانیسم های بیماری زا تمایز قائل شود. در واقع، استراتژی‌های مقاومت ضد میکروبی با استفاده از CRISPR (یعنی Cas9، Cas12، Cas13 و Cas14) می‌توانند در تشخیص باکتری‌ها و مقاومت آن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها اهمیت زیادی داشته باشند.

کلید واژه: سیستم کریسپر-کس ؛ باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک؛ انتقال افقی ژن ؛ ویرایش ژنوم

CRISPR-Cas Systems: A Weapon Against Antibiotic-Resistant Pathogens

Moein Iranmanesh[1], Mostafa Zare[1], Mohsen yaghoubi[1], Mohammad Purghasem[2], Abbas Hajizade[1*]

[1]Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

[۲]Department of Medical Biotechnology, Faculty of Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Langarud , Iran

* Corresponding author E-mail address: abbashajizade@gmail.com

Abstract

Since the discovery of antibiotics in 1928, they have made a leap in modern medicine. Overuse of antibiotics in the last century has led to the evolution of antibiotic-resistant pathogens. antimicrobial resistance genes are shared between bacterial pathogens mainly via horizontal gene transfer (HGT) on mobile genetic elements (MGEs), thereby accelerating the spread of antimicrobial resistance (AMR) and increasing the burden of drug resistance. Various strategies have been introduced to combat these pathogens, including novel antibiotics, naturally derived enzymes/peptides that specifically target pathogens, and bacteriophages that lyse these pathogens. Recently, the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas) system, a genome editing technology, has revolutionized almost all fields of biology, including bacteriology and bacterial-related infections. Developing new therapeutics and antimicrobials is one of the important applications of the system. CRISPR-Cas systems can be introduced as potent and programmable antimicrobials, opening new avenues for the development of CRISPR-based tools to selectively eliminate bacterial pathogens, especially multidrug-resistant (MDR) pathogens, and precisely alter microbiome composition. The system can be designed so that it is able to distinguish between beneficial (resensitizing bacterial cells to antibiotics) and pathogenic microorganisms. Indeed, antimicrobial resistance strategies using CRISPR (i.e. Cas9, Cas12, Cas13 and Cas14) can be of great importance in the detection of bacteria and their resistance to antibiotics.

Key word: CRISPR/Cas Systems; Antibiotic-resistant bacteria; Horizontal gene transfer; Genome editing.

ترکیبات آپتامر-نانومواد برای تشخیص بیماری های عفونی و غیر عفونی

مصطفی زارع[۱]، حدیثه شکری[۲]، معین ایران منش[۱]، محسن یعقوبی[۱]، محمد پورقاسم[۳]، عباس حاجی زاده[۱*]

[۱] مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین، تهران، ایران

[۲] کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران

[۳] گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، لنگرود، ایران

چکیده

آپتامرها اسیدهای نوکلئیک تک رشته ای هستند که با ویژگی ها و میل ترکیبی بالا به اهداف خود متصل می شوند. آنها بر اساس توانایی شان در اتصال به مولکول های دیگر در فرآیندی به نام تکامل سیستماتیک لیگاندها توسط غنی سازی نمایی (SELEX) از مخازن تصادفی انتخاب می شوند. پس از انتخاب می توان آنها را تقویت کرد و به مقدار زیادی تکثیر کرد. این مولکول ها به دلیل اتصال حساس و اختصاصی به اهداف خود، ابزار مناسبی برای شناسایی موجودات زنده از جمله پاتوژن های میکروبی هستند.

نانومواد به دلیل خواص شگفت‌انگیزشان، به طور فزاینده‌ای در زمینه‌های مختلف، از صنعت گرفته تا کشاورزی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. هنگامی که این مواد با روش های دیگر مانند تکنیک های مولکولی و روش های سرولوژیکی ترکیب می شوند، عملکرد این روش ها را افزایش می دهند. در بررسی حاضر، کارایی کونژوگه‌های آپتامر-نانوذره در تشخیص پاتوژن‌های میکروبی برای گسترش دانش ما در مورد کاربرد این سیستم‌ها در این زمینه بررسی می‌شوند.

کونژوگه های مختلف NPs-aptamer برای شناسایی باکتری ها در محیط های مختلف از جمله غذا، آب، نمونه های بیولوژیکی و غیره مورد بهره برداری قرار گرفته اند. *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کلی O157:H7* و سایر باکتری ها از طریق این سیستم شناسایی و تشخیص داده شده اند. . تقریباً تمام مطالعات اثربخشی این روش را برای شناسایی باکتری ها نشان داده اند. ویروس‌های بیماری‌زا نیز از طریق بیوکونژوگه‌های NPs-aptamers شناسایی شده‌اند. ویروس آنفولانزا، ویروس زیکا، ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)، سندرم حاد تنفسی ویروس کرونا ۲ (SARS-CoV-2) و غیره از جمله پاتوژن‌های ویروسی هستند که توسط این سیستم شناسایی شده‌اند. سموم و بیماری های غیر عفونی از جمله سرطان های مختلف نیز با موفقیت توسط این سیستم شناسایی می شوند.

در بررسی حاضر، پس از مقدمه ای گسترده در مورد آپتامرها، انواع و کاربردهای مختلف آنها، نانوساختارها و روش های مختلف ترکیب، مطالعاتی در زمینه تشخیص بیماری های عفونی و غیر عفونی بررسی و مورد بحث قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: آپتامر؛ نانومواد؛ بیماری های عفونی؛ تشخیص میکروبی؛ بیماری های غیر عفونی.

Aptamer-nanomaterials conjugates for the detection of infectious and non-infectious diseases

Mostafa Zare[۱], Hadise Shokri[۲], Moein Iranmanesh[۱], Mohsen Yaghubi[۱], Mohammad Purghasem[3], Abbas Hajizade[*۱]

[۱]Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

[۲]Master's degree, Department of Animal Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran, Iran

[3] Department of Medical Biotechnology, Faculty of Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Langarud, Iran

* Corresponding author E-mail address: abbashajizade@gmail.com

Abstract

Aptamers are single-stranded nucleic acids that bind to their targets with high specificities and affinities. They are selected from random pools based on their ability to bind to other molecules in a process called Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX). Following the selection they can be amplified and produced in a large quantity. Due to their sensitive and specific binding to their targets, this molecules are appropriate tools for the detection of living organisms, inclusing microbial pathogens.

Owing to their astonishing properties, nanomaterials are increasingly used in different fields, from industry to agriculture and medicine. When these materials are combined with other methods, such as molecular techniques and serological methods, they enhance the functions of these methods. In the present review, the efficiency of aptamer-nanoparticle conjugates in the detection of microbial pathogens is reviewed to expand our knowledge on the application of these systems in this field.

Various NPs-aptamer conjugates have been exploited for the detection of bacteria in different environments, including food, water, biological samples, etc. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157:H7*, and other bacteria have been detected and identified via this system. Almost all studies have shown the effectiveness of this method for the detection of the bacteria. Pathogenic viruses have also been detected via the NPs-aptamers bioconjugates. Influenza virus, Zika Virus, Human immunodeficiency virus (HIV), Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), etc. are among the viral pathogens that have been detected by this system. Toxins and noninfectious diseases, including different cancers are also successfully detected by this system.

In the present review, following an expanded introduction on aptamers, their different kinds and applications, nanostructures and different conjugation methods, studies on the detection of infectious and noninfectious diseases are reviewed and discussed.

Keywords: Aptamer; Nanomaterials; Infectious diseases; Microbial Detection; Non-infectious diseases.

سیستم ترشحی نوع ۶ در باکتری ویبریو کلرا

محسن یعقوبی[۱]، محمد پورقاسم[۲]، معین ایرانمنش[۱]، احسان یعقوبی[۳]، مصطفی زارع[۱]، عباس حاجی‌زاده*[۱]

[۱،*]مرکز زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(علیه السلام)، تهران، ایران

[۲]مرکز بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، لنگرود، ایران

[۳]مرکز بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

ایمیل نویسنده اول : mohsen.yaghobi976@gmail.com

ایمیل نویسنده مسئول: : abbashajizade@gmail.com

چکیده

ویبریو کلرا یک باکتری گرم منفی است که چندین بار در مناطق مختلف جهان اپیدمی های زیادی ایجاد کرده است. بیوفیلم‌های باکتریایی در طبیعت معمولاً چند میکروبی هستند و دارای گونه‌ها و سویه‌های متعدد از یک گونه هستند. هم در محیط میزبان و هم درسایر محیط‌ها، موفقیت یک باکتری به توانایی آن در رقابت با سایر موجودات برای منابع و فضای محدود بستگی دارد. یک مکانیسم رقابتی که توسط *ویبریو کلرا* مورد بهره برداری قرار می گیرد، سیستم ترشحی نوع۶ است که یک دستگاه ماکرومولکولی هارپون مانند است که پروتئین های سمی (به نام افکتورها) را به محیط خارجی و سلول های مجاور می رساند.

تقریباً ۲۵ درصد از همه گونه‌های باکتریایی گرم منفی ژن‌های سیستم ترشحی نوع۶ را رمزگذاری می‌کنند که نشان می‌دهد این دستگاه نقش مهمی در سبک زندگی و اکولوژی باکتری‌ها دارد. سلول‌های باکتریایی که در رقابت با واسطه سیستم ترشحی نوع۶ شرکت می‌کنند و سموم را به سلول‌های مجاور می‌رسانند، سلول‌های «قاتل» نامیده می‌شوند.

در سویه های *ویبریو کلرا* توالی یافته، ژن های سیستم ترشحی نوع۶ روی یک خوشه بزرگ و چندین خوشه کمکی یافت می شوند. همه سویه‌های *ویبریو کلرا* دارای دو خوشه کمکی سیستم ترشحی نوع۶ هستند: Aux 1 و Aux 2. این خوشه‌ها لوله داخلی، شکل‌دهنده نوک، پروتئین‌های چاپرون، و ماژول‌های ایمنی موثر را کد می‌کنند. یک خوشه ژنی Aux 3 که در برخی ایزوله‌های *ویبریو کلرا* یافت می‌شود، پروتئینی با دامنه PAAR (پرولین-آلانین-آلانین- آرژینین) و یک ماژول ایمنی اثرگذار را کد می‌کند. در نهایت، بسیاری از سویه‌های *ویبریو کلرا* حاوی خوشه‌های اضافی Aux 4 و Aux 5 که دارای سازماندهی ژنتیکی مشابه با Aux 1 و Aux 2 است اما سموم موثر مجزایی را رمزگذاری می کند. تنظیم بیان ژن سیستم ترشحی نوع۶ در بین سویه های *ویبریو کلرا* بسیار متغیر است و به مولکول های خارجی مانند سنجش حد نصاب و الیگومرهای کیتین بستگی دارد.

کلمات کلیدی: *ویبریو کلرا*، سیستم ترشحی نوع۶، عوامل بیماری‌زا باکتری، پاتوژن

The *Vibrio cholerae* type VI secretion system

Mohsen Yaghuobi[1], Mohammad Purghasem[2], Moein Iranmanesh[1], Ehsan Yaghuobi[3], Mostafa Zare[1], Abbas Hajizadeh[1*]

[1]Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

[2] Department of Medical Biotechnology, Faculty of Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Langarud, Iran

[3] Department of Microbial Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

first author email: mohsen.yaghobi976@gmail.com

[*]correspond email: abbashajizade@gmail.com

Abstract

Vibrio cholerae (*V. cholerae*) is a Gram-negative bacterium that has caused many epidemics in different regions of the world several times. Bacterial biofilms in nature are typically polymicrobial, featuring different taxa, species, and multiple strains of the same species. In both host and environmental settings, the success of a bacterium relies on its ability to compete with other organisms for limited resources and space. One competitive mechanism that is exploited by *V. cholerae* is the type VI secretion system (T6SS), a harpoon-like macromolecular apparatus that delivers toxic proteins (called effectors) into the external milieu and into adjacent cells.

Approximately, 25% of all Gram-negative bacterial species encode T6SS genes, suggesting that the apparatus plays an important role in the lifestyle and ecology of bacteria. Bacterial cells that engage in T6SS-mediated competition and deliver toxins into adjacent cells are referred to as ‘killer’ cells.

In sequenced *V. cholerae* strains, T6SS genes are found on a large cluster and several auxiliary clusters. All sequenced *V. cholerae* strains possess two auxiliary T6SS clusters: Aux 1 and Aux 2. The clusters encode the inner tube (Hcp), tip-forming (VgrG), chaperone proteins, and effector-immunity modules. An Aux 3 gene cluster found in some *V. cholerae* isolates encodes a protein with a PAAR (Proline-Alanine-Alanine-Arginine) domain and an effector-immunity module. Finally, many isolates of *V. cholerae* contain additional clusters Aux 4 and Aux 5, which have a similar genetic organization to Aux 1 and Aux 2 but encode distinct effector toxins. The regulation of T6SS gene expression is highly variable among *V. cholerae* strains and depends on external molecules, such as quorum sensing and chitin oligomers.

Key words: *V. cholerae*, Type VI Secretion System, Virulence Factor, Pathogenicity

پتانسیل ویرایش ژن با CRISPR-Cas9 برای درمان بتا تالاسمی

محمد پورقاسم[۱]، محسن یعقوبی[۲]، معین ایرانمنش[۲]، مصطفی زارع[۲]

[۱]مرکز بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، لنگرود، ایران

[۲]مرکز زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(علیه السلام)، تهران، ایران

ایمیل نویسنده اول: mhmmd.purghasem@gmail.com

چکیده

پروتئین هموگلوبین از چهار زنجیره پلی پپتیدی تشکیل شده است. این پروتئین نقش مهمی در انتقال اکسیژن دارد. در طول رشد قبل از تولد، هموگلوبین یک تترامر از $\alpha_2\gamma_2$ به نام هموگلوبین جنینی (HbF) است. پس از تولد، تولید γ-گلوبین کاهش می یابد، زیرا تولید β-گلوبین افزایش می یابد و هموگلوبین بزرگسالان (HbA)تشکیل می شود. HbA از دو زنجیره α و دو زنجیره β تشکیل شده است. BCL11A یک فاکتور رونویسی است که بیان گاما گلوبین را سرکوب می کند و بنابراین نقش مهمی در انتقال از HbF به HbA دارد. به دلیل جهش در زنجیره β، بتا تالاسمی می تواند در انسان ایجاد شود. بتا تالاسمی با حدود ۶۰۰۰۰ مورد در سال یکی از شایع ترین بیماری های تک ژنی در سراسر جهان است.

نوزادان مبتلا به بتا تالاسمی بدون علامت هستند، اما پس از تولد با کاهش هموگلوبین جنین علامت دار می شوند. مطالعات ارتباط گسترده ژنوم نشان داده است که پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs)که در جایگاه BCL11A در کروموزوم ۲ قرار دارند، با افزایش بیان هموگلوبین جنینی در بزرگسالان مرتبط هستند.

سیستم نوکلئاز پالیندرومی کوتاه (CRISPR)-Cas9 که به طور منظم در فاصله بین آنها قرار گرفته است، یک سیستم ایمنی باکتریایی است که می‌تواند DNA را شکافت، هدف‌گیری قابل برنامه‌ریزی درج‌ها یا حذف‌ها را در یک مکان خاص DNA ژنومی ممکن می‌سازد. تکنیک‌های ویرایش ژن CRISPR-Cas9 را می‌توان در سلول‌های بنیادی و پیش ساز خونساز (HSPCsدر ناحیه تقویت‌کننده اختصاصی اریتروئید BCL11A برای کاهش بیان BCL11A در سلول‌های اریتروئیدی، بازگرداندن سنتز γ-گلوبین و فعال کردن مجدد تولید هموگلوبین جنین استفاده کرد. . بنابراین، علائم بیماری به شدت کاهش می یابد.

کلمات کلیدی: بتا-تالاسمی، کریسپر/کس۹، ویرایش ژن، هموگلوبین

The Potential of CRISPR-Cas9 Gene Editing for the Treatment of β-thalassemia

Mohammad Purghasem[1], Mohsen Yaghuobi[2], Moein Iranmanesh[2], Mostafa Zare[2]

[1] Department of Medical Biotechnology, Faculty of Paramedicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

[2]Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

first author email: mhmmd.purghasem@gmail.com

Abstract

The protein hemoglobin consists of four polypeptide chains. This protein has an important role in the transportation of oxygen. During the prenatal development, hemoglobin is a tetramer of $\alpha_2\gamma_2$ called fetal hemoglobin (HbF). Postnatally the production of γ-globin decreases as the production of β-globin increases to form adult hemoglobin (HbA). HbA consists of two α and two β chains. BCL11A is a transcription factor repressing the expression of γ-globin and so has an important role in transition from HbF to HbA. Due to the mutations in β-chain, β-thalassemia can be developed in humans. β-thalassemia is one of the most common monogenic diseases worldwide with an approximately 60000 cases annually.

Infants with β-thalassemia are asymptomatic, but postnatally become symptomatic as the fetal hemoglobin decreases. Genome-wide association studies have shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs) which located in the BCL11A locus on chromosome 2, associate with increasing expression of fetal hemoglobin in adults.

The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9 nuclease system, a bacterial immune system that can cleave DNA, enables programmable targeting of insertions or deletion at a specific genomic DNA site. CRISPR-Cas9 gene-editing techniques can be used in hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) at the erythroid-specific enhancer region of BCL11A to reduce BCL11A expression in erythroid-lineage cells, restore γ-globin synthesis, and reactivate production of fetal hemoglobin. Therefore, the symptoms of the disease are vastly decreases.

Key words: β-thalassemia, CRISPR/CAS9, Gene Editing, Hemoglobin

بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره روغنی سیاه دانه رقم هندی برعلیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی در شرایط آزمایشگاهی

محمد صادق عوده زاده ، اشکان حاجی نور محمدی ، جمیل زرگان *، میرمرتضی سادات ابراهیمی ، حسین دلاوری

1.دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

2.پژوهشگر، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

3.دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

4.پژوهشگر، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

5.دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: Zargan@ihu.ac.ir

چکیده

گیاه سیاهدانه به طور گسترده در طب سنتی استفاده می شود. از خواص محصولات سیاهدانه فعالیت های ضد سرطانی ، ضدقارچی، آنتی اکسیدانی، درمان دیابت و ضدباکتریایی گزارش شده است. هدف این مطالعه بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره روغنی گیاه سیاهدانه رقم هندی بر علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی است. جهت انجام این ارزیابی از عصاره روغنی سیاه دانه رقم هندی در تست MICبرای سنجش ویژگی های ضد باکتریایی استفاده شد. در این بررسی از دو گونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بعنوان نماینده باکتری های گرم مثبت و اشریشیاکلی بعنوان نماینده باکتری های گرم منفی استفاده گردید. در این آزمایش پنج غلظت مختلف عصاره روغنی سیاه دانه بکار برده شد بیشترین مقدار برابر با 15% w/vو کمترین مقدار 0/42 % w/vبود. این مطالعه نشان داد غلظت 15%w/vباعث ایجاد 47%مهار در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و 78%مهار در باکتری اشریشیاکلی شده است و با کاهش مقادیر حجمی- وزنی عصاره میزان مهار نیز کاهش یافته است.

باتوجه به نتایج حاصل میتوان از عصاره روغنی سیاهدانه رقم هندی به عنوان گزینه پیشنهادی در درمان بیماری های باکتریایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سیاهدانه، آنتی باکتریال، *MIC*

Examining the impact of the antibacterial characteristics displayed by the extract of Indian black seed oil on Staphylococcus aureus and E. coli in an in vitro setting.

Mohammad Sadegh Odehzadeh[1], Ashkan Hajinoor Mohammadi[2], Jamil Zargan*[3], Mir-Mortaza Sadat[4], Hossein Delavari[5]

1.Master student, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

2. Researcher, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

4. Researcher, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

5.Master student, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

*Correspond: Zargan@ihu.ac.ir

Abstract

The plant Nigella sativa, a member of Ranunculaceae, has been widely used in traditional medicine due to its historical importance. Nigella sativa products combat cancer, fungi, oxidation, diabetes, and bacteria per prior research. Study aims to test antibacterial effects of Indian Nigella sativa oil extract. For the purpose of this investigation, we examined the Indian variant of Nigella Sativa oil extract via MIC assay to assess its antibacterial properties. Two species of bacteria, Staphylococcus aureus and E. coli, are utilized for testing purposes. In the course of this inquiry, a selection of five Indian variety Nigella sativa oil extracts (with concentrations ranging from 15% w/v to 0.42% w/v) were employed for testing against both gram-positive and gram-negative bacterial strains. The investigation's findings demonstrate that a concentration of 15%w/v produced a 47% inhibition rate for Staphylococcus aureus, as a representative of gram-positive bacteria and decreasing the concentration of N. sativa oil extract resulted in a decrease of inhibition. Additionally, it was discovered that the oil extract of N. sativa, at a concentration of 15% w/v, caused a 78% inhibition in E. coli (gram-negative) and reducing the concentration of the N. sativa oil extract of Indian variety led to a decline in the degree of inhibition observed. It has been posited by this study that the oil

extract obtained from Nigella sativa possesses antibacterial properties that can be employed in the treatment of bacterial illnesses.

Key words: Nigella sativa, MIC, antibacterial

بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره گیاه آدنیوم آبسئوم بر رده سلولی Ej138 در شرایط آزمایشگاهی

سید محمود مولی[۱]، جمیل زرگان[۲]*، محمد صادق عوده زاده[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: Zargan@ihu.ac.ir

چکیده

سرطان مثانه به عنوان نهمین سرطان شایع در سراسر جهان تشخیص داده شده است. میزان بروز این سرطان در مردان، همواره بالاتر از زنان می‌باشد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که گیاهان منبع مفیدی از ترکیبات ضد توموری بوده و تلاش‌هایی در سراسر جهان برای کشف عوامل ضد سرطانی جدید از گیاهان صورت گرفته است. عصاره بسیاری از گیاهان همچون عصاره خام گیاه آدنیوم آبسئوم در درمان سرطان‌ها موثر هستند. هدف از این پژوهش ارزیابی سمیت سلولی عصاره خام گیاه آدنیوم آبسئوم (A.O) بر رده سلولی سرطان مثانه Ej138 در شرایط آزمایشگاهی است. میزان اثرات ضد سرطانی عصاره گیاه آدنیوم آبسئوم با تست های MTT و NRU سنجیده گردید. بعد از آنکه سلول های سرطان مثانه در معرض عصاره گیاه آدنیوم آبسئوم قرار گرفتند تست های MTT و NRU کاهش زنده مانی سلول ها را نشان دادند. در نتیجه با توجه به نتایج حاصل میتوان از عصاره گیاه آدنیوم آبسئوم بعنوان گزینه ای پیشنهادی برای درمان سرطان مثانه استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سرطان، کشت سلول، آدنیوم آبسئوم

In vitro evaluation of the impact of crude extract of Adenium Obesum on Ej138 cell line (bladder cancer cells).

Seyed Mahmood Moula[1], Jamil Zargan*[2], Mohammad Sadegh Odehzadeh[3]

1.Master student, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

3.Master student, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

*Correspond: Zargan@ihu.ac.ir

Abstract

Bladder cancer is classified as the ninth most prevalent form of cancer on a global scale. The occurrence of this type of cancer tends to be higher in men than in women. It has been reported that plants can serve as a valuable reservoir of antitumor substances. As such, various efforts have been undertaken globally to explore and identify new plant-derived anticancer agents. Several types of plant extracts, including Adenium Obesum crude extract, have demonstrated efficacy in the treatment of various types of cancers. The objective of this analysis is to assess the cytotoxic effects of the crude extract obtained from Adenium Obesum (A.O) on the Ej138 bladder cancer cell line within controlled laboratory settings. Investigation was conducted to determine the impact of A.O. on the viability of Ej138 cells through MTT and NRU methodologies, resulting in the calculation of the cytotoxic effect. After treatment with Adenium Obesum crude extract, the MTT and NRU tests demonstrated a reduction in the viability of Ej138 cells that correlated with the concentration of the extract. The findings indicate that the extract obtained from the Adenium Obesum plant displays anti-cancer characteristics when used on the Ej138 cell line. Consequently, it can be proposed that the employment of Adenium Obesum plant extract may be beneficial for the treatment of bladder cancer.

Key words: Cancer, cell culture, Adenium Obesum

گرایش تحقیقات جهانی در زمینه اپی ژنتیک: آنالیز علم سنجی

مرضیه راشکی قلعه نو*[۱]، حسینعلی عبدی[۲]

۱. کارشناس ارشد علم اطلاعات و دانش شناسی. کتابدار کتابخانه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی زابل
۲. دکتری زیست شناسی- ژنتیک مولکولی. دبیر آموزش و پرورش شهرستان هامون
سمت و ایمیل نویسنده مسئول (rashki.marzieh@gmail.com)

چکیده

علم اپی ژنتیک مطالعه تغییرات وراثتی در فعالیت ژن است که توسط مکانیسم هایی غیر از تغیرات توالی DNA ایجاد می شود. تغییرات اپی ژنتیکی در هر دو حالت طبیعی و بیماری برای یک ارگانیسم بسیار مؤثر است. این تغییرات شامل متیلاسیون، استیلاسیون، فسفوریلاسیون و یوبی کوئیتینه شدن DNA و پروتئین های هیستونی است. بسیاری از بیماری ها، مانند انواع سرطان ها اغلب با تغییرات اپی ژنتیکی همراه هستند. در این مطالعه از انتشارات مربوط به اپی ژنتیک از ابتدا (سال ۱۹۵۳) تا سال ۲۰۲۲ در پایگاه Web of Scienceجستجو شد و در مجموع ۱۴۰۹۰۹ مدرک استخراج و مورد بررسی آنالیز علم سنجی قرار گرفت. بیشترین مدرک منتشر شده در این زمینه مربوط به سال ۲۰۲۱ (۹٪) بود. در بین مدارک منتشر شده با کلید واژه اپی ژنتیک نویسندگان کشورهای آمریکا، چین، آلمان، انگلیس، ایتالیا و ژاپن به ترتیب با ۳۸,۳٪، ۱۶٪، ۸,۳٪، ۷,۵٪، ۵,۸٪ و ۵,۵٪ بیشترین بودند. کشور ایران با تعداد ۱۵۷۷ مدرک منتشر شده در پایگاه Web of Science در رده ۲۴ جهان قرار دارد. در بین نویسندگان Zhang با تعداد ۱۰۰۶ مدرک با کلید واژه اپی ژنتیک به عنوان نویسنده پر انتشار در این زمینه بود. تجزیه و تحلیل علم سنجی این مطالعه نشان می دهد که تعداد انتشارات مربوط به اپی ژنتیک به سرعت در حال افزایش است. این داده ها نشان می دهد که علم اپی ژنتیک در دنیای علمی امروز در حال توسعه است.

کلمات کلیدی: اپی ژنتیک، Web of Science ، آنالیز علم سنجی

Global Research Trends in Epigenetics: a Bibliometric Analysis

Marzieh Rashki ghaleh noo[1*], Hosseinali Abdi[2]

۱. Master's degree in information science and epistemology. Librarian of the central library of Zabol University of Medical Sciences

۲. PhD in Biology-Molecular Genetics. Secretary of Education of Hamoon

Name and email address of the corresponding author (rashki.marzieh@gmail.com)

Abstract

Epigenetics is the study of heritable changes in gene activity caused by mechanisms other than DNA sequence changes. Epigenetic changes are very effective in both normal and disease states for an organism. These changes include methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitination of DNA and histone proteins. Many diseases, such as types of cancers, are often associated with epigenetic changes. In this study, publications related to epigenetics from the beginning (1953) to 2022 were searched in the Web of Science database, and a total of 140,909 documents were extracted and analyzed bibliometrically. The most documents published in this field were related to 2021 (9%). Among the documents published with the keyword epigenetics, the authors of the countries of America, China, Germany, England, Italy and Japan were the most with 38.3%, 16%, 8.3%, 7.5%, 5.8% and 5.5%, respectively. Iran ranks 24th in the world with the number of 1577 documents published in the Web of Science database. Among the authors, Zhang was the most published author in this field with the number of 1006 papers with the keyword epigenetics. The bibliometric analysis of this study shows that the number of publications related to epigenetics is increasing rapidly. These data show that the science of epigenetics is developing in today's scientific world.

Keywords: epigenetics, Web of Science, bibliometric analysis

بهبود ترمیم زخم با استفاده از پانسمان‌های هیدروژلی حاوی صمغ عربی-سریسین

مهدی خلجی[۱]، کورش جهانبان[۱]، سیده شیرین شاهنگیان[۱*]، نوید پورزردشت[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲-گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

[*]استادیار، آدرس ایمیل: Shahangian@guilan.ac.ir

چکیده

پوست به عنوان بزرگترین اندام در بدن انسان شناخته می‌شود که وظیفه مهم و حیاتی حفاظت از بافت‌های داخلی در برابر انواع آسیب‌های فیزیکی و محیطی را به عهده دارد. امروزه محققین علم پزشکی تمرکز زیادی بر روی تولید پانسمان‌های جدید جهت ترمیم زخم و سوختگی نموده‌اند به صورتی که آنها نه تنها از بروز عفونت جلوگیری می‌کنند بلکه عوارض جانبی را درحین القا ترمیم بافت کاهش می‌دهند. پانسمان‌های هیدروژلی به دلیل قابلیت جذب موثر آب و تخلیه آهسته آن به عنوان درمان موثر زخم‌های سطحی و عمیق، سوختگی، جراحات و زخم بستر پدیدار شده‌اند که باعث ترمیم سریع‌تر زخم می‌شوند. از این رو در این مطالعه از هیدروژل بر پایه صمغ عربی به واسطه عملکرد آنتی‌بیوتیکی، ضدالتهابی و همچنین ظرفیت و توانایی دارورسانی موثر استفاده شد. سریسین نیز به عنوان عامل بهبود زخم پایداری زیستی بالا، زیست تخریب‌پذیری، عدم سمیت سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریالی و توان افزایش تکثیر سلولی را نشان می‌دهد. بدین منظور هیدروژل‌هایی با درصدهای متفاوتی از این ترکیبات سنتز شد و با توجه ویژگی‌های فیزیکی و ساختاری، هیدروژل حاوی ۶٪ صمغ عربی و ۴٪ سریسین مورد تائید اولیه قرار گرفت. برای بررسی نحوه عملکرد بستر هیدروژلی حاوی سریسین، آزمایش رهایش با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری در بازه‌های زمانی معین انجام شد. نتایج حاصل، نشان‌دهنده روند آزادسازی منظم و کنترل‌شده طی هفت روز بود که بیانگر توانایی بهبود زخم توسط بستر حاوی پروتئین سنتز شده در این تحقیق به واسطه کاهش هزینه‌های احتمالی تعویض پانسمان و کاهش احتمال آلودگی و عفونت طی آن می‌باشد.

کلیدواژه: ترمیم زخم، سریسین، صمغ عربی، پانسمان‌های هیدروژلی، دارورسانی

Advancing Wound Healing with Sericin-Loaded Gum Arabic Hydrogel Bandages

Mahdi Khalaji[1], Koorosh Jahanban[1], S. Shirin Shahangian[1*], Navid Pourzardosht[2]

۱- Biology group, science faculty, Guilan university, Rasht, Iran

۲- Clinical biochemistry group, medicine faculty, Guilan university of medical sciences, Rasht, Iran

[*]associate professor, E-mail address: Shahangian@guilan.ac.ir

Abstract

The skin, being the largest organ of the human body, plays a vital role in safeguarding internal tissues against a wide range of physical and environmental damages. Medical researchers are now focused on developing innovative bandages for wound and burn healing that not only prevent infections but also minimize side effects while promoting tissue repair. Hydrogel bandages have emerged as effective treatments for external and deep wounds, burns, injuries, and bedsores, thanks to their water absorption capacity and slow drainage, which expedite wound healing. In this study, a hydrogel based on gum Arabic was utilized due to its antibiotic and anti-inflammatory properties, as well as its potential for efficient drug delivery. Sericin, chosen as a wound healing agent, offers high biological stability, biodegradability, non-cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity, and the ability to enhance cell proliferation. Hydrogels were synthesized with varying proportions of these compounds, and based on their physical and structural characteristics, the hydrogel containing 6% gum Arabic and 4% Sericin was initially selected. To assess the functionality of the Sericin-containing hydrogel, release tests were conducted at specific time intervals using a spectrophotometric technique. The results demonstrated a consistent and controlled release process over a seven-day period, underscoring the wound healing potential of the synthesized protein-loaded hydrogel. This development offers the advantages of reducing the need for frequent bandage changes, minimizing the risk of contamination and infection during the healing process, and potentially lowering treatment costs.

Keywords: Wound healing, Sericin, Gum Arabic, Hydrogel bandages, Drug delivery

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بهینه سازی شرایط (غلظت، دما، pH و زمان) تشکیل نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه حنا (*Lawsonia inermis*)

سیف الله عزیزی[۱]، سیف الله بهرامی کیا[*۱] و عبدالناصر محمدی غلامی[۱]
[۱]، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
[*] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران bahramikia.s@lu.ac.ir

چکیده

استفاده از نانوذرات سنتز شده به وسیله فرایندهای سبز به دلیل سازگاری با محیط زیست، اثرات غیربیماری‌زا و عدم استفاده از شرایط دمایی، فشار و انرژی بالا و اثرات جانبی کمتر در مقایسه با روشهای شیمیایی از اهمیت خاصی برخوردار است. بعلاوه گیاهان در مقایسه با جلبک‌ها و باکتری‌ها نسبت به سمیت فلزات حساسیت کمتری دارند بنابراین؛ گزینه مناسبی برای تولید نانوذرات به روش بیولوژی محسوب می شوند. از عصاره قسمت‌های مختلف گیاهان مانند ساقه، ریشه، میوه، دانه، پینه، پوست، برگ و گل گیاهان برای بیوسنتز نانوذرات فلزی در اشکال و اندازه‌های مختلف با رویکردهای بیولوژی استفاده می‌شود. در این تحقیق، شرایط بهینه (غلظت، دما، pH و زمان) برای سنتز نانوذرات نقره تهیه شده از گیاه حنا مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از نسبت‌های متفاوت عصاره و محلول نیترات نقره یک میلی مولار استفاده شد. جهت اطمینان از تولید نانو ذرات نقره غلظت‌های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند، سپس طیف مرئی این محلول‌ها در ناحیه ۷۰۰ -۳۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه UV-Vis اندازه گیری شد. برای تایید نانوذرات از تکنیک های مختلف شامل اسپکتروفتومتر، FTIR، میکروسکوپ الکترونی نگاره، XRD و EDAX استفاده گردید. نتایج نشان داد که برای تهیه نانو ذرات سنتز شده از گیاه، بهترین نسبت نیترات نقره به عصاره، ۴،۵ به ۶ ، دمای بهینه ۶۰ درجه سانتیگراد و بهترین pH برابر با ۹ و زمان بهینه ۲۴ ساعت بود. نتایج به دست آماده از این مطالعه نشان داد که می توان از گیاه حنا جهت تولید نانو ذرات استفاده کرد. در روش سنتز سبزنانو ذرات، علاوه بر اینکه از هیچ گونه ماده سمی و شیمیایی استفاده نمی شود بلکه از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه تر است.

کلمات کلیدی: نانوذرات ، حنا، PH، نیترات نقره.

Optimizing conditions (concentration, temperature, pH and time) for the formation of silver nanoparticles synthesized from *Lawsonia inermis*

Seifollah Azizi[1], Seifollah Bahramikia[1*] and Abdelnasser Mohammadi Gholami[1]

Department of Biology, Lorestan University, Khorramabad, Iran

* Corresponding author: Seifollah Bahramikia E-mail address: bahramikia.s@lu.ac.ir

Abstract

The use of nanoparticles synthesized by green processes is of particular importance due to its compatibility with the environment, non-disease effects, and the absence of high temperature, pressure, and energy conditions, and fewer side effects compared to chemical methods. Plants are also less susceptible to metal toxicity than algae and bacteria. For this reason, they are considered an appropriate option for producing nanoparticles through biological methods. Extracts from different parts of plants such as stems, roots, fruits, seeds, calluses, bark, leaves, and flowers are used for the biosynthesis of metal nanoparticles in different shapes and sizes with biological approaches. In this research, the optimum conditions (concentration, temperature, pH, and time) for the synthesis of silver nanoparticles prepared from the *Lawsonia inermis* plant were investigated. Different proportions of the extract and a 1 mM silver nitrate solution were used. To ensure the production of silver nanoparticles, the prepared concentrations were kept at room temperature for 24 hours, then the visible spectrum of these solutions was measured in the region of 300-700 nm using a spectrophotometer. A variety of techniques including spectrophotometer, FTIR, scanning electron microscope (SEM), XRD, and EDAX were used to confirm nanoparticles. The results showed that for the preparation of nanoparticles synthesized from the plant, the best ratio of silver nitrate to the extract was 4.5 to 6, the optimum temperature was 60 ^{O}C, the best pH was 9, and the optimal time was 24 hours. Results from this study have shown that *Lawsonia inermis* can be used to produce nanoparticles. In the method of green synthesis of nanoparticles, besides the fact that no toxic or chemical substances are used, it is also more cost-effective.

Keywords: Nanoparticles, *Lawsonia inermis*, pH, Silver nitrate

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

بررسی فعالیت های ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه حنا (Lawsonia inermis)

سیف الله عزیزی[۱]، سیف الله بهرامی کیا[*۱] و عبدالناصر محمدی غلامی[۱]
[۱]، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
[*] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران bahramikia.s@lu.ac.ir

چکیده

اخیراً با توجه به اثرات جانبی و مقاومتی که میکروارگانیسم های پاتوژن علیه آنتی‌بیوتیکها کسب نموده‌اند، در پزشکی به عصاره‌ها و ترکیبات با خواص بیولوژیکی گونه‌های گیاهی توجه زیادی شده است. در سال‌های اخیر، فرایند سنتز سبز نانوذرات فلزی به دلیل سازگاری با محیط زیست، اثرات غیربیماری‌زا، امکان تولید مواد کاهنده طبیعی، تنوع زیستی غنی، عدم نیاز به شرایط پیچیده، هزینه کم و دسترسی بالا معمولا نسبت به سایر سیستم‌های بیولوژیکی توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده است. در این تحقیق، اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه حنا مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار، غلظت های ۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذرات تهیه شد و با استفاده از اشعه UV استریل گردیدند. سپس در محیط کشت مولر هینتون آگار از باکتری تازه کشت داده شده (با کدورت OD=0.1 در سرم فیزیولوژی استریل) با سوآپ استریل به صورت انبوه کشت داده شد. سپس حجم ۳۰ میکرولیتر از هر غلظت بر روی دیسک خالی لود شد و به همراه یک دیسک آنتی بیوتیک آمپی سیلین (با غلظت ۲۵ میکروگرم در دیسک) به عنوان کنترل مثبت با فاصله های مناسب در محیط آگار قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس قطر هاله عدم رشد توسط خط کش اندازه گیری شدند. نتایج نشان داد که نانوذرات به صورت وابسته به دوز باعث افزایش هاله عدم رشد در باکتریهای *E. coli* و *P. Aeruginosa* شد ولی روی *B. Cereus* تاثیری نداشت. بر اساس نتایج گرفته شده ار این مطالعه می توان نتیجه گیری کرد که استفاده از نانوذرات تهیه شده از گیاه حنا می تواند به عنوان یک راهکار درمانی برای درمان بیماریهای عفونی مورد مطالعه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: حنا، سنتز سبز، ضد باکتریایی، نانوذرات نقره

Investigation of antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from *Lawsonia inermis*

Seifollah Azizi[1], Seifollah Bahramikia[1*] and Abdelnasser Mohammadi Gholami[1]

Department of Biology, Lorestan University, Khorramabad, Iran

* Corresponding author: Seifollah Bahramikia E-mail address: bahramikia.s@lu.ac.ir

Abstract

Recently, due to the side effects and resistance that pathogenic microorganisms have acquired against antibiotics, much attention has been paid to extracts and compounds with biological properties of plant species in medicine. In recent years, the process of green synthesis of metal nanoparticles is due to its compatibility with the environment, non-disease effects, the possibility of producing naturally reducing substances, rich biodiversity, no need for complex conditions, low cost and high availability usually compared to other systems. Biologicals have attracted increasing attention. In this research, the antibacterial effects of silver nanoparticles synthesized from *Lawsonia inermis* have been studied. To this end, concentrations of 1250, 2500, and 5000 µg/ml of nanoparticles were prepared and sterilized with UV radiation. Then, freshly cultivated bacteria (with OD turbidity = 0.1 in sterile physiological serum) were grown in bulk in the Müller Hinton agar culture medium with the sterile swab. Thirty µl of each concentration was loaded on an empty disc and placed in the agar medium along with an ampicillin antibiotic disc (with a concentration of 25 µg/ml in the disc) as a positive control with suitable intervals and kept for 24 hours at 37 ^{o}C. Then the size of the inhibition area was measured with a ruler. The results showed that nanoparticles increased the aura of non-growth in *E. coli* and *P. aeruginosa* bacteria in a dose-dependent manner, but had no effect on *B. cereus*. Based on the results of this study, it can be concluded that the use of nanoparticles prepared from the *Lawsonia inermis* plant can be studied as a therapeutic strategy for the treatment of infectious diseases.

Keywords: *Lawsonia inermis*, Green synthesis, antibacterial, silver nanoparticles

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

پیوند پوست سلول زدایی شده ماهی: کلاژن و پتانسیل امیدوارکننده بازسازی پوست انسان

اسماعیل عیسی زاده[۱]، سیده شیرین شاهنگیان[*۱] ، الهام هادی پور[۱]، نوید پورزردشت[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
[*]Email: shahangian@guilan.ac.ir

چکیده

مقدمه: پیوند پوست بدون سلول ماهی، بعنوان جایگزینی نوظهور برای پوست انسان در کاربردهای بالینی استفاده می‌شود. پوست ماهی شامل مولکول‌های کلیدی از جمله کلاژن، فیبرونکتین، لامینین، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و فاکتورهای رشد است که با ساختار خاص خود، فرآیند بهبود زخم را تسریع می‌کند. همچنین، این پوست مزایایی مانند عدم ریسک انتقال بیماری و فرآیند تولید با هزینه کم را داراست که موجب می‌شود به عنوان جایگزینی بالقوه برای سایر گزینه های پیوند پوست مطرح شود. **روش کار:** در این مطالعه، ماهی کپور سلول‌زدایی شد. ابتدا پوست تازه ماهی با آب سرد شستشو و قطعاتی به ابعاد ۵×۵ سانتیمتر مربع تهیه شد. این مقطع‌های پوستی چندین بار در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه منجمد و سپس در دمای محیط ذوب شدند. شستشو با محلول بافر فسفات انجام و سپس پوست ماهی در معرض محلولی هیپرتونیک قرار گرفت و لیوفیلیزه شد. **نتایج:** رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین حاکی از سلول‌زدایی موفقیت‌آمیز بود و حذف کامل سلول‌ها از بافت پوست ماهی کپور را تائید کرد. آنالیز محتوای DNA کاهش قابل توجهی را در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد و مؤید کارایی فرآیند سلول زدایی بود. **بحث:** بر اساس این یافته‌ها، پوست سلول زدایی شده ماهی زیست سازگاری عالی، حداقل سمیت و خواص فیزیکی و مکانیکی مطلوبی نشان داد که تائیدکننده قابلیت آن برای بازسازی بافت پوست انسان است. پیوند پوست بی‌سلول ماهی دارای ویژگی‌های لازم برای بازسازی موثر بافت پوست انسان است و جایگزینی قابل اعتماد برای پیوندهای سنتی محسوب می‌شود که آن را بعنوان گزینه‌ای ارزشمند با کاربردهای بالینی مطرح می‌سازد.

کلمات کلیدی: کپور، کلاژن، پیوند پوست بدون سلول ماهی، جایگزین پوست، ترمیم زخم، سلول زدایی

Acellular Fish Skin Grafting: Collagen and Promising Potential for Human Skin Tissue Regeneration

Esmaeil Eisazadeh[1], S. Shirin Shahangian[1]*, Elham Hadipour[1], Navid Pourzardosht[2]

1. Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Department of Biochemistry, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

*Email: shahangian@guilan.ac.ir

Abstract

Introduction: Acellular fish skin grafting is an emerging skin substitute currently utilized in clinical applications. Comprising essential molecules such as collagen, fibronectin, laminin, glycosaminoglycans, and growth factors, fish skin exhibits a specific structure that promotes accelerated wound healing. Additionally, it offers advantages such as a lack of disease transmission risk and a cost-effective production process, positioning fish skin as a potential alternative to other grafts. **Experimental:** In our study, we employed carp for the decellularization process. Initially, fresh carp skin was thoroughly washed with cold water and descaled. Subsequently, the skin was cut into 5×5 cm² sections. These skin sections underwent multiple cycles of freezing at -20°C for 30 minutes followed by thawing at ambient temperature. Washing with phosphate buffer solution (PBS) ensued, after which the fish skins were exposed to a hypertonic solution and lyophilized. **Results:** Hematoxylin and Eosin staining confirmed successful decellularization, showing the complete removal of cells from the carp skin tissue. Analysis of residual DNA content demonstrated a significant reduction compared to the control sample, validating the effectiveness of the decellularization process. **Conclusion:** Based on these findings, the decellularized fish skin demonstrated excellent biocompatibility, minimal toxicity, and favorable physical and mechanical properties, indicating its potential for human skin tissue regeneration. In summary, acellular fish skin grafting possesses the necessary properties for effective human skin tissue regeneration and offers a promising alternative to traditional grafts, making it a valuable asset in clinical applications.

Keywords: Carp, Collagen, Acellular fish skin grafting, Skin substitute, Wound healing, Decellularization

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

مهندسی آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس در موقعیت۲۷۹ با استفاده از جهش زایی هدفدار برای بهبود پایداری

معصومه همتی[۱]، باقر سیدعلیپور[۱*]، ملیحه سادات عطری[۱]، مهدی ایمانی[۲]

۱.گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

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

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir

چکیده

آنزیم اوریکاز یا اورات اکسیداز جزء دسته اکسیدازهای بدون کوفاکتور می باشد. آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس باعث کاتالیز اسیداوریک به ۵-هیدروکسی ایزواورات وهیدروژن پراکسید میشود که در نهایت این ترکیب طی واکنش غیر آنزیمی به یک ترکیب قابل دفع به نام آلانتوئین تبدیل می شود. اوریکاز یک آنزیم اصلی در تجزیه نوکلئوتیدهای پورینی می باشد. این آنزیم توزیع گسترده ای درمیان میکروارگانیسم ها دارد اما انسان ها وتعدادی از نخستی های عالی به علت جهش های بی معنی در دوره میوسن این آنزیم را از دست داده اند. هدف این مطالعه جایگزینی اسید آمینه آلانین در موقعیت۲۷۹ به سیستئین جهت بررسی پایداری آنزیم اوریکاز می باشد. برای بررسی این موضوع از مطالعات بیوانفورماتیکی از قبیل سرورهای I-Mutant، I-Stable استفاده کردیم. در این تحقیق از پلاسمید pET28a(+) حاوی ژن اوریکاز وباکتری*E.coli* سویه BL21 مورد استفاده قرار گرفت. جهش زایی هدفدار به روش Quick-change PCR به منظور ایجاد جهش نقطه ای با استفاده از*pfu* DNA polymeras انجام شد و از کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA برای تخلیص پروتئین استفاده شد. پس از خالص سازی، دمای بهینه ۲۵، ۲۵ و همچنین pH بهینه ۸، ۹ به ترتیب برای آنزیم جهش یافته و وحشی به دست آمد. همچنین پایداری حرارتی آنزیم جهش یافته در دماهای ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی گراد تقریبا ۸۰ درصد فعالیت خود را از دست داده است. بنابراین به منظور پایدارسازی آنزیم های دارویی، از روش جهش زایی هدفدار می توان استفاده کرد.

کلید واژه: اوریکاز، دمای بهینه، پایداری حرارتی، آسپرژیلوس فلاووس

Engineering of Aspergillus flavus uricase enzyme at position 279 using site-directed mutagenesis for improving thermostability

Masoume Hemmati[1], Bagher Seyedalipour[1,*] Maliheh Sadat Atri[1], Mehdi Imani[2]

1.Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

***Corresponding author*: Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir

Abstract

Uricase enzyme or urate oxidase is one of the oxidases without cofactors the uricase enzyme of Aspergillus flavus catalyzes uric acid into 5-hydroxyisoaurate and hydrogen peroxide, and finally this compound is converted into a removable compound called allantoin through a non-enzymatic reaction. Uricase is a main enzyme in the breakdown of purine nucleotides. This enzyme is widely distributed among microorganisms, but humans and higher primates have lost this enzyme due to nonsense mutations in the Miocene period. The aim of this study is to replace the amino acid alanine at position 279 with cysteine to check the stability of uricase enzyme. To investigate this issue, we used bioinformatics studies such as I-mutant and I-stable serves. servers. In this research, plasmid pET28a(+) containing uricase gene and *E.coli* strain BL21 was used. Targeted mutagenesis was done by quick-change PCR method to create point mutation using pfu DNA polymerase. Ni-NTA affinity chromatography was used for protein purification. After purification, the optimal temperature of 25, 25 and also optimal PH of 8, 9 were obtained for the mutant and wild enzyme respectively. Also, the thermal stability of the mutant enzyme has lost almost 80% of its activity at temperatures of 40, 50, and 60℃. Therefore, in order to stabilize medicinal enzymes, targeted mutagenesis can be used.

Keywords: Uricase, optimum temperature, Thermal stability, Aspergillus flavus

بررسی اثرات ضد تکثیری پپتید SHK از سم شقایق دریایی خلیج فارس(*Stichodactyla haddoni*) بر سلول های سرطانی ریه رده A549

مدیا عبداللهیان[۱]، *محمد نبیونی[۲]، لطیفه کریم زاده[۳]

۱. دانشجوی ارشد گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲. استاد، گروه علوم سلولی مولکولی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

* محمد نبیونی استاد (Devbiokharazmi@gmail.com)

چکیده

مقدمه: یکی از شایع ترین انواع سرطان ها ،سرطان سلول های غیرکوچک ریه (non-small cell lung cancer; NSCLC) است که ۸۰ درصد از انواع سرطان ریه را به خود اختصاص داده است .سم تولید شده توسط شقایق دریایی خلیج فارس مجموعه ای از مولکول های فعال زیستی با خواص ضد سرطانی است. تاکنون گزارشی از مکانیسم اثرات ضدسرطانی پپتید SHK سم در سلول های سرطانی ریه گزارش نشده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد تکثیر سلولی سم شقایق دریایی خلیج فارس بر سلول های سرطانی ریه رده سلولی A549 بود.

روش کار : پپتید SHK مشتق از سم شقایق دریایی در غلظت های سریالی بر سلول های سرطانی ریه در شرایط ازمایشگاهی تاثیر داده شد. اثر وابسته به غلظت و زمان این پپتید بر میزان بقا سلول های سرطانی ریه به روش MTT بررسی گردید و نتایج به روش آنالیز آماری یک طرفه و با سطح معنی داری $p<0.05$ انجام شد.

نتایج: غلظت IC50 از میان غلظت های مختلف پپتید SHK بر روی این رده سلولی در ۲۴ ساعت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد و با گذشت زمان میزان مرگ سلولی تا ۴۸ ساعت افزایش یافت.

بحث: پپتید SHK از محتوای کل سم شقایق دریایی خلیج فارس اثر ضد تکثیری وابسته به دوز و وابسته به زمان بر روی سلول های سرطانی ریه رده A549 دارد.

واژگان کلیدی: تکثیر سلولی، پپتید SHK، سرطان ریه، *Stichodactyla haddoni*

The Evaluation of anti cancer effects of SHK peptide from Persian Gulf sea anemone (*Stichodactyla haddoni*) venom on A549 lung cancer cells

Media Abdollahian[1], *Mohammad Nabiuni[2], Latifeh Karimzadeh[3]

1. Student, Department of cell and molecular biology, Faculty of biological sciences, Kharazmi university, Tehran, Iran

2. Professor, Department of cell and molecular biology, Faculty of biological sciences, Kharazmi university, Tehran, Iran

3. Department of Animal biology, Faculty of biological sciences, Kharazmi university, Tehran, Iran

* Mohammad Nabiuni, Professor (Devbiokharazmi@gmail.com)

Abstract

Introduction: One of the most common types of cancer is non-small cell lung cancer (NSCLC), which accounts for 80% of all types of lung cancer. The venom produced by the Persian Gulf sea anemone is a collection of Bioactive molecules with anti-cancer properties. So far, there has been no report on the mechanism of anticancer effects of SHK poison peptide in lung cancer cells. The aim of this study was to investigate the anti-proliferative effects of Persian Gulf sea anemone venom on A549 cell lung cancer.

Methods: SHK peptide derived from sea anemone venom in serial concentrations was affected on lung cancer cells in vitro. The concentration and time-dependent effect of this peptide on the survival rate of lung cancer cells was investigated by MTT method, and the results were performed by one-way statistical analysis with a significance level of $p<0.05$.

Results: The concentration of IC50 among different concentrations of SHK peptide on this cell line was 350 µg/ml in 24 hours, and the rate of cell death increased up to 48 hours.

Conclusion: SHK peptide from the total content of Persian Gulf sea anemone venom has a dose-dependent and time-dependent antiproliferative effect on A549 lung cancer cells.

Keywords: cell proliferation, SHK peptide, lung cancer, *Stichodactyla haddoni*

فعال‌سازی مسیر Wnt در سلول‌های کومولوس تحت درمان توسط IVF

شکیبا روشنایی[۱*]، فرزانه محمدی فارسانی[۲]، بهناز صفار[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست سلولی مولکولی دانشگاه شهرکرد

۲- استادیار گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی نقش جهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه شهرکرد

Roshanaei89@gmail.com

چکیده

ناباروری زمانی اتفاق می‌افتد که یک زوج نمی‌توانند بصورت طبیعی بچه دار شوند و باید از روش‌های کمک باروری مثل IVF و ICSI استفاده کنند. شناخت پارامترهای مهم درروند لانه‌گزینی با افزایش موفقیت روش‌های کمک باروری همراه است. در این مطالعه، جهت شناسایی ژن‌ها و مسیرهای سیگنال‌رسانی مهم در روند لانه‌گزینی جنین، به پایگاه GEO مراجعه شده و سری GSE9526 انتخاب گردید. این سری حاوی اطلاعات بیانی سلول‌های کومولوس در نمونه‌های بلاستوسیست و جنینی تحت درمان توسط IVF است که در این مطالعه توسط ابزار آنالیز GEO2R آنالیز شد. نتایج این مطالعه نشان داد که دو ژن PRICKLE2 و PLEKHF1 تفاوت بیان معناداری در سلول‌های جنینی نسبت به سلول‌های بلاستوسیست دارند. بررسی مسیرهای سیگنال‌رسانی مرتبط با این دو ژن در پایگاه داده Enrichr نشان داد که مسیر Wnt به طور معناداری با این دو ژن در ارتباط است. مسیر سیگنالینگ Wnt یک مسیر حفظ شده تکاملی است که جنبه-های حیاتی تعیین سرنوشت سلول، مهاجرت سلولی، قطبیت سلولی، الگوهای عصبی و اندام زایی را در طول رشد جنینی تنظیم می‌کند. مطالعات نشان داده است که در اواخر روز ۴ تا اوایل روز ۵، بلاستوسیست مسیر سیگنالینگ Wnt/β-catenin را در اپی‌تلیوم مجرای رحم فعال می‌کند که باعث پیشروی تا مرحله‌ی لانه-گزینی جنین و بارداری می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نیز تایید کننده ارتباط مسیر Wnt با باروری موفق در IVF است.

کلمات کلیدی: ناباروری، مسیر سیگنال‌رسانی Wnt، سلول‌های کومولوس، IVF

Shakiba Roshanaei [1]*, Farzaneh Mohmadi Farsani [2], Behnaz Saffar [3]
1- Master of science student of cellular and molecular biology
2- Assistant Professor of Molecular Genetics, Naghshejahan Higher Education Institute, Isfahan, Iran
3- Associate Professor of genetic shahrekurd university
Roshanaei89@gmail.com

Abstract
Infertility occurs when a person cannot get pregnant and must use assisted reproductive methods such as IVF and ICSI. Knowing the important parameters in the process of implantation is associated with increasing the success of assisted reproductive methods. In this study, in order to identify important genes and signaling pathways in the process of embryo implantation, the GEO database was referred to and the GSE9526 series was selected. This series contains the expression information of cumulus cells in blastocyst and embryo samples treated by IVF, which was analyzed throught GEO2R. The results of this study showed that PRICKLE2 and PLEKHF1 genes have significant expression differences in embryonic cells compared to blastocyst cells. Enrichment analysis with Enrichr database showed that the Wnt signaling pathway is significantly related to these two genes. The Wnt signaling pathway is an evolutionarily conserved pathway that regulates critical aspects of cell fate determination, cell migration, cell polarity, neural patterning, and organogenesis during embryonic development. Studies have shown that at the end of day 4 to the beginning of day 5, the blastocyst activates the Wnt/β-catenin signaling pathway in the epithelium of the uterine, which leads to the stage of embryo implantation and pregnancy. The results of the present study also confirm the relationship between the Wnt pathway and successful fertility in IVF.

بررسی بیان ژن‌های *HTR1A*، *HTR2A* و *HTR3A* در بیماران مبتلا به گلوکوم

صفیه حیدری صادق[۱]، درمحمد کردی تمندانی[۲و*]، محمد اریش[۳]، میلاد ملاعلی[۴]

۱. دانشجو کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. استاد ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۳. متخصص چشم، گروه چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۴. دانشجو دکترا ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

*نویسنده مسئول: درمحمد کردی تمندانی، استاد ژنتیک مولکولی؛ dor_kordi@science.usb.ac.ir

چکیده

مقدمه: گلوکوم به عنوان دومین عامل اصلی نابینایی در سراسر جهان شناخته می‌شود. گلوکوم زاویه باز اولیه (POAG) یک اختلال پیشرونده است چشم است که با تغییرات در سر عصب بینایی همراه با از دست دادن میدان بینایی (VF) مشخص می‌شود. سروتونین، ۵-هیدروکسی تریپتامین (5-HT)، یک پیام‌رسان کلیدی است که طیفی از عملکردهای مرکزی و محیطی را در بدن انسان میانجی‌گری می‌کند. هدف از این پژوهش ارزیابی بیان نسبی ژن‌های *HTR1A*، *HTR2A* و *HTR3A* در بیماران مبتلا به POAG در شهر زاهدان می‌باشد. روش کار: در پژوهش حاضر ۴۰ نمونه خون از مراجعه کنندگان به بیمارستان چشم پزشکی الزهرا زاهدان اخذ شد. ۲۰ عدد از نمونه‌ها بیماران مبتلا به POAG بوده و ۲۰ نمونه دیگر افراد فاقد این بیماری (گروه کنترل) بودند. ابتدا استخراج RNA و به دنبال آن سنتز cDNA صورت گرفت. در نهایت روش quantitative Real-Time PCR به منظور بررسی الگوی بیان نسبی ژن‌های *HTR1A*، *HTR2A* و *HTR3A* به کار گرفته شد. نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ برای تحلیل‌های آماری استفاده شد. نتایج: بیان ژن *HTR2A* در بیماران ۱۳٪ کاهش یافته بود ($p<۰/۰۰۱$ و ۰/۲۰۵ - ۰/۰۵۷ =CI)؛ اما دو ژن دیگر افزایش بیان در بیماران نسبت به افراد کنترل نشان دادند (برای *HTR1A*: ۴۳٪ ($p<۰/۰۰۱$، ۰/۳۶۳ - -۰/۵۳۵ =CI) و برای *HTR3A* ۶۲٪ ($p<۰/۰۰۱$ و ۰/۵۳۷ - -۰/۷۲۰ =CI)). بحث: به نظر می‌رسد تحقیقات بیشتر در ژن‌های گیرنده سروتونین انسانی یک راه امیدوارکننده برای مشخص کردن پاتوژنز PAOG باشد.

کلمات کلیدی: گلوکوم زاویه باز اولیه، *HTR1A*، *HTR2A*، *HTR3A*، بیان ژن

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Analysis of *HTR1A*, *HTR2A*, and *HTR3A* Genes Expression in Patients with Glaucoma

Safie Heydari Sadeq[1], Dor-Mohammad Kordi-Tamandani[2,*], Mohammad Arish[3], Milad Mollaali[4]

1. Master of Science Student in Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
2. Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
3. Ophthalmologist, Department of Ophthalmology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
4. PhD Student in Molecular Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

*Corresponding author: Dor-Mohammad Kordi-Tamandani, Professor of Molecular Genetics; E-mail: dor_kordi@science.usb.ac.ir

Abstract

Introduction: Glaucoma is known as the second leading cause of blindness worldwide. Primary open-angle glaucoma (POAG) is a progressive eye disorder characterized by changes in the optic nerve head with visual field (VF) loss. Serotonin, 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a key messenger that mediates a variety of central and peripheral functions in the human body. The aim of this study is to evaluate the relative expression of *HTR1A*, *HTR2A* and *HTR3A* genes in POAG patients in Zahedan City. Methodology: In the current study, 40 blood samples were collected from patients referred to Al-Zahra Ophthalmology Hospital in Zahedan. Twenty of the samples were patients with POAG and the other 20 samples were individuals without this disease (control group). First, RNA was extracted and following that, cDNA was synthesized. Finally, the quantitative real-time PCR technique was used to investigate the relative expression pattern of *HTR1A*, *HTR2A*, and *HTR3A* genes. SPSS version 27 software was used for statistical analysis. Results: *HTR2A* gene expression was decreased by 13% in patients (p<0.001 and CI= 0.057 - 0.205); But two other genes showed increased expression in patients compared to control subjects (for *HTR1A*: 43% (p<0.001, CI= -0.535 - -0.363) and for *HTR3A*: 62% (p<0.001) and CI= -0.537 - -0.720)). Further research into the human serotonin receptor genes appears to be a promising avenue for pinpointing the pathogenesis of PAOG.

Keywords: Primary open-angle glaucoma, *HTR1A*, *HTR2A*, *HTR3A*, Gene expression

ارزیابی الگوی بیان ژن‌های *DRD2*، *DRD3* و *DRD4* در بیماری گلوکوم

الناز نرماشیری[۱]، درمحمد کردی تمندانی[۲و*]، شهرام بنائی[۳]

۱. دانشجو کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. استاد ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۳. متخصص چشم، گروه چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
*نویسنده مسئول: درمحمد کردی تمندانی، استاد ژنتیک مولکولی؛ dor_kordi@science.usb.ac.ir

چکیده

مقدمه: گلوکوم به مجموعه‌ای از نوروپاتی‌های پیشرونده بینایی اطلاق می‌شود که شامل دژنراسیون دیسک بینایی و انحراف میدان بینایی، با یا بدون فشار خون چشمی است. دوپامین انتقال‌دهنده عصبی غالب در شبکیه می‌باشد. هدف این مطالعه مقایسه الگوهای بیان ژن‌های گیرنده دوپامین (*DRD2*، *DRD3* و *DRD4*) در بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه و گروه کنترل می‌باشد. روش کار: این پژوهش بر مبنای خون محیطی از ۲۰ فرد مبتلا به گلوکوم زاویه باز و ۲۰ فرد کنترل که همگی مراجعه‌کنندگان به بیمارستان الزهرا شهر زاهدان بودند بنا گردید. RNA تام سلول از نمونه‌های خون با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA، استخراج شد و بلافاصله از آن‌ها cDNA سنتز شد. در نهایت بیان ژن‌های *DRD2*، *DRD3* و *DRD4* در کنار ژن خانه‌دار *GAPDH* در دستگاه StepOne Real-Time PCR به روش نسبی اندازه‌گیری شد. داده‌های خروجی، توسط نرم‌افزارهای آماری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج: بیان تمام ژن‌ها در بیماران گلوکومی از لحاظ آماری معنی‌دار بود (هر سه ژن $p <$ ۰/۰۰۱) و همگی افزایش بیان داشتند (*DRD2*، ۵۱٪؛ *DRD3*، ۶۲٪؛ *DRD4*، ۲۷٪). همچنین بین خود ژن‌ها با هم نیز همبستگی معنی‌دار مثبت وجود داشت (بین *DRD2* و *DRD3*، ۰/۶۸۴؛ بین *DRD2* و *DRD4*، ۰/۵۲۶؛ و بین *DRD3* و *DRD4*، ۰/۷۸۵). همبستگی منفی نیز بین سن و گزوه سنی با ژن *DRD2* مشاهده شد (به ترتیب ۰/۴۰۸- و ۰/۳۶۵-). **بحث:** بیان گیرنده‌های دوپامین در این پژوهش در بیماران گلوکومی بالاتر بود. لذا می‌توان آن‌ها را به عنوان نشانگرهای زیستی احتمالی در گلوکوم زاویه باز اولیه مورد مطالعات بیشتر قرار داد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، *DRD2*، *DRD3*، *DRD4*، گلوکوم زاویه باز اولیه

Evaluation of *DRD2*, *DRD3*, and *DRD4* Genes Expression Pattern in Glaucoma Disease

Elnaz Narmashiri[1], Dor-Mohammad Kordi-Tamandani[2,*], Shahram Banaie[3]

۵. Master of Science Student in Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
۶. Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
۷. Ophthalmologist, Department of Ophthalmology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan,

*Corresponding author: Dor-Mohammad Kordi-Tamandani, Professor of Molecular Genetics; E-mail: dor_kordi@science.usb.ac.ir

Abstract

Introduction: Glaucoma refers to a series of progressive optic neuropathies that involve optic disc degeneration and visual field aberration, with or without ocular hypertension. Dopamine regulates diverse aspects of brain function and plays roles in multiple psychiatric and neurological conditions. Dopamine is the predominant neurotransmitter in the retina. This study aims to compare the expression patterns of dopamine receptor genes (*DRD2*, *DRD3*, and *DRD4*) among patients with primary open-angle glaucoma and the control group. Methods: This research was based on the peripheral blood samples of 20 patients with angle-closure glaucoma and 20 controls, all referred to Al-Zahra Hospital in Zahedan. An RNA extraction column kit was used to extract total cell RNA from blood samples and immediately synthesize cDNA from the extracted RNA. Finally, the expression of *DRD2*, *DRD3*, and *DRD4* genes along with the *GAPDH* housekeeping gene was measured using a relative method in the StepOne Real-Time PCR device. The output data was analyzed using statistical software to analyze the results. Results: All three genes were statistically significant (p <0.001) in glaucoma patients, and all had increased expression (*DRD2*, 51%; *DRD3*, 62%; *DRD4*, 27%). Moreover, there were significant positive correlations between the genes themselves (between *DRD2* and *DRD3*, 0.684; between *DRD2* and *DRD4*, 0.526; between *DRD3* and *DRD4*, 0.785). Furthermore, a negative correlation was observed between age and age group with the *DRD2* gene (-0.408 and -0.365, respectively). Discussion: Dopamine receptor expression in this study was higher in glaucoma patients. Therefore, they can be extensively studied as possible biomarkers in primary open-angle glaucoma.

Keywords: Gene expression, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4*, Primary open-angle glaucoma

بررسی میزان بیان ژن‌های *CHD1L*، *ERCC6* و *ITGB7* در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال

سمیرا ستوده[۱]، درمحمد کردی تمندانی[۲و*]، علیرضا بخشی پور[۳]، میلاد ملاعلی[۴]

۱. دانشجو کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. استاد ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۳. فوق تخصص گوارش، گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۴. دانشجو دکترا ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

*نویسنده مسئول: درمحمد کردی تمندانی، استاد ژنتیک مولکولی؛ dor_kordi@science.usb.ac.ir

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال چهارمین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان در بزرگسالان در جهان می باشد که ۹٪/۲ از مرگ و میرهای ناشی از این بیماری را به خود اختصاص می‌دهد و آن را دومین سرطان شایع در زنان و سومین سرطان شایع در مردان تبدیل می‌کند. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد *CHD1L*، *ITGB7* و *ERCC6* در ایجاد سرطان کولورکتال اولیه نقش دارند. هدف ما تعیین بیان نسبی ژن‌های *CHD1L*، *ITGB7* و *ERCC6* در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در زاهدان است. روش کار: جامعه آماری متشکل از ۲۰ بافت کولون بیماران است که در دو وضعیت توموری و حاشیه سالم آن ها مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از طی کردن مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA، روش qRT-PCR برای بررسی الگوی بیان نسبی ژن‌ها در دو وضعیت توموری و سالم به کار گرفته شد. *GAPDH* به عنوان ژن خانه‌دار انتخاب شد و از نرم افزار SPSS نیز برای تحلیل های آماری داده‌ها استفاده شد. نتایج: ژن *ERCC6* در بافت توموری ۹٪ افزایش بیان داشت ($p<0.001$). اما ژن‌های *CHD1L* و *ITGB7* به ترتیب ۱۳٪ و ۵٪ کاهش بیان داشتند ($p<0.001$). بحث: یافته‌های این پژوهش می‌تواند به عنوان یک استراتژی هدفمند برای تشخیص و درمان سرطان کلورکتال در آینده مورد بررسی بیشتر قرار گیرند.

کلمات کلیدی: بیان ژن، *CHD1L*، *ITGB7*، *ERCC6*، سرطان کلورکتال

Evaluation of *CHD1L*, *ERCC6* and *ITGB7* Genes Expression in Patients with Colorectal Cancer

Samira Sotudeh [1], Dor-Mohammad Kordi-Tamandani[2,*], Alireza Bakhshipour [3], Milad Mollaali[4]

1.Master of Science Student in Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
2.Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
3.Gastrointestinal Fellowship, Department of Internal Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
4.PhD Student in Molecular Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

*Corresponding author: Dor-Mohammad Kordi-Tamandani, Professor of Molecular Genetics; E-mail: dor_kordi@science.usb.ac.ir

Abstract

Colorectal cancer is the fourth most frequent cause of cancer death in adults worldwide, accounting for 9.2% of deaths due to the disease, making it the second most common cancer in women and the third most common in men. There is increasing evidence that CHD1L, ITGB7, and ERCC6 play a role in the development of early colorectal cancer. We aim to determine the relative expression of *CHD1L*, *ITGB7*, and *ERCC6* genes in Zahedan patients with colorectal cancer. A total of 20 colon tissues from patients were examined for both tumor and healthy margins as a statistical population. After going through the stages of RNA extraction and cDNA synthesis, qRT-PCR method was used to check the relative expression pattern of genes in both tumor and healthy conditions. *GAPDH* was selected as the housekeeping gene, and SPSS software was also used for statistical data analysis. Results: *ERCC6* gene expression increased by 9% in tumor tissue (p<0.001). However, *CHD1L* and *ITGB7* genes had a 13% and 5% decrease in expression, respectively (p<0.001). Discussion: The findings of this research can be further investigated as a targeted strategy for the diagnosis and treatment of colorectal cancer in the future.

Keywords: Colorectal cancer, *ERCC3*, *ERCC4*, *ERCC5*, Gene expression

بررسی میزان بیان ژن‌های *ERCC3*، *ERCC4* و *ERCC5* در مبتلایان به سرطان کلورکتال

شهناز دهواری[۱]، درمحمد کردی تمندانی[۲و*]، حمیدرضا زیوری فر[۳]، میلاد ملاعلی[۴]

۱. دانشجو کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. استاد ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۳. فوق تخصص گوارش و کبد، گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۴. دانشجو دکترا ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

*نویسنده مسئول: درمحمد کردی تمندانی، استاد ژنتیک مولکولی؛ dor_kordi@science.usb.ac.ir

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال سومین نئوپلاسم بدخیم و چهارمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. علاوه بر این، تخمین‌زده می‌شود که این مرگ و میرها ۶۰٪ تا سال ۲۰۳۵ افزایش یابد. ترمیم برش نوکلئوتیدی (NER) یک مسیر ضروری ترمیم DNA است که به حذف ضایعات حجیم مانند محصولات نوری ایجاد شده توسط جزء فرابنفش تشعشع خورشیدی اختصاص داده شده است. ژن‌های ERCC از عوامل محوری در مسیر سیگنالینگ NER می‌باشند. بیان غیرطبیعی این ژن‌ها می‌تواند منجر به عدم تعادل بین آسیب DNA و ترمیم گردد. در پژوهش حاضر، هدف بررسی الگوی بیان ژن‌های *ERCC3*، *ERCC4* و *ERCC5* در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال در شهر زاهدان می‌باشد. روش کار: ۴۰ نمونه بافت کولون از ۲۰ بیمار مراجعه کننده (۸ زن و ۱۲ مرد) به بیمارستان علی ابن ابیطالب زاهدان توسط پزشک معالج اخذ گردید. ۲۰ نمونه بافت توموری بوده و ۲۰ نمونه دیگر بافت سالم حاشیه بافت توموری همان بیماران بود. استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد و از تکنیک qRT-PCR به منظور بررسی بیان ژن‌ها استفاده گردید. نتایج: ژن *ERCC3* حدود ۱۱٪ کاهش بیان در بافت توموری نسبت به سالم کاهش بیان نشان داد ($p<۰/۰۰۱$ و CI= ۰/۰۵۶ - ۰/۱۲۶)؛ اما برای ژن ERCC4 حدود ۱۶٪ افزایش بیان ($p<۰/۰۰۱$، CI= -۰/۲۰۵ - -۰/۱۲۲) و در ژن ERCC5 ۱۹٪ ($p<۰/۰۰۱$، CI= -۰/۲۳۴ - -۰/۱۴۰) افزایش بیان مشاهده گردید. بحث: شواهد ما نشان می‌دهد که بیان متفاوت تغییریافته ژن‌های این پژوهش در پیشرفت سرطان کلورکتال تأثیر دارند.

کلمات کلیدی: سرطان کلورکتال، *ERCC3*، *ERCC4*، *ERCC5*، بیان ژن

Evaluation of *ERCC3*, *ERCC4*, and *ERCC5* Genes Expression in Patients with Colorectal Cancer

Shahnaz Dehvari[1], Dor-Mohammad Kordi-Tamandani[2,*], Hamidreza Zivarifar[3], Milad Mollaali[4]

1.Master of Science Student in Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
2.Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
3.Gastrointestinal Fellowship, Department of Internal Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
4.PhD Student in Molecular Genetics, Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

*Corresponding author: Dor-Mohammad Kordi-Tamandani, Professor of Molecular Genetics; E-mail: dor_kordi@science.usb.ac.ir

Abstract

Introduction: Colorectal cancer is the third malignant neoplasm and the fourth cause of cancer-related deaths worldwide. Furthermore, these deaths are estimated to increase by 60% by 2035. Nucleotide excision repair (NER) is a DNA repair pathway dedicated to removing bulky waste photoproducts generated by the ultraviolet component of solar radiation. ERCC genes are central factors in the direction of NER. Abnormal expression of these genes can lead to the absence of DNA damage and repair. The present study aims to investigate the expression pattern of *ERCC3*, *ERCC4*, and *ERCC5* genes in patients with colorectal cancer in Zahedan City. Methods: 40 colon tissue samples were taken from 20 patients (8 females and 12 males) referred to Ali Ibn Abi Talib Hospital of Zahedan by the attending physician. Twenty samples were tumor tissue, and the other 20 samples were healthy tissue, tumor tissue of the same patients. RNA extraction and cDNA synthesis were performed, and the qRT-PCR technique was used to investigate gene expression. Results: The *ERCC3* gene showed an 11% decrease in expression in tumor tissue compared to healthy tissue (p<0.001 and CI= 0.056 - 0.126). Nevertheless, for the *ERCC4* gene, about a 16% increase in expression (p<0.001, CI= -0.205 - -0.122); and, for the *ERCC5* gene, 19% (p<0.001, CI= -0.234 - -0.140) increased expression was observed. Discussion: Our evidence shows that the differentially altered expression of this study's genes affect colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer, *ERCC3*, *ERCC4*, *ERCC5*, Gene expression

بررسی اثرات محافظتی کو آنزیم Q10 بر عملکرد بافت کلیه در موش سوری دریافت کننده بوسولفان

علی لویی منفرد*[۱]، ابراهیم بابااحمدی[۱]،عارف دلخوش[۲]

*۱.گروه بافت شناسی و میکروب شناسی،دانشکده پیرادامپزشکی،دانشگاه ایلام،ایلام،ایران.

۲.دکترای تخصصی پاتولوژی دامپزشکی،دانشکده دامپزشکی،دانشگاه ارومیه،ارومیه،ایران.

*ایمیل نویسنده مسئول: a.loueimonfared@ilam.ac.ir

چکیده

مقدمه: بوسولفان یک داروی ضد سرطان است که دارای اثرات سمی بر یاخته های مختلف بدن به ویژه دستگاه ادراری می باشد. یکی از مهم ترین عوارض جانبی آن، تغییر عملکرد و آسیب کلیوی می باشد و ممکن است منجر به نارسایی کلیه گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی کوآنزیم Q10 به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی بر سمیت القا شده توسط داروی بوسولفان در بافت کلیه موش های کوچک سفید آزمایشگاهی بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، تعداد ۲۴ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی ماده به وزن تقریبی ۲۰-۲۵ گرم بصورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. گروه کنترل به صورت روزانه سرم نرمال سالین با دوز(۰,۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی)،گروه بوسولفان (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی و تک دوز)، گروه بوسولفان(مشابه دوز گروه دوم)+ کوآنزیمQ10(۲۰میلی گرم بر کیلوگرم روزانه بصورت خوراکی) و گروه کوآنزیم Q10(۲۰میلی گرم بر کیلوگرم روزانه بصورت خوراکی)دریافت کردند.پس از پایان دوره آزمایش، تمامی حیوانات با تزریق داخل صفاقی زایلازین و کتامین بیهوش و خونگیری از قلب انجام و میزان اوره و کراتینین سرم سنجش شد.سپس

نمونه های بافت کلیه از بدن خارج و پس از ثبوت در فرمالین ۱۰٪ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج و بحث: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد دریافت داروی بوسولفان در موش های سوری موجب اختلال در عملکرد بافت کلیه و افزایش اوره و کراتینین سرم شده و دریافت کوآنزیم Q10 منجر به کاهش معنی دار آنها شده است($p<0/05$).همچنین ارزیابی های هیستوپاتولوژیک بافت کلیه در گروه بوسولفان حاکی از احتقان،التهاب بینابینی و تخریب بافت پوششی توبول ها بود و کوآنزیم Q10 در گروه سوم موجب بهبود وضعیت بافت کلیه و نزدیک شدن به شرایط طبیعی شده بود.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد کوآنزیم Q10 به دلیل دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی و حفاظتی می تواند از بافت کلیه در برابر آسیب ناشی از دریافت داروی بوسولفان جلوگیری نماید و موجب بهبود عملکرد آن شود.

کلمات کلیدی: بوسولفان،کلیه، کوآنزیم Q10، آنتی اکسیدان، موش سوری

Evaluation of protective effects of co-enzyme Q10 on kidney tissue function in mice receiving busulfan

Ali Loueimonfared[1*], Ebrahim Babaahmadi[1], Aref Delkhosh[2]

*1.Department of Histology and Microbiology,Faculty of Paraveterinary,Ilam University,Ilam.Iran.

2. Graduate of Veterinary Pathology,Faculty of Veterinary,Urmia University,Urmia,Iran.

*Corresponding e.mail:a.loueimonfared@ilam.ac.ir

Abstract

Introduction: Busulfan is an anti-cancer drug that has toxic effects on various body cells, especially the urinary system. One of the most important side effects is the change in kidney function, damage and may lead to kidney failure. The aim of this study was to investigate the protective effects of coenzyme Q10 as a strong antioxidant on toxicity induced by the drug busulfan in the kidney tissue of lab mice.

Methods: In this experimental study, 24 female mice weighing approximately 20-25 gr were randomly divided into 4 groups of 6 each and treated for 21 days. The control group received daily normal saline with a dose (0.1 ml intraperitoneally), busulfan group (10 mg/kg of body weight intraperitoneally and single dose), busulfan group (same dose as the second group) + coenzyme Q10(20 mg/kg daily orally) and the coenzyme Q10 group (20 mg/kg daily orally). After the end of the experimental period, all animals were anesthetized with intraperitoneal injection of xylazine and ketamine and blood was taken from the heart and Urea and Creatinine levels were Serum was measured. Then the kidney tissue samples were removed from the body and after being fixed in 10% formalin and hematoxylin-eosin staining, they were studied by light microscope.

Results and discussion: The results of this study showed that the administration of busulfan in mice caused kidney tissue dysfunction and increased serum urea and creatinine, and administration of coenzyme Q10 led to a significant decrease in them($p<0.05$). Also, the histopathological evaluations of the kidney tissue in the busulfan group indicated congestion, interstitial inflammation, and destruction of the tubules' epithelial tissue, and coenzyme Q10 in the third group improved the condition of the kidney tissue and brought it closer to normal conditions. Conclusion: The present study showed that coenzyme Q10, due to its antioxidant and protective properties, can prevent kidney tissue from damage caused by taking busulfan and improve its function.

Key words: busulfan, kidney, coenzyme Q10, antioxidant, mice

بررسی برهمکنش کمپلکس cis-[Pd(pyrr)2Cl2] با آلبومین سرم گاوی به کمک طیف سنجی جذب الکترونی

اعظم راشکی کمک[۱]، خاطره عبدی[۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

چکیده

آلبومین‌های سرم با اتصال به لیگاندهای مختلف و منجمله داروها بر میزان جذب، توزیع، متابولیسم، دفع و همچنین ثبات و سمیت داروها تأثیر قابل توجهی می‌گذارند. بنابراین، بررسی برهم‌کنش آلبومین سرم و مولکول‌های کوچک نه تنها برای درک فرآیندهای انتقال و متابولیسم آن‌ها در بدن مهم است، بلکه می‌تواند بینشی در مورد سمیت داروها در سطح مولکولی فراهم کند. در این تحقیق، برهم‌کنش کمپلکس cis-[Pd(pyrr)Cl_2] (که در آن pyrr = پیرولیدین) با آلبومین سرم گاوی (BSA) در بافر تریس (pH = ۷) در دو دمای ۲۹۸ و ۳۱۰ کلوین، به‌کمک طیف‌سنجی جذب الکترونی مطالعه شد. این مطالعات شامل تعیین ثابت پیوند شدن کمپلکس مورد مطالعه با سرم آلبومین (K)، غلظتی از کمپلکس که در آن نیمی از BSA موجود در محیط غیرطبیعی می‌شود ($L_{1/2}$) و پارامترهای ترمودینامیکی می‌شوند. در فرآیند تیتراسیون BSA با کمپلکس Pd(II) مشخص شد که صورتبندی این پروتئین با افزایش غلظت کمپلکس تغییر کرده زیرا جذب BSA در ۲۸۰ نانومتر افزایش معنی‌داری نشان داد. مقادیر ثابت پیوند (K) بین کمپلکس مورد مطالعه و DNA در دمای ۲۹۸ و ۳۱۰ کلوین به ترتیب برابر $۴/۶ \times ۱۰^{۴}$ و $۷/۴ \times ۱۰^{۳}$ M^{-1} محاسبه شد و مقادیر $L_{1/2}$ در این دو دما به ترتیب ۰/۰۲ و ۰/۰۴ mM به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده حاکی از برهم‌کنش نسبتاً قوی بین کمپلکس Pd(II) با BSA می‌باشد. در بررسی پارامترهای ترمودینامیکی، منفی بودن مقدار $\Delta G°$

خودبخودی بودن برهم‌کنش را تایید نمود. منفی بودن ΔH° و ΔS° نشان می‌دهد که نوع پیوند بین کمپلکس مورد مطالعه و BSA از نوع هیدروژنی و واندروالس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس پالادیم (II)، آلبومین سرم گاوی، طیف سنجی جذب الکترونی، پارامترهای ترمودینامیکی

complex and bovine serum albumin Study of the interaction between *cis*-[Pd(pyrr)Cl_2] using electronic absorption spectroscopy

Azam Rashki Kemmak[1], Khatereh Abdi[2]*

[1]MSc student, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

Abstract

Serum albumins have a significant effect on the absorption, distribution, metabolism, excretion, as well as the stability and toxicity of drugs via their binding to each other. Therefore, investigation of the interaction between serum albumin and small molecules is not only important for understanding their transport and metabolism processes in the body, but can also provide insight into the toxicity of drugs at the molecular level. In this research, the interaction of *cis*-[Pd(pyrr)Cl_2] (pyrr = pyrrolidine) with bovine serum albumin (BSA) was studied by electronic absorption spectroscopy in Tris buffer (pH = 7) at two temperatures of 298 and 310 K. These studies include determination of the binding constant of metal complex to serum albumin (K), the midpoint concentration of metal complex that can denature half of the BSA molecules present in the medium ($L_{1/2}$) and the thermodynamic parameters. In the titration of BSA with Pd(II) complex, it was found that the conformation of this protein changed upon addition of the metal compound. It is because, the absorbance of BSA at 280 nm showed a significant decrease with increasing the concentration of the metal complex. The binding constant values (K) between the studied complex and BSA were calculated to be 4.6×10^4 and 7.4×10^3 M^- and the values of $L_{1/2}$ were obtained 0.02 and 0.04 mM, at 303 and 310 K, respectively. The obtained results indicate a moderately strong interaction between the Pd(II) complex and BSA. While studying thermodynamic parameters: the negative values of $\Delta G°$, confirmed the spontaneous nature of the reaction and the negative values of $\Delta H°$ and $\Delta S°$ indicate that the type of binding between the studied complex and BSA is hydrogen bonding and van der Waals interactions.

Keywords: Pd(II) complex, Bovine serum albumin, Electronic absorption spectroscopy Thermodynamic parameters

بررسی اثر عصاره گیاه آدنیوم آبسئوم در القای آپوپتوز در رده سلولی Ej138 در شرایط آزمایشگاهی

سید محمود مولی[۱]، جمیل زرگان[۲]*، اشکان حاجی نور محمدی[۳]، محمد صادق عوده زاده[۴]، حسین دلاوری[۵]

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۵. دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۶. پژوهشگر، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۷. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۸. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: Zargan@ihu.ac.ir

چکیده

بیشتر انواع سرطان‌ها در نتیجه تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در یک سلول واحد ایجاد می‌شوند. مشخصه سرطان، تغییر در بیان ژن‌هایی است که این تغییر منجر به بی‌نظمی در برنامه طبیعی سلول برای تقسیم و تمایز سلولی می‌شود. در سراسر جهان، خطر ابتلا به سرطان مثانه در مردان ۱/۱٪ و در زنان ۰/۲۷٪ است. خواص ضد سرطانی بسیاری از گیاهان دارویی، از طریق مکانیسم‌های مختلفی صورت میگیرد یکی از آن فرایندها القای آپوپتوز است.گیاه آدنیوم آبسئوم از جمله گیاهانی است که خواص دارویی فراوانی دارد و اثرات ضد سرطانی این گیاه نیز گزارش شده است. در این مطالعه به بررسی اثر عصاره گیاه آدنیوم آبسئوم در القای آپوپتوز در رده سلولی Ej138 در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شده است. در این مطالعه از تست کامت قلیایی به منظور بررسی آسیب‌های القا شده به DNA توسط غلظت‌های مختلف ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره خام، بر روی سلول Ej138 استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان القاء آپوپتوز عصاره خام گیاه در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۴۵، ۵۱ و ۵۸

درصد بوده است. همچنین نتایج نشان داد عصاره خام گیاه در غلظت‌های فوق، آپوپتوز را در سلول به صورت معنی‌دار القاء نموده و مرگ سلول‌های سرطانی را درپی داشت. این مطالعه نشان داد که عصاره خام گیاه آدنیوم آبسئوم سبب القای آپوپتوز در سلول‌های Ej138 می‌شودو میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی در یک الگوی وابسته به غلظت، بصورت معناداری افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: کامت قلیایی، سرطان مثانه، آپوپتوز، کشت سلول

Exploring the impact of Adenium abesum extract on the induction of apoptosis within the Ej138 cell line in an in vitro setting

Seyed Mahmood Moula[1], Jamil Zargan*[2], Ashkan Hajinoor Mohammadi[3], Mohammad Sadegh Odehzadeh[4], Hossein Delavari[5]

1.Master student, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

3. Researcher, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

4. Master student, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

5. Master student, Department of Biology, Faculty of Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran

*Correspond: Zargan@ihu.ac.ir

Abstract

The majority of cancer types arise due to the accumulation of genetic and epigenetic alterations within a single cell. A hallmark of cancer is alterations in gene expression, resulting in disruption of the standard cellular processes for differentiation and proliferation. Globally, the incidence of bladder cancer in males and females is 1.1% and 0.27%, respectively. One of the mechanisms by which medicinal plants exhibit anticancer properties is through the induction of apoptosis, among other processes. The Adenium abesum plant possesses multiple therapeutic qualities, inclusive of reported anti-cancer properties. The present study examines the impact of Adenium abesum plant extract on the initiation of apoptosis in Ej138 cell line under controlled laboratory conditions. The present investigation utilized the alkaline comet test to examine the harm inflicted on Ej138 cells' DNA by varied levels of crude extract at concentrations of 0.25, 0.5 and 1 µg/ml. It was found that the rate of apoptosis induction by the unrefined plant extract at concentrations of 0.25, 0.5, and 1 µg/ml were 45%, 51%, and 58% correspondingly. Furthermore, as per the findings, the unrefined extract obtained from the plant at the aforementioned dosages yielded a noteworthy increase in apoptotic cell death, thereby facilitating the demise of cancerous cells. The present investigation has demonstrated that the unrefined concentrate derived from the Adenium abesum plant is capable of inducing apoptosis in Ej138 cells. Additionally, it has been

observed that the apoptosis rate of cancer cells shows a noteworthy increase when exposed to the crude extract in a concentration-dependent manner.

Key words: **Alkaline comet, Bladder cancer, Apoptosis, Cell culture**

مطالعه ارتباط ژن MS4A6A سیستم ایمنی با امکان بروز آلزایمر

*معصومه محمودی نیا ۱،فرزام عجمیان!

۱گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه،دانشگاه گیلان،ایران،رشت

*دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، Gmail:MasoumeMahmoudi7776@gmail.com

چکیده:

بیماری آلزایمر،مهمترین اختلال عصبی و شایعترین آسیب عصبی است که خودش را با از دست دادن تدریجی حافظه و آگاهی به صورت پیشرونده نشان میدهد و در نهایت منجر به مرگ بیمار میشود.در این بیماری هم عوامل ژنتیکی و هم عوامل محیطی دخیل هستند و تا ۷۹ درصد وراپت پذیری نشان میدهد.از جمله این ژنهای دخیل در ایجاد بیماری آلزایمر عبارتند از: APP,PSEN1,PSEN2,MS4A,...خانواده ی MS4A دارای خصوصیات ژنی ضعیفی میباشد ولی در حالت کلی نقشهایی برای اعضای این خانواده در نظر گرفته شده از جمله:پروتئینهایی بعنوان آداپتور،در سلولهای خونساز،در سیگنال دهی و تنظیم دقیق فعال سازی سلولها. MS4A6A از جمله اعضای این خانواده است که وراثت پذیری بالایی نشان میدهد، در چند مکان روی بازوی بلند کروزوموزم ۱۱ قرار دارد.افزایش خطر ابتلا به بیماری آلزایمر (AD) قبلاً با یک SNP به نام rs610932 در نزدیکی ژن MS4A6A مرتبط بوده است. هدف از این آزمایش تعیین کمیت بیان دو ایزوفرم MS4A6A در مغز افراد مبتلا به AD و غیر AD بود، به ویژه به عنوان تابعی از ژنوتیپ rs610932. طبق مقالهای MS4A6A دارای چهار ایزوفرم مختلف است که گزارش شده است که در خون افراد مبتلا به AD در مقایسه با افراد غیر AD بیان متفاوتی دارند.دیده شده که در بیماری آلزایمر، دو ژن MS4A4A,MS4A6A افزایش بیان نشان داده اند. ولی به هر جهت،تحقیقات بیشتری نیاز است تا متوجه شویم چگونه این اتفاق رخ میدهد.

کلمات کلیدی:آلزایمر،MS4A،MS4A6A

Abstract:

Alzheimer's disease is the most important neurological disorder and the most common neurological damage that manifests itself with the gradual loss of memory and consciousness and eventually leads to the death of the patient. Both genetic and environmental factors are involved in this disease and It shows 79% reproducibility. Among these genes involved in the development of Alzheimer's disease are: APP, PSEN1, PSEN2, MS4A,…. The MS4A family has weak genetic characteristics, but in general, roles have been considered for the members of this family, including: proteins as adapters, in hematopoietic cells, in signaling and fine-tuning the activation of cells. MS4A6A is one of the members of this family that shows high heritability, located at several locations on the long arm of chromosome 11. Increased risk of Alzheimer's disease (AD) has previously been associated with a SNP named rs610932 near the MS4A6A gene. The aim of this experiment was to quantify the expression of the two MS4A6A isoforms in the brains of AD and non-AD subjects, specifically as a function of rs610932 genotype. According to one article, MS4A6A has four different isoforms, which have been reported to be differentially expressed in the blood of AD subjects compared to non-AD subjects. It has been seen that two genes MS4A4A and MS4A6A have increased expression in Alzheimer's disease. But in any case, more research is needed to understand how this happens.

Key words:Alzheimer,MS4A,MS4A6A

تجزیه و تحلیل ارتباط پلی مورفیسم های A>G ۱۰۸۲-، T>C ۸۹۱- و A>C ۵۹۲- در ژن اینترلوکین-۱۰ با پره اکلامپسی: یک متا آنالیز

دانیال جهان تیغ [۱،*]

[۱] گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

*نویسنده مسئول: دانیال جهان تیغ; آدرس: زاهدان، بلوار دانشگاه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی: ۹۸۱۶۷۴۵۷۸۵، شماره تلفن همراه: ۰۹۱۵۱۴۹۳۰۱۴، تلفن/فکس: ۹۸۵۴ ۳۳۴۴۶۵۶۵ +

ایمیل: yahoo.comdanial_jahantigh@

چکیده

پره اکلامپسی (PE)، یک شکایت جدی از بارداری است و اینترلوکین-۱۰ (IL-10)، می تواند نقش اصلی را در علت آن ایفا کند. سه پلی مورفیسم رایج A>G ۱۰۸۲-، T>C ۸۹۱- و A>C ۵۹۲- در ناحیه پروموتر ژن IL-10 وجود دارد که ممکن است خطر PE را تغییر دهد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ذکر شده با خطر پلی‌مورفولوژیک با استفاده از یک متاآنالیز و سپس با رویکرد in silico بود. پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed، EMBASE، Web of Science و Google Scholar به طور سیستماتیک جستجو شدند تا مطالعات مورد-شاهدی مرتبط منتشر شده تا ژانویه ۲۰۲۳ را بیابند. نسبت‌های شانس ادغام شده (ORs)، با فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI)، تحت مدل‌های ژنتیکی احتمالی مختلف محاسبه شدند. . از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای ارزیابی اثرات مولکولی پلی‌مورفیسم‌های مذکور استفاده شد. نتایج ما ارتباط معنی‌داری را بین پلی‌مورفیسم A>C ۵۹۲- و کاهش خطر PE در جمعیت‌های آسیایی و قفقازی نشان داد. نتایج مشابهی برای پلی‌مورفیسم T>C ۸۹۱- در جمعیت‌های قفقازی مشاهده شد. اما، با توجه به انتقال A>G ۱۰۸۲-، جمعیت آسیایی در معرض خطر بالایی برای PE بودند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داد که هر سه پلی‌مورفیسم مورد مطالعه ممکن است مکان‌های اتصال فاکتور رونویسی را در ناحیه پروموتر IL-10 تغییر دهند. یافته‌های ما نقش محافظتی A>C ۵۹۲- و T>C ۸۹۱- و همچنین نقش بالقوه پلی‌مورفیسم A>G ۱۰۸۲- را در پاتوژنز PE به شیوه‌ای وابسته به قومیت نشان داد. بنابراین، این تغییرات می تواند به عنوان نشانگرهای زیستی ژنتیکی در حساسیت به PE در نظر گرفته شود.

کلیدواژه: پره اکلامپسی اینترلوکین-۱۰; پلی مورفیسم ژنتیکی؛ متاآنالیز

Association analysis of -1082 A>G, -819 T>C, and -592 A>C polymorphisms in the interleukin-10 gene with preeclampsia: a meta-analysis

Danial Jahantigh [1]
[1]Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.

*Corresponding Author: Danial Jahantigh;
Address: Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, University Boulevard, Zahedan, Iran
Postal code: 9816745785
Cellphone number: 09151493014
Tel/Fax: +98 54 33446565
E-mail: denial_jahantigh@yahoo.com

Abstract

Preeclampsia (PE) is a serious complaint of pregnancy and interleukin-10 (IL-10) can play a main role in its etiology. There are three common polymorphisms, -1082 A>G, -819 T>C, and -592 A>C, in the promoter region of IL-10 gene which may alter the risk of PE. The aim of this study was to examine the association of the mentioned polymorphisms with PE risk using a meta-analysis followed by an in silico approach. PubMed, EMBASE, Web of Science, and Google Scholar databases were systematically searched to find relevant case-control studies published up to January 2023. Pooled odds ratios (ORs) with their 95% confidence intervals (CI) were computed under different probable genetic models. Some bioinformatics tools were employed to evaluate the molecular effects of the mentioned polymorphisms. Our results showed significant associations between -592 A>C polymorphisms and decreased risk of PE in Asian and Caucasian populations. The similar results were observed for -819 T>C polymorphism in Caucasian populations. But, with regard to -1082 A>G transition, Asian populations were at high risk for PE. In silico analysis revealed that all three of studied polymorphisms might alter transcription factor binding sites in the promoter region of IL-10. Our finding showed protective roles of -592 A>C and -819 T>C, and the potential role of -1082 A>G polymorphism in the pathogenesis of PE in an

ethnic- dependent manner. Therefore, these variations could be considered as genetic biomarkers in susceptibility of PE.

Key words: Preeclampsia; Interleukin-10; Genetic polymorphism; Meta-analysis

تنظیم مسیر سیگنالینگ بیوژنز لیگاند WNT توسط LncRNA PAN3-AS1 از طریق تعامل با SNX8 mRNA در بیماران مولتیپل اسکلروز

یاسمن مستقیمی[۱]، دکتر زهره حجتی[۲] ، دکتر محمد حدادی[۱*]
[۱]: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل
[۲]: گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان

چکیده

مقدمه: مالتیپل اسکلروزیس (MS) یا اسکلروز چندگانه ،یک بیماری خود ایمنی درگیر کننده اعصاب مرکزی (CNS) بوده که منجر به دمیلینه شدن و دژنراسیون آکسون در مغز و نخاع شده و درنهایت می‌تواند باعث ناتوانی عصبی پیشرونده شود. علائم MS شامل اختلال در عملکردهای خودکار مانند بی خوابی، دردهای عصبی ، اختلالات شناختی، اسپاستیسیتی، بیهوشی، اضطراب و افسردگی است که به طور قابل توجهی کیفیت زندگی بیمار را کاهش می دهد. این علائم تصاعدی و پیشرونده در نهایت باعث کاهش تدریجی توانایی های حرکتی سیستم عصبی می شوند. در این پژوهش ، ما به واسطه آنالیزهای بیوانفورماتیک و پژوهش آزمایشگاهی در کنار هم مسیری برای سنجش بیان ژن و شناسایی مسیر تعامل یک RNA طولانی غیر کدکننده جدید (LncRNA)، *PAN3-AS1* در نمونه‌های MS انجام دادیم.

مواد و روش: آنالیز های Microarray توسط نرم افزار R Studio با استفاده از پکیج های affy و limma انجام شد. تجزیه و تحلیل برهمکنش وتعامل LncRNA-mRNA RNA با استفاده از پایگاه داده LncRRIsearch انجام شد. تجزیه و تحلیل مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با ژن های مورد بررسی توسط نرم‌افزارهای آنلاین KEGG و Reactome انجام شد. آنالیز برهمکنش پروتئین-پروتئین توسط نرم افزار آنلاین STRING انجام شد. تجزیه و تحلیل Gene ontology (GO) توسط پایگاه داده Enrichr انجام شد.

نتایج: براساس آنالیز داده های Microarray، LncRNA *PAN3-AS1* در نمونه‌های MS نسبت به نمونه های سالم، بیان کم‌تری دارد.(logFC: -1.2, adj. P. Val: 0.03) LncRNA *PAN3-AS1* می تواند به عنوان یک نشانگر زیستی تشخیصی بالقوه MS در نظر گرفته شود. بر اساس تجزیه و تحلیل برهم کنش بین LncRNA-mRNA، LncRNA *PAN3-AS1* سطح بیان ژن کد کننده ی پروتئین SNX8 را تنظیم می کند. بر اساس آنالیز برهمکنش پروتئین-پروتئین، SNX8 با پروتئین های VPS29 و MSH3 برهمکنش دارد.

VPS29 مسیر سیگنالینگ بیوژنز لیگاند WNT را تنظیم می کند. بر اساس آنالیز gene ontology ، VPS29 در تنظیم فرآیند کاتابولیک سلولی نقش دارد.

نتیجه گیری : LncRNA *PAN3-AS1* به‌عنوان یک LncRNA با کاهش بیان معنی‌دار در نمونه‌های MS ممکن است در تنظیم سطح بیان پروتئین‌هایSNX8 ، VPS29و MSH3 ایفای نقش کند. از طریق فرآیند تنظیمی ذکر شده، LncRNA *PAN3-AS1* می تواند مسیر سیگنالینگ بیوژنز لیگاند WNT را تعدیل کند. اختلال در مسیر سیگنال دهی WNT ممکن است سیستم عصبی در حالت طبیعی را به وضعیت MS برساند.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، تجزیه و تحلیل Microarray، مسیر غنی سازی (افزاینده) ، ژن شناسی

LncRNA *PAN3-AS1* regulates WNT ligand biogenesis signaling pathway in multiple sclerosis patients via interaction with SNX8 mRNA

Yasaman Mostaghimi [1], Dr Zohreh Hojjati [2], Dr Mohammad Haddadi [1]
Department of Biology, University of Zabol, Zabol, Iran [1]

Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran[2]

Abstract

Introduction :Multiple sclerosis (MS), an autoimmune condition of the central nervous system (CNS), can lead to demyelination and axonal degeneration in the brain and spinal cord, which can cause progressive neurologic disability. MS symptoms include autonomic dysfunction, such as insomnia, neuropathic and nociceptive pain, cognitive impairment, spasticity, dysaesthesia, anxiety, and depression, which significantly reduce patient quality of life. These symptoms appear in addition to the progressive decline in the nervous system's motor abilities. In this investigation, we performed an integrated bioinformatics and experimental approach to find the gene expression and interaction of a novel long non-coding RNA (LncRNA), *PAN3-AS1* in MS samples.

Methods: Microarray analysis was performed by R Studio using affy and limma packages. LncRNA-mRNA RNA interaction analysis was performed using lncRRIsearch database. Pathway enrichment analysis was performed by KEGG and Reactome online softwares. Protein-protein interaction analysis was performed by STRING online software. Gene ontology (GO) analysis was performed by enrichr database.

Results: Based on microarray analysis, LncRNA *PAN3-AS1* has a significant low-expression in MS samples, compared to control. LncRNA *PAN3-AS1* (logFC: -1.2, adj. P. Val: 0.03) could be considered as a potential diagnostic biomarker of MS. Based on LncRNA-mRNA interaction analysis, LncRNA *PAN3-AS1* regulates the expression level of SNX8. Based on protein-protein interaction analysis, SNX8 has interaction with VPS29 and MSH3 proteins. VPS29 regulates WNT ligand biogenesis signaling pathway. Based on gene ontology analysis, VPS29 involves in regulation of cellular catabolic process.

Conclusion: LncRNA *PAN3-AS1* as a significant low-expressed LncRNA in MS samples might regulate the expression level of SNX8, VPS29, and MSH3 proteins. Through mentioned regulatory process, LncRNA *PAN3-AS1* could modulate WNT ligand biogenesis signaling pathway. Dysregulation of WNT signaling pathway might lead the normal nervous system to the MS status.

Keywords: Multiple Sclerosis, Microarray Analysis, Pathway Enrichment, Gene Ontology

بررسی سطح بیان فاکتورهای رونویسی NFATc1 در لنفوسیت‌های بیماران مبتلا به COVID-19

امید خمر، نیما سندگل، محمد حدادی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل

چکیده

زمینه و هدف: کروناویرو سها خانواده بزرگی از ویرو سها هستند که در انسان و حیوان منجر به بیماری م یشوند. بیماران مبتلا به بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ (طیفی از علائم با شدت متفاوت از جمله تب، سرفه، گلودرد و غیره را نشان می‌دهند و در اکثر افراد خفیف است. اولین واکنش سیستم ایمنی در برابر ویروس را نوتروفیل‌ها تشکیل داده و ماکروفاژها و دندرتیک سل‌ها فرایند بیگانه‌خواری را انجام می‌دهند. در ادامه سیستم ایمنی تطبیقی (لنفوسیت B و T) وارد عمل می‌شود. لنفوسیت‌های T کمک‌کننده، به واکنش قوی‌تر سیستم ایمنی بدن در برابر ویروس و هدایت لنفوسیت‌های T کشنده به سوی سلول‌های آلوده به ویروس کمک می‌کنند. فاکتورهای هسته‌ای سلول های‌T فعال (NFAT: Nuclear factor of activated T cells) از پنج ایزوفرم (NFATc1-c4، NFAT5) تشکیل شده است. این پروتئین‌ها نوعی فاکتور رونویسی هستند که هم در سیتوپلاسم و هم در هسته انواع سلول‌های بدن وجود دارند. NFATها در توسعه و فعال سازی سلول‌های ایمنی، به ویژه لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها نقش دارند. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان فاکتور NFATc1 را در زمان تشخیص بیماری کرونا (قبل از درمان) و پس از پایان بیماری بود.

مواد و روش ها: تعداد ۱۰۰ نمونه خون از افراد مراجعه کننده به بیمارستان بوعلی زاهدان با کسب رضایت-نامه در ابتدای بیماری (قبل از شروع درمان) جمع آوری شد که۵۰ نفر تایید شده مبتلا به کووید۱۹ و ۵۰ نفرسالم به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. با استفاده از محلول ترایزول می‌توان RNA با کیفیت بالا را جداسازی کرد. سنتز cDNA این فرایند با استفاده از کیت شرکت سیناکلون انجام شده در نهایت میزان تفاوت بیان ژن با استفاده از فرمول 2-ΔΔCT حاصل می‌شود و با کمک نرم افزار های آماری نظیر SPSS و آزمون‌هایی نظیر آزمون chi-square سطح اختلاف بیان ژن مورد نظر در ابتدا و انتهای بیماری کووید۱۹ تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: سیستم ایمنی اکتسابی شامل لنفوسیت های T و B با از بین بردن مستقی سلول های آلوده، ترشح سایتوکاین های تقویت کننده پاسخ ها و ترشح آنتی بادی های خنثی کننده در جهت ریشه کن کردن ویروس در بدن فعالیت می کنند ولی انحراف این پاسخ هتا به سمت T helper نیز می تواند زمینه ساز التهاب غیرقابل کنترل و آسیب بافتی شود. درمان های ضدالتهابی، ضدویروسی، سرم درمانی و حمایتی برای بیماران بدحال مورد استفاده اند. فاکتورهای هسته‌ای سلول هایT فعال (NFAT) نقش ویژه ای در تشخیص و درمان این بیماری دارند.از بین بیماران مبتلا شده پس از تایید به روش PCR تعداد ۵۸٪ ژن NFATc1 را بیان کردند.

نتیجه گیری: از آنجا که NFATها در توسعه و فعال سازی سلول‌های ایمنی، به ویژه لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها نقش بسزایی دارند میتوان نتیجه گرفت که میزان بیان NFAT1 در این بیماری در جهت درمان و تشخیص کمک شایانی خواهد نمود.

کلید واژه ها: کوید ۱۹، qRT PCR، لنفوسیت T، NFATc1

Investigating the expression level of NFATc1 transcription factor in lymphocytes of patients with COVID-19

Omid Khammar, Nima Sanadgol, Mohammad Haddadi*

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol.

Abstract

Background: Coronaviruses are a large family of viruses that cause disease in humans and animals. Patients with the 2019 coronavirus disease (show a range of symptoms of varying severity, including fever, cough, sore throat, etc., and it is mild in most people. The first reaction of the immune system against the virus is formed by neutrophils, and macrophages and Dendritic cells carry out the process of xenophagy. Next, the adaptive immune system (B and T lymphocytes) comes into action. T lymphocytes contribute to a stronger reaction of the body's immune system against the virus and direct killer T lymphocytes to the cells. infected with the virus. Nuclear factors of activated T cells (NFAT) consist of five isoforms (NFATc1-c4, NFAT5). These proteins are a type of transcription factor that is found both in the cytoplasm and in the nucleus of various types of cells. exist in the body. NFATs play a role in the development and activation of immune cells, especially T lymphocytes and macrophages. The purpose of this study is to investigate the expression level of NFATc1 factor at the time of diagnosis of corona disease (before treatment) and after the end It was a disease.

Materials and Methods: 100 blood samples were collected from people referred to Bo Ali Zahedan hospital with consent at the beginning of the disease (before starting treatment), 50 people confirmed to be infected with covid-19 and 50 healthy people were considered as negative controls. High quality RNA can be isolated by using Trizol solution. The cDNA synthesis of this process was done using the Cinacloon company kit. Finally, the difference in gene expression is obtained using the formula 2-ΔΔCT, and with the help of statistical software such as SPSS and tests such as the chi-square test, the level of expression difference The desired gene was analyzed at the beginning and end of the disease of Covid-19.

Findings: The acquired immune system, including T and B lymphocytes, works to eradicate the virus in the body by directly destroying infected cells, secreting cytokines that strengthen responses, and secreting neutralizing antibodies, but the deviation of this response even leads to T helper can also cause uncontrollable inflammation and tissue damage. Anti-inflammatory, antiviral, serum therapy and supportive treatments are used for critically ill patients. The nuclear factors of activated T cells (NFAT) have a special role in the diagnosis and treatment of this disease. Among the affected patients, 58% expressed the NFATc1 gene after confirmation by PCR.

Conclusion: Since NFATs play a significant role in the development and activation of immune cells, especially T lymphocytes and macrophages, it can be concluded that the level of NFAT1 expression in this disease will help in the treatment and diagnosis.

Keywords: COVID-19, qRT PCR, T lymphocyte, NFATc1

مقالات کامل

بررسی میزان بیان ژن LncRNAH19 اگزوزومی به عنوان بیومارکر تشخیصی سرطان پستان

فاطمه مومنی‌مقدم[۱]، حسینعلی ساسان*[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید با هنر کرمان

۲. بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

حسینعلی ساسان*: hsasa@uk.ac.ir

چکیده:

سرطان پستان بیشترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان در کل جهان است. بنابراین شناسایی روش‌ها و نشانگرهای زیستی جدید برای درمان سرطان پستان ضروری است. هدف از انجام این پژوهش بررسی بیان LncRNAH19 سرطان زا در خون بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌باشد. در این مطالعه نمونه خون از ۳۰ زن سالم و ۳۰ زن بیمار مبتلا به سرطان پستان جمع آوری شد. سپس استخراج RNA از ارگانلهای اگزوزومی انجام و در ادامه cDNA سنتز شد. تکنیک Real-Time PCR برای اندازه گیری سطح بیانLnc RNAH19 صورت گرفت. میزان بیان Lnc RNA H19 در نمونه های اگزوزومی خون بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به افراد سالم تغییرات معنی داری نداشت، اگرچه با کاهش نسبی همراه بود. نظر به عدم وجود اختلاف معنی دار در نمونه های اگزوزومی افراد مبتلا و سالم در مقادیر Lnc RNAH19 می توان گفت اندازه گیری میزان این نوع RNA ها نمی‌تواند بیومارکرهای مناسبی برای تشخیص و حتی برای درمان سرطان پستان باشند.

واژگان کلیدی: Real Time PCR، Lnc RNAهای سرطان‌زا، سرطان پستان.

Abstract:

Breast cancer is the leading cause of cancer deaths among women worldwide. Therefore, it is necessary to identify new methods and biomarkers for breast cancer treatment. The purpose of this research is to investigate the expression of 2 carcinogenic LncRNAs in blood exosome samples of breast cancer patients. In this study, blood samples were collected from 30 healthy women and 30 women with breast cancer, exosome was extracted from the blood, then RNA was extracted and cDNA was synthesized. Real-time PCR technique was used to measure the expression level of H19 Lnc RNAs. The level of Lnc RNA H19 expression in the blood samples of breast cancer patients did not change compared to healthy people. Although it was associated with a relative decrease. Due to the lack of significant difference in exosome samples of affected and healthy people in Lnc RNAH19 levels, it can be said that measuring the amount of these types of RNAs cannot be suitable biomarkers for breast cancer diagnosis and even treatment.

Keywords: Real-time PCR, Oncogenic lncRNA, Breast cancer,Exosome, H19

مقدمه

سرطان پستان شایعترین سرطان و همچنین اصلی ترین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان سراسر جهان است. حدود ۱,۳۸ میلیون مورد جدید سرطان پستان در سال ۲۰۰۸ تشخیص داده شد که تقریبا ٪۵۰ از کل بیماران مبتلا به سرطان سینه و حدود ٪۶۰ از مجموع مرگ و میر مربوط به کشورهای در حال توسعه بود. سرطان پستان ۲۱,۴ ٪ از سرطان‌های بدخیم را در میان زنان ایران شامل می‌شود. به دلیل کم کاری در غربالگری سازمان دهی شده و هم چنین کمبود برنامه آموزشی جهت تشخیص اولیه وبه موقع سرطان پستان در ایران، حدود ۷۰ ٪ زنان ایرانی در مراحل خطرناکی از این بیماری تشخیص داده می‌شوند.

اگزوزومها وزیکول‌های کوچک دارای غشا و در اندازه‌ی ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که در مایعات بدن نظیر بزاق، خون، ادرار، مایع منی، سرم و غیره یافت می‌شوند. اگزوزوم‌ها نقشی چند وجهی در توسعه و پیشرفت تومورها دارند. از یک جنبه، اگزوزوم‌ها توانایی جلوگیری از رشد سلول‌های توموری را دارند. از جنبه دیگری، اگزوزوم‌ها می‌توانند وقوع و پیشرفت تومورها را تقویت کرده و نقش مهمی در روند تهاجم و متاستاز تومور داشته باشند (۱). تایید شده که LncRNA ها نقش مهمی در پیشرفت سرطان و متاستاز دارند. اگزوزوم‌ها دارای طیف وسیعی از lncRNA ها هستندکه به تعدیل بیان ژن با مهار ترجمه یا با عمل به عنوان endogenous RNA رقابتی شناخته میشوند(۲).

H19 یک مولکول RNA ترجمه نشده با طول ۲۳۰۰ جفت باز است. مجموعه وسیعی از مطالعات تایید کرده اند که H19 در تمایز و تکثیر سلولی نقش دارد. علاوه بر این، تحقیق در مورد کاربرد آن در محیط بالینی نشان داد که H19 دارای پتانسیل برای خدمت به عنوان نشانگر زیستی سرطان، و نوید به عنوان یک گزینه درمانی جدید در انکوتراپی است (۴۰). lncRNA H19، محصول رونویسی ژن H19 است. ژن H19 یک انکوژن در سرطان سینه است و در بافت‌های سرطانی بیشتر از بافت‌های طبیعی بیان می‌شود. سطح بیان H19 با سرطان زایی، تکثیر، تهاجم، متاستاز و مقاومت دارویی در سرطان پستان مرتبط است. بیان H19 ممکن است به عنوان یک هدف تشخیصی برای سرطان پستان باشد (۳). هدف اصلی این پژوهش اندازه گیری تغییرات سطح بیان Lnc RNA نوع UCA1 در افراد سالم و مبتلا به سرطان پستان میباشد که می تواند به عنوان یک بیومارکر احتمالی پیش تشخیصی سرطان پستان استفاده شود.

مواد و روشها:

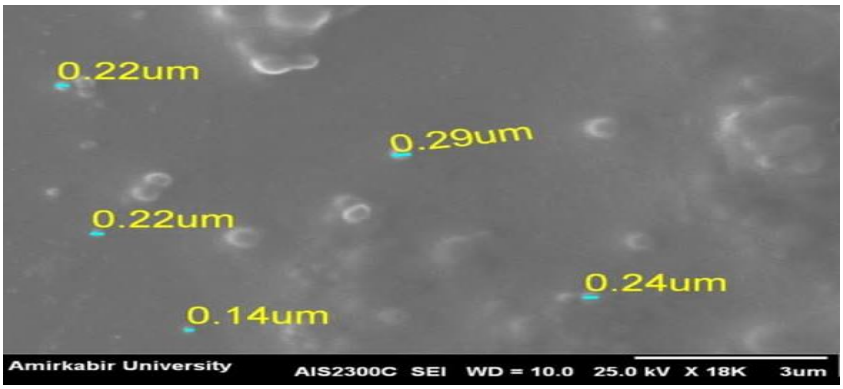
نمونه گیری: برای نمونه گیری از ۳۰ خانم مبتلا به سرطان پستان که بالاتر از ۲۵ سال سن داشتند و هیچ گونه درمانی اعم از شیمی درمانی و رادیو تراپی و به علاوه هیچ گونه جراحی پستان روی آنها صورت نگرفته بود، به میزان ۸ میلی لیتر خون گرفته شد. نمونه گیری از بیمارستان‌های فرمانیه و سینا در تهران صورت

گرفت . نمونه های خون تازه در لوله‌های جمع آوری خون CLOT-ACTIVATOR ژل دار جمع اوری و سپس برای جداسازی سرم به انستیتو پاستور منتقل شدند. **ملاحظات اخلاقی:** یک گام مهم جهت رعایت موازین اخلاقی در تحقیقاتی همچون این تحقیق داشتن رضایت تک تک افراد اعم از سالم و بیمار می‌باشد. در این پژوهش به تمامی افراد فرم رضایت نامه جهت گرفتن نمونه خون از آنها داده شد. **استخراج ذرات اگزوزومها: استخراجRNA** : برای اسخراج کل RNA از کیت های شرکت زاور زیست آزما استفاده شد. نمونه های استخراج شده در میزان ۳۰ میکرولیتر DEPC Water حل و در دمای 20°C- نگهداری شدند. کمیت و کیفیت RNA خالص شده با دستگاه نانودراپ سنجیده شده و نمونه های با غلظت بالاتر ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر انتخاب شدند.

طراحی پرایمرها: با استفاده از سایت NCBI ردیف ژن *β-ACTIN* به عنوان کنترل و ردیف ژنH19 به عنوان ژن هدف اخذ و آغازگرهای واتسون و کریک در آزمایشگاه با عناوین **actinW and actinC:** **actinW: 5'-ctcttccagccttccttcct-3'; actinC:5'-agcactctgttggcgtacag-3'** و آغازگرهای جلوبرنده ژن هدف با عناوین **HF** and **HR** ، **HF: 5'-gccttcctgaacacctta-3'; HR:5'-ttgtccccattttccatcat-3'** طراحی و از شرکت شرکت متابیون آلمان با OD بین ۲ تا ۴ خریداری شدند. **ساخت cDNA و Real Time PCR** ساخت cDNA با استفاده از کیت SMOBIO و دستور العمل داده شده و سپس با برنامه دمایی ۵۰ دقیقه در 50°C و ۵ دقیقه در دمای 80°C انجام شد. آزمایش Real Time PCR با استفاده از کیت AMPLICON شامل آب مقطر 7.5µl، پرایمر جلوبرنده (100µM) یک میکرولیتر، پرایمر برگشت (100µM) یک میکرولیتر، cDNA نیم میکرولیتر و مسترمیکس Mastermix به میزان 10µl با حجم کلی هر تیوب ۲۰ میکرولیتر و با استفاده از یک برنامه زمانی- دمایی 15 دقیقه در 95°C ، ۲۰ ثانیه در 95°C، ۳۰ ثانیه در 55°C، ۲۰ ثانیه در 72°C و ۳۰ دور انجام شد. **نرم افزارهای آنالیز آماری:** بررسی داده‌ها توسط نرم افزارهایLinRegPCR ، Excel و SPSS انجام شد. با استفاده ازLinRegPCR میزان کارایی پرایمر محاسبه شد. توسط Excel میزان CT مقایسه‌ای محاسبه شد و جهت رسم نمودارها و بررسی معنادار بودن عوامل مختلف موثر بر بیان از نرم افزار SPSS استفاده شد. سطح معناداری در نرم افزار SPSS کمتر از ۰،۰۵ در نظر گرفته شد.

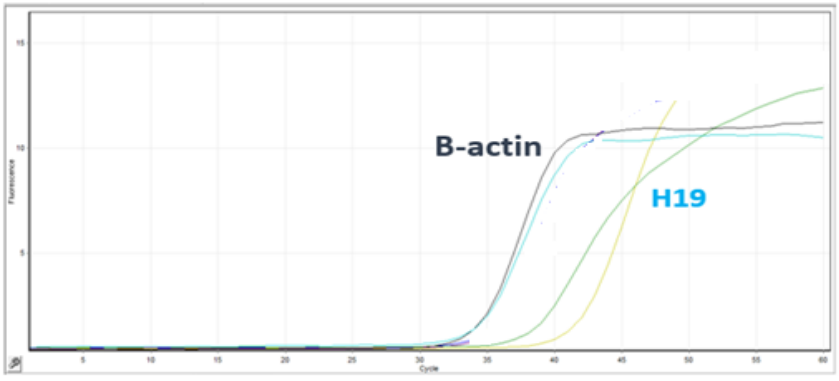
نتایج و بحث:

نتایج عکس برداری میکروسکوپ الکترونی وجود اندامکهای اگزوزوم را در شکل یک (۱) نشان می دهد. اندازه های در حد میکرومتر در تطابق با مقادیر مورد انتظار می باشد.

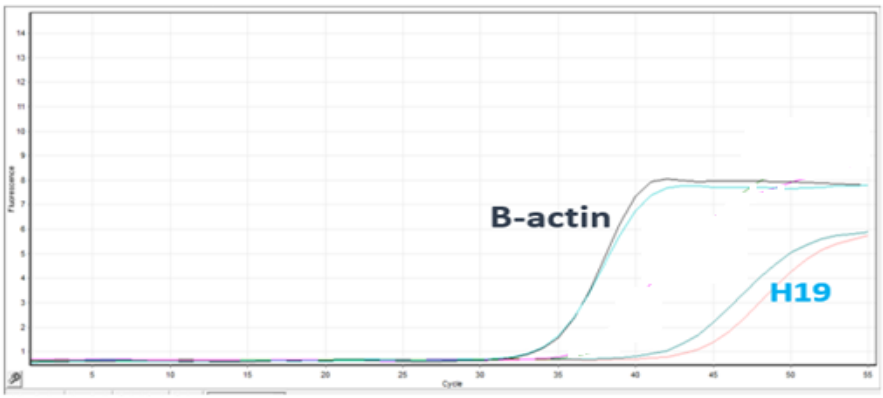


شکل۱: مشاهده اگزوزوم‌ها را توسط میکروسکوپ الکترونی نشان می دهد.

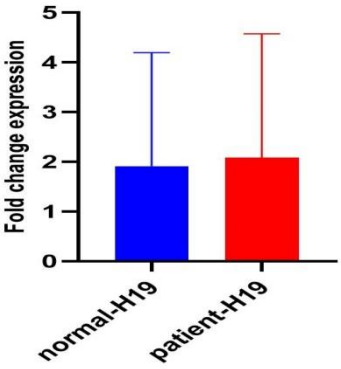
شکل ۲ منحنی میزان بیان ژن H19 و ژن کنترل را در آزمایش Real-time RTPCR در یک فرد سالم نشان می دهد. شکل ۳ میزان بیان ژن H19 و ژن کنترل را در آزمایش Real-time RTPCR در یک فرد مبتلا به سرطان پستان نشان می دهد. شکل شماره ۴ مقایسه میزان بیان ژن H19 در یک فرد سالم و بیمار نشان می دهد که فاقد اختلاف معنی دار است. نتایج در شکل ۴ نشان می دهد که میزان بیان Lnc RNA H19در بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به افراد سالم P Value =0.8205 ، تغییر معناداری با توجه به نمودار ۴ نداشته است.



شکل۲: این شکل میزان بیان ژن‌های Lnc RNAH19 سرطان زا در یک فرد سالم را در مقایسه با ژن کنترل داخلی β-actin نشان می دهد.



شکل ۳: این شکل میزان بیان ژن‌های Lnc RNAH19 سرطان زا در یک فرد مبتلا به سرطان پستان را در مقایسه با ژن کنترل داخلی β-actin نشان می دهد.



شکل ۴: الگوی میزان بیان Lnc RNA H19 را در افراد سالم و بیمار مبتلا به سرطان پستان نشان می دهد. تفاوت در این مقادیر معنی دار نیست.

بحث:

در حال حاضر، سرطان پستان با استفاده از معاینات جسمی و تصاویر حاصل از تکنیک‌هایی از جمله ماموگرافی و سی تی اسکن تشخیص داده میشود. با این وجود تکنیک‌های تصویر برداری موجود حساسیت کافی برای آشکار نمودن توده‌های کوچک و در مراحل اولیه بیماری را ندارند. همچنین ناهمگونی بالای تومورهای پستانی و در برخی موارد نیز شباهت بالای تومورهای بدخیم و خوشخیم، تشخیص به موقع تومورهای بدخیم و طبقه بندی مناسب آن‌ها را با مشکل مواجه کرده است و بنابراین تعیین درمان مناسب برای هر بیمار نیز با مشکل مواجه می‌شود. در نتیجه، تلاش برای شناسایی مارکرهای مولکولی اختصاصی جهت تشخیص زودهنگام و افتراقی تومورهای پستانی و انتخاب روش درمانی مناسبتر از اهمیت ویژه‌ای

برخوردار می‌باشد. به عبارتی جستجوی مارکرهای مولکولی که بتوانند به تشخیص این سرطان در مراحل اولیه پیشروی، درک بهتری از رفتار سلول‌های سرطانی و در نهایت انتخاب بهترین روش درمانی برای هر بیمار کمک کنند بسیار حائز اهمیت است. در سال‌های اخیر نیز تلاش‌های زیادی به منظور کشف مارکرهای مولکولی که بتوانند به عنوان فاکتور کمک تشخیصی و پیش آگهی دهنده در کنار سایر روش‌های پاتولوژیکی به کار گرفته شوند، انجام شده است .نتایج حاصل از مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که lncRNAها ممکن است نقش‌های عملکردی در سرطان زایی و رشد سرطان ایفا کنند و بنابراین lncRNAهای عملکردی می‌توانند برای تشخیص سرطان و یا پیش اگهی و یا به عنوان اهداف درمانی مورد استفاده قرار گیرند(۴) .

وزیکول‌های خارج سلولی شامل اگزوزوم‌ها، میکرووزیکول‌ها و انکوزوم‌های بزرگ هستند که فرآیندهای اساسی را در طول پیشرفت تومور از طریق تعامل مستقیم با سلول‌های هدف هماهنگ می‌کنند. مدت‌ها قبل از گسترش سلول‌های تومور به مکان‌های متاستاتیک آینده، اگزوزوم‌های ترشح شده از تومور وارد گردش خون می‌شوند و جایگاه‌های دور پیش از متاستاتیک را ایجاد می‌کنند. شواهد جدید حاکی از آن است که اگزوزوم‌های سرطان سینه با القای نشت عروقی، رگزایی، تهاجم، تعدیل ایمنی و مقاومت شیمیایی، پیشرفت تومور و متاستاز را افزایش می‌دهند. اگزوزوم‌ها تقریباً در تمام مایعات فیزیولوژیکی از جمله پلاسما، ادرار، بزاق و شیر مادر یافت می‌شوند که منبع ارزشمندی برای توسعه بیومارکرهای سرطان غیرتهاجمی است. در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک SEM (مشاهده اگزوزوم‌ها در ابعاد 0.55 um – 0.14) و تکنیک DLS ثابت شده که وزیکول‌های استخراج شده از نوع اگزوزوم هستند (۵) .

در چند دهه گذشته، lncRNA ها سابقه طولانی را تجربه کرده اند، از آنکه بعنوان غیرکارآمد در نظر گرفته شدند تا اینکه به عنوان یک عامل مهم در پیشرفت انواع تومورهای بدخیم در نظر گرفته شدند، توجه زیادی را از چندین مورد به خود جلب کردند. بسیاری از محققان پژوهش‌های خود را بر روی نحوه عملکرد و تاثیر lncRNAها در سرطان پستان انجام دادند (۶). یک علت شایع مرگ در اثر سرطان با یک پیش آگهی بسیار ضعیف است. از آنجا کهlncRNA ها، یک کلاس جدید ازRNA های نظارتی هستند و همچنین در زیست شناسی سرطان نقش دارند، در اینجا نقش احتمالی آنها به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی و پیش آگهی یا اهداف درمانی در سرطان پستان بررسی شده است. مطالعات قبلی بیانگر بیان غیر طبیعی LncRNAهای درگیر در شروع و توسعه سرطان پستان بوده است و نشان داده شده است که چندین LncRNAبا سرطان پستان همراه بوده و نشان دهنده پیش آگهی ضعیف است، از جملهHOTAIR ، GAS5، H19، MALAT1، JADE وUCA1 (۷). H19 از طریق تعامل با پروتئین، میکروRNA ها، miR-675-5p مشتق شده از H19 وH19antisenselncRNA (H19) در سرطان پستان درگیر است. نشان داده شده است که میزان بیان H19 در بیوپسی سرطان و در پلاسما به طور چشمگیری افزایش یافته است و

میزان H19 پلاسما به طور قابل توجهی با گیرنده استروژن و پروژسترون و متاستاز گره‌های لنفاوی در ارتباط است(۸).

در تحقیق حاضر طبق نتایج بدست آمده مشخص شد که میزان بیان Lnc RNA H19 در اگزوزوم خون بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به خون افراد سالم افزایش چشم گیری ندارد. تعداد فزاینده‌ای از استراتژی‌های درمانی جدید برای درمان سرطان پستان از جمله درمان هدفمند مولکولی، ژن درمانی و ایمنوتراپی ساخته شده است، با این حال نتایج درمانی رضایت بخش حاصل نشده است و سرطان پستان یک نگرانی عمده بهداشت عمومی است.

منابع

1. Zhou R, Chen KK, Zhang J, Xiao B, Huang Z, Ju C, et al. The decade of exosomal long RNA species: an emerging cancer antagonist. Molecular cancer. 2018;17(1):1-14.
2. Sun Z, Yang S, Zhou Q, Wang G, Song J, Li Z, et al. Emerging role of exosome-derived long non-coding RNAs in tumor microenvironment. Molecular cancer. 2018;17(1):1-9.
3 Wang J, Sun J, Yang F. The role of long non‐coding RNA H19 in breast cancer. Oncology letters. 2020;19(1):7-16.
4. Han Y, Yang Y-n, Yuan H-h, Zhang T-t, Sui H, Wei X-l, et al. UCA1, a long non-coding RNA up-regulated in colorectal cancer influences cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution. Pathology. 2014;46(5):396-401.
5 Pelissier Vatter FA, Lucotti S, Zhang H. Recent advances in experimental models of breast cancer exosome secretion, characterization and function. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2020;25(4):305-17.
6. Wu Y, Shao A, Wang L, Hu K, Yu C, Pan C, et al. The role of lncRNAs in the distant metastasis of breast cancer. Frontiers in oncology. 2019;9:407.
7. Lei B, Xu S-p, Liang X-s, Li Y-w, Zhang J-f, Zhang G-q, et al. Long non-coding RNA MVIH is associated with poor prognosis and malignant biological behavior in breast cancer. Tumor biology. 2016;37(4):5257-64.
8. Collette J, Le Bourhis X, Adriaenssens E. Regulation of human breast cancer by the long non-coding RNA H19. International journal of molecular sciences. 2017;18(11):2319.

شناسایی جهش c.C 616T در ژن MFSD8 در بیمار مبتلا به CLN7

طیبه باران زهی*

گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
*kiana8588@gmail.com

چکیده

مقدمه و هدف: لیپوفاسینوسیس های سروئید عصبی نشان دهنده گروهی از اختلالات ،نورودژنراتیو پیشرونده و نادر هستند. این بیماری ها از نظر بالینی و ژنتیکی بسیار ناهمگن بوده که عمدتاً کودکان ۲ تا ۶ ساله را تحت تأثیر قرار می دهند. جهش در حداقل ۱۳ ژن مختلف، کد کننده ی پروتئین‌های محلول و پروتئین‌های غشایی، که در شبکه آندوپلاسمی یا اندامک‌های اندوزومی/لیزوزومی قرار دارند، باعث ایجاد اشکال مختلف NCL می شوند.کودکان مبتلا عمدتاً رشد روانی حرکتی طبیعی خود را، تا زمانی که رشد تدریجی تشنج، کاهش بینایی، زوال عقلی و حرکتی، اختلال شناختی و در نهایت مرگ زودرس اتفاق افتد، نشان می دهند. با وجود نادر بودن این بیماری، سالانه ۳۰۰ تا ۳۵۰ مورد NCL در ایالات متحده گزارش می شود. بالاترین میزان بروز در برخی از کشورهای شمال اروپا (یک در ۱۴۰۰۰ در ایسلند) گزارش شده است، در حالی که بروز بیماری برای بسیاری از کشورهای دیگر از جمله ایران ناشناخته است. در این پژوهش بیمار مبتلا به CLN7 مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفت. **مواد و روش ها**: DNA با استفاده از روش salting out استخراج و توالی یابی کل اگزوم جهت شناسایی جهش استفاده شد. **نتایج:** توالی یابی اگزوم جهش nonsense در اگزون۷ ژن *MFSD8* نشان داد. این جایگاه کد کننده ی اسیدآمینه گلوتامات ۲۰۶ است که پس از جهش کدون پایان ایجاد می شود. **نتیجه گیری:** جهش شناسایی شده در این مطالعه در مقالات قبلی گزارش شده است.

کلمات کلیدی: توالی یابی کل اگزوم، MFSD8،CLN7 .

Identification of c.C 616T mutation in the *MFSD8* gene in a patient with CLN7

Tayebeh Baranzehi

Department of Biology, university of Sistan and Baluchestan, Zahedan,Iran.

kiana8588@gmail.com

Abstract

Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) represent a group of rare progressive neurodegenerative LSD. This diseases are clinically and genetically heterogeneous, mainly affecting children aged 2 - 6 years. Mutations in at least 13 different genes, encoding soluble proteins and membrane proteins, located in the ER or endosomal/lysosomal organelles, cause various forms of NCL. Affected children mostly show normal psychomotoric development until progressive development of seizures, vision loss, intellectual and motor decline, cognitive impairment, and eventually premature death. Despite the rarity of this disease, 300–350 cases of NCLs are reported annually in the US. The highest incidence rates have been reported in some Nordic countries (1/14000 in Iceland), while incidence is unknown for many other countries, including Iran. In this study, a patient with CLN7 was examined genetically. **Material and method:** DNA was extracted using the salting out method and whole exome sequencing was used to identify the mutation**. Result:** Exome sequencing showed nonsense mutation in exon 7 of *MSD8* gene. This position encodes glutamate 206 amino acid, and after mutation creates a stop codon. **Conclusion**: This mutation has been reported previously in articles.

Keywords: whole exome sequencing, MFSD8, CLN7.

مقدمه

بیماری باتن نام رایج گروه ناهمگن ژنتیکی و بالینی از اختلالات ارثی و تحلیل برنده عصبی پیشرونده مغز و در بیشتر موارد شبکیه است، که لیپوفاسینوزیس های سروئید عصبی[1] (NCLs) نامیده می شود[۱, ۲]. این طیف بیماری ها با زوال تدریجی ذهنی و حرکتی، نارسایی بینایی، تشنج، آتروفی مخچه و مرگ زودرس مشخص می‌شوند و کودکان و بزرگسالان جوان را تحت تاثیر قرار می دهند [۲]. سن شروع بیماری عمدتا در دوران کودکی است. در اکثر NCL ها، کودکان تا زمان بروز اولین علائم، رشد کاملاً طبیعی دارند. این بیماری ها در ابتدا با تشنج بدون تب و به دنبال آن از دست دادن بینایی، زوال عقلی و حرکتی، اختلال شناختی و در نهایت مرگ زودرس ظاهر می شوند. این گروه از بیماری‌های نورودژنراتیو تحت عنوان بیماری‌های ذخیره‌سازی لیزوزومی طبقه‌بندی می‌شوند[۳]. با توجه به سن شروع اولین علائم بالینی، این بیماری ها به شش زیر گروه طبقه بندی می شوند:

فرم شروع مادرزادی (CLN10)، فرم شروع شیرخوارگی (CLN1)، یا بیماری سانتاووری-هالتیا، فرم شروع دیررس شیرخوارگی (CLN2)، یا بیماری جانسکی بیلشوسکی، فرم شروع دیررس نوزادی (CLN5، CLN6، CLN7 و CLN8)، فرم شروع جوانی (CLN3) یا بیماری اسپیل-مایر-وگت-شوگرن و فرم شروع بزرگسالان (CLN4) یا بیماری کوف[۴]. این ژن‌ها پروتئین‌های لیزوزومی محلول با عملکرد آنزیمی (پالمیتول-پروتئین تیو استراز ۱/CLN1، تری پپتیدیل-پپتیداز۱/ CLN2، CLN5، کاتپسین D /CLN10 و کاتپسینF /CLN13)، پروتئین های غشای لیزوزوم(CLN3 و CLN7)، پروتئین های غشای شبکه آندوپلاسمی (CLN6 و CLN8)، گرانولین/ CLN11 یک پروتئین مسیر ترشحی، پروتئین های غشایی اندوزوم (CLN12) و پروتئین های محلول در سیتوزول (CLN4 و CLN14) را کد میکنند[۵, ۶]. این تحقیق با هدف بررسی ژنتیکی دختر بچه بیمار دارایCLN7 با استفاده از روش توالی یابی نسل جدید انجام شد.

مواد و روش ها

کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد(IR.MUMS.REC.1395.534) این مطالعه را از نظر اخلاقی تایید کرد و رضایت نامه کتبی آگاهانه از شرکت کنندگان در مطالعه گرفته شد.

استخراج DNA

DNA ژنومی از خون محیطی پروباند و اعضای خانواده وی با استفاده از روش مشخص شده salting out استخراج و کیفیت و یکپارچگیDNA استخراج‌شده با الکتروفورز ژل (آگارز ۱ درصد) ارزیابی شد.

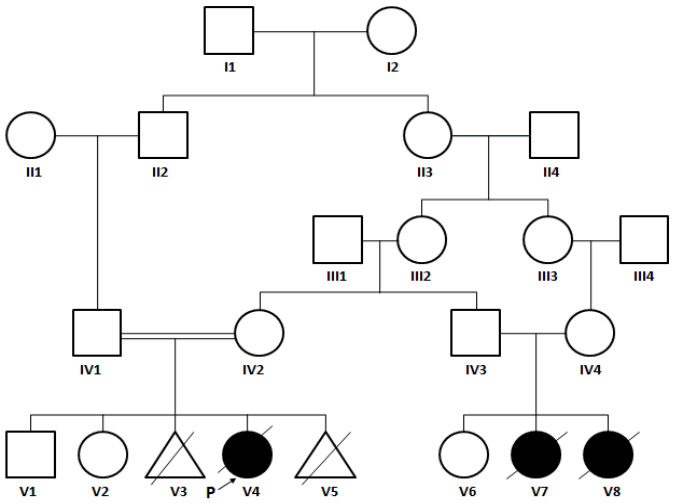
[1] Neuronal Ceroid Lipofuscinoses

توالی یابی DNA

دو میکروگرم از DNA پروباند با استفاده از کیت Agilent SureSelect Human All Exon V6 (Agilent, Sata Clara, CA, USA) تحت exome capturing قرار گرفت و توالی یابی روی یک توالی سنجی Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) انجام شد. دیتا خام با استفاده از BWA-0.7 با ژنوم رفرنس (GRCh37/UCSC hg19) هم تراز شد. واریانت کالینگ با ابزار GATK (Genome Analysis Tool Kit) انجام شد.SNV ها با استفاده از VarScan نسخه ۲,۲,۵، MuTec، ایرانوم و نومد شناسایی شد. دیتا بیس Variome برای فیلتر واریانت فرکانس خاص جمعیت استفاده شد.

نتایج

اطلاعات بیمار

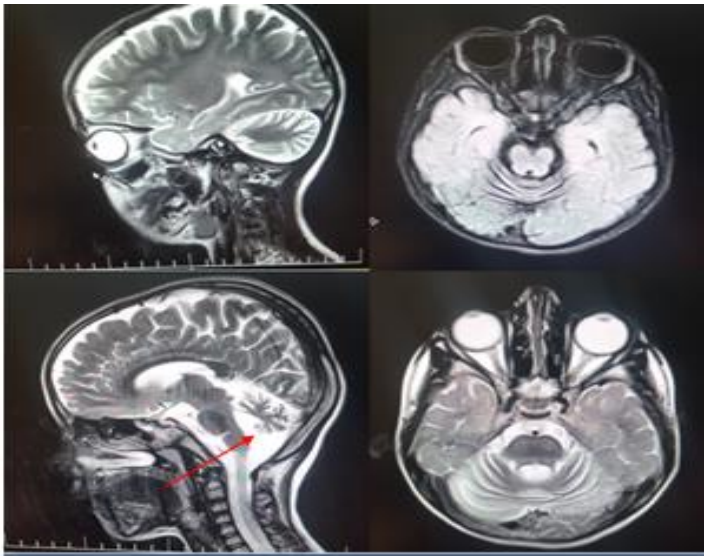


شکل ۱: شجره خانوادگی بیمار

بیمار دختر ۵ ساله حاصل ازدواج فامیلی بود. پدر و مادر هر دو سالم بودند. بررسی شجره نشان داد دو دختر دایی (۷ و۶ ساله) ،بیمار، هر دو با علایم مشابه بوده اند، که یک تا دوسال بعد ظهور علایم اولیه بیماری فوت کرده اند. هیچ خواهر و برادر مبتلا در خانواده مشاهده نشد و برادر (۱۷ ساله) و خواهر(۱۵ ساله) بزرگتر سالم بودند. تجزیه و تحلیل شجره نامه نشان داد که مادر سابقه دو سقط جنین قبل و بعد از بیمار داشته که دلایل سقط ها مشخص نشده است (شکل۱). سیر و تکامل پیش از تولد کاملا طبیعی بوده و کودک در هفته ۳۸ بارداری با وزن ۳,۴کیلوگرم با زایمان طبیعی متولد شده است. در یک سالگی کودک می توانسته بدون کمک گرفتن از دیگران راه برود و در دو سالگی می توانسته جملاتی را ادا کند. اولین مشکل تشنج بدون تب در سن ۵ سالگی بوده است. برگشت رشدی و شناختی رخ داده، بیماری به سرعت شروع به پیشرفت کرده و کودک توانایی راه رفتن را از دست داده است. طبق اظهارات والدین در ابتدا با

گرفتن دست به دیوار میتوانسته راه برود اما پس از مدتی فقط می توانسته بخزد. پسرفت تکلم داشته و گفتارش به چند کلمه محدود شده است و در نهایت نمیتوانسته صحبت کند. علاوه بر این، کودک بینایی خود را از دست داده است، طبق اظهارات مادر کودک به صداهای اطراف واکنشی نداشته و ظاهرا شنوایی خود را نیز از دست داده بود. کودک در بلع مشکل داشته و به دلیل در گیر شدن ریه ها به مدت چند هفته در بیمارستان بستری بوده. کودک دو سال پس از بروز اولین علایم (تشنج) در سن هفت سالگی فوت کرد.

مشاهدات MRI آتروفی شدید مخچه را نشان داد (شکل ۲).

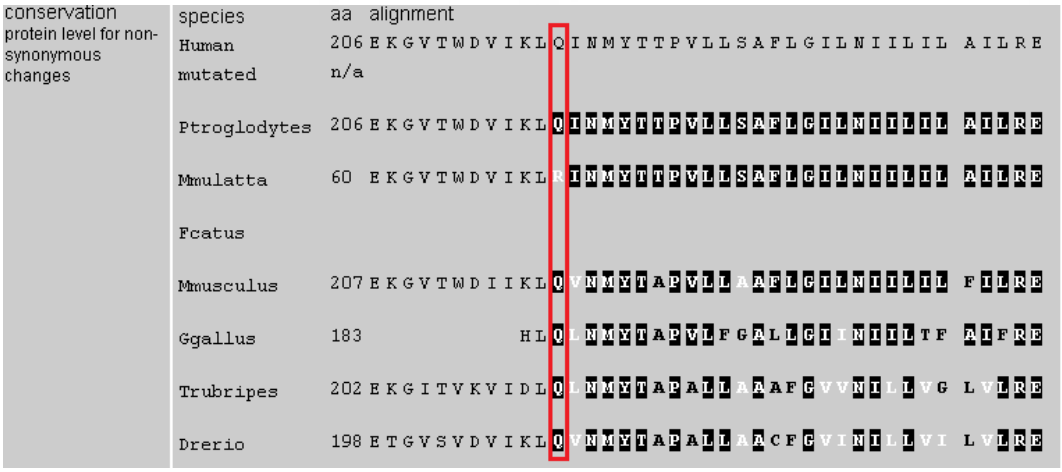


شکل۲: آتروفی شدید مخچه در نتایج MRI

آنالیز ژنتیکی

نتایج توالی یابی جهش هموزیگوت از دست دادن عملکرد را در اگزون هفتم ژن *MFSD8* نشان داد (c.C616T: p.Gln206Ter).

این جهش باعث تبدیل اسید آمینه گلوتامین در جایگاه ۲۰۶ به کدون خاتمه می شود. جایگاه اسید امینه گلوتامین ۲۰۶ در بین گونه های مختلف بسیار حفاظت شده است (شکل۳).



شکل ۳. میزان کانزرویتی اسید آمینه گلوتامین ۲۰۶ در پروتئین MFSD8

پیش بینی ACMG برای این واریانت Likely Pathogenic است. پیش بینی Mytation taster برای این واریانت disease causing است.فراوانی آللی این واریانت در دیتا بیس کنترل نوماد ۰,۰۰۰۰۰۳۹۸۰ وفراوانی افراد هموزیگوت صفر می باشد. در حالی که از این واریانت هیچ فراوانی در پایگاه داده ExAC یا ۱۰۰۰ ژنوم گزارش نشده است.

بحث

ژن *CLN7* (OMIM*611124) روی کروموزوم 4q28.1 با یک رونوشت اصلی حدود 5kb قرار دارد. این ژن یک پروتئین ۵۸ کیلو دالتون حفظ شده طی تکامل، CLN7، با ۱۲دمین ترانس ممبران را کد می کند. CLN7حاوی ۵۱۸ اسید آمینه است و متعلق به خانواده بزرگ تسهیل کننده (MFS) است که کلاس های خاصی از سوبستراها، از جمله قندها، داروها، کاتیون های معدنی و آلی و متابولیت های مختلف را حمل می کند. با این حال، سوبسترا اختصاصی CLN7 هنوز مشخص نیست. بیشترین CLN7 بیان شده در لیزوزوم ها قرار دارد. جهش در ژن CLN7 باعث ایجاد CLN دیررس نوزادان ترکی می شود (vLINCL, MIM#610951). مشابه سایر اشکال vLINCL، CLN5، CLN6 و CLN8، سن شروع آن از ۲ تا ۷ سال متغیر است. علائم اولیه معمولاً تشنج های شدید صرع هستند. زوال پیشرونده شناختی و حرکتی، میوکلونوس (انقباضات ناگهانی تنه، گردن و دست ها)، تغییرات شخصی و نابینایی منجر به مرگ زودرس می شود[۷].

واریانت های از دست دادن عملکرد هموزیگوت در ژن *MFSD8* عمدتاً در Variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinoses دیده می شود که با علایمی از جمله برگشت حرکتی، شناختی پیشرونده همراه با تشنج، آتاکسی و اختلال بینایی ظاهر می شوند[۳] .

کوزینا و همکارانش در سال ۲۰۱۸ یک دختر بچه روسی ۵ ساله با بیماری CLN7 گزارش کردند. دوره نئوناتال نرمال بوده و تا ۲,۵ سالگی کودک بدون تاخیر در گفتار و رشد حرکتی رشد کرده بود. اولین حمله تشنج ناشی از تب در ۳ سالگی رخ داده بود. پس از آن والدین متوجه بدتر شدن قابل توجه در گفتار و ارتباطات او شده بودند. کودک از نظر اجتماعی منزوی شده بود. MRI آتروفی قشر مغز، لکوپاتی اطراف بطنی هر دو نیمکره مغز و آتروفی مخچه را نشان داده بود. حرکت کودک دچار مشکل شده بود و در ۵ سالگی کودک توانایی راه رفتن را از دست داده بود. برخلاف مورد ما سن بروز علایم اولیه در کودک روسی زودتر آغاز شده بود. تشنج، از دست دادن بینایی، عدم توانایی راه رفتن، پسرفت زبان و آتروفی مخچه همانند بیمار ما در این کودک نیز مشاهده شده بود، اما مشکل شنیداری، و درگیری ریه ها در مشاهدات کوزینا گزارش نشده است. همچنین مشکلات بلع که در بیمار ما مشاهده شد در دختر بچه روسی گزارش نشده است[۸].

در مطالعه ای که توسط زارع عبداللهی و همکاران روی پنج بیمار مبتلا به دیستروفی ماکولا غیر سندرمی (چهار مرد و یک زن) از دو خانواده غیر خویشاوند گزارش شد، بیماران دارای دو واریانت missense در ژن *MFSD8* بودند. این دو واریانت قبلاً در بیماران vLINCL در خانواده‌های جداگانه گزارش شده بود، این مشاهدات همبستگی ژنوتیپ-فنوتیپ را پیچیده می‌کند و نشان دهنده تأثیر ژن‌های اصلاح‌کننده یا عوامل محیطی بر فنوتیپ است. تظاهرات اولیه بالینی در سنین ۲۰-۱۵ سالگی ظاهر شده بود، همچنین در هر دو خانواده بیماران کاهش وضوح دید و سپس افزایش حساسیت به نور (photophobia) را نشان داده بودند. ایجاد اختلال در میدان بینایی و شب کوری به ترتیب در سنین ۳۰-۳۴ و ۳۸-۴۰ سالگی ظاهر شده بود. در این بیماران هیچ گونه درگیری عصبی مشاهده نشده بود. در واقع، نتایج نشان دهنده Variable expressivity و/یا اثر پلیوتروپیک جهش‌های ژن *MFSD8* است[۹].

جهش مشاهده شده در این بررسی قبلا توسط مطالعه تروجیلانو و همکارانش در سال ۲۰۱۷روی ۲۸۱۹ بیمار مبتلا به انواع مختلف NCL گزارش شده است. در مشاهده آنها بیمار پسر بچه ۵ ونیم ساله حاصل ازدواج فامیلی بود. علایم شامل اپتیک اتروفی، اسپاستیسیتی، پسرفت نموی و لکودیستروفی بود. سابقه بیماری در شجره خانوادگی بیمار گزارش شده توسط تروجیلانو نیز وجود داشت. طبق مروری که ما بر روی مقالات داشتیم مشکلات ریه و همچنین ناشنوایی در موارد مبتلا به CLN7 گزارش نشده است [۱۰].

در مطالعه پنجه شانی و همکارانش در سال ۲۰۲۳ روی چهار بیمار از سه خانواده مبتلا به CLN7 جهش c.C616T مشاهده شده بود. علائم در بیماران آنها با آتاکسی و تشنج با میانگین سنی ۳,۳ سالگی (در اواخر دوران شیرخوارگی) شروع شده است. همه آنها رگرسیون ذهنی و رشدی، آتاکسی و نابینایی داشتند [۱۱].

جهش گزارش شده در این پژوهش به دلیل ایجاد کدون خاتمه زودرس در mRNA باعث حذف این پروتئین توسط Nonsense-mediated mRNA decay در داخل سلول می شود. با توجه به اینکه برای بیماران NCL درمان دقیق و کاملی وجود ندارد و تنها در CLN2 تزریق داخل وریدی آنزیم نوترکیب میتواند باعث تاخیر علایم شود، در نتیجه پیش آگهی در خانواده های با سابقه بیماری میتواند از تولد موارد جدید جلوگیری کند.

منابع

1. Uygur, O., et al., *A Case with Neonatal-onset Type 2 Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: A Novel Mutation.* Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP, 2020. **30**(5): p. 543-544.
2. Angural, A., et al., *Missense Variation in TPP1 Gene causes Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Type 2 in a Family from Jammu and Kashmir-India.* 2021.
3. Kose, M., et al., *Neuronal ceroid lipofuscinosis: Genetic and phenotypic spectrum of 14 patients from Turkey.* Neurological Sciences, 2021. **42**(3): p. 1103-1111.
4. Huber, R.J., *Altered protein secretion in Batten disease.* Disease Models & Mechanisms, 2021. **14**(12): p. dmm049152.
5. Nita, D.A., S.E. Mole, and B.A. Minassian, *Neuronal ceroid lipofuscinoses.* Epileptic Disorders, 2016. **18**(s2): p. S73-S88.
6. Platt, F.M., B. Boland, and A.C. van der Spoel, *Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction.* Journal of Cell Biology, 2012. **199**(5): p. 723-734.
7. Jalanko, A. and T. Braulke, *Neuronal ceroid lipofuscinoses.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2009. **1793**(4): p. 697-709.
8. Kozina, A.A., et al., *Neuronal ceroid lipofuscinosis in the Russian population: Two novel mutations and the prevalence of heterozygous carriers.* Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2020 ;(۷)۸ .p. e1228.
9. Zare-Abdollahi, D., et al., *MFSD8 gene mutations; evidence for phenotypic heterogeneity.* Ophthalmic Genetics, 2019. **40**(2): p. 141-145.
10. Trujillano, D., et al., *Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families.* European Journal of Human Genetics, 2017. **25**(2): p. 176-182.
11. Panjeshahi, S., et al., *Clinical and genetic characterization of Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) in 29 Iranian patients: Identification of 11 novel mutations.* 2023.

شناسایی دومین جهش شایع ژن ALG1 در بیمار مبتلا به اختلال مادرزادی گلیکوزیلاسیون

طیبه باران زهی*

گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
*kiana8588@gmail.com

چکیده:

مقدمه و هدف: اختلالات مادرزادی گلیکوزیلاسیون گروه ناهمگن ژنتیکی و بالینی از حدود ۱۵۰ بیماری است که به دلیل نقص در گلیکوزیلاسیون پروتئین و لیپید ایجاد می شود. جهش های ALG1 (مانوزیل ترانسفراز) باعث اختلال مادرزادی گلیکوزیلاسیون نوع Ik می شود، که یک اختلال N-گلیکوزیلاسیون شایع است و با علائم و نشانه های مختلف معمولاً در دوران نوزادی ایجاد می شود و افراد مبتلا اغلب دارای ناتوانی ذهنی، تاخیر در رشد و تون عضلانی ضعیف (هیپوتونی) هستند. در این پژوهش بررسی ژنتیکی سه بیمار مبتلا به اختلال مادر زادی گلیکوزیلاسیون با استفاده از روش توالی یابی کل اگزوم انجام گرفت.

مواد و روش ها: DNA پروباندها وافراد سالم خانواده با استفاده از روش salting out استخراج و توالی یابی کل اگزوم جهت شناسایی جهش استفاده شد. پس از شناسایی جهش تائید جهش علت بیماری با استفاده از تکنیک توالی یابی سنگر صورت گرفت.

نتایج: نتایج توالی یابی اگزوم جهش missense در اگزون۱۱ ژن *ALG1* نشان داد.

نتیجه گیری: جهش شناسایی شده دراین مطالعه دومین جهش شایع در ژن *ALG1* در این بیماران می باشد که باعث شکل خفیف تر بیماری میشود..

کلمات کلیدی: توالی یابی کل اگزوم، ALG1، اختلال مادر زادی گلیکوزیلاسیون.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

Identification of the second common *ALG1* gene mutation in a patient with congenital disorder of glycosylation

*Tayebeh Baranzehi

*Department of Biology, university of Sistan and Baluchestan, Zahedan,Iran.

kiana8588@gmail.com

Abstract

Background and aim: Congenital glycosylation disorders are a genetically and clinically heterogeneous group of about 150 diseases caused by defects in protein and lipid glycosylation. ALG1 (mannosyltransferase) mutations cause congenital disorder of type Ik glycosylation. which is a common N-glycosylation disorder and with various signs and symptoms usually occurs in infancy, and affected individuals often have mental retardation, developmental delay, and weak muscle tone (hypotonia). In this research, the genetic investigation of three patients with congenital glycosylation disorder was done using the whole exome sequencing method. **Materials and methods:** DNA of probands and healthy individuals of the family was extracted using the salting out method and whole exome sequencing was used to identify the mutation. After identification of the mutation, the disease-causing mutation was confirmed using Sanger sequencing technique**. Results:** Exome sequencing results showed missense mutation in exon 11 of *ALG1* gene**. Conclusion:** The mutation identified in this study is the second most common mutation in the *ALG1* gene in these patients, which causes a milder form of the disease.

Keywords: Whole exome sequencing, ALG1, ALG1-CDG.

مقدمه

دو نوع اصلی گلیکوزیلاسیون پروتئین عبارتند از N-glycosylation و O-glycosylation.

N-گلیکوزیلاسیون رایج ترین مدیفیکاسیون کووالانسی پروتئین ها در سلول های انسانی است. این فرآیند شامل یک پیوند N-گلیکوزیدی است که نیتروژن یک گروه آمیدی آسپاراژین (Asn) را به N- استیل گلوکوز آمین (GlcNAc) یک گلیکان پیوند می دهد. آسپاراژین بخشی از توالی اسید آمینه توافقی Asn-X-Thr (که در آن X مخفف هر اسید آمینه ای، به جز پرولین) می باشد.N -گلیکوزیلاسیون شامل آنزیم ها و انتقال دهنده های مختلفی در سیتوزول، شبکه آندوپلاسمی و گلژی است.

اختلالات مادرزادی گلیکوزیلاسیون[۲] (CDG) یک گروه ناهمگن ژنتیکی و بالینی از حدود ۱۵۰ بیماری است که به دلیل نقص در گلیکوزیلاسیون پروتئین و لیپید ایجاد می شود. اختلال در مسیر گلیکوزیلاسیون مرتبط با N می تواند بیش از پنجاه اختلال ژنتیکی ایجاد کند[۱].

Asparagine-linked glycosylation protein 1, (ALG1)کد کننده آنزیم مانوزیل ترانسفراز β1,4 شبکه اندوپلاسمی است که اولین مانوز را به دولیکول انتقال می دهد. جهش های ALG1 باعث یک اختلال اتوزومال مغلوب نادر به نام ALG1-CDG (MIM# 608540) می شوند. ALG1-CDG، که همچنین به عنوان اختلال مادرزادی گلیکوزیلاسیون نوع Ik شناخته می شود، یک اختلال N-گلیکوزیلاسیون شایع است[۲].

این بیماری یک اختلال ارثی با علائم و نشانه های مختلف است که معمولاً در دوران نوزادی ایجاد می شود و می تواند قسمت های مختلف بدن را تحت تأثیر قرار دهد. افراد مبتلا اغلب دارای ناتوانی ذهنی، تاخیر در رشد و تون عضلانی ضعیف (هیپوتونی[۳]) هستند. بسیاری از افراد مبتلا دچار تشنج هایی می شوند که درمان آن دشوار است همچنین این افراد ممکن است مشکلات حرکتی مانند لرزش ریتمیک غیرارادی (لرزش[۴]) یا مشکلات حرکتی و تعادلی (آتاکسی) داشته باشند. افراد مبتلا به ALG1-CDG اغلب مشکلاتی با لخته شدن خون دارند که می تواند منجر به لخته شدن غیرطبیعی یا خونریزی شود. سطوح پایین غیرطبیعی آنتی بادی (یا ایمونوگلوبولین ها)، به ویژه ایمونوگلوبولین G نیز در این بیماران مشاهده شده است[۳, ۴]. آنتی بادی ها به محافظت از بدن در برابر عفونت توسط ذرات خارجی و میکروب ها کمک می کنند. کاهش آنتی بادی ها می تواند مبارزه با عفونت ها را برای افراد مبتلا دشوار کند. برخی از افراد مبتلا به ALG1-CDG دارای ناهنجاری‌های فیزیکی مانند اندازه کوچک سر (میکروسفالی) هستند. مشکلات چشمی که ممکن است در افراد مبتلا به این عارضه رخ دهد عبارتند از: چشم هایی که در یک جهت قرار نمی گیرند

[2] Congenital disorder of glycosylation
[3] Hypotonia
[4] Tremor

(strabismus) یا حرکات غیر ارادی چشم (nystagmus). از دست دادن بینایی به ندرت در افراد مبتلا مشاهده می شود. ناهنجاری‌های کمتر رایج شامل مشکلات تنفسی، کاهش حس در بازوها و پاهای آنها (نوروپاتی محیطی)، تورم (ادم) و مشکلات گوارشی است. علائم و نشانه‌های ALG1-CDG اغلب شدید هستند و افراد مبتلا فقط تا دوران نوزادی یا کودکی زنده می‌مانند. با این حال، برخی از افراد مبتلا به این بیماری به طور خفیف‌تری تحت تأثیر قرار می‌گیرند و تا بزرگسالی زنده می‌مانند[۵, ۶].

مواد و روش ها

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد(IR.MUMS.REC.1395.534) تایید و رضایت نامه کتبی آگاهانه از شرکت کنندگان در مطالعه گرفته شد.

استخراج DNA

DNA ژنومی از خون محیطی پروباند و اعضای سالم خانواده وی با استفاده از روش salting out استخراج و کیفیت و یکپارچگیDNA استخراج‌شده با ژل الکتروفورز (آگارز ۱ درصد) ارزیابی شد.

توالی یابی DNA

دو میکروگرم از DNA پروباند با استفاده از کیت Agilent SureSelect Human All Exon V6 (Agilent, Sata Clara, CA, USA) تحت exome capturing قرار گرفت و توالی یابی روی یک توالی سنجی Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) انجام شد. دیتا خام با استفاده از BWA-0.7 با ژنوم رفرنس (GRCh37/UCSC hg19) هم تراز شد. واریانت کالینگ با ابزار GATK (Genome Analysis Tool Kit) انجام شد.SNV ها با استفاده از VarScan نسخه ۲,۲,۵، MuTec، ایرانوم و نومد شناسایی شد. دیتا بیس Variome برای فیلتر واریانت فرکانس خاص جمعیت استفاده شد.

PCR و توالی یابی سنگر

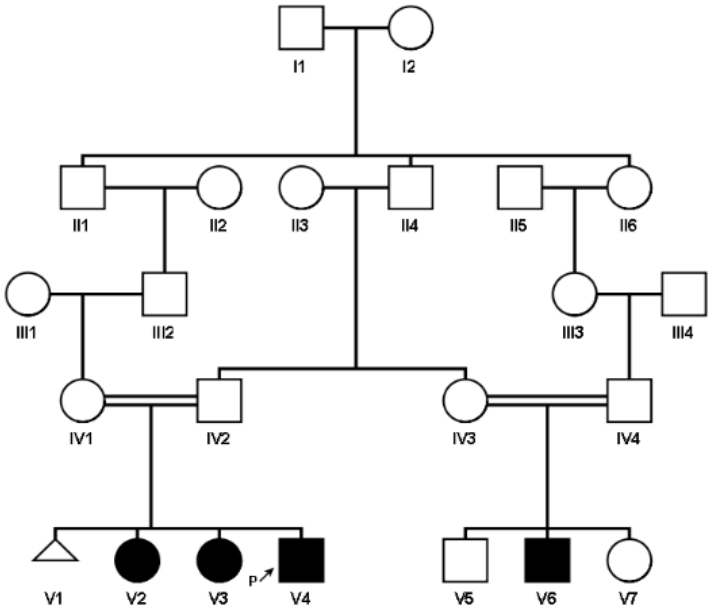
میزان یک میکرولیتر DNA ژنومی یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای فوروارد (5'GGGATCACTGTGGAGTCAAAG-3′) و ریورس (5'-AGACCTGGCTCAGTTCATGC-3')، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس(Sina Clon Cat. No.: MM206) PCR و ۱۲ میکرولیتر آب DEPC در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش PCR استفاده شد. واکنش‌های PCR با استفاده از مرحله انکوباسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه، و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. مرحله نهایی گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. مقدار یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد یا ریورز به محصول PCR مرحله قبل اضافه شد و

مخلوط حاصل جهت سکانس سنگر ارسال شد. سکانس سنگر در دستگاه XL DNA analyzer (ABI, Foster City 3730) انجام شد و دیتا مربوطه به صورت فایل فرمت ABI جهت انالیز ارائه شد.

نتایج

اطلاعات بیماران

سه بیمار (دو دختر۱۲ و ۸ ساله و پسر ۶ ساله) حاصل با ازدواج فامیلی هستند. مادر در هفته ۱۳ بارداری سابقه سقط داشته که دلیل سقط مشخص نشده است. بررسی شجره خانوادگی بیماری را در دختر عمه بیماران با علایم مشابه نشان می دهد که در سن ۱۲سالگی فوت کرده است. دختر بچه ۱۲ و ۸ ساله با زایمان طبیعی متولد شده اند. اما پسر ۶ ساله از طریق سزارین در هفته ۳۷ بارداری متولد شده است. وزن دختر دوازده ساله در زمان تولد ۳,۱۰۰ کیلوگرم، دختر ۸ ساله ۳,۲۰۰ و پسر ۶ ساله ۳ کیلوگرم بوده است. مادر در زمان بارداری برای هر سه کودک فشار خون بالا داشته است. در هر سه کودک تشنج تونیک-کلونیک ژنرالیزه از ۸ ماهگی شروع و در چهار سالگی متوقف شده است. هر سه کودک ناتوانی ذهنی و تاخیر رشد دارند. هایپر اکتیو بودن یا بیش فعالی در هر سه مشهود است. افزایش میزان استون و پروتئین در آزمایش ادرار مشاهده شد. صرع در هر سه کودک وجود دارد که تحت درمان با فنوباربیتال قرار گرفته اند. دختر بچه ۸ ساله مشکل راه رفتن دارد و نمی تواند بدون کمک راه برود.



شکل۱: شجره خانوادگی بیماران

آنالیز ژنتیکی

نتایج توالی یابی جهش هموزیگوت missense را در اگزون یازدهم ژن *ALG1* نشان داد (c. c.1076C>T: p.Ser359Leu).

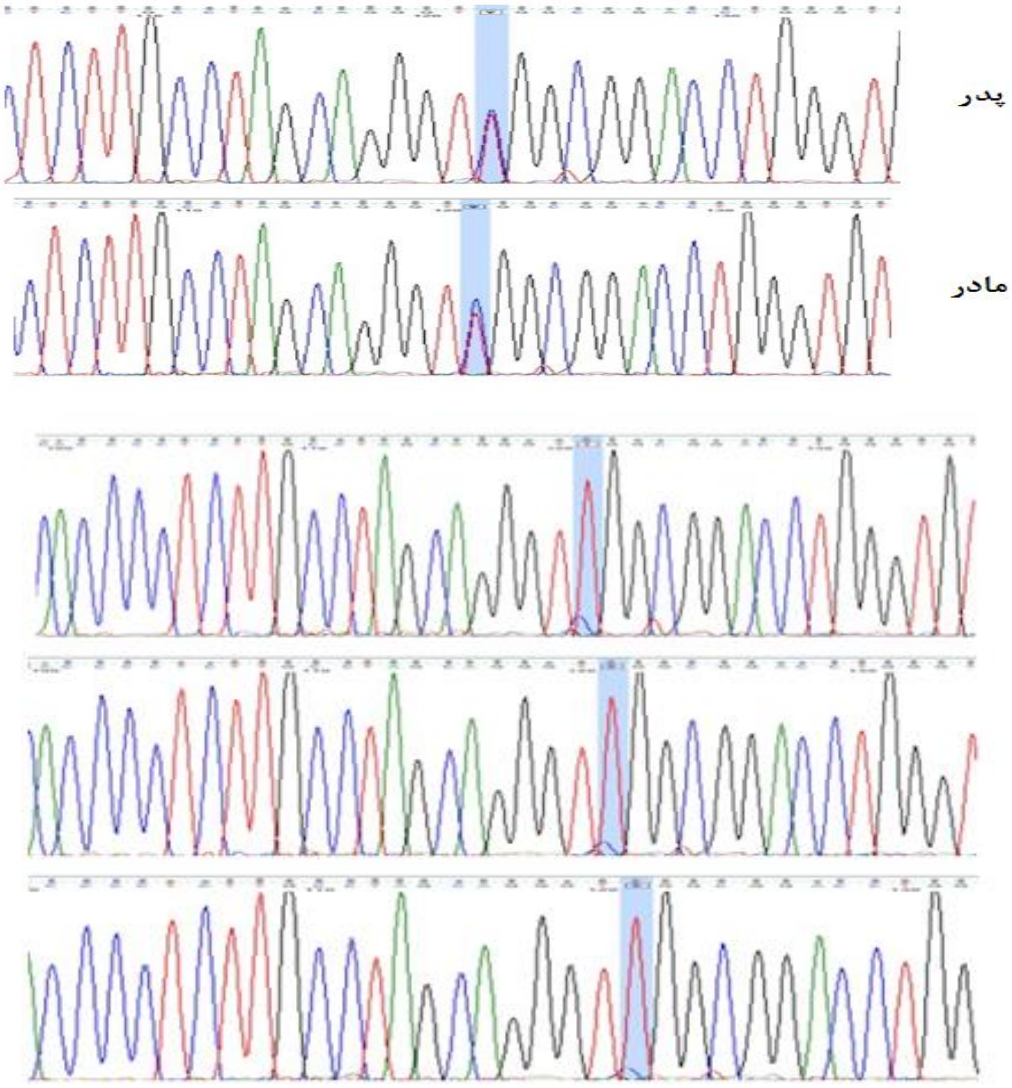
این جهش باعث تبدیل اسید آمینه سرین در جایگاه ۳۵۹ به اسید آمینه لوسین می شود. جایگاه اسید امینه سرین ۳۵۹ در بین گونه های مختلف بسیار حفاظت شده است (شکل۲).

species	aa	alignment
Human	359	L E A E D Y P L L L G S A D L G V C L H T S S S
mutated	359	L E A E D Y P L L L G **L** A D L G V C L H T S S
Ptroglodytes	359	L E A E D Y P L L L G **S** A D L G V C L H T S S
Mmulatta	336	L E A E D Y P L L L G **S** A D L G V C L H T S S
Fcatus	358	L E A E D Y P L L L G **S** A D L G V C L H K S S
Mmusculus	359	L E A E D Y P L L L G **S** A D L G V C L H M S S
Ggallus	356	L E A E D Y P V L L G **S** A D L G V C L H K S S
Trubripes	361	L E A E D Y P V L L G **S** A D L G V
Drerio	381	L E A E D Y P V L L G **S** A D L G V C L H
Dmelanogaster	337	L E I E D Y P T V L A **S** A D L G V C L H W S T
Celegans	346	L E A E D Y P K I L A **S** A D L G I S L H T S T
Xtropicalis	377	L E A E D Y P L L L G **S** A N L G V C L H K

شکل ۲. آمینو اسید سرین حفاظت شده در جایگاه ۱۰۷۶ پروتئین**ALG1**

پیش بینی ACMG برای این واریانت Likely Pathogenic است. ابزار Mytation taster برای این واریانت disease causing پیش بینی می کند. فراوانی آللی این واریانت در دیتا بیس کنترل نوماد ۰,۰۰۰۰۱۹۹۶ وفراوانی افراد هموزیگوت صفر می باشد.

این واریانت در پدر و مادر بررسی شد و طبق پیش بینی والدین برای این واریانت هتروزیگوت بودند(شکل۳).



شکل۳. نتایج سنگر واریانت c.1076C>T در والدین و بیماران

بحث

۴۳ واریانت ژن *ALG1* در ۵۹ فرد مبتلا تاکنون در مقالات گزارش شده است. اولین بیماران مبتلا به ALG1-CDG در سال ۲۰۰۴ توسط گروبنمن، کرنز و شوارز گزارش شدند. از ۵۹ بیمار گزارش شده، ۲۰ نفر (۳۳,۳٪) در سال اول زندگی فوت کردند، که نشان می دهد ALG1-CDG با مشخصات بالینی شدید مرتبط است[۷].

رایج ترین واریانت گزراش شده در ALG1 واریانت(28.8%) c.773C>T است. این واریانت باعث فنوتیپ های سخت بیماری می شود که منجر به مرگ در سال اول زندگی می شود.

دومین واریانت رایج(11.7%) c.1076C>T است. این واریانت در حالت هموزیگوت ممکن است منجر به شکل خفیف تر بیماری شود، همانطور که در بیماران ما نیز مشاهده می شود[۸].

علائم عصبی اصلی شامل، تاخیر رشد روانی حرکتی، ناتوانی ذهنی و هیپوتونی در ۵۷ بیمار قبلی مشاهده شده است. مشابه بیماران ما تقریباً همه بیماران حملات صرع را داشتند. همچنین، بدشکلی صورت در اکثر بیماران (۳۹ از ۵۶؛ حدود ۷۰٪) گزارش شده بود. تظاهرات گوارشی مانند مشکلات تغذیه، اسهال مزمن و انتروپاتی های از دست دادن پروتئین در حدود ۵۰ درصد گزارش شده است. که در سه بیمار ما مشکلات گوارشی گزارش نشده.

برخی از بیماران علائم بینایی (استرابیسم و نیستاگموس)، ناهنجاری های اسکلتی، تظاهرات قلبی و درگیری ایمونولوژیک داشتند که منجر به عفونت های جدی مکرر می شد. این علایم در بیماران ما مشاهده نشد.

در مشاهدات اونسل ،در یک بیمار اهل ترکیه، تظاهرات عصبی، بدشکلی صورت، صرع، مشکلات تغذیه، ناهنجاری های انعقادی و عفونت های شدید مکرر بدون هیچ گونه ناهنجاری ایمونولوژیک گزارش شده بود[۲].

سه بیمار ما همچنین هایپر اکتیو یا بیش فعال بودند که در گزارش های قبلی بیش فعالی گزارش نشده است. همچنین دفع استون و پروتئین در ادرار در بیماران دیگر گزارش نشده ولی در ازمایشات سه بیمار ما گزارش شده است.

منابع

1. Grubenmann, C.E., et al., *Deficiency of the first mannosylation step in the N-glycosylation pathway causes congenital disorder of glycosylation type Ik.* Human Molecular Genetics, 2004. **13**(5): p. 535-542.
2. Öncül, Ü., E. Kose, and F.T. Eminoğlu, *ALG1-CDG: A patient with a mild phenotype and literature review.* Molecular Syndromology, 2022. **13**(1): p. 69-74.
3. Paprocka, J., et al., *Congenital disorders of glycosylation from a neurological perspective.* Brain Sciences, 2021. **11**(1): p. 88.
4. Grünewald, S ,.G. Matthijs, and J. Jaeken, *Congenital disorders of glycosylation: a review.* Pediatric research, 2002. **52**(5): p. 618-624.
5. Ng, B.G., et al., *ALG1-CDG: clinical and molecular characterization of 39 unreported patients.* Human Mutation, 2016. **37**(7): p. 65۶۶۰,-۳

6. González-Domínguez, C.A., et al., *ALG1-CDG caused by non-functional alternative splicing involving a novel pathogenic complex allele.* Frontiers in Genetics, 2021. **12**: p. 744884.
7. Monticelli, M., et al., *Immunological aspects of congenital disorders of glycosylation (CDG): a review.* Journal of Inherited Metabolic Disease, 2016. **39**(6): p. 765-780.
8. Kranz, C., et al., *Congenital disorder of glycosylation type Ik (CDG-Ik): a defect of mannosyltransferase I.* The American Journal of Human Genetics ۲۰۰۴ .(۳)۷۴ ,p. 545-551.

طراحی وساخت ناقل نوترکیب CRISPR ژن بیماری زای EscD باکتری *E.coli O157:H7*

عاطفه محمودیان[۱]، حسینعلی ساسان*[۲]، مهدی حسن شاهیان [۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲. بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان
حسینعلی ساسان*: hsasa@uk.ac.ir

چکیده: *E.coli O157:H7* یکی از سوش های بیماری زا می باشد. ژن escD واقع در ناحیه LEE درشکل گیری و فعالیت سیستم ترشحی نوع III که برای ایجاد بیماری توسط این ناحیه لازم است، وجود دارد. سیستم کریسپیر CRISPR از یک RNA کوچک به نام gRNA و یک اندونوکلئاز به نام Cas9 تشکیل شده که اتصال این دو باعث هدایت اندونوکلئازبه سمت یک توالی اختصاصی می شود و پس اتصال به توالی خاص خود، منجر به ایجاد شکستگی دورشته DNA می شود. سرانجام با عمل سیستم نوترکیبی سلول، موجبات ایجاد جهش فراهم می گردد. هدف این مطالعه ساخت پلاسمید نوترکیب سیستم کریسپیر حاوی RNA راهنمای لازم برای ایجاد برش و جهش در ژن بیماری زای escD باکتری *E.coli O157:H7* بود. الیگونوکلئوتیدها بااستفاده از سایت Crispr gRNA Design Tool طراحی وپس از دورشته ای شدن و اتصال به وکتور خطی کریسپر به سلولهای باکتری میزبان منتقل شدند. نتایج یافته ها با استفاده از ژل الکتروفورز و آزمایش PCR بررسی شدند.آنالیز ژل الکتروفورز، تشکیل gRNA دورشته ای وآزمایش PCR، کلونینگ موفق ژن بیماری زای escD را در ناقل بیانی کریسپر ثابت کرد. با ساخت ناقل نوترکیب CRISPR ایجاد تغییرات اصلاحی دقیق در ژنوم با اهدافی ازجمله تخریب ژنهای بیماری زا و ژن درمانی امکان پذیر می گردد.

واژگان کلیدی: اصلاح ژنتیکی، کریسپر، ژن EscD ، باکتری *E.coli O157:H7* .

Abstract: *E.coli O157:H7* is one of the pathogenic strains. The escD gene located in the LEE region is involved in the formation and activity of the type III secretion system, which is required to cause disease. The CRISPR system consists of a RNA called gRNA and an endonuclease called Cas9, the connection of these two leads the endonuclease to a specific sequence, and after connecting to its specific sequence, and it leads to double strand break. This finally provides by the action of the cell's recombination system, causing mutations. The aim of this study was to construct the recombinant plasmid of the CRISPR system containing the guide RNA necessary to create cuts and mutations in the escD pathogenic gene of *E.coli* O157:H7 bacteria. Oligonucleotides were designed using the Crispr gRNA Design Tool and after being double-stranded and connected to the Crispr linear vector, they were transferred to host bacterial cells. The results of findings were checked using gel electrophoresis and PCR test. Electrophoresis, formation of double-stranded gRNA and PCR test proved the successful cloning of escD pathogenic gene in CRISPR expression vector. With the construction of the recombinant CRISPR vector, it is possible to make precise modifications in the genome with the goals of destroying pathogenic genes and gene therapy.

Keywords: Genetic modification, CRISPR, EscD gene, *E.coli O.157*

مقدمه:

اشریشیاکلی*O157:H7* یکی از علل اصلی اسهال خونی و سندرم اورمیک همولیتیک (HUS) در سراسر جهان است. این سویه با شیوع های متعدد در سراسر جهان همراه بوده و یک تهدید جدی برای سلامت عمومی به شمار می رود. سه عامل بیماری زای عمده *E.coli O157:H7* سموم شیگا، محصولات جزیره بیماریزایی به نام محل آسیب به انتروسیت و محصولات پلاسمید pO157 می باشند [۱]. گاوهای شیری به ویژه حیوانات جوان به عنوان مخزن *E.coli O157:H7* می باشند. سه عامل بیماری زای عمده *E.coli O157:H7* سموم شیگا، محصولات جزیره بیماریزایی به نام محل آسیب به انتروسیت[۵](LEE) و محصولات پلاسمید pO157 می باشند[۲]. T3SS یک مجموعه چند پروتئینی حفاظت شده است که شبیه به یک نانو سرنگ است. پروتئین های مؤثر مسیرهای کلیدی درون سلولی (مانند چرخه سلولی، پاسخ ایمنی، سازمان اسکلت سلولی، فرآیندهای متابولیک و ورود و خروج در سلول میزبان) را دستکاری می کنند، که در نهایت تکثیر و انتقال باکتری را ترویج می کند. EscC ، EscD ، و EscJ برای فعالیت T3SS مورد نیاز می باشند. این پروتئین‌ها (EscC ، EscD و EscJ) برای تشکیل حلقه‌های غشایی و شروع شکل گیری کمپلکس سوزنی T3SS حیاتی می باشند[۳]. پروتئین CAS9، آنزیم نوکلئاز سیستم CRISPR، توسط یک RNA راهنمای تک رشته ای (sgRNA) هدایت می شود که DNA مورد نظر را از طریق جفت شدن بازها، بین رشته های واتسون و کریک شناسایی کند. توالی راهنمای درون این RNA های CRISPR به طور اختصاصی با توالی های فاژ مرتبط هستند و به آسانی می توانند با توالی دیگری جایگزین شوند. سهولت استفاده از آنزیم CAS9، امکان انجام اصلاحات بسیار و بازدهی بالای آن، طیف وسیعی از کاربرد های این آنزیم را در طول تحقیقات پایه امکان پذیر کرده است[۴]. هدف از انجام این مطالعه طراحی و ساخت ناقل نوترکیب کریسپیر رای ایجاد جهش در ژن بیماری زای EscD باکتری *E.coli O157:H7* بود.

مواد و روشها

طراحی پرایمرها، راهنماها، آنیلینگ پیشساز های تک رشته برای ایجاد ساختار دو رشته ای، برش ناقل، اتصال، تراسفورماسیون و اثبات همسانه سازی: پرایمرهای لازم برای ساخت dsDNAgRNA و اثبات همسانه سازی مولکولهای راهنما طراحی و خریداری شدند (جدول۱). مقدار ۳ میکرولیتر پرایمر رفت با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، ۳ میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت ۱۰۰ میکرومولار مربوط به پیشساز gRNA، ۴ میکرولیتر نمک NaCl نیم مولار و ۳ میکرولیتر بافر آنزیم T4 DNA Ligase و ۷ میکرولیترآب با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مخلوط و در دستگاه PCR به مدت ۵ دقیقه در

دمای ۹۵ درجه و به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۲ درجه قرار داده شد. در مرحله بعد به منظور سرد شدن تا دمای ۲۵ درجه سانتی گراد حرارت دستگاه PCR به گونه ای تنظیم شد که دما یک درجه یک درجه به فاصله زمانی ایستایی هر درجه ۱۰ ثانیه کاهش یافت. سپس به منظور رقیق‌سازی یک میکرولیتر ازنمونه را به ۵۰ میکرولیتر بافر آنزیم T4 DNA Ligase اضافه و به عنوان gRNA استفاده شد. ۵ میکرولیتر بافر آنزیم برشگر *BBS1* ، ۵ میکرولیتر وکتورحلقوی و۰,۵ میکرولیتر آنزیم برشگر *BBS1* را مخلوط کرده وباآب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و به مدت ۵ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای فعالیت آنزیم قرارداده شد و سپس محصول برش آنزیمی پلاسمید بر روی ژل آگارز ۱ درصد لود شد و توسط کیت Bioneer استخراج از ژل قطعه مورد نظر انجام شد. در مرحله بعد ۳ میکرولیتر پلاسمید خطی، ۱,۵ میکرولیتر بافر آنزیم T4 DNA Ligase لیگاز، ۰,۵ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase و ۲ میکرولیتر محلول رقیق شده پیشساز gRNAرا با هم ترکیب کرده و پس از تنظیم حجم نهایی به وسیله آب مقطر تا حجم ۲۰ میکرولیتر نمونه ها به مدت دو ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

جدول ۱. الیگونوکلئوتیدهای لازم برای پیشسازgRNAو تکثیر قطعات پلاسمید نوترکیب طراحی شده برای جهش زایی ژنEscD

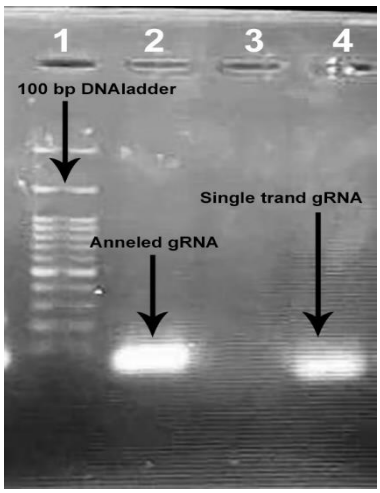
نام	توالی(۵' → ۳')	scores	طول قطعه
gRNAF	TAGTCAAACTTCATGCAATCACTC	۱۰۰	۲۰bps
gRNAR	AAACGAGTGATTGCATGAAGTTTG	۱۰۰	۲۰bps
PPF PPR	GGGCCTATTTCCCATGATTCCT CGCGCTAAAAACGGACTAGC		~ ۴۰۰ bps
PPF gRNAR	GGGCCTATTTCCCATGATTCCT AAACGAGTGATTGCATGAAGTTTG		~ ۲۷۰ bps
gRNAF PPR	TAGTCAAACTTCATGCAATCACTC CGCGCTAAAAACGGACTAGC		~ ۱۵۰ bps

فرایند انتقال پلاسمید های نوترکیب به سلولهای مستعدشده ی باکتری توسط شوک حرارتی انجام شد (ترانسفرم کردن). بدین منظور ابتدا سلولهای مستعدشده باکتری را داخل میکروتیوپ روی یخ قرارداده و

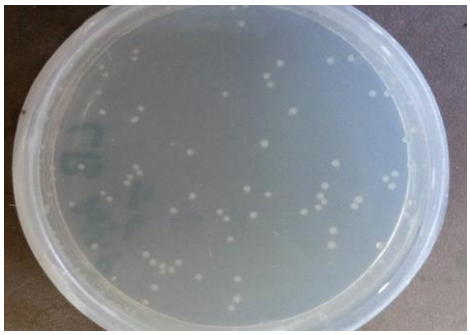
۱,۶میکرولیتر بتامرکاپتواتانول راروبش اضافه کرده سپس ده دقیقه روی یخ قرار داده شد.سپس ۷ میکرولیتر محصول اتصالی(قطعه طراحی شده و وکتور) را روی سلولهای مستعد اضافه کرده سپس نیم ساعت روی یخ قرار داده شد سپس به مدت ۲-۱دقیقه داخل آب ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد.سپس باکتری ها روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (به منظور غربالگری)کشت داده شدند. تایید کلونینگ و غربالگری باکتری های نوترکیب بااستفاده ازروش PCR صورت گرفت. بدین منظور واکنش PCR درحجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۸ میکرولیتر Master Mix، یک میکرولیتر از DNAالگو، ۰,۵ میکرولیتر پرایمررفت و ۰,۵ میکرولیتر پرایمربرگشت و ۱۰ میکرولیتر آب انجام شد. برنامه PCR شامل ۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتی گراد جهت دناتوراسیون اولیه سپس ۳۸ سیکل شامل یک دقیقه ۹۵ درجه سانتیگراد، یک دقیقه ۵۸ درجه سانتیگراد، یک دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد و نهایتاً ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

نتایج و بحث

شکل ۱ فرم دو رشته ای شدن قطعه راهنما را نشان می دهد. چاهک اول DNA Laddr، چاهک دوم حالت دورشته ای (اندازه بزرگتر وسنگین تر) و چاهک چهارم حالت تک رشته ای رانشان می دهند. شکل ۲. کلنی های نوترکیب و غیر نوترکیب ترانسفرم شده با پلاسمید نوترکیب کریسپر حاوی قطعه راهنما را نشان می دهد.

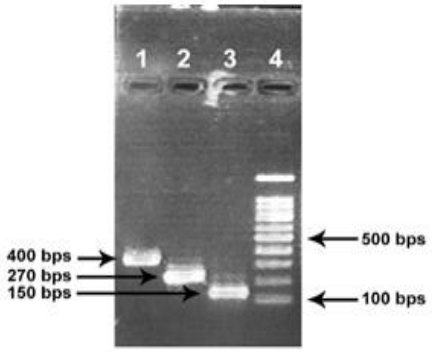


شکل۱.ساخت قطعه راهنمای دورشته ای. چاهک اول مارکر، چاهک دوم فرم دورشته ای و چاهک چهارم فرم تک رشته ای قطعه راهنما رانشان می دهد.



شکل ۲ کلنی های ترانسفرم شده برروی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین را نشان می دهد.

با استفاده از آزمایش PCR بر روی پلاسمیدهای خالص شده کلنی های فوق و همچنین تعیین ردیف نوکلئوتیدی کلنی های نوترکیب غربال گری شدند. شکل ۳ نتایج آزمایش های PCR برای تایید کلونینگ قطعه راهنما را نشان می دهد. با توجه به قطعه بسیار کوچک کلونینگ شده راهنما، حدود ۲۰ جفت باز، تایید کلونینگ با روش برش آنزیمی امکان پذیر نبود. از مکانیزم های تعیین ردیف DNA و PCR چندگانه برای اثبات این امر استفاده شد. آغازگرها به صورتی طراحی شدند که پیش سازهای جلوبرنده و برگشت PPF و PPR یک قطعه حدود ۴۰۰ جفت بازی را در دو طرف قطعه راهنما تکثیر کنند. همچنین پیش ساز جلوبرنده PPF و الیگونوکلئوتید آنتی سنس قطعه راهنما، gRNAR، یک قطعه ۲۷۰ جفت بازی و بالاخره پیشساز برگشت PPR و الیگونوکلئوتید سنس قطعه راهنما، gRNAF، یک قطعه ۱۵۰ جفت بازی را در صورت کلونینگ موفقیت آمیز تکثیر کنند. تکثیر قطعات سه گانه مذکور برابر با مقادیر مورد انتظار نشان می دهد که کلونینگ قطعه راهنما در پلاسمید مورد نظربه طور موفقیت آمیزی صورت گرفته است.



شکل۳. نتیایج آزمایش PCR.چاهک چهارم مارکر،چاهک اول قطعه ۴۰۰جفت بازی حاصل تکثیر پرایمرجلوبرنده و برگشت،چاهک دوم قطعه ۲۷۰جفت بازی حاصل تکثیر پرایمرجلوبرنده والیگونوکلئوتید آنتی سنس راهنما،چاهک سوم قطعه ۱۵۰جفت بازی حاصل تکثیر پرایمربرگشت ورشته سنس راهنما.تکثیر این قطعات ۳گانه تاییدکننده کلونینگ موفقیت آمیز است.

بحث

سیستم کریسپیر ابزای مناسب برای فناوری مهندسی ژنوم است و می توان بـرای انجـام ویـرایش ژن از آن استفاده کرد. با کریسپر می توان برای تولید جهش های ازدست دادن عملکرد در آنکوژنها ، بـه دسـت آوردن عملکرد در ژن های سرکوبگرتومور ، تعدیل کننده های بیان ژن و یـا حـذف ژنهـای بیمـاری زای باکتریـایی استفاده کرد. پس از جدا شدن DNA هدف توسط Cas9، مسیرهای ترمیمی فعال می شود وباعـث جهـش های با تغییر درچهارچوب شده و باعث غیرفعال شدن ژن می شود[۵].تـا کنـون از سیسـتم کریسـپر جهـت درمان بیماری های سیستم عصبی و ماهیچه ای از جمله دیستروفی عضلانی[۶]،. انواع سرطان هـا از جملـه سرطان ریه(7) و همچنین ژنهای پاتوژن باکتریایی استفاده شده است. همچنین معرفی دارو به بافت هدف از طریق حذف ژن اخلال گر و وارد نمودن ژن سالم از دیگر سوابق سیستم کریسپر در کمک به بهبـود بیمـاری هاست [۷]. بـا سـاخت حامـل کریسـپیر نوترکیـب ژن EcD بیمـاری زای بـاکتری escD بـاکتری *E.coli O157:H7* که در این پژوهش انجام گرفت دستورزی و جهش حذفی ژن فوق با اهداف کاربرد دارویـی و ژن درمانی بیماریهای خاص همچون واکسن سازی امکان پذیر می گردد. بر اساس نتایج به دسـت آمـده از ایـن پژوهش و با توجه به نتایج حاصل از روشCRISPR-Cas9 ارائه شده در این پروژه، می توان اظهار نمـود کـه gRNA طراحی شده وCas9 به طور موفق و اختصاصی نواحی مورد نظـر در ژن EscD را شناسـایی و بـرش داده است. با توجه به مطالب و نتایج ذکر شده مـی‌تـوان نتیجـه‌گیـری کردکـه تکنولـوژی CRISPR-Cas9 می‌تواند به عنوان یک ابزار قدرتمند، ارزان و دقیق در جهت تغییرات ژنتیکی در آزمایشگاه‌هـای دانشـگاهی و مراکز تحقیاتی و داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Franzin FM, Sircili MP. (2015). Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorragic Escherichia coli subjected to a complex network of gene regulation. BioMed research international. Oct; 2015.
2. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. (2010). A brief overview of Escherichia coli O157: H7 and its plasmid O157. Journal of microbiology and biotechnology. Jan;20(1):5.
3. Tseytin I, Dagan A, Oren S, Sal-Man N. (2018). The role of EscD in supporting EscC polymerization in the type III secretion system of enteropathogenic Escherichia coli. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. Feb 1; 1860 (2):384-95.
4. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. Jun 5;157(6):1262-78.
5. Mead PS, Griffin PM. (1998). *Escherichia coli O157*: H7. The Lancet. Oct 10; 352(9135):1207-12.
6. Su C, Brandt LJ. (1995). *Escherichia coli O157: H7* infection in humans. Annals of internal medicine. 1995 Nov 1; 123(9):698-707.
7. Doyle MP. (1991). *Escherichia coli O157:H7* and its significance in foods. International journal of food microbiology. Apr 1;12(4):289-301.

شناسایی جهش missense ژن TMEM 67 در یک خانواده ایرانی مبتلا به سندرم COACH

طیبه باران زهی*

گروه زیست شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
*kiana8588@gmail.com

چکیده:

مقدمه و هدف: سندرم COACH ، یک سیلیو پاتی نادر، بیماری ژنتیکی است که عمدتاً مغز و کبد را درگیر می کند. اکثر افراد مبتلا به این سندرم دارای ناتوانی ذهنی، مشکلات کبدی (فیبروز) و مشکل در حرکت (آتاکسی) هستند. برخی نیز ممکن است ناهنجاری چشم (به نام کولوبوما) یا حرکات غیرطبیعی چشم (مانند نیستاگموس) داشته باشند. این بیماری به صورت اتوزومال مغلوب به ارث می رسد. سندرم COACH شکل نادرتر سندرم ژوبرت در نظر گرفته می شود. علائم این بیماری ممکن است در نوزادی ظاهر شود. علائم ممکن است در یک محدوده سنی منفرد یا در چندین محدوده سنی شروع شود. دانستن زمان ظاهر شدن علائم می تواند به ارائه دهندگان پزشکی کمک کند تا تشخیص صحیح را پیدا کنند. جهش در ژن *TMEM67* (پروتئین ترانس ممبران ۶۷) باعث ایجاد طیفی از ciliopathy های انسانی، از جمله سندرم COACH می‌شود. ۷۰ درصد موارد ناشی از تغییرات ژنتیکی در ژن *TMEM67* می باشند. هدف از این مطالعه بررسی ژنتیکی دو بیمار مبتلا به سندرم COACH بود. **مواد و روش ها**: DNA پروباندها و افراد سالم خانواده با استفاده از روش salting out استخراج و توالی یابی کل اگزوم جهت شناسایی جهش استفاده شد. با استفاده از تکنیک توالی یابی سنگر تائید جهش در سایر افراد سالم صورت گرفت. **نتایج:** نتایج توالی یابی اگزوم جهش missense (c.725A>G; p.Asn242ser) در اگزون هشتم ژن *TMEM67* نشان داد.

نتیجه گیری: جهش شناسایی شده در این مطالعه در مقالات گزارش شده و از جمله جهش های شایع این ژن می باشد.

کلمات کلیدی: توالی یابی کل اگزوم، TMEM67، سندرم COACH.

Identification of missense mutation of *TMEM* 67 gene in an Iranian family with COACH syndrome

*Tayebeh Baranzehi

*Department of Biology, university of Sistan and Baluchestan, Zahedan,Iran.

kiana8588@gmail.com

Abstract

Background and aim: COACH syndrome, a rare ciliopathy, is a genetic disease that mainly affects the brain and liver.Most individuals with COACH syndrome have intellectual disability, liver problems (fibrosis), and difficulty with movement (ataxia). Some may also have an abnormality of the eye (called a coloboma) or abnormal eye movements (such as nystagmus). This condition is inherited in an autosomal recessive manner; COACH syndrome is considered a rarer form of Joubert syndrome. Symptoms of this disease may start to appear as a Newborn.

Symptoms may begin in a single age range, or during several age ranges. The symptoms from some diseases may begin at any age. Knowing when symptoms began to appear can help medical providers find the correct diagnosis. Mutations in the *TMEM67* (transmembrane protein 67) gene causes a range of human ciliopathies, including COACH syndrome. 70% of cases are thought to be caused by genetic changes in the *TMEM67* gene. The purpose of this study was to investigate the genetics of two patients with COACH syndrome.

Materials and methods: DNA of probands and healthy individuals of the family was extracted using the salting out method and whole exome sequencing was used to identify the mutation. By using Sanger sequencing technique, the mutation was confirmed in other healthy indivituals. **Results:** The results of exome sequencing showed a missense mutation (c.725A>G; p.Asn242ser) in the eighth exon of *TMEM67* gene. **Conclusion:** The mutation identified in this study has been reported in articles and is among the common mutations of this gene.

Keywords: Whole exome sequencing, TMEM67, COACH syndrome.

مقدمه

مژک های اولیه[6] اندامک های مبتنی بر میکروتوبول هستند که سیگنال های خارج سلولی را در بسیاری از سلول ها در طول فاز G1/G0 چرخه سلولی حس و انتقال می دهند و اکنون ثابت شده است که مژک ها واسطه مسیرهای کلیدی رشد جنینی، از جمله سیگنال دهی Wnt و Shh هستند. گروه مهمی از اختلالات رشدی ارثی، ciliopathies ، ناشی از جهش در ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی هستند که اجزای primary cilium و basal body هستند. مخچه جزء اصلی ساختار مغزی است که بیشتر در ciliopathies تحت تأثیر قرار می گیرد. نقایص رشد مخچه در تعدادی از ciliopathies از جمله سندرم ژوبرت (JBTS) یافت می‌شود[۱]. سندرم ژوبرت (JS, MIM 213300) یک وضعیت neurodevelopmental ناهمگن نادر با توارث اتوزومال مغلوب است که در اثر جهش در حداقل ۲۹ ژن کد کننده اجزای ساختاری یا عملکردی primary cilium ایجاد می شود. علائم عصبی از دوران نوزادی وجود دارد و شامل هیپوتونی پیشرونده به سمت آتاکسی، تاخیر رشد و اختلالات حرکتی چشم و اختلال در تنظیم تنفس است[۲, ۳]. سایر ویژگی‌های متغیر عبارتند از دیستروفی شبکیه، فیبروز کبدی، کلیه پلی کیستیک و پلی داکتیلی (چند انگشتی). تنوع فنوتیپ JS تعیین معیارهای تشخیصی بالینی دقیق سندرم را دشوار می کند. شیوع سندرم ژوبرت یک در هشتاد هزار تا یک در صدهزار تولد زنده در سرتاسر جهان تخمین زده شده است. وقوع این بیماری در اکثر کشورهای خاورمیانه از جمله ایران به خوبی مشخص نشده است. هرچند تخمین زده می شود که به دلیل نرخ بالای ازدواج های فامیلی در ایران نسبت به سایر جمعیت ها شیوع آن در ایران بیشتر باشد[۴]. سندرم COACH که با نام سندرم ژوبرت با نقص کبدی نیز شناخته می شود، یک بیماری ژنتیکی نادر اتوزومال مغلوب است. علائم سندرمCOACH از بدو تولد تا اوایل کودکی بروز می کند. ناهنجاری های صورت یک علامت رایج این سندرم است. جهش در TMEM67 (MKS3) باعث ایجاد طیفی از ciliopathy های انسانی می‌شود، از جمله سندرم های کچ[7] (MIM 216360)، سندرم ژوبرت(MIM 610688)، سندرم مکل گروبر[8] (MIM 607361)، و نفرونوفتیزیس[9] (MIM 613550) همچنین در سندرم باردت بیدل[10] به عنوان یک ژن اصلاح کننده[11] (MIM 615991).TMEM67 گیرنده Wnt Frizzled مانند TMEM67 (همچنین به عنوان مکلین شناخته می شود) را رمزگذاری می کند که اخیراً نشان داده شده که از نظر عملکردی با لیگاند Wnt5a تعامل دارد. این پروتئین غشایی با طول ۹۹۵ امینو اسید با N- ترمینال خارج سلولی حاوی یک سیگنال پپتید و یک دمین غنی از سیستئین است. این پروتئین برای ساختار و عملکرد cilia مورد نیاز است.[۵].

6 Primary cilia
7 COACH syndrome
8 Meckel-Gruber syndrome
9 Nephronophthisis
10 Bardet-Biedl
11 Modifier gene

مواد و روش ها

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد(IR.MUMS.REC.1395.534) تایید و رضایت نامه کتبی آگاهانه از شرکت کنندگان در مطالعه گرفته شد.

استخراج DNA

DNA ژنومی از خون محیطی پروباند و اعضای سالم خانواده وی با استفاده از روش salting out استخراج و کیفیت و یکپارچگیDNA استخراج‌شده با ژل الکتروفورز (آگارز ۱ درصد) ارزیابی شد.

۲-۲. توالی یابی DNA

دو میکروگرم از DNA پروباند با استفاده از کیت Agilent SureSelect Human All Exon V6 (Agilent, Sata Clara, CA, USA) تحت exome capturing قرار گرفت و توالی یابی روی یک توالی سنجی Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) انجام شد. دیتا خام با استفاده از BWA-0.7 با ژنوم رفرنس (GRCh37/UCSC hg19) هم تراز شد. واریانت کالینگ با ابزار GATK (Genome Analysis Tool Kit) انجام شد.SNV ها با استفاده از VarScan نسخه ۲,۲,۵، MuTec، ایرانوم و نومد شناسایی شد. دیتا بیس Variome برای فیلتر واریانت فرکانس خاص جمعیت استفاده شد.

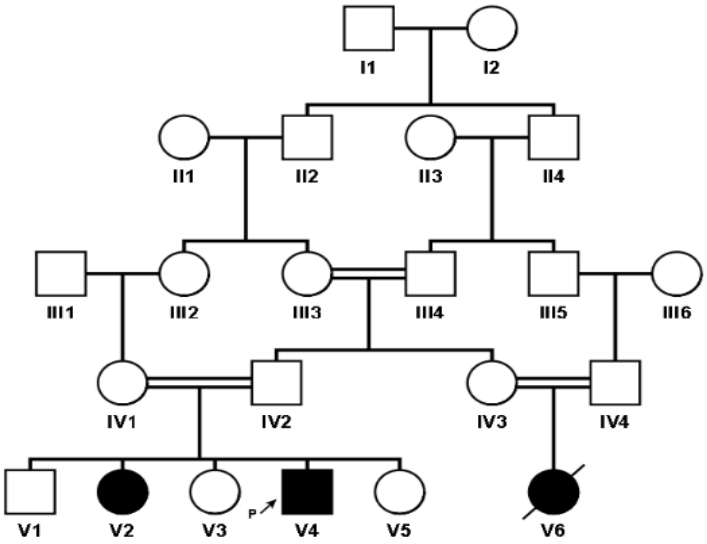
PCR و توالی یابی سنگر

میزان یک میکرولیتر DNA ژنومی استخراج شده در مراحل قبلی به همراه یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای فوروارد

(5'–GAGGTGTCCCATTTTTCCAG-3′) وریورس(5'- AACAGTGCTCAGTCCAGCAG-3') ، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس(Sina Clon Cat. No.: MM206) PCR و ۱۲ میکرولیتر آب DEPC در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش PCR استفاده شد. واکنش‌های PCR با استفاده از مرحله انکوباسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه، و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. مرحله نهایی گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. مقدار یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد یا ریورس به محصول PCR مرحله قبل اضافه شد و مخلوط حاصل جهت سکانس سنگر ارسال شد. سکانس سنگر در دستگاه XL DNA analyzer (ABI, Foster City 3730) انجام شد و دیتا مربوطه به صورت فایل فرمت ABI جهت انالیز ارائه شد.

نتایج

اطلاعات بیماران



شکل۱: شجره خانوادگی بیماران

۲-۳. آنالیز ژنتیکی

نتایج توالی یابی جهش هموزیگوت missense را در اگزون هشتم ژن *TMEM67* نشان داد c 725A>G; (p.Asn242Ser).

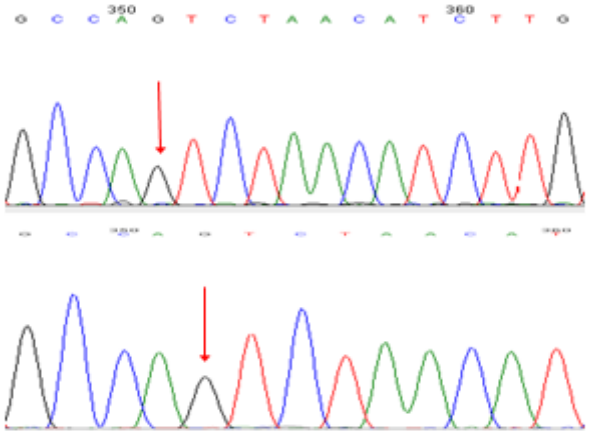
این جهش باعث تبدیل اسید آمینه آسپاراژین در جایگاه ۷۲۵ به اسید آمینه سرین می شود. جایگاه اسید امینه آسپارارژین۲۴۲ در بین گونه های مختلف بسیار حفاظت شده است (شکل۲).

species	aa	alignment
Human	242	QSSAAACWVYANLTSCQALGNMCV
mutated	242	ASLTSCQALGNMC
Ptroglodytes	242	ANLTSCQALGNMC
Mmulatta	241	ANLTSCQALGNIC
Fcatus	138	VYANLTSCQALGNMC
Mmusculus	311	ANLTSCQALGNMC
Ggallus	213	EASASACWLYSNLTACQALGNMC
Trubripes	241	YSSAAACLLFSNLTACQALGNMC
Drerio	238	YSSAAACLLFSNRTA
Dmelanogaster	235	KFVAFFCLTLRNDTACQQLANLC
Celegans	166	STDAKLC-SERNIQSCEAMVNMC
Xtropicalis	242	QASAAACLMYTNQTSCQALGNMC

شکل ۲. آمینو اسید آسپاراژین حفاظت شده در جایگاه ۷۲۵ پروتئین**TMEM67**

پیش بینی ACMG برای این واریانت Likely Pathogenic است. ابزار Mytation taster برای این واریانت disease causing پیش بینی می کند. فراوانی آللی این واریانت در دیتا بیس کنترل نوماد ۰,۰۰۰۰۰۷۹۶۰ وفراوانی افراد هموزیگوت صفر می باشد.

این واریانت در پروباند دیگر سنگر و تائید شد (شکل۳).



شکل۳. نتایج تائید و سگریگیشن واریانت **c.725A>G** در بیماران

بحث

سندرم COACH یک ciliopathy است، گروهی از بیماری‌ها که بر اساس رفتار نامنظم primary cilia دسته‌بندی می‌شوند که در تقسیم سلولی، حمل‌ونقل، ارتباطات و تمایز بافتی نقش دارند و منجر به رشد نامنظم بافت در اندام ها و بیماری های مختلف دیگر می شود. سندرم ژوبرت تقریباً ۱ در ۸۰۰۰۰ تا ۱ در ۱۰۰۰۰۰ تولد زنده را تحت تأثیر قرار می دهد، به این معنی که یک بیماری نادر است، در حالی که سندرم COACH حتی نادرتر است و تنها ۴۳ مورد از زمان کشف آن تا سال ۲۰۱۰ گزارش شده است[۶]. تخمین زده می شود که این بیماری در کمتر از یک میلیون نفر رخ می دهد[۷]. با توجه به این نادر، پیش آگهی بیماری به صورت موردی بررسی می شود. بقا به شدت علائم بستگی دارد و اکثر بیماران در دوران نوزادی زنده می مانند.TMEM67 یکی از شایع ترین ژن های JS جهش یافته در بیماران از جمعیت شمال اروپا و ژاپن است، با این حال، بر اساس داده های موجود در حال حاضر، علت شایع در جمعیت عرب خاورمیانه و شمال آفریقا نیست.

جهش در ژن TMEM67 یکی از علل اصلی MKS و JBTS انسانی است که هر دو با ناهنجاری های شدید مخچه تظاهر می کنند. علل احتمالی مرگ با پیشرفت نارسایی کلیه و کبد در مراحل بعدی زندگی است. تاکنون۹۸ جهش در ژن TMEM67 مرتبط با بیماری های مختلف در مقالات گزارش شده است[۱].

تای فونگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش یک خانواده ویتنامی با ازدواج غیر خویشاوندی با سندرم ژوبرت، یک جنین و یک پسر ۱۰ ساله با تاخیر در رشد، را کردند. پسر ۱۰ ساله ناهنجاری های صورت داشت، آتاکسی، و همچنین تاخیر حرکتی شدید[۸].

در سال ۲۰۱۸ نیز یک بیمار زن ۲۲ ساله ،حاصل ازدواج غیر خویشاوندی، با سندرم COACH توسط هوینچ گزارش شد که هیپوتونی، تاخیر در رشد، هپاتومگالی و تعداد کم پلاکت ها داشت. تاخیر رشد در این بیمار از ۲ ماهگی شروع شده بود[۹].

منابع

1. Brancati, F., et al., *MKS3/TMEM67 mutations are a major cause of COACH Syndrome, a Joubert Syndrome related disorder with liver involvement.* Human Mutation, 2009. **30**(2): p. E432-E442.
2. Lee, S.-H., et al., *Functional validation of novel MKS3/TMEM67 mutations in COACH syndrome.* Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-9.
3. Doherty, D., et al., *Mutations in 3 genes (MKS3, CC2D2A and RPGRIP1L) cause COACH syndrome (Joubert syndrome with congenital hepatic fibrosis).* Journal of medical genetics, 2010. **47**(1 :(p. 8-21.

4. Dehghani, M., et al., *A common ancestral Asn242Ser mutation in TMEM67 identified in multiple Iranian families with Joubert syndrome.* Public health genomics, 2017. **20**(3): p. 188-193.
5. Abdelhamed, Z.A., et al., *The ciliary Frizzled-like receptor Tmem67 regulates canonical Wnt/β-catenin signalling in the developing cerebellum via Hoxb5.* Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 5446.
6. Weiland, M.D., et al., *COACH syndrome: an unusual cause of neonatal cholestasis.* The Journal of pediatrics, 2011. **1** ;(۵)۵۸p. 858-858. e1.
7. Parisi, M.A. *Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders.* in *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2009: Wiley Online Library.
8. Bui, T.P.H., et al., *Novel compound heterozygous TMEM67 variants in a Vietnamese family with Joubert syndrome: a case report.* BMC Medical Genetics, 2020. **21**(1): p. 1-8.
9. Huynh, J.M., M. Galindo, and C.M. Laukaitis, *Missense variants in TMEM67 in a patient with Joubert syndrome.* Clinical Case Reports, 2018. **6**(11): p. 2189.

سنتز نانوذرات نشاسته اصلاح شده جهت دارورسانی در شرایط دمایی مختلف

علی دانشوری اسفهلان[۱]، سعید نژاوند[۲،*]، محمد پاژنگ [۳]، رحیم محمدرضایی [۴]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
ali.daneshvari2@gmail.com
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
Saeed.Najavand@gmail.com
۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران،

mpazhang@yahoo.com

۴- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران،

r.mohammadrezaei@ymail.com

عضو هیئت علمی دانشگاه سراسری شهید مدنی آذربایجان تبریز،Saeed.Najavand@gmail.com

چکیده

دارورسانی روشی است که به وسیله آن با طراحی یک سیستم و یا بستر، می توان داروی مورد نظر را به موضع هدف رساند، طوری که هم عوارض شیمیایی دارو کاهش پیدا کند و هم دارو به طور اختصاصی به موضع مورد درمان رسیده و در بهبود بیماری مؤثر عمل کند. در این تحقیق نشاسته به عنوان بستری برای حمل و رسانش داروی ضدسرطان دوکسوروبیسین انتخاب شد. داروی دوکسوروبیسین در حین ساخت نانوذرات، درون نانوذرات به دام انداخته شد. مشاهده شد که اندازه نانوذرات نشاسته به طور میانگین زیر ۵۰ نانومتر بود. نتایج رهایش دارو از نانوذرات نشاسته، نشان داد که نانوذرات در دماهای بالا، دارای رهایش بیشتری نسبت به دماهای پایین تر هستند که این امر پیشنهاد کننده استفاده از این نانوذرات در شرایط فیزیولوژیکی دما بالا بود.

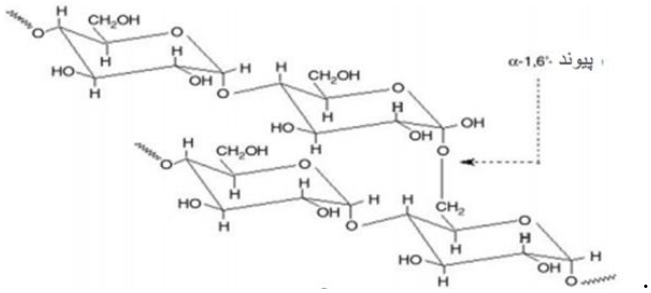
کلمات کلیدی: دارورسانی، نانو ذرات، نشاسته، دما بالا، دوکسوروبیسین، بارگیری، رهایش

۱. مقدمه

داروهای شیمیایی علاوه بر اینکه دارای اثرات مفیدی برای بهبود بیماری دارند، اما مصرف آنها طبیعتاً می تواند دارای عوارض شیمیایی خاص خود نیز باشد. در این جاست که علم نانو به کمک علم داروسازی رفته و با ایجاد بسترهای مناسب حمل دارو به محل بافت و اندام هدف، سعی می کند با به حداقل رساندن اثرات شیمیایی حاصل از دارو در سایر اندام ها، میزان مصرف دارو و اثرگذاری آن را بهبود بخشد. هدف علم دارورسانی استفاده از ظرفیت علوم مختلف در جهت بهبود کیفیت و کمیت دارورسانی به بافت های هدف در بدن است. در این زمینه از علوم مختلفی همچون: بیوشیمی، شیمی، داروسازی، پزشکی، بیوتکنولوژی، نانوتکنولوژی استفاده می شود. بنابرین سیستم های تحویل دارو، یک نوع فرمولاسیون و یا ماده ای می باشند که باعث فراهم آوری انتشار به موقع دارو می شوند. این سیستم به تنهایی، از نظر دارویی فعال نیست، ولی ایمنی و کارایی دارویی را که حمل می کند را بهبود می دهد. در دارورسانی تمرکز بر روی ماده مؤثره (جزء فعال) دارو است که این خود باعث کاهش استفاده از مواد شیمیایی همراه دیگر می شود که طبیعتاً باعث حذف یا کاهش اثرات سوء آن ها نیز می شود. یعنی با دارورسانی هدفمند،علاوه بر کاهش هزینه ها، شاهد عملکرد بهتر دارو به دلیل استفاده از ماده مؤثره آن و کنترل رهایش آن در محل خاص می شوند [۱].

می توان به عنوان نمونه ای در زمینه توجه به راه کار انتقال هدفمند دارو، به توجه به اثر pH اشاره نمود. با توجه به اینکه هر دارو در موضع و یا مواضع خاصی اثر می گذارد، بنابرین هرکدام از این نقاط دارای شرایط خاص فیزیولوژیکی همچون pH می باشند[۲]. اندازه کوچک نانوذرات، باعث می شود حمل نانوذرات حاوی دارو به محل اثر امکان پذیر بوده و دارو آسان تر در معرض سلول قرار بگیرد. نانوذرات دارو رسان دارای قطری در حدود ۱۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر هستند [۳].

دارورسانی هدفمند، سعی در مهندسی رهایش دارو در یک موضع خاص است تا هم فراهمی زیستی دارو در آن موضع خاص بهبود یابد و از هدررفت دارو یا کم بودن میزان داروی رسیده به محل لازم جلوگیری شود و نیز مانع بروز عوارض ناشی از تأثیر دارو در قسمت های دیگر بدن بیمار شد. با دارورسانی هدفمند، علاوه بر کاهش هزینه ها، شاهد عملکرد بهتر دارو به دلیل استفاده از ماده مؤثره آن و کنترل رهایش آن در محل خاص می شوند [۴]. نشاسته یک نوع پلی مر آلی است که خود از دو نوع پلی مر به نام آمیلوز و آمیلوپکتین ساخته شده است و خود این دو نیز از مولکول های گلوکز ساخته شده اند. گلوکز ها در رشته خطی نشاسته با پیوند های آلفا ۱ به ۴ و در شاخه ها با پیوند آلفا ۱ به ۶ به هم متصل هستند.



شکل ۱- ساختار آمیلوپکتین در نشاسته

نشاسته یک ماده در دسترس و ارزان است که یکی از دلایل استفاده از این پلی مر در این مطالعه نیز همین است. صرف نظر از روش های استخراج نشاسته از انواع گیاهان، نوع گیاهی هم که برای استخراج نشاسته مورد استفاده قرار می گیرد نیز مهم است. زیرا هر نوع نشاسته با توجه به خصوصیاتی که دارد برای یک نوع مصرف خاص مفید تر می باشد. به عنوان نمونه نشاسته ذرت مومی یا گلوتین آمیلوز کم تری دارد و یا اصلاً ندارد در حالی که برخی از حبوبات حاوی آمیلوز بیشتری هستند [۵]. محققان با ایجاد تغییرات ساختاری هدفمند، سعی در بهبود کیفیت استفاده از نشاسته در اموری همچون دارورسانی را دارند تا نشاسته، مقاوم تر و کاربردی شود که به این عمل، اصلاح نشاسته گفته می شود که از این میان می توان به استفاده از ترکیباتی همچون، استات، گرافن کوانتوم دات، آلژینات، پلی اتیلن گلیکول و ... در ایجاد تغییرات اشاره کرد. به عنوان مثال با استاته کردن نشاسته مشکل تورم آن نیز تا حدودی برطرف می شود [۶]. با توجه به تغییر سبک زندگی و بروز انواع بیماری های جدید و اختلالات مهم، برای رفع این مشکلات، از داروهای مختلفی استفاده می شود. در این تحقیق از داروی دوکسوروبیسین (آدریامایسین) که از داروهای ضد سرطان در مبحث اختلالات گوارشی است، به عنوان داروی مدل استفاده شده است. این دارو در ارتباط با DNA بوده و لذا یک نوع مهار کننده بیوسنتزی است. این دارو، توپوایزومراز نوع دوم را مهار می کند، بنابرین در مبحث باز کردن ابرمارپیچ در رونویسی دخالت دارد. دوکسوروبیسین با دخالت در کار توپوایزومراز باعث توقف روند همانند سازی رشته DNA می شود [۷].

باید خاطر نشان کرد که هر دارو به دلیل اینکه یک ترکیب شیمیایی است، اغلب دارای یک سری عوارض شیمیایی است. مشخص شده است که در بیمارانی که دوکسوروبیسین مصرف می کنند، کاردیومیوپاتی مزمن رخ می دهد که این خود تهدید کننده زندگی است، زیرا می تواند به سرعت به نارسایی احتقانی قلب پیشرفت کند که مرتبط با یک نوع از توپوایزومرازها است. کاردیوتوکسیک مربوط به این دارو نیز مشخص شده است که وابسته به دوز است. سایر عوارض جانبی دوکسوروبیسین بر روی کلیه، ریه و خون دیده می شود و به نظر می رسد علت ایجاد سمیت و عوارض جانبی مربوط به ایجاد رادیکال آزاد در اثر مصرف این دارو باشد [۸و۹].

۲. سنتز نانوذره نشاسته حاوی داروی دوکسوروبیسین

اساس روش کار در این تحقیق، مطابق روش سنتز رسوبی نانوذرات انجام شده توسط جینا اس ال- فکی و همکاران بود که با انجام تغییراتی هدفمند در روش مذکور، سنتز نانوذرات نشاسته انجام گردید. این روش اولاً به دلیل ایجاد یک قطر مناسب جهت دارورسانی و ثانیاً به دلیل میزان بارگیری مطلوب دارو ، در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت [۱۰]. جهت تهیه بستر نشاسته ای، ابتدا میزان ۰/۵ گرم از نشاسته به مدت یک شبانه روز در ۱۷ میلی لیتر از آب حاوی ۳۷۵ میلی گرم NaOH حل شد. بعد از یک روز، ۱ میلی لیتر داروی دوکسوروبیسین با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر را از محلول داروی خالص برداشته و به بستر نشاسته ای که روی استایرر قرار داشت ریخته شد. محلول بستر حاوی دارو به مدت ۵ دقیقه تحت التراسونیک پروب دار با قدرت ۴ الی ۴/۵ قرار گرفت. در همین زمان ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۲۵ گرم از سدیم تری پلی فسفات (TPP) به صورت قطره قطره با کمک قطره چکان به محلول فوق افزوده شد. بعد از انجام مراحل فوق، به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه، محلول آماده شده بر روی استایرر با دور ملایم قرار گرفت. بعد از گذشت زمان بیان شده، به اندازه حجم محلول سنتز شده، اتانول مطلق بر روی محلول سنتز شده افزوده می شود. در ادامه محلول مورد نظر تحت عمل سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. آنالیز محلول رویی مشخص کننده میزان داروی به دام افتاده در ساختار نانوذرات نشاسته سنتز شده می باشد. بعد از جداسازی محلول رویی، رسوب با محلول اتانول و آب به نسبت ۴ به ۱ و هم حجم خود محلول سنتزی مورد شست و شو قرار گرفت و مجدداً با همان دور و البته به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ قرار گرفت.

۳. بررسی رهایش دارو از نانو ذرات سنتز شده در دماهای مختلف

در این مرحله نانوذرات، در سه دمای مختلف قرار داده شد و رهایش نانوذرات را در محلول بافر فسفات با pH فیزولوژیک (۷/۴) مورد بررسی قرار گرفت. جهت این کار ۵ میلی لیتر از محلول بافر فسفات را در سه ارلن به صورت جداگانه ریخته و سپس ۱۰ میلی گرم از نانوذره سنتز شده را به هر کدام از ارلن های بافر دار اضافه شد. سپس درب ارلن ها را بسته و هر کدام در انکوباتور شیکردار با دماهای ۳۵،۲۵و۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و شیکر با دور ۱۱۰ دور در دقیقه تنظیم شد. در این مرحله نیز در هر یک ساعت، به میزان ۲ میلی لیتر از محلول قرار گرفته درون شیکر، نمونه برداشته و به یک میکروتیوب اضافه می شود. این عمل تا ۶ ساعت به طور متوالی اجرا شد. بعد از گذشت زمان رهایش، میکروتیوب ها با دور ۹۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و مایعات موجود، در طول موج ۴۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی شدند.

۴. نتایج

تمام نمونه های این آزمایش در طول موج ۴۸۰ نانو متر که مربوط به جذب داروی مدل (دوکسوروبیسین) بود جذب خوانی شدند و با مطالعه تفاوت جذب داروی آزاد و محلول سنتزی به میزان بارگیری دارو در

نانوذرات به شکل درصدی محاسبه شد. از فرمول زیر برای بررسی به دام افتادن دارو و میزان درصد بارگیری دارو استفاده شد [۶۰]:

۱۰۰× میزان کل دارو÷ (میزان داروی آزاد – میزان کل دارو)

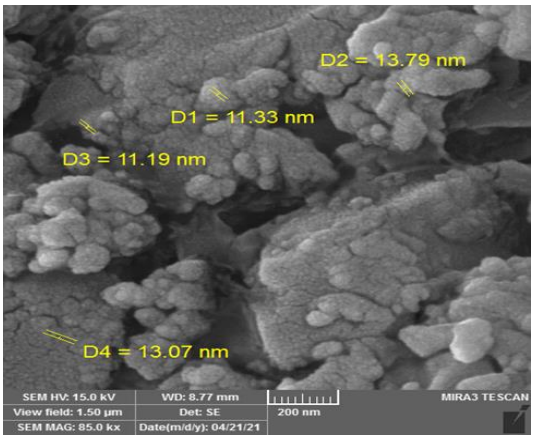
بنابرین با توجه به فرمول بیان شده، در این تحقیق نیز میزان داروی آزاد و نیز بارگیری شده در نانوذرات نشاسته، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شده و بر حسب اعداد حاصل از جذب نوری (OD)، و به کمک فرمول بالا، درصد بارگیری دارو (%EE) در نانوذرات محاسبه شد. نتایج بارگیری دارو در نانوذرات سنتز شده در جدول شماره یک آمده است:

جدول ۱- نتایج بارگیری دارو در دو نوع نانوذره نشاسته سنتز شده

OD داروی اولیه	OD مایع روئی	%EE
۱/۴	۰/۲۶	۸۱/۴۱

۱-۴. نتایج مربوط به تصاویر SEM

به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (نگاره یا SEM) می توان آنالیز سطحی، شیمیایی و داخلی نمونه های مورد نظر را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. در تصویر ۱ زیر تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نانوذرات سنتز شده آورده شده است:

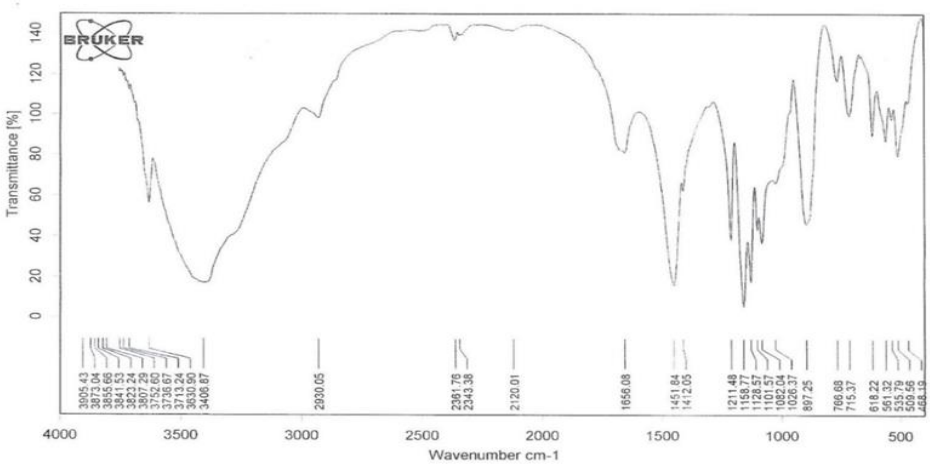


تصویر۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی **(SEM)** نانوذرات نشاسته

همانطور که در تصویر۱ مشاهده می شود، قطر میانگین نانوذرات نشاسته زیر ۵۰ نانومتر است. بنابرین احتمال بارگیری زیاد دارو در نانوذرات سنتز شده، افزایش می یابد.

۴-۲. نتایج FTIR مربوط به نانوذرات سنتز شده

با استفاده از این روش سنجشی و تحلیل پیک های طیف، حضور یا عدم حضور یک ترکیب شیمیایی خاص در ماده سنتز شده قابل توجیه می باشد. نتایج FTIR مربوط به نانوذرات سنتز شده در نمودار۱ آورده شده است:

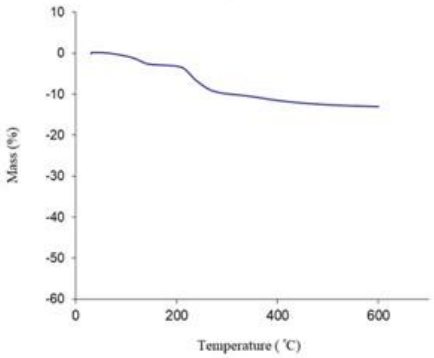


نمودار ۱- آنالیز FT-IR نانوذرات نشاسته حاوی دوکسوروبیسین

در تفسیر طیف FT-IR مربوط به نشاسته، پیک ناحیه ۳۴۰۶ مربوط به پیوند کششی O-H و پیوندهای درون مولکولی هیدروژنی می باشد. پیک‌های ناحیه ۲۹۳۰ و ۱۶۵۶ احتمالا به ترتیب متعلق به پیوند خمشی C-H و آمید نوع اول (C=O) هستند که پیوند C=O از پیوندهای اصلی در داروی دوکسوروبیسین می باشد. البته در یک مطالعه ای دیگر، پیک های مشخص داروی دوکسوروبیسین در نواحی مختلف از جمله ناحیه ۱۶۵۵ نیز ثبت شده است [۱۱] که در این تحقیق نیز می توان در این ناحیه، پیک را مشخص کرد.

۴-۳. نتایج آنالیز TGA نانوذرات سنتز شده

آنالیز توزین حرارتی (TGA)، یک نوع روش سنجش اطلاعات فیزیکی در مورد نمونه مورد بررسی است. این روش به تجزیه و تحلیل اطلاعاتی همچون: نرخ تجزیه نمونه، اکسیداسیون، احیا و ... می پردازد [۱۲]. در این تحقیق نیز نمونه نانوذرات نشاسته تحت دستگاه TGA قرار گرفتند که در نمودار ۲ قابل مشاهده است:

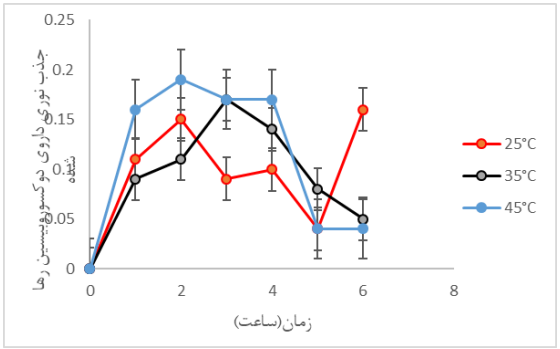


نمودار ۲- نمودار مربوط به **TGA** بستر نشاسته

همانطور که در نمودار بالا مشاهده می شود، با افزایش دما، شاهد کاهش وزن هر دو نمودار هستیم. کاهش وزنی را در حوالی ۱۱۰ درجه مشاهده می شود که مربوط به حضور آب در ساختار است. این کاهش وزن در دمای گفته شده که می تواند به این دلایل باشد: حضور آب در نمونه مذکور و عدم خشک شدن کامل نمونه، و یا قدرت بالای جذب و نگه داری آب در نمونه نانوذرات نشاسته و یا همچنین حذف گروه های عاملی نمونه. همچنین در محدوده دمایی ۳۵۰-۳۰۰ نیز نمودار و نمونه دچار کاهش وزن شده اند. در این مرحله کاهش وزن را می توان به تخریب نمونه نسبت داد.

۴-۴. نتایج رهایش دارو از نانوذرات سنتز شده در دماهای مختلف

رهایش دارو از نانوذرات سنتز شده در دما های مختلف مورد بررسی قرار گرفته شد. با استفاده از بافر فسفات، pH فیزیولوژیک ایجاد و رهایش دارو از نانوذرات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج رهایش دارو از نانوذرات نشاسته در دماهای مختلف در نمودار ۳ آورده شده است:



نمودار۳- رهایش دمایی دوکسوروبیسین از نانوذرات نشاسته

همانطور که در نمودار ۳ مشاهده می شود رهایش دارو در دمای بالا نسبت به دماهای پایین، بیشتر است. رهایش دارو در ساعات اولیه در مقایسه با ساعات انتهایی نیز بیشتر است. افزایش رهایش دارو از نانوذرات در دماهای بالا نشانگر حساسیت ساختار نانوذرات به دماهای بالا است. اما در بررسی جزئی تر، رهایش دارو در دمای اتاق به نسبت دو دمای ۳۵ و ۴۵ درجه، کم تر است که می تواند ماندگاری دارو در نانوذرات در

دمای معمولی را موثر واقع شود. از طرفی می توان نتیجه گرفت که به احتمال، افزایش دما، باعث تغییر ساختار و تخریب شکل نانوذرات می شود، زیرا از ساعت چهارم به بعد، الگوی رهایش در دمای ۳۵ درجه و ۴۵ درجه تغییر قابل توجهی دارد. این تغییر در دمای ۴۵ درجه باعث کاهش رهایش دارو به مرور و نیز در ساعت پنجم در دمای ۳۵ درجه، باعث عدم رهایش و یا خروج خالص دارو از نانوذرات می شود. بنابرین این دو تغییر محسوس می تواند به دلیل تأثیر دما بر ساختار نانوذرات باشد. زیرا رهایش دارو از نانوذرات مذکور در دمای ۲۵ درجه، به شکل یک نمودار زیگزاگی از اول تا پایان آزمایش است که احتمالاً نشانگر این است که دمای پایین تأثیری بر ساختار نانوذرات نشاسته و رهایش دارو ندارد.

۵. بحث و نتیجه گیری

با طراحی نانوحامل های دارورسان، می توان نقشی موثر را در درمان بهتر بیماری ها از جمله سرطان داشت و همچنین باعث کاهش عوارض دارو در مواضع غیر لازم در بدن و اثر دارو در محل مورد نیاز شد. اثبات شده است که استفاده از نانوسیستم ها در دارورسانی سرطان، با دو مزیت مناسب همراه است که شامل کاهش عوارض جانبی و نیز بهبود اثر عملکرد دارو می باشد [۱۳].

بارگیری دارو در نانوذرات نشاسته برحسب درصد بارگیری دارو، برابر با ۸۱/۴۱ می باشد. با توجه به میزان بالای درصد بارگیری دارو در نانوذرات، می توان بر ساختار خوب این نوع سیستم دارورسان برای بارگیری دارو نتیجه گرفت.

نتایج حاصل از مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که اندازه نانوذرات به طور میانگین زیر ۵۰ نانومتر است، طبق نظر محققان در مورد ارتباط بین قطر نانوذرات سنتزی با بارگیری دارو در آن ها، گفته شده است که زمانی که اندازه نانوذرات کوچکتر باشد، میزان بارگیری دارو نیز در آن بیش تر خواهد بود [۱۴].

نتایج نشان داد که رهایش دارو در دماهای بالا، در نانوذرات نشاسته بالاست که برای شرایط التهابی، تب و دماهای بالا می تواند یک گزینه مناسب باشد زیرا در این شرایط نیاز به یک سیستم دارورسانی است که بتواند به راحتی رهایش دارو را انجام دهد. یکی از دلایل رهایش بالای دارو از نانوذرات در دماهای بالا، می تواند به دلیل تورم ساختار نانوذرات و در بعضی مواقع تخریب ساختار نانوذرات باشد که منجر به خروج مقدار زیاد دارو از نانوذرات و به عبارتی رهایش بالا می شود. لازم به ذکر است میزان رهایش دارو در بدن نیز، طبق مطالعات محققان، در هنگام افزایش دمای بدن، بالاست [۱۵].

طبق نتایج حاصل از FTIR برخی از پیک ها در نمودار نانوذرات نشاسته خالص پهن است. با توجه به اینکه پهن بودن یک پیک در چنین نمودارهایی، نشان از حضور پیوند های هیدروزنی و درون مولکولی را دارد بنابرین، با توجه به طیف مربوطه در مورد نانوذرات نشاسته حاوی دارو، می توان به وجود چنین پیوند هایی اذعان نمود. این نانوذرات همچنین به دلیل دارا بودن بخش های آمورف در ساختار خود، دارای حلالیت

خوبی در محیط مایع هستند و با توجه به اینکه محل اثر نانوذرات در بدن و در شرایط مایع، می باشد بنابرین امتیازی دیگر برای آن ها محسوب می شود.

۶. منابع

1 .Bae, Y.H. and K. Park, *Advanced drug delivery 2020 and beyond: Perspectives on the future.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2020. 158: p. 4-16.

2. Xia, W., et al., *Fabrication, characterization and evaluation of myricetin adsorption onto starch nanoparticles.* Carbohydrate Polymers, 2020. 250: p. 116848.

3 .Mudshinge, S.R., et al., *Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery.* Saudi Pharmaceutical Journal, 2011. 19(3): p. 129-141.

4. Bae, Y.H. and K. Park, *Advanced drug delivery 2020 and beyond: Perspectives on the future.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2020. 158: p. 4-16.

5. Pokhrel, S., *A review on introduction and applications of starch and its biodegradable polymers.* International Journal of Environment, 2015. 4: p. 114.

6. Tuovinen, L., et al., *Starch acetate microparticles for drug delivery into retinal pigment epithelium—in vitro study.* Journal of Controlled Release, 2004. 98(3): p. 407-413.

7. Rivankar, S., *An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy.* Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2014. 10(4): p. 853-858.

8. Taemeh, M.A., et al., *Fabrication challenges and trends in biomedical applications of alginate electrospun nanofibers.* Carbohydrate Polymers, 2020. 228: p. 115419.

9. Tang, J., et al., *Nucleosome-inspired nanocarrier obtains encapsulation efficiency enhancement and side effects reduction in chemotherapy by using fullerenol assembled with doxorubicin.* Biomaterials, 2018. 167: p. 205-215.

10. Tiwari, G., et al., *Drug delivery systems: An updated review.* International journal of pharmaceutical investigation, 2012. 2(1): p. 2-11.

11. Sun, N., et al., *Fabricated porous silk fibroin particles for pH-responsive drug delivery and targeting of tumor cells.* Journal of Materials Science, 2019. 54(4): p. 3319-3330.

12. Sai Revanth, J., et al., *TGA and DSC analysis of vinyl ester reinforced by Vetiveria zizanioides, jute and glass fiber.* Materials Today: Proceedings, 2020. 26: p. 460-465.

13. Piktel, E., et al., *Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy.* Journal of Nanobiotechnology, 2016. 14(1): p. 39

14. El-Feky, G.S., et al., *Utilization of Crosslinked Starch Nanoparticles as a Carrier forIndomethacin and Acyclovir Drugs.* Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 2015. 6: p. 1-8.

15. Xu, Y., et al., *A novel controllable molecularly imprinted drug delivery system based on the photothermal effect of graphene oxide quantum dots.* Journal of Materials Science, 2019. 54(12): p. 9124-9139.

بررسی رهایش داروی دوکسوروبیسین از نانوذرات نشاسته در pH های مختلف

علی دانشوری اسفهلان [۱] سعید نژاوند [۲،*]، محمد پاژنگ [۳]، رحیم محمدرضایی [۴]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران،
ali.daneshvari2@gmail.com

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران،
Saeed.Najavand@gmail.com

۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران،

mpazhang@yahoo.com

۴- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران،

r.mohammadrezaei@ymail.com

هیئت علمی دانشگاه سراسری شهید مدنی آذربایجان تبریز،Saeed.Najavand@gmail.com

چکیده

امروزه از سیستم های مختلفی جهت انتقال داروها به محل هدف استفاده می شود که استفاده از هر کدام از سیستم ها، می تواند با هدف مشخصی همراه باشد. هر سیستم انتقال دارو باید دو ویژگی داشته باشد یعنی اولاً افزایش عملکرد دارو در بافت بیمار و ثانیاً کاهش اثرات مضر در بافت های سالم را دارا باشد. در عصر کنونی شاهد پیشرفت های شگرفی در زمینه علم نانوتکنولوژی شده ایم. علم نانوتکنولوژی این زمینه را فراهم می کند تا با رسیدن به مقیاسی که بتوان سلول ها را آسان تر تحت تأثیر قرار داد، به مطالعه و درمان بیماری ها پرداخت. مسأله شیوع امراض گوارشی در عصر کنونی که متأثر از تغییر سبک زندگی، فشار های عصبی و مواردی از این است، باعث مراجعه افراد مختلف جامعه به پزشک برای درمان خود می شود. بنابر این طبیعی است که میزان مصرف داروهای اختلالات گوارشی در این موارد افزایش پیدا کند. با این اوصاف توجه به بهبود دارورسانی در این افراد، شاید بتواند کمک بسیاری در روند بهبودی بیمار و عملکرد اختصاصی دارو داشته باشد. در این تحقیق سعی بر استفاده از نشاسته به عنوان یک سیستم دارورسان برای حمل داروهای بیماری های گوارشی است. داروی مدل استفاده شده در این تحقیق، دوکسوروبیسین است که با انجام این تحقیق مشاهده شد که این دارو در بستر نشاسته در شرایط pH پایین دارای رهایش مناسبی بود.

کلمات کلیدی: دارورسانی، نانو ذرات، نشاسته، دما بالا، دوکسوروبیسین، بارگیری، رهایش

Abstract
Today, various systems are used to transfer drugs to the target location, and the use of each system can be associated with a specific purpose. Every drug delivery system should have two features, i.e. firstly, increase the drug's performance in the diseased tissue and secondly, reduce the harmful effects in healthy tissues. In the current era, we have witnessed tremendous advances in the field of nanotechnology. The science of nanotechnology provides this field to study and treat diseases by reaching a scale that can affect cells more easily. The problem of the prevalence of digestive diseases in the current era, which is affected by lifestyle changes, nervous pressures, etc., causes different people in the society to go to the doctor for their treatment. Therefore, it is natural that the amount of medication for digestive disorders increases in these cases. Having said that, paying attention to the improvement of drug delivery in these people, maybe it can help a lot in the patient's recovery process and the specific performance of the drug. In this research, an attempt is made to use starch as a drug delivery system to carry drugs for digestive diseases. The model drug used in this research is doxorubicin, which was observed by doing this research that this drug had a good release in the starch bed under low pH conditions.
Keywords: drug delivery, nanoparticles, starch, high temperature, doxorubicin, loading, release

۱. مقدمه

دارورسانی روشی است که به وسیله آن با طراحی یک سیستم و یا بستر، میتوان داروی مورد نظر را به موضع هدف رساند، طوری که هم عوارض شیمیایی دارو کاهش پیدا کند و هم دارو به طور اختصاصی به موضع مورد درمان رسیده و در بهبود بیماری مؤثر عمل کند. با ظهور و پیشرفت علم نانوتکنولوژی، تأثیر زیاد این مطالعات، بر سیستم های دارورسانی و طراحی این سیستم ها رخ داد. توجه به این نکته هم جالب به نظر میرسد که به دلیل اینکه گذر به حدود نانو به دلیل اندازه آن، باعث میشود دارو، آسانتر در معرض سلول قرار بگیرد. نانوذرات دارو رسان دارای قطری در حدود ۱۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر هستند [۱]. بنابراین یک ذره نانو، ابزار قابل کنترل و قابل هدایتی برای امور دارورسانی است. نانوذرات، در دارورسانی دارای مزایای دیگری هم همچون موارد زیر هستند[۱]:

الف) بهبود وضعیت زیست فراهمی به دلیل افزایش حلالیت آبی

ب) افزایش زمان ماندگاری در بدن و افزایش نیمه عمر، جهت رهایش

ج)رساندن دارو به موضع خاص در بدن

بیماری های مختلفی روده را تحت تأثیر قرار می دهند که از آن جمله می توان به سرطان روده بزرگ (CRC) که یکی از شایع ترین سرطان ها در جهان و نیز تا سال های قبل به عنوان سومین سرطان بدخیم رایج در ایران، شناخته می شد اشاره کرد.. این مشکل، به عنوان یکی از مسائل دلهره آور در جوامع بشری است. با استفاده از روش های درمانی همچون پرتو درمانی، جراحی و ... به بهبود بیماران کمک می شود. عوامل مهم ایجاد کننده این سرطان شامل، چاقی، رژیم غذایی پرچرب، مصرف گوشت قرمز، سیگار کشیدن، مصرف الکل، عوامل ژنتیکی همچون غیر فعال سازی ژن سرکوبگر تومور و نیز جهش ها در نقاط دیگر ماده ژنتیکی می باشد. یکی از اختلالاتی که منجر به بروز این سرطان می شود. مشخص شده است که متاستازهای این سرطان به داروی دوکسوروبیسین پاسخ می دهند [۳, ۲]. بنابرین در این پژوهش با استفاده از علم نانوفناوری و اهمیت شناخت اختلالات روده و کمک به درمان این مشکلات به طراحی یک نوع سیستم دارورسان برای اینگونه اختلالات پرداخته شده است.

۲. نشاسته در دارورسانی

دارورسانی را می توان روش و راهی که از طریق آن برای یک ماده مؤثره دارویی، جهت تأثیر اختصاصی و کاهش عوارض جانبی دارو استفاده می شود، تعریف کرد. به بیانی دیگر، می توان دارورسانی را به عنوان کارکرد بهتر داروها، تعریف نمود. لذا همان طور که از این تعریف برمی آید در دارورسانی تمرکز بر روی ماده

مؤثره (جزء فعال) دارو است که این خود باعث کاهش استفاده از مواد شیمیایی همراه دیگر می شود که طبیعتاً باعث حذف یا کاهش اثرات سوء آن ها نیز می شود. یعنی با دارورسانی هدفمند، علاوه بر کاهش هزینه ها، شاهد عملکرد بهتر دارو به دلیل استفاده از ماده مؤثره آن و کنترل رهایش آن در محل خاص می شوند [۴].

لازم به توضیح است که هر نوع دارورسانی، هدفمند نیست. دارورسانی غیر هدفمند در درجه اول فقط وظیفه انتقال دارو به بدن بیمار و بهبودی او را دارد که بدیهی است که هم میزان دارو در مواردی بالا بوده و بنابرین ایجاد هزینه می کند و هم اثراتی تحت عنوان عوارض جانبی را برای فرد ایجاد می کند. به طور کلی یک سیستم دارورسانی هدفمند شامل یک دارو، یک حامل و یک لیگاند هدف گذاری شده است. البته دارو می تواند در مواردی همان ماده مؤثره داروی اصلی باشد که اثرات درمانی را دارد. حامل دارویی شامل سیستم هایی طراحی شده توسط محققان برای انتقال دارو به اندام، بافت و یا سلول های خاص هستند. به عنوان مثال: حامل هایی از جنس پلی مر مانند پلی ساکارید، حامل های لیپوزومی، هیدروژل ها، دندریمرها و ... که در آزمایشگاه طراحی و ساخته می شود، به نحوی که دارای یک ساختار اختصاصی برای انتقال دارو به محل خاص و همچنین محافظت از دارو در برابر عوامل تخریبی در مسیر انتقال هستند.

مخاط روده کوچک، ناپیوسته است، اما مخاط معده و روده بزرگ دولایه است. دارو از طریق مویرگ منتشر می شود. بنابرین تفاوت بخش های مختلف دستگاه گوارش از دهان تا روده، باعث ایجاد شرایط فیزیولوژیکی متفاوت می شود که در طراحی سیستم دارورسانی چنین شرایطی باید مورد توجه قرار گیرد. همچنین موانع بیوشیمیایی مانند، حضور آنزیم ها همچون پپسین در معده و یا شرایط pH خاص مانند اسید معده منجر به حذف ۹۸-۹۴ درصد از داروی مصرف شده در اثر عواملی همچون هیدرولیز و ... می شود. در مواردی هم مشکلات دارو رسانی مربوط به حضور یک نوع خاص سلول است که در دارو رسانی اختلال ایجاد می کند [۵].

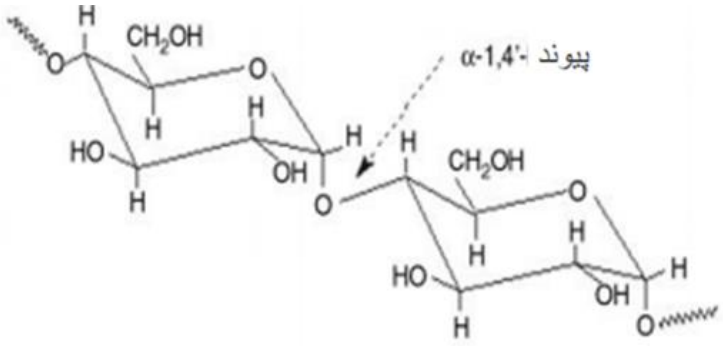
نوع دارو و نوع بیماری نیز می تواند در کنار توجه به محل اثر دارو، اطلاعات مفیدی را در ساخت سیستم دارورسان در اختیار محقق قرار دهد تا بر اساس محیط رهایش دارو، سیستم دارورسان مناسب را طراحی کند. در یک مطالعه اثبات شده است که سلول های توموری در سرطان دارای pH اسیدی تر نسبت به سلول های سالم هستند که این عدد بین ۵/۷ تا ۷/۸ متغییر است و به طور متوسط حدود ۶ در نظر گرفته می شود [۶].

نشاسته یک نوع پلی مر آلی است که خود از دو نوع پلی مر به نام آمیلوز و آمیلو پکتین ساخته شده است و خود این دو نیز از مولکول های گلوکز ساخته شده اند. گلوکز ها در رشته خطی نشاسته با پیوند های آلفا ۱ به ۴ و در شاخه ها با پیوند آلفا ۱ به ۶ به هم متصل هستند. به دلیل اینکه آمیلو پکتین یک ترکیب نامحلول در آب است لذا نشاسته نیز پلی مری نامحلول در آب است.

اما نشاسته ویژگی های جالب توجهی دارد که باعث شد در این مطالعه از آن استفاده شود که از جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد:

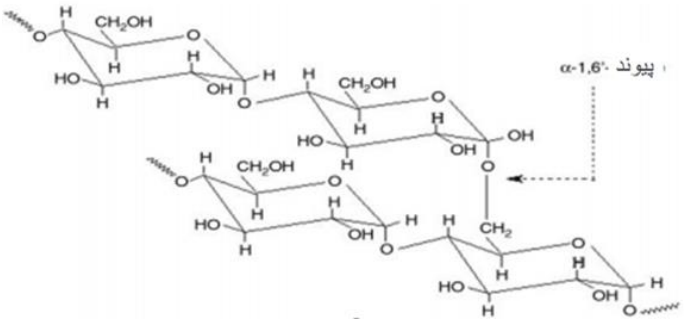
- زیست سازگاری
- عدم سمیت
- ارزان بودن
- در دسترس بودن
- تجدید پذیری
- اندازه متفاوت برای نانوذرات ساخته شده از نشاسته گیاهان مختلف
- پایین بودن آنتالپی ژلاتینه سازی که می تواند در به دام اندازی مواد دیگر مثلاً در دارورسانی مفید باشد [۷].

بنابرین همانطور که مشاهده شد، نشاسته به عنوان یک پلی مر طبیعی، یکی از گزینه های مناسب برای دارورسانی در بدن مطرح می شود که نیازمند مطالعه و استفاده از این ماده زیستی در صنعت داروسازی است. در یک مطالعه اثبات شد که محتوای بالای آمیلوز باعث کاهش شاخص هیدرولیز و مقاومت بیشتر نشاسته می شود. نشاسته مقاوم، به نشاسته ای گفته می شود که در روده کوچک جذب نشود و مقداری از آن نیز باقی مانده و خود را به روده بزرگ برساند [۸].



شکل ۱- ساختار آمیلوز در نشاسته

همانطور که اشاره شد، نشاسته علاوه بر آمیلوز، دارای آمیلوپکتین نیز می باشد که دارای شاخه های جانبی می باشد که همین امر باعث وجود ساختاره ای شاخه مانند در ترکیب نشاسته می شود. این مطلب در شکل ۲ قابل مشاهده است:



شکل ۲- ساختار آمیلوپکتین در نشاسته

می توان با ایجاد تغییرات هدفمند بر روی ذرات نشاسته، این ماده را برای سیستم های دارورسانی استفاده کرد. بنابرین نشاسته به عنوان یک ماده طبیعی و ارزان و در دسترس، که قابلیت ایجاد تغییرات هدفمند شیمیایی را نیز با سایر ترکیبات دارد، به عنوان یک گزینه خوب برای دارورسانی می توان مطرح کرد. استفاده از نشاسته در علم - صنعت داروسازی و دارورسانی می تواند یک انقلاب شگرفی با توجه به مزایای گفته شده در این زمینه ایجاد کند. اما در کنار مزایا و ویژگی هایی که برای نشاسته به عنوان یک دارورسان اشاره شد، باید گفت که نشاسته دارای محدودیاتی نیز می باشد که می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- جاذب آب و متورم شدگی و به عبارتی حساس به رطوبت
- حل شدگی در حلال
- ویسکوزیته بالا [۹].

محققان با ایجاد تغییرات ساختاری هدفمند، سعی در بهبود کیفیت استفاده از نشاسته در اموری همچون دارورسانی را دارند تا نشاسته، مقاوم تر و کاربردی شود که به این کار اصلاح نشاسته گفته می شود که از این میان می توان به استفاده از ترکیباتی همچون، استات، گرافن کوانتوم دات، آلژینات، پلی اتیلن گلیکول و ... در ایجاد تغییرات اشاره کرد. به عنوان مثال با استاته کردن نشاسته، مشکل تورم آن نیز تا حدودی حل می شود [۱۰].

بنابرین توجه به نشاسته به عنوان یک ترکیب آلی، زیست نخریب پذیر و غیر سمی، می تواند گزینه جالبی در زمینه دارو درمانی امراض مختلف از جمله مشکلات گوارشی باشد که در این پژوهش با شناخت این مهم، به استفاده از این ترکیب رسیده شده است.

۳. سنتز نانوذره نشاسته حاوی داروی دوکسوروبیسین

اساس روش کار در این تحقیق، طبق روش سنتز رسوبی نانوذرات انجام شده توسط جینا اس ال-فکی و همکاران بود که با انجام تغییراتی هدفمند در روش مذکور، سنتز نانوذرات نشاسته انجام گرفته شد. این روش نیز اولاً به دلیل ایجاد یک قطر مناسب جهت دارورسانی و ثانیاً به دلیل میزان بارگیری مطلوب دارو در این نوع روش سنتزی نانوذرات نشاسته، در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت [۱۱].

جهت تهیه بستر نشاسته ای، ابتدا میزان ۰/۵ گرم از نشاسته به مدت یک شبانه روز در ۱۷ میلی لیتر از آب حاوی ۳۷۵ میلی گرم از قرص NaOH حل شد. بعد از یک روز، ۱ میلی لیتر داروی دوکسوروبیسین با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر را از محلول داروی خالص برداشته و به بستر نشاسته ای که روی استایرر قرار داشت ریخته شد.

محلول بستر حاوی دارو به مدت ۵ دقیقه تحت التراسونیک پروب دار با قدرت ۴ الی ۴/۵ قرار گرفت. در همین زمان ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۲۵ گرم از سدیم تری پلی فسفات (TPP) به صورت قطره قطره به محلول فوق افزوده شد. بعد از انجام مراحل فوق، به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه، محلول آماده شده بر روی استایرر قرار گرفت. بعد از گذشت زمان بیان شده، به اندازه حجم محلول، اتانول مطلق بر روی محلول سنتز شده افزوده می شود. در این مرحله اتانول باعث ایجاد حالت رسوب مانند می شود. ترکیب سنتز شده دوکسوروبیسین در تصویر ۱ قابل مشاهده است:

در ادامه محلول مورد نظر تحت عمل سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. آنالیز این محلول رویی ، مشخص کننده میزان داروی به دام افتاده در ساختار نانوذرات است. بعد از جداسازی محلول رویی، رسوب با محلول اتانول و آب به نسبت ۴ به ۱ و هم حجم خود محلول سنتزی مورد شست و شو قرار گرفت و مجدداً با همان دور و به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ قرار گرفت. سپس، محلول رویی و رسوب جهت بررسی رهایش دارو، نگه داری شد.

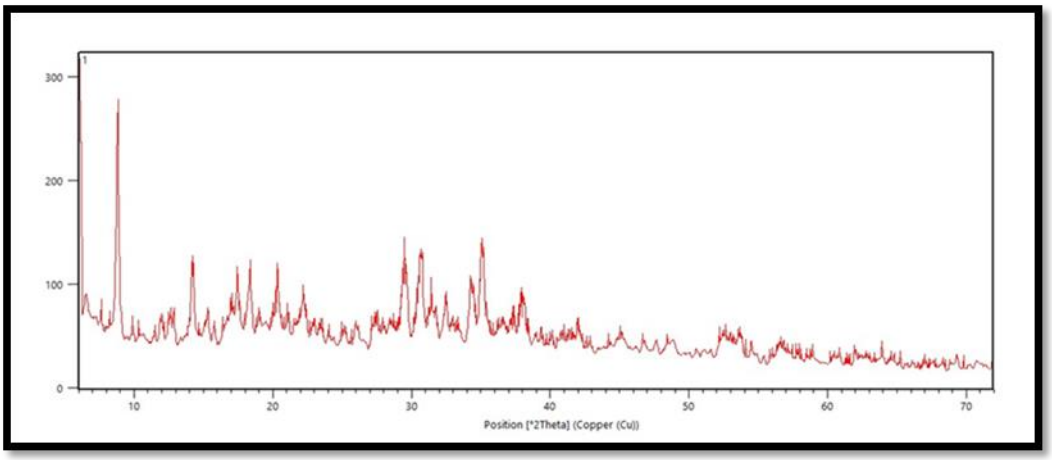
۴. بررسی رهایش دارو از نانوذرات در pH های مختلف

ابتدا ۴ نوع بافر فسفات با pH های ۷،۵،۳ و ۹ تهیه گردید. سپس ۵ میلی لیتر از هر کدام از بافرها را آماده نموده و ۱۰ میلی گرم رسوب خشک شده از نانوذرات را توزین کرده و به محلول های بافری اضافه می شوند. در ادامه هر چهار نمونه در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شد. هر ساعت به اندازه ۲ میلی لیتر از محلول های درون ارلن را برداشته و به همان میزان بافر از همان نوع بافر ارلن برداشته شده، اضافه می شود.

عمل نمونه برداری از ارلن ها، تا شش ساعت، و در هر ساعت ۲ میلی لیترنمونه برداری از هر ارلن ادامه پیدا می کند و نمونه های جمع آوری شده و بعد از اتمام زمان نمونه گیری، تمام نمونه ها را با دور ۹۰۰۰، سانتریفیوژ کرده و مایع را جمع آوری کرده و به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر، در طول موج ۴۸۰ نانومتر بررسی می شود.

۵. نتایج آنالیز XRD نانوذرات سنتز شده

پراش پرتو ایکس (XRD) یک روش و دستگاه آزمایشگاهی است که برای تعیین ساختار اتمی و مولکولی مواد در اثر تابش پرتو ایکس در زوایای مختلف به کار می رود. در نمودار ۱ زیر نمودار های مربوط به آنالیز های XRD نانوذرات سنتز شده را می توان مشاهده نمود:

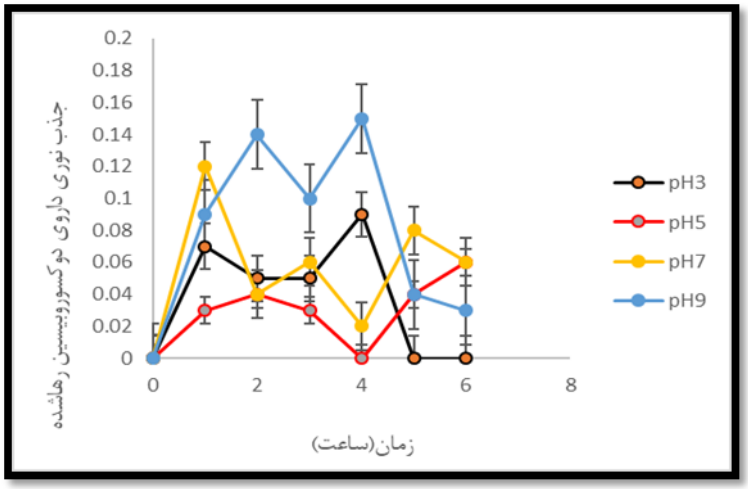


نمودار ۱- آنالیز **XRD** نانوذرات نشاسته حاوی دوکسوروبیسین

وجود قله های کوچک به شکل گسترده در نمودار، نشانگر وجود بخش های کریستالی کوچک در نانوذرات است.

۶. نتایج رهایش دارو از نانوذرات سنتز شده در pH های مختلف

در این قسمت رهایش دارو از نانوذرات سنتز شده در pH های مختلف مورد بررسی قرار گرفته شد. با استفاده از بافر فسفات، pH های مختلف ایجاد و رهایش دارو از نانوذرات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج رهایش دارو از نانوذرات نشاسته در pH های مختلف در نمودار ۲ آورده شده است:



نمودار ۲- رهایش دوکسوروبیسین از نانوذرات نشاسته در **pH** های مختلف

در شکل اول در بررسی وضعیت رهایش در pH های مختلف طبق نمودار ها، می توان به مقاومت نسبی نانوذرات در شرایط اسیدی نسبت به شرایط بازی، در مورد رهایش دارو پی برد. میزان میانگین رهایش دارو از نانوذرات در pH بازی نسبت به شرایط اسیدی بالاتر است.

۷. بحث ونتیجه گیری

در این تحقیق، نشاسته به عنوان بستر سیستم دارورسان برای اختلالات گوارشی انتخاب شد. نشاسته مورد استفاده در این تحقیق از نوع ذرت بود، که به وسیله سدیم هیدروکسید هیدرولیز شد. محیط قلیایی قوی، باعث جدا شدن پروتون های گروه OH از نشاسته و باقی ماندن بار های منفی روی نشاسته می شود. در ادامه این بارهای منفی با یکدیگر به حالت دافعه در می آیند که این امر موجب تورم دانه های نشاسته شده که این مسأله باعث ایجاد تنش در ساختار کریستالی نشاسته شده و در نهایت ساختار مارپیچ نشاسته و حالت کریستالی از بین می رود [۱۲].

نتایج رهایش دارو در pH های مختلف نشان داد که نانوذرات نشاسته سنتز شده حاوی دارو، رهایش بالایی را در شرایط بازی دارند. بنابرین چنین نانوذرات سنتز شده ای می تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای دارورسانی اختلالات گوارشی روده که دارای pH بازی است باشد. یعنی به دلیل رهایش کم تر در شرایط اسیدی، می تواند از مسیر هایی همچون معده که pH اسیدی دارند عبور کرده و داروی خود را در روده آزاد کند.

نتایج حاصل از مطالعات XRD نشان داد که ساختار نانوذرات متشکل از ساختارهای کریستالی و آمورف در کنار هم است. بر اساس مطالعات انجام شده توسط محققان، ساختارهای آمورف، انرژی آزاد بیش تری نسبت به نمونه های کریستالی خود دارند، لذا این نوع ترکیبات، تمایل بیشتری به تغییرات فیزیکی و شیمیایی

دارند و بنابرین از ساختارهای آمورف در مواد دارویی می توان استفاده نمود. ساختارهای آمورف، اغلب حلالیت و سرعت انحلال سریع تری نسبت به ترکیبات کریستالی مربوطه را از خود نشان می دهند در نتیجه می توانند باعث افزایش فراهمی زیستی دارو گردند [۱۳].

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که نشاسته، می تواند به عنوان یک ناقل دارویی در شرایط بازی عمل کند. این نانوذرات همچنین به دلیل دارا بودن بخش های آمورف در ساختار خود، دارای حلالیت خوبی در محیط مایع هستند و با توجه به اینکه محل اثر نانوذرات در بدن و در شرایط مایع همچون سلول ها و اطراف سلول ها می باشد و بنابرین امتیازی دیگر برای آن ها محسوب می شود.

منابع

1. Mudshinge, S.R., et al., *Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery.* Saudi Pharmaceutical Journal, 2011. 19(3): p. 129-141.
2. Montminy, E.M., et al., Screening for Colorectal Cancer. Med Clin North Am, 2020. 104(6): p. 1023-1036.
3. Su, B., et al., *Systemic TNFα Gene Therapy Synergizes With Liposomal Doxorubicine in the Treatment of Metastatic Cancer.* Molecular Therapy, 2013. **21**(2): p. 300-308.
4. Bae, Y.H. and K. Park, *Advanced drug delivery 2020 and beyond: Perspectives on the future.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2020. **158**: p. 4-16.
5. Ahadian, S., et al., Micro and nanoscale technologies in oral drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 2020. 157: p. 37-62.
6. Xu, Y., et al., *A novel controllable molecularly imprinted drug delivery system based on the photothermal effect of graphene oxide quantum dots.* Journal of Materials Science, 2019. **54**(12): p. 9124-9139.
7. Qin, Y., et al., *Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Influence of amylose content and starch type.* Industrial Crops and Products, 2016. **87**: p. 182-190
8. Margareta Leeman, A., et al., *Resistant starch formation in temperature treated potato starches varying in amylose/amylopectin ratio.* Carbohydrate Polymers, 2006. **65**(3): p. 306-313.
9. Le Corre, D. and H. Angellier-Coussy, Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. Reactive and Functional Polymers, 2014. 85: p. 97-120.

10. Tuovinen, L., et al., *Starch acetate microparticles for drug delivery into retinal pigment epithelium—in vitro study.* Journal of Controlled Release, 2004. **98**(3): p. 407-413.

11. Tiwari, G., et al., *Drug delivery systems: An updated review.* International journal of pharmaceutical investigation, 2012. **2**(1): p. 2-11.

12. Uthumporn, U., et al., *Effects of NaOH treatment of cereal starch granules on the extent of granular starch hydrolysis.* Colloid and Polymer Science, 2012. **290**(15): p. 1481-1491

13. Nunes, C., A. Mahendrasingam, and R. Suryanarayanan, *Quantification of Crystallinity in Substantially Amorphous Materials by Synchrotron X-ray Powder Diffractometry.* Pharmaceutical Research, 2005. **22**(11): p. 1942-1953

تحول و تکامل در بیوتکنولوژی علم فناوری

پریا کشاورز[۱]، پوریا کشاورز[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم گیاهی گرایش فیزیولوژی گیاهی. پیام نور بین الملل اربیل عراق

Priyak123@gmail.com

۲- کارشناسی ارشد مهندسی شیمی. شهر بوشهر. فارغ التحصیل از موسسه آموزش عالی خرد بوشهر.

Pooryak1@gmail.com

چکیده

امروزه بیوتکنولوژی بسیاری از رشته‌های مختلف را پوشش می‌دهد (به عنوان مثال ژنتیک، بیوشیمی، زیست شناسی مولکولی و غیره). فناوریها و محصولات جدید هر ساله در حوزه‌های مختلف توسعه می‌یابند. مانند: پزشکی (توسعه داروهای جدید و درمان)، کشاورزی (توسعه گیاهان اصلاح شده ژنتیکی، سوخت‌های زیستی، درمان بیولوژیکی) یا بیوتکنولوژی صنعتی (تولید مواد شیمیایی، کاغذ، منسوجات و مواد غذایی). هدف این تحقیق بررسی «تحول و تکامل در بیوتکنولوژی علم فناوری » می‌باشد. این پژوهش از نظر هدف کاربردی، از نظر ماهیت توصیفی و از نظر نحوه گردآوری داده‌ها به صورت تحلیلی و کیفی می‌باشد. ابزار تحقیق فیش‌برداری و یادداشت‌برداری است و روش تحقیق به صورت کتابخانه ای اسنادی انجام شد. یافته‌های تحقیق حاکی از آن است که حوزه کاربردهای بیوتکنولوژی بسیار وسیع است و نتایج تحقیقات پیشین و این پژوهش نشان داد که داروسازی و واکسن، صنایع غذایی و سایر موارد می‌تواند از علم بیوتکنولوژی بهره‌های زیادی ببرد.

واژگان کلیدی: بیوتکنولوژی، داروسازی، کاربردهای بیوتکنولوژی

Transformation and evolution in biotechnology science technology

Abstract

Today, biotechnology covers many different disciplines (for example, genetics, biochemistry, molecular biology, etc.). New technologies and products are developed every year in different fields. Such as: medicine (development of new drugs and treatments), agriculture (development of genetically modified plants, biofuels, biological treatment) or industrial biotechnology (production of chemicals, paper, textiles and food). The purpose of this research is to investigate "development and evolution in biotechnology, science and technology". This research is applied in terms of purpose, descriptive in nature and analytical and qualitative in terms of data collection. The research tool is taking notes and taking notes, and the research method was done in the form of a document library. The findings of the research indicate that the field of biotechnology applications is very wide and the results of previous research and this research showed that pharmaceuticals and vaccines, food industry and other cases can benefit greatly from biotechnology.

Keywords: biotechnology, pharmaceuticals, biotechnology applications

۱. مقدمه

بیوتکنولوژی تکنولوژی است که از سیستم‌های بیولوژیکی، موجودات زنده یا بخش‌هایی از آن برای تولید یا ایجاد محصولات مختلف استفاده می‌کند. نان‌های نوشیدنی نمون‌های از فرآیندهای موجود در مفهوم بیوتکنولوژی است (استفاده از مخمر= موجود زنده). برای تولید محصول مورد نظر. چنین فرآیندهای سنتی معمولا از موجودات زنده در فرم طبیعی خود استفاده می‌کنند (یا بیشتر به وسیله پرورش آنها توسعه می‌یابند)، در حالی که شکل مدرن بیوتکنولوژی به طور کلی شامل تغییرات پیشرفته‌تر در سیستم بیولوژیکی یا ارگانیسم می‌شود. با توسعه مهندسی ژنتیک در دهه ۱۹۷۰، تحقیقات در زمینه بیوتکنولوژی) و سایر زمینه‌های مرتبط مانند پزشکی، زیست شناسی و غیره) به سرعت به دلیل امکان تغییر در مواد ژنتیکی موجودات زنده[۱۲] به سرعت توسعه یافت. بیوتکنولوژی ریشه در تاریخ دارد و تکوین آن از سال‌های بسیار دور آغاز شده تابحال ادامه یافته است. درتقسیم‌بندی زمانی می‌توان سه دوره برای تکامل بیوتکنولوژی قائل شد.

۱- دوره اولیه قرن حاضر که با استفاده آگاهانه از تکنیک‌های تخمیر و کشت میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های مناسب و متعاقباً استفاده از فرمانتورها در تولیدآنتی بیوتیکها، آنزیمها، اجراء مواد غذائی، مواد شیمیائی آلی و سایر ترکیبات،بشر به گسترش این علم مبادرت ورزید. در آن دوره این بخش از علم نام میکروبیولوژی صنعتی بخود گرفت و هم اکنون نیز روند استفاده از این فرآیندهادر زندگی انسان ادامه دارد. لیکن پیش بینی می‌شود به تدریج با استفاده ازتکنیک‌های بیوتکنولوژی نوین بسیاری از فرآیندهای فوق نیز تحت تأثیر قرارگرفته و به سمت بهبودی و کارآمدی بیشتر تغییر پیدا کنند.

۲- دوره نوین بیوتکنولوژی که با کمک علم ژنتیک درحال ایجاد تحول در زندگیبشر است. بیوتکنولوژی نوین مدتی است که روبه توسعه گذاشته و روز بروزدامنه وسعت بیشتری به خود میگیرد.

این دوره زمانی از سال ۱۹۷۶ با انتقال ژنهائی از یک میکروارگانیسم به میکروارگانیسم دیگر آغاز شد. تا قبل از آن دانشمندان در فرآیندهای بیوتکنولوژی از خصوصیات طبیعی و ذاتی میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌گردند لیکن در اثر پیشرفت در زیست شناسی مولکولی وژنتیک و شناخت عمیق تراجزاء و مکانیسم‌های سلولی ومولکولی متخصصین علوم زیستی توانستند تا به اصلاح و تغییر خصوصیات (میکرو) ارگانیسم‌ها بپردازند و (میکرو) ارگانیسم‌هائی باخصوصیات کاملاً جدید بوجود آوردند تا با استفاده ازآن‌ها بتوان ترکیبات جدید را با مقادیر بسیار بیشتر و کارائی بالاتر تولید نمود.

---

[12]. DNA

تاریخچه‌ی توسعه بیوتکنولوژی

درک صحیح و استنباط واقعی از سیر تحولات بیوتکنولوژی را می‌توان با نگاهی گذرا بر نقاط عطف تاریخچه‌ی توسعه آن دریافت. سرآغاز بیوتکنولوژی سنتی به ۶ هزار سال قبل از میلاد مسیح برمی‌گردد؛ زمانیکه سومریان و مصریان بدون اینکه از میکروارگانیسم‌ها اطلاعاتی داشته باشند با فرآیند تخمیر، نان و شراب تهیه می‌کردند. در ۴ هزار سال قبل از میلاد، چینی‌ها به تولید شراب، ماست و پنیر مشغول بودند. ۱۷۵۰ سال قبل از میلاد، سومریان صنعت تولید الکل را بنا کردند. چینی‌ها از سویای کپک زده بعنوان آنتی بیوتیک جهت درمان جوش‌ها و دمل‌ها بهره میبردند. و در سال ۱۷۹۷ برای اولین بار واکسن آبله به انسان تزریق شد. اولین آنزیم در سال ۱۸۳۲ جداسازی شد. در سال ۱۹۱۴ از باکتری‌ها برای تصفیه پس اب در شهر منچستر انگلستان استفاده شد. اصطلاح بیوتکنولوژی برای اولین بار در سال ۱۹۱۹ توسط یک مهندس کشاورزی مجاری بکار برده شد. در سال ۱۹۲۰ هورمون رشد توسط دو محقق بنام Long و Evansکشف شد. پنی سیلین در سال ۱۹۲۸ بعنوان اولین آنتی بیوتیک کشف و در سال ۱۹۴۷ به تولید انبوه رسید و این بعنوان شروع تاریخ بیوتکنولوژی صنعتی قلمداد شده است. در سال ۱۹۵۰ اینترفرون‌ها کشف شدند.در سال ۱۹۵۳ ساختار فضایی DNA توسط دو دانشمند مشهور واتسون و کریک معرفی شد.در سال ۱۹۶۹ اولین آنزیم در آزمایشگاه، سنتز شد. سال ۱۹۷۰ سنتز کامل ژن برای اولین بار صورت گرفت. در سال ۱۹۷۳ روش مهندسی ژنتیک با معرفی آنزیم‌های برشدهنده و جوش‌دهنده، بطور موفقیتآمیز توسط دو دانشمند استفنکوهن و هربرت بویر انجام شد. در سال ۱۹۷۵ اولین آنتی بادی منوکلونال برای اولین بار تولید شد.انسولین انسانی بعنوان اولین محصول مهندسی ژنتیک برای معالجه بیماران دیابتی در سال ۱۹۸۲ مورد تایید قرار گرفت. سال ۱۹۹۰ اولین گاو شیرده تراریخته معرفی شد. اولین محصول غذایی مهندسی ژنتیک بنام گوجه FLAVRSAR در سال ۱۹۹۴ وارد بازار شد. در سال ۱۹۹۷ محققین اسکاتلندی اولین گوسفند کلون شده بنام دالی را معرفی کردند. سال ۲۰۰۰ نقشه ژنوم انسان اعلام شد و این امر موجب آغاز تحقیقات و دستآوردهای عظیم و شگرف در زمینه ژندرمانی و علاج بیمارهای صعب العلاج خواهد شد. .با نگرشی بر رشد بازار فرآورده‌های فناوری زیستی جهان در سال ۲۰۰۰، به گسترهی عملکرد انقلاب سبز بیوتکنولوژی و برتری آن نسبت به اغلب علوم و فنون پی می‌برید.

با رشد بی رویه جمعیت و افزایش آن به بیش از ۸ میلیارد نفر در سال ۲۰۳۰ و افزایش تقاضا، بیوتکنولوژی پاسخگوی شایست‌های جهت تامین امنیت ملی در ابعاد غذایی، دارویی، بهداشتی، محیط زیست، دفاعی و قضایی است. در حال حاضر از طریق بیوتکنولوژی صنعتی و با استفاده از راکتورهای زیستی و میکروارگانیسم‌های مناسب، فرآوردهای مهم و استراتژیک تولید می‌شود که پاسخگوی نیاز بشر در عرصه غذا، بهداشت و محیط زیست می‌باشد.

همزمان با ظهور بیوتکنولوژی نوین در دهه ۷۰ در قرن بیستم، ابزارهای مورد استفاده سنتی جای خود را به فنون بیوتکنولوژی نوین سپردند به موازات دگرگونی در بیوتکنولوژی، مهندسی زیست فرآیند نیز دستخوش

تحولات شگرف شد. دورنمای مهندسی زیست فرآیند و بیوتکنولوژی صنعتی تا قبل از ۱۹۸۰ معطوف به دیدگاه‌های مهندسی و بزرگنمایی فرآیندها بود، لیکن در جهت گیری‌های اخیر، بیوتکنولوژی صنعتی از طراحی تجهیزات، بزرگنمایی و مدلسازی ماکروسکوپیک فاصله زیادی گرفته است. بنابراین دوران ۱۹۸۰ به بعد برای بیوتکنولوژی صنعتی عصر شکوفایی دیدگاه‌های زیست مولکولی، فرآیندهای سلولی، مهندسی آنزیم و تولید فرآورده‌های جدید از میکروارگانیسم‌های تراریخته، پروتئین داروهای نوترکیب، آنتی بادی‌های منوکلونال، اینترفرون‌های لکوسیتی، واکسن‌های ژنی، زیست کاتالیزورهای صنعتی، نسل جدید آنتی بیوتیک‌ها و ... می‌باشد. میزان فروش، یکی از شاخص‌های اقتصادی صنعت بیوتکنولوژی است. با نگاهی به میزان فروش فرآورده‌های بیوتکنولوژی درسال ۱۹۹۷ که نسبت به سال ۱۹۹۶، بیست درصد رشد داشته و به میزان ۱۳ میلیارد دلار میرسد، اهمیت سرمایه‌گذاری در این بخش و محوریت این فناوری بعنوان فناوری کلیدی و محوری توسعه پایدار آشکار می‌شود. آنزیم‌های صنعتی بعنوان یکی از فرآورده‌های مهم بیوتکنولوژی دارای بازار جهانی به میزان ۱,۶ میلیارد دلار بوده و برآورد می‌شود این رقم به ۳ میلیارد دلار با نرخ رشد سالانه ۶,۵ درصد افزایش یابد. بازار فروش آنزیم باعث موج بی سابقه ای از ادغام غول‌های سرمایه گذاری و همکاری فزآینده شرکت‌های تازه تاسیس برای دستیابی به فناوری‌های جدید شده است بیوتکنولوژی نوین تنها به تولید فرآورده‌های سنتی بسنده نکرده بلکه با ارائه روش‌های جدید، امکان تولید فرآورده‌های جدید را برای شرکت‌ها و بخش‌های مشتاق و ایجاد فرصت‌های شغلی سبب می‌شود. بعنوان مثال تعداد فرصت‌های شغلی ناشی از توسعه یوتکنولوژی در ژاپن در سال ۱۹۹۷ در حدود ۳۰۰۰۰ بود، در حالی‌که پیش بینی می شود در سال ۲۰۱۰ به ۱۵۰۰۰۰ افزایش یابد.

تکامل بیوتکنولوژی

-دوره نوین بیوتکنولوژی که با کمک علم ژنتیک درحال ایجاد تحول در زندگی بشر است .بیوتکنولوژی نوین مدتی است که رو به توسعه گذاشته و روز به وز دامنه وسعت بیشتری به خود می‌گیرد. آغاز روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک با انتقال ژنهایی از یک میکروارگانیسم به میکروارگانیسم دیگر از سال ۱۹۷۶ بوده است. تا قبل از آن دانشمندان در فرآیندهای بیوتکنولوژی از خصوصیات طبیعی و ذاتی ارگانیسم یا میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌کردند.

کاربردهای بیوتکنولوژی

واکسن سازی

واکسن یک ماده بیولوژیکی است که سیستم ایمنی بدن میزبان را با وارد کردن یک ارگانیسم پاتوژن به بدن سالم تحریک می‌کند.از واکسیناسیون، به کمک تجویز یک ماده آنتی ژنیک (واکسن)، به عنوان موثرترین روش برای پیشگیری و کنترل بیماری یاد می‌شود. یک واکسن معمولاً حاوی عاملی است که شبیه یک

پاتوژن بیماریزا ایجادکننده بیماری است و اغلب از ارگانیسم‌های غیرفعال شده، ارگانیسم‌های ضعیف شده زنده، سموم آنها یا بخشی از آنتی ژن‌های سطحی آنها (زیر واحد) ساخته می‌شود. هنگامی‌که یک موجود زنده (میزبان) واکسینه شد، ایمن می‌شود، زیرا حاوی جمعیت‌هایی از سلول‌های حامل مولکول‌ها بر روی سطوح خود است که مولکول‌های آنتی ژن خاصی را که توسط یک عامل عفونی یا بخشی از آن تولید می‌شود، تشخیص می‌دهند. با این حال، ابزارهای بیوتکنولوژیک و ژنومیک مدرن، عصر جدیدی را برای توسعه واکسن‌های جدید باز کرده‌اند و بسیاری از محصولات با موفقیت در سراسر جهان بازاریابی می‌شوند. پیشرفت‌های پیش‌بینی‌شده در زیست‌شناسی سلولی، ایمونولوژی، ژنتیک مولکولی، ژنومیک و ایمنی سلولی، تولید واکسن‌های ارزان، ایمن و مؤثر را تا حد زیادی تسریع کرده و بیوتکنولوژی انقلابی در حوزه زیست پزشکی ایجاد کرده است. واکسن‌های جدید که از نوآوری‌های بیوتکنولوژیکی استفاده می‌کنند به ما کمک می‌کنند تا راه پیشگیری از بیماری را تغییر دهیم. پرواضح است که کاربرد بالینی واکسن‌ها همراه با توسعه بیوتکنولوژی متنوع خواهد شد. واکسن‌های دی اکسی ریبونوکلئیک اسید اساساً DNA مهندسی شده ژنتیکی هستند که وقتی تزریق می‌شوند آنتی ژن تولید می‌کنند و پاسخ ایمنی قوی را القا می‌کنند. واکسن‌های[۱۳]، واکسن شناسی معکوس و پلت فرم‌های ژنتیک معکوس در توسعه انواع واکسن‌ها کاربرد و نتایج امیدوارکننده‌ای را نشان می‌دهند. بیوتکنولوژی بستر واکسیناسیون مدرن و بیشترین امکان را برای تلاش در تحقیقات برای یافتن درمان بیماری‌ها برای بهبود نوع بشر فراهم کرده است. در جامعه مدرن، شیوع بسیاری از بیماری‌های عفونی از طریق واکسیناسیون کاهش یافته است. متدهای جدید بیوتکنولوژی ممکن است نه تنها به درک متقابل از واکسنهایی که در القای محافظت در برابر بیماری‌های عفونی حیاتی هستند، بلکه به تولید واکسن‌های درمانی که برای همه بیماری‌ها از جمله بیماری‌های عفونی و غیرعفونی مؤثر هستند، منجر شود.(اپرینتس[۱۴]، ۱۴۰۲).

[13]. mRNA
[14]. eprints.arums.ac.ir

صنایع غذایی

کاربردهای بیوتکنولوژی در صنایع غذایی

شکل ۱-بیوتکنولوژی در صنایع غذایی

مطالعات صورت گرفته نشان داده است که جمعیت جهان تا اواسط قرن حاضر، دو برابر خواهد شد و این در حالی است که اکنون نیمی‌از کودکان جهان از غذای کافی محروم هستند. همچنین فشار از طرف مصرف‌کنندگان، خصوصاً در کشورهای صنعتی، باعث شده است که تولید محصولات غذایی بطرف استفاده از مواد افزودنی طبیعی و بکارگیری روش‌های فرآوری نزدیکتر به روش‌های طبیعی، جهت پیدا کند. نکات، به همراه سایر مزایایی که وجود داشته‌اند، روش‌های بیوتکنولوژی در صنایع غذایی را گسترش داده‌اند.

تعریف بیوتکنولوژی غذایی در ارتباط با صنایع غذایی می‌توان بیوتکنولوژی را به‌صورت زیر تعریف کرد :

استفاده از سلول‌های زنده یا قسمتی از آنها، به منظور تولید یا اصلاح محصولات غذایی یا مواد افزودنی به غذا از یک دیدگاه دیگر می‌توان کاربرد بیوتکنولوژی در صنایع غذایی را به دو بخش کاربرد بیوتکنولوژی سنتی و کاربرد بیوتکنولوژی مدرن تقسیم کرد :

۱-درکاربرد بیوتکنولوژی سنتی در صنایع غذایی، از فناوری تخمیری (ریزساوارزه‌ها یا میکروارگانیزم‌ها) جهت تغییر مواد خام غذایی به محصولات غذایی تخمیری شامل پنیر، ماست، خمیر نان و غیره استفاده می‌گردد. استفاده از ریزسازواره‌ها و آنزیم‌ها در این فرآیندها باعث ایجاد تغییرات در طعم، عطر و بافت مواد خام غذایی یا افزایش قابلیت نگهداری آنها می‌گردد .

۲- در بکارگیری بیوتکنولوژی نوین در صنایع غذایی، از ژنتیک مولکولی و آنزیم‌شناسی کاربردی بهمراه فناوری تخمیری، جهت بهبود خواص مواد افزودنی غذایی استفاده می‌گردد. در قسمت‌های بعدی این نوشتار، برخی از کاربردهای بیوتکنولوژی در صنایع غذایی به طور اجمال و در چند زمینه بیان می‌شوند .

تولید محصولات نهایی غذایی با استفاده از بیوتکنولوژی

بیوتکنولوژی می‌تواند جهت تغییر مواد خام غذایی مانند شیر، گوشت، سبزیجات و غلات به محصولات با طعم و عطر مطلوب و قابلیت نگهداری بیشتر استفاده شود. تولید این نوع محصولات در جهان، سابقه‌ی بسیار طولانی دارد و هم‌اکنون این محصولات در مقیاس صنعتی در سطح دنیا تولید می‌گردند. بر اساس گزارشات موجود، حدود یک سوم رژیم غذایی در اروپا از غذاهایی تشکیل می‌شود که تخمیر شده‌اند؛ در حالی که این رقم در سایر نقاط دنیا بین ۲۰ تا ۳۰ درصد می‌باشد. از مثال‌های این محصولات می‌توان به محصولات لبنی تخمیری مانند ماست و پنیر، سوسیس تخمیرشده‌ی خشک و نیمه‌خشک، سبزیجات تخمیرشده مانند کلم[15] و زیتون تخمیرشده، نان، قارچ خوراکی، مشروبات الکلی و انواع غذاهای تخمیری آسیای شرقی مانند سس سویا، میسو، سوفو و تمپه اشاره نمود .برخی از این محصولات از قبیل فرآورده‌های لبنی تخمیری، نان و قارچ خوراکی، در ایران نیز در مقیاس صنعتی تولید می‌گردند. همچنین اخیراً در رابطه با تولید محصولات دیگر مثل زیتون تخمیر شده و سس سویا، پروژه‌های تحقیقاتی در ایران انجام گرفته است .

توده‌ی میکروبی و پروتئین تک‌یاخته به‌عنوان غذا

توده میکروبی نیز بعنوان یک ماده غذایی غنی از پروتئین، مورد استفاده قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، آلمانی‌ها طی جنگ جهانی دوم، برای جبران کمبود پروتئین، مخمرها را در مقیاس صنعتی کشت داده و بعنوان منبع غذایی در خوراک انسان مورد استفاده قرار دادند. همچنین از دهه‌ی شصت میلادی تولید محصولاتی به نام پروتئین تک‌یاخته[16]، ابتدا از مواد هیدروکربنی و بعدها از مواد کربوهیدراتی ارزان‌قیمت در مقیاس صنعتی آغاز شد. این محصولات، بعنوان افزودنی پروتئینی در خوراک دام و مثالی از تولید پروتئین تک یاخته[17]:

به‌عنوان مثال، شرکت ICI در انگلستان از کشت باکتری[18] بر روی متانول در یک فرمانتور پیوسته به حجم ۱۵۰۰ متر مکعب، برای تولید سالانه ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار تن پودر خشک شده SCP در سال استفاده کرد. حجم زیاد فرمانتور و نیاز به راه‌اندازی آن بصورت پیوسته تحت شرایط استریل[19] باعث شد که نیاز به ابداع تکنیک‌های جدید مهندسی برای تولید این محصول در مقیاس صنعتی بوجود آید .

---

15. sauerkraut
16. SCP
17. scp
18. Methylophilus methylotrophous
19. aseptic

با وجودی‌که تولید این محصول از نظر فنی با موفقیت روبرو شد، ولی بخاطر برخی مشکلات از جمله هزینه‌های تولید بالا و کاهش قیمت‌های محصولات رقیب (یعنی کنجاله‌ی سویا)، این پروژه و پروژه‌های مشابه در کشورهای غربی از نظر اقتصادی موفقیت‌آمیز نبودند. به‌عنوان مثال، شرکتICI ، تولید محصول SCPخود را در اواسط دهه ۸۰ میلادی متوقف کرد. قابل ذکر است که تولید این محصول در کشورهای بلوک شرق نظیر اتحاد جماهیر شوروی با موفقیت اقتصادی خیلی زیادی روبرو شد؛ زیرا تولید این محصول باعث عدم وابستگی به کنجاله‌ی سویای وارداتی از کشورهای غربی می‌شد .

مثال دیگری از تولید پروتئین تک‌یاخته: پروژه‌ی شرکت نفتی فیلیپس از جمله پروژه‌هایی است که در آن تولید SCP از موفقیت اقتصادی بالاتری برخوردار می‌باشد. در این پروژه از یک سیستم با دانسیته سلولی بالا و بر اساس کشت مخمر Torulaبر روی اتانول، ساکاروز و ملاس (به‌عنوان منبع کربن) و آمونیاک (به‌عنوان منبع ازت) برای تولید SCP استفاده گردیده است .در این فرآیند، مایع تخمیری خروجی از فرمانتور دارای غلظت سلولی ۱۶۰ گرم وزن خشک در لیتر بود و لذا امکان خشک‌کردن مستقیم این مایع توسط خشک‌کن‌های پاششی وجود داشت. علت موفقیت اقتصادی این پروژه، بالابودن بازده فرایند و هزینه پایین‌تر بازیابی محصول بوده است .

استفاده از پروتئین میکروبی[20] در خوراک انسان:

به دلیل بالابودن درصد اسیدهای هسته‌ای درSCP ، مصرف آن به عنوان خوراک انسان مضر است. شرکت انگلیسی RHM با همکاری شرکت ICI در اواسط دهه‌ی ۸۰ میلادی، پروتئین میکروبی تحت نام تجارتی Quornتولید کرد که ساختاری شبیه به گوشت داشته و توسط رشد کپکی به نام Fusarium graminerarumبر روی مواد نشاسته‌ای تولید می‌گردد. این محصول بخاطر استفاده از کپک (که بطور طبیعی حاوی اسید هسته‌ای کمتری نسبت به باکتری‌ها می‌باشد) و بخاطر اضافه کردن یک عملیات برای کاهش RNA در فرآیند تولید صنعتی، دارای محتوی هسته‌ای خیلی پایین می‌باشد و لذا استفاده از آن در خوراک انسان در انگلستان مجاز تشخیص داده شد. تولید اولیه این محصول در سال ۱۹۸۵، حدود ۱۰۰۰ تن در سال بود و از موفقیت اقتصادی برخوردار شد زیرا به جای کنجاله‌ی سویا با سویا و گوشت رقابت می‌کرد .

تولید مواد افزودنی غذایی با استفاده از بیوتکنولوژی

مواد افزودنی غذایی مانند اسید سیتریک، اسید گلوتامیک و نوکلئوتیدهای مورد استفاده برای بهبود طعم غذا نیز به روش تخمیر تولید می‌شوند، استفاده از این روش، سابقه‌های طولانی دارد. اما رویکرد به سمت

[20]. Quorn

جایگزینی اجزای طبیعی، فرصت‌هایی را جهت استفاده گسترده‌تر از محصولات تخمیری بعنوان طعم‌دهنده فراهم کرده است .به‌عنوان مثال، حدود بیست سال پیش، یک ترکیب به نام furanone در آب گوشت شناسایی شد که این ترکیب، نقش خیلی مهمی در طعم گوشت بازی می‌کند و تا مدتی پیش به‌صورت شیمیایی از گزیلوز سنتز می‌شد. اخیراً یک ماده‌ی پیش‌ساز طبیعی شناسایی شده که می‌توان آنرا توسط تخمیر گلوکز تولید کرده و با یک تیمار حرارتی مخصوص به furanone موردنظر تبدیل کرد .شناسایی ترکیبات طعم‌دهنده‌ی اصلی، امکان توسعه‌ی روش‌های میکروبی جهت سنتز این ترکیبات را فراهم کرده است. به‌عنوان مثال می‌توان به تولید گاما-دکالاکتون که یک جزء اصلی در طعم هلو می‌باشد، اشاره کرد . مثالی دیگر از تولید مواد طعم‌دهنده با استفاده از ریزسازواره‌ها، یک طعم‌دهنده‌ی طبیعی کم‌نمک به نام BIOSOLاست که طی دو مرحله با استفاده از مخمر غیرفعال شده تولید می‌گردد. در مرحله‌ی اول، مخلوطی از آنزیم‌ها با خواص تجزیه‌کنندگی پروتئین، چربی و دیواره سلولی استفاده می‌شود. در مرحله دوم، از باکتری جهت انجام عملیات تخمیر استفاده می‌گردد.

پروتئین طی این دو مرحله به اسیدهای آمینه و پپتیدها، RNAبه یک طعم‌دهنده‌ی طبیعی[۲۱] و پلی‌ساکاریدها به اسید لاکتیک و ساکسینیک تبدیل می‌گردند. هضم آنزیمی‌و تخمیر را می‌توان بصورت همزمان انجام داده و مایع تخمیری حاصله را پس از جداسازی مواد غیرمحلول به روش پاششی خشک کرد . از جمله مثال‌های دیگر در زمینه تولید مواد افزودنی به روش بیوتکنولوژی می‌توان به: تولید شیرین‌کننده‌های مغذی مثل شربت گلوکز، شربت با درصد بالای فروکتوز[۲۲] و شیرین‌کننده‌های رژیمی‌مثل [۲۳]از ترکیب متیل استر ال‌فنیل آلانین و ال‌اسید اسپارتیک)، تاوماتین[۲۴] و گزایلیتول (از طریق تبدیل آنزیمی‌گزایلن پلیمرهای الیاف ذرت به گزایلوز و سپس تخمیر گزایلوز) و همچنین پلی‌ساکاریدهای میکروبی مانند صمغ گزانتان (به‌عنوان قوام‌دهنده و عامل ایجاد ژل) اشاره کرد .برخی از ریزسازواره‌ها قادر به تجمع مقادیر زیادی تری‌گلیسیرید در داخل خود می‌باشند. از این نوع ریزسازواره‌ها جهت تولید محصولی به نام روغن تک‌سلولی[۲۵] استفاده شده است. به‌عنوان مثال در ژاپن مخمرهایی با موفقیت کشت داده شده‌اند که تا ۸۰ درصد وزن خشک آنها از تری‌گلیسریدهای ذخیره‌ای تشکیل شده است. برای تولید این محصولات ابتدا از خوراک‌های هیدروکربوری استفاده می‌شد، ولی اخیراً در این ارتباط خوراک‌های کربوهیدراتی مورد توجه قرار گرفته‌اند .

---

[21]. Lactobacillus delbrueki
[22]. HFCS
[23]. aspartame
[24]. thaumatin
[25]. Single cell oil

اصلاح مستقیم مواد غذایی و مواد افزودنی به غذا

روش‌های مهندسی پروتئین

مواد خام غذایی را می‌توان یا مستقیماً و یا بعد از اصلاح میکربی یا آنزیمی‌استفاده کرد. مواد خام غذایی اصلی دارای خاصیت کارکردی[۲۶] در محصولات غذایی مثل امولسیون‌سازی، پیوند با آب، ایجاد ژل، پایداری کف در نوشابه‌ها، دسرها و محصولات گوشتی (که عبارتند از پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها) می‌باشند.رابطه‌ی دقیق بین ساختمان این مواد و خواص کارکردی که در غذا ایجاد می‌کنند، هنوز بطور کامل شناخته نشده است؛ ولی نتایج تحقیقات گسترده‌ی سال‌های اخیر می‌تواند در جهت انتخاب نوع اصلاح این مواد خام استفاده شود .به‌عنوان مثال، یک رابطه‌ی مستقیم بین ساختار پروتئین‌ها (یعنی اندازه مولکول پروتئینی و ترکیب اسیدهای آمینه آن) و خواص کارکردی آنها بدست آمده است. می‌توان با تغییر مناسب در اندازه و ترکیب اسیدهای آمینه در یک پروتئین، به خواص کارکردی مورد نیاز برای یک کاربرد بخصوص دست یافت. اندازه‌ی پروتئین‌ها را می‌توان توسط آبکافت اسیدی یا آنزیمی‌کاهش داد. اما ایجاد تغییرات در ترکیب اسیدهای آمینه یک پروتئین، مشکل‌تر است. برای ایجاد تغییرات در ترکیب اسیدهای آمینه یک پروتئین، از روش‌هایی تحت عنوان مهندسی پروتئین استفاده می‌شود که از طریق تغییر در کدهای ژنتیکی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، ترتیب اسیدهای آمینه‌ی پروتئین عوض می‌شود .از روش‌های مهندسی پروتئین، برای افزایش پایداری پروتئین‌های آنزیمی‌که در مقیاس صنعتی نقش کاتالیزور را دارند نیز استفاده شده است. به‌عنوان مثال، گلوکز ایزومراز، آنزیمی‌است که در فرآیند تولید HFCS از اهمیت فراوان برخوردار است. این آنزیم در بیوراکتورهای صنعتی توسط یک واکنش شیمیایی بین گلوکز (سوبسترات واکنش) و گروه‌های آمین ثانویه لیزین موجود در ساختار آنزیم، غیرفعال می‌گردد.محققین در شرکتGist-Brocade روشی را جهت اصلاح ژن گلوکز ایزومراز ایجاد کردند که در آن قسمتی از مولکول آنزیم (جزء لیزین) که گلوکز به آن حمله می‌کند، به گروه‌هایی (جزء آرژینین) که مورد حمله‌ی گلوکز واقع نشده ولی قادر هستند که ساختار آنزیم را حفظ کنند تبدیل می‌شود. با استفاده از این روش، زمان استفاده‌ی مفید از آنزیم گلوکز ایزومراز در شرایط صنعتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته و این موضوع باعث افزایش ظرفیت تولید و کاهش هزینه‌های عملیاتی می‌شود .

تولید مواد کمک فرآوری

ریزسازواره‌ها به‌عنوان کشت آغازگر در فرآوری مواد غذایی جهت بهبود و تولید طعم، افزایش قابلیت نگهداری مواد غذایی و تولید اسید و گازها تولید می‌گردند. به‌عنوان مثال از ریزسازواره‌ها در تولید

---

[26]. functionality

محصولات لبنی، محصولات گوشتی و تولید نان استفاده می‌گردد. مثال دیگر مواد کمک فرآوری مورد استفاده در صنایع غذایی، آنزیمها می‌باشند که بطور گستردهای از آنها در فرآوری انواع مواد غذایی استفاده می‌شود .کاربردهای تشخیصی برای تایید ایمنی و سلامت محصولات غذایی از دقت بسیار زیادی که مولکول‌های زیستی در شناسایی برخوردارند، جهت توسعه فناوری‌هایی برای شناسایی حضور ریزسازواره‌های بیماری‌زا، سموم و پروتئین‌های خارجی در مواد غذایی استفاده می‌شود. در این فناوری‌ها از مولکول‌های مخصوص حس‌گر استفاده می‌گردد. به‌عنوان مثال در DNA کروموزمی‌و RNA باکتری‌ها، ترتیب‌های بازی مشخص کوتاهی وجود دارد که از آنها می‌توان جهت شناسایی و ردیابی آنها استفاده کرد. از این حس‌گرهای ژنتیکی می‌توان جهت شناسایی سریع ریزسازواره‌ها در سطح خانواده، گونه یا زیرگونه استفاده کرد. در حال حاضر، چنین حس‌گرهایی برای لیستریا، سالمونلا، کلستریدیوم، یرسینیا، کمپیلوباکتر ساخته شده‌است .از آنتی‌بادی‌های نوترکیب چنددودمانی و تک‌دودمانی جهت توسعه‌ی روش‌های سریع و ساده برای شناسایی میکرب‌های بیماری‌زا با منشاء غذایی مثل سالمونلا، لیستریا و سم‌های قارچی (مثل آفلاتوکسین و تریتوتشین)، آفت‌کش‌ها و سم‌های طبیعی (مثل گلیکوآلکالوئید سیب‌زمینی) استفاده شده است. سم‌های تولیدی برخی قارچ‌ها در انواع مواد غذایی (بخصوص غلات و میوه‌های مغزدار که در شرایط نامناسب نگهداری می‌شوند) را می‌توان با استفاده از کیت‌هایی مبتنی بر آنزیم ELISA شناسایی کرد و ایمنی و سلامت محصولات را تضمین نمود.

به عنوان مثال، می‌توان از آزمون‌های ELISA برای شناسایی Salmonella در مواد غذایی استفاده نمود و نتیجه‌ی آزمایش در عرض یک روز مشخص می‌شود؛ در حالی که توسط روش‌های مرسوم میکروبیولوژی تا شش روز طول می‌کشد .روش‌های بیوتکنولوژی برای تایید غیرتقلبی‌بودن یک محصول غذایی نیز بکار می‌روند. به‌عنوان مثال برای شناسایی پروتئین‌های شیر، آنتی‌بادی‌هایی وجود دارد که می‌توان از آنها در ساخت کیت‌های ELISA استفاده کرد. این کیت‌ها قادر هستند، استفاده غیرمجاز از شیر گاو در تولید پنیرهایی که ادعا می‌گردد از شیر گوسفند تهیه شده است را تشخیص دهند .

در پزشکی

تکنیک‌های بیوتکنولوژی در پزشکی برای تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. این فرصت برای مردم فراهم می‌کند تا خود را از بیماری‌های خطرناک محافظت کنند.زمینه بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک تکنیک‌هایی مانند ژن درمانی، تکنولوژی DNA نوترکیب و واکنش زنجیرهای پلیمریزا را معرفی می‌کند که از ژن‌ها و مولکول‌های DNA برای تشخیص بیماریها استفاده می‌کند و ژن‌های جدید و سالم را در بدن قرار می‌دهند که سلول‌های آسیب دیده را جایگزین می‌کنند.

برنامه‌های کاربردی بیوتکنولوژی در پزشکی

بیوداروها[۲۷]: این داروها با استفاده از میکروارگانیسم‌ها بدون استفاده از مواد مصنوعی و مواد شیمیایی توسعه می‌یابد. مولکول‌های بزرگ پروتئین معمولا منبع داروهای بیولوژیکی هستند. آنها هنگامی‌که در بدن حمله به مکانیسم‌های پنهان. از بیماریها و آنها را بدون هیچ گونه عوارض جانبی نابود می‌کند. در حال حاضر دانشمندان در حال تلاش برای توسعه داروهای بیولوژیکی دارو هستند. که می‌توانند در برابر بیماری‌هایی مانند هپاتیت، سرطان و بیماری‌های قلبی درمان شوند.

ژن درمانی[۲۸]: در ظرافت و تشخیص بیماری‌هایی مانند سرطان و پارکینسون استفاده می‌شود. دستگاه این تکنیک این است. که ژن‌های مناسب زیر بدن حمله می‌کنند که یا سلول‌های مجروح را از بین می‌برد یا جایگزین می‌کنند. در برخی موارد، ژن‌های متناسب با اطلاعات ژنتیکی اصلاح می‌شوند. و این به این معنی است که ژن‌ها عملکرد را به نفع بدن آغاز می‌کنند.

ژنومیک فارماکولوژیک[۲۹]: ژنومیک فارماکولوژی یک روش ژنتیکی اصلاح شده دیگری است که برای یادگیری اطلاعات ژنتیکی شخصیت استفاده می‌شود. این بدن پاسخ بدن به داروهای مطمئن را تجزیه و تحلیل می‌کند. این ترکیبی از داروها و ژنومیک است. هدف از این زمینه گسترش مواد مخدر است. که در فرد وارد شده بر اساس اطلاعات ژنتیکی موجود در فرد است.

تست ژنتیک[۳۰]: این تکنیک از وراثت به منظور نتیجه گیری. از بیماری‌های ژنتیکی در غربالگری والدین، جنس و حامل استفاده می‌شود. تکنیک تست ژنتیک این است که از پروتئین‌های DNA استفاده کنید که دنبال‌های مشابه به توالی‌های جهش یافته دارند. این روش همچنین برای تشخیص جنایتکاران و تست والدین کودک استفاده می‌شود.

نتیجه گیری

در این تحقیق به بررسی رشد بیوتکنولوژی در علم و فناوری و صنایع پرداخته شد.

---

27. Biopharmaceuticals:
28. Gene Therapy
29. Pharmacological genomics
30. Genetic testing

نتایج تحقیق نشان داد حوزه کاربردهای بیوتکنولوژی بسیار وسیع است و نتایج تحقیقات پیشین و این پژوهش نشان داد که علوم نساجی، دامی، داروسازی و واکسن، صنایع غذایی و سایر موارد می‌تواند از علم بیوتکنولوژی بهره‌های زیادی ببرد.

منابع

- صمد یعقوبی هرگلان، بیوتکنولوژی و جامعه بشری، فصلنامه علوم انسانی و اجتماعی دانشگاه تبریز ۱۳۸۴ ،ش۱۹
- مهشید صیفوری معصومه شهبازی مقدم، رشد بیوتکنولوژی در چین، تدبیر ۱۳۸۲ شماره ۱۳۳
- عبدالکریم درویشی، بیوتکنولوژی در کشاورزی، نقش جهانی فائو، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (تکنولوژی زیستی)
- گروه مترجمان میثاق مدیران، دیدگاه تام پتزینگر پیشگام استفاده از مدل بیوتکنولوژی برای مدیریت، مطالعات میان رشته ای در علوم انسانی دوره ششم تابستان ۱۳۹۳ شماره ۳ (پیاپی ۲۳)
- آذرمیدخت خیراندیش نصرت الله ضرغام، تاریخچه و عملکرد کمیسیون بیوتکنولوژی شورای پژوهش‌های علمی کشور، میثاق مدیران ۱۳۸۶ شماره ۲۷
- سیده کیانا بنی کمالی، نقش بیوتکنولوژی در برآورده شدن حق انسان‌ها بر تغذیه، پژوهش‌های حقوقی دوره ۱۷ زمستان ۱۳۹۷ شماره ۲۵۴۳۶ – 237
- غلامرضا پزشکی راد امیر نعیمی، تحلیل عاملی نگرش متخصصان بیوتکنولوژی استان تهران نسبت به بکارگیری گیاهان تراریخته، تحقیقات اقتصاد در توسعه کشاورزی ایران دوره چهل و یکم تابستان ۱۳۸۹ شماره ۲
- حسن اطاعت، بیوتکنولوژی و حفاظت منابع ژنتیکی دیدگاه جدید در افزایش تولید و کیفیت مواد غذایی، اقتصاد کشاورزی و توسعه ۱۳۷۷ شماره ۲۱
- محمود تولایی، مروری بر روند کنوانسیون منع توسعه، تولید و ذخیره سلاح‌های بیولوژیک و بایدها و نبایدهای بیوتکنولوژی، سیاست دفاعی زمستان ۱۳۷۷ شماره ۲۵
- غلامرضا پزشکی راد امیر نعیمی، بررسی عوامل آموزشی ترویجی موثر بر بکارگیری گیاهان تراریخته از نظر متخصصان بیوتکنولوژی مراکز تحقیقات استان تهران، اقتصاد و توسعه کشاورزی سال بیست و پنجم بهار ۱۳۹۰ شماره ۱
- حمیدرضا رضوانی حسنعلی آقاجانی سید نورالدین مقیمی‌درونکلایی، تعیین شاخص‌های بومی‌برای سنجش نوآوری در ایران با استفاده از آزمون فرض فازی (مطالعه موردی: حوزه بیوتکنولوژی)، توسعه کارآفرینی ۱۳۸۸ شماره ۴

- بهمن معینیان مهدی الیاسی جهانیار بامدادصوفی میر علی سیدنقوی، طراحی الگوی حفظ و نگهداری کارکنان دانشی در شرکت‌های دانش بنیان تولیدی (مطالعه موردی: شرکت‌های فناوری اطلاعات و ارتباطات و بیوتکنولوژی)، مدیریت منابع انسانی پایدار سال سوم بهار و تابستان ۱۴۰۰ شماره ۴ - 89 111

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

تاثیر عصاره متانولی گیاه مریم نخودی خزری (*Teucrium hyrcanicum*) بر زنده مانی، فعالیت آنزیم LDH و القای نکروز در سلول های PC-3

پریسا توکلی[۱]، مجید تفریحی[۲]

۱. دانشجو ی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۲. عضو هیئت علمی و استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

*m.tafrihi@umz.ac.ir

چکیده

سرطان پروستات شایع ترین نوع سرطان در مردان و جزء شش سرطان مرگ آور در دنیا است. گیاهان به دلیل داشتن فیتوکمیکال ها، نقش مهمی در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان دارند. گیاه *Teucrium hyrcanicum* متعلق به خانواده *Lamiaceae* و بومی ایران است. در این پژوهش پس از تهیه عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* سلول های PC-3 با غلظت های مختلف عصاره به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* بر میزان تکثیر و بقاء رده سلولی PC-3 با استفاده از تست MTT، سنجش میزان آزاد شدن آنزیم لاکتات دهیدروژناز(LDH) از سلول ها و همچنین میزان تولید گونه های فعال اکسیژن(ROS) درون سلولی بررسی شد. سنجش سمیت سلولی با تست MTT نشان داد که عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* بطور قابل توجهی زنده مانی سلول های PC-3 تیمار شده را مهار می کند و میزان IC_{50} حدود ۴۴ µg/ml بدست آمد. نتایج حاصل از تست LDH نشان داد که میزان آزاد سازی آنزیم LDH با افزایش غلظت عصاره گیاه، افزایش یافت. سطح ROS درون سلولی با استفاده DCFH-DA با روش فلورومتری اندازه گیری شد و نتایج نشان داد که تیمار سلول ها با عصاره گیاه در غلظت های پایین تر از ۴۴ µg/ml، قادر به افزایش میزان تولید ROS در مقایسه با گروه کنترل می باشد. نتایج این پژوهش نشان می دهد که *T. hyrcanicum* به خاطر داشتن ترکیبات مختلف شیمیایی از رشد و تکثیر سلولی جلوگیری می کند و دارای اثرات سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدانی می باشد.

کلمات کلیدی: مریم نخودی خزری، MTT، LDH، ROS، سرطان پروستات

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

The effect of methanolic extract of *Teucrium hyrcanicum*, on the viability, LDH enzyme activity, and induction of necrosis in PC-3 cells

Parisa Tavakoli[1], Majid Tafrihi[2] *

[1] M.Sc. student, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran, University, Babolsar, Iran

[2] Faculty member and assistant professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Iran

*m.tafrihi@umz.ac.ir

Abstract

Prostate cancer is one of the most common types of cancer in men and ranks among the top six deadliest cancers worldwide. Plants, with their phytochemicals, play a crucial role in treating numerous diseases, including cancer. The *Teucrium hyrcanicum* plant, a member of the *Lamiaceae* family, is indigenous to Iran. In this study, the methanolic extract of *T. hyrcanicum* was prepared and used to treat PC-3 cells with varying concentrations of the extract for 48 hours. The impact of the extract on the proliferation and survival of the PC-3 cell line was evaluated using the MTT test, measurement of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme release from cells, and assessment of the production of intracellular reactive oxygen species (ROS). The MTT test revealed that the methanolic extract of *T. hyrcanicum* significantly inhibited the survival of treated PC-3 cells, with an IC_{50} level of approximately 44 µg/ml. The results of the LDH test indicated that the release rates of the LDH enzyme increased with an increase in the concentration of the plant extract. The level of intracellular ROS was measured using DCFH-DA by fluorometric method, and the findings demonstrated that the treatment of cells with plant extract in concentrations lower than 44 µg/ml increased the ROS production compared to the control group. The findings of this research demonstrate that *T. hyrcanicum* has cytotoxic and antioxidant effects, preventing cell growth and proliferation due to its various chemical compounds.

Keywords: *Teucrium hyrcanicum*, MTT, LDH, ROS, Prostate cancer

۱. مقدمه

سرطان یکی از مشکلات مهم بهداشتی و یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر دنیا می باشد که با وجود پیشرفت روزافزون در پیشگیری و درمان، همچنان باعث مرگ و میر و ناتوانی بیماران می شود. شیوع آن روز به روز در حال افزایش می باشد و پیش بینی شده است که سرطان اولین و مهمترین عامل مرگ در سال ۲۰۳۰ خواهد بود[۱]. سرطان بیماری است که در آن سلول های بدن به طور غیر عادی تقسیم و تکثیر می شود و بافت های سالم را نابود می کنند[۲]. سرطان پروستات یکی از شایعترین بدخیمی های سیستم ادراری مردان و همچنین دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه در مردان است، که معمولا در سنین بالای ۶۵ سال رخ می دهد[۳]. راه های درمان سرطان شامل جراحی، رادیو درمانی، شیمی درمانی، هورمون درمانی، ایمونوتراپی و ژن درمانی می باشد، ولی تمامی این روش ها عوارض جانبی بسیاری روی سلول ها و بافت های سالم بدن دارند[۴]. به دلیل عوارض جانبی شدید این روش های درمانی و مقاومت های دارویی، دستیابی به گیاهان دارویی با اثرات جانبی کمتر که بتواند تأثیرات داروهای سیتوتوکسیک و داروهای تمایزدهنده را افزایش دهد موردتوجه قرار گرفته است[۵]. گیاهان به دلیل داشتن فیتوکمیکال ها، نقش مهمی در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان دارند. فلاونوئیدها، فنول ها و همچنین ویتامین های ترپن دار نظیر ویتامین های E، A و C از مهمترین فیتوکمیکال های مؤثر موجود در میوه ها و سبزی ها هستند که دارای اثرات آنتی اکسیدانی می باشند[۶]. جنس *Teucrium* متعلق به خانواده *Lamiaceae* با بیش از ۳۴۰ گونه در سراسر جهان است، این جنس در ایران با نام فارسی مریم نخودی شناخته شده است. ۱۲ گونه از این جنس در ایران وجود دارد و سه گونه آن بومی هستند[۷]. بیشتر گونه های جنس *Teucrium* هزاران سال است که در طب سنتی مورد استفاده قرار می گیرد و کاربردهای بالقوه متفاوتی از داروسازی تا صنایع غذایی دارند که به دلیل محتوای بالای متابولیت های ثانویه با فعالیت های بیولوژیکی قابل توجه اند[۸]. متابولیت های جدا شده از گونه های این جنس شامل دی ترپن ها ، سسکوی ترپن ها، تری ترپن ها، استروئیدها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها، ساپونین ها و آلکالوئیدها می باشند که دارای طیف گسترده ای از فعالیت های بیولوژیکی از جمله فعالیت های ضد التهابی، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی هستند[۹]. گیاه *Teucrium hyrcanicum L.* (مریم نخودی خزری) گیاهی علفی و چند ساله است و یکی از معروف ترین و مورد تحقیق ترین گونه های جنس *Teucrium* می باشد. این گونه سرشار از ترکیبات فنلی است، به طوری که بررسی های فیتوشیمیایی نشان داده که *T. hyrcanicum* منبع غنی دی ترپنوئیدها است، که مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره این گونه هستند. از این گیاه در صنایع غذایی و دارویی به دلیل خواص ضد میکروبی، ضدعفونی، ضدسرطانی، ضدالتهابی و کاهنده قندخون مورد استفاده قرار می گیرد. گیاه *T. hyrcanicum* گیاهی بومی است که در شمال ایران می روید[۱۰]. تاکنون بررسی ها و آزمایشات بسیاری بر روی عصاره گیاه مریم

نخودی خزری انجام شده است که نشان داده اند عصاره این گیاه دارای ترکیباتی است که منجر به خواص آنتی اکسیدانی بالای این گیاه می باشد. اما هنوز برای اثبات موثر بودن این گیاه در درمان سرطان به مطالعات و آزمایشات بیشتری نیاز است. ما دراین پژوهش به بررسی اثرات ضدسرطانی و آنتی اکسیدانی عصاره ی متانولی گیاه مریم نخودی خزری بر سلول های سرطان پروستات (PC-3) پرداختیم.

۲. مواد و روش

۱،۲. مواد و وسایل:

EDTA-Trypsin از شرکت DACell، پنی سیلین(Penicilin)، استرپتومایسین(Streptormycine)، پودرMTT از شرکت Aldrich-Sigma و محیط کشت RPMI1640 از شرکت BIO-IDEA خریداری شدند. سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و DMSO cell culture از شرکت AnaCell خریداری شد. کیت سنجش LDH از شرکت KIAZIST و کیت سنجش میزان ROS درون سلولی ازشرکت TEB PAZHOUHAN RAZI (TPR) تهیه شد. وسایل کشت سلول از قبیل فلاسک، پلیت، سرسمپلر، فالکون و میکروتیوب از شرکت آریا پوش تک تهیه شد.

۲،۲.تهیه عصاره متانولی گیاه *Teucrium hyrcanicum*:

۵۰ گرم از پودر گیاه *T. hyrcanicum* در ۵۰ میلی لیتر متانول خیس داده شد و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر هم زده شد. مایع رویی تغلیظ شد و سپس توسط دستگاه Freeze-dryer خشک شد. از عصاره خشک شده یک استوک با غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر در متانول تهیه شد و تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۳،۲. کشت سلول های PC-3:

در این مطالعه برای کشت in vitro، رده سلولی پروستات (PC-3) از آزمایشگاه ژنیران تهران خریداری شد. سلول هایPC-3 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی سیلین (۱۰۰ واحد درمیلی لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) و ۱۰٪ سرم جنین گاوی(FBS) درون فلاسک کشت سلول T-25 کشت شدند. سپس فلاسک سلولی در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفت، پس از ۴۸ ساعت محیط کشت قدیمی با محیط کشت تازه تعویض شد. هنگامی که سلول ها ۷۰٪ از بستر فلاسک را فراگرفتند، با استفاده ازمحلول EDTA-Trypsin سلول ها از بستر جدا شده جهت تکثیر بیشتر در فلاسک های بیشتری تقسیم شدند.

۴،۲. بررسی مرگ سلولی با تست MTT:

میزان بقاء و تکثیر سلول ها در برابر عصاره متانولی گیاه مریم نخودی خزری با روش رنگ سنجی، با استفاده از نمک متیل تیازولیل تترازولیوم بروماید یا MTT بررسی شد. برای انجام تست MTT، ابتدا با شمارش سلول های تریپسینه و جداشده از بستر فلاسک با استفاده از لام نئوبار تعداد ۵×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از اینکه سلول ها به تراکم ۷۰ ٪ رسیدند، با غلظت های

۰(کنترل)، ۲، ۵، ۱۰ ،۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانولی گیاه مریم نخودی خزری به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، محیط کشت قبلی از هر چاهک برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد. پس از ۳ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT را خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO به آن اضافه شد و میزان جذب آن در طول موج ۵۹۰ نانومتر توسط ELIZA reader خوانده شد.

۵،۲. اندازه گیری میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase release):

این روش براساس سنجش کالریمتریک برای تعیین کمیت مرگ سلولی، از طریق اندازه گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) آزاد شده از سیتوزول سلول های آسیب دیده در محیط کشت سلول های PC-3 می باشد. برای اندازه گیری میزان آنزیم LDH ابتدا با شمارش سلول های PC-3 تریپسینه و جداشده با استفاده از لام نئوبار تعداد ۶×۱۰^{۳} سلول در چاهک های پلیت ۹۶ خونه کشت داده شد. پس از اینکه سلول ها به تراکم ۷۰ ٪ رسیدند، با غلظت های ۰(کنترل)، ۱۰، ۲۵، ۴۴ و ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانولی گیاه مریم نخودی خزری به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز با استفاده از کیت تشخیصی لاکتات دهیدروژناز شرکت KIAZIST مطابق دستورالعمل ارزیابی شد. خوانش جذب به روش کالریمتری در طول موج ۵۲۰ ناتومتر با دستگاه ELIZA reader اندازه گیری شد.

۶،۲. اندازه گیری میزان ROS درون سلولی (Reactive oxygen species):

به منظور تعیین میزان تولید ROS درون سلولی، ابتدا با شمارش سلول های PC-3 تریپسینه و جداشده با استفاده از لام نئوبار تعداد ۵×۱۰^{۳} سلول درهر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از اینکه سلول ها به تراکم ۷۰ ٪ رسیدند، با غلظت های ۰(کنترل)، ۱۰، ۲۵ و ۴۴ میکروگرم بر میلی لیترعصاره متانولی گیاه مریم نخودی خزری به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. برای بررسی میزان ROS درون سلولی از کیت تشخیصی شرکت RAZI (TPR) TEB PAZHOUHAN استفاده شد. کیت TPR-ROS Assay میزان ROS در درون سلول براساس یک سنجش فلوریمتری با استفاده از پروب فلورسانس ۲، ۷- دی کلروفلورسئین دی استات (DCFH-DA) اندازه گیری می کند. شدت فلورسانس با استفاده از طول موج تحریک ۵۰۰ نانومتر و طول موج انتشار ۵۵۰ نانومتر با دستگاه Cytation3 اندازه گیری شد.

۷،۲. مطالعات آماری:

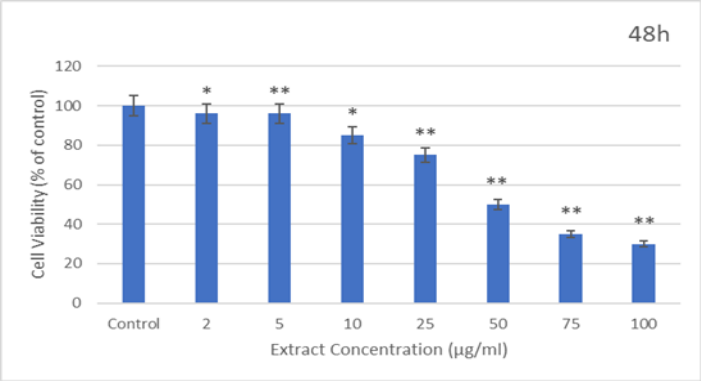
در این مطالعه، همه آزمایش ها حداقل سه بار تکرار شد و در نهایت داده ها با نرم افزار گرفپد پریسم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳. نتایج

۱،۳. بررسی اثر عصاره بر بقای سلولی با روش MTT:

تاثیر عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* بر قابلیت بقاء و تکثیر سلول های سرطانی PC-3 با استفاده از تستMTT در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. سلول ها با غلظت های ۰(کنترل)، ۲، ۵، ۱۰ ،۲۵، ۵۰،

۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانولی *T. hyrcanicum* به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. مقدار IC_{50} عصاره متانولی *T. hyrcanicum* برای رده سلولی PC-3 بعد از گذشت ۴۸ ساعت حدود ۴۴ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج حاصل از MTT نشان داد که عصاره متانولی *T. hyrcanicum* بقاء و حیات سلول ها را به صورت قابل توجهی کاهش می دهد.

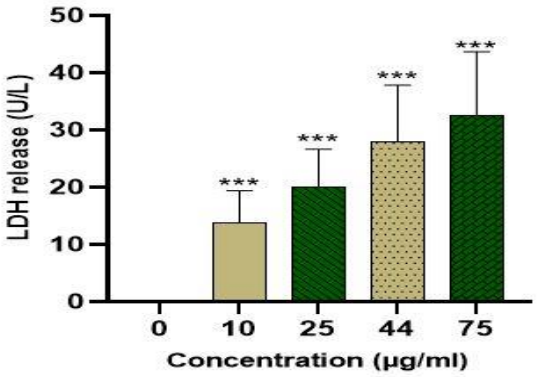


نمودار ۳-۱: بررسی اثرات عصاره متانولی *T. hyrcanicum* بر بقاء و تکثیر سلول های PC-3 پس از ۴۸ ساعت به روش MTT.
داده های نشان داده شده به صورت میانگین سه تکرار مستقل می باشد (P<0.05:*) (P<0.01:**)

همانطور که در نمودار ۳-۱ نشان داده شده است، تیمار سلول های PC-3 با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر اندکی منجربه افزایش در تعداد سلول های زنده شد (تا ۵ ٪) اما از غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر به بالا حیات سلول ها را به صورت قابل توجه کاهش می دهد. در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر زنده مانی سلول ها تا ۸۵٪ کاهش می یابد و در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر زنده مانی سلول ها تقریباً به ۵۰ ٪ می رسد، در غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زیر ۲۰ ٪ سلول ها زنده می مانند.

۲,۳. سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) :

آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)، محلول در سیتوپلاسم است و از سلول های مرده یا آسیب دیده، زمانی که یکپارچگی غشای سلولی مختل شده باشد، آزاد می شود. آزاد سازی LDH به درون محیط کشت، یکی از روش های مورد استفاده در ارزیابی مرگ سلولی(نکروز) می باشد. سلول ها با غلظت های ۰(کنترل)، ۱۰، ۴۴ و ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* به مدت ۴۸ ساعت تیمار شد.

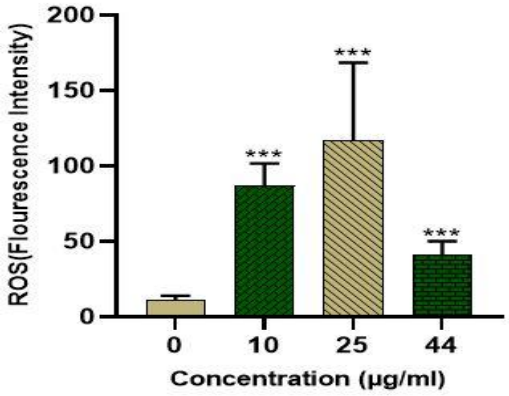


نمودار۲-۳: میزان آزادسازی آنزیم LDH در سلول های PC-3 پس از تیمار با غلظت های مختلف عصاره متانولی *T. hyrcanicum* پس از ۴۸ ساعت، میانگین حاصل از سه آزمایش مستقل می باشد(***:P <0.001).

همانطور که در نمودار۳-۲ نشان داده شده است، میزان آزاد سازی آنزیم LDH در سلول های تیمار شده با عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت عصاره متانولی گیاه میزان تخریب غشای سلولی نسبت به سلول های کنترل افزایش یافته و میزان آنزیم LDH بیشتری به محیط کشت آزاد شده است. بنابراین، تاثیر سیتوتوکسیتی عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* با آسیب غشای پلاسمایی سلول ها همراه بوده است.

۳،۳. بررسی اثر عصاره بر میزان تولید ROS درون سلولی:

اثر عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* بر تولید گونه های فعال اکسیژن درون سلولی(ROS) براساس یک سنجش فلوریمتری مورد بررسی قرار گرفت. سلول ها با غلظت های ۰(کنترل)، ۱۰، ۲۵ و ۴۴ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانولی *T. hyrcanicum* به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند.



نمودار۳ -۳: میزان تولید ROS در سلول های PC-3 پس از تیمار با غلظت های مختلف عصاره متانولی *T. hyrcanicum* پس از ۴۸ ساعت، میانگین حاصل از سه آزمایش مستقل می باشد(***:۰,۰۰۱> P).

همانطور که در نمودار ۳-۳ نشان داده شده است، در غلظت های ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل میزان ROS افزایش یافت. در غلظت ۴۴ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به غلظت ۱۰ و ۲۵ کاهش دیده شد اما نسبت به گروه کنترل همچنان اثر افزایشی مشاهده شد. کـــاهش میزان ROS در غلظت ۴۴ میکروگرم بر میلی لیتر، نشان دهنده خاصـــیت آنتی اکسیدانی و افزایش میزان ROS در غلظت های ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر درمقایسه با گروه کنترل نشان دهنده خاصیت پرواکسیدانی عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* می باشد. بنابراین عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* موجب القاء مرگ آپوپتوزی در سلول های PC-3 از طریق افزایش تولید ROS درون سلولی می شود.

۴. بحث و نتیجه گیری

درحال حاضر سرطان پس از بیماری های قلبی-عروقی دومین عامل مرگ و میر در کشورهای پیشرفته می باشد[۱]. سرطان پروستات شایع ترین بدخیمی در مردان و جزء شش سرطان مرگبار در دنیا به شمار می رود[۳]. مقاومت در برابر داروهای ضد سرطان و عوارض جانبی داروها از موانع اصلی موفقیت درمان های سرطان هستند. گیاهان به دلیل داشتن فیتوکمیکال ها، پتانسیل بالایی در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان دارند. فیتوکمیکال ها می توانند موجب محافظت و ترمیم آسیب DNA، توقف چرخه سلولی و القاء آپوپتوز شوند.[۶] امروزه گیاهان دارویی و ترکیبات حاصل از آن ها منبع با ارزشی برای تولید انواع محصولات دارویی با عوارض کمتر و اثرات مؤثر می باشند. گیاه *Teucrium hyrcanicum* یک گیاه بومی ایران است و از معروف ترین گونه های جنس *Teucrium* است. فنول ها، فلاونوئیدها، دیترپنوئیدها و کاروتنوئیدها در عصاره گیاه *T. hyrcanicum* وجود دارند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی هستند و می توانند فعالیت ضد سرطانی را نیز نشان دهند[۹]. هدف اصلی این پژوهش بررسی اثرات سیتوتوکسـیک و آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* بر سلول هـای سرطان پروستات (PC-3) بوده است. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که این گیاه می تواند به صورت وابسته به غلظت و زمان درصد زنده

مانی و بقاء سلول ها را کاهش دهد. در ادامه سمیت سلولی عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* از طریق آزادسازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز(LDH) و خواص آنتی اکسیدانی آن به واسطه میزان تولید گونه های فعال اکسیژن(ROS) در سلول ها بررسی نمودیم. میزان لیز سلولی که نشان دهنده مرگ سلولی (نکروز) است با استفاده از کیت سنجش آنزیم LDH مورد ارزیابی قرار گرفت. آنزیم LDH آنزیمی سیتوپلاسمی است و مسئول تبدیل پیرووات به لاکتات در طی گلیکولیز است، این آنزیم به محض آسیب غشای سلولی به بیرون آزاد می شود. نتایج ما نشان داد که آزاد شدن آنزیم LDH از سلول های PC-3 با افزایش غلظت و گذشت زمان بیشتر شده است. افزایش سطح آنزیم پس از گذشت ۴۸ ساعت در محیط کشت سلولی بیانگر این است که احتمالا عصاره گیاه *T. hyrcanicum* دارای ترکیباتی است که باعث آسیب به غشاء شده و یکپارچگی آن از بین برده است. بنابراین عصاره گیاه *T. hyrcanicum* دارای اثر نکروتیک بر روی سلول های PC-3 می باشد و موجب مرگ سلولی از طریق مکانسیم نکروز می شود. نتایج حاصل از بررسی میزان تولید ROS درون سلولی نشان دادکه عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* در غلظت IC_{50} دارای اثرات آنتی اکسیدانی می باشد و درغلظت های کمتر از IC_{50} قادر به افزایش میزان تولید ROS درون سلولی می باشد. میتوکندری ها منبع سلولی اولیه تولید ROS هستند، افزایش تولید ROS موجب افزایش نفوذپذیری دیواره میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول و شروع مسیرداخلی آپوپتوز می شود. بنابراین عصاره متانولی گیاه *T. hyrcanicum* از طریق القای آپوپتوز به واسطه تولید بیش از حد ROS درون سلولی منجر به مرگ سلول های PC-3 می شود. همچنین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی نیز می باشد و می تواند با کاهش استرس اکسیداتیو از سرطان زایی جلوگیری کند[۱۱]. پتانسیل آنتی اکسیدانی بالای گیاهان به دلیل وجود ترکیبات فنولی در عصاره آن ها است. گیاه *T. hyrcanicum* منبع غنی ترکیبات فنولی از جمله دیترپنوئیدها و فلاونوئید ها می باشد که می توان به عنوان یک منبع آنتی اکسیدانی جدید معرفی کرد. نتایج پژوهش ما نشان می دهد که عصاره گیاه *T. hyrcanicum* دارای ترکیبات شیمیایی می باشد که از تکثیر و رشد سلولی جلوگیری می کند و می تواند به عنوان یک منبع گیاهی طبیعی در تولید داروهای ضد سرطان جدید پیشنهاد شود. این پژوهش نیازمند مطالعات بیشتر آزمایشگاهی در زمینه مکانیسم ها و چگونگی تأثیر بر روی مسیرهای درون سلولی و همچنین تأثیر بر انواع دیگر رده سلول های سرطانی می باشد.

۵. منابع

1. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer, 136(5), E359-E386.

2. Seca, A. M., & Pinto, D. C. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. International journal of molecular sciences, 19(1), 263.
3. Rawla, P. (2019). Epidemiology of prostate cancer. World journal of oncology, 10(2), 63.
4. Gezici, S., & Şekeroğlu, N. (2019). Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 19(1), 101-111.
5. Michaelson, M. D., Cotter, S. E., Gargollo, P. C., Zietman, A. L., Dahl, D. M., & Smith, M. R. (2008). Management of complications of prostate cancer treatment. CA: a cancer journal for clinicians, 58(4), 196-213.
6. Haghi, A., Azimi, H., & Rahimi, R. (2017). A comprehensive review on pharmacotherapeutics of three phytochemicals, curcumin, quercetin, and allicin, in the treatment of gastric cancer. Journal of gastrointestinal cancer, 48, 314-320.
7. Sadeghi, Z., Yang, J. L., Venditti, A., & Moridi Farimani, M. (2021). A review of the phytochemistry, ethnopharmacology and biological activities of Teucrium genus (Germander). Natural Product Research, 1-18.
8. Abdullah, F. O., Hussain, F. H., Sardar, A. S., Gilardoni, G., Thu, Z. M., & Vidari, G. (2022). Bio-Active compounds from Teucrium plants used in the traditional medicine of Kurdistan Region, Iraq. Molecules, 27(10), 3116.
9. Candela, R. G., Rosselli, S., Bruno, M., & Fontana, G. (2021). A review of the phytochemistry, traditional uses and biological activities of the essential oils of genus Teucrium. Planta Medica, 87(06), 432-479.
10. Valizadeh, G., Nejad Ebrahimi, S., Gholami, M., Mazaheritehrani, M., Rezadoost, H., and Sonboli, A. (2021). Rearranged abietane diterpenoids from roots of Teucrium hircanicum L. Journal of Medicinal Plants, 20(79): 24-36.
11. Wason, M. S., Colon, J., Das, S., Seal, S., Turkson, J., Zhao, J., & Baker, C. H. (2013). Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 9(4), 558-569.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

مکانیسم های ملکولی پیری

طاهره حیدری[۱] ، پونه نیکوئی[۲] ،غلامرضا مطلب[۳*]

۱-دانشجو کارشناسی ارشد ، واحد سلولی و ملکولی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، پردیس دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲-دانشجو کارشناسی ارشد ، واحد سلولی و ملکولی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل،ایران

۳-دانشیار واحد سلولی و ملکولی گروه زیست شناسی ، دانشکده دانشکده علوم پایه ، دانشگاه زابل، زابل، ایران

* نویسنده مسلول: غلامرضا مطلب ، دانشیار بیولوژی ملکولی : reza.motaleb@uoz.ac.ir

چکیده

پیری یکی از معماهای حل نشده باقی مانده در زیست شناسی مولکولی است، عواملی که ممکن است شروع پیری را به تأخیر بیندازد یا از شدت آن بکاهد همیشه مورد توجه محققین بوده است. افزایش سن عملکرد های بیولوژیک سلولی را کاهش داده و خطر ابتلا به سرطان ، دیابت نوع ۲، بیماری های قلبی عروقی و اختلالات عصبی را افزایش می دهد. پیری فرآیند بیولوژیکی پیچیده ای است که شامل آسیب به ماکرو مولکول هایی مانندDNA ،پروتئین و اندامک هایی مانند میتوکندری می شود. تحقیقات جدید نقش بی‌ثباتی ژنومی، اختلال عملکرد تلومر، تغییرات اپی ژنتیکی، از دست دادن پروتئوستاز، تغییر در اتوفاژی، اختلال عملکرد میتوکندری، پیری سلولی، کاهش ارتباطات بین سلولی سلول‌های بنیادی و فرسودگی بین سلولی در فرایند پیری را نشان میدهد. افزایش سن باعث تغییرات متعدد در فرآیند های بیولوژیکی از جمله تغییرات اپی ژنتیکی می شود. در این مقاله مروری از پایگاه های اطلاعاتی مانند Google Scholar ، Civilica ،Elsevier ،Microsoft academic research استفاده گردید.

کلمات کلیدی : پیری ، DNA ، تغییرات اپی ژنتیکی، پیری سلولی

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Molecular mechanisms of aging

Abstract

The process of aging remains an enigma in the field of molecular biology. Researchers have long been interested in identifying factors that could potentially delay the onset of aging or mitigate its severity. The process of aging is associated with a decline in cellular biological functions, which in turn elevates susceptibility to a range of health conditions such as cancer, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and neurological disorders. The process of aging is a multifaceted biological phenomenon that encompasses the deterioration of macromolecules, including DNA, proteins, and organelles such as mitochondria. Recent studies have demonstrated the involvement of various biological mechanisms such as genomic instability, telomere dysfunction, epigenetic modifications, proteostasis impairment, alterations in autophagy, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, reduced intercellular communication of stem cells, and intercellular exhaustion in the process of aging. The present review article utilized various databases, including but not limited to Google Scholar, Civilica, Microsoft academic research, and Elsevier.

Keywords: Aging, DNA, Molecular mechanisms, Epigenetic modifications

مقدمه

پیری با کاهش عملکرد پیشرونده در سطح مولکولی-سلولی ، بافتی و ارگانی مشخص می شود. بیماری های مختلفی از جمله دیابت نوع ۲ (T2DM) ، سرطان ، پارکینسون(PD) ، آلزایمر (AD) دراثراختلالات متابولیکی ناشی از پیری می باش[۱]. نشانه های پیری که به طور طبیعی درفرآیندهای ملکولی رخ می دهند عبارتند از بی ثباتی ژنومی ، ساییدگی تلومر ، اختلال عملکرد mtDNA ، تغییرات اپی ژنتیکی، از دست دادن پروتئوستازیس ، بی نظمی مواد مغذی و تغییر در ارتباطات بین سلولی است[۲]. دراین مقاله مروری برخی از مکانیسم های ملکولی اصلی فرایند پیری را بررسی می کنیم.

روش کار

در این مقاله مروری از پایگاه های اطلاعاتی مانند Google scholar ، Civilica ، Microsoft academic research، Elsevier استفاده گردید.

نتایج و بحث

آسیب و جهش DNA

آسیب و جهش DNA از ویژگی های کلیدی سلول های پیر می باشد. بطور مثال سندروم پروجریا هاچینسون گیلفورد به دلیل جهش در لامین ایجاد می شود، که منجر به A/C (LMNA) بیان لامین با حذف ۵۵ آمینواسید در انتهای C ترمینال آن میگردد. این حذف باعث تغییر در غشای هسته و از بین رفتن هتروکروماتین و متیلاسیون هیستون می شود که نشان می دهد چگونه یک جهش ژنی می تواند باعث پیری سلولی شود [۴].

جهش درmtDNA با افزایش سن در انواع بافت ها و گونه ها و در طیف وسیعی از بیماری های پیچیده مرتبط با سن، افزایش می یابد. این جهش ها شامل بازآرایی و جایگزینی است که بازآرایی mtDNA در دیابت نوع ۲ و ناشنوایی به ارث رسیده از مادرمثال هایی از آن است [۵]. بیماری های دیگر بازآرایی که مرتبط با افزایش سن است بیماری مزمن عروق کرونری، AD است. سلول ها دارای سیستم ترمیم DNA و حذف Ros هستندکه در سلول های پیرعمل نمی کند. بنابراین تجمع این آسیب ها منجربه تغییرات اپی ژنتیکی (مانند اصلاح هیستون ها، بازسازی کروماتین و متیلاسیون DNA [۷] می شود [۶]. از سوی دیگر تغییرات اپی ژنتیکی را می توان معکوس کرد اما جهش های ژنومی معکوس نمی شوند. این معکوس کردن یک هدف درمانی برای به تأخیر انداختن فرآیند پیری در سلول هاست [۸].

اتوفاژی-لیزوزومی و یوبی کوئیتینین-پروتئازوم

سیستم های تخریب پروتئین مانند اتوفاژی-لیزوزومی و یوبی کوئیتینین-پروتئازوم با افزایش سن به تدریج کاهش می یابد [۹]. فعال شدن اتوفاژی می تواند طول عمر حیوان آزمایشگاهی را افزایش دهد. بعنوان مثال راپامایسین۱ باعث ایجاد ماکروفاژی و کاهش پیری در موش می شود [۱۰]. همانطور فعال شدن مسیر سیگنال دهی فاکتور رشد اپیدمی (EGF) و تنظیم مثبت پروتئین های مرتبط با سیستم یوبی کوئینین-پروتئازوم پیری را در C-elegance به تأخیر می اندازد [۱۱]. این تحقیقات نشان می دهد که فعال شدن کاتابولیسم پروتئین روند پیری را به تأخیر می اندازد و ممکن است با عث افزایش طول عمر شود.

سیستم های سنجش مواد مغذی

سیستم های سنجش مواد مغذی از جمله کیناز های فعال شده با AMP(AMPK),SIRTs وmTOR پیری را تنظیم میکنند[۱۲] . AMPK فعال کننده اصلی مسیر های کاتابولیک مثل اکسیداسیون اسیدهای چرب است و متابولیسم آنابولیک مثل بیوسنتز کلسترول و اسیدهای چرب را سرکوب نموده و باعث بهبود فعالیت انسولین میشود. فعالیت آن از طریق فسفریلاسیون ترئونین ۱۷۲ می باشد که بعنوان یک استراتژی برای افزایش طول عمر پستانداران مطرح است [۱۳]. انسولین و مسیر سیگنالینگ فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1) (IIS) یکی از سیستم های سنجش مواد مغذی با هدف به تأخیر انداختن پیری است [۱۵].

تلومر

تلومر ناحیه ای در انتهای کروموزوم است که آن را از آسیب و همجوشی با کروموزوم های مجاورمحافظت می کند. از دست دادن تلومر و کوتاه شدن آن می تواند بیماری های مربوط به افزایش سن را تشدیدکند [۱۶]. آنزیم تلومراز به حفظ تلومر در فرآیند همانندسازی کمک می کند. فقدان عملکرد صحیح تلومراز باعث از دست رفتن توالی های نوکلئوتیدی (که از تلومرهای محافظت میکند) می شود. کوتاه شدن تلومر معمولا باعث کاهش تکثیر سلولی و پیری سلولی می شود [۱۷].

پیری سلولی

پیری سلولی توقف غیرقابل برگشت چرخه سلولی است. البته پیری سلولی فواید فیزیولوژیکی هم دارد بعنوان مثال سرکوب تومورزایی ، ولی تجمع بیش از حد سلول های پیر می تواند اثرات منفی بجای بگذارد [۳].

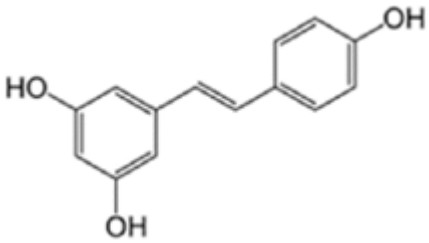
از جمله فاکتور های مرتبط با پیری (SASP) Senescence – associated Secretory Phenotype سایتوکاین های التهابی- اینترلوکین ها و عوامل رشد می باشند (۱۸) . برخی از سرکوبگرهای تومور از

طریق چرخه سلولی، عکس العمل به آسیب DNA ، القای پاسخ های ایمنی و نیز متابولیسم ، پیری سلول را القا می کنند [۲۰].

برای مثال سرکوبگر تومور P16INK4a یا P16ARF یک مهار کننده کینازی وابسته به سایکلین است که افزایش مقدار P16INK4a یکی از نشانگرهای ملکولی اصلی پیری در سلول است [۲۱].

Resveratrol

Resveratrol (3,5,40-trihydroxy-trans-stilbene) یک پلی فنول طبیعی است که ۲۲۸,۲ گرم درمول وزن مولکولی دارد (شکل ۱). برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ از ریشه ***Veratrum grandiflorum*** O. Lies جدا شد [۲۳]. در انگور، کاکائو، توت فرنگی ، گوجه فرنگی ، بادام زمینی ، کرن بری و نیشکر وجود دارد. این ترکیب میل ترکیبی بالایی به مولکول های پروتئین هدف خود دارد. تقریبا ۲۰ پروتئین مانند SIRT1 با Resveratrol همکاری میکنند [۲۴] .



شکل شماره ۱: ساختار[25] Resveratol

Resveratol به عنوان قوی ترین القا کننده فعالیت داستیلاز درمیان پلی فنل ها معرفی شده است [۲۶]. Resveratol باعث افزایش طول عمر دروزفیلا ملانوگاستر ، سی الگانس و ساکارومیسزسرویزیه، و نیز موش میگردد [۲۶]. این پلی فنول گزارش گردیده باعث افزایش طول عمردر ماهی های مسن می شود [۲۷].

Resveratol مستقیما به SIRTs که حسگر+NAD سلولی است متصل شده و آن را فعال می کند. از سوی دیگر AMPK SIRT1 را تنظیم می کند.

AMPK یک تنظیم کننده منفی Mtor است که باعث ایجاد اتوفاژی و بیوژنز میتوکندری می شود. در حالی که SIRT1 یک مهار کننده زنجیره سبک کاپا فاکتور هسته ای سلول های B فعال است (NF-KB). این مهم نشان می دهد Resveratol اثرات ضد پیری دارد[۲۸] .

بحث و نتیجه گیری

پیری یک فرآیند پاتوفیزیولوژیکی تدریجی و غیرقابل برگشت است. این بیماری با کاهش عملکرد بافت و سلول و افزایش ابتلا به بیماری‌های عصبی، قلبی عروقی، متابولیک، اسکلتی عضلانی و سیستم ایمنی ظاهر میگردد.

تحقیقات جدید نقش بی‌ثباتی ژنومی، اختلال عملکرد تلومر، تغییرات اپی ژنتیکی، از دست دادن پروتئوستاز، تغییر در اتوفاژی، اختلال عملکرد میتوکندری، پیری سلولی، کاهش ارتباطات بین سلولی سلول‌های بنیادی و فرسودگی بین سلولی در فرایند پیری را نشان میدهد.

علاوه بر این، تحقیقات در مورد پاتوژنز پیری و روش‌های درمانی مانند حذف سلول‌های پیر، درمان با سلول‌های بنیادی، آنتی‌اکسیدان ها – مواد ضد التهابی و درمان بوسیله هورمون ها می‌تواند بروز بیماری‌های مرتبط با افزایش سن را کاهش داده و به نوبه خود پیری سالم و طول عمر را افزایش دهد.

منابع

1- Kirkwood, T. B. (2005). Understanding the odd science of aging. Cell, 120(4), 437-447.

2- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. Cell, 153(6), 1194-1217.

3-Hoenicke, L., & Zender, L. (2012). Immune surveillance of senescent cells—biological significance in cancer-and non-cancer pathologies. Carcinogenesis, 33(6), 1123-1126.

4- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I, & Lévy, N. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. Science, 300(5628), 2055-2055.

5- Mitochondrial DNA Mutations in Disease and Aging Douglas C.Wallace*
ORU for Molecular and Mitochondrial Medicine and Genetics,University of California, Irvine, CA

6- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. Nature, 481(7381), 287-294.

7- Tissenbaum, H. A., & Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans. Nature, 410(6825), 227-230.

8- Freije, J. M., & López-Otín, C. (2012). Reprogramming aging and progeria. Current opinion in cell biology, 24(6), 757-764.

9- Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. Cell, 146(5), 682-695.

10-Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., ... & Kasahara, M. (2012). Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. The American journal of pathology, 180(3), 963-972.

11-Liu, G., Rogers, J., Murphy, C. T., & Rongo, C. (2011). EGF signalling activates the ubiquitin proteasome system to modulate C. elegans lifespan. The EMBO journal, 30(15), 2990-3003.

12- Houtkooper, R. H., Williams, R. W., & Auwerx, J. (2010). Metabolic networks of longevity. Cell, 142(1), 9-14.

13- McCarty, M. F. (2004). Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging. Medical Hypotheses, 63(2), 334-339.

14-Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P. S., & Curtis, R. (2004). The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans. Genes & development, 18(24), 3004-3009.

15- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span—from yeast to humans. science, 328(5976), 321-326.

16- Blackburn, E. H., Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. Nature medicine, 12(10), 1133-1138.

17- Olovnikov, A. M. (1996). Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. Experimental gerontology, 31(4), 443-448.

18-Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annual review of pathology: mechanisms of disease, 5, 99-118.

19- Tchkonia, T., Zhu, Y., Van Deursen, J., Campisi, J., & Kirkland, J. L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. The Journal of clinical investigation, 123(3), 966-972.

20-Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. Current opinion in cell biology, 22(6), 816-827.

21- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., & Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. The Journal of clinical investigation, 114(9), 1299-1307.

22- Jeck, W. R., Siebold, A. P., & Sharpless, N. E. (2012). a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. Aging cell, 11(5), 727-731.

23- Takaoka, M. J. J. F. S. H. I. U. (1940). Of the phenolic substrate of hellebore (Veratrum grandiflorum Loes. fil.). J Fac Sci Hokkaido Imper Univ., 3, 1-16.

24- Britton, R.G.; Kovoor, C.; Brown, K. Direct molecular targets of resveratrol: Identifying key interactions to unlock complex mechanisms. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2015, 1348, 124–133.& Xia, N.; Daiber, A.; Forstermann, U.; Li, H. Antioxidant e_ects of resveratrol in the cardiovascular system.Br. J. Pharmacol. 2017, 174, 1633–1646.

25- Mechanisms of Aging and the Preventive E_ects of Resveratrol on Age-Related Diseases. In Soo Pyo y, Suyeon Yun y, Ye Eun Yoon y, Jung-Won Choi y and Sung-Joon Lee .Department of Biotechnology, College of Life Sciences & Biotechnology, BK21-PLUS, Korea University, Seoul 02846, Korea; pyois95@korea.ac.kr (I.S.P.); suyun609@korea.ac.kr (S.Y.); yeeun916@korea.ac.kr (Y.E.Y.);cjay1@korea.ac.kr (J.-W.C.)

26- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., ... & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature, 425(6954), 191-196.

27- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellerino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Current biology, 16(3), 296-300.

28- Takaoka, M. J. J. F. S. H. I. U. (1940). Of the phenolic substrate of hellebore (Veratrum grandiflorum Loes. fil.). J Fac Sci Hokkaido Imper Univ., 3, 1-16.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

شناسایی ژن آنزیم سلولاز از فلور میکروبی منطقه آتشفشانی تفتان و مهندسی منطقی آن به منظور افزایش پایداری حرارتی: یک مطالعه آزمایشگاهی- محاسباتی

فاطمه محمدیان [۱]، میلاد لگزیان [۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی ، دانشگاه سیستان و بلوچستان

۲- دانشیار گروه زیست شناسی ،دانشگاه سیستان و بلوچستان

Email: fmohammadian@pgs.usb.ac.ir
Email: m.lagzian@science.usb.ac.ir

نویسنده مسئول: میلاد لگزیان ، دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان

چکیده

امروزه استفاده از آنزیم های سلولاز یکی از ضروری ترین مراحل در بسیاری از صنایع مهم به شمار می رود. با این حال یافتن سلولازهای طبیعی مقاوم به گرما بسیار به سختی قابل انجام است. لذا تولید آنها با روش های دیگر مانند مهندسی منطقی، یکی از راه های نوید بخش است. در این پژوهش ابتدا نمونه ای از فلور میکروبی منطقه آتشفشانی تفتان تهیه گردید و در ادامه یک سویه با قابلیت تولید بالا سلولاز در محیط کشت از آن شناسایی شد. سپس با استفاده از روش های مولکولی توالی ژن 16srRNA به منظور شناسایی سویه باکتری و ژن آنزیم سلولاز به منظور هدف اصلی تحقیق تعیین گردید. در مرحله بعد مدل سازی همولوژی آنزیم سلولاز مربوطه با استفاده الگوی بدست آمده از سرور alphafold انجام پذیرفت و کیفیت مدل برای انجام مراحل بعدی پروژه ارزیابی گردید. براساس نتایج حاصله سویه تولید کننده Acidothermus cellulolyticus تعیین شد که یکی از بهترین سویه های تولید کننده این نوع آنزیم است. آنزیم سلولاز بدست آمده از این باکتری دارای اندازه ۶۲۹ آمینواسید و وزن مولکولی ۶۷,۲۷۵ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۸ تولید می نماید. این آنزیم دارای ۴ جهش منحصر به فردx100y ، q101w، s212r وd213w است که در هیچکدام از توالی های موجود در دیتابیس دیده نشده است. مدل سه بعدی ساخته شده دارای کیفیت بالای ساختاری بود که بسیار مناسب برای مرحله بعدی که جهش سازی است می باشد.

کلمات کلیدی: باکتری ترموفیل ، ژن آنزیم سلولاز ، پایداری حرارتی ، روش های آزمایشگاهی ، رویکرد های بیوانفورماتیکی

Abstract

Cellulase enzymes play a crucial role in various industries today. However, the search for thermostable natural cellulases remains challenging. Therefore, alternative approaches like rational engineering offer promising prospects for their production. In this study, we isolated and identified a highly cellulase-producing strain from the microbial flora of Tafatan volcanic region. Molecular methods, including 16srRNA gene sequencing, were employed to characterize the bacterial strain and the cellulase enzyme gene, which were the main focus of our research. Subsequently, we performed homology modeling of the cellulase enzyme using alphafold server patterns and assessed the model's quality for further steps. Our findings highlighted Acidothermus cellulolyticus strain as an excellent cellulase producer. The obtained cellulase enzyme consists of 629 amino acids, with a molecular weight of 67.275 kilodaltons and an isoelectric point (pH) of 8. Notably, it possesses four unique mutations (x100y, q101w, s212r, and d213w) absent in existing database sequences. The constructed 3D model exhibited high structural quality, rendering it suitable for subsequent stages such as in-silico mutagenesis.

Keywords: thermophilic bacteria, cellulase enzyme gene, thermal stability, laboratory methods, bioinformatics approaches

۱- مقدمه

آنزیم های سلولاز به طور گسترده در فرآیندهای صنعتی برای هیدرولیز سلولز به گلوکز و سایر مونوساکاریدها استفاده می شوند.با این حال، پایداری حرارتی آنها اغلب یک عامل محدود کننده است که منجر به کاهش فعالیت و کارایی در دماهای بالا می شود. برای مقابله با این چالش، محققان استراتژی‌های مختلفی را برای بهبود پایداری حرارتی سلولازها، از جمله مهندسی آنزیم با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و محاسباتی ، بررسی کرده‌اند[۱]. باتوجه به اینکه تبدیل سلولز به گلوکز در صنعت در شرایط خاص مثل دمای بالا انجام می شود و تعداد آنزیم های در دسترسی که بتوانند دمای بالا را تحمل کنند کم میباشد، در نتیجه کشف انواع جدیدی از آنزیم ها با ویژگی‌های خاص که در محیط ها و شرایط بیولوژیکی متفاوتی نسبت به نمونه‌های مزوفیل بتوانند به فعالیت خود ادامه دهند، بسیار حیاتی است و به دلیل اینکه کشف طبیعی این آنزیم با ویژگی های مورد نظر بسیار دشوار است ، باید با تکنیک های آزمایشگاهی، راهکارهای بیوانفورماتیکی و روش های مهندسی پروتئین مودیفیکیشن های خاصی را در ساختار آنزیم سلولاز مورد نظر ایجاد کرد تا پایداری حرارتی آن بهبود یابد که بتوان در صنعت تحت شرایط خاص از آن ها استفاد کرد. با توجه به نیاز صنایع مختلف به آنزیم سلولاز، یا باید آنزیم سلولازی پیدا کرد که به صورت طبیعی مقاوم به گرما باشد که این مدل آنزیم ها بسیار کمیاب هستند، و یا باید آنزیم های سلولازی که مقاوم به گرما نیستند را با استفاده از راهکارهای مهندسی پروتئین مقاوم به گرما کرد .برای مثال یک رویکرد مهندسی پروتئین امیدوارکننده توسط گیلمور و کالاک و همکارانشان بر روی دو آنزیم سلولاز صورت گرفت .آنها ابتدا با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی یک آنزیم سلولاز را (از یک گونه یا ارگانیسم) در محل کربن های دومین کاتالیزوری به یک آنزیم سلولاز دیگر (از گونه یا ارگانیسم دیگر) ادغام کردند ،که آنزیم سلولاز جدیدی سنتز شد . مطالعات این پژوهش نتایج دلگرم‌کننده‌ای را از ایجاد آنزیم‌های سلولاز پایدار و متحمل به حرارت شان داد.[۲-۶] به دلیل ضرورت استفاده انزیم سلولاز ترموفیل در صنایع مختلف من جمله تولید کاغذ و دستمال های بهداشتی، تولید دارو، مواد شیمیایی، سوخت‌های زیستی، مواد غذایی - آشامیدنی و سایر محصولات مصرفی ، این مطالعه با انجام روش های مقرون به صرفه آزمایشگاهی، روش های بیوانفورماتیکی و مهندسی پروتئین و رویکرد های محاسباتی پایداری ژن آنزیم سلولاز مزوفیلی را در دمای بالا افزایش داد ، تا قابل استفاده در شرایط خاص (دمای بالا) در صنایع گوناگون باشد.

۲- روش تحقیق

۲-۱ جمع آوری داده ها (بخش آزمایشگاهی)

در این تحقیق ابتدا تهیه نمونه از فلور میکروبی خاک اطراف چشمه های گوگردی تفتان ، به دلیل داشتن شرایط بیولوژیکی ویژه صورت پذیرفت . روش لیز سلولی باکتری *Acidothermus cellulolyticus* به منظور دستیابی به منظور آن انجام شد ، سپس روش استخراج DNA انجام گرفت ، به منظور کشت و تکثیر از ژنوم حاصل شده تکنیک PCR به کار برده شد. در نهایت برای شناسایی قطعه مورد نظر روش الکتروفورز استفاده گردید.

۲-۲ شناسایی ژن ها

فایل AB1 توالی فوروارد و ریورس 16srRNA و همچنین فایل AB1 توالی فوروارد و ریورس ژن آنزیم سلولاز که از انجام تست های آزمایشگاهی بدست آمده بودند ، جهت شناسایی به نرم افزار جینیوس پرایم Import شدند .

۲-۳ اسمبل ژن

طی گذراندن مراحل آزمایشگاهی قطعات 16srRNA و ژن آنزیم سلولاز بصورت قطعات فوروارد و ریورس بدست آمد با استفاده از نرم افزار جینیوس پرایم توالی فوروارد و ریورس 16srRNA و توالی فوروارد و ریورس ژن سلولاز اسمبل شد.

۲-۴ شناسایی باکتری مورد نظر

جهت شناسایی باکتری مورد نظر بر اساس ژن 16srRNA ، می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کرد. یکی از روش‌های معمول استفاده شده برای شناسایی باکتری‌ها بر اساس ژن 16srRNA ، سیکوئنسینگ مستقیم DNA با استفاده از تکنولوژی PCR است. در این روش، ابتدا DNA باکتری مورد نظر با استفاده از روش استخراج DNA از باکتری جدا شده و سپس با استفاده از پرایمرهای خاصی که بر اساس توالی‌های 16srRNA طراحی شده‌اند، قطعه‌ای از DNA شامل ژن 16srRNA تقویت گردید. سپس، DNA تقویت شده با استفاده از تکنولوژی سیکوئنسینگ DNA، به توالی‌های DNA تبدیل شد. در نهایت، توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از بانک‌های توالی ژنتیکی و نرم افزار های بیوانفورماتیکی مختلفی بررسی و مطابقت داده می‌شوند و پس از blast توالی 16srRNA باکتری مورد نظر شناسایی گردید.

۲-۵ شناسایی Locus

لوکوس (Locus) به معنی موقعیت ژنتیکی یک ژن یا مجموعه‌ای از ژن‌ها در ژنوم است. برای شناسایی لوکوس، ابتدا باید موقعیت ژنتیکی ژن مورد نظر را در ژنوم مشخص کرد. این موقعیت می‌تواند با استفاده از اطلاعات مربوط به توالی ژن، مسیرهای تنظیمی و سایر ویژگی‌های مرتبط با ژن، به‌دست آید. برای شناسایی لوکوس می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کرد. یکی از روش‌های معمول استفاده شده برای شناسایی لوکوس، استفاده از نرم‌افزارهایی است که در آن روش BLAST برای جستجوی توالی ژن مورد نظر در ژنوم صورت می گیرد . براساس انجام این روش توالی ژن آنزیم سلولاز را blast کرده و لوکوس مربوطه مشخص گردید.

۲-۶ شناسایی ORF

ORF به معنی "فریم باز" یا "منطقه کدگذاری شونده باز" است و به مجموعه‌ای از نواحی پی در پی در یک توالی ژنتیکی گفته می‌شود، که از نوع ترجمه‌پذیر (coding) هستند و باعث تولید پروتئین مورد نظر می‌شوند. برای شناسایی ORFها در توالی‌های ژنتیکی، می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کرد. یکی از این روش ها استفاده از ORF Finder نرم افزار های بیوانفورماتیکی است . در این روش اسمبل ژن آنزیم سلولاز ترجمه گردید و سپس از گزینه ی ORF Finder نرم افزار جینیوس پرایم توالی امینواسیدی ORF مشخص شد.

۲-۷ Blast توالی امینواسیدی ORF

BLAST یکی از ابزارهای بیوانفورماتیکی است که برای مقایسه توالی‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور یافتن توالی هایی که بیشترین درصد Identity و بیشترین درصد Coverage را با توالی انزیم سلولاز مورد نظر ما دارند از تکنیک Blast استفاده شد.

۲-۸ رسم درخت فیلوژنی

رسم درخت فیلوژنی یکی از روش‌های متداول در بیوانفورماتیک برای مطالعه و تحلیل روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها است. برای رسم درخت فیلوژنی، می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کرد . یکی از روش ها Alignment توالی مورد نظر با سایر توالی ها است . در این روش Alignment به منظور مقایسه امینواسیدی توالی هایی که بیشترین درصد Identity و Coverage را با توالی 16srRNA داشتند انجام شد. بر این اساس درخت فیلوژنی رسم گردید.

۲-۹ شناسایی Domain پروتئینی

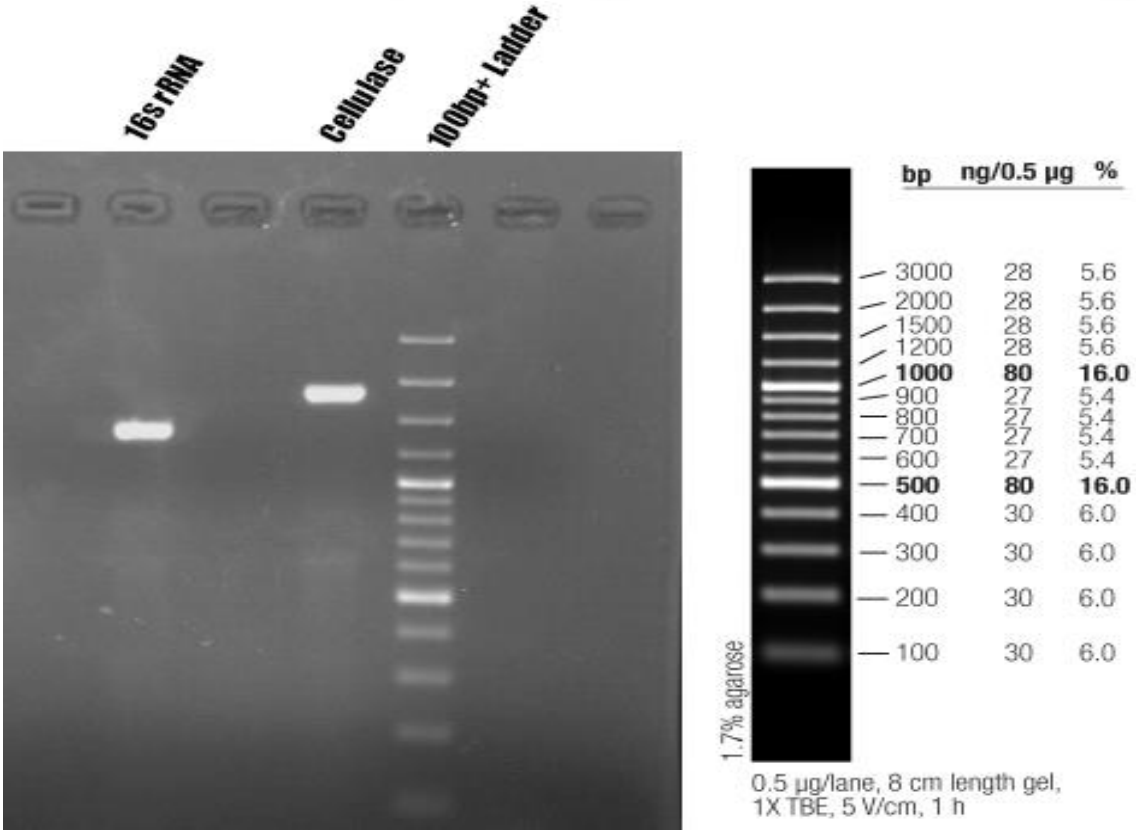
دومین‌های پروتئینی به مجموعه‌ای از قسمت‌های مستقل و قابل تمایز در ساختار پروتئینی گفته می‌شود که با وظایف مختلف در پروتئین‌ها سازگاری دارند. شناسایی دومین‌های پروتئینی می‌تواند به درک بهتر از ساختار و عملکرد پروتئین‌ها کمک کند. با استفاده از گزینه Find domain Inter Pro شناسایی جایگاه دومین آنزیم سلولاز و همچنین Signal peptide نمایان شد.

۲-۱۰ مدلسازی پروتئین مورد نظر

مدلسازی پروتئین یکی از روش‌های مورد استفاده در بیوانفورماتیک است که به کمک آن می‌توان ساختار سه بعدی پروتئین را پیش‌بینی و تحلیل کرد. در طی این روش سیگنال پپتید حذف شد و پروتئین بالغ شده بدست امد . توالی امینواسیدی پروتئین بالغ شده را در سرور Alphafold وارد کرده و سپس بر اساس روش blast شبیه ترین مدل موجود در سرور Alphafold به عنوان الگو در نظر گرفته شد و در نهایت با استفاده از نرم افزار Molsoft icm-pro همولوژی مدل پروتئینی مد نظر ما ساخته شد و به صورت فایل PDB خروجی حاصل شد . در مرحله بعدی به منظور سنجش کیفیت مدل از Save Server استفاده کرده و همچنین نمودار راماچاندران سلولاز مدلسازی شده رسم شد.

۳-نتایج

آنزیم های سلولاز باکتری *Acidothermus cellulolyticus* که در محیط اکستریم خاک اطراف چشمه گوگردی تفتان به زیست طبیعی خود ادامه می‌دهند ، دارای ویژگی های منحصر به فردی می‌باشند ؛ تاکنون مطالعه و پژوهشی در خصوص آنزیم های سلولاز چشمه های گوگردی تفتان صورت نگرفته است ، بدین منظور پس از انجام تکنیک های آزمایشگاهی مانند استخراج DNA و PCR توالی های 16srRNA و ژن انزیم سلولاز در تکنیک الکتروفورز شناسایی شدند.(شکل ۱).



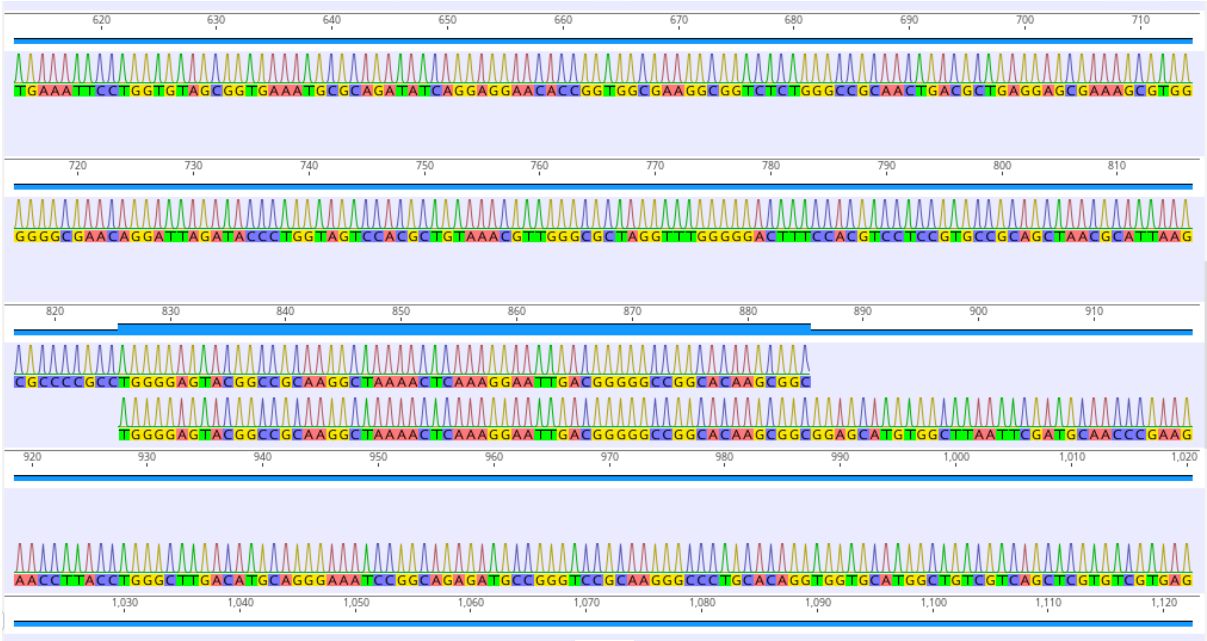
شکل۱: ژل الکتروفورز محصولات **PCR** ژن انزیم سلولاز و **16srRNA**

۳-۱ شناسایی ژن ها

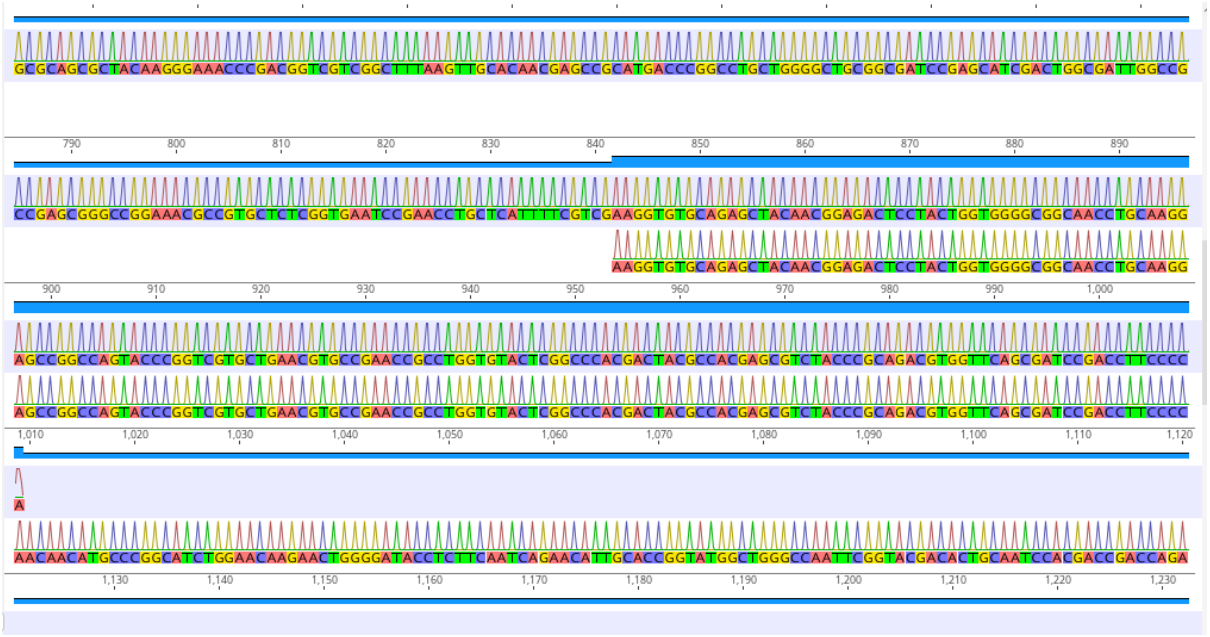
فایل AB1 توالی فوروارد 16srRNA شامل ۸۸۵ نوکلئوتید و توالی ریورس 16srRNA شامل ۶۰۶ نوکلئوتید بود . فایل AB1 توالی فوروارد ژن آنزیم سلولاز شامل ۱۰۰۹ نوکلئوتید و توالی ریورس ژن آنزیم سلولاز شامل ۱۰۴۷ نوکلئوتید بود

۳-۲ اسمبل ژن

اسمبل توالی فوروارد و ریورس 16srRNA توالی به طول ۱۴۳۱ نوکلئوتید و اسمبل توالی فوروارد و ریورس ژن آنزیم سلولاز توالی به طول ۱۸۸۸ نوکلئوتید حاصل گردید.(شکل۲ الف و ب).



(الف)



(ب)

شکل ۲ : الف) توالی 16srRNA و ب) توالی ژن انزیم سلولاز

۳-۳ شناسایی باکتری مورد نظر

پس از blast توالی 16srRNA اسمبل شده و انجام تست های مورفولوژی و مولکولی ، باکتری *Acidothermus cellulolyticus* حاصل شد. این باکتری گرم منفی بوده و گرمادوست و اسیدوفیل و سلولولیتیک است . بیشتر در شرایط اکسترمم مانند مناطق اتشفشانی یافت می شود .

۴-۳ شناسایی Locus

پس از blast توالی ژن انزیم سلولاز اسمبل شده ، لوکوس U33212 شناسایی شد . توالی U33212 دارای ۱۸۹۴ نوکلئوتید است . پس از ترجمه لوکوس U33212 پروتئینی با وزن مولکولی ۵۸۵,۲۱۱ کیلودالتون و با طول ۶۳۱ امینواسید ایجاد شد .

۵-۳ شناسایی ORF

ناحیه ORF (open reading frame) در توالی ژن آنزیم سلولاز یافت شد . ناحیه ORF توالی نوکلئوتیدی است که پس از ترجمه به پروتئین ، توالی امینواسیدی انزیم سلولاز مورد نظر ما را ایجاد کرد. طول توالی امینواسیدی انزیم سلولاز که شامل ۵۸۳ آمینواسید بود .

۶-۳ Blast توالی امینواسیدی ORF

در طی انجام این روش توالی WP-011719450 بیشترین درصد Coverage و Identity را به توالی ما داشت و به تعداد ۵ امینواسید با توالی ما فرق داشت ، در توالی آمینواسیدی سلولاز ما آمینواسیدهای پرولین ، گلوتامین ، لیزین ،گلوتامیک اسید و والین موجود بود اما در توالی WP-011719450 به ترتیب آمینواسیدهای گلایسین ، گلوتامیک اسید ، آسپارتیک اسید ، آسپارتیک اسید و متیونین وجود داشتند.

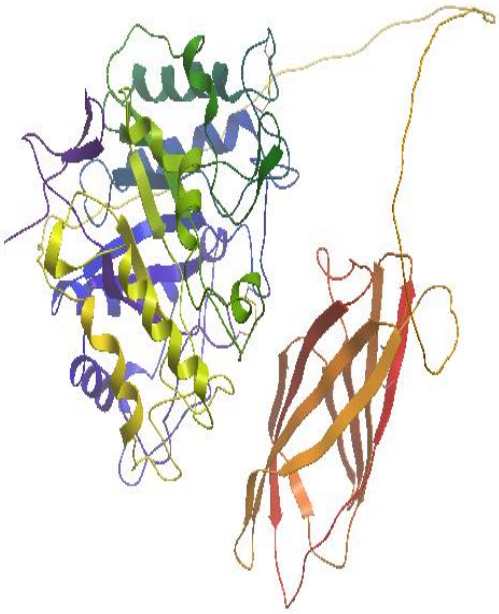
۷-۳ Inter Pro scan

توالی امینواسیدی انزیم سلولاز در دومین CBD2 قرار داشت و همچنین طول سیگنال پپتید مشخص شده ۶۱ امینواسید بود که به منظور بالغ شدن پروتئین حذف گردید. پس از حذف توالی سیگنال پپتید در نهایت ۵۲۲ آمینواسید حاصل شد که پروتئین بالغ است . پروتئین بالغ شده به منظور مدلسازی پروتئین مورد استفاده قرار گرفت.

۸-۳ مدلسازی سه بعدی پروتئین

پس از حذف توالی سیگنال پپتید ۶۱ آمینواسیدی از انزیم سلولاز ، توالی ۵۲۲ امینواسیدی انزیم سلولاز حاصل وارد سرور Alphafold شد . سپس blast به منظور یافتن شبیه ترین توالی به انزیم سلولاز صورت

گرفت . در سرور Alphafold توالی P54583 به عنوان الگو جهت مدلسازی انزیم سلولاز انتخاب شد . در مرحله بعدی توالی الگو P54583 وارد نرم افزار Molsoft icm-pro شد و در نهایت مدل همولوژی ساخته شد و به صورت فایل PDB خروجی گرفته شد. پس از مدلسازی کیفیت مدل با Save Server سنجیده شد که فاکتور کیفیت آن ۹۲ و تاییدیه مدل هم قبول گردید. در ادامه نمودار راماچاندران به منظور دانستن زوایای سای و فای هر یک از امینواسیدهای این ساختار رسم شد . نتایج حاصل از نمودار راماچاندران نشان داد که ۳۷۲ آمینواسید در ناحیه favoured هستند که یعنی دارای کمترین برخورد و پایداری بالا است. ۵۶ امینواسید در ناحیه allowable یعنی زوایای خود را دارا هستند. ۴ امینواسید در ناحیه نیمه مجاز و ۲ امینواسید در ناحیه غیر مجاز است. در ادامه موتاسیون های x100y ، q101w ، s212r ، d213w در انزیم سلولاز مشخص گشت (شکل ۴ ،۵ ،۶)



شکل ۴ : مدل همولوژی ساخته شده توسط سرورAlphafold

job #1344630: model_my_cellulase_model_trm.pdb [job link] [3D Viewer]

ERRAT Complete

Overall Quality Factor

92.0259

Results

VERIFY Complete

96.55% of the residues have averaged 3D-1D score >= 0.1

Pass

At least 80% of the amino acids have scored >= 0.1 in the 3D/1D profile.

Results

PROVE

Temporarily down at the moment

WHATCHECK Complete

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43
44 45 46 47 48 49

Results

PROCHECK Complete

Out of 9 evaluations

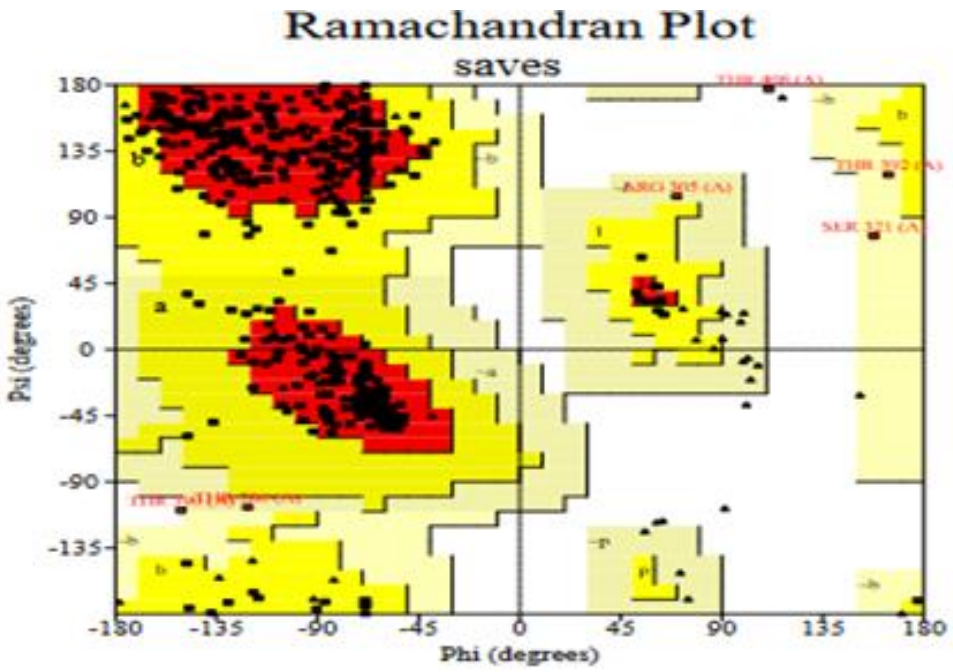
- Errors: 2
- Warning: 3
- Pass: 4

Results

OPEN

We are open to suggestions for a 6th program to operate in this window. If you know of a program that we could run locally on our server that would be most useful, please let us know: email holton at mbi dot ucla dot edu with your suggestion

شکل ۵: نتایج ارزیابی کیفیت مدل سلولاز با استفاده از SAVESv6.0



شکل ۶ : نمودار راماچاندران مدل همولوژی انزیم سلولاز ساخته شده توسط Alphafold

۴- بحث و نتیجه گیری

با توجه به بررسی ها و مطالعات صورت گرفته شده در خصوص موضوع مورد نظر، به ندرت به شناسایی ژن آنزیم سلولاز جهت پایداری حرارتی آن توسط روش های منطقی و رویکرد های محاسباتی پرداخته شده است در این مطالعه بهترین رویکرد های محاسباتی و تکنیک های ازمایشگاهی برای افزایش پایداری حرارتی آنزیم سلولاز بدون استفاده از روش های پرهزینه آزمایشگاهی و همچنین بهترین روش های بیوانفورماتیکی جهت مدلسازی توالی امینواسیدی پروتئین مورد نظر صورت گرفت و در ادامه با استفاده از ارزیابی نرم افزاری و آنالیز های ثانویه شامل داکینگ و دینامیک مولکولی پایداری حرارتی ژن آنزیم سلولاز را افزایش خواهیم داد تا بتوان در صنایع گوناگون از آنها بهره مند شد .

۵- منابع

1. Schmid, A., et al., *Industrial biocatalysis today and tomorrow.* nature, 2001. **409**(6817): p. 258-268.
2. Gilmore, S.P., et al., *Designing chimeric enzymes inspired by fungal cellulosomes.* Synthetic and Systems Biotechnology, 2020. **5**(1): p. 23-32.
3. Chalak, A., et al., *Influence of the carbohydrate-binding module on the activity of a fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenase on cellulosic substrates.* Biotechnology for biofuels, 2019. **12**(1): p. 1-10.
4. Koskela, S., et al., *Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) mediated production of ultra-fine cellulose nanofibres from delignified softwood fibres.* Green Chemistry, 2019. **21**(21): p. 5924-5933.
5. Crouch, L.I., et al., *The contribution of non-catalytic carbohydrate binding modules to the activity of lytic polysaccharide monooxygenases.* Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(14): p. 7439-7449.
6. Xia, L. and P. Cen, *Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry.* Process Biochemistry, 1999. **34**(9): p. 909-912.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

افزایش پایداری آنزیم استیل استراز با استفاده از روش های زیست شناسی محاسباتی

علی ابوالحسن زاده۱، میلاد لگزیان۲

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی ، دانشگاه سیستان و بلوچستان (Email: a.abolhasani7310@gmail.com)

۲. دانشیار گروه زیست شناسی ، دانشگاه سیستان و بلوچستان (Email: m.lagzian@science.usb.ac.ir*)

نویسنده مسئول: میلاد لگزیان، دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان
Email: m.lagzian@science.usb.ac.ir

چکیده

مهندسی پروتئین فرآیند توسعه پروتئین‌های با ارزش و مفید است و رشته ای با حوزه تحقیقاتی فراوان محسوب می‌شود. این تحقیقات عمدتاً به منظور درک فولدینگ (تاشدگی) پروتئین‌ها و شناخت اصول طراحی پروتئین انجام شده است، مهندسی پروتئین همچنین بازار گسترده‌ای از محصولات و خدمات را دارا می باشد، آنزیم ها اغلب پروتئین هایی هستند که به عنوان کاتالیزورهای بیولوژیکی عمل می‌کنند. کاتالیزورها سرعت واکنش های شیمیایی را افزایش می‌دهند و آنزیم های صنعتی، آنزیم هایی هستند که به صورت تجاری در انواع صنایع مانند صنایع دارویی، مواد شیمیایی، سوخت‌های زیستی، مواد غذایی و آشامیدنی و محصولات مصرفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. *Trichoderma harzianum* یک قارچ آسکومیست و مزوفیل است که در محیط های مختلف یافت می شود و از آن جایی که این قارچ یک موجود مزوفیل است و موجودات مزوفیل دمای رشد بهینه پایینی دارند پس آنزیم های آن نیز در دماهای پایین فعالیت بهینه خود را دارند و در نتیجه در شرایط سخت صنعتی که شامل دماهای بالاست عملکرد خود را از دست می دهند، در این تحقیق ما با رویکردی محاسباتی موفق به طراحی یک آنزیم مهندسی شده با انجام ۴ جهش تثبیت کننده در این موقعیت ها شدیم: D29W, D75C, S77R, D278، آنزیم جدید تا ۱۳,۵۵ (Kcal/mol)- پایدارتر از آنزیم بومی است.

کلمات کلیدی: استیل استراز، مهندسی آنزیم، پایدارسازی گرمایی، زیست شناسی محاسباتی

Abstract

Protein engineering is the process of developing valuable and useful proteins and is considered as a major with many research fields. These researches is mainly done to understand the folding state of proteins and to understand the principles of protein design. Protein engineering also has a wide market of products and services. Enzymes are often proteins that act as biological catalysts. Catalysts increase the speed of chemical reactions and industrial enzymes are those that are used commercially in a variety of industries such as pharmaceuticals, chemicals, biofuels, food and beverages, and consumer products. *Trichoderma harzianum* is an ascomycetic and mesophilic fungus that is found in different environments and since this fungus is a mesophilic organism and mesophilic organisms have a low optimal growth temperature, then its enzymes also have their optimal activity at low temperatures and as a result, they lose their performance in harsh industrial conditions that include high temperatures. In this research, with an in silico approach, we managed to design an engineered enzyme by performing 4 stabilizing mutations in these positions,: D29W, D75C, S77R, D278. The new enzyme is more stable by -13.55 (Kcal/mol) rather than the native enzyme.

Keywords: Acetyl Esterase, Enzyme Engineering, Thermostabilization, Computational Biology

۱- مقدمه

از گذشته آنزیم ها در تولید مواد غذایی و هم چنین نوشیدنی ها مورد استفاده قرار می گرفتند[۱]. در طی دهه های اخیر، کاربرد آنزیم های مختلف در قسمت های مختلف صنعت از جمله صنایع مواد غذایی، نساجی و چرم، صنعت تولید کاغذ، آرایشی و بهداشتی، داروسازی و نیز انرژی های زیستی[1] گسترش زیادی یافته است [۲]. حال گاهی اوقات آنزیم های استخراج شده از منابع طبیعی و به شکل اولیه خود خواص مطلوبی ندارند که دانشمندان و محققان را وادار به جستجوی آنزیم های جدید می کند[۳]. از آن جایی که انواع آنزیم های مقاوم در برابر حرارت اغلب به صورت طبیعی در دسترس نیستند، افزایش پایداری حرارتی آنزیم های مورد نیاز بخش های صنعتی یک هدف بسیار مهم در مهندسی پروتئین است. استراتژی های مهندسی پروتئین برای افزایش پایداری را می توان با ایجاد جهش در ساختار پروتئینی با رویکردهایی که شامل بیوانفورماتیک و طراحی محاسباتی است، بهبود بخشید و اغلب با انجام تجزیه و تحلیل و محاسبات بیوانفورماتیکی بر روی توالی، می توان موقعیت و ماهیت جهش های پایدار کننده را پیش بینی کرد[۴].

در روش طراحی محاسباتی رویکرد مهندسی پروتئین شامل جهش زایی مستقیم[2] (SDM) در ساختار پروتئین‌ها می‌شود. در این شیوه با دانش قبلی که درباره ساختار مد نظر، عملکرد و مکانیسم پروتئین هدف که باید مهندسی شود داریم ، جهش (های) ژنی برنامه ریزی شده در پروتئین ایجاد میشود که به دنبال آن در یک میزبان مناسب بیان می شود. سودمندی این روش در این است که تعداد گونه های جهش یافته حاصل تا حد زیادی کم شده و در نتیجه احتمال دستیابی سریع تر به جهش های مفید به طور چشم گیری بهبود می یابد و از آن جایی که معمولا خواص آنزیم های نوع وحشی به صورت کامل جوابگوی نیاز صنعتی نیست، آنزیم های موجود تا حد زیادی برای بهبود پایداری حرارتی[3] و افزایش راندمان کاتالیزوری[4] مهندسی شده اند[۵].

۱-۱ Acetyl Esterase

T. harzianum IOC-3844 یک سویه برزیلی از قارچ مد نظر ماست و زمانی که توسط عده ای از محققان کشت داده شد، متوجه سطوح بالایی از فعالیت اندوگلوکاناز[5] شدند و مشخص شد که این سویه ویژگی‌های مناسبی را برای کاربرد در هیدرولیز سلولز نشان می‌دهد[۶].

[1] Bioenergy sectors
[2] Site-directed mutagenesis
[3] Thermal stability
[4] Catalytic efficiency
[5] Endoglucanase

Aline Crucello و همکارن ۶ ناحیه ژنومی از این قارچ را بررسی کردند و ژن های موجود را تجزیه و تحلیل کردند و یک آنزیم کربوهیدرات استراز (CE) را از خانواده ۱۶ شناسایی کردند، **یک استیل استراز (EC 3.1.1.6)** که هیدرولیز گروه های جانبی استیل از گلوکورونوزایلان[1] را بر عهده دارد و بنابراین در تجزیه زیستی زایلان[2] نقش ایفا می کند[۷] (شکل ۱).

۱-۲ صنعت تولید کاغذ

پروسه تولید خمیر کاغذ که در آن چوب های تیکه شده در محلول های شیمیایی در دمای بالا قرار می گیرند و در نهایت منجر به تجزیه و حل شدن لیگنین[3] می‌شود. خمیر کاغذ به دست آمده در طی این فرآیند قهوه ای رنگ است و میزان این رنگ تابعی از میزان و حالت شیمیایی لیگنین به جا مانده است که باید طی فرآیندی تحت عنوان رنگ زدایی حذف شود. با هیدرولیز زایلان موجود در ترکیب حاصل آزاد سازی لیگنین از خمیر کاغذ ممکن می شود. رنگ زدایی با استفاده از عوامل زیستی یا آنزیم ها سطح استفاده از کلر که یک ماده شیمیایی است را به عنوان عامل رنگ زدا کم کرده و بنابراین، آلودگی محیط زیست توسط هالوژن های آلی کاهش می یابد و همچنین سفیدی و بهبود خمیر کاغذ را ثمر می بخشد[۸].

۱-۳ ضرورت انجام تحقیق

از آنجایی که این قارچ ویژگی های مناسبی را برای هیدرولیز زیست توده از خود نشان داده است[۹]، زایلاناز های آن ، میتوانند گزینه خوبی برای استفاده در صنایع تولید کاغذ و فرآورده های آن باشد، اما این قارچ یک موجود مزوفیل است، پس در نتیجه فعالیت بهینه آنزیم های تولیدی توسط این گونه نیزدر دمای پایین است و در شرایط سخت و استفاده های صنعتی که شامل دماهای بالا است تاشدگی[4] طبیعی خود را از دست داده و غیر فعال میشود.

هدف انجام این تحقیق افزایش پایداری کلی این آنزیم است تا بتواند در شرایط سختی که شامل دماهای بالاست نیز فعالیت بهینه خود را داشته باشد.

[1] Glucuronoxylan
[2] Xylan
[3] Lignin
[4] Folding

۲- روش تحقیق

۲-۱ جمع آوری داده ها

فایل FASTA ناحیه ژنومی مورد نظر[1] از نتیجه کار پژوهشی Crucello و همکارن (۲۰۱۵) و با ارجاع به پایگاه داده NCBI و با طولی در حدود ۱۴۷ Kbp به دست آمد.

۲-۲ شناسایی ژن ها

فایل FASTA به صورت خام وارد نرم افزار Geneious Prime 2021.1.1 (https://www.geneious.com) شد و در ادامه ژن های این ناحیه ژنومی با استفاده از پلاگین Augustus که ابزاری برای شناسایی ژن ها در توالی های نوکلئوتیدی یوکاریوتی است، شناسایی و مورد تجزیه و تحلیل به منظور یافتن توالی ژنی آنزیم مورد نظر قرار گرفتند.

۲-۳ ترجمه ژن موزد نظر به پروتئین

توالی نوکلئوتیدی مورد نظر با استفاده از گزینه Translate نرم افزار Geneious Prime و با Genetic code استاندارد (Taxonomy browser (Trichoderma harzianum IOC 3844) (nih.gov)) به توالی پلی پپتیدی ترجمه شد.

۲-۴ شناسایی دومین های پروتئین

ابزار Interproscan در نرم افزار Geneious Prime به منظور شناسایی دومین های توالی پلی پپتیدی به دست آمده استفاده شد.

۲-۵ مدل سازی پروتئین مورد نظر

پس از شناسایی دومین ها، توالی پلی پپتیدی به دست آمده وارد نرم افزار UCSF ChimeraX شد و در ادامه توسط سرور AlphaFold مدل سازی سه بعدی آن انجام شد.

[1] GenBank accession number : KM555250

۲-۶ ارزیابی کیفیت مدل ساخته شده و بهبود ساختار

فایل PDB به دست آمده از نتیجه مدل سازی پروتئین ما توسط سرور SAVES v6.0 (SAVESv6.0 - Structure Validation Server (ucla.edu)) و در ادامه در نرم افزار YASARA View توسط پلاگین FoldX 5.0 و به وسیله ابزار Stability Of Object به منظور ارزیابی کیفیت مورد بررسی قرار گرفت و سپس کیفیت مدل پروتئینی موجود توسط ابزار Repair Object پلاگین Foldx 5.0 که با باز آرایی زنجیره های جانبی آن ها را در بهترین حالت ممکن خود قرار می دهد تا پایداری ساختار افزایش پیدا کند، بهبود یافت.

۲-۷ Alignment ساختار سه بعدی به دست آمده و شناسایی رزیدو های کلیدی

Alignment فضایی ساختار سه بعدی نهایی توسط DALI Server انجام شد تا مشابه ترین ساختار از نظر فرم فضایی به پروتئین مد نظر ما ب دست آید و سپس با مقایسه ساختار سه بعدی پروتئین مورد پژوهش ما با مشابه ترین ساختار حاصل از DALI Server رزیدو های کلیدی ساختار شناسایی و مشخص شدند.

۲-۸ Alanine Scanning

در این مرحله با استفاده از نرم افزار BIOVIA Discovery Studio 2018 و گزینه Calculate Mutation (Stability) Energy و استفاده از تنظیمات آن به صورت temperature-dependent calculations که بر روی ۶۰ درجه سانتی گراد تنظیم و به صورت pH-independent mode و forcefield که بر روی CHARMm Polar H قرار گرفت، تمامی ۳۱۸ آمینو اسید ساختار به صورت جهش تک نقطه ای به آمینواسید Alanine (Alanine Scanning) تبدیل شد تا بهترین موقعیت ها در ساختار برای ایجاد جهش های پایدار کننده شناسایی شود و موقعیت دقیق آن دسته از جهش هایی که اثر پایدار کننده ای بر روی ساختار دارند (دارای انرژی جهش منفی هستند) شناسایی شد و در ادامه آمینو اسید موجود در هرکدام از این موقعیت ها به ۲۰ آمینو اسید دیگر جهش داده شد تا در تک تک این موقعیت ها آمینواسیدی که بیشترین اثر پایدار کننده را دارد مشخص گردد.

۲-۹ ساخت آنزیم جهش یافته و بررسی اثرات کلی جهش های ایجاد شده بر پایداری ساختار

در نهایت با استفاده از گزینه Build Mutant نرم افزار BIOVIA Discovery Studio 2018 آنزیم جهش یافته نهایی ساخته و فایل PDB حاصل برای بررسی اثرات جهش ها از نرم افزار دریافت و در ادامه با استفاده از ابزار Repair Object پلاگین FoldX 5.0 مجدد زنجیره های جانبی آمینواسید ها باز آرایی و سپس با استفاده مجدد از ابزار Stability of object میزان پایداری آنزیم جهش یافته[1] بررسی شد.

[1] Mutant Enzyme

۳- نتایج

۳-۱ شناسایی ژن آنزیم مورد نظر در توالی و ترجمه آن به توالی پلی پپتیدی

پس از شناسایی ژن های موجود در توالی ناحیه ژنومی مد نظر ما که با استفاده از پلاگین Augustus شناسایی شده بودند، با استفاده از ابزار BLAST ، توالی ژنی که بیشترین شباهت را به دیگر آنزیم های استیل استرازهای موجود در پایگاه NCBI داشت مشخص و در نتیجه ژن شماره ۹ با طول ۱۳۱۷ bp به عنوان ژن آنزیم استیل استراز تولید شده توسط این قارچ شناسایی شد و در ادامه با استفاده از گزینه Translate به توالی پلی پپتیدی با طول ۳۴۸ آمینواسید ترجمه گشت (شکل ۱).

۳-۲ شناسایی Signal Peptide

نتایج حاصل از بررسی توالی پلی پپتیدی توسط Interproscan نشان داد که ۱۷ آمینواسید اول نقش Signal Peptide را

دارند و آمینواسید های شماره ۲۹ تا ۳۴۶ به عنوان بخش اصلی ساختار هیدرولازی آنزیم عمل میکنند (شکل ۱و ۲).

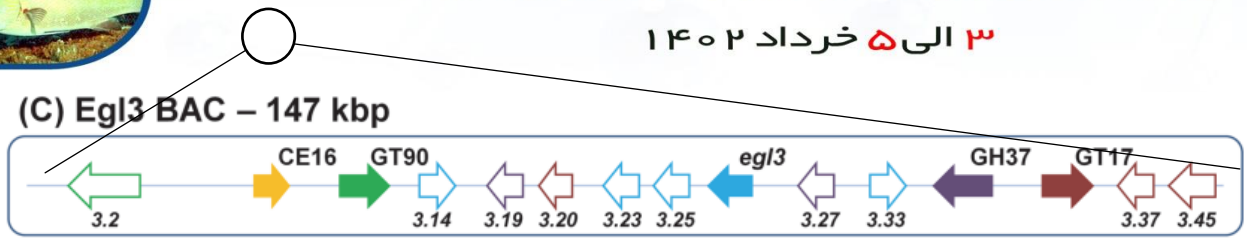
۳-۳ مدل سازی سه بعدی ساختار

پس از حذف Signal Peptide، توالی ۳۱۸ تایی حاصل برای مدل سازی سه بعدی با سرور Alpafold وارد نرم افزار ChimeraX شد و نتیجه مدل سازی سه بعدی به صورت یک فایل PDB از نرم افزار خروجی گرفته شد (شکل۳-الف).

۳-۴ کیفیت مدل ساخته شده

نتیجه بررسی کیفیت مدل ساخته شده به وسیله سرور SAVES برای پارمتر های ERRAT و VERIFY 3D به ترتیب برابر است با: (Overall Quality Factor) ۹۳,۱۵۹۶ و ۸۳,۳۳ ٪ و به وسیله ابزار Stabity of object پلاگین FoldX 5.0 برابر است با : (kcal/mol) ۸۳,۷۶ که پس از Repair توسط FoldX این اعداد به ترتیب برابرند با:

(overall quality Factor) ۹۳,۴۸۵۳ و ۸۳,۹۶ ٪ و (kcal/mol) ۳۶,۱۷- که این اعداد نشان دهنده بهبود کیفیت ساختار سه بعدی ما پس از Repair هستند.

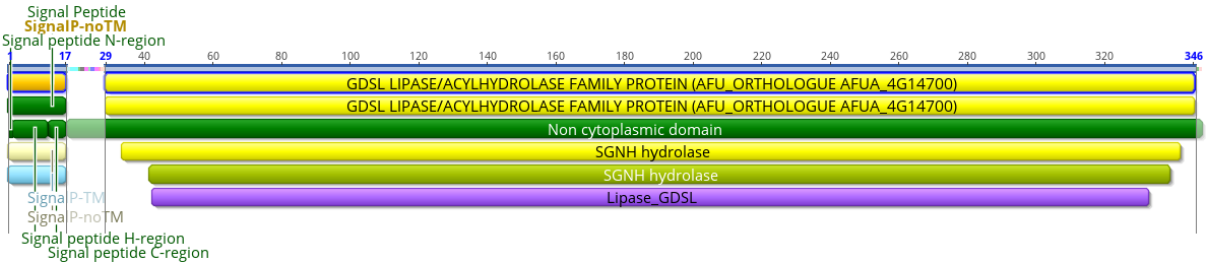


ATGCTGTTACTTTCTATTCTCCCTTTTGCGGCGGCTAGCATGGTTAGTGCTCGAAACAATTATGCCG
AGATTAAGGAGCTATCAAGCAGTAATAAGCATTCTTGGTTTGGAGGCAAATTCAAAAACCTTGTTG
TCTTTGGAGACAGTTACACAGATGAATCGAGGTTGGATTATTTCACAGCCCATAATAATACGCCTC
CACCGGTGGGCTTACTGCTTCCTGAGTCCCTCGATGCTTCTGATGGCGGACGCGTTTGGCCTAGGT
GTATGCATTACCCATTGAAACTCTACTATGCAGAAGAATTATTTAACATATGAGGAAAAGATGTCA
GCCAATACTCAGGCGCAAAGCTTTACAATTACGCCATCGCTAGCGGGATATGTCGGTAATCCTTTG
CACTTTACCCAGAATCTGTTGCGAGAGAACATACAGTAATGACGAAGGCTAAATATACGTCCGATT
AGGCACAACAAGCATCATGCCACAGGCCAGAGCAACTCTCAAGGACCTTTCTGCAGCTATTTTAG
AAACGGAGATGCCTGCTTGGCTCGCTGAGTTGCATTTAACGAGTGCCGTCTCACCACATCAAAAGT
TTTACACCGGCTCAGCCGATGACACTCTATATGCCATGTGGATTGGCGTCAACGACATTGGCAAGA
AGAACATATTCATTGATAGCCAGACTACTGGAACTTCGCTCACAACTTTTACTGATTGTGTGTTCAC
CGCTTTTGATCGCATCTATAAAAATGGTGGGCGGAAGTTTGTGTTGATGAATGTTCCCCCGCTTGA
GCTGCATCCGATCTACGCGACGCCTGAAAAAAAAGGAGTTCCCCCAGGCACACCGGATTGGCCAA
ATAAGCCGTCTAACCTAACCGAGGTTTCTTTTAAGATGTATGAATATACGAGTGCAGTGAATGAGA
TCTCCAAGTTCCAAGTCCCGTTCCAGCAACACGTTGCCAAGAGGTATCCTGGTGCTAAGTGGGCAA
TCTATGGTGAGCAAGAGCTTATTCTCTCGTTAAAGCCTTTTTAGTATTGGCTAATTGACTTTAATAT
GACTTTTAGATGTAAACTCTTTATTTAAAGATATCCATCGGAACCCGCAAAAGTATCTAAACGGCA
CAACACCTCTGGATGTACTCGACTTTATACACCATTGCGAGGCGGGCGCGGCAAATTGTACGGATT
TACCGGGCGATAGAGATTCGTTCATGTTCTATGACTCGCTTCATCCTTCTGAACAAGTCCACCGTGT
AGTAGCTCAGAATTTTATGGACGTGATCAATGGCGGGAGTAAATTCGCGACTTATTGGTAG
(Length: 1317 bp)

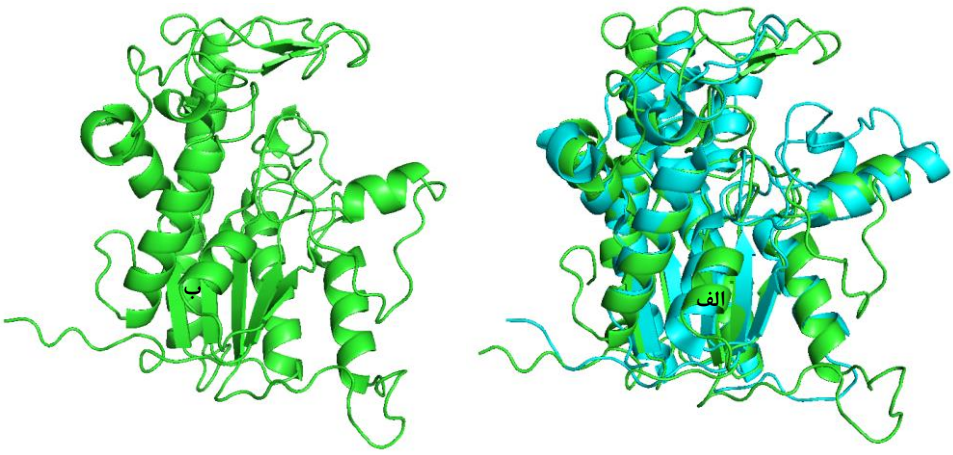
Translate to Protein

MLLLSILPFAAASMVSARNNYAEIKELS**SSNKHSWFGGKFKNLVVFGDSYTDESRLDYFTAHNNTPP**
PVGLLLPESLDASDGGRVWPRTTSIMPQARATLKDLSAAILETEMPAWLAELHLTSAVSPHQKFY
TGSADDTLYAMWIGVNDIGKKNIFIDSQTTGTSLTTFTDCVFTAFDRIYKNGGRKFVLMNVPPLE
LHPIYATPEKKGVPPGTPDWPNKPSNLTEVSFKMYEYTSAVNEISKFQVPFQQHVAKRYPGAKW
AIYVNSLFKDIHRNPQKYLNGTTPLDVLDFIHHCEAGAANCTDLPGDRDSFMFYDSLHPSEQVHR
VVAQNFMDVINGGSKFATYW (Length: 348 aa)

"شکل ۱ : مدل شماتیک ناحیه ژنومی آنزیم مورد پژوهش در ژنوم سویه قارچی مد نظر به همراه ژن های تنظیم کننده آن"



"شکل ۲ : نتیجه حاصل از بررسی توالی پلی پپتیدی با ابزار Interproscan"



"شکل ۳: طرح شماتیک مدل پروتئینی ساخته شده توسط سرور **Alphafold** (الف) و **Alignment** ساختاری مدل پروتئینی استیل استراز ساخته شده به وسیله **Alphafold** (سبز) با استیل کولین استراز باکتریایی با کد **6UQZ** (فیروزه ای) (ب)"

۳-۵ مشابه ترین ساختار سه بعدی به مدل پروتئینی ما

نتایج حاصل از ارسال ساختار مدل شده به DALI Server نشان دهنده این است که مشابه ترین ساختار به پروتئین ما پروتئینی با کد 6UQZ است که یک استیل کولین استراز باکتریایی است که با وجود اینکه فقط ۱۶ ٪ تشابه توالی با مدل ما دارد اما Z-Score ای برابر با ۲۷,۱ و rmsd برابر با ۲,۴ Å نشان میدهد.

۳-۶ Alignment ساختاری دو توالی و شناسایی رزویدو های کلیدی

مقایسه ساختار Alighn شده مدل پروتئینی ما و ساختار 6UQZ (شکل ۳-ب) نشان میدهدکه این دو ساختار رزیدو های کلیدی تقریباً مشابهی دارند که در نتیجه این مقایسه رزویدو های کلیدی ساختار مدل شده ما که حاصل مقایسه ساختاری آن با پروتئین 6UQZ است به ترتیب عبارت اند از (شکل ۴-الف) :

Ser 21 (Catalytic), Tyr 22, Val 120, Asn 121, Gly 124, Asp 290 (Catalytic), Leu 292, His 293(Catalytic)

۳-۷ Alanine Scannig و شناسایی جهش های پایدار کننده ساختار:

در نتیجه Alanine Scanning، ۹ موقعیت مناسب برای ایجاد جهش های پایدار کننده (دارای انرژی جهش منفی) در ساختار شناسایی شد که این ۹ موقغیت عبارت ند از:

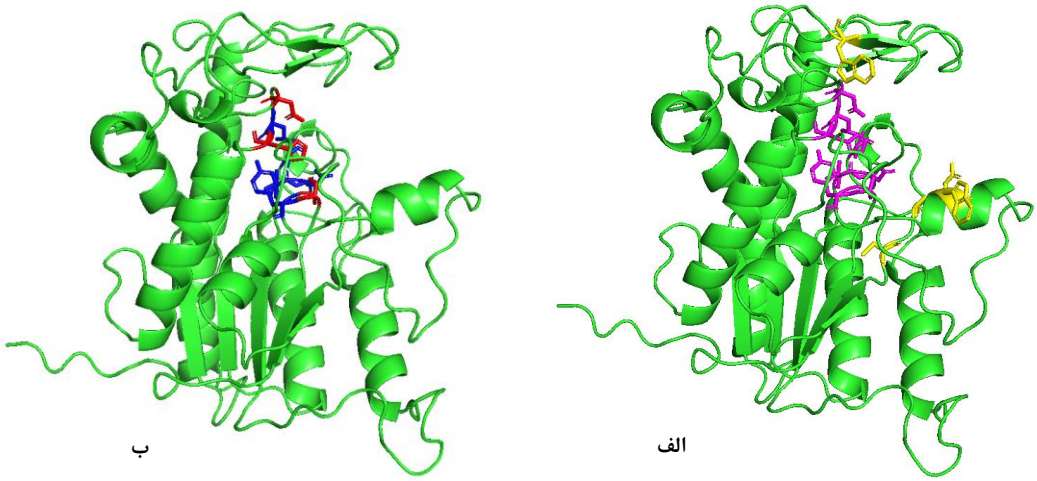
Asp 29, Asp 50, Asp 75, Ser 77, Asp 122, Asp 131, Asp 278, Asp 284, Gly 313

سپس هر کدام از این ۹ موقعیت به ۲۰ آمینواسید دیگر جهش داده شدند و انرژی جهش برای تک تک این تغییرات حساب شد و در نهایت با ساختن آنزیم های جهش یافته بسیار متعدد و با توجه به این موضوع که

تلاش بر این است تا با کمترین میزان ایجاد جهش به پایدار ترین حالت ممکن برسیم ۴ جهش زیر به عنوان پایدار کننده ترین جهش ها در ساختار شناسایی شدند (شکل ۴-ب) :

D278W (Mutation Energy: -4.06), D29W (Mutation Energy: -3.62), D75C (Mutation Energy: -3.12), S77R (Mutation Energy: -2.89)

همچنین جهش D122I نیز اثر پایدار کننده مطلوبی بر روی ساختار ما دارد اما از آن جایی که این رزیدو دقیقا در مجاورت Asn 121 که یک رزیدوی کلیدی است، قرار گرفته فعلا از ایجاد جهش در این ناحیه صرف نظر میکنیم.



"شکل ۴: رزیدو های کلیدی پروتئین مدل شده، کاتالایتیک (قرمز) و سایر رزیدو های کلیدی (آبی) (الف) و رزیدو های کلیدی (این بار همه به رنگ ارغوانی) و ۴ رزیدو جهش یافته به منظور بهبود پایداری ساختار(زرد) (ب)"

۸-۳ ارزیابی پایداری آنزیم جهش یافته

پس از ایجاد جهش های مورد نظر در ساختار و ساخت آنزیم جهش یافته مد نظر فایل PDB خروجی آن گرفته و مجدداً به وسیله ابزار repair object پلاگین FoldX 5.0 زنجیره های جانبی ساختار را بازآرایی و در نهایت با استفاده از ابزار Stability of object پایداری ساختار را بررسی و در نهایت به عدد (Kcal/mol) ۴۹,۷۲- رسیدیم.

۴- بحث و نتیجه گیری

ما در این تحقیق و تا به اینجای کار موفق شدیم صرفاً با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی و محاسباتی پایداری آنزیم استیل استراز تولید شده توسط گونه قارچی *T. harzianum IOC-3844* را بر روی کاغذ بهبود ببخشیم به طوری که در ابتدا پایداری گونه وحشی عددی معادل (kcal/mol) ۳۶,۱۷- بود که با ایجاد جهش های هدفمند به عدد (Kcal/mol) ۴۹,۷۲- رسید که بهبود (Kcal/mol) ۱۳,۵۵- را نشان می دهد. این آنزیم میتواند یک گزینه امیدوار کننده در صنعتی مثل صنعت تولید کاغذ باشد و جایگزینی بی خطر برای مواد شیمیایی مضری مثل کلر باشد.

۵- قدردانی

با احترام فراوان به جناب آقای دکتر میلاد لگزیان، نویسنده مسئول طرح و استاد راهنمای پروژه

منابع

1. Elyasi Far, B., et al., *Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives.* Adv Pharm Bull. **10**(3): p. 350-358.
2. Raveendran, S., et al., *Applications of Microbial Enzymes in Food Industry.* Food Technol Biotechnol, 2018. **56**(1): p۳۰,-۱۶ .
3. Kumar Awasthi, M., et al., *Metagenomics for taxonomy profiling: tools and approaches.* Bioengineered, 2020. **11**(1): p. 356-374.
4. Wijma, H.J., R.J. Floor, and D.B. Janssen, *Structure- and sequence-analysis inspired engineering of proteins for enhanced thermostability.* Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(4): p. 588-94.
5. Sinha, R. and P. Shukla, *Current Trends in Protein Engineering: Updates and Progress.* Curr Protein Pept Sci, 2019. **20**(5): p. 398-407.
6. de Castro, A.M., et al., *Trichoderma harzianum IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β-glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin.* Appl Biochem Biotechnol, 2010. **162**(7): p. 2111-22.
7. Crucello, A., et al., *Analysis of genomic regions of Trichoderma harzianum IOC-3844 related to biomass degradation.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122122.
8. Zhu, D., Q. Wu, and N. Wang, *3.02 - Industrial Enzymes*, in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, M. Moo-Young, Editor. 2011, Academic Press : Burlington. p. 3-13.
9. Ahmed, S., et al., *Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from Trichoderma harzianum and Chaetomium thermophilum.* Electronic Journal of Biotechnology, 2012. **15**: p. 717-3458.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ترکیبات مؤثره عصاره گیاه دارویی اکینوفورا پلتی لوبا (خوشاریزه)

مرضیه تقی پور دهکردی*[۱]، سجاد قاراخانی ده سرخی[۱]
۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
(Biology1818@gmail.com)

چکیده

اکینوفورا از تیره چتریان از گیاهان دارویی مهم است که در صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارد. گیاهی از خانواده چکیده مقاله در این محل نوشته شود. در این تحقیق ترکیب‌های شیمیائی اسانس اکینوفورا پلتی لوبا منطقه در آذربایجان شرقی مورد بررسی قرار گرفته است. سرشاخه‌های گل‌دار گونه‌های یاد شده در بهار سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری و در شرایط آزمایشگاه خشک شد. اسانس گیری به روش کلونجر انجام و برای شناسائی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس، از دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی(GC) و گاز کروماتوگرافی متصل شده به طیف‌سنج جرمی(GC/MS) و جهت عصاره گیری نیز روش پرکولاسیون انجام شد (عصاره متانولی) .برای این تحقیق باکتری های اشرشیاکلی (گرم منفی)، پسودوموناس آئروژینوزا (گرم مثبت) ، استافیلوکوکوس آرئوس (گرم مثبت)، لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم (گرم منفی) با انجام کشت جداسازی، خالص‌سازی و از طریق PCR شناسایی گردید. تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) در پلیت استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد. یافته‌ها نشان داد لیستریا مونو سایتوژنز و استافیلوکوکوس آرئوس (گرم مثبت) حساسترین باکتری ها در مقابل اسانس و عصاره بودند. اثر ضد قارچی عصاره متانولی گیاه خوشاریزه بر کاندیدا آلبیکنس نشان داده شد. عصاره در برابر باکتری های گرم منفی غیر مؤثر بود. همچنین تجزیه اسانس نشان داد بیشترین ترکیبات بدست امده شامل اسیمن (۲۷/۶۶ در صد) و گاما ترپینن (۹/۷۷ درصد) بودند. ترکیبات عصاره شامل اسیمن، متانول، آلفا پی ان و گاما دود کانولاکتون بود. با توجه به نتایج بدست آمده پتانسیل ضد باکتریایی و ضد قارچی گیاه دارویی مورد بررسی آشکار گردید.

کلمات کلیدی: خوشاریزه، ضد باکتریایی، اسانس، اسیمن

Investigating the antibacterial activity and effective compounds of Echinophora peltiloba medicinal plant extract (Khusharize)

Marziyeh Taghipour Dehkordi*[1], Sajjad Gharakhani Deh Sorkhi[1]
1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Abstract

Echinophora is an important medicinal plant that is used in the food and pharmaceutical industries. A plant from the family of the abstract of the article should be written in this place. In this research, the chemical composition of Echinophora pletiloba essential oil in the region of East Azerbaijan has been investigated. The flowering branches of the mentioned species were collected in the spring of 1400 and dried in laboratory conditions. Essential oil extraction was done by Cloninger method and gas chromatography (GC) and gas chromatography connected to mass spectrometer (GC/MS) devices were used to identify the components of essential oil. For this research, Escherichia coli (Gram negative), Pseudomonas aeruginosa (Gram positive), Staphylococcus aureus (Gram positive), Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium (Gram negative) were isolated, purified and identified through PCR. Determining the minimum inhibitory concentration (MIC) was done in a sterile plate using the broth microdilution method. The findings showed that Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus (gram positive) were the most sensitive bacteria against essential oil and extract. The antifungal effect of the methanolic extract of Khosharizah plant was shown on Candida albicans. The extract was ineffective against Gram-negative bacteria. Also, the analysis of the essential oil showed that the most obtained compounds were acemene (27.66 percent) and gamma-terpinene (9.77 percent). The components of the extract included O-cymen, methanol, alpha P-N and gamma dod canolactone. According to the obtained results, the antibacterial and antifungal potential of the investigated medicinal plant was revealed..

Keyword: Echinophora peltiloba, Antibacterial, essential oil, O-Cymen

مقدمه

Echinophora گیاهی است علفی، چند ساله و معطر از خانواده Apiacea که ارتفاع آن حدود ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی متر است. دارای ساقه استوانه ای بدون کرک با برگ های سوزنی شکل است. خانواده Apiaceae در طب سنتی برای التیام زخم در بین مردم و درمان زخم معده استفاده می‌شود به ویژه به واسطه وجود خواص ضد قارچی، ضد نفخ و گوارشی آن. مطالعات همچنین نشان داده است که جنس اکینوفورا حاوی فعالیت آنتی اکسیدانی قوی با محتوای فنلی است. چهار گونه علفی، چند ساله و معطر اکینوفورا در ایران یافت می شود [۱]. دو گونه platyloba و cinerea بومی ایران هستند و دو گونه دیگر یعنی sibthorpiana و orientalis علاوه بر ایران در آناتولی، ارمنستان، روسیه، ترکمنستان، افغانستان، بالکان، کرت، قبرس و سوریه می‌رویند همچنین دارای گل های چتری کوچک و زرد رنگ با گل آذین و ریشه های مخروطی شکل است. علاوه بر این، میوه های آن حاوی دانه های کوچک است. این گیاه در مناطق بالای ۱۵۰۰ متر یافت می شود [۲]. در مطالعه برزگر و همکاران (۱۳۹۹) عمده ترکیبات خوشاریزه کلروژنیک اسید و پیروکاتکول گزارش شد. داروغه و همکاران (۲۰۱۴) در طی مطالعه‌ای که بر روی اسانس زیره سبز انجام دادند، نشان دادند که اجزای اصلی اسانس شامل آنتول، کارون، لیمونن، هیدروسینامیل و کارواکرول هستند [۳]. بررسی مشتقات اسانس و فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی در کرفس و گشنیز نشان داد که ترکیب اصلی کرفس و بذرهای آن لیمونن و در گشنیز لینالول می‌باشد [۴]. تقاضاهای جهانی گیاهان دارویی برای جستجوی ترکیبات فعال دارویی جدید به‌شدت در حال افزایش است زیرا آن‌ها به‌صورت محلی، با منشأ طبیعی، با حاشیه ایمنی بالاتر و عوارض جانبی کمتر یا بدون عوارض در دسترس هستند [۵]. علاوه بر این، بیش از نیمی از داروهای مدرن به روشی از گیاهان دارویی به دست می‌آیند. اهمیت این ترکیبات به دلیل افزایش فراوانی بیماری‌های مختلف مانند بیماری عروق کرونر، سرطان، بیماری آلزایمر و دیابت که با عادات غذایی در زمان‌های اخیر در ارتباط است، در حال افزایش است. مزایای سلامتی در نظر گرفته شده توسط مصرف‌کنندگان ممکن است به وجود مواد شیمیایی گیاهی مختلف از جمله ترپن‌ها، آلکالوئیدهای گلیکوزید و فلاونوئیدها نسبت داده شود [۶]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیبات طبیعی یا مصنوعی بوده که از تشکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها با اتصال به رادیکال‌های آزاد خرابکاری آن‌ها مانند از بین رفتن سلول‌ها و بافت‌های بدن، تجزیه DNA و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را خنثی می‌کنند. بیشتر تجربیات بالینی در رابطه با تحقیقات بر روی گیاه دارویی بابونه نشان داد بیشتر عملکردهای دارویی این گیاه به دلیل توانایی آن در کنترل رادیکال‌های آزاد و بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدی است [7] . داروهای مشتق شده از گیاهان اغلب ارزان‌تر و کمتر سمی هستند و عوارض جانبی کمتری در مقایسه با داروهای مصنوعی دارند در راستای نیل به این هدف لازم است سه مرحله انجام شود: مرحله اول، ایمنی دارو، مرحله دوم اثربخشی داروها یا محصولات گیاهی و

مرحله سوم ارزیابی در جمعیت بزرگ‌تری تعیین می‌شود و کار آزمایی بالینی ادامه می‌یابد [8]. با توجه به نیاز به مواد آنتی باکتریال قوی و ضد قارچ در صنایع غذایی و دارویی گیاه دارویی اکینوفورا پلتی لوبا با نام محلی خوشاریزه جهت بررسی ترکیبات موثره انتخاب شد.

روش کار

ابتدا قسمت هوایی گیاهان در سال ۱۴۰۰ در تبریز جمع آوری و سپس در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان با استناد بر فلور ایران و رده بندی گیاهی شناسایی شدند. گام بعد خشک کردن گیاهان و پس از آن در محیط بدون نور نگهداری شدند. منظور تهیه اسانس با استفاده از ۱۰۰گرم بافت خشک و با استفاده از سیستم کلونجر انجام شد. اسانس به دست آمده با استفاده از سولفات سدیم بی آب خشک شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در ظرف تاریک نگهداری شد. عصاره گیری نیز از ۱۰۰گرم بافت خشک و متانول با استفاده از دستگاه سوکسله و روش پرکولاسیون انجام شد (عصاره متانولی). ترکیبات شیمیایی با استفاده دستگاه GC (کروماتوگرافی گازی) شناسایی گردید. جهت تهیه محیط نوترین آگار از دستورالعمل موجود در بروشور محیط کشت (مرک، آلمان) استفاده گردید. بدین صورت که ۲۸ گرم از این محیط کشت را در یک لیتر آب مقطر استریل مخلوط کرده تا کاملاً حل شود. سپس محلول مورد نظر به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد در اتوکلاو استریل شد. تهیه سوسپانسیون میکروبی ۲۴ ساعت قبل انجام شد. در هر مرحله از آزمایش با استفاده از محیط‌های کشت ذخیره مبادرت به تهیه کشت تازه‌ای شد که به آن کشت ۲۴ ساعته گویند. به طوری که قبل از شروع تلقیح با استفاده از یک سواپ استریل مقداری از کلونی‌های سطح محیط کشت به لوله حاوی نوترین براث انتقال داده شد. سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با استفاده از محلول استاندارد ۱ مک فارلند بررسی شد. برای تهیه محلول استاندارد ۱ مک فارلند: ۰/۵ میلی لیتر محلول کلرید باریم ۱٪ به ۹/۹ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱٪ اضافه و خوب تکان داده شد. روش رقت لوله‌ای یکی از دقیق ترین روش های تعیین حساسیت باکتری ها نسبت به مواد ضد میکروبی به شمار می رود. با کمک این روش حداقل غلظت مهار کنندگی ماده ضد میکروبی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی (MBC) تعیین می‌گردد.

MBC حداقل غلظتی است که توانایی کشتن ۹۹/۹٪ از میکروارگانیسم‌ها را دارد.

MIC حداقل غلظت مهاری عبارت است از حداقل غلظت عصاره یا اسانس که منجر به ممانعت از رشد ۵۰ درصد باکتری می شود.

در روش انتشار دیسک برای کشت باکتری در محیط نوترین آگار از سوسپانسیون میکروبی روی محیط جامد ریخته شد. سپس با استفاده از سواپ پنبه ای استریل مایع روی سطح محیط پخش شد پس از آن داخل هر پلیت سه دیسک آنتی بیوگرام خالی به صورت مثلثی گذاشته شد. سپس از دوز 10000 µg/ml عصاره و اسانس گیاه مورد نظر مقدار ۲۰ میکرولیتر به دیسک های اختصاص یافته اضافه شد. سه دیسک

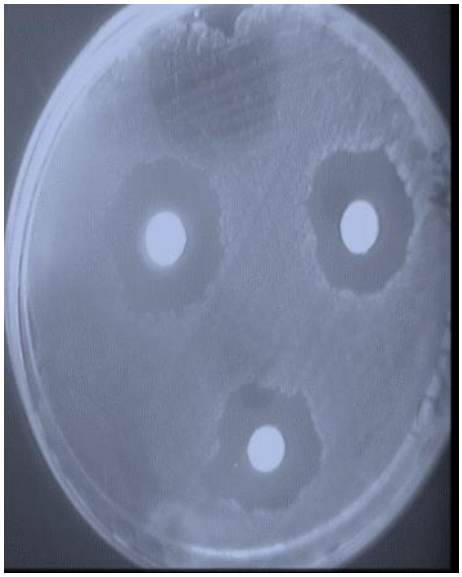
اریترومایسین هم داخل پلیت های مشخص قرار داده شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) بر روی هر یک از دیسک ها ریخته شد. سپس پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شد و بعد از آن قطر هاله های اطراف هر دیسک با کولیس مورد سنجش قرار گرفت. برای شناسائی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس، از دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی(GC)و گاز کروماتوگرافی متصل شده به طیف‌سنج جرمی(GC/MS) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج و بحث: عملکرد اسانس و عصاره متانولی ۰/۳ ٪ تا ۵/۱ ٪ بود. ۲۳ ترکیب شیمیائی در اسانس سرشاخه‌های گل‌دار گیاه خوشاریزه شناسایی شد. اجزای اصلی اسانس گیاه شامل: O- Cymene (۲۷/۶۶) و γ-Terpinene (۹/۷۷) بودند (جدول ۱).

ترکیبات عصاره شامل اسیمن، متانول، آلفا پی ان و گاما دود کانولاکتون بود. اسانس خاصیت ضد باکتری قوی در برابر تست باکتری نشان داد (شکل ۱). عصاره در برابر باکتری های گرم منفی غیر مؤثر بود. لیستریا مونو سایتوژنز و استافیلوکوکوس آرئوس (گرم مثبت) حساسترین باکتری ها در مقابل اسانس و عصاره بودند. اثر ضد قارچی عصاره هیدروالکلی گیاه خوشاریزه بر کاندیدا آلبیکنس نشان داده شد که حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره هیدروالکلی گیاه خوشاریزه برای کاندیدا آلبیکنس برابر با ۳۶ میلی گرم در میلی لیتر است. بنابراین از این گیاه می توان علیه مخمر کاندیدا آلبیکنس به نحو مطلوب و با اطمینان استفاده کرد. به طور کلی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی حساس ترند. علت حساس تر بودن باکتری های گرم مثبت به مواد شیمیایی و عصاره های گیاهی اختلاف ساختمان دیواره می باشد. باکتری های گرم مثبت در ساختمان دیواره دارای ترکیب موکوپپتید بوده، در صورتی که باکتری های گرم منفی فقط لایه نازکی موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره آن ها لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید است و به همین علت در مقابل مواد ضد باکتری مقاوم ترند [9]. مکانیسم‌های پیشنهادی برای اثرات حفاظتی گیاهان دارویی شامل کاهش استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو می‌باشد. کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، جلوگیری از تکه‌تکه شدن DNA کاهش فعالیت میکروگلیا و آستروسیتها، مهار بیان پروتئین آپوپتوز؛ افزایش بیان ژن میتوکندری، کاهش لکوترین ها، پروستاگلاندین ها و ترومبوکسان. افزایش بیان پروتئین آنتی آپوپتوتیک؛ و کاهش بیان واسطه التهابی در یک تحقیق پیشنهاد شده‌ا ند. معمولاً ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی پس از سنتز در نتیجه پیوند با قندها در یک یا چند جایگاه مخصوص به صورت محلول در آمده و در واکوئل ها ذخیره می‌گردند[7]. خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی عمدتاً مربوط به خواص احیاکنندگی و ساختار شیمیایی آن‌ها است که قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، ترکیب با یون‌های فلزی و خاموش کردن اکسیژن یگانه و سه‌گانه هستند. ترکیبات فنولی از طریق دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد واکنش اکسیداسیون را متوقف می‌کنند [10]. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که

استفاده از گیاهان دارویی مانند اکینوفورا پلتی لوبا با توجه به معطر بودن، خاصیت طعم دهی، افزایش اشتها و اثر ضد باکتریایی می‌توانند در افزایش بهداشت مواد غذایی مفید و مؤثر باشند. بر اساس خالص سازی و ارزیابی اثرات ضد باکتریایی ترکیبات فعال اسانس و عصاره متانولی این گیاه جهت استفاده آن به عنوان ترکیب ضد باکتریایی و نگهدارنده مواد غذایی علیه میکروارگانیسم های مسمومیت زا و بیماری زا توصیه می شود.



شکل ۱. هاله ممانعت از رشد باکتری استافیلوکوکوس آرئوس

جدول ۱. ترکیبات بدست آمده از تجزیه اسانس

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	میزان ترکیب (درصد وزنی/وزنی)
۱	α-Pinene	۹۳۵	۸/۵۶
۲	β-Myrcene	۱۰۷۱	۳/۲۲
۳	Sabinene	۹۷۵	۱/۴۹
۴	Alpha-Pinene	۹۷۹	۶/۴۲
۵	Formic acid	۱۵۷۶	۱/۲۹
۶	Acetic acid	۱۰۳۱	۱/۸۰

۷	O-Cymene	۱۰۳۴	۲۷/۶۶
۸	γ-Terpinene	۱۰۶۰	۹/۷۷
۹	3,8-*p*-Menthadiene	۱۰۷۱	۱۰/۰۶
۱۰	β-Linalool	۱۱۴۹	۵/۹۹
۱۱	menth-3-en-8-ol	۱۱۵۳	۱/۰۸
۱۲	Naphtalene	۱۱۸۱	۱/۳۱
۱۳	Octadecene-1	۱۲۶۷	۳/۴۷
۱۴	Piperitenone	۱۳۵۲	۱/۴۲
۱۵	Transe-Farnesol	۱۳۸۰	۳/۵۰
۱۶	Other componentes	-	-
	مجموع		**۹۴/۷۳**
	-		

منابع

1.Rashidipour, M., Ashrafi, B., Hadavand, S., Beyranvand, F., & Zareivenovel, M. (2020). Evaluation of the chemical compounds and the antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of Echinophora cinerea Boiss essential oil. Herbal Medicines Journal (Herb Med J), 1-10.

2. Çarşi, Ş. C., Sariçoban, C., & Cabi, A. (2019). Effects of addition Hyssop (Echinophora sibthorpiana) powder on some quality properties of beef patties. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 25(2), 89-100.

3. Darougheh F. Barzegar, M. Sahari. M.L. 2014. Antioxidant and Anti-fungal Effect of Caraway (Carum Carvi L.) Essential Oil in Real Food System. Current Nutrition & Food Science, 10: 70-76.

4. Naglaa H. M. Hassanen A. M. F. Eissa1 Sa'eb A. M. Hafez, and Esraa A. M. Mosa. 2015. Antioxidant and antimicrobial activity of celery (Apium graveolens) and coriander (Coriandrum sativum) herb and seed essential oils. International.Journal .Current.Microbiology.Applied.Science. 4(3): 284-296.

5.Nasri H. Toxicity and safety of medicinal plants. J HerbMed Pharmacol. 2013

6. Zhang Y, Hao J, Liu Z, Li Z, Teng L, Wang D. Inonotus hispidus Protects against Hyperlipidemia by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation through Nrf2/NF-κB Signaling in High Fat Diet Fed Mice. Nutrients. 2022;14(17):3477.

۷. قاراخانی ده سرخی، سجاد. تقی پور دهکردی, مرضیه. (۱۴۰۰). بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه آلمانی بر زنده‌مانی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک کبد گوسفندان. پژوهش‌هایی در یاخته و بافت, ۲(۳), ۲۶-۳۱.

7.Kumar R, Rizvi SI. Vitamin C Improves Inflammatory-related Redox Status in Hyperlipidemic Rats. Indan J Clin Biochem. 2022:1-7.

8.Georgala, A. (2020). Food Science and Applied Biotechnology.

9. Georgala, A. (2020). The microbiology of Greek/Cyprus Trahanas and of Turkish Tarhana: a review of some literature data. Food Science and Applied Biotechnology, 3(2), 134-148.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

مطالعه مقایسه ای نانوامولسیون ها و میکروامولسیون ها: تعاریف، روشهای تولید و خواص

نفیسه سپه دوست[۱]، زهرا رحیم زاده[۱]، الناز تمجید[۱،*]

۱. گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*Email: tamjid@modares.ac.ir

چکیده

امولسیون ها موادی هستند که از ترکیب دو مایع امتزاج ناپذیر و پایدار سازی آن ها توسط عوامل فعال سطحی تشکیل می شوند. نانوامولسیون ها و میکروامولسیون ها نوعی از امولسیون ها هستند که دارای اندازه در حد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر بوده و خواص منحصر به فردی ازجمله پایداری بالاتر، نسبت سطح به حجم و ظرفیت بالاتر به‌عنوان حامل و ظاهر شفاف دارند. این امر باعث توجه چشمگیر محققان به آنها در کاربرهای مختلف از جمله پزشکی، صنایع غذایی، پلیمریزاسیون و غیره شده است. شایان ذکر است که این دو عبارت به دلیل تشابه زیاد در برخی تحقیقات به جای یکدیگر به کار برده می شوند درحالی که دارای خواص و روش های سنتز متمایزی می باشند. نانوامولسیون ها از لحاظ سینتیکی پایدار هستند اما از لحاظ ترمودینامیکی پایداری بالایی ندارند؛ همچنین دارای روش های سنتز پر انرژی و کم انرژی می باشند. اما میکروامولسیون ها با ایجاد مقادیر دقیق و مناسب از مواد تشکیل دهنده آنها، بصورت خودبخودی تشکیل می شوند و همچنین پایداری ترمودینامیکی و عدم پایداری سینتیکی از مشخصات میکروامولسیون ها می باشد. هر کدام از این دو نوع امولسیون با توجه به خواص خود می توانند در کاربرد های مختلف استفاده شوند؛ برای مثال میکروامولسیون ها در صورت عدم تغییر غلظت مواد و شرایط محیطی می توانند ماه ها و یا سال ها بدون تغییر باقی بمانند در حالی که نانوامولسیون ها محدودیتی برای تغییر غلظت ندارند ولی مدت پایداری آنها کوتاه تر می باشد. در این پژوهش به مقایسه تفاوت ها و شباهتهای این دو نوع امولسیون با تاکید بر تعاریف، روش های سنتز و خواص اصلی آنها پرداخته خواهد شد.

کلمات کلیدی: سیستم های کلوئیدی؛ نانوامولسیون؛ میکروامولسیون؛ پایداری سینتیکی؛ پایداری ترمودینامیکی

A comparative study on Nanoemulsions and Microemulsions: Definitions, Preparation Methods, and Properties

Nafise Sepahdoost[1], Zahra Rahimzadeh[1], Elnaz Tamjid[*,1]

[1] Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Email: tamjid@modares.ac.ir

Abstract

Emulsions are mixtures of two immiscible liquids stabilized by surface active agents. Nanoemulsions and microemulsions are emulsions with droplet sizes ranging from 1 to 100 nanometers. They have unique properties such as higher stability, surface area to volume ratio, and carrier capacity, as well as transparent appearance. These properties have attracted the interest of researchers for various applications such as medicine, food industry, polymerization, etc. Although nanoemulsions and microemulsions are not identical in terms of properties and fabrication methods, these terms are frequently used interchangeably in the literature. Nanoemulsions are kinetically stable, nonetheless, thermodynamically unstable. They can be prepared through high-energy or low-energy methods. In contrast, Microemulsions are thermodynamically stable, despite being kinetically unstable. They form spontaneously when the optimal and precise amounts of the components are mixed and the environmental conditions remain unchanged. Microemulsions remain unchanged for months or years if the composition is not altered, while nanoemulsions are less stable, exhibiting a shorter shelf life. In this research, the similarities and differences of these two categories of emulsions will be compared with a focus on their definitions, preparation methods, and fundamental properties.

Keywords: Colloidal systems; Nanoemulsion; Microemulsion; Kinetic stability; Thermodynamic stability

مقدمه

در طی سالیان گذشته برای محصور کردن، محافظت و تحویل اجزای چربی دوست به صورت هدفمند علاقه ی زیادی به سیستم های کلوئیدی نشان داده شده است. این سیستم ها که معمولاً شامل پراکنشی از ذراتی با شعاع مطلوب کمتر از ۱۰۰ نانومتر در داخل یک مایع دیگر هستند مزایای زیادی را نسبت به سیستم های سنتی نشان می دهند. از جمله این مزیت ها می توان به خواص رئولوژیکی قابل تنظیم، رنگ شفاف تا شیری به علت اندازه ی کوچکتر از شعاع پرتو نور مرئی و در نتیجه مناسب بودن این محصولات برای ساخت موادی که نیازمند شفافیت در رنگ محصول هستند، پایداری بیشتر در برابر تجمع ذرات، افزایش فراهمی زیستی با محصور کردن دارو در فاز ناقطبی و بهره‌گیری از پوشش قطبی برای عبور و رساندن مواد چربی دوست در محیط های آبگریز اشاره کرد. نانوامولسیون ها و میکروامولسیون دو نوع مرسوم از این سیستم های کلوئیدی هستند که شامل سه جزء اصلی آب، سورفکتانت و روغن می باشند. نانوامولسیون‌ها اندازه ای در حدود ۱۰۰ نانومتر و کمتر از آن دارند اما بصورت تک توزیع[۴۲] نمی‌باشند. این ترکیبات از لحاظ پایدار هستند به این معنی که با تغییر غلظت در آن‌ها ناپایداری بوجود نیامده و ساختار به هم نمی‌ریزد. اما این نوع مایعات از لحاظ ترمودینامیکی ناپایدارند و پس از مدتی در حدود چند هفته یا چند ماه ساختار ذرات باز شده و یا اندازه ذرات تغییر می‌کند. میکروامولسیون‌ها اندازه ای بسیار کوچک در حد زیر ۱۰ نانومتر دارند. این ترکیبات از لحاظ سینتیکی ناپایدار هستند اما از لحاظ ترمودینامیکی پایداری بالایی دارند و مدت‌ها بدون تغییر باقی می مانند[۱-۴]. این تفاوت ناشی از وقوع فرایند ترمودینامیکی مهمی به نام «استوالد رایپنینگ[۴۳]» است که به درشت شدن ذرات فاز دوم در محیط های جامد، مایع و گاز اطلاق می گردد. درشت شدن فازی که در واقع رشد متوسط اندازه ی ذرات می باشد، با مصرف شدن ذرات ریز موجود در سیستم و پیوستن آنها به ذرات بزرگتر همراه است که در طی آن ذرات ریز ابتدا تدریجاً تحلیل رفته و در نهایت ناپدید می شوند. علت این امر، اصل ترمودینامیکی تمایل مواد به رسیدن به حداقل انرژی آزاد گیبس[۴۴] است. به این ترتیب در صورت تلفیق ذرات کوچکتر، نسبت سطح به حجم کاهش یافته و به کاهش میزان انرژی می انجامد. شایان ذکر است که این پدیده در صورت توزیع ناهمگن ذرات، نیرو محرکه[۴۵] بیشتری داشته و به همین دلیل در نانو امولسیونها بیشتر به وقوع می پیوندد[۵].

نکته ای در مورد امولسیون‌هایی که ابعاد بزرگتری دارند -ماکروامولسیون‌ها با اندازه ای بالای ۱ میکرومتر- باید مورد توجه قرار گیرد آن است که ناحیه ای در فصل مشترک آب و روغن که نیروهای بین مولکولی در

[42] Monodispersed
[43] Ostwald Ripening
[44] Gibbs Free Energy
[45] Driving Force

آن عمل می کنند سطحی تقریباً صاف است. در نتیجه این مواد بسیار ناپایدار بوده و ذرات تشکیل شده در حدود زمانی چند دقیقه یا چند ساعت باز می‌شوند و امولسیون به دو فاز جدا از هم تبدیل می‌شود. اما در خصوص نانوامولسیون ها و میکروامولسیون‌ها –با اندازه ای در حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر- فصل مشترک مذکور، سطحی منحنی است. در نتیجه نانوامولسیون‌ها و میکروامولسیون‌ها به علت خواص منحصر به فرد و پایداری بیشتر نسبت به ماکروامولسیون‌ها، بیشتر در تحقیقات آزمایشگاهی و کاربردهای پزشکی، محصولات آرایشی و غذایی مورد استفاده قرار گرفته اند. هرکدام از این دو نوع امولسیون با توجه به خواص ویژه خود در کاربرد مناسب می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. میکروامولسیون‌ها می‌توانند در حضور غلظت‌های مناسبی از مواد تشکیل دهنده آن بصورت خود به خودی تشکیل شوند. این ترکیبات در برابر تغییر غلظت، پایداری ندارند و ساختارشان از هم باز می‌شود. در مقابل اگرچه نانوامولسیون‌ها پایداری ترمودینامیکی کمتری دارند اما محدودیت بسیار بالای میکروامولسیون‌ها یعنی عدم امکان ایجاد تغییر در غلظت را ندارند؛ در نتیجه نانوامولسیون‌ها می‌توانند با افزودنی‌های بیشتر و متنوع تری ترکیب و عامل‌دار شوند[۱, ۳].

نکته مهم دیگر آن است که میکروامولسیون ها و نانوامولسیون ها به علت خواص متفاوت خود رفتارهای متفاوتی نسبت به تغییر دمایی و رقیق شدن از خود نشان می دهند. همانگونه که پیشتر ذکر شد، میکروامولسیون ها سیستم هایی با پایداری ترمودینامیکی هستند اما به طور عکس نانوامولسیون ها از نظر ترمودینامیکی پایدار نبوده اما از نظر سینتیکی پایدار هستند؛ در نتیجه میکروامولسیون ها از لحاظ شکل و اندازه با تغییر دما تغییر می کنند، اما نانوامولسیون ها به تغییر دما مقاوم بوده و در نتیجه در محیط هایی که تغییرات دمایی متعدد وجود دارد در صورتی که عدم تغییر اندازه و شکل ذرات مورد نظر باشد، استفاده از نانوامولسیون ها بر میکروامولسیون ها ارجحیت دارد. هم چنین رقیق سازی تغییری در اندازه ی ذرات نانوامولسیونی ایجاد نمی کند، در نتیجه در تکنیک‌هایی همانند DLS[۴۶] برای یافتن اندازه ی ذرات می توان از رقیق سازی ذرات نانوامولسیونی استفاده کرد، اما رقیق سازی میکروامولسیون ها سبب تغییر اندازه ی آن ها می شود. بعلاوه تغییرات pH و اسمولاریته[۴۷] هم بر میکروامولسیون ها بر خلاف نانوامولسیون ها تاثیرگذار است[۴]. در ادامه نگاهی جزئی تر به هر یک از این دو سیستم کلوئیدی داریم.

نانوامولسیون ها

چنانکه پیش تر اشاره شد، نانوامولسیون‌ها، پراکنش قطرات مایع در مایع هستند که از لحاظ سینتیکی پایدار بوده و اندازه ذرات آن‌ها از ۱۰ نانومتر تا ۳۰۰ نانومتر- در برخی پژوهش ها- ذکر شده است. اندازه کوچک ذرات آن‌ها باعث می‌شود تا نسبت سطح به حجم بالایی داشته باشند، همچنین باعث افزایش پایداری آن‌ها می‌شود. ازآنجایی‌که اندازه نانوامولسیون‌ها کمتر از طول‌موج نور مرئی است، دارای ظاهری

[46] Dynamic light scattering
[47] Osmolarity:

شفاف تا شیری‌رنگ هستند. به طور معمول، نانوامولسیون‌ها شامل روغن، آب و یک یا دو امولسیفایر هستند. دلیل اهمیت این مواد به علت توانایی آن‌ها در انحلال یک محلول قطبی در غیرقطبی، تغییر رنگ و یا بو و هم چنین افزایش کارایی آن است. به علت ناپایداری ترمودینامیکی در دوفاز نانوامولسیونی، لازم است تا از سورفکتانت‌ها [۴۸] که دارای یک سر آب‌دوست و قطبی و یک سر آب‌گریز یا غیرقطبی هستند برای کاهش تنش سطحی بین دوفاز استفاده شود. در واقع سورفکتانت‌ها بین دو سطح در بین دوفاز مایع قرار می‌گیرند و جلوی به‌هم‌آمیختگی امولسیون که در جهت رسیدن سامانه به حداقل انرژی آزاد گیبس است را می‌گیرند. به طور معمول مواد چربی‌دوست در فاز روغنیِ نانوامولسیون حل می‌شوند و با افزایش چربی دوستی [۴۹] روغن، انحلال‌پذیری ماده ی چربی دوست در آن بیشتر می‌شود. به‌طورکلی اندازه ذرات نانوامولسیونی با افزایش میزان غلظت روغن در فرمولاسیون، افزایش می‌یابد[۶, ۷].

انواع مرسوم نانوامولسیون‌ها شامل پراکنش ذرات چربی در آب، هنگامی‌که ذرات چربی یا غیرقطبی در فاز داخلی و ذرات آب یا قطبی در فاز خارجی باشند، به‌صورت «روغن در آب» نامیده می‌شود و هنگامی‌که ذرات آبی در فاز داخلی و ذرات چربی در فاز بیرونی باشند، «آب در روغن» نام می‌گیرد. در سال‌های اخیر سیستم‌های پیچیده‌تری نظیر نانوامولسیون های «آب در روغن در آب» و «روغن در آب در روغن» گسترش یافته‌اند. در نانوامولسیون‌های آب در روغن، فاز آبی در مرکز هر قطره، و سر آب‌دوست سورفکتانت و کوسورفکتانت به سمت داخل و سر آب‌گریز آن به سمت خارج قطره قرار می‌گیرد. در نانوامولسیون‌های روغن در آب، این پدیده بر عکس بوده و در نتیجه این دو نوع نانوامولسیون برای جادادن به ترتیب، مواد آب‌دوست و آب‌گریز در داخل خود مناسب هستند. نانوامولسیون‌ها به علت خواص منحصربه‌فردی از جمله اندازه کوچک، پایداری بالا و رئولوژی قابل‌تنظیم در صنایع مختلفی از جمله آرایشی و بهداشتی، مواد غذایی، دارویی و داورسانی هدفمند موردتوجه واقع شده‌اند[۲, ۶].

روش‌های سنتز نانوامولسیون‌ها

روش‌های آماده‌سازی نانوامولسیون‌ها به دودسته اصلی روش‌های پر انرژی و روش‌های کم انرژی تقسیم می‌شود. روش‌های پر انرژی، شامل همگن‌سازی با فشار بالا، میکروفلوئیدی و اولتراسونیک است که در این روش‌ها دستگاه با صرف انرژی بالا و تبدیل آن به انرژی مکانیکی، آب و روغن را به ذرات کوچک می‌شکند. روش آماده‌سازی نانوامولسیون‌ها به طور معمول یک فرایند دومرحله‌ای است که در آن ابتدا ماکروامولسیون ساخته شده و سپس ماکروامولسیون‌ها به نانوامولسیون تبدیل می‌شود. روش‌های کم انرژی بر تکنیک‌های اختلاط و امولسیون‌سازی ملایم تکیه می‌کنند که نیازی به ورودی انرژی زیادی ندارند و شامل فرایندهای فیزیکوشیمیایی خاصی همانند دمای وارونگی فاز و نقاط وارونگی امولسیونی هستند. در این سیستم‌ها بدون

[48] Surfactants (Surface Active Agents)
[49] Lipophilicity

صرف انرژی بالا، قطرات کوچک زمانی تشکیل می‌شوند که سیستم در پاسخ به تغییرات همانند ترکیب یا دما دچار وارونگی فاز شود و در نتیجه از یک حالت کشش سطحی پایین عبور می‌کند. هر روش مزایا و معایب خاص خود را دارد و انتخاب مناسب ترین روش به ویژگی ها و الزامات خاص فرمولاسیون نانوامولسیون بستگی دارد[۸].

روش‌های سنتز پرانرژی نانوامولسیون‌ها

سنتز نانوامولسیون‌ها عموماً از روش‌های با انرژی بالا مانند استفاده از دستگاه‌های فراصوت و یا دستگاه‌های همگن کنندهٔ فشار بالا[۵۰] انجام میشود[۴]. در این روش‌ها از انرژی ای در حدود $10^8\ W/Kg$ برای شکستن ذرات به ذرات کوچکتر استفاده می‌شود. این روش ها مقیاس پذیر بوده اما به علت انرژی بالایی که مصرف میکنند سبب هزینه های بالا تولید نیز می شوند. همچنین دمای تولید شده در این روش ها برای تولید برخی مواد نامناسب می باشد[۸, ۹].

روش‌های سنتز کم انرژی نانوامولسیون‌ها

از مزیت‌های سنتز کم انرژی نانوامولسیون‌ها می‌توان به مصرف انرژی کم و قابلیت تولید نانوامولسیون از ترکیبات حساس به دما اشاره کرد[۱۰]. در روش های پرانرژی، نیاز به وارد کردن اثرات حرارتی بالا به سیستم است؛ در نتیجه برای داروهایی مانند پروتئین‌ها و موادی که به حرارت حساس بوده و بسیار اثر پذیر هسند مناسب نمی‌باشد[۱۱]. همچنین روش‌های کم انرژی نیز برای سنتز نانوامولسیون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که در آن‌ها از تنش سطحی کم سیستم در فصل مشترک فازها برای کوچک کردن اندازه ذرات استفاده می‌شود. این ترکیبات عموما توسط استیررهای مغناطیسی با انرژی حدود $10^{3-5}\ W/Kg$ تولید می‌شوند[۹].

روش نقطه معکوس امولسیون[۵۱]

در این روش برای سنتز نانوامولسیون روغن در آب، ابتدا ماکرو امولسیون آب در روغن تهیه می‌شود و سپس به آرامی توسط آب رقیق می‌شود. در اثر این اتفاق سیستم از یک غلظت مشخصی از آب عبور می‌کند که در آن تنش سطحی بین روغن و آب در کمترین حالت خود قرار دارد و قطرات مورد نظر ما می‌توانند بدون دریافتن انرژی خاصی تشکیل شوند؛ در نتیجه سیستم به نانوامولسیون روغن در آب تبدیل می‌شود. همچنین برای تولید نانوذرات آب در روغن نیز می‌توان به همین روش و فقط با جابجا کردن جای روغن و آب در دستور، به ترکیب مورد نظر دست یافت[۶].

[50] High pressure homogenizer
[51] Emulsion Inversion Point (EIP)

روش دمای معکوس فازی[۵۲]

در این روش برای تولید نانوامولسیون روغن در آب، ابتدا یک ماکروامولسیون آب در روغن در دمای بالاتر از دمای تغییر فاز سیستم تهیه می‌شود. سپس با پایین آوردن دمای سیستم تا دمای اتاق، ترکیب تبدیل به یک نانوامولسیون آب در روغن می‌شود. در این روش نیز مانند روش قبل برای تولید نانوامولسیون آب در روغن جای روغن و آب را در روش عوض می شود[۶]. دو روش بالا بیشتر در مقالات مورد استفاده قرار گرفته اند اما به روش‌های دیگری نیز در مقالات اشاره شده که کمتر مورد استفاده قرار گرفته اند که یکی از آنها در زیر معرفی می گردد.

روش انفجار حباب[۵۳]

در این روش ترکیبی فیلم روغنی بر روی آب حضور دارد و سپس حباب‌های گاز وارد فاز آبی می‌شود. وقتی حباب‌های گازی به سطح مشترک آب و روغن می‌رسند، باز شده و یک چاه در فصل مشترک ایجاد می‌شود که فیلم روغنی را تحت نیروی موییننگی به داخل آب می‌کشد و باعث تشکیل قطرات روغنی در آب می‌شود[۶, ۱۲].

میکروامولسیون ها

میکروامولسیون ها، مایعاتی ایزوتروپیک و از نظر ترمودینامیکی پایدار می باشند که ترکیبی از سه مایع روغن، آب و سورفکتانت(ها) هستند. ساختار و فازهای این دسته از مواد به ترکیب و شرایط محیط به خصوص دما وابسته است که ممکن است تا بیش از سه فاز جداگانه ای که با یکدیگر در تعادل هستند را تشکیل دهند. ساختار درون این فازها می تواند کروی (مانند میسل یا میسل معکوس)، استوانه مانند (مانند میسل های میله ای یا میسل معکوس)، صفحه مانند (مثلاً ساختارهای لایه ای) یا اسفنج مانند (مثلاً دوپیوسته) باشند. هم چنین فاز پیوسته ی این مواد بسته به غلظت، ماهیت و آرایش مولکول‌های موجود می تواند آبی، روغنی یا دوپیوسته[۵۴] باشد. در ساخت میکروامولسیون ها، دما عامل مهمی است که بر حلالیت، تغییر فاز، کشش سطحی، ویسکوزیته، هدایت و سایر پارامترهای میکروامولسیون ها تأثیر می گذارد. دما همچنین می تواند تغییراتی در مورفولوژی و اندازه ساختارهای میکروامولسیونی ایجاد کند. به عنوان مثال، افزایش دما می تواند باعث تغییر شکل از میسل های کروی به کرم مانند[۵۵] یا از قطرات به میکروامولسیون های دوپیوسته شود. دما همچنین می تواند بر پایداری و عملکرد میکروامولسیون ها در کاربردهای مختلف

[52] Phase Inversion Temperature (PIT)
[53] Bubble bursting
[54] bicontinuous
[55] worm-like micelles

تأثیر بگذارد. به عنوان مثال، در کاربردهای دارورسانی، تغییرات دما می‌تواند ظرفیت انحلال، سرعت آزادسازی و فراهمی زیستی داروهای محصور شده در میکروامولسیون‌ها را تغییر دهد[۲-۴].

روش های سنتز میکروامولسیون ها

روش سنتز میکروامولسیون ها بر اساس رفتار فازی سیستم سورفکتانت-روغن-آب است که می توان آن را با نمودار فاز سه تایی[۵۶] یا درصورت استفاده از دو نوع سورفکتانت، نمودار سه گانه شبه فاز[۵۷]، نشان داد. نمودار فاز، نواحی فازها و ساختارهای مختلف را نشان می دهد که با تغییر ترکیب و دمای سیستم تشکیل می شوند؛ برخلاف میکروامولسیون ها، استفاده از نمودارهای فاز سه تایی برای نانوامولسیون ها صحیح نمی باشد. نمودار فاز همچنین می تواند به شناسایی شرایط بهینه برای تهیه یک نوع میکروامولسیون مورد نظر کمک کند. به عنوان مثال، اگر تهیه ی یک میکروامولسیون روغن در آب متشکل از ذرات کروی کوچک مدنظر باشد که حاوی مولکول‌های روغن و سورفکتانت است که در آب پراکنده شده‌اند، باید ترکیب و دمایی را انتخاب کرد که در ناحیه این فاز در نمودار قرار دارد. نمودار این ناحیه به عنوان ناحیه Winsor IV یا ناحیه میکروامولسیون قطره[۵۸] نیز شناخته می شود. در روش دیگر، می توان ابتدا نوع متفاوتی از میکروامولسیون (به عنوان مثال، آب در روغن یا دوپیوسته) تهیه کرد و سپس آن را با محلول مناسب رقیق کرد تا میکروامولسیون نهایی روغن در آب به دست آید. این روش اساس سیستم های دارورسانی خود میکروامولسیون کننده[۵۹] است که برای استفاده در صنعت داروسازی توسعه یافته است[۲, ۴].

منابع

1. Sheth, T., et al., *Multiple nanoemulsions.* Nature Reviews Materials, 2020. **5**(3): p. 214-228.
2. McClements, D.J., *Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities.* Soft matter, 2012. **8**(6): p. 1719-1729.
3. Suhail, N., et al., *Microemulsions: unique properties, pharmacological applications, and targeted drug delivery.* Frontiers in Nanotechnology, 2021. **3**: p. 754889.
4 Anton, N. and T.F. Vandamme, *Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences.* Pharmaceutical research, 2011. **28**: p. 978-985.
5. Koroleva, M.Y. and E.V. Yurtov, *Ostwald ripening in macro-and nanoemulsions.* Russian Chemical Reviews, 2021. **90**(3): p. 293.
6. Gupta, A., et al., *Nanoemulsions: formation, properties and applications.* Soft matter, 2016. **12**(11): p. 2826-2841.

[56] ternary phase diagram
[57] pseudophase ternary diagram
[58] droplet microemulsion region
[59] self-micro-emulsifying drug delivery systems (SMEDDS)

7. Li, Y., et al., *Influence of Nanoemulsion Droplet Size of Removing Water Blocking Damage in Tight Gas Reservoir.* Energies, 2022. **15**(14): p. 5283.
8. Safaya, M. and Y. Rotliwala, *Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique.* Materials Today: Proceedings, 2020. **27**: p. 454-459.
9. Gupta, A., A.Z.M. Badruddoza, and P.S. Doyle, *A general route for nanoemulsion synthesis using low-energy methods at constant temperature.* Langmuir, 2017. **33**(28): p. 7118-7123.
10. Komaiko, J.S. and D.J. McClements, *Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods.* Comprehensive reviews in food science and food safety, 2016. **15**(2): p. 331-352.
11. Shaker, D.S., et al., *Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs.* Scientia Pharmaceutica, 2019. **87**(3): p. 17.
12. Shchekin, A., A. Kuchma, and E. Aksenova, *Effects of viscous and capillary forces on the growth rates of gas bubbles in supersaturated liquid–gas solutions.* Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, 2023. **609**: p. 128303.

اثر افزایشی ترکیب تیمول با دوستاکسل بر مهار رشد سلول های سرطان پستان

نرجس اسلامی شعبجره[۱]، سارا سلطانیان[۲*]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲. دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان E-mail: soltanian@uk.ac.ir

چکیده

سرطان پستان دومین سرطان شایع در بین سرطان‌ها و شایع ترین سرطان در بین زنان است. دوستاکسل به طور گسترده به عنوان فعال ترین داروی موجود برای درمان سرطان پستان در نظر گرفته می شود. اگرچه سرطان پستان یکی از تومورهای جامد حساس به داروهای شیمیایی محسوب می‌شود، اما اغلب تومورها پس از شیمی درمانی مجددا رشد می کنند و بنابراین سرطان پستان در برابر طیف وسیعی از داروهای شیمی درمانی مقاومت نشان می دهد. یکی از مهم ترین دلایل مقاومت در برابر شیمی درمانی وجود زیرمجموعه ای از سلول‌های سرطانی به نام سلول‌های بنیادی سرطانی است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که بسیاری ازترکیبات فیتوکمیکال مشتق شده از گیاهان به طور انتخابی سلول های بنیادی سرطانی را همراه با سلول های تومور در حال تکثیر هدف قرار می‌دهند. علاوه بر این، عوامل ضد سرطانی مشتق شده از گیاه نسبت به داروهای شیمی درمانی عوارض جانبی و سمیت کمتری دارند و بسیاری از آنها به طور هم افزایی یا افزایشی با داروهای شیمی درمانی عمل می کنند و تکثیر سلولی را کاهش می‌دهند و باعث آپوپتوز و توقف چرخه سلولی می‌شوند. بنابراین، استفاده ترکیبی از فیتوکمیکال‌ها و داروهای شیمی درمانی می تواند به توسعه درمان سرطان کمک کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر هم زمان تیمول به عنوان یک ترکیب شیمیایی طبیعی در گیاهان با دوستاکسل به عنوان داروی شیمی درمانی می‌باشد که مطالعات نشان دهنده اثر افزایشی این دو ترکیب بر روی سلول‌های سرطان پستان MCF7 می باشد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، دوستاکسل، سلول های بنیادی سرطانی، تیمول، سلول های سرطان پستان MCF7

Abstract

Breast cancer is the second most common of all cancers and by far the most frequent cancer amongst women. Docetaxel is broadly considered the most active single agent available for the treatment of breast cancer. Although breast cancer is considered one of the most chemosensitive solid tumors, most initially responsive tumors relapse and develop resistance to a broad spectrum of drugs. One of the most important reasons for resistance to chemotherapy is due to a subset of cancer cells, termed cancer stem cells (CSC). Numerous studies have shown that many plants derived phytochemicals selectively target CSCs together with the proliferating tumor cells. Furthermore, plant-derived anticancer agents have less side effect and toxicity than chemotherapy drugs and many of them synergistically or additive act with cancer chemotherapeutics reducing cell proliferation and inducing apoptosis and cell cycle arrest. Therefore, combinational use of phytochemicals and chemotherapy drugs can help to develop cancer treatment. The aim of this study was to investigate combination effect of thymol as a phytochemical component with docetaxel as a chemotherapy drug. Our result showed additive effect of thymol and docetaxel on human breast cancer cell line MCF-7.

Keywords: Breast cancer, Docetaxel, cancer stem cells, thymol, MCF-7

مقدمه

سرطان پستان رایج ترین سرطان در بین زنان سراسر جهان است. مانند انواع دیگر سرطان‌ها ، یکی از مشکلات اصلی در درمان سرطان پستان برگشت سرطان بعد از رادیوتراپی و شیمی درمانی است. شکست درمان و برگشت سرطان بخاطر حضور زیرجمعیت کوچکی از سلول های سرطانی هست که سلول های بنیادی سرطانی [60]نامیده می‌شوند. سلول های بنیادی سرطانی ، سلول‌هایی در داخل تومور با ویژگی خودتجدیدی و پرتوانی هستند که قابلیت تمایز به انواع مختلف سلول های تومور را دارا می‌باشند. علاوه بر این مقاومت این سلول ها به شیمی‌درمانی و پرتو درمانی علت برگشت سرطان و متاستاز بعد از درمان اولیه میباشد[۱, ۲].

داروی شیمی درمانی دوستاکسل ([61]تاکسونر) با جلوگیری ازدپلیمریزاسیون رشته های دوک ها، از تکثیر سلول ها جلوگیری می کند[۳]. اگر چه داروی شیمی‌درمانی دوستاکسل و دوکسوروبیسین اثرات ضد توموری قابل توجه ای بر روی سرطان پستان داشته اند اما عود تعداد زیادی از این سرطان ها بعد شیمی درمانی نشان دهنده مقاومت ان ها به این داروها می باشد[۴]. بنابراین یافتن استراتژی های جدید برای هدف گیری سلول های بنیادی سرطانی امید تازهای برای درمان سرطان پستان خلق میکند.به علاوه وجود اثرات جانبی داروهای شیمی درمانی مانند دوستاکسل و دوکسوروبیسین محققان را تشویق کرد که مواد فعال غیرسمی برای هدف‌گیری و ازبین بردن سلول های بنیادی سرطانی پیدا کنند.

مطالعات زیادی نشان داده است تعداد بسیاری از ترکیبات فیتوکمیکال مشتق از گیاهان اثرات انتی‌اکسیدان و ضد سرطان دارند[۵-۹].همچنین شواهد زیادی نشان داده است ترکیبات فیتوکمیکال به طور انتخابی سلول های بنیادی سرطانی را مورد هدف قرار می‌دهند. همچنین این ترکیبات ضد سرطان، اثرات جانبی و سمیت کمتری نسبت به داروهای شیمی درمانی دارند. بنابراین استفاده از داروهای شیمی درمانی به صورت ترکیبی و همزمان با ترکیبات فیتوکمیکال به پیشرفت درمان سرطان کمک می‌کند[۱۰-۱۲].

تیمول [62]یک ترکیب فنولی مونوترپنوئید است که دراسانس زنیان رومی و اویشن معمولی وجود دارد و دارای ویژگی انتی اکسیدانی ،ضد اسپا سم[۱۳-۱۵] ضد میکروب وضد اثرات التهابی است[۱۶, ۱۷]. مطالعات زیادی اثرات ضد سرطانی تیمول را نشان داده است[۱۸-۲۰].هدف این تحقیق بررسی اثر ضدسرطانی دوستاکسل به تنهایی و درترکیب با تیمول بر علیه سلول های سرطان پستان MCF-7 است.

[60] cancer stem cells (CSCs)
[61] docetaxel
[62] thymol

مواد و روش‌ها

کشت سلول:

رده سلولی MCF ۷-سرطان پستان انسان از بانک سلولی انسیتوپاستور تهیه و کلیه مراحل کشت سلول در شرایط استریل و در زیر هود المینار اتاق کشت سلول انجام می شود. سلول های MCF ۷-در محیط کشت DMEMحاوی ۱۰ FBS% و انتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین ۱ ٪و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با رطوبت کافی و میزان ۵ ٪دی اکسید کربن کشت داده می شود.

بررسی اثر سیتوتوکسیک ترکیب دوستاکسل و تیمول بر روی سلول های سرطان پستان با تکنیک MTT

ابتدا تعداد ۸۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد برای بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی دوستاکسل و ترکیب دوستاکسل با تیمول ، سلول ها با غلظت های مختلف از دوستاکسل و ترکیب دوستاکسل-تیمول تیمار شدند. و به گروه کنترل نیز محیط کشت تنها داده شد. بعد از ۴۸ ساعت به هر خانه پلیت ۱۰ میکرو لیتر MTT با غلظت ۵ میلیگرم بر میلی لیتر اضافه و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس محلول MTT بافیمانده کشیده شد وبه هر چاهک ۱۰۰میکرولیترDMSO برای حل کردن بلور های فورمازان اضافه شدو بعد از گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون دردمای اتاق ، میزان جذب نوری پلیت توسط اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شدهمچنین غلظت مهاری(IC50) نیز تعیین شد. جهت حصول نتیجه بهتر و اطمینان از صحت نتایج به دست امده ، هرکدام از آزمایش ها سه بار تکرار شدند . درصد سلول های زنده طبق فرمول زیر محاسبه شد.

درصد سلول های زنده: (میانگین جذب نوری تست/میانگین جذب نوری کنترل)× ۱۰۰

اثر داروهای ترکیبی با استفاده از شاخص ترکیبی(CI) مطالعه می‌شود.این شاخص براساس معادله اثر متوسط Chou و Talalay مطابق زیرمحاسبه می‌شود:

$$CI = \frac{D2}{D2X} + \frac{D1}{D1X}$$

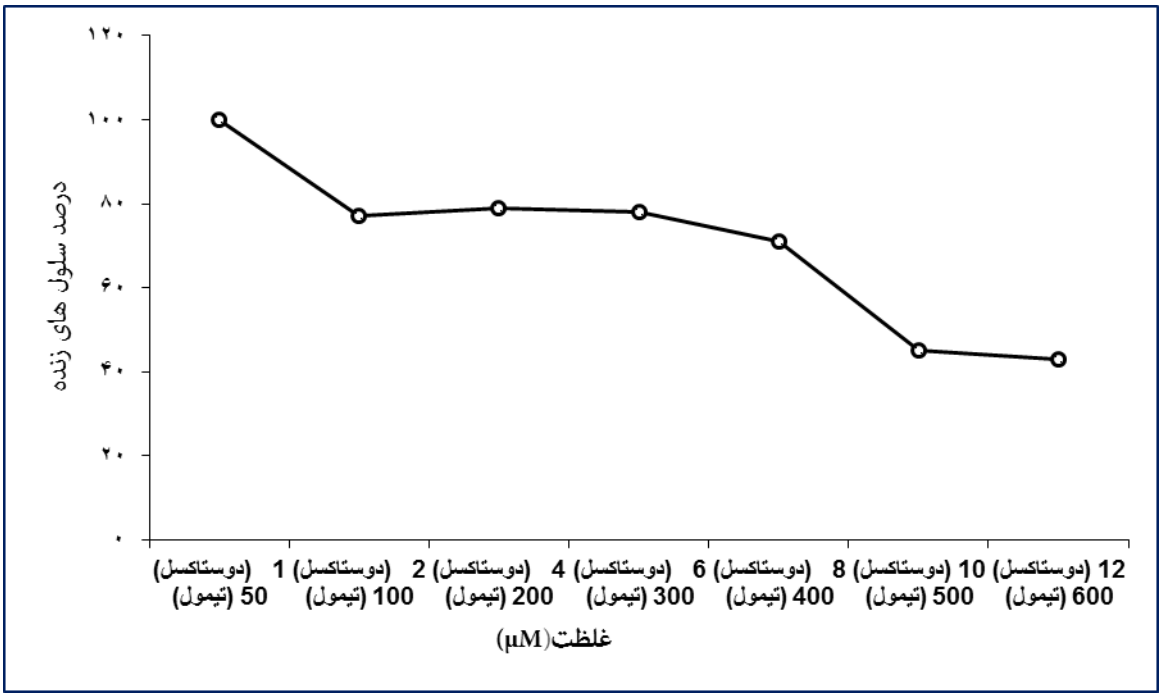
D1 وD2 دوز ترکیبات D1 و D2 برای دست یافتن به مهار x% درحالت ترکیبی هستند. D1X و D2X دوز ترکیبات D1 وD2 برای دست یافتن به مهار x% در حالتی که به تنهایی حضور دارند هستند. ارزش شاخص ترکیبی اگر کوچکتر از یک،مساوی با یک وبزرگتر از یک باشد به ترتیب هم‌افزایی[۶۳](سینرژیسم)،افزایشی[۶۴] وتضاد[۶۵] را در فعالیت داروهای ترکیبی نشان می‌دهد.

63 synergism
64 additivity
65 antagonism

نتایج

مطالعات ازمایشگاهی ثابت کردند دوستاکسل و تیمول اثر مهاری بر تکثیر سلول‌های MCF-7 دارند. . سنجش MTT نشان داد که مقدار IC50 دوستاکسل به تنهایی روی سلول‌های MCF-7 بعد از ۴۸ ساعت تیمار ۱۶,۷ میکرومولار بود. و مقدار IC50 تیمول به تنهایی بعد از ۴۸ ساعت تیمار۶۱۲ میکرومولار بود. درنهایت اثر افزایشی حاصل از ترکیب تیمول با دوستاکسل بررسی شد وIC50 ترکیبی تیمول و دوستاکسل در صورت استفاده هم زمان به ترتیب ۴۸۰ و۹,۶ میکرومولار محاسبه شد.

بنابراین، مقدار CI=1 نشان دهنده تعامل افزایشی بین تیمول و دوستاکسل بود. داده های ما برای اولین بار نشان می دهند که تیمول به طور افزایشی با دوستاکسل در مهار رشد رده سلولی سرطان پستان عمل می کند (شکل ۱).



شکل (۱) اثر افزایشی ترکیب تیمول با دوستاکسل در مهار رشد سلول های سرطان پستان

بحث

اگرچه ترکیب دوستاکسل و دوکسوروبیسین و همچنین تاموکسیفن به طور گسترده به عنوان خط اول شیمی درمانی در درمان سرطان پستان استفاده می شوند، اما درصد CSC های پستان پس از درمان با این داروهای شیمی درمانی رایج کاهش نیافته است[۴, ۲۱-۲۴]. علاوه بر مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمی‌درمانی، سمیت این داروها برای بافت‌های طبیعی و عوارض جانبی آن‌ها، پژوهشگران را برای یافتن رویکردهای درمانی جدید ترغیب کرده است. برای این منظور، نشان داده شده است که استفاده هم

زمان ازترکیبات مشتق شده از گیاهان با داروهای شیمی درمانی ممکن است نتیجه درمان سرطان را با عوارض جانبی سمی کمتر و اثربخشی بیشتر بهبود ببخشد[۲۵-۳۴]. بنابراین، شناسایی ترکیبات طبیعی جدید مشتق از گیاهان که CSC ها را هدف قرار می‌دهند بسیار امیدوارکننده است. تیمول یک ترکیب فنولی مونوترپنوئید است که دراسانس زنیان رومی و اویشن معمولی وجود دارد و دارای ویژگی انتی اکسیدانی ، [۱۳, ۱۴]ضد میکروب وضد اثرات التهابی است[۱۶, ۱۷]. تحقیقات پیشین اثر محافظتی تیمول را در برابر پرتوهای القا کننده اسیب سلولی نشان داده اند. و اثرات ضد جهش زایی تیمول گزارش شده است[۳۵, ۳۶]. مطالعات زیادی اثرات ضد سرطانی تیمول را نشان داده است[۱۸-۲۰]. به عنوان مثال تیمول اثرات ضد تکثیری و آپوپتوز وابسته به غلظت و زمان را بر روی سلول های غیر کوچک سرطان ریه ، سرطان پروستات و رده های سلولی سرطان پستان انسان با متاستاتیک بالا نشان داده است. تیمول نه تنها از تکثیر جلوگیری می کند، بلکه باعث القای آپوپتوز در سلول های سرطانی می شود. تیمول گذر اپیتلیال-مزانشیمی(EMT)، تهاجم و متاستاز را با جلوگیری ازفعالیت مسیر Wnt/B_catenin در سلول های سرطان کلون متوقف می کند. EMT فرایندی است که سلول های اپیتلیال غیرمتحرک چسبندگی خود را به یکدیگر از دست می دهند وخاصیت تهاجم و مهاجرت بدست می اورند.این فرایند در پیشرفت سرطان و متا ستاز ومقاومت دارویی نقش دارد.مسیر های سیگنالی که در این فرایند فعال می شوند در ایجاد مقاومت دارویی سلول های سرطانی نقش دارند.سلول هایی که وارد EMT میشوند ویژگی هایی شبیه به CSCs نشان می‌دهند[۳۷-۳۹]. بنابراین باتوجه به اثرات ضد EMT تیمول و ارتباط EMT باCSC ها تیمول اثر مهاری بر رشد CSCها دارد. در یک مطالعه نشان داده شد تیمار سلول های HL-۶۰با تیمول باعث فعالسازی کاسپازهای ۹ ، ۸ و ۳ می شود[۴۰]. در مطالعه دیگری اثر ضد سرطانی تیمول بر روی سلول های AGSکارسینومای معده انسان نشان داده شد که در این مطالعه تیمول باعث تغییر فشردگی کروماتین ، القا افزایش فاز G-Sub ۱، دپالریزاسیون غشا میتوکندری ، القا اپپتوز و بیان اعضا خانواده Bcl ۲-،کاسپار و PARPمیشود[۴۱].

اثر افزایشی در داروشناسی شرایطی را توصیف می کند که اثرات ترکیبی دو دارو با مجموع اثرات دو دارو که به طور مستقل عمل می کنند برابر است[۴۲, ۴۳]. اثر افزایشی اغلب زمانی رخ می دهد که دو داروی مشابه با هم مصرف شوند تا به همان درجه از اثر درمانی دست یابند و در عین حال اثرات نامطلوب خاص یک داروی خاص را کاهش دهند. با توجه به نتایج این تحقیق، هنگامی که سلول‌های سرطانی MCF-7 انسان با ترکیب دوستاکسل و تیمول به طور هم زمان تیمار شدند یک اثر افزایشی بین این دو ترکیب مشاهده شد.

در نتیجه می توان از تیمول در کنار داروی شیمی درمانی برای کاهش عوارض جانبی و بهبود اثربخشی داروهای شیمی درمانی بر سلول های بنیادی سرطانی و در نهایت کاهش مقاومت به داروهای شیمیایی و عود سرطان استفاده کرد.

منابع

1. Soltanian, S. and M.M. Matin, *Cancer stem cells and cancer therapy.* Tumor Biology, 2011. **32**: p. 425-440.
2. Abdullah, L.N. and E.K.-H. Chow, *Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells.* Clinical and translational medicine, 2013. **2**: p. 1-9.
3. Lavelle, F., et al. *Preclinical evaluation of docetaxel (Taxotere)*. in *Seminars in oncology*. 1995.
4. Baltalı, E., et al., *Combination of docetaxel and doxorubicin as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer.* Tumori Journal, 2001. **87**(1): p. 18-19.
5. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010.* Journal of natural products, 2012. **75**(3): p. 311-335.
6. Nobili, S., et al., *Natural compounds for cancer treatment and prevention.* Pharmacological research, 2009. **59**(6): p. 365-378.
7. Amin, A., et al., *Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs.* International journal of biomedical science: IJBS, 2009. **5**(1): p. 1.
8. Soltanian, S., et al., *Phytochemical composition, and cytotoxic, antioxidant, and antibacterial activity of the essential oil and methanol extract of Semenovia suffruticosa.* Avicenna journal of phytomedicine, 2019. **9**(2): p. 143.
9. Soltanian, S., M. Sheikhbahaei, and N. Mohamadi, *Cytotoxicity evaluation of methanol extracts of some medicinal plants on P19 embryonal carcinoma cells.* Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2017. **7**(7): p. 142-149.
10. Soltanian, S., et al., *Effect of Cinnamic acid and FOLFOX in diminishing side population and downregulating cancer stem cell markers in colon cancer cell line HT-29.* DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **26**: p. 19-29.
11. Soltanian, S., et al., *Kaempferol and docetaxel diminish side population and down-regulate some cancer stem cell markers in breast cancer cell line MCF-7.* Biocell, 2017. **41**(2&3): p. 33.
12. Taylor, W.F. and E. Jabbarzadeh, *The use of natural products to target cancer stem cells.* American journal of cancer research, 2017. **7**(7): p. 1588.
13. Zahin, M., I. Ahmad, and F. Aqil, *Antioxidant and antimutagenic activity of Carum copticum fruit extracts.* Toxicology in vitro, 2010. **24**(4): p. 1243-1249.
14. Bera, D., D. Lahiri, and A. Nag, *Novel natural antioxidant for stabilization of edible oil: the ajowan (Carum copticum) extract case.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 2004. **81**(2): p. 169-172.
15. Meister, A., et al., *Antispasmodic activity of Thymus vulgaris extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects.* Planta medica, 1999. **65**(06): p. 512-5۱۶,

16. Goudarzi, G.R., et al., *Antibacterial activity and chemical composition of Ajowan (Carum copticum Benth. & Hook) essential oil.* Journal of Agricultural Science and Technology, 2011. **13**(2): p. 203-208.
17. Braga, P.C., et al., *Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase.* Pharmacology, 2006. **77**(3): p. 130-136.
18. Andersen, A., *Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol.* International journal of toxicology, 2006. **25**: p. 29-127.
19. Braga, P.C., et al., *Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems.* Pharmacology, 2006. **76**(2): p. 61-68.
20. Jaafari, A., et al., *Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme.* Revista Brasileira de Farmacognosia, 2007. **17**: p. 477-491.
21. Liu, H ,et al., *Tamoxifen-resistant breast cancer cells possess cancer stem-like cell properties.* Chinese medical journal, 2013. **126**(16): p. 3030-3034.
22. Kim, J.B., et al., *Berberine diminishes the side population and ABCG2 transporter expression in MCF-7 breast cancer cells.* Planta medica, 2008. **74**(14): p. 1693-1700.
23. Lee, H.E., et al., *An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer.* British journal of cancer, 2011. **104**(11): p. 1730-173۸,
24. Zhang, X., et al., *Effects of the combination of RAD001 and docetaxel on breast cancer stem cells.* European Journal of Cancer, 2012. **48**(10): p. 1581-1592.
25. Ding, X.-Z. and T.E. Adrian, *Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells.* Pancreas, 2002. **25**(4): p. e71-e76.
26. Feldmann, G., et al., *Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers.* Cancer research, 2007 ;(۵)۶۷ .p. 2187-2196.
27. Giacomelli, C., et al., *Carnosol controls the human glioblastoma stemness features through the epithelial-mesenchymal transition modulation and the induction of cancer stem cell apoptosis.* Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 1-17.
28. Kim, B., et al., *Apigenin inhibits cancer stem cell-like phenotypes in human glioblastoma cells via suppression of c-met signaling.* Phytotherapy Research, 2016. **30**(11): p. 1833-1840.
29. Park, S., J. Sung, and N. Chung, *Berberine diminishes side population and down-regulates stem cell-associated genes in the pancreatic cancer cell lines PANC-1 and MIA PaCa-2.* Molecular and cellular biochemistry, 2014. **394**: p. 209-215.

30. Patel, B.B., et al., *Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R.* International journal of cancer, 2008. **122**(2): p. 267-273.
31. Patel, B.B., et al., *Curcumin targets FOLFOX-surviving colon cancer cells via inhibition of EGFRs and IGF-1R.* Anticancer research, 2010. **30**(2): p. 319-325.
32. Shankar, S., et al., *Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition.* PloS one, 2011. **6**(1): p. e16530.
33. Tsai, P.-H., et al., *Dietary flavonoids luteolin and quercetin suppressed cancer stem cell properties and metastatic potential of isolated prostate cancer cells.* Anticancer Research, 2016. **36**(12): p. 6367-6۳۸۰,
34. Zhou, W., et al., *Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells.* International journal of oncology, 2010. **37**(3): p. 551-561.
35. Archana, P., et al., *Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity.* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009. **680**(1-2): p. 70-77.
36. Mezzoug, N., et al., *Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of Origanum compactum essential oil and some of its constituents.* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2007. **629**(2): p. 100-110.
37. Elbe, H., et al., *Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer.* Bratislavske lekarske listy, 2020. **121**(2): p. 122-128.
38. Zeng, Q., et al., *Thymol Isolated from Thymus vulgaris L. inhibits colorectal cancer cell growth and metastasis by suppressing the Wnt/β-catenin pathway.* Drug Design, Development and Therapy :۲۰۲۰ ,p. 2535-2547.
39. Du, B. and J.S. Shim, *Targeting epithelial–mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer.* Molecules, 2016. **21**(7): p. 965.
40. Deb, D.D., et al., *Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60.* Chemico-biological interactions, 2011. **193**(1): p. 97-106.
41. Kang, S.-H., et al., *Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells.* Journal of microbiology and biotechnology, 2016. **26**(1): p. 28-37.
42. Bank, H.S.D., *Canadian centre for occupational health and safety*. 1998, Q-1.
43. Bista, S.R., et al., *Protein binding of fentanyl and its metabolite nor-fentanyl in human plasma, albumin and α-1 acid glycoprotein.* Xenobiotica, 2015. **45**(3): p. 207-212.

بررسی داربست های بر پایه پلی آمید۶ و کاربردهای آن در پوشش زخم

مریم کیانی خراجی[۱]، حمید حیدرزاده درزی [۲*]، سارا سیمرغ[۳]، حسین زارع ولوکلائی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه حکیم سبزواری

۲. استادیار، دانشگاه حکیم سبزواری

۳. استادیار،دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران

۴. استادیار، مرکز آموزش عالی فنی و مهندسی بوئین زهرا

h.heydarzadeh@hsu.ac.ir*

چکیده

پوست بدن انسان به عنوان یک سد محافظ برای اندام های داخلی در برابر عوامل خارجی عمل می کند. زخم ناشی از آسیب به بافت پوست است که ساختار و عملکرد طبیعی پوست و بافت را مختل می کند. یکی از عوامل موثر در بهبود زخم، استفاده از زخم پوش مناسب است. حفاظت مکانیکی از زخم، پیشگیری از عفونت و جذب ترشحات زخم سبب تسریع روند بهبود زخم می شوند. زخم پوش های مدرن متشکل از ترکیبات مختلف با فراهم کردن این شرایط محیط درمانی ایده‌آلی را برای زخم‌ها ایجاد می‌کنند. پلی آمید ۶، یک پلیمر سنتزی است که به دلیل زیست سازگاری، استحکام مکانیکی مناسب و پایداری شیمیایی و حرارتی بالا، پتانسیل استفاده در کاربردهای زیست پزشکی و به خصوص زخم پوش را دارد. با ترکیب پلی آمید ۶ و پلیمرهای طبیعی، ویژگی های داربست تهیه شده بهبود می یابد. در این پژوهش، خواص داربست های بر پایه پلی آمید ۶، تاثیر ترکیب پلیمرهای طبیعی در این داربست ها، و در نهایت کاربرد آنها در مهندسی بافت و زخم پوش مورد بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: پلی آمید ۶، پلیمرهای طبیعی، زخم پوش، مهندسی بافت.

Investigation of polyamide 6-based scaffolds and its applications in wound dressing

Abstract

The human skin acts as a protective barrier for the internal organs against external factors. A wound is damage to skin tissue that disturbs normal skin and tissue structure and function. The use of a suitable wound dressing is one of the most effective parameters in wound healing. Mechanical protection of wound, prevention of infection and adsorption of wound secretions accelerate the wound healing process. By providing these conditions, modern wound dressings including various materials create an ideal healing environment for wounds. Polyamide 6, a synthetic polymer, has potential to be used in biomedical applications, especially wound dressings, due to its biocompatibility, good mechanical strength, and high chemical and thermal stability. Natural polymers can promote the properties of the prepared polyamide 6 based scaffold. In this research, properties of polyamide 6 based scaffolds and the effect of natural polymers content in these scaffolds for application in tissue engineering and wound dressing were investigated.

Keywords: Polyamide 6, natural polymers, wound dressing, tissue engineering.

۱- مقدمه

پوست بزرگترین اندام انسان است که به عنوان یک سد محافظ برای اندام های داخلی در برابرعوامل خارجی مانند پاتوژن ها، ویروس ها، میکروارگانیسم ها و همچنین شرایط محیطی خاص (محدودیت های شیمیایی، مکانیکی یا حرارتی) عمل می کند. بر این اساس، پوست همیشه می‌تواند دری باز به روی آسیب‌ها یا عوامل مضر باشد که منجر به زخم‌های غیرقابل التیام می‌شود [۱]. پوست ساختاری چند لایه دارد که بیرونی ترین آن اپیدرم نام دارد که عمدتا از سلول های مارکل، کراتینوسیت ها، ملانوسیت ها و سلول های لانگرهانس تشکیل شده است. لایه بعدی، درم نام دارد که بیشتر سلول های تشکیل دهنده آن فیبروبلاست ها هستند و حاوی رگ های خونی و الیاف کلاژن می باشد. دو لایه ذکر شده در بالای بافت زیر جلدی که اصطلاحا هیپودرم نامیده می شود قرار دارند. لایه هیپودرم از الاستین، چربی و ماکروفاژها تشکیل شده است و قسمت های داخلی بدن مانند استخوان و ماهیچه را متصل می کند [۲]. زخم جراحت یا آسیب ساختار و عملکرد پوست است که توسط عوامل فیزیکی، مکانیکی، حرارتی، شیمیایی و الکتریکی ایجاد می شود. زخم های پوست باعث از بین رفتن پیوستگی اپیتلیوم با از دست دادن یا بدون از دست دادن بافت همبند زیرین است [۳]. زخم ها را می توان به دو دسته حاد یا مزمن طبقه بندی کرد. زخم حاد در مدت زمان پیش بینی شده ای بهبود یافته و پس از بهبود عوارضی نشان نمی دهد. زخم مزمن در مدت زمان بیشتری التیام می یابد و ممکن است درمان آن شامل برخی از عوارض نیز باشد [۴]. ترمیم زخم واکنش فیزیولوژیکی بسیار پیچیده یک سیستم زنده به آسیب فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی یا حرارتی است. این فرایند شامل تعامل بین سلول‌ها، اجزای ماتریکس و سایر عوامل بیولوژیکی است که بهبودی را تسهیل می کند و یکپارچگی بافت را بازیابی می کند [۵].

مراحل بهبود زخم شامل هموستاز، التهاب، تکثیر سلولی و بازسازی بافت می باشد [۶]. حفاظت مکانیکی از زخم، پیشگیری از عفونت و جذب ترشحات زخم سبب تسریع روند بهبود زخم می شوند که زخم پوش های مدرن با فراهم کردن عوامل نامبرده، محیط درمانی ایده‌آلی را برای زخم‌ها ایجاد می‌کنند. یک داربست ایده آل برای ترمیم زخم باید رطوبت اطراف زخم را کنترل کند، ترشحات اضافی را از بین ببرد، از زخم در برابر عفونت و میکروارگانیسم محافظت کند و استحکام مکانیکی کافی داشته باشد. همچنین باید به راحتی تعویض شود، امکان تبادل گاز در آن فراهم باشد، درد زخم را تسکین دهد، زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و غیر سمی باشد. زخم پوش مناسب بر اساس ارزیابی دقیق از عمق، موقعیت، وسعت زخم و میزان ترشح زخم انتخاب می شود [۷-۹].

زخم پوش های سنتی معمولا روی زخم‌های خشک و تمیز شده اعمال شده و شامل گاز و بانداژ می باشند. عملکرد اصلی این زخم پوش ها به دلیل ساختار فیبری آنها، جذب ترشح و مایع از زخم می باشد [۱۰]. مطالعات اخیر بر ایجاد زخم پوش با خواص مختلف برای حفظ محیط زخم در شرایط مناسب و نه فقط پوشاندن آن متمرکز شده‌اند. زخم پوش های سنتی نمی توانند محیط مرطوب را برای زخم فراهم کنند،

بنابراین پانسمان های مدرن با فرمولاسیون های پیشرفته تر جایگزین شده اند. پانسمان زخم مدرن علاوه بر این که پوششی برای زخم هستند بهبود زخم را تسریع می کنند. این زخم پوش ها یک محیط درمانی ایده‌آل و مرطوب برای زخم‌ها ایجاد می‌کنند. زیست مواد مختلف تحت عنوان فیلم نیمه تراوا، فوم نیمه تراوا ، هیدروژل، هیدروکلوئید و نانوالیاف به عنوان زخم پوش استفاده شده اند [۳, ۱۱]. تاکنون، استراتژی‌های متعددی برای ساخت داربست‌های ترمیم زخم، مانند اکستروژن، قالب گیری ، خشک کردن انجمادی، نمونه سازی سریع، و الکتروریسی اجرا شده است [۵]. ترکیب پلیمرهای سنتزی و طبیعی نیز به عنوان یک استراتژی امیدوارکننده برای غلبه بر محدودیت‌های هر کدام به صورت جداگانه دیده می‌شود. این رویکرد استحکام و دوام یک پلیمر مصنوعی را با زیست سازگاری و زیست فعالی پلیمرهای طبیعی همراه می کند [۱۲].

پلی آمید ۶، یک پلیمر مصنوعی است که به دلیل زیست سازگاری، استحکام مکانیکی بالا، پایداری مناسب در مایع بدن انسان و پایداری شیمیایی و حرارتی بالا، پتانسیل استفاده در کاربردهای زیست پزشکی را دارد [۱۳]. Dias و همکاران در سال ۲۰۱۹ داربست پلی آمید ۶ اصلاح شده با روغن سویا را جهت استفاده بعنوان زخم پوش مورد آزمایش قرار دادند. در این پژوهش اثر افزودن فاکتور رشد PDGF-BB بر روند درمان زخم نیز بررسی شد. داربست های تهیه شده اتصال سلول های فیبروبلاست را تقویت کرده و داربست اصلاح شده با افزایش انرژی آزاد سطحی، چسبندگی سلولی، تشکیل کلاژن و ترشح ماتریکس خارج سلولی را بهبود بخشیده و در نتیجه روند بهبود زخم را تسریع کردند. نتایج نشان دادند که وجود پلی آمید در این داربست ها سبب افزایش زنده مانی سلول ها می شود [۱۴]. Nur وهمکاران در سال ۲۰۲۱ حصیرهای نانوالیاف پلی آمید ۶، عسل و اسید بوریک را با تکنیک الکتروریسی و الکترواسپری برای کاربردهای ترمیم زخم تهیه کردند. تمام نانوالیاف تولید شده می توانند به طور موثر ترشحات زخم را جذب کنند که این امر می تواند ناشی از ماهیت آبدوست پلی آمید ۶ باشد. همچنین الیاف تولید شده خاصیت ضد باکتریایی داشته و به این ترتیب این داربست خواص مناسبی را برای استفاده بعنوان زخم پوش دارا می باشد [۱۵]. در این پژوهش، به بررسی خواص پلی آمید ۶ در مهندسی بافت پرداخته می شود. همچنین کاربردهای این ماده در زخم پوش و تاثیر ترکیب آن با پلیمرهای طبیعی مورد بررسی قرار می گیرد.

۲- کاربرد پلی آمید ۶ در مهندسی بافت

پلی آمید ۶ به دلیل ماهیت زیست سازگار، پایداری شیمیایی مطلوب و خواص مکانیکی قابل تنظیم، به طور گسترده به عنوان بخیه، کاتتر[66]، دندان مصنوعی و غیره استفاده می شود. این ماده می تواند به راحتی به صورت الیاف، فیلم و قطعات قالب گیری شده شکل دهی شود. همچنین با مواد مختلف ترکیب شده و به عنوان زخم پوش استفاده می شود. در سال های اخیر، کامپوزیت های حاوی پلی آمید ۶ به طور فعال در

[66] Catheter

مهندسی بافت به عنوان جایگزینی برای ایمپلنت های فلزی با پتانسیل زیست فعالی مناسب برای رشد استخوان مورد تحقیق قرار گرفته اند. از آنجا که در کاربردهای پزشکی، پلی آمید در مدتی طولانی با بافت در تماس است، محققان در حال توسعه استراتژی‌های ضد میکروبی برای مواد بر پایه این ماده می باشند تا پتانسیل آن‌ها را ارتقا دهند [۱۶]. جدول ۱ تعدادی از کاربردهای این ماده در مهندسی بافت را به همراه خواص داربست های تهیه شده نشان می دهد.

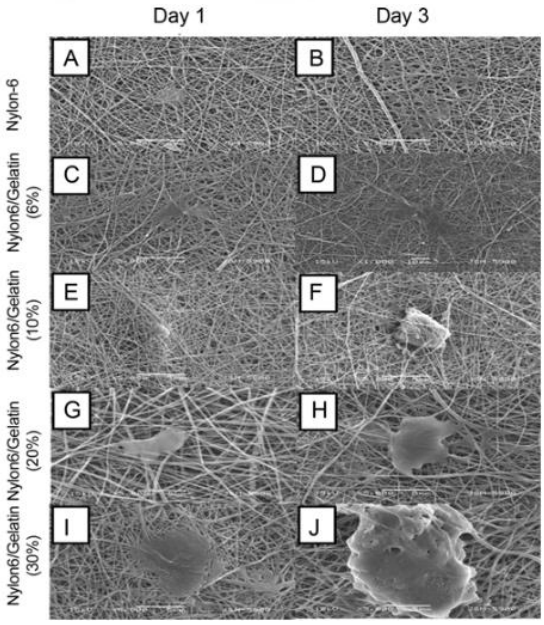
جدول ۱- کاربرد پلی آمید ۶ در مهندسی بافت

ردیف	مواد تشکیل دهنده داربست	نوع داربست	کاربرد	مزایا	منابع
۱	پلی آمید ۶ – روغن سویا – فاکتور رشد PDGF – BB	الیاف	زخم پوش	چسبندگی و تکثیر سلولی مناسب، خواص مکانیکی مناسب، تشکیل کلاژن و ترشح ECM، حفظ رطوبت محیط و جذب ترشحات زخم	[14]
۲	پلی آمید ۶ – ژلاتین	نانوالیاف	زخم پوش	خواص مکانیکی مناسب، سازگاری سلولی، چسبندگی و تکثیر سلولی	[17]
۳	پلی آمید ۶ – عسل – بوریک اسید	نانوالیاف	زخم پوش	ترشوندگی و پایداری حرارتی مناسب، ضد باکتریایی، آبدوست	[15]
۴	پلی آمید ۶ – آلژینات – پلی هگزا متیلن بیگوانید – نانوذرات نقره	الیاف	زخم پوش	آبدوست، جاذب ترشحات، ضدباکتریایی، انعطاف پذیری	[18]
۵	پلی آمید ۶ – میکروسلولز – ان وینیل کاپرولاکتام	فیلم	زخم پوش	خواص مکانیکی مناسب، آبدوست، ضد باکتریایی	[19]
۶	پلی آمید ۶	الیاف	مری	ساختار شبیه به ECM، خواص مکانیکی بهبودیافته نسبت به ECM، زیست سازگاری و چسبندگی سلولی برای سلول های AD-MSC و BMD-MSC	[20]
۷	پلی آمید ۶ – کیتوزان – هیدروکسی آپاتیت	غشای دولایه	استخوان	ایمنی بیولوژیکی، زیست فعالی خوب، زیست سازگاری و رسانایی استخوان خواص مکانیکی مناسب	[13]
۸	پلی آمید ۶ – کیتوزان	نانوالیاف	زیست پزشکی	زیست سازگاری، تکثیر سلولی مناسب	[21]
۹	پلی آمید ۶ – سیر	نانوالیاف	زخم پوش	ضد باکتریایی، آبدوست، رشد سلولی مناسب	[22]

۲-۱- کامپوزیت پلی آمید ۶ / پلیمرهای طبیعی در زخم پوش

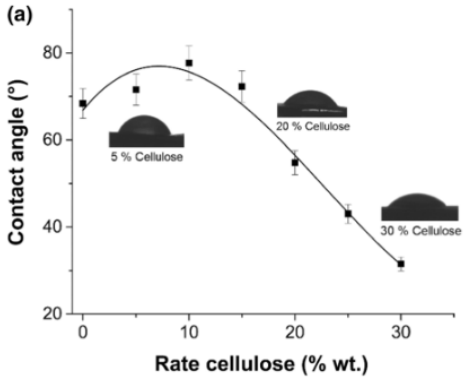
اسدی و همکاران زخم پوش پلی آمید، آلژینات و پلی هگزا متیلن بیگوانید حاوی نانوذرات نقره را تهیه کردند. در این پژوهش پلی آمید بعنوان پلیمر پایه استفاده شد و به عنوان جایگزینی برای زخم پوش پنبه ای معرفی شد. برای افزایش آبدوستی پلی آمید، گروه های هیدروکسیل با عملیات پلاسمای گاز اکسیژن روی سطح پلی آمید افزوده شدند. طی دو آزمایش جداگانه نانوکامپوزیت های آلژینات، پلی هگزا متیلن بیگوانید و نانوذرات نقره به زخم پوش پلی آمید و زخم پوش پنبه ای اضافه شدند. با بررسی اطلاعات به دست آمده، خاصیت ضد باکتریایی زخم پوش پلی آمید به طور قابل توجهی بیشتر از زخم پوش پنبه ای است که نکته مثبتی برای جایگزینی داربست پلی آمید برای پوشش زخم ها می باشد. آلژینات کلسیم، که محیطی مرطوب در اطراف زخم ایجاد می کند، می تواند روند بهبود زخم را بهبود بخشد و نانوذرات نقره و پلی هگزا متیلن بیگوانید فعالیت ضد باکتریایی مطلوبی بر روی زخم پوش پنبه ای و بستر پلی آمید ایجاد می کنند [۱۸].

داربست پلی آمید ۶ و ژلاتین توسط Panthi و همکاران در سال ۲۰۱۳ به منظور کاربردهای زیست پزشکی از جمله زخم پوش توسط روش الکتروریسی تهیه شد. این داربست خواص مکانیکی مناسبی داشته و همچنین تکثیر سلولی را افزایش داد. شکل ۱ تصاویر SEM نحوه اتصال سلول فیبروبلاست بر روی نانوالیاف کامپوزیتی پلی آمید ۶ و پلی آمید ۶-ژلاتین در روز اول و سوم کشت را نشان می دهد. بر اساس تصویر شکل ۱، مورفولوژی طبیعی رشد سلولی روی نانوالیاف مشاهده شد. رشد سلولی در داربست های نانوالیاف کامپوزیت پلی آمید ۶- ژلاتین نسبت به نانوالیاف پلی آمید ۶ بیشتر بدست آمد. ترکیب ژلاتین با پلی آمید ۶ فعالیت زیستی را بهبود می بخشد و سبب گسترش یافتن سلول ها روی الیاف می شود. ماهیت آبدوست داربست های پلی آمید ۶- ژلاتین نیز ممکن است دلیلی برای چسبندگی و تکثیر بهتر فیبروبلاست ها باشد [۱۷].



شکل ۱- تصاویر SEM چسبندگی سلولی بر روی پلی آمید ۶ (A, B)، پلی آمید ۶- ژلاتین (۶ درصد وزنی) (C, D)، پلی آمید ۶- ژلاتین (۱۰ درصد وزنی) (E, F) پلی آمید ۶- ژلاتین (۲۰ درصد وزنی) (G, H) و پلی آمید ۶- ژلاتین (۳۰ درصد وزنی) (I,J) پس از ۱ و ۳ روز.

در سال ۲۰۲۰ پژوهشی توسط Flores-Rojas و همکاران انجام شد که طی آن، خواص داربست سلولز، پلی آمید ۶ و N-وینیل پلی کاپرولاکتام مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین اثرات داروهای ضد میکروبی وانکومایسین و بنزالکونیوم کلرید نیز بررسی شد. زخم پوش تهیه شده خواص مکانیکی و ضد میکروبی مناسبی را از خود نشان داد. همچنین جذب دارو در داربست های کامپوزیتی افزایش یافته و رهایش آن به صورت کنترل شده انجام گرفت. مطابق نتایج این پژوهش، افزودن سلولز در مقادیر معین آبدوستی داربست را افزایش داده و در نتیجه سبب بهبود عملکرد زخم پوش شده است. همان طور که در شکل ۲ نمایش داده شده است، میکروسلولز در مقادیر ۲۰٪ یا بیشتر منجر به کاهش قابل توجهی در زاویه تماس آب شد، به گونه ای که با افزودن ۳۰٪ میکروسلولز به پلی آمید ۶ در داربست، زاویه تماس آب برابر با ۳۱ درجه اندازه گیری شد [۱۹].



شکل ۲- زاویه تماس آب در دمای اتاق فیلم های پلی آمید۶-میکروسلولز با نسبت های مختلف میکروسلولز.

نتیجه گیری

جذب کنترل شده ترشحات زخم و جلوگیری از عفونت های باکتریایی از خصوصیات اصلی یک زخم پوش مناسب به شمار می آیند. داربست مورد استفاده در زخم پوش با تبادل مناسب جریان گاز امکان کنترل رطوبت زخم و متعاقب آن سهولت تعویض را فراهم می کند. زخم پوش های مدرن برخلاف نمونه های سنتی با بکارگیری همزمان از خواص ترکیبات مختلف امکان دستیابی به این شرایط را ممکن می سازد. به طور کلی ترکیب پلیمرهای سنتزی و طبیعی سبب ایجاد داربست هایی با خواص مناسب برای استفاده در زیست پزشکی و به ویژه زخم پوش می شود. در این مطالعه خواص داربست های تهیه شده با پلی آمید ۶ و تاثیر ترکیب پلیمرهای طبیعی با آن بررسی شده است. آبدوستی زخم پوش بر پایه پلی آمید ۶ با افزودن سلولز به داربست بهبود یافته و در نتیجه داربست عملکرد مناسبتری در ترمیم زخم نشان داده است. همچنین بر اساس نتایج چسبندگی سلولی و سازگاری سلول در مجاورت داربست بر پایه پلی آمید ۶ با افزودن ژلاتین بهبود یافته است. مطابق پژوهش های انجام شده، پلیمر های طبیعی باعث بهبود عملکرد زخم پوش مبتنی بر پلی آمید ۶ شده و کاربرد این ماده را گسترش می دهند.

منابع

1. Sousa, M.P., et al., *Bioinspired multilayer membranes as potential adhesive patches for skin wound healing.* Biomaterials Science, 2018. **6**(7): p. 1962-1975.
2. Shahrousvand, M., V. Haddadi-Asl, and M. Shahrousvand, *Step-by-step design of poly (ε-caprolactone) /chitosan/Melilotus officinalis extract electrospun nanofibers for wound dressing applications.* International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **180**.
3. Eskandarinia, A., et al., *A propolis enriched polyurethane-hyaluronic acid nanofibrous wound dressing with remarkable antibacterial and wound healing activities.* Int J Biol Macromol, 2020. **149**: p. 467-476.
4. Singh, M.R., et al., *Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances.* Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2013. **41**(3): p. 202-12.
5. Negut, I., G. Dorcioman, and V. Grumezescu, *Scaffolds for wound healing applications.* Polymers, 2020. **12**(9): p. 2010.
6. Gaydhane, M.K., J.S. Kanuganti, and C.S. Sharma, *Honey and curcumin loaded multilayered polyvinylalcohol/cellulose acetate electrospun nanofibrous mat for wound healing.* Journal of Materials Research, 2020. **35**(6): p. 600-609.
7. Rezvani Ghomi, E., et al., *Wound dressings: Current advances and future directions.* Journal of Applied Polymer Science, 2019.
8. Azhar, F.F., et al., *Evaluation of a novel bioactive wound dressing: an in vitro and in vivo study.* J Wound Care, 2021. **30**(6): p. 482-490.
9. Qiu, Y., et al., *A novel multilayer composite membrane for wound healing in mice skin defect model.* Polymers, 2020. **12**(3): p. 573.

10. Brumberg, V., et al., *Modern wound dressings: hydrogel dressings.* Biomedicines, 2021. **9**(9): p. 1235.
11. Dhivya, S., V.V. Padma, and E. Santhini, *Wound dressings–a review.* BioMedicine, 2015. **5**(4): p. 22.
12. Miguel, S.P., et al., *Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review.* Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2018. **169**: p. 60-71.
13. Niu, X., et al., *Electrospun polyamide-6/chitosan nanofibers reinforced nano-hydroxyapatite/polyamide-6 composite bilayered membranes for guided bone regeneration.* Carbohydrate Polymers, 2021. **260**: p. 117769.
14. Dias, F.T.G., et al., *Soybean-modified polyamide-6 mats as a long-term cutaneous wound covering.* Materials Science and Engineering: C, 2019. **99**: p. 957-968.
15. Parın, F.N., et al., *Fabrication of polyamide 6/honey/boric acid mats by electrohydrodynamic processes for wound healing applications Polyamide 6/Honey/Boric Acid Bioactive Fibers.* Materials Today Communications, 2021. **29**: p. 102921.
16. Shakiba, M., et al., *Nylon-A material introduction and overview for biomedical applications.* Polymers for Advanced Technologies, 2021.
17. Panthi, G., et al., *Preparation and characterization of nylon-6/gelatin composite nanofibers via electrospinning for biomedical applications.* Fibers and Polymers, 2013. **14**: p. 718-723.
18. Asadi, L., J. Mokhtari, and M. Abbasi, *An alginate–PHMB–AgNPs based wound dressing polyamide nanocomposite with improved antibacterial and hemostatic properties.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2021. **32**: p. 1-11.
19. Flores-Rojas, G., et al., *Synthesis of polyamide-6@ cellulose microfilms grafted with N-vinylcaprolactam using gamma-rays and loading of antimicrobial drugs.* Cellulose, 2020. **27**: p. 2785-2801.
20. Zhuravleva, M., et al., *In vitro assessment of electrospun polyamide-6 scaffolds for esophageal tissue engineering.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2019. **107**(2): p. 253-268.
21. Nirmala, R., et al., *Preparation of polyamide-6/chitosan composite nanofibers by a single solvent system via electrospinning for biomedical applications.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **83**(1): p. 173-178.
22. Hussain, N., et al., *Fabrication and Characterization of Novel Antibacterial Ultrafine Nylon-6 Nanofibers Impregnated by Garlic Sour.* Fibers and Polymers, 2020. **21**: p. 2780-2787.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی داربست های بر پایه زئین و کاربردهای آن در ترمیم زخمهای تمام ضخامت پوستی

زهرا فضائلی پور[۱]، حمید حیدرزاده درزی[۲*]، بی بی فاطمه کلالی نیا[۳]، نفیسه جیرفتی[۴]، سید محمد مهدی نوری[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه حکیم سبزواری

۲. استادیار، دانشگاه حکیم سبزواری

۳. دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴. پسادکترا، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۵. استادیار، دانشگاه حکیم سبزواری

h.heydarzadeh@hsu.ac.ir*

چکیده

پوست به عنوان بزرگترین اندام در انسان نقش مهمی در محافظت در برابر عوامل مضر محیطی نظیر اشعه ماوراء بنفش، مواد شیمیایی، ارگانیسم های خارجی و غیره دارد. میلیون ها نفر از زخم های پوستی ناشی از آسیب های خارجی یا بیماری ها رنج می برند. پوشاندن زخم با پوشش مناسب از اولین اقدامات برای کنترل خونریزی و ترمیم محسوب می شود. یک زخم پوش مناسب می تواند بر مراحل بهبود زخم از جمله مرحله هموستاز، التهاب، تکثیر و بازسازی تاثیر داشته باشد. در سال های اخیر، زخم پوش های مبتنی بر مواد طبیعی به دلیل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و قابلیت بازسازی پوست، پتانسیل بالایی از خود نشان دادند. از میان این مواد، زئین، پروتئین اصلی موجود در ذرت، با نشان دادن زیست سازگاری مناسب با ترکیبات ماتریکس خارج سلولی برای کاربرد در زمینه های پزشکی و دارویی پیشنهاد شده است. زئین می تواند به آسانی به صورت ساختارهای مختلف نظیر فیلم، میکروکره، نانو ذرات، میسل، ژل، فوم و الیاف ساخته شود. هدف این پژوهش، بررسی خواص زخم پوش های بر پایه زئین به همراه مشتقات سلولز و پلیمرهای سنتزی می باشد. همچنین تاثیر زئین بر سازگاری سلولی و رهایش دارو مورد بحث قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: زخم پوش، زئین، مشتقات سلولز، چسبندگی سلولی، رهایش دارو

Investigation of zein-based scaffolds and its applications for full-thickness wound healing

Abstract

As the largest human organ, the skin plays an important role in protecting against UV rays, chemicals, foreign organisms and other harmful environmental factors. Millions of people suffer from skin damage caused by external trauma or diseases. When the skin is injured, it should be immediately covered with a suitable dressing depend on the size and severity of the wound. Covering the wound with a suitable dressing is one of the first acts to control bleeding and healing. A suitable dressing can affect the wound healing stages, including the hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling. In recent years, wound dressings based on natural materials show great potential due to their biocompatibility, biodegradability, and skin regeneration capability. Among these different types of materials, zein, the major protein in maize, shows excellent biocompatibility with extracellular matrix components and therefore has been recommended for potential applications in the biomedical and pharmaceutical fields. Zein can be easily fabricated as different structures including films, microspheres, nanoparticles, micelles, gels, foams, and fibers. The purpose of this research is to investigate the properties of wound dressings based on zein with cellulose derivatives and synthetic polymers. Also, the effect of zein on cell compatibility and drug release has been discussed.

Keywords: wound dressing, zein, cellulose derivatives, cell attachment, drug release

۱- مقدمه

مراقبت از زخم یک چالش مهم و ضرورتی رو به گسترش است. با توسعه مواد جدید و کارآمد و پیشرفت های اخیر علم و فناوری، ساخت و سنتز زخم پوش ها مورد توجه قرار گرفته است. زخم پوش های سنتی زخم، مانند بانداژ پنبه ای و گاز، بخش زیادی از رطوبت موجود در زخم را جذب می کند که سطح زخم را به شدت خشک می کند و منجر به کاهش سرعت التیام و ایجاد درد در جدا شدن زخم پوش می شود. در مقابل، طیف وسیعی از پلیمرها به شکل فیلم، نانوالیاف و ژل تولید شده‌اند که می‌توانند شرایط بهینه را در روند بهبود زخم فراهم کنند [۱, ۲]. در صورت بروز زخم، بدن باید با آن سازگار شده و تعدادی واکنش بیوشیمیایی را برای ترمیم بافت های آسیب دیده و بهبود زخم انجام دهد. این سری از واکنش ها شامل همگام سازی موضعی انواع سلول ها و فاکتورهای رشد هستند که به مجموعه ای از مراحل متوالی شامل هموستاز، التهاب، تکثیر و بازسازی (بلوغ) که با یکدیگر همپوشانی دارند تقسیم می شوند [۳, ۴].

یک زخم پوش ایده آل باید دارای ویژگی هایی از جمله کنترل رطوبت اطراف زخم، انتقال مناسب گازها، دفع ترشحات اضافی، محافظت از زخم در برابر عفونت ها و میکروارگانیسم ها، زیست سازگار، زیست تخریب پذیر، الاستیک، غیرسمی و تسکین دهنده درد زخم باشد. این زخم پوش باید رگزایی را تحریک کرده، به آسانی تعویض و یا حذف شود، مقرون به صرفه باشد و خواص مکانیکی مناسبی داشته باشد [۱, ۵, ۶]. زخم پوش ها می توانند بر اساس وجود یا عدم وجود یک یا چند ماده فعال دارویی یا مواد طبیعی به فرم فعال و غیرفعال طبقه بندی شوند. زخم پوش‌های غیرفعال را می‌توان زخم پوش‌های سنتی خشک در نظر گرفت که برای فرآیند بهبود سریع‌تر زخم ضروری هستند. طیف گسترده ای از زخم پوش های غیرفعال برای انواع ضایعات پوستی وجود دارد که می توان به گاز، بانداژ طبیعی و مصنوعی اشاره کرد. زخم پوش های فعال به عنوان پوشش های مدرن حاوی انواع زیادی از مواد فعال دارویی یا مواد طبیعی با خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی نام برد. زخم پوش های مدرن یا پیشرفته برای پوشش ضایعات بافتی طراحی شده اند و در این دسته هیدروژل ها، هیدروکلوئیدها، نانوالیاف، فیلم های نیمه تراوا و فوم های نیمه تراوا قرار می گیرند. یکی از بزرگترین تفاوت های بین زخم پوش سنتی و مدرن حفظ رطوبت موضعی زخم می باشد. بنابراین، زخم پوش‌های سنتی ظرفیت کمتری برای حفظ رطوبت موضعی در محل زخم دارند و زخم پوش‌های مدرن رطوبت موضعی عالی را برای بهبود زخم فراهم می‌کنند [۵]. در سال های اخیر، زخم پوش های مبتنی بر مواد زیستی به دلیل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و قابلیت بازسازی پوست، پتانسیل بالایی از خود نشان داده اند [۷]. زئین، محتوای اصلی پروتئین در ذرت، یک پلیمر زیستی مورد تایید FDA است که به دلیل زیست سازگاری با اجزای ماتریکس خارج سلولی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است [۸]. این ماده زیست تخریب پذیر بوده و در برابر حملات میکروبی مقاوم است. همچنین می تواند به راحتی به صورت فیلم، ذرات، میسل و الیاف ساخته شود [۹]. چنین خواصی سبب شده است تا

زئین برای کاربردهای دارورسانی، بسته بندی مواد غذایی، مهندسی بافت و پوشش زخم مورد بررسی قرار گیرد [۱۰].

در پژوهشی که توسط Qin و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد، غشای الیاف زئین و عصاره میخک جهت بهبود زخم تهیه شد. این غشا ساختار متخلخل و با نفوذپذیری مناسب برای تبادل گاز را از خود نشان داد. غشای الیاف زئین و عصاره میخک خاصیت فوق آبدوستی را در برابر مایع شبیه‌سازی شده بدن نشان داد که برای جذب ترشحات زخم مفید است. علاوه براین غشای الکتروریسی شده، خواص ضد باکتریایی و زیست سازگاری خوبی را از خود نشان داد [۸]. Kimna و همکاران نیز با سنتز غشای دو لایه مبتنی بر زئین، رهایش کنترل شده داروی جنتامایسین را برای درمان عفونت های حاد پوست بررسی کردند. الیاف ساخته شده شباهت ساختاری به لایه های بافت پوست با محدوده قطر الیاف ۳۵۰-۴۲۵ نانومتر و ضخامت لایه در محدوده ۳۱۱-۳۶۱ میکرومتر نشان دادند. همچنین این الیاف از خواص مکانیکی و فعالیت میکروبی مناسبی برخوردار بودند. به این ترتیب غشای دولایه مبتنی بر زئین خواص امیدوارکننده‌ای را برای استفاده به عنوان یک زخم پوش ضد میکروبی برای بازسازی بافت پوست نشان داد [۹]. نانو حصیرهای[۶۷] متشکل از زئین و نقره با استفاده از روش الکتروریسی توسط Dashdorj و همکاران تهیه شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که نانوالیاف زئین و نانوذرات نقره دارای خواص ضد باکتریایی مناسب می باشند. این زخم پوش رشد، تکثیر و همچنین چسبندگی سلولی خوبی را از خود نشان داد [۱۱].

۲- زخم پوش های حاوی زئین

بر اساس منابع، حضور زئین در نانوالیاف سبب چسبیدن و رشد بهتر سلول شده و تکثیر فیبروبلاست ها را به شدت افزایش می دهد. نتیجه این پدیده تسریع در روند بهبود زخم می باشد [۱۲]. زخم پوش های حاوی زئین عموما غیرسمی می باشند. افزودن نانوذرات فلزی، داروها و یا عصاره های گیاهی خواص ضدباکتریایی زخم پوش بر پایه زئین را تقویت می کنند. همچنین مطابق مطالعات، ترکیب زئین با مشتقات سلولز و یا پلیمرهای سنتزی، سبب تهیه زخم پوش هایی با خواص مناسب می شود که در ادامه مورد بررسی قرار می گیرند.

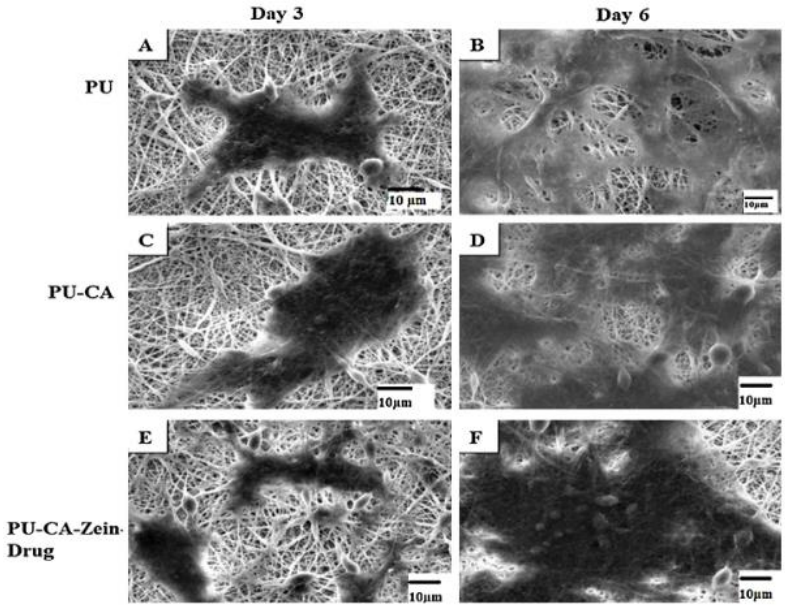
۲-۱- زخم پوش حاوی زئین و مشتقات سلولزی

در سال ۲۰۲۰ Liu و همکاران غشای نانوالیاف متشکل از سلولز استات[۶۸] (CA) و زئین را برای رهایش داروی سزامول تهیه کرده و تاثیر آن را بر بهبود زخم دیابتی موش مورد بررسی قرار دادند. غشای نانوالیاف ساخته شده با کاهش بیان عوامل التهابی و IL-10[۶۹] و همچنین داروی سزامول با تنظیم بیان IL-6[۷۰] به

[67] Nanomat
[68] Cellulose acetate
[69] Interleukin 10

طور مشترک باعث رشد و تکثیر کراتینوسیت ها شده و به این ترتیب روند بهبودی زخم دیابتی در موش را بهبود بخشیدند [۱۳]. Qiu و همکاران زخم پوش سه لایه شامل لایه ضدباکتری، لایه تقویتی و لایه بهبود زخم تهیه کردند. لایه ابتدایی حاوی زئین، اتیل سلولز و پروتوپورفیرین، لایه وسط حاوی سلولز باکتریایی و لایه انتهایی حاوی زئین، اتیل سلولز و vaccarin بود. زخم پوش تهیه شده به طور موثری گونه های Staphylococcus aureus وPseudomonas aeruginosa را مهار کرد و همچنین خواص مکانیکی مناسبی را نشان داد. میزان بهبود زخم موش های تحت درمان در روز دهم به ۹۲/۴ درصد رسید و به این ترتیب داربست تهیه شده بهبود زخم را تسریع کرد [۱۴]. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Unnithan صورت گرفت، داربست های نانوالیاف الکتروریسی شده پلی یورتان[۷۱] (PU) با زئین و سلولز استات تهیه شد. زئین و سلولز استات برای بهبود خواصی مانند آبدوستی، چسبندگی بهتر و تکثیر سلول و توانایی لخته شدن خون با پلی یورتان ترکیب شدند و با حفظ رطوبت مناسب روند بهبود زخم را سرعت بخشیدند. برای جلوگیری از عفونت، سولفات استرپتومایسین در الیاف گنجانده شد و سبب شد تا زخم پوش تهیه شده فعالیت ضد باکتریایی مناسبی را از خود نشان دهد. مورفولوژی سلول‌ها بر روی حصیرهای نانوالیاف تهیه شده پس از ۳ و ۶ روز کشت برای تایید زنده‌مانی سلول بررسی شد و نتایج آن در شکل ۱ آورده شده است. مطالعات سلولی از طریق تصاویر SEM نشان داد که سلول‌ها به داربست‌های نانوالیاف PU-CA-زئین با یا بدون دارو متصل شده و گسترش یافتند و در نتیجه سازگاری سلولی در این داربست مشاهده شد. رشد سلولی در داربست‌های نانوالیاف کامپوزیتی PU-CA و PU-CA-زئین-دارو بیشتر از نانوالیاف PU بود. PU که یک پلیمر زیست سازگار، غیرسمی و سنتزی است، در ترکیب با CA و زئین، داربستی با زیست فعالی بهبود یافته برای بازسازی بافت پوست فراهم می کند. بر اساس نتایج، سلول‌ها به خوبی در نانوالیاف کامپوزیت در مقایسه با نانوالیاف PU گنجانده شده‌اند. ماهیت آبدوستی داربست های PU-CA-زئین دلیل دیگری برای چسبندگی و تکثیر بهتر فیبروبلاست ها می باشد. بنابراین می توان به وضوح پیوستگی سلولی و پخش شدن سلول در ماتریس نانوالیاف را تایید کرد. ساختار متخلخل داربست های نانوالیاف کامپوزیتی نه تنها به نفوذ سلول ها به داخل کمک می کند، بلکه انتقال اکسیژن و مواد مغذی به سلول ها را نیز افزایش می دهد. سلول‌هایی که در داخل داربست‌های نانوالیاف PU-CA-زئین-دارو قرار دارند برای رگزایی و در نتیجه بهبود زخم موثر و ضروری خواهند بود [۱۲].

[70] Interleukin 6
[71] polyurethane



شکل ۲- تصاویر SEM چسبندگی سلولی به ترتیب بر الیاف PU، PU-CA- و PU-CA-زئین-دارو پس از ۳ روز (A,C,E) و ۶ روز (B,D,F) .

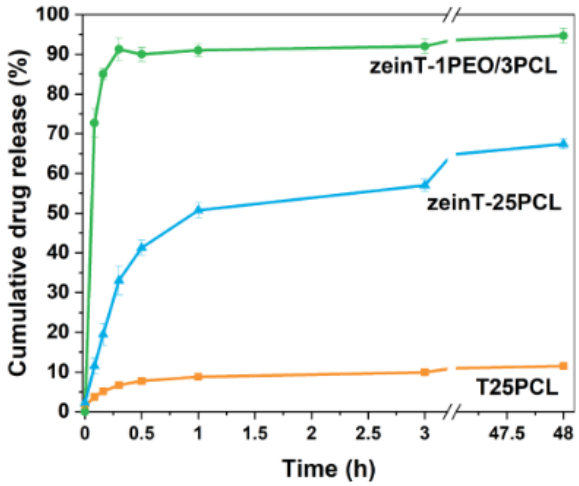
۲-۲- زخم پوش حاوی زئین و پلیمرهای سنتزی

Liu و همکاران زخم پوش زئین- پلی اتیلن اکساید و عصاره آویشن را با روش الکتروریسی تهیه کردند. این الیاف درجا بر زخم موش الکتروریسی شدند و دارای قطرهای یکنواخت در مقادیر چندین میکرومتر بوده و نفوذ مناسب گاز و در نتیجه تبادل مناسب آن را نشان دادند. آبدوستی بسیار بالای این الیاف به زخم پوش اجازه جذب ترشحات زخم را می دهد. الیاف الکتروریسی شده زئین-پلی اتیلن اکساید و عصاره آویشن در برابر باکتری های Staphylococcus aureus و Escherichia coli مقاومت بالایی نشان دادند و این امر نشانگر آن بود که زخم پوش از ایجاد عفونت جلوگیری کرده و آن را درمان می کند. آزمایش های انجام شده بر روی موش ها نشان داد که الیاف تهیه شده روند بهبود زخم را در عرض ۱۱ روز به میزان قابل توجهی ارتقا دادند [۱۵]. Cui و همکاران زخم پوش پلی وینیل الکل، زئین و quaternized stilbazole حاوی داروی vaccarin را تهیه کردند. غشاهای نانوالیاف از استحکام کافی برخوردار بوده و زیست سازگاری و چسبندگی سلولی مناسبی را از خود نشان دادند. همچنین تکثیر سلولی نیز با افزودن دارو بهبود یافت [۱۰].

رهایش پایدار آنتی بیوتیک ها از پانسمان زخم می تواند برای به حداقل رساندن دفعات کاربرد آنها در استفاده بالینی و طولانی شدن اثر ضد میکروبی آنها مفید باشد. Martin و همکاران داربست هسته-میکروالیاف زئین، پلی اتیلن اکساید[۷۳] (PEO) و پلی کاپرولاکتان[۷۴] (PCL) حاوی تتراسایکلین هیدروکلراید

[72] Core-shell nanofiber
[73] Polyethylene oxide

را برای استفاده به عنوان زخم پوش تهیه کردند. زخم پوش تهیه شده حاوی لایه درونی زئین و لایه بیرونی پلی کاپرولاکتان با یا بدون PEO بود. این زخم پوش خواص مکانیکی و فعالیت ضد میکروبی مناسبی را نشان داد و ماده فعال به صورت پایدار رهایش یافت. با افزایش محتوای PCL و کاهش محتوای PEO در داربست، رهایش به صورت پایدار مشاهده شد. رهایش کنترل نشده[۷۵] الیاف حاوی PEO را می توان به آب دوستی PEO نسبت داد که آزادسازی تتراسایکلین هیدروکلراید را به خارج از الیاف تسهیل می کند. در مقابل برای الیاف PCL به تنهایی، به دلیل آبگریزی PCL، تخریب الیاف و در نتیجه انحلال و آزادسازی دارو به طور قابل توجهی به تاخیر افتاد. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، بهترین نتایج از نظر رهش پایدار برای الیاف zein-25PCL با آبدوستی بیشتر سطح به دست آمد که به احتمال زیاد به دلیل وجود زئین و دارو در پوسته الیاف در نتیجه اختلاط بین محلول های هسته و پوسته در طول الکتروریسی است. در ابتدا، دارو در مقادیر بیشتری آزاد می شود که روی سطح الیاف یا نزدیک به آن وجود دارد و پس از آن، رهایش کنترل شده با رهش تتراسایکلین هیدروکلراید از درون الیاف انجام می شود [۱۶].



شکل ۳- رهایش تتراسایکلین هیدروکلراید از نانوالیاف

جدول زیر تعدادی از زخم پوش های حاوی زئین را به همراه ماده موثره و خواص آن نشان می دهد.

جدول ۲- زخم پوش های حاوی زئین و خواص آنها

ردیف	مواد تشکیل دهنده داربست	نوع داربست	ماده موثره	خواص	منابع
۱	زئین	الیاف	عصاره میخک	ضد باکتری، ساختار متخلخل، تبادل مناسب گاز، جذب ترشحات زخم	[۸]
۲	زئین	دولایه	جنتامایسین	ضد باکتری، ساختار دو لایه مشابه پوست، سطح	[۹]

[74] Polycaprolactone
[75] Burst release

		الیاف - فیلم		ویژه بالا، تکثیر سلولی مناسب	
۳	زئین – سلولز استات	نانوالیاف	سزامول	کاهش بیان عوامل التهابی و IL-10، افزایش بیان IL-6، رشد و تکثیر کراتینوسیت ها	[۱۳]
۴	زئین	نانوالیاف	روغن آویشن	ضد باکتری، ساختار یکنواخت، تبادل مناسب گاز، آبدوست و جذب ترشحات زخم، پیشگیری و درمان عفونت زخم	[۱۵]
۵	زئین – مونت موریونیت	دولایه الیاف - فیلم	روغن گل راعی	ضد باکتری، خواص مکانیکی مناسب، رهایش کنترل شده ماده موثره، چسبندگی و تکثیر سلولی مناسب، افزایش ترشح کلاژن و بهبود چسبندگی سلول	[۱۷]
۶	زئین – پلی اتیلن اکساید	میکروالیاف هسته - پوسته	تتراسایکلین هیدروکلراید	ضد باکتری، غیرسمی، آبدوست، بهبود مهاجرت سلولی	[۱۸]
۷	زئین – پلی اتیلن اکساید – پلی کاپرولاکتان	نانوالیاف هسته - پوسته	تتراسایکلین هیدروکلراید	ضد باکتری، غیرسمی، خواص مکانیکی مناسب، رهایش پایدار دارو، بهبود چسبندگی سلولی	[۱۶]
۸	زئین	نانوحصیر	نانوذرات نقره	ضد باکتری، رشد و تکثیر مناسب سلول، چسبندگی سلولی	[۱۱]
۹	زئین – اکسید گرافن	نانوالیاف	تتراسایکلین هیدروکلراید	باکتری کش، خواص مکانیکی مناسب، آبدوست، چسبندگی و تکثیر مناسب سلولی، بهبود رهایش کنترل شده دارو	[۱۹]
۱۰	زئین	حصیر نانوالیاف	سولفادیازین نقره	ضد باکتری، رهایش مناسب دارو، ساختار یکنواخت	[۲۰]
۱۱	زئین – اتیل سلولز	سه لایه نانوالیاف	Vaccarin	ضد باکتری، ساختار نانو شبکه، انعطاف پذیری و خواص مکانیکی مناسب، رگزایی	[۱۴]

۳- نتیجه‌گیری

میلیون ها نفر از آسیب های پوستی ناشی از ضربه های خارجی، جراحت یا بیماری ها رنج می برند. درمان ناکارآمد منجر به ماندگاری اثر زخم، ناتوانی حرکتی یا حتی مرگ می شود. بنابراین مراقبت از زخم ضرورتی رو به گسترش است. با توسعه مواد جدید و کارآمد و پیشرفت های اخیر علم و فناوری، ساخت و سنتز زخم پوش ها مورد توجه قرار گرفته است. یک زخم پوش ایده آل علیرغم داشتن خواص مکانیکی و فیزیکی مناسب باید با تامین خواص زیستی مناسب مراحل ترمیم زخم را بهبود دهد. همچنین ترشحات زخم را جذب کند و چسبندگی، تکثیر و مهاجرت سلولی را افزایش دهد. در سال های اخیر، زئین و زخم پوش های مبتنی بر آن مورد توجه قرار گرفته اند. بر اساس نتایج، زخم پوش های بر پایه زئین با فراهم کردن خواصی

از جمله رگزایی مناسب، خواص ضد باکتریایی، رهش کنترل شده دارو و تبادل مناسب گاز، روند بهبود زخم را سرعت بخشیده و در نتیجه، برای درمان زخم مفید می باشند.

منابع

1. Rezvani Ghomi E, S Khalili, S Nouri Khorasani, R Esmaeely Neisiany, S Ramakrishna.(2019). Wound dressings: Current advances and future directions. Journal of Applied Polymer Science. 136(27):47738.
2. Stoica A E, C Chircov, A M Grumezescu.(2020). Nanomaterials for Wound Dressings: An Up-to-Date Overview. Molecules. 25(11)
3. Landén N X, D Li, M Ståhle.(2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. Cell Mol Life Sci. 73(20):3861-85.
4. Bernardes B G, P Del Gaudio, P Alves, R Costa, C A García-Gonzaléz, A L Oliveira.(2021). Bioaerogels: Promising Nanostructured Materials in Fluid Management, Healing and Regeneration of Wounds. Molecules. 26(13):3834.
5. Tudoroiu E E, C E Dinu-Pîrvu, M G Albu Kaya, L Popa, V Anuța, R M Prisada, M V Ghica.(2021). An Overview of Cellulose Derivatives-Based Dressings for Wound-Healing Management. Pharmaceuticals (Basel). 14(12)
6. Qian W, X Hu, W He, R Zhan, M Liu, D Zhou, Y Huang, X Hu, Z Wang, G Fei, J Wu, M Xing, H Xia, G Luo.(2018). Polydimethylsiloxane incorporated with reduced graphene oxide (rGO) sheets for wound dressing application: Preparation and characterization. Colloids Surf B Biointerfaces. 166:61-71.
7. Yao Y, Y Guo, X Li, J Yu, B Ding.(2021). Asymmetric Wettable, Waterproof, and Breathable Nanofibrous Membranes for Wound Dressings. ACS Applied Bio Materials. 4(4):3287-3293.
8. Qin M, X-J Mou, W-H Dong, J-X Liu, H Liu, Z Dai, X-W Huang, N Wang, X Yan.(2020). In Situ Electrospinning Wound Healing Films Composed of Zein and Clove Essential Oil. Macromolecular Materials and Engineering. 305(3):1900790.
9. Kimna C, S Tamburaci, F Tihminlioglu.(2019). Novel zein-based multilayer wound dressing membranes with controlled release of gentamicin. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 107(6):2057-2070.
10. Cui J, L Qiu, Y Qiu, Q Wang, Q Wei.(2015). Co-electrospun nanofibers of PVA-SbQ and Zein for wound healing. Journal of Applied Polymer Science. 132(39)
11. Dashdorj U, M K Reyes, A R Unnithan, A P Tiwari, B Tumurbaatar, C H Park, C S Kim.(2015). Fabrication and characterization of electrospun zein/Ag nanocomposite mats for wound dressing applications. Int J Biol Macromol. 80:1-7.
12. Unnithan A R, G Gnanasekaran, Y Sathishkumar, Y S Lee, C S Kim.(2014). Electrospun antibacterial polyurethane-cellulose acetate-zein composite mats for wound dressing. Carbohydr Polym. 102:884-92.
13. Liu F, X Li, L Wang, X Yan, D Ma, Z Liu, X Liu.(2020). Sesamol incorporated cellulose acetate-zein composite nanofiber membrane: An efficient strategy to accelerate diabetic wound healing. Int J Biol Macromol. 149:627-638.

14. Qiu Y, Q Wang, Y Chen, S Xia, W Huang, Q Wei.(2020). A Novel Multilayer Composite Membrane for Wound Healing in Mice Skin Defect Model. Polymers (Basel). 12(3)
15. Liu J-X, W-H Dong, X-J Mou, G-S Liu, X-W Huang, X Yan, C-F Zhou, S Jiang, Y-Z Long.(2020). In Situ Electrospun Zein/Thyme Essential Oil-Based Membranes as an Effective Antibacterial Wound Dressing. ACS Applied Bio Materials. 3(1):302-307.
16. Martin A, J Cai, A L Schaedel, M van der Plas, M Malmsten, T Rades, A Heinz.(2022). Zein-polycaprolactone core-shell nanofibers for wound healing. Int J Pharm. 621:121809.
17. Gunes S, S Tamburaci, F Tihminlioglu.(2019). A novel bilayer zein/MMT nanocomposite incorporated with H. perforatum oil for wound healing. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 31:7.
18. Akhmetova A, G M Lanno, K Kogermann, M Malmsten, T Rades, A Heinz.(2020). Highly Elastic and Water Stable Zein Microfibers as a Potential Drug Delivery System for Wound Healing. Pharmaceutics. 12(5)
19. Asadi H, A Ghaee, J Nourmohammadi, A Mashak.(2019). Electrospun zein/graphene oxide nanosheet composite nanofibers with controlled drug release as antibacterial wound dressing. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. 69:1-13.
20. Ullah S, M Hashmi, M Q Khan, D Kharaghani, Y Saito, T Yamamoto, I S Kim.(2019). Silver sulfadiazine loaded zein nanofiber mats as a novel wound dressing. RSC Advances. 9(1):268-277.

استخراج و به کارگیری عصاره گیاه *Anabasis Setifera* از منطقه بلوچستان برای احیای پالادیوم به عنوان کاتالیست آندی پیل سوختی اتانولی مستقیم

رامین هاشم زهی گونکی[۱]، زهرا یاوری*[۲]، فاطمه ریگی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیمی گرایش فیتوشیمی، گروه شیمی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

۲. عضو هیئت علمی (استادیار)، گروه شیمی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

۳. عضو هیئت علمی (استادیار)، گروه تولید و بهره برداری از گیاهان داوریی و معطر، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران

* نویسنده مسئول: استادیار، z_yavari@chem.usb.ac.ir

چکیده

الکترواکسیداسیون سوخت‌های سبک در پیل های سوختی، یک ایده جدید برای تأمین انرژی الکتریکی به حساب می آید؛ از این رو، معرفی کاتالیست های کارآمد برای انجام واکنش های اکسایش – احیا در پیل های سوختی موضوع پژوهش‌های اخیر شده است. برای این منظور، فلزات نجیب نظیر پالادیوم کارایی قابل توجهی را از خود نشان داده اند. از سوی دیگر، سنتز سبز ذرات فلزی به کمک عصاره گیاهان به دلیل سمیت کمتر رو به گسترش است. در مطالعه حاضر، عصاره گیاه Anabasis setifera از اندام های هوایی این گیاه با روش های خیساندن و التراسونیک استخراج شد. سپس، ذرات پالادیوم با احیای نمک کلریدی آن، به کمک عصاره گیاه Anabasis setifera سنتز شد. مورفولوژی ذرات پالادیوم (Pd)، به کمک تکنیک میکروسکوپ الکترونی گسیل میدان بررسی شدند. رفتار الکتروشیمیایی ذرات Pd و فعالیت کاتالیستی آنها نسبت به واکنش اکسیداسیون اتانول به کمک تکنیک های ولتامتری چرخه ایی و کولومتری پتانسیل ثابت ارزیابی شد. نتایج الکتروشیمی نشان داد ذرات پالادیوم بدست آمده با روش خیساندن در مقایسه با نوع بدست آمده از روش التراسونیک، کارایی بهتری (در حدود چهار الی پنج برابر) نسبت به کاتالیز فرایند الکترواکسیداسیون اتانول دارند.

کلمات کلیدی: عصاره Anabasis setifera؛ احیای پالادیوم؛ الکترواکسیداسیون اتانول

Extraction and application of Anabasis Setifera plant extract from Baluchistan region to reduce palladium as an anode catalyst for direct ethanol fuel cell

Ramin Hashem-Zehi Gonaki[1], Zahra Yavari[*2], Fatemeh Rigi[3]

1. Master's student, Department of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
2. Faculty member (Assistant professor), Department of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
3. Faculty member (Assistant professor), Department of Production and Utilization of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, Higher Education Complex of Saravan, Saravan, Iran

*Corresponding Author: Assistant professor, z_yavari@chem.usb.ac.ir

Abstract

The electrooxidation of light fuels in fuel cells is considered as a new idea to supply electrical energy; hence, the introduction of efficient catalysts to do oxidation-reduction reactions in fuel cells has become the subject of recent researches. For this purpose, the noble metals such as palladium have shown significant efficiency. On the other hand, the green synthesis of metal and metal oxide particles by plant extracts is expanding due to less toxicity. In the present study, the extract of Anabasis setifera plant was extracted from the aerial parts of this plant by methods of maceration and ultrasonic. Then, palladium particles were synthesized by reducing its chloride salt by Anabasis setifera plant extract. The morphology of the palladium particles (Pd) was studied by field emission electron microscope. The electrochemical behavior of Pd particles and their catalytic activity towards ethanol oxidation reaction were evaluated using cyclic voltammetry and constant potential coulometry techniques. Electrochemical results showed that palladium particles obtained by maceration method have better efficiency (about four to five times) to catalysis ethanol electrooxidation process compared to one of obtained by ultrasonic method.

Keywords: Extract of Anabasis setifera; Palladium reduction; Ethanol electrooxidation

مقدمه

پیل سوختی، انرژی شیمیایی سوخت را حین اکسایش آن به انرژی الکتریکی تبدیل می‌کند. پیل سوختی یک مدار الکتروشیمیایی و سه قسمت: آند یا الکترود منفی، کاتد یا الکترود مثبت و الکترولیت است. در آند، سوخت الکترون های خود را از دست داده به یون و الکترون تفکیک می شود. یون به کمک الکترولیت به سمت مقابل یعنی کاتد فرستاده می‌شود. الکترولیت نسبت به الکترون عایق بوده و از این رو، الکترون مجبور است از طریق مدار خارجی یا سیم به کاتد برسد. اکسیژن به عنوان اکسیدان به کاتد تزریق و با دریافت الکترون و ترکیب شدن با یون، واکنش را کامل می‌کند. شار الکترون در درون سیم، سبب تولید توان الکتریکی می شود [۱]. پیل سوختی اتانولی مستقیم یک پیل سوختی با غشای مبادله کننده پروتون به جای الکترولیت است؛ که در آن اتانول به عنوان سوخت به آند تزریق می شود. اتانول به دلیل سمیت پایین، دانسیته توان بالا در حد ۸ kWh/kg و تولید آسان (از تخمیر نیشکر و گندم) یک سوخت مناسب به شمار می آید [۲]. واکنش اکسایش اتانول به دلیل نیاز به شکسته شدن پیوند کربن-کربن، دارای سینتیک آهسته بوده و نیاز به حضور کاتالیست در سطح آند است. کاتالیست‌های پایه پالادیوم به علت پایداری و عملکرد بهتر در محیط قلیایی مورد توجه می باشند [۳]. حین واکنش الکترواکسیداسیون الکل در سطح کاتالیست آندی، حدواسط های کربونیلی تولید شده که جذب سطحی فلز کاتالیستی می‌شوند. تمایل بالا بین حدواسط و فلز، سبب می شود حدواسط دیرتر و دشوارترسطح کاتالیست را ترک نماید. از این رو، مولکول بعدی الکل، جایگاه های کمتری برای اتصال به سطح فلز در اختیار دارد و مسمومیت کاتالیست رخ می دهد. سنتز کاتالیست در ابعاد نانو می تواند مساحت سطح را افزایش داده و تعداد جایگاه های فعال را بهبود دهد.

یک روش سنتز کاتالیست، احیای فلز نجیب با عصاره گیاهان است. این امر به این دلیل است که گیاهان ترکیباتی چون فلاونوئید و فنول و ... را در خود دارند. در واقع مولکول های زیستی موجود در عصاره گیاه می تواند برای احیای یون های فلزی به نانو ذرات فلزی طی یک فرایند سنتز سبز تک مرحله استفاده شوند [۴]. ترکیبات موجود در گیاه به عنوان عوامل سطحی باعث پایداری نانو ذرات شده و از تجمع آن ها جلوگیری می کنند. سنتز سبز ترکیبات مختلف به ویژه نانو ذرات فلزی، با استفاده از اندام های مختلف گیاهی مانند دانه‌ها، پوست، گل ها، غده ها و ریشه ها انجام می شود. اما عصاره تولید شده از برگ گیاهان به عنوان مهمترین منبع شناخته می شود. زیرا این بافت در مقایسه با سایر اندام ها جوان تر بوده و برداشت آن، اثر مخرب بر گیاه ندارد [۵]. روش خیساندن (Maceration) یک روش سنتی و ساده، برای استخراج عصاره گیاهان است و معمولاً برای استخراج ترکیبات حساس به گرما و ترکیبات فنولی از آن استفاده می‌شود. عصاره گیری به روش فراصوت (التراسونیک) بازدهی و سرعت استخراج را افزایش داده، باعث کاهش دمای عملیاتی شده و همین امر سبب سهولت در استخراج ترکیبات حساس به دما می‌شود. در روش التراسونیک از امواجی با فرکانس بالای ۲۰ kHz استفاده می‌شود که با نفوذ این امواج به داخل ماده جمع

شدن و کشیدگی پیاپی به وجود می‌آید که سبب تشکیل حفره‌های نامتقارن به هم پیوسته در گیاه می‌شود که باعث خروج مواد از داخل سلول و یا تخریب بافت‌های زیستی و استخراج مواد شوند [۶].

گیاه موسوم به آسمانی سیخک دار یا جفته شور با نام علمی Anabasis setifera یک گونه از راسته میخک سانان، تیره تاج خروسیان، زیر خانواده Salsoloideae و سرده آسمانی می باشد [۷]؛ که در منطقه بلوچستان ایران نیز رشد می کند. شکل ۱ الف و ب، تصویر این گیاه و اندام های هوایی آن را نشان می دهد.

شکل ۱. تصویر (الف) گیاه **Anabasis setifera** و (ب) اندام های هوایی گیاه

در این کار تحقیقاتی، اندام های هوایی گیاه Anabasis setifera از منطقه بلوچستان ایران جمع آوری شد. عصاره آبی گیاه با روشهای خیساندن و التراسونیک استخراج گردید. عصاره های بدست آمده به منظور تهیه نانو ذرات پالادیوم استفاده شدند. فعالیت کاتالیستی ذرات پالادیوم نسبت به واکنش اکسیداسیون اتانول به کمک مطالعات الکتروشیمیایی ارزیابی شد.

روش کار

در این کار پژوهشی، آب دو بار تقطیر برای تهیه محلول‌ها به کار گرفته شد. پالادیوم کلرید($PdCl_2$) از شرکت sigma-Aldrich و سایر مواد از شرکت Merck تهیه شدند. مواداولیه بکار گرفته شده داری درجه خلوص قابل قبول بوده و فرایند خالص سازی برای مواد اولیه انجام نشده است.

برای تهیه عصاره گیاه، بافت گیاه تمیز، با آب مقطر شسته و در سایه خشک شد. سپس، گیاه خشک شده توسط آسیاب خرد گردید تا پودری مناسب بدست آید. ۲۰ گرم از این پودر در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای اتاق خیسانده شد. پس از ۲۴ ساعت، محلول صاف و عصاره آبی با سانتریفوژ شعاع mm ۴۱ مدل Sigma 101 به دست آمد. عصاره در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای کاربردهای بعدی نگهداری شد. برای عصاره گیری به روش فراصوت، از دستگاه اولتراسونیک مدل Euronda-Eurosonic 4D استفاده شد.

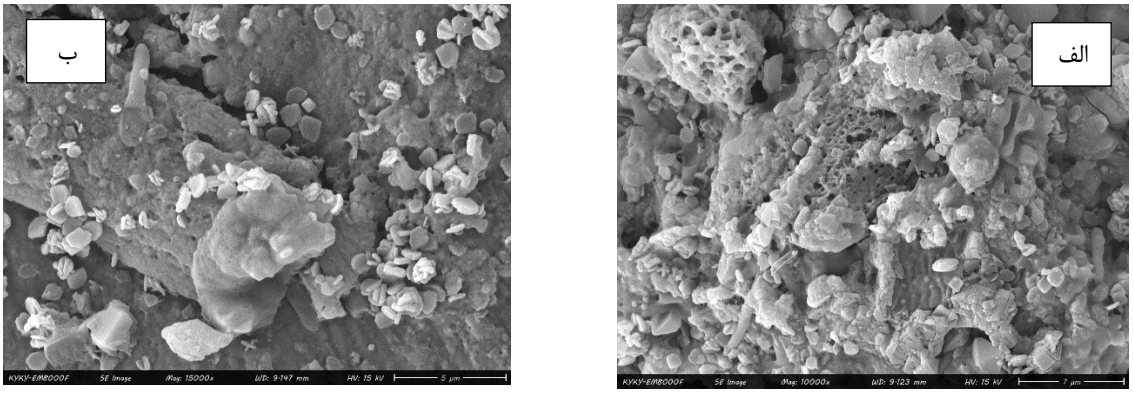
۱۵۰ میلی لیتر محلول کلرید پالادیوم با غلظت ۰/۰۵ مولار به بالن ته گرد منتقل و ۲۰ میلی لیتر عصاره آبی Anabasis setifera به صورت قطره ای به بالن اضافه شد. مخلوط به طور مداوم هم زده و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. pH مخلوط با افزودن محلول هیدروکسید سدیم (۱ M) تنظیم شد تا

pH در ۱۱ حفظ شود. در مرحله بعد محلول در دمای اتاق خنک شده و بـه مـدت ۱۵ دقیقـه بـا دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب به‌دست‌آمده سه مرتبه با اتانول و آب مقطر شسته شد.

بررسی های الکتروشیمیایی در سیستم سه الکترودی شامل: الکترود مرجع در محیط‌های قلیایی Hg/HgO و در محیط‌های اسیدی الکترود کالومل اشباع (SCE[۷۶])، الکترود مخالف یا شمارنده الکترود میله پلاتینی و الکترود کار الکترود کربن شیشه‌ای با مساحت ۰/۰۳۱۴ cm^2 می باشد. ابتدا پولیش مکانیکی سطح الکترود کار انجام شد. برای این منظور از پودر آلومینا بر روی یک تکه چرم مصنوعی مرطوب شده، استفاده شد. به منظور فعال کردن سطح الکترود صیقل داده شده، از روش ولتامتری چرخه‌ای استفاده گردید. الکترود در محلول سولفوریک اسید ۰/۵M قرار داده و سطح آن در پنجره پتانسیل ۱/۵- تا ۱/۵V+، با سرعت روبش ۱۰۰mV.s^{-1}، ده مرتبه روبش داده شد. برای اصلاح الکترود کار آماده شده، طی دو مرحله و هر بار ۵ µl از کاتالیست سنتز شده Pd، بر روی الکترود قرار داده شد. الکترود اصلاح شده بعد از خشک شدن در دمای اتاق، برای مطالعات الکتروشیمیایی، استفاده شد. الکترودها با عصاره های بدست آمده از روش خیساندن و التراسونیک، به ترتیب Pde1 و Pde2 نامگذاری شدند.

نتایج و بحث

شکل ۲ تصویر FESEM مربوط به پالادیوم احیا شده با عصاره گیاه را در دو بزرگنمایی مختلف نشان می دهد.



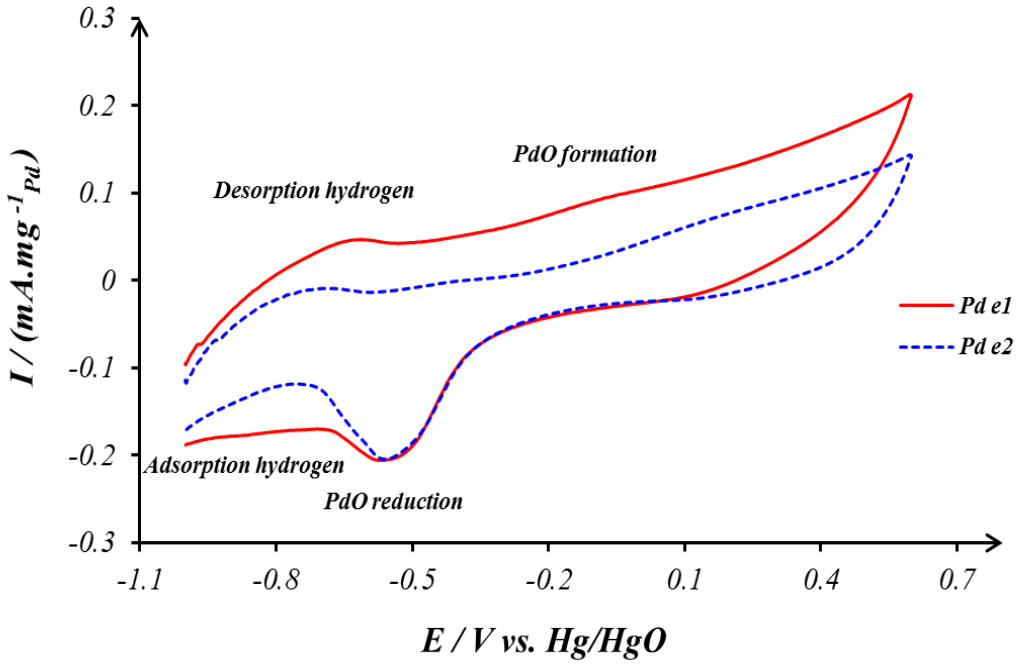
شکل ۲ تصاویر FESEM مخلوط احیای پالادیوم با عصاره گیاه (الف) با بزرگنمایی کمتر و (ب) با بزرگنمایی بیشتر

شکل ۲ الف، ساختار متخلخل ذرات پالادیوم و شکل ۲ ب، ذرات پولک مانند (دو بعدی) را نشان می دهد حفرات در ساختار Pd نسبت بالای سطح به حجم را نشان می دهد؛ که یک پارامتر مهم در فرایند های کاتالیستی ناهمگن است. این حفرات می توانند محلی برای ذخیره سوخت (اتانول) در مرحله بعد باشند؛ که پلاریزاسیون غلظتی را حین واکنش اکسیداسیون تقلیل دهد.

[76] Saturated Calomel Electrode

منحنی های ولتامتری چرخه ای برای دو الکترود Pde1 و Pde2 در محیط قلیایی بدون حضور سوخت در شکل ۳ آورده شده است. همانطور که در شکل ۳ دیده می شود، پروفایل مشاهده شده برای رفتاری ولتامتری هر دو الکترود، مربوط به فلز نجیب پالادیوم می باشد [۸]؛ که این مطلب سنتز موفق ذرات پالادیوم به کمک عصاره گیاه Anabasis setifera را بیان می کند. یک الکترون در سطح پالادیوم حین روبش پتانسیل به سمت مقادیر مثبت ایجاد شد؛ که پیک ۰/۶ V- روبش رفت مربوط به آن است. حین این روبش، فرایند واجذب هیدروژن های جذب سطحی شده رخ می دهد. در روبش برگشت پتانسیل ۰/۹ V- واکنش برگشت رخ داده و مجدد هیدروژن توسط پالادیوم جذب سطحی می شود. اکسید پالادیوم در پتانسیل های مثبت حدود ۰/۰۵V+ حین روبش رفت تشکیل می شود. پیک مشاهده شده در ۰/۵۱ V- حین روبش برگشت مربوط به احیای اکسید پالادیوم تشکیل شده در محیط قلیایی می باشد.

مساحت سطح فعال الکتروشیمیایی[۷۷] (EAS) پالادیوم برای دو الکتروکاتالیست به کمک انتگرال گیری از پیک های جذب و واجذب هیدروژن و پیک احیای پالادیوم اکسید قابل محاسبه می باشد. بدین ترتیب مقدار بار مبادله شده برای جذب (Q'_H) و واجذب (Q''_H) هیدروژن بر روی ذرات پالادیوم، بدست آمد؛ با میانگین گرفتن از این دو، میزان بار کولومبی جذب و واجذب هیدروژن (Q_H) محاسبه شد. با استفاده از معادله ۱، سطح فعال الکتروشیمیایی برای ذرات پالادیوم در هر دوالکترود محاسبه و در جدول ۱ گزارش شده است.



شکل ۳. ولتاموگرام الکترودهای Pde1 (خط) و Pde2 (خط چین) در ۰/۵ M سود با سرعت روبش ۱۰۰ $mV.s^{-1}$

[77] Electrochemical Surface Area

$$EAS_H = \frac{Q_H}{C*l}$$

معادله ۱

که C ضریب تبدیل بار به سطح برای پالادیوم نامیده شده و مقدار آن ۰/۴۲۰ $mC.cm^{-2}$ می باشد l میزان بارگذاری پالادیوم روی الکترود را نشان می دهد که مقدار آن ۳/۸۲ $mg.cm^{-2}$ محاسبه شد.

جدول۱. نتایج محاسبه شده از ولتاموگرام های چرخه ای الکترود های اصلاح شده در در محلول M ۰/۵ سود.

الکترود	Pde1	Pde2
Q'_H ($mC.cm^{-2}$)	۰/۳۳	۰/۰۰
Q''_H ($mC.cm^{-2}$)	۱/۸۵	۰/۹۴
Q_H ($mC.cm^{-2}$)	۰/۷۲	۰/۹۴
EAS_H ($m^2.g^{-1}$)	۰/۰۶	۰/۰۵
$D_{Pd} \times 10^{-3}$	۰/۵۴	۰/۴۵
Q_{Pd} ($mC.cm^{-2}$)	۰/۷۲	۰/۲۱
EAS_{Pd} ($m^2.g^{-1}$)	۰/۰۴	۰/۰۱

مساحت سطح فعال الکتروشیمیایی را می توان با محاسبه سطح زیر پیک مربوط به کاهش اکسید پالادیوم(Q_{Pd}) نیز، تخمین زد (معادله ۲)

$$EAS_{Pd} = \frac{Q_{pd}}{M*l}$$

معادله ۲

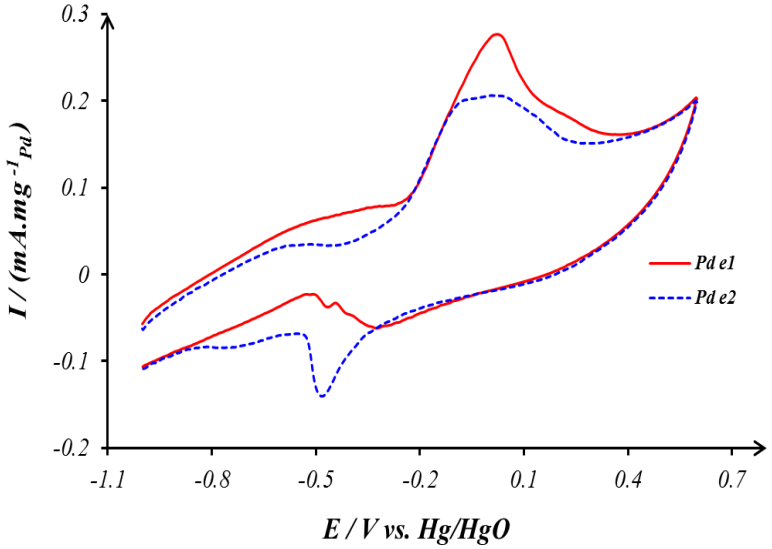
M برابر با ۰/۴۰۵ $mC.cm^{-2}$ می باشد. مطابق نتایج گزارش شده EAS برای الکترود Pde1 بزرگتر از الکترود Pde2 می باشد. میزان پراکندگی نانوذرات پالادیوم (D_{Pd}) بر سطح دو الکترود به کمک معادله ۳ محاسبه شد.

$$D_{Pd} = \frac{EAS}{\frac{1}{M_{Pd}}(N_A*4\pi*r_{pd}^2)}$$

معادله ۳

که M_{pd} جرم اتمی پالادیوم، N_A عدد آووگادرو ($۶/۰۲۳\times۱۰^{۲۳}$) و r_{pd} شعاع اتمی پالادیوم (۰/۱۴ nm) می‌باشد. نتیجه محاسبات در جدول ۱ گزارش شده است. مقایسه نتایج نشان می دهد ذرات پالادیوم سنتز شده با عصاره روش خیساندن پراکندگی بالاتری نسبت به ذرات پالادیوم احیا شده توسط عصاره روش التراسونیک دارند. این موضوع به دلیل دانه زایی سریع و عدم تجمع ذرات در عصاره روش خیساندن می باد. ضمن این که عصاره گیاه علاوه بر عامل احیا کننده، تأمین کننده عوامل فعال سطحی برای پایدار کردن ذرات سنتز شده و جلوگیری از تجمع آنها می باشد.

شکل ۴ منحنی های ولتامتری چرخه ای برای واکنش اکسیداسیون اتانول در سطح الکترودهای Pde1 و Pde2 را نشان می دهد. به طوری که در شکل ۴ دیده می شود، اکسیداسیون اتانول در سطح الکترودهای اصلاح شده با پالادیوم دارای دو پیک آندی یکی در روبش رفت دارای پتانسیل E_f و جریان I_f مربوط به اکسیداسیون ناقص اتانول که منجر به تولید حدواسط می شود و دیگری در روبش برگشت دارای پتانسیل E_b و I_b می باشد، که مربوط به اکسیداسیون حدواسط ها ایجاد شده نظیر استات در سطح کاتالیست می باشد [۹].



شکل ۴ . ولتاموگرام های اکسیداسیون اتانول در سطح الکترود های Pde1 (خط) و Pde2 (خط چین) در محلول ۰/۵ M سود و ۰/۸ M اتانول با سرعت روبش $mV.s^{-1}$ ۱۰۰

مقادیر پتانسیل و جریان پیک های رفت و برگشت مربوط به دو الکترود در جدول ۲ گزارش شده است. پتانسیل آستانه E_{onset} مربوط به مکانی است که جریان از مقادیر منفی به مقادیر مثبت تغییر می کند. مقدار کمتر پتانسیل برای الکترود نشان دهنده شروع به کار راحتتر پیل سوختی و سینتیک تسهیل شده اکسیداسیون سوخت در سطح کاتالیست است. جریان بالاتر نمادی از فعالیت بالاتر کاتالیست برای اکسیداسیون سوخت اتانول می باشد. از آنجا که میزان بارگذاری پالادیوم بر جریان های مشاهده شده اثرگذار است، جریان ها بر حسب $mA.mg^{-1}_{Pd}$ گزارش می شود؛ که البته در هر دو الکترود میزان بارگزاری پالادیوم یکسان می باشد.

جدول ۲. داده‌های الکتروشیمیایی اکسیداسیون اتانول در ۰/۵ M سود و ۰/۸ M

الکترود	E_{onset}(V)	E_f(V)	I_f($mA.mg^{-1}_{Pd}$)	E_b(V)	I_b($mA.mg^{-1}_{Pd}$)
Pde1	−۰/۸۰	+۰/۰۱	+۰/۲۷	−۰/۴۹	−۰/۰۲
Pde2	−۰/۷۷	+۰/۰۰	+۰/۲۰	−۰/۵۴	−۰/۰۷

مطابق نتایج ارائه شده در جدول ۲ الکترود Pde1 فعالیت کاتالیستی بالاتری نسبت به الکترود Pde2 دارد. این مشاهده می تواند به دلیل مساحت سطح بالاتر و تعداد بیشتر سایت های فعالی در این فرایند کاتالیستی ناهمگن باشد. علت پتانسیل مثبتتر برای الکترود Pde1 این است که هنگامی که جریان بالاتر باشد، این به آن معناست که تعداد مولکول بیشتر اتانول در سطح کاتالیست اکسید شده اند. از این رو، حدواسطهای بیشتری در سطح ایجاد می شود. این موضوع می تواند باعث شیفت مثبت پتانسیل شود.

نتیجه گیری

در این کار تحقیقاتی، عصاره گیاه Anabasis setifera در نقش احیا کننده زیستی بالقوه برای تهیه نانوذرات پالادیوم به عنوان روشی سازگار با محیط زیست، آسان، سریع و سبز مورد استفاده قرار گرفت. نتایج الکتروشیمی نشان داد ذرات پالادیوم بدست آمده با روش خیساندن در مقایسه با نوع بدست آمده از روش التراسونیک، مساحت سطح بالاتر، پراکندگی مطلوبتر و کارایی بهتری نسبت به کاتالیز الکترواکسیداسیون اتانول دارند. این به دلیل تخریب برخی ترکیبات موثر در حضور موج التراسونیک می تواند باشد؛ که کارایی عصاره را کاهش می دهد.

قدردانی

نویسندگان از دانشگاه سیستان و بلوچستان، برای حمایت مالی کار حاضر تشکر می کنند.

منابع

1. Peighambardoust, S.J., Rowshanzamir, S., Amjadi, M. (2010) Review of the proton exchange membranes for fuel cell applications, International Journal of Hydrogen Energy, 35(17):9349-9384.

2. Wang, Q., Lu, X., Xin, Q., and Sun, G. (2014) Polyol-synthesized Pt2.6Sn1Ru0.4/C as a high-performance anode catalyst for direct ethanol fuel cells. Chinese Journal of Catalysis, 35(8):1394-1401.

3. Li, L. Chen, M., Huang, G., Yang, N., Zhang, L., Wang, H., Liu, Y., Wang, W., Gao, J. (2014) A green method to prepare Pd–Ag nanoparticles supported on reduced graphene oxide and their electrochemical catalysis of methanol and ethanol oxidation, Journal of Power Sources 263:13-21.

4. Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.Ch. (2013) Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, Biotechnology Advances 31(2):346-56

5. Iravani S. (2011) Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chemistry 10:2638-2650.

6. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction-an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy reviews, 1(1), 7-18.

7. Mohammadi M., Alaei M., Bajalan I. (2016) Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of anabasis setifera and salsola tomentosa extracted with different extraction methods and solvents, Oriental Pharmacy and Experimental Medicine 16(1):31–35.

8. Xu C, Cheng L, Shen P, Liu Y (2007) Methanol and ethanol electrooxidation on Pt and Pd supported on carbon microspheres in alkaline media. Electrochemistry Communications 9(5):997–1001.

9. Tana J.L., De Jesus A.M., Chua S.L., Sanetuntikul J., Shanmugam S., Tongol B.J.V., Kim H (2017) Preparation and characterization of palladium-nickel on graphene oxide support as anode catalyst for alkaline direct ethanol fuel cell, Applied Catalysis A General 531:29-35.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

مطالعات تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مولکولی

آرمین نیک دهقان*[۱]، فاطمه شهسواری [۲]، مینا جعفری [۳]

۱.دانشجو کارشناسی ارشد،گروه علوم زیست شناسی،ژنتیک مولکولی،تهران، ایران
A_nikdehqan@yahoo.com
۲. دانشجو کارشناسی ارشد،گروه علوم زیست شناسی،ژنتیک مولکولی،تهران ،ایران
۳. دانشجو کارشناسی ارشد،گروه علوم زیست شناسی،ژنتیک مولکولی،تهران ،ایران

چکیده

صفات فنوتیپی دام توسط تنوع ژنتیکی با تغییرات محیطی تک تک حیوانات تعیین می شود. در گذشته، طبقه بندی نژادها بسته به ویژگی های مورفولوژیکی برای شناسایی نژاد بود.با این حال، در سال های اخیر، نشانگرهای ژنتیکی مختلفی را می توان برای شناسایی نژادهای مختلف و حیوانات جداگانه تجزیه و تحلیل کرد.این نشانگرهای ژنتیکی مولکولی را می توان برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و همچنین ردیابی منشاء و شناسایی گونه استفاده کرد.اخیراً، یک فناوری توالی یابی ژنوم می تواند به سرعت و با دقت انواع مختلف نشانگرهای ژنتیکی را در کل ناحیه ژنوم تأیید کند.از این میان، نشانگرهای SNP توسعه یافته و فناوری آرایه SNP که به سرعت در حال تکامل است، به طور فزاینده ای جایگزین تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره می شود.بنابراین، این بررسی اطلاعات اساسی برای توسعه نشانگرهای ژنتیکی مولکولی مختلف و استفاده از آنها در مطالعات تنوع ژنتیکی حیوانات دام را مورد بحث قرار داد

کلمات کلیدی: صفات فنوتیپی ،نشانگرهای SNP ، تنوع ژنتیکی،پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

Genetic diversity studies using molecular genetic markers

Armin Nik Dehghan*1, Fatemeh Shahsvari 2, Mina Jafari 3

1. Master's student, Department of Biological Sciences, Molecular Genetics, Tehran, Iran
A_nikdehqan@yahoo.com
2. Master's student, Department of Biological Sciences, Molecular Genetics, Tehran, Iran
3. Master's student, Department of Biological Sciences, Molecular Genetics, Tehran, Iran

Abstract

The phenotypic traits of livestock are determined by genetic variation with environmental changes of individual animals. In the past, the classification of breeds depended on morphological characteristics to identify the breed. However, in recent years, various genetic markers can be analyzed to identify different breeds and individual animals. These molecular genetic markers can be used to assess genetic diversity as well as trace origin and identify species. Recently, a genome sequencing technology can quickly and accurately confirm different types of genetic markers in the entire genome region. Among these, SNP markers have been developed and technology The rapidly evolving SNP array is increasingly replacing genetic variation analysis using microsatellite markers.Therefore, this review discussed the basic information for the development of different molecular genetic markers and their use in studies of genetic diversity of livestock.

Keywords: phenotypic traits, SNP markers, genetic variation, single nucleotide polymorphism

مقدمه

به طور کلی، بسیاری از نژادهای دامی که امروزه وجود دارند، قرن ها انتخاب طبیعی و انسانی را پشت سر گذاشته اند. بنابراین، نژادهای مختلف با شرایط محیطی و معیارهای تولید متفاوت پذیرفته شدند. به عنوان نتایج، حیوانات دام دارای ویژگی های فنوتیپی متفاوتی هستند که آنها را از زیر گروه های دیگر در همان گونه متمایز می کند. با این حال، در تمایز بین افراد و گروه‌های مختلف با استفاده از مورفولوژی پایه یا نمونه‌های بیولوژیکی آنها مانند خون، بافت و ترشحات، مشکلات و محدودیت‌هایی وجود دارد. این مشکل با طبقه بندی ژنتیکی افراد با فنوتیپ های مختلف با کشف مشخصات DNA و تنوع سطح ژنومی آنها ، به ویژه، در DNA میتوکندری[۷۸] (mtDNA) و DNA هسته ای. حل شده است[۱]. در واقع، این الگوهای تنوع ژنتیکی اشکال مختلفی مانند چندشکلی تک نوکلئوتیدی[۷۹](SNP) ، درج و حذف[۸۰](indel)، تکرار ساده[۸۱](STR)، تغییر شماره نسخه [۸۲](CNV)دارند.

مطالعات ژنومی اطلاعات پایه ای را برای تشخیص افراد و واریته ها در سطح DNA فراهم می کند (سینگ و همکاران، ۲۰۱۴).کشف این تغییرات ژنتیکی که جمعیت متنوعی را ایجاد می کند به پرورش دهندگان دانشگاهی، صنعتی و حیوانات اجازه می دهد تا گونه جدیدی را ایجاد کنند که در تغییرات آب و هوایی غالب و تغییرات واکنش در تقاضای مصرف کنندگان زنده مانده است.در طی چند دهه گذشته، تکنیک های ژنوتیپ توسعه یافته و هزینه های آنها به شدت کاهش یافته است، بنابراین دامنه کاربرد نشانگرهای ژنتیکی به طور مداوم در حال گسترش است.در صنعت دام، نشانگرهای ژنتیکی می‌توانند ابزار شناسایی مفیدی برای استقرار سیستم ردیابی، بهبود ژنتیکی با شناسایی نواحی کروموزومی باشند که جایگاه‌هایی را در خود جای داده‌اند که به طور قابل‌توجهی بر صفات مهم اقتصادی در تولید دام تأثیر می‌گذارند[۲]. اکثر نشانگرهای ژنتیکی مولکولی مانند SNP و نشانگرهای ریزماهواره‌ای که امروزه استفاده می‌شوند از سیستم‌های با توان بالا هستند. علاوه بر این، شناسایی شجره نامه ، در مطالعات تنوع و فیلوژنتیک با استفاده از نشانگرهای کروموزوم mtDNA و Y نیز رایج است. در این راستا رویکرد تحلیل تنوع ژنتیکی با استفاده از تنوع ژنتیکی مورد بحث قرار گرفته است، زیرا می‌توان از آن به عنوان داده‌های اساسی برای توسعه مطالعات کاربردی مختلف در حوزه‌های مختلف استفاده کرد. علاوه بر این، جزئیات مورد استفاده از نشانگر مولکولی و فن‌آوری ایده‌آل برای ارزیابی تنوع و نقشه‌برداری جایگاه صفات کمی[۸۳] و مطالعات ژن کاندید ارائه شده است.

[78] mitochondrial DNA (mtDNA)
[79] single nucleotide polymorphism (SNP)
[80] insertion and deletion(indel)
[81] simple tandem repeat (STR)
[82] copy number variation (CNV)
[83] quantitative traits loci (QTL)

DNA میتوکندری برای مطالعه تنوع در دام

میتوکندری یک اندامک با هسته درون سلولی است که از DNA مارپیچ دوگانه حلقوی جدا از هسته سلول تشکیل شده است. علاوه بر این، دارای ویژگی‌های منشأ مادری است، زیرا میتوکندری‌های موجود در تخمک در طول فرآیند تولید مثل به فرزندان به ارث می‌رسد[۳]. علاوه بر این، برخلاف توالی‌های DNA ژنومی، mtDNA فاقد نوترکیبی و فقدان جایگزینی سریع نوکلئوتیدی است، که آن را برای مطالعات تنوع ژنتیکی و مطالعات تکاملی مناسب می‌کند [۴]. mtDNA در مجموع از ۳۷ ژن تشکیل شده است که همگی ژن های ضروری برای عملکرد طبیعی هستند.در داخل میتوکندری، منطقه کنترل حلقه D، که عملکردی ندارد و ژن سیتوکروم اکسیداز[۸۴] I که با متابولیسم اکسیژن[۸۵] مرتبط است (هبرت و همکاران، ۲۰۰۳)، به طور گسترده برای مطالعات تنوع ژنتیکی استفاده می شود، زیرا حاوی تغییرات ژنتیکی بیشتر از سایر بخش های DNA میتوکندری میباشد[۵].

علاوه بر این، هفت ژن زیر واحد اکسیداسیون نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید هیدروژن[۸۶] (NADH) دهیدروژناز به نام ND وجود دارد که NADH را در میتوکندری کاتالیز می کند. در میان آنها، ND4 و ND5 در مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که حاوی جهش‌های تغییر قاب زیادی در ۴۱ کمپلکس اسید آمینه I بودند.از این دو ژن برای تایید تنوع نژادها استفاده شد[۶]. به طور خاص، از آن به عنوان نشانگر ایده آل برای طبقه بندی نژادهای Bos Indicus و Bos Taurus استفاده شد [۷].بنابراین، می توان با بررسی جهش mtDNA، گونه ها را در بین نژادها تشخیص داد و می توان از آن برای شناسایی منشاء نژادها و رمزگشایی پس زمینه تکامل استفاده کرد [۸].

پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی[۸۷] (SNP) یکی از نشانگرهای مهم DNA هسته ای

پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) نشان‌دهنده جایگزینی تک باز در توالی DNA است. در اصل، یکی از چهار پایه نوکلئوتیدی می تواند در موقعیت توالی فردی تغییر کند، اما در دی آللیک[۸۸] ظاهر می شود.دو دلیل اصلی برای این وجود دارد. اول، فرکانس جایگزینی تک نوکلئوتیدی در محل چندشکلی بسیار کم است، از x10-91 تا x10-95 در هر نوکلئوتید و در هر سال در موقعیت های خنثی در پستانداران متغیر است. دلیل دوم مکانیسم سوگیری نسبت به جهش است که منجر به دو نوع SNP می شود. مکانیسم جهش ممکن است انتقالی باشد (پورین-پورین؛ G↔A یا پیریمیدین-پیرمیدین؛ C↔T) یا عرضی (پورین پیریمیدین؛ A↔C و A↔T یا پیریمیدین-پورین؛ G↔C و T↔G) [۹] [۱۰]. نشانگرهای SNP که به‌عنوان تفاوت در توالی‌های DNA یافت می‌شوند، می‌توانند برای شناسایی ژنتیکی واریته‌ها و به‌عنوان

[84] cytochrome oxidase I (COI(
[85] oxygen metabolism
[86] Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen (NADH(
[87] Single Nucleotide Polymorphism(SNP)
[88] diallelic

جهش‌های مسببی که می‌توانند فنوتیپ‌های اقتصادی حیوانات را تحت تأثیر قرار دهند، استفاده شوند [۸]. در این راستا، کشف SNP ها و استفاده از آنها در انواع مطالعات ژنتیکی نشان می دهد که می توان از آنها به طور موثر برای بررسی تنوع ژنتیکی و بهبود ویژگی های اقتصادی استفاده کرد.

نشانگرهای SNP تولید شده با روش توالی یابی Sanger

فن آوری توالی یابی DNA توسط سانگر[۸۹] در سال ۱۹۷۷ آغاز شد و طی چند دهه اخیر به سرعت در حال توسعه است.برای شناسایی جهش‌های SNP در توالی DNA، از تکنیک‌های پلی‌مورفیسم طول قطعه محدود[۹۰] (RFLP)، تقویت‌شده تصادفی DNA پلی‌مورفیک[۹۱] (RAPD)، و چند شکلی طول قطعه تقویت شده[۹۲] (AFLP) استفاده شد. RFLP برای اولین بار به عنوان یک ابزار تجزیه و تحلیل ژنتیکی در سال ۱۹۷۴ مورد استفاده قرار گرفت [۱۱]. این می تواند تغییرات پایه خاصی را در توالی DNA با استفاده از آنزیم های محدود کننده شناسایی کند که توالی های خاص را تشخیص می دهند و شکاف های اندونوکلئولیتیک را ایجاد می کنند، که از قطعات طولی تعریف شده هستند که با استفاده از تکنیک های الکتروفورز ژل آگارز متمایز شده اند[۱۲]. این تکنیک به‌عنوان یک نشانگر ساده مندلی[۹۳] ایجاد شده است که امکان شناسایی آسان ژنوتیپ را فراهم می‌کند. علاوه بر این، می توان از آن به عنوان یک نشانگر ژنتیکی برای شناسایی خصوصیات ژنتیکی کامل یا جزئی در رابطه شجره نامه استفاده کرد[۱۳].معمولاً، الکتروفورز ژل دارای مضراتی است که طول می کشد تا نتایج تأیید شود.برای غلبه بر این محدودیت ها، یک تکنیک الکتروفورز خودکار برای شناسایی گونه های مختلف مانند گاو، گوسفند، مرغ، بوقلمون و ماهی با استفاده از تراشه Bioanalyzer Agilent 2100 توسعه داده شد [۱۴].تکنیک RAPD برای تکثیر تصادفی بخش ناشناس DNA هسته ای با استفاده از PCR در سال ۱۹۷۴ استفاده شد [۱۵]. این روش از مجموعه پرایمر کوتاه ۸-۱۰ جفت باز استفاده می‌شود و با دمای بازپخت پایین (از ۳۶ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) تقویت می‌شود و وجود یا عدم وجود نوار را تأیید می‌کند که نشان‌دهنده چندشکلی‌ها است [۱۵] [۱۶] [۱۷]. از آنجا که، چندین محصول را تولید می کند که نشان دهنده مکان های مختلف است، تنوع ژنومی را می توان به راحتی و با دقت بدون دانش قبلی از توالی DNA شناسایی کرد [۱۷] [۱۸].تکنیک ژنوتیپ RAPD می تواند تفاوت های توالی نوکلئوتیدی یا وجود ایندل(ها) را در محل اتصال پرایمر تعیین کند [۱۷]. بنابراین، RAPD قبلاً به عنوان ابزار مفیدی برای شناسایی گونه‌ها معرفی شده است و برای تکنیک انگشت نگاری توسعه داده شده است.AFLP معمولاً با تشخیص قطعات محدود کننده در ناحیه وسیع ژنوم توسط تقویت PCR شناسایی می شود [۱۹].آنزیم محدود کننده دو رشته DNA را می شکافد و آداپتور به انتهای قطعه

[89] Sanger
[90] Restriction Fragment Length Polymorphism
[91] Random Amplified Polymorphic DNA
[92] Amplified Fragment Length Polymorphism
[93] Mendelian

DNA متصل می شود و DNA الگو را می توان با استفاده از مجموعه های پرایمر مکمل تولید کرد.این روش یک تکنیک انگشت نگاری برای سایت اطلاعات ژنتیکی ناشناخته با استفاده از مجموعه های محدود از جفت آغازگرهای عمومی است و به عنوان یک ابزار نقشه برداری ژنوم برای مطالعه تنوع ژنتیکی گونه ها بدون نقشه نشانگر متراکم استفاده می شود [۲۰].

توسعه و کاربرد توالی‌یابی نسل بعدی[۹۴] (NGS) با استفاده از داده‌های SNP با چگالی بالا

سی سال پس از توسعه توالی یابی Sanger، Roche 454 از Life Science، Solexa از Illumina و سیستم SoLiD از Biosystems کاربردی از سال ۲۰۰۵ توسعه یافتند. این سه پلت فرم فناوری توالی یابی برای دقت توالی، دقت متغیر، نرخ پوشش، نرخ مثبت کاذب، نرخ منفی کاذب و نرخ اختلاف متغیر مقایسه و تجزیه و تحلیل شدند (Harismendy et al., 2009). بسیاری از داده های توالی یابی ژنوم انباشته شده در زمینه ژنومیک حیوانات از جمله انسان، تغییرات توالی نوکلئوتیدی را در سراسر ژنوم تایید کرده اند که منجر به توسعه تراشه های SNP با استفاده از روش آرایه شده است. برای یک لحظه، در گاو، آرایه ۵۰ K SNP BeadChip برای مطالعه ارتباط گسترده ژنوم گاو[۹۵] (GWAS) مورد استفاده قرار گرفت، بلکه تغییرات توالی نیز شناسایی شده است و بستری برای مطالعه ژن بیماری گاوی و نقشه برداری QTL فراهم می کند [۲۱]. همچنین، ژنوم بز در مقیاس بزرگ با استفاده از آرایه های BeadChip 60K در خوک ها مورد بررسی قرار گرفت [۲۲]. در مورد گوسفند، یک نقشه تنوع تعداد کپی (CNV) از گوسفند با استفاده از یک آرایه ۵۰ K SNP BeadChip ایجاد شد [۲۳]. برای مرغ، پیش نویس توالی ژنوم برای اولین بار در سال ۲۰۰۴ منتشر شد [۲۴] و متعاقباً، تراشه SNP با چگالی بالا K۶۰۰ برای ژنوتیپ SNP در مرغ با طیف گسترده ای از مفاهیم منتشر شد [۲۵].بنابراین، آرایه SNP یک فناوری محبوب جدید در گونه‌های مختلف جانوری است و می‌تواند برای نقشه‌برداری ارتباط، تنوع ژنتیکی و مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شود. علاوه بر این، داده‌های تراشه SNP انبوه را می‌توان به سرعت و با دقت برای درک بهتر عدم تعادل پیوند[۹۶] (LD)، عناصر تکراری پشت سر هم، و تغییر تعداد تکرار تجزیه و تحلیل کرد.

درک ساختار LD در یک جمعیت برای توسعه نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با فنوتیپ و کاربرد موثر انتخاب به کمک نشانگر[۹۷] (MAS) ضروری است (آباشت و همکاران، ۲۰۰۹). به طور کلی تغییر ساختار LD ناشی از عواملی مانند مهاجرت، انتخاب و رانش ژنتیکی در جمعیت است. این اندازه LD با نرخ نوترکیبی در مرحله میوز تعیین می شود. اندازهLD (r^2) را می توان با محاسبه درجه پیوند دو جایگاه مجاور با استفاده از فرکانس آللی تایید کرد [۲۶]. علاوه بر این، اندازه جمعیت موثر را می توان با مقادیر محاسبه شده(r^2) LD تخمین زد [۲۷]. اندازه جمعیت موثر حداقل تعداد افراد در یک جمعیت است که فرکانس آللی بدون تغییر

[94] Next Generation Sequencing (NGS)
[95] genome-wide association study (GWAS)
[96] Linkage Disequilibrium(LD)
[97] Marker Assisted Selection(MAS)

در یک نسل مکرر باقی می ماند [۲۸]. از آنجایی که LD را می توان ارتباط یک جفت جایگاه را اندازه گیری کرد [۲۹] [۳۰] ، اندازه گیری هموزیگوسیتی بخش کروموزوم[۹۸] (CSH) انجام شد [۳۰]. ارزیابی LD جمعیت برای ارزیابی ویژگی های ژنتیکی جمعیت و ایجاد یک استراتژی انتخاب کارآمد ضروری است [۳۱]. علاوه بر این، ارزیابی دقیق LD یک جمعیت می‌تواند مبنایی برای ردیابی امضای انتخاب برای یک فنوتیپ جمعیت فراهم کند و می‌تواند به شناسایی جهش‌های علت و نشانگرهای ژنتیکی که با یک فنوتیپ از طریق مطالعه ارتباط گسترده ژنوم (GWAS) مرتبط هستند، کمک کند. . این می تواند یک مطالعه اساسی برای به حداکثر رساندن میزان بهبود ژنتیکی با افزایش اثر انتخاب باشد. این روش های ارزیابی LD نیز همراه با پیشرفت اخیر فناوری NGS و انواع مختلف تراشه های SNP با چگالی بالا در حال توسعه هستند. علاوه بر این، با کمک روش انتساب اخیر، ژنوتیپ نشانگر SNP با چگالی کم به طور گسترده ای برای ارزیابی LD و GWAS استفاده شده است.

تکنیک تکرار تعداد متغیر پشت سر هم[۹۹] (VNTR) بر اساس تفاوت در تکرار پشت سر هم توالی های نوکلئوتیدی ژنوم یوکاریوتی است [۳۲]. دنباله ای از ۱ تا ۶ جفت باز است که ریزماهواره تکرارهای پشت سر هم کوتاه[۱۰۰] (STR) نامیده می شود [۳۳] و دنباله ای از ۱۰ تا ۶۰ جفت باز است که با توجه به تعداد نقوش تکراری مینی ماهواره (VNTR) نامیده می شود [۳۴]. ریزماهواره به دلیل تجزیه و تحلیل ژنتیکی نسبتا آسان و هزینه نسبتا کم به طور گسترده ای برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی و مطالعات برنامه اصلاحی در کشورهای در حال توسعه استفاده می شود [۳۵]. گزارش شده است که این نشانگر توانایی شناسایی چندشکلی ها را با مقایسه اندازه توالی های ساده تکراری دارد که اگر هتروزیگوسیتی[۱۰۱] مورد انتظار (Hexp) بیشتر از ۰,۵ و مقادیر اطلاعات چندشکلی[۱۰۲] (PIC) بیشتر از ۰,۶ باشد، افراد و نژادها را می توان شناسایی کرد [۱۰] [۱۳]. اگرچه، مطالعات موقعیت چندشکلی ، مکان‌های صفت کمی[۱۰۳] (QTL) برای یافتن ژن‌های کاندید موضعی مرتبط با صفات اقتصادی در اوایل دهه ۲۰۰۰ انجام شد، اخیراً آنها با مطالعات GWAS با استفاده از HD SNP جایگزین شده‌اند.

یکی از جهش‌های ساختاری ژنتیکی، تنوع تعداد تکرار (CNV) می‌تواند به تنوع و تکامل ژنتیکی کمک کند. در ابتدای مطالعه CNV، به عنوان یک قطعه DNA بزرگتر از ۱ کیلو بایت در مقایسه با ژنوم مرجع تعریف شد، اما اخیراً شامل بخش کوتاه ۵۰ جفت باز [۳۶] [۳۷]. اخیراً، داده‌های NGS برای تخمین دقیق‌تر CNV برای مطالعات گسترده ژنوم، به عنوان مثال، مرغ بومی کره‌ای و همچنین مقایسه CNV در جمعیت Hanwoo، Angus و Holstein استفاده شده است [۳۸] [۸].

[98] romosome segment homozygosity (CSH)
[99] Variable NumberTandem Repeat(VNTR)
[100] Short Tandem Repeats(STR)
[101] heterozygosity
[102] polymorphism information contents (PIC)
[103] quantitative trait loci (QTL)

نشانگرهای SNP در مقابل نشانگرهای MS

علیرغم این واقعیت که نشانگرهای MS چند شکلی بالایی دارند، تکنیک MS در حال استفاده محدود است. به خصوص، به دلیل محدودیت فنی، کار فشرده و هزینه آزمایش. یکی از مشکلات فنی نشانگرهای MS ، ناهماهنگی اندازه مشخصه ها است که مقایسه نتایج تولید شده از آزمایشگاه های مختلف را دشوار می کند [۱۰].دلیل اندازه متفاوت مشخصه ها این است که اندازه شاخص ها بسته به شرایط واکنش PCR متفاوت است. برای مثال؛ Taq پلیمراز بسته به شرایط تقویت PCR، تعداد شاخص های متفاوتی را در انتهای ۳ قطعه PCR سنتز کرده است [۳۹]. این توالی های نوکلئوتیدی اضافی منجر به اندازه های تقویت PCR نادرست می شود [۴۰].خطای اندازه قطعه منجر به تولید یک مشخصه جدید مصنوعی می شود و این مشخصه های مثبت کاذب را می توان در تجزیه و تحلیل جمعیت شجره نامه اصلاح کرد اما در تجزیه و تحلیل جمعیت تصادفی می تواند نتایج متفاوتی ایجاد کند [۱۰]. علاوه بر این، نشانگرهای MS به تجزیه و تحلیل حرفه ای برای به حداقل رساندن خطاهای ژنوتیپی در مقایسه با روش های تجزیه و تحلیل SNP اخیراً توسعه یافته نیاز دارند، و همچنین انجام PCR و تجزیه و تحلیل داده ها نسبتاً گران و زمان بر است. از سوی دیگر، نشانگرهای SNP را می توان به سادگی وجود یا عدم وجود آن را تایید کرد. ایجاد خطاهای SNP در یکی از دو آلل که هتروزیگوت را به هموزیگوت یا هموزیگوت را به هتروزیگوت ژنوتیپ می کند، آسان نیست. در مقایسه، روش تجزیه و تحلیل SNP از نظر هزینه، دقت تجزیه و تحلیل، زمان بر بودن مزایای بسیاری دارد. همچنین، سیستم تجزیه و تحلیل تمام خودکار مبتنی بر آرایه برای شناسایی ژنوتیپ های آلل استفاده می شود [۱۰]. به طور کلی، نشانگرهای MS به طور گسترده برای شناسایی افراد و تبعیض ژن مورد استفاده قرار گرفتند، اما نشانگرهای SNP آلل‌های نسبتاً کمتری نسبت به نشانگرهای MS داشتند. پیش از این، مقایسه توان کارایی بین ۱۳ نشانگر MS و ۳۷ نشانگر SNP برای شناسایی خوک و آزمایش والدین به دست آمد و نتایج نشان داد که آنها برآوردهای مشابهی از احتمال هویت[۱۰۴] (PI) داشتند [۲۵]. بنابراین، اگر تعداد کمی از نشانگرهای SNP سفارشی شود، می توان نتایج سریع و دقیقی به دست آورد. برای تحقیقات ژنومی به‌ویژه، تعداد SNPهای مشروح‌شده در منطقه گسترده ژنوم از طریق تجزیه و تحلیل توالی‌یابی NGS که در دهه ۲۰۰۰ ایجاد شد، مبنایی برای توسعه پلت‌فرم‌های SNP با چگالی کم و چگالی بالا و ابزارهای آرایه‌ای توسعه‌یافته شد که آسان‌تر و ارزان‌تر می‌کنند.

منابع

[1]. Syvanen AC (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. Nat Rev Genet2:930-942.
[2]. Fontanesi L (2009) Genetic authentication and traceability of food products of animal origin: new developments and perspectives. Italian Journal of Animal Science 8:9-18.

[104] probability of identity (PI)

[3]. Cummins JM (2000) Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. Human Reproduction15:92-101.
[4]. Hoque MR, Choi NR, Sultana H, Kang BS, Heo KN, Hong SK, Jo C, Lee JH (2013) Phylogenetic Analysis of a Privately-owned Korean Native Chicken Population Using mtDNA D-loop Variations. Asian-Australas J Anim Sci26:157-162.
[5]. Jin SD, Seo DW, Sim JM, Baek WK, Jung KC, Jang BK, Choi KD, Lee JH (2009) Single nucleotide polymorphism analysis of the COI gene in Korean native chicken. Korean Journal of PoultryScience 36:85-88
[6]. Bourges I, Ramus C, Mousson de Camaret B, Beugnot R, Remacle C, Cardol P, Hofhaus G, Issartel JP (2004) Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. Biochem J 383:491-499.
[7]. Yoon D, Kwon YS, Lee KY, Jung WY, Sasazaki S, Mannen H, Jeon JT, Lee JH (2008) Discrimination of Korean cattle (Hanwoo) using DNA markers derived from SNPs in bovine mitochondrial and SRY genes. Asian-Aust J Anim Sci 21:25-28
[8]. Seo DW, Lee JH (2016) DNA markers for the genetic diversity in Koran native chicken breeds: A review. Korean Journal of Poultry Science 43:63-76.
[9]. Collins DW, Jukes TH (1994) Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. Genomics 20:386-396.
[10]. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genet Sel Evol 34:275-305.
[11]. Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J (1974) Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 39:439-446.
[12]. Soller M, Beckmann JS (1983) Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor Appl Genet 67:25-33.
[13]. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314 331.
[14]. Dooley J, Garrett S (2001) Development of meat speciation assays using the Agilent 2100 bioanalyser. Agilent Technologies Application. Note.
[15]. Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 18:7213-7218.
[16]. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18:6531-6535.
[17]. Liu ZJ, Cordes J (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238:1-37.
[18]. Huang MC, Horng YM, Huang HL, Sin YL, Chen MJ (2003) RAPD fingerprinting for the species identification of animals. Asian Australasian Journal of Animal Sciences 16:1406-1410.
[19]. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23:4407-4414.
[20]. Mueller UG, Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. Trends Ecol Evol 14(10):389-394.

[21]. Matukumalli LK, Lawley CT, Schnabel RD, Taylor JF, Allan MF, Heaton MP, O'Connell J, Moore SS, Smith TP Sonstegard TS, Van Tassell CP (2009) Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. PLoS One 4:e5350.

[22]. Ramos AM, Crooijmans RP, Affara NA, Amaral AJ, Archibald AL, Beever JE, Bendixen C, Churcher C, Clark R, Dehais P (2009) Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. PloS one 4:e6524

[23]. Liu J, Zhang L, Xu L, Ren H, Lu J, Zhang X, Zhang S, Zhou X, Wei C, Zhao F, Du L (2013) Analysis of copy number variations in the sheep genome using 50K SNP BeadChip array. BMC Genomics 14:229.

[24]. Hillier LW, Miller W, Birney E, Warren W, Hardison RC, Ponting CP, Bork P., Burt DW, Groenen MA, Delany ME (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. Nature 432:695-716.

[25]. Lee JB, Yoo CK, Jung EJ, Lee JG, Lim HT. (2012) A comparison of discriminating powers between 13 Microsatellite markers and 37 single nucleotide polymorphism markers for the use of port traceability and parentage test of pigs. Jorunal of Agriculture and Life Science 46:73-82.

[26]. Hill W, Robertson A (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. TAG Theoretical and Applied Genetics 38:226-231.

[27]. Sved J (1971) Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. Theoretical population biology 2:125-141.

[28]. Wright S (1940) Breeding structure of populations in relation to speciation. The American Naturalist 74:232-248.

[29]. Devlin B, Risch N (1995) A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. Genomics 29:311-322.

[30]. Hayes BJ, Visscher PM, McPartlan HC, Goddard ME (2003) Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. Genome Res 13:635-643.

[31]. Barrett JC, Cardon LR (2006) Evaluating coverage of genome-wide association studies. Nat Genet 38:659-662.

[32]. Takezaki N, Nei M (2008) Empirical tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. Genetics 178:385-392.

[33]. Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet 44:397-401.

[34]. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. Nature 316:76.

[35]. Rege J, Marshall K, Notenbaert A, Ojango J, Okeyo A (2011_ Pro-poor animal improvement and breeding—What can science do? Livestock Science 136:15-28.

[36]. Alkan C, Coe BP, Eichler EE (2011) Genome structural variation discovery and genotyping. Nat Rev Genet 12:363-376.

[37]. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW (2006) Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. Hum Mol Genet 15:R57-66.

[38]. Cho ES, Chung WH, Choi JW, Jang HJ, Park MN, Kim N, Kim TH, Lee KT (2014) Genome-wide copy number variation in a Korean native chicken breed. Korean J Poult Sci 41:305-311.

[39]. Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. Biotechniques 20:1004 1006, 1008-1010.

[40]. Ginot F, Bordelais I, Nguyen S, Gyapay G (1996) Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. Nucleic Acids Research 24:540-541.

توصیف یافته‌های برخی از پژوهش‌های انجام شده پیرامون کنترل سرطان با ژن درمانی (با تاکید بر ژن‌های P۵۳)

بنیامین حلاجی*، دانشجوی سلولی مولکولی دانشگاه پیام نور استان البرز، مرکز کرج

benyaminhallajy@gmail.com

دکتر محبوبه طالبی، عضو هیات علمی دانشگاه پیام نور استان البرز، مرکز کرج

Mah_saghar@yahoo.com

چکیده

سلول‌های سرطانی جهت گسترش و حفظ بقای خود دچار تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی مختلفی می‌شوند و کنترل سرطان چه بواسطه پیشگیری و چه بواسطه درمان هدف مهم ژن درمانی است. هدف از این تحقیق توصیف یافته‌های برخی از پژوهش های انجام شده در خصوص کنترل سرطان از طریق ژن درمانی با تاکید بر ژن P ۵۳ بود. روش‌شناسی: این پژوهش از نظر سنجش پذیری داده‌ها، کیفی، از نظر راهبردی، استدلالی از نوع تحلیل محتوای کیفی است. از نظر هدف، کاربردی و از نظر جمع آوری داده‌ها، کتابخانه‌ای است. جامعه آماری این تحقیق پژوهش‌های انجام شده پیرامون ژن درمانی با تاکید بر ژن‌های $P_{۵۳}$ بود. نمونه گیری با توجه به هدف و روش‌شناسی تحقیق به شکل هدفمند می‌باشد. نمونه‌گیری از نوع روش غیراحتمالی است. تعداد ۱۸ پژوهش انتخاب شدند. یافته‌ها: پس از استخراج کدهای اولیه، کدهای اولیه در شش مقوله: تعریف ژن P53، ویژگی‌های ژن P53، نقش و اهمیت ژن P53 در درمان سرطان، نوع سرطان-های مورد مطالعه در ژن درمانی با ژن P53، ارتباط سایر ملکولها با ژن P53، داده‌های آماری در خصوص مکانیزم جهش ژن P53 قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: سرطان، ژن درمانی، ژن P53

Abstract

Cancer cells undergo various genetic and phenotypic changes in order to expand and maintain their survival, and cancer control, both through prevention and treatment, is an important goal of gene therapy. The purpose of this research was to describe the findings of some of the researches conducted regarding cancer control through gene therapy with an emphasis on the P53 gene. Methodology: This research is qualitative in terms of data measurability, and in terms of strategy, it is an argument of qualitative content analysis type. In terms of purpose, it is practical and in terms of data collection, it is a library. The statistical population of this research was the research conducted on gene therapy with emphasis on P53 genes. Sampling is purposeful according to the purpose and methodology of the research. Sampling is a non-probability method. 18 studies were selected Findings: After extracting primary codes, primary codes in six categories: definition of P53 gene, characteristics of P53 gene, role and importance of P53 gene in cancer treatment, type of cancers studied in gene therapy with P53 gene, relationship of other Molecules with P53 gene, statistical data regarding the mutation mechanism of P53 gene were placed.

Keywords: cancer, gene therapy, P53 gen

مقدمه

امروزه، سرطان، دومین عامل مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود. به طوری که طبق اعلام سازمان جهانی بهداشتWHO، از هر شش مورد فوتی در جهان، یک مورد، بر اثر ابتلا به سرطان بوده است. با توجه به این که در هنگام سرطان که رشد غیر عادی سلولی با توجه به نقص موجود در نقاط وارسی سلولی می‌باشد و همچنین با توجه به این که برخی از ژن های سری پی می توانند به مرگ درون سلولی و جلوگیری از سرطانی شدن سلول ها جلوگیری کنند لذا با توجه به این موارد می توانیم تاثیر افزایش ژن های سری پی که می‌توانند به کنترل شرایط بدن کمک کنند و از سرطانی شدن و متازتاز دادن سرطان جلوگیری کنند لذا با توجه به این موارد آزمایشاتی هم تدارک داده شده است. آزمایش در پاسخ به این سوال است که آیا می توانیم تا حدودی به این که عوامل محیطی محرک سرطان از جمله آلودگی های صوتی و مواد مخدر و مشروبات الکلی و غیره بر یک سری از موش هایی که ژن جدیدی دریافت نکرده اند و یک سری از موش هایی که این ژن ها را دریافت کرده اند ولی در معرض هیچ محرک محیطی‌ای که بتواند جهش ژنی و یا سرطان ایجاد کند قرار نگرفته‌اند بررسی می‌شود که آیا این افزایش ژن ها به خودی خود محرک و برانگیزنده سرطان و یا جهش هستند یا خیر و همچنین در آخر این موضوع یعنی همان افزایش ژن‌های سری پی ای که می‌توانند در مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی درون سلولی تاثیر بگذارند و به نوعی به کنترل سرطان و جلوگیری از انتشار آن و یا متاستاز دادن آن است کمک کنند و همچنین در موش‌های مختلفی بررسی می‌شود که به بافت های متعددی از جمله دو بافت هدف اصلی که بیشتر در معرض تغییر و تحول هستند(بافت استخوانی که سلول بنیادی دارد و بافت عضلانی مخطط) و در آخر هم این نتایج با گروه شاهدی که نه به آن ها ژنی تزریق شده است و نه در خطر محرک های محیطی هستند بررسی می‌شود این موضوع یعنی تزریق ژن های مدنظر به خودی خود حاوی مراحل بسیار پیچیده ای از قبیل شناسایی ژن های و کلونینگ ژن مدنظر است [1, 15] .

واژه «سرطان» به بیش از ۲۷۷ نوع بیمارهای سرطانی اطلاق می گردد. دانشمندان مراحل تولید سرطان ها را تعیین کرده که چندین ژن موتاسیون‌دار در آن دخالت دارند. این تغییرات ژنتیکی باعث از هم گسیخته شدن نظم طبیعی تقسیم و تمایز سلول ها می شود. اختلالات ژنتیکی از طریق وراثتی و غیروراثتی موجب تحولات جدیدی در کنترل رشد سلولی می شود. چهار گروه از ژن ها که بطور مکرر ناهنجاری پیدا می کنند نقش به سزایی در تولید سلول سرطان بازی می کنند: ۱- آنکوژن ها که ازدیاد فعالیت آنها باعث رشد غیرقابل کنترل سلول ها می‌شود، ۲- ژن‌های مهارکننده تومور، ۳- ژن های ترمیم کنندهDNA ، ۴- ژن های آپوپتوتیک در سلولهای سوماتیک بدن انسان میلیون ها ژن وجود دارد. بعد از اتمام پروژه ژنتیک انسانی در سال ۲۰۰۳ مشاهده کردیم که فقط ۲۳۵۰۰ ژن فعال وجود دارد که ۴۰۰۰۰۰ نوع پروتئین های مختلف را می سازند. در حدود ۹۳ درصد سرطان‌ها نتیجه تاثیرات عوامل محیطی است و فقط ۷ درصد آنها جنبه وراثتی دارد. به کمک پیشرفت های تکنولوژی در بیوانفورماتیک و تکنیک های مولکولی، اطلاعات

زیادی بدست آمده که در شناخت زودرس بیماری سرطان کمک خواهد کرد و همچنین غربالگری به موقع برای بعضی از سرطان ها کمک موثری در تشخیص زودرس آن می‌نماید. در سال های اخیر مطالعات ژنتیک مولکولی اساس مکانیسم تولید سرطان‌ها را توجیح کرده است. نتیجه کل این مطالعات مولکولی منجر به این شد که سرطان‌ها جز بیماری های ژنتیکی هستند[17].

ژنP53 معروف‌ترین ژن بازدارنده توموری است که در بیش از ۵۰٪ سرطان های انسانی دچار جهش می-شود. این ژن با عنوان هایی چون «نگهبان ژنوم»، «ژن فرشته نگهبان» و «استاد نگهبان» توصیف شده است که به نقش حیاتی آن در پایداری ژنومی, و سرکوب توموری عمدتا با القای آپوپتوز ,توقف چرخه سلولی, پیری, و مهار رگ‌زایی اشاره دارد. نام P53 در ۱۹۷۹ میلادی جهت توصیف جرم مولکولی ظاهری به کار رفت؛ تحلیل SDS-PAGE نشان می‌دهد که این پروتئین دارای وزن مولکولی ۵۳-کیلودالتون (kDa) است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ میلادی انجام شد، معلوم گشت که جهش پرولین درTP53 ، اثر ژرفی بر روی ریسک سرطان لوزالمعده در سرطان سینه میان مذکران دارد. مطالعه‌ای که بر روی زنان عرب انجام گشت نشان داد که هموزیگوسیتی در کدون ۷۲ ازTP53 ، با اهش ریسک سرطان سینه مرتبط است. در مطالعه‌ای به سال ۲۰۱۱ میلادی، مشخص شد که چندریختی در کدون ۷۲ از TP53 با افزایش ریسک سرطان ریه مرتبط است[20] .

عبدالهی و همکاران(۱۳۹۶) در پژوهشی با عنوان « پژوهش های P53 و درمان سرطان » به مرور کلی تاریخچه و عملکرد های P53 پرداختند. همچنین پولادی و همکاران (۱۳۹۹) به بررسی پژوهش های P53 و درمان سرطان؛ دامغانی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی فراوانی جهش های ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان حنجره؛ شیخ پور و همکاران (۱۳۹۳) به تاثیر هورمون پروژسترون بر میزان پروتئین P53 در رده سلولی T47D سرطان پستان؛،گل محمدی و همکاران (۱۳۸۹) به بیان ژن P53 با شاخص های بافتی و آسیب شناسی در سرطان پستان؛ علا طالیب و همکاران (۱۴۰۱) به ارتباط بیان پروتئین P53 با سایر مشخصات هیستوپاتولوژی در مبتلایان به سرطان پستان؛ جوشقانی و همکاران (۱۳۸۲) به تعیین جهش های ژن P53 در سرطان معده به روشPCR- SSCP ؛ گل محمدی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی نقش سرطان زایی ژنوتیپ کدون ۷۲ ژن P53 در کارسینومای مهاجم مجرایی سرطان پستان؛ گل محمدی و همکاران (۱۳۸۴) به بررسی موتاسیون اگزون ۵ ژن P53 در سرطان کولورکتال؛ عسگری و همکاران (۱۳۸۱) به برریس افزایش بروز ژن P53 در سرطان ترانزیشنال مثانه؛ نوری و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی دلویی نقش P53 در آپوپتوز و درمان سرطان؛ فاتحی و همکاران (۱۳۹۵) به بررسی پلی مورفیسم تکرار TAAAAدر ژن P53 و ارتباط آن با سرطان کولورکتال؛ گل محمدی و همکاران (۱۳۸۶) به بررسی پایداری پروتئین P53 با شاخص های پاتولوژی در سرطان کولورکتال با روش ایمونوهیستوشیمی؛ صدری و همکاران (۱۳۹۵) به بررسی پلی مورفیسم تکرار TAAAA در ژن P53 و ارتباط آن با سرطان پروستات؛ شیروانی و همکاران (۱۳۹۷) به مطالعه تغییرات میزان ناقل مونوکربوکسیلات و بیان ژن P53 با تمرین

ورزشی تناوبی در کارسینوم تجربی کولون موش؛ سالاری و همکاران (۱۳۹۷) در پژوهش با عنوان به بررسی میزان تغییر بیان و جهش های ژن هایP53 وMICAL2 در مبتلایان به سرطان معده ؛ اصغری و همکاران (۱۳۹۷) به بررسی اثر هشت هفته تمرینات ترکیبی بر توان هوازی و سطح سرمی پروتئین سرکوب‌گر تومور P53 در بیماران مبتلا به سرطان پروستات؛ و پارسا (۱۳۹۰) به فراتحلیل پروتئینP53 و تاثیر آن بر سرطان پرداختند[1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18]. با این همه این پرسش مطرح است که یافته‌های برخی از پژوهش‌های انجام شده پیرامون کنترل سرطان از طریق ژن درمانی چگونه است و توصیف کیفی آنها چه نتیجه ای را در بردارد؟ به عبارت دیگر محقق در پی آن است که به توصیف یافته‌های برخی از پژوهش های انجام شده در خصوص کنترل سرطان از طریق ژن درمانی با تاکید بر ژن $P_{۵۳}$ بپردازد.

روش کار/ روش شناسی

از منظر سنجش پذیری داده ها، روش تحقیق این پژوهش از دسته تحقیقات کیفی محسوب می‌شود که به صورت اکتشافی انجام می‌شود و جزء تحقیقات غیرتجربی(غیر آزمایشی) یا توصیفی نیز از دیدی دیگر محسوب می‌گردد. این روش از منظری دیگر جزء روش های تحقیق استدلالی محسوب می شود[19]. بنابراین، این پژوهش از نظر سنجش پذیری داده ها، کیفی، از نظر راهبردی، استدلالی از نوع تحلیل محتوای کیفی است. از نظر هدف، کاربردی و از نظر جمع آوری داده‌ها، کتابخانه‌ای است.

جامعه آماری این تحقیق پژوهش های انجام شده پیرامون ژن درمانی با تاکید بر ژن $P_{۵۳}$ می‌باشد. با توجه به ماهیت تحقیق حجم نمونه برابر با تعداد پژوهش های انجام شده پیرامون ژن درمانی با تاکید بر ژن $P_{۵۳}$ می‌باشد روش نمونه‌گیری: نمونه گیری با توجه به هدف و روش شناسی تحقیق به شکل هدفمند می باشد. به عبارت دیگر نمونه گیری از نوع روش غیراحتمالی (هدفمند) است. ابزارهای تحقیق عبارتند از: چک لیست درج اطلاعات از پایگاههای تحقیقاتی.

در اجرای این تحقیق محقق ابتدا با عنایت به حس مسئله اقدام به مطالعه مبانی نظری و پژوهش ها در خصوص ژن درمانی کرد. سوال پیش روی محقق عبارت بود از اینکه توصیف برخی از یافته‌های پژوهشی در ژن درمانی پژوهش های انجام شده پیرامون ژن درمانی با تاکید بر ژن‌های $P_{۵۳}$ دارای چه دستاوردها و یا نتایجی است؟

محقق در بررسی اسناد کتابخانه‌ای به پژوهش‌های پیرامون بررسی برخی از یافته‌های پژوهشی در ژن درمانی پژوهش های انجام شده پیرامون ژن درمانی با تاکید بر ژن‌های $P_{۵۳}$ پرداخت همچنین از منابع معتبر در این زمینه به مانند کتاب برخی از کتاب‌های معنبر و علمی کمک گرفت. محقق ابتدا یافته ها را استخراج و سپس مضمون اصلی یکایک عبارات را استخراج کرد. مفاهیم اولیه در قالب کد برجسته شد. این کار یعنی کدگذاری باز که زمان طولانی را به خود اختصاص داد و بارها محقق نسبت به ویرایش آن اقدام

کرد. پس از کد گذاری اولیه، نوبت به کشف مشابهت‌ها و تمایزات بین همین مفاهیم کدگذاری شده رسید. به بیانی دیگر تلاش شد تا مفاهیمی / کدهای اولیه که با همدیگر قرابت معنایی بیشتری دارند، در کنار هم قرار گیرند. با این اقدام محقق به شکل گیری مقوله‌ها اقدام کرد که به آن کد گذاری محوری نیز می‌گویند. به منظور اعتبارسنجی روند اجرا، در هر مرحله محقق با راهنمایی و کمک استاد راهنما روند کدگذاری را چک می‌کرد تا نسبت به دقت در شناسایی کدهای اولیه و نیز تولید کدهای محورهای اطمینان حاصل شود. داده‌های بدست آمده از یافته های پژوهشی از طریق فرایند تحلیل مقایسه‌ای مداوم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این پژوهش نیز با استفاده از رسیدگی مداوم، در تولید و جمع آوری داده‌ها از شیوه یادداشت برداری استفاده شد.. همچنین اختصاص زمان کافی برای مطالعه و بررسی یافته ها طی جلسات مختلف برای افزایش اعتبار پژوهش بکار رفت.

دو رویکرد برای تحلیل داده‌ای کیفی وجود دارد. در رویکرد قیاسی محقق از سوالات طراحی شده به عنوان ساختاری برای شکل دادن به داده‌ها استفاده میکند در حالی که در رویکرد استقرایی محقق هیچ پیش بینی برای سازمان دادن یافته‌ها ندارد. روش استقرایی مبتنی بر یک ساختار از پیش تعیین شده یا قوانین / چارچوبی اساسی نیست. وقت گیرتر و رویکرد کاملی برای تجزیه و تحلیل داده های کیفی است. رویکرد استقرایی غالباً هنگامی استفاده می‌شود که محقق نسبت به پدیده تحقیق اطلاعات بسیار اندک باشد یا تصوری از آن نداشته باشد. در تحقیق حاضر محقق از رویکرد استقرایی استفاده کرد و یافته به واسطه ماهیتی که دارند کدگذاری و مقوله‌بندی شوند.

نتایج

نتایج/یافته‌ها بر اساس روش تحقیق کیفی و با متد کدگذاری تحلیل و تولید شد. این یافته‌ها در قالب دو جدول ارائه شد. در جدول شماره ۱در قالب دو ستون ابتدا یافته‌های تحقیقات و سپس کدهای اولیه در طی فرآیند کدگذاری باز ارائه شده اند که به دلیل حجم بالا از مقاله حذف و صرفا کدهای اولبه استخراج شده به جدول ۲ انتقال یافت. در جدول ۲ ابتدا در ستون سمت راست کدهای اولیه آورده شده است. البته برای اینکار محقق به شکلی کدها را در ستون سمت راست چینش می کند که بتواند با کمک درک و فهم خود قرابت معنای و مفهومی بین آنها پیدا کند. و سپس با عنایت به این قرابت معنای و مفهومی است که کدهای محوری ظهور پیدا می کنند و تلاش محقق را به ثمر می‌رسانند.

جدول مقوله‌بندی کدهای اولیه استخراج شده از یافته‌های پژوهشی پیرامون ژن درمانی تاکید بر پروتئین‌های **P53**

کد اولیه(کدگذاری باز)	مقوله‌بندی (کد محوری)
– پروتئین P53 یک آنتی ژن توموری است. – شناسایی ایزوفرم های مختلف ,P53 – کشف یک آنتی سنتز طبیعی (WraP53) P53	چیستی / تعریف ژن **P53**

– پروتئین P53 که محصول ژن P53 می باشد, مهم ترین عامل سرکوب کننده تومور است.	
– مقاومت ژن P53 در جهش های مختلف به شیمی درمانی – بیشترین میزان بیان پروتئین P53 در گروه سنی ۵۰≤سال (۷۵ ٪) بود. – مشاهده تفاوت معنی دار بین این نوع ژنوتیپ در گروه – محافظت از سلول های سالم در مقابل پرتودرمانی یا شیمی درمانی از طریق فعال کردن ژن P53 در سلول های سرطانی – مساوی یا کوچک تر بودن تعداد ژنوتیپ های هموزیگوت در افراد شاهد نسبت به افراد بیمار – در حالت طبیعی, نیمه عمر پروتئین P53 کوتاه است. – در شکل جهش یافته, نیمه عمر پروتئین افزایش می‌یابد که با روش ایمونوهیستوشیمی قابل ردیابی است. – در پاسخ به استرس, P53 نقش مهمی در جلوگیری از پیشرفت سرطان دارد. – هیچ ارتباطی بین این ژنوتیپ با سن شروع, توارث پذیری و متاستاز مشاهده نشد – تغییردرسطح بیان ژنها یکی ازمهمترین عوامل دربروز سرطان است. – وجود پروتئین های سرکوب‌گر تومور از جمله P53 یکی از مکانیسم های تنظیمی در کنترل پیشرفت این بیماری است.	ویژگی‌های ژن **P53**
– شصت و چهار هزار مقاله و گزارش پژوهشی با نام پروتئین P53 منتشر شده است. – نقش های مهم ژنP53 در فرآیند هایی چون طول عمر – پیری و سوخت و ساز موجب شده اند که P53 همچنان مولکولی جذاب برای تحقیق باشد. – افزایش سطح P53 ویژگی مشترک بسیاری از سرطان های بدخیم است. – تفاوت در میزان بیان ژن P53 در سرطان پستان. – یکی از مهم ترین ژنهایی که در ممانعت از بروز سرطان اهمیت دارد ژن P53 است. –در برخی از سرطان ها تا ۵۰ درصد موارد در ژن P53 جهش دیده می شود. – وقتی P53 حذف یا خاموش شود, سلول یک برتری رشد انتخابی پیدا می کند و تبدیل به سرطان می شود. – از جمله ژنهایی که سطح بیان آنهادرسرطان, تغییرمی کند می توان به P53 و MICAL2 اشاره کرد. –ژن ,P53یکی ازمهم ترین ژن هایی است که درممانعت ازبروز سرطان اهمیت داشته ودرتنظیم چرخه سلولی نقش دارد.	نقش و اهمیت ژن **P53** در درمان سرطان
– انتقال نسخه سالم P53 به سلول های سرطانی دارای نقص در P53	

نوع سرطان‌های مورد مطالعه در ژن درمانی با ژن **P53**	– یکی از TSGهای شناخته شده در سرطان های سلول سنگفرشی سر و گردن, ژن P53 می باشد که در فعالیت های مهاری رشد سلول نقش دارد, – باتوجه به تغییرات در بیان ژنهای P53و MICAL2درسرطان معده می توان از تغییر بیان ژنها درافرادی که سابقه خانوادگی دارند, بعنوان یک بیومارکر استفاده نمود – گزارش‌های ضد و نقیض در مورد نقش سرطان زایی پلی مورفیسم آلل کدون ۷۲ ژن P53 در سرطان پستان، – همراه بودن موتاسیون ژن P53 با دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در غرب یا همان سرطان کولورکتال – در نظر گرفتن P53 مهاجم بیشتر برای درمان بیماران مبتلا به TCC مثانه در بیمارستان شهید هاشمی نژاد – در ارتباط بودن تغییرات ژنتیکی در ژن P53 با تومورزایی به خصوص تومورهای جامد مانند کولون, ریه و پستان – P53 روی سلول های تومورال در بیماران مبتلا به TCC مثانه
ارتباط سایر ملکولها با ژن **P53**	– در گروه تومور کولون نسبت به سایر گروه ها, افزایش معنادار در میزان پروتیین MCT1 (0/01P<) و کاهش معنادار در بیان ژن P53 (0/001P<) مشاهده شد. – معرفی مولکول های کوچکی که پروتئین P53 جهش یافته را فعال می کنند – -فعالیت تنظیم کننده مهم آن یعنی پروتئین MDM2 را مهار می کنند. – همراه بودن موتاسیون ژن P53 با دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در غرب یا همان سرطان کولورکتال – تعیین حضور یا عدم حضور موتاسیون اکسون ۵ ژن P53 در نمونه های سرطانی کولورکتال – ارتباط تاثیر انکوپروتیئن – P53 روی سلول های تومورال در بیماران مبتلا به TCC مثانه – مطالعه ارتباط تاثیر انکوپروتئین P53بر پیش آگهی بیماری – کاهش معنا دار در میزان پروتیین MCT1 (0/01P<) و افزایش معنادار در بیان ژن P53 (0/001P<) در گروه تمرین و گروه تمرین + تومور نسبت به گروه کنترل و گروه تومور مشاهده شد
	– در ۸۰,۸ درصد از ۵۲ نمونه مورد استفاده, جهش ژن P53 مشاهده گردید. – دچار جهش شدن پروتئین P53 در نیمی از سرطان ها از جمله سرطان پستان. – -سلول هایی که تحت تیمار با غلظت ۱ نانومول از هورمون پروژسترون قرار داشتند تغییری در میزان پروتئین P53 نسبت به گروه کنترل نشان ندادند. – سلول هایی که تحت تیمار با غلظت ۱۰ و ۲۰ نانومول بودند میزان پروتئین کمتری نسبت به گروه کنترل نشان دادند – حدود ۸۷ درصد موارد جهش ها P53 در اگزون های ۵ تا ۸ هستند.

داده‌های آماری در خصوص مکانیزم جهش ژن**P53**	– تفاوت در ۹ مورد حرکت الکتروفورتیک باندهای نمونه بیماران با نمونه های طبیعی، – مشاهده یک جهش در اگزون ۵ (۱۱,۱ درصد), ۲ جهش در اگزون ۶ (۲۲,۲ درصد), ۳ جهش در اگزون ۷ (۳۳,۳ درصد) و ۳ جهش در اگزون ۸ (۳۳,۳ درصد)P53 – میزان بروز جهش در ژن P53 در سرطان معده ۲۰,۵ درصد به دست آمد که بیانگر فراوانی متوسط جهش ژن P53 در جامعهٔ مورد مطالعه است. – فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوتی آرژینین/پرولین در نمونه های سرطانی و سالم به ترتیب ۴۹ (۳۰,۶ درصد) و ۵۱ (۳۱,۹ درصد) بود – فراوانی ژنوتیپ هموزیگوتی آرژینین/آرژینین در نمونه های سرطانی و سالم به ترتیب ۲۹ (۱۸,۱ درصد) و ۱۵ (۹,۴ درصد) بود. – دچار جهش شدن ژنP53 معروف ترین ژن بازدارنده ی توموری در بیش از ۵۰ ٪ سرطان های انسانی – بررسی پلی مورفیسم TAAAA واقع در اینترون ۱ ژن P53 در بین مبتلایان به سرطان کولورکتال و افراد سالم و ارتباط آن با سرطان کولورکتال – تعداد تکرار و توالی TAAAA به وسیله الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید و تعیین توالی – میزان جهش و بیان ژن P53 در نمونه های سرطانی کولورکتال در نواحی مختلف متفاوت گزارش شده است. – P53 در نمونه های سرطانی کولورکتال در نواحی مختلف متفاوت گزارش شده است – بین پایداری پروتئین P53 با مرحله بندی تومور, درجه تمایز و نواحی مختلف روده بزرگ و رکتوم ارتباط معنی داری مشاهده نشد. – ارتباط بین جهش و پایداری پروتئین معنی‌دار بود – آلل و ۱۲ ژنوتیپ مختلف برای پلی مورفیسم تکرار TAAAA در ژن P53 مشخص شد. – آلل ۸ تکرار ,TAAAAشایع ترین آلل در بین افراد گروه های مورد و شاهد برآورد شد. – میزان بیان اگزون ۶ دربافت سالم ۰/۳۸ و دربیماران ۲/۰۴ و میزان بیان اگزون ۷ در بافت سالم ۰/۴۷و دربیماران ۳/۱۱ بود ولی اگزونهای ۴ و ۵ ژن P53 تغییر معنی‌داری نداشت. – افزایش بیان ژن MICAL2 دربافت توموری۲/۲ برابر بافت سالم بود ومشخص شد میزان بیان ژنهای P53 و MICAL2 دربافت توموری, به مراتب بیشتر ازبافت سالم اطراف تومور می باشد. – وجود پروتئین های سرکوب گر تومور از جمله P53 یکی از مکانیسم‌های

تنظیمی در کنترل پیشرفت این بیماری است. – افزایش معنی‌داری را در سطح سرمی (P=0/029) P53 در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل نشان داد	

بحث و نتیجه‌گیری

در اجرای این تحقیق محقق ابتدا با عنایت به حس مسئله اقدام به مطالعه مبانی نظری و پژوهش ها در خصوص ژن درمانی کرد. سوال پیش روی محقق عبارت بود از اینکه توصیف برخی از یافته‌های پژوهشی در ژن درمانی پژوهش های انجام شده پیرامون ژن درمانی با تاکید بر ژن‌های P_{53} دارای چه دستاوردها و یا نتایجی است؟

محقق در بررسی اسناد کتابخانه‌ای به پژوهش‌های پیرامون بررسی برخی از یافته‌های پژوهشی در ژن درمانی پژوهش های انجام شده پیرامون ژن درمانی با تاکید بر ژن‌های P_{53} پرداخت همچنین از منابع معتبر در این زمینه به مانند کتاب برخی از کتاب‌های معنبر و علمی کمک گرفت. یافته های این تحقیق مبتنی بر تجزیه و تحلیل کیفی ۱۸ پژوهش انجام شده پیرامون ژن درمانی با تاکید بر ژن های بود. یافته‌ها این پژوهش طی دو مرحله کد گذاری باز و کد کذاری محوری انجام شد و مقوله‌ها شامل این موارد هستند :چیستی / تعریف ژن P53، وِیژگی‌های ژن P53، نقش و اهمیت ژن P53 در درمان سرطان، نوع سرطان-های مورد مطالعه در ژن درمانی با ژن P53، ارتباط سایر ملکولها با ژن P53، داده‌های آماری در خصوص مکانیزم جهش ژن P53

در خصوص اولین یافته که در قالب مقوله (چیستی / تعریف ژن P53) که به روش استقرایی کشف شده است می توان چنین ابراز نظر کرد که: مطابق با مبانی نظری و تحقیقات انجام شده مشخص است که یکی از یافته‌های پژوهش‌ها درک ماهیت و چیستی ژن P53 است. البته ژن های پی از منظر توجه محقین یکسان نیستند.

در خصوص دومین یافته که در قالب مقوله (وِیژگی‌های ژن P53) که به روش استقرایی کشف شده است می توان چنین ابراز نظر کرد که: مطابق با مبانی نظری و تحقیقات انجام شده مشخص است که هرچه تحقیقات ادامه می‌یابد ویژگی‌های بیشتری برای ژن‌های سری پی یافت می‌شود. البته جریان تاکید بر ویژگی‌های اصلی که غالبا در تعریف دقیق ژن‌های سری پی استخراج و دریافت میشود پا برجاست مثل توصیف «جرم مولکولی ظاهری» و یا «یک آنتی ژن توموری است».

در خصوص سومین یافته که در قالب مقوله (نقش و اهمیت ژن P53 در درمان سرطان) که به روش استقرایی کشف شده است می توان چنین ابراز نظر کرد که: مطابق با مبانی نظری و تحقیقات انجام شده مشخص است که یکی از مقرون به‌صرفه‌ترین شیوه‌های درمان سرطان ژن درمانی است. از اینرو با بیان و

نقش ژن‌های سری پی در درمان سرطان اهمیت آنها بیشتر شده و تحقیقات بیشتری در این خصوص در جریان است.

در خصوص چهارمین کد محوری (نوع سرطان‌های مورد مطالعه در ژن درمانی با ژن P53) که به روش استقرایی کشف شده است می توان چنین ابراز نظر کرد که: مطابق با مبانی نظری و تحقیقات انجام شده مشخص است که ژن درمانی با ژن های سری پی در سرطان بافت‌های مختلف بدن مورد بررسی قرار گرفته و نتایج در حال بررسی است. برخی از مهمترین بافت*های که پیرامون جهش ژن* P53 انجام شده است، بافت پستان، معده و پروستات بوده است.

در خصوص پنجمین یافته که در قالب مقوله (ارتباط سایر ملکولها با ژن P53) که به روش استقرایی کشف شده است می توان چنین ابراز نظر کرد که: مطابق با مبانی نظری و تحقیقات انجام شده مشخص است. همواره ارتباط بین جهش ژنP53 بواسطه سایر ملکولها مهم و حیاتی بوده است. درک واریانس تغییرات جهش این ژن بواسطه واریانس تغییرات سایر ملکولها کمک بزرگی به محققین در تولید روشهای ژن درمانی می کند. برای نمونه: در گروه تومور کولون نسبت به سایر گروه ها, افزایش معنادار در میزان پروتیین MCT1 (0/01P<) و کاهش معنادار در بیان ژن P53 (0/001P<) مشاهده شد. معرفی مولکول های کوچکی که پروتئین P53 جهش یافته را فعال می‌کنند. فعالیت تنظیم کننده مهم آن یعنی پروتئین MDM2 را مهار می کنند.

در خصوص ششمین یافته که در قالب مقوله (داده‌های آماری در خصوص مکانیزم جهش ژن P53) که به روش استقرایی کشف شده است می توان چنین ابراز نظر کرد که: مطابق با مبانی نظری و تحقیقات انجام شده مشخص است که در تحقیقات با روش تجربی / آزمایشگاهی داده‌های دقیق و آماری در خصوص جهش ژن P53 ارائه شده است. برای نمونه حدود ۸۷ درصد موارد جهش ها P53 در اگزون های ۵ تا ۸ هستند. مشاهده یک جهش در اگزون ۵ (۱۱,۱ درصد), ۲ جهش در اگزون ۶ (۲۲,۲ درصد), ۳ جهش در اگزون ۷ (۳۳,۳ درصد) و ۳ جهش در اگزون ۸ (۳۳,۳ درصد)P53 ، میزان بروز جهش در ژن P53 در سرطان معده ۲۰,۵ درصد به دست آمد که بیانگر فراوانی متوسط جهش ژن P53 در جامعهٔ مورد مطالعه است. افزایش معنی داری را در سطح سرمی P53 (029/0=P) در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل؛

پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده با روش کیفی مقوله‌های بیشتر و دقیقتری پیرامون یافته‌های پژوهش های آینده انجام شود. این اقدام به تعیین دقیق مسیر پژوهش‌های آینده خواهد انجامید.

منابع

۱-پولادی، ناصر، دهقان الوار، رقیه، حسین پورفیضی، محمدعلی، عبدالهی، سپهر، و ولی پور، معصومه. (۱۳۹۶). پژوهش های P53 و درمان سرطان. *مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی*، ۶(۲)، ۳۶۳-۳۷۷. SID. https://sid.ir/paper/270529/fa

۲-دامغانی، محمدعلی، بذرافشانی، محمدرضا، و رضامیرشکاری، تورج. (۱۳۹۱). بررسی فراوانی جهش های ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان حنجره در کرمان. *مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان*، ۱۹(۲)، ۱۶۸-۱۷۵. SID. https://sid.ir/paper/400/fa

۳-شیخ پور، رباب، و محیطی اردکانی، جواد. (۱۳۹۳). تاثیر هورمون پروژسترون بر میزان پروتئین P53 در رده سلولی T47D سرطان پستان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ۲۵(۱۰)، ۹۵۴-۹۶۰. SID. https://sid.ir/paper/64156/fa

۴-گل محمدی، رحیم، و پژهان، اکبر. (۱۳۸۹). بیان ژن P53 با شاخص های بافتی و آسیب شناسی در سرطان پستان. *دانشگاه علوم پزشکی سبزوار*، ۱۷(۲) ۱۲۳-۱۲۸. SID. https://sid.ir/paper/82361/fa

۵-داوود، علاطالیب، و عبود، علی حسن. (۱۴۰۱). ارتباط بیان پروتئین P53 با سایر مشخصات هیستوپاتولوژی در مبتلایان به سرطان پستان. بیماریهای پستان ایران، ۱۵(۳)، ۹۹-۱۱۱. SID. https://sid.ir/paper/1001692/fa

۶-جوشقانی، حمیدرضا، کوچکی شلمانی، اسماعیل، احسانی زنوز، عبدالوهاب، شعبانی، محمد، درخشنده پیکر، پوپک، و کدیور، مریم. (۱۳۸۲). تعیین جهش های ژن P53 در سرطان معده به روش PCR- SSCP *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان*، ۵(۱۲)، ۳۶-۴۲. SID. https://sid.ir/paper/79492/fa

۷-گل محمدی، رحیم، و نمازی، محمدجواد. (۱۳۹۲). بررسی نقش سرطان زایی ژنوتیپ کدون ۷۲ ژن P53 در کارسینومای مهاجم مجرایی سرطان پستان. فیض، ۱۷(۴)، ۳۸۷-۳۹۳. SID. https://sid.ir/paper/40865/fa

۸-گل محمدی، رحیم، نیک بخت، مهدی، صالحی، منصور، و مختاری، مژگان. (۱۳۸۴). بررسی موتاسیون اگزون ۵ ژن P53 در سرطان کولورکتال. *مجله دانشکده پزشکی اصفهان*، ۲۳(۷۸)، ۸۱-۸۷. SID. https://sid.ir/paper/50248/fa

۹-عسگری، مژگان، و نوری، صغری. (۱۳۸۱). افزایش بروز ژن P53 در سرطان ترانزیشنال مثانه. علوم پزشکی رازی ، *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران*، ۹(۲۹)، ۲۵۰-۲۵۵. SID. https://sid.ir/paper/423667/fa

۱۰-نوری دلویی، محمدرضا، و عبداله زاده، رسول. (۱۳۹۳). نقش P53 در آپوپتوز و درمان سرطان. افق دانش، ۲۰(۳)، ۱۹۱-۲۰۱. SID. https://sid.ir/paper/68351/fa

۱۱-فاتحی، زهرا، توسلی، منوچهر، همتی، سیمین، و صفری، فروزان. (۱۳۹۵). بررسی پلی مورفیسم تکرار TAAAA در ژن P53 و ارتباط آن با سرطان کولورکتال. *مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد* (Journal of Shahrekord University of Medical Sciences)، ۱۸(3)، ۱۲۸-۱۳۶. SID. https://sid.ir/paper/58751/fa

۱۲-گل محمدی، رحیم، مهاجری، محمدرضا، و زرگریان، سیدمهدی. (۱۳۸۶). بررسی پایداری پروتئین P53 با شاخص های پاتولوژی در سرطان کولورکتال با روش ایمونوهیستوشیمی. *دانشگاه علوم پزشکی سبزوار*، ۱۴(۳ (۴۵)، ۱۴۱-۱۴۶. SID. https://sid.ir/paper/82309/fa

۱۳-صدری، زهرا، توسلی، منوچهر، همتی، سیمین، و صفری، فروزان. (۱۳۹۵). بررسی پلی مورفیسم تکرار TAAAA در ژن P53 و ارتباط آن با سرطان پروستات. *مجله دانشکده پزشکی اصفهان*، ۳۴(۳۸۴)، ۶۰۵-۶۱۱. SID. https://sid.ir/paper/50291/f

۱۴-دامغانی، محمدعلی، بذرافشانی، محمدرضا، و رضامیرشکاری، تورج. (۱۳۹۱). بررسی فراوانی جهش های ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان حنجره در کرمان. *مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان*، ۱۹(۲)، ۱۶۸-۱۷۵. SID. https://sid.ir/paper/400/fa

۱۵-شیروانی، حسین، عیسی نژاد، امین، رحیمی، مصطفی، بازگیر، بهزاد، و علیزاده، علی محمد. (۱۳۹۷). مطالعه تغییرات میزان ناقل مونوکربوکسیلات و بیان ژن حP53 با تمرین ورزشی تناوبی در کارسینوم تجربی کولون موش. *مجله دانشکده پزشکی*، ۷۶(۵)، ۳۱۳-۳۲۰. SID. https://sid.ir/paper/38214/fa

۱۶-سالاری، سعیده، محمودی، مهدی، ترک زاده ماهانی، مسعود، عسکری، ناهید، حاجی زاده، محمدرضا، بنی اسدی، نادیه، ملک پور، رضا، و خوشدل، علیرضا. (۱۳۹۷). بررسی میزان تغییر بیان و جهش های ژن های P53و MICAL2در مبتلایان به سرطان معده در شهر کرمان. *پژوهش در پزشکی*، ۴۲(۴)، ۲۴۷-۲۵۳. SID. https://sid.ir/paper/374262/fa

۱۷-پارسا, ناصر. (۱۳۹۰). اساس سلولی و مولکولی سرطان در انسان، مقاله مروری .*سلول و بافت*)2 ,زمستان ۹۰), ۳۶۵-۳۷۶. doi: 10.52547/JCT.2.4.365

۱۸-اصغری رکابدار کلایی، محمد، براری، علیرضا، عبدی، احمد، و هسراک، کامبیز. (۱۳۹۷). اثر هشت هفته تمرینات ترکیبی بر توان هوازی و سطح سرمی پروتئین سرکوب گر تومور P53 در بیماران مبتلا به سرطان پروستات: یک کارآزمایی بالینی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی* رفسنجان، ۱۷(۸)، ۷۳۳-۷۴۱. SID. https://sid.ir/paper/366430/fa

۱۹-کامکاری، کامبیز؛ کیومرثی، فیروز و شکرزاده، شهره. (۱۳۸۷). *روش پژوهش کاربردی*(با تاکید بر سازه هوش). تهران: دانشگاه آزاد واحد اسلامشهر.

۲۰-نوری دلویی، محمدرضا، و عبداله زاده، رسول. (۱۳۹۳). نقش p53 در آپوپتوز و درمان سرطان. افق دانش، ۲۰(۳)، ۱۹۱-۲۰۱. SID. https://sid.ir/paper/68351/fa

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

اندوفیت‌های میکروبی و کاربرد آن‌ها در کشاورزی پایدار

مهرآنا کوهی دهکردی [۱*]، عبدالرزاق دانش شهرکی [۲]

[۱*] . دانشیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، M.kouhi@pnu.ac.ir
[۲]. دانشیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

با توجه به پیشرفت‌های اخیر در اکولوژی میکروبی مطالعات اندوفیتیک بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. بافت داخلی گیاه منطقه‌ای مناسب برای رشد میکروب‌های اندوفیتی متنوع برای سنتز فیتوهورمون ها، ترکیبات متابولیک، اسیدهای آلی، سیدروفورها و آنزیم‌های هیدرولیتیک است. مکانیسم‌های میکروب‌های اندوفیت که تعامل آن‌ها با گیاه میزبان و سایر میکروب‌ها را توضیح می‌دهند، می‌توانند نقش عملکردی آن‌ها را در بیوتکنولوژی کشاورزی بر اساس ویژگی و شایستگی ژن در شرایط تنش زیستی و غیرزیستی آشکار کنند. ایجاد جوامع میکروبی در گیاهان به سلامت گیاه برای افزایش عملکرد کمک می کند. از فیلاهای باکتریایی غالب، پروتئوباکتری‌ها، فیرمیکوت‌ها، اکتینوباکتری ها، باکتروئیدیت ها و کلروفلکسی و فیلاهای قارچی اسکومیست، بازیدومیست و زیگومایکوتا، اساس درک مفهوم اندوفیت را در مطالعات فعلی و آینده تشکیل می‌دهند و مطالعات آینده با رویکردهای متاومیک فرصت‌های مناسبی را برای کشف، کاوش و ترکیب محصولات زیستی اندوفیت در توسعه کشاورزی سازگار با محیط زیست ایجاد می‌کند. کاربرد محصولات زیستی میکروبی اندوفیت در کمک به تحمل تنش و کنترل بیماری در گیاهان با دیدگاه مبارزه با چالش‌های کشاورزی فعلی برای تولید محصول حائز اهمیت می‌باشد.

کلمات کلیدی: اندوفیت، باکتری های محرک رشد گیاه، قارچ های محرک رشد گیاه

Microbial endophytes and their application in sustainable agriculture

Mehrana Kohi Dehkordi [1*], Abdul Razzaq Danesh Shahraki [2]

[*1] Associate professor, Department of Agricultural Sciences, Payam Noor University, Tehran, Iran, M.kouhi@pnu.ac.ir

[2.] Associate professor, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

Due to the recent advances in microbial ecology, endophytic studies have received more attention. The internal tissue of the plant is a suitable area for the growth of diverse endophytic microbes for the synthesis of phytohormones, metabolic compounds, organic acids, siderophores and hydrolytic enzymes. The mechanisms of endophytic microbes that explain their interaction with the host plant and other microbes can reveal their functional role in agricultural biotechnology based on gene specificity and competence under biotic and abiotic stress conditions. Establishing microbial communities in plants contributes to plant health to increase yield. From the dominant bacterial phyla, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, and Chloroflexia and the fungal phyla Scomyceta, Basidomyceta, and Zygomycota, form the basis of understanding the endophyte concept in current and future studies, and future studies with metaomic approaches provide suitable opportunities to discover Exploration and incorporation of endophyte bioproducts in the development of environmentally friendly agriculture. It is important to provide information about the reality of endophyte microbial biological products in helping to withstand stress and disease control in plants with the view of combating current agricultural challenges for crop production.

Key words: endophyte, growth promoting rhizobacteria

مقدمه

اندوفیت های گیاهی، میکروب‌های درون همزیستی هستند که بخشی از چرخه زندگی خود را در یک میزبان زنده سپری می‌کنند، بدون اینکه هیچ نشانه ای از وجود خود ایجاد کنند [۱]. اندوفیت ها به طور مستقیم و غیرمستقیم تحمل گیاهان میزبان را در برابر شرایط نامطلوب محیطی افزایش می‌دهند. میکروارگانیسم های محرک رشد گیاه (PGPMs[۱۰۵])، که شامل باکتری های محرک رشد گیاه و قارچ های محرک رشد گیاه (PGPFs[۱۰۷])، می‌شوند نیز نقش برجسته ای در رشد گیاه و تحمل به طیف وسیعی از تنش های محیطی ایفا می کنند [۲]. میکروارگانیسم های محرک رشد گیاه دارای پتانسیل کاهش نیتروژن اتمسفر، ارتقاء عملکرد گیاه از طریق تشکیل ای سی سی د آمیناز، آزادسازی سیدروفور، بیوسنتز فیتوهورمون بوده و انحلال فسفر را کاهش می‌دهند. بنابراین، دستیابی به استراتژی‌های اضافی به جز بهبود ژنتیکی گیاهان برای افزایش مقاومت آن‌ها در برابر تنش غیرزیستی ضروری به نظر می‌رسد [۳]. مطالعات متعددی به این موضوع پرداخته‌اند و نیاز به بهره‌گیری از میکروب‌های اندوفیتی را که هم برای گیاهان مفید هستند و هم تأثیر مثبتی بر تعاملات میکروب‌های گیاهی دارند، برجسته می‌کنند. این فعل و انفعالات مطلوب میکروب گیاهی ممکن است به بهترین وجه نیازهای غذایی جهان را تامین کند. در طی این فعل و انفعالات، گیاهان و میکروب‌ها مشارکت‌های سودمندی را تشکیل می‌دهند که به تحمل گیاهان میزبان در برابر چالش‌های مختلف شامل سموم، فلزات سنگین، خشکسالی، نمک، چالش‌های تغذیه‌ای و دمای بالا کمک می‌کنند. امروزه، ظهور کنسرسیوم‌های زیستی هیجان جهانی را برانگیخته است و این پتانسیل را دارد که به یک انقلاب سبز جدید کمک کند [۴].

میزبان های گیاهی اندوفیت‌ها، توزیع آنها در گیاهان و تراکم آنها

اندوفیت ها قادرند به طیف وسیعی از گونه ها و اندام های گیاهی حمله کنند؛ تقریباً تمام گونه‌های گیاهی که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته اند، از جمله محصولات زراعی، محصولات باغبانی، درختان یک ساله و گیاهان دارویی را می‌توانند به عنوان میزبان استفاده نمایند[۵]. از سیستم ریشه‌ای، برگ، ساقه، میوه و دانه بسیاری از گیاهان نیز جمعیت‌های اندوفیت جدا شده است که بسته به جزء گیاهی تفاوت نشان می‌دهد. به عنوان مثال، بیشترین غلظت اندوفیت ها معمولاً در ریشه گیاهان و به دنبال آن ساقه ها و برگ ها یافت می شود. غلظت اندوفیت‌ها در سایر اجزای گیاهی، مانند میوه‌ها، گل‌ها و دانه‌ها، به طور قابل ملاحظه ای کمتر از ساقه ها است. اندوفیت‌ها ممکن است در سایر قسمت‌های گیاه به دلیل تراکم جمعیت کم آن‌ها به سختی شناسایی شوند[۶]. در حالی که برخی ادعا کرده اند که تراکم بالای جمعیت اندوفیت با باکتری های خطرناک مرتبط است، گیاهان سالمی با حداکثر ۱۰۱۰ واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU) اندوفیت در هر گرم بافت یافت شده اند[۷]. نوع گیاهی، تغییرات مرحله رشد میزبان و روش‌های جداسازی مورد استفاده،

[105] Plant growth-promoting microorganisms (PGPMs)
[106] Plant growth-promoting bacteria (PGPBs)
[107] Plant growth promoting fungi (PGPFs)

برخی از عوامل دیگری هستند که بر تراکم اندوفیت تأثیر می گذارند. حتی روش‌های رایج ضدعفونی نمودن سطحی که برای جداسازی میکروب‌های اندوفیت استفاده می‌شود، می‌تواند بر تراکم جمعیت و بازیابی آنها از بافت‌های گیاه میزبان تأثیر بگذارد، زیرا برخی از عواملی که برای استریل کردن سطح گیاهان استفاده می‌شوند می‌توانند به بافت‌های گیاه نفوذ کرده و باعث آسیب به جوامع اندوفیت شوند [۸]. جوامع اندوفیت گیاهی به دلایل مختلف از نظر ساختاری ناهمگن هستند. عوامل مختلفی مانند گیاه میزبان، مرحله رشد، اندام گیاهی، عوامل محیطی، خاک و شیوه های مدیریتی و وجود پاتوژن های گیاهی وجود دارد که الگوی توزیع اندوفیت ها را تعیین می‌کنند.

میزبان گیاه و مرحله رشد آن

جنس گیاه یک عامل شناخته شده است که بر ترکیب جوامع میکروبی اندوفیت تأثیر می گذارد[۹]. علاوه بر این، تفاوت‌های ژنتیکی در گونه‌های یک جنس گیاهی ممکن است ترکیب عامل باکتریایی اندوفیت را تغییر دهد .به عنوان مثال، با کاربرد روش انگشت نگاری T-RFLP و توالی‌های 16S rRNA تغییرات قابل‌توجهی در جمعیت باکتری‌های اندوفیت دو فلفل شیرین مشاهده شد[۱۰].روش هایی که یک میزبان گیاهی می‌تواند بر انواع جوامع اندوفیت تأثیر بگذارد هنوز ناشناخته است و تحقیقات بیشتری برای تفسیر این مکانیسم ها مورد نیاز است[۱۱].

مرحله رشد گیاهان عامل دیگری است که به شدت با جوامع اندوفیت مرتبط است. بر اساس ویژگی های فیزیکی و فیزیولوژیکی، گونه های میکروبی اندوفیت بین گیاهان گندم زمستانه نابالغ و بالغ (*Triticum aestivum*)تفاوت دارند[۱۲]. این اختلافات ناشی از بافت‌های رویشی کوچک‌تر و ضعیف‌تر گیاهان است که باعث تکثیر کمتر اندوفیت در طول زمستان می‌شود .نرخ رشد اندوفیت در داخل بافت های گیاهی در طول تابستان و بهار، زمانی که زیست توده گیاهی به طور فعال در حال گسترش بود، افزایش یافت، و تسلط رقابتی چند گونه اندوفیت موجود در طول زمستان را کاهش داد[۱۳].

اندام های گیاهی

اندام های مختلف در یک گیاه ممکن است گروه های مختلف اندوفیت را حفظ کنند. هنگام استفاده از تجزیه و تحلیل توالی RAPD و ۱۶ S rRNAبرای تعریف جوامع اندوفیت ذرت، مشاهده شد که تنوع پروتئوباکتری ها در ریشه بیشتر از اندام هوایی است. این باکتری ها همچنین در ریزوسفرهای گیاهی یافت شدند که نشان می‌دهد منشا آنها می‌تواند در خاک باشد. این یافته می‌تواند به توضیح اینکه چرا آنها در ریشه ها به وفور بیشتری نسبت به شاخساره‌ها یافت می‌شوند کمک کند. بر اساس جستجوهای بلاست از توالی ای تی اس در پایگاه داده NCBI و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، گزارش شده است که مقدار و ترکیب اندوفیت‌های قارچی در سراسر بافت گیاه تغییر کرده است [۱۴]. ناهماهنگی ترکیب جامعه اندوفیت در بین ریشه‌ها وساقه‌ها اغلب به دلیل واریانس‌های محیطی و بیولوژیکی در بافت‌های گیاهی است. مطالعه دیگری

نشان داد که برگ‌ها و ریشه‌های ارکیده که در معرض سطوح مشابه نور و هوا قرار می‌گیرند، ترکیب جمعیت قارچی اندوفیتی یکسانی دارند[۱۵].

کاربردهای میکروب های اندوفیت در کشاورزی، بیوتکنولوژی و صنعت

برای اطمینان از تولید مواد غذایی کشاورزی پایدار، نیاز به ابداع استراتژی‌های طولانی‌مدت برای پاسخگویی به تقاضای غذای فعلی برای جمعیت رو به رشد و ارائه راه‌حل‌های پایدار برای گرسنگی و نا امنی غذایی وجود دارد. کاربرد محصولات زیستی میکروبی به عنوان محرک رشد در بیوتکنولوژی کشاورزی به عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی کشاورزی در افزایش بهره‌وری محصول امیدوارکننده است [۱۶]. اثرات میکروب‌های اندوفیت بر روی گیاهان میزبان به توانایی آنها برای رشد، استقرار، استعمار و تجمع در گیاهان میزبان از طریق توسعه اندامک‌های سلولی، برای باکتری‌ها و قارچ‌ها (میسلیوم) بستگی دارد. میکروب‌های اندوفیت به طور مستقیم یا غیرمستقیم رشد و سلامت گیاه را از طریق تحریک صفات محرک رشد گیاه، مانند تثبیت نیتروژن، حل شدن فسفات، تولید سیدروفور و آنزیم، سنتز فیتوهورمون، تولید آمونیاک و اگزوپلی ساکارید، فعالیت ACC deaminase و ISR حفظ می‌کنند[۱۷].

کاربرد میکروب های اندوفیت به تحمل تنش در گیاهان

افزایش جمعیت انسانی مستلزم تشدید بیشتر کشاورزی برای حداکثر تولید محصول برای تضمین امنیت غذایی است، با اینحال بسیاری از عوامل مانع از تولید مواد غذایی بیش از حد انتظار می‌شود. عوامل تنش‌زای غیر زیستی مانند دمای بالا، شوری، تنش اکسیداتیو، خشکسالی، فلزات سنگین و تغییرات آب و هوایی، شرایط محیطی رایجی هستند که تهدیدی برای بهره وری محصول و تخریب محیط زیست به شمار می‌روند[۱۸]. بنابراین، ابداع استراتژی‌هایی که گیاه را قادر می‌سازد تا با تنش محیطی متنوع سازگار شود یا مقابله کند، از اهمیت بالایی برخوردار است .باکتری‌ها و قارچ‌های اندوفیت در محیط‌های مختلف سازگار می‌شوند و تحمل تنش غیر زیستی را در گیاهان میزبان ایجاد می‌کنند. از این رو، کاوش در محصولات زیستی آنها می‌تواند یک استراتژی امیدوارکننده در جلوگیری از چالش‌های عملکرد کم محصول ناشی از تنش غیرزیستی باشد. کشف اهمیت بیوتکنولوژیک اندوفیت‌ها می‌تواند برای بهبود تحمل تنش گیاهی و تولید غذای پایدار مفید باشد. جالب توجه است که ترکیبات شیمیایی وسیع تولید شده توسط اندوفیت‌ها به رشد، سازگاری و بقای گیاه در یک محیط پیچیده تحت تنش کمک می‌کند[۱۹]. تلقیح گیاهان با میکروب های اندوفیت مقاوم به تنش که دارای ژن های هورمون رشد هستند به طور قابل توجهی رشد آنها را افزایش می دهد و باعث ایجاد مقاومت در برابر عوامل تنش‌زای غیرزیستی می‌شود [۲۰].

نقش میکروب های اندوفیت در تغذیه، رشد و بهبود عملکرد گیاه

میکروب‌های اندوفیت نقش عمده‌ای در رشد ریشه گیاه برای جذب مواد مغذی از سطح خاک دارند. در یک محیط طبیعی، فراهمی زیستی و جذب بیشتر مواد مغذی ضروری خاک، مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم به رشد و عملکرد گیاه کمک می‌کند. مطالعات متعددی در مورد نقش میکروب های اندوفیت در فراهمی

زیستی، تجمع زیستی و دسترسی به مواد مغذی خاک برای تغذیه گیاه انجام شده است[۲۱]. به عنوان مثال، استفاده از میکروب‌های اندوفیت متنوع به عنوان کاندیدهای امیدوارکننده برای جذب مواد مغذی در خاک‌های محدودکننده مواد مغذی به رشد بسیاری از گیاهان در شرایط آب و هوایی چالش‌برانگیز کمک کرده است. از مکانیسم های مستقیم در حل شدن مواد مغذی، تولید هورمون های گیاهی، تثبیت نیتروژن، بیوسنتز سیدروفور و سایر مکانیسم های غیرمستقیم در حفظ سلامت گیاه استفاده می شود[۲۲]. علاوه بر این مکانیسم‌ها، این میکروب‌ها پتانسیل کاهش اثر تنش غیرزیستی در گیاهان را دارند. با تأکید بر تقویت رشد گیاه توسط میکروب‌های اندوفیت، تغذیه گیاه اساساً به سه روش قابل دستیابی است؛ الف. افزایش در دسترس بودن مواد مغذی خاک، (ب) بازیابی مواد مغذی در خاک، و (ج) افزایش دسترسی گیاه به مواد مغذی خاک. نقش میکروب‌های اندوفیت در جذب فسفر در خاک از طریق تولید اسیدهای آلی و آنزیم های هیدرولیز کننده فسفات برای عملکرد گیاه و بهبود عملکرد محصول اخیراً بررسی شده است[۲۳].

کاربرد بیوتکنولوژی و صنعتی

از نظر بیوتکنولوژیکی باکتری‌های اندوفیت را می‌توان در تولید محصولات کشاورزی به‌عنوان تلقیح زیستی برای حداکثر افزایش بازده و کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد بررسی قرار داده و به کار برد. در پزشکی، محصولات بیولوژیکی طبیعی از باکتری‌های اندوفیت به عنوان منبع آنتی اکسیدان‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌ها در فرمول‌بندی عوامل کنترل زیستی گزارش شده‌اند [۲۴]. پیشرفت بیوتکنولوژیکی و بینش‌های مولکولی در مطالعات اندوفیت نشان‌دهنده طرح‌هایی در بازیابی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین بوده است. در صنایع، ارتباط باکتری‌های اندوفیت در تولید محصولات بیولوژیکی ایمن و مقرون به صرفه گزارش شده است [۲۵]. افزایش هندسی جمعیت انسانی باعث تخریب سیستم‌های زیست محیطی شده است و در نتیجه منجر به چالش‌های مختلف سلامتی می‌شود. یکی از این نمونه ها مقاومت هشداردهنده آنتی بیوتیکی توسط باکتری ها است که نگرانی قابل توجهی در صنایع داروسازی بوده است. تشدید تحقیقات در کشف آنتی بیوتیک ها و محصولات زیستی قوی از باکتری های اندوفیت می تواند به یافتن راه حلی پایدار برای مقاومت آنتی بیوتیکی کمک کند. هرچه، تحقیقات در مورد باکتری‌های اندوفیت در توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید در حال انجام است. بنابراین، ابداع رویکردهای مدرن برای جلوگیری از این کمبود در صنایع داروسازی ضروری به نظر می‌رسد.

قابلیت کنترل بیولوژیکی بیماری های گیاهی از طریق میکروب های اندوفیت

بیش از یک دهه است که استفاده از میکروب های اندوفیت به عنوان عوامل کنترل زیستی به طور فزاینده ای در کشاورزی، پزشکی و صنعت رایج شده است. باکتری ها و قارچ های اندوفیت با ویژگی‌های عملکردی به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیکی در برابر پاتوژن های گیاهی با هدف محافظت و حفظ سلامت گیاه مورد توجه قرار گرفته اند. ویژگی های سرکوب کننده بیماری برخی از میکروب های اندوفیت به طور قابل

توجهی باعث کاهش بیماری زایی گیاه می شود. میکروب‌های اندوفیت از طریق اختلال در موانع ساختاری، سنتز متابولیت‌های فعال زیستی، فیتوالکسین و ترکیبات فنلی، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، آنزیم‌های هیدرولیتیک و الیگوساکاریدها، مکانیسم‌های مختلفی را در کنترل بیماری‌های گیاهی به کار گرفته‌اند[۲۶]. اندوفیت‌هایی که قادر به تولید سیانید هیدروژن، سیدروفورها، آنتی‌بیوز، رقابت برای مواد مغذی با پاتوژن‌های گیاهی، انگلی و شکار هستند، می‌توانند شدت بیماری را در گیاهان کاهش دهند (اصغری و همکاران، ۲۰۲۰غربالگری اندوفیت ها برای تولید هیدروژن سیانید، که اثرات کشنده ای بر پاتوژن های گیاهی دارد نیز در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است[۲۷]. مکانیسم‌های کنترل زیستی قارچ‌های اندوفیت را می‌توان به رقابت آنها برای مواد مغذی، مایکوپرازیتیسم، آنزیم (کیتیناز)، متابولیت و تولید آنتی‌بیوتیک نسبت داد. پتانسیل تولید آنزیم نیز یکی دیگر از ویژگی های کلیدی اندوفیت ها در ارتقای رشد گیاه است. آنزیم های میکروبی با ایجاد اختلال در دیواره سلولی پاتوژن و سرکوب تهاجم گیاه توسط قارچ های بیماری زا در فعالیت هیدرولیتیک شرکت می کنند. کاربرد بیوتکنولوژیک آنزیم‌های میکروب‌های اندوفیت در زمینه‌های متنوعی مانند کشاورزی، زیست‌شناسی مولکولی، داروسازی، مواد شوینده و نساجی و پزشکی قابل توجه بوده است [۲۸].

نتیجه گیری

بهبود تولید مواد غذایی کشاورزی از طریق غنی سازی خاک با تمرکز تحقیقات بر روی میکروب های اندوفیت در تضمین کشاورزی پایدار می‌تواند راهگشا باشد. با توجه به تهدیدات زیست محیطی ناشی از استفاده از کودهای شیمیایی، لازم به نظر می رسد رویکردهای جایگزین و مناسبی در راستای رشد غلات، حبوبات و دانه های روغنی با صرفه اقتصادی در نظر گرفته شود. کاربرد مجزا یا ترکیبی از میکروب‌های اندوفیت به‌عنوان تلقیح زیستی می‌تواند اثر تنش غیرزیستی را بر گیاه بهبود بخشد. غربالگری میکروب‌های اندوفیت در شرایط آزمایشگاهی، برای ویژگی‌های محرک رشد گیاه، مانند تثبیت نیتروژن، فعالیت ACC دآمیناز، تولید سیدروفور، و حل شدن فسفات با موفقیت در آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه مورد بررسی قرار گرفته است. با اینحال درک شیوه زندگی و عملکرد میکروبی اندوفیت‌ها در گیاهان نیازمند بررسی بیشتر است. برای کشف حداکثری منابع زیستی اندوفیت، نیاز به فرمولاسیون زیستی و کود زیستی به عنوان یک اصلاح آلی برای حفظ سلامت گیاه و خاک وجود دارد. تلقیح گیاهان با چالش‌های زیادی مواجه است از این رو، نیاز به درک چگونگی تلقیح، انتقال و تعامل اندوفیت ها با گیاهان از نظر مولکولی اهمیت دارد. تا به امروز، اطلاعات کمی در پایگاه داده در مورد داده های متاژنوم در دسترس است، در حالی که داده های متابولومیکی در مورد میکروب های اندوفیت ثبت شده است. از این رو، درک ویژگی‌های ژنوم میکروب‌های اندوفیت به درک مکانیسم‌های تعامل و متابولیسم آنها برای تغذیه گیاه کمک می‌کند. علاوه بر این، رویکردهای بیوتکنولوژیک مدرن در تحقیقات اندوفیت می‌تواند راهکاری برای جلوگیری از کمبود در صنعت داروسازی به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط برخی عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی

باشد. عوامل ضد میکروبی مشتق از میکروب های اندوفیت می توانند بهترین جایگزین در پزشکی آینده در درمان دیابت، سرطان، تومور و سایر بیماری های مرتبط باشند. با این وجود، یافته های تحقیقاتی در دستیابی به این پدیده علمی هنوز در دست بررسی است و توصیه می‌شود که تحقیقات بیشتری بر روی اندوفیت های مرتبط با گیاهان دارویی متمرکز شود، زیرا ویژگی های ضد میکروبی این گیاهان می تواند به راحتی بر روی میکروب های مرتبط برای توسعه آینده محصولات دارویی استفاده شود.

منابع

1. Suryanarayanan T (2017) Fungal Endophytes: an Eclectic Review. Kavaka 48(1):1–9
2. Dubey A, Malla MA, Kumar A, Dayanandan S, Khan ML (2020) Plants endophytes: unveiling hidden agenda for bioprospecting toward sustainable agriculture. Critical Rev Botechnol 40(8):1210–1231
3. Lata R, Chowdhury S, Gond SK, White JF Jr (2018) Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. Lett Appl Microbiol 66(4):268–76
4. Caruso G, Abdelhamid MT, Kalisz A (2020) Linking endophytic fungi to medicinal plants therapeutic activity. A Case Study on *Asteraceae*. Agriculture 10(7):286
5. Zhou J, Liu Z, Wang S, Li J, Li Y, Chen WK, Wang R (2020) Fungal endophytes promote the accumulation of Amaryllidaceae alkaloids in Lycoris radiata. Environ Microbiol 22(4):1421–34
6. De Souza JT, Silva AC, de Jesus Santos AF, Santos PO, Alves PS, Cruz-Magalhães V, Marbach PA, Loguercio LL (2021) Endophytic bacteria isolated from both healthy and diseased Agave sisalana plants are able to control the bole rot disease. Biol Control 157:104575
7. Vega Hurtado C (2020) Evaluation of the symbiotic relation between endophyte and poplar trees exposed to landfill leachate. Dissertation, Missouri University of Science and Technology
8. Schulz B, Boyle C (2006) What are endophytes? Microbial root endophytes, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg.
9. Chalot M, Puschenreiter M (2021) Exploring plant rhizosphere, phyllosphere and endosphere microbial communities to improve the management of polluted sites. Front Microbiol 12:763566.
10. Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J (2015) Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. Environ Microbiol Rep 7(1):40–50
11. Strobel G (2018) The emergence of endophytic microbes and their biological promise. J Fungi 4(2):57
12. Lugtenberg BJ, Caradus JR, Johnson LJ (2016) Fungal endophytes for sustainable crop production. FEM Microbiol Ecol 92:12.
13. Suryanarayanan T (2017) Fungal Endophytes: an Eclectic Review. Kavaka 48(1):1–9
14. Lugtenberg BJ, Caradus JR, Johnson LJ (2016) Fungal endophytes for sustainable crop production. FEM Microbiol Ecol 92:12.

15. Parthibhan S, Rao MV, Kumar TS (2017) Culturable fungal endophytes in shoots of *Dendrobium aqueum* Lindley–an imperiled orchid. Ecol Gen Genom 3:18–24
16. Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galvan, ´ A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., Bonilla, R., 2017. Azotobacter chroococcum as a potentially usefulbacterial biofertilizer for cotton (Gossypium hirsutum): effect in reducing N fertilization. Rev. Argent. Microbiol. 49, 377–383.
17. Bhutani, N., Maheshwari, R., Kumar, P., Suneja, P. (2021). Bioprospecting of endophytic bacteria from nodules and roots of Vigna radiata, Vigna unguiculata and Cajanus cajan for their potential use as bioinoculants. Plant Gene 28, 100326.
18. Omomowo, O.I., Babalola, O.O. (2021). Constraints and prospects of improving cowpea productivity to ensure food, nutritional security and environmental sustainability. Front. Plant Sci. 12, 751731.
19. Asaf, S., Jan, R., Khan, A.L., Bilal, S., Asif, S., Al-Harrasi, A., Kim, K.-M. (2022). Unraveling the Genome sequence of Plant growth promoting *Aspergillus niger* (CSR3) provides insight into the synthesis of secondary metabolites and its comparative genomics. J. Fungi 8, 107
20. Spence, C., Bais, H. (2015). Role of plant growth regulators as chemical signals in plant–microbe interactions: a double edged sword. Curr. Opin. Plant Biol. 27, 52–58.
21. Batool, S., Asghar, H.N., Shehzad, M.A., Yasin, S., Sohaib, M., Nawaz, F., Akhtar, G., Mubeen, K., Zahir, Z.A., Uzair, M. (2021). Zinc-solubilizing bacteria-mediatedenzymatic and physiological regulations confer zinc biofortification in chickpea (*Cicer arietinum* L.). J. Soil Sci. Plant Nutr. 21, 2456–2471.
22. Faria, P.S.A., de Oliveira Marques, V., Selari, P.J.R.G., Martins, P.F., Silva, F.G., de F´ atima Sales, J. (2021). Multifunctional potential of endophytic bacteria from *Anacardium othonianum* Rizzini in promoting *in vitro* and *ex vitro* plant growth. Microbiol. Res. 242, 126600
23. Etesami, H., Jeong, B.R. (2021). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate–solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant: a review. Front. PlantSci. 12, 1355.
24. Dong, L., Cheng, R., Xiao, L., Wei, F., Wei, G., Xu, J., Wang, Y., Guo, X., Chen, Z., Chen, S. (2018). Diversity and composition of bacterial endophytes among plant parts of *Panax notoginseng*. Chin. Med. 13, 41.
25. Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S.K., White Jr., J.F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. Lett. Appl. Microbiol. 66, 268–276.
26. Orozco-Mosqueda, M.d.C., Rocha-Granados, M.d.C., Glick, B.R., Santoyo, G., 2018. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promotingmechanisms. Microbiol. Res. 208, 25–31
27. Egamberdieva, D., Alimov, J., Shurigin, V., Alaylar, B., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S.D. (2022). Diversity and plant growth-promoting ability of endophytic, halotolerant bacteria associated with *Tetragonia tetragonioides* (Pall.) Kuntze. Plants 11, 49.

28. Castro, P., Parada, R., Corrial, C., Mendoza, L., Cotoras, M. (2022). Endophytic fungi Isolated from *Baccharis linearis* and *Echinopsis chiloensis* with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. J. Fungi. 8, 19

مهندسی پروتئین، فناوری های نوین در ایجاد آنزیم فیتاز پایدار

شیما ربیعی[۱]، بهناز صفار[۲]

[۱] دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، ارشد بیوتکنولوژِی میکروبی

[۲] دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

shima.rabiee@stu.sku.ac.ir

چکیده:

با نقش حیاتی در زنده ماندن و جوانه زنی بذر، میو اینوزیتول(۱،۲،۳،۴،۵،۶) هگزاکی فسفات که معمولا به نام اسید فیتیک شناخته می شود ، جزء اصلی همه ی دانه های گیاهی است که حدود ۶۰ تا ۹۰ درصد کل فسفر را تشکیل می دهد. فیتازها آنزیم هایی هستند که اسید فیتیک را هیدرولیز کرده و فسفر معدنی را در دسترس حیوانات قرار می دهند. فیتازها به طور گسترده در خوراک دام برای افزایش دسترسی به فسفر و کاهش اثر ضد تغذیه ای میو اینوزیتول هگزاکی فسفات استفاده می شوند. اگرچه مقدار نسبتا کم تولید این آنزیم در منشا وحشی، هزینه ی زیاد تولید آنزیم نوترکیب در میزبان های میکروبی و ناپایداری ساختاری مولکولی آنزیم در شرایط مختلف pH و دمای فرآیندهای فرآوری و ساخت، از جمله موانعی است که در حال حاضر در استفاده از فیتازها وجود دارد. در این مقاله نگاهی اجمالی به ویژگی های آنزیم فیتاز به عنوان یک آنزیم پرکاربرد در صنعت تولید خوراک دام داشته ایم و به بررسی ضرورت تولید آنزیم فیتاز با ویژگی های بهبود یافته برای استفاده در کاربردهای صنعتی پرداخته ایم. پیشرفت های اخیر در مهندسی پروتئین، بستری ایده آل برای دستکاری ویژگی های مولکولی پروتئین های نوترکیب فراهم کرده است.

کلمات کلیدی:

فیتاز، فیتیک اسید، فیتات، پایداری حرارتی ، مهندسی پروتئین ، فعالیت ویژه

Protein engineering, new technologies in creating stable phytase enzyme

Shima Rabiee[1] * , Behnaz Safar [2]

۱. Shahrekord University, Faculty of basic sciences , Master of Microbial Biotechnology

۲ . Shahrekord University, Faculty of basic sciences , Genetics department

shima.rabiee@stu.sku.ac.ir

Abstract:

With a critical role in seed survival and germination, myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexaphosphate, commonly known as phytic acid, is the main component of all plant seeds, comprising approximately 60 to 90 percent of total phosphorus. Phytases are enzymes that hydrolyze phytic acid and make inorganic phosphorus available to animals. Phytases are widely used in animal feed to increase phosphorus availability and reduce the anti-nutritional effect of myo-inositol hexaphosphate. Although the relatively low amount of production of this enzyme in wild origin, the high cost of recombinant enzyme production in microbial hosts and the molecular structural instability of the enzyme in different conditions of pH and temperature of the processing and manufacturing processes are among the obstacles that currently exist in the use of phytases. has it. In this article, we have had a brief look at the characteristics of phytase enzyme as a widely used enzyme in the animal feed production industry, and we have investigated the necessity of producing phytase enzyme with improved characteristics for use in industrial applications. Recent advances in protein engineering have provided an ideal platform for manipulating the molecular properties of recombinant proteins.

key words:

Phytase, phytic acid, phytate, thermal stability, protein engineering, specific activity

مقدمه

فیتاز یک اصطلاح عمومی است که برای توصیف آنزیمی استفاده می شود که پیوندهای فسفو مونو استری را از اسید فیتیک (میو اینوزیتول ۴،۵،۶،۱،۲،۳- هگزاکیس دی هیدروژن فسفات)[۱۰۸] هیدرولیز می کند و در نتیجه ارتو فسفات های معدنی را آزاد می کند [1]. حلقه ی میو اینوزیتول حامل شش گروه فسفات و نشان دهنده ی بارمنفی بالا در pH دستگاه گوارش حیوانات تک معده است [2]. فیتاز یک افزودنی مهم برای افزایش زیست دسترسی فسفر و سایر مواد معدنی مغذی در حیوانات تک معده مانند خوک، طیور و ماهی است که اسید فیتیک را به فسفریک اسید و میو اینوزیتول هیدرولیز می کند [3].

حیوانات تک معده قادر به استفاده از فیتات نیستند، زیرا آنها فاقد فعالیت فیتاز هستند یا سطوح پایینی از فعالیت فیتاز در مسیرهای گوارشی خود دارند.. بنابراین، فسفات معدنی اغلب به خوراک آنها اضافه می شود تا رشد مطلوب این حیوانات را تسهیل کند [4]. گنجاندن مقادیر کافی فیتاز در جیره برای حیوانات ساده معده، نیاز به مکمل ارتوفسفات خوراک را کاهش می دهد. در نتیجه، محیط زیست از آلودگی ناشی از رواناب بیش از حد فسفر کود محافظت می شود زیرا دفع فسفات از مدفوع حیوانات تا ۵۰ درصد کاهش می یابد [5]. در طبیعت، فیتات در درجه اول به عنوان کمپلکس های فلز- فیتات با کاتیون های مهم تغذیه ای مانند Ca^{2+}، Zn^{2+} و Fe^{2+} وجود دارد. فیتازها به عنوان یک افزودنی خوراک دام برای بهبود زیست دسترسی فسفات و کاهش اتلاف فسفات و کاتیون های دو ظرفیتی از فیتات استفاده می شوند [4]. پتانسیل فیتازها در بهبود تغذیه ی انسان با مواد معدنی ضروری در غذاهای مشتق شده از گیاه در حال بررسی است. این بررسی بیوشیمی پایه و کاربرد فیتازها را پوشش می دهد و بر بیوتکنولوژی نوظهور مورد استفاده برای توسعه‌ی فیتازهای موثر جدید با خواص بهبود یافته تاکید می کند [6].

پیشینه

از آغاز قرن بیستم، زمانی که فیتازها برای اولین بار کشف شدند، آنها در ارگانیسم های متعددی از جمله گیاهان، میکروارگانیسم ها و حیوانات شناسایی شده اند [7]. سوزوکی و همکاران این آنزیم را در سال ۱۹۰۷ کشف کردند [8]. اولین محصول تجاری فیتاز به نام ناتوفوس[۱۰۹] در سال ۱۹۹۱ عرضه شد. این فیتاز از *آسپرژیلوس نایجر*[۱۱۰] مشتق شد [2].

بیشتر کارهای علمی و صنعتی بر روی فیتازهای میکروبی انجام شده است که ۴۰ درصد کارایی زیستی بیشتری نسبت به فیتازهای مشتق شده از گیاه نشان دادند [2]. اکثر کارهای روشی که روی فیتاز های موجودات انجام شده است، عمدتا روی آن هایی است که از قارچهای رشته ای مثل *آسپرژیلوس فیکوم*[۱۱۱] و

۱.myo-inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexakis dihydrogen phosphate
۱.Natuphos
۲.*Aspergillus niger*
۳.*Aspergillus ficuum*

آسپرژیلوس فومیگاتوس [۱۱۲] و گونه های *کلادوسپوریوم* [۱۱۳] و فیتازهای مخمری مانند *شوانیومیسس اوکسی دنتالیس* [۱۱۴]، *پیچیا آنومالا* [۱۱۵] ، باکتری های گرم مثبت مانند *باسیلوس سابتیلیس* [۱۱۶] و گرم منفی مانند *اشرشیاکلای* [۱۱۷] و باکتری *سودوموناس* [۱۱۸] و گونه های *کلبسیلا* [۱۱۹] منشا می گیرند [8] . دو فیتاز از *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فیکوم* معمولا به عنوان یک افزودنی خوراک در تجارت استفاده می شود [9] . تعدادی از فیتازها نیز در باکتری های مختلف مانند *آئروباکترآئروجنس* [۱۲۰] ، *گونه ی اینتروباکتر* [۱۲۱]، *سیتروباکتر براکی* [۱۲۲]، *اوبسوباکتریوم پروتئوس* [۱۲۳] ، *اروینیا کارلوتورا* [۱۲۴] و *یرسینیا اینترمدیا* [۱۲۵] کلون و بیان شده اند [9,10].

ژن های فیتاز متعددی با موفقیت در چندین میزبان باکتریایی، ذرت تراریخته و خوک ها شبیه سازی شده اند. اشرشیا کلای اغلب به عنوان یک میکروارگانیسم میزبان اولیه برای تولید این آنزیم انتخاب می شود [8]. بررسی فیتازهای خالص شده نشان داد که فیتازهای باکتریایی مثل *اشرشیا کلای*، *سیتروباکتر براکی* و *ابسوم باکتریوم پروتئوس*، فعالیت ویژه ی بالاتری نسبت به فیتازهای گزارش شده نشان می دهند [11].

اهمیت فسفر:

فسفر یک ماده معدنی موجود در طبیعت و دومین ماده معدنی فراوان در بدن انسان است که ۱٪ وزن کل بدن را تشکیل می دهد [12]. فسفر یکی از عناصر ضروری مهم در متابولیسم و رشد سلولی است، اما منابع فسفات نامحلول نمی تواند توسط انسان، حیوانات و گیاهان استفاده شود [3]. فسفر در تشکیل و معدنی شدن ماتریکس آلی استخوان و در رشد عضلات ضروری است [13]. فسفر با توزیع خارج سلولی و درون سلولی به عنوان یک جزء ساختاری استخوان ها و دندان ها و DNA/RNA عمل می کند و دو قطبی غشاهای لیپیدی و لیپو پروتئین های در گردش را امکان پذیر می کند. از نظر متابولیکی، فسفر در مسیرهای حیاتی برای تولید و ذخیره انرژی در پیوندهای فسفات (ATP)، بافر خون، تنظیم رونویسی ژن،

۴.*Aspergillus fumigatus*
۵.*Cladosporium* species
۶.*Schwanniomyces occidentalis*
۷.*Pichia anomala*
۸.*Bacillus subtilis*
۹.*Escherichia coli*
۱۰.*Pesudomonas*
۱۱.*Klebsiella spp*
۱۲. *Aerobacter aerogenes*
۱۳. *Enterobacter sp*
۱۴.*Citrobacter braakii*
۱۵. *Obesumbacterium proteus*
۱۶. *Erwinia carotovora*
۱۷. *Yersinia intermedia*

فعال کردن کاتالیز آنزیم و فعال کردن انتقال سیگنال از مسیرهای تنظیمی که بر انواع عملکرد ارگان‌ها از دفع کلیوی تا سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارد، عمل می‌کند [12].

فیتات[۱۲۶]:

اکثر فسفات موجود در مواد خام گیاهی که به عنوان خوراک حیوانات تک معده استفاده می شود به صورت فیتات، نمک اسید فیتیک میو اینوزیتول هگزاکیس دی هیدروژن فسفات ذخیره می شود [7]. فیتات تقریبا ۷۵-۸۰ درصد کل فسفر دانه های گیاهی را تشکیل می دهد [3]. فیتیک اسید شکل عمده ی ذخیره ی فسفر در غلات، حبوبات، دانه های روغنی و آجیل است [10]. این فسفات به دلیل فقدان فعالیت فیتاز کارآمد در دستگاه گوارش به راحتی در دسترس حیوانات تک معده نیست [7] و غیر نشخوارکنندگان قادر به تجزیه ی اسید فیتیک نیستند [2]. فیتات های بلعیده شده عمدتا دفع می شوند و باعث کمبود تغذیه ای و آلودگی محیطی می شوند [10]. مصرف مقادیر زیادی از غذاهای غنی از فیتات ممکن است باعث کمبود مواد معدنی و مشکلات آلودگی در مناطقی شود که تولیدات دامی فشرده است [9]. بنابراین علاوه بر کاهش زیست دسترسی فسفر، فیتات می تواند کاتیون های ضروری مانند Fe^{2+}، Mg^{2+}، Ca^{2+}، Cu^{2+}و Zn^{2+} را کلات کند که فیتات را به یک جزء ضدمغذی تبدیل می کند [2]. فیتات از طریق اتصال و تشکیل کمپلکس های نامحلول با فلزات مهمی مانند آهن، روی ، منیزیم و کلسیم و همچنین پروتئین ها و ویتامین ها باعث کاهش جذب، هضم و فعالیت های بیولوژیکی آن ها می شود [3].

فیتاز:

فیتاز یعنی میو اینوزیتول هگزاکیس فسفات فسفو هیدرولاز (EC ۳,۱,۳,۸) ، یک افزودنی غذایی مهم برای افزایش زیست دسترسی فسفر و سایر مواد معدنی مغذی در حیوانات تک معده مانند خوک، طیور و ماهی است که اسید فیتیک را به فسفریک اسید و میواینوزیتول هیدرولیز می کند [3]. فیتازها فسفو هیدرولازهایی هستند که حذف تدریجی فسفات از فیتات را آغاز می کنند [6]. فیتازها فیتات را با فسفریلاسیون گام به گام تجزیه می کنند [2]. برای اینکه یک آنزیم فیتاز باشد، باید فعالیت فسفاتاز نشان دهد[1] . فیتاز حداقل یک فسفات از فیتات آزاد می کند [8]. همه فیتازها پروتئین های مونومر هستند، به جز فیتاز B از *آسپرژیلوس نایجر* که یک تترامر است. جرم مولکولی آنزیم ها در محدوده ۳۸-۱۰۰ کیلو دالتون کاملاً متغیر است [4].

منشا فیتاز:

به طور کلی چهار منبع ممکن برای فیتازها وجود دارد: فیتاز گیاهی، فیتاز میکروبی، فیتاز تولید شده توسط مخاط روده ی کوچک و فیتازهای میکروفلورال مرتبط با روده. میکروارگانیسم ها بزرگترین منبع بالقوه ی

1. phytate

فیتاز هستند و بعد ازآن گیاهان در مرتبه ی بعدی قرار می گیرند. باکتری ها و قارچ ها مهم ترین منابع فیتاز میکروبی را تشکیل می دهند. آنزیم های فیتاز از تعدادی از منابع گیاهی مانند گندم، برنج، دانه ی کلزا، سویا، ذرت و چاودار جدا شده اند. فعالیت فیتاز در روده ی کوچک به طور گسترده در گروه ماهیان ثبت شده است. فیتاز های میکرو فلور روده عمدتا در روده ی بزرگ خوک ها مشهود است. فلور باکتریایی تولید کننده ی فیتاز در ناحیه ی پیش روده و روده ی عقبی دستگاه گوارش بسیاری از ماهیان آب شیرین جدا شده است [2].

مزایای استفاده از فیتاز:

ثابت شده است که استفاده از فیتاز به عنوان مکمل خوراک باعث افزایش جذب مواد مغذی و دفع متوسط فسفات تا ۵۰ درصد می شود [16]. امروزه افزایش نگرانی عمومی در مورد تاثیر زیست محیطی سطوح بالای فسفر در مدفوع حیوانات، ضرورت استفاده از فیتاز در رژیم غذایی حیوانات و اهمیت بیولوژیکی فیتاز را ایجاد کرده است [8]. بنابراین فواید فیتاز دو جانبه است: صرفه جویی در منابع فسفر غیرآلی گران قیمت و تجدید ناپذیر با کاهش نیاز به گنجاندن آن در جیره ی غذایی حیوانات و محافظت محیط زیست از آلودگی بیش از حد رواناب فسفر کود [6] .

کاربرد صنعتی فیتازها:

فیتازها با خصوصیات بهبود یافته از منابع مختلف برای کاربردهای صنعتی استفاده شده اند [14]. فیتازها با منشا باکتریایی یا قارچی در صنعت استفاده می شوند. فیتازهای قارچی پایداری حرارتی بالایی دارند اما فعالیت ویژه ی پایینی دارند. فیتازهای باکتریایی در حال حاضر به دلیل فعالیت ویژه ی بالای خود به عنوان اجزای آماده سازی تجاری محبوب تر شده اند. با این حال آن ها در دمای بالاتر از ۷۰ درجه ی سانتی گراد ضعیف هستند که نشان دهنده ی نیاز به اصلاح آن ها است [15]. گاهی برای تولید فیتاز در مقیاس تجاری ، میزبان های قارچی ترجیح داده می شوند زیرا آن ها می توانند تیترهای آنزیمی بالایی تولید کنند و تغییرات پس از ترجمه مانند گیکوزیلاسیون را اعمال کنند که می تواند منجر به پایداری حرارتی به عنوان یک ویژگی مطلوب برای فیتاز شود [2]. با وجود سطح بیان بالا و افزایش فعالیت ویژه ی فیتاز در مخمر، اشرشیا کلای به دلیل رشد سریع، ادغام غیرکروموزومی و کارایی بالای انتقال پلاسمید میزبان ارجح برای این پروتئین است [16]. مخمر پیچیا پاستوریس[۱۲۷] به طور فزاینده ای در ساخت سویه های تولید کننده ی صنعتی استفاده می شود که دارای سیستم قدرتمند بیان ژن و ترشح پروتئین نوترکیب است [15].

۱.*Pichia pastoris*

مزایای اقتصادی استفاده از فیتاز:

فیتاز از منابع میکروبی برای تولید فیتاز در سطح تجاری امیدوارکننده است[9]. فیتازها یک جایگزین مقرون به صرفه برای اطمینان از دستیابی حیوانات به فسفر کافی از جیره های گیاهی هستند، زیرا آنها می توانند فیتات گیاهی را به منبع بسیار ارزشمند فسفر با بهبود زیست دسترسی آن برای تغذیه حیوانات تبدیل کنند [2]. یکی از مهم ترین مسائل در تولید فیتاز چگونگی کاهش بیشتر هزینه هاست. یک رویکرد بهبود سطح بیان فیتاز است، در حالی که روش دیگر انتخاب فیتاز با فعالیت ویژه ی بالاتر است [17].

افزایش پایداری آنزیم فیتاز با روشهای مهندسی پروتئین:

بیشتر فیتازها در برابر حرارت مقاوم نیستند و خوراک دام عموماً در دمای بین ۶۵ تا ۸۰ درجه سانتیگراد پلت می‌شود، از این رو، درصد قابل توجهی از فعالیت فیتاز تحت این شرایط فرآوری از بین می‌رود [16]. تمام آنزیم های خوراک باید در حرارت پایدار باشند تا از کاهش فعالیت قابل توجه در طول این فرآیند جلوگیری شود [6]. گونه های باسیلوس می توانند فیتاز قلیایی مقاوم به حرارت تولید کنند [8]. پایداری حرارتی آنزیم ها موضوع مهمی در کاربرد آنزیم در صنعت است. دما می تواند بر انواع فرآیندهای متابولیکی مانند دناتوره شدن پروتئین، مهار آنزیم، القاء یا مهار تولید متابولیت خاص، مرگ سلولی و غیره تأثیر بگذارد. با توجه به اینکه از فیتازها برای فرآوری کنجاله حیوانی استفاده می شود، تحمل دمای بالاتر برای این آنزیم مزیت محسوب می شود [3].

یکی از ویژگی های مهم فیتاز در کاربردهای عملی، فعالیت ویژه آن است. به دست آوردن سطوح بیان بالا از فیتاز با فعالیت ویژه بالا، راه موثری برای بهبود قدرت تخمیر فیتاز و کاهش هزینه های تولید خواهد بود. بررسی فیتازهای خالص شده نشان داد که فیتازهای باکتریایی مانند *اشریشیا کلای*، *سیتروباکتر براکی* و *ابسوم باکتریوم پروتئوس*، فعالیت ویژه ی بالاتری نسبت به سایر فیتازهای گزارش شده نشان می دهند. فعالیت ویژه ی بالا و هیدرولیز کارآمد برای استفاده در یک فرآیند صنعتی ضروری است [11].

پیشرفت های اخیر در مهندسی پروتئین، بستری ایده آل برای دستکاری ویژگی های مولکولی پروتئین های نوترکیب فراهم کرده است. پیش از این تلاش های متعددی برای این منظور انجام شده است. لمن و همکاران پایداری حرارتی فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* را حدود ۲۰ درجه ی سانتی گراد با استفاده از مقایسه ی توالی پروتئین اولیه ی سیزده فیتاز قارچی افزایش دادند. ون دن بورگ و همکاران نتایج مشابهی را برای *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[۱۲۸]، پروتئاز شبه ترمولیزین[۱۲۹]، با جایگزینی هشت رزیدیوی اسیدآمینه افزایش مقاومت حرارتی تا ۲۱ درجه ی سانتی گراد به دست آوردند. مطالعه ی دیگری بهبود ۲۰ درصدی در تحمل

۱. *Bacillus stearothermophilus*
۲. Thermolysin- like protease

حرارتی فیتاز را با تثبیت برهم کنش های محلی با استفاده از واکنش پلیمراز مستعد خطا[۲] گزارش کرد. وانگ و همکاران از طریق معرفی ۱۰جهش نقطه ای، پایداری حرارتی فیتاز را تا ۷,۵ درجه ی سانتی گراد افزایش دادند و این بهبود را به افزایش محتوای مارپیچ آلفا و سطح آب گریز در دسترس نسبت دادند. افزایش در سایت های گلیکوزیلاسیون نیز با موفقیت برای افزایش تحمل حرارتی فیتاز مورد استفاده قرار گرفت [16]. فیتاز *سیترو باکتر براکی* فعالیت ویژه ی بالاتری نسبت به فیتاز AppA *اشرشیا کلای* نشان داد و هم چنین به پروتئازهای مختلف مانند تریپسین، پپسین و پانکراتین مقاوم بود. اما خاصیت حرارت پذیری آن برای فرآیند پلت سازی خوراک دام، جایی که دمای بالا به طور موقت ممکن است منجر به از دست دادن فعالیت شود، کافی نیست [14].

ساکارومایسز سرویزیه به طور گسترده ای به عنوان ارگانیسم میزبان برای تولید پروتئین های هترولوگ استفاده شده است. بیان هترولوگ در *ساکارومایسز سرویزیه* معمولا منجر به هایپر گلیکوزیلاسون عظیم آنزیم میشود که می تواند بر پایداری حرارتی آن تاثیر بگذارد [14].

مخمر متیلوتروفیک *پیچیا پاستوریس* نیز با موفقیت به عنوان میزبان برای بیان ژن هترولوگ استفاده می شود و سطح بالایی از پروتئین های نوترکیب از جمله فیتاز تولید می کند. بیان آنزیم به عنوان پروتئین ترشحی یکی از ویژگی های مفید و مهم برای تولید اقتصادی آن در صنعت است که *پیچیا پاستوریس* با موفقیت به عنوان ارگانیسم میزبان برای تولید خارج سلولی پروتئین های نوترکیب در سطح بالا از جمله فیتاز استفاده شده است. *پیچیا پاستوریس* می‌تواند در محیط‌های تعریف شده ی ساده رشد کند، به تراکم سلولی بسیار بالایی برسد و غلظت بسیار بالایی از پروتئین درون یا خارج سلولی را تحت کنترل پروموتر *AOX1* انباشته کند. علاوه بر این، *پیچیا پاستوریس*، به عنوان سیستم بیان یوکاریوتی، می تواند پردازش پروتئین، تا کردن و اصلاحات پس از ترجمه را انجام دهد [10]. این مخمر به دلیل توانایی رشد تا تراکم سلولی بسیار بالا، توانایی آن در تولید مقادیر گرم پروتئین نوترکیب در هر لیتر کشت ، هم به صورت درون سلولی و هم به صورت ترشحی و به دلیل در اختیار داشتن پروموتر تنظیمی قوی (P_{AOX1}) *AOX1* یک سیستم تولیدی ارزشمند است [18].

فیتاز های متعلق به خانواده ی HAP با موفقیت به عنوان افزودنی مورد استفاده قرار گرفته اند. اگرچه تولید تجاری فیتازها در حال حاضر بر روی قارچ ها از گونه های آسپرژیلوس متمرکز است، مطالعات فیتازهای باکتریایی به دلیل پایداری در برابر حرارت، ویژگی اختصاصیت بیشتر برای سوبسترا، مقاومت بیشتر در برابر پروتئولیز و کارایی کاتالیزوری بهتر، امیدوارکننده تر نشان داده اند. ویژگی اختصاصیت سوبسترای آنزیم برای جلوگیری از هیدرولیز سایر ترکیبات فسفات بسیار مطلوب است به طوری که برای جذب حیوانات در دسترس باقی می مانند [10].

۲. error-prone polymerase reaction

فیتازها معمولا در معرض دمای بالاتر از ۶۰ درجه ی سانتی گراد در طول فرآیندهای پلت سازی خوراک قرار می گیرند، در حالی که بیشتر فیتازهای نوع وحشی در این مرحله دچار دناتوره شدن حرارتی برگشت ناپذیر می شوند، دمای باز شدن فیتاز را می توان با مهندسی پروتئین افزایش داد. از نظر تئوری ، هر تلاشی برای افزایش تعداد برهم کنش های درون مولکولی ممکن است منجر به کاهش انرژی آزاد کل پروتئین و در نتیجه بهبود پایداری ساختاری مولکول شود. این را می توان از طریق معرفی اسیدهای آمینه ی غیرقطبی از جمله فنیل آلانین، گلایسین، آلانین، پرولین، والین، لوسین، ایزولوسین، متیونین و تریپتوفان به ساختار اولیه پروتئین به دست آورد. تعامل آبگریز بین این رزیدیو ها به طور طبیعی مقاومت پروتئین را در برابر شرایط سخت گرما و PH بهبود می بخشد [16]. چند روش برای افزایش پایداری حرارتی پروتئین وجود دارد: تکامل هدفمند[۱۳۱] (روش های خطای مجاز PCR [۱۳۲]و DNA شافلینگ[۱۳۳]) ، طراحی نیمه منطقی[۱۳۴] (ایجاد توالی اجماع[۱۳۵] ، جهش زایی هدفمند اشباع[۱۳۶]) و طراحی منطقی[۱۳۷] (جهش زایی هدفمند[۱۳۸]) [15] بهبود پایداری حرارتی می تواند در نتیجه ی تغییرات ساختاری جزئی عمومی و موضعی، تثبیت برهم کنش های موضعی یا طولانی مدت و کاهش آنتروپی کلی مولکول باشد. بهبود پایداری ترمودینامیکی یک پروتئین، تفاوت انرژی آزاد بین حالت تا نخورده و تا خورده را افزایش می دهد یا با افزایش اختلاف انرژی آزاد بین حالت تاشده و حالت گذار باز شدن، سرعت باز شدن را کاهش می دهد [16]. عناصر زیر از ساختار فضایی پروتئین، پایداری آن را تعیین می کند: تعداد پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های یونی، درجه تغییر شکل ساختاری و تا شدن هسته آبگریز. این عوامل می توانند تحت تأثیر جایگزینی اسیدهای آمینه واقع در مناطق مهمی از ساختارهای فضایی آنزیم قرار گیرند. جستجوی چنین رزیدیوهای اسید آمینه و مناطق آنزیمی خاص برای افزایش پایداری حرارتی یک کار مهم است [15]. اینها عموما از طریق دو رویکرد اصلی مهندسی پروتئین منطقی انجام می شود که درآن جهش های نقطه ای براساس ترکیب پروتئین پیش بینی شده وارد می شوند و تکامل هدفمند که درآن مجموعه ای از جهش ها در راستای انتخاب جهش یافته های بهبود یافته معرفی می شوند [16].

نتیجه گیری کلی:

فیتازها یکی از پرمصرف ترین افزودنی های خوراکی و غذایی هستند که فواید تغذیه ای، فیزیولوژیکی و زیست محیطی را برای انسان و حیوانات فراهم می کنند . این آنزیم ها برای افزایش ارزش غذایی خوراک و

۱.directed evolution
۲.PCR permissible
۳.DNA shuffling
٤.semirational design
٥.consensus sequences
٦.directed site-saturation mutagenesis
۷.rational design
۸. site-directed mutagenesis

بهبود عملکرد رشد و سلامت حیوانات ضروری هستند و باعث کاهش تقاضا برای فسفر غیرآلی مکمل می شوند. به علاوه افزودن فیتاز به خوراک منجر به دفع کمتر فسفر در کود دامی می شود که به اثرات زیست محیطی کمتر دامداری کمک می کند [2]. افزایش تحمل حرارتی و افزایش فعالیت ویژه دو موضوع مهم نه تنها برای خوراک دام، بلکه برای کاربردهای فرآوری مواد غذایی فیتازها است. از آنجا که فیتازها با خواص مورد نیاز برای کاربردهای فرآوری مواد غذایی تاکنون در طبیعت یافت نشده‌اند، مهندسی پروتئین به منظور بهینه‌سازی ویژگی‌های کاتالیزوری آنها به عنوان یک استراتژی امیدوارکننده دیده می‌شود [5]. بیشتر تحقیقات اخیر در مورد فیتاز بر شناسایی فیتازهای جدید، افزایش تولید فیتاز برای کاهش هزینه ها و بهبود ویژگی های آنزیمی مورد نظر متمرکز شده است [11].

منابع:

1. Mullaney EJ, Ullah AH.(1989). The term phytase comprises several different classes of enzymes. Biochemical and biophysical research communications, 312 (1), 179-184.

2.Naghshbandi MP.(2018).Nanoarmoring of Enzymes with Carbon Nanotubes and Magnetic Nanoparticles. Methods in Enzymology,120-5.

3.Ebrahimian M, Motamedi H, Shafiei M.(2017). Citrobacter farmeri phas32, an isolate from bean (Phaseolus vulgaris) farm soil with high phytase production. Biological Journal of Microorganism ,6 (24),55-65 .

4. Oh B-C, Choi W-C, Park S, Kim Y-O, Oh T-K .(2004). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. Applied Microbiology and Biotechnology, 63 (4), 362-72.

5.Greiner R, Konietzny U. (2006). Phytase for food application. Food Technology & Biotechnology, 44(2.(

6.Lei XG, Porres JM. Phytase enzymology, applications, and biotechnology.(2003). Biotechnology letters ,25(21), 1787-94.

7. Pontoppidan K, Glitsoe V, Guggenbuhl P, Quintana AP, Nunes CS, Pettersson D, et al.(2012). In vitro and in vivo degradation of myo-inositol hexakisphosphate by a phytase from Citrobacter braakii. Archives of animal nutrition ,66 (6),431-44.

8. Saadi MI, Doosti A, Jalali H, Abdolyousefi EN, Hooshiyar M, Tabrizi R, et al.(2021). Cloning of Bacillus subtilis phytase gene construct in Escherichia coli. Iranian Journal of Microbiology ,13(5), 664-70.

9. Kim H-W, Kim Y-O, Lee J-H, Kim K-K, Kim Y-J .(2003). Isolation and characterization of a phytase with improved properties from Citrobacter braakii. Biotechnology Letters, 25(15) , 1231-4.

10. Pal Roy M, Mazumdar D, Dutta S, Saha SP, Ghosh S .(2016). Cloning and expression of phytase appA gene from Shigella sp. CD2 in Pichia pastoris and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in E. coli. PloS one, 11(1), e0145745.

11.Luo H, Huang H, Yang P, Wang Y, Yuan T, Wu N, et al .(2007). A novel phytase appA from Citrobacter amalonaticus CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in Pichia pastoris. Current Microbiology , 55(3), 185-92.

12. Calvo M, Lamberg-Allardt C .(2015). Phosphorus. Advances in Nutrition: An International Review Journal, 6, 860-2.

13.da Silva CA, Callegari MA, Dias CP, Bridi AM, Pierozan CR, Foppa L, et al .(2019). Increasing doses of phytase from Citrobacter braakii in diets with reduced inorganic phosphorus and calcium improve growth performance and lean meat of growing and finishing pigs. PLoS One, 14(5), e0217490.

14.Kim Y-O, Kim H-W, Lee J-H, Kim K-K, Lee S-J .(2006). Molecular cloning of the phytase gene from Citrobacter braakii and its expression in Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology letters, 28(1), 33-8.

15.Gordeeva T, Borshchevskaya L, Kalinina A, Sineoky S, Kashirskaya M, Voronin S .(2019). Increase in thermal stability of phytase from Citrobacter freundii by site-directed saturation mutagenesis. Biotekhnologiya ,34(6), 33-42.

16.Fakhravar A, Hesampour A .(2018). Rational design-based engineering of a thermostable phytase by site-directed mutagenesis. Molecular biology reports, 45(6) , 2053-61.

17. Huang H, Luo H, Yang P, Meng K, Wang Y, Yuan T, et al .(2006). A novel phytase with preferable characteristics from Yersinia intermedia. Biochemical and biophysical research communications ,350(4),884-9.

18.Li C, Lin Y, Zheng X, Pang N, Liao X, Liu X, et al .(2015). Combined strategies for improving expression of Citrobacter amalonaticus phytase in Pichia pastoris. BMC biotechnology,15(1), 1-11.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی اثر قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه *Rhabdociadium aucheri* بر روی قارچ *Candida albicans*

هانیه سرفرازی‌صالح[۱]، رضا حبیبی‌پور[۱*]، محسن رجبی[۲]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی ، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۲. گروه تحقیقات جنگل و مرتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران

*نویسنده مسئول: Habibi.reza@gmail.com

چکیده

قارچ‌ها دسته‌ای جداگانه از یوکاریوت‌ها را تشکیل می‌دهند که نه گیاه هستند و نه جانور. سلسله قارچ‌ها[۱۳۹] که در دیواره یاخته‌های آن‌ها کیتین وجود دارد و توان فتوسنتز ندارند در طبیعت بین موجودات زنده روابط گوناگونی حاکم است، که یکی از این روابط، رابطه‌ی همزیستی می‌باشد. اغلب گیاهان که در اکوسیستم‌های طبیعی مطالعه شده‌اند بوسیله‌ی قارچ‌هایی که علائمی ایجاد نمی‌کنند کلنیزه می‌شوند. د باری (De Bary) برای توصیف این قارچ‌ها اصطلاح اندوفیت را ابداع کرد. قارچ‌های اندوفیت همه جا زی بوده و تقریباً در همه‌ی سلسله‌ی گیاهان و حتی پروتیست‌های گیاه‌مانند یافت شده‌اند. کاندیدا آلبیکانس یک مخمر بیماری‌زا است و معمولاً عامل ایجاد عفونت‌های برفک دهان وعفونت قارچی واژن است. کاندیدا آلبیکانس به صورت گندروی (ساپروفیت) و همزیست بر روی پوست و در دهان، دستگاه گوارش و دستگاه تناسلی می‌روید. این قارچ میکروسکوپی جزو میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده فلور میکروبی بدن است و به‌طور طبیعی به‌صورت هم‌زیستی مسالمت‌آمیز در بدن انسان زندگی می‌کند و بیماری ایجاد نمی‌کند. *از این رو* هدف از این مطالعه بررسی اثر قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه *Rhabdociadium aucheri* بر روی قارچ *Candida albicans* است. جهت بررسی اثر قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه *Rhabdociadium aucheri* بر روی قارچ *Candida albicans* ، در این مطالعه مشاهده ای پس از ایزوله کردن قارچ های اندوفیت به روش اصلاح شده مرتن و استروبل (۱۹۹۵) برروی قارچ بیماری زای *Candida albicans*اثر دهی و سپس درصد بازدارندگی اندازه گیری شد. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد.*در نهایت مشخص شد که کشت متقابل Alternaria rosae K11 در مقابل Candida albicans با میزان۶۷/۵درصد بازدارندگی نشان دهنده بیشترین توان بازدارندگی این اندوفیت در برابر قارچ Candida albicans بوده است.*

کلید واژه‌ها: *اندوفیت، متابولیت ثانویه، قارچ، Rhabdosciadium aucheri، میکروارگانیسم.*

[139] Fungi

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

effect of endophytic fungi isolated from *Rhabdociadium aucheri* on *Candida albicans*

Hanieh Sarfrazi-Saleh[1], Reza Habibipour[1]*, Mohsen Rajabi[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
2 . Forest and Rangeland Agricultural and Natural Resources Research and Education Center , AREEO , Hamedan , Iran

[1]*Responsible author: Habibi.reza@gmail.com

Abstract

Fungi form a separate group of eukaryotes that are neither plants nor animals. The genus of fungi, whose cell walls contain chitin and are unable to photosynthesize, there are various relationships between living organisms in nature, and one of these relationships is symbiotic relationship. Most plants that have been studied in natural ecosystems are colonized by fungi that do not cause symptoms. De Bary coined the term *endophyte* to describe these fungi. *Endophytic fungi* are ubiquitous and have been found in almost all plant orders and even plant-like protists. *Candida albicans* is a pathogenic yeast and is usually the cause of oral thrush and vaginal yeast infections. *Candida albicans* grows as a gondroid (saprophyte) and symbiotically on the skin and in the mouth, digestive tract and reproductive tract. This microscopic fungus is one of the microorganisms that make up the microbial flora of the body and naturally lives in a peaceful coexistence in the human body and does not cause disease. . Therefore, the aim of this study is to investigate the effect of *endophytic* fungi isolated from *Rhabdociadium aucheri* on *Candida albicans*. In order to investigate the effect of *endophytic* fungi isolated from *Rhabdociadium aucheri* on *Candida albicans*, in this study an observation after isolating endophytic fungi by the modified method of Merten and Strobel (1995) on the pathogenic fungus *Candida albicans* and then The inhibition percentage was measured. The experiment was conducted as a randomized complete block design with 3 replications. Data analysis was done with SPSS version 18 software and the comparison of averages was done with Duncan's multi-range test method at the probability level of 5%. Finally, it was determined that the cross-cultivation of *Alternaria rosae K11* against *Candida albicans* with The inhibition rate of 67.5% indicates the highest pregnancy potential of this endophyte against *Candida albicans* fungus.

Keywords: *Endophyte, Secondary metabolite, Fungi, Rhabdosciadium aucheri,Microorganism*

مقدمه

قارچها دسته‌ای جداگانه از یوکاریوت‌ها را تشکیل می‌دهند که نه گیاه هستند و نه جانور. سلسله قارچها[۱۴۰] که در دیواره یاخته‌های آن‌ها کیتین وجود دارد و توان فتوسنتز ندارند. قارچها همگی هتروتروف یا دگرخوار بوده و برای رشد و تکثیر به ترکیبات آلی برای دریافت انرژی و کربن نیاز دارند. قارچها هوازی یا بی‌هوازی اختیاری هستند. اکثر قارچها ساپروتروف بوده، در خاک و آب به سر می‌برند و در این نواحی، بقایای گیاهی و جانوری را تجزیه می‌کنند. . اندوفیت ها میکروارگانیسم هایی هستند که حداقل یک مرحله از چرخه زندگی خود را درون گیاهان بدون ایجاد هرگونه عالئم بیماری سپری می کنند. این میکروارگانیسم ها در قرن ۱۹ شناخته شده اند ولی بررسی قابل توجهی روی آنها صورت نگرفت؛ اما در بیست سال گذشته استعداد و توانایی آنها در حفاظت از گیاه میزبان در برابر آفات و بیمار ی ها شناسایی شده است(باکن[۱] ۲۰۰۰وکوئرین[۲] ۱۸۹۸)اندوفیت ها موجوداتی مثل باکتری ها و قارچ ها هستند که بدون آسیب آشکار و اثرات منفی بر میزبان درون بافت های آن زندگی می کنند. این میکروارگانیسم ها در بسیاری از گونه های گیاهی بررسی شده، یافت شدهاند و به عنوان یک منبع بالقوه برای ترکیبات طبیعی مؤثر جهت استفاده در پزشکی، کشاورزی و صنعت شناخته شده اند (پیمنتل[۳] و همکاران،۲۰۱۱).قارچها مانند باکتری‌ها در تجزیه مواد و گردش عناصر در طبیعت دخالت داشته، حائز اهمیتند (هایبیت[۱۴۱] و همکاران، ۲۰۰۷). بیش از ۳۸ هزار نوع قارچ وجود دارد که بعضی از آن‌ها سمی‌اند و بعضی از آن‌ها قابل خوردن می‌باشند. رنگ، شکل و اندازه قارچها می‌تواند خیلی متنوع و مختلف باشد. سلسله قارچها به دو شاخه قارچهای کاذب و قارچهای حقیقی تقسیم‌بندی می‌شوند. قارچهای حقیقی خود به پنج زیر شاخه تقسیم می‌شوند که عبارتند از: ماستیگومایکوتا، زیگومایکوتا، آسکومایکوتا، بازیدیومایکوتا و دئوترومایست (بلک‌ول[۱۴۲]، ۲۰۱۱). بعضی از قارچها با تثبیت نیتروژن به گیاهان کمک می‌کنند و بعضی دیگر به خاطر داشتن این ویژگی با گیاهان به طور همزیست زندگی می‌کنند (بلک‌ول، ۲۰۱۱). در طبیعت بین موجودات زنده روابط گوناگونی حاکم است، که یکی از این روابط، رابطه‌ی همزیستی می‌باشد. طی این رابطه همواره یکی از دو موجود سود می‌برد، این رابطه شامل حالات، همیاری، انگلی، شکارگری و هم سفرگی می‌باشد. اغلب گیاهان که در اکوسیستم‌های طبیعی مطالعه شده‌اند بوسیله‌ی قارچهایی که علائمی ایجاد نمی‌کنند کلنیزه می‌شوند. د باری(De Bary) برای توصیف این قارچها اصطلاح اندوفیت را ابداع کرد.این اصطلاح به طور معمول، برای هر عاملی که بتواند بافت‌های زنده و داخلی میزبان را کلنیزه کند بدون اینکه علائم قابل مشاهده‌ای ایجاد کند، به کار برده می‌شود. به تازگی یک مطالعه نشان داده است که ۵۱ ٪ مواد فعال بیولوژیکی که از اندوفیت‌های قارچی جدا شده‌اند، پیش از این ناشناخته بودند. از تولیدات طبیعی جدید اندوفیت‌های قارچی، می‌توان ترکیبات با فعالیت‌های ضد باکتریایی را نام برد. بررسی‌ها مشخص کرده است که قارچهای اندوفیت رشته‌ای،

[140] Fungi
[141] Hibbett
[142] Blackwell

متابولیت‌های ثانویه‌ی مهمی را در گیاهان تولید می‌کنند (شکل ۲-۵). این متابولیت‌ها برای کاربرد در صنایع غذایی و دارویی، آنتی‌بیوتیک‌های جدید، ایمنوساپرس‌ها[۱۴۳] و ترکیبات ضد سرطان جداسازی، کشت و خالص سازی شده‌اند (گانز[۱۴۴] و همکاران، ۲۰۰۷). قارچ‌های اندوفیت همه جا زی بوده و تقریباً در همه‌ی سلسله‌ی گیاهان و حتی پروتیست‌های گیاه‌مانند یافت شده‌اند. دو گروه اکولوژیکی از قارچ‌های اندوفیت‌ها تشخیص داده شده‌اند؛ اندوفیت‌های باریک برگ‌ها و اندوفیت‌های گیاهان چوبی. اندوفیت‌های قارچی اغلب شامل *آسکومیست‌ها*[۱۴۵] بوده و تعداد کمی از بازیدیومیست‌ها[۱۴۶]، زیگومیست‌ها[۱۴۷] و ائومیست‌ها[۱۴۸] را شامل می‌شود (ژو[۱۴۹] و همکاران، ۲۰۱۰). کاندیدا آلبیکانس نام علمی: (*Candida albicans*)یک مخمر بیماری‌زا است و معمولاً عامل ایجاد عفونت‌های برفک دهان وعفونت قارچی واژن است. کاندیدا آلبیکانس به صورت گندروی (ساپروفیت) و همزیست بر روی پوست و در دهان، دستگاه گوارش و دستگاه تناسلی می‌روید. این قارچ میکروسکوپی جزو میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده فلور میکروبی بدن است و به‌طور طبیعی به‌صورت هم‌زیستی مسالمت‌آمیز در بدن انسان زندگی می‌کند و بیماری ایجاد نمی‌کند. کاندیدا آلبیکنس به عنوان یک فلور طبیعی در بخشهای مختلف بدن انسان از جمله دستگاه گوارش ، دستگاه ادراری تناسلی و به میزان کمتری پوست زندگی میکند و در شرایطی که فرد دچار ضعف سیستم ایمنی به دلایل مختلف می شود ، به یک پاتوژن فرصت طلب تبدی می گردد. با توجه به این که کاندیدا آلبیکنس یک پاتوژن قارچی یوکاریوت است ، بسیاری از مسیرهای بیولوژیکی آن با انسان مشترک است . از طرفی ، بیشتر داروهای ضد قارچی مورد استفاده دارای اثرات جانبی در دوزهای مورد استفاده می باشند. بنابراین شناسایی داروهای ضد قارچی که اثرات جانبی کمتری بر بدن انسان داشته و سبب از بین رفتن کامل پاتوژن قارچی گردد ، بسیار حائز اهمیت است . این قارچ فرصت طلب می تواند موجب بیماری هایی از قبیل برفک ، واژنیت ، عفونت پوست ، انده کاردیت ، مننژیت ، آبسه مغزی و حتی آرتریت " در میزبان انسانی_شود.

مواد و روش‌ها

ابتدا قارچ‌های اندوفیت گیاه *Rhabdociadium aucheri* از کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان تهیه و برای بررسی‌های بیشتر خالص‌سازی انجام گردید و نهایتاً پنج ایزوله K2 -K23 K21 -K18- K11- قابل دسترس بود (جدول۱). قارچ بیماری‌زای انسانی نیز از انستیتو پاستور ایران تهیه و پس از راستی آزمایی در آزمون ها به کار قرار گرفت. (جدول۲).

[143] immunosuppresor
[144] Gange
[145] Ascomycetes
[146] ***Basidiomecetes***
[147] ***Zygomecetes***
[148] ***Oomecetes***
[149] Zhou

جهت درست کردن محیط کشت PDA ابتدا مقدار۴۰ گرم از پودر PDA را در ۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس آن را بروری هیتر قرار داده تا گرم شده و محلول مورد نظر بدست آید .(ترجیحا اول پودر داخل شیشه مورد نظر ریخته شده و از مگنت جهت حل شدن بهتر استفاده شود). بعد از حل شدن کامل، محیطهای کشت مورد استفاده به منظور استریل شدن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد و در فشار ۵ اتمسفر، اتوکلاوگردیدند تا کامل استریل شود سپس زیر هود را ضدعفونی کرده و ظرف حاوی محلول محیط کشت پتری دیش ها در معرض تابش UV قرار گرفتند. بعد از سرد شدن محلول، داخل پتری دیش ها ریخته شد. سپس محیط های کشت بدست آمده در یخچال ۴ درجه سانتیگراد بصورت برعکس قرار گرفت، تا قطرات حاصل از بخار آب در روی آنها ریخته نشود، در مرحله ی بعد قارچ های اندوفیت که شامل (K2 -K23 -K11 -K18- K21)هستند بر روی محیط کشت های تهیه شده کشت گردید؛ جهت کشت ابتدا لوپ را بروی شعله داغ کرده و و قسمتی از قارچ های رشد کرده از گیاه را برش داده و بر روی محیط کشت جدید قرار گرفت، در این محله باید توجه داشت که قسمت پرز مانند و رشته ای قارچ ها به سمت پایین و به سمت محیط کشت قرار گیرد تا با تماس هاگ ها و میسیلیوم های رویشی با محیط کشت جدید رشد قارچ در محیط جدید صورت گیرد. در ادامه به علت کند رشد بودن قارچ های اندوفیت به مدت حدود ۷روز در انکوباتور با دمای۲۷±۲ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا به رشد مطلوب و به حدود رشدی با شعاع ۳ سانتی متر برسند (شکوهی، ۱۳۹۱). برای کشت متقابل اندوفیت ها با قارچ *Candida albicans* بر اساس آزمون مرتن و استروبل(۱۹۹۵) در یک طرف پیلیت ۹ سانتی متری دارای محیط کشت PDA ،یک قطعه به قطر ۳ میلی متر از کشت فعال گونه های اندوفیت قرار داده شد و در سمت مقابل آن به فاصله۳ سا نتی متر قارچ *Candida albicans* کشت گردید و بعد مدت ۷ روز در انکوباتور در دمای ۲۷±۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد و اثر آنتاگونیستی قارچ های اندوفیت دربرابر قارچ *Candida albicans* بررسی و مشاهده گردید و نتایج بدست آمده به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ انجام وجمع آوری شد.

جدول ۱: مشخصات ایزوله‌های اندوفیتی

کد ایزوله قارچی	کدآزمایشگاه	میزبان	گونه	منطقه جغرافیایی
K2	$EMR_1(2)$	*Rhabdociadium aucheri*	*Alternaria radicina strain 2*	امامزاده کوه (محسن)
K23	$PR_3(3)$	*Rhabdociadium aucheri*	*Paraphoma radicana*	پیست اسکی (تاریکدره)
K11	PSS1(1)	*Rhabdociadium aucheri*	*Alternaria rosae*	پیست اسکی (تاریکدره)
K18	$DR_1(1)$	*Rhabdociadium aucheri*	*Alternaria radicina*	دره مرادبیگ
K21	$DB_1(3)$	*Rhabdociadium aucheri*	*Alternaria radicina strain 2*	دره مرادبیگ

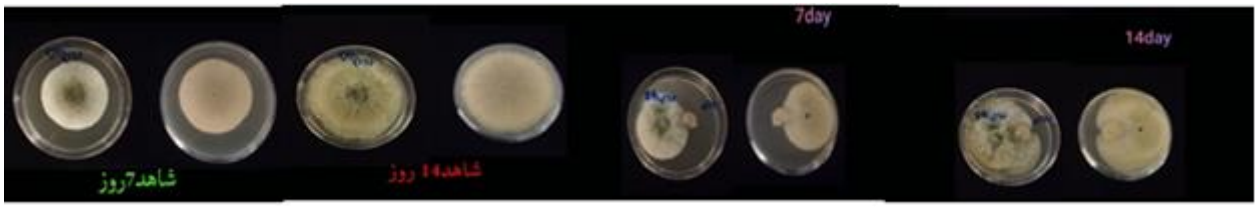
جدول ۲: مشخصات قارچ بیماری‌زای انسانی

قارچ بیماری‌زای انسانی	PFCC NO	Other Collection No
Candida_albicans	*(89-3003)*	-

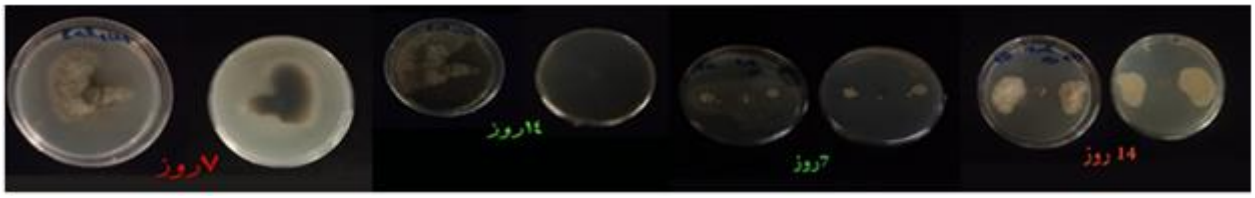
بحث ونتایج

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ ٪ نشان داد، قارچ‌های اندوفیت بر روی قارچ *Candida albicans* اثر معنی‌داری دارند. مقایسه میانگین اثر قارچ‌های اندوفیت گیاه *Rhabdosciadium aucheri* بر روی قارچ *Candida albicans* مورد مطالعه نشان داد کشت متقابل *Alternaria radicina strain 2K21* در مقابل *Candida albicans* با میزان ۱۴میلی متر نشان دهنده بیشترین توان رشد این اندوفیت دربرابر قارچ *Candida albicans* را داشته و همچنین کشت متقابل Alternaria radicina strain 2K2 *درمقابل Candida albicans با میزان۴میلی متر نشان دهنده کمترین توان رشداین اندوفیت برابر قارچ Candida albicans داشته است.(شکل۳،۲،۱). کشت متقابل Alternaria rosae K11 درمقابل Candida albicans با میزان۶۷/۵درصد بازدارندگی نشان دهنده بیشترین توان بازدارندگی این اندوفیت در برابر قارچ Candida albicans را داشته و همچنین کشت متقابل Alternaria radicina strain 2K2 در مقابل Candida albicans با میزان ۱۳/۸درصد بازدارندگی نشان دهنده کمترین توان بازدارندگی این اندوفیت در برابر قارچ C Candida albicans را داشته است.(نمودار۱)*.نتایج پژوهش های مشابه محققان دیگر در گیاهان متفاوت در رابطه با بیوکنترل ها نشان داده است که قارچ های اندوفیت دارای پتانسیل ویژهای در بازدارندگی قارچ *albicans Candida* دارد به عنوان مثال‌که جهت بررسی اثر بازدارندگی اندوفیت‌های قارچی سرو بر روی *کاندیدا آلبیکنس* صورت گرفت مشاهده شد اثرات ضدقارچی اندوفیت های قارچی سرو کشت برهم نهی (*CSE32*)و تریکودرما آتروویریده (*JCE33*) به ترتیب با ۲۴ و ۲۳ درصد بیشترین اثر پلیت تریکودرما کنینجی بازدارندگی از رشد را روی کاندیدا آلبیکنس داشته اند (عرفاندوست،۱۳۹۵). این نتایج نشان دهنده این است که اندوفیت‌های گیاهان مختلف از جمله سرو، *Rhabdociadium aucheri* و مفراح و قارچ‌های گونه *تریکودرمای* و قارچ‌های گونه‌ی خاصیت بازدارندگی از رشد *کاندیدا آلبیکنس* را دارد. احتمالا علت تاثیرگذاری ۵۸/۳ درصد *Alternaria rosae K11* بر روی قارچ های بیماری‌زا به علت بیشتر بودن سرعت رشد، خاصیت مایکوپارازیتسیم و متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. در پژوهشی مشابه دیگر که تحت عنوان تاثیر همزیستی قارچ اندوفیت بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه گوجه فرنگی تحت تنش شوری ده روزه صورت گرفت نتایجش نشان می‌دهد همزیستی قارچ *اندوفیت پریفورموسپورا ایندیکا* می‌تواند باعث کاهش اثرات سمی شوری از طریق بهبود فتوسنتز و شرایط آبی گیاه شود (قربانی،۱۳۹۷). مطالعه ای دیگری تحت عنوان فعالیت ضد قارچی عصاره ی گیاهان علیه گونه های

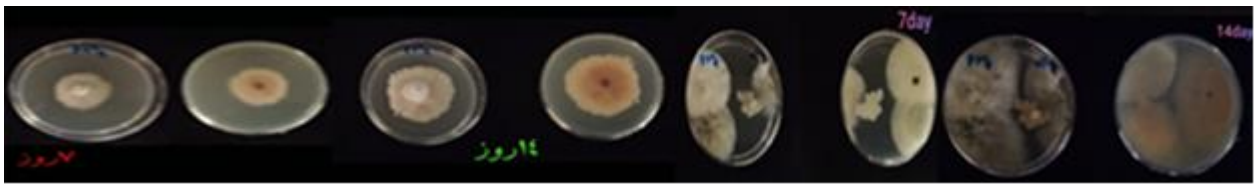
کاندیدای ناشی از عوارض دهانی را مورد بررسی قرار دادند . فعالیت ضد قارچی برای *Syzygium jambolanum Caulerpa scalpelliformis , Cassia siamea Sargassum wightii* مشاهده شد . یعنی گیاهان مورد بررسی فعالیت ضدقارچی مناسبی در مقابل قارچ کاندیدا از خود نشان دادند. (Prabhakar et al.,2008)



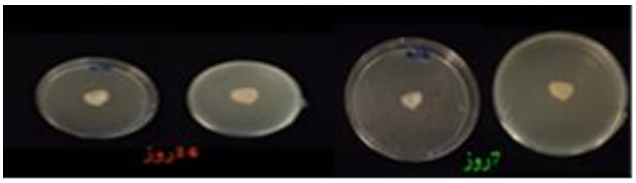
شکل ۱-کشت شاهد ۷و ۱۴ روز قارچ *Alternaria radicina strain 2K21* الف)کشت متقابل *K21* بروی قارچ *Candida albicans* ۷روز سمت چپ –ب) کشت ۱۴ روز سمت راست



شکل ۲-کشت شاهد ۷و ۱۴ روز قارچ *Alternaria radicina strain 2K2* الف)کشت متقابل *K2* بروی قارچ *Candida albicans* ۷روز سمت چپ –ب) کشت ۱۴ روز سمت راست

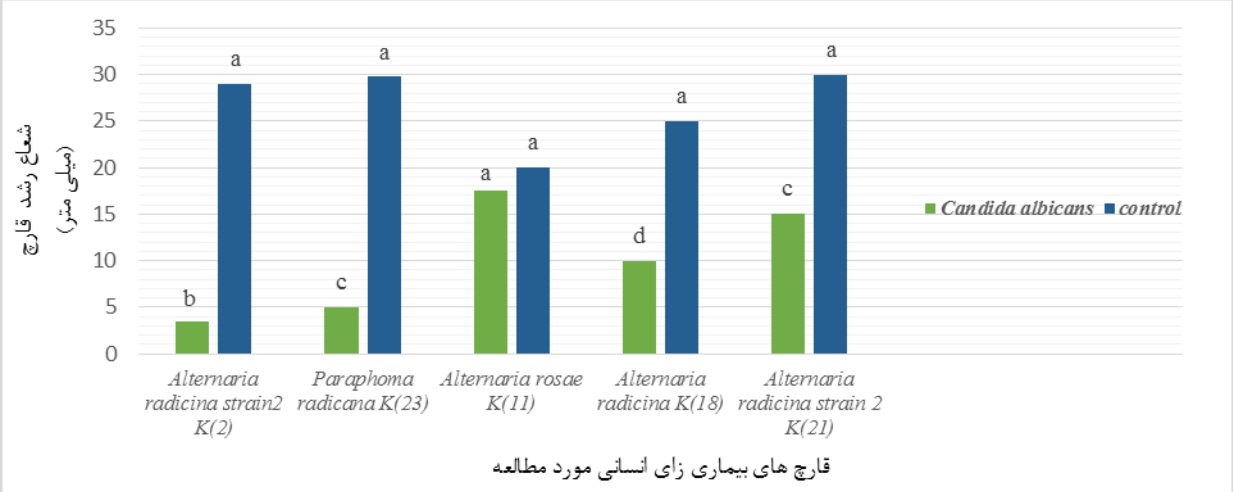


شکل ۳ -کشت شاهد ۷و ۱۴ روز قارچ *Alternaria rosae K11* الف)کشت متقابل *K11* بروی قارچ *Candida albicans* ۷روز سمت چپ –ب) کشت ۱۴ روز سمت راست



شکل۴-کشت شاهد قارچ *Candida albicans* الف) سمت چپ۷روز- ب) سمت راست ۱۴ روز

نمودار ۱. مقایسه میانگین اثر قارچ های اندوفیت جدا شده از *Rabdociadium aucheri* بر روی قارچ*Candida glabrata* مورد مطالعه



نتیجه‌گیری نهایی:

نتایج کلی نشان داد کشت متقابل Alternaria rosae K11 در مقابل Candida glabrata با میزان۶۷/۵درصد بازدارندگی نشان دهنده بیشترین توان بازدارندگی این اندوفیت در برابر قارچ Candida albicans بوده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خویش را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان اعلام می دارند.

منابع

- شکوهی، مینا. ج داسازی و شناسایی قارچ های اندوفیت، دانشگاه بوعلی سینا همدان ،۱۳۹۱.
- عرفان دوست رویا ، بررسی اثرات زیستی اندوفیت های قارچی سرو بر روی برخی قارچ های بیماری زای انسان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان،۱۳۹۵
- قربانی ابوذر، رضوی سید مهدی ، قاسمی ولی الله، پیر دشتی همت الله، تاثیر همزیستی قارچ اندوفیت بر برخی شاخص های فیزیولوژیک گیاه گوجه فرنگی تحت تنش شوری ۱۰ روزه، فصلنامه فرآیند و کارکرد گیاهی، سال هفتم شماره ۲۷ (آذر و دی ۱۳۹۷)

- Bacon, C.W., and White, J.F. 2000. Microbial Endophytes. Marcel Deker Inc., New York.
- Bacon, C. W. and Hill, N. S. (1996). "Neotyphodium/Grass Interactions". Plenum Press, New York 112: 258-325.
- Pimentel, M.R., Molina, G., Dionísio, A.P., Maróstica Junior, M.R., Pastore, G.M. 2011. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. Biotechnology Research International; 11: 1-11. http://doi.org/10.4061/2011/576286.
- *K. Prabhakar, L. Sathish Kumar, S. Rajendran, M. Chandrasekaran, K. Bhaskar, and A. K. Sajit Khan, Antifungal Activity of Plant Extracts against Candida Species from Oral Lesions, Received 2006 May 30; Revised 2008 May 26; Accepted 2008 Dec 10. www.10.4103/0250-474X.49128 .Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008 Nov-Dec; 70(6): 801–803.*
- Zhu D, Wang J, Zeng Q, Zhang Z & Yan R (2010) A novel endophytic Huperzine A-producing fungus, Shiraia sp. Slf14, isolated from Huperzia serrata. Journal of applied microbiology 109: 1469-1478.

سنجش میزان بیان LncRNA UCA1 به عنوان بیومارکرهای تشخیصی سرطان پستان

فاطمه مومنی‌مقدم[1]، حسینعلی ساسان*[2]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید با هنر کرمان

۲-بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

حسینعلی ساسان* hsasa@uk.ac.ir

چکیده:

سرطان پستان بیشترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان در کل جهان است. بنابراین شناسایی روش‌ها و نشانگرهای زیستی جدید برای درمان سرطان پستان ضروری است. هدف از انجام این پژوهش بررسی بیان LncRNA UCA1 سرطان زا در نمونه خون بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌باشد. در این مطالعه نمونه خون از ۳۰ زن سالم و ۳۰ زن بیمار مبتلا به سرطان پستان جمع آوری شد واستخراج اگزوزوم از خون انجام گردید و سپس استخراج RNA انجام شد و در آخر cDNA سنتز شد. تکنیک Real-Time PCR برای اندازه گیری سطح بیان Lnc RNA UCA1 صورت گرفت. میزان بیان Lnc RNA UCA1 با P.Value برابر با 0.0001 در نمونه خون بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش معنی دار داشته است..افزایش بیان Lnc RNA ها می‌تواند بیومارکرهای مناسبی برای تشخیص و حتی برای درمان سرطان پستان در آینده باشند.

واژگان کلیدی: Real Time PCR، Lnc RNAهای سرطان‌زا، سرطان پستان.

Abstract:

Breast cancer is the leading cause of cancer deaths among women worldwide. Therefore, it is necessary to identify new methods and biomarkers for breast cancer treatment. The purpose of this research is to investigate the expression of one carcinogenic LncRNA in blood exosome samples of breast cancer patients. In this study, blood samples were collected from 30 healthy women and 30 women with breast cancer, then RNA was extracted and cDNA was synthesized. Real-time PCR technique was used to measure the expression level of UCA1 Lnc RNAs. The expression level of Lnc RNA UCA1 with P.Value equal to 0.0001 has significantly increased in the blood samples of patients with breast cancer. The increase in the expression of Lnc RNAs can be suitable biomarkers for the diagnosis and even for the treatment of breast cancer in the future.

Keywords: Real-time PCR, Oncogenic lncRNAUCA1, Breast cancer,

مقدمه

سرطان پستان شایعترین سرطان و همچنین اصلی ترین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان سراسر جهان است. حدود ۱,۳۸ میلیون مورد جدید سرطان پستان در سال ۲۰۰۸ تشخیص داده شد که تقریبا ٪۵۰ از کل بیماران مبتلا به سرطان سینه و حدود 60٪ از مجموع مرگ و میر مربوط به کشورهای در حال توسعه بود. سرطان پستان 21.4 ٪ از سرطان‌های بدخیم را در میان زنان ایران شامل می‌شود. یک مطالعه در تهران نشان داد که سرطان پستان 25 ٪ کل سرطان‌های مربوط به زنان ایران را در بر می‌گیرد که معادل با ابتلای 22.4 نفر در هر صد هزار نفر زن می‌باشد.در ایران توجه به بیماری سرطان پستان بسیار حائز اهمیت است زیرا نسبت به کشورهای پیشرفته زنان جوانتری را درگیر می‌کند [1]. به دلیل کم کاری در غربالگری سازمان دهی شده و هم چنین کمبود برنامه آموزشی جهت تشخیص اولیه وبه موقع سرطان پستان در ایران، حدود 70 ٪ زنان ایرانی در مراحل خطرناکی از این بیماری تشخیص داده می‌شوند.

مطالعات جمع آوری شده نشان داده‌اند که UCA1 در سرطان‌های مختلف به شدت بیان می‌شود و تنظیم مثبت آن عملکردهای سلولی مانند تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم را که ارتباط نزدیکی با پیش‌آگهی بیماران دارد، ارتقا می‌دهد. Urothelial carcinoma-associated 1 (UCA1) یک lncRNA با سه اگزون است که یک ایزوفرم 1.4kb و یک ایزوفرم 2.2kb را کد می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که ایزوفرم UCA11.4kbبه عنوان یک انکوژن در سرطان پستان عمل می‌کند. به طوری که UCA1 با hnRNPI رقابت می کند و با سرکوب سطح پروتئین p27، منجر به افزایش رشد تومور پستان می‌شود.UCA1 یک lncRNA انکوژنیک در سرطان پستان است که باعث افزایش تهاجم به سلول‌های سرطان پستان میشود [2]. هدف اصلی این پژوهش اندازه گیری تغییرات سطح بیان Lnc RNA نوع UCA1 در افراد سالم و مبتلا به سرطان پستان میباشد که می تواند به عنوان یک بیومارکر احتمالی پیش تشخیصی سرطان پستان استفاده شود.

مواد و روشها:

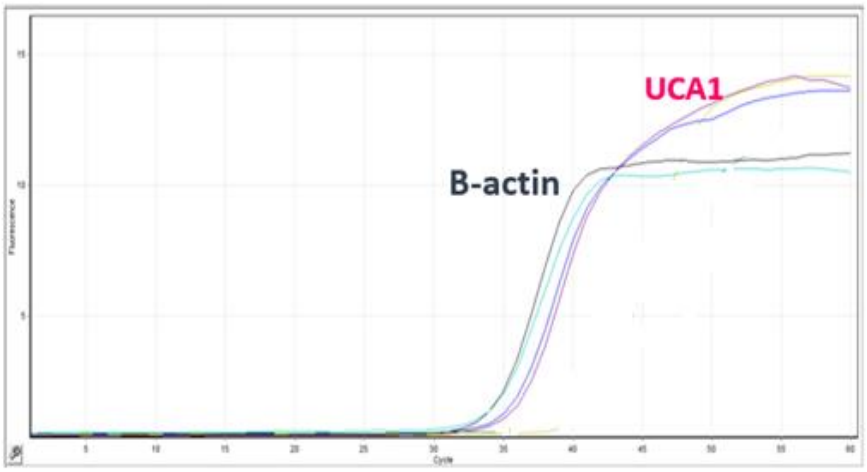
نمونه گیری: برای نمونه گیری از ۳۰ خانم مبتلا به سرطان پستان که بالاتر از ۲۵ سال سن داشتند و هیچ گونه درمانی اعم از شیمی درمانی و رادیو تراپی و به علاوه هیچ گونه جراحی پستان روی آنها صورت نگرفته بود، به میزان ۸ میلی لیتر خون گرفته شد. نمونه گیری از بیمارستان‌های فرمانیه و سینا در تهران صورت گرفت . نمونه های خون تازه در لوله‌های جمع آوری خون CLOT-ACTIVATOR ژل دار جمع اوری و سپس برای جداسازی سرم به انستیتو پاستور منتقل شدند. **ملاحظات اخلاقی:** یک گام مهم جهت رعایت موازین اخلاقی در تحقیقاتی همچون این تحقیق داشتن رضایت تک تک افراد اعم از سالم و بیمار می‌باشد.

در این پژوهش به تمامی افراد فرم رضایت نامه جهت گرفتن نمونه خون از آنها داده شد. **استخراجRNA :** برای اسخراج کل RNA از کیت های شرکت زاور زیست آزما استفاده شد. نمونه های استخراج شده در میزان ۳۰ میکرولیتر DEPC Water حل و در دمای 20°C- نگهداری شدند. کمیت و کیفیت RNA خالص شده با دستگاه نانودراپ سنجیده شده و نمونه های با غلظت بالاتر ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر انتخاب شدند.

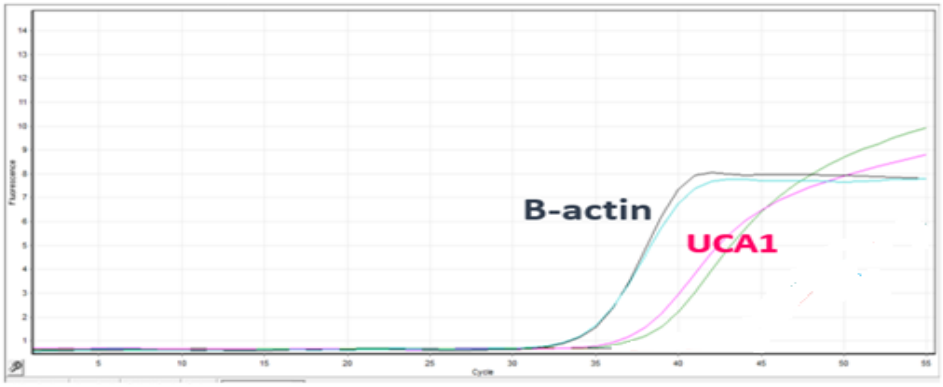
طراحی پرایمرها: با استفاده از سایت NCBI ردیف ژن *β-ACTIN* به عنوان کنترل و ردیف ژن UCA1 به عنوان ژن هدف اخذ و آغازگرهای واتسون و کریک در آزمایشگاه با عناوین **actinC:** actinW and **actinW: 5'-ctcttccagccttccttcct-3'; actinC:5'-agcactctgttggcgtacag-3'** و آغازگرهای جلوبرنده ژن هدف با عناوین UF and UR ، **UR:5'-ttgtccccattttccatcat-,UF: 5'-tttgccagcctcagcttaat-3';** **3'** طراحی و از شرکت شرکت متابیون آلمان با OD بین ۲ تا ۴ خریداری شدند. **ساخت cDNA و Real:** **Time PCR** ساخت cDNA با استفاده از کیت SMOBIO و دستور العمل داده شده و سپس با برنامه دمایی 50 دقیقه در 50°C و ۵ دقیقه در دمای 80°C انجام شد. آزمایش Real Time PCR با استفاده از کیت AMPLICON شامل آب مقطر 7.5µl، پرایمر جلوبرنده (100µM) یک میکرولیتر، پرایمر برگشت (100µM) یک میکرولیتر، cDNA نیم میکرولیتر و مسترمیکس Mastermix به میزان 10µl با حجم کلی هر تیوب 20 میکرولیتر و با استفاده از یک برنامه زمانی- دمایی 15 دقیقه در 95°C ، 20 ثانیه در 95°C، 30 ثانیه در 55°C، 20 ثانیه در 72°C و 30 دور انجام شد. **نرم افزارهای آنالیز آماری:** بررسی داده‌ها توسط نرم افزارهایLinRegPCR ، Excel و SPSS انجام شد. با استفاده ازLinRegPCR میزان کارایی پرایمر محاسبه شد. توسط Excel میزان CT مقایسه‌ای محاسبه شد و جهت رسم نمودارها و بررسی معنادار بودن عوامل مختلف موثر بر بیان از نرم افزار SPSS استفاده شد. سطح معناداری در نرم افزار SPSS کمتر از 0.05 در نظر گرفته شد.

نتایج : تعیین نسبت ژنی در نمونه‌های کنترل و آزمایش

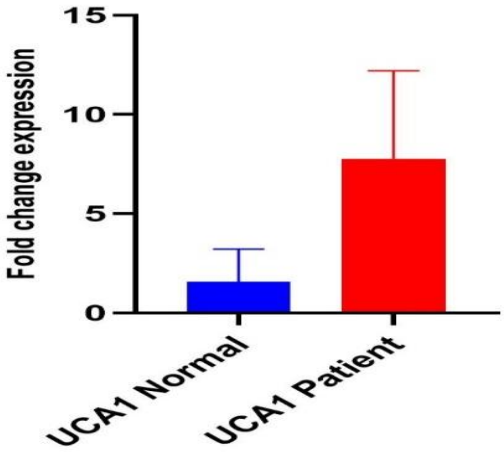
تست‌های Real Time PCR برای نمونه‌های آزمایشی نسبت به ژن مرجع انجام شد. شکل یک بیان ژن Lnc RNAUCA1 و ژن کنترل داخلیβ-actin در یک فردبیمار سالم را نشان می دهد. شکل ۲ نتیجه آزمایش Realtime RTPCR ژن Lnc RNAUCA1 را در یک فرد مبتلا به سرطان پستان و ژن کنترل داخلی β-actin را نشان می دهد. شکل شماره ۳ میزان تفاوت معنی دار بیان این ژن در افراد مبتلا به سرطان و افراد سالم را نشان می دهد. نتایج Real Time PCR میزان بیان LncRNAUCA1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به افراد سالمP Value =0.0001، افزایش معنی داری با توجه به شکل شماره ۳ داشته است.



شکل یک: میزان بیان ژن‌های Lnc RNA سرطان زا در یک فرد سالم



شکل۲: میزان بیان ژن‌های Lnc RNA سرطان زا در یک فرد مبتلا به سرطان پستان



شکل شماره ۳: نمودار قرمز(بزرگتر) میزان بیان Lnc RNA UCA1 در افراد مبتلا به سرطان پستان و نمودار کمتر – آبی- میزان بیانLnc RNA UCA1 در هراد سالم را نشان می دهد.

در حال حاضر، سرطان پستان با استفاده از معاینات جسمی و تصاویر حاصل از تکنیک‌هایی از جمله ماموگرافی و سی تی اسکن تشخیص داده میشود. با این وجود تکنیک‌های تصویر برداری موجود حساسیت کافی برای آشکار نمودن توده‌های کوچک و در مراحل اولیه بیماری را ندارند. همچنین ناهمگونی بالای تومورهای پستانی و در برخی موارد نیز شباهت بالای تومورهای بدخیم و خوشخیم، تشخیص به موقع تومورهای بدخیم و طبقه بندی مناسب آن‌ها را با مشکل مواجه کرده است و بنابراین تعیین درمان مناسب برای هر بیمار نیز با مشکل مواجه می‌شود. در نتیجه، تلاش برای شناسایی مارکرهای مولکولی اختصاصی جهت تشخیص زودهنگام و افتراقی تومورهای پستانی و انتخاب روش درمانی مناسبتر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. به عبارتی جستجوی مارکرهای مولکولی که بتوانند به تشخیص این سرطان در مراحل اولیه پیشروی، درک بهتری از رفتار سلول‌های سرطانی و در نهایت انتخاب بهترین روش درمانی برای هر بیمار کمک کنند بسیار حائز اهمیت است. .نتایج حاصل از مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند کهlncRNA ها ممکن است نقش‌های عملکردی در سرطان زایی و رشد سرطان ایفا کنند و بنابراینlncRNA های عملکردی می‌توانند برای تشخیص سرطان و یا پیش اگهی و یا به عنوان اهداف درمانی مورد استفاده قرار گیرند[3,4].

در چند دهه گذشته، lncRNA ها سابقه طولانی را تجربه کرده اند، از آنکه بعنوان غیرکارآمد در نظر گرفته شدند تا اینکه به عنوان یک عامل مهم در پیشرفت انواع تومورهای بدخیم در نظر گرفته شدند، توجه زیادی را از چندین مورد به خود جلب کردند. بسیاری از محققان پژوهش‌های خود را بر روی نحوه عملکرد و تاثیر lncRNAها در سرطان پستان انجام دادند[4,5].. یک علت شایع مرگ در اثر سرطان با یک پیش آگهی بسیار ضعیف است. از آنجا کهlncRNA ها، یک کلاس جدید ازRNA های نظارتی هستند و همچنین در زیست شناسی سرطان نقش دارند، در اینجا نقش احتمالی آنها به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی و

پیش آگهی یا اهداف درمانی در سرطان پستان بررسی شده است. با توسعه اپی ژنتیک، lncRNAs که یک کلاس از ncRNA که اخیراً یافت شده است، در ایجاد تومور و بروز سرطان نقش داشته است. اگرچه مجموعه‌ای ازlncRNA ها با پیشرفت سرطان در ارتباط هستند، مشخصات بیان و اهمیت پیش آگهی lncRNAدر سرطان پستان به دلیل کمبود نمونه‌های موجود و اطلاعات پیش آگهی سرطان پستان به طور سیستماتیک مورد بررسی قرار نگرفته است[5,6,7].

در تحقیق حاضر نیز طبق نتایج بدست آمده مشخص شد که میزان بیان Lnc RNA UCA1 در خون بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به خون افراد سالم افزایش دارد. این یافته می تواند در صورت مطالعات تکمیلی به عنوان یک مارکر هشدار دهنده پیش تشخیصی در شناسایی افراد مبتلا به سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Bidgoli SA, Ahmadi R, Zavarhei MD. Role of hormonal and environmental factors on early incidence of breast cancer in Iran. Science of the total environment. 2010;408(19):4056-61.

2. Zhang K, Luo Z, Zhang Y, Song X, Zhang L, Wu L, et al. Long non-coding RNAs as novel biomarkers for breast cancer invasion and metastasis. Oncology letters. 2017;14(2):1895-904.

2. Xiao C, Wu C, Hu H. LncRNA UCA1 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) of breast cancer cells via enhancing Wnt/beta-catenin signaling pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(13):2819-24.

4. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. New England Journal of Medicine. 2002;347(16):1233-41.

5. Han Y, Yang Y-n, Yuan H-h, Zhang T-t, Sui H, Wei X-l, et al. UCA1, a long non-coding RNA up-regulated in colorectal cancer influences cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution. Pathology. 2014;46(5):396-401.

6. Wu Y, Shao A, Wang L, Hu K, Yu C, Pan C, et al. The role of lncRNAs in the distant metastasis of breast cancer. Frontiers in oncology. 2019;9:407.

7. Nie ZL, Wang YS, Mei YP, Lin X, Zhang GX, Sun HL, et al. Prognostic significance of long noncoding RNA Z38 as a candidate biomarker in breast cancer. Journal of clinical laboratory analysis. 2018;32(1):e22193.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

حذف بیولوژیک رنگ آزوRemazol Black-B با استفاده از باکتری Streptomyces hygroscopicus در شرایط مختلف محیطی

مجتبی تاران[۱]، علی حسینی روزبهانی[۲*]

۱-دانشیار میکروبیولوژی،دانشگاه رازی، کرمانشاه،ایران

mojtabataran@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، ایران
ali.hosseni.rozbahani1365@gmail.com

چکیده

مقدمه: در میان رنگ‌های شیمیایی، رنگ‌های آزو متداولترین رنگ‌های بکاررفته مصنوعی هستند و به میزان زیادی در نساجی کاربرد دارند. این رنگ‌ها از آلاینده‌های مهم محیط زیست به شمار می‌آیند. امروزه به دلیل محدودیت و مشکلات روش‌های فیزیکی و شیمیایی درحذف مواد رنگزا، تصفیه زیستی که روشی اقتصادی و موثر برای پالایش و الودگی زدایی است،ترجیح داده میشود.

روش‌ها: دراین پژوهش شرایط بهینه رنگ بری به منظور حذف رنگ Remazol Black-B از محیط آبی توسط باکتری Stereptomyces hygroscopicus مورد مطالعه قرار گرفت. در میان عوامل مؤثر بر میزان رشد، اثر سه عامل غلظت پساب، غلظت کربن و غلظت نمک محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تأثیر این عوامل بر میزان رشد از روش تاگوچی برای طراحی آزمایش استفاده شد. با توجه به جدول، آرایه‌ها در سه عامل و سه سطح، نه آزمایش طراحی شده ، پس از انجام آزمایش‌ها نتایج بدست آمده با استفاده از برنامه کامپیوتری Qualitek-4 تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: بررسی ها نشان داد که باکتری Stereptomyces hygroscopicus توانایی رنگ بری رنگ Remazol Black-B در محدوده وسیعی از نمک تا ۲۰ درصد و غلظت کربن ۵ تا ۱۰ درصد را دارد. از نظر تحمل‌پذیری رنگ این سویه تا ۱ گرم در میلی‌لیتر (۱۰۰۰ ppm) رنگ را تحمل می‌کند و بالاترین میزان رنگ‌بری را در ۱۰۰ppm دارد.

بحث و نتیجه گیری: این سویه با قرار گرفتن در شرایط بهینه رشد ، یعنی غلظت کربن ۱۰ درصد، غلظت نمک ۲۰ درصد میتواند تا ۶۴ درصد رنگ آزوی Remazol Black-B با غلظت ۱۰۰ppm را از محیط آبی

حذف می‌کند. با توجه به اینکه باکتری Stereptomyces hygroscopicus عمل رنگ‌بری را در مدت زمان کوتاهی و به شکل هوازی انجام می‌دهد، استفاده از این باکتری در تصفیه بیولوژیک پساب‌های دارای رنگ‌های صنعتی می‌تواند کمک موثری در تصفیه این گونه آب‌ها باشد.

کلمات کلیدی:
باکتری Stereptomyces hygroscopicus ؛ رنگ‌های آزو؛ رنگ Remazol Black-B ؛ رنگ‌بری؛ نساجی

biological removal of azo dye Remazol Black-B by Streptomyces hygroscopicus in different conditions

Mojtaba Taran[1], Ali Hosseni Rozbahani[2]*
1-Associate Professor of Microbiology, Razi University, Kermanshah, Iran,
mojtabataran@yahoo.com

2-M.Sc. of Microbiology, Islamic Azad University,Borujerd branch, Iran,
ali.hosseni.rozbahani1365@gmail.com

Abstract

Introduction: Among chemical dyes, azo dyes are the most commonly used synthetic dyes and are widely used in textiles. These colors are considered important environmental pollutants. Nowadays, due to the limitations and problems of physical and chemical methods in removing dyes, biological treatment is preferred, which is an economical and effective method for purification and decontamination.

Methods: In this research, the optimal conditions of dye removal were studied in order to remove Remazol Black-B dye from water environment by Stereptomyces hygroscopicus bacteria. Among the factors affecting the growth rate, the effect of three factors of effluent concentration, carbon concentration and salt concentration of the culture medium was investigated. To investigate the effect of these factors on the growth rate, Taguchi method was used to design the experiment. According to the table, the arrays in three factors and three levels, nine experiments were designed, after the experiments, the obtained results were analyzed using Qualitek-4 computer program.

Results and discussion: Investigations showed that the bacterium Stereptomyces hygroscopicus has the ability to remove Remazol Black-B dye in a wide range of salt up to 20% and carbon concentration of 5-10%. In terms of color tolerance, this strain tolerates color up to 1 gram per milliliter (1000 ppm) and has the highest color removal rate at 100 ppm.

Conclusions:This strain can remove up to 64% of Remazol Black-B azo dye with a concentration of 100 ppm from the water environment by being placed in optimal growth conditions, i.e. 10% carbon concentration, 20% salt concentration. Considering that the bacterium Stereptomyces hygroscopicus performs the decolorization process in a short period of time and aerobically, the use of this bacterium in the biological treatment of wastewater containing industrial dyes can be an effective help in the treatment of such waters.

Key words:
bacteria Stereptomyces hygroscopicus; azo dyes; paints Remazol Black-B; bleaching, textile

۱- مقدمه

از سال ۱۸۵۶ تاکنون که اولین رنگ سنتزی یا ترکیبی ارغوانی روشن کشف شد، بیش از ۱۰۰۰۰۰ رنگ سنتزی جدید تولید شده است. این رنگ‌ها در صنایع مختلفی از جمله نساجی، آرایشی و بهداشتی، کاغذ، چرم، دارو و غذا با مصرف سالانه حدود ۰/۷میلیون تن کاربرد دارند. صنایع نساجی حدود دوسوم بازار کامل ماده‌ی رنگ را در اختیار دارد. رنگ‌های آزو (AZO) بزرگ‌ترین دسته‌ی شیمیایی رنگ‌ها با بیشترین تنوع رنگ هستند و در نساجی، رنگرزی و نقاشی کاغذ پراستفاده می‌باشند. این رنگ‌ها به آسانی تجزیه نمی‌شوند و در عین حال برخی از آن‌ها برای جانوران بزرگ بسیار سمی هستند. در طول فرآیند رنگرزی، تقریباً ۱۵-۱۰ درصد از رنگ استفاده شده در پساب رها شده و باعث تولید خطراتی برای سلامت و محیط زیست می‌شود. وجود رنگ در اکوسیستم های آبی، فتوسنتز را با تاخیر نفوذ نور به لایه‌های عمیق‌تر کاهش داده و از این طریق کیفیت آب را تا حد زیادی از بین برده است. علاوه براین رنگ‌ها و محصول تجزیه‌ی آن‌ها برای گیاهان و جانوران سمی است. بنابراین رنگ‌زدایی پساب نساجی از مدت‌ها پیش تبدیل به نگرانی اصلی محیط زیست شده است. روش‌های تصفیه‌ی شیمیایی یا شیمیایی- فیزیکی مانند انعقاد و لخته‌شدگی، جذب و غیره به طور کلی ناکارآمد، پرهزینه و دارای کاربرد محدود است [۱و۲].

۱-۱- روش های تجزیه پساب نساجی

در تصفیه‌ی سیلان خروجی نساجی و به منظور رنگ‌زدایی از آن چندین روش فیزیکی-شیمیایی استفاده شده و شیوه های فیزیکی برمبنای انعقاد، لخته شدن و جذب رنگ‌ها به وجود آمده است با این حال، بکارگیری شیوه‌های فیزیکی- شیمیایی از نقاط ضعف درونی یا ذاتی برخوردارند از جمله غیرعملی بودن از نظر اقتصادی ، ناتوانی در برداشتن رنگ‌های آزو ناسازگار و سرسخت و یا مکمل‌های متابولیت آلی وتولید مقدار فراوانی لجن که باعث تولید مشکلات آلودگی ثانویه شده و بکارگیری شیوه‌های پیچیده ای را دربرمی‌گیرد.رنگ‌زدایی میکربی وتجزیه‌ی رنگ‌های آزو بسیار مورد توجه قرار گرفته چون ارزان و دوستدار محیط زیست هستند و مقدار کمی لجن تولید می‌کند.اثر رنگ‌زدایی میکربی به قابلیت سازگاری با محیط و فعالیت میکروارگانیسم‌های انتخابی بستگی دارد و رنج وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری، قارچ، کپک، اکتینومایسیت‌ها و جلبک توانایی تجزیه‌ی رنگ‌ها آزو را دارند. مکانیسم تجزیه‌ی میکربی رنگ‌های آزو شامل شکستن کاهنده‌ی پیوندهای آزو (-N=N-) با کمک آزو ریدوکتاز تحت شرایط بی‌هوازی شده و باعث تشکیل محلول‌های بی‌رنگ می‌شود. متابولیت واسطه ی نتیجه(یعنی آمین های معطر)هم به صورت بی‌هوازی و هم هوازی تجزیه شده و بیشتر بررسی‌های زیست تجزیه‌ی رنگ آزو روی باکتری و قارچ متمرکز شده که در اصل کشت‌های متنوع قارچی آن به قارچ سفید و پوسیده تعلق داشتند و برای تولید بیوفرآیند و به منظور معدنی سازی رنگ‌های آزو کاربرد دارد با این حال چرخه‌ی طولانی رشد به شرایط محدودساز نیتروژن و زمان نگهداری هیدرولیک طولانی مدت برای رنگ‌زدایی کامل نیاز داشته وهمیشه عملکرد سیستم رنگ‌زدایی قارچ را محدود می سازد در مقابل، رنگ‌زدایی باکتری کارآمدتر و سریعتر است ولی

گونه‌ی باکتری انفرادی معمولا نمی‌تواند رنگ‌های آزو را به طور کامل تجزیه کند و محصولات واسطه‌ی آن اغلب آمین‌های کارسینوژن و معطری هستند که به تجزیه شدن بیشتری نیاز دارند. پس سیستم‌های تصفیه از ترکیب جمعیت‌های میکربی شکل گرفته و دارای درجه‌ی فراوان زیست تجزیه و معدنی‌سازی به علت فعالیت‌های متابولیکی هم نیروبخشی جمعیت میکربی هستند و مزیت‌های قابل توجهی بر استفاده از کشت‌های خالص در تجزیه‌ی رنگ‌های سنتزی دارند [۳و۴و۵].

۲- روش تجربی

در این پژوهش برای طراحی آزمایش و تعیین شرایط بهینه رنگبری سویه مورد مطالعه از روش تاگوچی استفاده می شود. روش تاگوچی یک روش طراحی آزمایش از نوع کسری از فاکتوریل کامل است، که در این روش تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین متغیر ها انتخاب می شود، انتخاب این تعداد بر اساس طرح آزمایش به کار رفته، طوری صورت می گیرد که واریانس خطا، با حالتی که تمام ترکیب‌های ممکن اجرا شود، یکسان باشد. پس از انجام آزمایش ها وبا ارزیابی پاسخ های بدست آمده، بهترین پاسخ انتخاب می‌شود. در این روش با کاهش تعداد آزمایشات، زمان کل انجام آزمایش ها نیز تا حد زیادی کاهش می‌یابد. با استفاده از روش تاگوچی و بررسی عواملی مثل غلظت منبع کربن، غلظت رنگ و غلظت نمک ، شرایط رنگبری باکتری استرپتومایسس هیگروسکوپیکوس به منظور حذف رنگ ریمازول بلک از محیط آبی بررسی شد. با توجه به جدول آرایه‌ها در ۳ عامل و ۳ سطح، ۹ آزمایش طراحی شد. پس از انجام آزمایش‌ها نتایج بدست آمده با استفاده از برنامه کامپیوتری Qualitek-4 تجزیه و تحلیل شد[۶و۷].

۲-۱- ابزارها و دستگاه های مورد استفاده

جدول ۱. تجهیزات آزمایشگاهی و ابزارهای مورد استفاده

نام دستگاه	مدل دستگاه
سانتریفیوژ	BHG-Roto unit II
انکوباتور شیکردار	Innola 4200 Wagtech EDiSO , Nj=Usa
انکوباتور معمولی	Wt-birider-7200 TUTTLINGEN GERMANY
ترازوی دیجیتال	SCALTEC Max=150g . d=0/001g GERMANY
اسپکتروفتومتر	TOMAS UV 331
اتوکلاو	
نرم افزار کامپیوتری	Qualitek-4
ست سمپلر	

۲-۲-ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت باکتری

جدول ۲ . ترکیبات موجود در محیط کشت باکتری

مقدار	ترکیبات
۰/۴گرم	مانیتول
۰/۴ گرم	آرد سویا
۰/۱گرم	کلرید کلسیم
۰/۰۴ گرم	کربنات کلسیم
۵۰لامبدا	Hcl 1%
۲۵۰لامبدا	نیستاتین

۲-۳-تهیه محیط کشت و کشت نمونه‌ها

برای ساخت محیط کشت اختصاصی، مواد لازم را بر حسب میزان حلالیت آن‌ها به محیط آبی می‌افزاییم. به این ترتیب ارلن حاوی آب را روی Hot Plate قرار داده و موادی که دیر تر حل می‌شوند را در ابتدا به آب مقطر می‌افزاییم تا به وسیله مگنت به خوبی حل شوند، که در این جا ما به ترتیب زیر مواد را اضافه می‌کنیم:

۱- مانیتول

۲- آردسویا

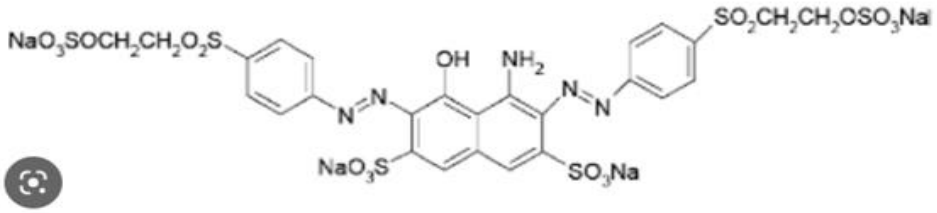
۳- کلرید سدیم

۴- کربنات کلسیم

۵- Hcl یک درصد

۶- نیستاتین برای جلوگیری از رشد قارچ

در این تحقیق، از رنگ ریمازول Remazol Black-B به عنوان نماینده رنگ‌های آزو استفاده شد، که از پرمصرف‌ترین رنگ ها در صنعت نساجی به شمار می‌آید. این رنگ با فرمول شیمیایی C12H21N5Na4O19S6 و وزن مولکولی۹۹۱/۸۲ گرم بر مول که در ازمایشگاه دانشگاه رازی موجود بود تهیه شد. ساختار رنگ در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل۱. ساختار رنگ Remazol Black-B

۲-۴-روش انجام آزمایش

برای انجام هر آزمایش ۲۰ سی‌سی از محیط کشت یاد شده را در ارلن های ۱۰۰ ریخته ، بعد از تنظیم غلظت رنگ با توجه به شرایط تعیین شده توسط نرم افزار، به هر ارلن ۱۰٪ آلودگی(۳×۱۰^{۷}سلول باکتری در میلی لیتر) تلقیح کرده و سپس ارلن‌ها را جهت هوادهی درون انکوباتور شیکردار با دور 120 rpm در دمای ۳۰ درجه سانتی راد به مدت ۵ روز گذاشته و بعد از پایان آزمایش مقدار رنگ حذف شده از محیط با استفاده از اسپکتروفتومتر بررسی می‌شود.

ابتدا طیف جذبی رنگ Remazol Black-B در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر تعیین شد، تا بیشینه طول موج جذبی رنگ های فوق مشخص شود. ماکزیمم طول موج جذبی برای رنگ Remazol Black-B ۵۹۸ نانومتربود. از ارلن‌های گرماگذاری شده برای اندازه‌گیری طیف جذبی در طول موج مربوط به هر رنگ، ۲ میلی‌لیتر نمونه برداشته و با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع‌رویی را برداشته و درطول موج ۵۹۸ نانومتر میزان جذب نور اندازه‌گیری شد [۸و۹].

۲-۵-روند آزمایش

در بخشی از این پژوهش‌ها شریط رشد بهینه این میکروارگانیسم مورد مطالعه قرار گرفت. در روش تاگوچی اولین گام، تعیین عوامل موثر وسطوح آن‌ها می‌باشد.در میان عوامل موثر در رشد و رنگبری این سویه سه عامل شامل، غلظت نمک محیط ،غلظت رنگ محیط و غلظت منبع کربن و برای هر فاکتور سه سطح در نظر گرفته شد. در جدول ۳ فاکتورها و سطوح بررسی شده نشان داده شده است.

جدول۳ . فاکتورها و سطوح بکار گرفته شده طبق طراحی روش تاگوچی در باکتری استرپتومایسس هیگروسکوپیکوس

فاکتورها	پارامترها	سطح۱	سطح۲	سطح۳
فاکتور(الف)	غلظت منبع کربن(٪)	۵	۷/۵	۱۰
فاکتور(ب)	غلظت رنگ (ppm)	۱۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰
فاکتور(ج)	غلظت نمک(٪)	۵	۱۰	۲۰

در این روش برای طراحی و اجرای آزمایش‌ها مجموعه‌ای از جداول به عنوان جدول آرایه‌های متعامد وجود دارد. این جداول برای وضعیت‌های مختلف آزمایشی قابل استفاده است. با توجه به جدول آرایه‌های متعامد در سه عامل و سه سطح و همچنین عوامل و سطوحی که در نظر گرفته شد. جدول ۴ شرح نه آزمایشی که با توجه به جدول آرایه های متعامد تاگوچی طراحی و انجام شد را نشان می‌دهد. برای انجام هر آزمایش، با توجه به شرایط مشخص شده منبع آلودگی با میکروارگانیسم مورد نظر را به میزان ۵ تا ۱۵ درصد محیط کشت را به ارلن‌های مورد نظر می‌افزاییم(که ما در این آزمایش ۵ درصد محیط کشت آلودگی یعنی ۱cc آلودگی را به ۲۰cc محیط کشت افزودیم). سپس ارلن‌ها را در شیکر قرار داده و با تنظیم دمای مورد نظر و دور ۱۲۰rpm بعد از گذشت هر ۲۴ ساعت میزان رنگ زدایی را بررسی نمودیم و میزان درصد حذف رنگ از محیط کشت را به دست آوردیم. سپس این کار را برای هر ۹ آزمایش به طور جداگانه انجام دادیم. و برای هر آزمایش ۴ بار تکرار قرار داده و درصدهای حذف رنگ را در هر بار ثبت نمودیم [۱۰و۱۱].

جدول ۴ . فاکتورها و سطوح بکار گرفته شده جهت حذف رنگ Remazol Black-B توسط باکتری Stereptomyces hygroscopicus

ارلن	مانیتول	رنگ	Nacl	درصد رنگبری
۱	۱	۱	۱	۵۵/۸۱
۲	۲	۲	۱	۴۴/۷۱
۳	۳	۳	۱	۳۵/۸۸
۴	۲	۱	۲	۴۹/۴۶
۵	۳	۲	۲	۵۰/۴۴
۶	۱	۳	۲	۳۱/۳۰
۷	۳	۱	۳	۶۴/۴۰
۸	۱	۲	۳	۳۴/۲۱
۹	۲	۳	۳	۵۰۳۰

طبق نتایج، این سویه بیشترین میزان حذف رنگ را در غلظت رنگ ۱۰۰ppm، غلظت نمک ۲۰درصد و مانیتول ۱۰ درصد دارا می‌باشد.

جدول ۵ . پیشگویی شرایط بهینه برای تجزیه زیستی رنگ Remazol Black-B توسط باکتری Stereptomyces hygroscopicus

ستون/فاکتور		سطح	سهم
۱ فاکتور نمک	فاکتورنمک- سطح۱	۱	۲,۰۲۴
۲فاکتور غلظت رنگ	فاکتور غلظت رنگ- سطح۱	۱	۱۳,۲۰۱
۳فاکتور غلظت کربن	فاکتور غلظت کربن- سطح۳	۳	۸,۵۰۲
جمع سهم کلی همه فاکتورها			۲۳,۷۲۷
میانگین اصلی از انجام کار			۴۰,۱۶۵
نتیجه قابل پیشگویی در شرایط بهینه			۶۳,۸۹۲

در جدول ۵ سهم هرکدام از فاکتورها در طی دوره ها مشخص شده است. طبق این جدول غلظت رنگ نقش مهم و اساسی در حذف رنگ از محیط آبی دارد و درتحت شرایط بهینه برای باکتری Stereptomyces hygroscopicus انتظار می‌رود بیش از ۶۳٪ باشد.

۳- نتایج و بحث

نتایج آزمایشات در این تحقیق نشان داد که روش تاگوچی یکی از روش‌های مؤثر برای بهینه سازی پارامترهای مؤثر در فرایند تجزیه زیستی رنگ Remazol Black-B به مقدار زیاد در باکتری Stereptomyces hygroscopicus است. در باکتری Stereptomyces hygroscopicus تحت محیط پری کالچر، غلظت رنگ موثرترین فاکتور در حذف رنگ Remazol Black-B از محیط آبی می باشد، و در تحت شرایط بهینه انتظار می‌رود بیش از ۶۳٪ باشد.

۴- نتیجه گیری

در سال ۲۰۰۳، Chen و همکارانش ۶ گونه ی باکتری با قابلیت تجزیه ی رنگ های پارچه از نمونه‌های لجن وگل ولای دریاچه را جدا نمودند و Aeromonas hydrophila به این دلیل انتخاب و شناسایی شد که بیشترین مقدار رنگ‌بری رنگ‌های متنوع را نشان داد.اگرچه Aeromonas hydrophila رشد خوبی را در کشت هوازی نشان داد ولی برداشتن رنگ آن در کشت بی هوازی بهترین بود. با برداشتن رنگ، مناسب ترین pH و دما عبارت بودند از PH=5.5-10 و در دمای 30-20 درجه سانتی گراد تحت شرایط کشت بی هوازی بیش از ۹۰ درصد رنگ REDRBN را در مدت ۸ روز و با غلظت رنگ 3000mgl-1 از بین بردند.این

گونه می تواند واسطه ی حاوی مخلوطی از رنگ ها در مدت ۲ روز انکیباسیون رنگ زدایی کند. منابع نیتروژنی مانند عصاره ی کپک یا پپتون می تواند شدیدا کارایی رنگ زدایی را افزایش دهد.در مقایسه با منبع نیتروژن، گلوکز از فعالیت رنگ زدایی جلوگیری می کند چون گلوکز مصرف شده به اسیدهای آلی تبدیل شده و ممکن است pH واسطه ی کشت را کاهش دهد و بنابراین از رشد سلول و فعالیت رنگ زدایی آن جلوگیری می کند.

در سال۲۰۱۱، Poranj و همکاران ایزولیت رنگ بری رنگ را توسط باکتری های،Bacillus sp، Klebsiella sp، Salmonella sp و Pseudomonas sp که از نمونه های سیال خروجی پارچه جمع آوری شده از منطقه ی Tamil Nadu,Elampillaiجدا شده بود بررسی کردند. پارامترهای متفاوتی مانند منبع کربن گوناگون، منبع نیتروژن، دما، pH واندازه ی تلقیح برای رنگزدایی رنگ Orange 3R استفاده شد. باکتری Bacillus sp ، Pseudomonas sp بیشترین رنگ بری رنگ را ۸۹ درصد در پایان ۱۴۴ ساعت تحت شرایط مطلوب نشان دادند ولی Bacillus sp در رنگ زدایی سودمندتر بود.

مکانیسم‌های رنگ زدایی

ساده‌ترین مکانیسم رنگ زدایی به وسیله سلول‌های باکتریایی Stereptomyces hygroscopicus جذب سطحی رنگ به درون بیومس است. به طور خلاصه، احتمالاً دو مکانیسم برای رنگ زدایی در سیستم-های باکتریایی وجود دارد:

۱- انتقال مستقیم الکترون به رنگ‌های نساجی به عنوان گیرنده‌های نهایی الکترون از طریق آنزیم‌ها در طی کاتابولیسم باکتریایی، مرتبط با تولید ATP (حفاظت انرژی).

۲- کاهش رنگ‌ها به وسیله محصولات نهایی کاتابولیسم سلولی، بی ارتباط با تولید ATP .

فهمیدن اساس بیوشیمیایی کاهش رنگ مهم است، چرا که در این صورت فرایندهای تیمار زیستی می‌تواند بدون دست ورزی فیزیولوژیکی یا استفاده از مهندسی ژنتیک به شکل کامل بهینه سازی شوند.

نتایج به دست آمده از این آزمایشات نشان داد که استفاده از این روش نه تنها در تعیین سطوح بهینه فاکتورهای بسیار مهم با کمترین میزان مصرف زمان و نیروی انسانی مؤثر است، همچنین در بهینه کردن تجزیه زیستی برای رنگ زدایی توسط باکتری مفید است.

منابع

1. Avramova T, Stefanova L, Angelova B, Mutafov S. Bacterial Decolorization of Acid Orange 7 in the Presence of Ionic and Non-Ionic Surfactants. Bulgarian Academy of Sciences, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology,Acad.
2. Saratale R.G, Saratale G.D, Kalyani D.C,Chang J.S , Govindwar S.P. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. Bioresource Technology 100 (2009) 2493-2500.$

3. Ponraj M, Gokila K, Zambare V. Bacterial decolorization of textile dye- Orange 3R. International Journal of Advanced Biotechnology and Research ISSN 0976-2612, Vol 2, Issue 1, 2011, 168-177.
4. Cetin D, D¨onmez G. Decolorization of reactive dyes by mixed cultures isolated from textile effluent under anaerobic conditions. Enzyme and Microbial Technology 38 (2006) 926-930.
5. Wang H, Qiang Su J, Wei Zheng X, Tian Y, Jing Xiong X, Ling Zheng T. Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by Citrobacter sp. CK3. International Biodeterioration & Biodegradation 63 (2009) 395-399.
۶- مراد خانی،دوتقوی،ف ۱۳۸۶،آشنایی با روش طراحی آزمایشات تاگوچی،انتشارات دانشگاه زنجان.
7. Chen K.Ch, Wu J.Y, Liou D.J, Hwang S.J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. Journal of Biotechnology 101 (2003) 57-68.
۸- استفاده از میکروارگانیسم های هالوفیل و هالوتولرنت در پاکسازی زیستی کارخانجات نساجی.صدیقه اسد. محمدعلی آموزگار. محمدنبی سربلوکی، احمدعلی پوربابایی.
۹- رنگ زدای رنگ Reactive Blaek 5 توسط سویه های بومی جداسازی شده از پساب کارخانجات نساجی در تهران اشرف السادات نوحی، مژگان امتیازجو، نگار اردوزاده.
10. Asgher M, Kausar Sh, Bhatti H.N, Hassan Shah S, Ali M. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by Schizophyllum commune BL-06. International Biodeterioration & Biodegradation 61 (2008) 189-193.
11. Asad S, Amoozegar M.A, Pourbabaee A.A, Sarbolouki M.N, Dastgheib S.M.M. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. Bioresource Technology 98 (2007) 2082–2088.
Z. Naturforsch. 62c, 87D92 (2007).

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بهینه سازی حذف بیولوژیک رنگ آزو Remazol yellow با استفاده از باکتری Streptomyces hygroscopicus در شرایط مختلف محیطی

مجتبی تاران[۱]، علی حسینی روزبهانی[۲*]

۱- دانشیار میکروبیولوژی،دانشگاه رازی، کرمانشاه،ایران mojtabataran@yahoo.com

۲-علی حسینی روزبهانی[۲*]: کارشناس ارشد میکروبیولوژی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد-ایران ali.hosseni.rozbahani1365@gmail.com

چکیده

مقدمه: آب یعنی حیات، ولی امروزه بواسطه پیشرفت در صنعتی شدن تا مقدار زیادی فاسد و مسموم شده است در بین مواد آلوده‌کننده محیط زیست، رنگ‌ها نامطلوب‌ترین گزینه هستند. در میان رنگهای شیمیایی، رنگ‌های آزو متداولترین رنگ‌های بکار رفته مصنوعی هستند و کاربرد فراوانی در نساجی دارند. روش‌های فیزیکی و شیمیایی در حذف مواد رنگ‌زا، بطور کلی پرهزینه و ناکارآمد هستند و کاربرد محدودتری دارند در حالیکه تصفیه زیستی یک روش اقتصادی و موثر برای آلودگی زدایی است.

روش‌ها: در این تحقیق با استفاده از روش تاگوچی و بررسی عواملی مثل غلظت کربن، غلظت رنگ و غلظت نمک در محیط، شرایط بهینه رنگ بری باکتری Stereptomyces hygroscopicus به منظور حذف رنگ Remazol yellow از محیط آبی بررسی شد. با توجه به جدول، آرایه‌ها در سه عامل و سه سطح، نه آزمایش طراحی شده ، پس از انجام آزمایش‌ها نتایج بدست آمده با استفاده از برنامه کامپیوتری Qualitek-4 تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: بررسی ها نشان داد که باکتری Stereptomyces hygroscopicus توانایی رنگ بری در محدوده وسیعی از نمک تا ۱۵ درصد و غلظت کربن ۷/۵-۵ درصد را دارد. از نظر تحمل‌پذیری رنگ این سویه تا ۱ گرم در میلی‌لیتر (۱۰۰۰ppm) رنگ را تحمل می‌کند و بالاترین رنگ‌بری را در ۱۰۰ppm دارد.

بحث و نتیجه گیری: این سویه با قرار گرفتن در شرایط بهینه رشد بدست آمده طی تحلیل آزمایش‌ها، یعنی غلظت کربن ۷/۵ درصد، غلظت نمک ۱۵ درصد تا ۶۶ درصد رنگ آزوی Remazol yellow با غلظت ۱۰۰ppm را از محیط آبی حذف می‌کند. با توجه به اینکه باکتری Stereptomyces hygroscopicus عمل رنگ‌بری را در مدت زمان کوتاهی یعنی ۷۲ ساعت و به شکل هوازی انجام می‌دهد، استفاده از این باکتری

در تصفیه بیولوژیک پساب‌های دارای رنگ‌های صنعتی می‌تواند کمک موثری در تصفیه این گونه آب‌ها باشد.

کلمات کلیدی: باکتری Stereptomyces hygroscopicus ؛ رنگ‌های آزو؛ رنگ Remazol yellow ؛ رنگ‌بری؛ نساجی

Optimization of biological removal of azo dye remazol yellow by Streptomyces hygroscopicus in different conditions

Mojtaba Taran[1], Ali Hosseni Rozbahani[2*]

1-Associate Professor of Microbiology, Razi University, Kermanshah, Iran, mojtabataran@yahoo.com

2-M.Sc. of Microbiology, Islamic Azad University,Borujerd branch, Iran, ali.hosseni.rozbahani1365@gmail.com

Abstract

Introduction: water is life, but today, due to advances in industrialization has been a lot of corrupt and toxic pollutants in the environment, the colors most undesirable option. Among chemical dyes, azo dyes commonly used colors are artificial and are widely used in the textile industry. Physical-chemical method for the removal of dye, are generally inefficient and costly and have limited use as biological treatment is an effective method for decontamination.

Methods: In this study, using the Taguchi method factors such as carbon concentrations, saturation and concentration of salt used, optimal conditions bleaching Stereptomyces hygroscopicus to remove bacteria from water environment was Remazol yellow color. According to the table, arrays in three factors and three levels, not experiment, the results of experiments performed using the computer program Qualitek-4 were analyzed.

Results and discussion: The results revealed that the bacteria Stereptomyces hygroscopicus bleaching ability within the range of 7.5 to 5 percent salt and 15 percent of its carbon concentration. The color of the strain tolerance to 1 gram per milliliter (ppm 1000) color tolerance and the highest bleaching is in ppm 100.

Conclusions: This level of growth achieved by being in optimum conditions during test analysis, the carbon concentration of 7.5%, the salt concentration of 15 percent to 66 percent Remazol yellow azo dye concentration of the aqueous solution eliminates ppm 100. Because the bacteria Stereptomyces hygroscopicus bleaching action in a short period of 72 hours aerobically does this bacteria on biological treatment of industrial wastewater color can help in the treatment and reuse of such is water.

Key words: bacteria Stereptomyces hygroscopicus; azo dyes; paints Remazol yellow; bleaching; textile

۱- مقدمه:

رنگ‌ها از جمله مواد شیمیایی هستند که به میزان فراوانی در صنایع نساجی، چاپ، غذایی، دارویی و آرایشی استفاده می‌شوند. امروزه رنگ‌های نساجی یکی از پرمصرف‌ترین مواد شیمیایی مصرفی هستند. در حدود ده هزار رنگ مختلف با تولید جهانی سالیانه بیش از هفتصدهزار تن بطور تجاری قابل دسترس هستند. با وجود اینکه رنگ‌های آلی تنها بخش کوچکی از بار آلی پساب را تشکیل می‌دهد، وجود آن‌ها از نظر ظاهری قابل قبول نیست. در میان رنگ‌های شیمیایی، رنگ‌های آزو متداولترین رنگ‌های به کار رفته مصنوعی هستند و حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد رنگ‌های مصرفی را تشکیل می‌دهند. رنگ‌های آزو با پیوند N=N شناخته می‌شوند که دارای تنوع رنگی بالایی هستند و به عنوان یکی از آلاینده‌های مهم محیط زیست محسوب می‌شوند. برخی رنگ‌ها و یا ترکیبات حاصل از تجزیه آن ها سمی، جهش‌زا، سرطان‌زا و برای عمل فتوسنتز بسیار مضر هستند زیرا باعث جلوگیری از انتقال و نفوذ نور شده و بنابراین بر فعالیت فتوسنتز گیاهان آبزی تأثیر گذاشته در نتیجه حتی در غلظت‌های کم، زندگی جانوران آبزی را به مخاطره انداخته و از طریق جانوران آبزی وارد چرخه غذایی انسان‌ها می‌شود. یکی از انواع رنگ‌های آزو ماده رنگ زای ریمازول یلو است که در صنایع نساجی و چرم استفاده زیادی دارد و بعنوان یکی از آلاینده های مهم محیط زیست محسوب می‌شود، بنابراین حذف این ماده رنگ‌زا از پساب ضروری است [۱و۲و۳].

۱-۱- استفاده از باکتری‌ها برای رنگ‌زدایی پساب

بکارگیری شیوه‌های فیزیکی- شیمیایی از نقاط ضعف درونی یا ذاتی برخوردارند از جمله غیرعملی بودن از نظر اقتصادی (به مصرف انرژی و مواد شیمیایی فراوانی نیاز دارد)،ناتوانی در برداشتن رنگ‌های آزو ناسازگار و سرسخت و یا مکمل‌های متابولیت آلی و تولید مقدار فراوانی لجن که باعث تولید مشکلات آلودگی ثانویه شده و بکارگیری شیوه‌های پیچیده‌ای را در بر می گیرد. رنگ‌زدایی میکربی و تجزیه‌ی رنگ‌های آزو بسیار مورد توجه قرار گرفته چون ارزان و دوستدار محیط زیست هستند و مقدار کمی لجن تولید می‌کند. اثر رنگ‌زدایی میکربی به قابلیت سازگاری با محیط و فعالیت میکروارگانیسم‌های انتخابی بستگی دارد و رنج وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری، قارچ، کپک، اکتینومایسیت‌ها و جلبک توانایی تجزیه‌ی رنگ‌ها آزو را دارند. مکانیسم تجزیه‌ی میکربی رنگ‌های آزو شامل شکستن کاهنده ی پیوندهای آزو(-N=N-)با کمک آزو ریدوکتاز تحت شرایط بی‌هوازی شده و باعث تشکیل محلول‌های بی‌رنگ می‌شود. متابولیت واسطه‌ی نتیجه (یعنی آمین‌های معطر) هم به صورت بی‌هوازی و هم هوازی تجزیه شده و بیشتر بررسی‌های زیست تجزیه‌ی رنگ آزو روی باکتری و قارچ متمرکز شده که در اصل کشت های متنوع قارچی آن به قارچ سفید و پوسیده تعلق داشتند و برای تولید بیوفرآیند و به منظور معدنی سازی رنگ‌های آزو کاربرد دارد با این حال چرخه ی طولانی رشد به شرایط محدودساز نیتروژن و زمان نگهداری هیدرولیک طولانی مدت

برای رنگ‌زدایی کامل نیاز داشته و همیشه عملکرد سیستم رنگ‌زدایی قارچ را محدود می سازد در مقابل، رنگ‌زدایی باکتری کارآمدتر و سریعتر است [۴].

۲- بخش تجربی

در این قسمت کار با استفاده از روش تاگوچی و بررسی عواملی مثل غلظت منبع کربن، غلظت رنگ و غلظت نمک در محیط، شرایط بهینه رنگبری باکتری استرپتومایسس هیگروسکوپیکوس به منظور حذف رنگ ریمازول یلو از محیط آبی بررسی شد. با توجه به جدول آرایه‌ها در ۳ عامل و ۳ سطح، ۹ آزمایش طراحی شد. پس از انجام آزمایش‌ها نتایج بدست آمده با استفاده از برنامه کامپیوتری Qualitek-4 تجزیه و تحلیل شد [۵].

۲-۱- ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت باکتری

جدول ۱ . ترکیبات موجود در محیط کشت باکتری

مقدار	ترکیبات
۰/۴گرم	مانیتول
۰/۴ گرم	آرد سویا
۰/۱گرم	کلرید کلسیم
۰/۰۴ گرم	کربنات کلسیم
۵۰لامبدا	Hcl 1%
۲۵۰لامبدا	نیستاتین

در این تحقیق، از رنگ ریمازول یلو به عنوان نماینده رنگ‌های آزو استفاده شد، که از پرمصرف‌ترین رنگ ها در صنعت نساجی به شمار می‌آید. این رنگ با فرمول شیمیایی C20H21 CI N4o11 S32Na و وزن مولکولی ۶۶۹/۰۴ گرم بر مول که در ازمایشگاه دانشگاه رازی موجود بود تهیه شد.

۲-۲- تهیه محیط کشت و کشت نمونه‌ها

برای ساخت محیط کشت اختصاصی، مواد لازم را بر حسب میزان حلالیت آن‌ها به محیط آبی می‌افزاییم. به این ترتیب ارلن حاوی آب را روی Hot Plate قرار داده و موادی که دیر تر حل می‌شوند را در ابتدا به آب مقطر می‌افزاییم تا به وسیله مگنت به خوبی حل شوند، که در این جا ما به ترتیب زیر مواد را اضافه می‌کنیم:

۱- مانیتول

۲- آردسویا

۳- کلرید سدیم

۴- کربنات کلسیم

۵- Hcl یک درصد

۶- نیستاتین برای جلوگیری از رشد قارچ

۲-۳- روش انجام آزمایش

در این پژوهش برای طراحی آزمایش و تعیین شرایط بهینه رنگبری سویه مورد مطالعه از روش تاگوچی استفاده می شود. روش تاگوچی یک روش طراحی آزمایش از نوع کسری از فاکتوریل کامل است، که در این روش تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین متغیر ها انتخاب می شود، انتخاب این تعداد بر اساس طرح آزمایش به کار رفته، طوری صورت می گیرد که واریانس خطا، با حالتی که تمام ترکیب‌های ممکن اجرا شود، یکسان باشد. پس از انجام آزمایش ها وبا ارزیابی پاسخ های بدست آمده، بهترین پاسخ انتخاب می‌شود. در این روش با کاهش تعداد آزمایشات، زمان کل انجام آزمایش ها نیز تا حد زیادی کاهش می‌یابد.

برای انجام هر آزمایش ۲۰ سی‌سی از محیط کشت یاد شده را در ارلن‌های ۱۰۰ ریخته، بعد از تنظیم غلظت رنگ با توجه به شرایط تعیین شده توسط نرم افزار، به هر ارلن ۱۰٪ آلودگی تلقیح کرده و ارلن‌ها را جهت هوادهی درون انکوباتور شیکردار با دور 120 rpm در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز گذاشته و بعد از پایان آزمایش مقدار رنگ حذف شده از محیط با استفاده از اسپکتروفتومتر بررسی می‌شود [۶و۷].

۲-۴- بررسی میزان رنگ و کدورت در محیط

ابتدا طیف جذبی رنگ ریمازول یلو در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر تعیین شد، تا بیشینه طول موج جذبی رنگ های فوق مشخص شود. ماکزیمم طول موج جذبی برای رنگ ریمازول یلو ۵۲۶ نانومتربود. از ارلن‌های گرماگذاری شده برای اندازه‌گیری طیف جذبی در طول موج مربوط به هر رنگ، ۲ میلی‌لیتر نمونه برداشته و با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع‌رویی را برداشته و درطول موج ۵۲۶ نانومتر میزان جذب نور اندازه‌گیری شد و درصد رنگبری مطابق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$D(\%) = \frac{(A-A^{\circ})}{A} \times 100 \quad (۱)$$

A = جذب در محیط پس از رنگبری Ao= جذب در محیط شاهد (اولیه) D = درصد رنگبری

۲-۵- روش طراحی آزمایش

در روش تاگوچی اولین گام، تعیین عوامل موثر وسطوح آن‌ها می‌باشد.در میان عوامل موثر در رشد و رنگبری این سویه سه عامل شامل، غلظت‌نمک محیط ،غلظت رنگ محیط و غلظت منبع کربن و برای هر فاکتور سه سطح در نظر گرفته شد. در جدول ۲ فاکتورها و سطوح بررسی شده نشان داده شده است [۸].

جدول ۲ . عوامل و سطوح مورد بررسی در طراحی آزمایشات

سطح / فاکتور	۱	۲	۳
غلظت منبع کربن(٪)	۵	۶/۵	۷/۵
غلظت رنگ (ppm)	۱۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰
غلظت نمک (٪)	۵	۱۰	۱۵

۲-۶- روند آزمایش

در میان عوامل مؤثر بر میزان رشد، اثر سه عامل غلظت پساب، غلظت کربن و غلظت نمک محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نتایج مطالعات قبلی برای هر عامل سه سطح تعیین شد. جدول ۲ این عوامل و سطوح را مشخص می‌کند. جدول ۳ شرح نه آزمایشی که با توجه به جدول آرایه های متعامد تاگوچی طراحی و انجام شد را نشان می‌دهد(برای مثال آزمایش شماره یک، آزمایشی است که در آن غلظت کربن ۵ درصدو غلظت رنگ ۱۰۰ppm و غلظت نمک ۵ درصد می‌باشد). برای انجام هر آزمایش، با توجه به شرایط مشخص شده منبع آلودگی با میکروارگانیسم مورد نظر را به میزان ۵ تا ۱۵ درصد محیط کشت را به ارلن‌های مورد نظر می‌افزاییم(که ما در این آزمایش ۵ درصد محیط کشت آلودگی یعنی ۱cc آلودگی را به ۲۰cc محیط کشت افزودیم). سپس ارلن‌ها را در شیکر قرار داده و با تنظیم دمای مورد نظر و دور ۱۲۰rpm بعد از گذشت هر ۲۴ ساعت میزان رنگ زدایی را بررسی نمودیم و میزان درصد حذف رنگ از محیط کشت را به دست آوردیم. سپس این کار را برای هر ۹ آزمایش به طور جداگانه انجام دادیم. و برای هر آزمایش ۴ بار تکرار قرار داده و درصدهای حذف رنگ را در هر بار ثبت نمودیم. همانطور که در جدول ۳ مشاهده میکنید این سویه بیشترین میزان حذف رنگ را در غلظت رنگ ۱۰۰ppm، غلظت نمک ۱۵درصد و مانیتول ۷/۵ درصد دارا می‌باشد.

جدول ۳ . فاکتورها و سطوح بکار گرفته شده جهت حذف رنگ Remazol yellow توسط باکتری Stereptomyces hygroscopicus

ارلن	مانیتول	رنگ	Nacl	درصد رنگبری
۱	۱	۱	۱	۵۹/۱۷
۲	۲	۲	۱	۴۵/۸۱
۳	۳	۳	۱	۳۳/۶۸
۴	۲	۱	۲	۴۲/۴۷

۵	۳	۲	۲	۵۴/۴۰
۶	۱	۳	۲	۳۱/۰۳
۷	۳	۱	۳	۶۷/۴۰
۸	۱	۲	۳	۳۵/۱۲
۹	۲	۳	۳	۲۸/۰۵

در جدول ۴ اثر هر سطح از هر فاکتور بر روی رنگبری این سویه نشان داده شده است، که غلظت کربن در سطح ۳ یعنی ۷,۵ درصد، غلظت‌رنگ محیط در سطح ۱ یعنی ppm ۱۰۰ و درصدنمک محیط در سطح ۳ یعنی ۱۵ درصد بیشترین تاثیر را در رنگبری رنگ Remazol yellow توسط باکتری Stereptomyces hygroscopicus دارند.

جدول ۴ . اثر سطوح مختلف فاکتورها بر میزان حذف رنگ

فاکتورها/ سطوح	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
غلظت کربن	۴۱,۷۷۳	۳۸,۷۷۶	۵۱,۸۲۶
غلظت رنگ	۵۶,۳۴۶	۴۵,۱۱	۳۰,۹۱۹
غلظت نمک	۴۶,۲۲	۴۲,۶۳۳	۴۳,۵۲۳

تعیین پارامترهای تاثیرگذار در رنگبری رنگ Remazol yellow به کمک آنالیز واریانس در جدول ۵ نشان داده شده است. ستون آخر اثرات هر یک از فاکتورها را در رنگبری تعیین می‌کند. فاکتور غلظت رنگ موثرترین فاکتور برای رنگبری رنگ Remazol yellow توسط باکتری Stereptomyces hygroscopicus می‌باشد، بعد از آن فاکتورکربن ودرآخرنمک به ترتیب بیشترین تاثیر را دارد.

جدول ۵ . آنالیز واریانس‌ها برای تجزیه زیستی رنگ Remazol yellow توسط باکتری

Stereptomyces hygroscopicus

فاکتور/ ستون	درجه آزادی(f)	مجموع مربعات (s)	واریانس(V)	سطح F (F)	مجموع مربعات خالص (S‘)	درصد %
غلظت نمک	۲	۲۰,۹۲۹	۱۰,۴۶۴	۰,۰۹۳	۰	۰
غلظت رنگ	۲	۹۷۴,۱۳۴	۴۸۷,۰۶۷	۴,۳۵	۷۵۰,۲۴۶	۵۰,۰۳۹
غلظت کربن	۲	۲۸۰,۳۵۳	۱۴۰,۱۷۶	۱,۲۵۲	۵۶,۴۶۵	۳,۷۶۶
خطاها	۲	۲۳۳,۸۸۷	۱۱۱,۹۴۳			۴۶,۱۹۵
جمع کل	۸	۱۴۹۹,۳۰۴				۱۰۰

در جدول ۶ سهم هرکدام از فاکتورها در طی دوره ها مشخص شده است. طبق این جدول غلظت رنگ نقش اساسی در حذف رنگ از محیط آبی دارد و درتحت شرایط بهینه برای باکتری Stereptomyces hygroscopicus انتظار می‌رود بیش از ۶۶٪ باشد.

جدول ۶ . پیشگویی شرایط بهینه برای تجزیه زیستی رنگ Remazol yellow توسط باکتری Stereptomyces hygroscopicus

ستون/فاکتور		سطح	سهم
۱ فاکتور نمک	فاکتورنمک- سطح۱	۱	۲,۰۹۴
۲فاکتور غلظت رنگ	فاکتور غلظت رنگ- سطح۱	۱	۱۲,۲۲۱
۳فاکتور غلظت کربن	فاکتور غلظت کربن- سطح۳	۳	۷,۷۰۱
جمع سهم کلی همه فاکتورها			۲۲,۰۱۵
میانگین اصلی از انجام کار			۴۴,۱۲۵
نتیجه قابل پیشگویی در شرایط بهینه			۶۶,۱۴۱

۳- نتایج و بحث

نتایج آزمایشات در این تحقیق نشان داد که روش تاگوچی یکی از روش‌های مؤثر برای بهینه سازی پارامترهای مؤثر در فرایند تجزیه زیستی رنگ ریمازول یلو به مقدار زیاد در باکتری Stereptomyces hygroscopicus است. در باکتری Stereptomyces hygroscopicus ، غلظت رنگ موثرترین فاکتور در حذف رنگ ریمازول یلو از محیط آبی می باشد، و در تحت شرایط بهینه انتظار می‌رود بیش از ۶۶٪ باشد.

۴- نتیجه گیری

طبق تحقیقاتی که Asad و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی باکتری‌های نمک دوست جدا شده از پساب نساجی انجام دادند از بین نمک های مختلف، سدیم کلراید بیش ترین اثر را بر رنگ بری نشان داد آن ها اعلام کردند که حضور این نمک برای رشد و فعالیت باکتری‌های نمک دوست و تحمل پذیر نمک ضروری است [۹].

۴-۱- فاکتورهای مؤثر بر رنگ زدایی

تحقیقات نشان می‌دهد که کارایی سیستم‌های تیمار بیولوژیکی به مقدار زیاد تحت تأثیر پارامترهای عملکردی قرار می‌گیرند. سطح هوادهی، غلظت کربن، PH ، غلظت رنگ، غلظت نمک و پتانسیل کاهشی سیستم بایستی برای دستیابی به بیشترین نرخ کاهش رنگ بهینه سازی شوند [۱۰].

۴-۲- غلظت رنگ

غلظت رنگ نیز کارایی رنگ زدایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مشاهدات Zhang و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که کارایی رنگ زدایی با افزایش در غلظت رنگ موجود در پساب کاهش می‌یابد. داده‌های حاصل آزمایشات ما نیز این نتایج را تأیید می‌کند. به عبارتی، افزایش تدریجی رنگ تا غلظتppm ۱۰۰ افزایش رنگزدایی را در پی دارد در حالیکه پس از این مرحله سرعت رنگ زدایی کاهش می‌یابد. این اثر به سمیت متابولیت‌هایی که در طول کاهش رنگ تشکیل می‌شوند نسبت داده می‌شود. غلظت بالاتر رنگ به زمان طولانی‌تری برای رنگ زدایی نیاز دارد.

۴-۳- ساختار رنگ

رنگ‌هایی با ساختار ساده و وزن مولکولی پایین سرعت‌های بالاتر رنگ زدایی را نشان می‌دهند، در حالی که رنگ زدایی از رنگ‌هایی با گروه‌های استخلافی بیشتر و وزن مولکولی بالاتر بسیار مشکل است. تعدادی از محققین سطح رنگ زدایی را با نوع رنگ در ارتباط می‌دانند تا با ساختارهای مولکولی. Greaves و همکاران در سال ۱۹۹۹ نتیجه گرفتند که:

۱- رنگ‌ها اسیدی به خاطر تعداد گروه‌های گوگردی موجود رنگ زدایی اندکی را نشان می‌دهند.

۲- رنگ‌های دایرکت سطوح بالایی از رنگ زدایی را که مستقل از گروه‌های گوگردی است را نشان می-دهند.

۳- رنگ‌های رآکتیو نیز سطوح پایین رنگ زدایی را نشان می‌دهند [۱۱].

۴-۴- مکانیسم‌های رنگ زدایی

ساده‌ترین مکانیسم رنگ زدایی به وسیله سلول‌های باکتریایی Stereptomyces hygroscopicus جذب سطحی رنگ به درون بیومس است. به طور خلاصه، احتمالاً دو مکانیسم برای رنگ زدایی در سیستم-های باکتریایی وجود دارد:

۱- انتقال مستقیم الکترون به رنگ‌های نساجی به عنوان گیرنده‌های نهایی الکترون از طریق آنزیم‌ها در طی کاتابولیسم باکتریایی، مرتبط با تولید ATP (حفاظت انرژی).

۲- کاهش رنگ‌ها به وسیله محصولات نهایی کاتابولیسم سلولی، بی ارتباط با تولید ATP .

فهمیدن اساس بیوشیمیایی کاهش رنگ مهم است، چرا که در این صورت فرایندهای تیمار زیستی می‌تواند بدون دست ورزی فیزیولوژیکی یا استفاده از مهندسی ژنتیک به شکل کامل بهینه سازی شوند. Chang و همکاران (۲۰۰۱) به پارامترهای بسیار مهم و مؤثر در رنگ زدایی (PH، دما، اکسیژن محلول) اشاره نمودند. همچنین جایگزین‌های متفاوتی برای پیش بینی تجزیه پذیری زیستی مواد شیمیایی و آلی از دیدگاه ساختار مولکولی فراهم آوردند. همه آن‌ها نتیجه گرفتند که ساختار شیمیایی آلاینده‌های آلی (مانند

رنگ‌ها) اهمیت زیادی برای تجزیه پذیری زیستی آن‌ها دارد و همچنین خطرشان برای بشر به عنوان دریافت کننده آن‌ها. به علاوه زمان‌های طولانی‌تر رنگ زدایی برای محیط کشت‌های قدیمی تر پیشنهاد می-کند که سلول‌های پیرتر به زمان طولانی تری برای سازگار شدن با محیط برای زنده ماندن نیاز دارند. طراحی آزمایش ارائه شده در این مطالعه به شکل مؤثری ترکیب بهینه محیط کشت، که در آن بیشترین چگالی سلولی فراهم می‌شود، را معرفی می‌نماید. به علاوه بهینه سازی محیط کشت سرعت رشد و مقدار بیومس حاصل از محیط کشت Stereptomyces مورد آزمایش را افزایش می‌دهد. با مسلم شدن سادگی و کم هزینه بودن آماده سازی محیط کشت بهینه، ما اندیشیدیم که نتایج این مطالعه برای افزایش استفاده از Stereptomyces hygroscopicus در تجزیه پساب نساجی مفید است.

منابع

۱- استفاده از میکروارگانیسم های هالوفیل و هالوتولرنت در پاکسازی زیستی کارخانجات نساجی.صدیقه اسد. محمدعلی آموزگار. محمدنبی سربلوکی، احمدعلی پورابایی.

2. Asgher M, Kausar Sh, Bhatti H.N, Hassan Shah S, Ali M. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by Schizophyllum commune BL-06. International Biodeterioration & Biodegradation 61 (2008) 189-193.

3. Saratale R.G, Saratale G.D, Kalyani D.C,Chang J.S , Govindwar S.P. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. Bioresource Technology 100 (2009) 2493-2500.$

4. Ponraj M, Gokila K, Zambare V. Bacterial decolorization of textile dye- Orange 3R. International Journal of Advanced Biotechnology and Research ISSN 0976-2612, Vol 2, Issue 1, 2011, 168-177.

۵- مراد خانی،دوتقوی،ف ۱۳۸۶،آشنایی با روش طراحی آزمایشات تاگوچی،انتشارات دانشگاه زنجان.

۶- رنگ زدای رنگ Reactive Blaek 5 توسط سویه های بومی جداسازی شده از پساب کارخانجات نساجی در تهران اشرف السادات نوحی، مژگان امتیازجو، نگار اردوزاده.

۷- ملک زاده،شهامت،۱۳۸۶،میکروبیولوژی عمومی،انتشارات دانشگاه تهران

8. Chen K.Ch, Wu J.Y, Liou D.J, Hwang S.J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. Journal of Biotechnology 101 (2003) 57-68.

9. Asad S, Amoozegar M.A, Pourbabaee A.A, Sarbolouki M.N, Dastgheib S.M.M. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. Bioresource Technology 98 (2007) 2082–2088.

10. Avramova T, Stefanova L, Angelova B, Mutafov S. Bacterial Decolorization of Acid Orange 7 in the Presence of Ionic and Non-Ionic Surfactants. Bulgarian Academy of Sciences, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology,Acad. Z. Naturforsch. 62c, 87D92 (2007).

11. Chang, J.S., Chou, C., Lin, YC., Lin, P.J., Ho, J.Y.(2001). Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by Pseudomonas luteola. Water Res. 35:2841-2850.

کاربردها وآینده‌نگری CRISPR-Cas9 در ایمونوتراپی سرطان

الهه سنگی کاظم آباد، رویا زیوری، فاطمه قائم دوست، ساجده کوه سرخی، مهدیه روح الامینی ده میری*
دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان
*پست الکترونیک نویسنده مسئول:Rooholaminimahdieh@gmail.com

چکیده

مرگ‌ومیر ناشی از سرطان یک مشکل عمده بهداشت عمومی در سراسر جهان است. جدای از درمان‌های توسعه‌یافته تا به امروز، اثرات درمانی رضایت‌بخش سرطان با گسترش جعبه ابزار مورد توجه قرار نگرفته است. ظهور ایمونوتراپی عصر جدیدی را در درمان تومورهای جامد گشوده است، اما محدود باقی مانده و نیاز به حذف عوارض جانبی دارد. در همین حال، توسعه فناوری های پیشرفته را می‌توان با تجزیه و تحلیل ژن و دستکاری در سطح مولکولی تسریع کرد. ظهور فن‌آوری‌های پیشرفته ویرایش ژنوم، به ویژه تکرارهای پالیندرومیک کوتاه خوشه‌ای با فاصله منظم (CRISPR-Cas9)، پتانسیل خود را برای غلبه بر محدودیت‌های ایمونوتراپی سرطان نشان داده است. بسیاری از باکتری‌ها در تکرارهای پالیندرومیک کوتاه - (CRISPR) CRISPR مرتبط با (Cas) خوشه‌بندی می‌شوند که از DNA اندونوکلئاز هدایت شده توسط RNA دوگانه Cas9 برای محافظت در برابر تهاجم فاژ و پلاسمیدهای مزدوج با معرفی شکاف‌های دو رشته‌ای خاص سایت به DNA هدف استفاده می‌کنند. این بررسی مکانیسم ویرایش ژنوم با واسطه CRISPR-Cas9 و جعبه ابزار قدرتمند CRISPR را ارائه می‌دهد. علاوه بر این، ما بر بررسی تأثیر شکست‌های دو رشته‌ای (DSBs) ناشی از CRISPR بر ایمنی درمانی سرطان (ناک اوت) تمرکز خواهیم کرد. در نهایت، ما غربالگری گسترده ژنوم مبتنی بر CRISPR-Cas9 را برای شناسایی هدف مورد بحث قرار می‌دهیم.

کلمات کلیدی: CRISPR-Cas ، ایمونوتراپی سرطان، سلول درمانی، مهندسی ژنومی، مکانیسم

Application and prospects of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy

Elaheh Sangi Kazemabad, Roya Zivari, Fatemeh Ghaemdoost, Sajedeh Koohsorkhi, Mahdieh Rooholamini Dehmiri*

University of Sistan and Baluchistan-Zahedan

E-mail of the responsible author: Rooholaminimahdieh@gmail.com

Abstract

The incidence and mortality of cancer are the major health issue worldwide. Apart from the treatments developed to date, the unsatisfactory therapeutic effects of cancers have not been addressed by broadening the toolbox. The advent of immunotherapy has ushered in a new era in the treatments of solid tumors, but remains limited and requires breaking adverse effects.Mean while, the development of advanced technologies can be further boosted by gene analysis and manipulation at the molecular level. The advent of cutting-edge genome editing technology, espe-cially clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas9), has demonstrated its potential to break the limits of immunotherapy in cancers.

Keywords: CRISPR-Cas9, Cancer immunotherapy, Cellular therapy, genome engineering, structure

مقدمه

سیستم گروه‌بندی تکرارهای پالیندرومیک کوتاه (CRISPR) - پروتئین مرتبط با CRISPR9 (Cas9)، مکانیسم حفاظت باکتریایی در برابر عفونت فاژ و انتقال پلاسمید در طبیعت به یک پلتفرم هدف‌گیری DNA هدایت شده توسط RNA قدرتمند برای ویرایش ژنوم، اختلال رونویسی، مدولاسیون اپی‌ژنتیک و تصویربرداری ژنوم تبدیل شده است. این فناوری امکان دستکاری دقیق تقریباً هر توالی ژنومی تعریف شده توسط یک ناحیه کوتاه از RNA راهنما را فراهم می کند (۱)، و اجازه می‌دهد تا عملکرد ژن‌های دخیل در توسعه و پیشرفت بیماری، تصحیح جهش‌های ایجادکننده بیماری، غیرفعال سازی انکوژن‌های فعال شده یا فعال‌سازی ژن‌های سرکوب‌کننده سرطان غیرفعال شده با استفاده از پروتئین فیوژن، Cas9 کمبود نوکلئاز و دمین مؤثر فراهم می‌کند. (۲،۳،۴،۵).

بعلاوه، این تکنولوژی اندونوکلئاز قابل برنامه‌ریزی به محققان اجازه می‌دهد تا عملکرد چندین ژن را به طور همزمان بررسی کنند و همزمان چندین مکان ژنومی را در یک ازمایش واحد هدف قرار دهند. با استفاده از کتابخانه‌های یک جهته RNA (sgRNA)، غربالگری ژنوم مبتنی بر CRISPR می‌تواند برای شناسایی ژن-های هدف یا ژن‌های مقاوم به بیماری، مانند سرکوب کننده‌های تومور جدید یا انکوژن‌ها و همچنین برای ارزیابی سریع اهداف دارویی (6، 7) استفاده شود. بنابراین، مهندسی ژنومی با واسطه CRISPR-Cas9 وعده فوق‌العاده‌ای برای دارو یا حتی درمان بیماری‌های ژنتیکی، از جمله بسیاری از اشکال سرطان و تخریب عصبی و همچنین کم خونی سلول داسی شکل، فیبروز کیستیک، دیستروفی عضلانی دوشن، عفونت های ویروسی، اختلالات ایمونولوژیک و بیماری های قلبی عروقی است. (۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲)

جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی (۱۳،۱۴،۱۵) شناخته شده، ترجیح داده شده و به طور گسترده در سراسر جهان برای درمان سرطان استفاده می‌شود. درمان هدفمند (۱۶)، فتوتراپی و فتودینامیک درمانی (۱۷) در حال حاضر رو بهبود و توسعه است. با این حال، درمان سرطان فردی هنوز در مراحل اولیه است. آسیب ناشی از تشعشع، سمیت دارویی (۱۸،۱۹،۲۰) و سایر واکنش‌های نامطلوب ممکن است با درمان معمولی رخ دهد و حتی منجر به مرگ شود (۲۱) ما نیاز فوری به افزایش ابزارهای جدید برای درمان سرطان داریم. ایمونوتراپی سرطان با بازیابی یا تحریک سیستم ایمنی با رشد و تهاجم سلول های تومور مبارزه می کند.(۲۲)

علاوه بر زمینه رو به رشد ویرایش پایه و اولیه، کارایی و موفقیت ویرایش ژن به این بستگی دارد که آیا می-توان شکست‌های دو رشته‌ای (DSB) را در مکان‌های خاص، دقیق و قابل پیش‌بینی ایجاد کرد یا خیر.(۲۳) به طور خاص، CRISPR-Cas9 در مقیاس‌پذیری، انعطاف‌پذیری و عملکرد بهتر از دیگران عمل می‌کند که به راحتی می‌توان با بیان RNAهای راهنما (sgRNA) مختلف مهندسی کرد. سهولت طراحی sgRNA برای هدف قرار دادن تقریباً هر بخشی از ژنوم که امکان توسعه کتابخانه‌های CRISPR ادغام شده در مقیاس ژنوم

را فراهم می‌کند (شاهدی که TALEN یا ZFN نمی توانند به آن دست یابند). به طور خلاصه، محققان CRISPR-Cas9 را به عنوان امیدوارکننده‌ترین رویکرد برای ویرایش ژن تشخیص دادند.(۲۴)

روش کار:

ساختارهای Cas9 در حالت اپو دارای دو لوب متمایز هستند: لوب تشخیص مارپیچ الفا (REC) و کسر نوکلئاز (NUC) حاوی دامنه‌های نوکلئاز HNH حفظ شده و نوکلئازهای RuvC شکافته شده و همچنین دارای یک دامنه ترمینال C متغیر (CTD) است(۲۵).

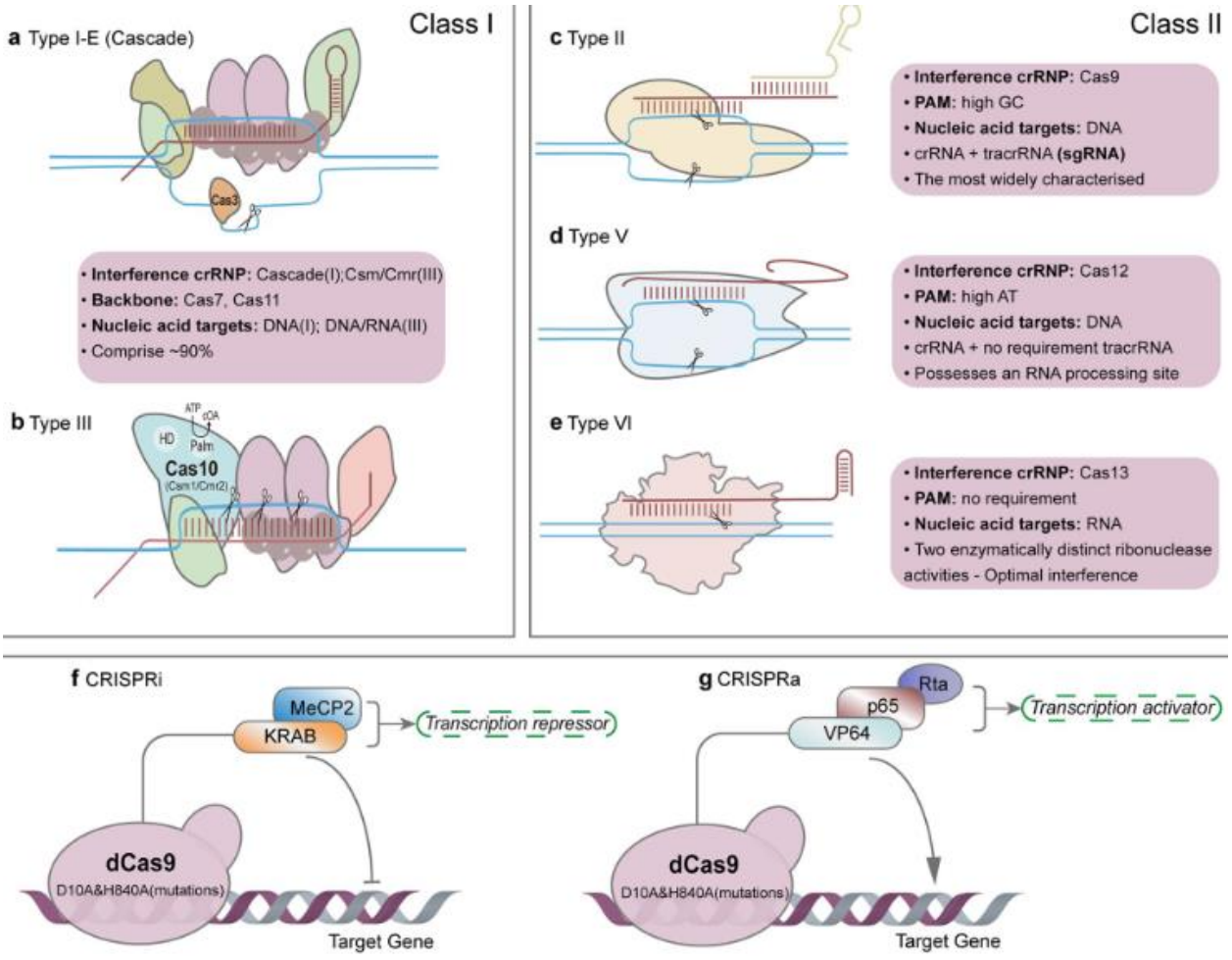
مکانیسم اساسی ویرایش ژنوم با واسطه CRISPR-Cas9

بارانگو و دیگران.(۲۶) آزمایش‌هایی روی عفونت با استرپتوکوک ترموفیلوس انجام داد و دریافت که سیستم CRISPR-Cas9 به فاژها مقاومت می‌دهد و اولین شواهد تجربی را برای نقش آن در ایمنی تطبیقی ارائه می‌دهد.

به عنوان یک قاعده، ایمنی تطبیقی با واسطه CRISPR-Cas شامل سه مرحله است: اکتساب، رونویسی، و تداخل [۲۷]. به سادگی می‌توان آن را به عنوان کسب DNA خارجی برای ادغام در جایگاه میزبان CRISPR برای تشکیل crRNA بالغ (RNA مشتق شده از CRISPR) و پروتئین Cas که توالی هدف را تحت هدایت RNA می‌شکافد خلاصه کرد. بنابراین، سیستم Te شامل نوکلئاز Cas9 و RNA راهنما (gRNA) است. به طور معمول، gRNA متشکل از یک crRNA و یک crRNA فعال کننده (tracrRNA) است که با توالی‌های DNA هدف جفت می‌شود و به Cas9 اجازه می‌دهد تا یک DSB خاص مکان را به DNA وارد کند.TracrRNA: crRNA معمولاً به صورت یک کمپلکس RNA منفرد (sgRNA) طراحی می‌شود. عملکرد ساختار دو جزئی sgRNA و Cas9 آسان است. ویرایش چندگانه یک مکان هدف را می‌توان با تولید sgRNAهای متعدد به دست آورد. در مجموع، انتهای ۵' یک توالی DNA هدف خاص را از طریق جفت شدن باز Watson-Crick تشخیص می‌دهد، در حالی که نوکلئاز Cas9 به انتهای ۳' sgRNA متصل می‌شود و باعث ایجاد DSB هدف در حدود ۳ جفت باز می‌شود.(۲۸،۲۹)

سیستم CRISPR دارای دو کلاس مجزا است: کلاس I و کلاس II. کلاس I شامل انواع I، III و IV است که توسط پروتئین‌های Multi-Cas تعریف شده‌اند، در حالی که کلاس II شامل انواع II، V و VI بر اساس عوامل Cas9، Cas12 (Cpf1) و Cas13 به طور جداگانه است. نوع I معمولاً برای ویرایش ژن‌ها با به کارگیری نوکلئازها و آبشارهای Cas3 یا فقط با تنظیم بیان ژن در آبشار استفاده می شود.(۳۰) سیستم‌های CRISPR-Cmr یا -Csm نوع III می‌توانند با هدف‌گیری RNA خاص توالی و هدف‌یابی DNA مستقل از توالی و رونویسی جفت شوند. بنابراین خاموش کردن ژن و ویرایش ژنوم با این سیستم را امکان پذیر می-کند.(۳۱) در مقایسه با دو حوزه نوکلئاز Cas9، Cas12 حاوی یک دامنه نوکلئاز RuvC است که به طور غیر

اختصاصی DNA دو رشته‌ای (dsDNA) یا تک رشته‌ای (ssDNA) را قطع می‌کند(۳۲) و Cas13 شامل دو دامنه HEPN است که به طور خاص RNA را می‌شکند.(۳۳) از آنجا که کشف مداوم پروتئین‌های Cas به طور طبیعی و استفاده از پروتئین‌های Cas مهندسی شده امکان انتخاب یک ابزار CRISPR مناسب را از مجموعه گسترده‌ای از ابزارها برای گسترش پتانسیل درمانی فراهم می‌کند.(شکل ۱)



شکل ۱: پروتئین‌های کاس به طور طبیعی و پروتئین‌های کاس مهندسی شده. این سیستم‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند: کلاس I از پروتئین‌های Cas متعدد برای تشکیل کمپلکس‌های مؤثر استفاده می‌کند، در حالی که کلاس II فعالیت هدف‌گیری و نوکلئازی را با یک پروتئین Cas منفرد انجام می‌دهد. a) نوع I-E که به نام آبشار نیز شناخته می شود، نوکلئاز DNA است. b) نوع III یک نوکلئاز DNA/RNA است. فعال سازی دامنه‌های HD و Palm زیرواحد Cas10 برای میانجی‌گری ایمنی بسیار مهم است. c) نوع II(Cas) دارای نقوش مجاور یک پروتوسپیسر GC بالا (PAM) است. TracrRNA: crRNA معمولاً به صورت یک

کمپلکس RNA منفرد (sgRNA) طراحی می‌شود. Cas9 گسترده‌ترین پروتئین است. d) نوع V (cas12) دارای سطح بالایی از AT PAM است، می‌تواند crRNA خود را پردازش کند و دارای یک سایت پردازش RNA است. e) نوع VI (Cac13) به PAM نیاز ندارد، به طور خاص RNA را هدف قرار می‌دهد. پروتئین Cas9 به دلیل معرفی جهش‌های D10A و H840A به ترتیب در حوزه‌های RuvC و HNH فعالیت برش خود را از دست می‌دهد.F و g) فعال‌سازی CRISPR (CRISPRa) و تداخل CRISPR (CRISPRi)، که با به‌کارگیری حوزه‌های مؤثر مختلف، ژن‌های هدف را فعال یا سرکوب می‌کنند، که منجر به مدولاسیون رونویسی و اپی‌ژنتیکی زمانی می‌شود.

نتایج و بحث

نقش برجسته فناوری CRISPR-Cas9 در سلول درمانی

هدف ایمونوتراپی سرطان فعال کردن سیستم ایمنی در حالت مهاری ناشی از TME و بازیابی توانایی آن در کشتن سلول‌های تومور است.(۳۴) به طور کلی، سلول درمانی استخراج سلول‌های T، سلول‌های NK و غیره از بیماران و توسعه فعالیت ضد توموری آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی است. علاوه بر این، قبل از انفوزیون، شیمی‌درمانی پیش شرطی لازم است، و سپس این سلول‌ها به بدن تزریق می‌شوند و امکان درمان فردی سرطان را فراهم می‌کنند. در مقایسه با شیمی درمانی سنتی و روش‌های دیگر، سلول درمانی در صورت استفاده صحیح کمتر سمی و بی‌خطرتر است.(۳۵)

کاربرد CRISPR در سلول‌های مسلح CAR-T درمانی با CRISPR

در بیماران سرطانی، سیستم ایمنی تمایل به تحریک ضعیف و سرکوب بالا در TME دارد. علاوه بر این، سلول‌های T معمولاً شرایط فنوتیپی و عملکردی ایجاد می‌کنند که نشان دادن اثرات ضد توموری مانند تکثیر ضعیف و آپوپتوز شدید را دشوار می‌کند.(۳۶) مولکول‌های مناسب را می‌توان از طریق CRISPRCas9 تجویز کرد، بنابراین CAR-T می‌تواند خود را برای تقویت اثر ایمونوتراپی مسلح کند.

ایجاد "ستاره‌های به روز" برای ایمونوتراپی سرطان – سلول‌های CAR-T آلوژنیک "آماده"

بسته به منبع سلول‌های T، دو نوع سلول درمانی CAR-T داریم: اتولوگ یا آلوژنیک. هر دو درمان سلولی CAR-T مورد تایید FDA اتولوگ هستند (۳۷) با این حال، درمان اتولوگ در مقایسه با درمان آلوژنیک دارای محدودیت‌های متعددی است. بر این اساس، ما خوشحالیم که متوجه شدیم که CRISPRCas9 می‌تواند سلول‌های CAR-T آلوژنیک «خارجی» تولید کند. در مقایسه با سلول‌های CAR-T آلوژنیک "آماده" اتولوگ، مزایای زیادی دارند (۳۸) از جمله ۱) کاهش هزینه و زمان، امکان تولید فوری CAR-T را برای بیماران مبتلا به بیماری به سرعت پیشرونده (مانند بدخیمی های تهاجمی) فراهم می‌کند. ۲) ارائه

سلول‌های T با کیفیت بالا و مقدار کافی، غلبه بر محدودیت های تولید لنفوپنی، با قابلیت مدیریت ۳) کاهش نسبی در ناهمگونی، اجرای تولید استاندارد CAR-T، و درمان کارآمد چندین بیمار.

نتیجه گیری

تبدیل سیستم CRISPR به یک ابزار ویرایش ژن، انقلابی در علوم زیستی ایجاد کرده است. نسل بعدی فناوری‌های ویرایش ژن، تطبیق پذیری سیستم CRISPR را گسترش داده و ابزارهای قدرتمند جدیدی را برای مطالعه سیستم‌های بیولوژیکی و بیماری‌های انسانی فراهم کرده است. فناوری‌های CRISPR می‌توانند درمان‌های مهمی برای انسان باشند. علاوه بر این، توانایی عالی برای از بین بردن ژن‌های خاص بدون بازارایی کروموزومی در مقیاس بزرگ با معرفی زودرس یک کدون توقف زودرس یا اختلال در محل اتصال دارد. این ویژگی اجازه می‌دهد تا چندین ژن در سلول‌های T از بین برود تا سلول‌های CAR T کارامدتر و ایمن‌تر ایجاد شود. اگر چه ویرایش اولیه در حال حاضر کمتر در تحقیقات انکولوژی استفاده می‌شود، اما یک استراتژی جدید برای توسعه تکنیک‌های جهش ژنی قوی‌تر در اینده فراهم می‌کند. توسعه ایمن زایی و موثر در داخل بدن همچنان بزرگترین چالش برای استفاده بالینی گسترده CRISPR / Cas9 در درمان انسانی است.

اکثر مطالعات بالینی مدرن از ناقلین ویروسی استفاده می‌کنند، اما مشکلاتی مانند ایمنی‌زایی، سمیت سلولی و سرطان‌زایی هنوز باید بر آن غلبه شود.(۳۹) توسعه سریع فناوری نانو به آزاد شدن پتانسیل پلیمرها و لیپیدهای حامل کمک می‌کند. گردش خون، جذب سلولی و هدف قرار دادن دقیق از طریق اصلاح سطح برای کاهش اثرات هدف. با این حال، سیستم نانوهامر ازاد شده پایدار هنوز باید بر بسیاری از موانع فیزیکی غلبه کند تا ویرایش CRISPR / Cas را در محل تومور اجرا کند و درمان دقیق را انجام دهد. اگر چه نانومواد موجود نمی‌توانند نیازهای کاربردهای بالینی در مقیاس بزرگ را براورده کنند، توسعه مواد زیستی کمک خواهد کرد .اگرچه غربالگری CRISPR هنوز در دوران کودکی خود است، اما وعده زیادی در کشف ژن های مهم سرطان و اهداف درمانی دارد. مطالعات قبلی از غربالگری CRISPR برای شناسایی عملکرد سلول‌های ایمنی و مکانیسم‌های تعامل با سلول‌های سرطانی استفاده کرده‌اند. در حالی که تحقیقات اینده بر روی سایر سلول های تنظیم کننده ایمنی برای شناسایی مسیرهای تنظیمی جدید در TME تمرکز خواهد کرد. مدل‌های PDX و GEMM بهترین ابزار فعلی برای توصیف ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک تومورهای بیماران هستند.

علاوه بر این، سیستم CRISPR / Cas9 پتانسیل زیادی برای مبارزه با ویروس‌های سرطان‌زا دارد. استفاده از سیستم CRISPR / Cas9 با هدف قرار دادن HPV18-E6 یا HPV16-E6 منجر به کاهش ظرفیت تکثیر و افزایش اپوپتوز در رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم HPV مثبت شد، در حالی که سلول‌های HPV منفی

تحت تاثیر قرار نگرفتند و ایده جدیدی برای ژن درمانی سرطان ارائه دادند.(۴۰) به همین ترتیب، سیستم CRISPR تاثیر عمیقی بر تحقیقات سرطان داشته است و در اینده نقش مهمی ایفا خواهد کرد.

منابع:

1. Charpentier E, Doudna JA. 2013. Biotechnology: rewriting a genome. Nature 495(7439):50–51
2. Charpentier E, Marraffini LA. 2014. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. Curr.Opin. Microbiol. 19:114–19
3. Doudna JA, Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science346(6213):1258096
4. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 157(6):1262–78
5. Wang H, La Russa M, Qi LS. 2016. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. Annu. Rev. Biochem.85:227–64
6. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. 2016. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 17(1):5–15
7. Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. Nat. Rev. Genet. 16(5):299–311
8. Barrangou R, Doudna JA. 2016. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. Nat. Biotechnol. 34(9):933–41
9. Heidenreich M, Zhang F. 2016. Applications of CRISPR–Cas systems in neuroscience. Nat. Rev. Neurosci.17(1):36–44
10. Maeder ML, Gersbach CA. 2016. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. Mol. Ther.24(3):430–46
11. Strong A, Musunuru K. 2017. Genome editing in cardiovascular diseases. Nat. Rev. Cardiol.14(1):11–20
12. Xiong X, Chen M, Lim WA, Zhao D, Qi LS. 2016. CRISPR/Cas9 for human genome engineering and disease research. Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 17(1):131–54
13. Wyld L, Audisio RA, Poston GJ. The evolution of cancer surgery andfuture perspectives. Nat Rev Clin Oncol. 2015;12(2):115–24
14. Schaue D, McBride WH. Opportunities and challenges of radiotherapyfor treating cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2015;12(9):527–40.
15. Galmarini D, Galmarini CM, Galmarini FC. Cancer chemotherapy: a critical analysis of its 60 years of history. Crit Rev Oncol Hematol. 2012;84(2):181–99
16. Baudino TA. Targeted cancer therapy: the next generation of cancertreatment. Curr Drug Discov Technol. 2015;12(1):3–20.
17. Li X, Lovell JF, Yoon J, Chen X. Clinical development and potential ofphotothermal and photodynamic therapies for cancer. Nat Rev ClinOncol. 2020;17(11):657–74

18. Deng X, Shao Z, Zhao Y. Solutions to the drawbacks of Photothermaland photodynamic cancer therapy. Adv Sci. 2021;8(3):2002504
19. Coffey JC, Wang JH, Smith MJ, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, RedmondHP. Excisional surgery for cancer cure: therapy at a cost. Lancet Oncol.2003;4(12):760–8
20. Coffey JC, Wang JH, Smith MJ, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, RedmondHP. Excisional surgery for cancer cure: therapy at a cost. Lancet Oncol.2003;4(12):760–8
21. Nystrom H. Extracellular matrix proteins in metastases to the liver -composition, function and potential applications. Semin Cancer Biol.2021;71:134–42
22. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system tobattle cancer. J Clin Invest. 2015;125(9):3335–

24. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system tobattle cancer. J Clin Invest. 2015;125(9):3335–

25. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, et al. 2014. Structures of Cas9 endonucleases
reveal RNA-mediated conformational activation. Science 343(6176):1247997

26. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S,et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.Science. 2007;315:1709–1

27. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling thestructural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Micro-biol. 2014;12:479–92.

28. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new fron-tier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science.2014;346(6213):1258096.

29. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E.A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptivebacterial immunity. Science.2012;337:816–21

30. Zheng Y, Li J, Wang B, Han J, Hao Y, Wang S, et al. Endogenous typeI CRISPR-Cas: from foreign DNA defense to prokaryotic engineering.Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:62

31. Liu T, Pan S, Li Y, Peng N, She Q. Type III CRISPR-Cas system: introduc-tion and its application for genetic manipulations. Curr Issues Mol Biol.2018;26:1–4.

32. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al.CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-strandedDNase activity. Science.2018;360:436–9.

33. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM,Cox DBT, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guidedRNA-targeting CRISPR effector. Science. 2016;353:f5573

34. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MW. Combination cancer immuno-therapies tailoredto the tumour microenvironment. Nat Rev Clin Oncol.2016;13(3):143–58.

35. Lin Y, Okada H. Cellular immunotherapy for malignant gliomas. ExpertOpin Biol TH. 2016;16(10):1265–75

36. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion,senescence, and stemness in the tumor microenvironment. Curr OpinImmunol. 2013;25(2):214–21

37. Zhou X. Empowering chimeric antigen receptor T-cell therapy with CRISPR. Biotechniques. 2020;68:169–71

38. Torikai H, Cooper LJ. Translational implications for off-the-shelfimmune cells expressing chimeric antigen receptors. Mol Ther.2016;24(7):1178–86

39. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms withinthe gene therapy landscape. Signal Transduct Target Ther. 2021;6:53.

40. Ehrke-Schulz E, Heinemann S, Schulte L, Schiwon M, Ehrhardt A. Adeno-viral vectors armed with PAPILLOMAVIRUs oncogene specific CRISPR/Cas9 kill human-papillomavirus-induced cervical cancer cells. Cancers(Basel). 2020;12(7):1934.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

جداسازی باکتریوفاژ لیز کننده باکتری اشریشیا کلی

اعظم مختاری[۱]، رضا عامری [*۱]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران Rezaameri058@gmail.com

*نویسنده مسئول: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: اشرشیاکلی یکی از عوامل مهم بیماری زایی مرتبط با ورم پستان گاوی است که ماستیت ناشی از آن به طور معمول با علائم بالینی شدید همراه است. E. coli عمدتا از موارد با تعداد سلول سوماتیک بالا (SCC) در گاوداری های شیری جدا می شود. این ارگانیسم به طور کلی یک پاتوژن محیطی محسوب می شود که از طریق کانال پستان وارد پستان شده و باعث آسیب بافتی به غدد پستانی می شود. بعلاوه، میزان مقاومت این باکتری در برابر چندین آنتی بیوتیک طی سال¬های اخیر افزایش یافته است. بنابراین در مطالعه حاضر جداسازی فاژ علیه این باکتری به عنوان یک راهکار درمانی مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۰ جدایه ای کلای از نمونه‌های شیر ورم پستانی جداسازی شد. پس از اخذ نمونه‌ی فاضلاب، باکتریوفاژها به طریق فیلتراسیون و غنی سازی در کشت شبانه‌ی اشرشیا کلی جدا شدند. حضور باکتریوفاژ با استفاده از مشاهده‌ی پلاک در آگار دولایه تشخیص و توسط تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM تأیید شد.

نتایج: نتایج مشاهده با میکروسکوپ الکترونی حضور باکتریوفاژهایی با مشخصات ظاهری خانواده سیستوویریده را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: این باکتریوفاژ توانست تمام جدایه‌های E. coli را در محیط کشت لیز کند. بنابراین این فاژ می‌تواند به عنوان یک عامل بالقوه مناسب در درمان این عفونت‌ها مورد توجه قرار گیرد، هرچند ارزیابی عملکرد بالینی آن در حیوان و انسان ضروری است.

واژه‌های کلیدی: اشریشیا کلی، باکتریوفاژ، عفونت

Isolation of bacteriophage lysing Escherichia coli

Azam Mokhtari[1], Reza Ameri [1*]

1- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

* Corresponding author: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran , Rezaameri058@gmail.com

Abstract

Introduction and objective: Escherichia coli is one of the important pathogenic factors associated with bovine mastitis, and the resulting mastitis is usually associated with severe clinical symptoms. E. coli is mainly isolated from cases with high somatic cell count (SCC) in dairy cattle. This organism is generally considered an environmental pathogen that enters the breast through the mammary canal and causes tissue damage in the mammary glands. In addition, the resistance of this bacterium to several antibiotics has increased in recent years. Therefore, in the present study, phage isolation against this bacterium was considered as a therapeutic solution.

Materials and methods: In this study, 20 isolates were isolated from mastitis milk samples. After taking the wastewater sample, bacteriophages were isolated through filtration and enrichment in Escherichia coli overnight culture. The presence of bacteriophage was detected by observing plaque in double-layer agar and confirmed by TEM electron microscope image.

Results: The results of electron microscope observation showed the presence of bacteriophages with the appearance characteristics of Cystoviridae family.

Discussion and conclusion: This bacteriophage was able to lyse all E. coli isolates in the culture medium. Therefore, this phage can be considered as a suitable potential agent in the treatment of these infections, although it is necessary to evaluate its clinical performance in animals and humans.

Key words: Escherichia coli, bacteriophage, infection

مقدمه:

اشریشیاکلی در پستان گاو شیری چه در حالت سلامت و چه همراه با تورم پستان مشاهده شده است و عامل بعضی از تورم‌های حاد پستانی، این ارگانیسم می‌باشد. برخی متخصصین براین باورند که غالباً ورم پستان ناشی از اشریشیاکلی با تظاهری از تب شدید، کم شدن سریع شیر، ترشح ماده زردرنگ قلیایی از نوک سرپستانک آلوده که محتوی مقدار زیادی لوکوسیت و گاهی نیز همراه با ذرات قرمز رنگی می‌باشد، بروز پیدا می‌کند. این آلودگی به اشکال مختلف وجود دارد که عبارتند از فرم حاد، مزمن و تحت بالینی، و بسته به مقاومت دام‌ها، در بعضی حالات به صورت موضعی وجود داشته و پستان آلودگی مختصری را نشان می‌دهد. در بعضی گاوهای حساس عوارض و علائم عمومی متعاقب آلودگی به فرم حاد دیده می‌شود و منجر به تب، توکسمی و عوارض آن و نهایتا مرگ می‌گردد [۱].

تورم پستان ناشی از اشریشیاکلی جزء ورم پستان‌های محیطی است چرا که این ارگانیسم در محیط به‌دلیل دفع روده ای آن، فراوان وجود دارد و بدلیل عدم رعایت بهداشت در زمان شیردوشی و استفاده از وسایل آلوده در هنگام شیردوشی وارد کانال پستانی شده و در مدت زمان فاصله بین دوشش‌ها با تشکیل کلنی‌های ضعیف می‌تواند پستان را مستعد ورم پستان کند. لیپوپلی ساکارید (LPS)، جزء دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی، به عنوان عامل حدت اولیه در باکتری های کلیفرم در نظر گرفته می‌شود .که مسئول اکثر واکنش های پاتوفیزیولوژیک در ورم پستان ناشی از اشریشیا کلای می‌باشد که پس از مرگ سلولی و در طی تکثیر از باکتری آزاد می‌شود [۲]. علائم بالینی در ورم پستان کلیفرم حاد توسط LPS و انتشار متعاقب آن واسطه های التهابی القا می‌شود. هیچ عامل تعیین کننده خاصی برای حدت در E. coli جدا شده در ورم پستان شناسایی نشده است . علائم بالینی ماستیت E. coli می‌تواند از التهاب خفیف ، با تغییرات جزئی در ظاهر شیر و بدون علائم سیستمیک، تا علائم بالینی شدید و کاهش شدید تولید شیر متفاوت باشد. شدت ورم پستان حاد E. coli بین گاوهای منفرد بسیار متفاوت است و با سن گاو و مرحله شیردهی مرتبط است [۳]. گاوهایی که در طول دوره نفاس (postpartum period) آلوده می شوند اغلب می‌میرند و تنها ۳۰ تا ۵۰ درصد از آنها به شیردهی کامل باز می‌گردند [۴] بدون توجه به درمان ضد میکروبی و حمایتی عامل اصلی تعیین کننده شدت ورم پستان E. coli رشد باکتری در مرحله حاد عفونت، قبل از هجوم موثر نوتروفیل‌ها است [۵]. باکتریمی ممکن است در موارد ورم پستان E. coli ایجاد شود و به طور قابل توجهی در گاوهایی با علائم بالینی شدید مشاهده شده است [۶].

عفونت ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش است، بنابراین استفاده از روش‌های جایگزین باعث کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود که یکی از این روش‌ها استفاده از باکتریوفاژها می‌باشد [۷]. باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که می‌توانند باکتری‌ها را آلوده کنند و به عبارت دیگر میزبان این دسته از ویروس‌ها، باکتری‌ها می‌باشند. باکتریوفاژها دارای دونوع چرخه زندگی تخریب‌گر و لایزوژنیک

هستند [۸]. درصورتی که پس از ورود ژنوم باکتریوفاژ به درون سلول میزبان به‌صورت مستقل تکثیر یافته و سلول را تخریب کند به آن فاژ تخریب‌گر می‌گویند. از این خصوصیت باکتریوفاژهای تخریب‌گر در پدیده فاژتراپی استفاده می‌شود. اما در فاژهای لایزوژنی ژنوم فاژ وارد ژنوم میزبان شده که در این حالت به آن پروفاژ می‌گویند و یا درون سلول باقی‌مانده و هیچ گونه آسیبی به سلول میزبان وارد نمی‌کند [۹]. باکتریوفاژ اولین‌بار با موفقیت به درمان عفونت‌های باکتریایی در یک دهه قبل از پنی‌سیلین کشف شد و مورد استفاده قرار گرفت. اغلب باکتریوفاژها در محیط‌های آبی جدا شده‌اند. در حال‌حاضر تعدادی از دانشمندان و پزشکان باکتریوفاژها را به‌عنوان یک گزینه درمانی، در درمان عفونت‌های باکتریایی به‌دنبال دارند [۱۰]. از فاژ درمانی برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس، اشریشیا کلی مقاوم به متی‌سیلین، استرپتوکوکوس‌ها و همین طور باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از جمله اشریشیا کلی استفاده شده است [۱۱،۱۲]. با توجه به موارد ذکر شده و اهمیت باکتری اشریشیا کلی در پزشکی لازم است که فعالیت بیشتری در زمینه شناسایی فاژهای مؤثر بر باکتری نام برده انجام شود. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی فاژهای مؤثر بر ۲۰ جدایه اشریشیا کلی بود.

مواد و روش‌ها

خالص سازی باکتری‌ها:

ابتدا ۲۰ جدایه اشریشیا کلی جهت احیا و خالص سازی روی محیط های افتراقی کشت و پاساژ داده شد. کلونی های تک به دست آمده پس از تایید با آزمون های بیوشیمیایی IMViC برای جداسازی باکتریوفاژمورد استفاده قرار گرفتند.

نمونه‌گیری و آماده‌سازی فاضلاب:

برای این کار ابتدا با استفاده از بطری شیشه‌ای استریل دربدار، از تصفیه خانه واقع در استان فارس، نمونه برداری شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. برای رسوب محتویات فاضلاب، ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ g سانتریفیوژ و سپس به‌وسیله فیلتر سرنگی ۴۵/ استریل، فیلتر شدند.

آماده‌سازی باکتری‌ها و اضافه کردن پساب:

ابتدا به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع دوبار غلظتBHI ، یک میلی‌لیتر محیط کشت شبانه باکتری اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد. سپس به آن ۲۰ میلی‌لیتر از فاضلاب فیلتر شده اضافه و مجددا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شد.

سپس سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ و سوپرناتانت به‌وسیله فیلتر سرنگی ۴۵/ استریل، فیلتر شد.

لکه گذاری به روش آگار دو لایه:

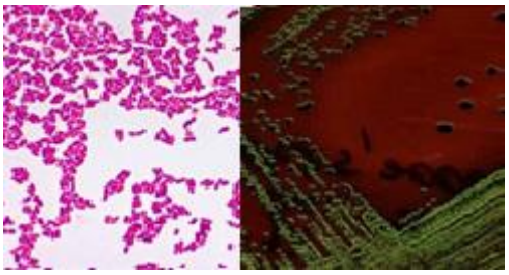
برای این کار ابتدا محیط کشت نیمه جامد BHI (حاوی ۷/ ٪ آگار) تهیه کرده، درون لوله‌های استریل به حجم ۹ سی‌سی ریخته و استریل شد. پس از اینکه دمای محیط کشت نیمه جامد به حدود ۴۵ درجه سانتیگراد رسید به آن ۱/ میلی لیتر محیط کشت شبانه باکتری اضافه و با تکان دادن باکتری به‌طور یکنواخت در محیط کشت پخش و به محیط کشت جامد و استریل BHI (حاوی ۱/۵ ٪ آگار) اضافه شد (به-صورت دو لایه). وقتی آگار رویی سفت شد ۲۰ میکرولیتر از محلول فیلتر شده در مرکز محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت مشاهده لکه شفاف در مرکز محیط کشت نشان دهنده وجود باکتریوفاژ تخریب‌گر علیه باکتری مورد مطالعه در محلول فیلتر شده بود.

بررسی ریخت‌شناسی باکتریوفاژها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی:

برای بررسی شکل ظاهری، اجزای تشکیل دهنده فاژ و تشخیص خانواده آن لازم است که از میکروسکوپ الکترونی کمک گرفته شود. برای مشاهده راحت‌تر باکتریوفاژها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی تیتر بالایی از باکتریوفاژ نیاز بود. به همین جهت پس از فیلتر نمودن سوسپانسیون با فیلتر ۴۵/ میکرومتر، مجددا این سوسپانسیون به‌وسیله فیلتر ۲۲/ میکرومتر فیلتر شد. این کار باعث می شد به علت کوچک بودن قطر منافذ فیلتر ۲۲/ نانومتری ناخالصی‌های بیشتری توسط فیلتر به دام افتاده و نهایتا تصویر واضح‌تر شود. سپس سوسپانسیون فاژی به‌مدت ۹۰ دقیقه با دور g ۲۰۰۰۰ سانترفیوژ شد. سپس محلول رویی به آرامی از لوله خارج و لکه سفید رنگی که به جداره لوله چسپیده شده بود در ۵۰ میلی لیتر بافر حل و مجددا طبق شرایط فوق سانترفیوژ شد. پس از اتمام دوره سانترفیوژ محلول رویی خارج و لکه سفید موجود در لوله، در ۲۵ میلی‌لیتر بافر حل شد. برای رنگ‌آمیزی فاژها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به‌روی گرید مسی پوشیده شده با کربن (۴۰۰ مش) منتقل و ۲۱۰ ثانیه در این حالت قرار داده شد. در ادامه گرید ۲۰ ثانیه در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس با رعایت کلیه جنبه‌های ایمنی، ۲۰ میکرولیتر اورانیول استات ۲٪ به روی گرید ریخته شد، و پس از ۱۶۰ ثانیه، اورانیول استات اضافه به‌وسیله کاغذ خشک کن به آرامی گرفته و به مدت نیم ساعت جهت خشک شدن کامل گرید، در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. نکته قابل توجه این است که به دلیل سمیت بالای اورانیل استات هنگام کار با این ماده باید کلیه نکات ایمنی رعایت شود.

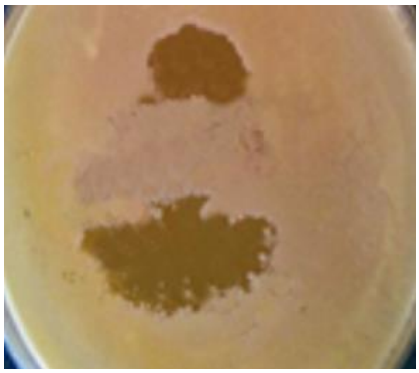
یافته‌های پژوهش:

کلنی‌های خالص شده ۲۰ جدایه اشریشیا کلی پس از کشت و احیا برروی محیط EMB مشاهده و بعد از تهیه گسترش رنگ آمیزی گرم شد. نتایج تستIMViC برای ۲۰ جدایه باکتری‌ها نشاندهنده ی صحت حضور جدایه اشریشیا کلی بود.



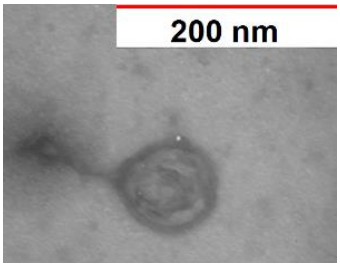
تصویر۱: کشت خالص اشریشیا کلی در محیط **EMB** و رنگ آمیزی گرم

پس از نمونه‌گیری از فاضلاب استان اصفهان، باکتریوفاژهای تخریب‌گر جداسازی شدند و پلاک فاژی برروی محیط‌های کشت کاملا مشخص بود. این پلاک‌ها نشان دهنده، لیتیک بودن فاژ جدا سازی شده، روی ۲۰ جدایه اشریشیا کلی بود.



تصویر۲ :تصویر کشت دولایه روی پلیت و مشاهده پلاک‌های فاژی

در تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی TEM، فاژ اصلی در مورد همه پلاک‌ها مورد شناسایی قرار گرفت. ساختار باکتریوفاژ اختصاصی جداسازی شده شبیه به اعضای سیستوویریده (cystoviridae) بود. سر کروی داشته و دارای انولوپ بود. داشتن این خصوصیات به همراه وجود RNA پلیمراز باعث شده اعضای سیستوویریده شباهت زیادی به رئوویروس ها داشته داشته باشند.



تصویر ۳: باکتریوفاژ اختصاصی اشریشیا کلی

بحث و نتیجه‌گیری:

فاژهای لیتیک از این نظر که فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی دارند مشابه آنتی بیوتیک‌ها هستند. با این حال، فاژهای درمانی حداقل از نظر تئوری مزایایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. فاژها در درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی خیلی کارآمدتر و مؤثرتر از آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده‌اند. علاوه بر استفاده برای از بین بردن باکتری‌ها، فاژها ویژگی میزبانی معینی دارند که می‌توانند برای شناسایی و تایپینگ عفونت‌های باکتریایی مورد بهره برداری قرار گیرند [۱۳]. فاژ تراپی که با تشخیص سریع اهداف باکتریایی و تعیین حساسیت آن‌ها به فاژهای اختصاصی روش مؤثری در مهار عفونت‌های باکتریایی است [۱۴].

دینی و همکاران در سال ۲۰۱۶ میلادی مطالعه‌ای برای درمان عفونت اشرشیا کلی انتروهموراژیک با استفاده از فاژ و پروبیوتیک انجام دادند. این درمان ترکیبی باعث کاهش تعداد سلول های آپوپتوتیک به میزان ۵۷/۳٪ و کاهش چسبندگی اشرشیا کلی انتروهموراژیک به تک لایه‌ی سلولی به میزان log CFU 2/1 شد. در این پژوهش استفاده هم‌زمان از فاژها و پروبیوتیک ها هیچ اثر آنتاگونیستی نشان نداد و ذوب و انجماد مکرر نیز بر فعالیت ضد پاتوژنیک این دو ماده تأثیری نداشت[۱۵].

جوزاک -کیرک و همکاران در سال ۲۰۱۶ میلادی یک آنالیز در مقیاس وسیع برای شناسایی بیوفیزیکی و زیستی باکتریوفاژها انجام دادند. ۸۳ باکتریوفاژ از پساب شهری به دست آمد و علیه ۶۰ سویه اشرشیا کلی شامل سویه‌های انتروهموراژیک، ۱۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا، ۴ سویه سالمونلا انتریتیکا، ۳ سویه استافیلوکوکوس سیوری و ۶ انتروکوکوس فکالیس استفاده شدند. این جمعیت باکتریوفاژ تنوع زیستی فراوانی در نوع میزبان، اندازه‌ی پلاک و مورفولوژی آن، دمای رشد، pHقابل تحمل، حساسیت به استرس اسمزی و حساسیت به دترجنت‌ها و حلال‌های آلی نشان داده و به لحاظ ریخت شناسی در مقاطع میکروسکوپ الکترونی نیز متنوع بودند. تعداد ۷ باکتریوفاژ نیز ویژگی‌های زیستی غیر معمولی نظیر توانایی تشکیل پلاک در دمای پایین (۴ درجه سانتیگراد)، مقاومت به دمای بالا (۶۲ یا ۹۵ درجه) یا بقا در حضور حلال‌های آلی (اتانول،

استون، DMSOو کلروفرم) یا دترجنت‌هاSDS)، CTAB،سارکوزیل) نشان می‌دادند که بیانگر پتانسیل استفاده از آنها در کاربردهای بیوتکنولوژی بود [۱۶].

جمال و همکاران طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ فاژ MJ1 اختصاصی علیه سویه های اشرشیا کلی را به مدت ۱ ساعت در دماهای (۳۷ تا ۸۰ سانتی گراد) وpH های مختلف (۳ تا ۱۱) انکوبه کردند و مشخص شد فاژ بیشترین پایداری را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داشت. همچنین مشاهده شد فاژ مورد نظر پایداری خوبی در دماهای ۴۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد از خود نشان داد ولی در دماهای بالاتر از آن جدایه اشرشیا کلی ارزیابی شد. میکروگراف‌های الکترونی و آنالیز ژنوم انجام شد و فاژ جدا شده از خانواده فعالیت فاژی به طور چشمگیری کاهش یافت به‌طوریکه در ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد فاژ به طور کامل غیر فعال گردید [۱۷].

آسکورا و همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی به جستجوی باکتریوفاژ لیتیک مؤثر بر رشد سویه‌های انتروهموراژیک و انتروپاتوژنیک اشرشیا کلی جدا شده از گاو و کارگران گاوداری پرداختند. باکتریوفاژ با تشکیل پلاک منفرد مورد جداسازی قرار گرفت. حساسیت این پلاک به روش لکه‌گذاری برای ۴۴ سیفوویریده تشخیص داده شد. این فاژ به محیط کشت سویه هایO26 ، O111و O124تلقیح گردید و بر روی تمام سویه‌ها اثر لایتیک داشت و این گروه تحقیقاتی فاژ جداسازی شده (øZE1) را به عنوان یک کنترل کننده‌ی زیستی سویه‌های انتروهموراژیک و انتروپاتوژنیک اشریشیا کلی معرفی کردند [۱۸].

پریاسمی و ساندرام در سال ۲۰۱۳ گزارش دادند که باکتریوفاژها قادر به از بین بردن باکتری‌های پاتوژن نظیر اشرشیا کلی را در پساب بیمارستانی هستند [۱۹]. راگو و همکاران در سال ۲۰۱۲ با انجام مطالعه‌ای نتیجه گرفتند که می‌توان از باکتریوفاژها در پاک سازی محیط زیست، کنترل بیوفیلم‌ها و نیز تصفیه‌ی آب و فاضلاب استفاده نمود [۲۰].

اشنایدر و همکاران در سال ۲۰۱۲ میلادی باکتریوفاژهایی برای کنترل اشرشیا کلی انتروهموراژیک در محصولات غذایی وارد نموده و خصوصیات آن‌ها را بررسی کردند. لیزات فاژ جدا شده در این مطالعه باعث ۲/۵ Logکاهش اشریشیا کلی در فلفل سبز و ۱/۵ Log کاهش تیتر این باکتری در بیبی اسفناج شده و کوکتل فاژها لود باکتری را بیشتر کاهش می‌داد. در این مطالعه مشخص شد نگهداری محصول فرآوری شده با لیزات فاژ در یخچال تأثیر فاژ را افزایش می‌داد [۲۱].

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مادی و معنوی دانشگاه شهرکرد به انجام رسید. بدین وسیله از مسئولین این مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Shimazaki KI, Kawai K. Advances in lactoferrin research concerning bovine mastitis. Biochemistry and Cell Biology. 2017;95(1):69-75.
2. Liu Y, Liu G, Liu W, Liu Y, Ali T, Chen W, Yin J, Han B. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of Escherichia coli associated with bovine mastitis. Research in microbiology. 2014 May 1;165(4):273-7
3. Larsen T, Røntved CM, Ingvartsen KL, Vels L, Bjerring M. Enzyme activity and acute phase proteins in milk utilized as indicators of acute clinical E. coli LPS-induced mastitis. Animal. 2010 Oct;4(10):1672-9.
4. Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, McSweeney KD, Dinsmore RP, Goodell G, Callan RJ. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2001 Oct 1;219(7):976-81.
5. Wenz JR, Garry FB, Barrington GM. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2006 Jul 15;229(2):259-62.
6. Jones TO. Escherichia coli mastitis in dairy cattle-a review of the literature. Veterinary Bulletin (United Kingdom). 1990.
7. Lehtolainen T, Pohjanvirta T, Pyörälä S, Pelkonen S. Association between virulence factors and clinical course of Escherichia coli mastitis. Acta Veterinaria Scandinavica. 2003 Dec;44(4):1-3.
8. komeyjani M, Bozari M, Rahimi F. [Identification of gram-negative bacteria phages with high prevalence of wound infections and the possibility of using them for wound healing]. Thesis. 1394;1-108. (persian)
9. Golkar Z, Bagasra O, Jamil N. Experimental phage therapy on multiple drug resistant pseudomonas aeruginosa infection in mice. J Antivir Antiretrovir, 2013; 10:1-6.
10. Ackermann H-W. Basic phage electron microscopy. Bacteriophage: Methods and protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. 2009; 1: 113-126.
11. Hanlon G W. an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections, Int J Ant Bacteriophages. 2007; 30: 118-128.
12. Harper DR, Enright MC. Bacteriophages for the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. J Appl Microbiol 2011; 111:1-7.
13. Chanishvili N. Phage therapy—history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. Advances in Virus Research, 2012; 83: 3-40.
14. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, et al. Experimental Phage Therapy against Staphylococcus areus in mice. Journal of Atimicrobial Agents and Chemotheraphy, 2007; 51(8): 2765- 2773.
15. Dini C, Bolla PA, de Urraza PJ. Treatment of in vitro enterohemorrhagic Escherichia coli infection using phage and probiotics. Journal of Applied Microbiology, 2016; 121(1):78-88.

16. Jurczak-Kurek A, Gąsior T, Nejman-Faleńczyk B. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. Scientific Reports, 2016; 34338: 1-17.

17. Jamal M, Hussain T, Rajanna Das C, Andleeb S. Isolation and characterization of a Myoviridae MJ1 bacteriophage against multi-drug resistant Escherichia coli 3. Jundishapur Journal of Microbiology, 2015; 8, e25917.

18. Askora A, Merwad A, Gharieb RM, et al. A lytic bacteriophage as a biocontrol for some enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli strains of zoonotic risk in Egypt. Revue de medecine veterinaire, 2015; 166: 3-4, 76-83.

19. Periasamy D, Sundaram A. A novel approach for pathogen reduction in wastewater treatment. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 2013; 11(1):12.

20. Raghu HV, Gaare M, Manjunatha BM, Mishra S, Sawale P. Beneficial face of bacteriophages: Applications in food processing. International Journal for Quality research. 2012; 6(2): 101-108.

21. Snyder AB. Isolation and characterization of Bacteriophage for the control of Enterohemorrhagic Escherichia coli on fresh Produce. Thesis Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for Honors Research Distinction for the College of Arts and Sciences, The Ohio State University, 2012; 17-79.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

سنجش میزان تجزیه فنانترن توسط یک باکتری اکستریم هالوفیل

امیرارسلان کاویانی‌فرد

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ۴۶۹۷-۱۳۹۵، ایران.

Email: kavyanifarda@pnu.ac.ir

چکیده

فنانترن یک هیدروکربن آروماتیک و یکی از پرمخاطره‌ترین آلاینده‌های پساب صنایع مختلف همچون پالایشگاه‌های نفت، صنایع پتروشیمی و غیره است. این ماده از سمیت بالایی برخوردار بوده و میزان تجزیه‌ی زیستی آن بسیار کم است. باکتری *Haloferax*.sp KA3 یک سویه‌ی اکستریم هالوفیل است که قبلا از دریاچه نمکدان قشم جداسازی شد. هدف از این مطالعه بررسی میزان تجزیه هوازی فنانترن توسط این باکتری بود. بدین منظور، از محیط کشت پایه نمکی که حاوی فنانترن (به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی) استفاده شد. پس از یک دوره‌ی ۲۱ روزه، میزان فنانترن باقیمانده در محیط با کمک گاز گروماتوگرافی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد باکتری مورد مطالعه قادر است ۷۵,۹۰٪ از فنانترن را تجزیه کند. با در نظر گرفتن توان باکتری *Haloferax*.sp KA3 در تجزیه زیستی فنانترن، می‌توان از آن برای تیمار پساب‌ها آلوده به این ترکیب استفاده بهره برد.

کلمات کلیدی: فنانترن، *Haloferax*.sp KA3، گاز کروماتوگرافی، پساب.

Measurement of phenanthrene degradation rate by *Haloferax* sp. KA3 bacterium

Amirarsalan Kavyanifard

Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, 1395-4697, Iran.
E-mail: kavyanifarda@pnu.ac.ir

Abstract

Phenanthrene, an aromatic hydrocarbon, is one of the most dangerous effluent pollutants of various industries such as oil refineries, petrochemical industries, etc. This substance has high toxicity and its biodegradation rate is very low. *Haloferax* sp. KA3 bacterium is an extreme halophile strain that was previously isolated from Qeshm Salt Lake. The aim of this study was to investigate the aerobic degradation of phenanthrene by this bacterium. For this purpose, salt-based culture medium containing phenanthrene (as the only source of carbon and energy) was used. After a period of 21 days, the amount of phenanthrene remaining in the medium was measured using gas chromatography method. The results showed that the studied bacterium was able to decompose 75.90% of phenanthrene. Considering the ability of *Haloferax* sp. KA3 bacterium in biodegradation of phenanthrene, it can be used to treat wastewaters contaminated with this compound.

Keywords: phenanthrene, *Haloferax* sp. KA3, gas chromatography, wastewater.

مقدمه

فنانترن یک ترکیب هیدروکربنی آروماتیک متشکل از سه حلقه‌ی بنزن است. این ترکیب، بصورت یک پودر سفید رنگ است که دارای فلورسانس آبی رنگ می‌باشد. فنانترن تقریباً در آب نامحلول است اما در بیشتر حلال‌های آلی دارای غیر قطبی، مانند کلروفرم، تولوئن، اتر، اسید استیک و بنزن حل می‌شود[1].

یکی از دغدغه‌های سالم‌سازی پساب‌هایصنعتی،تیمار پسماندهای آلوده به ترکیبات هیدروکربنی پلی-آروماتیک است. اما به علت سمیت بالا و قابلیت تجزیه بیولوژیکی کم آنها، چالش‌های بزرگی در این مسیر وجود دارد. روش‌های فیزیکوشیمیایی مرسوم در تصفیه‌ی هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک، نمی‌تواند آنها را به‌طور کامل حذف کند و در مواردی حتی منجر به تولید محصولات خطرناک ناخوسته نیز می‌شود [2]. امروزه روش‌های متفاوتی برای تیمار و سالم‌سازی محیط‌های آلوده بکار گرفته می‌شود که در این میان، تیمار زیستی بدلیل زیست‌سازگار بودن با محیط و نداشتن پیامدهای بعدی؛ با اقبال بیشتری همراه بوده است. تجزیه‌ی زیستی، شامل شکستن مولکول‌های آلاینده با کمک میکروارگانیزم‌هاست که در نتیجه‌ی آن، ترکیبات آلاینده به مواد غیر خطرناک تبدیل شده و سپس وارد چرخه‌های بیوشیمیای می‌شوند [3]. گر چه شدت تجزیه‌ی زیستی تحت تاثیر فاکتورهای مختلف محیطی مانند ترکیب، غلظت و دسترسی زیستی به آلاینده، غلظت نمک، pH، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محیط اکسیژن در دسترس و غیره می‌باشد؛ اما انتخاب میکروارگانیزم تجزیه کننده که از پتانسیل بالاتری برخوردار باشد، مهمتریم عامل در نظر گرفته می‌شود [4].

باید در نظر داشت در محیط‌های شور، دسترسی زیستی به هیدروکربن‌ها در مقایسه با محیط‌های غیر شور؛ کمتر است. این امر بخاطر آنست که نمک‌های محلول در آب، باعث کاهش انحلال هیدروکربن‌ها در آب می‌شوند و بنابر این هر چه غلظت نمک‌ها بالاتر رود، ترکیبات آلی تمایل دارند به ماتریکس جامد جذب شده و به این ترتیب از دسترس میکروارگانیزم‌ها خارج شوند [5]. گذشته از این، شوری بالا نه تنها محدودیت میکروارگانیزم‌ها در دسترسی به هیدروکربن‌ها را به دنبال دارد؛ بلکه بدلیل کاهش انحلال اکسیژن در آب، باعث کاهش دسترسی ارگانیزم‌ها به اکسیژن نیز می‌شود. در این میان باکتری‌های اکستریم هالوفیل در طول سالیان متمادی سازگاری تکاملیِ بالایی برای فعالیت در محیط‌های بسیار شور بدست آورده‌اند و در چنین محیط‌هایی، نسبت به دیگر ارگانیزم‌ها از قابلیت بالاتری برای تجزیه ترکیبات هیدروکربنی برخوردارند [6]. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی قابلیت باکتری اکستریم هالوفیل *Haloferax* sp. KA3 در تجزیه زیستی فنانترن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

محیط کشت

محیط کشت شامل یک محیط پایه نمکی با ترکیبات زیر بود: ۲۰۰ گرم NaCl، ۰/۲۴ گرم Na_2HPO_4 ، ۲ گرم NH_4Cl ، ۰/۰۴ گرم $CaCl_2$، ۳۰ گرم $MgSO_4$ به همراه ۱ میلی‌لیتر محلول نمک‌های کمیاب در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر. محلول نمک‌های شامل: محلول عناصر میکرو نیز شامل ۲۰ میلی‌گرم کلرید مسII، ۱۰۰ میلی‌گرم کلرید نیکل، ۲۰۰ میلی‌گرم کلرید کبالت، ۲۶ میلی‌گرم سلنیت سدیم، ۵۰ میلی‌گرم مولیبدات سدیم، ۳۰ میلی‌گرم ولفرامات سدیم، ۱۰ میلی‌گرم وانادات سدیم و ۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲۵٪ در یک لیتر آب مقطر بود. در نهایت pH محیط برروی ۷ تنظیم شد.

باکتری مورد مطالعه و روش کشت

باکتری مورد استفاده یک باکتری اکستریم هالوفیل بود و مطالعات قبلی از دریاچه نمکدان واقع در قشم جداسازی شده که با نام *Haloferax* sp. KA3 در بانک اطلاعاتی GenBank با شماره دسترسی KP343876 ثبت شده بود.

استوک استون

استوک فنانترن بدین ترتیب تهیه شد: ۱ گرم فنانترن در ۵۰mL استون حل شد (غلظت ۲۰۰mg/L) و در دمای ۴°C نگهداری گردید. در مراحل بعدی، هر جا که نیاز به استفاده از فنانترن بود؛ بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز، ابتدا اجازه داده می‌شد تا حلال استونی تبخیر شود.

شرایط کشت و تجزیه فنانترن

ابتدا غلظتی معادل نیم مک‌فارلند از باکتری به محیط پایه نمکی تلقیح و مقدار ۲۰۰mg/L فنانترن به آن اضافه شد. ارلن‌های کشت شده در شیکرانکوباتور با دور ۱۱۰ RPM و دمای ۳۰°C به مدت ۲۱ روز قرار داده شدند. یک ارلن شاهد بدون تلقیح بامتری نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

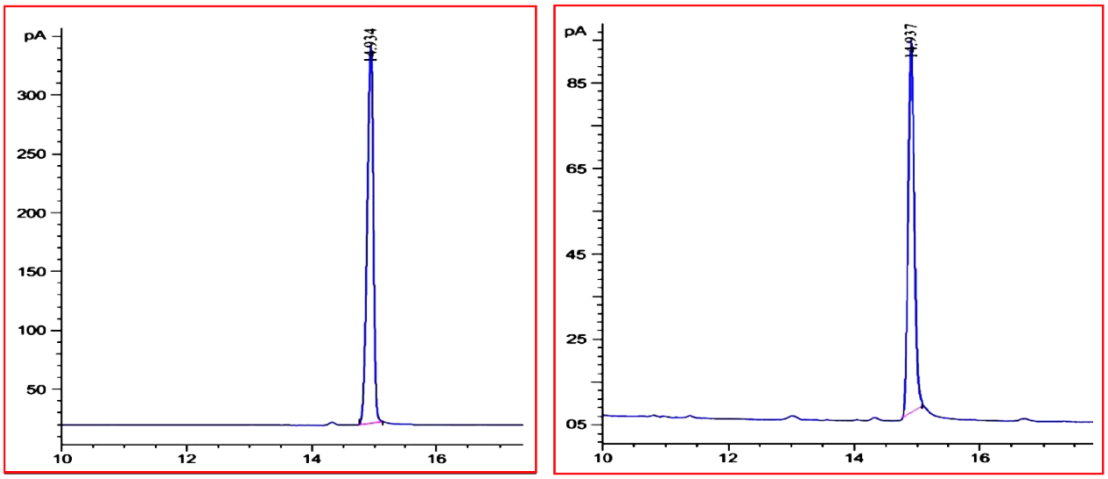
استخراج فنانترن از محیط کشت و آنالیز آن با کمک گازکروماتوگرافی

ارلن‌های تلقیح شده و شاهد بعد از ۲۱ روز و به طور جداگانه توسط اتیل‌استات، شستشو و استخراج شدند و مقادیر فنانترن موجود در آنها توسط GC اندازه گیری شد. برای این کار ۵۰ میلی‌لیتر اتیل‌استات به هر ارلن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز، فاز آلی حاوی فنانترن جمع آوری و فاز آبی مجدداً با ۵۰ میلی‌لیتر اتیل استات استخراج شد. در نهایت، فاز آلی توسط Na_2SO_4 (بی آب) خشک شد و حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر تنظیم شد. نمونه‌های عصاره با استفاده از GC-FID مجهز به یک ستون مویرگی سیلیس ذوب شده‌ی HP-5MS (60m × 0.25 mm ID × 0.25 lm thicknesses, Agilent

Technologies, USA) و دمای آشکارساز و انژکتور (به ترتیب ۳۰۰ و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از نیتروژن به عنوان گاز حامل استفاده شد. برنامه دمای آون به شرح زیر بود: ۸۰ درجه سانتی گراد (به مدت ۲ دقیقه) تا ۱۲۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه و ۱۲۰ درجه سانتی گراد تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۴ درجه سانتی گراد در دقیقه و در دمای ۳۰۰ درجه نگهداری به مدت ۱۵ دقیقه شد. تعیین کمیت و شناسایی مواد شیمیایی با تطبیق زمان نگهداری آنها با استانداردها انجام شد [7].

نتایج

همچنانکه در شکل ۱ نشان داده شده است، نتایج آنالیز گازکروماتوگرافی نشان داد میزان فنانترن باقیمانده در ارلن شاهد و ارلن تخمیر شده به ترتیب برابر با ۳۹۵PA و ۹۵ PA بود که نشان می‌دهد در یک بازه زمانی ۲۱ روزه؛ ۷۵,۹٪ از فنانترن توسط باکتری *Haloferax* sp. KA3 تجزیه شده است.



شکل ۱- نتایج آنالیز گازکروماتوگرافی. میزان فنانترن باقیمانده در ارلن تخمیر شده (راست) و ارلن شاهد (چپ).

بحث

تر کیبات پلی‌آروماتیک و از جمله فنانترن، یکی از هیدروکربن‌های آلاینده ناشی ازصنایع مختلف هستند که متاسفانه از سمیت بسیار بالایی برخوردار بوده و در صورت ورود به محیط؛ پیامدهای بغرنجی به همراه دارند. بنابراین ضرورت دارد آلودگی‌های ناشی از آنها را سالم‌سازی نمود. بر خلاف روش‌های فیزیکوشیمیایی که معمولاً عوارض جانبی به همراه دارند؛ تجزیه‌ی زیستی ترکیبات آلاینده، یک تکنولوژی زیست سازگار، کم هزینه و موثر در پاکسازی محیط‌های آلوده است. تا بحال باکتریهای زیادی با قابلیت تجزیه‌ی هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک جداسازی شده‌اند که از قابلیت‌های متفاوتی در تجزیه آنها برخوردارند [8]. در این مطالعه از باکتری *Haloferax* sp KA3 که یک باکتری اکستریم‌هالوفیل است، برای تجزیه زیستی

فنانترن استفاده شد. اندازه‌گیری‌های کمی با استفاده از گازکروماتوگرافی نشان داد که این باکتری می‌تواند در یک دوره ۲۱ روزه ۷۵,۹۰٪ از فنانترن را در محیط پایه نمکی تجزیه نماید که نشان‌دهنده راندمان نسبتاً بالای آن برای تجزیه‌ی فنانترن است.

در پاکسازی محیط‌های بسیار شور،؛ برای پرهیز از رقیق سازی، اسمز معکوس، تبادل یونی یا الکترودیالیز که فوق‌العاده هزینه بر هستند، باید از ارگانیزم‌های هالوفیل که اپتیمم فعالیتشان در این محدوده‌های نمکی قرار دارد بایستی استفاده شوند [9]. از آنجا که باکتری مورد مطالعه‌ی ما یک ارگانیزم اکستریم‌هالوفیل است، بنابراین می‌توان از آن برای تیمار زیستی محیط‌های بسیار شور که آلوده به فنانترن هستند، بهره برد.

References

[1]. Márquez-Villa JM. Rodríguez-Sierra JC. Amtanus Chequer N. Cob-Calan NN. García-Maldonado JQ. Cadena S. Hernández-Núñez E. (2023). Phenanthrene Degradation by Photosynthetic Bacterial Consortium Dominated by Fischerella sp. Life.13, 1108. https://doi.org/10.3390/life13051108

[2]. Bernard O, Michel M. (2005). Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, D.C. 1th edition. pp: 317-319.

[3]. Margesin R, Schinner F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl Microbiol Biotechnol, 56:650–663

[4]. McGenity TJ. (2010). Halophilic hydrocarbon degraders. In: K. N. Timmis (ed). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag, Berlin, pp 1939-1951.

[5]. Martins LF, Peixoto RS. (2012). BIODEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN HYPERSALINE ENVIRONMENTS, Brazilian Journal of Microbiology, pp 865-872

[6]. Chang W. Akbari A. Snelgrove J. Frgon D, and Ghoshal S. (2013). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated clayey soils from a sub-arctic site: the role of aggregate size and microstructure. Chemosphere 91: 1620 – 1626.

[7]. Fathi Z, Ebrahimipour G, Kavyanifard A, Najmi Z. (2016). Optimization of Phenanthrene-Degradation by Dietzia cinnamea AP for Bioremediation Applications. Res. Mol. Med. (ISSN: 2322-133X), 2016, Vol: 4, Issue: 3, Pages: 22-28

[8]. Pourbabaee AA, Shahriari MH, Garousin H. (2019). Biodegradation of phenanthrene as a model hydrocarbon: Power display of a super-hydrophobic halotolerant enriched culture derived from a saline-sodic soil. Biotechnology Reports. Volume 24, e00388, https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00388.

[9]. Al-Mailem DM. Sorkhoh NA. Al-Awadhi H. Eliyas M. Radwan SS. (2010). Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. Extremophiles 14:321–328

کلونینگ مولکول های shRNA در وکتور لنتی ویروسی به منظور ممانعت از تکثیر ویروس سپتی سمی خون ریزی دهنده

نگین پورحسینی دهکردی[۱]، بهناز صفار [۲*]، اعظم مختاری[۳]
۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه شهرکرد
۲-دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد
۳-دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه شهرکرد
*ایمیل نویسنده مسئول: *saffar_b@sci.sku.ac.ir*

چکیده:

ویروس سپتی سمی خون ریزی دهنده (VHSV) از خطرناک ترین پاتوژن های عفونی آبزیان است و به عنوان تهدیدی جدی برای صنعت پرورش ماهی در نظر گرفته می‌شود. این ویروس متعلق به خانواده‌ی *Rhabdoviridae* می‌باشد و عمدتا ماهی قزل آلای رنگین کمان را آلوده می‌کند. تاکنون واکسن و درمان موثری بر علیه این ویروس گزارش نشده است. هدف از این تحقیق کلونینگ مولکول های shRNA در سیستم لنتی ویروسی برای خاموش کردن ژن NV ویروس VHS می‌باشد. ابتدا توالی های shRNA به کمک نرم افزار های مختلف طراحی و سپس سنتز شدند. برای تولید اولیگومر های دو رشته ای و کلونینگ آن‌ها در وکتور مورد نظر، مقدار برابری از هر دو رشته‌ی سنس و آنتی سنس در شرایط مناسب با هم جفت شدند. از وکتور pCDH جهت کلونینگ استفاده شد. به منظور دستیابی به وکتور خطی، واکنش هضم دوگانه توسط آنزیم های *Eco*RI و *Bam*HI انجام شد و سپس الحاق مولکول های shRNA با پلاسمید هضم شده توسط آنزیم T4 لیگاز انجام گردید. محصول این مرحله در سلول های مستعد DH5α ترنسفورم شد. برای تایید حضور توالی shRNA در پلاسمید، کلونی PCR انجام گردید و محصول PCR در کنار DNA لدر بر روی ژل برده شد. مشاهده‌ی باند مورد نظر بر روی ژل نشانه ای بر تایید کلونینگ است. امید است این مولکول های shRNA مبتنی بر وکتور به عنوان یک روش درمانی علیه ویروس سپتی سمی خون ریزی دهنده استفاده گردند.

کلمات کلیدی: کلونینگ، shRNA، ویروس سپتی سمی خون ریزی دهنده، وکتور لنتی ویروسی

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

Cloning of shRNA molecules in lentiviral vector in order to prevent the replication of hemorrhagic septicemia virus

Negin Pourhoseini Dehkordi[1], Behnaz Saffar [*2], Azam Mokhtari[3]

1- MSc student, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University
2- Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University
3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University

*Corresponding author's email: *saffar_b@sci.sku.ac.ir*

Abstract:

Hemorrhagic septicemia virus (VHSV) is one of the most dangerous aquatic infectious pathogens and is considered a serious threat to the fish farming industry. This virus belongs to the *Rhabdoviridae* family and mainly infects rainbow trout. So far, no effective vaccine or treatment has been reported against this virus. The aim of this research is to clone shRNA molecules in the lentiviral system to silence the NV gene of VHS virus. First, shRNA sequences were designed with the help of different software and then synthesized. To produce double-stranded oligomers and clone them in the desired vector, equal amounts of both sense and antisense strands were paired together in appropriate conditions. pCDH vector was used for cloning. In order to obtain the linear vector, double digestion reaction was performed by *EcoRI* and *BamHI* enzymes, and then ligation of shRNA molecules with plasmid digested by T4 ligase enzyme was performed. The product of this step was transformed in DH5α susceptible cells. To confirm the presence of the shRNA sequence in the plasmid, the PCR colony was performed and the PCR product was taken on the gel along with the ladder DNA. Observing the desired band on the gel is a sign of confirmation of cloning. It is hoped that these vector-based shRNA molecules will be used as a therapeutic method against hemorrhagic septicemia virus.

Keywords: Cloning, shRNA, hemorrhagic septicemia virus, lentiviral vector

مقدمه

ویروس سپتی سمی خون ریزی دهنده از بزرگ ترین تهدید ها برای صنعت پرورش آبزیان است. این ویروس متعلق به جنس*novirhabdovirus* از خانواده‌ی *Rhabdoviridae* می‌باشد و گونه های متعددی از ماهیان پرورشی و آزاد را آلوده می‌کند[۱]. این ویروس در بیشتر قاره‌ی اروپا همه گیر است و به وسیله‌ی تماس مستقیم با ماهی بیمار یا آب آلوده منتقل می‌گردد[۲، ۳] . نشانه های بیماری شامل دانه های قرمز خون ریزی دهنده در اطراف چشم ها و آبشش ها، ورم و لخته های خونی در چربی بدن، احشا و ماهیچه ها است[۴]. ژنوم این ویروس شامل یک تک رشته RNA سنس منفی می‌باشد که پنج ژن اصلی را دارا است[۵]. علاوه بر این پنج ژن، دارای یک ژن غیر ویروسی (NV) نیز هست که مسئولیت سرکوب آپوپتوز و پاسخ های سیتم ایمنی ذاتی را بر عهده دارد. پروتئین این ژن برای همانند سازی موثر ویروس نیز مورد نیاز است[۷،۶]. این ویروس برای انسان خطر بیماری زایی ندارد و بیماری مشترک انسان و دام به حساب نمی‌آید[۸]. در سال ۱۳۹۲ این ویروس از طریق واردات غیر قانونی تخم آلوده به ایران آمد و خسارات زیادی را به وجود آورد. هنوز درمان موثری بر علیه این ویروس گزارش نشده است[۹].

در سال های اخیر روش های سرکوب بیان ژن و ایجاد تداخل به کمک RNA های مداخله گر(RNAi)، انقلابی در درمان های ضد ویروسی ایجاد کرده است. این یک روش سرکوب بیان ژن است، که با اثر گذاری بر mRNA هدف نقش مهمی در تنظیم رونویسی، خاموشی ژن ها و متیلاسیون DNA دارد. مهار بیان ژن ها توسط تجزیه‌ی mRNA هدف انجام می‌شود و یک نوع خاموشی بعد از رونویسی است. در این روش اولیگونوکلئوتید هایی مانند microRNA و shRNA نقش اصلی را در مهار mRNA به صورت کاملا اختصاصی ایفا می‌کنند[۱۱،۱۰].

وکتور های لنتی ویروسی یکی از بهترین انتخاب های در دسترس برای انتقال shRNA ها به سلول ها و بیان پایدار آن ها می‌باشند. این وکتورها توانایی انتقال به سلول های غیر قابل تقسیم را دارند و به طور خاص هسته را هدف قرار می‌دهند[۱۲]. نگرانی هایی درباره‌ی استفاده از این وکتور ها در تحویل ژن و تولید ویروس عفونی وجود دارد. برای کمتر کردن این خطر تغییراتی در ساختار وکتور مهندسی شده اعمال می‌شود[۱۴،۱۳] . هدف اصلی این طرح، کلونینگ shRNA علیه ژن NV ویروس VHSV در سیستم لنتی ویروسی می‌باشد.

روش کار

تهیه و تخلیص پلاسمید لنتی ویروسی pCDH-CMV-MCS-EF1-cGFP-T2A-Puro

ابتدا انتقال پلاسمید لنتی ویروسی به باکتری و سپس استخراج آن انجام شد. به این منظور باکتری های مستعد DH5α به روش شیمیایی تهیه شدند. برای انتقال پلاسمید pCDH به باکتری مستعد از روش شوک حرارتی استفاده گردید[۱۵]. به این صورت که ابتدا میکروتیوب حاوی باکتری به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و قبل از ذوب شدن کامل، مقدار ۱ میکرولیتر پلاسمید لنتی ویروسی به آن اضافه گردید. به منظور القای شوک حرارتی، میکروتیوب حاوی باکتری و پلاسمید به مدت ۹۰ ثانیه درون بن ماری با دمای ۴۲°C قرار داده شد و سریعا برای ۳ دقیقه بر روی یخ منتقل شد. سپس مقادیر ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB مایع، ۱۶ میکرولیتر گلوکز و ۴ میکرولیتر Mgcl2 به باکتری اضافه گردید. به منظور تکثیر DNA پلاسمیدی در باکتری، میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷°C و دور ۱۸۰rpm قرار گرفت. در نهایت میکروتیوب به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شد و ۹۰ درصد مایع رویی حاصل بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی سیلین پخش شد. پش از خشک شدن کامل مایع، پلیت ها به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور دمای ۳۷°C قرار گرفتند. برای استخراج این پلاسمید از کلون باکتری، از کیت شرکت دنازیست استفاده شد. مراحل استخراج طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت و ۱ میکرولیتر از پلاسمید حاصله بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شد.

برش پلاسمید لنتی ویروسی pCDH-CMV-MCS-EF1-cGFP-T2A-Puro

به منظور خطی شدن پلاسمید و آماده سازی آن برای اتصال قطعات مورد نظر، واکنش هضم دوگانه توسط آنزیم های *Eco*RI و *Bam*HI انجام شد. از بافر K مشترک جهت فعالیت این دو آنزیم استفاده گردید. برای واکنش هضم دوگانه ۷ میکرولیتر پلاسمید، ۱ میکرولیتر آنزیم *Eco*RI، ۱ میکرولیتر آنزیم *Bam*HI به همراه ۱,۵ میکرولیتر بافر K مشترک با هم ترکیب شدند و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند. به منظور تایید انجام برش ۱ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شد. تخلیص و بازیابی پلاسمید برش خورده، به کمک کیت استخراج از ژل شرکت Thermo scientific انجام گرفت.

طراحی مولکول های shRNA

در مطالعه‌ی قبلی توسط امینی و همکاران، shRNA های مورد نظر بر علیه ژن NV ویروس VHS طراحی و سنتز شدند[۱۶].

الحاق shRNA های طراحی شده به وکتور لنتی ویروسی برش خورده

به منظورالحاق قطعه به پلاسمید ، ابتدا shRNA ها طی فرآیند انیلینگ به صورت دو رشته ای درآمدند. به این صورت که دو رشته‌ی سنس و آنتی سنس در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به طور کامل واسرشته گشته، سپس به صورت آهسته سردسازی و به هم متصل شدند. برای فرآیند الحاق(الحاق) ۵ میکرولیتر پلاسمید هضم شده، ۵ میکرولیتر از قطعات shRNA، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 لیگاز و ۱,۵ میکرولیتر بافر آنزیم با هم مخلوط شدند و با ۲,۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به حجم نهایی رسیدند. میکروتیوب به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۲۲°C قرار داده شد[۱۵].

ترانسفورماسیون محصول الحاق

محصولات الحاق به روش شوک حرارتی به باکتری مستعد *Ecoli* DH5α ترنسفورم گردید. برای انتقال به ازای هر ۱۰۰ µl از باکتری مستعد، ۱۵ µl محصول الحاق اضافه شد و به آرامی با هم مخلوط گردید. پس از انجام مراحل ترانسفورماسیون، مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ بر روی پلیت های LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین ۱۰۰mg/ml پخش شد. پس از خشک شدن کامل پلیت ها به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷°Cقرار داده شدند.

کلونی PCR

برای تایید حضور قطعات shRNA در کلونی های حاصل از ترانسفورم، واکنش کلونی PCR انجام شد. ابتدا تک کلون های رشد کرده، توسط لوپ استریل در ۱۰ میکرولیتر آب استریل حل شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش با دمای ۹۶°C قرار گرفتند. سپس میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه میکروفیوژ شدند. ۳ میکرولیتر از محلول رویی به عنوان DNA الگو به ویال حاوی مواد PCR اضافه گردید. مواد مورد نیاز برای واکنش کلونی PCR شامل: ۶ µl مستر میکس ، ۵/. µl آغازگر پیشرو، ۵/. µl آغازگر معکوس و ۵ µl آب مقطر تزریقی می‌باشد. شرایط دمایی و توالی پرایمرها در جدول ۱ و ۲ آورده شده است. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگیری شدند. از بین کلونی های حاوی قطعه‌ی مورد نظر، دو کلونی برای استخراج پلاسمید نوترکیب انتخاب و در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. سپس به کمک کیت استخراج پلاسمید شرکت دنازیست، استخراج و برای تعیین توالی به شرکت زیست فناوران ارسال گردید.

جدول ۱: جزئیات آغازگر های مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر (تعداد جفت باز) Tm	پرایمر(°C)
CMV Forward	AATGGGCGGTAGGCGTGTA	19	59.5
EF1 Reverse	GGACTGTGGGCGATGTGC	18	60.7

جدول ۲ : شرایط دمایی واکنش کلونی PCR

مراحل واکنش PCR	دمای واکنش PCR	مدت زمان
واسرشتگی اولیه	95 °C	۵ دقیقه
واسرشتگی	95 °C	۴۵ ثانیه
اتصال پرایمر	55 °C	۴۰ ثانیه
تکثیر توالی	72 °C	۴۵ ثانیه
تکثیر نهایی	72 °C	۱۰ دقیقه
۳۰ سیکل		

نتایج

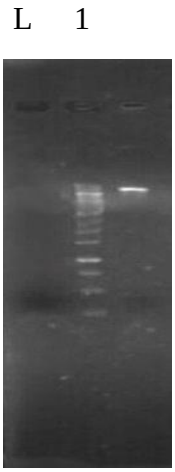
استخراج پلاسمید لنتی ویروسی pCDH-CMV-MCS-EF1-cGFP-T2A-Puro :

پلاسمید لنتی ویروسی که با کیت شرکت دنازیست استخراج شد، بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شد و باند مشاهده شده صحت فرآیند استخراج را تایید کرد.

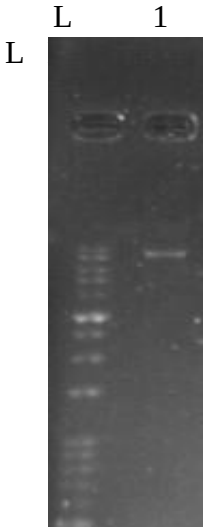
برش پلاسمید لنتی ویروسی pCDH-CMV-MCS-EF1-cGFP-T2A-Puro : محصول هضم دوگانه‌ی پلاسمید لنتی ویروسی pCDH بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت و باند مشاهده شده حاکی از برش صحیح پلاسمید مورد نظر بود. به دلیل انجام برش پلاسمید با دو آنزیم، در نهایت دو قطعه وجود

خواهد داشت ولی به دلیل این که قطعه ی دوم بسیار کوچک است و طولی برابر با bp ۱۷ دارد، باندی از آن در شکل مشاهده نشد(شکل ۱).

محصول تخلیص پلاسمید برید شده که با کیت از ژل آگارز بازیابی شده بود، بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد. باند مشاهده شده بر روی ژل صحت فرآیند را تایید کرد(شکل ۲).

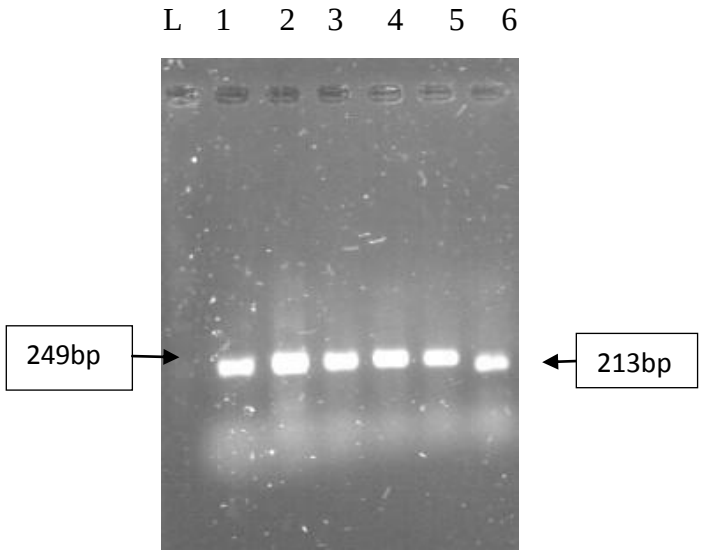


شکل ۱. هضم دوگانه‌ی پلاسمید لنتی ویروسی ۱) پلاسمید هضم شده توسط دو آنزیم *BamHI* و *EcoRI* DNA(L لدر(1 (Kb



شکل ۲. نتیجه‌ی تخلیص پلاسمید لنتی ویروسی هضم شده با کیت ۱) پلاسمید تخلیص شده ۲) DNA لدر(1 Kb)

ترانسفورماسیون محصول الحاق پلاسمید و shRNA و کلونی PCR : پس از انکوباسیون به مدت ۱۶ ساعت، کلون های واجد محصول الحاق در محیط کشت LB آگار حاوی آمپی سیلین قابل مشاهده بودند. پس از انجام PCR ، محصولات واکنش کلونی PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگیری شدند. باند های مشاهده شده هم سطح با نمونه‌ی کنترل مثبت (پلاسمید حاوی قطعه کلون شده) قرار گرفتند. اختلاف باندی هم با نمونه‌ی کنترل کنفی(پلاسمید بدون قطعه) قابل تشخیص بود(شکل۳).



شکل ۳.تصویر ژل الکتروفورز محصولات colony PCR قطعات shRNA

L) DNA لدر (50 bp)

۱،۲) کلونی های سطح پلیت مربوط به VHSshRNA-1

۳،۴) کلونی های سطح پلیت مربوط به VHSshRNA-2

۵) نمونه کنترل مثبت(پلاسمید حاوی قطعه کلون شده)

۶) نمونه کنترل منفی(پلاسمید بدون قطعه)

بحث

تا امروز هیچ گونه واکسن یا درمانی برای این ویروس زیانبار نهایی نشده است و همه ی راه حل ها بیش تر به شکل نگهدارنده و پیشگیرانه هستند. به همین دلیل علم ژنتیک می‌تواند با روشی نسبتا ایده آل به صورت ژن درمانی عملیات سرکوب همانند سازی را در این ویروس انجام دهد. ژن درمانی با کمک RNAهای تداخلگر کارایی قابل قبولی را نشان می دهد. به این معنی که اثرات جانبی کم و اختصاصیت زیادی به دنبال دارد. به علاوه می تواند در طیف وسیعی از بیماری ها کاربرد داشته باشد، به آسانی سنتز

شود و به شکل های مختلفی (تزریق، بلع، تنفس و...) تحویل گردد. از آن جایی که RNAi مختص ژن طراحی میشود، می تواند به سرعت بیماری های ویروسی را درمان کند و راه خود را بین دارو های جدید باز نماید[۱۷] . در مطالعه ای که توسط Whang و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی ویروس nover carcinoma انجام دادند، روش RNAi منجر به مسدود شدن سنتز RNA و پروتئین و در نهایت منجر به کاهش تکثیر ویروسی شد[۱۸] . حاجی حسینی و همکاران در سال ۲۰۲۱ برای مهار تکثیر ویروس Border که هنوز در ایران ریشه کن نشده است، shRNA هایی را علیه ژن NS3 طراحی و سنتز کردند. نتایج نشان داد که سه مورد از shRNA ها تا ۹۰ درصد RNA ویروسی را کاهش دادند[۱۹] .

نکته ی مهم دیگر این است که هدف اکثر دارو های سنتی پروتئینها هستند. در حالی که مولکول های تداخلگر، یک مرحله قبل از پروتئین سازی وارد عمل می شوند و می توانند رونوشتهای mRNA ها را تنظیم کنند. مولکول های تداخلگری که از نوع miRNA هستند، اکثرا در شرایط خاصی به سرعت تخریب میشوند. RNAi های نوع siRNA هم عملکرد موقتی دارند. اگرچه می توان تا حدودی اثر مقطعی آن ها را با ترنسفکت مجدد جبران کرد و میزان siRNA را در سلول کنترل کرد، shRNA ها به عنوان گزینه ی مناسب در اکثر تحقیقات جدید در نظر گرفته می شوند. shRNA همچنین این امکان را دارد که به ژنوم میزبان وارد شود و از طریق همانند سازی به سلول های دختری منتقل گردد و با این عمل در طول چند نسل ثبات خود را حفظ کند. shRNA ها کم هزینه تر و ساده تر از سایر RNAi ها هستند. راحت تر هدفگیری را انجام می دهند و سیستم ایمنی را هم چندان تحریک نمی کنند. ولی با این حال اثرات خارج از هدف و جذب سلولی ضعیفی دارند که البته در این پژوهش سعی شده است تا مولکول هایی طراحی شوند که کم ترین اثر خارج از هدف و پایینترین ایمنی زایی را به دنبال داشته باشند و فعالانه در مقابل VHSV وارد عمل شوند[۲۰] . shRNA ها می توانند توسط وکتور به سلول وارد شوند. در وکتور های ویروسی، پروموتر منجر به القای بیان shRNA می گردد. وکتور استفاده شده در این پژوهش، از نوع وکتور های لنتی ویروسی نسل سوم است و حدود ۸ kb گنجایش دارد. این وکتور طیف وسیعی از میزبان را پشتیبانی می کند. برتری دیگر این لنتی وکتور توانایی آن در حذف ناحیه ی U3 از 3′LTR می باشد که منجر به ایجاد لنتی وکتور SIN می شود و به محض ورود آن ها به سلول، ویروس توانایی رونویسی را از دست می دهد. بدین ترتیب احتمال رویداد تداخل پروموتری و فعال سازی ژن های مجاور محل ادغام بسیار پایین است[۲۱].

با وجود شواهدی مبنی بر استفاده ی موفقیت آمیز از RNAi و نتایج مثبت مطالعات مرتبط با آن، کاربرد این روش به صورت *in vivo* نیاز به پژوهش و بررسی بیش تری خواهد داشت تا عوارض و تاثیرات آن بر موجود زنده ی مورد درمان، به طور کامل مشخص گردد. بدین منظور ادامه ی این پژوهش در مرحله ی کشت سلول در حال انجام است تا میزان knock down اعمال شده توسط shRNA هایی که در این پژوهش طراحی و کلون شده اند به صورت *in vitro* بررسی شود. مطالعاتی که در شرایط *in vivo* انجام

میگیرند، زمینه ی ورود این قبیل طرح ها را به مرحله ی clinical trial فراهم می سازند. تا به این ترتیب در آینده به کمک روش RNAi با تولید آبزیان تراریخته یا ساخت واکسن و دارو، در برابر ویروس VHS مصونیت جمعی پدید آید.

منابع

1. Rocha, A., Ruiz, S., Tafalla, C., & Coll, J. M. (2004). Conformation- and fusion-defective mutations in the hypothetical phospholipid-binding and fusion peptides of viral hemorrhagic septicemia salmonid rhabdovirus protein G. Journal of virology, 78(17), 9115–9122.
2. ensen MH. 1965.Research on the virus of Egtved disease. Annals of the New York Academy of Sciences.;126(1):422-6.
3. orgensen V. 1973.Artificial transmission of VHS of rainbow trout. Riv Ital Pisci Ittiop.;8:101-
4. Wolf K. 2019.Fish viruses and fish viral diseases: Cornell University Press.
5. Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Forsberg, R., & Lorenzen, N. (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. The Journal of general virology, 85(Pt 5), 1167–1179.
6. Hogenhout, S. A., Redinbaugh, M. G., & Ammar, el-D. (2003). Plant and animal rhabdovirus host range: a bug's view. Trends in microbiology, 11(6), 264–271.
7. Ammayappan, A., & Vakharia, V. N. (2011). Nonvirion protein of novirhabdovirus suppresses apoptosis at the early stage of virus infection. Journal of virology, 85(16), 8393–8402.
8. Woo PT, Leatherland JF, Bruno DW.2011. Fish diseases and disorders: CABI.
9. کارگاه ها. اپیدمیولوژی بروز بیماری VHS در ایران و استان خراسان رضوی
10. Ito, M., Kawano, K., Miyagishi, M., & Taira, K. (2005). Genome-wide application of RNAi to the discovery of potential drug targets. FEBS letters, 579(26), 5988–5995.
11. Khaliq, S., Khaliq, S. A., Zahur, M., Ijaz, B., Jahan, S., Ansar, M., Riazuddin, S., & Hassan, S. (2010). RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. Biotechnology advances, 28(1), 27–34.
12. Morris, K. V., & Rossi, J. J. (2006). Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. Gene therapy, 13(6), 553–558.
13. Uprichard S. L. (2005). The therapeutic potential of RNA interference. FEBS letters, 579(26), 5996–6007.
14. Barde, I., Salmon, P., & Trono, D. (2010). Production and titration of lentiviral vectors. Current protocols in neuroscience, Chapter 4.
15. Sambrook J, R.D. 2001. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, third edn.
16. .امینی،ا.، صفار،ب.، مختاری،ا. ۱۴۰۱. طراحی shRNA علیه ژن NV ویروس VHS به عنوان ابزاری بالاقوه برای ژن درمانی با استفاده از الگوریتم ها.مقاله ارائه شده در دهمین کنگره‌ی بین المللی زیست شناسی

17. Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F., & Kay, M. A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. Nature, 441(7092), 537–541.

18. Wang, Z., Ren, L., Zhao, X., Hung, T., Meng, A., Wang, J., & Chen, Y. G. (2004). Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. Journal of virology, 78(14), 7523–7527.

19. Arani, M. J. H., Mokhtari, A., Saffar, B., & Asadi Samani, L. (2021). In vitro Inhibition of Border Disease Virus Replication With Lentivirus-Mediated shRNAs. Frontiers in veterinary science, 8, 708591.

20. Brownawell, A. M., & Macara, I. G. (2002). Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. The Journal of cell biology, 156(1), 53–64.

21. Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A. M., Doglio, A., Bertrand, E., Macara, I. G., & Dargemont, C. (2003). Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. The Journal of biological chemistry, 278(8), 5505–5508.

پاتوفیزیولوژی بیماری دیابت خودایمن تاخیری در بالغین و مقایسه آن با دیابت نوع ۱ و دیابت نوع ۲

ملیحه محمدی

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان

ایمیل نویسنده‌ی مسئول: mmohammadi@science.usb.ac.ir

چکیده: پاتوفیزیولوژی بیماری دیابت خودایمن تاخیری در بالغین (LADA) در مقایسه با دیابت نوع ۱ (T1D) و دیابت نوع ۲ (T2D) کمتر شناخته شده است. با این وجود برخی از ویژگی‌های بالینی و ژنتیکی بیماران مبتلا به LADA، شبیه هر دو نوع دیابت اصلی می‌باشد و به همین علت، به نام دیابت نوع ۱,۵ هم شناخته می‌شود. براساس معیارهای ایمونولوژی انجمن دیابت، بیماران LADA با سه ویژگی شناسایی می-شوند: ۱- سن شروع بیماری بیش از ۳۰ سال،۲ – وجود یکی از اتوآنتی‌بادی های علیه آنتی‌ژن های سلولهای β و ۳- عدم نیاز به انسولین درمانی حداقل در ۶ ماه اول بعد از تشخیص بیماری. LADA با ناهمگنی ژنتیکی، فنوتیپی و هومورال مشخص می‌شود که درجات مختلفی از مقاومت به انسولین و خودایمنی را در بر می‌گیرد. این ناهمگونی احتمالاً ناشی از مکانیسم‌های پاتولوژیک مختلف است که پیامدهایی برای درمان موثر این بیماران در پی دارد. در این مقاله مروری، درک فعلی و شکاف هایی که در رابطه با پاتوفیزیولوژی و ویژگی‌های بالینی دیابت خودایمنی بزرگسالان وجود دارد مورد بحث قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: دیابت ملیتوس، دیابت خودایمنی در بالغین، پاتوفیزیولوژی

Pathophysiology of latent autoimmune diabetes in adults and its comparison with type 1 diabetes and type 2 diabetes

Malihe Mohammadi

Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan
Corresponding email address: mmohammadi@science.usb.ac.ir

Abstract:

The pathophysiology of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is considered less understood than that of type 1 (T1D) and type 2 diabetes (T2D). However, some of the clinical and genetic characteristics of LADA patients are similar to both main types of diabetes, and for this reason, earning it a reputation as being "type 1.5 diabetes". Based on the criteria of Immunology of Diabetes Society, LADA patients are identified with three characteristics: 1- age over 30 years at diagnosis, 2- The presence of at least one of the autoantibodies against β cell antigens and 3- no need for using insulin for at least 6 months after initial disease diagnosis. LADA is characterized by genetic, phenotypic and humoral heterogeneity, which includes different degrees of insulin resistance and autoimmunity. This heterogeneity is probably caused by different pathological mechanisms, which has consequences for the effective treatment of these patients. This review article discusses the current understanding and gaps regarding the pathophysiology and clinical features of adult-onset autoimmune diabetes.

Keywords: Diabetes Mellitus, latent autoimmune diabetes in adults, pathophysiology

مقدمه:

دیابت ملیتوس[1] (DM) یکی از رایج‌ترین بیماری متابولیکی شناخته شده در جهان است و آمار مبتلایان به این بیماری در سرتاسر دنیا و بخصوص در کشورهای در حال توسعه به سرعت رو به ازدیاد است [۱]. این بیماری به طور کلاسیک به دو نوع دیابت نوع ۱ (T1D) و دیابت نوع ۲ (T2D) تقسیم می‌شود، ولی در سال۱۹۷۷ ایروین و همکاران[2] گزارش کردند که آنتی‌بادی علیه سلول‌های β تولید کننده انسولین که از ویژگی‌های افراد دیابتی نوع ۱ می‌باشد، در سرم خون ۱۱٪ از افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ نیز وجود دارد. واژه LADA در سال ۱۹۹۳ توسط تووومی و همکاران[3] به کار برده شد برای توصیف زیر گروهی از بیماران که دارای برخی ویژگی‌های مشترک با بیماران دیابت نوع ۲ و ویژگی‌های ایمونولوژیک مشابه با بیماران دیابت نوع ۱ بودند. تحقیقات جامع در مورد این بیماران، منجر به یک طبقه‌بندی جدید شد که اکنون آن را در بزرگسالان LADA می‌نامند. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که LADA ۲ تا ۱۲ درصد کل موارد دیابت و یا تقریبا ۹٪ از کل دیابت شروع شده در بزرگسالان را شامل می‌شود [۵-۲].

بیماری دیابت نوع ۱ و دیابت نوع ۲، هر دو ناشی از پیامدهای متابولیکی عملکرد انسولین نابهینه، با عوارض مشابه هستند ولی مکانیسم بروز این دو نوع بیماری با هم متفاوت است [۶]. پاتوفیزیولوژی بیماری دیابت خودایمن تاخیری در بالغین[4] (LADA)، در مقایسه با T1D و T2D کمتر شناخته شده است، با این حال مشخص شده است که برخی ویژگی های بالینی این بیماران شبیه هر دو کلاس اصلی دیابت است و از این رو بیماری نوع ۱,۵ هم نامیده می‌شود [۷]. این بیماری غالبا" در افراد بالغ دیده می‌شود و بیماران در ابتدای تشخیص بیماری، نیازی به انسولین درمانی ندارند، که از این نظر شبیه T2D به نظر می‌رسند. از طرفی وجود اتوآنتی‌بادیهای موجود در گردش خون، آنها را شبیه بیماران نوع ۱ نشان می‌دهد. در واقع به طور میانگین، بین ۸ تا ۱۰ درصد بیمارانی که T2D تشخیص داده می‌شوند، در حقیقت بیماران LADA هستند [4].

تا کنون مطالعات متعددی در زمینه اتیولوژی و پاتوفیزیولوژی دیابت نوع ۱ و نوع ۲ انجام گرفته است ولی چنین مطالعاتی در مورد LADA کمتر است. شناخت اتیولوژی و پاتوفیزیولوژی هر بیماری، علاوه بر اینکه به شناسایی صحیح بیماران کمک می‌کند، کلید دستیابی به روش های بهینه درمانی هم می‌باشد. بنابراین تا زمانیکه علل بروز یک بیماری به درستی شناسایی نشود، درمان مبتلایان نیز کارایی لازم را نخواهد نداشت. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اتیولوژی و پاتوفیزیولوژی LADA و مقایسه آن با اتیولوژی و پاتوفیزیولوژی T1D و T2D می‌باشد.

[1] Diabetes Mellitus
[2] Irvine et al.
[3] Tuomi et al.
[4] latent autoimmune diabetes in adults

دیابت نوع ۱

دیابت نوع ۱ که دیابت وابسته به انسولین نامیده می‌شود، بیشتر در کودکان و جوانان دیده می‌شود. این نوع از دیابت ۵ تا ۱۰ درصد کل موارد دیابت را تشکیل می‌دهد [8]. دیابت نوع ۱ نوعی بیماری پیشرونده خود ایمن با واسطه سلولهای T است که با از دست دادن تحمل آنتی ژن‌های سلول بتا و نفوذ لنفوسیتی مخرب در جزایر شناخته می‌شود، که به نوبه خود منجر به کمبود انسولین، اختلال در هموستاز گلوکز و افزایش قند خون می‌شود [9]. تصور می‌شود که ایجاد دیابت نوع ۱ با ارایه پپتیدهای سلول بتا توسط سلول‌های ارایه دهنده آنتی ژن (APC)[1] آغاز می‌شود. APC های حامل این اتو آنتی‌ژن‌ها به غدد لنفاوی لوزالمعده مهاجرت می‌کنند و در آنجا با لنفوسیت های $CD4^+T$ واکنش دهنده تعامل می‌کنند، که به نوبه خود باعث فعال شدن سلول‌های $CD8^+T$ فعال می‌شود. این سلول‌های فعال شده به سلول‌های جزایر که بیانگر آنتی ژن‌های ایمنی در مولکول‌های بافت اصلی هستند، برمی‌گردند. تخریب سلول‌های بتا با ترشح سیتوکین‌ها و گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر از سلول‌های ایمنی ذاتی (ماکروفاژها، سلول‌های کشنده طبیعی و نوتروفیل‌ها) بیشتر تشدید می‌شود. کل این فرایند توسط نقص در لنفوسیت‌های T نظارتی، که به طور موثر خود ایمنی را سرکوب نمی‌کنند، تقویت می‌شود. سلول‌های T فعال شده در غدد لنفاوی لوزلمعده نیز لنفوسیت های B[2] را تحریک کرده و آنتی‌بادی‌هایی بر علیه پروتین‌های سلول β تولید می‌کنند که می‌توان آنها را در گردش خون اندازه‌گیری کرد و به عنوان تعیین کننده نشانگر زیستی دیابت نوع ۱ در نظر گرفت [10,11]. این اتوآنتی‌بادی‌ها عبارتند از: آنتی‌بادی ضد سلول جزیره (ICA)[3] علیه پروتین های سیتو پلاسمی موجود در سلول بتا، آنتی‌بادی ضد گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD-65)[4]، آنتی‌بادی ضد انسولین (IAA)[5]، آنتی-بادی ضد تیروزین فسفاتاز-آنتی ژن ۲ (IA-2)[6] و آنتی‌بادی ضد انتقال دهنده روی (ZnT8A)[7] [12,13].

در حال حاضر این آنتی‌بادی‌ها قابل اطمینان‌ترین نشانگرهای زیستی در مرحله پیش تولید T1D می‌باشند، زیرا از نظر ظاهری ظهور آن‌ها قبل از شروع آشکار T1D برای سال‌ها یا حتی دهه‌هاست [14,15]. تخریب سلول‌های بتا در اثر واکنش‌های خود ایمنی زمینه‌های ژنتیکی متعددی دارد، علاوه بر این با عوامل محیطی نیز در ارتباط است. زمینه اتیولوژی ژنتیکی در دیابت نوع ۱ کاملا" شناخته شده است عمده ترکیب سازگاری بافتی MHC[8] که به عنوان آنتی‌ژن‌های لکوسیتی انسان یا HLA نیز شناخته می‌شود، تقریبا ۴۰ تا ۵۰ درصد تجمع خانوادگی T1DM را تشکیل می‌دهد و عوامل تعیین کننده قابل توجه پلی مورفیسم ژن-های HLA کلاس II که رمز گذار DQ و DR4-DQ8 هستند، با DR3-DQ2 که در ۹۰٪ بیماران T1DM یافت می‌شود. علایم ایمونولوژیک دیابت نوع ۱، نفوذ لنفوسیتی در جزایر لوزالمعده، افزایش بیش از حد

[1] Antigen-presenting cell
[2] B Lymphocytes
[3] Cytoplasmic islet cell Autoantibodies
[4] Autoantibodies against glutamic acid decarboxylase
[5] Autoantibodies against Insulin
[6] Autoantibodies to tyrosine phosphatase-Like insulinoma antigen 2
[7] Zinc transporter 8 autoantibody
[8] Major histocompatibility complex

MHC کلاس I در تمام سلول‌های جزایر و بیانMHC کلاس II نابجا در سلول‌های β در جزایر ملتهب، افزایش تعداد سلول‌های T فعال شده در جزایر و گردش خون است [16,17]. تصور بر این است که در کودکان مستعد ژنتیکی با هاپلوتیپ DR4-DQ8، عوامل برون زایی که هنوز مشخص نشده اند، باعث ایجاد یک واکنش خود ایمنی علیه انسولین می‌شوند، که توسط آنتی‌بادی‌های انسولین به عنوان اولین آنتی‌بادی ظاهر می‌شود. در کودکان مبتلا به هاپلوتایپ DR3-DQ2 واکنش تحریک کننده در درجه اول در برابر GAD است که توسط آنتی‌بادی‌های علیه GAD به عنوان اولین آنتی‌بادی ظاهر می‌شود. میزان بروز آنتی‌بادی ضد انسولین به عنوان اولین آنتی‌بادی، در طی سال‌های اول زندگی به اوج خود می‌رسد و پس از آن کاهش می-یابد. میزان بروز GADA به عنوان اولین آنتی‌بادی برای اولین بار به اوج خود می‌رسد اماکاهش نمی‌یابد. اگر چه در همه افراد با یک نوع اتوآنتی‌بادی، دیابت پیشرفت نمی‌کند اما به نظر می‌رسد وجود آنتی‌بادی‌های متعدد، با از دست دادن توده سلول‌های بتا عملکردی و در نهایت با افزایش قند خون و علایم آن همراه است. به نظر می‌رسد نفوذ سلول‌های تک هسته ای در جزایر و اطراف آن، یک پدیده دیر هنگام است که در آنتی‌بادی مثبت چندگانه با هایپرگلایسمی ظاهر می‌شود [14]. بنابراین همانطور که گفته شد هم ایمنی سلولی و هم ایمنی هومورال در آسیب به سلولهای βی لانگرهانس و در نتیجه بروز دیابت نوع ۱ دخیلند. زمانی که تقریبا ۹۰ درصد سلول‌های بتا جزایر لوزالمعده از بین می‌روند، علائم بالینی دیابت نوع ۱ بروز می-کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که عفونت‌های ویروسی نیز می‌توانند منجر به دیابت شوند؛ شامل انتروویروس، روتا ویروس، هرپس ویروس، سیتومگالوویروس، ویروس درون زا و عوامل ویروسی شامل سرخچه مادرزادی و .... همچنین عواملی مانند کاهش ویتامین D نیز می‌تواند یک زنگ خطر برای دیابت نوع ۱ باشد. با این وجود نقش عوامل محیطی در پاتوژنز این بیماری کمی بحث برانگیز است [۱۶].

میزان تخریب سلول‌های β در این شکل از دیابت از بیماری به بیمار دیگر کاملا" متفاوت است. در برخی از بیماران، به طور عمده کودکان شیرخوار و بزرگتر سرعت آن زیاد، و در برخی دیگر به طور عمده بزرگسالان سرعت آن کمتر است. سابقا" دیابت نوع یک فقط در کودکان و نوجوانان به عنوان یک اختلال در نظر گرفته می‌شد، اما این نظر در طی دهه گذشته تغییر کرده است، به طوری که سن در شروع علامت دیگر یک عامل محدود کننده نیست. علائمی مانند پلی اوریا[1]، پلی فاژی[2]، بیماری قلبی، کمبود انرژی، خستگی مفرط، کاهش ناگهانی وزن، ترمیم کند زخم‌ها، عفونت‌های مکرر و تاری دید و کتواسیدوز دیابتی به دنبال کمبود شدید آب بدن به خصوص در کودکان و نوجوانان و به میزان کمتری در بزرگسالان دیده می‌شود. سایر بیماری‌های خود ایمنی مانند گریوز[3]، تیروییدیت، هاشیموتو، بیماری آدیسون، هپاتیت خود ایمنی، میاستنی گراویس[4] و کم خونی مخرب نیز ممکن است در بیماران مبتلا به T1D دیده شود. یک نیاز فوری برای

[1] Polyuria
[2] Polyphagia
[3] Graves
[4] Myasthenia gravis

جایگزینی انسولین برون زا نیز مشخصه دیگر دیابت نوع ۱ است. کتو اسیدوز دیابتی[1] (DKA) یک عارضه جدی دیابت و اولین علایم T1DM در کودکی، به ویژه کودکان کمتر از ۵ سال نسبت به افراد مسن است [16-18].

دیابت نوع ۲

دیابت نوع ۲ (DM2) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیکی مزمن در سراسر جهان و یکی از مهمترین چالش‌های بهداشت عمومی قرن ۲۱ است که ۸۰ تا ۹۰ درصد از کل موارد DM را شامل می‌شود. مشخصه آن یک نقص ترشحی پیش رونده به دلیل مقاومت به انسولین است، که به منظور حفظ هموستاز گلوکز، نیاز بدن به انسولین را افزایش می‌دهد. اگر سلول‌های β پانکراس نتوانند انسولین کافی برای جبران افزایش تقاضای انسولین ترشح کنند، سطح گلوکز خون به تدریج بالا می‌رود. دیابت نوع ۲ از تعامل بین عوامل خطر ژنتیکی، محیطی و رفتاری ناشی می‌شود یعنی ترکیبی از عوامل ژنتیکی مربوط به اختلال در ترشح انسولین، مقاومت در برابر انسولین و عوامل محیطی مانند چاقی، پرخوری، استرس و همچنین افزایش سن و عوامل رفتاری مربوط به رژیم غذایی نامناسب و عدم تحرک می‌باشد [۱۹]. به طور کلی دیابت تیپ ۲ یک بیماری چند عاملی است که شامل چندین ژن و عوامل محیطی تا میزان مختلف است. عوامل ژنتیکی دخیل در پاتوژنز دیابت نوع ۲ به طور واضح با سابقه خانوادگی ابتلا به دیابت مرتبط است. میزان همخوانی قابل توجه بالاتر دوقلوهای مونوزیگوت[2] نسبت به دوقلوهای دایگوزیگوت[3] دخالت قابل توجهی از فاکتورهای ژنتیکی را در این نوع دیابت نشان می‌دهد. عوامل دخیل در سازوکار مولکولی عملکرد انسولین در ژن‌های گلوکوکیناز و ژن‌های میتوکندریایی نسخه‌های گیرنده انسولین، داری ناهنجاری‌های ژنتیکی شناخته شده‌ای هستند که می‌توانند از عوامل وابسته به بیماری‌زایی باشند، که این نا هنجاری‌های ژنتیکی حدود ۳۰ درصد از فاکتورهای ژنتیکی این نوع از دیابت را توضیح می‌دهند. نقش عوامل محیطی مانند بالا رفتن سن، چاقی، مصرف بیش از اندازه کالری، نوشیدن الکل، سیگار کشیدن، و غیره از عوامل مستقل خطرزایی برای پاتوژنز دیابت نوع ۲ هستند. چاقی (به ویژه چاقی موضعی در ناحیه شکمی) به دلیل کمبود ورزش همراه با کاهش توده عضلانی، مقاومت به انسولین را القا می‌کند [19,20]. شیوع T2D در جهان روند رو به رشدی دارد و طبق آخرین گزارش‌های منتشر شده توسط انجمن بین المللی دیابت، تعداد افراد دیابتی در سال ۲۰۱۳ حدود ۳۸۲ میلیون نفر بوده است و در سال ۲۰۳۵ حدود ۵۹۲ میلیون نفر تخمین زده می‌شود. طبق آمار فدراسیون بین المللی دیابت، در سال ۲۰۱۳ بیش از ۴,۳ میلیون نفر در ایران دیابت داشتند و شیوع این بیماری در جمعیت بزرگسال ۲۰ تا ۷۹ ساله ۸,۴۳ درصد تخمین زده شده است [۲۱].

دیابت تیپ دو یا (دیابت بزرگسالان) می‌تواند افراد را در هر سنی، حتی کوکان را هم تحت تاثیر قرار دهد؛ با این حال بیشتر در افراد میانسال و مسن ایجاد می‌شود. افزایش قند خون مزمن با آسیب طولانی مدت،

[1] Diabetic Ketoacidosis
[2] monozygotic
[3] dizygotic

اختلال در عملکرد و نارسایی اندام‌های مختلف به ویژه چشم‌ها، کلیه‌ها، اعصاب، قلب و رگ‌های خونی همراه است که منجر به افزایش میزان مرگ و میر می‌شود. علاوه بر مقاومت به انسولین که در اکثر بیماران مبتلا دیده می‌شود، فشار خون بالا، دیس لیپیدمی[1](تری گلیسیرید بالا) و سطح کلسترول HDL پایین؛ هایپر لیپیدمی بعد از غذا، از شاخصه هایی هستند که در افراد T2D دیده می‌شوند [22,23].

دیابت خودایمن تاخیری در بالغین (LADA)

بیماران LADA از نظر داشتن اتو آنتی‌بادی علیه سلول های βی تولید کننده انسولین، BMI[2] پایین (پایین تر از بیماران دیابتی نوع ۲) همانند بیماران دیابتی نوع یک و از نظر داشتن سن بیش از ۳۰ سال و اینکه وابسته به انسولین نیستند (حداقل ۶ ماه پس از تشخیص) و مقاومت به انسولین یا ضعف آن، مشابه بیماران دیابتی نوع دو هستند و از طرفی دارای ویژگی‌های ژنتیکی مشترک با هر دو نوع بیماری دیابت نوع ۱ و ۲ هستند [۷]. برخی مطالعات ژنتیکی انجام شده در مورد LADA به تعداد محدودی از ژن‌هایی که نقش مکان های خطر را در پاتوژنز دیابت نوع ۱ و۲ پشتیبانی می‌کنند اشاره دارند. با این وجود در برخی مطالعات LADA به عنوان یک زیر گروه از دیابت نوع ۱ با واسطه ایمنی اختصاص می‌یابد. از طرفی برخی مطالعات دیگر اینطور بیان می‌دارند که LADA نوعی دیابت خود ایمن، متمایز از T1D است که چرا که سن بیماران مبتلا نسبت به سن بیماران نوع ۱ بیشتر است. امروزه انجمن ایمنی شناسی[3] برای تشخیص LADA سه معیار اصلی را تعیین کرده است: ۱-سن شروع بیماری بالاتر از ۳۰ سال ۲- وجود حداقل یک نوع از آنتی-بادی‌های سلول جزیره ای در سرم بیمار ۳-عدم نیاز به انسولین درمانی حداقل شش ماه پس از تشخیص بیماری [2, 24].

بیمارانی که به عنوان LADA تعریف می شوند با ناهمگنی ژنتیکی، فنوتیپی و ایمنی شناختی، تنوع زیاد تخریب سلول‌های β و درجه های مختلف مقاومت به انسولین و خود ایمنی مشخص می‌شوند، احتمالا به دلیل تفاوت در ژنتیک و ایمنی و نا همگنی زیاد LADA تعیین الگوریتم پیش‌بینی برای درمان این بیماری دشوار است [4].

ویژگی‌های ژنتیکی داده‌های موجود درباره حساسیت ژنتیکی نشان می‌دهد که LADA مولفه ژنتیکی پایین‌تری را نسبت به T1D نشان می‌دهد. به طور خاص آنتی‌ژن لکوسیت انسانی -DRB1*04-(HLA) DQB1*0302 وHLA-DRB1*0301-DQB1*0201 که در T1D بسیار شایع است و با افزایش سن در شروع بیماری فراوانی آن کاهش می‌یابد، در LADA کمتر ازT1D بزرگسالان است. از طرفی یافتههای مشابهی برای پلی مورفیسم تک نوکلیوتیدی[4] Cyst1858Thr در ژن پروتین تیروزین فسفاتاز غیر گیرنده ۲۲ (PTPN22)[5] و تکرار پشت سر هم انسولین با تعداد متغیر[6] I/I (INS VNTR) مشاهده شده است، و

[1] Dyslipidemia
[2] Body Mass Index
[3] Immunology of Diabetes Society
[4] single-nucleotide polymorphism
[5] protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 (PTPN22) gene
[6] insulin variable number tandem repeat (INS VNTR) I/I genotype expression

نشان داده شده است که فرکانس پلی مورفیسم Ala49Gly مربوط به آنتی‌ژن ۴ لنفوسیت Tسیتوتوکسیک[1](CTLA4) در اگزون ۱ با سن شروع T1D ارتباط ندارد و این نشان دهنده نقش مشابهی در حساسیت ژنتیکی LADA با بیماران تیپ ۱ دیابت است [4, 6].

همچنین مطالعات انجام شده در سوئد و فنلاند نشان دادند که فراوانی ژنوتیپ‌های دیابت نوع ۲ مرتبط به CT/TTrs7903146 در ژن (TC-F7L2)[2] در افراد LADA همانند زیر شاخه‌های دیابت نوع ۲ افزایش یافته و همچنین در این جمعیت‌ها شباهت‌های ژنتیکی بیماران LADA با دیابت نوع ۱ مربوط به ISN VNTR، HLA و PTPN22 مشاهده شد [۳۶،۳۹،۴۰]. بر اساس این یافته‌ها، LADA در واقع بیماری هتروژنی است که با HLA که قوی‌ترین عامل تعین کننده ژنتیکی دیابت نوع ۱ است و همچنین با فاکتور (TC-F7L2) که قوی‌ترین استعداد ژنتیکی را به دیابت نوع ۲ می‌بخشد، از طریق مسیر سیگنالینگ Wnt[3] که در هموستاز گلوکز نقش دارد و آلل جزیی T که با اختلال در ترشح انسولین همراه است، مرتبط است[۶].

با توجه به خصوصیات ژنتیکی و ایمونولوژیک مشترک بین LADA و دیابت نوع ۱، افراد مبتلا به LADA با بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ نیز تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند؛ از جمله اینکه در مقایسه با دیابت نوع ۱، ژن‌های حساسیت شیوع کمتری داشته و ژن‌های محافظ درLADA شیوع بیشتری دارند، این موارد ممکن است تا حدی شروع نسبتا" دیررس LADA را در مقایسه با دیابت نوع ۱ توضیح دهند. این نتایج نشان می-دهد که وجود ویژگی‌های ژنتیکی مشترک بیماران LADA با T1Dو T2D از این ایده که LADA آمیزه ای از ویژگی‌های هر دو نوع دیابت را دارد، پشتیبانی می‌کند، با این حال باید توجه داشت که اکثر این مطالعات ژن‌هایی را بررسی کرده اند که قبلا با T1D یا T2D که بروز آن در سنین جوانی بوده است، مرتبط می-باشند. برای مشخص کردن حساسیت ژنتیکی LADA برای انجام درمان‌های ایمن و موثر، مطالعات بیشتری لازم است [25].

از جمله سایر ویژگی‌های مهم بالینی بیماران LADA می‌توان به سطح متوسطی از اختلال عملکرد سلول بتا بین افراد دیابت نوع ۱ و ۲، کاهش سریعتر C پپتید در مقایسه با دیابت نوع ۲ و سطحی از مقاومت به انسولین که با دیابت نوع ۱ قابل مقایسه است اشاره کرد. اگرچه با وجود رابطه پاتو فیزیولوژیکی نزدیکتر LADA با دیابت نوع ۱، اما اغلب به اشتباه دیابت نوع ۲ تشخیص داده شده و به عنوان دیابت نوع ۲ درمان می‌شود [26, 27]. در دیابت نوع ۱ سن معمول شروع بیماری کمتر از ۳۵ سال و پاسخ به شیوه زندگی و عوامل خوراکی ضعیف است و عملا" بیماران از کاهش وزن ناخواسته لاغر هستند و همچنین حداقل یکی از انواع اتوآنتی‌بادیهای ذکر شده در سرم آنها قابل اندازه‌گیری است. بر عکس در دیابت نوع ۲ سن معمول بیشتر از ۳۵ سال است و پاسخ به شیوه‌های زندگی و عوامل خوراکی خوب است. بیماران غالبا" دارای اضافه

[1] T-lymphocyte–associated antigen 4
[2] transcription factor 7 like 2 (TCF7L2) gene
[3] Wnt signaling pathway

وزن بوده و یا چاق هستند و از نظر وجود آنتی‌بادی در سرم منفی هستند. اما بیماری LADA اغلب در سنین بالای ۳۰ سال که بیشتر مشخصه دیابت نوع ۲ است بروز می‌یابد و بیماران در ابتدا به رژیم غذایی، ورزش و عوامل خوراکی پاسخ می‌دهند، اما با بدتر شدن عملکرد سلول‌های β، پاسخ آن ها کاهش می‌یابد. بیماران LADA ممکن است در ابتدا به داروهای خوراکی پاسخ دهند، اما اغلب طی ۵ سال بعد از تشخیص به انسولین درمانی نیاز دارند. علاوه بر یک پانل کامل آنتی بادی، C پپتید اغلب به عنوان یک مارکر اندازه-گیری می شود تا انواع دیابت را از هم شناسایی کند [۲۸]. C پپتید اغلب در دیابت نوع ۱ قابل تشخیص نیست با این حال بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ می‌توانند تا ۵ سال پس از تشخیص، مقداری باقیمانده C پپتید داشته باشند، به ویژه کسانی که بعد از ۱۸ سالگی تشخیص داده می‌شوند. میزان این فاکتور در دیابت نوع ۲ طبیعی یا حتی بیشتر از حد طبیعی است، در حالی که بیماران مبتلا بهLADA ، سطح C پپتید پایین‌تر از حد طبیعی بوده ولی نسبت به بیماران تیپ ۱ بیشتر است. [29-31]. در جدول ۱ ویژگی‌های ژنتیکی، بالینی و متابولیکی LADA با T1D و T2D مقایسه شده است.

جدول۱: مقایسه ویژگی‌های ژنتیکی، بالینی و متابولیکی LADA با دیابت نوع ۱ و دیابت نوع ۲ [31]

ویژگی بیماری	نوع بیماری		
	دیابت نوع ۱	LADA	دیابت نوع ۲
سن تشخیص بیماری	کودکان و نوجوانان- به ندرت در بالغین	۳۰ سال<	عموما در بزرگسالان- به ندرت در کودکان و نوجوانان
شروع بیماری	حاد	به ندرت صورت حاد	آهسته
خودایمنی	به شدت افزایش می‌یابد	افزایش می‌یابد	بدون تغییر
کتواسیدوزیس	رایج	به ندرت	به ندرت
مقاومت به انسولین	بدون تغییر	رو به افزایش یا بدون تغییر	به شدت افزایش می‌یابد
عملکرد سلول‌های β	به شدت کاهش می‌یابد	کاهش می‌یابد	رو به افزایش یا بدون تغییر
وابستگی به انسولین	به محض شروع بیماری	۶ ماه بعد از شروع بیماری <	سالها بعد از شروع بیماری
شاخص توده بدنی (BMI)	کمتر از نرمال تا معمولی	معمولی تا افزایش وزن	افزایش وزن تا چاق
ریسک بروز سندرم متابولیک	بدون تغییر	افزایش می‌یابد	به شدت افزایش می‌یابد
حساسیت به HLA	به شدت افزایش می‌یابد	افزایش می‌یابد	بدون تغییر

درمان LADA

به دلیل پاتوفیزیولوژی مبهم و نکات بالینی ویژه‌ی LADA تاکنون هیچ راهنمای خاصی برای درمان LADAارائه نشده است. به طور کلی هدف از درمان باید ارایه کنترل متابولیکی و جلوگیری از عوارض مداوم باشد. گزینه‌های در حال اجرا برای درمان LADA شامل تغییر سبک زندگی، داروهای خوراکی و انسولین است. به دلیل شباهت با بیماران دیابتی نوع دو ممکن است بیماران LADA که نیاز به انسولین دارند، با داروهای خوراکی درمان نشوند. اگر چه بسیاری از بیماران LADA با داروهای خوراکی درمان را آغاز می-کنند. دارو های معمول کاهش قند خون به عنوان مثال، سولفونیل اوره ها (SUs)، متفورمین یا تیازولیدیدن دیون[۱] (TZDs) و مهار کننده‌های DPP-4 [۲] در حفظ سطح گلوکز خون بسیار خوب هستند، اما فقط برای درمان کوتاه مدت؛ برای درمان دراز مدت LADA، انسولین درمانی طی ۵ سال از زمان تشخیص لازم است. انسولین درمانی و همچنین سه مهار کننده DPP-4 (سیتاگلیپتین[۳]، لیناگلیپتین[۴] و ساکساگلیپتین[۵]) می-توانند عملکرد سلول‌های β را حفظ کنند، در حالی که سولفونیل اوره ها ممکن است وابستگی به انسولین را تسریع کنند و به عنوان خط اول درمان برای بیماران LADA استفاده نمی‌شوند. مهار کننده های DPP-4 بازدارنده های دی پپتیدیل پپتیداز هستند که با کاهش سطح گلوکز خون بدون ایجاد هیپوگلیسمی (قند خون پایین) کار می‌کنند. این داروها به همین ترتیب می‌توانند لوزالمعده را برای تولید انسولین بیشتر تحریک کنند. سولفونیل اوره دسته ای از داروها است که برای مدت طولانی مورد استفاده بوده و معمولا" به عنوان عامل دوم برای کمک به کاهش قند خون در زمان غذا استفاده می‌شود، به عنوان مثال متفورمین احتمالا" در مبتلایان به چاقی LADA بسیار ارزشمند است [29,31,32]. تجویز انسولین در همه موارد غیر قابل تشخیص C پپتید ضروری است و تنها سلاحی است که می‌تواند جایگزین ترشح انسولین سلولβ در T1Dشود. افراد مبتلا بهLADA روند کندتری را به سمت وابستگی به انسولین مطلق نشان می‌دهند که توسط C پپتید بالاتر در شروع بیماری نشان داده می‌شود. نتایج حاصل از مطالعات بالینی نشان می‌دهدکه تجویز انسولین برون زا، از عملکرد سلول بتا پشتیبانی می‌کند و شدت انسولیت را هم به دلیل کاهش سمیت گلوکوز و هم به دلیل سرکوب فعال بودن سلول جزایر کاهش می‌دهد. انسولین درمانی سلول‌های T واکنش-پذیر را از طریق انتشار موضعی سیتوکین‌های تنظیم کننده سرکوب می‌کند. با توجه به نتایج آزمایشات بالینی، پزشکان تمایل دارند که در مراحل اولیه در بیماران مبتلا به LADA با سطح C پپتید کمتر و عملکرد سلول بتا باقی مانده درمان با انسولین را تجویز کنند [۷].

[1] Thiazolidinediones
[2] Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors
[3] Sitagliptine
[4] Linagliptine
[5] Saxagliptine

بحث و نتیجه‌گیری

دیابت خودایمن تاخیری در بزرگسالان طیف وسیعی از فنوتیپ‌های بالینی و متابولیک ناهمگن را در بر می‌گیرد که از دیابت کلاسیک T1D با شروع در بزرگسالی تا LADA را شامل می‌شود. اگر تعریفی را بپذیریم که به موجب آن LADA را می‌توان با مثبت بودن هر اتوآنتی بادی علیه پروتئین‌های جزیره شناسایی کرد، باید اذعان کرد که این شکل از دیابت دارای درجه قابل توجهی از ناهمگنی است [2,31]. این ناهمگونی نه تنها شامل بیمارانی می‌شود که علائم واضح کمبود انسولین را دارند، که معمولاً با نشانگرهای قوی خودایمنی همراه است، بلکه بیمارانی را نیز در بر می‌گیرد که دارای فنوتیپ بالینی شبیه به دیابت نوع ۲ هستند اما هنوز برای نشانگرهای نسبتاً ضعیف واکنش خود ایمنی مثبت هستند. بنابراین، ناهمگنی LADAمی‌تواند نشان دهنده یک طیف فنوتیپی پیشرونده بین دو نوع رایج دیابت قندی، T1Dو T2D باشد [۴,24]. این فرضیه این تصور متعارف را که فرآیندهای ناشی از سیستم ایمنی به پاتوژنز T2Dمرتبط نیستند به چالش می‌کشد. همچنین به دلیل تنوع ویژگی‌های بیوشیمیایی و بالینی در غربالگری بیماران LADA، هنوز بهترین نوع درمان موثر برای این بیماران شناسایی نشده است. بنابراین مطالعات بیشتر برای دخالت فرآیند خودایمنی در پاتوژنز دیابت نوع ۲ و LADA ضروری است.

منابع

1. Karamanou M, Protogerou A, Tsoucalas G, Androutsos G, Poulakou-Rebelakou E. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. World J Diabetes. 2016;7(1):1-7
2. Carlsson S. Etiology and Pathogenesis of Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) Compared to Type 2 Diabetes. Front Physiol. 2019;10:320.
3. Singh K, Martinell M, Luo Z, Espes D, Stålhammar J, Sandler S, et al. Cellular immunological changes in patients with LADA are a mixture of those seen in patients with type 1 and type 2 diabetes. Clin Exp Immunol. 2019;197(1):64-73.
4. Pozzilli P, Pieralice S. Latent Autoimmune Diabetes in Adults: Current Status and New Horizons. Endocrinol Metab (Seoul). 2018;33(2):147-59.
5. Moosaie F MN, Deravi N,et al. Prevalence of diabetes-associated autoantibodies among patients presenting with type 2 diabetes and related metabolic differences. PrimCare Diab. 2020.
6. Andersen MK, Lundgren V, Turunen JA, Forsblom C, Isomaa B, Groop PH, et al. Latent autoimmune diabetes in adults differs genetically from classical type 1 diabetes diagnosed after the age of 35 years. Diabetes Care. 2010;33(9):2062-4.
7. Pieralice S, Pozzilli P. Latent Autoimmune Diabetes in Adults: A Review on Clinical Implications and Management. Diabetes Metab J. 2018; 42:451-464.
8. Mobasseri M, Shirmohammadi M, Amiri T, Vahed N, Hosseini Fard H, Ghojazadeh M. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. Health Promot Perspect. 2020;10(2):98-115.
9. Simmons KM, Michels AW. Type 1 diabetes: A predictable disease. World J Diabetes. 2015;6(3):380-90.

10. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. Nature reviews Disease primers. 2017;3(1):1-17.
11. Giwa AM, Ahmed R, Omidian Z, Majety N, Karakus KE, Omer SM, et al. Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: genetics to environment. World journal of diabetes. 2020;11(1):13.
12. Wenzlau JM, Hutton JC. Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. Current diabetes reports. 2013;13(5):608-15.
13. Verkauskiene R, Danyte E, Dobrovolskiene R, Stankute I, Simoniene D, Razanskaite-Virbickiene D, et al. The course of diabetes in children, adolescents and young adults: does the autoimmunity status matter? BMC endocrine disorders. 2016;16(1):1-13.
14. Regnell SE, Lernmark Å. Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. Diabetologia. 2017;60(8):1370-81.
15. Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. Front Endocrinol (Lausanne). 2017;8:343.
16. Shojaeian A, Mehri-Ghahfarrokhi A. An overview of the epidemiology of type 1 diabetes mellitus. Int J Metab Syndr. 2018;2(1):1-4.
17. Wändell PE. Quality of life of patients with diabetes mellitus an overview of research in primary health care in the Nordic countries. Scandinavian journal of primary health care. 2005;23(2):68-74.
18. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. Lancet. 2014;383(9911):69-82.
19. Baynes HW. Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. J diabetes metab. 2015;6(5):1-9.
20. Kohei K. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. JMAJ. 2010;53(1):41-6.
21. Shahriari S, Hejazi N, Eftekhari MH. The role of camel milk in treatment of type 2 diabetes: a review. International Journal of Nutrition Sciences. 2018;3(3):120-6
22. Zhao Y, Xu G, Wu W, Yi X. Type 2 diabetes mellitus-disease, diagnosis and treatment. J Diabetes Metab. 2015;6(533):2.
23. Kousar S. Type 1 Diabetes: Causes, Symptoms and Treatments, Review with Personal Experience. Current Research in Diabetes & Obesity Journal. 2019;11(4):1-7.
24. Chen Y, Chen G. New genetic characteristics of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). Ann Transl Med. 2019;7(5):81.
25. Seok H, Lee BW. Latent Autoimmune Diabetes in Adults: Autoimmune Diabetes in Adults with Slowly Progressive β-cell Failure. Diabetes Metab J. 2012;36(2):116-9.
26. Pipi E, Marketou M, Tsirogianni A. Distinct clinical and laboratory characteristics of latent autoimmune diabetes in adults in relation to type 1 and type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes. 2014;5(4):505-10.
27. Hawa MI, Buchan AP, Ola T, Wun CC, DeMicco DA, Bao W, et al. LADA and CARDS: a prospective study of clinical outcome in established adult-onset autoimmune diabetes. Diabetes Care. 2014;37(6):1643-9; doi: 10.2337/dc13-2383.
28. Stenström G, Gottsäter A, Bakhtadze E, Berger B, Sundkvist G. Latent autoimmune diabetes in adults: definition, prevalence, beta-cell function, and treatment. Diabetes. 2005;54 Suppl 2:S68-72. doi:10.2337/diabetes.54.suppl_2.s68

29. Laugesen E, Østergaard JA, Leslie RD. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. Diabet Med. 2015;32(7):843-852. doi:10.1111/dme.12700
30. O'Neal KS, Johnson JL, Panak RL. Recognizing and Appropriately Treating Latent Autoimmune Diabetes in Adults. Diabetes Spectr. 2016;29(4):249-52.
31. Buzzetti R, Zampetti S, Maddaloni E. Adult-onset autoimmune diabetes: current knowledge and implications for management. Nat Rev Endocrinol. 2017;13(11):674-86.
32. Page CP, Fitzgerald B, Hawes EM. Latent autoimmune diabetes of adulthood: case report. Clin Diabetes Endocrinol. 2017;3:11.

استفاده از ترکیبات مستخرج از جانداران دریایی در درمان های مبتنی بر سلول های بنیادی

گلنوش زینعلی[۱]، زهرا خوشنود[۲*]

۱.. کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران.

*۲. دکتری زیست شناسی دریا، گروه زیست شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران.
zkhoshnood@gmail.com

چکیده

قسمت عمده بافت پیوندی متشکل از کلاژن می باشد. امروزه کلاژن دریایی در زمینه پزشکی بازسازی و درمان مبتنی بر سلول های بنیادی کاربردهای فراوانی دارد. مهندسی بافت شاخه از پزشکی بازسازی است که در حال توسعه می باشد. در این علم تحقیقاتی در زمینه سلول های بنیادی و موادزیستی و کاربرد آنها برای ترمیم و بازسازی اندام ها و بافت های آسیب دیده انجام شده است. کلاژن دریایی به دلیل خواص سازگار با محیط زیست، عدم انتقال بیماری های حیوانی، مقرون به صرفه بودن و ... گزینه ی ایده آلی برای بازسازی بافت ها و اندام های آسیب دیده به شمار آورده است. امروزه تحقیقات گسترده ای در زمینه بازسازی غضروف، استخوان، پریودنتال (بیماری لثه) و بازسازی قرنیه با استفاده از کلاژن ماهی انجام شده است. مطالعه ی حاضر با استفاده از مطالعات پیشین و اخیر، به بررسی و معرفی امکان استفاده از ترکیبات طبیعی مستخرج از جانداران دریایی در درمان های ترمیمی مبتنی بر سلول های بنیادی می پردازد.

کلمات کلیدی: سلول های بنیادی، جانداران دریایی، درمان

Application of extracted components from marine organisms in stem cell based treatments

Golnoosh Zeinali1 and Zahra Khoshnood2*

1: BSc in Cell and Molecular Biology, Department of Biology, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran.

2: PhD in Marine Biology, Department of Biology, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran.

zkhoshnood@gmail.com

Abstract

The major part of connective tissue consists of collagen. Today, marine collagen has many applications in the field of regenerative medicine and treatment based on stem cells. Tissue engineering is a branch of regenerative medicine that is developing. In this science, research has been done in the field of stem cells and biomaterials and their use for repairing and regenerating damaged organs and tissues. Due to its environmentally friendly properties, non-transmission of animal diseases, cost-effectiveness, etc., marine collagen is an ideal option for the regeneration of damaged tissues and organs. Today, extensive research has been done in the field of cartilage, bone, periodontal (gum disease) and corneal reconstruction using fish collagen. Using previous and recent studies, the present study examines and introduces the possibility of using natural compounds extracted from marine organisms in restorative treatments based on stem cells.

Keywords

Stem cells, Marine organisms, treatment

مقدمه

فناوری سلول های بنیادی دریایی، علمی میان رشته ای می باشد که به محققین اجازه می دهد تعداد زیادی مولکول های زیستی فعال تولید کنند. بسیاری از این مولکول ها تاثیرات بی نظیری بر سلامت انسان دارند. امروزه مطالعات فراوانی در زمینه بازسازی و ترمیم بافت ها و اندام های آسیب دیده با استفاده از کلاژن دریایی انجام شده است.

استفاده از کلاژن دریایی در درمان مبتنی بر سلول های بنیادی و بازسازی بافت

مهندسی بافت و پزشکی بازسازی علمی میان رشته ای است که به سرعت در حال تحول است و ادغامی از علوم مهندسی زیستی، پزشکی، زیست شناسی سلولی، فارماکولوژی و شیمی، با هدف بازسازی بافت ها و اندام های به خطر افتاده می باشد[4] .

گسترده ترین مفهوم پذیرفته شده از مهندسی بافت و پزشکی بازسازی شامل سه جز اصلی می باشد:

۱- توسعه عملکردی و داربست های زیست سازگار

۲- انتخاب سلول های بنیادی مناسب

۳- القای مسیرهای سیگنالینگ خاص برای ترمیم و بازسازی بافت ها یا اندام های خاص[9].

مواد زیستی اجزای ضروری برای توسعه داربست هستند، استفاده از مواد زیستی مناسب می تواند سلول های بنیادی را بهبود بخشد[5].

سلول های بنیادی به طور معمول تمایز نیافته اند با این حال دارای توانایی تجدید خود می باشند، به گونه ای که سلول های فرزند یا دخترشان می توانند به تبارهای مختلف یا انواع سلول ها رشد کنند. این ویژگی متمایز سلول های بنیادی را یک نامزد ایده آل برای استفاده در بازسازی بافت ها یا اندام های آسیب دیده به شمار آورده است.

سلول های بنیادی را می توان به دسته های مختلف به گونه ای که وابسته به منشا آنها باشد تقسیم کرد:

۱- سلول های بنیادی جنینی

۲- سلول های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) (induced pluripotent stem cells)، پرتوان در نظر گرفته می شوند به این منظور که آن ها می توانند در هر سه لایه رویان، یعنی اکتودرم، اندودرم و مزودرم تمایز یابند.

در مقابل سلول های بنیادی مزانشیمی و سلول های بنیادی خون ساز، سلول های چندتوان هستند که می توانند به هرنوع سلول تنها در یک لایه از رویان، تمایز یابند به علاوه سلول های بنیادی مزانشیمی دارای عملکرد های تنظیم ایمنی هستند[7].

در میان تمام پلیمرهای طبیعی، کلاژن یکی از گسترده ترین موارد مطالعه و کاربردی می باشد. کلاژن تقریبا یک سوم از تمام پروتئین های یک جانور را تشکیل می دهد و تشکیل دهنده اصلی ماتریکس خارج سلولی در بافت همبند از جمله پوست، استخوان، غضروف، رباط و تاندون ها می باشد[17].

کلاژن جهت قدرت استحکام و کشش برای بافت ضروری می باشد. همچنین کلاژن در تعمیر، بازسازی و تحرک به واسطه ی شبکه ی سیگنالینگ مکانیکی- شیمیایی داخل سلولی موثر است.

زیست پزشکی برنامه های کاربردی مربوط به استفاده از کلاژن، شامل توسعه مواد زیستی، مهندسی بافت، بخیه قابل جذب جراحی، عوامل هماستاتیک و سوختگی یا زخم می باشد[20].

باتوجه به پیامد های اخلاقی یا رژیم غذایی در یک محیط اجتماعی و خطر انتقال بیماری های حیوانی مانند جنون گاوی و تب برفکی، جامعه ی علمی در حال بررسی توسعه ی کلاژن دریایی به عنوان جایگزین برای کلاژن پستانداران است[1].

دلیل دیگر ترجیح استفاده از کلاژن دریایی این است که تقریبا ۷۵٪ از کل وزن ماهی را کلاژن تشکیل داده است[19].

به طور متوسط تقریبا سه چهارم از یک ماهی، از جمله پوست، باله، سیستم اسکلت و سر، در طول فرآوری ماهی دور انداخته می شود [2].

این دفع محصولات جانبی از فرآوری ماهی می تواند تهدیدی برای محیط زیست باشد. محصولات جانبی دریایی منابع مهم و ارزشمند معدنی و آلی هستند که پتانسیل استفاده ی مختلف صنعتی مانند مواد مغذی، لوازم آرایشی و دارویی را دارند. استفاده از کلاژن دریایی محدود نیست و در مهندسی بافت، پانسمان زخم و... به کار می رود.

مطالعات انجام شده نشان می دهد که کلاژن ماهی هیدرولیز شده از نظر بیولوژیک فعال می باشد و دارای ویژگی هایی از جمله آنتی- اکسیداتیو، ایمونومدولاتوری (تعدیل کننده ی سیستم ایمنی)، ضدباکتری، ضد التهابی و خواص مهاری ضد آنزیم می باشد[11].

بنابراین استفاده از کلاژن ماهی نه تنها می تواند مقدار مواد زیستی را برای محافظت از محیط زیست محدود کند همچنین می تواند ارزش اقتصادی محصولات جانبی ماهی را افزایش دهد.

امروزه تحقیقات زیادی در زمینه بازسازی غضروف،استخوان و پریودنتال (بیماری لثه) و بازسازی قرنیه با استفاده از کلاژن ماهی انجام شده است[5].

ویژگی های اساسی کلاژن دریایی

۲۸ نوع کلاژن در موجودات دریایی وجوددارد[13].کلاژن نوع I، فراوان ترین نوع کلاژن است و می تواند در فلس های ماهی، پوست و استخوان یافت شود. در حالی که کلاژن نوع II می تواند در غضروف و استخوان ماهی یافت شود[6].

کلاژن های دریایی قابلیت زیستی و راندمان جذب بیشتری در بدن، در مقایسه با کلاژن مشتق شده از پستانداران مانند گاو و خوک دارند[18].

با این حال استفاده از کلاژن ماهی معایبی هم دارد: از جمله میزان بالاتر تخریب، مقاومت مکانیکی پایین تر و دناتوراسیون در دماهای پایین تر و سختی بیومکانیکی پایین تر، از معایب استفاده از کلاژن می باشد[17].
کلاژن دریایی در مقایسه با کلاژن پستانداران توسط پروتئاز ها به راحتی هیدرولیز می شود[3].
از آنجا که خواص مکانیکی کلاژن دریایی تعین کننده اصلی فعالیت بیولوژیک آن است، مقاومت مکانیکی پایین تر و دمای دناتوراسیون کلاژن دریایی منجر به انحلال آسان تر فیبرکلاژن در محیط های فیزیولوژیک می شود. این امر یک مانع برای استفاده زیست پزشکی از کلاژن دریایی می باشد[5].

تاثیر مواد زیستی دریایی بر تنظیم ایمنی خواص سلول های بنیادی مزانشیم مشتق شده از مغز استخوان

سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان (BMSCs)(bone marrow-derived mesenchymal stem cells) سلول های بنیادی ای هستند که به طور گسترده ای در پزشکی و مهندسی بافت مور د مطالعه قرار می گیرند.
این سلول ها به آسانی به دست می آیند و در شرایط خاص توانایی تمایز دارند که پایه و اساس نقش های مختلف آنها در زمینه ی پزشکی بازسازی می باشد. BMSCs دارای عملکرد های تنظیم ایمنی قوی هستند. BMSCs می تواند تکثیر لنفوسیت های T را مهار کند و ترشح سیتوکین های ایمنی مانند فاکتور نکروز تومور را مهار کند[14].
عملکردهای تنظیم ایمنی BMSCs پیامدهای مهمی در زمینه های مهندسی بافت و درمان سلول های بنیادی دارد. عملکرد های تنظیم ایمنی BMSCs برای فرار از حمله لنفوسیت ها از جمله سلول های کشنده ی طبیعی و سلول های T فعال ضروری است[21].
بنابراین حفظ عملکردهای تنظیم ایمنی BMSCs برای موفقیت نهایی ترمیم بافت بسیار مهم است[10].
در سال های اخیر مطالعات نشان داده است که یک محیط استئوژنیک می تواند تمایز استئوژنیک BMSCs را ایجاد کند که عملکرد های تنظیم ایمنی خود را پس از تمایز حفظ کند[15].
مطالعات دیگر نشان داده که بسیاری از مواد بیولوژیک می توانند تمایز استئوژنیک BMSCs را القا کند [8].
با این حال هنوز مشخص نیست که آیا BMSCs می تواند عملکرد های تنظیم ایمنی خود را پس از تحریک توسط این مواد زیستی حفظ کنند.
مطالعات نشان داده که کلاژن ماهی هیدرولیزشده دارای القای استخوان خوبی است[12].
که این سوال مطرح می شود که آیا HFC (hydrolyzed fish collagen)روی عملکرد تنظیم ایمنی سلول های بنیادی مزانشیمی تاثیر می گذارد (ضعیف می شود یا افزایش می یابد)[16].

نتیجه گیری

در سالیان اخیر استفاده از منابع دریایی به طور گسترده ای افزایش یافته است و کلاژن دریایی به دلیل سازگاری با محیط زیست، مقرون به صرفه بودن و کم خطربودن آن بهترین گزینه برای درمان مبتنی بر سلول های بنیادی و بازسازی بافت می باشد. با این حال استفاده از این روش معایبی هم دارد می توان به مواردی از جمله میزان بالاتر تخریب، مقاومت مکانیکی پایین و ... اشاره کرد.

منابع

1.Adamiak K, Lewandowska K and Sionkowska A: The infuence of salicin on rheological and film-forming properties of collagen. Molecules 26: 1661, 2021.

2.Alves A, Marques A, Martins E, Silva T and Reis R: Cosmetic potential of marine fish skin collagen. Cosmetics 4: 39, 2017.

3.Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG and Sánchez ML: Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. J Cosmet Dermatol 17: 20-26, 2018.

4.Caddeo S, Boffito M and Sartori S: Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models. Front Bioeng Biotechnol 5: 40, 2017.

5.Chao Liu: Application of marine collagen for stem-cell-based therapy and tissue regeneration (Review). Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, P.R. China Received April 22, 2021; Accepted June 22, 2021.

6.Cumming MH, Hall B and Hofman K: Isolation and characterisation of major and minor collagens from hyaline cartilage of hoki (Macruronus novaezelandiae). Mar Drugs 17: 223, 2019.

7.Glotzbach JP, Wong VW, Gurtner GC and Longaker MT: Regenerative medicine. Curr Probl Surg 48:148-212, 2011.

8.García-Gareta, E.; Coathup, M. J.; Blunn, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. Bone: 81, 112−121,2015.

9.La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, De Rosa A, Papaccio G, Tirino V and Laino L: Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. J Dent 42: 761-768, 2014.

10.La Rocca, G.; Lo Iacono, M.; Corsello, T.; Corrao, S.; Farina, F.;Anzalone, R. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro: new perspectives for cellular therapy. Curr. Stem Cell Res.Ther. 8, 100−113,2013.

11.Liu C and Sun J: Marine based biomaterial‐fish collagen enhances the polarization of human macrophage. IOP Conf Ser Mater Sci Eng 1040: 012006, 2021.

12.Liu, C.; Sun, J. Hydrolyzed tilapia fish collagen induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells.Biomed. Mater. 10, No. 065020,2015.

13.Meyer M: Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. Biomed Eng Online 18: 24, 2019.

14.Molina, E. R.; Smith, B. T.; Shah, S. R.; Shin, H.; Mikos, A. G.Immunomodulatory properties of stem cells and bioactive molecules for tissue engineering. J. Controlled Release . 219, 107−118,2015.

15.Niemeyer, P.; Kornacker, M.; Mehlhorn, A.; Seckinger, A.;Vohrer, J.; Schmal, H.; Kasten, P.; Eckstein, V.; Südkamp, N. P.;Krause, U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. Tissue Eng. 13, 111−121,2007.

16.Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.;Taghadosi, M.; Esmaeili, S. A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi,A.; Afshari, J. T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J. Cell. Physiol. 233, 6425−6440,2018.

17.Subhan F, Hussain Z, Tauseef I, Shehzad A and Wahid F: A review on recent advances and applications of fish collagen. Crit Rev Food Sci Nutr 61: 1027‐1037, 2021.

18.Sripriya R and Kumar R: A novel enzymatic method for preparation and characterization of collagen film from swim bladder of fish rohu (Labeo rohita) Food Nutr Sci 6: 1468‐1478, 2015.

19.Senaratne LS, Park PJ and Kim SK: Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (Lagocephalus gloveri) skin. Bioresour Technol 97: 191‐197, 2006.

20.Tziveleka LA, Ioannou E, Tsiourvas D, Berillis P, Foufa E and Roussis V: Collagen from the marine sponges Axinella Cannabina and Suberites Carnosus: Isolation and morphological, biochemical, and biophysical characterization. Mar Drugs 15: 152, 2017.

21.Yuan, T.; Zhang, L.; Feng, L.; Fan, H.; Zhang, X. Chondrogenic differentiation and immunological properties of mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogel. Biotechnol. Prog. 26, 1749− 1758,2010.

جداسازی باکتریوفاژ لیز کننده باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

اعظم مختاری[۱]، ویدا محسنی فر*[۱]

۱-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
*نویسنده مسئول: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
mohsenifarvida@gmail.com

چکیده

مقدمه و هدف: برمبنای مطالعات موجود، پس از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، عمدتاً استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، میکروارگانیسم اصلی موجود در موارد ورم پستان است. در سال‌های اخیر S. epidermidis به طور فزاینده‌ای به عنوان یک عامل بیماری‌زای فرصت طلب در موارد ورم پستان شناخته شده است. به موازات آن، چندین عامل تعیین کننده‌ی ژنتیکی که در مکانیسم‌های اتصال و تشکیل بیوفیلم نقش دارند، در این گونه توصیف شده‌اند. بعلاوه، میزان مقاومت این باکتری در برابر چندین آنتی بیوتیک طی سال‌های اخیر افزایش یافته است. بنابراین در مطالعه حاضر جداسازی فاژ علیه این باکتری به عنوان یک راهکار درمانی مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۱۴ جدایه S. epidermidis از نمونه‌های شیر ورم پستانی جداسازی شد. استافیلوفاژ به دست آمده از فاضلاب، از طریق فیلتراسیون و غنی سازی در یک کشت شبانه S. epidermidisجدا شد. تشخیص باکتریوفاژ با استفاده از تست پلاک آگار دولایه انجام شد. در نهایت، شناسایی استافیلوفاژ توسط بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM انجام شد.

نتایج: پس از بررسی با میکروسکوپ الکترونی، مشخص شد این فاژ متعلق به Siphoviridae بود .

بحث و نتیجه‌گیری: این استافیلوفاژ توانست تمام جدایه‌های S. epidermidis را در محیط کشت لیز کند. بنابراین این فاژ می‌تواند به عنوان یک عامل باالقوه مناسب در درمان این عفونت‌های استافیلوکوکی مورد توجه قرار گیرد، با این وجود، تایید ارزیابی عملکرد بالینی در حیوان و انسان ضروری است.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باکتریوفاژ، عفونت

مقدمه

در سال‌های اخیر، تمایل جامعه‌ی تحقیقاتی روی S. epidermidis متمرکز می‌باشد، زیرا این باکتری به یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی تبدیل شده است (۱). تجزیه و تحلیل کامل ژنوم برخی از سویه‌های S. aureus و S. epidermidis مقاوم به متی سیلین با منشاء انسانی، تمایل S. aureus برای ایجاد عفونت های شایع و گاهی تهدید کننده‌ی زندگی را نشان می‌دهد در مقابل S. epidermidis به ایجاد عفونت‌های مزمن و مکرر (۲) تمایل دارد. شناسایی S. epidermidis به عنوان عامل عفونت گاهی اوقات با این واقعیت که عفونت‌های مرتبط با این میکروارگانیسم با تظاهرات بالینی خفیف و غیر اختصاصی مشخص می‌شود، دچار اختلال می‌گردد (۳).

استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی (CNS) گروهی از عوامل بیماری‌زای سازگار و فرصت طلب هستند که توانایی تداوم و تکثیر آنها در محیط‌های مختلف باعث ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها در انسان و حیوان می‌شود. در انسان، عفونت توسط Staphylococcus epidermidis (سرگروه استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی) یکی از مخرب ترین عوارض جراحی مفصل مصنوعی است (۴). در مقابل، در حیوانات ماده‌ی شیروار، CNS جزء عوامل بیماری‌زای جزئی عامل ورم پستان گاو در نظر گرفته شده است. با این وجود، اخیراً بسیاری از مطالعات، اهمیت عفونت‌های CNS را در ایجاد عفونت غدد پستانی در گونه‌های دیگر نظیر بز و گوسفند نشان داده‌اند (۵، ۶). عفونت‌های CNS معمولاً خفیف تر از عفونت‌های ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس هستند که عامل اصلی ورم پستان واگیر گاو است. در بافت‌های پستانی آلوده به CNS، نفوذ لکوسیت‌های بیشتر و افزایش استرومای بافت همبند نسبت به گروه کنترل گزارش شده است (۷). مطالعه‌ای نشان داده است که عفونت‌های CNS باعث کاهش ۸ تا ۷ درصدی در تولید شیر از مجموع تولید شیر ۳۰۵ روزه می‌شود (۸). با وجود اینکه امروزه بیش از پیش، محققان به اهمیت عفونت‌های داخل پستانی CNS پی برده‌اند، عوامل بیماری زایی CNS هنوز به‌خوبی شناسایی نشده است. فاکتورهای حدت استافیلوکوکوس‌های گاو یا گوسفند در S. aureus به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. در این گونه، بسیاری از عفونت‌های مزمن با رشد باکتری‌ها در قالب کلونی‌ها چسبنده که توسط یک ماتریکس اگزوپلی ساکارید بزرگ احاطه شده‌اند (بیوفیلم)، همراه است (۹). بیوفیلم‌ها با توجه به اندازه‌ی بزرگشان، مستعد فاگوسیتوز توسط ماکروفاژ نیستند و نسبت به بعضی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم می شوند (۱۰،۹).

عفونت ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش است، بنابراین استفاده از روش‌های جایگزین باعث کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود که یکی از این روش‌ها استفاده از باکتریوفاژها می‌باشد (۱۱). باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که می‌توانند باکتری‌ها را آلوده کنند و به عبارت دیگر میزبان این

دسته از ویروس‌ها، باکتری‌ها می‌باشند. باکتریوفاژها دارای دونوع چرخه زندگی تخریب‌گر و لایزوژنیک هستند (۱۲). درصورتی که پس از ورود ژنوم باکتریوفاژ به درون سلول میزبان به‌صورت مستقل تکثیر یافته و سلول را تخریب کند به آن فاژ تخریب‌گر می‌گویند. از این خصوصیت باکتریوفاژهای تخریب‌گر در پدیده فاژتراپی استفاده می‌شود. اما در فاژهای لایزوژنی ژنوم فاژ وارد ژنوم میزبان شده که در این حالت به آن پروفاژ می‌گویند و یا درون سلول باقی‌مانده و هیچ گونه آسیبی به سلول میزبان وارد نمی‌کند (۱۳). باکتریوفاژ اولین‌بار با موفقیت به درمان عفونت‌های باکتریایی در یک دهه قبل از پنی‌سیلین کشف شد و مورد استفاده قرار گرفت. اغلب باکتریوفاژها در محیط‌های آبی جدا شده‌اند. در حال‌حاضر تعدادی از دانشمندان و پزشکان باکتریوفاژها را به‌عنوان یک گزینه درمانی، در درمان عفونت‌های باکتریایی به‌دنبال دارند (۱۴). از فاژ درمانی برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی‌سیلین، استرپتوکوکوس‌ها و همین طور باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از جمله اشریشیا کلی استفاده شده است (۱۵،۱۶). با توجه به موارد ذکر شده و اهمیت باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در پزشکی لازم است که فعالیت بیشتری در زمینه شناسایی فاژهای مؤثر بر باکتری نام برده انجام شود. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی فاژهای مؤثر بر ۱۴ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود.

مواد و روش‌ها

خالص سازی باکتری‌ها:

ابتدا ۱۴ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جهت احیا و خالص سازی روی محیط بلاد آگار، کشت و پاساژ داده شد. جهت اطمینان از خالص بودن جدایه‌ها، تست کوآگولاز روی آن‌ها صورت گرفت. برای این کار دو قطره سرم فیزیولوژی روی دو طرف یک لام قرار داده و یک کلنی از ارگانیسم مورد آزمایش در یکی از قطره‌ها حل شد تا یک سوسپانسیون غلیظ به دست آمد. سپس یک قطره پلاسمای رقیق نشده خرگوش به سوسپانسیون اضافه و به آرامی مخلوط گردید. تجمع ارگانیسم‌ها طی ۱۰ ثانیه بررسی شد. به قطره شاهد، پلاسمای خرگوش اضافه نشد و فقط حاوی سوسپانسیون غلیظ باکتری بود. تجمع ارگانیسم طی مدت ۱۰ ثانیه به معنی مثبت بودن تست بود.

نمونه‌گیری و آماده‌سازی فاضلاب:

برای این کار ابتدا با استفاده از بطری شیشه‌ای استریل درب‌دار، از تصفیه خانه واقع در استان اصفهان، نمونه برداری شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. برای رسوب محتویات فاضلاب، ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در g۸۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس به‌وسیله فیلتر سرنگی ۴۵/ استریل، فیلتر شدند.

آماده‌سازی باکتری‌ها و اضافه کردن پساب:

ابتدا به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع دوبار غلظتBHI ، یک میلی‌لیتر محیط کشت شبانه باکتری اضافه و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد. سپس به آن ۲۰ میلی‌لیتر از فاضلاب فیلتر شده اضافه و مجددا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. سپس سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در۸۰۰۰g سانترفیوژ و سوپرناتانت به‌وسیله فیلتر سرنگی ۴۵/ استریل، فیلتر شد.

لکه گذاری به روش آگار دو لایه:

برای این کار ابتدا محیط کشت نیمه جامدBHI (حاوی ۷/ ٪ آگار) تهیه کرده، درون لوله‌های استریل به حجم ۹ سی‌سی ریخته و استریل شد. پس از اینکه دمای محیط کشت نیمه جامد به حدود ۴۵ درجه سانتیگراد رسید به آن ۱/ میلی لیتر محیط کشت شبانه باکتری اضافه و با تکان دادن باکتری به‌طور یکنواخت در محیط کشت پخش و به محیط کشت جامد و استریل BHI (حاوی ۱/۵ ٪ آگار) اضافه شد (به-صورت دو لایه). وقتی آگار رویی سفت شد ۲۰ میکرولیتر از محلول فیلتر شده در مرکز محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت مشاهده لکه شفاف در مرکز محیط کشت نشان دهنده وجود باکتریوفاژ تخریب‌گر علیه باکتری مورد مطالعه در محلول فیلتر شده بود.

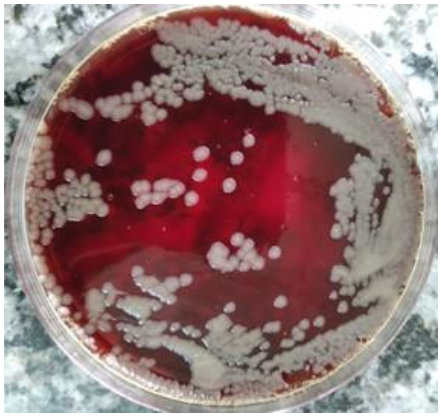
بررسی ریخت‌شناسی باکتریوفاژها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی:

برای بررسی شکل ظاهری، اجزای تشکیل دهنده فاژ و تشخیص خانواده آن لازم است که از میکروسکوپ الکترونی کمک گرفته شود. برای مشاهده راحت‌تر باکتریوفاژها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی تیتر بالایی از باکتریوفاژ نیاز بود. به همین جهت پس از فیلتر نمودن سوسپانسیون با فیلتر ۴۵/ میکرومتر، مجددا این سوسپانسیون به‌وسیله فیلتر ۲۲/ میکرومتر فیلتر شد. این کار باعث می شد به علت کوچک بودن قطر منافذ فیلتر ۲۲/ نانومتری ناخالصی‌های بیشتری توسط فیلتر به دام افتاده و نهایتا تصویر واضح‌تر شود. سپس سوسپانسیون فاژی به‌مدت ۹۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰g سانترفیوژ شد. سپس محلول رویی به آرامی از لوله خارج و لکه سفید رنگی که به جداره لوله چسپیده شده بود در ۵۰ میلی لیتر بافر حل و مجددا طبق شرایط فوق سانترفیوژ شد. پس از اتمام دوره سانترفیوژ محلول رویی خارج و لکه سفید موجود در لوله، در ۲۵ میلی‌لیتر بافر حل شد. برای رنگ‌آمیزی فاژها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به‌روی گرید مسی پوشیده شده با کربن (۴۰۰ مش) منتقل و ۲۱۰ ثانیه در این حالت قرار داده شد. در ادامه گرید ۲۰ ثانیه در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس با رعایت کلیه جنبه‌های ایمنی، ۲۰ میکرولیتر اورانیول استات ۲٪ به روی گرید ریخته شد، و پس از ۱۶۰ ثانیه، اورانیول استات اضافه به‌وسیله کاغذ خشک کن به

آرامی گرفته و به مدت نیم ساعت جهت خشک شدن کامل گرید، در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. نکته قابل توجه این است که به دلیل سمیت بالای اورانیل استات هنگام کار با این ماده باید کلیه نکات ایمنی رعایت شود.

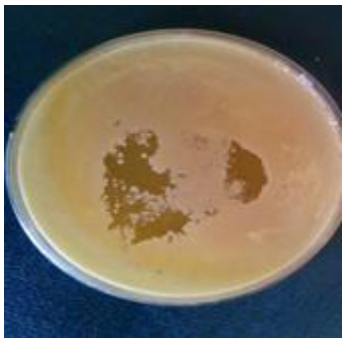
یافته‌های پژوهش:

کلنی‌های خالص شده ۱۴ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پس از کشت و احیا برروی محیط بلاد آگار، مشاهده شد. نتایج تست کوآگولاز برای ۱۴ جدایه باکتری‌ها منفی دیده شد و به صورت عدم آگلوتیناسیون (عدم وجود ذرات توده مانند) روی لام مشاهده گردید.



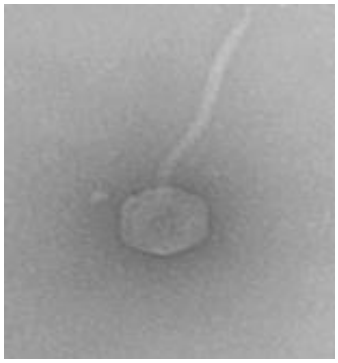
عکس شماره۱: کشت خالص استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در محیط بلاد آگار

پس از نمونه‌گیری از فاضلاب استان اصفهان، باکتریوفاژهای تخریب‌گر جداسازی شدند و پلاک فاژی برروی محیط‌های کشت کاملا مشخص بود. این پلاک‌ها نشان دهنده، لیتیک بودن فاژ جدا سازی شده، روی 14 جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود.



عکس شماره ۲ :تصویر کشت دولایه روی پلیت و مشاهده پلاک‌های فاژی

در تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی TEM، فاژ اصلی در مورد همه پلاک‌ها مورد شناسایی قرار گرفت. ساختار باکتریوفاژ اختصاصی جداسازی شده دارای سر شش وجهی و متقارن و اندازه ۶۵ نانومتر، دم غیر منقبض شونده، نازک و ساده بود. با توجه به ویژگی‌های ریخت شناسی به نظر می‌رسد متعلق به خانواده سیفوویریده باشد. سیفوویریده یک خانواده از ویروس‌های دارای DNA دو رشته‌ای است و در راسته کائودوویرالس قرار دارد.



عکس شماره ۳: باکتریوفاژ اختصاصی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

بحث و نتیجه‌گیری:

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر داروهای ضد میکروبی یک مشکل بزرگ برای بی‌اثر شدن داروهای شیمیایی می‌باشد و یک تهدید عمومی و بحرانی برای سلامتی جامعه می‌باشد. در حال حاضر استفاده از فاژها به منظور درمان عفونت در بسیاری از عفونت‌های مقاوم به درمان، به طور موفقیت‌آمیز مورد استفاده قرار گرفته است. حتی پزشکان در برخی از کشورها از جمله گرجستان، فاژها را به فراوانی در بخش‌های اطفال، جراحی و سوختگی به کار می‌برند (۱۷-۱۹). در مطالعات اخیر به‌ویژه در ایالات متحده از باکتریوفاژها در تکمیل فناوری‌های پیشرفته ازجمله ساخت پوست مصنوعی آغشته به فاژ جهت پیشگیری از عفونت‌های شایع در پیوند پوست استفاده شده است (۲۰). در مورد فاژهای موثر بر سویه‌های استافیلوکوکوس مطالعات زیادی انجام شده است.

Fišarová و همکاران فاژهای موثر علیه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را در سال ۲۰۲۱ میلادی جداسازی کرده و نشان دادند فاژهای استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پلاسمیدهای مقاوم به ضد میکروبی را انتقال داده و جزایر کروموزومی را به حرکت در می آورند. آنها اولین شواهد انتقال جزیره کروموزومی القایی با فاژ را در S. epidermidis ارائه کردند. یافته‌های آنها بر نقش فاژهای معتدل استاف. اپیدرمیدیس در تکامل سویه‌های

استاف. اپیدرمیدیس با انتقال افقی ژن تأکید می‌کند که می‌تواند برای مطالعات ژنتیکی این باکتری نیز نیز مورد استفاده قرار گیرد. (۲۰).

و همکاران در سال ۲۰۲۳ میلادی، ژنوم یک فاژ آلوده کننده S. اپیدرمیدیس به نام Lacachita را گزارش و ژنوم آن را با پنج فاژ دیگر مقایسه کردند. این فاژها نشان دهنده یک جنس جدید سیفوویروس بودند که اخیراً گزارش شده است. عضو منتشر شده از این گروه به عنوان یک عامل فاژ درمانی مورد ارزیابی قرار گرفت، اما Lacachita قادر به انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی و ایجاد مقاومت فاژی به سلول های ترانسداکت شده است. اعضای این جنس ممکن است در داخل میزبان خود به عنوان پروفاژهای پلاسمید خارج کروموزومی، از طریق لیزوژنی پایدار یا شبه لیزوژنی نگهداری شوند. بنابراین، نتیجه گرفتند که Lacachita ممکن است معتدل باشد و اعضای این جنس جدید برای فاژ درمانی مناسب نیست (۲۱).

با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته و اهمیت باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در پزشکی و افزایش روز افزون مقاومت دارویی در این باکتری می‌توان از باکتریوفاژهای لیتیک علیه این باکتری به‌عنوان روش درمانی جایگزین استفاده نمود. هدف از این پژوهش جداسازی فاژهای فعال علیه 14 جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از شیر است. باکتریوفاژ جداسازی شده دارای اثرات باکتریسیدال قابل قبول بر روی جدایه‌های باکتری مذکور است. نتایج مطالعه حاضر همانند سایر مطالعات، نشان دهنده تاثیر باکتری کشی باکتریوفاژ جداسازی شده بر علیه سویه‌های باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود. با توجه به مطالعات صورت گرفته و نتایج پژوهش حاضر می توان از باکتریوفاژ جداسازی شده به‌عنوان روش درمانی جایگزین و مؤثر استفاده نمود. پیشنهاد می‌شود تاثیر فاژهای جداسازی شده در مدل‌های حیوانی بررسی شود. در صورت به دست آمدن نتایج قابل قبول، می‌توان باکتری‌کشی و اثر درمانی آن را در بیماری‌های عفونی پوستی انسانی مانند عفونت‌های ثانویه بر اثر سوختگی، زخم، دمل و ... نشان داده و از فاژها به صورت ترکیب با آنتی‌بیوتیک-ها و یا به صورت جداگانه در درمان استفاده نمود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مادی و معنوی دانشگاه شهرکرد به انجام رسید. بدین وسیله از مسئولین این مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

22. Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S: Nosocomial infections by Staphylococcus epidermidis: how a commensal bacterium turns into a pathogen. International journal of antimicrobial agents, 2006; 28(Suppl 1): S14-S20.

23. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. Journal of Bacteriology Research, 2005; 187:2426-2438.
24. von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infectious diseases, 2002; 2:677-685.
25. Rupp M. E. & Archer G. L. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clinical Infectious Diseases, 1994; 231–243; quiz 244–245.
26. Deinhofer M & Pernthaner A. Staphylococcus spp. As mastitis-related pathogens in goat milk. Veterinary Microbiology, 1995; 43, 161–166.
27. 100. Burriel AR & Dagnall, GJ. Leukotoxic factors produced by staphylococci of ovine origin. Microbiological research, 1997; 152, 247–250.
28. Trinidad P, Nickerson SC & Alley TK. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. Journal of Dairy Science, 1990; 73: 107–114.
29. Cucarella C, Tormo M. A, Ubeda C, Trotonda M. P, Monzon M, Peris C, Amorena, B, Lasa I. & Penade´ s J. R. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus. Infection and Immunity, 2004; 72: 2177–2185.
30. Amorena B, Gracia E, Monzo´ n M, Leiva J, Oteiza C, Pe´ rez M, et al. Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999; 44, 43–55.
31. komeyjani M, Bozari M, Rahimi F. [Identification of gram-negative bacteria phages with high prevalence of wound infections and the possibility of using them for wound healing]. Thesis. 1394;1-108. (persian)
32. Golkar Z, Bagasra O, Jamil N. Experimental phage therapy on multiple drug resistant pseudomonas aeruginosa infection in mice. J Antivir Antiretrovir, 2013; 10:1-6.
33. Ackermann H-W. Basic phage electron microscopy. Bacteriophage: Methods and protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. 2009; 1: 113-126.
34. Hanlon G W. an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections, Int J Ant Bacteriophages. 2007; 30: 118-128.
35. Harper DR, Enright MC. Bacteriophages for the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. J Appl Microbiol 2011; 111:1-7.
36. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. Curr Opin Microbiol 2008; 11:393-400.
37. Mathur M. D, Vidhani S, Mehndiratta PL. Bacteriophage therapy:An alternative to Conventional antibiotics. Japi 2003;51:1-4.
38. Santos R L, Silva T M A, Costa E A, Paixo T A, Tsolis R M. Laboratory animal models for Brucellosis research. J Biomed Biotechnol 2011;2011 :1 -9.
39. WHO, Report of WHO working group Meeting on oral/ conjunctival Brucellosis strain

2 vaccine Rome. 2. 4 October 1991. Available at: http: //www. Who. int/emc.

40. Khajeh Karamdin M, Fazli Bazaz B, Ebrahimi M, Ghazvini k, Afzal Aghai M, Naderi Nasab M, et al. [Enrichment and separation of lecithin bacteriophages Against Pseudomonas aeruginosa isolates resistant to Antibiotics]. Iran J Microbiol 1388; 3:1-7. (Persian)

41. Fišarová, L., Botka, T., Du, X., Mašlaňová, I., Bárdy, P., Pantůček, R., ... & Doškař, J. (2021). Staphylococcus epidermidis phages transduce antimicrobial resistance plasmids and mobilize chromosomal islands. *Msphere*, *6*(3), e00223-21.

42. Andrews, T., Hoyer, J. S., Ficken, K., Fey, P. D., Duffy, S., & Boyd, J. M. (2023). A Transducing Bacteriophage Infecting Staphylococcus epidermidis Contributes to the Expansion of a Novel Siphovirus Genus and Implies the Genus Is Inappropriate for Phage Therapy. Msphere, e00524-22.

ارزیابی روش سازگار با محیط زیست با استفاده از میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی

زکیه گنجعلی[۱]، ماشاالله رحمانی[۲،*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه سیستان و بلوچستان

۲. دانشیار شیمی تجزیه دانشگاه سیستان و بلوچستان

rahmani341@hamoon.usb.ac.ir*

چکیده

در این مطالعه، یک روش دوستدار محیط زیست با استفاده از میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی پیشنهاد شده است. برای افزایش راندمان استخراج، عوامل موثر بر روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی با روش سطح پاسخ بررسی و بهینه‌سازی شدند. با استفاده از روش سطح پاسخ، بهترین بازده استخراج با استفاده از محلولی با pH=4.3، ۲۶۸ میکرو لیتر از حلال استخراجی، زمان استخراج ۷/۵ دقیقه و مقدار نمک ۱/۱ درصد وزنی- حجمی بدست آمد. در این روش ضریب همبستگی پیش بینی شده و ضریب همبستگی تعدیل شده به ترتیب ۰/۹۹۹۸ و ۰/۹۹۹۹ به دست آمد که نشان دهنده رابطه مناسب و معنادار بین داده های تجربی و پیش بینی شده با استفاده از روش سطح پاسخ است. راندمان خوب به دست آمده با بازیابی استخراج بیش از ۹۸ درصد نشان می دهد که میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب پیشنهادی پتانسیل خوبی برای تعیین نمونه های آب در محیط دارد.

کلمات کلیدی: نمونه های آب محیطی، سازگار با محیط زیست، میکرواستخراج، کریستال بنفش

Evaluation of environmentally friendly method using vortex-assisted dispersed liquid microextraction for the analysis of crystal violet in environmental water samples

Zakiie Ganjali and Mashaallah Rahmania*
University of Sistan and Baluchestan, Zahedan 98135-674, Iran.
*Corresponding author: Rahmani341@hamoon.usb.ac.ir

Abstract

In this study, eco-friendly method using vortex-assisted dispersed liquid micro–extraction for the analysis of crystal violet in environmental water samples has been proposed. To increase the extraction efficiency, the affecting factors on the dispersive liquid-liquid micro-extraction method were investigated and optimized by response surface methodology. By using the response surface method, the best extraction efficiency was achieved using a solution with pH=4.3, 268 microliters of extraction solvent, extraction time of 7.5 minutes, and salt content of 1.1%W/V. In this method, the predicted correlation coefficient and the adjusted correlation coefficient were obtained as 0.9998 and 0.9999, respectively, which indicates a suitable and significant relationship between the experimental and predicted data using the response surface method. The good efficiency obtained with an extraction recovery of more than 98% shows that the proposed vortex-assisted dispersed liquid micro-extraction has good potential for the determination of water samples in the environment.

Keywords: Environmental water samples, Eco-friendly, microextraction, crystal violet

۱- مقدمه

پساب های رنگرزی صنایع نساجی از مشکلات جهانی است که محیط زیست را به شدت تهدید می کند [۱]. ورود پساب های صنعتی حاوی رنگ به آب منجر به کاهش کیفیت آب، اثرات سمی، سرطان زایی، جهش و آسیب جبران ناپذیر به محیط می شود. کریستال بنفش یک رنگ تری آریل متان است و از آنجایی که توسط میکروب ها متابولیزه می شود و بنابراین در برابر نور و شستشو بسیار مقاوم است، به راحتی قابل تجزیه نیست. کریستال بنفش ممکن است باعث تحریک پوست، تحریک دستگاه گوارش، نارسایی تنفسی و نارسایی کلیه شود. به طور گسترده ای در صنایع نساجی، کاغذ، لاستیک و پلاستیک استفاده می شود [۲]. بنابراین، حذف رنگ های سمی از نمونه های آب قبل از دفع به نمونه های آب محیطی حائز اهمیت است [۳-۵]. از طرفی، بهینه سازی شرایط مؤثر برفرآیند روش ریز استخراج از اهمیت خاصی برخوردار است. روش سطح پاسخ یک تکنیک آماری مؤثر برای بهینه سازی فرآیندهای پیچیده است. استفاده از روش سطح پاسخ تعداد آزمایش های تجربی مورد نیاز برای ارزیابی پارامترهای متعدد را کاهش می دهد و باعث صرفه جویی در زمان و هزینه می شود، بنابراین می توان از آن در بهینه سازی استفاده کرد [۶].

در این مطالعه، یک روش دوستدار محیط زیست با استفاده از میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی پیشنهاد شده است. و برای بهینه سازی شرایط مؤثر برفرآیند از روش سطح پاسخ استفاده می شود.

۲- بخش تجربی

این مطالعه یک روش میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب و سازگار با محیط زیست را برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی توصیف می کند. همه مواد شیمیایی مورد کاربرد در این کار پژوهشی از شرکت مرک آلمان تهیه شد. روال فرآیند به این صورت دنبال می شود که برای انجام فرآیند، ابتدا مقدار مشخصی از محلول آنالیت با غلظت مشخص به ظرف آزمایش منتقل می شود تا بتوان شرایط را برای شروع آزمایش فراهم کرد. سپس به این مجموعه، حجم های میکرولیتری حلال استخراجی منتقل شده و فرآیند انجام تحقیق بر روی آن اجرا می شود. قبل از انجام آزمایش و بهینه سازی شرایط آزمایش، تنظیم شرایط دستگاه آنالیز برای فرایند انجام تحقیق مد نظر قرار می گیرد. سپس بهینه سازی شرایط مختلف در جهت بهبود فرایند انجام تحقیق ، مانند بررسی مقدار بهینه آلاینده، قدرت یونی محیط مورد آزمایش، محدوده اندازه گیری برای عوامل موثر در میکرو استخراج، دمای محیط کار انجام تحقیق و غلظت اولیه آلاینده، زمان تماس آلاینده در محیط انجام تحقیق و غیره که برای دستیابی به شرایط بهینه در جهت بهبود فرایند انجام تحقیق مهم است، بررسی می شود. آنگاه، آلوده کردن نمونه مورد نظر با مقادیر مشخص

آنالیت و اندازه گیری آنها با روش پیشنهادی در شرایط بهینه شده و تجزیه نمونه های حقیقی در شرایط ذکر شده بررسی می شود. در این طرح تحقیق، امکان سنجی یک روش میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب و سازگار با محیط زیست را برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی بررسی می شود. بدین منظور، برای بهینه سازی فرآیند، پارامترهای موثر مانند اثر pH، زمان استخراج، مقدار نمک، حجم حلال بررسی شدند. در این کار تحقیقاتی طراحی آزمایش با استفاده از روش سطح پاسخ انجام شد. بدین منظور از نسخه ده نرم‌افزار دیزایناکسپرت استفاده شد. در این نرم‌افزار پارامترهای مورد بررسی به عنوان داده به نرم‌افزار وارد می‌شود و خروجی نرم‌افزار نتایج مورد نظر می‌باشد. در آغاز جهت بررسی شاخص مربوطه آزمایش‌هایی توسط نرم‌افزار طراحی و اجرا گردید. در این فرآیند به فاکتورهایی که تغییرات آنها بیش‌ترین تأثیر را در نتیجه آزمایش داشته باشند اصطلاحا پارامتر می‌گویند. پارامتر آزمایشگاهی شامل اثر pH، زمان استخراج، مقدار نمک، حجم حلال به عنوان متغیرهای مستقل مدل استفاده شد جهت طراحی به روش طرح مرکب مرکزی برای پارامترهای مورد نظر دو حد بالا و پایین تعریف شدند. . هدف به حداقل رساندن کارایی متغیرهای کنترل نشده بر کیفیت استخراج مربوطه بود. در این آزمایش اندازه گیری ها در طول موجی با بیشترین جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش انجام شد. پارامترهای موثر شامل اثر pH، زمان استخراج، مقدار نمک، حجم حلال به عنوان متغیرهای مستقل مدل استفاده شد. در انداز گیری از اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش استفاده شد و ، امکان سنجی روش میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب و سازگار با محیط زیست را برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی بررسی می شود.

۳- نتایج و بحث

جدول ۱ طراحی آزمایش با استفاده از طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی را نمایش می دهد.

جدول ۱. طراحی آزمایش با استفاده از طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی

	A: pH		B:Salt (5%W/V, mL)		C:Extraction time (min)		D:Volume of extractan (µL)	
Run	**Coded**	**Uncoded**	**Coded**	**Uncoded**	**Coded**	**Uncoded**	**Coded**	**Uncoded**
1	0	6	2	1.7	0	6	0	200
2	-1	4	-1	0.5	1	8	1	275
3	0	6	0	0.9	2	10	0	200
4	-1	4	-1	0.5	-1	4	1	275
5	0	6	-2	0.1	0	6	0	200
6	1	8	1	1.3	1	8	-1	125
7	2	10	0	0.9	0	6	0	200

8	0	6	0	0.9	0	6	2	350
9	1	8	-1	0.5	-1	4	-1	125
10	1	8	-1	0.5	-1	4	1	275
11	0	6	0	0.9	0	6	0	200
12	-1	4	-1	0.5	-1	4	-1	125
13	-1	4	1	1.3	1	8	1	275
14	1	8	1	1.3	1	8	1	275
15	1	8	-1	0.5	1	8	1	275
16	1	8	-1	0.5	1	8	-1	125
17	1	8	1	1.3	-1	4	1	275
18	0	6	0	0.9	0	6	0	200
19	-1	4	1	1.3	-1	4	-1	125
20	-1	4	1	1.3	-1	4	1	275
21	-1	4	-1	0.5	1	8	-1	125
22	0	6	0	0.9	-2	2	0	200
23	0	6	0	0.9	0	6	0	200
24	0	6	0	0.9	0	6	0	200
25	-1	4	1	1.3	1	8	-1	125
26	-2	2	0	0.9	0	6	0	200
27	0	6	0	0.9	0	6	0	200
28	0	6	0	0.9	0	6	-2	50
29	1	8	1	1.3	-1	4	-1	125
30	0	6	0	0.9	0	6	0	200

جدول ۲ آنالیز واریانس بدست آمده برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی را نشان می دهد. بر اساس نتایج این جدول، مدل درجه دوم از کفایت لازم برخوردار است و به عنوان مدل پیشنهادی انتخاب می شود.

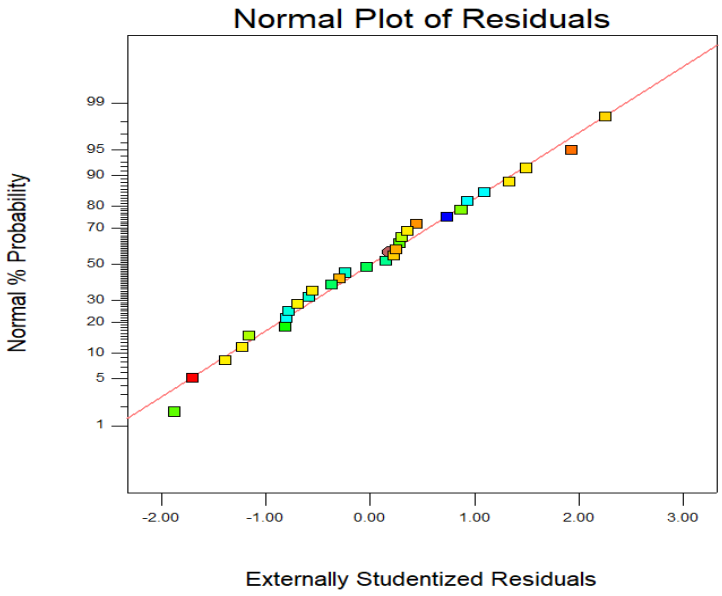
جدول ۲ آنالیز واریانس بدست آمده برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی

Source	SS	DF	MS	F-value	p-value	
Model	6543.22	14	467.37	19920.69	< 0.0001	significant
A	1243.87	1	1243.87	53017.21	< 0.0001	
B	990.48	1	990.48	42216.87	< 0.0001	
C	1953.37	1	1953.37	83257.99	< 0.0001	
D	1295.07	1	1295.07	55199.42	< 0.0001	
AB	66.50	1	66.50	2834.58	< 0.0001	
AC	0.21	1	0.21	9.02	0.0089	
AD	0.11	1	0.11	4.78	0.0450	
BC	0.24	1	0.24	10.03	0.0064	
BD	6.66	1	6.66	283.71	< 0.0001	
CD	63.92	1	63.92	2724.45	< 0.0001	
A^2	89.18	1	89.18	3800.98	< 0.0001	

B^2	564.57	1	564.57	24063.45	< 0.0001	
C^2	283.84	1	283.84	12097.98	< 0.0001	
D^2	311.85	1	311.85	13291.91	< 0.0001	
Residual	0.35	15	0.023			
Lack of Fit	0.21	10	0.021	0.70	0.7036	not significant
Pure Error	0.15	5	0.029			
Cor Total	6543.57	29				

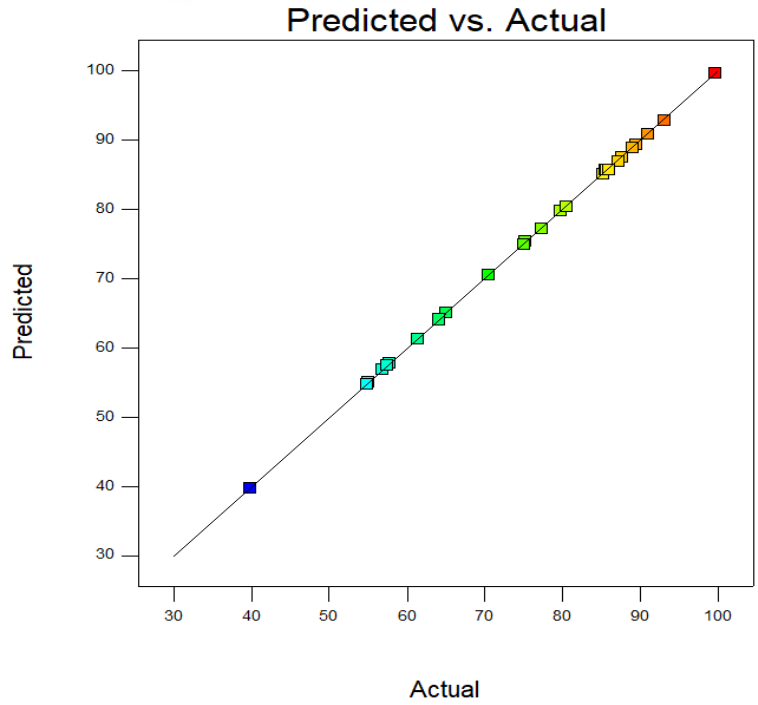
Model summary statistics			
Standard Deviation(SD)	0.15	R^2	0.9999
Mean	75.38	Adjusted R^2	0.9999
C.V. %	0.20	Predicted R^2	0.9998
PRESS	1.40	Adequate Precision	553.801

شکل ۱ نشان دهنده نمودار توزیع نرمال است. این نموداربیانگر پخش تصادفی داده ها در پیرامون خط مبنا است، این شکل بیانگر این است که نتایج ازمدل خاصی تبعیت نمی کند که بیان کننده کفایت مدل سطح پاسخ پیشنهادی برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی است.



شکل ۱ نمودار توزیع نرمال برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی

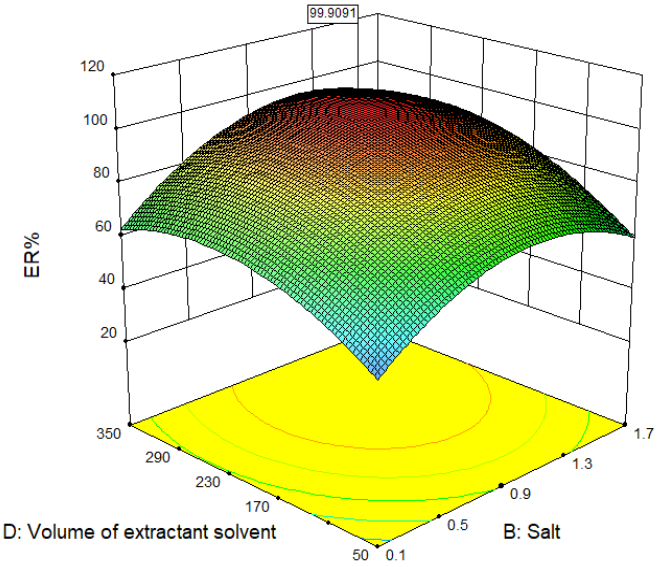
شکل ۲ نمودار نتایج آزمایشگاهی در مقابل مقدار پیش بینی شده برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی را نمایش می دهد.



شکل ۲ نمودار نتایج آزمایشگاهی در مقابل مقدار پیش بینی شده برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی

نزدیکی داده های آزمایشگاهی به نتایج پیش بینی شده به روش سطح پاسخ، بیانگر این است که مدل درجه دوم بدست آمده از روش سطح پاسخ از کفایت لازم برخوردار است و می تواند برای پیشگویی پاسخ ها بکار رود.

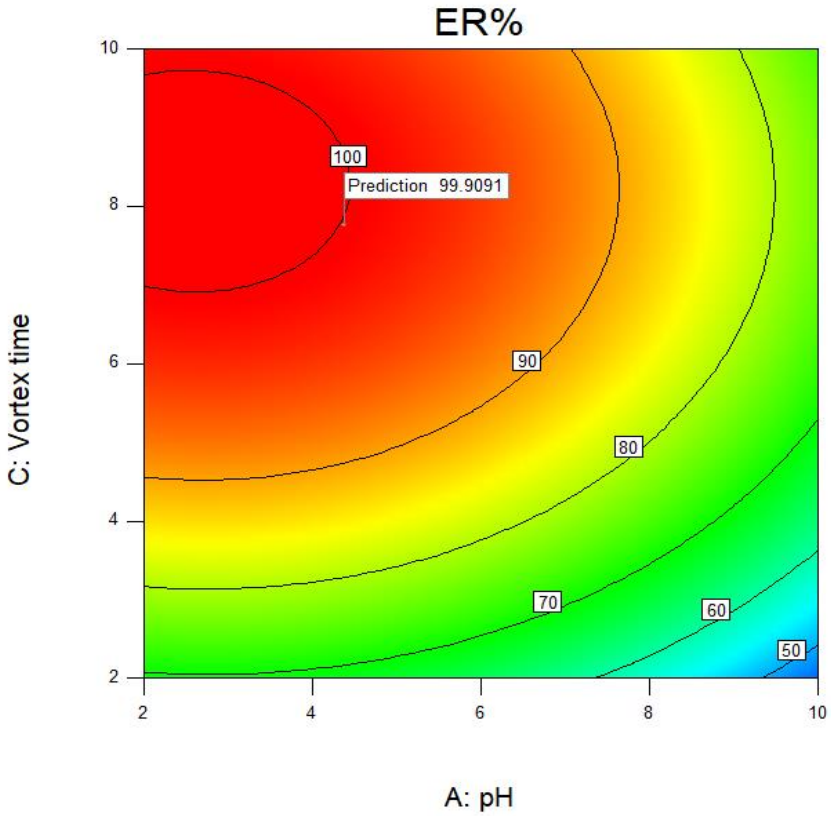
شکل ۳ نمودار اثر همزمان مقدار نمک و حجم حلال را در استخراج برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی نشان می دهد.



شکل ۳ نمودار برهمکنش مقدار نمک و حجم حلال را در استخراج برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی

با استفاده از روش سطح پاسخ، بهترین راندمان استخراج برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی در شرایطی با استفاده از ۲۶۸ میکرو لیتر از حلال استخراجی و مقدار نمک ۱/۱ درصد وزنی- حجمی بدست آمد.

شکل ۴ نمودار مربوط به اثر همزمان پارامترهای pH و زمان استخراج برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی را نشان می دهد.



شکل ۴ نمودار مربوط به برهمکنش اثر پارامترهای pH و زمان استخراج برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی

بر اساس نتایج، بیشترین درصد استخراج برای کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی در شرایطی با استفاده از محلولی با pH=4.3 و زمان استخراج ۷/۵ دقیقه بدست آمد.

۴- نتیجه‌گیری

این مقاله یک روش میکرو استخراج مایع پخشی به کمک گرداب و سازگار با محیط زیست را برای آنالیز کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی توصیف می کند. این تکنیک یک روش موثر برای کاهش مصرف و در معرض قرار دادن حلال های پرخطری است که دفع آنها از محیط زیست نیز هزینه بر است. در این روش ضریب همبستگی پیش بینی شده و ضریب همبستگی تعدیل شده به ترتیب ۰/۹۹۹۸ و ۰/۹۹۹۹ به دست آمد که نشان دهنده رابطه مناسب و معنادار بین داده های تجربی و پیش بینی شده با استفاده از روش سطح پاسخ است. نتایج آزمایشات استخراج در شرایط بهینه نشان داد که فرآیند استخراج از درصد بالایی برخوردار است. برای افزایش راندمان استخراج، عوامل موثر بر روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی با روش سطح پاسخ بررسی و بهینه‌سازی شدند. با استفاده از روش سطح پاسخ، بهترین بازده استخراج با استفاده از محلولی با pH=4.3، ۲۶۸ میکرو لیتر از حلال استخراجی، زمان استخراج ۷/۵ دقیقه و مقدار نمک ۱/۱ درصد وزنی- حجمی بدست آمد. در شرایط بهینه، روش پیشنهادی با موفقیت در تعیین

کریستال بنفش در نمونه های آب محیطی با بازیابی استخراج بیش از ۹۸ درصد مورد استفاده قرار گرفت و نتایج قابل قبول بود.

منابع

[1] Kalpana, R., Maheshwaran, M., Vimali, E., Soosai, M. R., Shivamathi, C. S., Moorthy, I. G., Varalakshmi, P. (2020). Decolorization of textile dye by halophilic Exiguobacterium sp. VK1: biomass and exopolysaccharide (EPS) enhancement for bioremediation of Malachite Green. ChemistrySelect, 5(28), 8787-8797.

[2] Zhou, Z., Fu, Y., Qin, Q., Lu, X., Shi, X., Zhao, C., Xu, G. (2018). Synthesis of magnetic mesoporous metal-organic framework-5 for the effective enrichment of malachite green and crystal violet in fish samples. Journal of Chromatography A, 1560, 19-25.

[3] Jones, J. J., Falkinham III, J. O. (2003). Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy, 47(7), 2323-2326.

[4] Raval, N. P., Shah, P. U., & Shah, N. K. (2017). Malachite green “a cationic dye” and its removal from aqueous solution by adsorption. Applied Water Science, 7(7), 3407-3445.

[5] Saxena, R., Saxena, M., Lochab, A. (2020). Recent progress in nanomaterials for adsorptive removal of organic contaminants from wastewater. ChemistrySelect, 5(1), 335-353.

[6] Rahmani, M., Ghasemi, E., Sasani, M. (2017). Application of response surface methodology for air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction of deoxynivalenol in rice samples prior to HPLC-DAD analysis and comparison with solid phase extraction cleanup. Talanta, 165, 27-32.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی فعالیت سیتوتوکسیسیتی عصاره متانولی گیاه *Teucrium persicum*، تاثیر بر فعالیت آنزیم LDH و تولید رادیکال های آزاد در سلول های سرطانی پروستات (PC-3)

عطیه باقرنژاد درزی[۱]، مجید تفریحی[۲*]، اباصلت حسین زاده کلاگر[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران

[۳] استاد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران

چکیده

سرطان پروستات شایع ترین نوع بدخیمی در مردان است. گیاهان دارویی ممکن است راهبردهای درمانی جایگزین برای عوامل ضد سرطان باشند زیرا دارای منبع غنی از مواد شیمیایی زیست فعال هستند و عوارض جانبی کمتری دارند. گیاه *Teucrium persicum*، یک گیاه بومی ایران است که در استان فارس رشد می کند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سیتوتوکسیسیتی و آنتی اکسیدانی عصاره ی متانولی *T. persicum* بر سلول های PC-3 می باشد. در این مطالعه، پس از تهیه عصاره متانولی گیاه *T . Persicum*، سلول های PC-3 کشت داده شدند و با غلظت های مختلف عصاره به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. میزان بقای سلول ها با استفاده از تست MTT بررسی گردید. همچنین میزان LDH آزاده شده در سلول هایی که تحت تاثیر عصاره قرار گرفته بودند اندازه گیری شد، سپس میزان گونه های اکسیژن فعال درون سلولی (ROS) توسط روش فلوریمتریک مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج MTT عصاره متانولی گیاه *T . Persicum*، میزان بقای سلول های PC-3 را کاهش داد و شاخص IC_{50}، $142\mu g/ml$ به دست آمد. همچنین تست LDH نشان داد که این عصاره موجب افزایش میزان رهایی آنزیم لاکتات دهیدروژناز می شود و گونه های فعال اکسیژن پس از درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. نتایج حاصل از این

E-mail: *m.tafrihi@umz.ac.ir

مطالعه نشان می دهد که عصاره متانولی گیاه *T . Persicum* با افزایش غلظت دارای اثر سیتوتوکسیک بوده و باعث مهار رشد و تکثیر سلول ها می شود و قادر به القا آپوپتوز در سلول ها می باشد.

کلمات کلیدی: MTT، LDH، ROS، گیاه *Teucrium persicum*، فعالیت ضد سرطان

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Investigating the cytotoxic activity of the methanolic extract of *Teucrium persicum* plant, its effect on LDH enzyme activity and free radical production in prostate cancer cells (PC-3)

Atiye Baghernezhad Darzi[1], Majid Tafrihi[2*], Abasalt Hosseinzadeh Colagar[3]

[1] Master student, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran

[2] Assistant professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran

[3] Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran

Abstract

Prostate cancer is the most common type of malignancy in men. Medicinal plants may be alternative therapeutic strategies for anticancer agents because they have a rich source of bioactive chemicals and have fewer side effects. *Teucrium persicum* is a native plant of Iran that grows in Fars province. This study aims to investigate the cytotoxicity and antioxidant effects of *T. persicum* methanolic extract on PC-3 cells. In this study, after preparing the methanolic extract of *T. Persicum*, PC-3 cells were cultured and treated with different concentrations of extract for 48 hours. The survival rate of cells was checked using the MTT test. Also, the amount of LDH released in the cells that were affected by the extract was measured, then the amount of intracellular reactive oxygen species (ROS) was evaluated by a fluorimetric method. Based on the MTT results, the methanolic extract of *T. Persicum* decreased the survival rate of PC-3 cells and the IC50 index was 142µg/ml. Also, the LDH test showed that this extract increases the release of lactate dehydrogenase enzyme and reactive oxygen species decreased after treatment compared to the control group. The results of this study show that the methanolic extract of *T. Persicum* has a cytotoxic effect with increasing concentration and inhibits the growth and proliferation of cells and is capable of inducing apoptosis in cells.

Keywords: MTT, LDH, ROS, *Teucrium persicum*, anticancer

* e-mail: m.tafrihi@umz.ac.ir

۱. مقدمه

سرطان گروهی از بیماری هایی هستند که به وسیله ی رشد غیر قابل کنترل و گسترش سلول های غیر عادی دسته بندی می شوند که اگر این گسترش کنترل نشود در نهایت منجر به مرگ می شود [1]. عوامل موثر در ایجاد سرطان می تواند عوامل داخلی که مربوط خود میزبان می باشد مثل جنس، سن، نژاد، هورمون ها و جهش های ژنتیکی یا نیز عوامل خارجی مثل دخانیات، رژیم غذایی نا مناسب، مواد شیمیایی، اشعه و ارگانیسم های عفونت زا باشد که این عوامل ممکن است باهم و یا به دنبال هم اثر کنند [2]. بنا به پیشرفت اقتصادی و بهداشتی کشورها، سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر در سراسر جهان محسوب می شود [3]. به طوری که در سال ۲۰۲۰ بیش از ۱۹ میلیون مورد جدید سرطان و حدود ۱۰ میلیون مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان رخ داده است. تخمین زده می شود که آمار موارد سرطان تا سال ۲۰۴۰ به بیش از ۲۸ میلیون برسد [4]. در ایران نیز سرطان به عنوان بزرگترین مشکل سلامت عمومی در نظر گرفته می شود و طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، سرطان سومین علت مرگ در ایران بعد از بیماری های قلبی-عروقی شناخته شده است [5]. در حال حاضر سرطان پروستات، شایع ترین نوع بدخیمی در مردان است. یک بیماری چند عاملی که عوامل ژنتیکی و محیطی در آن نقش دارد [6]. تقریبا ۴۲٪ موارد سرطان پروستات در مردان بالای ۵۰ سال رخ می دهد [7]. گزینه های درمانی موجود برای سرطان پروستات شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتو درمانی و هورمون درمانی می باشد که هر کدام دارای مشکلات و عوارضی هستند [8]. لذا با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی در کشورهای درحال توسعه علاقه زیادی به استفاده از داروهای گیاهی وجود دارد. گیاهان به دلیل فیتوکمیکال ها توانایی قابل توجهی در درمان بیماری های مختلف از جمله سرطان دارند [9]. جنس *Teucrium* متعلق به خانواده Lamiacea می باشد که با بیش از ۳۴۰ گونه در سراسر جهان توزیع می شوند [10]. گونه های این جنس بیش از ۲۰۰۰ سال به عنوان گیاهان دارویی استفاده می شوند [11]. بسیاری از گونه های *Teucrium* دارای خواص دارویی و بیولوژیکی فراوانی از جمله فعالیت های ضد التهابی، ضد باکتری، ضد تشنج، ضد سرطان، ضد دیابت، ضد تب، ضد نفخ، ضد فشار خون و ضد زخم هستند [12]. گیاه *Teucrim Persicum* با نام فارسی مریم نخودی شیرازی، یک گیاه بومی ایران است که در استان فارس رشد می کند و در پزشکی سنتی برای تسکین سر درد و دردهای شکمی از جمله کولیت مورد استفاده قرار می گیرد. [13]. در این پژوهش، به بررسی اثرات سیتوتوکسیتی و آنتی اکسیدانی عصاره ی متانولی *T. persicum* بر رده ی سلولی PC-3 پرداختیم.

۲. مواد و روش ها

۱,۲. تهیه عصاره متانولی گیاه *Teucrium persicum*

۲۵ گرم از قسمت های هوایی گیاه *T. persicum* پودر شده و در ۵۰ میلی لیتر متانول خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر هم زده شد. مایع رویی تغلیظ شد و سپس توسط دستگاه، Freeze-dryer خشک شد. از عصاره خشک شده یک استوک با غلظت ۲۰ میلی گرم در یک میلی لیتر متانول خالص تهیه شد و در در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲,۲. مطالعات آماری

تمامی آزمایشات با حداقل سه بارتکرارانجام شده و در نهایت داده ها با نرم افزار گرفپد پریسم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳,۲.کشت سلولی

رده ی سلولی PC-3 مورد استفاده در این مطالعه از آزمایشگاه تحقیقاتی ژنیران تهران خریداری گردید. به منظور کشت سلول از محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو(سیگما) و یک درصد پنی سیلین/ استرپتومایسین شد. سلول های سرطانی پروستات در فلاسک با حجم ۲۵ میلی لیتر در شرایط ۹۵ درصد رطوبت، ۵ درصد C02 و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

۴,۲.بررسی میزان کشندگی عصاره با روش MTT

به منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی عصاره متانولی گیاه *Teucrium Persicum* از تست MTT استفاده شد.

تعداد $۵*۱۰^{۳}$ سلول PC-3 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشت داده شدند و در انکوباتور نگهداری شد تا ۷۰٪ سطح چاهک ها از سلول پر شود. سلول ها با غلظت های ۰(کنترل)، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره متانولی *T. persicum* در فاصله زمانی ۴۸ ساعت تیمار شدند. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای خارج شد و به آن ۱۰۰ میکرو لیتر محلول MTT اضافه شد و بعد از ۳ ساعت محلول MTT با ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول DMSO جایگزین شد. در نهایت جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۹۰ نانو متر قرائت شد.

۵,۲.سنجش میزان آزاد سازی آنزیم الکتات دهیدروژناز به محیط کشت

سمیت سلولی با اندازه گیری آزاد سازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز از سلول ها مورد بررسی قرار گرفت. $۶*۱۰^{۳}$ سلول PC-3 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشت داده شد. بعد از اینکه سلول ها به تراکم ۷۰٪ رسیدند با غلظت های مشخصی از عصاره ۰(کنترل)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۴۲، ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار شدند. آنزیم لاکتات دهیروژناز آزاد شده از سوپرناتانت سلولی حاصل با استفاده از کیت تشخیصی لاکتات دهیدروژناز شرکت کیازیست مطابق دستورالعمل سازنده مورد ارزیابی قرار گرفت.

خوانش جذب با روش کالریمتری در طول موج ۵۲۰ نانو متر و با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد.

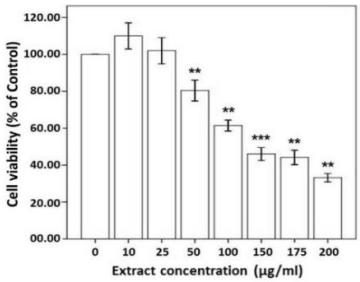
۶,۲.سنجش ROS درون سلولی به روش فلوریمتری

به منظور بررسی میزان تولید رادیکال های آزاد در سلول ها از ماده ی ′7،′2-دی کلرو دی هیدروفلورسئین دی استات (DCFH-DA) استفاده شد که یک مولکول نفوذ پذیر به درون سلول و غیر فلورسانس است. این ماده توسط استرازهای سلولی به′2 ،′7-دی کلرو دی هیدروفلورسئین (DCFH2) شکسته می شود و در حضور ROS به ۲،'۷'-دی کلروفلورسئین (DCF) فلورسنت اکسید می شود. برای تعیین میزان تولید ROS، ابتدا با شمارش سلول های PC-3 تریپسینه و جدا شده با استفاده از لام نئوبار تعداد^{3}۱۰*۵ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. بعد از اینکه سلول ها به تراکم ۷۰٪ رسیدند، سلول ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت های مشخصی از عصاره ۰(کنترل)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شدند. برای سنجش میزان ROS درون سلولی از کیت تشخیصی شرکت TEB PAZHOHAN RAZI (TPR) استفاده شد. شدت فلورسنس با استفاده از طول موج تحریک بین ۵۰۰-۴۸۰ نانومتر و طول موج انتشار بین ۵۵۰-۵۱۰ نانومتر اندازه گیری شد.

۳. نتایج

۱,۳. بررسی تاثیر عصاره بر حیات سلول های PC-3 با استفاده از آزمون MTT

میزان حیات سلول ها در تیمار ۴۸ ساعته با غلظت های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره گیاه *T. persicum* سنجیده شد. نتایج به دست آمده از آزمون MTT نشان داد که حیات سلول ها بسته به غلظت تغییر می کند به طوری که با افزایش غلظت عصاره میزان بقا سلولی کاهش یافت (نمودار ۳-۱). شاخص IC_{50} عصاره *T. persicum* برای سلول PC-3، ۱۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

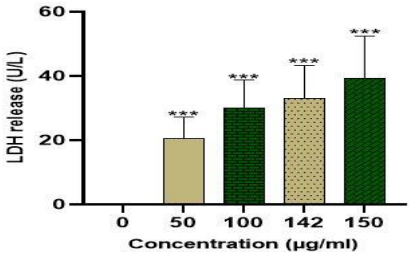


نمودار۳-۱: بررسی اثر عصاره متانولی گیاه *T. persicum* بر حیات سلول های PC-3 داده های نشان داده شده، میانگین حاصل از سه آزمایش مستقل میباشد. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

همانطور که در نمودار۳-۱ نشان داده شده است ؛ تیمار سلول های PC-3 با غلظت ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به افزایش جزئی در تعداد سلول های زنده شد (تا ۱۵ درصد) اما از غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به بالا حیات سلول ها به طور قابل توجهی کاهش یافت و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر حیات سلول ها تا بیش از ۶۰ درصد کاهش یافت.

۲,۳. بررسی میزان رها سازی لاکتات دهیدروژناز(LDH)

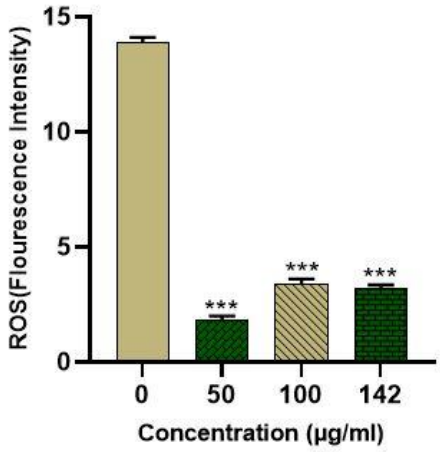
رها سازی آنزیم سیتوپلاسمی لاکتات دهیدروژناز به درون محیط کشت به عنوان یک مارکر در تشخیص میزان یکپارچگی غشا سلولی و در نتیجه اندازه گیری سمیت سلولی در نظر گرفته می شود. همانطور که در نمودار زیر مشاهده می شود؛ سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره *T. persicum* (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۴۲ ، ۱۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) که به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده بودند، نسبت به سلول های کنترل مقدار آنزیم لاکتات دهیدروژناز رها شده در محیط کشت افزایش یافته است و این رها سازی با افزایش غلظت عصاره، افزایش یافت (نمودار ۳-۲).



نمودار۳-۲: میزان آزاد سازی آنزیم LDH در سلول های PC-3 پس از تیمار با غلظت های مختلف عصاره بعد از ۴۸ ساعت. داده های نشان داده شده، میانگین حاصل از سه آزمایش مستقل میباشد. (***p<0.001)

۳,۳. اندازه گیری ROS درون سلولی

تعیین رادیکال های آزاد اکسیژن درون سلولی (ROS) به عنوان یکی از نقش های اصلی پدیده ی استرس اکسیداتیو با استفاده از روش فلوریمتری در مقایسه با گروه کنترل انجام شد. از یک پروپ فلورسنت حساس به اکسیداسیون DCFH-DA استفاده شد. (نمودار ۳-۳)



نمودار ۳-۳: اثر عصاره گیاه *T. persicum* بر میزان تولید ROS در بازه ی زمانی ۴۸ ساعت. (***p<0.001)

همانطور که در نمودار ۳-۳ مشاهده می شود؛ میزان تولید ROS پس از مواجه سلول های PC-3 با غلظت های مختلف عصاره متانولی گیاه *T. persicum* (۰، 50، ۱۰۰، ۱۴۲ میکرو گرم بر میلی لیتر) برای مدت زمان ۴۸ ساعت بررسی شد و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت، میزان تولید ROS درون سلولی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت.

۴. بحث

سرطان به دلیل شیوع روز افزون، میزان مرگ ومیر و هزینه بالا درمان، یکی از بارزترین مسائل بهداشتی در همه کشورهاست[14] . روش های درمانی مختلفی جهت مهار یا درمان سرطان معرفی شده که هر کدام عوارض جانبی زیادی برای بیمار به همره دارند [15]. گفته می شود دلیل اصلی توجه به گیاهان و ترکیبات گیاهی به عنوان دارو بیشتر به دلیل عوارض جانبی کمتر در مقایسه با داروهای شیمیایی است [16]. در حال حاضر حدود نیمی از داروهایی که در پزشکی استفاده می شوند منشاء طبیعی دارند که از جمله آن ها میتوان به داروهای وین کریستین، وین بلاستین، تاکسول و... اشاره کرد [17]. در این مطالعه خواص آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیک گیاه *Teucrium persicum* به عنوان یک گیاه بومی ایران مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی اثرات سیتوتوکسیک گیاه*T. persicum* بر توان حیاتی سلول های PC-3 با استفاده از تست MTT نشان داد که گیاه *T. persicum* از قدرت مهاری بالایی بر حیات سلول های PC-3 برخوردار است و این مهار به علت القای آپوپتوز میباشد. لاکتات دهیدروژناز از آنزیم های پایدار سیتوزولی است که در اغلب سلول های یوکاریوت حضور دارد[18] . نشت LDH به محیط نشان دهنده تغییر نفوذپذیری غشا پلاسمایی و بروز نکروز یا آپوپتوز می باشد، که با استفاده از کیت تشخیصی لاکتات دهیدروژناز قابل سنجش است. نتایج حاصل از تست LDH نشان داد که میزان آزاد سازی آنزیم LDH در سلول های تیمار شده با عصاره متانولی گیاه *T . persicum* در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری با افزایش غلظت و

گذشت زمان افزایش یافته است. در نتجه تست LDH به مرگ سلولی همراه با پاره شدن و آسیب غشای پلاسمایی و آزاد شدن محتوی سیتوپلاسم به خارج از سلول پی بردیم. در واقع این آنزیم به عنوان یک نشانگر تشخیصی مهم، عامل پیش آگهی برای پاسخ به درمان سرطان در نظر گرفته می شود. اخیراً گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، دسته‌ای از مولکول‌های بسیار فعال زیستی، به طور گسترده در سرطان‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. سلول‌های سرطانی معمولاً سطوح بالاتری از ROS پایه را نسبت به سلول‌های طبیعی نشان می‌دهند که در درجه اول به دلیل افزایش متابولیسم، فعال شدن انکوژن و اختلال عملکرد میتوکندری است. این افزایش متوسط در سطوح ROS شروع، توسعه و پیشرفت سرطان را تسهیل می کند. با این حال، غلظت بیش از حد ROS می تواند منجر به انواع مختلف مرگ سلولی شود. بنابراین، استراتژی‌های درمانی که یا ROS داخل سلولی را به سطوح سمی افزایش می‌دهند یا برعکس، سطوح ROS را کاهش می‌دهند، ممکن است در درمان سرطان‌ها از طریق تنظیم ROS مؤثر باشند. ROS به عنوان مولکول‌های دو وجهی، نه تنها با اثرات مضر همراه هستند، بلکه مولکول‌های پیام رسان درگیر در مسیرهای پیام رسانی سلولی متعدد برای سرنوشت سلول‌های طبیعی و تومور می باشد. بنابراین، توسعه رویکردهایی برای استفاده منطقی از ROS در کاربردهای ضد تومور بسیار چالش برانگیز اما ارزشمند است[19]. یکی از عوامل طبیعی مؤثر در جلوگیری از رشد سلولهای سرطانی آنتی اکسیدان ها هستند. سیستم دفاع آنتی اکسیدانی به طور مستقیم یا غیر مستقیم سلولها را در برابر آسیب های ناشی از اکسیدان ها محافظت می نماید. با توجه به اهمیت آنتی اکسیدان ها تا اکنون تعدادی آنتی اکسیدان مصنوعی تولید و به بازار عرضه شده اند، اما به علت سمیت ترکیبات سنتز شده، استفاده از آنها محدود میباشد. امروزه با توجه به ایمنی کاربرد گیاهان دارویی تحقیقات گسترده ای روی ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی صورت گرفته است. اخیرا استفاده از گیاهان طبیعی یا عصاره آنها به عنوان آنتی اکسیدان در مدلهای حیوانی تایید و به صورت گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. موثرترین ترکیبات گیاهی با خاصیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی میباشد[20]. گزارش شده است که گونه های جنس *Teucrium* غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با فعالیت بیولوژیکی قوی هستند. در گیاهان ترکیبات پلی فنولی مثل فلاونوئید ها و فنولیک اسید به عنوان آنتی اکسیدان نقش مهمی در کاهش خطر بیماری هایی مثل سرطان، قلبی و عروقی ایفا می کند[21]. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که عصاره *Teucrim persicum* دارای اثر سیتوتوکسیک بوده و باعث مهار رشد و تکثیر سلول ها و القای آپوپتوز در سلول ها می باشد. براساس نتایج، با توجه به تاثیر گونه های مختلف *Teucrium* بر رده ی PC-3، به نظر می رسد که عصاره *Teucrim persicum* دارای پتانسیل استفاده به عنوان دارو برای درمان سرطان پروستات می باشد و میتواند به عنوان یک کاندیدای مناسب برای داروهای ضدسرطان باشد.

منابع

1. Soteriades, E. S., Kim, J., Christophi, C. A., & Kales, S. N. (2019). Cancer incidence and mortality in firefighters: A state-of-the-art review and meta-analysis. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, 20(11), 3221
2. Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. Journal of cancer science & therapy, 1(2), 1.
3. Zaimy, M. A., Saffarzadeh, N., Mohammadi, A., Pourghadamyari, H., Izadi, P., Sarli, A., ... & Tavakkoly-Bazzaz, J. (2017). New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. Cancer Gene Therapy, 24(6), 233-243.
4. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 71(3), 209-249.
5. Mousavi, S. M., Gouya, M. M., Ramazani, R., Davanlou, M., Hajsadeghi, N., & Seddighi, Z. (2009). Cancer incidence and mortality in Iran. Annals of oncology, 20(3), 556-563
6. Ito, K. (2014). Prostate cancer in Asian men. Nature Reviews Urology, 11(4), 197-212.
7. Pakzad, R., Rafiemanesh, H., Ghoncheh, M., Sarmad, A., Salehiniya, H., Hosseini, S., ... & Afshari-Moghadam, A. (2016). Prostate cancer in Iran: trends in incidence and morphological and epidemiological characteristics. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17(2), 839-843.
8. Safarzadeh, E., Shotorbani, S. S., & Baradaran, B. (2014). Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. Advanced pharmaceutical bulletin, 4(Suppl 1), 421.
9. Asadi-Samani, M., Kooti, W., Aslani, E., & Shirzad, H. (2016). A systematic review of Iran's medicinal plants with anticancer effects. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine, 21(2), 143-153.
10. Javidnia, K., Miri, R., & Khosravi, A. R. (2007). Composition of the essential oil of Teucrium persicum Boiss. from Iran. Journal of Essential Oil Research, 19(5), 430-432
11. Hajipour, P., Eizadifard, F., & Tafrihi, M. (2022). Chemical Constituents, Antioxidant and Cytotoxic Potential of Chloroform and Ethyl Acetate Extracts of Teucrium persicum. Jentashapir Journal of Cellular and Molecular Biology, 13(2).
12. Naeimi, A., Tafrihi, M., & Mohadjerani, M. (2022). Antioxidant and cytotoxic potentials of the methanolic extract of Teucrium persicum Boiss. in A-375 melanoma cells. Avicenna Journal of Phytomedicine, 12(2), 185
13. Miri, A., Monsef-Esfahani, H. R., Amini, M., Amanzadeh, Y., Hadjiakhoondi, A., Hajiaghaee, R., & Ebrahimi, A. (2012). Comparative chemical composition and antioxidant properties of the essential oils and aromatic water from Teucrium persicum Boiss. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR, 11(2), 573-581.

14. Salehi, B., Fokou, P. V. T., Yamthe, L. R. T., Tali, B. T., Adetunji, C. O., Rahavian, A., ... & Sharifi-Rad, J. (2019). Phytochemicals in prostate cancer: from bioactive molecules to upcoming therapeutic agents. Nutrients, 11(7), 1483
15. Afrin, S., Giampieri, F., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Varela-López, A., Quiles, J. L., ... & Battino, M. (2016). Chemopreventive and therapeutic effects of edible berries: A focus on colon cancer prevention and treatment. Molecules, 21(2), 169.
16. Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., & Vodička, P. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. European journal of medicinal chemistry, 144, 582-594.
17. Tan, G., Gyllenhaal, C., & Soejarto, D. D. (2006). Biodiversity as a source of anticancer drugs. Current drug targets, 7(3), 265-277.
18. Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J., & Huang, G. (2013). Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. IUBMB life, 65(11), 904-910.
19. Qian, Q., Chen, W., Cao, Y., Cao, Q., Cui, Y., Li, Y., & Wu, J. (2019). Targeting reactive oxygen species in cancer via Chinese herbal medicine. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019.
20. Ogunlesi, M., Okiei, W., Ofor, E., & Osibote, A. E. (2009). Analysis of the essential oil from the dried leaves of Euphorbia hirta Linn (Euphorbiaceae), a potential medication for asthma. African Journal of Biotechnology, 8(24).
21. Riddle, J. M. (1992). Contraception and Abortion from the Ancient World to the Renaissance. Harvard University Press.

استفاده از روش ریز استخراج دوستدار محیط زیست برای آنالیز مالاشیت گرین در نمونه های آبی

طاهره سرحدی[۱]، ماشاالله رحمانی[۲*]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه سیستان و بلوچستان
۲. دانشیار شیمی تجزیه دانشگاه سیستان و بلوچستان
rahmani341@hamoon.usb.ac.ir*

چکیده

این مقاله یک روش ریز استخراج سازگار با محیط زیست را برای سنجش مالاشیت گرین در نمونه های آبی توصیف می کند. این تکنیک یک روش موثر برای کاهش مصرف و در معرض قرار دادن حلال های پرخطری است که دفع آنها از محیط زیست نیز هزینه بر است. یکی از مزیت های این روش دوستدار محیط زیست، ایجاد قطرات ریز حلال استخراجی بدون نیاز به حلال پخشی بود. نتایج آزمایشات استخراج در شرایط بهینه نشان داد که فرآیند استخراج از درصد بالایی برخوردار است. با استفاده از روش سطح پاسخ، بهترین راندمان استخراج در شرایطی با استفاده از محلولی با pH=3.7، ۲۶۲ میکرو لیتر از حلال استخراجی، زمان استخراج ۸/۵ دقیقه و مقدار نمک ۱/۲ درصد وزنی- حجمی بدست آمد. در شرایط بهینه، روش پیشنهادی با موفقیت در تعیین مالاشیت گرین در نمونه های آبی با بازیابی استخراج بیش از ۹۸ درصد مورد استفاده قرار گرفت. در این روش، ضریب همبستگی پیش بینی شده و ضریب همبستگی تعدیل شده به ترتیب برابر ۰/۹۹۹۵ و ۰/۹۹۹۶ بدست آمد که بیانگر ارتباط مناسب و معنادار بین داده‌های تجربی و پیش بینی شده با استفاده از روش سطح پاسخ می‌باشد.

کلمات کلیدی: دوستدار محیط زیست، نمونه های آبی ، ریز استخراج، مالاشیت گرین

Using an eco-friendly microextraction method for the analysis of malachite green in water samples

Tahereh sarhadi and Mashaallah Rahmania*
University of Sistan and Baluchestan, Zahedan 98135-674, Iran.
*Corresponding author: Rahmani341@hamoon.usb.ac.ir

Abstract
This paper describes an environmentally friendly microextraction method for the analysis of malachite green in water samples. This technique is an effective way to reduce the consumption and exposure of hazardous solvents, which are costly to dispose of in the environment. One of the advantages of this environmentally friendly method was the creation of small droplets of extraction solvent without the need for dispersion solvent. The results of extraction tests in optimal conditions showed that the extraction process has a high percentage. By using the response surface method, the best extraction efficiency was achieved using a solution with pH=3.7, 262 microliters of extraction solvent, extraction time of 8.5 minutes, and salt content of 1.2%W/V. Under optimal conditions, the proposed method was successfully used in the determination of malachite green in aqueous samples with an extraction recovery of more than 98%. In this method, the predicted correlation coefficient and the adjusted correlation coefficient were obtained as 0.9995 and 0.9996, respectively, which indicates a suitable and significant relationship between the experimental and predicted data using the response surface method.

Keywords: Eco-friendly, water samples, microextraction, malachite green

مقدمه

مالاشیت گرین به طور گسترده در صنایع با هدف رنگ آمیزی استفاده می شود. ساختار شیمیایی مالاشیت سبز تری فنیل متان است که به صورت وسیعی برای از بین بردن قارچ ها، باکتری ها و انگل های خارجی در صنعت تکثیر و پرورش ماهی ها و سخت پوستان استفاده می شود[۱]. مالاشیت سبز رنگ کاتیونی محلول در آب است که به صورت پودر کریستالی سبز ظاهر می شود و در دسته ی تری فنیل متان قرار می گیرد. مالاشیت سبز برای رنگ آمیزی کاغذ، پنبه ابریشم، ساخت رنگ نقاشی و جوهر آن مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به مضراتی که تاکنون این ماده داشته است و اهمیت به ایمنی غذا و سلامت عمومی بسیاری از کشورها استفاده از مالاشیت سبز را در فرآیندهای آبزی پروری ممنوع اعلام کرده اند[۲]. از طرفی، تشخیص باقیمانده مالاشیت گرین در محیط های پرورش دهنده آبزیان نشان دهنده استفاده غیرمجاز از آن است. احتمال دارد که این ترکیب در ماهیها به فرمی تبدیل شود که بتوانند برای مدتها در بافتها باقی بماند. لذا تشخیص باقیمانده مالاشیت گرین در محیط های پرورش دهنده آبزیان ضروری است [۳]. احتمال دارد که مالاشیت گرین با سطوح غشای سلولی بر همکنش کرده و وارد سلول شده و در سیتوپلاسم متمرکز شود. بنابراین مالاشیت گرین می تواند سرطان زا باشد. همچنین این ترکیب به سختی توسط میکروبها متابولیز شده و تجزیه ناپذیر می شود و می تواند در محیط های مختلف دوام بیاورد. بنابراین قادر است که سلامتی انسان را تهدید کند. لذا استفاده گسترده از رنگ مالاشیت سبز خطرات متعددی برای سلامتی ایجاد کرده است و از این رو تصفیه ی مناسب پساب حاوی رنگ مالاشیت سبز بسیار ضروری است [۴]. از سوی دیگر، اندازه گیری مقادیر ناچیز مالاشیت گرین نیز مهم تلقی می شود. از طرفی، در اندازه گیری مقادیر ناچیز این ترکیب استفاده از یک روش آماده سازی که منجر به تغلیظ و افزایش حساسیت شود مهم تلقی می شود. هدف این تحقیق استفاده از روش ریز استخراج دوستدار محیط زیست برای آنالیز مالاشیت گرین در نمونه های آبی است. از طرفی، بهینه سازی شرایط مؤثر برفرآیند روش ریز استخراج از اهمیت خاصی برخوردار است. روش سطح پاسخ یک تکنیک آماری مؤثر برای بهینه سازی فرآیندهای پیچیده است. استفاده از روش سطح پاسخ تعداد آزمایش های تجربی مورد نیاز برای ارزیابی پارامترهای متعدد را کاهش می دهد و باعث صرفه جویی در زمان و هزینه می شود، بنابراین می توان از آن در بهینه سازی استفاده کرد [۵].

هدف این تحقیق استفاده از روش ریز استخراج دوستدار محیط زیست برای آنالیز مالاشیت گرین در نمونه های آبی است و برای بهینه سازی شرایط مؤثر برفرآیند از روش سطح پاسخ استفاده می شود.

بخش تجربی

همه مواد شیمیایی مورد کاربرد در این کار پژوهشی از شرکت مرک آلمان تهیه شد. هدف این تحقیق استفاده از روش ریز استخراج دوستدار محیط زیست برای آنالیز مالاشیت گرین در نمونه های آبی است. روال کار به این صورت دنبال می شود که برای انجام فرآیند، ابتدا مقدار مشخصی از محلول آنالیت با غلظت مشخص به ظرف آزمایش منتقل می شود تا بتوان شرایط را برای شروع آزمایش فراهم کرد. سپس به این مجموعه، حجم های میکرولیتری حلال استخراجی منتقل شده و فرآیند انجام تحقیق بر روی آن اجرا می شود. قبل از انجام آزمایش و بهینه سازی شرایط آزمایش، تنظیم شرایط دستگاه آنالیز برای فرایند انجام تحقیق مد نظر قرار می گیرد. سپس بهینه سازی شرایط مختلف در جهت بهبود فرایند انجام تحقیق ، مانند بررسی مقدار بهینه آلاینده، قدرت یونی محیط مورد آزمایش، محدوده اندازه گیری برای عوامل موثر در میکرو استخراج، دمای محیط کار انجام تحقیق و غلظت اولیه آلاینده، زمان تماس آلاینده در محیط انجام تحقیق و غیره که برای دستیابی به شرایط بهینه در جهت بهبود فرایند انجام تحقیق مهم است، بررسی می شود. آنگاه، آلوده کردن نمونه مورد نظر با مقادیر مشخص آنالیت و اندازه گیری آنها با روش پیشنهادی در شرایط بهینه شده و تجزیه نمونه های حقیقی در شرایط ذکر شده بررسی می شود. در این طرح تحقیق، امکان سنجی روش ریز استخراج برای سنجش مالاشیت گرین در نمونه های آبی با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی می شود. بدین منظور، برای بهینه سازی فرآیند، پارامترهای موثر مانند اثر pH، زمان استخراج، مقدار نمک، حجم حلال بررسی شدند. در این کار تحقیقاتی طراحی آزمایش با استفاده از روش سطح پاسخ انجام شد. بدین منظور از نسخه ده نرم‌افزار دیزایناکسپرت استفاده شد. در این نرم‌افزار پارامتر-های مورد بررسی به عنوان داده به نرم‌افزار وارد می‌شود و خروجی نرم‌افزار نتایج مورد نظر می‌باشد. در آغاز جهت بررسی شاخص مربوطه آزمایش‌هایی توسط نرم‌افزار طراحی و اجرا گردید. در این فرآیند به فاکتورهایی که تغییرات آنها بیش‌ترین تأثیر را در نتیجه آزمایش داشته باشند اصطلاحا پارامتر می‌گویند. پارامتر آزمایشگاهی شامل اثر pH، زمان استخراج، مقدار نمک، حجم حلال به عنوان متغیرهای مستقل مدل استفاده شد جهت طراحی به روش طرح مرکب مرکزی برای پارامترهای مورد نظر دو حد بالا و پایین تعریف شدند. . هدف به حداقل رساندن کارایی متغیرهای کنترل نشده بر کیفیت استخراج مربوطه بود. در این آزمایش اندازه گیری ها در طول موجی با بیشترین جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش انجام شد. پارامترهای موثر شامل اثر pH، زمان استخراج، مقدار نمک، حجم حلال به عنوان متغیرهای مستقل مدل استفاده شد. در انداز گیری از اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش استفاده شد و با استفاده از نرم افزار طراحی انجام و بر اساس پنج سطح برای هر عامل ذکر شده و ۳۰ اجرا تصادفی به دست آمده طبق روال دنبال شد.

نتایج و بحث

طراحی فرآیند بر اساس انتخاب پنج سطح برای هر عامل ذکر شده انجام و ۳۰ اجرا تصادفی به دست آمده طبق روال دنبال شد. هدف به حداقل رساندن کارایی متغیرهای کنترل نشده بر کیفیت استخراج مربوطه بود. طبق طرح مرکب مرکزی که یکی از روش های سطح پاسخ است، محلول های حاوی استاندارد مالاشیت گرین جهت بررسی فرآیند بهینه آزمایش ها استفاده شد. جدول ۱ طراحی آزمایش با استفاده از طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ برای مالاشیت گرین را نمایش می دهد.

جدول ۱. طراحی آزمایش با استفاده از طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ برای مالاشیت گرین

	A: pH		B:Volume of extractant solvent (µL)		C:Vortex time (min)		D:Salt (%W/V)	
Run	**Coded**	**Uncoded**	**Coded**	**Uncoded**	**Coded**	**Uncoded**	**Coded**	**Uncoded**
1	0	6	0	250	0		0	0.9
2	-1	4	-1	175	1		-1	0.6
3	0	6	0	250	0		2	1.5
4	2	10	0	250	0		0	0.9
5	1	8	1	325	1		-1	0.6
6	-1	4	-1	175	-1		-1	0.6
7	-1	4	1	325	1		1	1.2
8	1	8	1	325	1		1	1.2
9	0	6	0	250	0		0	0.9
10	-1	4	-1	175	1		1	1.2
11	-1	4	1	325	-1		1	1.2
12	0	6	-2	100	0		0	0.9
13	1	8	-1	175	1		1	1.2
14	0	6	0	250	0		0	0.9
15	0	6	0	250	0		0	0.9
16	1	8	-1	175	1		-1	0.6
17	1	8	1	325	-1		-1	0.6
18	1	8	1	325	-1		1	1.2
19	-1	4	1	325	-1		-1	0.6
20	1	8	-1	175	-1		-1	0.6
21	0	6	0	250	2		0	0.9
22	0	6	0	250	0		0	0.9
23	0	6	0	250	0		0	0.9
24	-1	4	1	325	1		-1	0.6
25	0	6	2	400	0		0	0.9
26	0	6	0	250	0		-2	0.3
27	-2	2	0	250	0		0	0.9

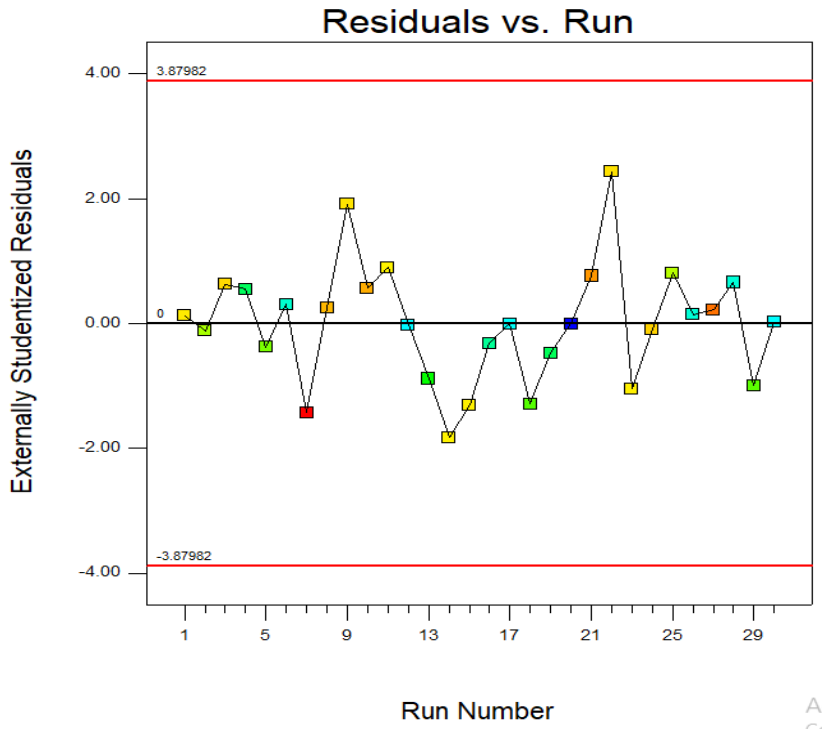
28	1	8	-1	175	-1	1	1.2
29	-1	4	-1	175	-1	1	1.2
30	0	6	0	250	-2	0	0.9

جدول ۲ خلاصه آماری مدل های بدست آمده برای مالاشیت گرین در نمونه های آبی را نشان می دهد. بر اساس نتایج این جدول، مدل درجه دوم به دلیل انحراف استاندارد کمتر و ضریب همبستگی بیشتر و خطای کمتر نسبت به بقیه مدلها از کفایت لازم برخوردار است و به عنوان مدل پیشنهادی انتخاب می شود.

جدول ۲ خلاصه آماری مدل های بدست آمده برای مالاشیت گرین در نمونه های آبی

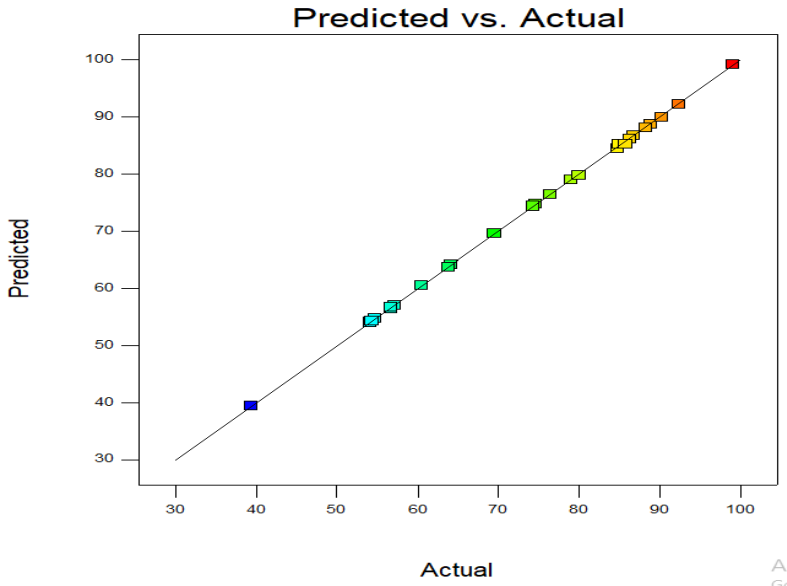
Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	6.59	0.8334	0.8067	0.7895	1372.28	
2FI	7.07	0.8544	0.7778	0.7534	1607.44	
Quadratic	0.28	0.9998	0.9996	0.9995	3.08	Suggested
Cubic	0.39	0.9998	0.9993	0.9956	28.48	

شکل ۱ نشان دهنده نمودار خطای باقی مانده براساس ترتیب آزمایش است. این نموداربیانگر پخش تصادفی داده ها در پیرامون خط مبنا است، این شکل بیانگر این است که نتایج ازمدل خاصی تبعیت نمی کند که بیان کننده کفایت مدل سطح پاسخ پیشنهادی برای مالاشیت گرین در نمونه های آبی است.



شکل ۱ نمودار شدت باقی مانده برحسب ترتیب آزمایش برای مالاشیت گرین

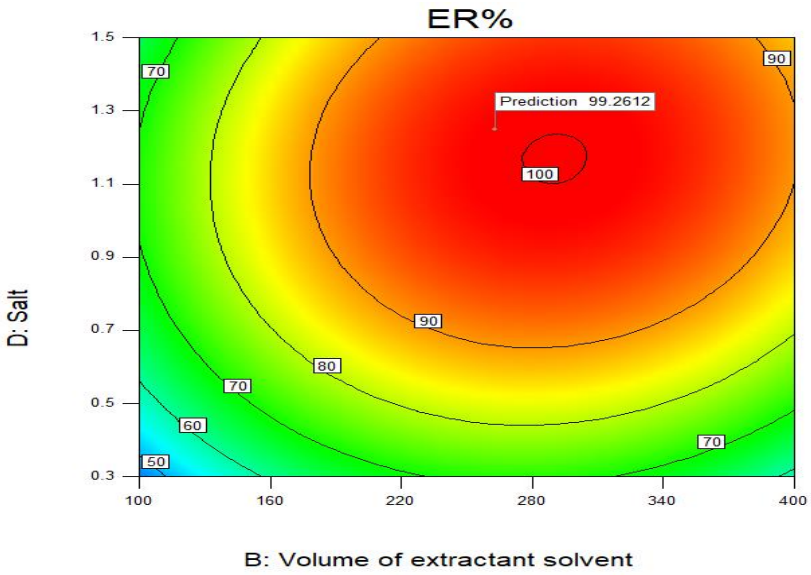
شکل ۲ نمودار نتایج آزمایشگاهی در مقابل مقدار پیش بینی شده برای مالاشیت گرین را نمایش می دهد.



شکل ۲ نمودار نتایج آزمایشگاهی در مقابل مقدار پیش بینی شده برای مالاشیت گرین

نزدیکی داده های آزمایشگاهی به نتایج پیش بینی شده به روش سطح پاسخ، بیانگر این است که مدل درجه دوم بدست آمده از روش سطح پاسخ از کفایت لازم برخوردار است و می تواند برای پیشگویی پاسخ ها بکار رود.

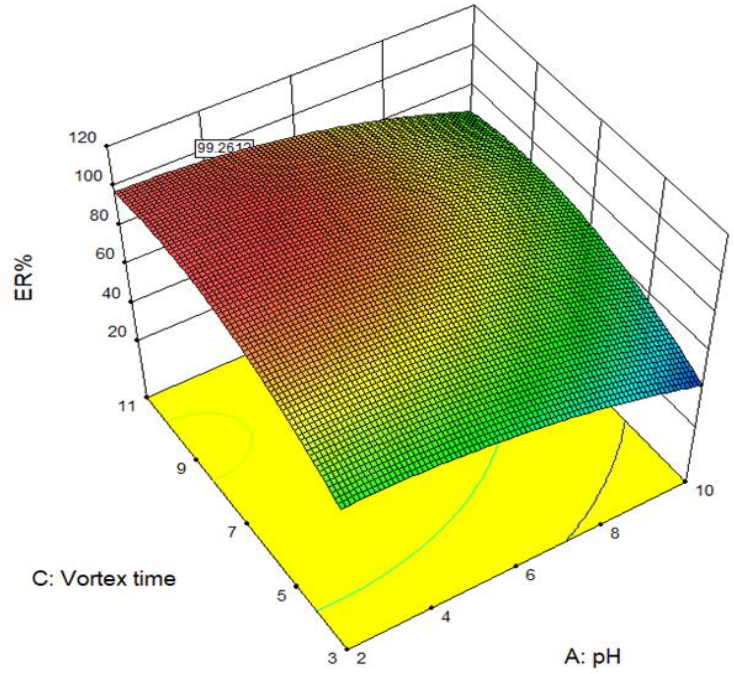
شکل ۳ نمودار اثر همزمان مقدار نمک و حجم حلال را بر استخراج مالاشیت سبز نشان می دهد.



شکل ۳ نمودار دوبعدی برهمکنش مقدار نمک و حجم حلال را بر استخراج مالاشیت سبز

با استفاده از روش سطح پاسخ، بهترین راندمان استخراج در شرایط استفاده از حجم ۲۶۲ میکرو لیتر از حلال استخراجی و مقدار نمک ۱/۲ درصد وزنی- حجمی بدست آمد.

شکل ۴ نمودار سه بعدی مربوط به اثر همزمان پارامترهای pH و زمان استخراج مالاشیت سبز را نشان می دهد.



شکل ۴ نمودار سه بعدی مربوط به برهمکنش اثر پارامترهای pH و زمان استخراج مالاشیت سبز

بر اساس نتایج، بیشترین درصد استخراج در شرایطی با استفاده از محلولی با pH=3.7 و زمان استخراج ۸/۵ دقیقه بدست آمد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، یک روش ریز استخراج سازگار با محیط زیست برای سنجش مالاشیت گرین در نمونه های آبی بررسی شد. طراحی آزمایش ها با استفاده از طرح مرکب مرکزی انجام شد و پارامترهای موثر بر میکرواستخراج به کمک روش سطح پاسخ بهینه سازی شد. این تکنیک یک روش موثر برای کاهش مصرف و در معرض قرار دادن حلال های پرخطری است که دفع آنها از محیط زیست نیز هزینه بر است. یکی از مزیت های این روش دوستدار محیط زیست، ایجاد قطرات ریز حلال استخراجی بدون نیاز به حلال پخشی بود. مقادیر بهینه شامل استفاده از محلولی با pH=3.7، ۲۶۲ میکرو لیتر از حلال استخراجی، زمان استخراج ۸/۵ دقیقه و مقدار نمک ۱/۲ درصد وزنی- حجمی است. در این روش، ضریب همبستگی پیش بینی شده و ضریب همبستگی تعدیل شده به ترتیب برابر ۰/۹۹۹۵ و ۰/۹۹۹۶ بدست آمد که بیانگر ارتباط مناسب و معنادار بین داده‌های تجربی و پیش بینی شده با استفاده از روش سطح پاسخ می‌باشد.
این روش ریز استخراج سازگار با محیط زیست با موفقیت در تعیین مالاشیت گرین در نمونه های آبی با بازیابی استخراج بیش از ۹۸ درصد مورد استفاده قرار گرفت.

مراجع

[۱].کوشا، مسعود,فرهانیان,امیدوار,درافشان و محبوبی صوفیانی. (۲۰۱۵). بررسی سینتیک و ماهیت جذب مالاشیت سبز توسط ریز جلبک های سبز.مجله آب و فاضلاب,۲۶ (۳) و۳۷-۵۰ .

[2] Zhou, Z., Fu, Y., Qin, Q., Lu, X., Shi, X., Zhao, C., Xu, G. (2018). Synthesis of magnetic mesoporous metal-organic framework-5 for the effective enrichment of malachite green and crystal violet in fish samples. *Journal of Chromatography A*, *1560*, 19-25.

[3] Jones, J. J., Falkinham III, J. O. (2003). Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *47*(7), 2323-2326.

[4] Raval, N. P., Shah, P. U., & Shah, N. K. (2017). Malachite green “a cationic dye” and its removal from aqueous solution by adsorption. *Applied Water Science*, *7*(7), 3407-3445.

[5] Rahmani, M., Ghasemi, E., Sasani, M. (2017). Application of response surface methodology for air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction of deoxynivalenol in rice samples prior to HPLC-DAD analysis and comparison with solid phase extraction cleanup. *Talanta*, 165, 27-32.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

مقایسه تاثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و ترشحات آن بر سیتوکاین تغییر یابنده رشد بتا (TGF-β) در رت های دیابتی

رضوان ایزدی[1*]، .سید حسام الدین حجازی[2]،.سیف اله بهرامی کیا[3]

۱. کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران، salome.baran1919@gmail.com

۲. استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۳. دانشیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

چکیده

دیابت در حال تبدیل‌شدن به یک اپیدمی بزرگ بوده و یکی از علل اصلی بستری‌های مکرر در بیمارستان می‌باشد. زخم‌های غیر التیام بخش در افراد دیابتی ممکن است به قطع عضو منجر شوند. سلول های بنیادی مزانشیمی به عنوان ترمیم کننده بافت عمل می کنند. این سلول ها با آزاد کردن عوامل تغذیه ای یا از طریق ویژگی های تمایز چند توان خود عمل می کنند. در این پژوهش تاثیر سلول های بنیادی مشتق از چربی (ASCs) و ترشحات آن بر سیتوکاین تغییر یابنده رشد بتا (TGF-β) در زخم پوستی رت های دیابتی بررسی شد. به این منظور، سلول های بنیادی از بافت چربی رت های نر توسط آنزیم کلاژناز I استخراج و کشت داده شدند. با کمک اتانول۹۶ درصد محیط کشت بهینه حاوی ترشحات سلول های بنیادی تهیه شد. رت ها به ۴ گروه غیر دیابتی، کنترل دیابتی، دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات و دیابتی تجربی تحت درمان با ASCs تقسیم شدند و در ۲۷ سر از آن ها دیابت توسط استرپتوزوسین القا شد. در سطح پشتی هر رت زخم ۵ میلی متری ایجاد و درمان اعمال شد. مقدار TGF-β در زخم و حاشیه آن توسط الایزا بررسی شد. مقدار فاکتور TGF-β در دو گروه دریافت کننده ASCs و ترشحات از گروه کنترل دیابتی کمتر بود. تزریق زیر جلدی ASCs و ترشحات آن از طریق کاهش التهاب و تعدیل سیستم ایمنی منجر به بهبود زخم دیابتی می شود.

کلمات کلیدی: زخم دیابتی، التهاب، TGF-β، ترشحات، ASCs

Comparison of the effect of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and its secretions on transforming growth factor– beta (TGF-β) cytokine in diabetic rats.

Rezvan Izadi*[1], Seyed Hesamaldin Hejazi[2], Seifollah Bahramikia[3]

1-master of biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University,

salome.baran1919@gmail.com

2-Assistant Professor of molecular genetics, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University

3-Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University

Abstract

Diabetes is becoming a big epidemic and is one of the main causes of frequent hospitalizations. Non-healing wounds in diabetics may lead to amputation. Mesenchymal stem cells act as tissue repair. These cells function by releasing trophic factors or through their multipotent differentiation properties. In this study, the effect of adipose-derived stem cells (ASCs) and their secretions on the transforming growth factor beta (TGF-β) cytokine in the skin wound of diabetic rats was investigated. For this purpose, stem cells were extracted from fat tissue of male rats by collagenase I enzyme and cultured. With the help of 96% ethanol, optimal culture medium containing stem cell secretions was prepared. The rats were divided into 4 non-diabetic groups, diabetic control, experimental diabetic treated with secretions and experimental diabetic treated with ASCs, and diabetes was induced by streptozocin in 27 of them. A 5 mm wound was created on the dorsal surface of each rat and treated. The amount of TGF-β in the wound and its margin was checked by ELISA. The amount of TGF-β factor in two groups receiving ASCs and secretions was lower than other groups. Subcutaneous injection of ASCs and especially its secretions leads to the healing of diabetic wounds by reducing inflammation and modulating the immune system.

Keywords: Diabetic wound, inflammation, TGF-β, secretion, ASCs

* Corresponding author: **Rezvan Izadi,** master of biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Email: salome.baran1919@gmail.com

مقدمه

دیابت در حال تبدیل‌شدن به یک اپیدمی بزرگ بوده و یکی از علل اصلی بستری‌های مکرر در بیمارستان می‌باشد. زخم‌های غیر التیام بخش در افراد دیابتی ممکن است در سراسر جهان به قطع عضو منجر شوند [۱]. زخم دیابتی یکی از مهم‌ترین عوارض دیابت است که حدود ۳۶ درصد از کل زخم‌های پوستی مزمن را به خود اختصاص می‌دهد. یک زخم مزمن دیابتی با علل پیچیده، مدت‌زمان طولانی درمان، هزینه‌های پزشکی بالا، استعداد عود مکرر و پیش‌آگهی بالینی ضعیف مشخص می‌شود؛ بنابراین برای بهبود کیفیت زندگی بیمار، شناسایی اقدامات درمانی مؤثر برای زخم پوستی مزمن دیابتی ضروری است، چرا که این بیماری مزمن سلامت انسان را به خطر انداخته و نه‌تنها کیفیت زندگی بیمار را به خطر می‌اندازد بلکه بار اقتصادی سنگینی را بر دوش جامعه و خانواده قرار می‌دهد [۲].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی برای درمان زخم‌های پوستی به دلیل فراوانی، جداسازی آسان و گسترش مناسب در شرایط آزمایشگاهی تحت بررسی هستند [۳]. در طول بهبود زخم ASCs ممکن است بر بسیاری از انواع سلول‌ها مانند سلول‌های ایمنی، سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست‌های دخیل در التهاب و تشکیل اسکار تأثیر بگذارد. کراتینوسیت‌های مرتبط با اپیتلیزاسیون مجدد نیز می‌توانند از اهداف ASCs باشند. ASCs پیوندی تکثیر سلول‌های اپیدرمی را افزایش می‌دهند که منجر به ایجاد اپیدرم ضخیم‌تر در حین بهبود زخم پوستی می‌شوند. ASCs می‌تواند عملکرد کراتینوسیت‌ها را در بهبود زخم از طریق دخالت پاراکرین بهبود بخشد [۴].

ترشحات مجموعه پیچیده‌ای از بخش‌های محلول مانند سیتوکاین ها و فاکتورهای رشد و وزیکول های خارج سلولی است. ترشحات به طور خاصی بر روند بهبود زخم در شرایطی مانند زخم دیابت و سوختگی شدید تأثیر می‌گذارند[۵]. ترشحات مزایای عمده‌ای نسبت به پیوند سلول‌های بنیادی دارند. ازجمله، مشکل بقای سلول پس از پیوند را ندارند. بیان پروتئین‌های سطح سلولی کمتری را در مقایسه با سلول‌های زنده و تکثیری ایجاد می‌کنند که در نتیجه ایمنی‌زایی کمتری را به وجود می‌آورد. استفاده از ترشحات به‌عنوان یک محصول آماده نیاز به استفاده از تعداد بالای سلول برای پیوند و پتانسیل درمانی ناشی از گسترش MSCs آزمایشگاهی را ندارد [۶].
سلول‌های بنیادی و ترشحات آن‌ها را می‌توان از طریق راه‌های مختلف تجویز کرد. تاکنون تزریق مستقیم به محل موردنظر و تزریق داخل وریدی به طور گسترده‌ای مورداستفاده قرار گرفته‌اند، زیرا آن‌ها مواد بیولوژیک را به طور مؤثرتری در مقایسه با سایر راه‌های تزریق به بافت هدف می‌رسانند[۷].

هدف از این پژوهش بررسی تاثیر ASCs و ترشحات آن بر ترمیم زخم دیابتی بود. اثر ASCs و ترشحات آن بر مقدار سیتوکاین تغییر یابنده رشد بتا (TGF-β) و التهاب مزمن در زخم پوستی رت های دیابتی بررسی شد.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت ASCs

سه سر موش صحرایی نر سالم و بالغ آلبینو ویستار با میانگین وزنی ۲۰±۲۸۰ گرم و سن ۱۴ هفته از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شدند. رت ها با تزریق صفاقی دوز بالای کتامین- زایلازین قربانی شدند. چربی های هر دو سمت اپی دیدیم برداشته شد. به‌منظور هضم آنزیمی بافت چربی از آنزیم کلاژناز تیپ I استفاده و بافت چربی به مدت ۷۵min در ۳۷ C° انکوبه شد. سوسپانسیون از سل استرینر ۱۰۰ µm عبور داده شد و سه بار با دور ۱۵۰۰RPM برای ۵ min سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در ۲ ml محیط کشت DMEM High Glucose همراه با fetal bovine serum10% و ۱٪ penicillin-streptomycin حل کرده و سوسپانسیون سلولی به فلاسک های T25 منتقل شد. فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ C° ، رطوبت ۹۵% و CO2 ۵% قرارداده شدند. بعد از گذشت ۷ روز سلول ها ۹۰ درصد کف هر فلاسک را فراگرفتند. به هر فلاسک ml ۰/۵ آنزیم Tripsin / EDTA 0/25% افزوده و فلاسک‌ها به مدت min ۴ -۳ درون انکوباتور ۳۷ C° قرار گرفتند و سپس پاساژ داده شدند. سلول ها پس از پاساژ اول برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز فلوسایتومتری

برای تأیید حضور سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در کشت ، یک هفته پس از پاساژ اول بیان نشانگرهای CD105 و CD34در سلول ها توسط فلوسایتومتری بررسی شد.

جداسازی ترشحات ASCs

سه روز بعد از پاساژ اول محیط کشت سلول‌ها را دور ریخته و دو مرتبه با بافر فسفات سالین (PBS) کف فلاسک‌ها شست‌وشو داده شد و سپس محیط کشت بدون سرم (DMEM High Glucose و PEN / STREP 1%) به هر فلاسک اضافه گردید. بعد از ۴۸ h محیط کشت سلول‌ها جمع‌آوری و دو بار با دور RPM ۲۰۰۰ به مدت min ۵ سانتریفیوژ شد. سه برابر حجم محیط کشت اتانول ٪ ۹۶ افزوده و برای یک ساعت در دمای ۲۰C ° - قرار داده شد. سپس از فیلتر µm ۰/۴۵ عبور داده و min ۲۰ با دور RPM ۲۰۰۰ در دمای ۴ C° سانتریفیوژ شد. رسوب توسط اتانول ۷۰% به حالت سوسپانسیون در آمد و برای min ۲۰ با دور ۲۰۰۰RPM و دمای ۴ C° درجه سانتریفیوژ انجام گرفت. سپس رسوب حاصل درون PBS حل و تا زمان استفاده در تانک ازت نگهداری شد.

حیوانات آزمایشگاهی

۳۰ سر موش صحرایی نر سالم و بالغ آلبینو ویستار با میانگین وزنی ۲۰ ±۲۵۰ گرم و سن ۱۲ هفته از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شدند. موش های صحرایی در در دمـای ۱ ±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و سـیکل مـنظم ۱۲ سـاعت روشـنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در نگهداری شدند. تمامی مراحل کار با موش‌های صحرایی طبق دستورالعمل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و با تایید کمیته اخلاق بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان (با کداخلاقLU.ECRA.2021/3) انجام گرفت.

ایجاد و تایید دیابت

برای ایجاد مدل دیابت ، مقدار mg/kg ۵۰ وزن بدن استرپتوزوسین ، بعد از ۱۲ ساعت ناشتا به‌صورت داخل صفاقی به ۲۷ سر موش صحرایی گروه های دیابتی، دیابتی تحت درمان با ترشحات، دیابتی تحت درمان با ASCs تزریق شد . بعد از گذشت ۷۲ ساعت قند خون موش‌های صحرایی بعد از ۱۲ ساعت ناشتا توسط دستگاه گلوکومتر سنجیده و موش‌های صحرایی با قند خون بالای mg/dl ۲۵۰ به‌عنوان موش صحرایی دیابتی تأیید شدند.

بافت‌برداری زخم‌ها

در هر یک از روزهای ۳، ۶ و ۹ بعد از ایجاد زخم، ۳ سر موش صحرایی از هر گروه با تزریق صفاقی دوز بالای کتامین - زایلازین قربانی شدند. سپس زخم و حاشیه آن برداشته و از آن برای بررسی TGF-β توسط الایزا استفاده شد.

بررسی سیتوکاین TGF-β توسط الایزا

نمونه‌های لازم برای تست الایزا تا زمان انجام کار در دمای انجماد ۸۰- ذخیره شدند. نمونه‌ها در جای خنک توسط بافر ریپا هموژن و ۲۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی جدا شد و مقدار TGF-β با استفاده از کیت الایزای موشی بررسی شد به این منظور، محلول شستشو 30X را باید قبل از استفاده رقیق کرد. برای رقیق‌سازی، ۲۹ میلی‌لیتر آب و ۱ میلی‌لیتر از بافر شستشو اضافه گردید. ابتدا ۴۰ میکرولیتر از نمونه و ۵۰ میکرولیتر از استانداردها در چاهک‌های جداگانه ریخته و سپس ۵۰ میکرولیتر از استرپتاویدین پراکسیداز ترب کوهی (Streptavidin HRP) به آن اضافه شد. سپس به چاهک نمونه‌ها ۱۰ لاندا از آنتی‌بادی اضافه گردید. به چاهک‌های استاندارد آنتی‌بادی اضافه نشد. درب پلیت با چسب درپوش الایزا پوشانده و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از یک ساعت، چسب پلیت برداشته و محلول داخل چاهک‌ها دور ریخته شد. سپس محلول شستشو به چاهک‌ها اضافه و پس از ۳۰ ثانیه چاهک خالی شد. این شستشو چهار بار تکرار گردید. برای کنترل نمونه چاهک بلانک هم تهیه شد.

چاهک بلانک شامل محلول‌های کروموژن A و B و محلول متوقف‌کننده بود. پس از شستشو و خشک‌کردن، ۵۰ میکرولیتر محلول کروموژن A به هر چاهک اضافه و سپس ۵۰ میکرولیتر محلول کروموژن B اضافه گردید. پلیت به‌آرامی تکان داده و ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۱۰ دقیقه محلول متوقف‌کننده به همه چاهک‌ها اضافه شد تا رنگ آبی به زرد تبدیل شود. جذب نوری چاهک‌ها، در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانش شد. با استفاده از جذب نوری نمونه‌های استاندارد، منحنی استاندارد را رسم و سپس با استفاده از فرمول به‌دست‌آمده، مقادیر هر نمونه محاسبه گردید.

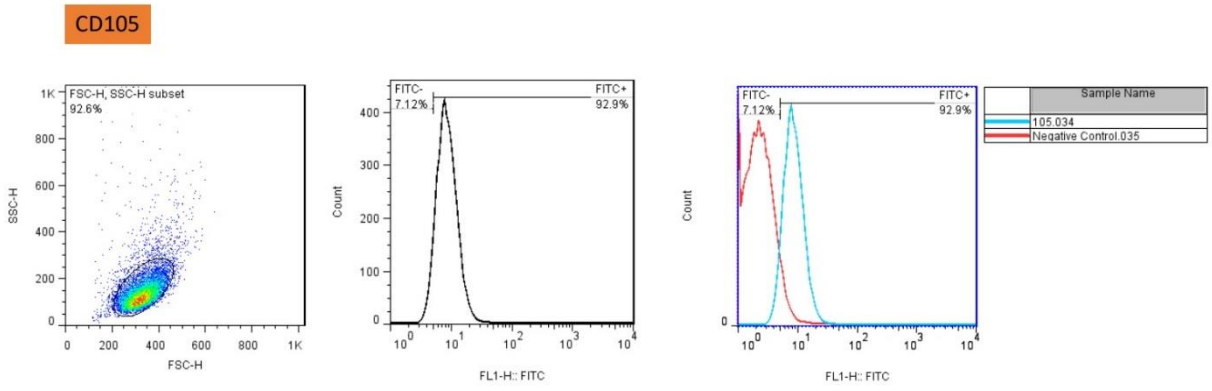
آنالیز آماری

داده های الایزا توسط نرم افزار SPSS26 و با آزمون Tukey و ANOVA با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ آنالیز شد. نتایج فلوسایتومتری با نرم‌افزار Flow jo آنالیز گردید.

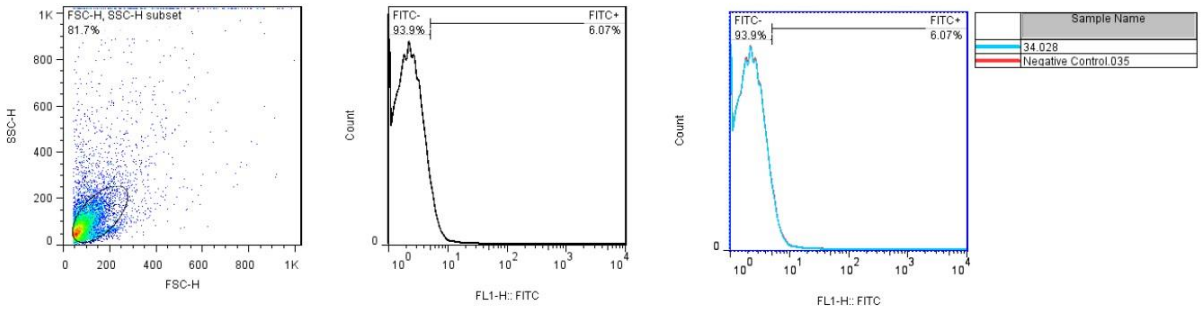
نتایج

فلوسایتومتری

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی موش صحرایی (ASCs) حاصل از پاساژ اول، برای نشانگر CD105 ۹۲/۹ درصد و برای نشانگرCD34 ۶/۰۷ درصد است.



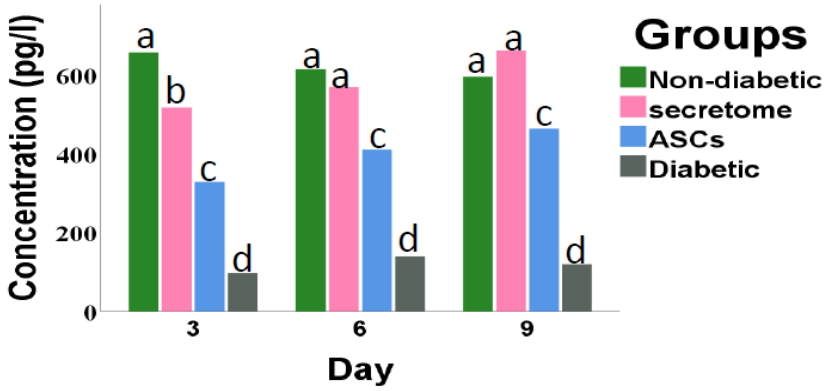
CD34



شکل۱. نتایج فلوسایتومتری نشانگرهای CD105 و CD34 در سلول های مشتق از چربی

بررسی سیتوکاین TGF-β

در روز سوم بعد از ایجاد زخم، TGF-β ، به ترتیب در گروه کنترل دیابتی، دیابتی تجربی تحت درمان با (ASCs)، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات و کنترل غیردیابتی بیشترین مقدار را داشت. میزان TGF-β در مقایسه تمامی گروه‌ها با یکدیگر، دارای اختلاف معنی‌داری بود. در روز ششم پس از ایجاد زخم، TGF-β به ترتیب در گروه کنترل دیابتی، دیابتی تجربی تحت درمان با (ASCs)، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات و کنترل غیردیابتی بیشترین مقدار را داشت. در مقایسه بین گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات با کنترل غیردیابتی و گروه دیابتی تجربی تحت درمان با (ASCs)، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در مقایسه بین گروه کنترل دیابتی با تمامی گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در مقایسه گروه کنترل غیردیابتی و گروه دیابتی تجربی تحت درمان با(ASCs) اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در روز نهم بعد از ایجاد زخم، TGF-β به ترتیب در گروه کنترل دیابتی، دیابتی تجربی تحت درمان با (ASCs)، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات و کنترل غیردیابتی بیشترین مقدار را داشت. مقایسه گروه کنترل دیابتی با همه گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌داری بود. در مقایسه بین گروه کنترل غیردیابتی، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با (ASCs) و گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.



شکل ۲. بررسی TGF-β در روز های سوم، ششم و نهم بعد از ایجاد زخم

بحث

یکی از نگرانی‌های اصلی در حوزه سلامت زخم دیابتی است. دیابت روند بهبودی زخم را با ایجاد اختلال در هر یک از مراحل ترمیم زخم به تأخیر می‌اندازد، اختلال در مراحل هموستاز، التهاب، تکثیر و بازسازی، با طولانی شدن زمان ترمیم زخم بر کیفیت زندگی بیمار تأثیر می‌گذارد. این زخم‌ها دارای عوارض متعددی از جمله مرگ‌ومیر می‌باشند. زخم‌های دیابتی با زخم‌های حاد و مزمنی مشخص می‌شوند که بهبود آن‌ها به تعویق افتاده یا دارای مراحل بهبودی نا هماهنگ هستند [۸].

بیماری‌هایی مانند دیابت، روند طبیعی ترمیم زخم را به تأخیر می‌اندازند و باعث ایجاد زخم مزمن می‌شوند. امروزه روش‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی برای بهبود بازسازی بافت مورد توجه قرار گرفته است. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ASCs) در بافت چربی وجود دارند. این سلول‌ها قادر به تمایز به انواع خاصی از سلول‌ها می‌باشند که برای بهبود زخم ضروری هستند. احتمالاً بهبود زخم با این روش عمدتاً به دلیل توانایی سلول‌های بنیادی در ترشح سیتوکاین ها و فاکتورهای رشد مختلف است. استفاده از ترشحات سلول‌های بنیادی یک درمان مؤثر برای زخم پای دیابتی و جلوگیری از قطع عضو است [۹].

سلول های بنیادی مشتق از چربی با بیان بالا و مثبت مارکرهای سطحی CD105 ، CD90 ، CD73 ، CD44 و بیان منفی و پایین مارکرهای سطحی CD34 ، CD45، CD19 ، CD14 مشخص می شوند [۱۰، ۱۱]. در نتایج حاصل از فلوسایتومتری در پژوهش An و همکاران مقدار بیان نشانگرهای سطحی CD105 به ترتیب ۹۴/۶ و ۹۶/۸ درصد و برای CD34 به ترتیب ۳/۴۴ و ۴/۳۳ بود که نشان‌دهنده بیان CD105 و عدم بیان CD34 می‌باشد [۱۲]. نتایج حاصل از فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی در این پژوهش برای CD105 ۹۲/۹ درصد بود که نشان‌دهنده بیان مثبت و بالای این نشانگر و برای CD34 ۶/۰۷ درصد است که نشان‌دهنده بیان پایین این نشانگر می‌باشد.

TGF.β سیتوکاینی است که توسط سلول های نوتروفیل، ماکروفاژ و کراتینوسیت تولید می شود. TGF.β نقش های متعددی در ترمیم زخم دارد از جمله حفظ ECM ، رشد سلول های اندوتلیال ، تنظیم ایمنی وجذب سلول های ایمنی مانند نوتروفیل و مونوسیت و همچنین تاثیر بر سایر سلول های دخیل در ترمیم زخم مانند فیبروبلاست و اندوتلیال. این فاکتور دارای اثرات ضدالتهابی و پیش التهابی است [۱۳-۱۵]. ما در مطالعه حاضر به بررسی سطح سیتوکاینTGF.β در زخم و حاشیه آن پرداختیم و به این منظور ما ازتمام لایه های اپیدرم برای بررسی سطح TGF.β استفاده کردیم. نتایج بررسی های ما نشان دادندکه سطح TGF.β در گروه کنترل دیابتی به طور معنی داری از گروه دیابتی دریافت کننده ASCs ، ترشحات و گروه کنترل سالم بالاتر بود. اگر چه در برخی مطالعات بیان شده TGF.β در زخم های مزمن مقدار کاهش یافته ای دارد اما بررسی تمام لایه های اپیدرم نشان دهنده افزایش این فاکتور است و کمبود آن مربوط به بخش بالایی اپیدرم است [۱۴].

استفاده از ترشحات به دست آمده به روش بدون سرم باعث افزایش زمان نگهداری سکرتوم بدون نگرانی از آلودگی آن می شود در حالی که استفاده از سرم باعث افزایش آلودگی و کاهش زمان نگهداری ترشحات می شود. ما در مطالعه حاضر از ترشحات محیط کشت بدون سرم حاوی آنتی بیوتیک استفاده کردیم [۱۶، ۱۷].

تزریق زیر جلدی روش مناسبی برای انتقال پروتئین های درمانی است . پروتئین های با اندازه کوچک جذب مویرگ های خونی ناحیه تزریق می شوند. ترشحات اندازه ی کوچکی دارند و می توانند به مویرگ های پوست وارد شوند.این نوع تزریق خطر عفونت سیستمیک کمتری در مقایسه با تزریق وریدی دارد [۱۸،۱۹]. در مطالعه حاضر ASCs و ترشحات آن به صورت زیر جلدی و آهسته تزریق شد و در بررسی ماکروسکوپی زخم و اطراف آن هیچ آثاری از هماتوم و کبودی مشاهده نشد [۲۰].

نتیجه گیری

به نظر میرسد ASCs و ترشحات آن از طریق کنترل التهاب و تعدیل سیستم ایمنی باعث بهبود زخم های دیابتی می شوند. استفاده از ASCs و ترشحات به صورت زیرجلدی بدون عارضه بوده و باعث افزایش سرعت بسته شدن زخم و به حداقل رساندن اسکار می شود.

منابع

[1] O'Loughlin A, Kulkarni M, Creane M, Vaughan EE, Mooney E, Shaw G, et al. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. Diabetes 2013;62:2588–94. https://doi.org/10.2337/db12-1822.

[2] Han Y, Sun T, Han Y, Lin L, Liu C, Liu J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells implantation accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats via the Wnt signaling pathway. Eur J Med Res 2019;24:10. https://doi.org/10.1186/s40001-019-0366-9.

[3] Navone SE, Pascucci L, Dossena M, Ferri A, Invernici G, Acerbi F, et al. Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice. Stem Cell Res Ther 2014;5:7. https://doi.org/10.1186/scrt396.

[4] Moriyama M, Sahara S, Zaiki K, Ueno A, Nakaoji K, Hamada K, et al. Adipose-derived stromal/stem cells improve epidermal homeostasis. Sci Rep 2019;9:18371. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54797-5.

[5] An Y-H, Kim DH, Lee EJ, Lee D, Park MJ, Ko J, et al. High-Efficient Production of Adipose-Derived Stem Cell (ADSC) Secretome Through Maturation Process and Its Non-scarring Wound Healing Applications. Front Bioeng Biotechnol 2021;9. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.681501.

[6] Sumarwoto T, Suroto H, Mahyudin F, Utomo DN, Romaniyanto, Tinduh D, et al. Role of adipose mesenchymal stem cells and secretome in peripheral nerve regeneration. Annals of Medicine and Surgery 2021;67. https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102482.

[7] Foo JB, Looi QH, Chong PP, Hassan NH, Yeo GEC, Ng CY, et al. Comparing the Therapeutic Potential of Stem Cells and their Secretory Products in Regenerative Medicine. Stem Cells Int 2021;2021:1–30. https://doi.org/10.1155/2021/2616807.

[8] Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. Biomedicine and Pharmacotherapy 2019;112. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108615.

[9] Ayavoo T, Murugesan K, Gnanasekaran A. Roles and mechanisms of stem cell in wound healing. Stem Cell Investig 2021;8. https://doi.org/10.21037/sci-2020-027.

[10] Hamada M, Iwata T, Kato Y, Washio K, Morikawa S, Sakurai H, et al. Xenogeneic transplantation of human adipose-derived stem cell sheets accelerate angiogenesis and the healing of skin wounds in a Zucker Diabetic Fatty rat model of obese diabetes. Regen Ther 2017;6:65–73. https://doi.org/10.1016/j.reth.2017.02.002.

[11] Wang J, Wu H, Peng Y, Zhao Y, Qin Y, Zhang Y, et al. Hypoxia adipose stem cell-derived exosomes promote high-quality healing of diabetic wound involves activation of PI3K/Akt pathways. J Nanobiotechnology 2021;19. https://doi.org/10.1186/s12951-021-00942-0.

[12] An R, Zhang Y, Qiao Y, Song L, Wang H, Dong X. Adipose stem cells isolated from diabetic mice improve cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. Stem Cell Res Ther 2020;11. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01621-x.

[13] de Mayo T, Conget P, Becerra-Bayona S, Sossa CL, Galvis V, Arango-Rodríguez ML. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. PLoS One 2017;12:e0177533. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177533.

[14] Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Role of TGF-β in Skin Chronic Wounds: A Keratinocyte Perspective. Cells 2020;9. https://doi.org/10.3390/cells9020306.

[15] Gonzalo-Gil E, Galindo-Izquierdo M. Papel del factor de crecimiento transformador-beta (TGF-β) en la fisiopatología de la artritis reumatoide. Reumatol Clin 2014;10:174–9. https://doi.org/10.1016/j.reuma.2014.01.009.

[16] Cases-Perera O, Blanco-Elices C, Chato-Astrain J, Miranda-Fernández C, Campos F, Crespo P V., et al. Development of secretome-based strategies to improve cell culture protocols in tissue engineering. Sci Rep 2022;12:10003. https://doi.org/10.1038/s41598-022-14115-y.

[17] Khayambashi P, Iyer J, Pillai S, Upadhyay A, Zhang Y, Tran SD. Hydrogel Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes for Tissue Engineering. Int J Mol Sci 2021;22. https://doi.org/10.3390/ijms22020684.

[18] Zeng Q-L, Liu D-W. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: An emerging therapeutic strategy for normal and chronic wound healing. World J Clin Cases 2021;9:6218–33. https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i22.6218.

[19] McDonald TA, Zepeda ML, Tomlinson MJ, Bee WH, Ivens IA. Subcutaneous administration of biotherapeutics: current experience in animal models. Curr Opin Mol Ther 2010;12:461–70.

[20] Kim H, Park H, Lee SJ. Effective method for drug injection into subcutaneous tissue. Sci Rep 2017;7:9613. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10110-w.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی اثرات ضد باکتریایی گیاه دارویی درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*)

منیژه ابراهیمی[۱*]، فاطمه دانشمند[۲*]، محبوبه میرحسینی[۲]، فاطمه نژادعلیمرادی[۲]
[۱]کارشناسی ارشدفیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.
manijehebrahimii@gmail.com[۱]
f.daneshmand@pnu.ac.ir[۲]

چکیده

اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس از باکتریهای بیماریزای مهم می باشد که طیف وسیعی از عفونتها را ایجاد می کند. مصرف روزافزون انتی بیوتیک ها علیه عفونت ناشی از این باکتریها سبب افزایش مقاومت دارویی شده است و همین امر سبب گردید تا مطالعات وسیعی بر روی داروهای ضد میکروبی جدید با اثر بخشی بیشتر صورت گیرد. *Artemisia aucheri* یا درمنه کوهی گیاهی از خانواده Asteroideae می باشد و در کاهش چربی خون (تری گلیسیرید و کلسترول بد یا LDL) و در درمان بیماریهای قلبی و عروقی استفاده می شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره *Artemisia aucheri* بر باکتری های اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. در این پژوهش عصاره بخش های هوایی این گیاه به روش سوکسله استخراج و خاصیت ضد میکروبی عصاره متانولی آن با استفاده از روش انتشار در آگار و تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC) علیه دو باکتری *اشرشیاکولی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی *Artemisia aucheri* در *اشرشیاکولی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب برابر با ۰/۱۸ ±۱۲/۴۶، ۰/۱۳± ۱۹/۳۶ میلی‌متر بود. نتایج تعیین MIC و MBC برای عصاره گیاه *Artemisia aucheri* نشان داد که MIC و MBC برای باکتری *اشرشیاکولی* به ترتیب برابر ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد که گیاه *Artemisia aucheri* دارای اثرات ضد میکروبی معنی داری بر دو باکتری مورد مطالعه داشته است. بنابراین پیشنهاد می شود جهت استفاده آن در صنعت داروسازی، مطالعات بیشتری روی متابولیتهای ثانویه گیاه انجام شود و با توجه به پتانسیل درمانی گیاه، حمایت قانع کننده ای از آینده آن در استفاده بالینی پزشکی مدرن ارائه می کند.

کلمات کلیدی: *Artemisia aucheri*، اثرات ضد میکروبی، اشرشیاکولی ، استافیلوکوکوس اورئوس

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Investigating the antibacterial effects of the medicinal plant *Artemisia aucheri*

Manijeh Ebrahimi [1*], Fatemeh Daneshmand [2*] Mahbobeh Mirhosseini [2], Fatemeh Nejad Alimoradi [2]

[۱]M.S. in Plant Physiology, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

[۲]Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

[1*]manijehebrahimii@gmail.com

[2*]f.daneshmand@pnu.ac.ir

Abstract

Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* are important pathogenic bacteria that cause a wide range of infections. The increasing use of antibiotics against the infection caused by these bacteria has caused an increase in drug resistance, and this has led to extensive studies on new antimicrobial drugs with greater effectiveness. *Artemisia aucheri* is a plant from the Asteroideae family and it is used in reducing blood fat (triglycerides and LDL-cholesterol) and in the treatment of cardiovascular diseases. The purpose of this study is to investigate the antibacterial effect of *Artemisia aucheri* extract on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. In this study, the extract of the aerial parts of this plant was extracted by the Soxhlet method and the antimicrobial properties of its methanolic extract were investigated using the agar diffusion method and the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the determination of the minimum lethal concentration (MBC) against two bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results of the mean diameter of inhibition zone of *Artemisia aucheri* methanol extract in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 12.46 ± 0.18, 19.36 ± 0.13 mm, respectively. The results of determining MIC and MBC for *Artemisia aucheri* extract showed that MIC and MBC for *Escherichia coli* were equal to 60 and 80 micrograms per milliliter and for *Staphylococcus aureus* bacteria were equal to 20 and 40 micrograms per milliliter. The results showed that the *Artemisia aucheri* had significant antimicrobial effects on the two studied bacteria. Therefore, it is suggested to conduct more studies on the secondary metabolites of the plant in order to use it in the pharmaceutical industry, and considering the therapeutic potential of the plant, it provides convincing support for its future clinical use in modern medicine.

Keywords: *Artemisia aucheri*, antimicrobial effects, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

مقدمه

تغییرات ژنتیکی در باکتری‌ها، مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک، میزان دسترسی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع، شرایط زمانی، مکانی، وضعیت فرهنگی و بهداشتی باعث به وجود آمدن انواعی از این سویه‌های باکتریایی مقاوم شده است. بنابراین با توجه به پیدایش چنین سویه‌های باکتریایی مقاوم به داروهای شیمیایی، تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید ضروری است. در طب سنتی، گیاهان دارویی زمینه‌های جدیدی از تحقیقات دارویی را فراهم می‌کنند. به‌دلیل شناخت روزافزون این موضوع که محصولات طبیعی، غیر سمی با عوارض جانبی کمتر و قابلیت دسترسی راحت‌تر هستند، تقاضا برای داروهای گیاهی، مکمل‌های غذایی، محصولات بهداشتی، دارویی و آرایشی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته در حال افزایش است. طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد جمعیت جهان به طب سنتی داروی گیاهی برای مراقبت‌های اولیه بهداشتی متکی هستند. [۱]. امروزه پژوهش در مورد داروهای جدید گرفته شده از منابع طبیعی به عنوان یک راه سیستماتیک و دارای ارزش استراتژی و اقتصادی در سطح جهان اهمیت خاصی پیدا کرده است. گیاهان و ترکیبات آنها مانند اسانس‌ها و عصاره‌ها دارای پتانسیل قوی جهت جایگزینی به جای داروهای شیمیایی هستند [۲]. از جمله باکتری‌ها پاتوژن می‌توان به *اشرشیاکولی* اشاره کرد که باکتری گرم منفی و متحرک است. این باکتری می‌تواند عامل اسهال، استفراغ‌های ناشی از مسمویت‌های غذایی و همچنین عفونت ادراری است [۳]. از باکتری‌های پاتوژن دیگر *استافیلوکوکوس اورئوس* است. استافیلوکوک‌ها باکتری از خانواده استافیلوکوکاسه ، کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که در همه جا پراکنده بوده و غالبا بر روی پوست و غشاهای مخاطی نیز به فراوانی یافت می شوند [۴]

آرتمیسیا (درمنه) گیاهی متعلق به شاخه گیاهان دانه‌دار، تیره کاسنی (Asteraceae) است. *Artemisia aucheri* (درمنه کوهی) به عنوان گیاه غالب اجتماعات گیاهی در استپ‌های خشک و نیمه خشک است. درمنه کوهی گیاهی پایا، بوته‌ای نیمه چوبی، پر ساقه، به رنگ سبز یا متمایل به زرد به ارتفاع ۲۵ تا ۵۰ سانتی‌متر است که انتشار گسترده‌ای در ایران دارد که غالبا در شیب‌های بالاتر از ۳۰ درصد دیده شده است. چند ساله بودن، مقاومت به سرما، خشکی محیط، خوش‌خوراکی، قابلیت هضم نسبی علوفه، طولانی بودن دوره رشد و امکان بهره‌برداری در فصل‌های پاییز و زمستان با تولید علوفه قابل ملاحظه از نظر کمی ، کیفی و مقاوم بودن در مقابل آفات از دیگر خصوصیات این گیاه است. درمنه کوهی، گیاهی است که ضمن داشتن ارزش علوفه‌ای به دلیل بوی معطر، دارای خواص دارویی است. ۱۷ ترکیب عمده در اسانس این گیاه شناسایی شده است که دارای خاصیت ضد قارچی است. گزارش شده است، اسانس و عصاره گیاه آرتمیسیا (درمنه) دارای اثر ضد انگلی در برابر *تریکوموناس واژینالیس* است. اسانس گیاه به طور معنی‌داری دارای اثر دور کنندگی حشرات بوده و با افزایش غلظت این اثر افزایش می‌یابد. عصاره *Artemisia aucheri* به طور معنی‌داری سطح تری‌گلیسرید، کلسترول تام، کلسترول بد را کاهش و کلسترول خوب را افزایش داده و

سبب کاهش ضایعات آترواسکلروتیک در آئورت می‌شود [۵ و ۶]. با توجه به مطالب ذکر شده در بالا، هدف از این پژوهش، مطالعه میزان اثرات ضد باکتریایی گونه دارویی درمنه کوهی *Artemisia aucheri* جمع آوری شده از استان کرمان، علیه دو باکتری بیماری‌زای گرم منفی و گرم مثبت (اشرشیاکولی و استافیلوکوکوس اورئوس) می باشد.

مواد و روش ها

نمونه ی گیاه دارویی *Artemisia aucheri* (درمنه کوهی) در تیر ماه (مرحله گلدهی و میوه‌دهی کامل) از منطقه سربیژن – ساردوئیه (دامنه‌های کوهستانی و ارتفاع ۲۹۷۵ متری) در ۵۵ کیلومتری شمال شهر جیرفت استان کرمان، جمع‌آوری شدند. شناسایی سیستماتیک گیاهان توسط آقای دکتر سید منصور میرتاج‌الدینی عضو هیات علمی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. قسمت های هوایی گیاهان با آب مقطر استریل شسته و گیاه در سایه خشک شده ، به صورت پودر در آمد و عصاره متانولی گیاه با روش سوکسله تهیه گردید.

بررسی خاصیت ضد میکروبی

جهت انجام تست آنتی‌بیوگرام به منظور بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه *Artemisia aucheri* علیه دو باکتری *اشرشیاکولی* (گرم منفی) با کد PTCC 1394 و *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) با کد PTCC 1431، ابتدا محیط مولرهینتون آگار ساخته شد. از کدورت ۰/۵ مک فارلند باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته و بر روی محیط مولرهینتون‌آگار ریخته شد. سپس با استفاده از سواب، باکتری کاملا در محیط به طور یکنواخت پخش و کشت داده شد..

در مرحله بعد دیسک‌های حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره متانولی *آرتمیسیا اوشری* بر روی محیط کشت حاوی باکتری با فاصله ۱۲ میلی‌متر از یک دیگر قرار گرفتند. سپس پلیت‌های کشت در داخل انکوباتور گرم خانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد قطر هاله عدم رشد ایجاد شده با استفاده از خط کش بر اساس میلی‌متر گزارش شد.

بررسی حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری‌های مورد آزمون

از عصاره‌ی گیاهی مورد نظر، غلظت‌های ۵ تا ۲۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در حلال DMSO تهیه شد. سپس به هر لوله آزمایش که حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث استریل است، ۱ میلی‌لیتر از هر غلظت اضافه شد و در نهایت به تمامی لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از کدورت ۰/۵ مک فارلند باکتری اضافه شد. لوله‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس لوله‌ای که دارای کمترین کدورت باکتریایی است به عنوان MIC درنظر گرفته شد [۷].

در تعیین MBC (حداقل غلظت کشنده باکتری)، از غلظت MIC و غلظت‌های قبل و بعد آن جداگانه کشت داده می‌شود و غلظتی که در آن باکتری رشد نکرد غلظت MBC است [۸]

آنالیز آماری

آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد و اثرات ضد میکروبی *Artemisisa aucheri* در برابر باکتری *اشرشیاکولی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شدند. میانگین‌های به دست آمده با استفاده از T-testدر سطح احتمال ۵درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره متانولی *Artemisia aucheri* در مقابل دو باکتری *اشرشیاکولی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در سه تکرار بررسی شد. بر اساس نتایج مشخص شد میانگین قطر هاله عدم رشد در *اشرشیاکولی* برابر با ۰/۱۸ ±۱۲/۴۶ میلی‌متر و در *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۰/۱۳ ±۱۹/۳۶ میلی‌متر بوده است که این نتیجه در *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر است. (جدول ۱). حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) دو باکتری مورد آزمون توسط عصاره متانولی *آرتمیسیا اوشری* با استفاده از روش براث بررسی شد.

حداقل غلظت بازدارندگی از رشد *اشرشیاکولی* در غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی *Artemisia aucheri* و حداقل غلظت کشندگی آن برابر با ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد آن در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی *Artemisia aucheri* و حداقل غلظت کشندگی آن برابر با ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است (جدول ۲ و ۳).

جدول ۱-قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره متانولی *Artemisia aucheri* (2 mg/Disk) در برابر باکتری *اشرشیاکولی* و استافیلوکوکوس اورئوس (مقایسه میانگین ها با T-test صورت گرفت و حروف انگلیسی غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد

تکرار	قطر هاله عدم رشد بر اشرشیاکولی (میلی متر)	قطر هاله عدم رشد بر استافیلوکوکوس اورئوس (میلی متر)
تکرار ۱	۱۲/۱	۱۹/۵
تکرار ۲	۱۲/۶	۱۹/۱
تکرار ۳	۱۲/۷	۱۹/۵
میانگین	b۱۲/۴۶	a۱۹/۳۶
انحراف استاندارد	۰/۳۲	۰/۲۳
خطای استاندارد	۰/۱۸	۰/۱۳

جدول ۲- نتایج MIC و MBC باکتری *اشرشیاکولی* توسط عصاره متانولی *Artemisia aucheri*

غلظت عصاره (میکروگرم در میلی لیتر)	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰	۱۶۰	۱۸۰	۲۰۰	۲۲۰	۲۴۰	۲۶۰
MIC	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBC					+	-									

کدورت ++ : کدروت زیاد - : عدم کدورت

جدول ۳- نتایج MIC و MBC باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط عصاره متانولی *Artemisia aucheri*

غلظت عصاره (میکروگرم در میلی لیتر)	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰	۱۶۰	۱۸۰	۲۰۰	۲۲۰	۲۴۰	۲۶۰
MIC	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBC			+	-											

کدورت ++ : کدروت زیاد - : عدم کدورت

بحث

فرآورده‌های گیاهی در درمان بسیاری از انواع اختلالات در تمدن‌های دوران باستان استفاده می‌شده است. در واقع، محصولات طبیعی شامل طیف گسترده‌ای از ترکیبات فعال بیولوژیکی به دست آمده از منابع طبیعی مانند گیاهان، قارچ ها و موجودات دریایی هستند. در نتیجه، حدود ۳۵ درصد از داروهای موجود در

بازار مستقیماً از منابع طبیعی جداسازی شده‌اند [۹].

استفاده گسترده از داروهای با منشاء صنعتی و نیز استفاده نادرست از این داروها موجب بروز عوارض جانبی زیادی خواهد شد که گاهی اثرات سمی حاصل جدی‌تر از خود بیماری‌ها خواهند بود. یک روش برای جلوگیری از ایجاد پدیده مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده از ترکیبات جدیدی هستند که به لحاظ ساختمان پایه‌ای با داروهای ضد میکروبی با منبع صنعتی موجود تفاوت دارند. به واسطه افزایش بروز مشکل مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نیاز اکید به دستیابی به داروهای ضد باکتریایی جدید وجود دارد و از میان منابع بالقوه داروهای گیاهان از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند. گیاه آرتمیسیا از جمله گیاهان بوته‌ای است که همانند بوته‌زارهای دنیا، مراتع قابل توجهی را در ایران تشکیل می‌دهد [۱۰].

با توجه به اثرات فارماکولوژیکی گونه گیاهی (*Artemisia aucheri*) و همچنین گسترش مصرف گیاهان دارویی در درمان خیلی از بیماری‌ها و عفونت‌ها با هدف کاهش استفاده از داروهای شیمیایی و مضرات ناشی از آن مصرف آن‌ها، در این پژوهش به بررسی خاصیت ضد میکروبی گیاه با استفاده از روش انتشار در آگار پرداخته شده است. نتایج نشان داد میانگین قطر هاله عدم رشد با خطای استاندارد در باکتری *اشرشیاکولی* برابر با ۰/۱۸ ±۱۲/۴۶ میلی‌متر و در *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۰/۱۳ ±۱۹/۳۶ میلی‌متر بود که این نتیجه در *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر است. با توجه به مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون T-test مشخص شد اثر گونه آرتمیسیا بر باکتری *اشرشیاکولی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند. حداقل غلظت مهار کننده از رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری، حداقل غلظت بازدارنده از رشد *اشرشیاکولی* در غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن برابر با ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توسط گیاه *Artemisia persica* بود که به ترتیب در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*، این میزان برابر با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

با توجه به نتایج به دست آمد مشخص شد تاثیر عصاره‌ی گیاهی هم در بررسی قطر هاله عدم رشد و هم در بررسی حداقل غلظت بازدارنده از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر بوده است که این می‌تواند به علت ترکیبات دیواره این باکتری که باکتری گرم مثبت است برگردد. دیواره باکتری‌های گرم منفی مانند *اشرشیاکولی* به دلیل نوع دیواره‌ای که دارند نسبت به عصاره‌های گیاهی مقاوم‌تر هستند.

در پژوهش امینیان و همکاران (۱۳۹۶) اثر ضد باکتریایی عصاره چند گیاه را بررسی کردند و نتایج نشان داد عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت تاثیر بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشتند و علت را تفاوت دیواره در دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت بیان کردند [۱۱]. محبوبی و قاشیان بیدگلی (۱۳۸۸) مشخص کردند اسانس گیاه *Artemisia aucheri* دارای اثرات ضد قارچی می باشد و همچنین روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت اثر می‌گذارد که تاثیر آن بر روی باکتری گرم مثبت بیشتر بوده است [۵]. مشابه با نتایج حاضر، Mojtahed zadeh asl و همکاران در سال ۲۰۱۸ نیز ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی عصاره *Artemisia aucheri* را بر روی برخی باکتری گرم مثبت، گرم منفی و یک مخمر بررسی کردند. نتایج نشان از تاثیر بهتر عصاره گیاه بر باکتری‌های گرم مثبت بوده است [۱۲].

نتیجه گیری

تاثیر عصاره‌ی گیاهی *Artemisia aucheri* چه در بررسی قطر هاله عدم رشد و همچنین در بررسی حداقل غلظت بازدارنده از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر بوده است که این می‌تواند به علت ترکیبات دیواره این باکتری که باکتری گرم مثبت است برگردد.

منابع

[1], Verma, N., Jha, K. K., Chaudhary, S., Singh, O., & Kumar, A. (2014). Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of Leptadenia pyrotechnica-An important medicinal plant. Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research, 2(1), 128-134.

[۲]، روحی س، رمضان‌زاده ر، محمدی ش، عبدالهی آ، شکیب پ، محمدی ب، احمدی ا. ۱۳۹۹. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره آبی و الکلی برگ درمنه کوهی و جلبک سبز –آبی اسپیرولینا بر باکتری *کلبسیلا پنمونیه* با مقاومت دارویی چندگانه شده شده از بیمار با عفونت پنومونی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، ۲۵: ۱۲۴-۱۳۹.

[۳]. نظام‌آبادی و، اخگر م، تهامی‌پور ب، رجایی پ. ۱۳۹۹. تهیه نانوالیاف کامپوزیتی زیست سازگار پلی‌وینیل الکل حاوی عصاره درمنه کوهی با خواص آنتی‌باکتریال مطلوب. مجله علمی پژوهشی نانومواد، ۱۲(۴۲): ۱۲۳-۱۳۵.

[۴]، رحیم‌خانی م، مردادی ع. ۱۴۰۰. بررسی اثر کشندگی سیپروفلوکسازین و محلول رویی جدا شده از *استافیلوکوکوس اورئوس* متاثر از سیپروفلوکسازین بر روی سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های کلینیکی. مجله پیاورد سلامت، ۱۵(۶): ۵۷۸-۵۸۴.

[۵] ، محبوبی م، قاضیان بیدگلی ف. ۱۳۸۸. بررسی ترکیب شیمیایی و خاصیت ضد میکروبی اسانس Artemisia aucheri Boiss. نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۵(۳): ۴۲۹-۴۴۰.

[۶]، عیسوند ح، لطیفی‌نیا ا. ۱۳۹۹. بررسی تاثیر هیدروپرایمینگ و امواج فراصوت بر جوانه‌زنی و نشت مواد از بذر درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* L.). علوم و تحقیقات بذر ایران، ۷(۲): ۱۷۹-۱۹۰.

[۷]، نیاکان م، عطار پوریزدی ع، صفایی قمی ج، خالویی م، جعفری ز. ۱۳۹۰. اثر عصاره متانولی گیاه درمنه ایرانی (Artemisia persica) بر سنتتیک رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس*. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۰(۴): ۱۳۹-۱۴۵.

[8], Naghsh A, Mohammadi Sichani M, Amjad L. 2015. Antibacterial activity of the essential oil of artemisiadeserti flowers against some pathogenic bacteria. Qom Univ Med Sci, 8(S1):57 64. [In Persian]

[9], Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. Nature reviews Drug discovery, 20(3): 200-216.

[۱۰]، حکیمی‌زاده ا، بنی‌اسدی‌پور ه، رضازاده ح، انصاری جابری ع، مشایخی ن، اسماعیلی م، نژادحسن ر، امین ف. ۱۳۹۲. بررسی اثر عصاره آبی –الکلی گیه درمنه بر سمیت کلیوی ناشی از کلرید جیوه دو ظرفیتی در موش سفید کوچک آزمایشگاهی. مجله علمی پزشمی قانونی، ۱۹(۲و۳): ۲۴۳-۲۵۰.

[۱۱]، امینیان ر، مردانی م، داودنیا ب. ۱۳۹۶. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکی بارهنگ کبیر و ناخنک بر تعدادی باکتری گرم منفی و گرم مثبت. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۱(۳): ۵۵۶-۵۶۷.

[12], Mojtahed zadeh asl R, Niakousari M, Gahruie H, Saharkhiz M. 2018. Study of two-stage ohmic hydro-extraction of essential oil from *Artemisia aucheri* Boiss.: Antioxidant and antimicrobial characteristics. Food Research International, 107: 462-469

مروری بر کاربرد برخی از نانوذرات در سیستم های دارویی نوین

نگار عرب مارکده[1*] ، مریم مودی[2] ، محمد حسین صیادی [3]

*۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی (گرایش صنعت و محیط زیست)،دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه بیرجند negar.arab_markade@birjand.ac.ir

۲- استادیار گروه زیست شناسی ،دانشکده علوم ،دانشگاه بیرجند maryammoudi@birjand.ac.ir

۳- دانشیار گروه محیط زیست ،دانشکده منابع طبیعی ومحیط زیست،دانشگاه بیرجند mh_sayadi@birjand.ac.ir

چکیده

با گسترش جوامع و پیشرفت تکنولوژی امروزه می توان با استفاده از نانوذرات بسیاری از بیماری ها را شناخت و یا حتی می توان با استفاده از این ذرات برخی از بیماری ها از جمله ی سرطان را بهبود بخشید .نانوذرات به عنوان یک ابزار مهم در سیستم های دارویی نوین شناخته شده اند و به دلیل ویژگی های بی شماری که دارند، می توانند به عنوان یکی از ابزارهای مؤثر در سیستم های دارویی استفاده شوند. سیستم دارو رسانی با استفاده از نانوذرات به معنی رساندن دارو از طریق فناوری نانو با کمترین خطر ممکن است. از جمله مزیت های استفاده از نانوذرات در سیستم های دارویی نوین می توان به افزایش بیوافینیتی[1]، کاهش سمیت و افزایش دقت در تحریک واکنش بیمار اشاره کرد. نانوذرات می توانند به عنوان یک وسیله برای افزایش مقاومت در برابر فعالیت های آنزیم ها و افزایش زمان عمر دارو در بدن به کار روند. همچنین، می توانند به عنوان واسطه ای برای تحویل دقیق دارو به محل هدف در بدن عمل کنند. در این مقاله به بررسی و مطالعه ی کاربرد برخی نانوذرات در سیستم های دارویی نوین و مزایا و معایب که این سیستم در جوامع دارد پرداخته می شود .روش کار در این مقاله مروری و بر اساس مطالعات استنادی می باشد.

کلید واژگان: نانوذرات،سیستم های دارویی ، نانوتکنولوژی،دارو

[1] Bio affinity

An overview of the use of some nanoparticles in modern pharmaceutical systems

Negar Arab Markadeh[1*], Maryam Moudi[2], Mohammad Hossein Sayadi[3]

*1- MSc student in biotechnology (industry and environment), Univercity of Birjand

negar.arab_markade@birjand.ac.ir

2- Assistant Professor, Faculty of Science- Department of Biology- University of Birjand,

maryammoudima@birjand.ac.ir

3- Associate Professor, Faculty of Natural Resources and Environment- Department of Environment,Univercity of Birjand

mh_sayadi@birjand.ac.ir

Abstract

With the expansion of society and the advancement of technology, nowadays many diseases can be recognized by using nanoparticles, or even some diseases, including cancer, can be cured by using these particles. Nanoparticles as an important tool in systems They are known as new drugs and because of their countless features, they can be used as effective tools in pharmaceutical systems. temsys delivery drug nanoparticle A means drug delivery through nano technology with the least possible risk. Among the advantages of using nanoparticles in modern pharmaceutical systems, we can mention increasing affinity bio, reducing toxicity, and increasing precision in stimulating the patient's reaction. Nanoparticles can be used as a means to increase resistance to enzyme activities and increase the lifetime of drugs in the body. Also, they can act as a mediator for accurate drug delivery to the target site in the body. This article examines and studies the use of some nanoparticles in modern pharmaceutical systems and the advantages and disadvantages of this system in societies. The work method in this article is a review based on reference studies.

Keywords: nanoparticles, pharmaceutical systems, nanotechnology, medicine

مقدمه

استفاده از نانوذرات در سیستم های دارویی ، به عنوان یک روش جدید، در دهه های اخیر گسترش یافته است. اولین بار که از نانوذرات در دارو رسانی استفاده شد، به دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد که داروی دیگوکسین[1] با استفاده از نانوذرات طلا تولید شد و در دهه های بعد از آن شاهد پیشرفت قابل توجهی در این سیستم شدیم. در دهه ۱۹۹۰، تحقیقات بیشتری بر روی نانوذرات در دارو رسانی صورت گرفت و اولین داروی نانوذرات با نام Abraxane[2] برای درمان سرطان شکمی تأیید شد. این دارو شامل نانوذرات آلبومین پیشرفته است که باعث افزایش جذب دارو توسط سلول‌های سرطانی می‌شود [1].

نانوذرات به عنوان ابزاری برای انتقال دارو یا تحریک واکنش در بدن، در سیستم های دارویی استفاده می شوند. با اندازه کوچک و سطح بالای خود، این ذرات می توانند به طور دقیق به بافت هدف وارد شوند و دارو را به صورت مستقیم به این محل تحویل دهند. به علاوه، نانوذرات می توانند به عنوان حامل‌های دارویی برای داروهایی که به طور معمول در بدن قابل جذب نیستند، به کار روند. با توجه به اینکه نانوذرات قابلیت کاهش دوز دارو و کاهش تعداد دفعات مصرف دارو را دارند، می تواند سبب بهبود درمان و کاهش اثرات جانبی دارو در بدن شود. با این حال، برخی مشکلاتی مانند سمیت، عدم تطابق با سیستم ایمنی بدن، مشکلات تولید و قیمت بالای نانوذرات نیز وجود دارد که باید در استفاده از آنها به دقت مورد توجه قرار گیرد[2].

در دهه‌های اخیر، تحقیقات بسیاری در زمینه ناوذرات انجام شده است که به واسطه ابعاد بسیار کوچکی که دارند، به عنوان یکی از فناوری‌های پیشرفته در بسیاری از صنایع مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از کاربردهای مهم نانوتکنولوژی، در زمینه سیستم‌های دارویی نوین است که با استفاده از نانوذرات سعی در بهبود روش‌های درمانی و کاهش عوارض جانبی مربوط به داروها دارند[3].

در دنیای علم و صنعت، نانوذرات به عنوان یکی از جدیدترین دستاوردهای فناوری نانو، جایگاه خاصی را در بسیاری از حوزه‌های علمی و صنعتی پیدا کرده‌اند، از جمله در سیستم دارویی نوین. نانوذرات به دلیل اندازه کوچک آن‌ها و خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی که دارند، خصوصیاتی را از خود نشان می‌دهند که در ذرات بزرگ‌تر وجود ندارد. برخی از کاربردهای نانوذرات در سیستم دارویی نوین شامل افزایش حلالیت دارو، افزایش جذب دارو، کاهش اثرات جانبی دارو و رساندن دارو به محل مورد نیاز در بدن می‌باشد [4]. سیستم‌های دارویی نوین با استفاده از نانوذرات، اجازه می‌دهند که دارو به صورت مستقیم و در نقطه دقیق موردنیاز در بدن تحویل داده شود[5]. در این مقاله تلاش شده است تا تعریفی از نانوذرات و کاربرد برخی از آن ها در سیستم های دارویی با استناد به مقالات مورد بحث و بررسی قرار بگیرند .

[1] Digoxin
[2] Nanoparticle albumin–bound paclitaxel

نانوذرات

نانوذرات به ذراتی گفته می‌شوند که اندازه آن‌ها در محدوده ۱تا۱۰۰ نانومتر می باشد. در واقع خصوصیاتی را از خود نشان می‌دهند که در ذرات بزرگ‌تر وجود ندارد. این خصوصیات شامل سطح بیشتر، فعالیت کاتالیستی بیشتر، توانایی نفوذ به بافت‌های بدن و... می‌باشد[6]. آن ها می توانند از مواد مختلفی مانند فلزات، سرامیک، پلیمرها و لیپیدها ساخته شوند. نانوذرات به دلیل اندازه کوچک خود دارای خواص منحصر به فردی مانند نسبت سطح به حجم زیاد هستند که می تواند منجر به افزایش واکنش پذیری، بهبود حلالیت و افزایش خواص نوری و مغناطیسی شود[7]. این ذرات را می‌توان طوری مهندسی کرد که خواص و عملکردهای خاصی برای کاربردهای مختلف از جمله دارورسانی، تصویربرداری، سنجش و تولید انرژی داشته باشند. به عنوان مثال، در دارورسانی، از نانوپارتیکل[1] می توان به عنوان حامل برای رساندن دارو به سلول ها یا بافت های خاص بدن استفاده کرد و در عین حال آسیب به سلول ها و بافت های سالم را به حداقل رساند. در تصویربرداری، از نانوذرات می توان به عنوان ماده کنتراست[2] برای افزایش دید ساختارها یا بافت های خاص در بدن استفاده کرد. در تولید انرژی می توان از نانوذرات به عنوان کاتالیزور برای افزایش کارایی واکنش های شیمیایی استفاده کرد[8]. به عنوان مثال، نانوذرات نقره به دلیل توانایی آن‌ها در کشتن باکتری‌ها و ویروس‌ها، در تهیه محصولات ضدعفونی کننده مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین، نانوذرات طلا به دلیل رنگ طلایی و خواص ویژه ای که دارند، در تهیه جواهرات و در تحقیقات پزشکی و بیوشیمی کاربرد های زیادی دارند [9].

این ذرات نانو به دلیل ویژگی‌هایی که دارند، در بسیاری از حوزه‌های علمی و صنعتی، از جمله در داروسازی، الکترونیک، برق، مکانیک ،شیمی، زیست‌شناسی و... مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از نانوذرات در این حوزه‌ها، باعث بهبود عملکرد و کارایی محصولات می‌شود[10] . نانوذرات در سیستم دارویی نوین به صورت مختلفی مانند نانوذرات پلیمری، نانوذرات فلزی، نانوذرات سیلیکاتی، لیپوزوم‌ها و میسل‌ها طراحی و ساخته می‌شوند [11].

نحوه ساخت نانوذرات نیز به شکل‌های متنوعی می باشد، از جمله روش‌های شیمیایی، فیزیکی، بیولوژیکی و ترکیبی. به همین دلیل، ساخت نانوذرات به دلیل دشواری‌های فنی و تعداد زیاد تلاش‌های تحقیقاتی، به چالش‌هایی برای سازمان‌ها و افراد فعال در حوزه داروسازی تبدیل شده است[12].

[1] Nanoparticle
[2] Contrast

کاربرد های نانوذرات در دارو رسانی

کارایی این ذرات در صنایع مختلف بسیار می باشد که یکی از این صنایع،صنعت داروسازی است.با کمک نانوذرات می توان به بهبود برخی از بیماری ها از جمله ی کم خونی ،آرتریت روماتوئید ،سرطان پروستات و .... کمک کرد .در زیر برخی از کاربردهای نانوذرات در دارو رسانی مورد بررسی قرار گرفته اند[13].

۱- افزایش حلالیت دارو

در بسیاری از موارد، داروهایی که برای درمان بیماری ها استفاده می‌شوند، از جمله داروهایی هستند که در آب و یا محلول‌های آبی، حل نمی‌شوند. در این حالت، با استفاده از نانوذرات، حلالیت دارو در آب و یا محلول‌های آبی بیشتر می‌شود و روش‌های دیگری برای اعمال دارو به بیماری مورد نظر نیاز نیست. افزایش حلالیت دارو یکی از مشکلاتی است که در دارو رسانی مطرح می‌شود. با این حال، با استفاده از نانوذرات، می‌توان این مشکل را حل کرد[14] .

یکی از روش‌هایی که برای افزایش حلالیت دارو با استفاده از نانوذرات مورد استفاده قرار می‌گیرد، استفاده از نانوذرات پلیمری است. در این روش، دارو درون نانوذرات پلیمری جای می‌گیرد و به دلیل ویژگی‌های خاصی که این نانوذرات دارند، حلالیت دارو افزایش می‌یابد. برای مثال، در یک تحقیق، با استفاده از نانوذرات پلیمری پلی‌استیرن [۱] برای حلالیت داروی کربامازپین [۲] استفاده شد. نتایج نشان داد که با استفاده از این نانوذرات، حلالیت دارو به شدت افزایش یافت[15] .

روش دیگر استفاده از نانوذرات خاکستری سیلیکاست. در این روش، دارو درون نانوذرات خاکستری سیلیکا قرار می‌گیرد که به دلیل سطح بیشتری که این نانوذرات دارند، حلالیت دارو به شدت افزایش می‌یابد. در یک آزمایش، خاکستری سیلیکا برای حلالیت داروی فنی توئین [۳] استفاده شد که نتایج بدست آمده نشان داد که باعث افزایش حلالیت دارو می شود [16] .

با وجود اینکه استفاده از نانوذرات در سیستم های دارویی جدید بسیار مؤثر است، اما برخی مشکلات مانند سمیت و عدم تطابق با سیستم ایمنی بدن وجود دارد که باید در بکار گیری از آن ها به دقت مورد توجه قرار گیرد. [17].

[1] Polystyrene polymer nanoparticles
[2] Carbamazepine
[3] Phenytoin

۲- افزایش جذب دارو

نانوذرات به دلیل اندازه ای که دارند ، می‌توانند به راحتی به بافت‌های بدن نفوذ کرده و دارو را به خوبی در آنجا آزاد کنند. پس می توان نتیجه گرفت با استفاده از نانوذرات، جذب دارو توسط بافت‌های بدن بیشتر می شود، به گونه ای که می‌توانند به بخش‌های مختلف بدن دسترسی داشته باشند با توجه به اینکه بسیاری از داروها به دلیل خصوصیات شیمیایی خود، قابلیت حل در آب و یا محلول‌های آبی را ندارند، استفاده از نانوذرات می‌تواند حلالیت دارو را در آب و یا محلول‌های آبی افزایش دهد و از این طریق جذب دارو توسط بافت‌های بدن را افزایش دهد [18] . استفاده از نانوذرات طلا در این روش بسیار مرسوم می باشد . در این روش، دارو درون نانوذرات جای می‌گیرد. در یک تحقیق، با استفاده از این نانوذرات برای جذب داروی پلاتین[1] در درمان سرطان استفاده شد. نتایج نشان داد که با استفاده از این نانوذرات، جذب دارو توسط بافت‌های بدن به شدت افزایش یافت و یا می توان با استفاده از نانوذرات طلا بیماری های زیادی از جمله ی سرطان پروستات را بهبود بخشید[19] . استفاده از نانوذرات لیپوزومی روش دیگری است که می توان برای افزایش جذب دارو از آن بهره برد. در این روش، دارو درون نانوذرات لیپوزومی جای می‌گیرد و جذب انجام می شود. آزمایش دیگری با استفاده از نانوذرات لیپوزومی برای جذب داروی پاکلی‌تاکسل[2] در درمان سرطان انجام گرفت که نتایج بدست آمده از این آزمایش نوید بخش این موضوع بود که اثر این دارو بر بدن کامل بوده و بهبودی در این بیماری دیده می شود[20].

نانوذرات آهن در درمان بیماری بتا تالاسمی نقش مهمی را ایفا می کنند. در این بیماری، کمبود هموگلوبین در بدن باعث کاهش اکسیژن رسانی به انواع اندام‌ها و بافت‌ها می‌شود. یکی از روش‌های درمانی این بیماری، تزریق هموگلوبین به بیمار می‌باشد. برای حل این مشکل، نانوذرات آهن به عنوان حامل دارو در درمان بتا تالاسمی استفاده می‌شود. این ذرات اندازه‌ی کوچکی دارند و به‌سادگی وارد سلول‌های خونی می‌شوند و در آنجا با هموگلوبین ارتباط برقرار می‌کنند. به این ترتیب، با استفاده از این نانوذرات، میزان هموگلوبین مورد نیاز برای جذب به خون کاهش یافته و عوارض جانبی کاهش می‌یابد[21].

۳-کاهش اثرات جانبی دارو

استفاده از نانوذرات، می‌تواند به کاهش اثرات جانبی دارو کمک کند. به عنوان مثال، در صورتی که دارویی برای درمان بیماری مورد نظر دارای اثرات جانبی شدیدی است، می‌توان با استفاده از نانوذرات، دارو را به گونه ای فرآوری کرد که این اثرات جانبی کمتر و یا حتی ناچیز شود. یکی از روش‌هایی که برای کاهش

[1] Platinum
[2] Paclitaxel

اثرات جانبی دارو با استفاده از نانوذرات مورد استفاده قرار می‌گیرد، استفاده از نانوذرات نقره است. در این روش، دارو درون نانوذرات نقره جای می‌گیرد و به دلیل ویژگی‌هایی که این نانوذرات دارند، اثرات جانبی دارو کاهش می‌یابد. برای مثال، با استفاده از نانوذرات نقره برای کاهش اثرات جانبی داروی سولفادیازین[1] استفاده شد.نتایج بدست آمده نشان داد که نانوذرات نقره با کارایی بالا می توانند کاهش اثرات جانبی را بر روی بدن داشته باشند [22] .در یک تحقیق دیگر، با استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم برای کاهش اثرات جانبی داروی دوکسوروبیسین[2] در درمان سرطان سینه استفاده شد. نتایج نشان داد که با استفاده از این ذرات، اثرات جانبی دارو به شدت کاهش یافته است[23]. با استفاده از نانوذرات بیماری‌های التهابی مثل آرتریت روماتوئید[3] را می توان درمان کرد . برای درمان این بیماری، اغلب از داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی (NSAIDs)[4]استفاده می‌شود. با این حال، این داروها ممکن است عوارض جانبی مانند درد شکمی، تهوع، افزایش خونریزی و ... داشته باشند. برای کاهش این عوارض جانبی، نانوذرات به عنوان حامل دارو در درمان بیماری‌های التهابی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نانوذرات به دلیل اندازه کوچکشان، قابلیت ورود به بافت‌های مختلف بدن را دارند و باعث می‌شوند که دارو به صورت موضعی و در محدوده‌ی تحریک التهابی عمل کند، در حالی که اثرات جانبی آن را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، برخی نانوذرات دارای خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که باعث افزایش اثر درمانی داروها می‌شوند.[24]

۴-رساندن دارو به محل مورد نیاز

رساندن دارو با استفاده از نانوذرات یکی از کاربرد های مهم این مواد می باشد.رساندن دارو به محل مورد نظر در بدن با استفاده از نانوذرات، روشی نوین در درمان بیماری‌هاست که به کمک آن داروها به صورت موضعی و در ناحیه‌ی خاصی از بدن عمل می‌کنند. نانوذرات به دلیل اندازه‌ی کوچکشان، می‌توانند به‌راحتی از رگ‌های خونی عبور کرده و به سرعت به محل مورد نظر رسیده و دارو را به‌صورت موضعی و در ناحیه‌ی خاصی از بدن آزاد کنند. همچنین، نانوذرات می‌توانند با توجه به خواص ویژه‌ی خود، به راحتی به سطح سلولی مورد نظر متصل شوند و دارو را به داخل سلول‌ها منتقل کنند. برخی از موارد کاربردی نانوذرات در درمان بیماری‌های مختلف شامل سرطان، بیماری‌های التهابی، بیماری‌های قلبی-عروقی و ... می‌باشد [25] .

یکی از کاربردهای مهم نانوذرات در سیستم های دارو رسانی، استفاده از آن‌ها برای رساندن دارو به محل مورد نیاز در بدن است. به عنوان مثال، در درمان سرطان، نانوذرات می‌توانند به سلول‌های سرطانی متصل شوند و دارو را به داخل سلول‌ها منتقل کنند. این روش باعث کاهش اثرات جانبی دارو و افزایش کارایی آن

[1] Sulfadiazine
[2] Doxorubicin
[3] Rheumatoid arthritis
[4] Nonsteroidal anti-inflammatory drug

می‌شود همچنین، استفاده از نانوذرات در تحریک سامانه ایمنی بدن، می‌تواند به بهبود درمان بیماری‌هایی مانند سرطان و بیماری‌های التهابی کمک کند[26] .

آزمایشات انجام شده نشان داده است که نانوذرات لیپوزومی در درمان بیماری‌های قلبی-عروقی نقش مهمی را دارا می باشند. در این روش، نانوذرات لیپوزومی به عنوان حامل دارو استفاده می‌شوند. این نانوذرات، که شامل یک لایه‌ی چربی هستند که می‌توانند دارو را درون خود جذب کنند و به محل مورد نیاز برسانند. در بیماری‌های قلبی-عروقی، جریان خون به دلیل انسداد عروق، کاهش می‌یابد و این مسئله باعث کاهش عملکرد قلب می‌شود. با استفاده از نانوذرات لیپوزومی، دارو به محل انسداد رسانده می‌شود و باعث بهبود جریان خون و کاهش اثرات بیماری می‌شود. علاوه بر این، نانوذرات لیپوزومی دارای خواص سطحی مناسبی برای تعامل با سلول‌های قلبی هستند و می‌توانند باعث افزایش جذب دارو توسط سلول‌های قلبی شوند. همچنین، ترکیبات دیگری مانند پپتیدها و آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به نانوذرات لیپوزومی اضافه شوند تا باعث افزایش دقت در رساندن دارو به محل مورد نیاز شوند[27].

یکی از مثال‌های کاربردی در این بخش استفاده از نانوذرات فلوئوروکربن در درمان بیماری‌های التهابی می‌باشد. در این روش، نانوذرات فلوئوروکربن به عنوان حامل دارو استفاده می‌شود. این نانوذرات، به دلیل اندازه کوچکشان، قابلیت ورود به بافت‌های مختلف بدن را دارند و به محل مورد نظر در بدن رسیده و دارو را به صورت موضعی آزاد می کنند. با استفاده از نانوذرات فلوئوروکربن، دارو به محل مورد نظر در بدن رسانده می‌شود و تاثیر موضعی دارو بر روی بافت مربوطه افزایش می‌یابد. نانوذرات فلوئوروکربن دارای خواص سطحی مناسبی برای تعامل با سلول‌های التهابی هستند و می‌توانند باعث افزایش جذب دارو توسط این سلول‌ها شوند. همچنین، ترکیبات دیگری مانند پپتیدها و آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به نانوذرات فلوئوروکربن اضافه شوند تا باعث افزایش دقت در رساندن دارو به محل مورد نیاز شوند[28] .

مزایا و معایب استفاده از نانوذرات

همانطور که گفته شد نانوذرات از مزایای بسیاری برای بدن برخوردار هستند. که از جمله ی آنها میتوان به افزایش بیو افینیتی یعنی استفاده از نانوذرات که دارو را به صورت مستقیم به محل هدف تحویل داده می دهند و از اثرات جانبی آن در سایر اعضای بدن می کاهند، [29]کاهش اثر سمیت دارو بر بدن[30] ، افزایش دقت در تحریک واکنش در بدن فرد بیمار [31]و افزایش کارایی و زمان عمر دارو اشاره کرد [32].

معایبی که این نوع از سیستم ها می توانند بر روی بدن از خود به جای بگذارند از جمله ی مسائل مربوط به سمیت بر روی بدن ،عدم تطابق با سیستم ایمنی بدن، مشکلات تولید در مقیاس بالای این نوع از نانوذرات و قیمت بالای نانوذرات میتوان اشاره کرد [33].

کاهش هزینه های درمان با استفاده از نانوذرات

استفاده از نانوذرات در سیستم های دارویی می‌تواند به کاهش هزینه های درمانی کمک کند. در واقع، استفاده از نانوذرات می‌تواند به طراحی دارویی با کارایی بالا و کمترین تاثیر جانبی منجر شود که این بهبود کارایی دارو و کاهش تعداد مراجعات و هزینه‌های درمانی را در پی دارد. به عنوان مثال، استفاده از نانوذرات در سیستم های دارویی می‌تواند به کاهش مصرف دارو و تعداد مراجعات بیمار منجر شود. همچنین، با استفاده از نانوذرات، می‌توان دارو را به طور دقیق‌تر و به محل مورد نیاز در بدن رساند که این کاهش تعداد دوزها و مدت زمان درمان را به دنبال دارد و در نتیجه هزینه‌های درمانی را کاهش می‌دهد. همچنین، استفاده از نانوذرات می‌تواند به بهینه‌سازی فرآیند تولید دارو و کاهش هزینه‌های تولید دارو منجر شود. به دلیل اینکه نانوذرات در حجم کوچک تولید می‌شوند، می‌توان از مواد اولیه کمتری استفاده کرد و در نتیجه هزینه‌های تولید دارو را کاهش داد [34].

با افزایش دقت در رساندن دارو به محل مورد نظر، می‌توان به کاهش مقدار داروهای مصرفی نیاز داشته و هزینه‌های درمان را کاهش داد .علاوه بر این، نانوذرات می توانند با بهبود کارایی توسعه و آزمایش دارو، به کاهش هزینه های مراقبت های بهداشتی کمک کنند. روش‌های تولید و آزمایش داروی سنتی می‌تواند زمان‌بر و پرهزینه باشد و اغلب به منابع و بودجه زیادی نیاز دارد. با این حال، نانوذرات را می توان برای رساندن داروها به سلول ها یا بافت های خاص مورد استفاده قرار داد و به محققان این امکان را می دهد که کارایی و ایمنی داروهای جدید را در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی با دقت بیشتری ارزیابی کنند. این روش می تواند به ساده سازی فرآیند توسعه دارو، کاهش زمان و منابع مورد نیاز برای عرضه داروهای جدید به بازار و در نهایت کاهش هزینه های مراقبت های بهداشتی کمک کند [35] .

نتیجه گیری

با توجه به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاصی که نانوذرات دارند، استفاده از آن‌ها در سیستم های دارویی نوین می‌تواند به بهبود عملکرد دارو و کاهش اثرات جانبی آن کمک کند. کاربردهای نانوذرات در سیستم دارویی شامل افزایش حلالیت دارو، افزایش جذب دارو، کاهش اثرات جانبی دارو، رساندن دارو به محل مورد نیاز در بدن و تحریک سامانه ایمنی بدن است. با استفاده از تکنولوژی نانو، می‌توان برای درمان بیماری ها با تاثیر بیشتر و کمترین اثرات جانبی استفاده کرد [36].

استفاده از نانوذرات به عنوان حامل دارو در سیستم دارویی نوین، می‌تواند بهبود و بهینه‌سازی روش درمانی را فراهم کند. با این روش، دارو به محل مورد نظر رسانده می‌شود و می‌توان دوز موثر دارو را با استفاده از مقدار کمتری از آن به بیمار تزریق کرد. همچنین، با استفاده از نانوذرات، عوارض جانبی مرتبط با درمان‌های

دیگر نیز به حداقل کاهش می‌یابد. بنابراین، مطالعات کاربرد نانوذرات در سیستم دارویی نوین نشان می‌دهند که استفاده از نانوذرات به عنوان حامل دارو، بهبود و بهینه‌سازی روش درمانی را فراهم می‌کند و با کاهش مقدار داروهای مصرفی، هزینه‌های درمان را نیز کاهش می‌دهد[37].

به طور کلی استفاده از نانوذرات در سیستم های دارویی ، به عنوان یک راه حل نوین در دارو رسانی، توانسته است برای بهبود عملکرد دارو و کاهش اثرات جانبی آن، بسیار موثر باشد. با توجه به پیشرفت‌های چشمگیر در تکنولوژی نانو، انتظار می‌رود که کاربردهای نانوذرات در این نوع از سیستم ها در آینده به میزان بیشتری گسترش یابد. استفاده از نانوذرات در سیستم دارو رسانی، می‌تواند به بهبود عملکرد دارو و کاهش اثرات جانبی آن کمک کند[38] . در آخر با توجه به مزایا و معایبی که این نوع از سیستم ها در حوزه نانوتکنولوژی دارند می توان گفت استفاده از برخی از نانوذرات یکی از موثر ترین و کم خطر ترین روش ها برای درمان برخی از بیماری ها می باشند.

منابع

[1]- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Andresen, T. L. (2012). Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. Annual review of pharmacology and toxicology, 52, 481-503.

[2]- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. Nature Biotechnology, 33(9), 941-951.

[3]-Muthu, M. S., Leong, D. T., Mei, L., & Feng, S. S. (2014). Nanotheranostics – - application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. Theranostics, 4(6), 660-677.

[4]-Paliwal, R., Babu, R. J., Palakurthi, S., & Nair, B. (2014). Nanomedicine scale-up technologies: feasibilities and challenges. AAPS PharmSciTech, 15(6), 1527-1534.

[5]- WT, C., SP, A., & FH., L. (2013). Sparse current source estimation for MEG using loose orientation constraints

[6]- El, A., & NM., M. (2011). Hepatoprotective effect of feeding celery leaves mixed with chicory leaves and barley grains to hypercholesterolemic rats.

[7]- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. Science, 311(5761), 622-627.

[8]- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS Nano, 3(1), 16-20.

[9]- L, Y., J, L., H, Y., & Z, B. (2020). Two novel mutations in MSX1 causing oligodontia.

[10]- JA, H., & EF, C. (2017). Threshold Limit Graphical Approach to Understanding Outcome Predictive Metrics: Data from the Osteoarthritis Initiative.

[11]- Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J.-H., & Yavlovich, A. (2009). Nanoparticle medicinal chemistry and toxicology. New Jersey: John Wiley & Sons.

[12]- Alkilany, A. M., Thompson, L. B., Boulos, S. P., Sisco, P. N., & Murphy, C. J. (2012). Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. Advanced drug delivery reviews, 64(2), 190-199.

[13]- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nature Reviews Cancer, 17(1), 20-37.

[14]- T, Y., D, Z., T, K., V, A., K, Y., MA, P., N, I., JE, M., H, K., & MA, H. (2017). The role of π-blocking hydride ligands in a pressure-induced insulator-to-metal phase transition in SrVO2H.

[15]-K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, & A. M. Rudzinski. (2001). Nanoparticles as drug delivery systems: Advantages and disadvantages. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 1(2), 110-124.

[16]- Y, M., T, S., T, T., K, S., K, A., & H., N. (2011). Enantioselective addition of allyltin reagents to amino aldehydes catalyzed with bis(oxazolinyl)phenylrhodium(III) aqua complexes. Molecules.

[17]-Muthu, M. S., Singh, S., & Konar, S. (2012). Exemplifying the impact of nanotechnology on drug delivery in recent times

[18]- Ghanbarzadeh, S., Pourhashemi, M. S., & Haddadi, S. (2019). Applications of Nanoparticles in the Diagnosis and Therapy of Diseases: Focus on Polymeric Nanoparticles" Journal of Drug Delivery Science and Technology.

[19]- M, B., RM, H., A, B., WS, A. D., C, V., & GÉ, R. (2018). Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with isolated CFHR3/1 deletion-rapid remission following complement blockade

[20]- D, Z., M, S., Z, L., M, L., R, G., & Z., Z. (2018). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tildipirosin Against Pasteurella multocida in a Murine Lung Infection Model

[21]- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., & Senesi, M. A. (2011). Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. Nanomedicine (London, England), 6(3), 429-41.

[22]- L, G., & JR, W. (2017). Evolution of Sex Chromosome Dosage Compensation in Animals: A Beautiful Theory, Undermined by Facts and Bedeviled by Details.

[23]- QN, C., WE, O. N., & GD, P. (2010). Advancing age alters the influence of eye position on sound localization.

[24]-Jain, K., Mehra, S. K., & Jain, N. C. (2014). Nanoparticles in inflammation and infection. Frontiers in Bioscience (Elite edition), 6, 293-303.

[25]- Zhang, Y., & Zhang, X. (2017). Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. Small, 13(38), 1700710.

[26]- A, A., A, H., T, D., F, P., AC, F., L, V. H., D, A., & MA., G. A. (2019). Hoatzin nestling locomotion: Acquisition of quadrupedal limb coordination in birds.

[27]- De Jong, W. H., & Borm, P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. International Journal of Nanomedicine, 3(2), 133-149.

[28]- V, K., Patel, L, D., Longo, B, W., Ershler, , B. Y., & D., R. (2009). Hemoglobin Concentration and the Risk of Death in Older Adults: Differences by Race/Ethnicity in the NHANES III Followup. 145(144): 514–523.

[29]- Faraji, A. H., & Wipf, P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17(8), 2950-2962.

[30]- Al-Jamal, K. T., & Kostarelos, K. (2011). Liposomes: From a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine. Accounts of Chemical Research, 44(10), 1094-1104.

[31]-Gelperina, S., & Kisich, K. (2005). Toxicological issues of drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews, 57(15), 1779-1790.

[32]-Sanchez-Lopez, E., Rodriguez-Gonzalez, V., Gonzalez-Alvarez, M. J., & Bermejo, M. (2020). Nanoparticles for topical drug delivery: A review. Nanomaterials, 10(5), 979.

[33]-Yuan, F., & Quan, Y. (2018). Liposomes as drug carriers in the treatment of cardiovascular diseases: Recent advances and emerging opportunities. Acta Pharmaceutica Sinica B, 8(6), 930-942.

[34]- PM, C., Y, S., C, R., & NB, N. (2017). Caffeine and Bicarbonate for Speed. A Meta-Analysis of Legal Supplements Potential for Improving Intense Endurance Exercise Performance.

[35]- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Andresen, T. L. (2012). Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. Annual review of pharmacology and toxicology, 52, 481-503.

[36]- S, L.-A., V, R., A, R.-H., E, M.-S., GJ, B., A, V., & MG., M. (2019). Thermostability of the Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Is Modulated by Lethal and Viability-Restoring Compensatory Amino Acid Substitutions.

[37]- Sharma, R., Sharma, A., & Mishra, A. K. (2017). Nano-sized drug delivery systems for improved pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-cancer agents.

[38]- Patra, J. K., Das, G., & Fraceto, L. F. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. Journal of Nanobiotechnology, 16(1), 71.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

باکتری‌های محرک رشد گیاه: گزینه ای مناسب برای القای تحمل به خشکی در محصولات زراعی

معصومه خلیلیان[۱]، مهرآنا کوهی دهکردی[۲*]، عبدالرزاق دانش شهرکی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲*] دانشیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، M.kouhi@pnu.ac.ir
[۳] دانشیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

تنش غیر زیستی به طور قابل توجهی رشد و تولید گیاه را محدود می‌کند. خشکسالی به عنوان یک محدودیت عمده محسوب می‌شود که می‌تواند رشد گیاه را تحت تأثیر قرار داده و بهره‌وری کشاورزی را در مقیاس جهانی محدود نماید. تنش آبی در گیاهان باعث ایجاد مجموعه‌ای از تغییرات مورفوانatomیک (اصلاح ساختار ریشه و برگ)، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (محتوای نسبی آب، پایداری غشاء، فتوسنتز، تعادل هورمونی، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی و تجمع اسمولیت) می‌شود که عمدتاً برای مقابله با تنش خشکی استفاده می‌شود. این استراتژی‌ها به گیاه اجازه می‌دهد بر دوره نامطلوب دسترسی محدود به آب غلبه کند. در حال حاضر، ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) ی محرک رشد گیاه (PGPR) به عنوان یک جایگزین امیدوارکننده برای بهبود رشد گیاه و تحمل شرایط خشکسالی مورد توجه قرار گرفته اند. این ریزوباکتری‌ها می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند تنظیمات اسمزی، افزایش آنتی‌اکسیدان، تولید فیتوهورمون، تنظیم هدایت روزنه‌ای، افزایش جذب مواد مغذی، آزادسازی ترکیبات آلی فرار (VOCs) و تولید اگزوپلی‌ساکارید (EPS) نه تنها بقای گیاه را در طول خشکسالی تضمین کنند، بلکه رشد آن را نیز افزایش دهند. از اینرو در مقاله حاضر با توجه به پتانسیل قابل توجه ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه برای تعدیل پاسخ فیزیولوژیکی در برابر کمبود آب، برخی از توانمندی‌های این میکروارگانیسم‌ها در تضمین بقای گیاه و بهبود مقاومت و رشد محصولات کشاورزی مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: تنش آبی، ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، زیست تلقیح، تنظیم اسمزی

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: a suitable option for inducing drought tolerance in crops

Abstract

Abiotic stress significantly limits plant growth and production. Drought is considered as a major limitation that can affect plant growth and limit agricultural productivity on a global scale. Water stress in plants causes a series of morphoanatomical (modification of root and leaf structure), physiological and biochemical changes (relative water content, membrane stability, photosynthesis, hormonal balance, antioxidant systems and osmolyte accumulation), which are mainly used to cope with drought stress. These strategies allow the plant to overcome the adverse period of limited water availability. Currently, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) have been considered as a promising alternative to improve plant growth and drought tolerance. These rhizobacteria can not only ensure plant survival during drought through various mechanisms such as osmotic adjustment, antioxidant enhancement, phytohormone production, stomatal conductance regulation, nutrient absorption enhancement, volatile organic compounds (VOCs) release, and exopolysaccharide (EPS) production but also increase its growth. Therefore, in this article, considering the significant potential of plant growth promoting rhizobacteria to modulate the physiological response to water shortage, some of the capabilities of these microorganisms in ensuring plant survival and improving the resistance and growth of agricultural products have been investigated.

Keywords: water stress, plant growth promoting rhizobacteria, bio inoculation, osmotic regulation

مقدمه

در حال حاضر، تغییرات آب و هوایی، رشد تصاعدی جمعیت و افزایش تقاضا برای مواد مغذی از جمله چالش‌های عمده‌ای است که کشاورزی در مقیاس جهانی با آن مواجه است. بر اساس آخرین برآورد سازمان ملل متحد، جمعیت جهان در حال حاضر ۷/۳ میلیارد نفر است و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۷ میلیارد نفر برسد [۱،۲]. رشد سریع جمعیت با از دست دادن زمین‌های کشاورزی حاصل‌خیز در اثر تخریب زمین و افزایش فعالیت‌های انسانی، مانند صنعتی شدن، شهرنشینی وتخریب جنگل‌ها همراه است. تغییر در الگوهای کاربری زمین منجر به انتشار گازهای گلخانه‌ای می‌شود. افزایش مداوم دمای هوا و سطوح CO_2 جو در نهایت الگوی بارش وتوزیع را تغییر می‌دهد و تغییرات آب و هوایی جهانی را تسریع می‌کند [۲، ۳].

آب ضروری‌ترین نیاز برای رشد و توسعه محصولات کشاورزی است؛ اصطلاح خشکسالی به طور کلی به معنای عرضه کمتر آب آبیاری نسبت به تقاضا است. تنش اسمزی به عنوان مضرترین عامل تنش محیطی در سراسر جهان رتبه بندی شده است [۴]. تناوب و شدت فزاینده خشکسالی، سال به سال منجر به کاهش چشمگیر تولید مواد غذایی می‌شود. تنش خشکی باعث کاهش ۱۰درصدی تولید غلات در نیم قرن گذشته شده است، درحالی‌که پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ تنش خشکی باعث کاهش بهره‌وری در بیش از ۵۰ درصد از زمین‌های قابل کشت می‌شود [۵]. موسسه بین المللی تحقیقات سیاست غذایی (IFPRI) کاهش شدیدی را در اکثر محصولات کشاورزی عمده جهان مانند گندم، ذرت و برنج مشاهده کرده است. بر اساس گزارش‌های منتشر شده بین سال‌های ۱۹۸۰ تا ۲۰۱۵، کمبود آب منجر به کاهش ۲۱ درصدی عملکرد گندم و کاهش ۴۰ درصدی تولید ذرت در سراسر جهان شد [۶،۷]. استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)یک رویکرد جایگزین برای اصلاح روش سنتی و بیوتکنولوژی برای افزایش بهره‌وری محصول است. از این رو، می‌تواند تحمل به خشکی را در محصولات مهم کشاورزی افزایش دهد و برای به حداقل رساندن تلفات محصول در شرایط آب محدود مورد استفاده قرار گیرد [۸].

اثرات تنش خشکی بر زندگی گیاهان

کمبود آب می‌تواند با جوانه‌زنی بذر در مراحل اولیه رشد گیاه تداخل داشته باشد و رشد گیاه را در مراحل بعدی کند نموده و مانع از رشد سلولی شود [۹]. از این رو، گیاهان کوتاه‌تر با سطح برگ کمتری هستند و تشعشعات فعال فتوسنتزی کمتری را جذب می‌کنند و در نتیجه عملکرد فتوسنتز را محدود می‌کنند. مواد مغذی برای رشد طبیعی گیاه حیاتی هستند و حمل و نقل مواد مغذی به شدت تحت تأثیر خشکسالی قرار می‌گیرد. تنش آبی، جریان انبوه مواد مغذی محلول در آب مانند نیترات، سولفات، کلسیم، منیزیم را مختل می‌کند. خشکسالی می‌تواند بر برخی از آنزیم‌های حیاتی تأثیر بگذارد آنزیم‌های مهم مانند نیترات ردوکتاز (NR)، به دلیل جذب کمتر نیترات از خاک ایجاد می‌شود [۱۰]. اولین نشانه مستقیم خشکسالی در گیاهان از سرعت فتوسنتز آشکار می‌شود که ناشی از کاهش رسانایی روزنه‌ها و افزایش همزمان تنفس نوری است

[۱۱]. بسته شدن روزنه‌ها همچنین می‌تواند باعث آسیب‌های مبتنی بر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) ، از دست دادن یکپارچگی غشاء و تخریب پروتئین، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک شود [۱۲]. خشکی می‌تواند در طی مراحل خاصی از رشد گیاه مضرتر شود، به عنوان مثال اگر خشکسالی فتوسنتز را در طول رشد بساک محدود کند، می‌تواند باعث نرعقیمی شود زیرا بلوغ گرده به دلیل سطح ناکافی کربوهیدرات در داخل سلول متوقف می‌شود [۱۳].

باکتری‌های محرک رشد گیاه

در حال حاضر روش‌های موثر مختلفی مانند، اصلاح مولکولی، مهندسی ژنتیک و استفاده از نانوذرات، هیدروژل‌های سوپرجاذب برای رفع مشکل تولید محصول پایدار در شرایط خشکسالی اتخاذ می‌شود، اما با این حال، بیشتر این روش‌ها در برخی مکان‌ها زمان‌بر، پرهزینه، پرزحمت و نیاز به دانش فنی پیچیده دارند. یک جایگزین امیدوارکننده برای بهبود رشد و تحمل گیاه در شرایط خشکی ، استفاده از ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (PGPR) به عنوان تلقیح باکتریایی است [۱۴].

ریزوباکتریوم یک ماده ژنتیکی منحصربه فرد از باکتری‌های ساکن در ریزوسفر است که نقش مهمی در سلامت و عملکرد گیاه دارد. برهمکنش ریزوباکتریوم با گیاه، زمینه‌ای را برای محافظت از گیاهان دربرابر تنش‌های مختلف غیرزیستی و زیستی فراهم می‌کند. ریزوباکترهای محرک رشد گیاه، باکتری‌های کلونیزه کننده ریشه هستند که مجموعه‌ای از آنزیم‌ها و متابولیت‌ها را تولید می‌کنند که به گیاهان کمک می‌کنند تا درشرایط سخت محیطی مقاومت کنند. فرمول‌های مختلفی از ریزوباکترها برای افزایش تحمل یا استقامت به خشکی در محصولات استفاده می‌شود که به نوبه خود باعث افزایش بهره‌وری محصول می‌شود [۱۵].

ریزوسفر ناحیه‌ای است که در آن تعامل بین خاک، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد. میکروارگانیسم‌های موجود در ریزوسفر برای بقای خود با هم رقابت می‌کنند، این رقابت برای نیاز به مواد مغذی، آب و فضا برای توسعه ارتباط آن‌ها با گیاه است. فعل و انفعالات میکروب‌های گیاهی منجر به بهبود رشد و نمو گیاهان می‌شود. جنس‌های متنوع باکتریایی، جزء مهم خاک‌ها را تشکیل می‌دهند که فعالیت‌های زیستی مختلف مانند بازیافت مواد مغذی اکوسیستم خاک را تسهیل می‌کنند که برای عملکرد پایدار محصول ضروری است. باکتری‌های محرک رشد گیاه دسترسی گیاه را به مواد مختلف غذایی سهل‌الوصول می‌کنند، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه را تولید و پاتوژن‌های گیاهی را مهار می‌کنند. آن‌ها همچنین کیفیت خاک را با پاکسازی زیستی آلاینده‌ها به وسیله تسهیل جذب فلزات سمی سنگین و تخریب ترکیبات بیگانه از جمله آفت‌کش‌ها بهبود می‌بخشند [۱۵]. گیاهان پرایم شده با ریزوباکتری‌ها بواسطه ابزارهای مختلفی مانند تنظیم اسمزی، افزایش سطح آنتی‌اکسیدان، تولید فیتوهورمون، افزایش جذب مواد مغذی، تولید اگزوپلی‌ساکارید (EPS) و آزادسازی ترکیبات آلی فرار (VOCs) در برابر خشک شدن مقاومت می‌کنند. همه مکانیسم‌های اشاره شده تقریباً همیشه با بهبود ظرفیت نسبی آب (RWC) گیاه

در شرایط خشکی عمل می‌کنند. مطالعات متعددی نشان داده است که تلقیح گیاهان با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه با افزایش ظرفیت نسبی آب همراه بوده است، با این حال مکانیسم دقیق این تغییر نامشخص است، اما به نظر می رسد افزایش آبسیزیک اسید (ABA) مبتنی بر PGPR در گیاهان و به دنبال آن بسته شدن سریع روزنه ها باعث افزایش ظرفیت نسبی آب در شرایط خشکسالی می‌شود [۱۶].

مکانیسم‌های بکار گرفته شده توسط ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه برای تحمل تنش خشکی

جوانه‌زنی بذر مرحله مهمی در چرخه زندگی گیاه است. عملکرد فردی یک گیاه در مراحل اولیه زندگی می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر رشد و عملکرد آن داشته باشد. استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه برای افزایش سرعت جوانه‌زنی بذر توسط چندین مطالعه تحقیقاتی ثابت شده است. سرعت جوانه‌زنی بالاتر نشان‌دهنده رشد و نمو بهتر نهال‌ها است که برای عملکرد کشاورزی ضروری است [۱۴].

هدایت روزنه‌ای

شروع خشکسالی محتوای آب خاک را کاهش می‌دهد و منجر به بسته شدن روزنه‌ها می‌شود و در نتیجه بر سرعت فتوسنتز تأثیر می‌گذارد، درحالیکه پرایمینگ گیاهان با باکتری‌های محرک رشد گیاه با افزایش سطح آب، سرعت فتوسنتز را افزایش می‌دهد و به دلیل رسانایی بیشتر روزنه‌ای، CO_2 بیشتری در ناحیه مزوفیل پراکنده می‌شود [۱۷].

با کمک جوامع باکتریایی مرتبط با ریشه، گیاهان مکانیسم‌های مختلفی را برای تحمل تنش خشکی اتخاذ می‌کنند. دو مکانیسم اصلی توسط ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه برای غلبه بر تنش اسمزی در گیاهان اتخاذ شده است: مستقیم و غیر مستقیم. مکانیسم‌های مستقیم پدیده‌هایی هستند که در داخل گیاه رخ می‌دهند و مستقیماً بر متابولیسم گیاه تأثیر می‌گذارند، در حالی که مکانیسم‌های غیرمستقیم در خارج از گیاهان رخ می‌دهند. مکانیسم‌های اصلی اتخاذ شده توسط این ریزوباکتری ها برای غلبه بر تنش خشکی شامل تغییر در مورفولوژی ریشه و تولید اسمولیت‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، فیتوهورمون‌ها، مواد پلیمری خارج سلولی (EPS) ، ترکیبات آلی فرار(VOCs) ، سیدروفورها ،۱-آمینو سیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات و ACC– دآمیناز می‌باشند [۸].

نقش ترکیبات آلی فرار (VOCs) در تحمل به تنش خشکی

درشرایط تنش، گیاهان مواد فرار تولید می‌کنند که به عنوان سیگنالی برای توسعه پاسخ سیستمیک یا برای پرایمینگ درون گیاه یا گیاهان مجاور عمل می‌کنند. ترکیبات آلی فرار که توسط گروه‌های مختلف باکتری از جمله *سودوموناس*، *باسیلوس*، *آرتروباکتر*، *استنوتروفوموناس* و *سراتیا* تولید می‌شوند، باعث افزایش رشد

گیاهان، مهار پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی و نماتدها و ایجاد مقاومت سیستماتیک در گیاهان نسبت به پاتوژن‌های گیاهی می‌شوند [۱۵].

ساخت اگزوپلی ساکارید (EPS)

ساخت اگزوپلی ساکاریدها توسط ریزوباکترها یک ویژگی حیاتی برای افزایش رشد در طول خشکسالی است زیرا به تشکیل بیوفیلم‌های آبدوست که در ریشه‌های گیاه ساکن می‌مانند کمک می‌کند، بنابراین آن‌ها را از شرایط کم‌آبی خاک محافظت می‌کند. اگزوپلی ساکاریدهای باکتریایی عموماً از همو یا هترو پلی‌ساکاریدها تشکیل شده است که به عنوان یک لایه لجن یا کپسول روی سطح سلول نگه داشته می‌شوند و بیوفیلم را تشکیل می‌دهند [۱۷].

نقش ریزوباکترها بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی برای القای تحمل به خشکی

در طول رشد طبیعی گیاه، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سطح پایین تولید می‌شود. شرایط تنش منجر به تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که باعث آسیب اکسیداتیو می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن بر سیگنال‌دهی، انتقال، متابولیسم و بیوسنتز اکسین تأثیر می‌گذارد و با فرآیند تولید هورمون‌های گیاهی تعامل دارد. در پاسخ به شرایط تنش، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی توسط گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد که در آن گیاهان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی مختلفی تولید می‌کنند. مشاهده شده است که فعالیت‌های آنزیمی منجر به کاهش آسیب اکسیداتیو می‌شود، اما در سطح بسیار بالای گونه‌های فعال اکسیژن، می‌تواند اثرات مضری داشته باشد. بنابراین، حفظ تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نابودی رادیکال‌های آزاد تولید شده اهمیت دارد. باکتری‌های محرک رشد قادر به انجام این کار می‌باشند و گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد نسبت به گیاهانی که تلقیح نشده‌اند با جلوگیری از آسیب اکسیداتیو، میزان بقای بالاتری را نشان می‌دهند [۱۵].

تعدیل سطح هورمون گیاهی

در تنش خشکی، تولید هورمون‌های گیاهی کاهش می‌یابد که مانع رشد طبیعی گیاه می‌شود. باکتری‌های محرک رشد گیاه قادر به تولید هورمون‌های گیاهی هستند و با تغییر سطح هورمون‌ها، مقاومت به خشکی را در گیاهان ایجاد می‌کند [۱۷]. فیتوهورمون‌هایی مانند ایندول ۳- استیک اسید، جیبرلین، سیتوکینین، اسید آبسیزیک و اتیلن تولید شده توسط ریزوباکتریوم‌ها برای تقویت رشد و نمو و کمک به گیاهان مهم هستند[۱۵].

اکسین (IAA) فراوان‌ترین هورمون گیاهی است و به طور کلی توسط ۸۰ درصد گونه‌های ریزوباکتری تولید می‌شود. اکسین تولید شده توسط ریزوباکتری‌ها می‌تواند دیواره‌های سلولی گیاه را شل کند و مقدار

ترشحات ریشه را افزایش دهد که از رشد میکروارگانیسم‌های ریزوسفر و فرآیند کلون‌سازی حمایت می‌کند. گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های مولد اکسین تحمل بیشتری نسبت به تنش خشکی نشان داده‌اند، آن‌ها باعث افزایش زیست توده اندام هوایی، تغذیه معدنی، تغییرات در معماری ریشه و برهمکنش آب شده‌اند [۱۴].

آبسیزیک‌اسید (ABA) هورمونی است که معمولاً به آن هورمون تنش گفته می‌شود که تغییرات فیزیولوژیکی را در گیاه بیشتر می‌کند و رشد آن را تعدیل می‌کند. گیاهان تلقیح شده با ریزوباکتری‌ها غلظت بالایی از آبسیزیک‌اسید را نشان می‌دهند، که توانایی بهبود یافته‌ای درتحمل خشکی دارند [۱۴]. باکتری‌های محرک رشد گیاه در بسیاری از گیاهان تلقیح شده باعث فعال شدن ژن‌های مسئول در برابر عوامل تنش‌زای غیرزیستی می‌شوند. چندین مطالعه بیان ژنومی با استفاده از تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی نشان داده‌اند که گیاهان تحت تنش تلقیح شده با ریزوباکتری‌ها، الگوی بیان ژنی متفاوتی نسبت به گیاهانی که تلقیح نشده‌اند نشان می‌دهند [۱۴].

مطالعات متعدد نشان داده است که گیاهان تلقیح شده با ریزوباکتری‌ها دارای ظرفیت نسبی آب بالاتری نسبت به گیاهان غیرتلقیح شده هستند. افزایش ظرفیت نسبی آب باعث بهبود مقاومت گیاهان به خشکی می‌شود. مکانیسمی که توسط آن ریزوباکتری‌ها قادرند ظرفیت نسبی آب گیاه را بهبود ببخشد هنوز مشخص نیست با اینحال به نظر می رسد که ریزوباکتری ها می توانند به افزایش ظرفیت نسبی آب گیاه از طریق سنتز اگزوژن محافظت‌کننده‌های اسمزی، مانند پرولین، که باعث افزایش پایداری غشای سلولی و کاهش نشت الکترولیت و از دست دادن آب می‌شود، کمک کند. این باکتری ها همچنین می‌تواند از طریق تولید هورمون‌هایی مانند ایندول استیک اسید که رشد ریشه و تشکیل ریشه جانبی را افزایش می‌دهد، به گیاهان کمک کند؛ در نتیجه جذب آب را افزایش می‌دهد، تعرق برگ‌ها را کاهش می‌دهد، تغذیه و فیزیولوژی را بهبود می‌بخشد و بسته شدن روزنه و فعالیت‌های متابولیکی را کنترل می‌کند [۱۴].

تنظیم اسمزی و بازیابی فشار تورگور

اسمولیت‌های سنتز شده توسط ریزوباکترها در شرایط خشکی می‌توانند رشد گیاه را افزایش دهند. پرولین، یک اسمولیت حیاتی است که می‌تواند در شرایط خشکی در گیاهان انباشته شود و به دلیل پتانسیل آبپوشی آن، می‌تواند به راحتی به پروتئین‌ها متصل شود و آن‌ها را محلول کند و در نتیجه از تخریب شدن آن‌ها جلوگیری کند. پرولین همچنین پتانسیل ردوکس سلول‌ها را تنظیم می‌کند و اسیدیته سلولی را با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد کاهش می‌دهد [۱۷].

تولید سیدروفور

کمبود آهن عامل محدودکننده اصلی ایجاد کلروز در گیاهان است و در نهایت بر کیفیت و عملکرد محصول تأثیر می‌گذارد. استفاده از کلات‌های مصنوعی برای غلبه بر کمبود بیشتر به دلیل تجزیه‌پذیری زیستی ضعیف آن‌ها امکان‌پذیر نیست. سیدروفورها، مولکول‌های آلی جزئی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها و چند گیاه دانه‌دار، تحت شرایط کمبود آهن گیاهان را قادر می‌سازند تا آهن را حتی در صورت کاهش دسترسی به آن از محیط اطراف جذب کنند. آن‌ها ترکیبات مهمی برای تثبیت گیاهی در شرایط نامطلوب هستند و ادغام فلز را فراهم می‌کنند، رشد گیاه را بهبود می‌بخشند و فراهمی زیستی فلز را در خاک کاهش می‌دهند [۸].

گیاهانی که در مناطقی با آلودگی فلزی رشد می‌کنند، فعالیت‌های فیزیوشیمیایی و مولکولی محدودی از خود نشان می‌دهند. اثر متقابل خشکی و تنش فلزی اثرات منفی شدیدی را بر فیزیولوژی، مورفولوژی، رشد و عملکرد گیاهان زراعی تحمیل می‌کند. با این حال، چندین سویه از ریزوباکتری قادر به کاهش سمیت فلز هستند. علاوه‌بر اثر ریزوباکتری‌ها در کاهش تنش، این باکتری‌ها قادرند کارآیی کاهش‌دهنده‌های تنش‌های برون‌زا از جمله نانوذرات، مواد مغذی گیاهی و فیتوهورمون‌ها را افزایش دهند [۸].

نتیجه گیری

کشاورزی و منابع آب در حال حاضر دوره بحرانی بی سابقه‌ای را در مقیاس بین المللی پشت سر می گذارد. خشکسالی با تغییرات اقلیمی رابطه مستقیم دارد. تنش خشکی مسئول تغییر رشد گیاه و همچنین برهمکنش های میکروبی خاک است. بنابراین کاهش تولیدات کشاورزی در جهان تهدیدی جدی برای کشاورزی پایدار است. مطالعات اخیر اهمیت استفاده از ریزوباکتری های محرک رشد ریشه مقاوم به خشکی را برای بهبود رشد گیاه و تحمل به خشکی ثابت کرده است. ریزوباکتری ها به عنوان یک روش جایگزین برای کودها و مواد شیمیایی می توانند نقش مهمی در بهبود خصوصیات خاک، تولید عملکرد و کشاورزی پایدار تحت تنش خشکی ایفا کنند. تحقیقات بیشتری باید در مورد استفاده از باکتری ها به عنوان کودهای زیستی، به عنوان تنظیم کننده رشد گیاه در شرایط تنش و شناسایی قوی ترین سویه های باکتریایی، و همچنین برای تعیین روش های بهینه تیمار (تیمار بذر، تیمار گیاهچه، محلول پاشی یا افزودن به خاک)، به منظور افزایش بهره وری محصول، حفظ محیط زیست و بهبود پایداری کشاورزی انجام پذیرد.

منابع

1. Goswami M, Suresh DEKA. (2020). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria–Alleviators of Abiotic Stresses in Soil. 30, 40–61.

2. Koza NA, Adedayo AA, Babalola OO, Kappo AP. (2022). Microorganisms in Plant Growth and Development: Roles in Abiotic Stress Tolerance and Secondary Metabolites Secretion. 10, 1528.

3. Chandra P, Wunnava A, Verma P, Chandra A, Sharma RK. (2021). Strategies to Mitigate the Adverse Effect of Drought Stress on Crop Plants–Influences of Soil Bacteria. 31, 496–509.

4. Imran J, Shahid IA, Hafiz MA. (2016). Assesment of Genetic Diversity in Wheat Synthetic Double Haploids for Yield and Drought Related Ttraits Tthrough Factor and Cluster Analyses. 3, 1-9.

5. Akhtar N, Ilyas N, Hayat R, Yasmin H, Noureldeen A, Ahmad P. (2021). Synergistic Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Silicon Dioxide Nano-Particles for Amelioration of Drought Stress in Wheat. 166, 160–176.

6. Siddique S, Naveed M, Yaseen M, Shahbaz M. (2022). Exploring Potential of Seed Endophytic Bacteria for Enhancing Drought Stress Resilience in Maize (Zea mays L.). 14, 673.

7. Pequeno DN, Hernandez-Ochoa IM, Reynolds M, Sonder K, MoleroMilan A, Robertson RD, Lopes MS, Xiong W, Kropff M, Asseng S. (2021). Climate Impact and Adaptation to Heat and Drought Stress of Regional and Global Wheat Production.

8. Muhammad Ahmad H, Fiaz S, Hafeez S ,Zahra S, Noor Shah A, Gul B, Aziz O, Rahman M, Fakhar A, Rafique M, Chen Y, Hwan Yang S, Wang X. (2022). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Eliminate the Effect of Drought Stress in Plants. 13.

9. Steiner Fb, Zuffo AM, Zoz T, Zoz A, Zoz J. (2017). Drought Tolerance of Wheat and Black Oat Crops at Early Stages of Seedling Growth. 40(3), 576-86.

10. Li S, Zhou L, Addo-Danso SD, Ding G, Sun M, Wu S, et al. (2020). Nitrogen Supply Enhances the Physiological Resistance of Chinese Fir Plantlets Under Polyethylene Glycol (PEG)-Induced Drought Stress. 10(1), 1-8.

11. Li X, Shi W, Broughton K, Smith R, Sharwood R, Payton P, et al. (2020). Impacts of Growth Temperature, Water Deficit and Heatwaves on Carbon Assimilation and Growth of Cotton Plants (Gossypium hirsutum L.).

12. Hasanuzzaman M, Bhuyan MHM, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, et al. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants Under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. 9(8), 681.

13. Yu J, Jiang M, Guo C. (2019). Crop Pollen Development Under Drought: from the Phenotype to the Mechanism. International journal of molecular sciences. 20(7), 1550.

14. Bouremani N, Cherif-Silini H, Silini A, Chenari Bouket A, Luptakova L, N. Alenezi F, Baranov O, Belbahri L. (2023). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Rampart against the Adverse Effects of Drought Stress.

15. Kumar Yadav V, Raghav M , K -Sharma S, Bhagat N. (2020). Rhizobacteriome Promising Candidate for Conferring Drought Tolerance in Crops. 14(1), 73-92.

16. Casanovas EM, Barassi CA, Sueldo RJ. (2002). Azospiriflum Inoculation Mitigates Water Stress Effects in Maize Seedlings. Cereal Research Communications. 30(3), 343-50.

17. Sati D, Pande V, Chandra Pandey S, Samant M. (2021). Recent Advances in PGPR and Molecular Mechanisms Involved in Drought Stress Tolerance.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

سنتز حسگر نورتاب با استفاده از نقاط کربنی مشتق شده از ضایعات زیست توده و چارچوب آلی-فلزی ۱۹۹ برای تشخیص آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین

فاطمه صادقی چاه نصیر[۱]، فاطمه امیری پور[۱]، شهرام قاسمی میر[۱*]

۱. دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

ایمیل نویسنده مسئول: sghasemi@umz.ac.ir

چکیده

در کار حاضر از یک حسگر نورتابی بر پایه‌ی نقاط کربنی و چارچوب آلی-فلزی برای تشخیص و اندازه‌گیری سیپروفلوکساسین استفاده شد. ابتدا، نقاط کربنی (CD) با استفاده از روش گرماآبی و توسط اصلاح‌گر رودامین B سنتز و سپس با پیش ماده‌های چارچوب آلی-فلزی، حسگر حساس و گزینش پذیر تهیه گردید(CD@RB/MOF-199). مشخصه‌یابی حسگر حاصل توسط تکنیک‌های طیف‌سنجی مرئی_ماورای بنفش(UV-Vis)، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه(FT-IR)، پراکندگی اشعه ایکس (XRD) و طیف سنجی فلوئورسانس انجام شد. کاوشگر دارای دو نشر مجزا در ۴۱۵و ۵۷۶ nm می باشد که ناشی از فلوئورسانس رنگساز CD و RB در ساختار حسگر است. در حضور سیپروفلوکساسین نشر رنگسازها در کاوشگر تقویت خواهدشد بطوریکه تحت شرایط بهینه پاسخ کامپوزیت به آنالیت در دامنه‌ی غلظت µM ۰/۱-۳۰۰با R^2=۰/۹۹۹۲تعیین شد.

واژه های کلیدی: چارچوب آلی فلزی، رودامینB، نقاط کربنی، سیپروفلوکساسین

Abstract

In the present work, a photoluminescence sensor based on carbon dots and metal- organic framework was used to detect and measure ciprofloxacin. First, carbon dots (CD) were prepared using hydrothermal method and rhodamine B modifier, and then, a sensitive and selective sensor was prepared with metal-organic framework precursors (CD@RB/MOF-199). The resulting sensor was characterized by UV-Vis, Fourier transform infrared (FT-IR), X-ray diffraction (XRD) and fluorescence spectroscopy techniques. The probe has two distinct emissions at 415 and 576 nm, which are caused by the fluorescence of CD and RB dyes in the sensor structure. In the presence of ciprofloxacin, the diffusion of dyes in the probe will be enhanced, so that under optimal conditions, the response of the composite to the analyte in the concentration range of 0.1-300 μM was determined with R^2=0.9992.

Keywords: metal-organic framework, rhodamine B, carbon dots, ciprofloxacin

مقدمه

سیپروفلوکساسین[1] به عنوان آنتی‌بیوتیک حیاتی در درمان بیماری‌های حیوانی و انسانی استفاده‌می شود[1]. این آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های مختلف مانند عفونت‌های دستگاه تنفسی، دستگاه گوارش، و مجاری ادراری کاربرد دارد[2,3]. مصرف بیش از حد این آنتی‌بیوتیک عوارض جانبی شدیدی مانند مسمومیت کبدی و اختلالات سیستم عصبی مرکزی را به همراه دارد[2]. از سوی دیگر، بررسی‌ها نشان می‌دهد که ۷۰ درصد از این آنتی‌بیوتیک وارد محیط می‌گردد و اثرات جدی بر اکولوژی دارد[4]. اخیراً مصرف بیش از حد این آنتی‌بیوتیک، توجه زیادی را به طراحی و ساخت مسیری ساده و حساس برای اندازه‌گیری آن به خود اختصاص داده‌است.

در گذشته از روش هایی مانند الکتروفورز مویینگی[2]، تکنیک‌های الکتروشیمی[3] و کروماتوگرافی[4] استفاده می‌شد که از دقت و حساسیت بالایی برخوردار هستند[5,6]، اما این تکنیک‌ها پیچیده هستند و اندازه‌گیری توسط این تکنیک‌ها نیازمند صرف وقت و زمان طولانی می‌باشد. اخیراً، روش فلوئورسانس[5] به‌دلیل سادگی ، کم‌هزینه بودن و حساسیت بالا، توجه محققان زیادی را در زمینه‌ی حسگرها به خود جلب کرده‌است[7].

نقاط کربنی[6] دسته جدیدی از مواد ساطع کننده نور هستند که به دلیل اصلاح سطح آسان سازگاری با محیط زیست و سمیت کمتر، جذاب هستند[8]، و در زمینه‌های مختلفی مانند زیست پزشکی، سلول‌های خورشیدی و تصویربرداری مورد توجه قرارگرفته‌اند[9]. امروزه CDs با منبع زیست توده[7] به‌دلیل زیست سازگاری بسیار بالا بسیار مورد توجه قرارگرفته‌اند، اما از معایب استفاده از منبع زیست توده سنتز CD با بازده کوانتومی[8] کم می‌باشد که برای افزایش خواص فلوئورسانس و افزایش راندمان کوانتومی می‌توان سطح CD را اصلاح کرد[5,8].

روش‌های مختلفی برای رفع این محدودیت وجود دارد در دو دهه اخیر، چارچوب‌ها آلی فلزی[9] دسته جدیدی از مواد کریستالی فلزی به‌دلیل خواص منحصر به‌فرد خود مانند مساحت سطح بالا، تخلخل زیاد و ساختار اسکلتی قابل تنظیم، که از اتصال لیگاند[10]های آلی با یون‌های فلزی ناشی می‌شود، توجه فراوانی را به خود جلب کرده‌است[10]. این دسته از مواد با توجه به قابلیت‌هایی که دارند، کاربردهای بالقوه زیادی در

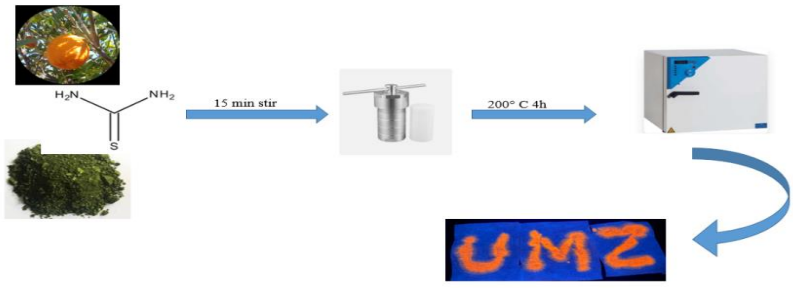
[1] Ciprofloxacin(Cip)
[2] Capillary electrophoresis
[3] Electrochemistry
[4] Chromatography
[5] Fluorescence
[6] Carbon Dot(CD)
[7] Biomass
[8] Quantum Yield(QY)
[9] Metal-Organic framework(MOF)
[10] Ligand

زمینه‌های مختلف مانند جذب و ذخیره گاز، جداسازی مولکولی، سنجش شیمیایی، دارورسانی و حسگرهای فلوئورسانس از خود نشان داده‌اند[11,12].

در این تحقیق، نقاط کربنی دوپ شده با گوگرد با استفاده از ضایعات پوست میوه توسط یک روش سبز با رودامین B[1] و سنتز شد و سپس در ساختار چارچوب آلی-فلزی-۱۹۹، جای‌گیری[2] شد. ساختار فیزیکی و شیمیایی حسگر تهیه‌شده با استفاده از تکنیک طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز[3] و پراکندگی اشعه ایکس[4] مورد بررسی قرارگرفت. در نهایت کارآیی حسگرCD@RB/MOF-199 برای تشخیص اندازه‌گیری Cip مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج با استفاده از تکنیک فلوئورسانس ثبت گردید. نتایج نشان دادند که فلوئورسانس حسگر تهیه‌شده در حضور Cip به شدت تقویت می‌شود و میزان افزایش نورتابی با غلظت‌های مختلف Cip رابطه خطی دارد.

بخش تجربی

در این تحقیق، از یک روش گرماآبی ساده برای سنتز CDs با استفاده از ضایعات پوست پرتقال بعنوان منبع کربنی استفاده‌شد. ۲۵ میلی گرم از ضایعات پوست پرتقال وزن شد، ۵۰ mg RB به آن اضافه شد. سپس مخلوط در ۴۰ میلی‌لیتر آب حل شد و به یک اتوکلاو منتقل شد. مخلوط واکنش در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفت و در نهایت CDs توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری شد، و پس از آن مقدار مشخصی از CDs تهیه شده به پیش ماده‌های MOF که شامل نمک (II) مس نیترات سه آبه (g ۰/۵) و لیگاند تری میزیک اسید (g ۰/۲۵) بود، اضافه شد و در حضور آب، اتانول و DMF بعنوان حلال ، محلول حاصل به اتوکلاو منتقل و به مدت ۲۴ ساعت تحت دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از صاف کردن ترکیب آبی رنگ CD@RB/MOF-199 حاصل گردید.

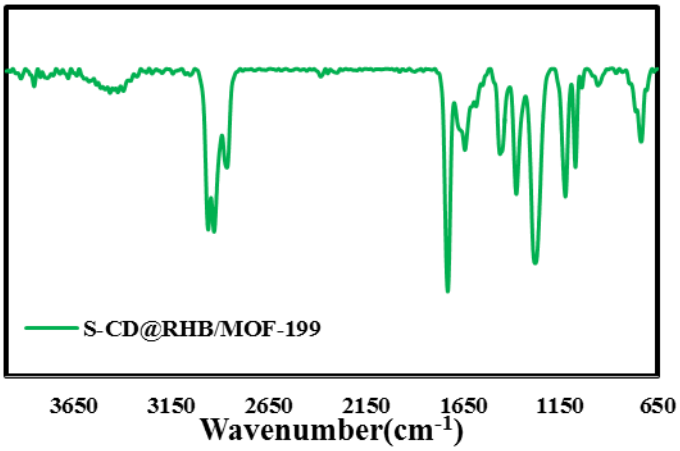


شماتیک سنتز کربن دات

[1] Rhodamine B(RB)
[2] Embedded
[3] Fourier Transform Infrared Spectroscopy(FT-IR)
[4] X-ray diffraction(XRD)

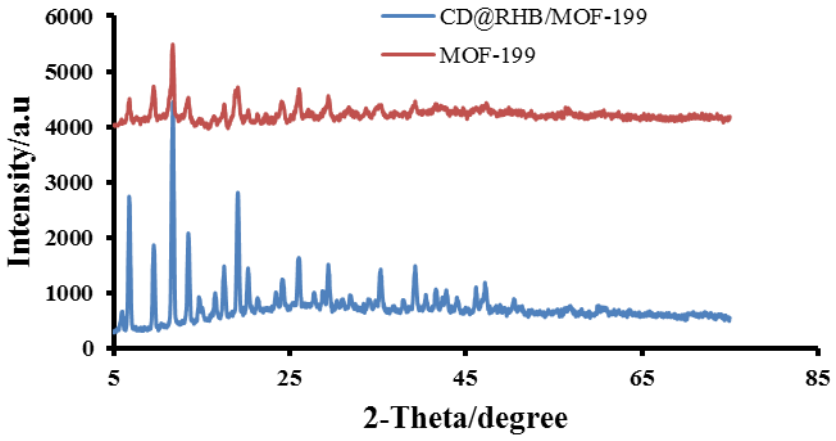
نتایج و بحث

شکل۱ طیف FT-IR کامپوزیت CD@RB/MOF-199 را نشان می‌دهد پیام_های موجود در عدد موجی ۱۳۷۷ وcm^{-1} ۱۴۵۴به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی C-Oو C-N می‌باشد؛ همچنین ارتعاشات C=O درناحیه با عدد موجیcm^{-1} ۱۷۲۹ قابل مشاهده است.نوار پهن در ناحیه ی cm^{-1} ۳۴۴۸ مربوط به ارتعاشات کششی O-H می‌باشد .



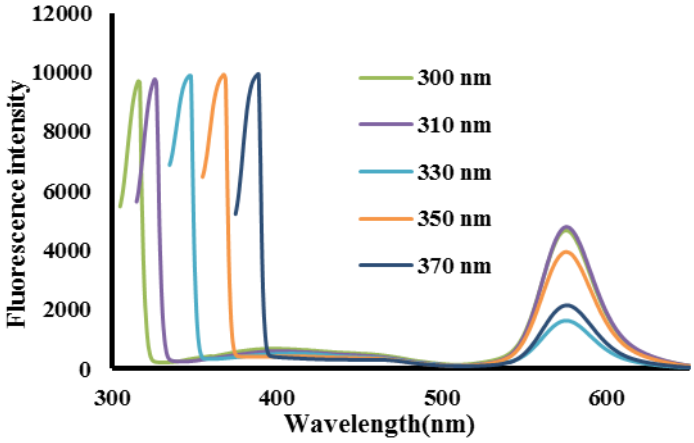
شکل ۱ - طیف **FT-IR** کامپوزیت **CD@RB/MOF-199**

شکل ۲ الگوی XRD حسگر و MOF-199 را نشان می‌دهد. موقعیت قله‌های الگوی XRD مربوط به MOF-199 در تطابق با گزارشات قبلی مرتبط با آن می‌باشد. ازطرفی همانطور که ملاحظه می‌گردد، پیک‌های مشخصه MOF-199 بعد از اصلاح دچار تغییر نگردیده است. به‌دلیل غلظت کم یا اندازه کوچک مولکول CDs، پیک‌های مشخصه‌ی آن در الگوی XRD قابل مشاهده نیست.



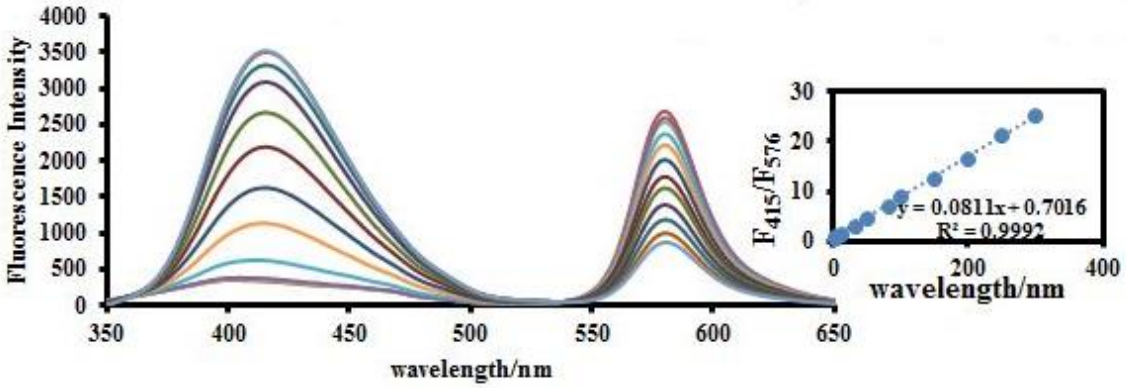
شکل ۲-الگوی XRD کامپوزیت CD@RB/MOF-199

خواص نوری CD@RB/MOF-199 به منظور بررسی آن در تشخیص Cip مورد بررسی قرارگرفت. یکی از مهمترین عوامل برای دستیابی به تشخیص با دقت، یافتن بهترین طول موج تحریک است. برای یافتن مناسب‌ترین طول موج، از کاوشگر در طول موج‌های مختلف فلوئورسانس گرفته‌شد و و بهترین و مناسب-ترین شدت نشر در طول موج تحریک ۳۱۰ نانومتر در نظر گرفته‌شد (شکل۳).



شکل ۳- طیف نشری پروب با طول موج‌های تحریک متفاوت (۳۰۰ تا ۳۷۰ نانومتر)

در شکل ۴ کارآیی کاوشگر CD@RB/MOF-199 در طول موج برانگیختگی ۳۱۰ nm برای تشخیص فلوئورسانسی در حضور و غیاب Cip نمایش داده‌شده: مشاهده می‌شود با افزایش غلظت Cip، شدت فلوئورسانس دو قله ی CD@RB/MOF-199 افزایش می‌یابد و می‌توان این پدیده را بطور کمی به غلظت Cip نسبت داد (شکل ۴).



شکل ۴- طیف نشری پروب در حضور غلظت های مختلف

برای ارزیابی عملکرد حسگر تهیه شده در اندازه‌گیری **Cip**، از نمونه واقعی سرم خون انسانی استفاده شد. پس از پیش تیمار کردن نمونه‌ها مقادیر مشخصی از **Cip** استاندارد به سرم انسانی در حضور کاوشگر اضافه شد و نتایج ثبت شد. همانطور که ملاحظه می‌شود بازیابی رضایت بخش برای سرم، اعتبار روش پیشنهادی را نشان می‌دهد.(جدول ۱)

جدول ۱- تعیین Cip در نمونه سرم خون انسانی با استفاده از CD@RH/MOF-199

نمونه	Cip اضافه شده (µM)	Cip پیدا شده (µM)	بازیابی (٪)
سرم خون انسانی	۱۵۰	۱۴۲	۹۴
	۲۰۰	۱۹۸	۹۹
	۳۰۰	۳۰۶	۱۰۲

نتیجه گیری

بطور خلاصه در این تحقیق، نقاط کربنی از یک منبع سبز تهیه شد وتوسط RB مورد اصلاح قرارگرفت و سپس با اضافه کردن به پیش ماده‌های چارچوب آلی-فلزی از طریق روش ساده و آسان گرماآبی سنتز کامپوزیت صورت گرفت ، سپس مشخصه‌یابی حسگر از طریق فنون فلورسانس، FT-IR, UV-Vis و XRD انجام شد. در نهایت، توانایی بالای حسگر برای اندازه گیری Cip در گستره‌ی خطی ۰٫۱-۳۰۰ µM مورد تایید قرار گرفت.

منابع

[1] Xiao J, Liu M, Tian F, Liu Z. (2021). Stable Europium-based Metal–Organic Frameworks for Naked-eye Ultrasensitive Detecting Fluoroquinolones Antibiotics. Inorganic Chemistry, 60(7), 5282-5289.

[2] Wang B, Yan B. (2020). A turn-on fluorescence probe Eu3+ functionalized Ga-MOF integrated with logic gate operation for detecting ppm-level ciprofloxacin (CIP) in urine. Talanta, 208, 120438.

[3] Fang X, Chen X, Liu Y, Li Q, Zeng Z, Maiyalagan T, Mao S. (2019). Nanocomposites of Zr (IV)-based metal–organic frameworks and reduced graphene oxide for electrochemically sensing ciprofloxacin in water. ACS Applied Nano Materials, 2(4), 2367-2376.

[4] Liu X, Wang T, Lu Y, Wang W, Zhou Z, Yan Y. (2019). Constructing carbon dots and CdTe quantum dots multi-functional composites for ultrasensitive sensing and rapid degrading ciprofloxacin. Sensors and Actuators B: Chemical, 289, 242-251.

[5] Gao X, Zhou X, Ma Y, Qian T, Wang C, Chu F. (2019). Facile and cost-effective preparation of carbon quantum dots for Fe3+ ion and ascorbic acid detection in living cells based on the “on-off-on” fluorescence principle. Applied Surface Science, 469, 911-916.

[6] Guo X, Yue G, Huang J, Liu C, Zeng Q, Wang L. (2018). Label-free simultaneous analysis of Fe (III) and ascorbic acid using fluorescence switching of ultrathin graphitic carbon nitride nanosheets. ACS applied materials & interfaces, 10(31), 26118-26127.

[7] Dong W, Yu J, Gong X, Liang W, Fan L, Dong C. (2021). A turn-off-on near-infrared photoluminescence sensor for sequential detection of Fe3+ and ascorbic acid based on glutathione-capped gold nanoclusters. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 247, 119085.

[8] Chen J, Jiang S, Wang M, Xie X, Su X. (2021). Self-assembled dual-emissive nanoprobe with metal− organic frameworks as scaffolds for enhanced ascorbic acid and ascorbate oxidase sensing. Sensors and Actuators B: Chemical, 339, 129910.

[9] Xu X, Ren D, Chai Y, Cheng X, Mei J, Bao J, Cen Y. (2019). Dual-emission carbon dots-based fluorescent probe for ratiometric sensing of Fe (III) and pyrophosphate in biological samples. Sensors and Actuators B: Chemical, 298, 126829.

[10] Xie W, Tian M, Luo X, Jiang Y, He N, Liao X, Liu Y. (2020). A dual-mode fluorescent and colorimetric immunoassay based on in situ ascorbic acid-induced signal generation from metal-organic frameworks. Sensors and Actuators B: Chemical, 302, 127180.

[11] Ma Y, Xu G, Wei F, Cen Y, Xu X, Shi M, Hu Q. (2018). One-pot synthesis of a magnetic, ratiometric fluorescent nanoprobe by encapsulating Fe3O4 magnetic nanoparticles and dual-emissive rhodamine B modified carbon dots in metal–organic framework for enhanced HClO sensing. ACS applied materials & interfaces, 10(24), 20801-20805.

[12] Chen X, Tong R, Shi Z, Yang B, Liu H, Ding S, Fang W. (2018). MOF nanoparticles with encapsulated autophagy inhibitor in controlled drug delivery system for antitumor. ACS applied materials & interfaces, 10(3), 2328-2337.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

طراحی و بهینه سازی پرایمر دژنره جهت بررسی تغییرات بیان ژن: ژن AMPK کرم خاکی *Eisenia fetida*، به عنوان یک گزارش اولیه

نیمامحسنی[۱]؛ اباصلت حسین‌زاده کلاگر[۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۲. استادتمام گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: ahcolagar@umz.ac.ir

چکیده

مقدمه: امروزه آنتی اکسیدان‌ها و اثراتی که در تغییرات بیان ژن‌ها، درمان بیماری‌ها و یا برخی از بیومارکرهای زیستی همچون کرم خاکی گونه *Eisenia fetida* دارند، توجه محققین زیادی را در زیست شناسی مولکولی، به خود جلب نمودند. یکی از این ژن‌های مهم، ژن *AMPK*، در پایین دست مسیر پیام رسانی آنتی اکسیدان‌ها است که هیچگونه اطلاعاتی از آن در بانک داده ثبت و گزارش نشد. برای این منظور استفاده از پرایمر دژنره، که احتمال حضور چندین نوکلئوتید بـه طـور هـم‌زمـان در برخی از موقعیت‌های آن را نشان می‌دهد، مورد توجه می‌باشد، اما طراحی و بهینه سازی این قبیل پرایمرها همواره از بحث‌های جدل برانگیز است.

هدف: طراحی و بهینه‌سازی پرایمرهای دژنره جهت شناسایی تغییرات بیان ژن *AMPK* کرم خاکی گونه *E. fetida* است.

روش کار: برای این منظور ابتدا زیر شاخه (کلاد) چرخ زیان (Lophotrochozoa) از پروتوستوم‌ها به عنوان نزدیکترین گونه‌های جانوری به گونه *E. fetida*، انتخاب شد. سپس توالی‌های آمینواسیدی AMPKی ثبت شده در پایگاه های ژنی از ۲۳ گونه مختلف این زیرشاخه استخراج شدند. همترازی این توالی‌ها و همچنین تعیین و حذف توالی‌هایی که شباهت کمتری به اکثر توالی‌ها دارند، با استفاده از نرم افزار MEGA X صورت گرفت. طراحی پرایمر دژنره، با استفاده از نرم افزار J-کدهاپ (J-CODEHOP) انجام شد.

نتایج و بحث: با تجزیه و تحلیل پرایمرهای دژنره مختلف طراحی شده توسط نرم افزار J-کدهاپ، پرایمر روبه جلوی VDYC16x-f با توالی 5'-GCAGATCATCTCCGGAgtngaytaytg و پرایمر معکوس DGEF32x-r با توالی 5'-GCAGGATGTTCGCAGraaytcnccrtc، انتخاب شده‌اند که حروف بزرگ و کوچک در این توالی‌های اولیگومری به ترتیب نشان‌دهنده توافقی و دژنره بودن آن است. این دو پرایمر با دژنرسی ≤۶۴ و محدوده Tm نزدیک به هم، برای تکثیر قطعه ۱۵۹ جفت بازی ژن *AMPK* مناسب می-

باشند. با توجه به حساس بودن پروتئین AMPK به میزان انرژی سلولی با عملکرد در پایین دست مسیر پیام رسانی آنتی اکسیدان‌ها و به عنوان یک مارکر مولکولی دراین مسیر، این توالی پرایمری دژنره می‌تواند در بررسی تغییرات بیان رونوشت‌های ژن آن مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پرایمر دژنره؛ ژن *AMPK*؛ کرم خاکی؛ *Eisenia fetida*

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Designing and Optimization of Degenerate Primers to Investigate Changes of Gene Expression: *AMPK* gene of *Eisenia fetida* Earthworms, As a First Report

Nima Mohseni[1], Abasalt Hosseinzadeh Colagar[2]*

1. MSc. student, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2. Full professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

*Corresponding author e-mails: ahcolagar@umz.ac.ir

Introduction: Today, antioxidants and their effects on gene expression changes, disease treatment, or some biological biomarkers, such as the earthworm *Eisenia fetid*a species, have attracted the attention of many researchers in molecular biology. One of important genes, the *AMPK* gene, is located in downstream of the antioxidant signaling pathway, and no information about it was reported in the database. For this purpose, the use of degenerate primers, which show the possibility of the presence of several nucleotides at the same time in some of its positions, is of interest, but the design and optimization of such primers is always controversial.
Purpose: Design and optimization of degenerate primers to detect changes in *AMPK* gene expression of earthworm *E. fetida* species.
Methods: For this purpose, first, the Lophotrochozoa sub-branch (clade) of the protostomes was selected as the closest animal species to *E. fetida*. Then the AMPK amino acid sequences recorded in gene databases were extracted from 23 different species of this subspecies. The alignment of these sequences as well as the determination and removal of sequences that are less similar to most sequences were done using MEGA X software. Degenerate primer design was done using J-CODEHOP software.
Results and discussion: By analyzing different degenerate primers designed by J-codehop software, the forward primer VDYC16x-f with sequence 5'-GCAGATCATCTCCGGAGtngaytaytg and the reverse primer DGEF32x-r with sequence 5'-GCAGGATGTTCGCAGraaytcnccrtc were selected. Of note, uppercase and lowercase letters in these oligomeric sequences indicate consensus and degeneracy, respectively. These two primers, which have a degeneracy of ≤64 with a Tm range close to each other, are suitable for this gene in order to amplify the 159 bp fragment. Considering the sensitivity of the AMPK protein to the amount of cellular energy by acting downstream of the antioxidant signaling pathway and as a molecular marker in this pathway, this degenerate primer sequence can be used to investigate changes in the expression of its gene transcripts.
Keywords: Degenerate primer; *AMPK* gene; Earth worm; *Eisenia fetida*.

مقدمه

امروزه غالب طراحی پرایمرها جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction/PCR) مستلزم شناخت توالی ژنومی ارگانیسم و یا ژن هدف در پایگاه‌های داده ژنی است. با این حال، در برخی موقعیت‌ها، جهت شناسایی توالی‌های ناشناخته، طراحی پرایمر PCR معمولاً مبتنی بر ترجمه معکوس توالی‌های هم‌تراز در مناطق حفاظت‌شده پروتئین‌ها صورت می‌گیرد [۱]. پرایمرهای PCR برای کاربردهای بسیاری از جمله تقویت، بیان ژن، شبیه سازی، تشخیص جهش، جهش زایی و غیره طراحی می‌شوند. برای اینکه PCR به ابزاری خاص، کارآمد برای محققان تبدیل شود انتخاب پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی مناسب هدف آزمایش اهمیت فراوانی دارد. با توجه به تکامل ژنوم موجودات و شکل‌گیری گونه‌ها توالی آمینواسید-های یک پروتئین در بین گونه‌ها حفظ می‌شوند، در حالیکه کدون‌های مربوطه ممکن است به دلیل دژنره شدن متفاوت باشند [۲]. اگر ارگانیسم مورد نظر بسیار نزدیک به گونه‌ی موردنظر باشد، ژن ممکن است به سادگی با PCR تکثیر شود و با استفاده از الیگونوکلئوتیدهایی که بر روی داده‌های توالی شناخته شده طراحی شده اند، توالی‌یابی شود. متأسفانه، جهش‌های مترادف مکرر هستند و یک تغییر تک‌نوکلئوتیدی در ناحیه‌ای که اولیگونوکلئوتید خاص قرار است متصل شود، اغلب برای جلوگیری از اتصال صحیح پرایمر و تشکیل محصول PCR کافی است [۳]. وجود دژنرگی بین پرایمر و توالی هدف می‌تواند پایداری دو رشته تشکیل شده را تحت تأثیر قرار دهد و همچنین ممکن است اثرات شدیدی بر اختصاصیت PCR داشته باشد. دنباله پرایمر PCR در صورتی دژنراته نامیده می‌شود که برخی از موقعیت‌های آن دارای چندین پایه احتمالی باشند [۱]. اثر دژنرگی در توالی پرایمر روی کارایی PCR، به عوامل مختلفی از قبیل محل دژنرگی، دمای اتصال پرایمر به الگو، طول پرایمر و حضور کاتیون‌های یک یا دو ظرفیتی بستگی دارد [۴]. در این مطالعه از یک استراتژی طراحی پرایمر CODEHOP (Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer) برای تکثیر توالی‌های ژنی مرتبط با فاصله دور براساس پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی هیبریدی استفاده شده‌است. این درحالی است که طراحی پرایمرهای دژنره در روش‌های قبلی یا بصورت دستی و یا توافقی انجام می‌شد. در روش دستی از مجموعه‌ای از پرایمرهای حاوی بیشتر یا تمام توالی‌های نوکلئوتیدی ممکن که یک موتیف آمینو اسید حفاظت‌شده را کد می‌کردند، استفاده می‌شد. در این روش پرایمرهای دژنره را به صورت دستی و با بررسی هم‌ترازی‌های متعدد توالی‌های هدف طراحی می‌نمودند. اما در طراحی پرایمرهای دژنره توافقی از یک پرایمر منفرد حاوی رایج‌ترین نوکلئوتید در هر موقعیت کدون درون موتیف بود استفاده می‌شد. اگرچه این استراتژی‌ها در جداسازی توالی‌های نزدیک به هم موفق بوده‌اند، اما معمولاً زمانی که توالی‌ها از جانوران با فاصله دورتر بودند غالبا ناتوان بودند [۵]. برای طراحی پرایمر دژنره با استفاده از استراتژی طراحی پرایمر CODEHOP از ژن پروتئین کیناز فعال شونده با آدنوزین مونوفسفات (Adenosine monophosphate protein kinase/AMPK) کرم خاکی به عنوان یک

مدل جهت مطالعات درون‌تنی (*in vivo*) که یک شاخص (بیومارکر) زیستی نیز است، به دلایل زیر استفاده شد.

استفاده از مدل حیوانی مهره‌دار با توجه به هزینه بالا، سختی در تهیه و پرورش آن‌ها، سرعت رشد و تکثیر کم، فرصت قابل توجهی برای بکارگیری جانوران کوچک‌تر و به‌خصوص بی‌مهره فراهم کرده‌است [۶]. از جمله این جانوران بی‌مهره می‌توان به کرم‌ها به‌خصوص کرم‌های خاکی (*Eisenia fetida*) اشاره نمود. این کرم‌ها با توجه به سازمان بدنی نسبتا ساده، سهولت در پرورش، طول نسل کوتاه و سرعت رشد و تکثیر بالا به‌عنوان کاندید مناسب برای این قبیل مطالعات اشاره کرد. این گونه از سوی بسیاری از دستورالعمل‌های بین المللی از قبیل ISO (International organization for standardization) و OECD (Organisation for economic co-operation and development) به‌عنوان گونه مدل و استاندارد برای این قبیل تست‌ها از جمله زیست پزشکی [۷] و سم شناسی به عنوان یک شاخص زیستی [۸] استفاده می‌شود.

از طرف دیگر گزارشات نشان می‌دهد ژن *AMPK* می‌تواند به‌عنوان مارکر ژنی برای بررسی تغییرات بیان ژن در پایین دست مسیر پیام‌رسانی آنتی‌اکسیدانی کاربرد داشته باشد. چرا که این ژن پروتئین AMPK، که حساس به میزان انرژی سلولی است، را کد می‌کند که از طریق فسفوریلاسیون مستقیم آنزیم‌های متابولیک و تنظیم‌کننده‌های رونویسی عمل می‌کند. پروتئین AMPK عموما دارای ۷ زیرواحد ($\alpha_1\alpha_2\beta_1\beta_2\gamma_1\gamma_2\gamma_3$) می‌باشد که زیرواحدهای کاتالیتیکی آن α_2 است. این پروتئین در پاسخ به افزایش AMP نسبت به ATP درون سلولی، مسیرهای تولید انرژی را فعال می‌کند و فرآیندهای مصرف‌کننده انرژی نظیر بیوسنتز پروتئین، کربوهیدرات، لیپید و همچنین رشد و تکثیر سلولی را مهار می‌کند [۹].

با توجه به عدم وجود توالی برای ژن *AMPK* در پایگاه‌های مختلف داده و اهمیتی که پروتئین کدشده آن در حفظ هومئوستازی و تنظیم متابولیسم انرژی سلولی ایفا می‌کنند، دارد. در این پژوهش، طراحی پرایمر دژنره مناسب برای جداسازی ژن *AMPK* کرم خاکی گونه *E. fetida* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب جمعیت هدف و ژن موردنظر: به منظور انتخاب نزدیکترین جانوران به گونه *E. fetida*، ابتدا زیر شاخه (کلاد) چرخ زیان (Lophotrochozoa) از گروه پروتوستوم‌ها (دهان‌نخستیان) با توجه به رده بندی تاکسونومی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) انتخاب گردید (شکل۱-A). سپس توالی های ژنی و آمینواسیدی پروتئین AMPK که در این پایگاه از گونه‌های مختلف این زیر شاخه ثبت شده‌اند، جمع‌آوری گردیدند (جدول ۱).

هم ترازی و رسم درخت فیلوژنی: همترازی توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با استفاده از نرم افزار MEGA X [۱۰] جهت شناسایی حذف‌ها و یا توالی‌هایی که شباهت کمی نسبت به سایر توالی‌ها داشتند، انجام شد. آنالیز بیشینه درستنمایی (Maximum likelihood) و ترسیم درخت فیلوژنتیک برای توالی-

های به دست آمده در فرمت FASTA جهت رویت تاریخچه تکامل جانوران مورد بررسی با استفاده از همین نرم افزار جهت سنجش حدود اطمینان برای این زیرشاخه، با تکرار ۱۰۰= Bootstrap انجام شد.

طراحی و بهینه سازی پرایمر دژنره با استراتژی CODEHOP: جهت طراحی پرایمر دژنره، از نرم افزار J-CODEHOP base-by-base [۱۱]، که براساس پیش‌بینی پرایمرهای CODEHOP از بلوک‌های توالی آمینواسیدهای حفاظت‌شده، است، استفاده شد. پس از اعمال تنظیمات و پردازش اطلاعات توسط نرم افزار، لیست پرایمرهای دژنره پیشنهادی با درنظر گرفتن میزان دژنریسی (انحطاط) و محدوده Tm، و انتخاب کدون (Codon usage) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث:

انتخاب جمعیت ژنی بهینه: از آنجائیکه هیچگونه توالی ژنی یا آمینواسیدی از ژن و یا پروتئین AMPK در پایگاه‌های داده از گونه *E. fetida* ثبت و گزارش نشد. در گام نخست نزدیکترین جانوران به گونه *E. fetida* می‌باشد. برای این منظور می‌توان از مطالعات مورفومتری تاکسونومیکی و یا از مارکرهای مولکولی مورد توافق از جمله توالی مارکرهای هسته ای مثل 18SrRNA یا ITS (Internal transcribed spacer) و یا مارکر میتوکندریایی مثل ژن COI ثبت شده در پایگاه‌های داده برای یافتن دقیق‌تر گونه‌ها یا جانوران دارای بیشترین تشابه ژنی به جانور موردنظر است، استفاده نمود. در این مطالعه از مارکرهای مولکولی هسته ای برای یافتن نزدیکترین جانوران به گونه *E. fetida*، که از قبل گزارش شد، استفاده شد [۱۲]. براین اساس از زیر شاخه (کلاد) چرخ زیان انتخاب گردید (شکل A-۱). سپس ۲۳ توالی ژنی و آمینو اسیدی هریک از زیر واحدهای α_2 (زیرواحد کاتالیتیکی) پروتئین‌های AMPKی که در این پایگاه ژنی از گونه‌های مختلف این زیر شاخه ثبت شده‌اند، جمع‌آوری شدند (جدول ۱) و درخت فیلوژنتیک براساس توالی نوکلئوتیدی کد کننده زیر واحدهای α_2 ژن *AMPK* رسم شد (شکل B-۱). مقادیر Bootstrap در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدهای، از درجه اعتماد قابل قبولی برخوردار است.

استراتژی CODEHOP به عنوان یک روش مناسب در طراحی پرایمر دژنره: در این روش طراحی پرایمرهای دژنره برنامه‌هایی با الگوریتم‌های مختلفی که در دسترس هستند، صورت می‌گیرد و پرایمرهایی بر مبنای توالی‌های پروتئینی هم‌تراز به منظور شناسایی یکه ناحیه از توالی DNA موردنظر طراحی می‌کند. از جمله این الگوریتم‌ها، برنامه J-CODEHOP است. پرایمرهای طراحی شده بر این اساس دارای یک ناحیه توالی دژنره در دم 3'-OH (3'-Degenerate core) که معمولاً با انحطاط حداکثر ۱۲۸ می‌باشد و یک ناحیه توالی توافقی در سر 5'-P (5'-Consensus clamp) است، که نقش تنظیم دمای اتصال را برعهده دارد می‌باشد [۱۳]. ناحیه ۴-۳ آمینواسیدی 3'-Degenerate core شامل نوکلئوتیدهای دژنره می‌باشد. ناحیه 5'-Consensus clamp برخلاف ناحیه 3'، یک منطقه همگن حاوی یک توالی نوکلئوتیدی توافقی منفرد است که دارای رایج ترین نوکلئوتید مشتق شده از توالی‌های همتراز شده می‌باشد. بنابراین استراتژی طراحی

پرایمر CODEHOP بر مشکلات هر دو روش پرایمر دژنره دستی و توافقی غلبه می‌کند [۱۴]. برای شناسایی و مشخص کردن پرایمرهای دژنره با استراتژی CODEHOP برای ژن ناشناخته *AMPK*، توالی‌های آمینو اسید ژن *AMPK* از ۲۳ ژنوم مختلف در یک راستا قرار گرفتند و در مجموع ۸۰۰۴۷ موقعیت در مجموعه داده نهایی وجود داشت (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات توالی ژنی *AMPK* ثبت شده در پایگاه‌های ژنی از گونه‌های مختلف شاخه (کلاد) چرخ زیان از گروه پروتوستوم‌ها

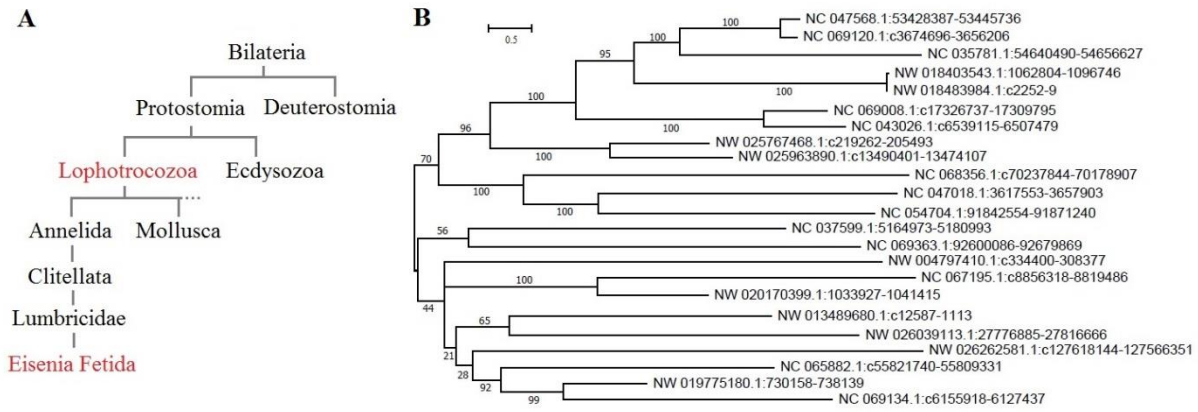
No	Name/Gene ID	Scientific Name	No. P.V*	No	Name/Gene ID	Scientific Name	No. P. V
1	LOC111121839**/ NC_035781.1***	*Crassostrea virginica*	15	13	LOC125669795/ NW_026039113.1	*Ostrea edulis*	18
2	LOC110449031/ NW_018403543.1	*Mizuhopecten yessoensis*	5	14	LOC123524031/ NC_069363.1	*Mercenaria mercenaria*	18
3	LOC105341321/ NC_047568.1	*Crassostrea gigas*	18	15	LOC121376464/ NC_054704.1	*Gigantopelta aegis*	1
4	LOC106153756/ NW_019775180.1****	*Lingula anatina*	2	16	LOC115226336/ NC_043026.1	*Octopus sinensis*	1
5	LOC112574032/ NC_037599.1	*Pomacea canaliculata*	2	17	LOC101852761/ NW_004797410.1	*Aplysia californica*	1
6	LOC117324994/ NC_047018.1	*Pecten maximus*	4	18	LOC110444361/ NW_018483984.1	*Mizuhopecten yessoensis*	1
7	LOC106080129/ NW_013489680.1	*Biomphalaria glabrata*	2	19	LOC126818992/ NC_065882.1	*Patella vulgate*	2
8	EGR_03655/ NW_020170399.1	*Echinococcus granulosus*	1	20	LOC124260095/ NW_025767468.1	*Haliotis rubra*	1
9	LOC127733673/ NW_026262581.1	*Mytilus californianus*	9	21	LOC124113732/ NW_02596389a;0.1	*Haliotis rufescens*	1
10	LOC127867508/ NC_068356.1	*Dreissena polymorpha*	13	22	LOC106875312/ NC_069008.1	*Octopus bimaculoides*	2
11	LOC128213881/ NC_069134.1	*Mya arenaria*	11	23	PRKAA2_1/ NC_067195.1	*Schistosoma haematobium*	2
12	LOC128165229/ NC_069120.1	*Crassostrea angulata*	16	-	-	-	-

*Number of Protein Variant; **Laryngo-onycho-cutaneous syndrome; ***NC represents sequence of chromosomes; ****NW represent various genomic scaffolds

پس از ارزیابی دژنراسیون کدون در داخل بلوک‌های آمینواسیدی، نهایتا یک بلوک برای طراحی پرایمر توسط نرم افزار پیشنهاد شد و در نهایت پرایمر روبه جلوی VDYC16x-f با توالی 5'-GCAGATCATCTCCGGAgtngaytaytg و پرایمر معکوس DGEF32x-r با توالی 5'-GCAGGATGTTCGCAGraaytcnccrtc، که در این توالی‌های اولیگومری حروف بزرگ و کوچک به ترتیب نشان دهنده توالی توافقی در سر 5'-P و توالی دژنره در دم 3'-OH است، انتخاب شدند(جدول ۲). از چالش‌های این روش طراحی می‌توان به عدم تطابق بین توالی توافقی در سر 5'-P و توالی هدف اشاره کرد. از آنجاییکه این ناحیه دور از محل گسترش یا همان توالی دژنره در دم 3'-OH قرار دارد، بنابراین اثرات

مخرب آن‌ها جهت شروع گسترش رشته DNA و پلیمراز به حداقل می‌رسد. از طرف دیگر با توجه به نامعلوم بودن میزان تشکیل دایمر بین پرایمرها است، می‌توان از روش Asymetric PCR از تشکیل این مورد نیز جلوگیری کرد. چرا که در این روش برهم‌کنشی بین دو پرایمر ایجاد نمی‌شود. یکی دیگر از مواردی که می‌تواند احتمال شناسایی ناحیه ژنی مدنظر را کاهش دهد ایجاد باندهای متعدد روی ژل الکتروفورز می‌باشد. که جهت جلوگیری از ایجاد چند باند در ژل الکتروفورز می‌توان از روش Hemi nested PCR جهت محدود کردن توالی دارای ژن مورد نظر است، استفاده کرد. همچنین با توجه به تفاوت انتخاب کدون در گونه‌های مختلف و حتی در ژن‌های موجود در یک سلول و با توجه به عدم وجود ژن مورد مطالعه و نداشتن اطلاعات در مورد انتخاب کدون، احتمال جایگذاری اشتباه نوکلئوتید نیز وجود دارد [۱۵].

با توجه به یافته های این مطالعه و با توجه به حساس بودن پروتئین *AMPK* به میزان انرژی سلولی با عملکرد در پایین دست مسیر پیام رسانی آنتی اکسیدان‌ها و به عنوان یک مارکر مولکولی دراین مسیر، این جفت توالی پرایمری دژنره می‌تواند در بررسی تغییرات بیان رونوشت‌های ژن آن مورد استفاده قرار گیرد.

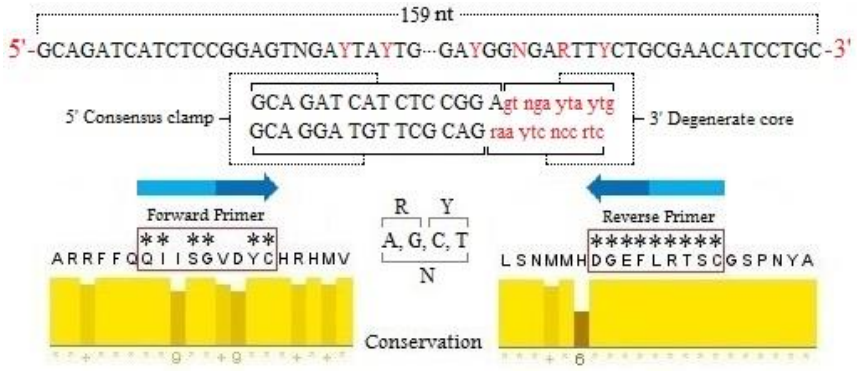


شکل ۱: دو درخت فیلوژنی مربوط به ژن *AMPK* در جانوران مورد بررسی در کلاد چرخ زیان: A) درخت فیلوژنی مربوط به کلاد چرخ زیان؛ B) درخت فیلوژنتیک ژن *AMPK* در جانوران مورد بررسی در کلاد چرخ زیان. درصد درختانی که در آن‌ها گونه‌های مرتبط با هم جمع شده‌اند در کنار شاخه‌ها نشان داده شد. تاریخچه تکامل با استفاده از روش Maximum likelihood استنباط شد. درخت به مقیاس کشیده شده‌است و با طول شاخه‌ها در تعداد جانشینی در هر سایت اندازه‌گیری می‌شود.

جدول ۲: مشخصات توالی پرایمر ژن *AMPK*

Priner names	Oligomer 5'→3'	Characteristics			
		ClL	CAT (°C)	CoL	CoD
VDYC16x-f*	5'-GCAGATCATCTCCGGAgtngaytaytg	16 bp	61.32	4 aa (11 bp)	16
DGEF32x-r*	5'-GCAGGATGTTCGCAGraaytcnccrtc	15 bp	61.75	4 aa (12 bp)	32

*f and r in the end of oligomer names indicate forward and reverse, respectively; ** ClL=Clamp Lentgh, CAT= Clamp Annealing Temp, Core Length, CoL= Core Length, CoD= Core Degeneracy



شکل ۲: پرایمر پیش بینی شده توسط نرم افزار J-CODEHOP (Base-by-Base)

منابع

Linhart C, Shamir R. (2005). The degenerate primer design problem: theory and applications. Journal of Computational Biology. 12(4), 431-456.

Chukwuemeka PO, Umar HI, Olukunle OF, Oretade OM, Olowosoke CB, Akinsola EO, *et al*. (2020). In silico design and validation of a highly degenerate primer pair: a systematic approach. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 18, 1-17.

Lang M, & Orgogozo V. (2011). Identification of homologous gene sequences by PCR with degenerate primers. Molecular methods for evolutionary genetics. 772, 245-56.

Kwok S, Chang SY, Sninsky JJ, and Wang A. 2009.Guide to the Design and Use of Mismatched and Degenerate Primers. Genome Research. 3, 539-47.

Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S. (1998) Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. Nucleic Acids Research. 26(7), 1628-35.

Davidson MK, Lindsey JR, and Davis JK. (1987). Requirements and selection of an animal model. Israel Journal of Medical Sciences. 23(6), 551-555.

Plytycz B, Bigaj J, Osikowski A, Hofman S, Falniowski A, Panz T, *et al*. (2018). The existence of fertile hybrids of closely related model earthworm species, Eisenia andrei and *E. fetida*. PLOS ONE. 13(1), e0191711.

Sinkakarimi MH, Solgi E, and Colagar AH. (2020). Subcellular partitioning of cadmium and lead in *Eisenia fetida* and their effects to sperm count, morphology and apoptosis. Ecotoxicology and Environmental Safety. 187, 109827.

Towler MC, Hardie DG. (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. Circulation Research. 100(3), 328-41.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 35,1547-49.

Rose TM, Henikoff JG, and Henikoff S. (2003). CODEHOP (COnsensus-DEgenerate hybrid oligonucleotide primer) PCR primer design. Nucleic acids research. 31(13), 3763-66.

Paps J, Baguna J, Riutort M. (2009). Lophotrochozoa internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 276(1660), 1245-54.

Najafabadi HS., Torabi N, Chamankhah M. (2008). Designing multiple degenerate primers via consecutive pairwise alignments. BMC Bioinformatics, 9(27), 1-8.

Staheli, JP, Boyce R, Kovarik D, Rose TM. (2011). CODEHOP PCR and CODEHOP pcr primer design. PCR Protocols. 687, 57-73.

Parvathy ST, Udayasuriyan V, Bhadana V. Codon usage bias. (2022). Molecular Biology Reports. 49, 539-65.

سنتز و شناسایی کمپلکسی جدید از Pd(II) با لیگاند پیرولیدین و بررسی برهمکنش آن با CT-DNA به کمک طیف سنجی جذب الکترونی

معصومه کمالی دلجو، خاطره عبدی*، حسن منصوری ترشیزی
گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
k.abdi@chem.usb.ac.ir

چکیده

در این پژوهش، کمپلکسی جدید از پالادیم (II) با فرمول *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ (pyrr = پیرولیدین) تهیه شد. ساختار این کمپلکس با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی FT-IR، ^{1}H-NMR و UV-Vis شناسایی گردید. بررسی برهم‌کنش کمپلکس سنتز شده با DNA غده تیموس گوساله در دو دمای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین به کمک تیتراسیون جذب الکترونی انجام شد. در مطالعات طیف‌سنجی جذب الکترونی، مقادیر ثابت ظاهری پیوند (K_{app}) بین کمپلکس سنتز شده و DNA در دمای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین به‌ترتیب برابر $۱/۳ \times ۱۰^۳$ و $۳/۵ \times ۱۰^۳$ M^{-1} محاسبه گردید. مقادیر $L_{1/2}$ (غلظتی از کمپلکس که در آن غلظت، نیمی از DNA موجود در محیط از حالت طبیعی به غیرطبیعی تبدیل می‌شود) در دو دمای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین به‌ترتیب ۰/۱۶ و ۰/۱۰ mM به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده از طیف‌سنجی UV-Vis حاکی از برهم‌کنش نسبتاً قوی کمپلکس سنتز شده با CT-DNA بوده و انتظار می‌رود این برهم‌کنش از نوع شیاری باشد.

کلمات کلیدی: کمپلکس پالادیم، پیرولیدین، برهم‌کنش با DNA، طیف سنجی جذب الکترونی

Synthesis and characterization of a new Pd(II) complex with pyrrolidine ligand and its interaction with CT-DNA by electronic absorption spectroscopy

ABSTRACT

In this study, a new Pd (II) complex of formula *cis*-$[Pd(pyrr)_2cl_2]$ (pyrr = pyrrolidine) was synthesized. The structure of the complex was determined using FT-IR, UV-Vis and ^{1}H-NMR. The interaction of the synthesized complex with calf thymus DNA (CT-DNA) was studied by electronic absorption spectroscopy at two temperatures of 303 and 310 K. In electron absorption spectroscopy studies, the apparent constant values of the bond (K_{app}) between the synthesized complex and DNA were calculated to be 1.3×10^3 M^{-1} and 3.5×10^3 M^{-1} at 303 and 310 K, respectively. The values of $L_{1/2}$ (the concentration of the complex at which the fifty percent of DNA present in the environment was changed from nature to denature) were obtained 310 K 0.16 and 0.10 mM, at 303 and 310 K, respectively. The results of UV-Vis indicate a moderate interaction of the complex synthesized with calf thymus DNA, which is probably done via groove binding.

Keywords: Palladium complex, pyrrolidine, DNA interaction, electronic absorption spectroscopys

۱- مقدمه

سرطان بیماری است که در آن سلول‌های طبیعی به صورت کنترل نشده‌ای شروع به رشد و تقسیم می-کنند. نتیجه این تقسیم غیرطبیعی ایجاد توده‌ای به نام تومور است که می‌تواند خوش‌خیم و یا بدخیم باشد. [۱] . تاکنون از روش‌های متعددی مانند جراحی، پرتودرمانی و دارودرمانی برای درمان سرطان استفاده شده است اما هیچ کدام از این روش‌ها درمان قطعی سرطان نیستند. از جمله ترکیباتی که به عنوان دارو در شیمی‌درمانی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود کمپلکس‌های فلزی بوده که فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی از قبیل فعالیت ضدتوموری، ضدباکتریایی و ضدمیکروبی از خود نشان می‌دهند [۲]. سیس-پلاتین با ساختار مربع مسطح، اولین دارو بر پایه فلز است که به‌صورت رسمی برای درمان سرطان در پزشکی استفاده شد [۳]. سیس-پلاتین یکی از مؤثرترین داروهای ضدسرطان است و در درمان سرطان بیضه، تخمدان، سر و گردن و ریه مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. این دارو برای درمان سرطان‌های سینه و کولن اثر کمی دارد و دارای عوارض جانبی مانند ریزش مو، تهوع، سردرد و ... می‌باشد. از معایب دیگر مصرف این دارو سمیت کلیوی، گوارشی، شنوایی، عصبی و مهار مغز استخوان و مقاوم شدن سلول‌های سرطانی بعد از چند دوره مصرف این دارو است [۵-۷]. شیمیدان‌ها کمپلکس‌های فلزات دیگر مانند: پالادیم، روتنیم، آهن، کبالت، نیکل، مس و روی را از نظر فعالیت بیولوژیکی مورد بررسی قرار دادند [۸]. از بین کمپلکس-های گروه پلاتین (Pd , Ru, Rh, Ir) کمپلکس‌های پالادیم(II) چون از نظر ساختاری و فرآیند تشکیل شباهت زیادی به کمپلکس‌های پلاتین(II) دارند، برای استفاده دارویی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. در کمپلکس‌های پالادیم به دلیل واکنش‌پذیری بیشتر نسبت به کمپلکس‌های پلاتین (۱۰۵ برابر سریعتر)، فرآیند هیدرولیز و جایگزینی لیگاند سریع‌تر انجام می‌شود و سبب تفکیک آسان و تشکیل گونه‌های فعال برای رسیدن به اهداف دارویی می‌شود [۹]. پیرولیدین (pyrrolidine) یک ترکیب هتروسیکل نیتروژن‌دار است که چهار پل متیلن ($-CH_2-$) و یک پل آمین ($-NH-$) دارد. پیرولیدین به‌طور گسترده توسط شیمیدانان دارویی برای سنتز ترکیبات جدید جهت درمان انواع بیماری‌های انسانی مورد استفاده قرار گرفته است. اتم نیتروژن پیرولیدین به حلقه خصلت بازی می‌دهد و به دلیل ویژگی هسته‌دوستی نیتروژن، مکان مناسبی برای واکنش جانشینی است به‌طوری‌که ۹۲درصد از تمام داروهای پیرولیدین تأیید شده توسط FDA در موقعیت N جایگزین شده‌اند [۱۰]. لذا در این پژوهش، یک کمپلکس آنالوگ پالادیم از سیس-پلاتین با لیگاند آمین آلیفاتیک حلقوی پیرولیدین طراحی، سنتز و شناسایی شد. برهم‌کنش این کمپلکس با CT-DNA که هدف اصلی اکثر داروهاست و می‌تواند منجر به خواص بیولوژیکی و ضدتوموری کمپلکس شود، به کمک روش طیف‌سنجی جذب الکترونی UV بررسی شد. هدف از این مطالعه، تعیین برهم‌کنش کمپلکس با DNA از دیدگاه کمی و کیفی است.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و دستگاه‌ها

مواد شیمیایی مورد نیاز برای سنتز کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ از شرکت مرک با درصد خلوص <۹۹٪ تهیه شد که این مواد شامل پالادیم (II) کلرید، پتاسیم کلرید، پیرولیدین و هیدورکلریک اسید می‌باشند. در این سنتز، از آب دوبار تقطیر به عنوان حلال سنتز و از استن مرک جهت خالص‌سازی استفاده گردید. برای بررسی برهم‌کنش کمپلکس سنتز شده با DNA، از DNA غده تیموس گوساله (CT-DNA) با درجه پلیمرزاسیون بالا که از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شده بود، استفاده گردید. تریس بافر نیز از شرکت مرک تهیه شد. برای ثبت طیف‌های مادون قرمز از دستگاه FT-IR شرکت بروکراستفاده شد و طیف‌ها در محیط قرص KBr و در محدوده طیفی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ ثبت شدند. طیف ^{1}H-NMR کمپلکس سنتز شده با دستگاه FT-NMR شرکت بروکر مدل Avance 300 MHz در محدوده ppm ۰-۱۲ در حلال $DMSO-d_6$ و در حضور TMS به عنوان استاندارد داخلی، ثبت شد. طیف‌های جذب الکترونی به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتویی شرکت PG Instrument مدل T80 و با استفاده از سل کوارتز به طول ۱ سانتی‌متر و حجم ۳/۵ میلی‌لیتر، ثبت شدند.

۲-۲- روش سنتز کمپلکس cis-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$

در یک بشر، مقدار ۴ میلی مول (۰/۷۱ گرم) از $PdCl_2$ و ۲۰ میلی مول (۱/۵ گرم) پتاسیم کلرید به ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه و در دمای ۷۰-۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه همزده شد. مخلوط واکنش بعد از خنک شدن به وسیله‌ی کاغذ صافی صاف شد. محلول زیر صافی که یک محلول قهوه‌ای رنگ شفاف است، حاوی $K_2[PdCl_4]$ می باشد. در بشری جداگانه، ۷/۵ میلی مول (معادل ۱ میلی‌لیتر) از لیگاند پیرولیدین در ۲۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل و با استفاده از هیدروکلریک اسید pH آن برروی۶ تنظیم شد. سپس این محلول را قطره قطره به محلول $K_2[PdCl_4]$ که درحال همزدن است، اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط همزده شد. سپس مقدار ۷/۵ میلی مول از لیگاند پیرولیدین را در ۲۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل و به ظرف واکنش اصلی که در حال هم خوردن است، اضافه گردید. pH مخلوط واکنش به وسیله‌ی محلول HCl ۱ مولار به دقت برروی ۶ تنظیم شد. در این مرحله، تشکیل رسوب یشمی رنگی مشاهده شد. مخلوط واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق همزده شد و رسوب یشمی رنگ حاصل به‌کمک کاغذ صافی جداسازی شد و با آب دوبار تقطیر و اتانول سرد شستشو داده شد. محصول در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آون قرار گرفت تا خشک شود. وزن محصول ۰/۹۰۷ گرم، راندمان ۷۱ درصد و نقطه تجزیه ۱۹۵ درجه سلسیوس به دست آمد[۱۱].

۳- نتایج و بحث

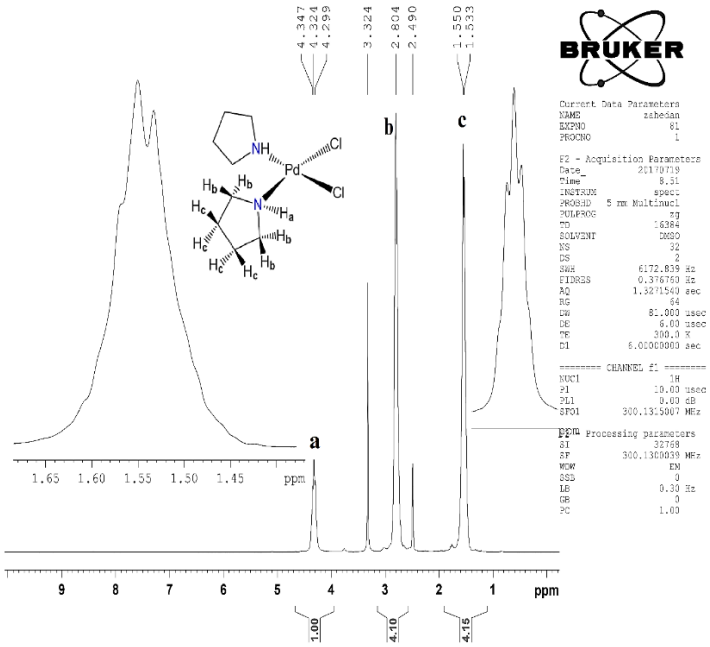
۳-۱- طیف مادون قرمز (IR)

در طیف مادون قرمز کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$، نوار ظاهر شده در ناحیه cm^{-1} ۴۷۳ مربوط به فرکانس ارتعاش کششی پیوند Pd–N است که حاکی از کوئوردینه شدن اتم نیتروژن لیگاند پیرولیدین به یون پالادیم (II) است.

نوار ظاهر شده در ناحیه cm^{-1} ۳۲۱۶ به ارتعاش کششی پیوند N–H نسبت داده می‌شود. این نوار در لیگاند آزاد در فرکانس cm^{-1} ۳۲۶۱ ظاهر شده است. جابجایی این نوار در کمپلکس نسبت به لیگاند آزاد، ناشی از کوئوردیناسیون اتم نیتروژن به یون Pd(II) است [۱۲]. در کمپلکس سنتز شده، ارتعاش کششی پیوند C–H آلیفاتیک در محدوده cm^{-1} ۲۸۷۲-۲۹۷۰ ظاهر شده است. علت تغییر اندک در فرکانس این نوار کششی قبل و بعد از کوئوردیناسیون پیرولیدین، دور بودن این گروه عاملی از مرکز کوئوردیناسیون فلز است [۱۳].

۳-۲- طیف ^{1}H-NMR

طیف ^{1}H-NMR کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ به همراه ساختار این کمپلکس که پروتون‌ها در آن شماره‌گذاری شده‌اند، در شکل ۱ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در طیف این کمپلکس سه دسته سیگنال ظاهر شده است. مجموعه سیگنال‌های ظاهر شده در محدوده ppm ۴/۳۲۴ به پروتون‌های آمینی a نسبت داده می‌شود. سیگنال مربوط به این پروتون‌ها به‌دلیل نزدیک بودن به اتم نیتروژن و همچنین مرکز کوئوردیناسیون، در میدان ضعیف ظاهر شده‌اند. سیگنال مشاهده شده در محدوده‌ی ppm ۲/۸۰۴ مربوط به پروتون‌های متیلنی b است که نسبت به H_a از اتم نیتروژن و مرکز کوئوردیناسیون دورتر هستند و در میدان قوی‌تر ظاهر شده‌اند. سیگنال مشاهده شده در محدوده‌ی ppm ۱/۵۴۱ مربوط به پروتون‌های متیلنی c است که به علت دورتر بودن از اتم N و همچنین مرکز کوئوردیناسیون پوشیده‌تر هستند و در میدان قوی‌ترظاهر شده اند. تعداد پروتون‌ها و مساحت زیر سطح سیگنال‌ها با تعداد پروتون‌های کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ برابری می‌کند [۱۴].



شکل ۱. طیف ^{1}H-NMR کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$

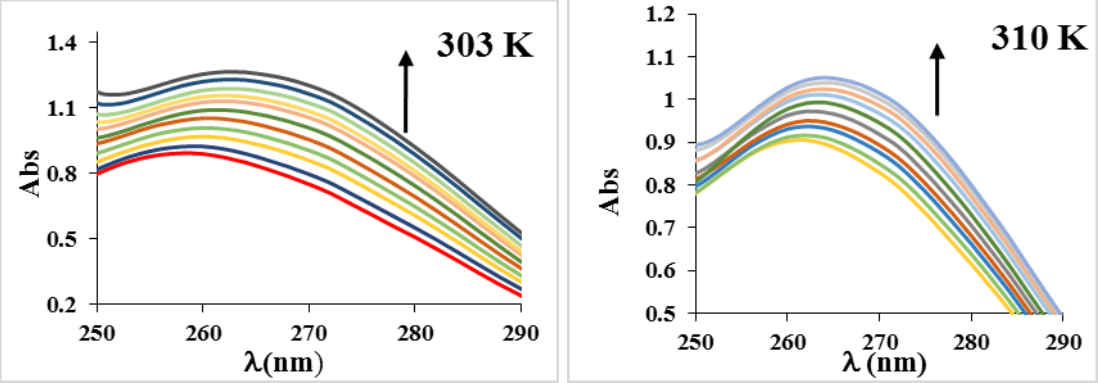
۳-۳- طیف جذب الکترونی

طیف جذب الکترونی کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ در حلال متانول ثبت شد. این کمپلکس در ناحیه فرابنفش یک نوار پرشدت در ۲۲۰ nm با ضریب جذب مولی ۲۷۵۰۰ $M^{-1}cm^{-1}$ دارد که به انتقال درون لیگاندی $n\rightarrow\sigma^{*}$ لیگاند پیرولیدین تخصیص داده می‌شود. در طیف جذبی این کمپلکس در ناحیه مرئی دو نوار جذبی پهن و کم‌شدت در ۵۲۴ و ۵۴۸ nm به ترتیب با ضرایب جذب مولی ۲۴۹ و ۲۲۸ $M^{-1}cm^{-1}$ مشاهده می شود. این نوارها به انتقالات میدان لیگاند (انتقالات $d\rightarrow d$) یون Pd(II) در میدان مربع مسطح نسبت داده می‌شود. مطابق الگوی شکافتگی اوربیتال‌های d در میدان مربع مسطح، انتظار می‌رود که در کمپلکس‌های d^8 مربع مسطح سه انتقال $d\rightarrow d$ مشاهده شود. احتمال می‌رود در طیف جذب الکترونی کمپلکس سنتز شده، نوار سوم در همپوشانی با دو نوار دیگر باشد [۱۱].

۳-۴- مطالعه برهم‌کنش کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ با CT-DNA به کمک طیف‌سنجی جذب الکترونی

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، با افزایش غلظت کمپلکس Pd(II) جذب DNA در ناحیه ۲۶۰ نانومتر افزایش پیدا کرده و پدیده هایپرکرومیک اتفاق می‌افتد. تغییر مشاهده شده در طیف جذبی DNA حاکی از وقوع برهمکنش بین کمپلکس مورد مطالعه و DNA است. این افزایش آنقدر ادامه یافت که تغییری در جذب مشاهده نشود یعنی هنگامی که کلیه جایگاه‌های پیوندی DNA توسط کمپلکس مورد

مطالعه اشباع گردد (بالاترین طیف در طیف‌ها). از این مشاهده می‌توان استدلال کرد که در اثر برهم‌کنش کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ با DNA، زنجیره DNA باز شده است و اصطلاحاً پدیده تاگشایی رخ داده است. در نتیجه این پدیده، بازهای آلی نسبت به نور UV روباز شده‌اند و به این دلیل DNA نور UV را با شدت بیشتری جذب می‌کند [۱۷].

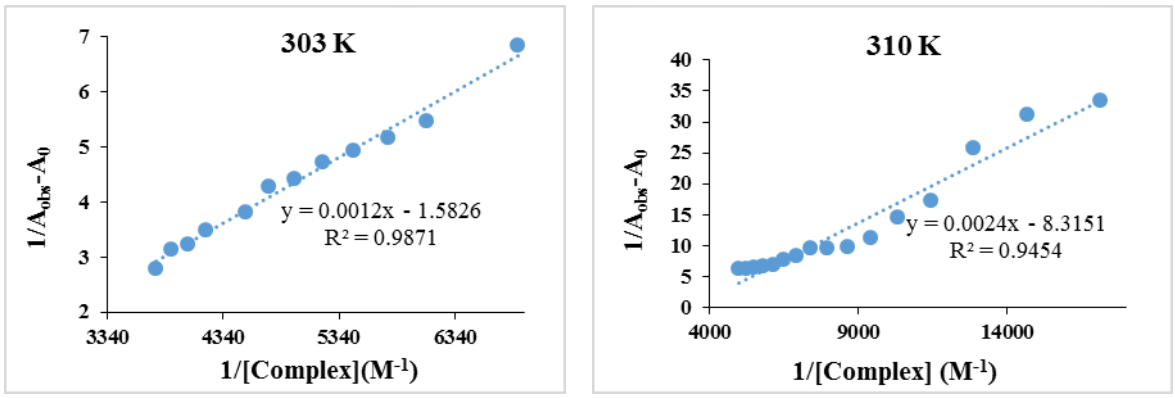


شکل ۲. طیف های جذب الکترونی حاصل از تیتراسیون DNA با کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ در دو دمای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین.

نتایج به‌دست آمده از تیتراسیون UV-Vis به‌کمک معادله زیر آنالیز شد:

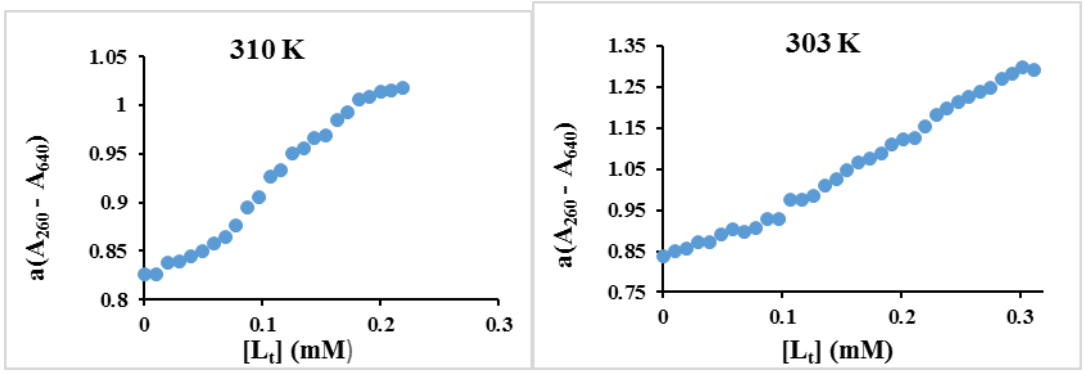
$$1/(A-A_0) = 1/(A_\infty-A_0)+1/K_{app}[A_\infty-A_0]\cdot 1/[\text{metal complex}]$$

در این معادله ، A_0، A و A_∞ به ترتیب عبارتند از بیشینه جذب DNA در ۲۶۰ نانومتر در غیاب کمپلکس، جذب DNA در ۲۶۰ نانومتر در حضور کمپلکس پس از هربار تیتراسیون و جذب نهایی DNA در ۲۶۰ نانومتر در آخرین نقطه تیتراسیون. با رسم نمودار $1/A\text{-}A_0$ بر حسب 1/[complex] که در شکل ۳ مشاهده می‌شود و بر اساس معادله خط به‌دست آمده، مقادیر K_{app} در برهم‌کنش بین کمپلکس سنتز شده و CT-DNA در دو دمای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین محاسبه شد که به ترتیب برابر است با $۱/۳ \times ۱۰^{۳}$ و $۳/۵ \times ۱۰^{۳}$ M^{-1} . مقدار K_{app} معیاری از میزان برهم‌کنش کمپلکس با DNA است. با توجه به مقادیر K_{app} به‌دست آمده در این بررسی می‌توان گفت که کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ برهم‌کنش مناسبی با CT-DNA دارد و همچنین میزان برهم‌کنش این کمپلکس با کمپلکس‌های مشابه در توافق است [۱۱].



شکل ۳. نمودارهای $1/A–A_0$ بر حسب $1/[complex]$ جهت محاسبه K_{app} در برهم‌کنش کمپلکس cis-$[Pd(pip)_2Cl_2]$ با CT-DNA در دماهای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین.

پارامتر $L_{1/2}$ غلظتی از کمپلکس است که سبب می‌شود نیمی از DNA از حالت طبیعی خارج شود. با استفاده از داده‌های به‌دست آمده از تیتراسیون UV در بررسی برهم‌کنش کمپلکس با CT-DNA و با رسم نمودار $a(A_{260}–A_{640})$ برحسب $[L_t]$، منحنی سیگموئیدی افزایشی برای دو دمای۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین به‌دست آمد که در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، مقادیر $L_{1/2}$ برای کمپلکس cis-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ در دو دمای۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین به ترتیب ۰/۱۶ و ۰/۱۰ mM است که نشان‌دهنده برهم‌کنش مناسب این کمپلکس با CT-DNA است.



شکل ۴. نمودار $L_{1/2}$ کمپلکس cis-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ در برهم‌کنش باCT-DNA در دماهای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، از واکنش $Na_2[PdCl_4]$ با مقدار اضافی از لیگاند پیرولیدین کمپلکسی جدید با فرمول cis-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ سنتز شد. شناسایی این کمپلکس به کمک روش‌های طیف‌سنجی FT-IR، ^{1}H-NMR و UV-Visible انجام گرفت که داده‌های حاصل، تشکیل کمپلکس مورد نظر را تایید می‌کنند. به عنوان یک مطالعه مقدماتی در راستای بررسی خواص بیولوژیکی کمپلکس سنتز شده، برهم‌کنش این کمپلکس با CT-

DNA به‌کمک روش طیف‌سنجی UV-Visible مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تیتراسیون جذب الکترونی CT-DNA با کمپلکس Pd(II) نشان می‌دهد که بیشینه جذب DNA در حضور غلظت‌های افزایشی از کمپلکس افزایش می‌یابد که حاکی از وقوع نوعی برهم‌کنش بین کمپلکس و DNA است که منجر به تغییر درکنفورماسیون DNA در راستای رو باز شدن بازهای آلی این بیوماکرومولکول به نور UV است. با توجه به یافته‌های تیتراسیون جذب الکترونی، پارامترهای K_{app} و $L_{1/2}$ در دو دمای ۳۰۳ و ۳۱۰ کلوین محاسبه شد. مقادیر به‌دست آمده برای این پارامترها بیانگر برهم‌کنش نسبتاً قوی کمپلکس با CT-DNA است که احتمالاً به شیوه شیاری انجام می‌شود. علاوه‌براین، نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که با افزایش دما مقدار K_{app} نیز افزایش می‌یابد که گویای گرماگیر بودن برهم‌کنش کمپلکس با CT-DNA است. یکی از نکات مثبت کمپلکس سنتز شده در برهمکنش با DNA این است که مقادیر $L_{1/2}$ به دست آمده نه چندان زیاد و نه چندان اندک است.

قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه سیستان و بلوچستان به خاطر پشتیبانی مالی، مساعدت و همکاری های لازم سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

[1] E. Moreno, “Is cell competition relevant to cancer?,” Nat. Rev. Cancer, vol. 8, no. 2, pp. 141–147, 2008.
[2] A. Catalá, “Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions,” Chem. Phys. Lipids, vol. 157, no. 1, pp. 1–11, 2009.
[3] A. Garoufis, S. K. Hadjikakou, and N. Hadjiliadis, “Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents,” Coord. Chem. Rev., vol. 253, no. 9–10, pp. 1384–1397, 2009.
[4] C. Monneret, “Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design,” in Annales pharmaceutiques francaises, 2011, vol. 69, no. 6, pp. 286–295.
[5] E. Wong and C. M. Giandomenico, “Current status of platinum-based antitumor drugs,” Chem. Rev., vol. 99, no. 9, pp. 2451–2466, 1999.
[6] C. A. Rabik and M. E. Dolan, “Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents,” Cancer Treat. Rev., vol. 33, no. 1, pp. 9–23, 2007.
[7] P. J. O’Dwyer, J. P. Stevenson, and S. W. Johnson, “Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs,” Drugs, vol. 59, no. 4, pp. 19–27, 2000.
[8] Y. Sun et al., “Palladium (II) and Platinum (II) Complexes Containing Six-Membered N-Heterocyclic Ligands: Synthesis, Characterization, Interaction with DNA, DFT Calculation, and Cytotoxicity,” Eur. J. Inorg. Chem., vol. 2014, no. 33, pp. 5741–5751, 2014.
[9] L. Tušek-Božić, M. Juribašić, P. Traldi, V. Scarcia, and A. Furlani, “Synthesis, characterization and antitumor activity of palladium (II) complexes of monoethyl 8-

quinolylmethylphosphonate," Polyhedron, vol. 27, no. 4, pp. 1317–1328, 2008.
[10] S. D. Roughley and A. M. Jordan, "The medicinal chemist's toolbox: an analysis of reactions used in the pursuit of drug candidates," J. Med. Chem., vol. 54, no. 10, pp. 3451–3479, 2011.
[11] F. Mohammadlou, H. Mansouri-Torshizi, and K. Abdi, "Interaction of bis (alkylamine) dichloropalladium (II) complexes with CT-DNA and BSA; their synthesis, characterization, antitumor, and antibacterial evaluations," J. Biomol. Struct. Dyn., vol. 39, no. 4, pp. 1354–1372, 2021.
[12] S. R. A. Khan, I. Guzman-Jimenez, K. H. Whitmire, and A. R. Khokhar, "Synthesis and characterization of piperidine platinum (II) complexes with dicarboxylates: crystal and molecular structure of cis-[Pt (piperidine) 2Cl2]• H2O," Polyhedron, vol. 19, no. 8, pp. 975–981, 2000.
[13] K. Nakamoto, Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, part B: applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry. John Wiley & Sons, 2009.
[14] M. Amirnasr, K. J. Schenk, A. Gorji, and R. Vafazadeh, "Synthesis and spectroscopic characterization of [CoIII (salophen)(amine) 2] ClO4 (amine= morpholine, pyrrolidine, and piperidine) complexes. The crystal structures of [CoIII (salophen)(morpholine) 2] ClO4 and [CoIII (salophen)(pyrrolidine) 2] ClO4," Polyhedron, vol. 20, no. 7–8, pp. 695–702, 2001.
[15] S. D. Kirik, A. K. Starkov, A. N. Matsulev, and A. A. Kondrasenko, "Two crystal forms of cis-bis (ethylamine) dichloro platinum (II)," J. Mol. Struct., vol. 987, no. 1–3, pp. 152–157, 2011.
[16] J. S. Coe and J. R. Lyons, "Preparation and infrared spectra of cis-dihalodiamminepalladium (II) complexes," Inorg. Chem., vol. 9, no. 7, pp. 1775–1776, 1970.
[17] B. M. Zeglis, V. C. Pierre, and J. K. Barton, "Metallo-intercalators and metallo-insertors," Chem. Commun., no. 44, pp. 4565–4579, 2007.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی راهبردهای مختلف افزودن گلوتارآلدهید در تثبیت BSA در دانه‌های کلسیم آلژینات

سید محمدحسین محمودی مهریزی[۱]، پریسا حجازی[۲*]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، گرایش بیوتکنولوژی، دانشگاه علم و صنعت ایران
۲. دانشیار دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، گرایش بیوتکنولوژی، دانشگاه علم و صنعت ایران
*phejazi@iust.ac.ir

چکیده

تثبیت بیومولکول‌ها برای کاربردهای مختلف دارای اهمیت بسیاری می‌باشد که از مهم‌ترین آن‌ها تثبیت آنزیم‌ها به‌عنوان بیوکاتالیست‌هایی است که باعث افزایش راندمان و پایداری آنزیم‌ها می‌شود. روش‌های مختلفی برای تثبیت بیومولکول‌ها وجود دارد در این میان روش تله اندازی یکی از این روش‌هاست که دارای مزایای زیادی می‌باشد. پایه‌های مختلفی برای تثبیت بیومولکول‌ها وجود دارد، آلژینات یکی از این انواع ژل‌های مورد استفاده در سنتز پایه‌هاست که به دلیل در دسترس بودن،ارزان بودن، پایداری در برابر حرارت، زیست سازگاری، تخلخل بالا و غیر سمی بودن موردتوجه ویژه‌ای قرارگرفته است.در این پژوهش از BSA به‌عنوان پروتئین مدل استفاده شده و روش‌های مختلف نحوه تشکیل ژل و میزان نشت پروتئین باگذشت زمان مورد بررسی قرارگرفته است. برای این منظور نحوه اضافه کردن گلوتارآلدهید به عنوان استحکام دهنده ژل و پیوند بین BSA و ژل به ۴ روش قبل و بعد از تشکیل دانه‌های کلسیم آلژینات مورد ارزیابی قرار گرفت. روشی که گلوتارآلدهید به‌عنوان ایجادکننده اتصالات عرضی داخل ژل افزوده شد، مناسب‌ترین روش بود زیرا با حفظ استحکام و پایداری کافی دانه‌های کلسیم آلژینات-BSA به میزان تثبیت ۷۳,۵٪ رسید. همچنین استفاده از بافر پتاسیم فسفات و بافر سیترات در هنگام سنتز دانه‌های کلسیم آلژینات-BSA باعث کاهش شدید پایداری و استحکام دانه‌ها شد. میزان نشت پروتئین از دانه‌هایی که گلوتارآلدهید بر سطح آن‌ها پوشانده شده، بسیار ناچیز بدست آمد.

کلمات کلیدی: تثبیت بیومولکول، کلسیم آلژینات، تله اندازی، گلوتارآلدهید، پایداری

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

Investigation on various strategies for adding glutaraldehyde in immobilization of BSA in calcium alginate beads

S. Mohammad H. Mahmoudi-Mehrizi[1]. Parisa Hejazi[2*]

[1] MSc student in biotechnology engineering, Iran University of Science and Technology (IUST)
[2] Associate Professor of Biotechnology, School of Chemical, Petroleum, Gas Engineering, IUST, Tehran
*phejazi@iust.ac.ir

Abstract
Biomolecules immobilization is very important for various applications, one of the most important of which is enzymes immobilization as biocatalysts, which increases the efficiency and stability of enzymes. There are various methods for biomolecules immobilization, among them, entrapment method with many advantages is one of these methods. There are different bases for immobilization biomolecules, alginate is one of these types of gels used in the synthesis of bases, which has received special attention due to its availability, cheapness, heat stability, biocompatibility, high porosity, and non-toxicity. In this research, BSA was used as a model protein and different methods of gel formation and the amount of protein leakage over time were investigated. For this purpose, the method of adding glutaraldehyde as a gel strengthener and the bond between BSA and gel were evaluated in 4 methods before and after the formation of calcium alginate beads. The method in which glutaraldehyde was added as a cross linker inside the gel was the most suitable method because it reached an immobilization rate of 73.5% by maintaining sufficient strength and stability of the calcium alginate-BSA beads. Also, the use of potassium phosphate buffer and citrate buffer during the synthesis of calcium alginate-BSA beads greatly reduced the stability and strength of the beads. The amount of protein leakage from beads covered by glutaraldehyde on their surface was found to be very small.

Key words: Biomolecule immobilization, Calcium alginate, Entrapment, Glutaraldehyde, Stability.

مقدمه

محدود نمودن تحرک بیومولکول‌ها در یک فضای ثابت و مشخص را تثبیت بیومولکول می‌گویند. مزیت‌های قابل‌توجهی مانند امکان استفاده مجدد از بیومولکول‌ها، افزایش پایداری، جداسازی آسان محصول از واکنشگرها، حذف فرایندهای بازیافت مجدد بیومولکول در این کار حاصل می‌شود [۱]. انواع بیومولکول‌ها همچون آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و مولکول‌های دارویی را با اهداف مختلف تثبیت می‌کنند.

روش‌های مختلفی برای تثبیت بیومولکول‌ها وجود دارد مانند تله اندازی، اتصال کووالانسی، اتصالات یونی، جذب سطحی، اتصال عرضی و کپسوله کردن ولی ارجحیت با روشی می‌باشد که هزینه کمتری داشته باشد و سهولت استفاده از آن بیشتر باشد [۲].

مواد مختلفی را می‌توان به‌عنوان ماتریس برای تثبیت استفاده کرد، معمولاً پلیمرهای بی‌اثر و مواد معدنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ماتریس ایده آل باید دارای ویژگی‌هایی باشد، مانند: اقتصادی بودن، بی‌اثر بودن، پایداری، قدرت فیزیکی، توانایی افزایش ویژگی و فعالیت بیومولکول، توانایی کاهش مهار محصول، توانایی برای جلوگیری از جذب غیراختصاصی و آلودگی باکتریایی [۲،۳]. بیشتر ماتریس‌ها فقط برخی از ویژگی‌ها را دارند. ازاین‌رو، انتخاب ماتریس حامل برای فرآیند تثبیت باید بر اساس خواص و محدودیت‌های ماتریس‌ها انتخاب شود. فرآیند تثبیت باعث به‌صرفه شدن عملیات فرایند، نسبت سرمایه‌گذاری به ظرفیت بالا و بازیابی محصول با خلوص بیشتری می‌شود [۴].

تله اندازی[1] یک روش تثبیت است که در آن بیومولکول‌ها در شبکه‌های پلیمری با هزینه کم محدود می‌شوند. این روش ممکن است یک استراتژی عملی برای جلوگیری از تجمع بیومولکول‌ها باشد. می‌توان از ماتریس‌های مختلفی مانند کیتوسان، کلسیم آلژینات، کلاژن، تری استات سلولز، پلی آکریل آمید، ژلاتین، آگار، سیلیکون، پلی وینیل الکل و پلی اورتان برای تله اندازی استفاده کرد. بلال و همکارانش (۲۰۱۶) برای تخریب رنگ‌ها از به تله اندازی آنزیم‌ها در دانه‌های کلسیم آلژینات استفاده کرده است [۵].

در این روش، بیومولکول‌ها با به دام افتادن در ژل و یا الیاف تثبیت می‌شوند. در تثبیت آنزیم‌ها، این بیومولکول‌ها در ماتریس‌ها حفظ می‌شوند درحالی‌که به سوبستراها و محصولات اجازه عبور داده می‌شود که باعث کاهش شسته شدن آنزیم‌ها، بهبود پایداری و ایجاد واکنش‌های آنزیمی می‌شود. ازآنجایی‌که هیچ پیوند کووالانسی بین آنزیم‌ها و ماتریس‌های حامل وجود ندارد، ترکیبات آنزیمی حفظ می‌شوند و فعالیت‌های کاتالیزوری بالا را تضمین می‌کنند از دیگر مزایای این روش اقتصادی بودن آن است [۲،۶].

آلژینات یک پلی‌ساکارید است که از دیواره سلولی جلبک قهوه‌ای به دست می‌آید. تثبیت بیومولکول‌ها با نمک‌های آلژینات مانند دانه‌های زانتان-آلژینات، ژل‌های آلژینات-پلی آکریل آمید و دانه‌های کلسیم آلژینات

[1] Entrapment

باعث افزایش فعالیت بیومولکول‌ها و قابلیت استفاده مجدد از آن‌ها می‌شود. ازآنجاکه آلژینات با یون‌های دو ظرفیتی مانند کلسیم و همچنین گلوتارآلدهید پیوند عرضی تشکیل می‌دهد، پایداری بیومولکول را بهبود می‌بخشد [۲،۷]. نحوه افزودن گلوتارآلدهید در فرآیند تثبیت کمتر موردتوجه قرارگرفته است.

آلبومین یک پروتئین کروی است که نقش اساسی در بدن جانداران دارد. ترکیبات مختلف با اتصال به آلبومین در خون منتقل می‌شوند. آلبومین سرم گاوی[1] (BSA) به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان پروتئین مدل در زمینه‌های مختلف مورد بررسی قرارگرفته است. وزن مولکولی BSA تقریباً برابر با ۶۶,۸ kDa می‌باشد [8]. در این تحقیق از BSA به‌عنوان پروتئین مدل از برخی از آنزیم‌ها مانند آلفا-آمیلاز (M_w= ۵۸,۴ kDa)، سلولاز (M_w= ۲۰-۸۰ kDa)، پکتیناز (M_w= ۴۸ kDa) و لیپاز (M_w= ۵۰ kDa) استفاده شد.

در این پژوهش به بررسی تثبیت BSA در دانه‌های کلسیم آلژینات و استراتژی‌های مختلف اضافه کردن گلوتارآلدهید به محیط تثبیت پرداخته‌ایم. همچنین نحوه نگهداری از پروتئین تثبیت شده برای استفاده مجدد و میزان نشت آن از دانه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

BSA، سدیم آلژینات از شرکت سیگما-آلدریچ، کلسیم کلرید، گلوتارآلدهید، سدیم کلرید، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سیتریک اسید و سدیم سیترات همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

روش‌های سنتز دانه‌های کلسیم آلژینات

دانه‌های کلسیم آلژینات-BSA طبق مراحل زیر به چهار روش سنتز شد.

ابتدا محلول ۳,۵٪ (w/v) سدیم آلژینات در آب مقطر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به کمک همزن مکانیکی تهیه شد. پس از خنک شدن محلول و رسیدن به دمای محیط، با نسبت حجمی برابر محلول BSA با غلظت ۱۰۰۰ ppm به محلول آلژینات اضافه و با همزن مکانیکی به‌خوبی مخلوط شدند.

پس از مخلوط شدن ژل را به چهار قسمت تقسیم کردیم و طبق روش‌های زیر عمل کردیم:

روش اول

این مخلوط به مدت ۳ ساعت در یخچال نگهداری شد. پس‌ازآن به‌صورت قطره‌قطره از مخلوط به‌وسیله‌ی پمپ سرنگی به محلول کلسیم کلرید ۲٪ (w/v) که روی حمام آب و یخ قرارگرفته اضافه شد و به مدت

[1] Bovine Serum Albumin

۳۰ دقیقه دانه‌ها در محلول کلسیم کلرید باقی ماندند. سپس دانه‌ها فیلتر و با محلول کلرید کلسیم تازه شستشو داده شد. برای سفت شدن دانه‌ها، دانه‌ها به مدت ۲ ساعت در یخچال قرار داده شد و در نهایت دوبار با محلول سدیم کلرید ۰,۹٪ و آب مقطر دانه‌ها شستشو داده شدند.

روش دوم

به مخلوط ژل آلژینات-BSA تحت همزن مداوم با همزن مکانیکی گلوتارآلدهید ۲۵٪ با نسبت ۰,۴٪ (v/v) اضافه شد. سپس این مخلوط به منظور ایجاد اتصالات عرضی به مدت ۳ ساعت در یخچال نگهداری شد. پس‌ازآن مخلوط به‌صورت قطره‌قطره وارد محلول کلسیم کلرید ۲٪ سرد شد و سایر مراحل همانند روش اول تکرار شد [۹،۱۰].

روش سوم

همانند روش اول فرآیند تثبیت، سنتز و شستشو دانه‌ها انجام شد. سپس دانه‌ها در محلول بافر پتاسیم فسفات (pH=۶ و ۰,۱ مولار) به همراه ۰,۴٪ (v/v) گلوتارآلدهید ۲۵٪ ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه با همزن مغناطیسی با ۱۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. سپس دانه‌ها با آب مقطر شسته و برای سفت شدن به مدت ۲ ساعت در یخچال قرار داده شد. در نهایت دانه‌ها دو بار با محلول سدیم کلرید ۰,۹٪ و آب مقطر شسته شدند [۱۱].

روش چهارم

ترکیبی از روش دوم و سوم برای تثبیت و سنتز دانه‌ها انجام شد. بدین ترتیب که به مخلوط ژل آلژینات-BSA تحت همزن مداوم با همزن مکانیکی ۰,۰۴٪ (v/v) گلوتارآلدهید ۲۵٪ اضافه شد. به منظور ایجاد اتصالات عرضی این مخلوط به مدت ۳ ساعت در یخچال نگهداری شد. پس‌ازآن همانند آنچه در روش‌های قبل آورده شد داده‌ها سنتز و شستشو با کلسیم کلرید داده شدند. پس‌ازآن دانه‌ها را در محلول بافر پتاسیم فسفات (pH=۶ و ۰,۱ مولار) به همراه ۰,۳۶٪ (v/v) گلوتارآلدهید ۲۵٪ ریخته و باقی مراحل همچون روش سوم انجام شد.

بررسی اثر نوع بافر در فرآیند تثبیت

روش‌های سوم و چهارم با استفاده از دو نوع بافر پتاسیم فسفات (pH=۶ و ۰,۱ مولار) و سیترات (pH=۵,۹ و ۰,۱ مولار) انجام داده شد.

روش‌های نگهداری دانه‌های آلژینات- BSA

دانه‌های سنتز شده به سه روش در داخل یخچال نگهداری شدند: در بافر پتاسیم فسفات، در بافر سیترات و بدون حضور مایع (بافر یا آب مقطر).

میزان نشت پروتئین باگذشت زمان

میزان نشت BSA از دانه‌های آلژینات در طی ۵ روز در بافر پتاسیم فسفات و بدون حضور مایع مورد ارزیابی قرار گرفت.

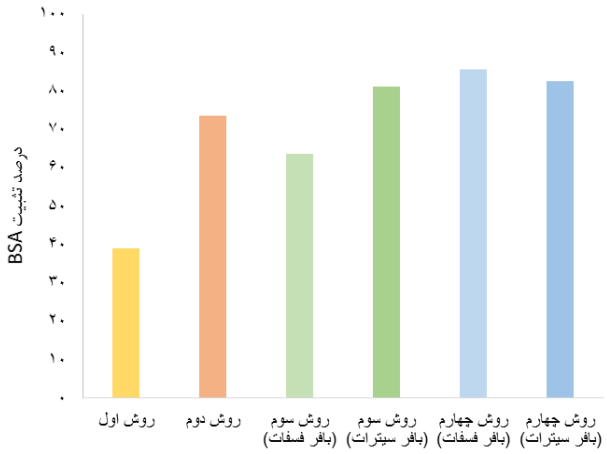
تعیین مقدار پروتئین BSA

برای محاسبه میزان تثبیت پروتئین، میزان پروتئین اولیه در محلول BSA از میزان پروتئین تثبیت نشده بر حسب میلی‌گرم کسر شد. میزان پروتئین تثبیت نشده برابر با میزان پروتئین آزاد در محلول کلسیم کلرید و تمامی شستشوهای بعدازآن می‌باشد. غلظت پروتئین موجود در محیط با استفاده از روش میکروبردفورد و BSA به‌عنوان پروتئین استاندارد اندازه‌گیری شد [۱۲].

نتایج و بحث

بررسی میزان تثبیت پروتئین در روش‌های مختلف سنتز دانه‌های آلژینات-BSA

با بررسی میزان پروتئین آزاد در حین مراحل سنتز و شستشوی دانه‌ها و اندازه‌گیری میزان آن به روش میکروبردفورد میزان تثبیت BSA در دانه‌های کلسیم آلژینات تعیین شد که در شکل (۱) آورده شده است.



شکل (۱) درصد تثبیت پروتئین در روش‌های مختلف سنتز دانه‌های آلژینات

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از میزان تثبیت در روش‌های مختلف می‌توان دریافت که در روش‌هایی که از گلوتارآلدهید به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی استفاده‌شده است میزان رهایش پروتئین کمتر از حالتی است که از گلوتارآلدهید استفاده‌نشده است. همچنین افزودن گلوتارآلدهید هم داخل ژل و هم بعد از تشکیل دانه‌ها و غوطه‌ور کردن آن‌ها (روش چهارم) در محلول گلوتارآلدهید باعث رهایش کمتر پروتئین نسبت به حالتی است که گلوتارآلدهید فقط داخل ژل (روش دوم) و یا فقط بعد از تشکیل دانه‌ها (روش سوم) استفاده‌شده است. بیشترین میزان پروتئین رهاشده در تمام روش‌ها در محلول کلسیم کلرید به هنگام تشکیل دانه‌های کلسیم آلژینات است. بااین‌وجود به دلیل استحکام کم دانه‌های تشکیل‌شده در روش‌های سوم و چهارم، این روش‌ها مناسب‌ترین روش تثبیت بیومولکول پروتئینی نمی‌باشند که در بخش بعدی به‌طور کامل به آن

می‌پردازیم.

بررسی روش سنتز دانه‌های آلژینات-BSA

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از روش‌های سنتز متفاوت و نمونه‌گیری‌های انجام‌شده از مراحل مختلف سنتز دانه‌ها، روش‌های سوم و چهارم با وجود میزان تثبیت بالا در حین سنتز، روش‌های مناسبی نمی‌باشند چراکه استحکام حداقلی را ندارند و به راحتی ازهم‌گسسته می‌شوند. در هنگام سنتز دانه‌ها به روش‌های سوم و چهارم که دانه‌ها در محلول بافر-گلوتارآلدهید غوطه‌ور می‌شود، مقدار زیادی رسوب بعد از خارج کردن دانه‌ها از بافر مشاهده شد. این رسوبات کمپلکسی هستند که کلسیم با بافرها تشکیل می‌دهد. این مورد در هر دو نوع بافر پتاسیم فسفات و بافر سیترات مشاهده شد. همچنین در تمامی مراحل شستشو نیز رسوب سفید رنگی در نمونه‌های گرفته‌شده دیده شد که این امر به دلیل جدا شدن کلسیم از ساختار ژل در حضور بافر است که باعث کاهش شدید استحکام دانه‌ها و متلاشی شدن آن‌ها می‌شود.

به این ترتیب روش دوم که در حین سنتز از بافر استفاده نمی‌شود و گلوتارآلدهید مستقیماً به داخل ژل افزوده می‌شود مناسب‌ترین روش سنتز می‌باشد چراکه استحکام خود را به‌خوبی حفظ می‌کند و میزان تثبیت در آن‌هم نسبتاً بالاست.

بررسی روش‌های نگهداری دانه‌های آلژینات- BSA

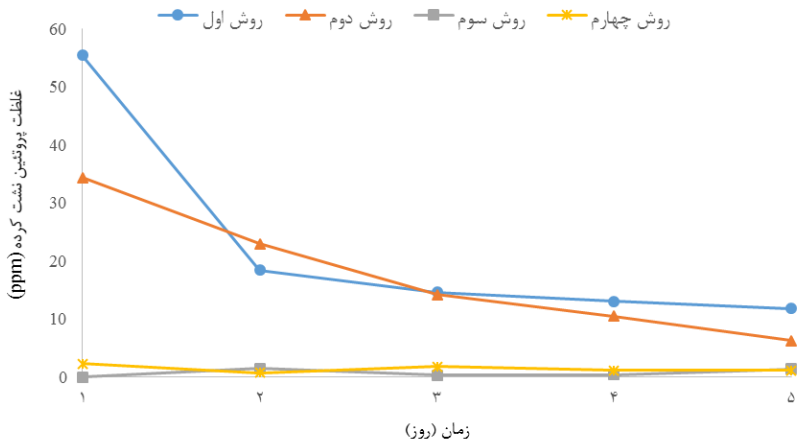
از بین سه روش نگهداری، روش سوم، نگهداری دانه‌های بدون حضور مایع داخل یخچال، مناسب‌ترین روش بود؛ چراکه دانه‌هایی که داخل بافر نگهداری شدند استحکام خود را از دست دادند و به‌سادگی متلاشی می‌شدند و کارایی خود برای استفاده مجدد را از دست دادند. اما دانه‌های خشک استحکام بالایی داشتند و به‌خوبی می‌توان از آن‌ها به منظور تثبیت بیومولکول مانند آنزیم و استفاده مجدد از آن‌ها در صنعت بهره برد.

بررسی میزان نشت پروتئین باگذشت زمان

میزان نشت BSA از دانه‌های آلژینات سنتز شده به چهار روش باگذشت زمان طی ۵ روز متوالی در بافر پتاسیم فسفات افزایش یافت. به‌طورکلی میزان نشت پروتئین از زیاد به کم در بافر پتاسیم فسفات متعلق به روش اول، دوم، چهارم و سوم می‌باشد. بهترین نحوه نگهداری از دانه‌ها برای بررسی میزان نشت پروتئین، روش نگهداری بدون حضور مایع در یخچال بود. شکل (۲) میزان نشت پروتئین در این روش را نشان می‌دهد. این نمودار بر حسب غلظت پروتئین در آبی است که برای شستشو به دانه‌ها اضافه کرده و سپس این آب را خارج کرده و در نهایت غلظت پروتئین را در آن اندازه‌گیری کرده‌ایم.

همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، دانه‌هایی که با روش اول سنتز شدند بیشترین میزان نشت را

در روز اول داشتند چراکه از گلوتارآلدهید در ساختار آن‌ها استفاده‌نشده بود ولی از روز دوم میزان نشت کاهش محسوسی نشان داد. دانه‌هایی که به روش دوم سنتز شده بودند، به دلیل وجود گلوتارآلدهید در داخل دانه‌ها، تقریباً به‌صورت خطی میزان نشت پروتئین کاهش‌یافته است. کمترین میزان نشت مربوط به روش‌های سوم و چهارم است که گلوتارآلدهید روی سطح دانه‌ها را پوشانده و امکان خروج پروتئین از داخل ژل به حداقل رسیده است.



شکل (۲) غلظت نشت پروتئین BSA در روش نگهداری خشک باگذشت زمان طی روزهای متوالی در روش‌های مختلف سنتز

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص است که استفاده از گلوتارآلدهید در ساختار ژل آلژینات به هنگام تشکیل دانه‌های کلسیم آلژینات باعث افزایش استحکام و پایداری دانه‌ها و افزایش میزان تثبیت BSA در ساختار دانه‌ها می‌شود. همچنین استفاده از بافر پتاسیم فسفات و بافر سیترات به هنگام تشکیل دانه‌ها به دلیل اتصال با کلسیم و جدا کردن آن از ساختار ژل باعث کاهش شدید استحکام و پایداری دانه‌ها می‌شود. استفاده از مقدار ناچیزی گلوتارآلدهید در سطح دانه‌ها مانع از نشت شدید پروتئین می‌شود.

منابع

[1] Michael L. Shuler, F. Kargi, and M. DeLisa, (1992), Bioprocess engineering: Basic concepts.

[2] V. L. Sirisha, A. Jain, and A. Jain, (2016), “Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes,” Adv. Food Nutr. Res., vol. 79, pp. 179–211.

[3] B. D. Singh and B. D. Singh, (2007), Biotechnology expanding horizons. Kalyani publishers.

[4] S. F. D’souza, (1999), “Immobilized enzymes in bioprocess,” Curr. Sci., pp. 69–79.

[5] M. Bilal, H. Hu, M. Iqbal, and X. Zhang, (2016), "Mutagenicity and cytotoxicity assessment of biodegraded textile effluent by Ca-alginate encapsulated manganese peroxidase," Biochemical Engineering Journal, vol. 109. Elsevier B.V.

[6] J. M. Guisan, (2013), "Immobilization of Enzymes and Cells IN Series Editor," Immobilization of Enzymes and Cells, vol. 1051. pp. 1–375.

[7] A. Flores-Maltos, L. V Rodríguez-Durán, J. Renovato, J. C. Contreras, R. Rodríguez, and C. N. Aguilar, (2011), "Catalytical Properties of Free and Immobilized Aspergillus niger Tannase," Enzyme Res., vol. 2011, p. 768183.

[8] A. Jahanban-esfahlan, A. Ostadrahimi, R. Jahanban-esfahlan, L. Roufegarinejad, M. Tabibiazar, and R. Amarowicz, (2019), "Recent developments in the detection of bovine serum albumin," International Journal of Biological Macromolecules, vol. 138. pp. 602–617.

[9] Y. Wang, C. Gao, Z. Zheng, F. Liu, J. Zang, and J. Miao, (2015), "Immobilization of Cold-Active Cellulase from Antarctic Bacterium and Its Use for Kelp Cellulose Ethanol Fermentation," BioResources, vol. 10.

[10] M. Liu, Q. Yong, Z. Lian, C. Huang, and S. Yu, (2020), "Continuous Bioconversion of Oleuropein from Olive Leaf Extract to Produce the Bioactive Product Hydroxytyrosol Using Carrier-Immobilized Enzyme.," Appl. Biochem. Biotechnol., vol. 190, no. 1, pp. 148–165.

[11] B. Bhushan, A. Pal, and V. Jain, (2015), "Improved Enzyme Catalytic Characteristics upon Glutaraldehyde Cross-Linking of Alginate Entrapped Xylanase Isolated from Aspergillus flavus MTCC 9390," Enzyme Res., vol, p. 210784, 2015.

[12] M. M. Bradford, (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," Anal. Biochem., vol. 72, no. 1, pp. 248–254.

بررسی اثر ضد سمیت یک نانو ذره جدید منگنز (II) بر روی رده سلولی A549

نیلوفر اکبرزاده تربتی[۱*]، ام البنین شهرکی[۲]، بهاره کرمی[1]

۱. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. مرکز تحقیقات فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
*n.akbarzadeh@chem.usb.ac.ir

چکیده

در این پروژه یک نانو ذره جدید از یون فلزی Mn(II) با لیگاند ۲-امینوبنزامید (2AB) در حضور اسید آمینه گلایسین (gly) به روش هیدروترمال تهیه شد. سپس نانوذرات بدست آمد با روش های مختلف مانند اسپکتروسکوپی طیف سنجی مادون قرمز(IR) شناسایی شد. این نانو ذرات توسط تصاویر SEM و پراش اشعه X بررسی شدند. تصاویر SEM نشان داد که نمونه های تهیه شده به صورت نانو وتقریبا با مورفولوژی یکنواختی هستند. در این تصاویر نانو کمپلکس ها نسبتا کروی و متخلخل و میانگین اندازه ذرات کمتر ۱۰۰ نانومتر به دست آمد. در مرحله بعد فعالیت سیتوتوکسیسیتی نانو کمپلکس[Mn(2AB)(gly)] بر رده سلولی A549 بررسی شد و اثر بازدارندگی این نانو ذره در برابرسلول‌های سرطانی ریه نتایج قابل قبول نشان داد.

کلمات کلیدی: هیدروترمال - متخلخل - سیتوتوکسیسیتی

Investigation of the Antitoxic Effect of a Novel Mn (II) Nano Particle on A549 Cell Line

*[1]Niloufar Akbarzadeh-T ,[2]Omolbanin Shahraki , [1]Bahareh Karami
[1]Department of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan, P.O. Box 98135-674, Zahedan, Iran
[2]Pharmacology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

* e-mail: n.akbarzadeh@chem.usb.ac.ir

Abstract

In this project, a new nanoscale particle of Mn(II) metal ion with the ligand 2-aminobenzamide (2AB) was synthesized by hydrothermal method in the presence of glycine amino acid. Then, the obtained nanoparticles were characterized by various methods such as infrared spectroscopy IR .These nanoparticles were examined by SEM images and X-ray diffraction. The SEM images showed that the prepared samples are nanoscale and almost uniform in morphology. In these images, relatively spherical and porous nanocomplexes with an average particle size of less than 100 nanometers were obtained. In the next step, the cytotoxic activity of the [Mn(2AB)(gly)] complex was evaluated on A549 cell line and the inhibitory effect of these compounds against lung cancer cells showed acceptable results.

Key words: hydrothermal - porous - cytotoxic

مقدمه

در چند دهه اخیرسنتز ترکیبات در مقیاس نانو افزایش یافته است. به این خاطرکه با تولید نانو کمپلکس‌های فلزی، باعث ایجاد خواص الکترونیکی، مغناطیسی، بیولوژیکی، و شیمیایی و فیزیکی منحصر به فرد آنها شده. ترکیبات کمپلکس‌های فلزات واسطه همچنین برای بهینه کردن کاربردهای زیست پزشکی لازم هستند. که این ترکیبات در سایز نانو تهیه شوند. اخیرا بسیاری از دانشمندان روی سنتز نانو کمپلکس‌ها به ویژه کمپلکس‌هایی با یون‌های فلزات واسطه کار می کنند.

سایز و شکل نانو مواد عوامل مهمی در شکل گیری ویژگی‌های آنها مثل نوری، الکتریکی، مغناطیسی، کاتالیزوری، و ضد میکربی هستند. نانو کمپلکس‌های فلزی و اکسید فلزی کاربردهای گشسترده ای دارند. از جمله کاتالیزورهای ناهمگن، دستگاه‌های سنجش الکترونی و شیمیایی، بازیافت محیط زیست، جداسازی‌ها، زمینه‌های دارویی، جوهرها، ضدعفونی کننده‌ها، فیلم‌های نازک، و همچنین ضد فعالیت میکربی هستند. که کاربردهای متنوع نام برده شده بستگی به مورفولوژی و سایز ذرات بستگی دارند . اندازه سطح و شکل و خلوص نانو ذرات به روش تولید آنها بستگی دارد. بنابر این روش سنتز آنها اهمیت بسیار زیادی دارد. اصلی ترین روش تولید نانو مواد روش شیمیایی می‌باشد. در روش شیمیایی برای تهیه نانو مواد از یک ماده اولیه که به صورت همگن یون‌های فلزی در آن توزیع شده اند. نیز استفاده میشود. سپس توسط روش هایی مانند سل‌ژل، هم رسوبی، تخریب حرارتی، حلالی، آبی ، سونوشیمی، حرارتی، الکتروشیمیایی، احتراق، و میکروامولسیون، تحت شرایط کنترل شده و ترکیبات فلزی یا ماکروویو نانو ذرات فلزی تهیه میشوند. لازم به ذکر است که در تمام روش‌های نام برده شده علم شیمی نقش به سزایی داردبه طوری که با کنترل شرایط از جمله حساس بودن فرایند به تغییر دما، ترکیب pH محیط، میتوان موادی را با خواص مورد نظر تولید کرد. مزیت اصلی این روش ها در امکان دستیابی به همگنی شیمیایی بسیار زیاد می‌باشد. زیرا فراوری شیمیایی مواد موجب همگنی ترکیب شیمیایی در سطح مولکولی می‌شود ودر نتیجه محصول نهایی همگن است. بنابراین شیمی کوئوردینانسیون ، موضوع مورد توجه برای محققان است. اهمیت طراحی لیگاندهای جدید عمدتا به دلیل استفاده از آن‌ها به عنوان مدل‌هایی برای محل اتصال پروتئین و فلز در گروه قابل توجهی از متالوپروتئین‌ها در سیستم‌های بیولوژیکی از قبیل باکتری ها، مدل‌هایی برای پدیده‌های تبادل مغناطیسی، معرف‌های درمانی در کیلیت‌تراپی برای درمان مسمومیت با فلز و آنتی‌بیوتیک‌های حلقوی که فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی آن با تشکیل کمپلکس فلزی حفظ می‌شود. مطالعات بسیاری در زمینه عوامل شیمی درمانی بر پایه فلز انجام شده، ولی با هدف یافتن کمپلکس های فلزات با عوارض جانبی کمتر و سمیت سلولی مشابه، بیشترین توجه به ترکیبات جدید معطوف شده است.

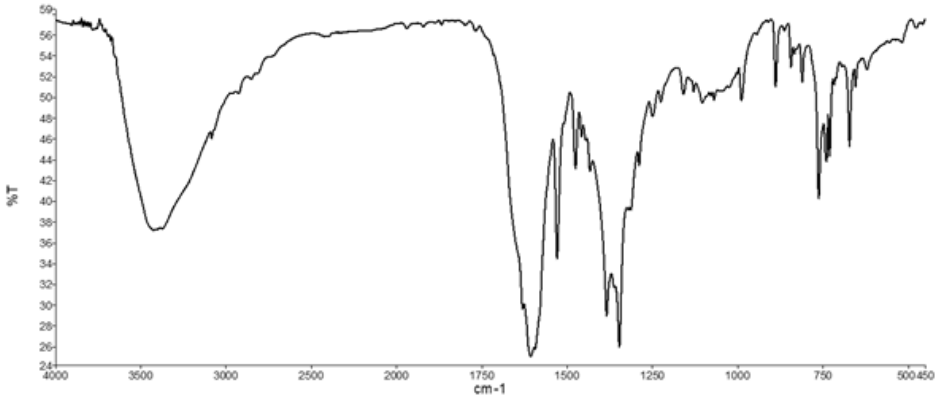
بنابراین در این پژوهش برآن شدیم یک نانو کمپلکس جدید یون Mn(II) با فرمول‌های [Mn(2AB)(gly)] تهیه کنیم و سپس تاثیر ضد سمیت آنها را علیه رده سلولی A549 بررسی نماییم.[1-4]

روش کار

جهت سنتز نانو کمپلکس ، نمک منگنز (II) را با مخلوط لیگاندها در حلال مناسب حل شد و سپس مخلوط بمدت ۴ ساعت در دمای جوش حلال رفلاکس شد.. پس از گذشت این زمان محصول جمع‌آوری شد.

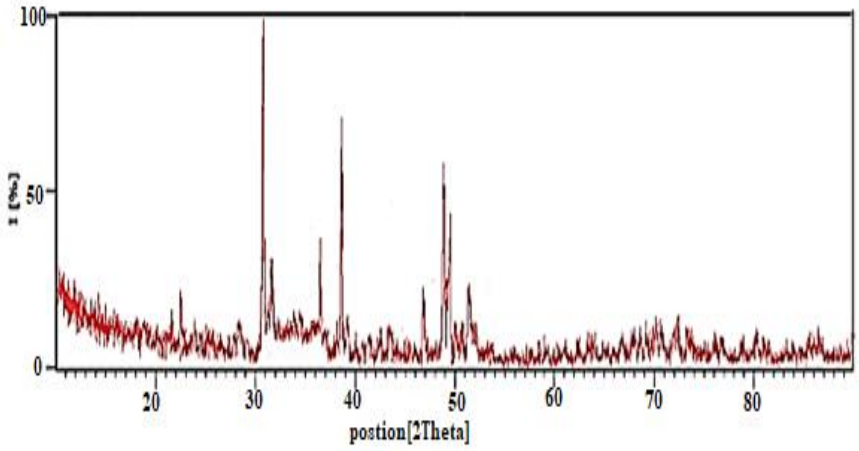
شناسایی

در بررسی طیف مادون قرمز نانو کمپلکس نوار مشاهده شده در ناحیه cm^{-1} ۱۶۰۰ مربوط به C=O ، ارتعاش در ناحیه cm^{-1} ۳۴۰۰ مربوط به گروه آمیدی و ارتعاشات ناحیه cm^{-1} ۳۳۰۰ به گروه O-H مولکول آب نسبت داده می شود. شکل ۱.



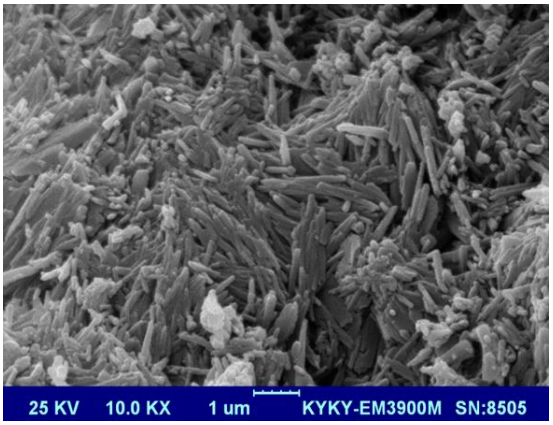
شکل ۱. طیف مادون قرمز نانوکمپلکس [Mn(2AB)(gly)] در محیط KBr

آنالیز پراش پودری (XRD) در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. الگوی XRD نانو کمپلکس تهیه شده

تصویر SEM نانو کمپلکس [Mn(2AB)(gly)] در شکل۳ نشان داده شد. همان گونه که در شکل مشخص است نمونه تهیه شده به صورت نانو ذره و تقریبا با موفولوژی یکنواختی و رشته‌ای می‌باشد. اندازه ی بلور با استفاده از معادله ی دبای شرر ۴۸نانومتر گزارش شده است.



شکل۳. تصویر SEM نانوکمپلکس[Mn(2AB)(gly)]

فعالیت سیتوتوکسیسیتی نانوکمپلکس [Mn(2AB)(gly)] برروی رده سلولی A549 بوسیله کاهش MTTبررسی شد. و مقادیر IC_{50} یعنی قدرت مهار فعالیت سلول برای هر ترکیب، یعنی غلظتی از نمونه مد نظر که ۵۰ درصد فعالیت سلول های سرطانی را مهار می‌کند، محاسبه شد و نتایج با موارد مشابه همخوانی داشت. بنابراین نانو کمپلکس تهیه شده توانایی مهار فعالیت سلول های سرطانی ریه را دارد.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان مقاله از حمایت های مالی دانشگاه سیستان و بلوچستان صمیمانه قدردانی می کنند.

منابع

[1] Saif M. *Journal of Molecular Structure*, (2016) 1118, 75-82.
[2] Zare N. *Bioorganic Chemistry*, (2018) 80, 334-346.
[3] Yousefi M. Soradi Zeid, S. Khorasani Motlagh M. *Applied Chemistry*, (2017.) 12(43) 93-102.
[4] Mousavi S., *Applied Organometallic Chemistry*, (2020). 34(4) 5550.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

تهیه و مشخصه یابی دو کمپلکس جدید کمپلکس های یونهای واسطه Ni(II) , Co(II) با لیگاند های ۲-امینوبنزامید در حضور آمینواسید گلایسین و بررسی اثر ضد سمیت آن‌ها بر رده سلولی MCF-7

بهاره کرمی[1]، نیلوفر اکبرزاده تربتی[۱*]، ام البنین شهرکی[۲]
۱-گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲-مرکز تحقیقات فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
*n.akbarzadeh@chem.usb.ac.ir

چکیده

در این پروژه کمپلکس هایی از یون های فلزی Co(II) و Ni(II) با لیگاند ۲-امینوبنزامید (2AB) در حضور اسید آمینه گلایسین (gly) به روش رفلاکس تهیه شدند. کمپلکس‌های [Ni(2AB)(gly)], [Co(2AB)(gly)]با روش‌های اسپکتروسکوپی مادون قرمز(IR) و طیف سنجی الکترونی (UV-Vis) شناسایی شدند. رفتار الکتروشیمیایی کمپلکس ها با روش ولتامتری چرخه‌ای بررسی شد. نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز درمحدوده ی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ فرکانس های ارتعاشی گروه کربونیل و NH_2 را نمایش داد. علاوه براین فرکانس های کششی پیوند Co-O و Ni-O تشکیل این پیوندها را تأیید نمود..طیف الکترونی این کمپلکس‌ها باندهای جذبی در ناحیه۸۰۰-200nm، انتقالات بار و میدان لیگاند را نشان می-دهد.

ولتاموگرام کمپلکس ها رفتار اکسایش و کاهشی یون نیکل و یون کبالت را نشان داد. فعالیت سیتوتوکسیسیتی دو کمپلکس [Co(2AB)(gly)], [Ni(2AB)(gly)] بر رده سلولی MCF-7 بررسی شد و اثر بازدارندگی این ترکیبات در برابرسلول‌های سرطانی نتایج قابل قبول نشان داد.

کلمات کلیدی: گلایسین- ولتامتری چرخه‌ای - سیتوتوکسیسیتی

Preparation and characterization of two new complexes of Ni(II) and Co(II) complexes with the ligands of 2-aminobenzamide and glycine, and investigation of their anti-toxicity effects on MCF-7

[1]Bahareh Karami-*[1]Niloufar Akbarzadeh-T – [2]Omolbanin Shahraki
[1]Department of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan, P.O. Box 98135-674, Zahedan, Iran
[2]Pharmacology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

* e-mail: n.akbarzadeh@chem.usb.ac.ir

In this project, complexes of Co (II) and Ni (II) metal ions with the ligand 2-aminobenzamide (2AB) in the presence of the amino acid glycine (gly) were prepared by reflux method. The complexes [Ni(2AB)(gly)] and [Co(2AB)(gly)] were identified using infrared spectroscopy (IR) and electronic spectroscopy (UV-Vis). The electrochemical behavior of the complexes was investigated using cyclic voltametric method. The results of the infrared spectroscopy in the frequency range of 4000-400 cm^{-1} displayed the vibrational frequencies of the carbonyl and NH_2 groups. In addition, the stretching frequencies of the Co-O and Ni-O bonds confirmed the formation of these bonds. The electronic spectra of these complexes showed absorption bands in the range of 200-800 nm, indicating charge transfers and ligand field transitions. Voltammetry of the complexes showed the oxidation and reduction behavior of Ni and Co ions. The cytotoxic activity of the two complexes [Ni(2AB)(gly)] and [Co(2AB)(gly)] was investigated on MCF-7 cells, and the inhibitory effects of these compounds against cancer cells were found to be acceptable.

Key words: infrared spectroscopy- ligand field- docking

مقدمه

سَمیَت یا سمی بودن(Toxicity) ، خاصیتی‌است که یک ماده شیمیایی یا ترکیبی از مواد دارای آن خاصیت، با آن بتواند به یک ارگانیسم آسیب برساند. سمی بودن می‌تواند بر روی یک ارگانیزم، مثلاً یک جانور، باکتری یا گیاه، و نیز بر زیرساختار ارگانیسم، مانند یاخته (سمیت سلولی) یا یک ارگان مانند کبد (سمیت کبد)، اثر کند. به‌طور گسترده، این کلمه ممکن است به صورت استعاری برای توصیف اثرهای سمی بر روی گروه‌های بزرگتر و پیچیده‌تر مانند گروه، خانواده، یا جامعه در کل استفاده شود. گاهی این کلمه بیشتر یا کمتر مترادف با مسمومیت در استفادهی روزمره است.

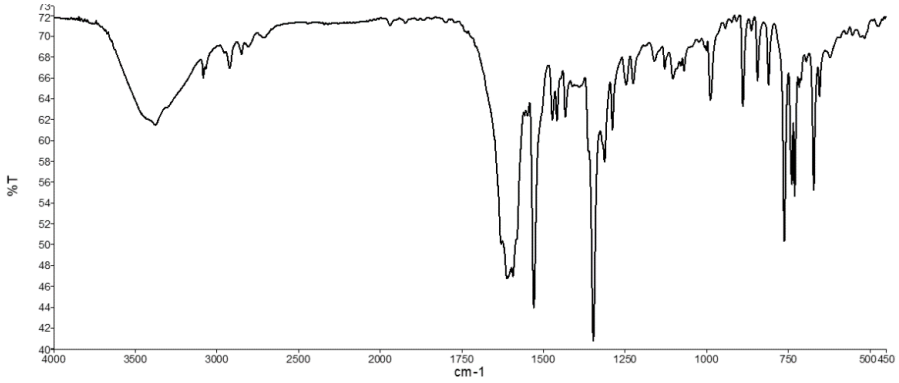
برداشت کلی از مفهوم سمیت این‌است که اثرهای سم به دوز وابسته است؛ مصرف بیش از حد آب می‌تواند منجر به مسمومیت آب شود، در حالی که حتی برای یک ماده بسیار سمی مانند زهر مار، دوز پایینی وجود دارد که هیچ اثر سمی قابل تشخیصی به وجود نمی‌آورد. سمی بودن خاصیتی «گونه-خاص» (species-specific)است و تجزیه و تحلیل گونه‌های متقاطع آن مشکل است. پارادایم‌ها و معیارهای جدید در حال تکامل هستند تا بتوان هم‌گام با حفظ و ادامهی مفهوم هدف‌های بررسی‌های سمیت آزمایش‌های جانوری را دور زد. ترکیبات کئوردیناسیون اثر بازدارندگی در برابر فعالیت سلول های سرطانی مختلف دارند. نتایج حاصل از سیتوتوکسی کمپلکس های گروه (I-V) بر علیه سلول های سرطانی حاد گزارش شده است. نتایج نشان میدهد که این کمپلکس ها بر روی رشدسلول های سرطانی انسانی در غلظت های انجام شده فعال است. یعنی این کمپلکس ها توانایی مهار فعالیت سلول های سرطانی را دارند. بنابراین در این پژوهش برآن شدیم دو ترکیب کئوردیناسیون از یونهای Co(II)وNi(II) با فرمول‌های [Ni(2AB)(gly)], [Co(2AB)(gly)] تهیه کنیم و سپس تاثیر ضد سمیت آنها را علیه رده سلولی MCF-7 بررسی نماییم.[1-4]

روش کار

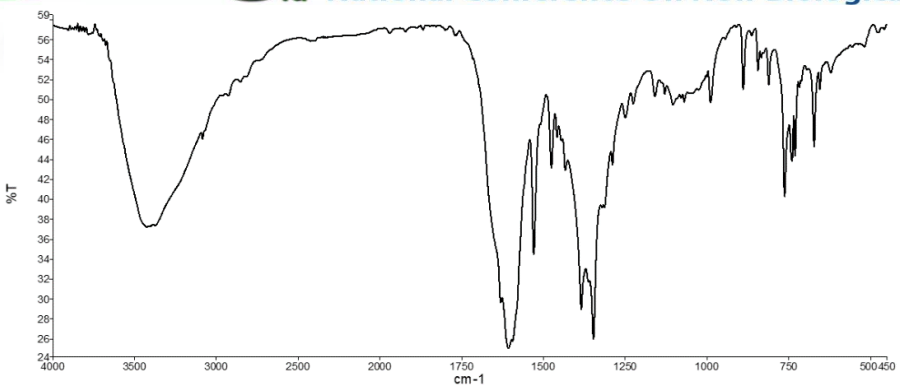
مراحل تهیه هر دو کمپلکس یکسان می‌باشد. بدین ترتیب که برای سنتز کمپلکس ها ، هر فلز با مخلوط لیگاندها بطور جداگانه در حلال مناسب حل شد و سپس مخلوط بمدت ۴ ساعت در دمای جوش حلال رفلاکس شد.. پس از گذشت این زمان محصول جمع‌آوری شد.

شناسایی

در بررسی طیف مادون قرمز کمپلکس ها نوار مشاهده شده در ناحیه cm^{-1} ۱۶۰۰ مربوط به C=O ، ارتعاش در ناحیه cm-1 ۳۴۰۰ مربوط به گروه آمیدی و ارتعاشات ناحیه cm^{-1} ۳۳۰۰ به گروه O-H مولکول آب نسبت داده می شود. شکل های ۱و۲.

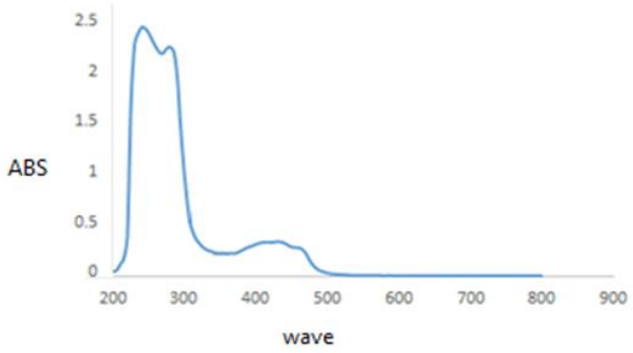


شکل ۱. طیف مادون قرمز کمپلکس [Co(2AB)(gly)] در محیط KBr

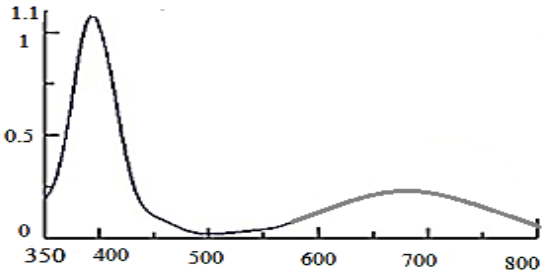


شکل 2. طیف مادون قرمز کمپلکس [Ni(2AB)(gly)] در محیط KBr

در طیف الکترونی هر دو کمپلکس انتقالات میدان لیگاند (d-d) نیز مشاهده شد. علاوه بر این انتقالات بار CT نیز انجام شد. شکل های ۳و۴

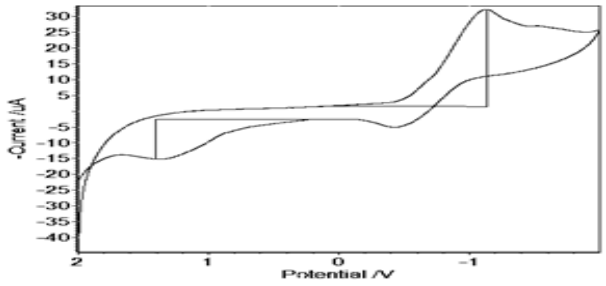


شکل 3. طیف الکترونی کمپلکس [Co(2AB)(gly)]در حلال DMSO

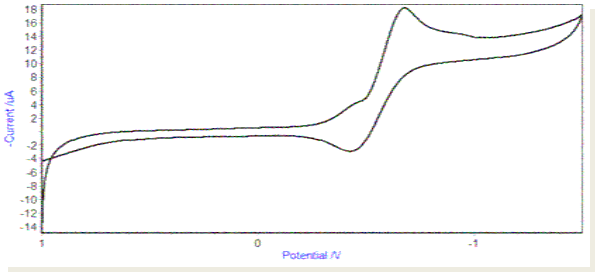


شکل 4. طیف الکترونی کمپلکس [Ni(2AB)(gly)]در حلال DMSO

ولتاموگرام های چرخه ای کمپلکس های [Co(2AB)(gly)], [Ni(2AB)(gly)] در شکل های ۵و۶ نشان داده شده است. همانطور که دیده می شود پتانسیل های شبه برگشت پذیر یون های Co(II) و Ni(II)در ولتاموگرام های مربوطه دیده می‌شود.



شکل ۵. ولتاموگرام چرخه ای کمپلکس [Co (2AB)(gly)]



شکل ۵. ولتاموگرام چرخه ای کمپلکس [Ni (2AB)(gly)]

فعالیت سیتوتوکسیسیتی کمپلکس های [Co(2AB)(gly)], [Ni(2AB)(gly)] برروی رده سلولی MCF-7 بوسیله کاهش MTT بررسی شد. و مقادیر IC_{50} یعنی قدرت مهار فعالیت سلول برای هر ترکیب، یعنی غلظتی از نمونه مد نظر که ۵۰ درصد فعالیت سلول های سرطانی را مهار می‌کند، محاسبه شد و نتایج نشان داد که هر دو کمپلکس توانایی مهار فعالیت سلول های سرطانی را دارند و کمپلکس [Ni(2AB)(gly)] فعالیت سیتوتوکسیسیتی بالاتری دارد.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان مقاله از حمایت های مالی دانشگاه سیستان و بلوچستان صمیمانه قدردانی می کنند.

منابع

[1] Saeidifar M, Mansouri-Torshizi H, Palizdar Y, Eslami-Moghaddam M, Divsla, A., Sabouri A.A, (2014) Acta chim. Slov, 61, 126-136

[2] Sorinezami Z., Mansouri-Torshizi H, Ghnbari B. 2017Inorganic and Nano-Metal Chemistry, 47, 4, 500-508.

[3] Talebi A., Salehi M. Khaleghian A. (2021). Journal of Molecular Structure, 131 1246, 2021

[4] Fazli M, Akbarzadeh-T N, Beitollahi H, Dušek M., Eigner, Eigner., (2021) Journal of Materials Science: Materials in Electronics 32, 25118–25136,.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول درمانی بیماران کرونایی

[۱*]محمدعلی حیدری، [۲]علی لطفعلی بائیس

[*] نویسنده مسئول: Mohammadali.he@yahoo.com

[۱] کارشناسی رشتۀ آموزش زیست‌شناسی دانشگاه فرهنگیان (پردیس حضرت رسول اکرم)، خوزستان، اهواز

[۲] کارشناسی رشتۀ آموزش زیست‌شناسی دانشگاه فرهنگیان (پردیس حضرت رسول اکرم)، خوزستان، اهواز

چکیده

بیماری COVID-۱۹ در اثر حمله شکل نوظهور بتاکرونا ویروس به نام SARS-CoV-۲ ایجاد می‌شود. در حال حاضر درمان مؤثری برای بیماری کرونا وجود ندارد. اما در میان گزینه‌های احتمالی درمان، سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان یکی از روش‌ها برای درمان بیماران مبتلابه COVID-۱۹ موردتوجه قرارگرفته است. در گزارش اخیر، سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی گزینه مطلوب‌تری است، چراکه این سلول‌ها با ایجاد ارگانوئیدها در محیط کشت و با حفظ قطبیت سیگنال دهی، ایمنی عملکردی دارند. در مدل کشت دو یا سه‌بعدی، استفاده از سلول‌های بنیادی به یک مدل کاربردی، جهت مطالعه و بررسی بیماری‌زایی ویروس تبدیل‌شده است. از بین انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا مشتقات آن‌ها امیدوارکننده‌ترین نتایج را در این زمینه در برداشته‌اند. علاوه بر موارد اشاره‌شده استفاده از اگزوزوم های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای مبارزه با بیماری COVID-۱۹ امیدوارکننده است. ویژگی تعدیل‌کننده سیستم ایمنی خاصیت ضدالتهاب ترمیم، بافت، ابعاد کوچک و توانایی انتقال هدفمند اگزوزوم های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همراه داروهای ضدویروسی و یا داروهای ضدالتهاب و اگزوزوم ها را به گزینه‌های جدیدی درزمینه درمان و پیشگیری از بیماری COVID-۱۹ تبدیل کرده است. برای انجام این مطالعه، مقالاتی که بین دسامبر سال ۲۰۱۹ تا فوریه سال ۲۰۲۰ در پایگاه داده‌های اصلی ScienceDirect, Embas, PubMed, Scopus, Cochrane Databas, Medline, ProQuest, Google Scholar منتشرشده بودند، با استفاده از کلمات کلیدی ۱۹- COVID یا SARS-COV۲، stem cells، mesenchymal به‌طور مستقل بدون محدودیت در زبان جستجو گردید. همچنین مطالعات از غربالگری مختصر لیست‌های مرجع مقالات بااهمیت بالا جمع‌آوری شد.

کلمات کلیدی: بیماری COVID-۱۹، سلول درمانی، سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اگزوزوم

The role of mesenchymal stem cells in cell therapy of corona's patients

*Heydari Mohammad Ali[1] , Lotfeali Baeis Ali[2]

*Author: mohammadali.he@yahoo.com

1. Department of Biology, Farhangian university (Hazrat Rasul Akram center), Khuzestan, Ahvaz
2. Department of Biology, Farhangian university (Hazrat Rasul Akram center), Khuzestan, Ahvaz

Abstract

COVID-19 disease is caused by an attack on an emerging form of beta-coronavirus called SARS-CoV-2 .There is currently no effective treatment for corona disease. But among the possible treatment options, stem cell therapy is considered as one of the methods for treating patients with COVID-19.In the recent report, stem cell therapy is a more desirable option, because these cells have functional immunity by creating organoids in the culture medium and by maintaining signaling polarity. In a two- or three-dimensional culture model, the use of stem cells has become an applied model for studying the virulence of the virus. Among stem cell types, mesenchymal stem cells or their derivatives have the most promising results in this field.

In addition to the mentioned cases, the use of exosomes derived from mesenchymal stem cells to fight COVID-19 disease is promising. The immunomodulatory properties of the immune system have made the anti-inflammatory properties of repair, tissue, small size, and the ability to purposefully transport mesenchymal stem cells derived exosomes along with antiviral drugs or anti-inflammatory drugs and exosomes into new options in the field of treatment and prevention of COVID-19 disease.

For this study, articles published between December 2019 and February 2020 in the main databases ScienceDirect, Embas, PubMed, Scopus, Cochrane Databas, Medline, ProQuest, and Google Scholar were searched independently using keywords 19-COVID or 2SARS-COV, stem cells, and mesenchymal keywords. Also, studies were collected from brief screening of reference lists of high-importance articles. Initially, the title and abstract of the article were evaluated for inclusion in this study. Various case studies were included in a cross-sectional clinical trial on the effectiveness of MSC in the treatment of patients with coronavirus.

Key words: Covid 19 disease, cell therapy, stem cells, mesenchymal stem cells, exosome

مقدمه

کووید ۱۹ از استان هوبی، شهر ووهان در چین در نوامبر ۲۰۱۹ آغاز شد و تا مارس ۲۰۲۰ در سراسر جهان پخش شد که در تاریخ جهان استثنایی است؛ زیرا چالش‌برانگیزترین فاجعه در جهان پس از ده ها سال شاید جنگ جهانی دوم رخ داده است. هم‌زمان با رشد و شیوع همه‌گیری جهانی، سازمان بهداشت جهانی (WHO) رسماً نوع جدید این بیماری را بیماری ویروس کرونا (COVID-۱۹) نامید (۱). بیماری ۱۹-COVID در طی ده ماه بیش از ۴۰ میلیون نفر را در ۲۱۴ کشور جهان آلوده کرده است (۲). این بیماری دارای تظاهرات بالینی متفاوت است و نسبت به سندرم حاد تنفسی (SARS-CoV) و سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) با میزان سرایت بالاتر گزارش‌شده است (۳). راه‌های انتقال SARS-CoV-۲ از طریق تماس نزدیک و مستقیم، قطرات و آئروسل‌ها، از طریق مدفوع به دلیل ورود ویروس به بافت‌های گوارشی، خلط، ادرار خون یا سرم و مایعات چشمی و به‌ندرت از مادر به جنین گزارش‌شده است (۴).

امروزه این ویروس همه‌گیر شده و دیگر هیچ کشوری از این بیماری در امان نیست؛ به جهت درمان این بیماری، رویکردهای درمانی مختلفی ارائه‌شده است. ازجمله ساخت واکسن که با چالش‌های زیادی روبه‌رو است درمان‌های جانبی شامل کاهش التهاب باواسطه کورتیکواستروئید پلاسما، درمانی آنتی‌بیوتیک برای درمان سپسیس باکتریایی ثانویه عوامل ضدویروسی غیراختصاصی و غیره که در موارد شدید بیماری ۱۹-COVID تأثیر زیادی نشان نمی‌دهند. دلیل اصلی شکست این روش‌های درمانی طوفان سیتوکین تولیدشده در ریه‌ها توسط ویروس است. در اسکن توموگرافی رایانه‌ای این طوفان‌های سیتوکین به‌عنوان ضایعات التهابی با تیرگی زمینه ظاهر می‌شود (۵). بیشتر بیماران در مراحل اولیه بیماری تظاهرات بالینی شدیدی ندارند. وخامت ناگهانی در وضعیت بیماران در مراحل بعدی پیشرفت بیماری مشاهده می‌شود. نارسایی سریع ارگان‌های متعدد و سندرم تنفسی حاد، منجر به مرگ بیمار در مدت‌زمان بسیار کوتاهی می. شود طوفان سیتوکین عامل احتمالی این سندروم بوده و در مواردی منجر به نارسایی چند عضو می‌شود (۶ و ۷).

اما در میان گزینه‌های درمان بیماران مبتلا به ویروس کرونا، سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان یکی از روش‌ها برای درمان بیماران مبتلا به COVID-۱۹ موردتوجه قرارگرفته است. از بین انواع سلول‌های بنیادی که برای درمان COVID-۱۹ موردتوجه قرار دارند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا مشتقات آن‌ها امیدوارکننده‌ترین نتایج را در این زمینه در برداشته‌اند. مطالعات نشان داده‌اند سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق بهبودترمیم سندرم ترشح سیتوکین یا طوفان سیتوکین (cytokine release syndrome) و ترشح انواع فاکتورها باعث محافظت سلول‌های آلوئولار در بیماران COVID-۱۹ مبتلا به سندرم حاد زجر تنفسی (ARDS) می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی

مزانشیمی سیتوکین‌هایی را ترشح می‌کنند که موجب فعال شدن انواع مختلف مکانیسم‌های ترمیمی آسیب حاد کلیه ازجمله مسیرهای ضدالتهابی ضد آپوپتوزیس و ضد رگزایی می‌شود (۳).

مواد و روش‌ها

مقالاتی که بین دسامبر سال ۲۰۱۹ تا فوریه سال ۲۰۲۰ منتشرشده بودند در پایگاه داده‌های اصلی ProQuest, Medline, PubMed, Scopus, Cochrane Databas, ScienceDirect, Embas Google Scholar, و با استفاده از کلمات کلیدی COVID-۱۹ یا SARS-COV-۲، stem cells، mesenchymal به‌طور مستقل بدون محدودیت در زبان جستجو گردید. همچنین مطالعات از غربالگری مختصر لیست‌های مرجع مقالات با اهمیت بالا جمع‌آوری شد.

در ابتدا عنوان مقاله و چکیده مقاله برای ورود به این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. پژوهش‌های مختلف گزارش مورد گروهی مقطعی کار آزمایی بالینی برون تنی یا درون تنی درزمینه‌ی اثربخشی MSC در درمان بیماران مبتلا به ویروس کرونا وارد مطالعه شدند. معیارهای خروج برای این مطالعه عبارت‌اند از: ۱- خلاصه مقالات ۲- مطالعات غیر بالینی ۳- مقالاتی که دقیقاً مرتبط با موضوع موردنظر نبودند؛ به‌عنوان‌مثال مقالاتی که به سایر بیماری‌های مرتبط با ویروس پرداخته بودند ۴- مطالعاتی که بیماران دارو و یا عاملی غیر از MSC دریافت کرده بودند ۵- مطالعات با داده‌های ناقص و غیرمفید.

انتخاب مطالعات نیز در دو مرحله انجام شد: در یک مرحله به‌طور مستقل عناوین و خلاصه مقالات منتشرشده از طریق استراتژی‌های جستجو بر اساس معیارهای ورود، غربال شد. مقالاتی که شرایط ورود را نداشتند از مطالعه خارج شد. در مرحلهٔ بعدی نیز در مواردی که مقاله شرایط ورود به مطالعه را داشته باشد متن کامل توسط همان و نویسندگان بررسی شد. برای هر مقاله‌ی واجد شرایط اطلاعات توصیفی زیر استخراج شد: ویژگی‌های مطالعه ژورنال نویسنده اول و کشور مطالعه مشخصات بالینی (سن جنس و جمعیت ویژگی‌های مداخله، انواع دوز و غیره) ویژگی‌های کار آزمایی بالینی کشور وضعیت مطالعه، منبع سلول علائم فاز آزمایش‌های بالینی (مسیر تزریق و تعداد دفعات تزریق) و یافته‌های اصلی (همه) نتایج و مرگ‌ومیر نتیجه اولیه میزان مرگ‌ومیر بود و نتایج دیگر شامل واکنش‌های جانبی تنظیم سیستم ایمنی‌ترمیم و بازسازی بافت آسیب‌دیده و یافته‌های توموگرافی کامپیوتری (CT) همچنین در مقالات انتخاب‌شده مسیرهای بیماری‌زایی ویروس SARS-CoV-۲ و عوارض آن و همچنین خصوصیات و پتانسیل‌های درمانی سلول‌های بنیادی در بهبود وضعیت بیماران کرونایی موردمطالعه قرار گرفت.

ویژگی‌های ویروس کرونا SARS-COV-۲

نتایج حاصل از این آنالیزهای توالی ژنوم SARS-COV-۲ نشان داده است که این ویروس جزو بتاکرونا ویروس‌ها بوده که شامل کرونا ویروس‌های خفاشی شبه SARS و MERS هستند. طی آنالیز فیلوژنتیکی

نشان داده شد که SARS-COV-۲ یک کلاد مجزا از SARS-CoV تشکیل می‌دهد و ۷۹/۵ درصد همولوژی با SARS-CoV دارد، همچنین نشان داده‌شده است که پروتئین اسپایک در SARS-COV-۲ و SARS-CoV بیش از ۷۰ درصد و SARS-COV-۲ و MERS-CoV بیش از ۵۰ درصد شباهت دارند، این تشابه بیشتر مربوط به زیر واحد S2 در این دو گونه است (۱۰- ۸).

ویروس با ورود به سلول میزبان و تکثیر آن درون سلول، رشته‌ی RNA+ داخل سلول آزاد می‌شود و با تکثیر خود و تولید اجزای کپسید ویروس، امکان تشکیل ذرات ویروسی جدید را فراهم می‌آورد. اتصال ذره‌ی ویروسی با سطح سلول از طریق اتصال پروتئین S به گیرنده‌ی آن در سطح سلول امکان ورود ژنوم تک رشته‌ی RNA به سیتوپلاسم و بیان ORF1a/b و ایجاد pp1a و pp1ab را فراهم می‌آورد. جدا شدن اجزای این پلی پروتئین‌ها از طریق پروتئازهای PLpro و CLpro۳ صورت می‌گیرد. یکی از این پروتئین‌ها، آنزیم RdRp است که در تکثیر دیگر RNA های تک رشته + ژنومیک و سابژنومیک نقش دارد. در این فرایند، RNA های تک رشته‌ی منفی به‌عنوان رشته‌های حد واسط عمل می‌کنند. پروتئین‌های ساختاری درنتیجه‌ی ترجمه‌ی RNA های سابژنومیک بیان می‌شوند و به این ترتیب، با تکمیل اجزای مختلف، تشکیل ذره‌ی ویروسی تکمیل می‌شود (۱۱).

پروتئین اسپایک SARS-COV-۲ یک پروتئین ادغام‌شده کلاس I و واسطه‌ای برای اتصال گیرنده و غشای ویروس است و ازنظر تعیین تروپیسم میزبان و ظرفیت انتقال، مهم محسوب می‌شود. پروتئین اسپایک به لحاظ ساختاری دارای دو زیر واحد S1 و S2 است. دمین اتصال یابنده به گیرنده یا Domain Binding Receptor (RBD) در زیر واحد S1 مسئول اتصال ویروس به گیرنده میزبان است و نقش مهمی در ایجاد عفونت دارد،S2 برای اتصال به غشای سلول میزبان باردار شده است و مسئول تحریک و آزاد کردن ژنوم ویروس به داخل سیتوپلاسم است. زیر واحد S1 به‌تنهایی نمی‌تواند القاکننده عفونت باشد چراکه لازم است جهت الحاق غشای ویروس با غشای سلول میزبان و یا غشای اندوزوم، پروتئین اسپایک توسط پروتئینازهای میزبان فعال شوند. درنتیجه لازم است زیر واحد S2 از یک مرحله کم ثبات پیش الحاقی به مرحله باثبات پس الحاقی منتقل شود. از راه‌های دیگر ورود این ویروس به سلول استفاده از گیرنده SP-CD147 است. درروش اندوسیتوز، کاتپسین L و فورین باعث فعال‌سازی پروتئین اسپایک می‌شوند. حال‌آنکه درروش همجوشی مستقیم پروتئاز ترا غشایی سرین، TMPRSS2 (با یا بدون همکاری فورین) و پروتئازهایی مانند تریپسین نقش مهم‌تری در این فرایند دارند. TMPRSS2 به‌عنوان یک سرین پروتئاز پروتئین اسپایک ویروس را به ۲ زیر واحد عملکردی تقسیم می‌کند: S1 که با ACE2 تعامل دارد و S2 که بیشتر توسط TMPRSS2 جذب و فعال می‌شود، این کار موجب همجوشی غشایی و ورود ژنوم ویروس به داخل سلول میزبان می‌شود (۳-۲).

ویژگی‌های بیماران مبتلابه کرونا ویروس

تب ۳۸ درجه سانتی‌گراد، سرفه خشک و تنگی نفس از شایع‌ترین علائم مشترک در سه بیماری SARS، MERS و COVID-19 هستند. سردرد، خستگی، درد ماهیچه و اسهال به‌علاوه علائم گوارشی شامل تهوع و استفراغ از علائم اختصاصی‌تر بیماری است. در بیماری COVID-19 تب در ۹۹-۸۳ درصد موارد و سرفه خشک در ۸۲-۵۹ درصد موارد در شروع بیماری مشاهده می‌شود (۱۲، ۸). بررسی علائم بیماری COVID-19 در ۴۵۸ بیمار در سال ۲۰۲۰ نشان داد که شایع‌ترین علائم آن عبارت‌اند از تب همراه با سرفه، گلودرد و تنگی نفس که طی ۵ روز این علائم ظاهر می‌شوند (۹). در بیماری COVID-19 برخلاف SARS که بیشترین علائم آن بعد از روز دهم از آلودگی به ویروس ظاهر می‌شود، بار میکروبی در زمان شروع علائم در بینی بیش از گلو است که طی چند روز این بار میکروبی کمتر می‌شود. درحالی‌که دوره‌ی نهفتگی سویه دلتای ویروس SARS-COV-۲ نسبت به سایر سویه‌ها کوتاه‌تر است (۱۳) . بررسی علائم سرولوژیکی بیماری COVID-19 با استفاده از آزمایش خون در افرادی که ابتلای آن‌ها به COVID-19 با استفاده از روش PCR-RT تأییدشده بود نشان داد که این بیماران دارای علائمی مانند میزان پایین اکسیژن خون نیز هستند. همچنین آنالیزهای cytometry Mass خون بیماران در این آزمایش‌ها نشان داد که لنفوسیت‌های T تنظیمی و سلول‌های دندریتیک حین بیماری در بیماران هیچ افزایشی ندارند (۱۴).

علائم هیستوپاتولوژیکی (پاتولوژی سیستم تنفسی)

ازآنجاکه مسیر اصلی انتقال SARS-COV-۲ از طریق ذرات تنفسی است، ریه‌ها در بیماران COVID-19 به‌شدت آسیب می‌بینند (۲). در مطالعه‌ای، مقدار زیادی از RNA SARS-CoV در بزاق تمام نمونه‌های ۱۷ بیمار مبتلابه SARS یافت شد، ازجمله در ۴ بیمار قبل از ایجاد ضایعات ریوی و در برخی از بیماران از ترشحات بالای حلق شواهدی از وجود SARS-CoV مشاهده شد. لئو و همکارانش با استفاده از یک مدل اولیه غیرانسانی دریافتند که سلول‌های ACE2+ به‌طور گسترده در موکوس دستگاه تنفس فوقانی و سلول‌های اپیتلیال ACE2 در مجاری غدد بزاقی، اولین سلول‌های هدفی بودند که به‌طور مؤثری آلوده شدند (۳).

این در حالی است که همه بافت‌های و اندام‌های بدن به‌ویژه سلول‌های بافت اندوتلیال کیسه‌های هوایی، ACE2 را کم‌وبیش بیان می‌کنند، بنابراین قرار گرفتن در معرض ویروس می‌تواند منجر به سندرم حاد تنفسی شود. از طرفی مشخص شد بیان زیاد ACE2 توسط سلول‌های آلوئولی ریه نوع ۲ (AT2) یکی از عمده‌ترین دلایل گرایش SARS-COV-۲ برای ایجاد عفونت در ریه است. (۱۵) مطالعات نشان داده است ویروس SARS-COV-۲ سلول‌های اپیتلیال درراه‌های هوایی و همچنین سلول‌های اندوتلیال عروقی و ماکروفاژهای ریوی را مورد هدف قرار می‌دهد (۱۶). همچنین مطالعات بیشتر دیگر نشان دادند COVID-

19 می‌تواند با اثر بر سلول‌های اپیتلیال لایه‌های سطحی ورود هوا به دستگاه تنفسی باعث ایجاد اثر سایتوپاتیک در آن‌ها و کاهش تحرک مژک‌های دستگاه تنفسی شوند (۱۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی از خصوصیات ویژه‌ای ازجمله خودنوزایی و تمایز به رده‌های مختلف سلولی برخوردار هستند که این ویژگی‌ها آن‌ها را به روشی جذاب برای سلول درمانی در کلینیک تبدیل می‌کند بااین‌حال به دلیل بسیاری از محدودیت‌های اخلاقی و قانونی توسعه‌ی بالینی و پیشرفت درمان به‌واسطه‌ی سلول‌های بنیادی نسبتاً کند بوده است. درمان به‌واسطه‌ی سلول‌های بنیادی به یکی از استراتژی‌های درمانی نوظهور برای چندین بیماری مقاوم به درمان ازجمله عفونت‌های ویروسی تبدیل‌شده است (۱۹،۱۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های چندتوانی هستند که در ابتدا در لایه‌های مزودرم و اکتودرم مراحل اولیه جنینی شناسایی شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی ابتدا از مغز استخوان جدا شدند اما پس‌ازآن در بافت‌های مختلفی مانند چربی پالپ دندان، بند ناف و جفت کشف شدند (۲۰).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس انجمن بین‌المللی سلول درمانی (International Society for Cell Therapy) به این صورت تعریف می‌شود: (a) سلول‌های چسبنده به کف ظرف کشت سلول که (b) قادر به تمایز به استئوسیت، کندروسیت سلول غضروفی و آدی پوسیت هستند و (C) فنوتیپ آن‌ها در مورد مارکرهای مزانشیمی CD105، CD73 CD90، CD44، CD146، CD166 و CD29 مثبت و برای اندیکاتورهای خون‌ساز CD45 HLA-DR، CD34، CD31، CD32، CD33، CD11b، CD14 منفی است (۲۲، ۲۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای گیرنده‌های ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix receptors) هستند. این گیرنده‌ها ارتباط سلول‌های بنیادی مزانشیمی را با مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی میسر می‌سازند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سایتوکاین کموکاین و فاکتورهای رشد متنوعی را بیان می‌کنند. این مزیت، دانشمندان را تشویق به استفاده از آن‌ها در درمان برخی بیماری‌ها می‌کند (۲۳). سلول‌های بنیادی مجاری تنفسی (Bronchi alveolar stem cells) به‌عنوان سلول‌های بنیادی پرتوان در نظر گرفته می‌شوند و قادر به تحمل آسیب ناشی از برونشیول و آلوئول تکثیر در فرآیند بازسازی اپیتلیال و تمایز به سلول‌های AT2 Clara و AT1 هستند (۲۴).

به‌کارگیری سلول‌های مزانشیمی در درمان بیماران کرونایی

در حال حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از منابع مختلف در حال آزمایش برای اثرات درمانی در بیماران COVID-۱۹ هستند سلول‌های بنیادی مزانشیمی سطح کمی از مولکول‌های کلاس ۱ آنتی‌ژن لکوسیت انسانی را بیان می‌کنند و مولکول‌های لوکوسیتی کلاس II یا مولکول‌های تحریک‌کننده را بیان نمی‌کنند.

این مشخصات سلول‌های بنیادی اجازه می‌دهد تا از واکنش‌های دفاعی سلول‌های B T و NK فرار کنند. (۲۵) سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بیماری‌های التهابی مربوط به سیستم ایمنی، بیماری التهابی روده، آرتریت روماتوئید و سندروم‌های حاد تنفسی به‌طور گسترده مورداستفاده قرارگرفته‌اند (۲۷، ۲۶). کابات و همکاران در یک متاآنالیز از آزمایش‌های بالینی مختلف، تزریق وریدی را به‌عنوان بیشترین روش مورداستفاده در آزمایش‌های مربوط به استفاده از سلول‌های بنیادی گزارش دادند (۲۲). در درمان ARDS با استفاده از تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی این تزریق به‌صورت اتوژنیک/آلوژنیک از طریق دو روش وریدی یا استنشاقی انجام‌شده است (۲۵). منبع سلول‌های بنیادی مورداستفاده در آزمایش‌های بالینی ذکرشده، یکی از متغیرهای مهم در میان ۸۸ مطالعه‌ی موردبررسی است. شایع‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورداستفاده بند ناف ژله وارتون بود.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند فاکتورهای رشد و سیتوکین های مختلفی را برای بهبود ریز محیط ریه ترشح کرده و ترمیم ریه را تقویت کنند (۲۸). به‌عنوان‌مثال، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند با ترشح فاکتور رشد کبدی (HGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) فاکتور رشد کراتینوسیت (KGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) باعث تکثیر سلولی و ترمیم آسیب بافتی شوند (۳۱ - ۲۹). همچنین MSCS قادرند از طریق وزیکول‌های خارج سلولی نیز HGF ترشح کنند و بدین‌وسیله آسیب التهابی را کاهش و اتوفاژی را افزایش دهند و درنتیجه منجر به بازیابی اپیتلیوم آلوئولار و پوشش اندوتلیال عروق ریوی شوند (۳۲). علاوه بر این سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند سطح فاکتورهای پروفیبروتیک را به‌منظور بهبود ریز محیط سلول‌های ریه کاهش دهند و از فیبروز ریوی به‌ویژه در بیماران مبتلابه COVID-۱۹ جلوگیری کنند. یک مکانیسم احتمالی برای این اثر تنظیم اگزوزوم است. این وزیکول‌های خارج سلولی غشایی در ترمیم آسیب بافتی نیز شرکت می‌کنند (۳۳). اگزوزومهای MSC می‌توانند با کاهش سطح TNF- α، TGF- β کلاژن نوع I کلاژن نوع III، هیدروکسی پرولین و سرولوپلاسمین سرم در بافت های ریه باعث بازسازی سلول‌های اپیتلیال، آلوئول، کاهش التهاب آلوئول و مهار آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال شوند و درنتیجه کاهش فیبروز ریوی شوند (۳۴). همچنین این سلول‌ها می‌توانند باعث‌ترمیم سایر بافت های آسیب‌دیده ازجمله کلیه‌ها در بیماران COVID-۱۹ شوند. به‌علاوه این سلول‌ها می‌توانند آسیب روده مربوط به این بیماران را از طریق ترمیم مخاط و بازسازی اپیتلیال درمان کنند (۳۵). مسئله‌ی اساسی سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از تزریق وریدی است. سرنوشت طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از تزریق به‌طور کامل مشخص نیست. پس از تزریق سلول‌های بنیادی اکثر سلول‌ها در رگ‌های ریه محبوس می‌شوند و طول عمر آن‌ها کوتاه است تعداد کمی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تزریق‌شده پس از تجویز در بافت های دیگر توزیع می‌شود. وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌طور سیستماتیک تزریق می‌شوند به‌سرعت از گردش خون در ریه خارج می‌شوند و در آنجا ممکن است به‌راحتی باعث آمبولی شوند، همچنین ممکن است یک حمله‌ی ایمنی ذاتی به‌عنوان واکنش التهابی سریع ایجاد کنند (۳۶).

اثر تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر علائم ظاهری بیماران کرونایی

اکثر این مطالعات بالینی موردمطالعه در حال بررسی بی‌خطر بودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان بیماران COVID-۱۹هستند. در اغلب موارد تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درجه‌ی اول اثرات ریوی ایجاد می‌کند، بنابراین مزیتی برای ترمیم بافت ریه در بیماری COVID-۱۹ فراهم می‌کند (۳۷). مطالعات نشان داده است تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بیماران مبتلابه COVID-۱۹ موجب بهبود علائم بالینی این بیماران می‌شود. در یک مطالعه در کشور چین تزریق وریدی آلوژنیک سه دوز متوالی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی (hUC-MSC) به تعداد و ۵×۱۰^{۶} سلول به ازای هر کیلوگرم از وزن بیمار با فاصله ۳ روز از هم در یک خانم بیمار ۶۵ ساله مبتلابه COVID-۱۹ دارای نقص عملکردی چند عضو ازجمله کبد و نیازمند ونتیلاتور برای تنفس موجب بهبودی علائم حیاتی اولیه وی یک روز پس از تزریق دوم و تنفس بدون نیاز به ونتیلاتور در روز چهارم پس از تزریق دوم شده است. همچنین بازگشت تمام پارامترهای بیولوژیکی ازجمله تعداد سلول‌های T خون به مقادیر طبیعی به دلیل کاهش التهاب و آسیب‌های داخل ریه‌ها و سایر بافت ها و خروج از بخش مراقبت‌های ویژه دو روز پس از تزریق سوم، عدم مشاهده عارضه جانبی گزارش‌شده است. در خصوص مکانیسم تأثیر بایستی این توضیح داده شود بعد از تزریق hUCMSCS افزایش تعداد سلول‌های CD3+ T، CD4+ T و CD8+ T به‌طور قابل‌توجهی به سطح طبیعی مشاهده‌شده است که نشان‌دهنده برگشت لنفوپنی است، این فرایند یک ویژگی مشترک بیماران COVID-۱۹ است و با شدت بیماری و مرگ‌ومیر مرتبط است. به‌علاوه نشان داده شد تعداد گلبول‌های سفید و تعداد نوتروفیل ها و نسبت نوتروفیل به لنفوسیت و سطح دایمر همچنین غلظت سرمی بیلی CRP ALT و AST نیز به‌تدریج کاهش می‌یابد و باعث می‌شود برخی علائم حیاتی دیگر بهبود یابد که این موارد می‌تواند نشانگر مهار التهاب و تعدیل سیستم ایمنی توسط MSC باشد (۳۸). در یک از مطالعه‌ی دیگر پس از تزریق سلول CT اسکن قفسه سینه بیماران نشان‌دهنده‌ی بهبودی بود و همه بیماران بهبودهای بالینی داشتند و در طی بستری شدن در بیمارستان هیچ فوتی رخ نداده است (۳۹). همچنین دکتر شو و همکاران گزارش کردند که تزریق UC-MSC برای درمان COVID-۱۹ کاملاً مؤثر و بی‌خطر است (۴۰).

لیانگ و همکارانش نیز موردی از یک بیمار کرونایی را که تحت درمان با این سلول‌ها قرارگرفته است گزارش کردند و نشان دادند تزریق سلول باعث بهبود شاخص‌های آزمایشگاهی و تسکین علائم التهاب شد (۴۱). وانگ و همکاران فاز ۱ آزمایش‌های بالینی استفاده از UC MSCs برای درمان کرونا را گزارش دادند (۴۲) هیچ عارضه جانبی جدی مرتبط تزریق مشاهده نشد و نتایج CT اسکن نشان داد ضایعات ریه در بیمارانی که تزریق UC-MSC انجام می‌دهند طی ۶ روز به‌خوبی کنترل می‌شوند و طی ۲ هفته کاملاً ناپدید می‌شوند. سانچیز و همکاران مطالعه‌ای در رابطه با کاربرد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی را برای درمان بیماران مبتلابه ذات‌الریه شدید مرتبط با کرونا گزارش دادند هیچ عارضه‌ی جانبی مربوط به سلول

درمانی مشاهده نشد (۴۳). بهبود بالینی در ۹ بیمار مشاهده شد، ۷ بیمار از بخش مراقبت‌های ویژه مرخص شدند و ۴ بیمار در وضعیت لوله‌گذاری باقی ماندند. Li و همکاران یک مطالعه بالینی را با استفاده از سلول‌های مشتق از خون قاعدگی برای درمان بیماران کرونا گزارش کردند (۴۴).

بحث و نتیجه

از بین همه روش‌های سلول درمانی که برای درمان COVID-۱۹ موردتوجه قرار دارند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا مشتقات آن‌ها یکی از امیدوارکننده‌ترین نتایج را در این زمینه داشته‌اند. مشخص‌شده است که در تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی این سلول‌ها مستقیماً به ریه‌ها مهاجرت می‌کنند و قادرند فاکتورهای زیادی را ترشح کنند که نقش مهمی در تعدیل سیستم ایمنی محافظت از سلول‌های اپیتلیال آلوئولار مقاومت در برابر فیبروز ریوی و بهبود عملکرد ریه دارند که این یک مزیت بزرگ برای درمان بیماری حاد ریوی است. در بیماری COVID-۱۹ مکانیسم اصلی اثر درمانی MSC از طریق ترشح فاکتورهای، محلول مانند سیتوکین ها، کموکین ها، عوامل رگ زایی، فاکتورهای رشد، اگزوزوم ها و وزیکول‌های خارج سلول است. اگرچه آزمایش‌های بالینی به‌طور مقدماتی نتایج امیدوارکننده‌ای در ایمنی و اثربخشی سلول‌های بنیادی مزانشیمی داخل وریدی در بیماران مبتلابه بیماری‌های ریوی مرتبط با بیماری COVID-۱۹ نشان داده‌اند بااین‌حال، نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتر و دقیق‌تری است چرا که ناهمگنی منابع سلولی و درنتیجه قابلیت‌های ترشحی و عملکردهای متفاوت تعدیل سیستم ایمنی و ترمیم بافت آن‌ها مقایسه و نتیجه‌گیری نهایی را دشوار می‌کند. بنابراین غلبه بر ناهمگنی سلول‌های بنیادی یکی از مهم‌ترین موارد در درمان مبتنی بر سلول‌های بنیادی در کلینیک است و تصویب و انتشار توافق‌ها و دستورالعمل‌های بین‌المللی در رابطه با استانداردهای بالینی تعیین کیفیت اثربخشی و سازگاری سلول‌های بنیادی در درمان بحران COVID-۱۹ امری لازم و ضروری است.

منابع

- 1. Ranasinghe, R., Damunupola, A., Wijesundara,S., Karunarathna, C., Nawarathna, D., Gamage, S., & Idroos, A. A. Tourism after Corona: Impacts of Covid 19 Pandemic and Way Forward for Tourism, Hotel and Mice Industry in Sri Lanka. Hotel and Mice Industry in Sri Lanka (April 22, 2020).
- 2. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. Current biology. 2020;30(7):1346-51. e2.
- 3. Yu F, Jia R, Tang Y, Liu J, et al. SARS-CoV-2 infection and stem cells: Interaction and intervention. Stem cell research. 2020;46:101859.
- 4. Zhu Z, Lian X, Su X, Wu W, et al. From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. Respiratory research. 2020;21(1):1-14
- 5. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the `Cytokine Storm' in COVID-19. J Infect 2020;80:607-13. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.037

- 6. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. Int J Antimicrob Agents 2020;55:105924. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105924
- 7. Special Expert Group for Control of the Epidemic of Novel Coronavirus Pneumonia of the Chinese Preventive Medicine A. [An update on the epidemiological characteristics of novel coronavirus pneumonia (COVID-19)]. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 2020;41:139-44. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.002
- 8. Zhu Z, Lian X, Su X, Wu W, et al. From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. Respiratory research. 2020;21(1):1-14.
- 9. Petrosillo N, Viceconte G, Ergonul O, Ippolito G, et al. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? Clinical Microbiology and Infection. 2020;26(6):729-34.
- 10. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, et al. Y. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. Cell. 2020;181(4):894-904.
- 11. Morse JS, Lalonde T, Xu S, Liu WR. Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. Chembiochem 2020; 21(5): 730-8.
- 12. Li YC, Bai WZ, Hashikawa T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. Journal of medical virology. 2020;92(6):552-5.
- 13. He N. Rapid evolution of the COVID-19 pandemic calls for a unified public health response. BioScience Trends. 2021; 15(4):196-200.
- 14. Leng Z, Zhu R, Hou W, Feng Y, et al. Transplantation of ACE2-mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia. Aging and disease. 2020;11(2):216-228.
- 15. Desterke C, Griscelli F, Imeri J, Marcoux P, et al. Molecular investigation of adequate sources of mesenchymal stem cells for cell therapy of COVID-19-associated organ failure. Stem Cells Translational Medicine. 2021;10(4):568-71.
- 16. Schäfer R, Spohn G, Bechtel M, Bojkova D, et al. Human mesenchymal stromal cells are resistant to SARS-CoV-2 infection under steady-state, inflammatory conditions and in the presence of SARS-CoV-2-infected cells. Stem Cell Reports. 2021;16(3):419-27.
- 17. Liu J, Zheng X, Tong Q, Li W, et al. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. Journal of medical virology. 2020;92(5):491-4.
- 18. Esquivel D, Mishra R, Soni P, Seetharaman R, Mahmood A, Srivastava A. Stem Cells Therapy as a Possible Therapeutic Option in Treating COVID-19 Patients. Stem Cell Rev Rep 2020. doi: 10.1007/s12015-020-10017-6
- 19. Du J, Li H, Lian J, Zhu X, Qiao L, Lin J. Stem cell therapy: a potential approach for treatment of influenza virus and coronavirusinduced acute lung injury. Stem Cell Res Ther 2020;11:192.doi: 10.1186/s13287-020-01699-3
- 20. Pittenger MF, Discher DE, Peault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. NPJ Regen Med 2019;4:22. doi: 10.1038/s41536- 019-0083-6

- 21. Can A, Coskun H. The rationale of using mesenchymal stem cells in patients with COVID-19 related acute respiratory distress syndrome: What to expect. Stem Cells Translational Medicine. 2020;9(11):1287-302.
- 22. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. Gastroenterology. 2011;141(5):1762-72.
- 23. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, et al. Replication of human noroviruses in stem cell–derived human enteroids. Science. 2016;353(6306):1387-93.
- 24. Pérez-Bermejo JA, Kang S, Rockwood SJ, Simoneau CR, et al. SARS-CoV-2 infection of human iPSC-derived cardiac cells predicts novel cytopathic features in hearts of COVID-19 patients. BioRxiv. 2020.
- 25. Can A, Coskun H. The rationale of using mesenchymal stem cells in patients with COVID-19-related acute respiratory distress syndrome: What to expect. Stem Cells Transl Med 2020;9:1287-302. doi: 10.1002/sctm.20-0164
- 26. Prockop DJ. The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2017;19:1-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.09.008
- 27. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. Mol Ther 2012;20:14-20. doi: 10.1038/mt.2011.211
- 28.. Li Z, Niu S, Guo B, Gao T, Wang L, Wang Y, et al. Stem cell therapy for COVID-19, ARDS and pulmonary fibrosis. Cell Prolif 2020;53:e12939. doi:10.1111/cpr.12939
- 29. Bernard O, Jeny F, Uzunhan Y, Dondi E, Terfous R, Label R, et al. Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signaling. ProteinCell 2018;314:L360-L71. doi: 10.1152/ajplung.00153.2017
- 30. Meng SS, Guo FM,Zhang XW, Chang W, Peng F, Qiu HB, et al. mTOR/STAT-3 pathway mediates mesenchymal stem cell-secreted hepatocyte growth factor protective effects against lipopolysaccharide-induced vascular endothelial barrier dysfunction and apoptosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2019;120:3637- 50.doi: 10.1002/jcb.27642
- 31. Qin H, Zhao A. Mesenchymal stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome: from basic to clinics. J Cell Biochem 2020;11:707-22. doi: 10.1007/s13238-020-00738-2
- 32. Hu S, Park J, Liu A, Lee J, Zhang X, Hao Q, et al. Mesenchymal Stem Cell Microvesicles Restore Protein Permeability Across Primary Cultures of Injured Human Lung Microvascular Endothelial Cells. Stem Cells Transl Med 2018;7:615-24. doi: 10.1002/sctm.17-0278
- 33. Zhao T, Sun F, Liu J, Ding T, She J, Mao F, et al. Emerging Role of Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes in Regenerative Medicine. Curr Stem Cell Res Ther 2019;14:482-94. doi: 10.2174/1574888X14666190228103230
- 34. Wang HY, Liu C, Wang Y, Zhang LL, Liu XR, Liu HL. [Experimental treatment of pulmonary interstitial fibrosis with human umbilical cord blood mesenchymal stem cells]. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi 2013;31:675-80.
- 35. Martinez-Rojas MA, Vega-Vega O, Bobadilla NA. Is the kidney a target of SARS-CoV-2? Am J Physiol Renal Physiol 2020;318:F1454-F62. doi: 10.1152/ajprenal.00160.2020

- 36. Islam D, Huang Y, Fanelli V, Delsedime L, Wu S, Khang J, et al. Identification and Modulation of Microenvironment Is Crucial for Effective Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Acute Lung Injury. Am J Respir Crit Care Med 2019;199:1214-24. doi: 10.1164/rccm.201802-0356OC
- 37. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. Stem Cells Dev 2009;18:683-92. doi: 10.1089/scd.2008.0253
- 38. Marshall M. The lasting misery of coronavirus long-haulers. Nature. 2020;585(7825):339-341.
- 39. Chen X, Shan Y, Wen Y, Sun J, Du H. Mesenchymal stem cell therapy in severe COVID-19: A retrospective study of short-term treatment efficacy and side effects. J Infect 2020;81:647-79. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.020
- 40. Shu L, Niu C, Li R, Huang T, Wang Y, Huang M, et al. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther 2020;11:361. doi: 10.1186/s13287-020- 01875-5
- 41. Liang B, Chen J, Li T, Wu H, Yang W, Li Y, et al. Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A case report. Medicine (Baltimore) 2020;99:e21429. doi: 10.1097/MD.0000000000021429
- 42. Meng F, Xu R, Wang S, Xu Z, Zhang C, Li Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase 1 clinical trial. Signal Transduct Target Ther 2020;5:172. doi: 10.1038/s41392-020-00286-5
- 43. Sanchez-Guijo F, Garcia-Arranz M, Lopez-Parra M, Monedero P, Mata-Martinez C, Santos A, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia requiring mechanical ventilation. A proof of concept study. EClinical Medicine 2020;25:100454. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100454
- 44. Tang L, Jiang Y, Zhu M, Chen L, Zhou X, Zhou C, et al. Clinical study using mesenchymal stem cells for the treatment of patients with severe COVID-19. Front Med 2020;14:664-73. doi: 10.1007/s11684-020-0810-9

مهندسی نانوذرات و کاربرد آن‌ها در زیست‌شناسی

الهام قائد شرفی[۱*]، فاطمه نظری[۲]
۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه جیرفت، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه جیرفت، ایران

[*]sef.arfand@gmail.com

چکیده

نانوذرات می‌توانند براساس ترکیبات، اندازه، شکل و سطوح شیمیایی مهندسی شده و به طور وسیع به عنوان ابزاری جهت مطالعات زیستی به کار روند. از کاربردهای علم نانوذرات در علوم سلولی و مولکولی می‌توان به تحویل درون سلولی مواد با واسطه نانولوله سیلیکونی جهت ویرایش ژن در محیط Ex Vivo، نانو ترانزیستور سلولی، رابط‌های نانو زیستی مهندسی شده برای تحویل و نمونه‌برداری درون سلولی، نقش‌نانوساختارهای عمودی یک بعدی در هماهنگ‌سازی عملکرد سلول‌های ایمنی، نانو حامل مغناطیسی الکتریکی تحریک شده توسط سنجش میدان الکتریکی زیست سلولی اشاره کرد. این بررسی مروری بروزترین روش‌های مهندسی نانوذرات و کاربرد آن‌ها در مباحث علم سلولی و مولکولی به تفصیل ارائه می‌گردد.

کلمات کلیدی: مهندسی نانوذرات، نانولوله، نانوترانزیستور، رابط‌های نانو، نانوساختارهای عمودی

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Nanoengineering and their application in biology

Elham Qaed Sharafi [1*] & Fatemeh Nazari[2]

1. Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran

[*]sef.arfand@gmail.com

Abstract

Nanoparticles can be engineered based on chemical composition, size, shape and surface and widely used as a tool for biological studies. Among the applications of nanoparticle science in cellular and molecular sciences are the intracellular delivery of materials through silicon nanotubes for ex vivo gene editing, cellular nanotransistors, engineered nanobiological interfaces for intracellular delivery and sampling, the role of One-dimensional vertical nanostructures in coordinating the function of immune cells, electro-magnetic nano-carriers stimulated by bio-cellular electric field sensing. This overview of the latest nanoparticle engineering methods and their application in cellular and molecular science topics is presented in detail.

Keywords: nanoparticle engineering, nanotube, nanotransistor, nanointerfaces, vertical nanostructures

مقدمه

نانوتکنولوژی شاخه‌ای از علم نسبتاً جدید است که طیف وسیعی از کاربردها را پیدا کرده است که از تولید انرژی گرفته تا فرآیندهای تولید صنعتی و کاربردهای زیست‌پزشکی را شامل می‌شود. یکی از کاربردهای کلیدی آن در زیست‌شناسی و تحقیقات زیست‌پزشکی است. نانوذرات (NPs) را می‌توان طوری مهندسی کرد که دارای ترکیبات و عملکردهای منحصر به فردی باشند که می‌توانند ابزارها و تکنیک‌های جدیدی را ارائه دهند که قبلاً در تحقیقات زیست پزشکی وجود نداشته است. انواع مختلفی از پلتفرم‌های NP با اندازه، شکل، ترکیبات و عملکردهای متفاوت وجود دارد. علاوه‌براین، هر نوع نانوذره به طور بالقوه می‌تواند با استفاده از تکنیک‌های مختلفی مانند نانورسوب و لیتوگرافی برای نانوذرات پلیمری ساخته شود. لیپوزوم‌ها، باند آلبومین، پلیمر، اکسید آهن، نقطه کوانتومی و طلا انواعی از نانوذرات هستند که در علوم زیستی به خصوص سلولی و مولکولی کاربرد دارند [۶].

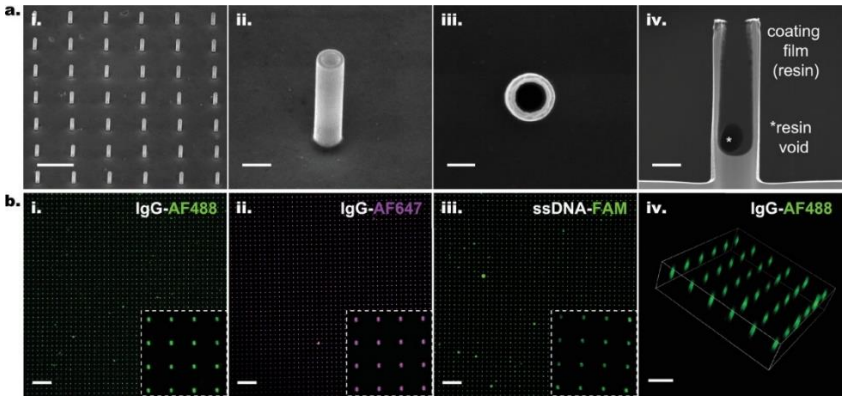
برخی از کاربردهای نانوذرات در زیست‌شناسی شامل مواردی همچون استفاده از نانوذرات به عنوان حسگر که برای کاربردهای مختلفی از جمله تشخیص آنالیت‌ها در غلظت‌های بسیار پایین، شناسایی و جداسازی پاتوژن‌ها، شناسایی و گرفتن سلول‌ها و تشخیص عملکردهای مولکولی و سلولی استفاده شده‌اند.. خواص منحصر به فرد NPها می‌تواند نظارت بر اهداف مولکولی و همچنین پاسخ‌های سلولی مرتبط با بیماری‌هایی مانند سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی را امکان‌پذیر کند. علاوه‌براین از مهمترین کاربردهای نانوذرات در علوم زیستی می‌توان به استفاده از آن ها به عنوان پیک و حامل انتقالی به درون سلول‌ها اشاره کرد [۶].

در این بررسی مروری به چند مورد از بروزترین روش‌های مهندسی نانوذرات و کاربرد آن‌ها در مباحث علم سلولی و مولکولی می‌پردازیم.

تحویل درون سلولی با واسطه نانولوله سیلیکونی، جهت ویرایش ژن در محیط Ex Vivo

رابط‌های نانوزیستی مهندسی‌شده که توسط مواد نانوساختار عمودی هدایت می‌شوند، به پیشرفت تحول‌آفرین در تنظیم فرآیندهای سلولی کمک می‌کنند. تحویل درون سلولی نوید بزرگی برای توسعه روش-های سلول درمانی جدید مبتنی بر اصلاح ژن است. در این مطالعه توسعه یک پلتفرم انتقال مکانیکی متشکل از آرایه‌های نانولوله سیلیکونی (VA-SiNT) تراز عمودی برای ویرایش ژن ex vivo استفاده شده است. ساختار توخالی داخلی SiNTها امکان حمل مؤثر مواد مختلفی مثل مولکول‌های زیستی را فراهم می‌کند. SiNTها، این مواد را بدون به خطر انداختن قابلیت حیات آنها به فیبروبلاست‌های جنینی موش GPE86 انتقال می‌دهند. براساس نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی پرتو یونی متمرکز (FIB-SEM) و میکروسکوپ کانفوکال، فرورفتگی‌های غشایی موضعی و تجمع caveolin-1 در رابط سلول-NT ایجاد شده-اند که نشان‌دهنده وجود حفره‌های اندوسیتی است. مهار مولکول کوچک اندوسیتوز نشان می‌دهد که فرآیند اندوسیتی فعال در تحویل درون سلولی مواد از SiNT نقش دارد. تحویل درون سلولی siRNA با واسطه

SiNT، موجب کاهش ظرفیت سطح بیان پروتئین اتصال-F اکتین (Triobp) و تغییر مورفولوژی سلولی GPE86می‌شود (شکل ۱). در نهایت، تحویل موفقیت‌آمیز ریبونوکلئوپروتئین Cas9 (RNP) به طور خاص ژن Hprt موش را هدف قرار داد [۱].

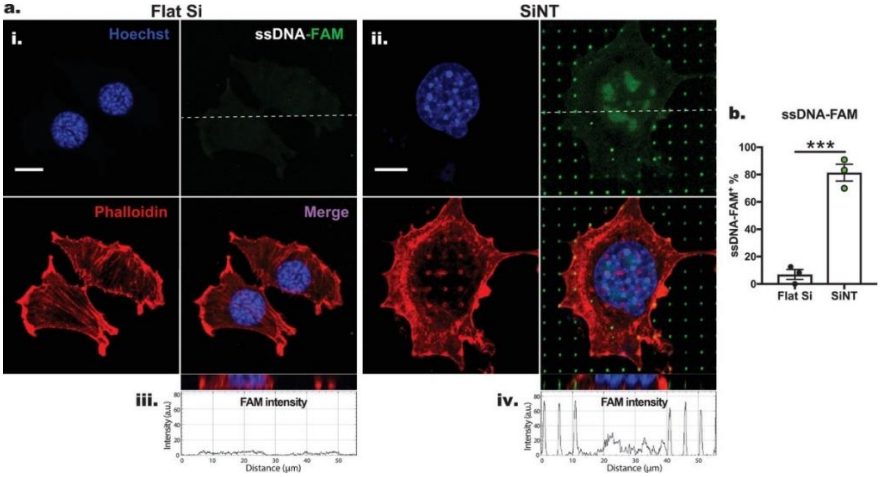


شکل ۱: بارگیری و حمل مولکول‌های زیستی بر روی ردیف های SiNT: a) تصاویر SEM که SiNTها را در نمای کوچک نمایی (i) و بزرگنمایی (ii)، بالا (iii) و نمای عمودی (رزین تعبیه شده) (iv) نشان می‌دهد. مقیاس: ۵ میکرومتر (i)، ۵۰۰ نانومتر (ii) و ۳۰۰ نانومتر (b.(iii,iv) تصاویر میکروسکوپ کونفوکال که به ترتیب نمای بالایی (i–iii) و سه بعدی (iv) SiNTهای حامل IgG-AF488 (سبز؛ i,iv) IgG-AF647 (سرخابی؛ ii) و ssDNA-FAM (سبز؛ iii) را نشان می‌دهد.

نانوتکنولوژی مخرب سلولی یک زمینه بین رشته‌ای به سرعت در حال گسترش است که نانومواد قابل برنامه‌ریزی را با سلول‌های زنده پیوند می‌دهد. با پیشرفت در تکنیک‌های ساخت نانو، نقش پیکربندی عمودی نانوساختارها بر رفتار و عملکرد سلول با استفاده از نانوتوپووگرافی‌ها از جمله، اشکال نانو مواد یک بعدی بررسی شده است. مزیت کلیدی نانوساختارهای با پیکربندی عمودی قابل تنظیم در تعامل بالای آنها در سطح مشترک بین سلول‌ها و نانومواد است که علت آن ابعاد نانومتری آنها می‌باشد. به طور خاص، تحویل درون سلولی مواد فعال زیستی یک الگوی ارزشمند است که نقش مهمی در بیان ژن در محیط ex vivo و درمان‌های مبتنی بر سلول و همچنین تسهیل تحقیقات سلولی بنیادی دارد [۱].

تحویل درون سلولی با واسطه نانوسیم سیلیکونی (SiNW) از آرایه‌هایی از SiNWهای جامد یا متخلخل استفاده می‌کند که از قبل با مولکول‌های زیستی مورد نظر بارگذاری شده‌اند. گروه Melosh در سال ۲۰۱۲ برای اولین بار توسعه یک پلتفرم تحویل مبتنی بر نانو نی (نانوسیم‌های توخالی) را که در یک دستگاه میکروسیال ادغام شده بود، نشان دادند. با سوراخ کردن غشای سلولی، نانو نی‌ها یک خط لوله سیال دائمی به داخل سیتوزول ایجاد کردند و گونه‌های غیرقابل نفوذ غشایی (مانند رنگ‌های فلورسنت، یون‌ها و پلاسمیدهای GFP) را به سلول‌های تخمدان HeLa و همستر چینی انتقال دادند. به دنبال آن، همان گروه تحقیقاتی پلت فرم نانو کاوش را در یک سیستم الکتروپوراسیون قرار دادند. آرایه‌های نانولوله‌های کربنی (CNT) ادغام شده در یک دستگاه میکروسیال نیز برای دستیابی به انتقال ژن با توان بالا به سلول‌های میوسیت HEK 293 و L6 موش صحرایی با سمیت کم گزارش شده است که در آن انتقال مولکول زیستی از طریق لومن نانولوله فعال می‌شود. پلت فرم مبتنی بر CNT به تحویل رنگ و DNA پلاسمید به ترتیب با

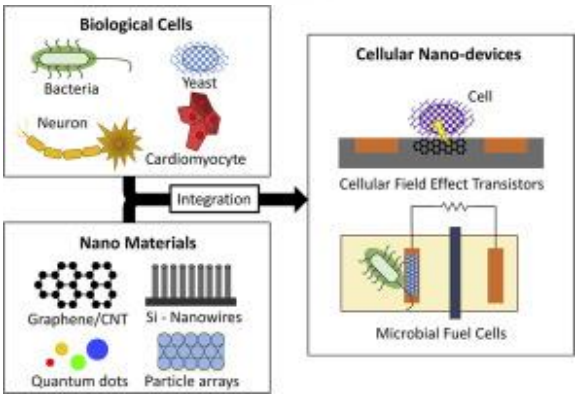
۹۹٪ و ۸۴٪ راندمان به ده‌ها هزار سلول از رده‌های سلولی میوسیت HEK293 و L6 موش صحرایی دسترسی پیدا کردند. اما استفاده از غشاهای نانومتخلخل به‌عنوان الگویی برای ساخت منجر به موقعیت‌یابی تصادفی عناصر nanostraw/CNT می‌شود که اجازه مطالعات تحویل کمی را نمی‌دهد. یک مطالعه جدیدتر این مشکل را حل کرده و یک پلت فرم الکتروفورتیک چندوجهی مبتنی بر نانولوله‌های توخالی پلاسمونیک سه بعدی را ارائه کردند که تحویل کنترل‌شده نانومیله‌های طلا را در سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش NIH 3T3 ممکن می‌سازد. پلت فرم تعبیه شده میکروسیالی به عنوان نانوالکترود برای الکتروپوراسیون سلولی، نانوکانال برای تحویل الکتروفورتیک و همچنین آنتن‌های پلاسمونیک عمل می‌کند (شکل ۲) [۱].



شکل ۲: SiNT ها انتقال داخل سلولی ssDNA را میانجیگری می‌کنند: a) تصاویر میکروسکوپ کونفوکال سلول‌های GPE86 را پس از ۶ ساعت کشت بر روی بسترهای مسطح Si (i) و SiNT (ii) که از قبل با ssDNA-FAM (سبز) بارگذاری شده‌اند نشان می‌دهد. سلول‌ها تثبیت و با هوخست (آبی) و فالویدین (قرمز) رنگ آمیزی شدند. مقیاس: ۱۰ میکرومتر. b) کمی سازی درصد سلول‌های حاوی ssDNA-FAM روی بسترهای مسطح Si و SiNT.

نانو ترانزیستور سلولی: رابط الکترونیکی بین نیمه هادی‌های نانومقیاس و سلول زیستی

یک ترانزیستور سلولی فعالیت بیوشیمیایی یک سلول واسط را به یک سیگنال الکتریکی تبدیل می‌کند. جفت شدن سطحی گونه‌های میکروسلولی با نانومواد نیمه رسانا در یک نانو ترانزیستور سلولی، محصور شدن حامل‌های بار تبدیل شده به یک یا دو بعد و رابط زیستی/نانو را امکان پذیر می‌سازد که منجر به تغییر بسیار حساس در چگالی حامل‌ها می‌شود. در مقابل، نیمه هادی‌های معمولی به دلیل عدم محصور شدن جریان حامل را در هر سه بعد امکان پذیر می‌کنند. علاوه‌براین، نانومواد نیمه رسانا سطح بزرگی را ارائه می‌دهند که رابط سازگارتر با سلول‌ها را ممکن می‌سازد. با وجود میلیون‌ها سلول که هر کدام عملکردهای متمایز خود را دارند، مانند پاسخ سلولی به مواد شیمیایی، نور، دما، استرس مکانیکی، محرک‌های الکتریکی و تولید آنزیمی الکترون، توسعه نانو ترانزیستورهای زیست سلولی و چندین نانومواد نیمه رسانا برای ایجاد رابط با آنها، منجر به انقلاب در حوزه بیوالکترونیک می‌شود [۲].



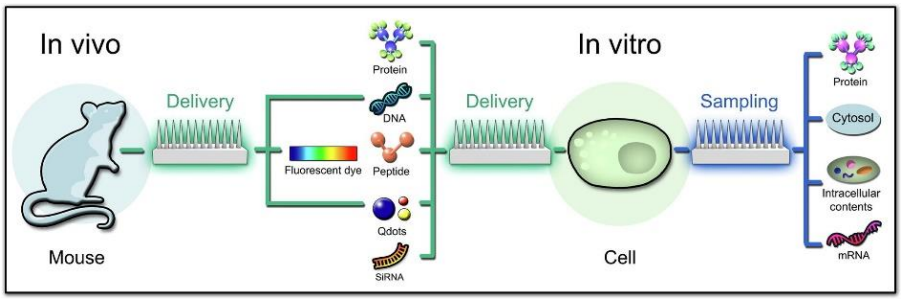
شکل ۳: تصویر شماتیکی که نانو دستگاه‌های مختلف را در سطح مشترک بین سلول ها و نانومواد نشان می‌دهد. انواع سلول‌های زیستی را می‌توان به نانودستگاه متعددی متصل کرد، که چشم‌انداز وسیعی از عملکردها را ارائه می‌دهد، جایی که یک فرآیند زیستی در یک سلول می‌تواند یک نانودستگاه واسط را هدایت کند یا یک نانودستگاه می‌تواند یک فرآیند بیوشیمیایی را در داخل سلول فعال کند.

ترانزیستور سلولی یک دستگاه ترکیبی متشکل از یک سلول زیستی و یک ترانزیستور نیمه هادی است که در آن تغییر در خواص حامل نانومواد نیمه هادی با تغییر در پتانسیل سطح غشای سلول ایجاد می‌شود. در اینجا، فرآیندهای بیوشیمیایی داخلی خاص در داخل یک سلول می‌تواند پتانسیل شیمیایی یا ترکیب شیمیایی غشای سلولی را تغییر دهد. این مکانیسم انتقال فرصتی را برای استفاده از دامنه منحصر به فرد فعالیت‌های سلولی که بر غشای سلولی در سلول‌های زیستی تأثیر می‌گذارد، ارائه می‌دهد که می‌تواند با نانودستگاه‌های مختلف همراه شود تا گروه جدیدی از دستگاه‌های زیستی نسل بعدی راایجاد کند. این مکانیسم انتقال دارای کاربردهای متعددی از جمله ابزارهای زیست پزشکی مانند حسگرهای زیستی است. حسگرهای زیستی به هر نوع وسیله‌ای گفته می‌شود که تغییر در محیط زیستی خود را تشخیص داده و آن را به سیگنال قابل خواندن تبدیل می‌کند. هنگام نظارت بر سیستم‌های زیستی پیچیده، تشخیص سریع، دقیق و حساس حیاتی است که در طراحی و ساخت حسگرهای زیستی در مقیاس نانو، به طراحی دستگاه‌های با ابعاد پایین و سازگار نیاز دارد. یکی از روش‌های مرسوم برای مطالعه فعالیت‌های غشای سلولی تکنیک گیره-وصله (patch clamping) است که توسط Neher و Sakmann در اواخر دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه ۱۹۸۰ ارائه شد. در این روش، یک سلول با یک میکروپیپت پر شده از یک الکترولیت و یک الکترود تماس برقرار می‌کند. فشار داخل پیپت بسته به روش اندازه‌گیری کنترل می‌شود که می‌تواند پتانسیل غشا و همچنین پتانسیل کلی سلول را اندازه‌گیری کند. با این حال، اندازه میکروپیپت (تقریباً یک میکرومتر) اجازه مطالعات مستقیم سلول‌های کوچکتر مانند سلول‌های باکتریایی را نمی‌دهد. همچنین، قدرت تفکیک فضایی آنها تقریباً ۱۰۰ نانومتر در هر پیپت است ولی معمولاً وقتی بین دو پیپت اندازه‌گیری می‌شود این مقدار بزرگتر از ۱۰ میکرومتر است. از طرف دیگر، عملکرد FETها (Field-effect transistor) یا ترانزیستورها (حسگرهای) زیستی اثر میدان ه اندازه سلول‌ها محدود نمی‌شود، زیرا می‌توان آنها را در ابعاد بسیار کوچکتر یا بزرگتر از سلول‌های هدف ساخت FETها همچنین ممکن است به گونه ای منظم قرار گیرند، که برای

میکروپیپت‌ها دشوار است، اما برای نقشه‌برداری فضایی سلول‌های متعدد یا تک ضروری است. یکی دیگر از مزایای کلیدی FET، بر خلاف میکروپیپت، عدم وجود اثر رقت سیتوزول (مایع درون سلولی) است، زیرا عملیات FET به برهمکنش الکترولیت پروب-سیتوزول متکی نیست. بنابراین، ثبت الکتریکی درون سلولی ممکن است برای مدت طولانی‌تری بدون تغییر یکپارچگی سلولی حفظ شود. یکی دیگر از روش‌های رایج تشخیص سلول‌ها از طریق تصویربرداری فلورسانس است. این روش امکان مشاهده تجربی بیان ژن و پروتئین و همچنین برهمکنش‌های مولکولی درون یک سلول زنده را فراهم کرده است. مفاهیم فیزیکی اضافی ممکن است در روش فلورسانس ادغام شوند، مانند انتقال انرژی تشدید فلورسانس (FRET)، که سیگنال‌های فلورسانس را در مورد ترکیب مولکولی و همچنین ارتباط و جداسازی ایجاد می‌کند که در محدوده یک تا ۱۰ نانومتر رخ می‌دهد. علیرغم کاربرد گسترده آن، تصویربرداری فلورسانس دارای برخی معایب حیاتی است. فوتوبلیچینگ می‌تواند با فلوروفورها اتفاق بیفتد، جایی که چرخه مداوم می‌تواند به مولکول روشن کننده آسیب برساند و شدت آن را کاهش دهد. شرایط محیطی، از جمله دما، pH و غلظت یون می‌تواند بر انتشار فلوئوروکروم‌ها تأثیر بگذارد. علاوه‌بر این، انواع خاصی از فلوئوروکروم‌ها و همچنین نور با طول موج کوتاه، ممکن است برای سلول‌ها و بافت‌ها سمی باشند. در نهایت، وضوح محدود پراش میکروسکوپ فلورسانس در مقایسه با روش‌های دیگر مانند میکروسکوپ الکترونی کمتر است. سایر روش‌های اندازه‌گیری سلولی، از جمله دستگاه‌هایی که از نقاط کوانتومی به عنوان عناصر حسگر استفاده می‌کنند، می‌توانند حساسیت، انتخاب‌پذیری و زمان پاسخ کوتاه را ارائه دهند. با این حال، این تکنیک به طور کلی نیاز به ادغام با ابزارهای نوری برای تبدیل پدیده‌های اتصال به یک سیگنال قابل اندازه‌گیری دارد و اندازه‌گیرهای سنجش را حجیم و پرهزینه می‌کند. اما، FETها برای نقش حسگرهای تعیین شده به دلیل توانایی آن‌ها در تعامل با مولکول‌های هدف به یک سیگنال الکتریکی قابل اندازه‌گیری، بدون تجهیزات طیف سنجی اضافی، مناسب‌تر هستند. مزایای اصلی فناوری حسگر زیستی مبتنی بر FET این است که بر خلاف روش‌های تشخیص زیستی مرسوم مانند اثر انگشت فنوتیپی/متابولیک یا سنجش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA): (۱) تشخیص‌های بلادرنگ را فراهم می‌کند (۲) قابل حمل است (۳) دارای مکانیسم‌های مبدل ساده است (۴) هزینه نسبتاً کم است و (۵) همه کاره است که امکان تعامل انتخابی با مولکول‌های زیستی مختلف از جمله غشای سلولی، پروتئین‌ها و ژن‌ها را فراهم می‌کند. اخیراً، نانومواد نیمه‌رسانا مانند نانوسیم‌های سیلیکونی (SiNWs) و نانولوله‌های کربنی (CNTs) با FETها که هر کدام به ترتیب SiNW-FETو CNT-FET نامیده می‌شوند، یکپارچه شده‌اند و توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند، زیرا دارای خواص سنسورهای زیستی تقریبا ایده‌آل هستند که شامل انتخاب پذیری و حساسیت بالا، پاسخ در زمان واقعی، و قابلیت‌های تشخیص بدون علامت می‌باشد. اندازه نانومقیاس آنها و اثرات محصور شدن اندازه باعث ایجاد حساسیت استثنایی می‌شود و همچنین اجازه می‌دهد تا سطح وسیعی را با اجسام کوچک مانند سلول‌های زیستی ارتباط برقرار کند [۲].

رابط‌های نانو زیستی مهندسی شده برای تحویل و نمونه‌برداری درون سلولی: کاربردها، نمایندگی و مصنوعات

رابط‌های سلولی نانو زیستی مهندسی شده، شکل مواد در مقیاس نانو را با سیستم‌های زنده ارگانیک گرد هم می‌آورد. این رابط‌های فوق‌العاده پیچیده قرار است از طریق تحقیقات بنیادی در حوزه چند رشته‌ای نوظهور نانو بیوتکنولوژی سلولی، پیشرفت‌های اساسی را در علوم زیستی ایجاد کنند. نقش آرایه‌های نانوسیم تراز عمودی (VA-NW) بررسی شده است. این چیدمان‌ها‌ها دارای توپوگرافی‌های نانومقیاس متنوعی هستند که امکان دستکاری عملکردها و فرآیندهای سلولی را در داخل بدن، درجا و در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌کنند. استفاده اخیر از این چیدمان‌ها- برای انتقال در شرایط زنده (in vivo)، نمونه‌برداری درون سلولی غیرمخرب و به دست آوردن بینش اساسی در مورد پاسخ‌های سلولی به نشانه‌های توپوگرافی خارج سلولی - به طور موثر پتانسیل پلفرم‌ها را نشان می‌دهد [۳].



شکل ۴: دستکاری عملکردها و فرآیندهای سلولی در در شرایط in vitro و in vivo توسط رابط‌های سلولی نانو زیست

نقش‌های نانوساختارهای عمودی یک بعدی در هماهنگ‌سازی عملکرد سلول‌های ایمنی

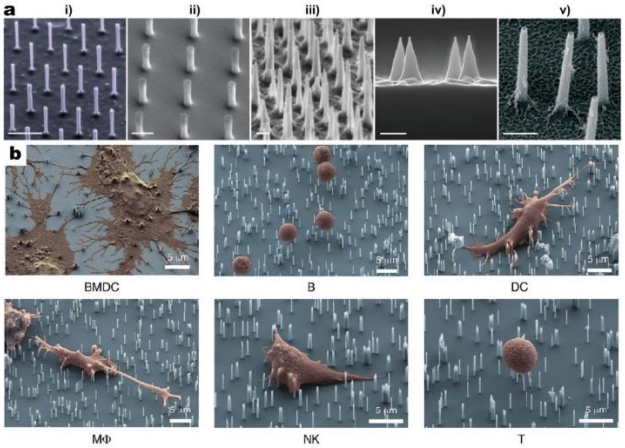
رابط‌های نانوزیست سلولی مهندجسی‌شده که توسط نانوساختارهای عمودی یک‌بعدی (D-VNS۱) هدایت می‌شوند، برای ایجاد پیشرفت اساسی در تعدیل فرآیندهای سلولی در مقیاس نانو تنظیم شده‌اند. در اینجا، فعل و انفعالات سطحی سلول-VNS قابل تنظیم بررسی و ارزیابی می‌شوند، که استفاده از D-VNS۱ در تعدیل ایمنی، و تحویل درون سلولی به سلول‌های ایمنی را برجسته می‌کند که هر دو در تحقیقات زیست‌پزشکی بنیادی و انتقالی حیاتی هستند [۴].

با توپوگرافی قابل برنامه‌ریزی و عملکرد سطح قابل تطبیق، D-VNS۱ نشانه‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی منحصر به فردی را برای هماهنگ کردن ایمنی ذاتی و تطبیقی، هم در شرایط ex vivo و هم in vivo ارائه می دهد. رابط سلول VNS در مقیاس نانو منجر به نفوذ غشاء و تغییر شکل سلولی می‌شود و تحویل درون سلولی کارآمد محموله‌های فعال زیستی متنوع را به سلول‌های ایمنی سخت‌تر میسر می‌سازد. با شناسایی پیشرفت‌های به‌روز و چالش‌های اساسی فناوری کنونی D-VNS۱ در دستکاری سلول‌های ایمنی، امید است

که پیشرفت‌های بیشتر در توسعه D-VNS۱ به عنوان یک پلتفرم ایمن، جهانی برای مهندسی سلول و غنی سازی در ایمونوتراپی پیشرفته سرطان مانند درمان گیرنده آنتی ژن کایمریک-T توسعه یابد [۴].

پیشرانه پرسرعت نانو مواد مغناطیسی الکتریکی فعال شده توسط حسگر میدان الکتریکی زیست سلولی

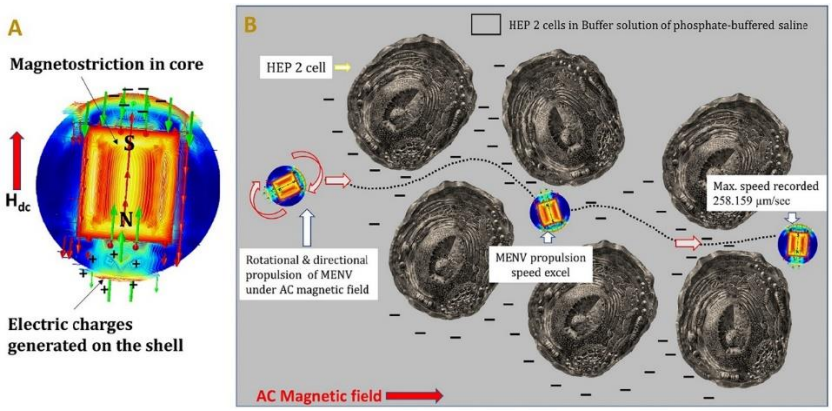
نانو مواد مغناطیسی (MENV) یک نانوساختار هسته-پوسته معدنی است که در آن هسته و پوسته در تحریک میدان مغناطیسی با یکدیگر تعامل دارند تا اثر مغناطیسی را نشان دهند. تحت تحریک میدان مغناطیسی نوسانی، این MENV بار الکتریکی سطحی نوسانی تولید می‌کند، یعنی مغناطیسی الکتریکی و به دلیل نیروهای لورنتس به حرکت پیشران جهت‌دار در محیط سیال می‌رسد. علاوه‌بر این، تحت تحریک میدان مغناطیسی، MENV می‌تواند به صورت دینامیکی میدان الکتریکی یک سلول بیولوژیکی را حس کند و به دلیل تجربه گشتاور با دافعه الکترواستاتیکی از میدان الکتریکی سلول‌هایی که در مسیر حرکت خود با آن مواجه می‌شوند، سرعت رانش را در محیط زیست سلولی به دست آورد. حداکثر سرعت به‌دست‌آمده توسط این MENV که توسط میدان مغناطیسی Oe (40 ac، 30 هرتز) در محیط سلول‌های اپیتلیال انسان (HEP2) به دست می‌آید، به ۲۵۸,۱۵۹ میکرومتر بر ثانیه می‌رسد. MENVها را می‌توان بدون توجه به مانع تراکم سلولی تجربه شده در مسیر پیشران، با دقت مقیاس میکرونی به یک سلول هدف در مکان مورد نظر منتقل و بی‌حرکت کرد. جالب توجه است که MENV با افزایش چگالی سلولی در مسیر پیشرانش، سرعت پیشرانه را افزایش می‌دهد. MENV برای حرکت جهتی تنظیم شده در حین هدف‌گیری سلولی به سیستم هدایت سوم نیاز ندارد [۵].



شکل ۵: کاربرد پلتفرم های D-VNS۱ در مطالعات ایمونولوژیکی a) تصاویر SEM از پنج نوع D-VNS۱، شامل نانوسیم‌ها (i)، نانوستون‌ها (ii)، نانوسوزن‌ها (iii)، نانومخروط‌ها (iv) و نانو نی‌ها (v). مقیاس: ۱ میکرومتر (i–iii) و ۵۰۰ نانومتر (iv,v). b) تصاویر SEM سلول‌های دندریتیک مغز استخوان اولیه موش (BMDCs)، سلول‌های B، سلول‌های دندریتیک (DCs)، ماکروفاژها (MΦs)، سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و سلول‌های T (نارنجی) در بالای SiNWs (آبی).

نتیجه‌گیری

نانوتکنولوژی و نانوذرات کاربردهای گسترده‌ای در زیست شناسی دارند. همانطور که در بالا ذکر شد، فناوری نانو امکان ایجاد دستگاه‌هایی را در مقیاسی مشابه سلول‌ها و مولکول‌های زیستی منفرد فراهم می‌کند و رویکردی منحصربه‌فرد برای تصویربرداری، سنجش، تحویل دارو و مشخص کردن فرآیندهای زیستی اساسی ایجاد می‌کند. از آنجایی که علاقه به کاربرد زیستی برای نانوذرات بسیار جدید است، دلیلی برای خوش‌بینی زیاد برای کاربردهای خلاقانه و هیجان انگیز نانوذرات در زیست شناسی وجود دارد.



شکل ۶: (A) شبیه‌سازی کامسول مولتی‌فیزیکس نانومواد مغناطیسی مولد الکترومغناطیس درمیدان مغناطیسی DC (B) افزایش سرعت پیشرانه نانومواد مغناطیسی در محیط زیست‌سلولی سلول‌های اپیتلیال انسان در محلول بافرنمک فسفات تحت تحریک میدان مغناطیسی AC.

تکنیک‌های پایش و تشخیص نانوذرات به طور بالقوه می‌تواند به درک اساس مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در بیماری و آسیب کمک کند. حسگرهای نانوذرات می‌توانند شناسایی مولکول‌های زیستی را که با سنجش‌های فعلی قابل آدرس‌دهی نیستند، فعال کنند. سیستم‌های نانوذرات هدفمند می‌توانند به حضور این مولکول‌ها با میل ترکیبی و انتخابی بالا متصل شوند یا به آن واکنش نشان دهند و سیگنال آنها را برای تشخیص و تصویربرداری مولکولی تقویت کنند. علاوه بر این، نانوذرات می‌توانند به غلبه بر محدودیت‌های مرتبط با روش‌های تحویل مرسوم مورد استفاده در تحقیقات زیستی مانند نامحلول بودن و ناپایداری ترکیبات آبگریز در شرایط آبی و هدف‌گیری غیر اختصاصی کمک کنند. با پیشرفت قابل توجه در مطالعه سیستم‌های زیستی در مقیاس نانو و ادغام پروتئومیکس و ژنومیک با فناوری نانو، می‌توان به درک عمیق‌تری از عملکرد و فرآیندهای سلولی دست یافت که به نوبه خود می‌تواند به طراحی ابزارهای جدید در مقیاس نانو کمک کند که ممکن است سیستم‌های مولکولی را به عقب برگرداند. همچنین توجه به این نکته مهم است که با توسعه روش‌های نانوتکنولوژی، موانع فنی کمتری برای زیست‌شناسان علاقه‌مند برای دستیابی به تکنیک‌ها/پلتفرم‌های نانوذرات و استفاده از آن‌ها در تحقیقات خود وجود دارد.

منابع

[1]. Chen Y, Aslanoglou S, Murayama T, Gervinskas G, Fitzgerald LI, Sriram S, Tian J, Johnston APR, Mprikawa Y, Suu K, Elnathan R, Voelcker NH. (2020). Silicon-Nanotube-Mediated Intracellular Delivery Enables Ex Vivo Gene Editing. Advanced Material. 32(24): 1-10. https://doi.org/10.1002/adma.202000036

[2]. Kim S, Keisham B, Berry V. (2020). Cellular nano-transistor: An electronic-interface between nanoscale semiconductors and biological cells. Material Today Nano. 9: https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2019.100063

[3]. Lestrell E , Patolsky F , Voelcker NH, Elnathan R . (202). Engineered nano-bio interfaces for intracellular delivery and sampling: Applications, agency and artefacts. Materialstoday. 33: 87-104. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2019.08.012

[4]. Chen Y, Wang J, Li X, Hu N, Voelcker NH, Xie X, Elnathan R. (2020). Emerging Roles of 1D Vertical Nanostructures in Orchestrating Immune Cell Functions. Advanced Materials. 32(40): 1-25. https://doi.org/10.1002/adma.202001668

[5]. Betal S, Bhalla AS, Guo R. (2020). High-speed propulsion of magnetoelectric nanovehicle actuated by bio-cellular electric field sensing. Sensing and Bio-Sensing Research. 38: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2022.100521

[6]. Edina C. Wang EC, and Andrew Z. Wang AZ. (2014). Naniparticles and their applications in cell and molecular biology. Integrative Biology. 6(1): 9-26. doi: 10.1039/c3ib40165k

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

تهیه، مشخصه یابی و مطالعات تئوری کمپلکس های یونهای واسطه Ni(II) , Co(II) با لیگاند سیستامین هیدرو کلراید و برهمکنش آنها با FS- DNA

الناز ناروئی[۱]، نیلوفر اکبرزاده تربتی[۱*]، راضیه رضوی[۲]
۱. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. گروه شیمی- دانشکده علوم پایه- دانشگاه جیرفت- جیرفت - ایران
*n.akbarzadeh@chem.usb.ac.ir

چکیده

در این پروژه کمپلکس های $[CoL_3](NO_3)_2(1)$, $[NiL_3](NO_3)_2(2)$ که در آنها L= ۲-آمونیوم اتان تیولات ($SCH_2CH_2NH^+$) می باشد به روش رفلاکس تهیه شدند. ترکیبات بدست امده با روش های اسپکتروسکوپی مادون قرمز(IR) و طیف سنجی الکترونی (UV-Vis) شناسایی شدند. نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز حضور پیوندهای Ni-S, Ni-N ,Co-N, Co-S, را ثابت کرد. .طیف الکترونی این کمپلکس‌ها باندهای جذبی در ناحیه۸۰۰-200nm، انتقالات بار و میدان لیگاند(d-d)را نشان می‌دهد .در ادامه برهم‌کنش این کمپلکس‌ها با دئوکسی‌ریبونوکلیک‌اسید ماهی (FS-DNA) در محیط تریس‌بافر با۷=PH به روش UV-Vis مورد مطالعه قرار گرفت.k_bثابت پیوندی کمپلکس ها باDNA بدست آمد. شبیه سازی مولکولی نیز به وسیله نرم افزار شیمی MOE انجام شد. موقعیت های پیوندی در DNA توسط نرم افزار6 GUASS VIEW شناسایی شدند و داکینگ در همان موقعیت های فعال انجام شد و نهایتا بهترین موقعیت شناسایی شد.

کلمات کلیدی: طیف سنجی مادون قرمز- میدان لیگاند- داکینگ

Preparation, characterization, and theoretical studies of Ni(II) and Co(II) intermediate ion complexes with the ligand k hydrochloride, and their interaction with FS-DNA.

[a]Elnaz narouie-*[a]Niloufar Akbarzadeh-T - [b]Razieh Razavi
[a]Department of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan, P.O. Box 98135-674, Zahedan, Iran
[b]Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran
* e-mail: n.akbarzadeh@chem.usb.ac.i

Abstract
In this project, the complexes [Co L3](NO3)2(1), [Ni L3](NO3)2(2), were prepared by reflux method, where L=2-aminoethylthiolate ($^{-}SCH_2CH_2NH^{+}$). The obtained compounds were identified by infrared spectroscopy (IR) and electronic spectroscopy (UV-Vis). The IR spectra confirmed the presence of Ni-S, Ni-N, Co-S, and Co-N bonds. The electronic spectra of these complexes showed absorption bands in the range of 200-800 nm, indicating charge transfer and ligand field (d-d) transitions. Subsequently, the interaction of these complexes with fish sperm deoxyribonucleic acid (FS-DNA) in Tris buffer with pH 7 was studied by UV-Vis method, and the binding constants (k_b) of the complexes with DNA were determined. Molecular simulation was also performed using the MOE chemistry software. The binding sites in DNA were identified by GUASS VIEW 6 software, and docking was performed in those active sites to identify the best binding position.

Key words: infrared spectroscopy- ligand field- docking

مقدمه

شیمی کوئوردینانسیون ، موضوع جالب تحقیقاتی در دو دهه گذشته برای محققان شده است. اهمیت طراحی لیگاندهای جدید عمدتا به دلیل استفاده از آن‌ها به عنوان مدل‌هایی برای محل اتصال پروتئین و فلز در گروه قابل توجهی از متالوپروتئین‌ها در سیستم‌های بیولوژیکی از قبیل یونوفورهای مصنوعی، مدل‌هایی برای پدیده‌های تبادل مغناطیسی، معرف‌های درمانی در کیلیت‌تراپی برای درمان مسمومیت با فلز و آنتی-بیوتیک‌های حلقوی که فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی آن با تشکیل کمپلکس فلزی حفظ می‌شود. در بین این نوع لیگاندها، لیگاندهای گوگرد دار و نیتروژن دار از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند، زیرا آنها می‌توانند بسته به تعداد، نوع و موقعیت اتم‌های دهنده در ساختارشان ، شعاع یونی مراکز فلزی و میزان و توانایی کوئوردینه شوندگی به صورت انتخابی به یون‌های فلزی خاصی کوئوردینه شوند .لیگاندهای نیتروژن دار دسته‌ی مهمی از ترکیبات آلی هستند. این نوع لیگاندها به دلیل ویژگی‌های منحصر بفرد از جمله سنتز آسان، تنوع ساختاری فراوان و ظرفیت بالقوه‌ی آن‌ها در تشکیل کمپلکس‌های متنوع و پایدار با یون‌های فلزی نقش ویژه‌ای را در شیمی کوئوردیناسیون برعهده دارند. این ترکیبات براساس گروه‌های فعال آنها دارای طیف گسترده‌ای از کاربردهای متنوع در صنعت، داروسازی، فعالیت‌های بیولوژیکی، درمان سرطان، فرایندهای کاتالیستی، مغناطیسی، واکنش‌های الکتروشیمیایی و آنزیمهای فلزی هستند [1-5].

بنابراین در این پژوهش دو کمپلکس با یونهای واسطه ی Ni(I) و Co(II) با لیگاند سیستامین که یک لیگاند گوگرد دار است تهیه شد و پس از مشخصه یابی ساختار، به بررسی و تعیین تئوری ساختار آن ها و در نهایت به برهمکنش این ترکیبات با FS-DNA پرداخته شد.

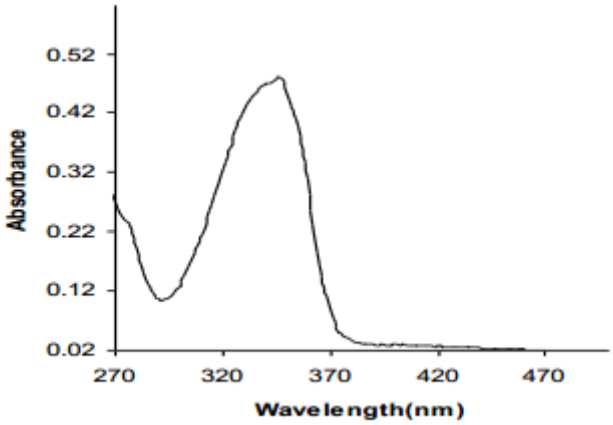
روش کار

مراحل تهیه هر دو کمپلکس یکسان می‌باشد. بدین ترتیب که برای سنتز کمپلکس ها ، هر فلز با لیگاند مربوطه بطور جداگانه در حلال مناسب حل شد و سپس با هم مخلوط و در انتها بمدت ۴ ساعت در دمای جوش حلال رفلاکس شد. پس از گذشت این زمان محصول جمع‌آوری شد.

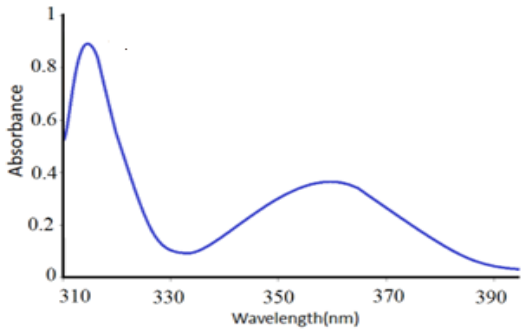
شناسایی

در بررسی طیف مادون قرمز کمپلکس ها نوار مشاهده شده در ناحیه $1500\ cm^{-1}$ مربوط به آمین نوع دوم و نیز ارتعاش در نواحی فرکانس های ارتعاشی مربوط به پیوندهای Ni-s و Co-S نیز مشاهده شد. و این امر نشان دهنده تشکیل کمپلکس می‌باشد.

در طیف الکترونی هر دو کمپلکس انتقالات میدان لیگاند (d-d) نیز مشاهده شد. در طیف های الکترونی انتقالات بار CT نیز مشاهده گردید.شکل‌های ۱و ۲

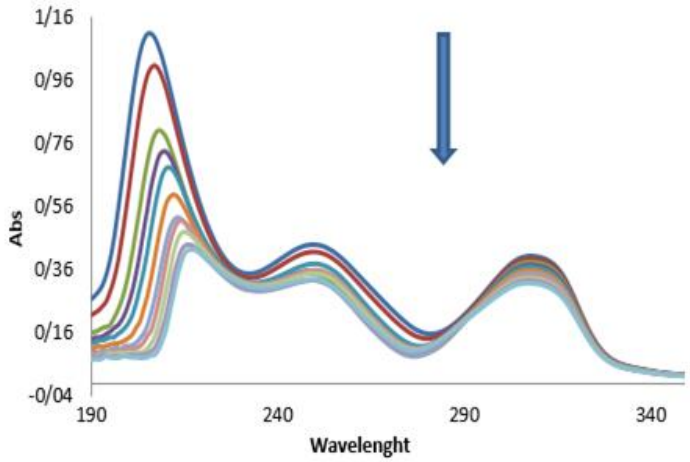


شکل ۱. طیف الکترونی کمپلکس $[Ni\ L_3](NO_3)_2$ در محیط KBr



شکل ۲. طیف الکترونی کمپلکس $[CoL3](NO_3)_2$ در محیط KBr

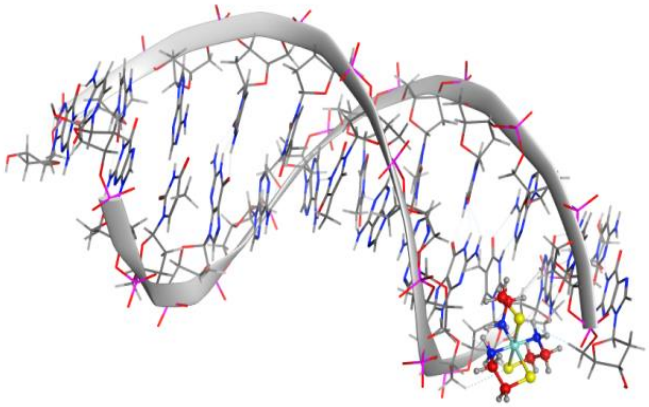
برهمکنش کمپلکس ها با FS DNA در دو دمای ۲۹۸ و ۳۰۳ کلوین و در محیط تریس بافر در pH=7.2 به روش UV - Vis مورد مطالعه قرار گرفت. مقدار K_b ثابت پیوند ترکیبات با FS- DNA بدست آمده. به کمک معادله وانت-هوف پارامترهای ترمودینامیکی ΔG° : پایداری ساختار DNA در حضور کمپلکس ها، ΔS°:آنتروپی حاصل از بر هم‌کنش DNA با کمپلکس ها و ΔH° میزان گرمای لازم برای برهم‌کنش ترکیبات محاسبه شد. نوع پیوند میان کمپلکس ها و FS -DNA از نوع شیاری می باشد. شکل ۳



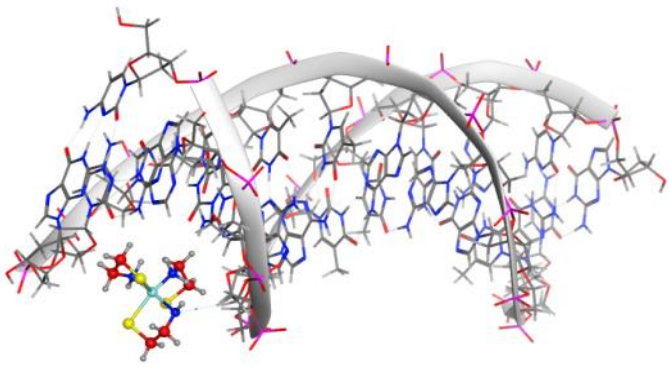
شکل ۳. منحنی جذب بر اساس افزایش کمپلکس (۱)

داکینگ مولکولی ترکیبات با استفاده از نرم افزار MOE انجام پذیرفت. ساختار کمپلکس های [Co L3](NO3)2(1), [Ni L3](NO3)2(2) با استفاده از نرم افزار GUASS VIEW 6 ترسیم شدند و پس از بهینه سازی ساختارها توسط نرم افزار GUASSIAN 9 در محاسبات داکینگ ملکولی مورد استفاده قرار گرفتند ساختار مربوط به DNA Fish Salmon از سایت www.RCSB.org استخراج شد. موقعیت های فعال در ساختار DNA توسط نرم افزار شناسایی شدند و داکینگ در همان موقعیت های فعال انجام شد و نهایتا بهترین موقعیت شناسایی شد. در مطالعات داکینگ، میدان نیروی AMBER 10H بکار برده شد. در هر بار انجام داکینگ، ساختار با کمترین انرژی داکینگ مورد استفاده قرار گرفت.

انرژی اتصال کمپلکس های **(۱)** و **(۲)** به DNA محاسبه شد. بر اساس میزان انرژی پایداری، کمپلکس **(1)** $[Co\ L_3](NO_3)_2$ با DNA پیوند پایدارتری ساخته است. پس از انجام داکینگ ملکولی بهترین موقعیت پیوند با DNA ارزیابی شد. در شکل های ۴ و ۵ موقعیت های فعال DNA برای ایجاد پیوند با کمپلکس های **(۱)** و **(۲)** نشان داده شده است.

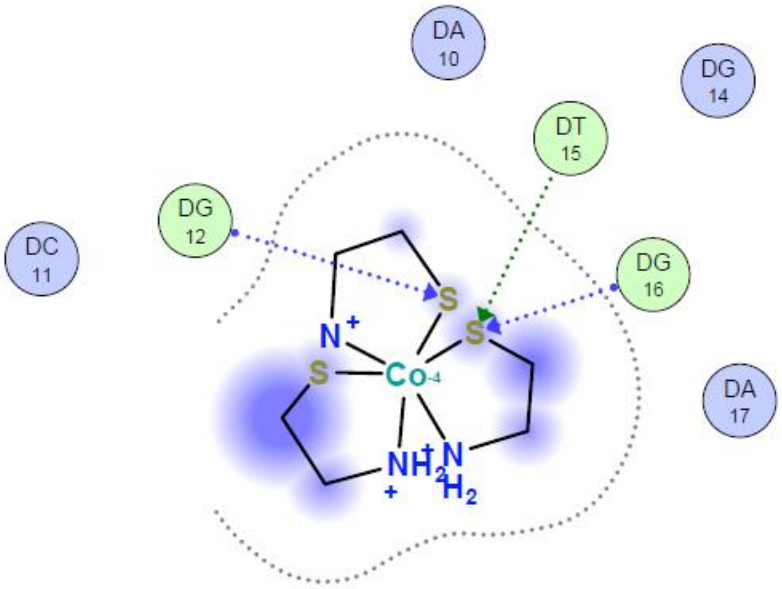


شکل ۴. موقعیت اتصال کمپلکس $[Co\ L_3](NO_3)_2$ با DNA

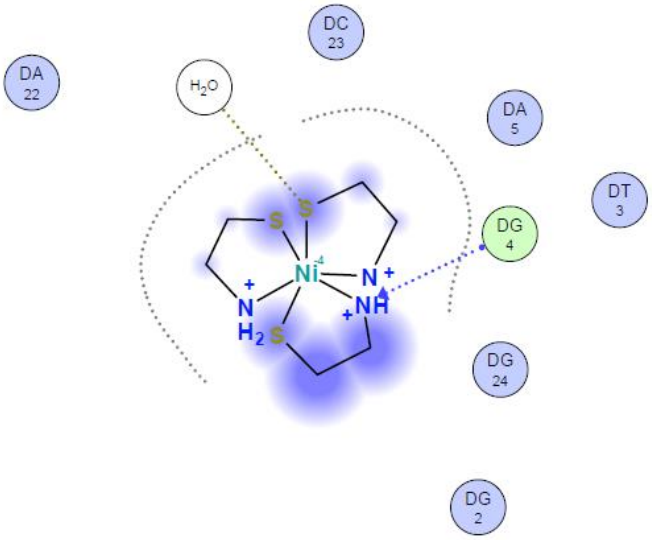


شکل ۵. موقعیت اتصال کمپلکس $[Ni\ L_3](NO_3)_2$ با DNA

بازهای آلی درگیر شده با کمپلکس‌های **(۱)** و **(۲)** به ترتیب در شکل‌های ۶ و ۷ آمده‌اند.



شکل ۶. باز های درگیر با کمپلکس $[Co\ L_3](NO_3)_2$ در موقعیت اتصال با DNA



شکل ۷. باز های آلی درگیر با $[Ni\ L_3](NO_3)_2$ در موقعیت اتصال با DNA

تقدیر و تشکر:

نویسندگان مقاله از حمایت های مالی دانشگاه سیستان و بلوچستان صمیمانه قدردانی می کنند.

منابع

[1] Mederos A, Domı´nguez S, Hernandez-Molina R, Sanchiz J, Brito F Coordination Chemistry Reviews , (1999) ۱۹۵. 857–911,

[2]Umemura I, Ando ., Hamaguchi ., Science reports, (2010.) 40(2), 195-201,

[3]Koizumi T, Fukuju K, Journal of Organometallic Chemistry. (2011),.696. 1232-1235,

[4] TalebiA., Salehi M, Khaleghian A. (2021). Journal of Molecular Structure, 131. 1246, 2021

[5] Dailami S.A, Onakpa S.A. Funtua M.A, (2016) IOSR Journal of Applied Chemistry, 9, 18-23,

[6] Fazli M, Akbarzadeh-T N, Beitollahi H, Dušek M, Eigner Eigner, (2021) Journal of Materials Science: Materials in Electronics 32, 25118–25136.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

تهیه یک نانو ذره جدید از یتربیوم(III) نیترات و برهم کنش آن با FS- DNA مطالعات تئوری و تعیین نوع برهمکنش آن

نیلوفر اکبرزاده تربتی[1*]، راضیه رضوی[2]، الناز ناروئی[1]
۱. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲. گروه شیمی- دانشکده علوم پایه- دانشگاه جیرفت- جیرفت - ایران
*n.akbarzadeh@chem.usb.ac.ir

چکیده

در این پژوهش یک نانو ذره جدید از یتربیوم(III) نیترات با لیگاند سیستامین ($SCH_2CH_2NH^+$) به روش هیدروترمال تهیه شد. سپس نانوذرات بدست آمد با روش های مختلف مانند اسپکتروسکوپی طیف سنجی مادون قرمز(IR) و طیف سنجی الکترونی (UV-Vis) شناسایی شدند. این نانو ذرات توسط تصاویر SEM و پراش اشعه X بررسی شدند. تصاویر SEM نشان داد که نمونه های تهیه شده به صورت نانو وتقریبا با مورفولوژی یکنواختی هستند. در این تصاویر نانو کمپلکس ها نسبتا کروی و متخلخل و میانگین اندازه ذرات کمتر ۱۰۰ نانومتر به دست آمد. در مرحله بعد برهم‌کنش نانو ذرات با FS-DNA در محیط تریس‌بافر باPH=۷ به روش UV-Visمورد مطالعه قرار گرفت. k_bثابت پیوندی نانو ذره باDNA و نیز تعداد جایگاه های پیوندی و نحوه پیوند بررسی شد. شبیه سازی مولکولی توسط نرم افزار شیمی MOE انجام شد. موقعیت های پیوندی در DNA توسط نرم افزار6 GUASS VIEW شناسایی شدند و داکینگ در همان موقعیت های فعال انجام شد و نهایتا بهترین موقعیت های اتصال شناسایی شد.

کلمات کلیدی: یتربیوم(III) نیترات - مورفولوژی - کروی و متخلخل

Preparation of a new nanocomplex of Ytterbium (III) nitrate and its interaction with FS-DNA, theoretical studies, and determination of the type of interaction.

*[1]Niloufar Akbarzadeh-T, [2]Razieh Razavi, [1]Elnaz naruee
[1]Department of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan, P.O. Box 98135-674, Zahedan, Iran
[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran
* e-mail: n.akbarzadeh@chem.usb.ac.ir

Abstract

In this study, a new nanocomplex of Ytterbium (III) nitrate $[YbL_3](NO_3)_3$ that L= Cystamine ($^{-}SCH_2CH_2NH^{+}$) was synthesized using the hydrothermal method. The resulting nanoparticles were identified using various methods such as infrared spectroscopy (IR) and electronic spectroscopy (UV-Vis). These nanoparticles were also examined using SEM images and X-ray diffraction. The SEM images showed that the prepared samples were nanoscale and had a relatively uniform morphology. The nanocomplexes were relatively spherical and porous, and the average particle size was less than 100 nanometers. In the next step, the interaction of the nanoparticles with FS-DNA in a Tris buffer with a pH of 7 was studied using UV-Vis. The binding constant (k_b) of the nanocomplex with DNA and the number and mode of binding sites were investigated. Molecular simulation was performed using the MOE chemistry software. The binding sites in DNA were identified using the GUASS VIEW 6 software, and docking was performed in the active binding sites, and finally, the best binding site was identified.

Key words: Ytterbium (III) nitrate- morphology- spherical and porous

مقدمه

DNA مولکولی است که حاوی دستورهای ژنتیکی مورد استفاده در توسعه و عملکرد تمام موجودات زنده‌ی شناخته شده می‌باشد و بسیاری از ویروس‌ها را کد گذاری می‌کند. این مولکول نه تنها ساخت دیگر مولکول‌ها (پروتئین‌ها) را کنترل می‌کند، بلکه در شکل‌گیری و بازسازی خود نقش دارند. اگر تغییر کوچکی درساختار آن شکل گیرد، ممکن است عواقبی جدی برای سلامتی و ادامه حیات موجود زنده در پی داشته باشد. و اگر به حد غیرقابل اصلاحی تخریب شود، سلول از بین می‌رود.

امروزه افزایش سرطان نگرانی‌های عمده‌ای را در سرتاسر جهان ایجاد کرده است و سرطان تبدیل به دومین عامل اصلی مرگ و میر بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی تبدیل شده است. پیدا کردن داروهایی برای درمان سرطان با بیشترین کارایی در بهبود بیمار و با کمترین عوارض جانبی تبدیل به یکی از مهمترین اهداف شرکت‌های دارو سازی در دنیا است. ترکیبات کوئوردینه شده فلزی نوید دهنده نسل جدیدی از داروهای سرطانی می‌باشند، که می‌توانند از طریق تخریب اکسیدان‌ها یا دخالت در مسیر فرآیندهای اکسایشی – کاهشی سلول‌های سرطانی باعث جلوگیری از تکثیر سلول و نهایت مرگ سلول‌های سرطانی شوند. توجه محققین به طراحی ترکیباتی جلب شده که بتوانند به شکل انتخابی به توالی خاصی از DNA متصل شوند. مولکول‌های سنتزی که جایگاه خاصی از DNA را هدف قرار می‌دهند ممکن است برای مهار یا تنظیم انتخابی بیان ژن به کار روند و آنها در درمان بیماری‌های سرطان و شیمی درمانی استفاده کرد. در اثر این اتصالات، کنفورماسیون DNA تغییر کرده و در نتیجه ساختار طبیعی دو رشته‌ای آن از بین می رود. این تغییرات ساختاری (فعالیت بیولوژیکی دارو) موجب می‌شود که آنزیم‌هایی مثل DNA پلیمراز نتواند DNA را شناسایی کند و درنتیجه امکان همانندسازی DNA در سلول سرطانی وجود ندارد. این عمل باعث مرگ سلول مادر و مرگ سلولی می‌گردد.

طیف‌سنجی جذبی UV-Vis عمومی‌ترین تکنیک ابزاری برای مطالعه‌ی پایداری و برهم‌کنش DNA با مولکول‌های دارو می‌باشد. در مولکول DNA مقدار بیشینه‌ی جذب در ۲۶۰ نانومتر می‌باشد که این جذب مربوط به بازهای آلی نیتروژن‌دار در ساختار مولکول است. مطالعه‌ی برهمکنش دارو- DNA با اسپکتروسکوپی UV-Vis با دنبال کردن تغییرات در خصوصیات نوارهای جذبی مولکول دارو و یا DNA انجام می‌شود. معمولاً مولکول‌های دارو یا DNA یک نوار جذبی ویژه دارند که در ناحیه‌ی UV-Vis تشخیص داده می‌شوند. برای تعیین هرگونه برهم‌کنش بین مولکول دارو و DNA بررسی جابجایی موقعیت این نوار (هایپرکرومیک و هیپوکرومیک) وقتی دارو یا DNA به‌صورت آزاد در محلول است یا وقتی که دارو در پیوند با DNA است، می‌باشد. اثر هایپرکرومیک از آسیب در ساختار DNA دورشته‌ای ناشی می‌شود. این آسیب منجر به افزایش جذب در طیف UV-Vis مربوط به DNA خواهد شد. در مقابل، اثر هیپوکرومیک به علت آسیب در اثر انقباض DNA حول محور مارپیچ است که نتیجه آن باعث ایجاد تغییرات کنفورماسیونی خواهد بود. این تغییرات باعث کاهش شدت جذب DNA دو رشته‌ای خواهد شد[1-4] .

بنابراین در این پژوهش یک نانو کمپلکس از یتربیوم(III) نیترات با لیگاند سیستامین، به روش هیدروترمال تهیه شد. سپس نانوذرات بدست آمد با روش های مختلف مانند اسپکتروسکوپی طیف سنجی مادون قرمز(IR) و طیف سنجی الکترونی (UV-Vis) شناسایی شدند. , در مرحله بعد پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش نانو ذره تهیه شده با FS-DNA بررسی شد. و در مرحله آخر به مطالعات تئوری این برهم کنش پرداخته شد.

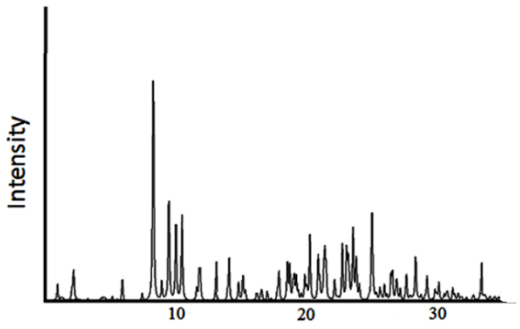
روش کار

برای سنتز تهیه کمپلکس ، نمک نیترات یتربیوم و لیگاند به نسبت مشخص در آب توسط امواج اولتراسونیک حل شدند و سپس در دستگاه بمب هیدرو ترمال بمدت ۲۴ ساعت در دمای معلوم قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان و خنک شدن اتو کلاو محصول جمع‌آوری شد.

شناسایی

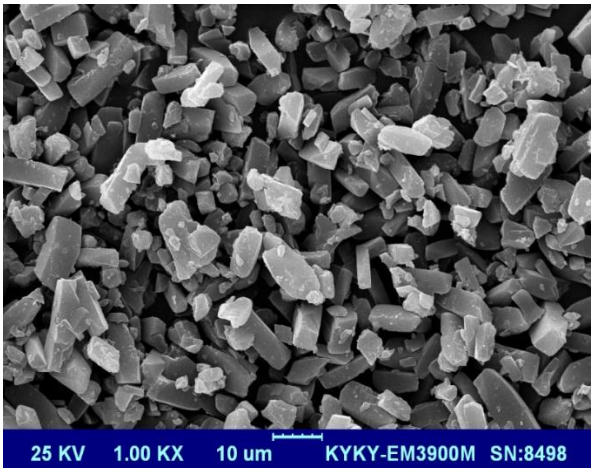
در بررسی طیف مادون قرمز کمپلکس ها نوار مشاهده شده در ناحیه $1500\ cm^{-1}$ مربوط به آمین نوع دوم و نیز ارتعاش در نواحی فرکانس های ارتعاشی مربوط به پیوندهایM-S و M-N نیز مشاهده شد. و این امر نشان دهنده تشکیل کمپلکس می‌باشد.د ر طیف الکترونی هر دو کمپلکس انتقالات میدان لیگاند نیز مشاهده شد. در طیف های الکترونی انتقالات بار CT نیز مشاهده گردید.

آنالیز پراش پودری (XRD) در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. الگوی XRD نانو کمپلکس تهیه شده

فاز کریستالی مربوط به ترکیب ۱ فازمکعبی شناسایی شده است. اندازه ی بلور با استفاده از معادله ی دبای شرر 51 نانومتر گزارش شده است. تصویر SEM نانو ذرکمپلکس در شکل۲ نشان داده شده است.



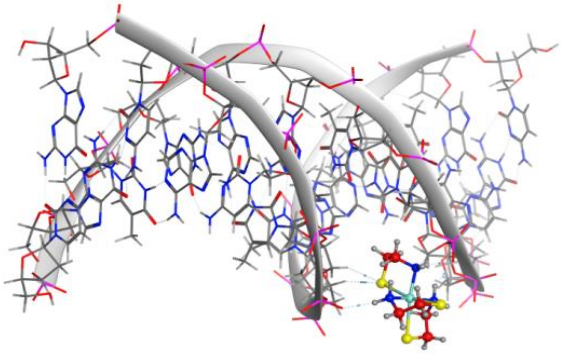
شکل۲. تصویر SEM نانوکمپلکس تهیه شده

این تصویر نشان می دهد که نمونه های تهیه شده به صورت نانو وتقریبا با مورفولوژی یکنواختی است.
در ادامه برهمکنش نانو ذره با FS-DNA هم از لحاظ کیفی (افزایش و کاهش شدت جذب و جابجایی محل باندها) و هم از لحاظ کمی (مقدار ثابت پیوندی) برهم‌کنش کمپلکس‌ها با DNA را بررسی کرد. اثرات هایپرکرومیک (افزایش در شدت جذب) و اثر هایپوکرومیک (کاهش در شدت جذب) از ویژگی‌های طیفی DNA ، مربوط به ساختار دو رشته‌ای آن می‌باشد.
اثر هایپوکرومیسم نتیجه‌ای از انقباض DNA در محور مارپیچ و همچنین تغییرات کنفورماسیونی DNA می‌باشد. در مقابل اثر هایپرکرومیسم از آسیب ساختار دو رشته‌ای DNA مشتق می‌شود. به طور کلی اتصال DNA از طریق اینترکلیشن به کمپلکس‌های فلزی منجر به کاهش در شدت جذب و جابجایی محل باندها به طول موج بلندتر به علت کوپل شدن قوی بین کروموفور آروماتیک کمپلکس و جفت بازهای DNA که باعث کاهش انرژی انتقالات و در نتیجه جابه‌جایی به طول موج‌های بلندتر می‌شود. اثر هایپرکرومیسم به - علت آسیب دیدن ساختار دو رشته‌ای DNA می‌باشد. در ادامه و نتایج بدست آمده از ثابت پیوندی با مقدار ثابت پیوندی اتیدیوم برماید $۱/۴\times۱۰^{۶}$ مقایسه شد و نتیجه قابل قبولی بدست آمد. همچنین نوی پیوند و تعدادجایگاه های پیوندی نیز معین شد.

داکینگ مولکولی ترکیبات با استفاده از نرم افزار MOE انجام پذیرفت. ساختار کمپلکس $[YbL_3](NO_3)_3$ با استفاده از نرم افزار GUASS VIEW 6 ترسیم شدند و پس از بهینه سازی ساختارها توسط نرم افزار GUASSIAN 9 در محاسبات داکینگ ملکولی مورد استفاده قرار گرفتند ساختار مربوط به DNA Fish Salmon از سایت www.RCSB.org استخراج شد. موقعیت های فعال در ساختار DNA توسط نرم افزار شناسایی شدند و داکینگ در همان موقعیت های فعال انجام شد و نهایتا بهترین موقعیت

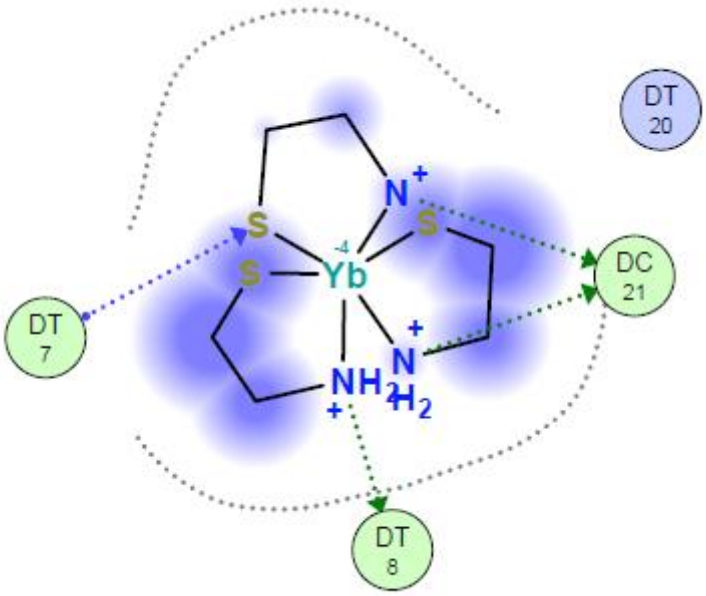
شناسایی شد. در مطالعات داکینگ، میدان نیروی AMBER 10H بکار برده شد. در هر بار انجام داکینگ، ساختار با کمترین انرژی داکینگ مورد استفاده قرار گرفت.

انرژی اتصال کمپلکس $[YbL_3](NO_3)_3$ به DNA محاسبه شد. پس از انجام داکینگ ملکولی بهترین موقعیت پیوند با DNA ارزیابی شد. در شکل های ۳ موقعیت های فعال DNA برای ایجاد پیوند با کمپلکس $[YbL_3](NO_3)_3$ نشان داده شده است.



شکل ۳. موقعیت اتصال کمپلکس $[YbL_3](NO_3)_3$ با DNA

بازهای آلی درگیر شده با کمپلکس$[YbL_3](NO_3)_3$ در شکل 4 و آمده است.



شکل ۴. باز های درگیر با کمپلکس $[YbL_3](NO_3)_3$ در موقعیت اتصال با DNA

تقدیر و تشکر:

نویسندگان مقاله از حمایت های مالی دانشگاه سیستان و بلوچستان صمیمانه قدردانی می کنند.

منابع

[1] Gopinathan H. Komathi N. Arumugham, M. (2014). Inorganica Chimica Acta, 416, 93-101

[2] Muniyandi V. Rama, N. (2016). Materials Science and Engineering C, 68, 258-266

[3] Esteban-Fernández D., Moreno-Gordaliza E., Cañas, B. Palacios, M. A. Gómez-Gómez M. M., (2010) Metallomics 2,. 19–38.

[4] Kondori T., Akbarzadeh-T N., Graiff C. (2019) Journal of the Iranian Chemical Society. 16 1827–1838.

نقش RNA های غیرکد کننده در بیماری‌های چشمی

سیده نگین موسوی[۱]، سیروس نعیمی[۲]، پرنیا کاظمی[۲]
۱. کارشناس زیست شناسی سلولی و مولکولی
۲. استادیار ژنتیک مولوکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، ایران
۳. کارشناس زیست شناسی سلولی و مولکولی

چکیده

شیوع اختلالات چشمی از جمله آب مروارید، گلوکوم، دژنراسیون ماکولا وابسته به سن و رتینوپاتی دیابت در سراسر جهان به در حال افزایش است مواردی که باعث اختلال بینایی و از دست دادن دائمی بینایی می‌شوند. پژوهش حاضر با هدف بررسی نقش RNAهای غیرکدکننده در بیماری‌های چشمی سعی در بررسی این موضوع دارد. شواهد گسترده نشان داده است که RNAهای غیرکدکننده تنظیم کننده‌های کلیدی بیوژنز مختلف و توابع بیولوژیکی، کنترل بیان ژن مرتبط، هیستوژنز و تمایز سلولی در بافت‌های چشمی هستند. عملکرد نابجای ncRNA می تواند منجر به اختلال در عملکرد سیستم بینایی و پیشرفت اختلالات چشمی‌شود. در مطالعات اخیر ثابت شده است که miRNAها و lncRNAها بر رشد چشم و فرآیندهای پاتولوژیک مهم بیماری‌های چشمی نقش دارند . با توجه به این نتایج می‌توان اذعان داشت که ncRNAها به عنوان اهداف مولکولی خوبی برای متوقف کردن بیماری‌های چشم عمل می‌کنند لذا می‌توان با هدف قرار دادن یک ncRNA به اثرات درمانی مورد انتظار دست یافت.

کلمات کلیدی: بیماری‌های چشمی، RNAهای غیرکد کننده، رشد چشم

[۱] نویسنده مسئول (naeimis@kau.ac.ir)

The Role of Non-Coding RNAs in Eye Diseases

Seyedeh Negin Mousavi [1], Siros Naimi [2*], Pernia Kazemi [3]

1. Cell and molecular biology expert

2. Assistant Professor of Molecular Genetics, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Iran [1*]

3. Cell and molecular biology expert

Abstract

The prevalence of eye disorders including cataracts, glaucoma, age-related macular degeneration, and diabetic retinopathy is increasing worldwide, causing visual impairment and permanent vision loss. The current study aims to investigate the role of non-coding RNAs in eye diseases. Extensive evidence has shown that non-coding RNAs are key regulators of various biogenesis and biological functions, controlling related gene expression, histogenesis, and cell differentiation in ocular tissues. Aberrant ncRNA function can lead to impaired function of the visual system and development of eye disorders. In recent studies, it has been proven that miRNAs and lncRNAs play a role in eye development and important pathological processes of eye diseases. According to these results, it can be acknowledged that ncRNAs act as good molecular targets to stop eye diseases, therefore, by targeting an ncRNA, the expected therapeutic effects can be achieved.

Key words: eye diseases, non-coding RNAs, eye development

[1]* Corresponding Author(naeimis@kau.ac.ir)

مقدمه

در سراسر جهان، تقریباً ۴۳/۳۰ میلیون نفر در سال ۲۰۲۱ به بیماری‌هایی چشمی نظیر آب مروارید، گلوکوم، دژنراسیون ماکولا وابسته به سن (AMD) و اپاتی شبکیه دیابتی (DR) دچار بودند[۱]. با توجه به شروع موذیانه و اختلال برگشت‌ناپذیر بینایی ناشی از برخی بیماری‌های چشمی، درک پاتوژنز این بیماری‌ها و توسعه روش‌های تشخیص زودهنگام و درمان‌های موثر برای بهبود بینایی بیماران بسیار مهم است. تا به امروز، ما می دانیم که نگهداری عادی و اختلال بینایی عمدتاً با تنظیم بیان ژن مرتبط با فرآیندهای بیولوژیکی متنوع، از جمله رشد سلولی، تکثیر سلولی، آپوپتوز، تنظیم چرخه سلولی، استرس اکسیداتیو و التهاب بصورت دقیق تعیین می‌شود[۲]. یک سری شواهد نشان داده است که RNAهای غیـــر کد کننده اخیراً به عنوان تنظیم کننده‌های کلیدی بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی فوق‌الذکر در حال ظهور هستند[۳-۴]. RNAهای غیر کد کننده یا ncRNAها ترانسکریپت‌هایی هستند که پروتئین کد نمی‌کنند در بین ،آنها، RNAهای غیـــر کد کننده بلند یا lncRNAها زیرگروهی هستند که طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید دارند و این وجه تمایز آنها از ncRNAs کوچک مانند tRNA miRNA و piRNAها است. lncRNAها از لحاظ رونویسی شبیه mRNAها هستند و توسط RNA پلیمراز مکان‌های ژنومی با حالتهای کروماتین مشابه رونویسی می‌شوند [۵]. پژوهش‌های فراوانی درباره lncRNAها در حال انجام است و نقش این مولکولها در بیولوژی سلولها و نیز برخی حالات پاتولوژیک و فیزیولوژیک آشکار شده است [۶-۸]. تحقیقات نشان داده است که بیان غیرطبیعی RNAهای غیر کدکننده (miRNA، lncRNA، circRNA) می تواند منجر به اختلال در رشد طبیعی عدسیو بیماری‌های چشمی شوند [۹-۱۱]. در این پژوهش قصد داریم تا نقش RNAهای غیـــر کدکننده را در بیماری‌های چشمی و چشم پزشکی مورد بررسی قرار دهیم. شواهد زیادی دال بر تاثیر گذاری RNAهای غیـــرکد کننده در بیماری‌های چشمی وجود دارد که در این پژوهش مورد واکاوی قرار خواهد گرفت.

نقش‌های تنظیمی ncRNAها در بیماری‌های چشم

علل اصلی اختلالات بصری شامل چندین بیماری چشمی از جمله آب مروارید، گلوکوم، DR و AMD است که میزان شیوع آن طی ۱۰ سال گذشته در حال افزایش است[۲، ۱۲]. بیماری‌های چشمی که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، از جمله آب مروارید، گلوکوم، DR و AMD هستندکه در این بخش بررسی می‌شوند.

آب مروارید

آب مروارید، که به عنوان کدر شدن شفاف طبیعی عدسی در چشم تعریف می‌شود که یکی از عوامل اصلی اختلال بینایی است که باعث ۴۷/۸٪ از کل موارد نابینایی می‌شود[۱۳]. ncRNA ها به عنوان یک کلاس

جدید از تنظیم کننده‌ها هستند که بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و بیان غیرطبیعی آنها می‌تواند با اختلال در رشد عدسی و سلول‌های فیبر مرتبط باشد و منجر به آب مروارید می‌شود [۱۴]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اختلال در تنظیم miRNA بر تشکیل آب مروارید تأثیر می‌گذارد. بیان غیر طبیعی miRNA در عدسی مشاهده شده است و در بسیاری از موارد بالینی با پیش آگهی ضعیف مرتبط است[۱۵-۱۶].

(جدول۱). نمونه مطالعات انجام گرفته در زمینه تاثیر RNAهای غیر کدکننده در آب مروارید

RNAهای غیـــر کد کننده	بیماری	توضیحات عملکردی	منابع
miR-30a	آب مروارید	با هدف قرار دادن BECN1 فعالیت اتوفاژی را تنظیم می‌کند.	[۱۶-۱۷]
KCNQ1OT1	آب مروارید	miR-214 را مهار می‌کند، کاسپاز ۱ را برای القای پیروپتوز تنظیم می‌کند. H2O2- را ترویج می‌کند	[۱۳، ۱۶]
MIAT	آب مروارید	به عنوان یک ceRNA برای اسفنج miR-150-5p خدمت کرده و در تکثیر و مهاجرت HLECها نقش دارد.	[۱۸]
XIST	آب مروارید	تنظیم SMAD2 برای تسهیل تکثیر، مهاجرت و تهاجم و با عمل به عنوان ceRNA miR-34a آپوپتوز را مهار می‌کند.	[۱۹]
H19	آب مروارید	مسیر H19/miR-29a/TDG را تنظیم می‌کند. محور H19/miR-675 ممکن است بر CRYAA تأثیر بگذارد.	[۲۰]
PLCD3-OT1	آب مروارید	از طریق رقابت برای miR-224-5p، بیان PLCD3 را تنظیم می‌کند.	[۲۱]
MEG3	آب مروارید	با افزایش تنظیم TP53INP1 ، پیشرفت ARC را ارتقا می‌دهد و با بیان P53 میزان miR-223 را ارتقاء می‌بخشد.	[۲۲]

گلوکوم

گلوکوم شایع‌ترین علت جهانی نابینایی غیرقابل برگشت است و با آسیب دیدگی عصب بینایی مشخص می‌شود[۲۳]. در بیشتر موارد، گلوکوم با افزایش فشار داخل چشم (IOP) همراه است که می‌تواند منجر به دژنراسیون عصب بینایی با مرگ RGC می‌شود. شبکه ترابکولار (TM)، واقع در زاویه محفظه قدامی و مسیر اصلی تخلیه زلالیه (AH) از چشم است و اختلال در عملکرد آن منجر به افزایش IOP می‌شود.ncRNA ها در هیستوژنز و تمایز سلولی در شبکیه و عصب بینایی نقش دارند. چندین مطالعه تغییر قابل توجه بیان miRNA را در جسم مژگانی[۲۴]، سلول‌هایTM [۲۵] و شبکیه چشم [۲۶] را تایید کرده‌اند.

(جدول۲). نمونه مطالعات انجام گرفته در زمینه تاثیر **RNA**های غیر کدکننده در گلوکوم

RNAهای غیـــر کد کننده	بیماری	توضیحات عملکردی	منابع
MALAT1	گلوکوم	تکثیر سلولی را تقویت می‌کند و با هدف قرار دادن miR-149-5p آپوپتوز سلولی RGCs را مهار می‌کند.	[۲۷-۲۸]
RP11-820	گلوکوم	در تخریب سلول‌های TM ماتریکس خارج سلولی انسان miR-3178به‌عنوان یک اسفنج عمل می‌کند.	[۲۹]
ANRIL	گلوکوم	اهداف p15، با تظاهرات چشمی مرتبط است	[۳۰]
GAS5	گلوکوم	بقای RGCها را از طریق تنظیم مسیر TGF-β حفظ می‌کند.	[۳۱]

رتینوپاتی دیابتی

رتینوپاتی دیابتی یک عارضه عمده مرتبط با دیابت و تهدید کننده ترین عامل برای بینایی بزرگسالان است که ممکن است باعث از دست دادن بینایی و حتی نابینایی شود [۳۲]. دیابت بر شبکیه تأثیر منفی می‌گذارد و منجر به ناهنجاری‌های عروق و تخریب عصبی می‌شود. امروزه ncRNAها به عنوان یکی از عوامل مهم تاثیرگذار وقوع DR در نظر گرفته می‌شوند به ویژه miRNAها و lncRNAها، که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند[۳۳].

(جدول۳). نمونه مطالعات انجام گرفته در زمینه تاثیر RNAهای غیر کدکننده در رتینوپاتی دیابتی

RNAهای غیـــر کد کننده	بیماری	توضیحات عملکردی	منابع
MALAT1	رتینوپاتی دیابتی	رگزایی و التهاب ناشی از HG در RVECs را توسط تنظیم کننده استرس ER ترویج می‌کند.	[۳۴]
H19	رتینوپاتی دیابتی	از ایجاد بیش از حد H19 ناشی از گلوکز EndMT جلوگیری می‌کند.	[۳۵]
HOTAIR	رتینوپاتی دیابتی	مولکول‌های رگ زا و مرتبط با دیابت در شبکیه چشم را در برابر افزایش‌های ناشی از گلوکز محافظت می‌کند.	[۳۶]
OGRU	رتینوپاتی دیابتی	پیشرفت DR را از طریق رقابت برای تنظیم miR-320 با بیان USP14 واسطه می‌کند.	[۳۷]
NEAT1	رتینوپاتی دیابتی	از طریق بالا بردن miR-497، سبب ارتقاء آپوپتوز سلول‌های مولر شده که در نتیجه می تواند DR را تشدید کنند.	[۳۸]

دژنراسیون ماکولار مرتبط با سن

دژنراسیون ماکولار مرتبط با سن(AMD) یک بیماری پیچیده است که بینایی را تهدید می‌کند. در سطح جهانی، AMD یکی از علل اصلی نابینایی در کشورهای توسعه یافته و سومین علت اصلی که می‌تواند سیستم پشتیبانی گیرنده نوری را از بین ببرد[۳۹]. AMD عمدتاً به دو نوع خشک و مرطوب تقسیم می‌شود که علامت خشکی آن آتروفی است. در حالی که شکل مرطوب آن نئوواسکولاریزاسیون است. اگرچه پاتوژنز آن نامشخص است، اما محققان این موضوع را مشخص کرده‌اند آنها اخیراً موفق به یافتن برخی از عوامل ژنتیکی شده است که ممکن است بر پیشرفت AMD تأثیر بگذارد[۴۰].

(جدول۴). نمونه مطالعات انجام گرفته در زمینه تاثیر RNAهای غیر کدکننده در دژنراسیون ماکولار مرتبط با سن

RNAهای غیـــر کد کننده	بیماری	توضیحات عملکردی	منابع
ZNF503-AS1	دژنراسیون ماکولار مرتبط با سن	تمایز سلول‌های RPE مشتق شده از iPSC بدون ZNF503-AS1 مهار می‌شود.	[۴۱]
miR-150-5p	دژنراسیون ماکولار مرتبط با سن	انتقال ماکروفاژها از حالت طبیعی را تنظیم می‌کند و سبب ترویج فنوتیپ‌های رگ زایی با هدف قرار دادن استئاروئیل کوآنزیم A (CoA) دساتوراز-۲(SCD2) می گردد.	[۴۲-۴۳]
LINC00167	دژنراسیون ماکولار مرتبط با سن	تمایز زدایی از RPE و اینکه این lncRNA عملکرد خود را از طریق سرکوب miR-203a-3p انجام می دهد که سبب افزایش بیان سرکوبگر سیگنالینگ سیتوکین می‌شود.	[۴۴]
lncRNA H19	دژنراسیون ماکولار مرتبط با سن	تنظیم مثبت در زلالیه بیماران مبتلا به شکل اگزوداتیو دژنراسیون ماکولا مرتبط با سن انسان	[۴۵]

رتینوبلاستوما

رتینوبلاستوما یک سرطان نسبتا نادر است. رتینوبلاستوما به راحتی در دسترس خطوط سلولی است که این منطقه را به یک منطقه مطالعه جذاب تبدیل می‌کند. چندین مطالعه پروفایل بیان بافت‌های رتینوبلاستوما را توصیف کرده اند، این مطالعات تعدادی از ncRNAها را شناسایی کرده اند. نتایج نشان می دهد که miRNAها ممکن است به عنوان نشانگرهای زیستی مفید در این سرطان باشند[۴۶].

(جدول۵). نمونه مطالعات انجام گرفته در زمینه تاثیر RNAهای غیر کدکننده در رتینوبلاستوما

RNAهای غیـــر کد کننده	بیماری	توضیحات عملکردی	منابع
miR-361-3p	رتینوبلاستوما	تکثیر رده سلولی رتینوبلاستوما را از طریق تنظیم آنکوژن‌های ۱ و ۳ مرتبط با گلیوما (GLI1 وGLI3) سرکوب می‌کند.	[۴۷]
miR-758-3p	رتینوبلاستوما	بافت‌های رتینوبلاستوما و تکثیر سلول‌های رتینوبلاستوما کاهش می‌یابد.	[۴۸]

بحث و نتیجه گیری

RNAهای غیرکد کننده متنوعی در پاتوژنز بیماری‌های چشم شناسایی شده اند. با توجه به نقش حیاتی آنها در پیشرفت بیماری، تعدیل بیان آنها احتمالاً می‌تواند توسعه درمان‌های جدید را تسهیل کند با توجه به این موضوع، جای تعجب نیست که مدولاسیون ncRNAها یک زمینه رو به رشد در توسعه درمان بیماری‌های مختلف است. به طور کلی، RNA درمانی از مولکول‌های RNA برای هدف قرار دادن رونوشت‌های RNA یا پروتئین‌ها در سلول‌ها با درجات مختلف موفقیت استفاده می‌کند.

به طور خلاصه، این بررسی مدولاسیون دقیق ncRNAها را در رشد، عملکرد و درمان بیماری‌های چشم خلاصه کرده است. هدف بحث ما تسهیل درک بهتر چشم پزشکی و ارائه گزینه‌های موثرتر است برای کاربرد درمانی دقیق ncRNAها در کلینیک‌ها و در نهایت بهبود کیفیت زندگی برای سالمندان مبتلا به بیماری‌های چشمی است. همانطور که در بالا ذکر شد، مطالعات اخیر تاثیر ثابت شده miRNAها و lncRNAها را بر رشد چشم و فرآیندهای پاتولوژیک مهم بیماری‌های چشمی شناسایی کرده‌اند. در آب مروارید، ncRNAها بیان ژن متنوع و مسیرهای سیگنالینگرا برای تأثیر بر تکثیر، مهاجرت، اتوفاژی، پیروپتوز، آپوپتوز را تعدیل می‌کنند. در بیماری گلوکوم، ncRNAها در سنتز ECM، تجزیه سلول‌های TM و آپوپتوز RGCs نقش دارند، در حالی که اولی سطح IOP را تنظیم می‌کند و دومی منجر به آسیب میدان بینایی می‌شود. به طور قابل توجه، مکانیسم‌های زیربنایی ncRNAها دخالت در پاتوژنز مشترک هر دو بیماری‌های DR و AMD از جمله استرس اکسیداتیو، التهاب، آپوپتوز و رگزایی در شبکیه است، در اکثر ncRNAهای حاشیه نویسی فعلی از نظر عملکردی مورد بررسی قرار نگرفته‌اند بنابراین، یک چالش مهم شناسایی همه ncRNAهای عملکردی نسبت به رشد چشم و بیماری چشمی است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ncRNAها به عنوان اهداف مولکولی خوبی برای متوقف کردن بیماری‌های چشم عمل می‌کنند. با این حال، بسیاری از چالش‌ها برای کاربرد آنها در عمل بالینی باید حل شود. اول اینکه، مشابه پروتئین‌ها،

یک ncRNA معمولاً چندین مورد را هدف قرار می‌دهد و هدف قرار دادن یک ncRNA واحد ممکن است به اثرات درمانی مورد انتظار دست یابد. علاوه بر این، هر پروتئین کدگذاری ژن ممکن است هدفی برای چندین ncRNA باشد بنابراین، هدف قرار دادن یک ncRNA واحد ممکن است عملکرد ناکافی ایجاد کند. برای مداخله در بیماری علاوه بر این، به دلیل فقدان مدل‌های تجربی قابل‌اعتماد، مطالعات بیماری‌های چشمی عمدتاً بر روی مدل‌های سلولی آزمایشگاهی و فنوتیپ‌های قوی یا مکانیسم‌های عملیاتی کمی انجام می‌شود. مطالعات بیشتر و مدل‌های تحقیقاتی بیشتر برای کشف عملکرد ncRNA ضروری است.

منابع

1. Blindness, G. B. D., Vision Impairment, C., & Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease, S. (2021a). Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The right to sight: An analysis for the global burden of disease study. The Lancet Global Health, 9(2), e144–e160.
2. Bourne, R. R. A., Flaxman, S. R., Braithwaite, T., Cicinelli, M. V., Das, A., Jonas, J. B., Keeffe, J., Kempen, J. H., Leasher, J., Limburg, H., Naidoo, K., Pesudovs, K., Resnikoff, K., Silvester, A., Stevens, G. A., Tahhan, N., Wong, T. Y., Taylor, H. R., & Vision Loss Expert, G. (2017). Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: A systematic review and meta-analysis. The Lancet Global Health, 5(9), e888–e897.
3. Yao, R. W., Wang, Y., & Chen, L. L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. Nature Cell Biology, 21(5), 542–551.
4. Maiorano, N. A., & Hindges, R. (2012). Non-coding RNAs in retinal development. International Journal of Molecular Sciences, 13(1), 558–578.
5. Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. Nature Reviews Genetics, *17*(1), 47-62.
6. Guo, J., Liu, Z., & Gong, R. (2019). Long noncoding RNA: an emerging player in diabetes and diabetic kidney disease. Clinical Science, 133(12), 1321-1339.
7. Salamon, I., Jotti, G. S., & Condorelli, G. (2018). The long noncoding RNA landscape in cardiovascular disease: a brief update. Current opinion in cardiology, 33(3), 282-289.
8. Schmitz, S. U., Grote, P., & Herrmann, B. G. (2016). Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. Cellular and molecular life sciences, 73, 2491-2509.
9. Mendell, J.T., and Olson, E.N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. Cell 148, 1172–1187.

10. Kung, J.T., Colognori, D., and Lee, J.T. (2013). Long noncoding RNAs: Past, present, and future. Genetics 193, 651–669.

11. Marchese, F.P., Raimondi, I., and Huarte, M. (2017). The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. Genome Biol. 18, 206.

12. Song, P., Wang, H., Theodoratou, E., Chan, K. Y., & Rudan, I. (2018). The national and subnational prevalence of cataract and cataract blindness in China: A systematic review and meta-analysis. Journal of Global Health, 8(1), 010804.

13. Jin, X., Jin, H., Shi, Y., Guo, Y., & Zhang, H. (2017). Long non-coding RNA KCNQ1OT1 promotes cataractogenesis via miR-214 and activation of the caspase-1 pathway. Cellular Physiology and Biochemistry, 42(1), 295–305.

14. Wu, C., Lin, H., Wang, Q., Chen, W., Luo, H., Chen, W., & Zhang, H. (2012). Discrepant expression of micro RNAs in transparent and cataractous human lenses. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 53(7), 3906–3912.

15. Zhang, J., Wang, J., Zheng, L., Wang, M., Lu, Y., Li, Z., Lian, C., Mao, S., Hou, X., Li, S., Xu, J., Tian, H., Jin, C., Gao, F., Zhang, J., Wang, F., Li, W., & Xu, G. T. (2017). miR-25 mediates retinal degeneration via inhibiting ITGAV and PEDF in rat. Current Molecular Medicine17(5), 359–374.

16. Zhang, M., & Cheng, K. (2021). Long non-coding RNA KCNQ1OT1 promotes hydrogen peroxide-induced lens epithelial cell apoptosis and oxidative stress by regulating miR-223-3p/BCL2L2 axis. Experimental Eye Research, 206, 108543.

17. Xiu, C., Jiang, J., & Song, R. (2020). Expression of miR-34a in cataract rats and its related mechanism. Experimental and Therapeutic Medicine, 19(2), 1051–1057.

18. Shen, Y., Dong, L. F., Zhou, R. M., Yao, J., Song, Y. C., Yang, H., Jiang, Q., & Yan, B. (2016). Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis and migration of lens epithelial cells: A clinical and in vitro study. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 20(3), 537–548.

19. Wang, C., Zhao, R., & Zhang, S. (2022). Lnc RNA XIST knockdown suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in diabetic cataracts through the miR34a/SMAD2 axis. Molecular Medicine Reports, 25(1), 7.

20. Cheng, T., Xu, M., Qin, B., Wu, J., Tu, Y., Kang, L., Wang, Y., & Guan, H. (2019). Lnc RNA H19 contributes to oxidative damage repair in the early age-related cataract by regulating mi R-29a/TDG axis. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 23(9), 6131–6139.

21. Xiang, J., Chen, Q., Kang, L., Zhang, G., Wang, Y., Qin, B., Wu, J., Zhou, T., Han, Y., & Guan, H. (2019). Lnc RNA PLCD3-OT1 functions as a CeRNA to prevent age-related cataract by sponging miR-224-5p and regulating PLCD3 expression. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 60(14), 4670–4680.

22. Tu, Y., Xie, L., Chen, L., Yuan, Y., Qin, B., Wang, K., Zhu, Q., Ji, N., Zhu, M., & Guan, H. (2020). Long non-coding RNA MEG3 promotes cataractogenesis by upregulating TP53INP1 expression in age-related cataract. Experimental Eye Research, 199, 108185.

23. Jonas, J. B., Aung, T., Bourne, R. R., Bron, A. M., Ritch, R., & Panda-Jonas, S. (2017). Glaucoma. The Lancet, 390(10108), 2183–2193.

24. Wang, F. E., Zhang, C., Maminishkis, A., Dong, L., Zhi, C., Li, R., Zhao, J., Majerciak, V., Gaur, A. B., Chen, S., & Miller, S. S. (2010). Micro RNA-204/211 alters epithelial physiology. The FASEB Journal, 24(5), 1552–1571.

25. Ryan, D. G., Oliveira-Fernandes, M., & Lavker, R. M. (2006). Micro RNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. Molecular Vision, 12, 1175–1184

26. Tanaka, Y., Tsuda, S., Kunikata, H., Sato, J., Kokubun, T., Yasuda, M., Nishiguchi, K. M., Inada, T., & Nakazawa, T. (2014). Profiles of extracellular miRNAs in the aqueous humor of glaucoma patients assessed with a microarray system. Scientific Reports, 4, 5089.

27. Li, X., & Wang, J. (2017). Comparison of micro RNA expression in aqueous humor of normal and primary open-angle glaucoma patients using PCR arrays: A pilot study. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 58(12), 4988.

28. Wang, L., Gong, J., Wang, J., Dan, J., & Wang, P. (2021). Long non-coding RNA MALAT1 alleviates the elevated intraocular pressure (Eiop)– induced glaucoma progression via sponging miR-149-5p. Current Eye Research, 46(6), 903–911.

29. Shen, W., Huang, B., He, Y., Shi, L., & Yang, J. (2020). Long non-coding RNA RP11-820 promotes extracellular matrix production via regulating miR-3178/MYOD1 in human trabecular meshwork cells. The FEBS Journal, 287(5), 978–990.

30. Wang, C., Zhao, R., & Zhang, S. (2022). Lnc RNA XIST knockdown suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in diabetic cataracts through the miR34a/SMAD2 axis. Molecular Medicine Reports, 25(1), 7.

31. Xu, Y., & Xing, Y. Q. (2018). Long non-coding RNA GAS5 contributed to the development of glaucoma via regulating the TGF-beta signaling pathway. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 22(4), 896–902.

32. Duh, E. J., Sun, J. K., & Stitt, A. W. (2017). Diabetic retinopathy: Current understanding, mechanisms, and treatment strategies. JCI Insight, 2(14), e93751.

33. Ye, E. A., & Steinle, J. J. (2017). miR-146a suppresses STAT3/VEGF pathways and reduces apoptosis through IL-6 signaling in primary human retinal microvascular endothelial cells in high glucose conditions. Vision Research, 139, 15–22.

34. Wang, Y., Wang, L., Guo, H., Peng, Y., Nie, D., Mo, J., & Ye, L. (2020). Knockdown of MALAT1 attenuates high-glucose-induced angiogenesis and inflammation via

endoplasmic reticulum stress in human retinal vascular endothelial cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, 124, 109699.

35. Thomas, A. A., Biswas, S., Feng, B., Chen, S., Gonder, J., & Chakrabarti, S. (2019). Lnc RNA H19 prevents endothelial-mesenchymal transition in diabetic retinopathy. Diabetologia, 62(3), 517–530.

36. Biswas, S., Feng, B., Chen, S., Liu, J., Aref-Eshghi, E., Gonder, J., Ngo, V., Sadikovic, B., & Chakrabarti, S. (2021). The long non-coding RNA HOTAIR is a critical epigenetic mediator of angiogenesis in diabetic retinopathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 62(3), 20.

37. Fu, S., Zheng, Y., Sun, Y., Lai, M., Qiu, J., Gui, F., Zeng, Q., & Liu, F. (2021). Suppressing long noncoding RNA OGRU ameliorates diabetic retinopathy by inhibition of oxidative stress and inflammation via mi R-320/USP14 axis. Free Radical Biology & Medicine, 169, 361–381.

38. Li, X. J. (2018). Long non-coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 inhibits the apoptosis of retina muller cells after diabetic retinopathy through regulating miR-497/brain-derived neurotrophic factor axis. Diabetes & Vascular Disease Research, 15(3), 204–213.

39. Pascolini, D., & Mariotti, S. P. (2012). Global estimates of visual impairment: 2010. The British Journal of Ophthalmology, 96(5), 614–618.

40. ElShelmani, H., Brennan, I., Kelly, D. J., & Keegan, D. (2021). Differential circulating micro RNA expression in age-related macular degeneration. International Journal of Molecular Sciences, 22(22), 12321.

41. Chen, X., Jiang, C., Qin, B., Liu, G., Ji, J., Sun, X., Xu, M., Ding, S., Zhu, M., Huang, G., Yan, B., & Zhao, C. (2017). Lnc RNA ZNF503-AS1 promotes RPE differentiation by downregulating ZNF503 expression. Cell Death & Disease, 8(9), e 3046.

42. Lin, J.B., Moolani, H.V., Sene, A., Sidhu, R., Kell, P., Lin, J.B., Dong, Z., Ban, N., Ory, D.S., and Apte, R.S. (2018). Macrophage microRNA-150 promotes pathological angiogenesis as seen in age-related macular degeneration. JCI Insight 3, e120157.

43. McLeod, D.S., Bhutto, I., Edwards, M.M., Silver, R.E., Seddon, J.M., and Lutty, G.A. (2016). Distribution and quantification of choroidal macrophages in human eyes with age-related macular degeneration. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 57, 5843–5855.

44. Chen, X., Sun, R., Yang, D., Jiang, C., and Liu, Q. (2020). LINC00167 regulates RPE differentiation by targeting the miR-203a-3p/SOCS3 axis. Mol. Ther. Nucleic Acids19, 1015–1026.

45. Zhang, P., Lu, B., Xu, F., Wang, C., Zhang, R., Liu, Y., Wei, C., and Mei, L. (2020). Analysis of long noncoding RNAs in choroid neovascularization. Curr. Eye Res. 45, 1403–1414.

46. Golabchi, K., Soleimani-Jelodar, R., Aghadoost, N., Momeni, F., Moridikia, A., Nahand, J.S., Masoudifar, A., Razmjoo, H., and Mirzaei, H. (2018). MicroRNAs in

retinoblastoma: Potential diagnostic and therapeutic biomarkers. J. Cell. Physiol. 233, 3016–3023.

47. Zhao, D., and Cui, Z. (2019). MicroRNA-361-3p regulates retinoblastoma cell proliferation and stemness by targeting hedgehog signaling. Exp. Ther. Med. 17, 1154–1162.

48. Li, J., and You, X. (2018). MicroRNA-758 inhibits malignant progression of retinoblastoma by directly targeting PAX6. Oncol. Rep. 40, 1777–1786.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی اثر گیاه اُزمَک (سوزی) بر روی باکتری استرپتوکوک و درنتیجه درمان گلو درد چرکی

عاطفه کشته گر، صالحه صادقی
دبیرستان فرزانگان، زاهدان
atefeh.keshtegar@gmail.com

چکیده:

منطقه سیستان با داشتن ویژگی‌های اقلیمی خاص، از تنوع گیاهی منحصر به فردی نیز برخوردار است؛ این منطقه دارای گیاهانی با خواص دارویی فراوان است و مردم این منطقه با آگاهی از این گنجینه عظیم، سالیان دراز برای درمان بیماری های بسیاری از این گیاهان بهره برده‌اند. به دلیل دسترسی ساده ، گیاهان دارویی ارتباط مستقیم با سلامت انسان دارند ؛ بنابراین ، ضرورت پژوهش پیرامون این گیاهان همواره احساس می شود. اُزمک (گویش محلی: سوزی) از لحاظ علمی گیاه دولپه و از خانواده‌ی شب بوها است. گیاه خودروی منطقه سیستان که غالبا در اطراف زمین های کشاورزی و در بستر رودها می روید. پژوهش حاضر به هدف معرفی گیاه اُزمک و نیز تشریح خواص دارویی آن به روش کتابخانه ای ، فیش برداری و آزمایشگاهی با بهره گیری از مصاحبه ، تصویر کلی و خواص درمانی این گیاه را ارائه می دهد. از مصاحبه های میدانی و مطالعات صورت گرفته بر می‌آید که این گیاه ضد باکتری استرپتوکوک A است و می تواند در درمان بیماری های: گلو درد چرکی ، جای نیش حشرات و نیز رفع کم خونی موثر واقع شود.

واژگان کلیدی: گیاه سوزی(اُزمک) ، باکتری استرپتوکوک A ، درمان

abstract

Sistan region has special climatic characteristics of plant diversity. Plants that have many medicinal properties and the people of this region are aware of this huge treasure for many years to treat many diseases of these plants. Due to their easy access, medicinal plants are directly related to human health. Therefore, the need for research on these plants is always felt. Ozmak (local dialect: Susie) is scientifically a dicotyledonous plant and belongs to the nightshade family. Sistan car plant that often grows around agricultural lands and in the bed of rivers The aim of this study is to introduce Ozmak plant and also to describe its medicinal properties by library, fish and laboratory methods using interviews, to provide an overview and therapeutic properties of this plant. Field interviews and studies show that this plant contains the bacterium Aspect coccus A, which can be effective in treating diseases: purulent sore throat, insect bites and anemia.

Keywords: Plant Burn (Ozmak), Streptococcus A bacteria, Treatment

مقدمه:

در منطقه سیستان چندین نوع گیاه دارویی شناسایی شده است که از دیرباز مردم این سرزمین برای درمان انواع بیماری ها از آنها استفاده می کرده اند. اما متاسفانه امروزه کمتر کسی از نسل با تجربه گذشته باقی مانده و خشکسالی ها نیز سبب کاهش عرضه گیاهان دارویی شده است. گیاهانی که بهره برداری مطلوب از آن ها می تواند موجبات درآمدزایی و رونق اقتصادی این منطقه را نیز فراهم کند. این منطقه به سبب داشتن ویژگی های اقلیمی خاص از تنوع گیاهی منحصر به فردی برخوردار است .یکی از این گیاهان ، گیاه ازمک در گویش سیستانی، سوزی با اسم علمی Cardaria draba گیاهی خودرو و به خانواده شب بوها تعلق دارد[۶] و بیشتر درمناطق گرم رشد می کند[۳]. این گیاهان نیاز رشدی زیادی ندارند و به راحتی تکثیر شده و رشد می کنند و می توانند به مدت کوتاهی به عنوان علف هرز در مزارع گسترش یابند[۷].

به دلیل آب و هوای گرم این ناحیه حشرات موذی خصوصا در تابستان مهمان ناخوانده مردم این منطقه اند. گزش حشرات شاید خطرناک نباشد اما اگرمحل گزش عفونی شود ممکن است جان فرد را تهدید کند. پژوهش های علمی نشان می دهد که عامل اغلب عفونت های پوستی و گلو درد چرکی باکتری استرپتوکوک است[۹] استرپتوکوک A یک گروه از باکتری های گرم مثبت است که به دلیل داشتن شکل کروی جزو کوکسی ها محسوب می شوند. آنها به شکل رشته ای و یا جفت جفت کنار هم قرار می گیرند. گلو درد چرکی نیز یک عفونت باکتریایی است که باعث التهاب و درد گلو می شود[۱]درکشورما دربین کودکان ۱۵٪بیشتر شایع است [۱۰].استفاده مناسب از آنتی بیوتیک می تواند به درمان عفونت منجر شود اما در مواردی تغییر خصوصیات باکتری ها به ایجاد مقاومت دارویی می انجامد و این امر باعث درمان ناقص گلودرد و افزایش عوارض آن می گردد[۱۱] و اگردرمان نشود زمینه آسیب به قلب و کلیه را فراهم می کند[۱۲]. امروزه با توجه به مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها استفاده از ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاهان به عنوان ترکیباتی طبیعی که اثر خوبی نیز دارند بیشتر مورد توجه است.

طبق تحقیقات اخیر ازمک در کاهش قندخون موشهای دیابتی موثر بوده[۴] و خاصیت ضدسرطانی داشته در تسکین درد [۵] و در درمان بیماری های گوارشی هم اثر دارد[۳]. دراین پژوهش برای اولین بار به بررسی تأثیرگیاه سوزی (ازمک) بر روی رشد باکتری استرپتوکوکA می پردازیم که می توان به جای آنتی بیوتیک ها از خاصیت ضد التهابی و التیام بخش فلاوونوئیدهای[۸] موجود دراین گیاه ، باکتری استرپتوکوک A را ازبین برد و در نتیجه التهاب پوستی ناشی از نیش حشرات و گلودرد چرکی را درمان کرد.

معرفی گیاه ازمک (سوزی):

شکل ظاهری :

گیاهی چند ساله و علفی که به خانواده شب بوها تعلق دارد. ساقه هوایی آن تا ۲۰ سانتی متر می رسد. برگ های قاعده ای واژ تخم مرغی و قاشقی و برگ های ساقه ای مستطیلی تا سر نیزه ای و ساقه آغوش هستند.(

تصویر شماره ۱) گل این گیاه ، خوشه ای متراکم و انتهایی است. طول گلبرگ ها ۲تا ۴ میلیمتر و رنگ آنها سفید است. دم میوه ۵ تا ۱۵ میلیمتر طول دارد و هر میوه محتوی۲ و به ندرت یک دانه است. این گیاه ریشه های قوی و طویل داشته، سرعت نمو آن زیاد است و هر سال ساقه ای قوی تولید می کند. تولید دانه نیز در این گیاه زیاد بوده گاهی به دو بار در سال می رسد.یک سطح بذر پهن و سطح دیگرش گرد است. بذرها دارای چهار زائده طویل بوده که زوائد کوچکتر بین آنها قرار دارند.

	گیاه سوزی (ازمک)
نام علمی	cardaria draba
خانواده	شب بوها
منطقه رشد	غرب آسیا

تصویر شماره ۱: شکل ظاهری گیاه سوزی(ازمک)

نحوه ی مصرف:

سوزی گیاهی خودرو است که علاقه مندان بسیاری دارد. در آبان و آذر بذر سوزی رویش نموده و تا اواسط دی ماه به مرحله ۸ الی ۱۰ برگی می رسد و قابل برداشت است .در این زمان مردم به مزارع رفته و بوته سوزی را با دست از ریشه در می آورند.پس از جمع آوری، برگهای تمیز شده را با آب شستشو داده تا خاک از آن شسته شود. آب را در دیگ بزرگ جوش آورده و در این مرحله سوزی را داخل آن ریخته و به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه به هم میزنند تا در اثر جوشش آب، برگها کاملا پخته و نرم گردد . بعد از این مرحله مخلوط سوزی وآب را از صافی عبور داده تا آب از برگهای پخته شده جدا شود، برگهای پخته شده را داخل ظرفی ریخته و با دست له می کنند تا برگ ها به شکل خمیر در آید، خمیر سوزی را با روغن مخلوط و سرخ می کنند .بعد از این مرحله خمیر آرد گندم را که آماده شد به صورت ورقه های دایره ای به قطر ۲۵ تا ۳۰سانتی متر در آورده وسپس مقداری از سوزی سرخ شده را روی آن پهن می کنند به نحوی که ضخامت لایه سوزی به یک سانتی متر برسد و حدود ۵ سانتی متر از حاشیه خمیر را بدون سوزی می گذارند که برای تا کردن آن می باشد و در نهایت پس از تا کردن به شکل مثلث در می آید که در اصطلاح محلی به آن بورک می گویند . البته سوزی سرخ شده را با همراه با نان و نیمرو هم مصرف می کنند.مشاهده شده که سوزی را به صورت خام نیز مصرف می کنند ،که البته خیلی کم دیده

شده است، ممکن است خام خوردن آن جاذبه نداشته باشد اما بطور قطع می توان گفت خام خوردن سوزی اثرات بهتری خواهد داشت چون در مراحل پختن بخشی از ویتامینها و مواد محلول در آب از بین می رود.

محیط رشد:

این گیاه ویژه مناطق گرم و نواحی آفتابگیر است و در خاک هایی با بافت سنگین و حاصلخیز خوب رشد می کند(جدول شماره ۱). ازمک از علف های هرز مزارع غلات، یونجه، سبزیجات و باغ ها بوده و علاوه بر این، آن را می توان به مقدار قابل توجهی در حاشیه ی جاده ها و زمین های بایر مشاهده کرد.

جدول شماره۱: محیط رشد گیاه سوزی

نور محیط	آبیاری و رطوبت	دمای مناسب محیط	خاک و تغذیه
زیاد	به میزان کم	گرم و نیمه گرم	خاک هایی با بافت سنگین و حاصلخیز

تکثیر:

تکثیر این گیاه از طریق کشت بذرها و نیز تقسیم بوته در بهار صورت می گیرد. این گیاهان نیاز رشدی زیادی ندارند و به راحتی تکثیر شده و رشد می کنند و می توانند به مدت کوتاهی به عنوان علف هرز در مزارع گسترش یابند.

خواص درمانی گیاه سوزی (ازمک):

این گیاه دارای خواص فراوان از جمله آهن است. شاید به همین دلیل است که به سوزی اسفناج صحرایی هم گفته می شود. به گفته کشاورزان بومی این منطقه سوزی یک نرم کننده ی سینه بی نظیر است. عصاره حاصل از برگهای گیاه سوزی در درمان ناراحتی های سیستم تنفسی مانند سرفه های سخت و دردناک کاربرد دارد بیشتر مصاحیه شوندگان بومی برای یکبار هم که شده از این گیاه در حل مشکلات تنفسی خود استفاده کرده بودند. این گیاه همچنین اشتهاآور است و برای افرادی که اضافه وزن دارند، توصیه نمی شود. تصفیه کننده خون، پاک کننده سینه از خلط و از بین برنده لکه های پوست صورت است و در درمان سریع زخمهای سطحی و درمان جای نیش حشرات مفید است. برخی از کشاورزان محلی داستان هایی را از زمان کودکی خود و چشیدن درد نیش حشرات و درمان آن با این گیاه به صورت ضماد روی جای نیش هنوز به خاطر داشتند.جوشانده ریشه آن نیز در درمان برخی

بیماری‌های پوستی و ناتوانی سیستم ادراری کاربرد دارد. برگ گیاه سوزی حاوی مقدار زیادی ویتامین C بوده و دارای خاصیت ضد باکتری و ضد انگلی نیز دارد.

روش کار:

در این پژوهش ابتدا با استفاده از اطلاعات مردمی و کتابخانه ای و با بهره گیری از مصاحبه و فیش برداری سعی شده است گیاه ازمک (سوزی) به خوبی معرفی و خواص آن تشریح شود. مصاحبه شوندگان ۲۰نفر از کشاورزان بومی منطقه سیستان هستند که هدف نهایی ارائه تصویری کلی از این گیاه دارویی و همچنین تاکید بر نقش آن در درمان بیماری است. سپس در مرحله دوم با استفاده از محیط آزمایشگاهی و با استفاده از روش انتشار دیسک ، تاثیر آنتی بیوتیک هایی مانند پنی سیلین و آزیترومایسین و همچنین عصاره این گیاه بر روی باکتری استرپتوکوک A و در نتیجه درمان بیماری گلودرد چرکی و جای نیش زخم حشرات بررسی می شود.

بحث :

از آنجا که اهالی بومی هر منطقه بهتر از هر کسی در باره گیاهان منطقه خود اطلاعات دارند و از نزدیک شاهد تاثیر این داروها بر روند درمان بیماری ها بوده اند، برای آگاهی از میزان اطلاعات آنها درباره خواص گیاه سوزی تعداد ۲۰نفر در این تحقیق مورد مصاحبه قرار گرفتند که درصد بیشتری از آنان را زنان عمدتا بیسواد یا کم سواد تشکیل می دادند و از آنجایی که اطلاعات و دانش افراد مسن و سالخورده روستایی درباره گیاهان دارویی بیشتر است، مصاحبه شوندگان از بین افراد بالای شصت سال انتخاب شده اند.

در جداول زیر میزان آگاهی مصاحبه شوندگان درباره خواص این گیاه و نحوه مصرف آن آمده است:

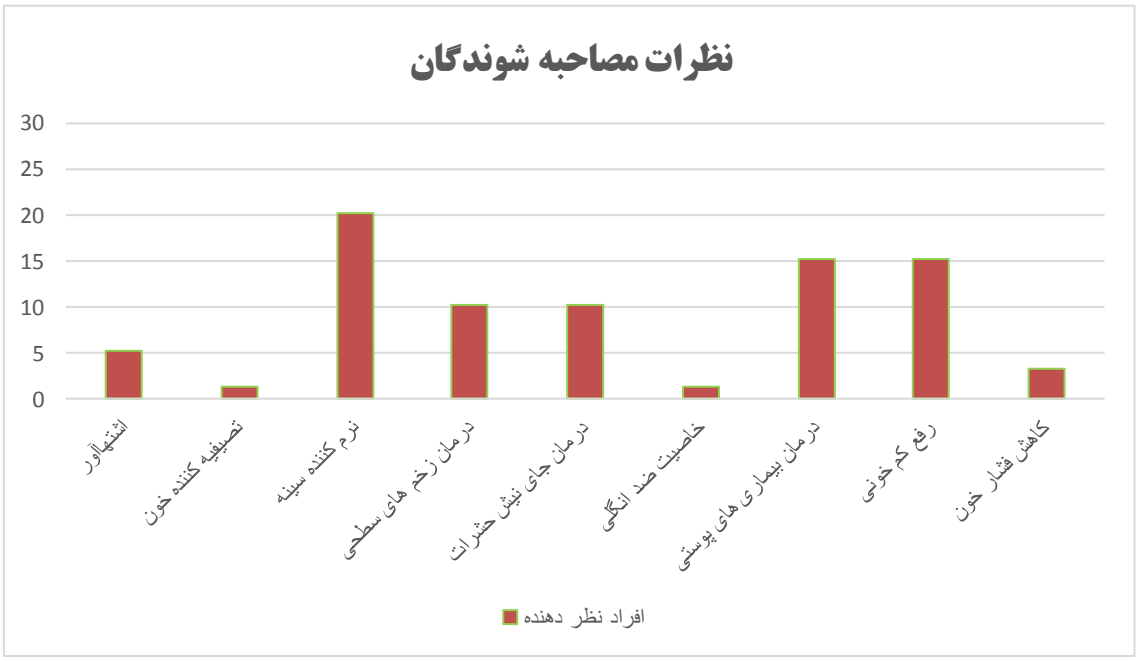
جدول شماره۲: کاربرد و خاصیت درمانی گیاه سوزی (ازمک)

کاربرد و خاصیت درمانی گیاه سوزی	تعداد مطلعین از این خاصیت از بین مصاحبه شوندگان (تعداد مصاحبه شوندگان ۲۰نفر)
اشتهاآور	۵
تصیفیه کننده خون	۱
نرم کننده سینه	۲۰
درمان زخم های سطحی	۱۰
درمان جای نیش حشرات	۱۰
خاصیت ضد انگلی	۱
درمان بیماری های پوستی	۱۵
رفع کم خونی	۱۵

جدول شماره۳: نحوه مصرف گیاه سوزی(ازمک)

نحوه مصرف گیاه سوزی	تعداد مصرف کنندگان
جوشانده	۱۵
سرخ کردن (برک)	۲۰
خام	۵

آمار فوق نشان می دهد مردم بومی این منطقه بیشتر از این گیاه برای رفع مشکلات تنفسی، کم خونی و درمان بیماریهای پوستی از آن استفاده می کنند(نمودار شماره ۱) و بیشتر آن را به صورت سرخ شده یا همان برک محلی استفاده می کنند.



(نمودار شماره ۱: نظرات مصاحبه شوندگان)

پس از آگاهی از خواص درمانی این گیاه ، نمونه ای از گیاه ازمک از روستاهای اطراف سیستان جمع آوری می شود و بعد از خشک کردن ، عملیات عصاره گیری به روش خیساندن با حلال اتانول ۷۰ درصد انجام می شود. به این ترتیب که در اتانول خیسانده شده و با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ شده و سپس عصاره را در DMSO دی متیل سولفوکسید حل می کنیم. سپس ۵۰میکرولیتر از عصاره را روی دیسکهای استریل اضافه و به مدت ۲ ساعت زمان می دهیم تا عصاره ها به طور کامل جذب دیسک های کاغذی شوند. سپس دیسک ها روی پلیت به فواصل مناسب قرار داده و نمونه ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد وانکوبه می کنیم. با استفاده از سوآپ استریل از لوزه ها و حفره های پشت آن از دو بیمار مبتلا به گلو درد چرکی و همچنین عفونت پوستی نمونه گرفته و به آزمایشگاه منتقل می‌شود . نمونه ها بلافاصله روی محیط آگار خون دار کشت داده شده و بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه، کلونی ظاهر می شود. سپس کلونی ها از نظر وجود کلونی های بتا همولیتیک یا همان گروه A بررسی می کنیم. بدین منظور آزمایش کاتالاز لازم است. آزمایش کاتالاز منفی می شود و مشخص می شود که کلونی فوق ، استرپتوکوک بتا همولیتیک یا همان گروه A است . در مرحله بعدی کلونی ها را روی محیط خون دار دیگری منتقل و در سطح محیط پخش می کنیم. و در وسط هر پلیت یک عدد از دیسک های آغشته به پنی سیلین و آزیترومایسین و عصاره ازمک قرار می دهیم. محیط های جدید در دمای ۳۷ درجه نگهداری شده و هاله های اطراف هر یک از دیسک ها اندازه گیری می شود. برای تفسیر نتایج هم از جدول استاندارد CLSI استفاده می کنیم.

الف: آگار خون دار ب) EMB

تصویر شماره ی ۲: محیط های کشت باکتری

نتایج آزمایش:

جدول شماره۴: میزان حساسیت باکتری استرپتوکوک A نسبت به پنی سیلین، آزیترومایسین و عصاره گیاه ازمک با استفاده از اندازه گیری قطر هاله عدم رشد براساس میلی متر

آنتی بیوتیک	فعالیت بسیار	فعالیت متوسط	غیر فعال
پنی سیلین	18 mm	-	-
آزیترومایسین	18 mm	-	-
عصاره گیاه ازمک	16 mm	-	-

درصورتی‌که قطر هاله عدم رشد برابر یا بیشتر از ۱۵ میلیمتر باشد فعالیت بسیار، قطر هاله عدم رشد بین ۱۰تا ۱۵ میلیمتر نشان دهنده فعالیت متوسط و قطر هاله عدم رشد کمتر از ۱۰ میلیمتر نشان دهنده غیرفعال بودن عصاره یا آنتی بیوتیک است.

تصویر شماره۳: اندازه گیری قطر هاله عدم رشد

قطر هاله عدم رشد پیرامون دیسک ها اندازه گیر ی شد. با رعایت استانداردهای پیشنهاد شده میزان تاثیرگیاه ازمک، پنی سیلین و آزیترومایسین بر باکتری مشخص گردید. نتایج حاصل از آزمایشات نشان می دهدکه این باکتری به عصاره ازمک ، پنی سیلین و آزیترومایسین حساس است.با توجه به مضرات استفاده از آنتی بیوتیک ها استفاده از گیاهان دارویی بیشتر متوجه است.

نتیجه گیری:

اهمیت بالای گیاهان دارویی و نقش آنها در سلامت انسان بر کسی پوشیده نیست به همین سبب بهره برداری از این ذخایر ارزشمند و انجام کارهای تحقیقاتی و سرمایه گذاری در زمینه افزایش سطح زیر کشت و تولید بیشتر می تواند نقطه قوت هر منطقه محسوب شود. منطقه سیستان نیز یکی از گنجینه های گیاهان دارویی کشور است .گیاه ازمک یا سوزی یکی از گیاهان محبوب این منطقه است. بر اساس نتایج بدست آمده میزان آگاهی مردم این منطقه درباره خواص این گیاه نشان از علاقه آنان در استفاده از گیاهان دارویی برای درمان است و این گیاه علاوه بر طعم بی نظیر و قرار گرفتن در سبد غذایی مردمان این سرزمین می تواند بعنوان دارویی موثر در درمان بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری گلودرد چرکی و درمان جای زخم نیش حشرات باشد. ازمک منبع غنی از گلوکورافانین محسوب می شود. گلوکورافانین موجود در این گیاه تحت تاثیر آنزیم میروزیناز سولفورفان تولید می کند {۶} که خاصیت ضد باکتریایی دارد بدین ترتیب باکتری استرپتوکوک از بین می رود.

همچنین اثرات ضد التهابی و التیام بخش فلاوونوئیدهای{۸} موجود درگیاه در درمان التهاب پوستی نیش حشرات بسیار موثر است که تفسیر نتایج آزمایشگاهی نیز به خوبی حساسیت این باکتری را به عصاره گیاه سوزی را نشان داد. هرچند این دو بیماری می تواند با استفاده از آنتی بیوتیک ها درمان شود اما با توجه به عوارض استفاده مکرر از این داروها خصوصا در کودکان با توجه به شیوع بالای این بیماری خصوصا گلو درد چرکی در این گروه سنی ، پیدا کردن راهی با عوارض کمتر برای درمان بیماری ها بیشتر متوجه است.بنابراین با توجه بیشتر و سرمایه گذاری در تولید این گیاه دارویی و بهره وری علمی از آن می توان تا حدی به یکی از معضلات مردم استان یعنی اشتغال کمک کرد.

منابع

[1] Cunningham MW: Pathogenesis of group A streptococcal infection. Clinical Microbiology Reviews 2000; 13:470-511.

۲- کهن طب جمشید, پنجه شاهین محمدرضا, صادقی اسماعیل, طباطبایی سیدحمیدرضا،۱۳۸۳، تعیین الگوی حساسیت میکروب استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A نسبت به برخی از آنتی بیوتیک ها در بین مبتلایان به عفونت های استرپتوکوکی، مجله تحقیقات پزشکی، دوره۲،شماره۳. صص۲۶ -۱۵

۳- قطب زاده کرمانی سپیده، ,پورسیدی شهرام,محمدی غلامعباس,معینی احمد,باقی زاده امین ، باززایی گیاه ازمک از طریق کشت بافت.مجله بیوتکنولوژی کشاورزی،بهار ۱۳۹۴, دوره ۷ , شماره ۱ ،ص۱۳۳

۴-شهرکی، علی و میری، عبدالحسین و ملاشاهی، علی،۱۳۹۵،بررسی اثر عصاره گیاه CARDARIA DRABAبر قند خون موشهای صحرایی،اولین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی،زاهدان،

۵-میری،عبدالحسین،شهرکی، علی ،۱۳۹۴، بررسی اثرات ضددرد و ضد التهابی عصاره هیدرو الکلی دانه گیاه ازمک بر روی موش سوری، کنفرانس بین المللی پژوهش در علوم و تکنولوژی

۶- رضایی، فاطمه. لاهوتی، مهرداد.ملکی، محمود.گنجعلی، علی،۱۳۹۷، تغییرات محتوای سولفورافان و فعالیت برخی از آنزیم های آنتی اکسیدان گیاهچه های ازمک در پاسخ به جاسمونات، فرایند و کارکرد گیاهی ،جلد ۷،شماره ۲۶،صص ۵۵-۴۵

۷-افغانی، اسلامی،سیدوحید ،۱۳۹۰، اثر شرایط محیطی بر جوانه زنی و ذخیره سازی بذرهای ازمک در خاک، دوره ۴۲،شماره۲ ،۲۷۴صص -۲۶۵

۸- امنیپور،حسن. مشهدی، مهدی (۱۳۹۹) فلاونوئیدها، عواملی اثربخش در محافظت از پرتوها، مجله علوم پزشکی رازی، دوره ۲۷،شماره ۱، فروردین۱۳۹۹

۹- اسلامی،گیتا. طاهری، سودابه، نعلچی، فائزه(۱۳۹۱) بررسی باکتریهای ایجاد کننده عفونتهای جلدی و الگوی مقاومت آنتیبیوتیکی آنها در مراجعین به بیمارستانهای شهدا و لقمان در سال ۱۳۹۰-۱۳۸۹ مجله پژوهش در پزشکی، دوره ۳۶ ،شماره ۴ ،زمستان ۱۳۹۱ صص.۲۱۰-۲۰۵

۱۰-شکیبا ، مهرداد . برکاتی ،منیر سادات،۱۳۸۱، ارزش تشخیصی علایم بالینی در درمان فارنژیت استرپتو کوک ، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، سال شماره ۲ ، تابستان ۱۳۸۱ ص ۵۲

۱۱-محسنی مقدم، فاطمه. شهیدی زرندی، بهروز.شعبانی شهربابک، زیبا ۱۳۹۲ ،مقاومت آنتیبیوتیکی استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A در کودکان حامل بدون علامت در شهرستان رفسنجان در سال ۱۳۸۸، مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ،دوره ۱۲،تیر۱۳۹۲ ،صص۲۹۸-۲۹۱

۱۲- معتمدی،بتول.یاسمی،محمدتقی،۱۳۷۸، آگاهی مادران از علائم، پیشگیری، مراقبتهای درمانی و عوارض گلودرد چرکی کودکان،مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان.جلد۸،شماره ۲۹و ۳۰،صص۴۹-۴۱

۱۳- ریاحی مدار علی, قاضی زاده احسایی مهشید,جدیدبنیاد فرشته,رضایی فرشته ، محتوای سولفورافان و بیان ژن های میروزیناز در گیاهچه های تیمار شده ازمک با غلظت های مختلف اکسید روی ،مجله بیوتکنولوژی کشاورزی شماره: پاییز ۱۳۹۸ , دوره ۱۱ , شماره ۳. ص۴۰

۱۴- محمدی مهدی، ریاحی مدار علی، پورسیدی شهرام، امینی زاده مریم (۱۳۹۵) بررسی اثر یونهای مس و روی بر تشکیل سولفورافان در گیاه ازمک، مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۸، ۱ ،صص ۸۱-۹۴

۱۵-یوسفی، کبری، پالایش یون مس توسط گیاه ازمک، اولین همایش ملی گیاه پالایی ۱۵،۱۳۹۰

۱۶ - فدائی، فاطمه و صندوقداران، حسین(۱۳۹۲) جمع آوری و شناسایی برخی گونه های گیاهان دارویی در استان سیستان و بلوچستان،اولین همایش منطقه ای گیاهان دارویی شمال کشور،گرگان.

۱۷- گنجعلی، علیرضا و خاک سفیدی ،عباس (۱۳۹۴) شناسایی برخی گونه های گیاهان داروئی شهرستان زابل مجلّه ی طب سنّتی اسلام و ایران، سال۶، شماره ۱، بهار

۱۸-دیانت ، مرجان و حسینی ، سید میثم،(۱۳۹۴) تغییرات مورفولوژیکی جمعیت‌های ازمک در ایران مجله پژوهش های گیاهی، شماره۱، دوره ۳۰، صص۹۸-۸۵

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی اثر سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی بر بازسازی جزایر لانگرهانس پانکراس در رت های دیابتی

زینب حاجی زاده[1*]، سیدحسام الدین حجازی [2]،مسعود علیرضایی[3]، امید دزفولیان[4]

۱. دانشجوی بیوشیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه لرستان،
hajizadeh1671@gmail.com
۲. استادیارگروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه لرستان،hejazi.h@lu.ac.ir
۳. دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان،alirezaei_m@lu.ac.ir
۴ . دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان،dezfoulian.o@lu.ac.ir

چکیده

دیابت شیرین (DM) یک اختلال متابولیکی مزمن است که با افزایش قند خون به دلیل آسیب یا نقص سلول های بتا پانکراس تعریف می شود. سلول های بتای بالغ که در جزایر لانگرهانس پانکراس وجود دارند، مسئول ترشح انسولین هستند. در دیابت نوع دو مانند دیابت نوع یک کاهش جرم سلول های بتا وجود دارد. اخیراً سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از بافت‌های بزرگسال مختلف به دست می آیند، به‌عنوان یک درمان امیدبخش برای دیابت توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. این سلول‌های بنیادی قابلیت تمایز به سلول‌های شبه انسولینی مانند، جزایر (IPCS)، جهت تحریک بازسازی سلول‌های بتای جزایر پانکراس را داشته و از طریق مکانیسم‌های تعدیل‌کننده ایمنی سلول های بتای جزایر داخلی پانکراس را از آپوپتوز محافظت می نمایند. در این مطالعه تجربی پس از استخراج آنزیمی سلولهای بنیادی مزانشیمی از بافت چربی رت و تعیین هویت سلول های استخراج شده به روش فلوسایتومتری، این سلول ها به موش های دیابتی شده با استرپتوزوسین(که به طور اختصاصی سلول های بتای جزایر لانگر هانس را سرکوب می کند) تزریق شده وسپس بافت پانکراس موش های دیابتی شده، کنترل و موش های دیابتی تحت درمان با سلولهای بنیادی را برداشته و توسط رنگ هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی شد و جزایر لانگرهانس آنها با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس یافته های این مطالعه، درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی باعث بازسازی و ترمیم جزایرلانگرهانس آسیب دیده در موش های صحرایی دیابتی می شود.

کلمات کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، دیابت، استخراج آنزیمی، جزایر لانگر هانس

Investigating the effect of mesenchymal stem cells extracted from adipose tissue on the regeneration of pancreatic islets of Langerhans in diabetic rats

Zeinab hajiazdeh[1]*, seyed hesamaldin hejazi[2], masoud alirezaei[3], omid dezfolian[4]

1-under graduate student biochemistry at lorestan university, hajizadeh1671@gmail.com

2-Assistant professor, department of Biology, faculty of Basic Sciences, Lorestan University, hejazi.h@gmail.com

3-Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Veterinary medicine, Lorestan University, alirezaei_m@lu.ac.ir

4-Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, dezfoulian.o@lu.ac.ir

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder defined by elevated blood sugar due to damage or malfunction of pancreatic beta cells. The mature beta cells present in the islets of Langerhans of the pancreas are responsible for insulin secretion. In type 2 diabetes, as in type 1 diabetes, there is a decrease in the mass of beta cells. Recently, MSCs derived from various adult tissues have attracted much attention as a promising treatment for diabetes These stem cells have the ability to differentiate into insulin-producing cells (IPCS), to stimulate the regeneration of pancreatic islet beta cells, and protect internal pancreatic islet beta cells from apoptosis through immunomodulatory mechanisms. In this experimental study, after enzymatic extraction of mesenchymal stem cells from rat adipose tissue and determining the identity of the extracted cells by flow cytometry, these cells were injected into diabetic rats with streptozocin (which specifically suppresses the cells of the beta islets of Langerhans). The pancreatic tissue of the diabetic mice under treatment with stem cells was compared to control diabetic mice and healthy mice, and stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope. Based on the findings of this study, treatment with mesenchymal stem cells leads to the regeneration and repair of damaged Langerhans islands in diabetic rats.

Keywords: stem cells, diabetes, enzyme extraction, Islets of Langerhans

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیک در سراسر جهان می‌باشد که با توجه به ماهیت چند عاملی بیماری، عوامل مختلفی در آن نقش دارند[1]. این بیماری به علت اختلال در ترشح یا مقاومت به انسولین به وجود می اید و در هردو حالت موجب هیپر گلیسمی وگلیکوزوری می شود. سلول های بتای بالغ که در جزایر لانگرهانس پانکراس هستند مسئول ترشح انسولین هستند[2].مکانیسم تخریب سلول های بتا در دیابت نوع یک نتیجه بیماری خودایمنی و خودالتهابی می باشد[3]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل اهمیت بیولوژیکی و کاربردهای بالینی بسیار با اهمیت هستند.این سلول ها دارای ویژگی‌های متمایزی مانند: سهولت در جداسازی و کشت، امن بودن و عدم امکان تغییر به شکل بدخیم پلاستی‌سیتی، استروپی‌ذاتی نسبت به منطقه آسیب دیده هستند. آن‌ها همچنین دارای فعالیت ضد التهابی و ضد آپوپتوز در بافت‌های آسیب دیده بوده و می‌توانند سلول‌های بنیادی ساکن دیگر را فعال کرده و نئوآنژیوژنز را تحریک کنند[4]. این سلول ها همچنین فاکتورهای مختلف رشد محلول و سایتوکاین‌هایی را ترشح می‌کنند که مانند غدد درون ریز و پاراکرین عمل می‌کنند، بنابراین سلول های مناسبی برای استفاده در مطالعات مرتبط با ژن درمانی، سلول درمانی و مهندسی بافت در نظر گرفته می‌شوند.[5] در این مقاله به بررسی اثر سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی بربازسازی و ترمیم جزایر لانگرهانس، در موش های صحرایی پرداخته شده است.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت ASCs

سه سر موش صحرایی نر سالم و بالغ آلبینو ویستار با میانگین وزنی ۲۰±۲۸۰ گرم و سن ۱۴ هفته از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شدند. رت ها با تزریق صفاقی دوز بالای کتامین- زایلازین قربانی شدند. چربی های هر دو سمت اپی دیدیم برداشته شد. به‌منظور هضم آنزیمی بافت چربی از آنزیم کلاژناز تیپ I استفاده و بافت چربی به مدت ۷۵min در ۳۷ C° انکوبه شد. سوسپانسیون از سل استرینر ۱۰۰ µm عبور داده شد و سه بار با دور ۱۵۰۰RPM برای ۵ min سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در۲ ml محیط کشت DMEM High Glucose همراه با fetal bovine serum10% و ۱٪ penicillin-streptomycin حل کرده و سوسپانسیون سلولی به فلاسک های T25 منتقل شد. فلاسک‌ها در انکوباتور۳۷ C° ، رطوبت ۹۵% و CO2 ۵% قرارداده شدند. بعد از گذشت ۷ روز سلول ها ۹۰ درصد کف هر فلاسک را فراگرفتند. به هر فلاسک ۰/۵ ml آنزیم Tripsin / EDTA 0/25% افزوده و فلاسک‌ها به مدت ۴ min -۳ درون انکوباتور۳۷ C° قرار گرفتند و سپس پاساژ داده شدند. سلول ها پس از پاساژ اول برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین هویت سلول های استخراج شده از بافت چربی

علاوه بر ظاهر کشیده و فیبروبلاست مانند سلول های کشت شده که خود تاییدی بر مزانشیمی بودن سلول ها بود، پس از گذشت ده روز و رسیدن سلول های کشت شده به تراکم مناسب، سلول ها با آنزیم Tripsin /EDTA ۲۵ درصد جداسازی و فلوسایتومتری شدند و بنیادی بودن سلول های استخراج شده تایید شد.(اشکال ۱،۲،۳)

گروه بندی حیوانات و القاء دیابت

۲۴ سر موش صحرایی نر سالم و بالغ آلبینو ویستار با میانگین وزنی ۲۰ ±۲۵۰ گرم و سن ۱۲ هفته از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شدند. موش های صحرایی در اتاق استریل مجزا از سایر حیوانات در دمای ۱ ±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و سیکل منظم ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان نگهداری شدند.

برای ایجاد مدل دیابت ، مقدار mg/kg ۵۰ وزن بدن استرپتوزوسین ، بعد از ۱۲ ساعت ناشتا به‌صورت تک‌دوز و داخل صفاقی به ۱۶سر موش صحرایی گروه های دیابتی ، دیابتی تحت درمان با ASCs تزریق شد .بعد از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق استرپتوزوسین از قسمت انتهایی دم، قند خون موش‌های صحرایی بعد از ۱۲ ساعت ناشتا توسط دستگاه گلوکومتر سنجیده و موش‌های صحرایی با قند خون بالای mg/dl ۲۵۰ به‌عنوان موش صحرایی دیابتی تأیید شدند. علائم پرنوشی و پرادراری وهمچنین قند خون را در روزهای چهارم وپنجم نیز بررسی کرده و با توجه به اینکه موش ها همچنان قند بالای 250mg/kg را داشتند دیابتی محسوب شدند..موش ها به سه گروه هشت تایی تقسیم و از روز ششم تا بیستم به مدت ۱۵ روز درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انجام شد. موش ها به شرح زیر تقسیم بندی شدند:

۱-گروه کنترل بدون ایجاد بیماری و دریافت روزانه ۱سی سی آب مقطر به مدت ۱۵ روز

۲-گروه دیابتی بدون درمان و دریافت روزانه ۱سی سی آب مقطر به مدت ۱۵ روز

۳-گروه دیابت + تزریق وریدی(ورید دمی) تک دوز یک و نیم میلیون سلول مزانشیمی مشتق از بافت چربی در روز ششم

برداشت نمونه بافت پانکراس

در روز۲۱ درپایان آزمایش تمام موش ها با دریافت دز بالای کتامین- زایلازین قربانی و سپس نمونه بافت پانکراس آنها برداشته شد بافت پانکراس برای بررسی پاتولوژی بافت جدا و سپس رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین انجام شد. نمونه ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند و بافت های پانکراس از لحاظ مورفولوژی جزایرلانگرهانس و میزان ترمیم و بازسازی آنها در گروه های مختلف موردبررسی قرار گرفتند.

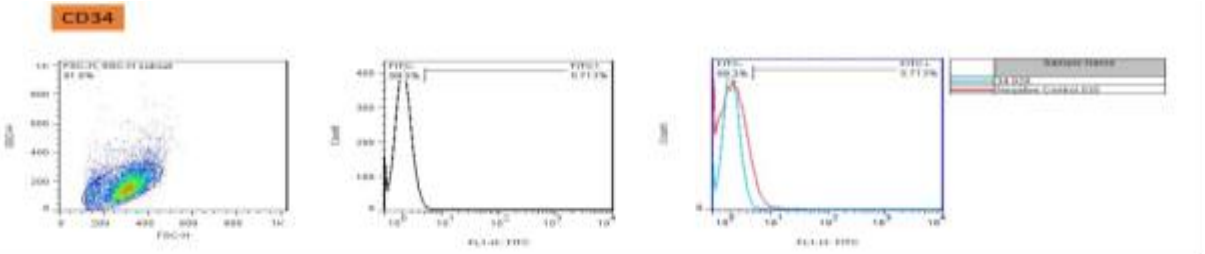
رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین(H& E)

ابتدا بافتها توسط آب مقطر شستوشو شده و سپس به سه ظرف حاوی اتانول ۷۰ ، ۸۰ و ۹۶ درصد و دو ظرف اتانول مطلق منتقل شدند. بافتها ۲ ساعت در هر ظرف قرار گرفتند. برای الکل گیری و شفاف کردن بافت از گزیلل با مقدار ۱۰۰ _ ۵۰ برابر حجم نمونه استفاده شد. بافت های جدا شده بر اساس پروتکل رنگ آمیزی هماتوکسیلین / آئوزین رنگ آمیزی شدند.پس از پایان رنگ آمیزی، اسلایدهای موجود توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

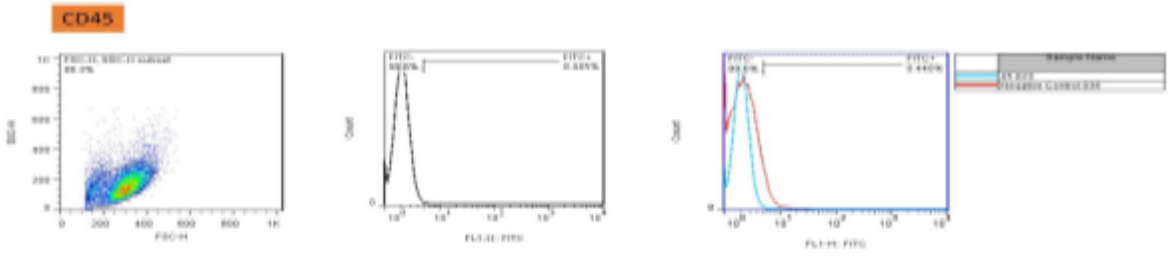
نتایج و بحث:

❖ **تعیین هویت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به روش فلوسایتومتری:**

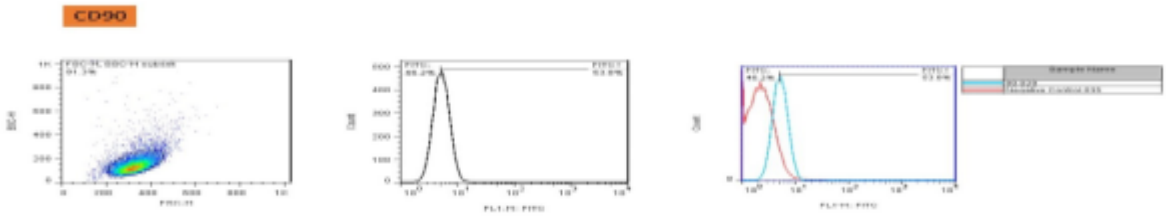
در این پژوهش فلوسایتومتری برای بررسی ۳ نشانگر سطحی به صورت سه تکرار برای هر نشانگر، انجام گرفت. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی اختصاصی سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی موش صحرایی حاصل از پاساژ اول، برای نشانگرCD 34 برای سه تکرار به ترتیب ۷۱۳ / ۰ درصد، ۷۲ / ۴ درصد و ۰۷ / ۶ درصد، برای سه تکرار نشانگر CD45، ۴۴۵ /۰ درصد، ۲۹۴ / ۰ درصد و ۴۳۶ / ۰درصد، برای سه تکرار نشانگر CD90، ۹ /۹۵ درصد، ۴ / ۹۲ درصد و ۸ / ۵۳ درصد و در نهایت برای سه تکرار نشانگر CD۱۰۵ ، ۹ /۹۲ درصد، ۶ / ۷۵ درصدو ۶ / ۶۴ درصد بود.



شکل ۱- نمودارهای فلوسایتومتری نشانگر سطحی $CD34^-$

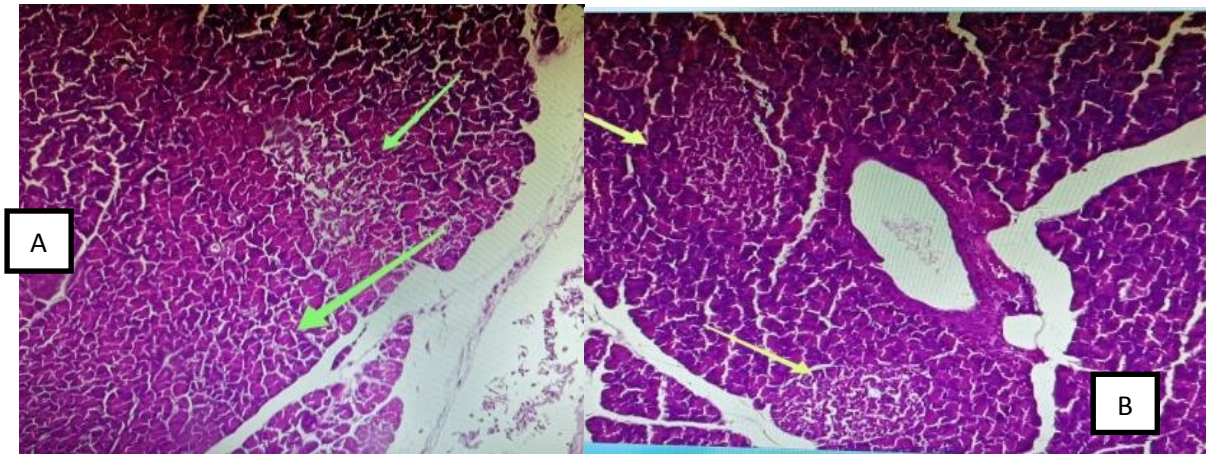


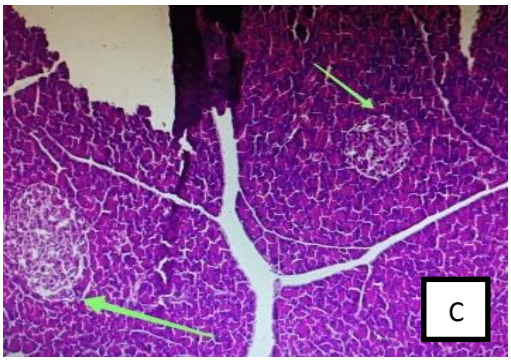
شکل ۲: نمودارهای فلوسایتومتری نشانگرسطحی $CD45^-$



شکل۳:نمودارهای فلوسایتومتری نشانگرسطحی $CD90^{+}$

بررسی بافت های رنگ آمیزی شده در گروه کنترل، دیابتی،دیابتی تحت درمان با سلول :





شکل ۴. A گروه کنترل ، B گروه دیابتی ، C گروه تحت درمان با سلول های بنیادی

از دهه۱۹۷۰برای تولید سلول های ترشح کننده انسولین، تلاش بسیار زیادی شده است.پیوند پانکراس تولید انسولین و کنترل قند خون را در افراد دیابتی بهبود می بخشد اما این کار درمان قطعی نخواهد بود ضمن اینکه پیوند پانکراس ممکن است توسط سیستم ایمنی و یا خود ایمنی رد شود[6]. یکی از راه کارهای درمانی بالقوه برای درمان دیابت استفاده از سلول های بنیادی و جایگزینی سلول ها می باشد. [7]. از روش های بررسی اثر سلول های بنیادی بر بافت آسیب دیده این است که این سلول ها از بدن خود فرد (پیوند اتولوگ) و یا بدن فرد دیگر (پیوند الوگرافت) گرفته شده و این سلول ها به صورت تزریق سیستمیک، به داخل جریان خون وارد شوند. فرض بر آن است که این سلول ها پس بعد از ورود به جریان خون از جدار عروق عبور کرده و وارد بافت صدمه دیده می شوند(Homing). سلول های پیوندی تحت تاثیر ریز محیط (Nich) جدید خود در ارگان آسیب دیده به سلول های بافت مورد نظر تمایز می یابند و در نهایت از لحاظ ساختاری و عملکردی جایگزین بافت صدمه دیده می شوند[9,8]. در این مطالعه با تزریق سلول های بنیادی اتولوگ به رت های دیابتی بعد از اتمام دوره درمان بافت پانکراس آنها به منظور بررسی جزایر لانگرهانس به عنوان کانون تولید انسولین، جداسازی و رنگ آمیزی شد. با بررسی جزایر لانگرهانس بافت پانکراس، مشخص شدکه در گروه دیابتی (شکل B) جزایر لانگرهانس به دلیل بیماری دیابت و اثرات آن آسیب دیده، و همانطور که در تصاویر مشخص است سلول ها از هم گسیخته شدند و جزایر لانگرهانس کاملا دچار آتروفی و دچار دژنراسیون و حتی دچار نکروز شده اند و از هم گسیختگی سلول ها نسبت به همدیگر کاملا مشهود است. فضای تو خالی هم در فضای جزایر ایجاد شده است، در صورتی که در گروه کنترل (شکلA) جزایر لانگرهانس کاملا نرمال هستند، اندازه جزایر طبیعی و سلول ها کاملا یکدست و یکنواخت دیده می شوند. در گروه تحت درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی(شکل C) مجددا جزایر لانگرهانس به حالت طبیعی درآمده اند، سلولها کاملا بازیافت شده و کیفیت این جزایر و سلول ها کاملا قابل تامل و قابل ملاحظه است و نشان دهنده این است که عملکرد سلول در پانکراس دچار دیابت موثر بوده و نتایج خود را برجای گذاشته است. بنابراین سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی می توانند به عنوان یک گزینه درمانی در بازسازی جزایر لانگرهانس جهت درمان و یا کنترل دیابت مورد استفاده قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه و پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی گروه زیست شناسی دانشکده علوم و دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه لرستان به انجام رسید بدین وسیله از ریاست محترم دانشکده و همچنین راهنمایی های اساتید راهنما و مشاورکمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1- Sharma A, Ezekowitz JA. Diabetes, impaired fasting glucose, and heart failure: it's not all about the sugar.Euro J heart failure 2014; 16(11): 1153-56.

2- Mimeault M, Batra SK. Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research:therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer. Gut.2008; 57(10): 1456-68.

3- Hsueh WA, Law RE. Cardiovascular riskcontinuum: Implications of insulin resistance and diabetes. Am J Med 1998; 105:4S–14S.

4- Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. EurCell Mater 2010;20:121-33.

5- Nichol JW, Khademhosseini A. Modular Tissue Engineering: Engineering Biological Tissues from the Bottom Up. Soft Matter2009;5(7):1312-9.

6- X. Liu, Y. Wang,Y. Li, andX. Pei, “Research status and prospect of stem cells in the treatment of diabetesmellitus,” Science China Life Sciences, vol. 56, no. 4, pp. 306–312, 2013.

7- Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stemcells: isolation, characterization and applications in surgery. ANZ J Surg 2009;79(4):235-44.

8- Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. Stem Cells Dev 2011;20(8):1297-308.

9- G. Yanai, T. Hayashi, Q. Zhi et al., “Electrofusion ofmesenchymal stem cells and islet cells for diabetes therapy: a rat model, PLoS ONE, vol. 8, no. 5,Article ID e64499, 2013.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

تولید رنگدانه قرمز موناسکوس پورپورئوس در بیوراکتور بسترآکنده آزمایشگاهی

زهرا خزائیلی[۱]، پریسا حجازی[۲*]
۱.دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، گرایش بیوتکنولوژی دانشگاه علم و صنعت ایران
۲. دانشیار دانشکده مهندسی شیمی، گرایش بیوتکنولوژی، دانشگاه علم و صنعت ایران
*phejazi@iust.ac.ir

چکیده

رنگ‌ها به طور گسترده در صنایع غذایی، دارویی و نساجی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بدلیل احتمال محدودیت‌های استفاده از رنگدانه های مصنوعی، رنگدانه های طبیعی به عنوان جایگزین در حال توسعه است. میکروارگانیسم ها یکی از بهترین منابع طبیعی تولید رنگ هستند. قارچ *موناسکوس پورپورئوس* یکی از گونه های مولد رنگدانه است که قابلیت تولید بیشترین میزان تولید رنگدانه را با استفاده تخمیر حالت جامد در محیط کشت حاوی نشاسته دارد. در این پژوهش، از پوسته‌ی سیب زمینی خشک شده به عنوان محیط کشت این قارچ استفاده شد. پس از افزودن محیط کشت نمکی مناسب به سوبسترای خشک و خرد شده و مایه تلقیح، تاثیر دو متغیر رطوبت اولیه سوبسترا و سرعت هوادهی هریک در دو سطح به ترتیب ۵۵ و ۶۰ درصد و ۶ و ۸ لیتر بر ساعت بر میزان تولید رنگدانه مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین رشد در هوادهی کمتر و بیشترین تولید رنگدانه در رطوبت کمتر مشاهده شد. مطابق با این پژوهش شرایط بهینه‌ی تولید رنگ، رطوبت ۵۵ درصد و هوادهی با جریان ۶ لیتر بر ساعت می باشد.

کلمات کلیدی: رنگدانه میکروبی؛ قارچ *موناسکوس پورپورئوس*؛ بیوراکتور بسترآکنده؛ هوادهی؛ رطوبت سوبسترا

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Production of *Monascus purpureus* red pigment in a lab-scale packed-bed bioreactor

Zahra Khazaeli[1], Parisa Hejazi[2*]

[1] MSc student in biotechnology engineering, Iran University of Science and Technology
[2] Associate Professor of Biotechnology, School of Chemical, Petroleum, Gas Engineering, Iran University of Science and Technology

*phejazi@iusst.ac.ir

Abstract

Pigments are widely used in food, pharmaceutical and textile industries. Due to the possible limitations of using synthetic pigments, natural pigments are being developed as alternatives. Microorganisms are one of the best natural sources of pigments production. *Monascus purpureus* fungus is one of the pigment-producing species that has the ability to produce the highest amount of pigment production by using solid state fermentation in a starchy substrate. In this research, dried potato peels was used as the substrate for this fungus. After adding suitable saline culture medium to the dry and crushed substrate and inoculation, the effect of two variables of initial substrate moisture content (55 and 60%) and aeration rate (6 and 8 L/h) on the amount of pigment production was investigated. The highest growth was observed in lower aeration and the highest pigment production was observed in lower initial substrate moisture. According to this research, the optimal conditions for color production are humidity of 55% and aeration with a flow of 6 liters per hour.

Key words: Microbial pigment; *Monascus purpureus* fungus; Packed-bed bioreactor; Aeration; Substrate moisture

مقدمه

رنگدانه‌ها به طور گسترده در نوشیدنی‌ها، لوازم آرایشی، دارویی و شیرینی‌جات مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین به عنوان افزودنی برای حفظ یا بهبود مواد غذایی و همچنین به عنوان نگه دارنده استفاده می‌شوند. رنگدانه‌های مورد استفاده در صنایع غذایی و سایر صنایع رنگدانه‌های مصنوعی هستند. مصرف رنگدانه‌های مصنوعی در طولانی مدت به خصوص برای کودکان مضر است. همچنین رنگدانه های مصنوعی دارای پتانسیل سرطان‌زایی و حساسیت‌زایی هستند. به همین سبب جایگزینی رنگدانه های طبیعی به جای رنگدانه های مصنوعی در حال توسعه است و بنابراین تقاضای بازار برای رنگدانه های طبیعی در آینده بسیار زیاد است [۱].

رنگدانه های طبیعی از سه منبع میکروبی، گیاهی و جانوری تامین می شوند [۲]. در مقایسه با رنگ های استخراج شده از گیاهان و حیوانات، میکروارگانیسم ها، منبع جذاب تری هستند. زیرا صرفه نظر از ایمن بودن آن ها، محدودیت فصلی ندارند و می توانند رنگ را در مقادیر زیادی تولید کنند. همچنین شرایط استفاده از این رنگ ها مطلوب تر است. همچنین تولید رنگدانه از میکروارگانیسم ها با توجه به رشد سریع و آسان، محیط کشت ارزان، استخراج راحت‌تر، عدم وابستگی به شرایط جوی و گستردگی تنوع رنگ بیشتر نسبت به سایر منابع زیستی، دارای مزایای بیشتری است [۳]. در میان بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، قارچ ها نقش بسیار مهمی در تولید رنگدانه ایفا می کنند. علاوه بر این، گزارش شده است که قارچ ها، مقدار رنگدانه‌ی بیشتری تولید می‌کنند.

افزایش تقاضا، منابع محدود و معایب مختلف مربوط به رنگدانه‌های طبیعی مجاز مانند در دسترس بودن، محدودیت در طول سال، بی‌ثباتی در برابر نور، گرما و pH نامطلوب، تغییر در استخراج رنگدانه و حلالیت کم در آب، تحقیقات جدیدی را در زمینه پایدار می‌طلبد [۴].

امروزه قارچها به عنوان منبع رنگ‌های طبیعی به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند. قارچها متابولیت‌های اولیه زیادی تولید می‌کنند که برای متابولیسم خود نیاز دارند و در شرایط سخت محیطی متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که از متابولیت‌های ثانویه می‌توان به اسیدهای آلی، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها و سایر افزودنی‌های غذایی اشاره کرد [۵]. رنگدانه‌های قارچی، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که گاهی به دلیل کمبود مواد غذایی، تولید می شوند. هنگامی که تغذیه از مواد مغذی ضروری کاهش می‌یابد و یا شرایط محیطی نامطلوب ایجاد می‌شود، میسلیوم‌ها، متابولیت های ثانویه تولید می کنند [۶].

یکی از قارچ‌های تولید کننده‌ی رنگدانه، سویه‌ی *موناسکوس پورپورئوس*[1] است. رنگدانه‌های تولید شده از *موناسکوس* حداقل به شش نوع رنگدانه طبقه‌بندی می‌شوند. رنگدانه قرمز با نام‌های روبروپونکتامین ($C_{21}H_{26}NO_4$) و موناسکوروبرامین ($C_{23}H_{27}NO_4$)، رنگدانه نارنجی با نام‌های روبروپونکتاتین ($C_{21}H_{22}O_5$) و موناسکوروبرین ($C_{23}H_{26}O_5$) و رنگدانه زرد با نام-های موناسین ($C_{21}H_{26}O_5$) و آنکافلاوین ($C_{23}H_{30}O_5$) می‌باشند [۷]. مهم‌ترین رنگدانه‌ی شناخته شده *موناسکوس*، رنگ قرمز است. رنگدانه‌های زرد و نارنجی از محصولات جانبی تولید شده توسط این قارچ هستند [۲].

موناسکوس پورپورئوس می‌تواند روی مواد حاوی نشاسته کشت شود. به طور کلی، بیشترین بستر مورد استفاده برای تولید رنگدانه توسط موناسکوس شامل گلوکز، نشاسته و برنج است [۲]. در حال حاضر شناخته شده‌ترین منبع کربن مورد استفاده برای تولید رنگدانه از قارچ موناسکوس، برنج است [۱]. با این حال، برنج تخمیر شده *موناسکوس* حاوی سیترینین[2] است. تولید سیترینین همراه با رنگدانه‌ها، استفاده از موناسکوس را به عنوان تولیدکننده رنگ‌های طبیعی غذایی محدود می‌کند [۸]. همچنین از آنجایی که برنج غذای اصلی مردم است در بسیاری از موارد، استفاده از برنج برای تولید رنگدانه به صرفه

[1] *Monascus purpureus*
[2] Citrinin

نیست [۱]. در عین حال استفاده از گلوکز و نشاسته در مقیاس بزرگ هزینه بالایی دارد [۲]. در نتیجه برای تولید اقتصادی‌تر رنگدانه، از محصولات جانبی تولید شده در صنایع کشاورزی و صنایع غذایی به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود [۱]. محصولات جانبی کشت و صنعت اغلب به عنوان ضایعات در نظر گرفته و دور ریخته می‌شوند، که می تواند باعث ایجاد آلودگی محیط زیست و اتلاف منابع شود. درنتیجه استفاده از محصولات جانبی کشت و صنعت برای تولید متابولیت‌های با ارزش، می تواند باعث کاهش هزینه‌ها و آلودگی محیط زیست شود [۲]. سیب زمینی، به عنوان یکی از اصلی‌ترین محصولات غذایی، به طور گسترده در جهان کاشته می شود [۱]. در ایران، تولید سالانه سیب زمینی حدود ۵/۵ میلیون تن است. در کارخانه‌های تولید چیپس سیب زمینی، در طول برش سیب زمینی به برش‌های گرد نازک، مقدار زیادی سیب زمینی با اندازه و شکل نامناسب تولید می‌شود. این تکه‌ها به عنوان ضایعات یا محصول جانبی در نظر گرفته می‌شوند و با قیمت بسیار کم برای استفاده به عنوان خوراک دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند [۹].

تخمیر حالت جامد[1](SSF) بر سوبسترای مرطوب جامد با ترکیبات پیچیده بازده بالاتری دارد. به طور کلی محیط کشت جامد رنگدانه را تا سه برابر بیشتر از محیط‌های مایع، تولید می‌کند. در کشت قارچ‌های میسلیومی توصیه می‌شود که رطوبت سوبسترا به اندازه‌ای باشد که اجازه رشد میسلیوم را بدهد و در عین حال آب آزاد وجود نداشته باشد. طبق یک تحقیق رطوبت ایده آل برای تولید رنگدانه در بسترهای جامد حدود ۵۶ درصد است [۱۰].

در مراجع مختلف کمتر به تولید رنگدانه قارچی در بیوراکتور بسترآکنده پرداخته شده است و دو متغیر رطوبت اولیه بستر و هوادهی به طور همزمان مورد بررسی نشده است. در این پژوهش از پوسته‌ی سیب زمینی به عنوان سوبسترا با دو رطوبت‌های مختلف استفاده شده و تخمیر در بیوراکتور بسترآکنده با دو سرعت هوادهی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم: قارچ *Monascus purpureus* PTCC 5303 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری و بر روی پلیت حاوی PDA کشت داده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. از این قارچ هر سه هفته یکبار زیرکشت گرفته شد.

مایه تلقیح: برای تهیه‌ی مایه تلقیح، به ازای هر ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل، یک پلیت حاوی قارچ را به طور کامل شست و شو داده شد تا میزان دانسیته نوری مایه تلقیح به ۰٫۵ برسد. سپس به ازای هر ۵ گرم سوبسترا، مقدار ۲ میلی لیتر مایه تلقیح به سوبسترا اضافه شد.

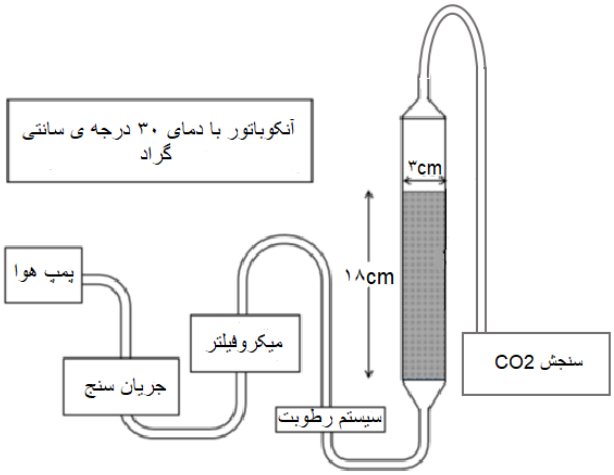
سوبسترا: پوست سیب‌زمینی به طور کامل شسته و با قرارگیری در محیط باز به طور کامل خشک شدند. سپس پوست‌های خشک شده به ذرات کوچک با سایز کمتر از ۲ میلی متر خرد و به عنوان سوبسترا استفاده شدند.

محیط کشت نمکی: محیط کشت نمکی شامل مقدار مشخصی از نمک های KH_2PO_4، $(NH_4)_2SO_4$، NaCl، $MgSO_4.7H_2O$ و $ZnSO_4.7H_2O$ آماده و به ازای هر ۵ گرم سوبسترا، میزان ۲ میلی لیتر به سوبسترا اضافه شد [۹].

تخمیر حالت جامد: در این پژوهش از چهار بیوراکتور کوچک آزمایشگاهی با قطر ۳ و ارتفاع ۱۸ سانتی متر از جنس پلی-پروپیلن استفاده شد. برای هر بیوراکتور، مقدار ۱۵ گرم سوبسترای خشک در نظر گرفته شد که با ۶ میلی لیتر محیط کشت نمکی و مقداری آب مقطر اضافه برای تنظیم رطوبت، درون ارلن مخلوط و استریل شدند. رطوبت نمونه‌ها روی دو سطح ۵۵ و ۶۰ درصد تنظیم شدند. سپس در شرایط استریل به هر ارلن، ۶ میلی لیتر مایه تلقیح اضافه و پس از هم خوردن مناسب، به آرامی هر یک از بیوراکتورها پر شدند.

[1] Solid state fermentation

برای هر بیوراکتور یک سیسم هوادهی شامل پمپ هوا، جریان سنج، فیلتر و سامانه‌ی رطوبت‌زنی در نظر گرفته شد و در نهایت بیوراکتورها در آنکوباتور با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی گراد قرار گرفتند. خروجی یکی از بیوراکتورها وارد یک سیستم خشک کن شده و در نهایت برای سنجش منحنی رشد، وارد یک داستگاه سنجش CO_2 شد. سرعت جریان هوا روی دو سطح ۶ و ۸ لیتر بر ساعت تنظیم شد. در روزهای ۰ و ۳ و ۵ و ۷ هر بیوراکتور برای انجام آنالیزهای مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. در شکل ۱ تصویر شماتیک سیستم را مشاهده می کنید.



شکل ۱- شماتیک سامانه بیوراکتور و سیستم رطوبت زن و هوادهی

استخراج و آنالیزها: برای استخراج رنگدانه از سوبسترای تخمیرشده از اتانول ۹۵ درصد استفاده شد. به این صورت که به ازای هر گرم سوبسترای تخمیرشده، مقدار ۳ میلی لیتر اتانول اضافه و در شیکرآنکوباتور به مدت ۱ ساعت با دور ۱۸۰ rpm مخلوط شدند. سپس مایع رویی به مدت ۱۵ دقیقه درون سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm قرار گرفت. سپس میزان جذب نور نمونه حاوی رنگدانه قرمز رنگ حاصل در طول موج ۵۰۷ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. سپس با کمک فرمول زیر میزان رنگدانه به دست آمد [۹].

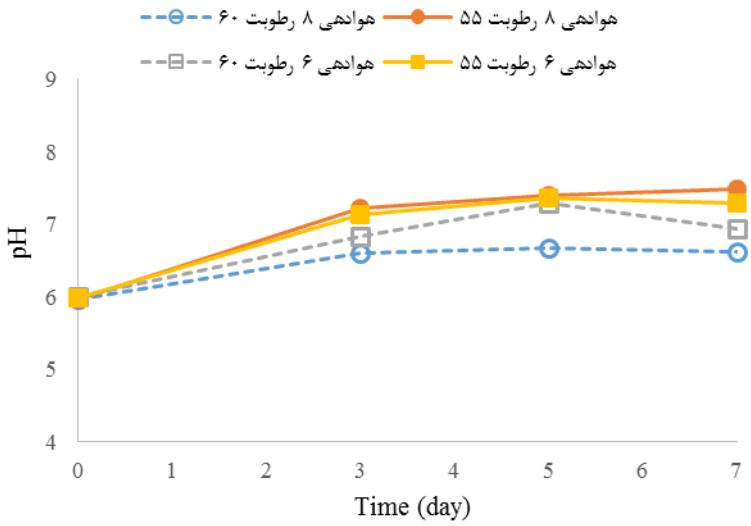
$$\text{میزان رنگدانه}\left(\frac{AU}{g\ fs}\right) = \frac{\text{میزان اتانول} \times \text{رقت} \times \text{جذب}}{\text{مقدار سوبسترای تخمیرشده } (g)}$$

همچنین آنالیزهای سنجش مقدار CO_2 تولیدشده، pH و رطوبت سوبسترا نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

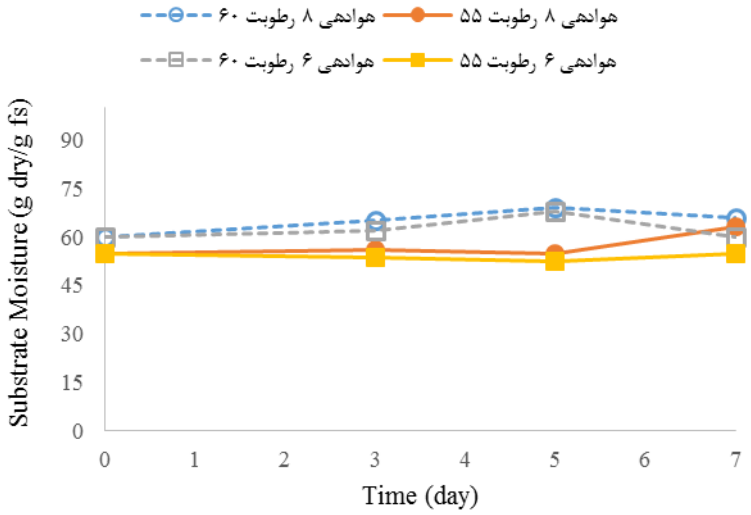
نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهند که پوسته‌ی سیب زمینی به عنوان منبع کربنی، یک بستر مناسب برای رشد و تولید رنگ توسط قارچ می‌باشد. همچنین عوامل مختلفی بر میزان رنگ و نوع آن تاثیرگذار هستند. عوامل هوادهی و رطوبت تاثیر زیادی بر مقدار رنگ تولیدی دارند.

بررسی تغییرات pH سوبسترا: نتایج نشان می‌دهد که تغییرات pH کم و تقریبا مستقل از میزان هوادهی و رطوبت اولیه سوبسترا است و به سبب رشد میکروارگانیسم محیط به سمت pH خنثی میل می کند که در شکل ۲ این نتایج ارائه شده است.



شکل۲- منحنی تغییرات pH سوبسترا در شرایط عملیاتی مختلف فرآیند تخمیر

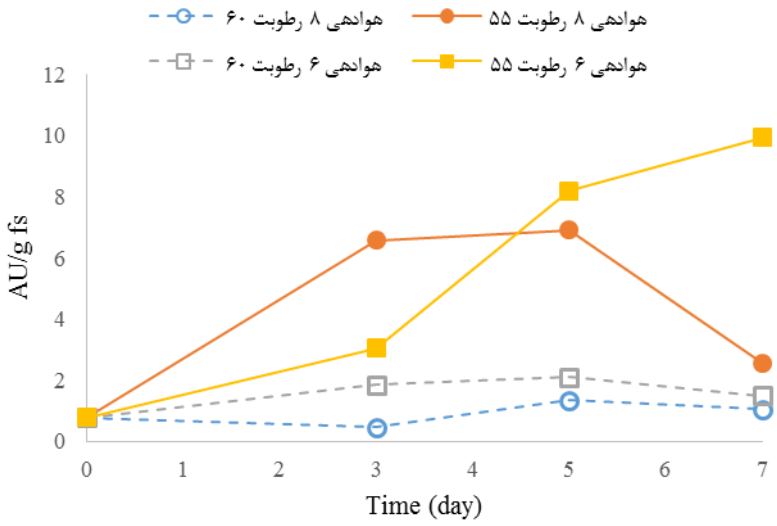
بررسی تغییرات رطوبت سوبسترا: بررسی میزان رطوبت متوسط سوبسترا در بیوراکتورها، نتایج نشان می‌دهد که وجود رطوبت زن‌ها و هوادهی، میزان تغییرات رطوبت را به حداقل رسانده است (شکل ۳). با افزایش سرعت هوادهی، میزان هوای مرطوب به داخل نمونه ها بیشتر شده و درنتیجه رطوبت سوبسترای تخمیر شده نسبت به رطوبت اولیه افزایش یافته است.



شکل۳- تغییرات رطوبت سوبسترای تخمیرشده در شرایط عملیاتی مختلف فرآیند

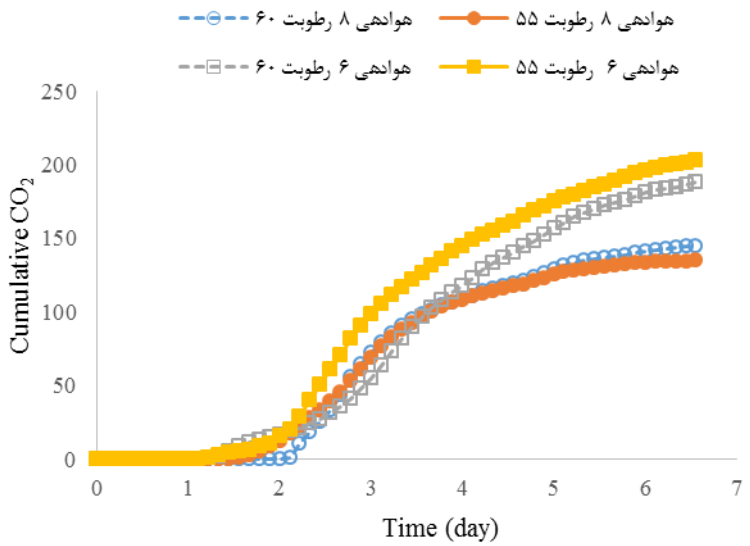
بررسی میزان رنگدانه تولیدشده: مطابق با شکل ۴ رطوبت یک عامل بسیار موثر بر تولید رنگدانه قرمز می‌باشد. با افزایش رطوبت به ۶۰ درصد، میزان رنگ‌دهی میکروارگانیسم کاهش می‌یابد و تولید رنگ قرمز پررنگی مشاهده نشد. ولی در رطوبت ۵۵ درصد، تولید رنگ قرمز خوبی مشاهده شد. در رطوبت اولیه کم سوبسترا، استرس محیطی بر قارچ افزایش می‌یابد که

منجر به افزایش میزان تولید رنگدانه می‌شود. از سوی دیگر با کاهش سرعت هوادهی، شرایط برای تولید رنگدانه توسط میکروارگانیسم فراهم می‌شود و میزان تولید رنگدانه در فاز سکون همچنان ادامه می یابد. درنتیجه شرایط بهینه برای تولید رنگدانه‌ی قرمز، رطوبت ۵۵ درصد و هوادهی با شدت ۶ لیتر بر ساعت می باشد.



شکل ۴ – تغییرات مقدار رنگدانه قرمز تولیدی در شرایط عملیاتی مختلف

منحنی رشد قارچ براساس تنفس سلولی: با استفاده از داده‌های تجمیعی به دست آمده از مقدار لحظه‌ای CO_2 موجود در هوای خروجی از بیوراکتور، منحنی رشد قارچ در طول فرآیند رسم شد (شکل ۵). مطابق با این منحنی، هوادهی تاثیر زیاد و رطوبت تاثیر کمی بر رشد قارچ دارد. هر چه سرعت هوادهی کمتر باشد، میزان رشد بیشتر است و تفاوت معناداری بین رطوبت ۵۵ و ۶۰٪ وجود ندارد.



شکل ۵- منحنی تجمعی میزان CO_2 تولیدی در فرآیند تخمیر

نتیجه گیری

با توجه به نتایج، هوادهی و رطوبت از عوامل موثر بر رشد و تولید رنگدانه هستند. به طوری که با تنظیم هوای ورودی به بیوراکتور بسترآکنده و رطوبت اولیه‌ی سوبسترا می توان میزان و نوع تولید رنگ را کنترل کرد. قارچ مورد نظر هوازی است اما برای رشد به هوای کمی احتیاج دارد. از این رو در هوادهی با سرعت کمتر، بیشترین میزان رشد قارچ مشاهده شد. در حالتی که رطوبت و سرعت هوادهی در مقدار کمتر تنظیم شده است، همزمان با رشد قارچ در فاز لگاریتمی و همچنین در فاز سکون تولید رنگدانه مشاهده شد که نشاندهنده نیمه وابسته بودن تولید رنگدانه به میزان رشد است. به طور کلی شرایط بهینه برای تولید رنگ توسط این قارچ، رطوبت ۵۵ درصد و با سرعت هوادهی ۶ لیتر بر ساعت بدست آمد. با بهینه سازی عوامل دیگر نیز می‌توان میزان تولید رنگ را افزایش داد و از آن در صنایع مختلف بهره برد.

منابع

1. Chen, X., et al., *Cost- effective process for the production of Monascus pigments using potato pomace as carbon source by fed- batch submerged fermentation.* Food Science & Nutrition, 2021. 9(10): p. 5415-5427.
2. Chen, X., et al., *Potato pomace: An efficient resource for Monascus pigments production through solid-state fermentation.* Journal of bioscience and bioengineering, 2021. 132(2): p. 167-173.
۳. ن.ع. آیت, معصومه, م., ن. علی، جداسازی و شناسایی مولکولی میکروارگانیسم های تولیدکننده رنگدانه و بررسی سمیت حاد رنگدانه ها.
4. Chen, W., et al., *Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in Monascus fungi.* Chemical Science, 2017. 8(7): p. 4917-4925.
5. Mukherjee, G., T. Mishra, and S.K. Deshmukh, *Fungal pigments: an overview.* Developments in fungal biology and applied mycology, 2017: p. 525-541.
6. Duarte, A.W.F., et al., *Antarctic fungi as producers of pigments.* Fungi of Antarctica, 2019: p. 305-318.
7. Patakova, P., *Monascus secondary metabolites: production and biological activity.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2013. 40(2): p. 169-181.
8. Dikshit, R. and P. Tallapragada, *Monascus purpureus: A potential source for natural pigment production.* J Microbiol Biotechnol Res, 2011. 1(4): p. 164-174.
9. Abdel-Raheam, H., et al., *Potato manufacturing wastes–a novel substrate for the production of natural pigments from Monascus purpureus.* Assiut J of Agric Sci, 2016. 47(2): p. 13-23.
10. Carvalho, J.C., et al., *Production of Monascus biopigments: an overview.* Agro Food Industry Hi Tech, 2003. 14(6): p. 37-43.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس برگ و پوست میوه پسته وحشی (بنه) لرستان

شبنم شماعی [۱*] و زینب نعمت الهی [۲]

۱-استادیار، گروه شیمی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی ،خرم‌آباد، ایران.

۲ - کارشناسی ارشد، گروه شیمی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی ،خرم‌آباد، ایران.

عضو هیات علمی E-mail:shabnamshamaie@gmail.com

چکیده

گیاهان دارویی از دیرباز به عنوان یکی از روش‌های طب سنتی برای درمان بیماری‌ها به کار گرفته می‌شوند. اسانس گیاهان دارویی در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد.این ترکیبات شیمیایی به دلیل دارا بودن خواص ضد التهابی، ضد عفونی کننده و آرامبخش، در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. در تحقیق حاضر شناسایی ترکیبات موثره اسانس برگ و پوست میوه پسته وحشی (بنه) لرستان بررسی شد.جهت تجزیه و شناسایی اسانس ها از دستگاه کروماتوگرافی گازی –طیف سنجی جرمی استفاده شد. در این بررسی مشخص شد که اسانس برگ پسته وحشی(بنه)،شامل ۳۲٪سزکویی ترپنویید اکسیژن دار و۳۰٪منوترپنوییداکسیژندار،۲۴٪سزکویی ترپن،۱۰٪منوترپنویید،۲٪دی ترپنویید اکسیژن دار و ۲٪منوترپنویید است که از این میان کارواکرول با بالاترین شاخص بازداری در اسانس برگ بنه به عنوان مهم ترین ماده در این ترکیب می باشدو نیز از بررسی اسانس پوست میوه پسته وحشی مشخص شد که در این ترکیب ۳۶٪سزکویی ترپنویید اکسیژن دار ،۲۲٪منوترپنویید اکسیژن دار ،۲۰٪سزکویی ترپنویید و ۱۶٪منوترپنوییدو همی ترپنویید –پلی ترپنویید و دی ترپنویید از هرکدام ۲٪در ترکیب اسانس شناسایی شد که از این میان کاریوفیلن با بالاترین شاخص بازداری به عنوان مهم ترین ماده در ترکیب شناسایی شد.

کلید واژگان: اسانس، گاز کروماتوگرافی , شاخص بازداری

Abstract

Herbal plants have been used for centuries as a traditional medical practice to treat diseases. Essential oils of herbal plants are used in various industries due to their anti-inflammatory, antimicrobial, and calming properties. In this study, the effective compounds of the essential oils from the leaves and wild pistachio fruit peel (Baneh) of Lorestan were identified and analyzed using gas chromatography-mass spectrometry. The results showed that the essential oil of wild pistachio leaves (Baneh) contains 32% oxygenated sesquiterpenoids, 30% oxygenated monoterpenoids, 24% sesquiterpenoids, 10% mono terpenoids, 2% oxygenated diterpenoids, and 2% monoterpenoids. Carvacrol was identified as the most important compound in this mixture, with the highest inhibition index in the essential oil of Baneh leaves. In addition, it was found that the essential oil of wild pistachio fruit peel contains 36% oxygenated sesquiterpenoids, 22% oxygenated mono terpenoids, 20% sesquiterpenoids, and 16% monoterpenoids, as well as poly terpenoids and di terpenoids, each accounting for 2% of the mixture. Caryophyllene was identified as the most important compound in this mixture, with the highest inhibition index. Gas chromatography and inhibition index are the main keywords of this study.

Keyword: Essence, Gas Chromatography, Retention Index

۱-مقدمه

گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه بیشتر کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی خطر برای انسان تلقی می شوند.ایران یکی از غنی ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می رود که دارای تنوع بالای شرایط زیستگاهی برای انواع این گیاهان می باشد از این رو محققان به بررسی ترکیبات فعال استخراج شده از گونه های مختلف گیاهی ،جهت از بین بردن عوامل بیماری زا علاقمند می باشند.متابولیت های ثانویه گیاهان مانند اسانس ها و فلاونوئیدها به علت خواص ضد میکروبی ،ضد باکتری ،ضد قارچی و آنتی اکسیدانی به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته اند [۴و۵]. گیاه پسته وحشی با نام علمی Pistacia atlantica در رده Magnoliopsida درختان گلدار، خانواده Anacardiaceae، جنس Pistacia و گونه Pistacia atlantica قرار دارد. درخت بنه در سواحل مدیترانه تا آسیای صغیر و سوریه ،قفقاز ،ایران ،افغانستان و پاکستان و جزایر قناری انتشار دارد.در ایران و آذربایجان (خوی علی بولاغ،ارسباران)در کرمانشاه(کرند وگهواره)لرستان و فارس انتشار دارد.وسعت درختان بنه در ایران بیش از یک میلیون و دویست هزار هکتار است مهم ترین رقم آن موتیکا به شمار می آید ودر نقاط مختلف ایران پراکندگی خوبی داردپوسته خارجی (۲۴درصدمیوه بنه)به رنگ سبز بوده،تقریبا ۳۰ درصدروغن داردوروغن پوست بنه از پایداری اکسایشی بسیار بالایی برخوردار است. ازطرفی جنگل های زاگرس، بخش وسیعی از جنگلهای ایران است که ویژگی های منحصر به فردی دارد. از مهم ترین گونه های بومی جنگلی زاگرس،پسته وحشی یا بنه که از گونه های درختی است که بخش زیادی از پوشش جنگل های غرب کشور را در بر گرفته است. این گیاه علاوه بر کاربردهای صنعتی دارای خواص دارویی نیز می باشد. پسته وحشی درختی با ارتفاع تا ۱۵ متر با تنه ای نسبتا قطور ناصاف وتیره رنگ است.برگ های آن شبیه به برگ های پسته شانه ای فرد با ۵-۲ سانتی متر برگچه،هر برگچه بیضی کشیده ونوکدارروی برگ سبز روشن مایل به آبی براق است و پشت برگ سبز مات و کنار برگ ها کمی مژه دار و دارای گل آذین خوشه ای باز هستند. میوه آن کوچک در ابعاد ۸-۵ میلیمتر با دم کوتاه،دارای پریکارپ معطر و آندو کارپ سخت وچوبی ودانه های آن روغنی است [۶]. درخت بنه منبع تولید شیره سقز است که صمغی به رنگ سبز خیلی روشن ،غلیظ و بسیار چسبنده است.و استفاده دارویی فراوانی دارد از شیره سقز در تهیه آدامس ،عطر ،حشره کش ها و در صنعت داروسازی در تهیه نرم کننده ها و ضد عفونی کننده ها استفاده می شود.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- تهیه گیاه و استخراج اسانس

برگ درخت و پوست میوه پسته وحشی(بنه)ازشهرخرم آباداستان لرستان دراردیبهشت ماه تهیه گردید.پس از تهیه گیاهان ، برگ ها از ساقه جدا وپوست میوه هم از مغز میوه جداشد و پس از خشک کردن درسایه

در دمای معمولی اتاق و پودر شدن،۳۰۰ گرم از نمونه گیاه با ۱ لیتر آب مقطر به مدت ۵ساعت به روش تقطیر با آب (دستگاه کلونجر)تقطیر شد.اسانس جمع آوری شده توسط سولفات سدیم بدون آب خشک و تازمان تزریق به دستگاه GC دریخچال نگه داری شد .

۲-۲- آنالیز اسانس

حاصل این کار تحقیقاتی که با مطالعه و بررسی دقیق زمان های بازداری ترکیب ها ،شاخص بازداری،طیف های جرمی و مقایسه کلیه این پارامترها با ترکیب های استاندارد صورت گرفت.شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده با تزریق ۰,۵ میکرولیتر اسانس به دستگاه گازکروماتوگرافی Varianمدل CP-۳۸۰۰ ،مجهز به ستون DB-۱(طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر)متصل به طیف سنج جرمی مدل Agilent 5975 استفاده شد. برنامه دمایی ستون به این روش تنظیم شد که دمای ابتدایی آن به مدت یک دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد نگه داشته شد سپس تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد با سرعت چهار درجه سانتی گراد دردقیقه افزایش یافت و به مدت چهار دقیقه در آن دما نگه داشته شد.دمای قسمت تزریق و آشکار ساز (FID) به ترتیب ۲۵۰ و ۲۶۰ درجه سانتی گراد بود و از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت (در منبع تولید کننده یون)استفاده گردید. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری ،مطالعه طیف های جرمی و مقایسه این طیف ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانهwileyn-1 دستگاه صورت گرفت.همچنین میزان درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر پیک آن در کروماتوگرام به روش نرمال کردن سطح به دست آمد.

۳- نتایج حاصل از تجزیه و شناسایی اسانس ها

۳-۱-نتایج حاصل از تجزیه و شناسایی اسانس پوست میوه بنه

در این تحقیق ۵۷ ترکیب در **اسانس پوست میوه بنه** شناسایی شد که ترکیب کاریوفیلین اکسید مهم ترین و بیشترین ترکیب شناسایی شده است که در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱-داده های مربوط به ترکیبات اسانس پوست میوه پسته وحشی

شماره پیک	نام ترکیب	شاخص بازداری	زمان بازداری	شاخص کواتس	جرم مولی	نوع ترپن
Peak	name	Area%	R.Time	KI	M.W	نوع ترپن
۱	ir-alpha-pinene	۵/۱۷	۵/۶۲۱	۹۳۲	۱۳۶/۲۳	منوترپنوییید
۲	beta.pinene	۰/۷۶	۶/۶۹۸	۹۷۴	۱۳۶/۲۳	منوترپنوییید

۳	beta-myrcene	۳/۳۹	۶/۸۱۴	۹۸۶	۱۳۶/۲۳	منوترپنوییید
۴	delta-3-carene	۰/۹۷	۷/۴۱۱	۱۰۳۴	۱۳۶/۲۴	منوترپنوییید
۵	(cas)p-cymene	۰/۷۰	۷/۸۷۸	۱۰۲۱	۱۳۴/۲۱	منوترپنوییید
۶	d-limonene	۰/۶۶	۷/۶۹۱	۱۰۲۶	۱۳۶/۲۴	منوترپنوییید
۷	cis-ocimene	۱/۰۴	۸/۰۱۲	۱۰۳۶	۱۳۶/۲۴	منوترپنوییید
8	linalool	۳/۰۵	۹/۹۱۰	۱۰۹۹	۱۵۴/۲۵	منوترپنوییید اکسیژن دار
9	trans-p-menth-1(7),8-dien-2-ol	۰/۶۶	۱۱/۵۹۰	۹۸۴	۱۵۲/۲۳	منوترپنوییید اکسیژن دار
10	endo-borneol	۰/۸۴	۱۲/۲۸۷	۱۱۶۵	۱۵۴/۲۵	منوترپنوییید اکسیژن دار
11	-(cas)4-terpineol	۲/۷۱	۱۲/۴۳۷	۱۱۷۵	۱۵۴/۲۵	منوترپنوییید اکسیژن دار
12	alpha-terpineol	۵/۴۵	۱۲/۹۰۹	۱۱۸۸	۱۵۴/۲۵	منوترپنوییید اکسیژن دار
13	cis-3-hexenyl isovalerate	۰/۶۱	۱۳/۵۶۸	۲۵۷۸	۱۷۲/۲۲	منوترپنوییید اکسیژن دار
14	2-bornene	۰/۵۶	۱۳/۸۰۵	۱۱۶۵	۱۳۶/۲۳	منوترپنوییید اکسیژن دار
15	p-menth-1-en-3-one	۰/۷۷	۱۴/۶۸۸	۱۰۰۶		منوترپنوییید اکسیژن دار
16	carvacrol	۳/۴۲	۱۵/۹۰۹	۱۵۳۰	۱۵۰/۲۱	منوترپنوییید اکسیژن دار
17	z-3-hexenyl tiglate	۰/۹۱	۱۶/۲۸۷	۱۹۰۴	۱۸۴/۲۷	سزکویی ترپنوییید اکسیژن دار
18	alpha-terpinenyl acetate	۰/۳۳	۱۷/۰۳۱	۱۰۱۴	۱۹۶/۲۹	سزکویی ترپنوییید اکسیژن دار
19	cis-3-hexenyl hexanoate	۰/۷۹	۱۷/۸۰۲	۱۰۱۷	۲۰۴/۲۶	سزکویی ترپنوییید اکسیژن دار
20	cis-jasmone	۰/۶۵	۱۸/۵۵۰	۱۹۶۶	۱۶۴/۲۴	سزکویی ترپنوییید اکسیژن دار
21	caryophyllene	۹/۸۳	۱۹/۱۳۱	۱۴۱۱	۲۰۴/۳۶	سزکویی ترپنوییید
22	alloaromadendrene	۰/۸۹	۱۹/۶۰۷	۱۴۷۱	۲۲۰/۳۵	سزکویی ترپنوییید اکسیژن دار
۲۳	isopentyl alcohol	۰/۴۶	۱۹/۶۶۵	۱۴۳۶	۶۰/۱	همی ترپنوییید
۲۴	alpha-humulene	۲/۴۹	۲۰/۰۸۵	۱۴۵۲	۲۰۴/۳۵	سزکویی ترپنوییید
۲۵	(-)-isosativene	۰/۷۶	۲۰/۵۴۲	۱۶۵۶	۲۰۴/۳۵	سزکویی ترپنوییید
۲۶	(+)-ledene	۰/۷۷	۲۰/۹۸۲	۱۰۸۲	۲۰۴/۳۵	سزکویی ترپنوییید

۲۷	3-methyl – gamma-decalactone,cis-	۰/۵۲	۲۱/۲۵۳	۹۲۷	۱۷۰/۲۵	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
۲۸	naphthalene,	۰/۳۸	۲۱/۳۲۹	۹۳۴	۱۲۸/۱۷	منوترپنویید
۲۹	5,58a-trimethyl-3,5,6,7,8,8a-hexahydro-2	۰/۴۷	۲۱/۸۲۶	۱۵۳۰	۱۴۰/۰۸	پلی ترپنویید
۳۰	(+)spathulenol	۱/۳۴	۲۱/۹۳۰	۱۵۳۲	۲۲۰/۳۶	سزکویی ترپنویید
31	3-hydroxydeecanoic acid	۰/۴۲	۲۲/۲۰۰	۱۵۴۲	۲۱۶/۳۲	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
32	nerolidol	۱/۰۶	۲۲/۴۰۸	۱۵۴۷	۲۲۲/۳۷	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
33	o-menth-8-ene-4-methanol	۰/۳۴	۲۲/۵۲۵	۱۵۹۱	۲۰۴/۲۶	منوترپنویید اکسیژن دار
34	nerolidol	۹/۹۹	۲۲/۶۵۹	۱۶۶۷	۲۰۶/۲۸	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
35	cis – 3 hexenyl benzoate	۳/۰۶	۲۳/۱۶۹	۱۰۷۸	۲۲۰/۳۶	منوترپنویید اکسیژن دار
36	benzoic acid ,hexyl ester	۰/۵۵	۲۳/۲۹۹	۱۵۶۱	۲۰۶/۲۸	منوترپنویید اکسیژن دار
37	spathulenol	۲/۸۳	۲۳/۴۱۵	۱۶۲۶	۲۲۰/۳۵	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
38	caryophyllene oxide	۱۱/۰۶	۲۳/۵۶۴	۱۵۸۶	۲۲۰/۳۵	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
39	viridiflorol	۰/۳۶	۲۳/۸۴۲	۱۶۳۴	۲۲۲/۳۷	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
40	methyl 10,12-tricosadiynoate	۰/۷۱	۲۳/۹۷۴	۱۶۳۶	۲۲۰/۳۵	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
41	eudesm -4(14)-en-11-01	۰/۳۱	۲۴/۱۱۰	۱۵۹۵	۲۲۰/۳۵	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
42	caryophyllene oxide	۱/۳۲	۲۴/۲۴۰	۱۵۸۶	۲۰۴/۳۶	سزکویی ترپنویید
43	(cas)widdrol	۰/۶۳	۲۴/۵۲۱	۱۴۳۹	۲۲۲/۳۷	سزکویی ترپنویید
44	gamma-eudesmol	۲/۰۲	۲۴/۶۹۸	۱۴۵۶	۲۰۴/۳۵	سزکویی ترپنوییداکسیژن دار
45	caryophyllene oxide	۰/۴۶	۲۴/۷۹۳	۱۵۸۶	۲۲۲/۳۷	سزکویی ترپنویید
۴۶	(+)-aromadendrene	۱/۱۶	۲۴/۹۰۱	۱۴۲۰	۲۲۰/۲۶	سزکویی ترپنویید
۴۷	a-eudesmol	۵/۷۰	۲۵/۳۴۹	۱۴۳۲	۱۲۲/۱۲	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
۴۸	cis-3-hexenyl salicylate	۰/۴۰	۲۵/۵۰۷	۱۶۳۴	۲۲۲/۳۷	منوترپنویید اکسیژن دار

۴۹	caryophyllene oxide	۰/۹۲	۲۵/۶۶۶	۱۵۸۶	۲۶۸/۴۷	سزکویی ترپنویید
۵۰	benzoic acid ,heptyl ester	۱/۰۰	۲۵/۷۶۸	۱۴۸۷	۱۶۶/۱۴	همی ترپنوییداکسیژن دار
۵۱	alpha-bisabolo	۰/۴۰	۲۵/۸۷۹	۱۵۴۳	۲۲۲/۳۷	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
۵۲	3. alpha,7.beta-dihydroxy	۰/۳۱	۲۹/۱۹۴	۱۴۲۳	۴۱۸/۶۶	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
۵۳	oleyl alcohol	۱/۲۹	۲۹/۵۶۸	۱۳۸۸	۲۶۸/۴۷	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
۵۴	phthalic acid	۰/۴۶	۷۲۹/۲۹	۱۴۵۲	۱۶۶/۱۴	همی ترپنویید اکسیژن دار
۵۶	1,3,6,10-cyclotetradecatetraene	۰/۹۳	۳۱/۵۹۱	۱۴۲۰	۲۷۲/۴۷	دی ترپنویید
۵۷	dibutyl phthalate	۰/۷۰	۳۱/۷۶۵	۱۴۳۱	۲۷۸/۳۵	سز کویی ترپنویید اکسیژن دار

داده های حاصل ازتزریق اسانس برگ بنه (پسته وحشی)در کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج

۲-۳- نتایج حاصل از تجزیه و شناسایی برگ بنه

داده های بدست آمده از بررسی اسانس برگ پسته وحشی(بنه)توسط کروماتوگرام گازی متصل به طیف سنج جرمی در جدول (۲)مشخص شده است.

جدول شماره۲-داده های حاصل از طیف سنج جرمی برگ پسته وحشی

شماره پیک	نام ماده موثره شناسایی شده	جرم مولی	شاخص بازداری	زمان بازداری	اندیس کواتس	نوع ترپن
PEAK	name	M.W	AREA%	R.TIME	KI	نوع ترپن
۱	ir.alpha.pinene	۱۳۶/۲۳	۰/۷۶	۵/۶۱۲	۹۳۲	منوترپنویید
۲	beta.myrcene	۱۳۶/۲۳	۴/۹۷	۶/۸۱۱	۹۸۶	منوترپنویید
۳	(cas)p-cymene	۱۳۴/۲۱	۰/۴۲	۷/۸۷۱	۱۰۲۱	منوترپنویید
۴	cis-ocimene	۱۳۶/۲۳۸	۰/۴۲	۸/۰۰۷	۱۰۳۶	منوترپنویید
۵	linalooll	۱۵۴/۲۵	۰/۶۵	۹/۸۹۵	۱۰۹۹	منوترپنویید اکسیژن دار
۶	nonanal	۱۴۲/۲۳	۰/۱۵	۱۰/۰۶۱	۱۰۷۶	منوترپنویید اکسیژن دار

۷	trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	۱۵۲/۲۳	۰/۲۷	۱۱/۵۷۸	۱۲۰۸	منوترپنوییید اکسیژن دار
۸	isoborneol	۱۵۴/۲۵	۰/۱۷	۱۲/۲۷۹	۱۲۰۹	منوترپنوییید اکسیژن دار
۹	(+)-ledene	۱۵۴/۲۵	۰/۵۵	۱۲/۴۲۶	۱۲۳۶	سزکویی ترپنویید اکسیژن دار
۱۰	.alpha.terpineol	۱۵۴/۲۵	۰/۳۰	۱۲/۸۷۸	۱۰۱۳	منوترپنوییید اکسیژن دار
۱۱	cis-hexenyl2-methylbutanoate	۱۸۴/۲۷	۰/۱۷	۱۳/۵۶۲	۱۰۲۹	منوترپنوییید اکسیژن دار
۱۲	isothymol methyl ether	۱۶۴/۲۴	۰/۱۰	۱۳/۹۳۴	۹۸۷	منوترپنوییید اکسیژن دار
۱۳	thymol	۱۵۰/۲۲	۰/۱۶	۱۵/۶۴۱	۱۰۱۷	منوترپنوییید اکسیژن دار
۱۴	carvacrol	۱۵۰/۲۱	۳۳/۲۶	۱۶/۰۰۰	۱۳۶۲	منوترپنوییید اکسیژن دار
۱۵	z-3-hexenyl tiglate	۱۸۲/۲۶	۰/۱۵	۱۶/۲۹۲	۱۰۳۴	منوترپنوییید اکسیژن دار
۱۶	isoledene	۲۰۴/۳۵	۰/۵۵	۱۷/۶۳۱	۱۰۴۱	سزکویی ترپن
۱۷	cis-3-hexenyl hexanoate	۱۹۸/۳۰	۰/۱۷	۱۷/۷۹۴	۹۸۴	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۱۸	viridiflorene	۲۰۴/۳۵	۰/۲۶	۱۸/۵۴۲	۱۷۴۰	سزکویی ترپن
۱۹	alpha-gurjunene	۲۰۴/۳۵	۰/۲۵	۱۸/۶۸۷		سزکویی ترپن
۲۰	beta-maaliene	۲۰۴/۳۵	۰/۱۵	۱۸/۸۵۴	۹۲۶	سزکویی ترپن
۲۱	caryophyllene	۲۰۴/۳۶	۵/۳۶	۱۹/۱۱۰	۱۴۱۱	سزکویی ترپن
۲۲	neoalloocimene	۱۳۶/۲۳	۰/۴۸	۱۹/۲۹۷	۱۰۵۶	منوترپنوییید
۲۳	(-)-alpha-panasinsen	۲۰۴/۳۵	۰/۵۷	۱۹/۵۰۴	۹۸۷	سزکویی ترپن

۲۴	(+)-aromadendrene	۲۰۴/۳۵	۵/۴۳	۱۹/۶۱۸	۱۰۴۳	سزکویی ترپن
۲۵	2-naphthalenemethanol	۱۵۸/۲	۰/۸۱	۱۹/۸۱۰	۱۳۲۱	منوترپن اکسیژن دار هیدروکربنه
۲۶	alpha-humulene	۲۰۴/۳۶	۰/۷۰	۲۰/۰۸۳	۱۳۲۰	سزکویی ترپن
۲۷	alloaromadendrene	۲۰۴/۳۵	۰/۷۹	۲۰/۲۰۳	۹۹۵	سزکویی ترپن
۲۸	alpha-amorphene	۲۰۴/۳۵	۰/۴۹	۲۰/۵۰۴		سزکویی ترپن
۲۹	2-naphthalenemethanol	۱۵۸/۲	۰/۲۰	۲۰/۸۳۱	۱۴۰۲	منوترپن اکسیژن دار
۳۰	(+)-ledene	۲۰۴/۳۵	۳/۴۹	۲۰/۹۸۱	۱۳۶۵	سزکویی ترپن
۳۱	alpha-muurolene	۲۰۴/۳۵	۰/۲۰	۲۱/۱۴۰		سزکویی ترپن
۳۲	viridiflorene	۲۰۴/۳۵	۰/۷۵	۲۱/۲۵۲	۱۴۱۵	سزکویی ترپن
۳۳	delta-cadinene	۲۰۴/۳۵	۰/۸۳	۲۱/۶۱۵	۹۸۴	سزکویی ترپن
۳۴	2-naphthalenemethanol	۱۵۸/۲	۱/۱۵	۲۲/۰۷۴		منوترپن اکسیژن دار
۳۵	nerolidol	۲۲۲/۳	۱/۱۱	۲۲/۶۰۵	۱۰۳۲	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۳۶	viridiflorol	۲۲۲/۳۷	۲/۲۱	۲۲/۹۵۰	۹۸۴	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۳۷	ledene oxide-(ii)	۲۲۰/۳۵	۲/۶۲	۲۳/۱۴۹	۱۰۲۹	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۳۸	spathulenol	۲۲۰/۳۶	۲/۴۱	۲۳/۳۷۸	۱۰۴۳	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۳۹	caryophyllene oxide	۲۲۰/۳۵	۲/۲۶	۲۳/۵۲۱	۱۲۴۵	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۴۰	(-)-globulol	۲۲۲/۳۷	۲/۲۹	۲۳/۵۹۷	۱۴۱۲	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۴۱	viridiflorol	۲۲۲/۳۷	۲/۴۲	۲۳/۸۳۱	۱۴۰۳	سزکویی ترپن اکسیژن دار

۴۲	2-naphthalenemethanol	۱۵۸/۲	۰/۷۸	۲۴/۰۹۸	۱۴۲۱	منوترپن اکسیژن دار
۴۳	caryophyllene oxide	۲۲۰/۳۵	۰/۴۷	۲۴/۲۲۹	۹۰۰	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۴۴	rosifoliol	۲۲۲/۳۷	۰/۸۶	۲۴/۵۰۳	۹۴۳	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۴۵	2-naphthalenemethanol	۱۵۸/۲	۳/۲۱	۲۴/۶۹۴	۹۵۴	منوترپن اکسیژن دار
۴۶	aristolene	۲۰۴/۳۵	۰/۲۴	۲۴/۷۹۰	۹۷۶	سزکویی ترپن
۴۷	hinesol	۲۲۲/۳۷	۰/۳۸	۲۴/۸۹۹	۹۸۷	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۴۸	2-naphthalenemethanol	۱۵۸/۲	۱۴/۹۹	۲۵/۳۷۷	۱۴۰۲	منوترپن اکسیژن دار
۴۹	caryophyllene oxide	۲۲۰/۳۵	۰/۲۴	۲۵/۶۵۵	۱۵۸۶	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۵۰	caryophyllene oxide	۲۲۰/۳۵	۰/۲۶	۲۵/۸۲۰	۱۲۹۰	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۵۱	farnesol	۲۲۲/۳۷	۰/۵۵	۲۶/۳۹۱	۱۴۰۳	سزکویی ترپن اکسیژن دار
۵۲	geranyllinalool	۲۹۰/۴۹	۰/۱۳	۳۱/۳۲۴	۱۳۸۰	دی ترپنویید اکسیژن دار
۵۳	dibutyl phthalate	۲۷۸/۳۵	۰/۲۰	۳۱/۷۵۸	۱۳۰۶	سزکویی ترپنویید
۵۴	phytol	۲۹۶/۵۴	۰/۲۵	۳۴/۴۹۴	۱۰۲۶	سزترپنویید

۴- بحث

همانطور که مشخص شد در نمونه برگ کارواکرول Carvacrol به عنوان مهم ترین ماده شناسایی و همچنین در برگ پسته وحشی از میان ۵۴ گونه شناسایی شده حدود ۵ منوترپنویید و ۱۵ منوترپنویید اکسیژن دارو ۱۲ سزکویی ترپن و ۱۶ سزکویی ترپنویید اکسیژن دارو ۱ دی ترپنویید اکسیژن دار و ۱ سز ترپنویید شناسایی شد. با بررسی اسانس برگ بنه میزان ترپن های مختلف آن مشخص گردید،در این نمونه میزان سزکویی ترپن های اکسیژن دار از همه ترپن های آن بالاتر بود و بعد منوترپن های اکسیژن دار نمونه میزان بالایی داشت [۷]. در نمونه پوست میوه پسته وحشی ۵۷ گونه شناسایی شد که در مورد آن مهم ترین ماده موثره که بیشترین مقدار را داشت مربوط به کاریوفیلن اکسید می باشد, از طرفی این نمونه دارای

۸ نوع منوترپنویید , ۱۱ نوع منوترپنویید اکسیژن دار , ۱۰ نوع سزکویی ترپنویید ، ۱۸نوع سز کویی ترپنویید اکسیژن دار ,۱ نوع همی ترپنویید , ۱ نوع پلی ترپنویید و ۱نوع دی ترپنویید است [۸].

قدردانی و تشکر

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد تشکر و قدردانی می کنند.

منابع

1. Mozaffarian, V. A., Mozaffarian, V. A., & Mozaffarian, V. (1996). Dictionary of Iranian plant names.
2. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol. 2012;3:12
3. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int J Food Microbiol. 2004;94(3):223-53.
4. Franz C, Novak J. Sources of Essential Oils. Handbook of Essential Oils: science, Technology, and Applications. 2009.
5.O'Bryan C.A., Pendleton S.J., Crandall P.G., Ricke S.C. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture—In vitro studies on antibacterial mode of action. Front. Vet. Sci. 2015;2:35. doi: 10.3389/fvets.2015.00035.
6.HosseiniShokraii, E. 1977. Chemical Composition of the Pistachio Nuts (Pistaciavera L.) Kerman, Iran. Journal Food Science, 42, 244-245.
7.Nagegowda D.A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett.* 2010;584:2965–2973. doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.045
8.Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46:446–475.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی ترکیبات شیمیایی گیاهان اسطوخودوس و به‌لیمو به منظور شناسایی کاندید دارویی ضد اضطراب با روش غربالگری مجازی و داکینگ مولکولی

پریسا ایمنی*[۱] ، میلاد درجه [۲]

۱. کارشناسی ارشد زیست‌فناوری صنعت و محیط زیست، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

۲. مدیر دپارتمان تحقیق و توسعه شرکت زرعطار نوین فارمد ایرانیان

Imeni.parisa@gmail.com

چکیده

اختلالات اضطرابی به عنوان مجموعه‌ای از پاسخ‌ها به شرایط تهدید هستند که باعث حفظ بقا می‌شوند. در صورتی که پاسخ‌های استرسی به حالت مزمن و غیر قابل کنترل درآیند به عامل تهدیدکننده بقا تبدیل می-شوند و بر فعالیت‌های روزمره تأثیر منفی می‌گذارند. اختلالات اضطرابی شایع‌ترین بیماری روانی در سطح جهان هستند. کنترل این اختلال به طور عمده با استفاده از دارودرمانی و روان‌درمانی به صورت مکمل است. داروهای اصلی برای اختلالات اضطرابی شامل داروهای مهارکننده انتخابی بازجذب سروتونین و نوراپی‌نفرین و بنزودیازپاین‌ها هستند. با توجه به محدودیت‌های داروهای موجود، مانند تأخیر در شروع و همچنین عادی‌سازی، تحمل و پتانسیل سوء مصرف، تعداد فزاینده‌ای از متخصصان مراقبت‌های بهداشتی به طور فعال در حال بررسی و ترویج داروها و درمان‌های مکمل و جایگزین هستند. به طور خاص، اسانس‌ها و رایحه درمانی روش های درمانی مهمی برای درمان اضطراب هستند. دو گیاه شناخته شده با فعالیت‌های ضد اضطرابی و آرام‌بخش، گیاه اسطوخودوس و به‌لیمو هستند. این گیاهان با داشتن ترکیبات شیمیایی خاص می‌توانند بر گیرنده‌های اصلی مسیر اضطراب اثر مهاری داشته باشند و فعالیت مشابه داروهای تایید شده موجود برای اختلالات اضطرابی از خود نشان دهند. در این پژوهش تاثیر ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره روغنی این گیاهان، با استفاده از روش غربالگری مجازی و داکینگ مولکولی بر گیرنده‌های اصلی مسیر اضطراب مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که بسیاری از ترکیبات موجود در این دو گیاه مانند کاریوفیلن اکساید، اسپاتولنول، کارون، دی‌هیدروکارون، ژرانیال، نرال، نرول، لینالول و لینالول‌اکساید اثرات مشابه و نزدیک به داروهای کنترل مثبت از خود نشان می‌دهند.

کلمات کلیدی: اختلالات اضطرابی، سروتونین، نوراپی‌نفرین

Abstract

Anxiety disorders are a set of reactions to threatening situations that ensure survival. When stress responses become chronic and uncontrollable, they become a threat to survival and negatively impact on daily activities. Anxiety disorders are the most common mental illness worldwide. Control of this disorder is mainly through complementary medication and psychotherapeutic treatment. Major medications for anxiety disorders include selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors and benzodiazepines. Given the limitations of existing medications, such as delayed onset of action, normalization, tolerance, and potential for abuse, more and more health professionals are actively exploring and promoting complementary and alternative medications and therapies. In particular, essential oils and aromatherapy are important therapeutic methods for treating anxiety. Two well-known plants with anxiety-relieving and calming effects are lavender and lemon verbena.

These plants with their special chemical compounds can have an inhibitory effect on the main receptors of the anxiety pathway and show a similar effect to the already approved drugs for anxiety disorders. In this study, the effect of the chemical compounds contained in the extracts of these plants was investigated using virtual screening and molecular docking methods on the main receptors of the anxiety system, and it was found that many of the compounds contained in these two plants, such as caryophyllene oxide, spatholenol, carvon, dihydrocarvon, geranial, neral, nerol, linalool, and linalool oxide, showed similar effects to the positive control drugs.

Key Words: Anxiety disorders, Serotonin, Norepinephrine

۱. مقدمه

۱-۱. اضطراب

اضطراب یک پاسخ عاطفی به تهدیدها یا خطرات احتمالی است که هنگامی که برای هشدار و آماده‌سازی یک ارگانیسم برای تهدیدات بالقوه سازگار شود، عادی تلقی می‌شود و زمانی که ناسازگار، دائمی و غیرقابل کنترل باشد و بر زندگی روزمره تأثیر منفی بگذارد، آسیب شناسی تلقی می‌شود. اضطراب می‌تواند گهگاه طولانی شده، بر فعالیت‌های روزمره تأثیر بگذارد و منجر به شرایط دیگری مانند افسردگی، سوء مصرف مواد مخدر، بیماری‌های قلبی عروقی و بی‌خوابی شود. آسیب‌پذیری نسبت به ایجاد اختلالات اضطرابی اغلب در دوران کودکی یا نوجوانی شروع می‌شود و به صورت مزمن تا بزرگسالی ادامه می‌یابد. در دنیای غرب، شیوع این اختلالات در طول زندگی تقریباً ۲۰ تا ۳۰ درصد در جمعیت شایع است که آن‌ها را به شایع‌ترین اختلالات عصبی-روانی تبدیل می‌کند، به طوری که زنان به طور قابل توجهی بیشتر از مردان و نزدیک به دو برابر مردان تحت تأثیر قرار می‌گیرند[۱،۲]. هنگام اضطراب، مغز انتقال دهنده‌های عصبی (معمولا دوپامین، سروتونین، اپی‌نفرین، استیل‌کولین و هیستامین) آزاد می‌کند که بدن را در حالت هوشیاری بالایی قرار می-دهد، یعنی بدن را برای پاسخ "جنگ یا گریز" به یک تهدید درک شده آماده می‌کند. با این حال، برخی از انتقال دهنده‌های عصبی وارد دستگاه گوارش می‌شوند و میکروبیوم روده را مختل می‌کنند که می‌توانند منجر به حالت تهوع شوند. در نتیجه مشکلات معده مانند تهوع و اسهال از شایع‌ترین علائم استرس و اضطراب هستند. ورود انتقال دهنده‌های عصبی به روده و تأثیر آن‌ها بر میکروبیوم، یکی از علل شایع و شناخته شده بیماری زخم پپتیک است. متأسفانه بسیاری از بیماران اعصاب و روان در دریافت درمان مناسب با مشکلاتی مواجه هستند[۲].بر اساس معیارهای مشاهدات بالینی، اختلالات اضطرابی را به اختلال اضطراب فراگیر (GAD)، فوبیا، اختلال اضطراب اجتماعی (SAD)، اختلال استرس پس از سانحه (PTSD)، اختلال هراس (PD) با یا بدون اورافوبیا، و اختلال وسواس فکری-اجباری (OCD) طبقه بندی می‌کنند. اختلالات اضطرابی اغلب همزمان با سایر اختلالات اضطرابی مانند افسردگی شدید رخ می‌دهند. برای مثال، در یک نظرسنجی بزرگ اروپایی مشخص شد که افسردگی شدید با تمام اختلالات اضطرابی ارتباط زیادی دارد به عنوان مثال GAD ارتباط زیادی با آگورافوبیا، اختلال هراس و اختلال اضطراب اجتماعی دارد[۱،۹]. با توجه به اینکه علائم اضطراب معمولاً ویژگی‌های اصلی همه این اختلالات هستند و تا حدودی مکانیسم‌های عصبی زیست‌شناختی همپوشانی دارند، توسعه دارو برای اختلالات اضطرابی، PTSD و OCD به طور مشترک در این بررسی مورد بحث قرار می‌گیرد و اصطلاح استفاده شده اضطراب و اختلالات مرتبط شامل همه این‌ها می‌شود. اختلالات اضطرابی با شیوع ۱۲ ماهه حدود ۱۰ درصد از جمعیت بزرگسال (یعنی حدود ۶،۸ میلیون بزرگسال) شایع‌ترین بیماری روانی در ایالات متحده (و احتمالاً در سطح جهانی) است.

شیوع جهانی اختلالات اضطرابی بر اساس داده های ۸۷ مطالعه در ۴۴ کشور در سراسر جهان ۷,۳ درصد برآورد شد[۲،۹].

۱-۲. داروهای ضد اضطراب

داروهای کاهش‌دهنده اضطراب برای قرن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در گذشته‌ای نزدیک، برای مقابله با علائم اضطراب اولین آرام‌بخش‌ها/ خواب‌آورهای مصنوعی مانند برومیدها، پارالدئید، کلرال هیدرات (قرن ۱۹) و به‌ویژه باربیتورات‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده از باربیتورات‌ها برای اختلالات اضطرابی و خواب پس از معرفی مپروبامات و به ویژه بنزودیازهای ایمن‌تر در دهه‌های ۵۰ و ۶۰ قرن بیستم به سرعت کاهش یافت. بنزودیازها توسط لئو استرنباخ در سال ۱۹۵۵ کشف شدند و توسط هافمن-لاروش در دهه ۱۹۶۰ برای اقدامات بالینی معرفی شدند[۱]. مهارکننده‌های انتخابی بازجذب سروتونین (SSRIs) (5-HT) و مهارکننده‌های انتخابی بازجذب نوراپی‌نفرین (SNRI) ، از جمله سیتالوپرام، سرترالین، فلوکستین در حال حاضر خط اول گزینه‌های درمانی دارویی برای اکثر اختلالات اضطرابی هستند. مهارکننده های انتخابی بازجذب سروتونین (SSRIs) رایج ترین داروهای ضد افسردگی هستند که برای درمان علائم افسردگی متوسط تا شدید و اختلالات اضطرابی تجویز می‌شوند. آن‌ها نسبتاً بی خطرهستند و معمولاً عوارض جانبی کمتری نسبت به سایر داروهای ضد افسردگی ایجاد می‌کنند. عملکرد آن‌ها افزایش سطح سروتونین و نوراپی نفرین در مغز با مسدود کردن یا به تاخیر انداختن بازجذب آن‌ها توسط نورون‌ها است که در درمان افسردگی، اختلالات اضطرابی و دردهای طولانی مدت (مزمن) به ویژه دردهای عصبی موثر هستند[۱]. سیستم‌های مونوآمین HT-۵، همراه با نورآدرنالین و دوپامین، انتقال‌دهنده‌های عصبی مونوآمین کلاسیک هستند که بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیکی و رفتاری مختلف، از جمله اضطراب، خلق و خو، پرخاشگری، پاسخ‌های استرس و جنبه‌های دیگر هیجانی را تنظیم می‌کنند. بسیاری از درمان های پزشکی کنونی اختلالات اضطرابی، مانند SSRI ها، SNRI ها، داروهای ضد افسردگی سه حلقه ای، مهارکننده های مونوآمین اکسیداز و بوسپیرون، در واقع بر انتقال عصبی HT-۵ (و سایر مونوآمین ها) تأثیر می‌گذارند، مانند داروهای روانگردان، از جمله سیلوسایبین، دی متیل تریپتامین و دی اتیل آمید اسید لیسرژیک (LSD) که به عنوان درمان های بالقوه اضطراب هستند. نقش HT-۵ و SSRI ها در اضطراب پیچیده است و مکانیسم های اعمال ضد اضطراب مرتبط با HT-۵ هنوز به طور کامل شناخته نشده‌است. افزایش غلظت HT-۵ در شکاف سیناپسی از طریق استفاده از SSRI ها می‌تواند هر یک از ۱۴ گیرنده HT-۵ مختلف جفت‌شده با پروتئین G را فعال کند [۱،۳،۸].اثرات ضد اضطرابی بنزودیازپاین‌ها بلافاصله پس از مصرف خوراکی یا تزریقی شروع می‌شود. برخلاف داروهای ضد افسردگی، بنزودیازپان‌ها در ابتدا منجر به افزایش عصبانیت و بی‌خوابی نمی‌شوند. در ایالات متحده، ۵۵ تا ۹۴ درصد از بیماران مبتلا به اختلالات اضطرابی با بنزودیازپان ها درمان می‌شوند. به همین ترتیب، مصرف بنزودیازپاین‌ها ممکن است با اختلالات سیستم عصبی مرکزی

مانند افسردگی، که منجر به خستگی، سرگیجه، افزایش زمان واکنش، اختلال در مهارت‌های رانندگی و سایر عوارض جانبی همراه باشد. دستورالعمل‌های فعلی بنزودیازپاین‌ها را به‌عنوان درمان‌های خط اول توصیه نمی‌کنند. بنزودیازپاین‌ها (BDZ) برای درمان GAD کارایی گسترده‌ای نشان می‌دهند و هنوز و حتی به طور فزاینده‌ای تجویز می‌شوند. کلردیازپوکساید (لیبریوم) یک بنزودیازپاین است که برای از بین بردن ترس و اضطراب قبل از جراحی از طریق تأثیر آن بر مغز و سیستم عصبی مرکزی استفاده می‌شود. تصور می‌شود مکانیسم اثر آن از طریق افزایش عملکرد GABA (گاما آمینوبوتیریک اسید)، انتقال دهنده عصبی بازدارنده اصلی در سیستم عصبی مرکزی بالغ باشد[۲،۴،۸،۹]. گابا مهم‌ترین انتقال‌دهنده عصبی مهار کننده در مغز است که از گلوتامات توسط آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز سنتز می‌شود، از وزیکول‌ها آزاد می شود و با بازجذب به پایانه‌های عصبی یا سلول‌های گلیال از سیناپس خارج می‌شود. GABA دو نوع اصلی از گیرنده-های موجود در مکان های پس سیناپسی، پیش سیناپسی و/یا خارج سیناپسی را فعال می‌کند. تنوع ساختاری بالای گیرنده‌های GABA-A و بیان متفاوت آن‌ها در مدارهای مغزی و محفظه‌های درون سلولی، کنترل مهاری بسیار پیچیده و دقیق مدارهای مغزی مهم در اضطراب را تعیین می‌کند. مطالعات حیوانی و انسانی نقش حیاتی گیرنده‌های GABA-A و GABA-B را در پردازش اضطراب و همچنین در پاتوژنز و آسیب‌شناسی اختلالات اضطرابی نشان داده‌اند[۴،۹]. بنزودیازپاین‌ها که برای چندین دهه مورد استفاده بالینی قرار گرفته اند، نه تنها اثرات ضداضطراب سریع نشان می‌دهند، بلکه دارای خواص آرام بخش، فراموشی آور، ضد تشنج، شل کننده عضلانی و اعتیادآور هستند. آن‌ها به عنوان تعدیل کننده های آلوستریک مثبت (PAMs) روی گیرنده‌های سازگار GABA-A عمل می‌کنند. محل اتصال BDZ بین زیر واحدهای α و γ گیرنده‌های هتروپنتامری گابا واقع شده است[۴].

با توجه به محدودیت‌های داروهای موجود، مانند تأخیر در شروع (مثلاً مهارکننده‌های انتخابی بازجذب سروتونین، مهارکننده‌های بازجذب سروتونین نوراپی‌نفرین، بوسپیرون) و همچنین عادت‌سازی، تحمل و پتانسیل سوء مصرف (مثلاً بنزودیازپاین‌ها، پرگابالین) و سایر عوامل محدود کننده عبارتند از عوارض جانبی، مانند آرام بخشی (به عنوان مثال، هیدروکسی زین، بنزودیازپین ها) تعداد فزاینده‌ای از متخصصان مراقبت‌های بهداشتی و افراد عادی به طور فعال در حال بررسی و ترویج داروها و درمان‌های مکمل و جایگزین (CAM) هستند. به طور خاص، اسانس‌ها و رایحه درمانی روش‌های درمانی مهم و رو به رشدی برای درمان اضطراب، تنظیم خلق و خو و بی‌خوابی علاوه بر خواص ضد باکتریایی، ضد التهابی و ضد درد هستند[۱،۲،۸].مجموعه ای از داروهای طبیعی که به طور سنتی برای کاهش علائم اضطراب استفاده می-شود، دامنه وسیعی دارد و ترکیبات گیاهی طبیعی و عصاره های‌گیاهی جدید به منظور شناسایی استراتژی-های درمانی جدید در حال مطالعه هستند .در حالی که چندین کلاس از فیتوکمیکال‌ها در حال حاضر در موارد اضطراب خفیف یا به عنوان مکمل درمان‌های ضد اضطراب معمولی در نظر گرفته شده‌اند، اثرات ضد اضطرابی فیتوکمیکال‌ها عمدتاً در مطالعات مربوط به مدل‌های حیوانی نشان داده شده‌است و روابط ساختار-

فعالیت، متابولیسم، جذب و مکانیسم‌های عصبی فارماکولوژیک در اکثر موارد واضح نیستند. با این حال، مدولاسیون سیستم GABA به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم چندین ماده شیمیایی گیاهی آشکار شده است. همچنین این ایده وجود دارد که ترکیبات فعال متعدد ممکن است به طور هم افزایی موثر باشند و از طریق مسیرهای مستقل اما به طور مکمل برای ایجاد حداکثر تأثیرات عمل کنند. دو نمونه از گیاهانی که در کارآزمایی‌های بالینی خواص ضد اضطرابی از خود نشان داداند، گیاهان اسطوخودوس و به‌لیمو هستند که در این پژوهش با استفاده از غربالگری مجازی و داکینگ مولکولی به بررسی خواص ضداضطرابی آن‌ها پرداخته می‌شود[۱،۲،۳].

۱-۳. اسطوخودوس

اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia Miller* یا *Lavandula ofcinalis Chaix*) ، گیاهی از خانواده *Lamiaceae*، در گونه‌های بسیاری با ویژگی‌های شیمیایی متفاوت وجود دارد. جنس اسطوخودوس تقریباً در ۳۰ گونه در سرتاسر جهان رشد کرده است که ترکیبات و خواص شیمیایی اصلی مشابهی دارند [۱،۳]. روغن اسطوخودوس اسانسی است که از گل‌ها و ساقه‌های گیاه اسطوخودوس با تقطیر با بخار آب استخراج می‌شود. این مایع بی‌رنگ یا زرد کم‌رنگ با رایحه‌ای شیرین، گلی و علفی است. روغن اسطوخودوس یک مخلوط چند عنصری است که حاوی بیش از ۱۶۰ ماده است. اجزای اصلی روغن اسطوخودوس عبارتند از: لینالول، لینالیل استات، ۱،۸- سینئول، ترپینئول و کامفور. اسطوخودوس دارای سابقه طولانی استفاده سنتی است و اسانس آن دارای طیف گسترده‌ای از اثرات بیولوژیکی است که با تقطیر با بخار تهیه می‌شود. به طور سنتی، اسطوخودوس به عنوان یک داروی گیاهی با خواص ضد اضطراب بوده است[۵]. ترکیبات کلیدی *L. Angustifolia*، که رایج‌ترین گونه اسطوخودوس است، لینالیل استات و لینالول هستند، و اگرچه لینالیل استات نسبت بیشتری دارد، لینالول به عنوان ماده فعال اولیه در نظر گرفته می‌شود. با این حال، هر دو جزء مسئول اثرات دارویی اسطوخودوس از جمله فعالیت آرام‌بخش هستند. در آلمان، عصاره اسانس استاندارد شده اسطوخودوس (SLO) بر اساس درصد لینالول برای تجویز خوراکی ساخته شده و برای استفاده در اضطراب تایید شده است[۳،۵،۹]. همچنین در مطالعات بالینی مشخص شده‌است که آروماتراپی با روغن اسطوخودوس در زنان، قبل از زایمان و جراحی سینه، اضطراب را کاهش می‌دهد. دو مطالعه انجام شده است که خواص ضد اضطرابی یک داروی اختصاصی روغن اسطوخودوس به نام سیلکسان را که به صورت خوراکی مصرف می‌شود، ارزیابی کرده است. مشخص شد که این کپسول در کاهش اضطراب با لورازپام (آتیوان) و پاروکستین (پاکسیل) در بیماران مبتلا به GAD برابر است[۲].روغن اسطوخودوس اثر ضد اضطراب قوی خود را از طریق مهار کانال‌های کلسیمی با ولتاژ (VOCCs) و کاهش فعالیت گیرنده سروتونین HT-۵ ایجاد می‌کند. این اثرات اکنون به اجزای اصلی روغن اسطوخودوس، یعنی الکل های مونوترپن لینالول و (+)-بورنئول و همچنین اکسید لینالول (محصول اکسیداسیون/تبدیل زیستی لینالول) نسبت داده می‌شود[۱،۲].در آزمایش‌های فارماکودینامیک in-vivo، نیز اثرات آرام‌بخشی اسطوخودوس نشان داده‌شده‌است.

زمانی که اسانس اسطوخودوس به صورت داخل صفاقی روی موش‌ها تجویز شد، مدت زمان بیهوشی ناشی از هکسوباربیتال سدیم را دو برابر کرد. برهمکنش اسانس اسطوخودوس با اهداف عصبی دارویی متعدد، مانند SERT (انتقال دهنده سروتونین) و گیرنده‌های یونوتروپیک (GABA-A)، مورد آزمایش قرار گرفت. در یک مطالعه پیشنهاد شد که اسانس اسطوخودوس می‌تواند به طور برگشت پذیر جریان‌های ناشی از GABA را به روشی وابسته به غلظت مهار کند[۵،۱۱].

۱-۴. به لیمو

یکی از گیاهان دیگری که خواص ضد اضطرابی از خود نشان می‌دهد، گیاه به لیمو (*Lippia citriodora*) است که بومی غرب آمریکای جنوبی است اما در منطقه مدیترانه و خاورمیانه نیز کشت می شود. به لیمو با نام علمی *Aloysia citrodora Paláu* یکی از گیاهان دارویی شناخته شده با چندین فعالیت درمانی است *A. citrodora* متعلق به خانواده *Verbenaceae* است. این گیاه به طور گسترده در آمریکای جنوبی برای اهداف دارویی و معطر و برای مدیریت بی‌خوابی و اضطراب در کشورهای آمریکای لاتین استفاده می‌شود. در طب سنتی مکزیک از این گیاه برای ناراحتی‌های معده، غم و اندوه و اختلالت عصبی استفاده می‌شود. در آرژانتین، این گیاه معمولاً به عنوان "سدرون" شناخته می‌شود و در تمام مناطق مرکزی و شمالی کشور رشد می‌کند و به‌عنوان یک داروی قلب و عروق و آرام‌بخش استفاده می‌شود. در اکوادور نیز از این گیاه برای کاهش اسپاسم و حملات عصبی استفاده می‌شود[۶،۷]. چندین دسته از مواد شیمیایی گیاهی در قسمت های مختلف A. citrodora شناسایی شده‌است. فلاونوئیدهای مختلفی از عصاره‌های متانولی، اتانولی یا آبی گیاه جدا می‌شوند. علاوه بر این، اسانس آن بیشتر از مونوترپن‌ها و مونوترپنوئیدها، سسکوی ترپن‌ها و سسکوی ترپنوئیدها و همچنین برخی از الکل‌های چرب تشکیل شده‌است. ترپن‌ها یکی از متنوع‌ترین کلاس‌های فیتوکمیکال‌ها هستند. طیف گسترده ای از ترپن‌ها و ترپنوئیدها در A. citrodora شناسایی شده‌اند که به شرح زیر مورد بحث قرار می‌گیرند: مونوترپن‌ها بیشتر در اسانس به دست آمده از اندام های هوایی A. citrodora شناسایی می‌شوند. ژرانیال، نرال، لیمونن، ۱و۸-سینئول، آلفا کورکومن، آلفا توجن، سابینن، سیترولنال و ترپینئول، مونوترپن‌های اصلی هستند که در اسانس برگ‌های شناسایی شده اند[۶،۷]. سسکوئی‌ترپن‌ها با اسکلت ۱۵ کربنی نیز در اسانس A. citrodora وجود دارند. بیشترین درصد آن‌ها مربوط به کاریوفیلن و ژرماکرن است[۷]. فنیل پروپانوئیدها دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که محصولات مسیر اسید شیکمیک هستند. احتمالاً مهمترین فنیل اتانوئید جدا شده از گیاه A. citrodora ورباسکوزید (استوزید) و مشتقات آن است که از عصاره متانولی اندام‌های هوایی جدا شده است. یکی از فراوان‌ترین پلی‌فنول‌های موجود در برگ‌های لیمو، ورباسکوزید است که یک فنیل پروپانوئید دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی، خواب‌آور و کاهنده اضطراب است که مکانیسم ضد اضطراب آن مربوط به اتصال ورباسکوزید به گیرنده‌های عصبی GABA-A، در همان محل بنزودیازپاین‌ها است، در نتیجه به طور بالقوه اثر مشابهی ایجاد می‌کند[۶].انتقال دهنده‌های عصبی گاما آمینوبوتیریک اسید

(GABA) برای تحریک خواب و ایجاد آرامش شناخته شده‌اند. سه گیرنده GABA شناخته شده به نام‌های A، B و C وجود دارد که GABA-A مربوط به خواب و اضطراب است. به طور خاص، چندین روش وجود دارد که عصاره‌های گیاهی توسط آن‌ها می‌توانند اثر خود را از طریق سیستم GABA اعمال کنند. در مطالعه‌ای اثر آرام‌بخشی عصاره به لیمو در حضور دیازپام افزایش یافت و با استفاده از فلومازنیل به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های بنزودیازپاین، اثر آن کاهش یافت. بنابراین، این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از عصاره گیاه به لیمو به‌عنوان جایگزینی طبیعی برای داروهای آرام‌بخش، که دارای عوارض جانبی زیادی هستند و می‌توانند باعث احساس وابستگی شود، می‌تواند مناسب باشد[۶].

۲. بخش تجربی

۲-۱. تهیه نمونه گیاهی و عصاره آبی گیاه

برای انجام این پژوهش، در فصل گلدهی گیاه اسطوخودوس و به لیمو اندام‌های هوایی گیاهان شامل گل و شکوفه‌های گیاه اسطوخودوس از روستای علوی واقع در منطقه‌ای به نام مشهد اردهال در فاصله ۴۲ کیلومتری غرب کاشان تهیه گردید. گیاهان جمع آوری شده پس از جداسازی قسمت‌های غیرقابل استفاده، به کمک حرارت غیر مستقیم خشک شده و سپس نمونه‌های خشک شده در دستگاه‌های مخصوص آسیاب و چرخ کن خرد و پودر گردیدند. تهیه عصاره آبی گیاه به کمک دستگاه کلونجر و با نسبت ۱ به ۳ از پودر خشک گیاه و آب، انجام گرفت[۱۳].

۲-۲. آنالیز ترکیبات شیمیایی

به منظور بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره آب‌پایه این گیاهان، از دستگاه گاز کروماتوگراف _طیف سنج جرمی یا GC-MS مرکزپژوهش‌های گیاهان دارویی استفاده شد. این روش آنالیزی است که از تلفیق خصوصیات کروماتوگرافی گازی و طیف سنج جرمی برای شناسائی مواد مختلف در یک نمونه استفاده می‌نماید[۱۴].

۲-۳. آنالیز بیوانفورماتیکی و داکینگ مولکولی

جهت بررسی خاصیت ضد التهابی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاهان اسطوخودوس و به لیمو که در آنالیز GC-MS گزارش شده‌است، اثر مهارکنندگی این لیگاندهای شیمیایی روی آنزیم‌های اصلی مسیر اضطراب از جمله آنزیم‌های GABA(A) Receptor (PDBID : 4cof)، Sodium dependent serotonin transporter (PDBID : 5i74) و 5-hydroxytryptamine receptor type 3 (PDBID :6w1m) توانایی و قدرت اتصال لیگاندهای شیمیایی این گیاه با جایگاه فعال آنزیم‌های مورد مطالعه با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی ترکیبات شیمیایی (PubChem) بانک داده‌های پروتئینی (PDB)، نرم افزار PyRx و نرم افزار Chimera 1.8.1، مورد بررسی قرار گرفت و در انتها ویژگی‌های فارماکوکینتیک لیگاندهای این گیاهان توسط پایگاه داده SWISS ADME مورد بررسی قرار گرفت[۱۵-۲۲]

۳. نتایج و بحث

۳-۱. نتایج حاصل از آنالیز GC-MS

طبق نتایج حاصل از آنالیز GC-MS که توسط مرکز پژوهش‌های گیاهان دارویی، گزارش شده‌است، گیاه اسطوخودوس با ۳۶ ترکیب مجزا مجموعا ۹۲,۶۱ درصد از اسانس گیاه اسطوخودوس را تشکیل داده‌اند که از بین آن‌ها ۱۱ ترکیب Linalool با درصد ۳۷,۰۸، Borneol با درصد ۹,۶۳، Terpineolبا درصد ۷,۶۹، geraniol با درصد ۴,۶۸، Caryophyllene oxide با درصد ۴,۱۷، Terpinen-4-ol با درصد ۳,۴۱، *1.8*-Cineole با درصد ۲,۹۲، Camphor با درصد ۲,۸۶، *cis*-Linalool oxide با درصد ۲,۵۵، Lavandulol با درصد ۲,۱۵ و Cryptone با درصد ۲,۰۴ با مجموع ۷۹,۱۸ درصد، دارای بالاترین درصدها می‌باشند. طبق نتایج حاصل از آنالیز GC-MS که توسط مرکز پژوهش‌های گیاهان دارویی، گزارش شده‌است، گیاه به‌لیمو با ۳۴ ترکیب مجزا مجموعا ۸۸,۶۰ درصد از اسانس گیاه به‌لیمو را تشکیل داداند که از بین آن‌ها ۱۴ ترکیب Neral با درصد ۱۵,۰۱، Dill apiole با درصد ۱۳,۱۸، Spathulenol با درصد ۱۲,۷۱، D-Carvone با درصد ۹,۷۵، Geranial با درصد ۶,۶۰، Caryophyllene oxide با درصد ۳,۸۱، *1,8*-Cineole با درصد ۳,۴۹، *6*-*methyl*-*5*-Hepten-2-one با درصد ۳,۴۰، Thymol با درصد ۲,۵۰، Nerol با درصد ۲,۴۷، Terpineol با درصد ۲,۲۶، *cis*-Dihydro carvone با درصد ۲,۰۳، Linalool با درصد ۱,۳۹ و Rosefuran epoxide با درصد ۱,۰۱ با مجموع ۷۹,۶۱ درصد دارای بالاترین درصدها می‌باشند.

۳-۲. نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیک و داکینگ مولکولی

آماده‌سازی پروتئین‌ها (گیرنده)

به منظور بررسی قدرت اتصال لیگاندهای شناسایی شده در آنالیز کروماتوگرافی گازی عصاره گیاهان اسطوخودوس و به لیمو با آنزیم‌های اصلی درگیر در مسیر اضطراب ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها از پایگاه بانک اطلاعاتی پروتئین (PDB) با کدهای 4cof و 5i74 و 6w1m، دریافت شد. ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار chimera بهینه سازی شده، لیگاندهای متصل به آن‌ها و مولکول‌های آب و حلال از ساختار ۳ بعدی حذف شد، اتم‌های هیدروژن درگیر در اتصالات هیدروژنی به ساختار اضافه شده و ساختار در حالت کمترین سطح انرژی ممکن قرار گرفت.

آماده سازی لیگاندها

ساختار سه بعدی لیگاندهای شناسایی شده در آنالیز کروماتوگرافی گازی عصاره گیاهان اسطوخودوس و به-لیمو و ساختار سه بعدی داروهای زاناکس، کلنازپام و لورازپام، دیازپام و کلرودیازپوکساید به عنوان داروهای مهارکننده دارای تاییدیه برای آنزیم GABA(A) Receptor، داروهای سرترالین، فلوکستین، سیتالوپرام و

استالیوپرام برای آنزیم Sodium dependent serotonin transporter و داروهای جرانیسترون، اندانسترون و راموسترون برای انزیم 5-hydroxytryptamine receptor type 3 به عنوان نمونه کنترل مثبت با قدرت اتصال بالا از پایگاه شیمیایی PubChem دریافت شد.

داکینگ مولکولی

با استفاده از نرم افزار PYRX و افزونه وینا ویزارد، داکینگ مولکولی بین آنزیم‌های مورد مطالعه و لیگاندهای شیمیایی استخراج شده از گیاهان و داروهای کنترل مثبت، انجام شد.

۳-۳. تفسیر نتایج حاصل از داکینگ مولکولی

نتایج حاصل از داکینگ مولکولی با استفاده از دو شاخص قدرت اتصال و شاخص ناپایداری مورد بررسی و تفسیر قرار گرفت. اتصالات بین رسپتور و لیگاند با شاخص قدرت اتصال منفی‌تر و و شاخص ناپایداری نزدیک به عدد صفر، مناسبترین اتصال بین لیگاند و گیرنده را نشان می‌دهند. اتصالات مناسب از نظر داشتن مناسب‌ترین قدرت اتصال و شاخص ناپایداری نسبت به اتصال بین پروتئین گیرنده و لیگاندهای مهارکننده انتخابی، از جنبه نوع آمینواسیدهای مهم درگیر در پیوند از گیرنده و تعداد پیوند های تشکیل شده بین گیرنده و لیگاندها نیز مورد بررسی قرار گرفتند. نزدیکترین نتایج حاصل از این آزمایشات به داروهای مورد تایید در جداول و شکل‌های ۱-۶ آورده‌شده‌است.

جدول ۱. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی آنزیم Sodium dependent serotonin transporter و ترکیبات شیمیایی گیاه اسطوخودوس و به‌لیمو

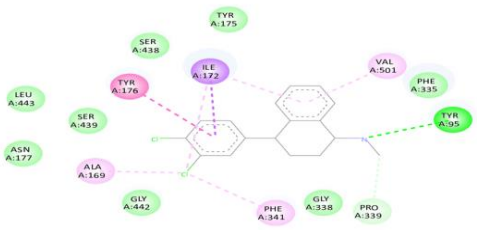
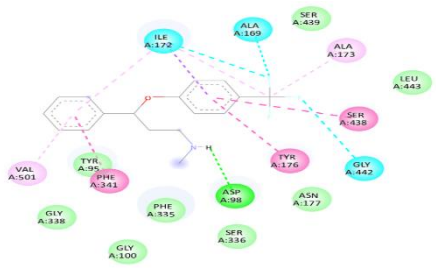
Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub
refine.sdst.5i74_sertraline_uff_E=226.21	-9.4	0
refine.sdst.5i74_fluoxetine_uff_E=244.75	-8.5	0
refine.sdst.5i74_Caryophyllene_oxide_uff_E=2180.22	-8.3	0
refine.sdst.5i74_Spathulenol_uff_E=1727.92	-8.3	0
refine.sdst.5i74_escitalopram_uff_E=365.62	-7.6	0
refine.sdst.5i74_D-Carvone_uff_E=108.41	-6.9	0
refine.sdst.5i74_Dihydro_carvone_uff_E=64.40	-6.9	0
refine.sdst.5i74_Thymol_uff_E=95.97	-6.7	0
refine.sdst.5i74_Borneol_uff_E=463.97	-6.6	0
refine.sdst.5i74_Dill_apiole_uff_E=304.43	-6.6	0
refine.sdst.5i74_Terpineol_uff_E=147.80	-6.5	0

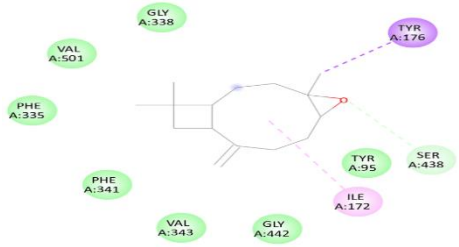
refine.sdst.5i74_alpha-Terpineol_uff_E=166.31	-6.4	0
refine.sdst.5i74_Terpinen-4-ol_uff_E=155.64	-6.3	0
refine.sdst.5i74_Rosefuran_epoxide_uff_E=1750.86	-6.1	0

در بین نتایج مطرح شده، لیگاندهایی با binding affinity منفی تر و rmsd پایینتر و نزدیک به صفر، مناسبترین و پایدارترین اتصال را با جایگاه فعال آنزیم دارند که این شرایط مربوط به داروهای تایید شده میباشد.

همانطور که در جدول مشاهده میشود، کاریوفیلن اکساید به عنوان لیگاند لوندر با درصد ۴,۱۷، با انرژی اتصال نزدیک به داروهای تایید شده مهارکننده این آنزیم، میتواند حدود ۸۸ درصد فعالیت مشابه با داروی سرترالین، ۹۷ درصد با داروی فلوکستین و همین طور از داروی سیتالوپرام و اسیتالوپرام عملکرد بهتری داشته باشند. این مطلوبیت اتصال به ترتیب مطرح شده در جدول برای لیگاندهای دیگر کاهش می‌یابد.

جدول۲. نتایج حاصل از بررسی اتم‌های درگیر در اتصالات داکینگ مولکولی

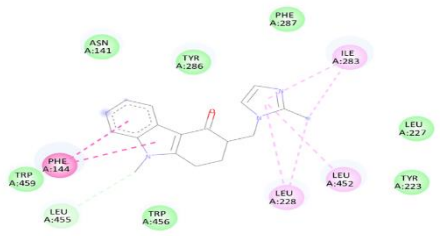
جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم Sodium dependent serotonin transporte و داروی سرترالین به عنوان لیگاند مهارکننده	
جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم Sodium dependent serotonin transporte و داروی فلوکستین به عنوان لیگاند مهارکننده آنزیم	

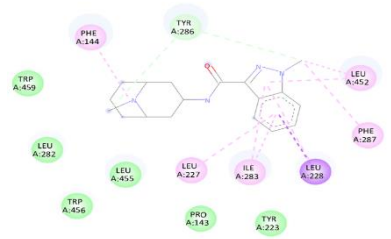
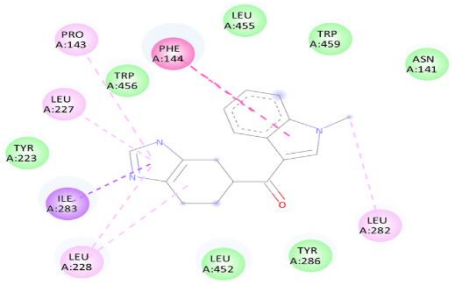
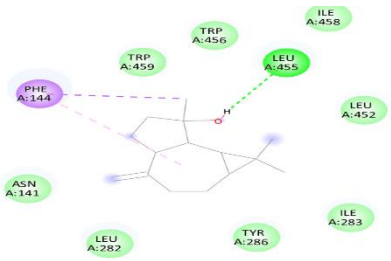
جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم Sodium dependent serotonin transporte و لیگاند کاریوفیلن اکساید	

جدول۳. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی آنزیم 5-hydroxytryptamine receptor type 3 و ترکیبات شیمیایی گیاه اسطوخودوس و به‌لیمو

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub
6w1m.refined_granisetron_uff_E=566.04	-8.1	0
6w1m.refined_Spathulenol_uff_E=1727.92	-7.8	0
6w1m.refined_ondansetron_uff_E=643.23	-7.7	0
6w1m.refined_ramosetron_uff_E=642.91	-7.7	0
6w1m.refined_Caryophyllene_oxide_uff_E=2180.22	-7	0
6w1m.refined_D-Carvone_uff_E=108.41	-6.1	0

جدول۴. نتایج حاصل از بررسی اتم‌های درگیر در اتصالات داکینگ مولکولی

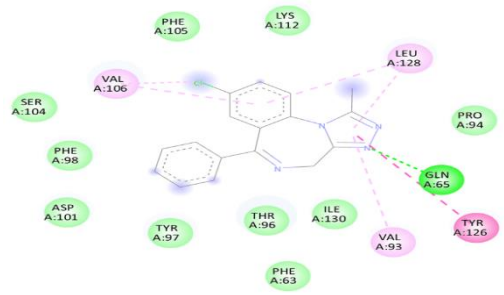
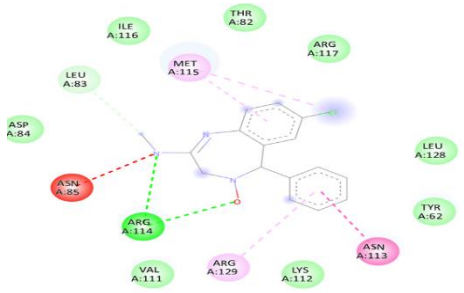
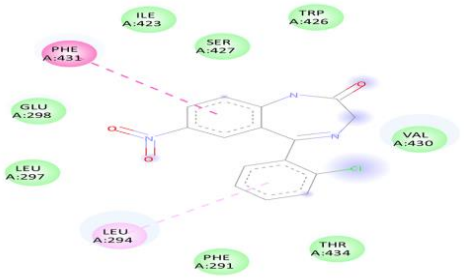
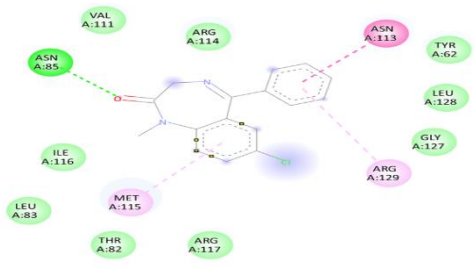
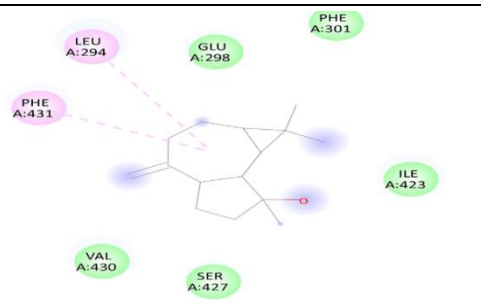
جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم-5 hydroxytryptamine receptor type 3 و داروی اندانسترون به عنوان لیگاند مهارکننده	

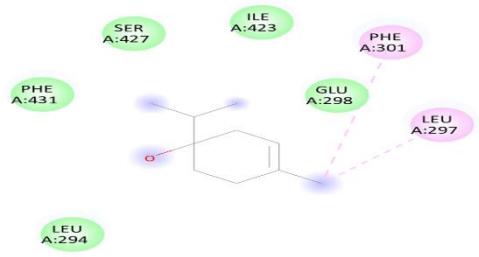
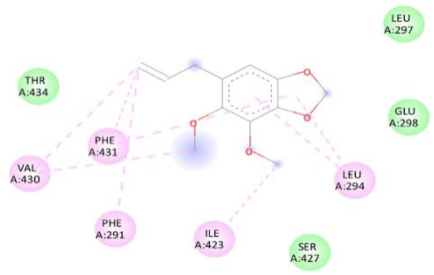
جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم-5 hydroxytryptamine receptor type 3 و داروی جرانیسترون به عنوان لیگاند مهارکننده آنزیم	
جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم-5 hydroxytryptamine receptor type 3 و داروی راموسترون	
جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم-5 hydroxytryptamine receptor type 3 و لیگاند اسپاتولنول	

جدول۵. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی آنزیم GABA(A) Receptor و ترکیبات شیمیایی گیاه اسطوخودوس و به‌لیمو

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub
refine.gaba.receptor4cof_alprazolam.xanax_uff_E=591.21	-7.2	0
refine.gaba.receptor4cof_chlordiazepoxide_uff_E=512.52	-7	0
refine.gaba.receptor4cof_clonazepam_uff_E=452.08	-6.7	0
refine.gaba.receptor4cof_diazepam_uff_E=365.23	-6.6	0
refine.gaba.receptor4cof_Spathulenol_uff_E=1727.92	-6.1	0
refine.gaba.receptor4cof_Caryophyllene_oxide_uff_E=2180.22	-5.8	0

جدول۶ .نتایج حاصل از بررسی اتم‌های درگیر در اتصالات داکینگ مولکولی

	جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم GABA(A) Receptor و داروی آلپرازولام به عنوان لیگاند مهارکننده
	جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم GABA(A) Receptor و داروی کلرودیازپوکساید به عنوان لیگاند مهارکننده آنزیم
	جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم GABA(A) Receptor و داروی کلنازپام
	جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم GABA(A) Receptor و داروی دیازپام
	جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم GABA(A) Receptor و اسپاتولنول

جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم GABA(A) Receptor و ترپینئول	
جایگاه اتصال و آمینواسید های درگیر در اتصال آنزیم GABA(A) Receptor و دیل آپیئول	

نتایج حاصل از پیشبینی فارماکوکینتیک لیگاندهای گیاه اسطوخودوس و به‌لیمو:

نتایج حاصل از پیشبینی فارماکوکینتیک لیگاندهای این دو گیاه نشان میدهد که تمامی این لیگاندها قوانین لیپینسکی را تایید میکنند و میتوانند به عنوان دارو مورد استفاده قرار بگیرند و در دارپلات رسم شده در پایگاه داده swiss ADME در ناحیه به رنگ صورتی میباشند که مطلوب ترین حالت ممکن است و می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیبات آثار سمی ندارند.

۴. نتیجه‌گیری

بنابر نتایج به دست آمده از مطالعات غربالگری مجازی، گیاهان اسطوخودوس و به‌لیمو به عنوان گیاه بومی ایران با پروفایل گیاهی و ترکیبات شیمیایی خاص خود می‌توانند به عنوان منابع غنی از ترکیبات طبیعی با فعالیت ضد اضطرابی و مهارکننده فعالیت آنزیم‌های اصلی مسیر اضطراب باشند و با توجه به پیش‌بینی ویژگی‌های فارماکوکینتیکی این لیگاندها، می‌توانند به عنوان جایگزین مناسب برای داروهای ضد اضطرابی مرسوم که دارای عوارض جانبی متعدد هستند، در نظر گرفته شوند. پیشنهاد میشود فعالیت ضد اضطرابی فیتوکمیکال‌های گیاهان اسطوخودوس و به‌لیمو در مطالعات پیش رو در سطح آزمایشگاهی و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

منابع

1. Sartori, S.B. and Singewald, N., 2019. Novel pharmacological targets in drug development for the treatment of anxiety and anxiety-related disorders. *Pharmacology & therapeutics*, *204*, p.107402.
2. Buch, R.M. and Von Fraunhofer, J.A., 2019. Lavender essential oil aromatherapy for anxiety. *EC Psychology and Psychiatry*, *8*(12), pp.01-09.

3. Malcolm, B.J. and Tallian, K., 2017. Essential oil of lavender in anxiety disorders: Ready for prime time?. *Mental Health Clinician*, *7*(4), pp.147-155.
4. Bandelow, B., Michaelis, S. and Wedekind, D., 2022. Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*.
5. Kim, M., Nam, E.S., Lee, Y. and Kang, H.J., 2021. Effects of lavender on anxiety, depression, and physiological parameters: systematic review and Meta-analysis. *Asian nursing research*.
6. Martínez-Rodríguez, A., Martínez-Olcina, M., Mora, J., Navarro, P., Caturla, N. and Jones, J., 2022. Anxiolytic Effect and Improved Sleep Quality in Individuals Taking Lippia citriodora Extract. *Nutrients*, *14*(1), p.218.
7. Bahramsoltani, R., Rostamiasrabadi, P., Shahpiri, Z., Marques, A.M., Rahimi, R. and Farzaei, M.H., 2018. Aloysia citrodora Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, *222*, pp.34-51.
8. Bandelow, B., Reitt, M., Röver, C., Michaelis, S., Görlich, Y. and Wedekind, D., 2015. Efficacy of treatments for anxiety disorders: a meta-analysis. *International clinical psychopharmacology*, *30*(4), pp.183-192.
9. Reinhold, J.A. and Rickels, K., 2015. Pharmacological treatment for generalized anxiety disorder in adults: an update. *Expert opinion on pharmacotherapy*, *16*(11), pp.1669-1681.
10. Koen, N. and Stein, D.J., 2022. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. *Dialogues in clinical neuroscience*.
11. Yap, W.S., Dolzhenko, A.V., Jalal, Z., Hadi, M.A. and Khan, T.M., 2019. Efficacy and safety of lavender essential oil (Silexan) capsules among patients suffering from anxiety disorders: A network meta-analysis. *Scientific Reports*, *9*(1), p.18042.
12. Donelli, D., Antonelli, M., Bellinazzi, C., Gensini, G.F. and Firenzuoli, F., 2019. Effects of lavender on anxiety: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*, *65*, p.153099.
13. Bruni, O., Ferini-Strambi, L., Giacomoni, E. and Pellegrino, P., 2021. Herbal remedies and their possible effect on the GABAergic system and sleep. *Nutrients*, *13*(2), p.530.
14. Hübschmann, H.J., 2015. *Handbook of GC-MS: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
15. Kim, S., Thiessen, P.A., Bolton, E.E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B.A. and Wang, J., 2016. PubChem substance and compound databases. *Nucleic acids research*, *44*(D1), pp.D1202-D1213.
16. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B. and Zaslavsky, L., 2019. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research*, *47*(D1), pp.D1102-D1109.
17. Rose, P.W., Prlić, A., Altunkaya, A., Bi, C., Bradley, A.R., Christie, C.H., Costanzo, L.D., Duarte, J.M., Dutta, S., Feng, Z. and Green, R.K., 2016. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic acids research*, p.gkw1000.
18. Rose, P.W., Prlić, A., Bi, C., Bluhm, W.F., Christie, C.H., Dutta, S., Green, R.K., Goodsell, D.S., Westbrook, J.D., Woo, J. and Young, J., 2015. The RCSB Protein Data Bank: views of structural biology for basic and applied research and education. *Nucleic acids research*, *43*(D1), pp.D345-D356.

19. Pawar, R.P. and Rohane, S.H., 2021. Role of autodock vina in PyRx molecular docking.
20. Dallakyan, S. and Olson, A.J., 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Chemical biology: methods and protocols*, pp.243-250.
21. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, *25*(13), pp.1605-1612.
22. Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V., 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, *7*(1), p.42717.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲
ISC

بررسی ژن ها و microRNA های دخیل در مقاومت دارویی چندگانه در درمان سرطان پستان سه گانه منفی

آرزو خاتونی پودینه[۱]، علی شهرکی[۱*]، رقیه شیر ولیلو[۲*]، صدیقه سادات مرتضوی[۳]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
۲- مرکز تحقیقات فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

مقدمه: شیوع مقاومت دارویی در تمام اشکال سرطان سینه، به خصوص در سرطان سینه سه بار منفی (TNBC)، یکی از چالش‌های بسیاری است که مدیریت این بیماری با تمام پیشرفت‌هایی که داشته هنوز با آن مواجه است.

روش‌ها: مطالعه کنونی با هدف بررسی ژن‌ها و میکروآران‌هایی که در مقاومت چند دارویی در درمان سرطان سینه نقش دارند، با استفاده از رویکردهای بایوانفورماتیک، به منظور معرفی هدف‌های درمانی مناسب و همچنین بیونمایگرهای پیش‌بینی و درمان با استفاده از دیتاست‌های GSE45898 و GSE47994 از پایگاه داده Gene Expression Omnibus (GEO) که نمونه‌های تومور مقاوم و پاسخ‌دهنده را شامل می‌شود، صورت گرفت. آنالیزهای بعدی با استفاده از زبان کامپیوتر R و بسته‌های مرتبط مانند Limma انجام شد. سایت KEGG FunRich برای انجام تحلیل انتولوژی ژن و شناسایی شبکه‌های سیگنال‌دهی KEGGو انتخاب ژن‌هایی با بیان تغییر یافته (DEGs) بر اساس معیار p.value <0.05 استفاده شد. علاوه بر این، میکروآران‌هایی که با DEGs های کشف شده ارتباط داشتند، با استفاده از پکیج MIRSystem پیدا شدند. همچنین، شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) و ارتباط بین ژن‌های کشف شده و میکروآران تنظیم کننده آن‌ها با استفاده از برنامه Cytoscape و STRING مشخص گردیدند.

نتایج: به طور کلی، در دیتاست GSE45898، ۳۱۲ ژن (۲۴۰ ژن با بیان بیشتر و ۷۲ ژن با بیان کمتر) و در دیتاستGSE47994 ، ۴۱۱ ژن (۷۴ ژن با بیان بیشتر و ۳۳۷ ژن با بیان کمتر) شناسایی شد. تحلیل‌های بعدی نشان داد که این ژن‌ها در شبکه‌های ارتباطی متعددی شامل انتقال اپیتلیال به مزنکیمال (EMT) نیز نقش دارند.

نتیجه‌گیری: در نتیجه، با استفاده از پیشرفت‌های بایوانفورماتیکی برای اهداف درمانی و شناسایی زودهنگام این نوع تومور، این کار با باز کردن درب تحقیقات اضافی، با افشای تعداد زیادی از ژن‌ها و میکرو آران‌های رابطه‌دار با فرآیند مقاومت در درمان TNBC، صورت گرفته است.

کلیدواژه‌ها: سرطان پستان؛ سرطان پستان سه گانه منفی؛ میکروآران‌ها؛ بیومارکر.

Evaluation of the differentially expressed genes and DEmiRs involved in MDR treatment of Triple-negative breast cancer

Arezoo Khatooni Poudineh[1], Ali Shahraki[1*], Roghayeh Sheervalilou[2*], Sedigheh Sadat Mortazavi[3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
[2]Pharmacology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
[3]Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

*Co-corresponding Authors:
1. Dr. Ali Shahraki,
Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
Email: ashahraki@science.usb.ac.ir

2.Dr. Roghayeh Sheervalilou,
Pharmacology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
E-mail: sheervalilour@tbzmed.ac.ir

Abstract

Introduction: Breast cancer, particularly triple-negative breast cancer (TNBC), poses a significant challenge in the field of oncology. Despite the remarkable progress made in understanding the underlying mechanisms and developing novel treatment approaches, TNBC remains a formidable adversary. Drug resistance, in particular, has emerged as a major hurdle in effectively combating this aggressive form of breast cancer.

Methods: To address this challenge, the current study employed cutting-edge bioinformatics techniques to unravel the genetic and molecular factors involved in multidrug resistance. By harnessing the power of computational analysis, researchers delved deep into the intricate interplay between genes, microRNAs, and signaling networks to identify potential therapeutic targets and predictive biomarkers.

The investigation focused on two comprehensive datasets, GSE45898 and GSE47994, obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. These datasets offered valuable insights into the gene expression profiles of both resistant and responsive TNBC tumors. Leveraging the computational prowess of the R programming language and utilizing specialized packages like Limma, researchers conducted sophisticated analyses to extract meaningful information from the vast amount of genomic data.

One of the key aspects of the study involved the utilization of the KEGG FunRich platform for ontology analysis of genes and the identification of KEGG signaling networks. This approach allowed researchers to gain a deeper understanding of the functional roles and

pathways associated with the differentially expressed genes (DEGs). By applying stringent statistical criteria (p-value < 0.05), a robust list of DEGs was established, revealing genes that exhibited significant changes in expression levels between drug-resistant and drug-responsive TNBC tumors.

Results: The results of the study unveiled a rich landscape of genetic alterations and molecular dysregulations in drug-resistant TNBC tumors. In the GSE45898 dataset, 312 genes exhibited significant differential expression, with 240 genes upregulated and 72 genes downregulated. Similarly, in the GSE47994 dataset, 411 genes displayed altered expression patterns, with 74 genes upregulated and 337 genes downregulated. These findings underscore the complexity and heterogeneity of TNBC and provide potential targets for future therapeutic interventions.

Conclusion: The integration of bioinformatics approaches with high-throughput genomic data has opened new avenues in our understanding of TNBC drug resistance. By deciphering the intricate molecular landscape, identifying novel targets, and elucidating the regulatory networks involved, this study paves the way for the development of more effective and personalized treatment strategies for TNBC patients.

Key word: breast cancer**,** triple-negative breast cancer, micro- RNAs, bimarker

مقدمه

شایع ترین نوع سرطان در میان زنان، سرطان پستان است [۱]. با تقریبا ۲,۳ میلیون مورد یا حدود ۱۱,۷ درصد از تمامی بیماران سرطان، سرطان پستان در صدر لیست سرطان های انسانی قرار دارد. بر اساس عوامل پیش بینی کننده برای بقا، وضعیت بیان گیرنده های استروژن (ER) ، پروژسترون (PR) و فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲(HER2) ، طبقه بندی سنتی و رایج سرطان پستان است [۲]. تاموکسیفن، فولوسترانت و مهارکننده های آروماتاز نمونه هایی از درمان هدفمند برای سرطان های پستان ER/PR مثبت و-HER2 غنی شده هستند که دارای پیش آگهی بهتری برای بقا نسبت به تومور های منفی سه گانه (TNBC)هستند که از بیان ER/PR و HER2 محروم می‌باشد [۳]. به دلیل عدم وجود داروهای هدفمند، TNBCها یک سرطان مهاجم شناخته می شوند و معمولا با شیمی درمانی معمول (آنتراسیکلین، تاکسان ها) درمان می شوند [4] .استفاده از آنتراسیکلین‌ها (مانند آدریامایسین و اپیرامایسین) و تاکسان‌ها (مانند سیتوکسان)، به صورت پی در پی یا همزمان، اساس شیمی‌درمانی سنتی سرطان پستان هستند [۵]. برای درمان هورمونی سرطان پستان، داروهای ضد استروژن مانند تاموکسیفن و مهارکننده‌های آروماتاز مانند لتروزول، انتخابات رایجی هستند [۶]. بیمارانی که سرطان پستان HER-2 مثبت دارند می‌توانند از درمان هدفمند استفاده کنند و داروی اصلی آن، آنتی بادی مونوکل کلونال تراستوزوماب (هرسپتین) است [۷]. شیمی‌درمانی بخش حیاتی از برنامه درمانی موفق است، اما مقاومت دارویی ممکن است از بهره‌مندی نصف بیماران از آن جلوگیری کند. بنابراین، مقاومت شیمی‌درمانی مانع مهمی برای درمان موثر سرطان پستان است.

RNAهای کوچک غیر کدگذاری شده به نام میکرو آر ان (miRNA) در مرحله پس از بیان، بیان ژن را کنترل می کنند [۸]. طبق مطالعات، miRNAها در سرطان های انسان به صورت غیر طبیعی بیان می شوند و با تشکیل سرطان، پخش سرطان، پیشرفت و مقاومت درمانی مرتبط هستند [۹]. افزایش اخیر در

شیوع سرطان و ظهور مقاومت در برابر دارو در بسیاری از انواع تومورها باعث شده است تا تمرکز تحقیقات سرطان به سمت زمینه های جدیدی که پایه روشنی برای ایجاد درمان های پزشکی شخصی سازی شده را فراهم می کنند، معطوف شود. miRNA ها در این راه با ارائه اطلاعاتی برای شناسایی زودرس سرطان، به توسعه یک برنامه درمانی ویژه کمک می کنند و همچنین با کمک در مطالعه حساسیت و مقاومت به دارو، می توانند در این زمینه از تحقیقات سرطان به ما کمک کنند [۹].

چندین تحقیق در سال های اخیر، عملکردهای مختلفی از miRNA را در حساسیت یا مقاومت سرطان سینه به شیمی درمانی بررسی کرده اند. اما مکانیزم دقیقی که این miRNA ها چگونه به حساسیت / مقاومت شیمی‌درمانی کمک می‌کنند، هنوز در هیچ یک از این تحقیقات شناسایی نشده است و این یک محدودیت در این زمینه است. ما قصد داریم با مطالعه رابطه بین بیان برخی از miRNA ها و مقاومت و حساسیت شیمی درمانی مرتبط با سرطان سینه، این کار را در یک موقعیت بالینی قابل اجرا کنیم. علاوه بر این، این تحقیق راهی برای توسعه رویکردهای درمانی جدیدی که به طور خاص، این miRNA ها را هدف قرار میدهند و همچنین روش‌های جایگزین برای جلوگیری از ایجاد مقاومت درمانی شیمیایی در سرطان سینه را فراهم می‌کند.

مواد و روش‌ها

دریافت مجموعه داده‌های میکروآرایه

مجموعه داده‌های میکروآرایه مرتبط با مقاومت دارویی سرطان پستان، شامل GSE45898 وGSE47994 ، از مجموعه داده‌های GEO (Gene Expression Omnibus) در مرکز ملی بیوتکنولوژی (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)، که به تعداد ۱۰ و ۱۳۳ نمونهTNBC ، به ترتیب، شامل می‌شوند، دریافت شدند .بیماران TNBC در مجموعه داده GSE45898 به مدت سه هفته در چهار دور از داروهای

Epirubicin (75 mg/m2)، Cyclophosphamide (750 mg/m2)، و Docetaxel (100 mg/m2) به صورت وریدی استفاده کردند؛ بیماران TNBC در مجموعه داده GSE47994 از داروهای شیمی درمانی Vinorelbine و Docetaxel استفاده کرده بودند. کلیه بیماران موجود شامل ۱۰۲ بیمار مقاومت به دارو و ۳۱ بیمار به‌عنوان پاسخ به درمان طبقه‌بندی شدند. در اینجا ذکر این نکته اهمیت دارد که در مطالعه کنونی، بیماران مقاومت به درمان به عنوان موارد مورد بررسی دسته‌بندی شدند، درحالیکه بیمارانی که به درمان پاسخ می‌دهند، به‌عنوان اعضای گروه کنترل دسته‌بندی گردیدند.

شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت شناسایی(DEGs)

قبل از انجام نرمال‌سازی سیگنال‌ها با استفاده از روش بنجامینی-هوچبرگ، پس‌زمینه سیگنال ها از داده‌ها حذف گردید. پس از نرمال‌سازی، ژن‌های با بیان متفاوت بین بیماران TNBC مقاوم به درمان در مقایسه با بیماران حساس به شیمی درمانی با استفاده از پکیج limma در R استخراج شدند. با استفاده از معیار مطالعه‌ی ما (P.value < 0.05 و LogFC > 1)، ژن‌های با بیان متفاوت تعریف شدند.

تحلیل مسیر و اندازه‌گیری کارکرد ژنی

برای ژن‌های با تفاوت بیان ، تحلیل مسیرهای پیامرسانی به دو شیوه Gene Ontology (GO) و Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway (KEGG) با استفاده از ابزار بر خط (نسخه ۳،۱،۳) (http://funrich.org/index.html) صورت گرفت. در این تحلیل‌ها، داده‌هایی که در سطح معناداری P < 0.05قرار داشتند، انتخاب شدند[۱۰].

پیش‌بینی miRNA های هدف گیرنده‌ی ژن های با بیان متفاوت

ژن‌های مورد هدف miRNA ها، موضوع چندین ابزار پیش‌بینی بوده‌اند، اما در بسیاری از الگوریتم‌های مورد استفاده نتایج متضاد به دست آمده است. علاوه بر این، نام‌گذاری miRNA های انسان در حال تغییر مداوم

است که ممکن است تجزیه و تحلیل را دشوارتر کند. MiRSystemبا یکپارچه کردن شناسایی ژن هدف و تحلیل مسیر سیگنالینگ، دانش مربوط به miRNA های مورد بررسی را به‌روزرسانی می‌کند و به پیش‌بینی عملکرد آنها می‌پردازد. این ابزار، به راحتی به شناسایی ژن های هدف و مسیرهای مربوطه برای چندین miRNAدر یک زمان کمک می‌کند و برای پاسخ به این مشکلات مناسب است.

به عبارت دیگر، پایگاه داده MiRSystem یک ابزار ساده برای شناسایی همزمان ژن‌های هدف و مسیرهای مرتبط با چندین miRNA را ارائه می‌دهد. در این مطالعه، با استفاده از این پایگاه داده و با کمک ژن‌های به دست آمده، miRNA های هدف دهنده‌ی اصلی شناسایی شدند و با استفاده از نرم‌افزارCytoscape ، یک نمودار شبکه به عنوان نشان دهنده تعاملات بین miRNAsو ژن‌های هدف آن‌ها، ساخته شد.

شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) و شبکه میکرو آرانه هدف و ساختاردهی آن

با تطبیق ژن‌های هدف با پایگاه داده(http://string-db.org) STRING ،[11] تعاملات با امتیاز کلی بیشتر از ۰,۴ به عنوان تعاملات معتبر شناخته شدند تا ارتباط تعاملی بین ژن‌های بابیان متفاوت و تعاملات بین این ژن‌ها و miRNAهای هدف پیش‌بینی شده را ارزیابی کنیم. برای شناسایی گره‌های مهم یا پروتئین‌های هاب در شبکهPPI و بررسی درجه اتصال در شبکه‌ها ، از نرم‌افزار سایتوسکیپ (نسخه ۳,۴,۰) استفاده شد

تجزیه و تحلیل نهاییGO

پس از به دست آوردن لیست های ژنی برای هر مجموعه داده که شامل DEG ها، ژن های مرکزی و miRNAهای هدف ژن های شناسایی شده بود، با استفاده از ابزار Venndiagram، همپوشانی لیست های ژنی و ژن های مشترک بین آنها پیدا شد. همچنین، با استفاده ازFunRich ، تجزیه و تحلیل GO برای شناسایی مسیرهای سیگنالینگ انجام شد و سایر داده‌های GO بر اساس ژن‌های دخیل در مقاومت دارویی به دست آمدند.

نتایج

شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت معنی‌دار (DEGs) و یافتن ژن‌های مشترک بین مجموعه‌های GSE45898وGSE47994

با مقایسه بافت‌های سرطان پستان دارای مقاومت به شیمی‌درمانی با بافت‌های حساس به شیمی‌درمانی، کلیه ۳۱۲ ژن (۲۴۰ ژن با بیان بالا و ۷۲ ژن با بیان پایین) و ۴۱۱ ژن (۷۴ ژن با بیان بالا و ۳۳۷ ژن با بیان پایین) از مجموعه‌های GSE45898 و GSE47994 به‌دست آمدند. از بسته EnhancedVolcano برای نمایش این ژن‌ها در نمودار Volcano استفاده شد تا نشان دادن موارد با اهمیت بالا براساس معیارهای p-value، logFCو همچنین p-value + logFC آسان‌تر شود (شکل ۱). در نتیجه، نمودار ون نشان‌دهنده ۱۸ ژن مشترک بین دو مجموعه داده مذکور بود (شکل ۲ و جدول ۱)

تجزیه و تحلیل توابع و مسیرهای کاربردی

برای ژن‌هایی که پیش‌تر شناسایی شده بودند، تحلیل غنی‌سازی مسیر عملکردی GO و KEGG انجام شد. شکل‌های ۳ و ۴، عملکردهای غنی‌شده GO برای ژن‌های هدف شناسایی شده از مجموعه‌داده‌های GSE45898و GSE47994 را نشان می‌دهند. ژن‌های غنی‌شده برتر، بیشتر در مسیر متابولیسم (GSE45898)و تنظیم فرآیند فیزیولوژیکی (GSE47994) در دسته‌ی فرآیند بیولوژیکی قرار دارند. همچنین در دسته‌ی اجزای سلولی ، لیزوزوم (GSE45898) و سیتوپلاسم (GSE47994) شناسایی شدند. در عملکرد مولکولی، فعالیت کاتالیزوری (GSE45898) و فعالیت فاکتور رونویسی (GSE47994) برتری داشتند و همچنین در طبقه‌بندی مسیر بیولوژیکی، انتقال مزانشیمی به اپیتلیال برای هر دو مجموعه‌داده شناسایی شدند.

ساخت شبکه PPI و شبکه هدف-میکروآران‌ها

در بانک اطلاعاتی STRING مشخص شد که چندین ژن هدف با یکدیگر در تعامل هستند. برای هر دو مجموعه داده، ۱۰ گره برجسته با بیشترین درجه انتخاب شدند تا بر روی شبکه ساخته شده بهتر دیده شوند. بر اساس این نتایج، شبکه مربوط به مجموعه داده GSE45898 شامل ۳۵ گره و ۱۵۱ پاره خطا تعاملاتی بود، که در آن، ژن‌هایMCM2 ، EZH2، SMC4، KIF11، PLK4، HIST1H3J، HIST1H2BB، MAD2L1، HIST1H3Iو HIST1H3H به عنوان ژن‌های کلیدی شناسایی شدند (شکل ۵). همچنین، مجموعه داده GSE47994 شامل ۷۶ گره و ۱۴۵ پاره خط تعامتی بود، و ژن‌هایSREBF1 ، NCOR1، FGFR2، PRKACB، ELN، CRK، INSR، GNG2، TTKو PIK3R3 به عنوان ژن‌های مهم در ژن های PPIاین مجموعه شناسایی شدند (شکل ۶، شکل ۷ و ۸).

تجزیه و تحلیل GO برای ژن های مشترک در دو مجموعه داده مختلف

تجزیه و تحلیل ژن انجام شده بر روی ۱۸ ژن یافت شده نشان داد که مسیر سیگنالی ترانزیشن اپیتلیال به مزنشیمال) (Epithelial to mesenchymal transition) مقدار P: 4.90425E-08و تعداد ژن: ۶) مهمترین مسیر سیگنالی است که این ژن های مشترک در آن شرکت دارند. این فهرست شامل ۱۸ ژن مرتبط با روند مقاومت در برابر دارو در سرطان پستان سه گانه منفی است. علاوه بر این، نتایج تجزیه و تحلیل نشان داد که انتقال پیام مربوط به گیرنده های سطح سلول (مقدار P: 0.007919227 و تعداد ژن: ۱)، فعالیت گیرنده سرین / ترئونین کیناز (مقدار P: 0.013818979 و تعداد ژن: ۱) و غشای پلاسمایی (مقدار P: 0.001923 و تعداد ژن: ۱) به ترتیب مربوط به فرآیندهای سلولی ، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی هستند (جدول ۲).

بحث

شمارش جدیدترین آمارهای سازمان مشاهدات سرطان جهانی نشان می‌دهد که بیش از ۲,۲ میلیون زن در سراسر جهان با سرطان پستان درگیر هستند و انتظار می‌رود این تعداد تا سال ۲۰۴۰ به دو برابر برسد[۱۲]. در واقع، این بیماری بیشتر از هر نوع سرطان دیگری زنان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و ۶,۸ هزار نفر در سال ۲۰۲۰ به دلیل آن درگذشته‌اند. حدود ۱۰-۱۵ درصد از تمام موارد سرطان پستان بدون هرگونه بیان گیرنده هورمونی و همچنین بدون بیان گیرنده‌های HER2 و HER3 (TNBC) هستند که در اغلب موارد افراد زیر ۵۰ سال را مبتلا می‌کند [۱۳, ۱۴]. تومورهای سینه نوع TNBC اغلب بزرگتر و کم‌تر تمایز یافته تر هستند و به دلیل کمبود مارکرهای زیرگروهی دیگر، قابل تمایز هستند. همچنین احتمال متاستازی این نوع تومور در عرض پنج سال پس از تشخیص اولیه، حدود ۲,۵ برابر بیشتر از سایر زیرگروه‌های سرطان سینه است [۱۵].

مقاومت دارویی یک مانع مهم برای درمان موثر سرطان پستان است [16]. در این مطالعه، با استفاده از رویکردهای بیوانفورماتیک، هدف‌های مولکولی توسط miRNA در مقاومت دارویی سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از پایگاه داده‌های GEO GSE45898 وGSE47994 ، ژن‌های بیانی مختلف و miRNAهای کنترل کننده آنها در بافت‌های مقاوم و حساس به شیمی درمانی در سرطان پستان شناسایی شدند. بر اساس نتایج، این ژن‌های بیانی وmiRNA های کنترل کننده آنها ممکن است در چندین فرآیند بیولوژیکی، فعالیت مولکولی و مسیرهای سیگنالی مربوط به سرطان حیاتی شرکت داشته باشند. همچنین، بر اساس ارزیابی‌های کارایی و غنی سازی انجام شده، این ژن‌ها وmiRNA ها می‌توانند به عنوان نشانگرهای مؤثر برای پیش‌بینی پیشگیری، انتخاب درمان‌های موثر و تخمین نرخ بقای بیماران با سرطان پستان TNBCعمل کنند [۱۷-۱۹]. علاوه بر این، این ژن‌ها وmiRNA ها می‌توانند برای درمان شخصی سازی

شده و به عنوان یک درمان هدفمند در مقابل مقاومت دارویی که بزرگترین مانع در درمان سرطان است، استفاده شوند [۲۰, ۲۱].

در این مطالعه مشخص شد که ژن های با بیان متفاوت در هر دو مجموعه داده‌ی مورد مطالعه، یان ژن ها در مسیر EMT نقش دارند. مکانیزم عمومی مقاومت دارویی مرتبط با EMT به افزایش دفع دارو، کاهش رشد سلولی و اجتناب از مسیرهای سیگنالی آپوپتوز مرتبط است .به علاوه، با تغییر در بیان مولکول‌های مرتبط با سرکوب ایمنی یا فرار از سیستم ایمنی، EMTبه طریق عمده ای به مقاومت درمانی کمک می کند. در نتیجه، احتمالاً PI3K یک عامل کلیدی در مقاومت دارویی است، زیرا EMT می‌تواند مسیر PI3Kرا از طریق مکانیزم های مختلف (مانند فعال‌سازیRTK های جایگزین مانند FGFRو (AXL فعال کند. مطالعات انجام شده با استفاده از مدل های موش ترانسژنیک نیز یکی از مطالعات جذاب در این زمینه می باشد [۲۲, ۲۳]. تحقیقات اخیر نشان داده است که در مدل های موش سرطان پستان با افزایش بیان-miR 200a، EMT مهار شده و مقاومت شیمیایی در برابر سایکلوفسفامید را می‌تواند از بین ببرد [۲۳]. اعضای خانواده miR-200a به دلیل نقش حیاتی و مهمی که در تنظیم و مهار EMT دارند، به عنوان مهمترین miRNAهای قابلیت ارزیابی می باشند. همچنین، miR-200 با EMT و همچنین سازگاری سلول های CD8+ TILهمبستگی دارد. به دلیل اینکه این miRNA، PDL-1 را هدف قرار می دهد، بیان آن توسط عامل ترانسکریپشن Zeb1 در هنگام EMT تقویت می شود. بنابراین، اثر مهاری PD-L1 کاهش یافته و در نتیجه سرکوب CD8+ T cell رخ می دهد [۲۴].

شناسایی غیر مستقیم miRNAs حیاتی در EMT نیز نشان می دهد که این miRNAs در فرایندهای مقاومت نقش دارند. به عبارت دیگر، داده های ما نشان می دهد که مسیر EMT در فرایندهای متاستاز و عود مجدد مرتبط با مقاومت در TNBC اهمیت دارد. این موضوع به شناسایی اهداف درمانی و نشانگرهایی

نظیر ژن های PRKACB ، PLK4، FGFR2، HIST1H2BB، CRKو INSR که ممکن است در بهره برداری از روش های فعلی تحویل دارو، از جمله نانوذرات، استفاده شود، منجر شود.

مسیر ترشح کلسترول یکی از مسیرهای دیگر مطالعه ما است که با مقاومت درمان مرتبط است. یکی از درمان های سرطان سینه استفاده از مهار کننده های آروماتاز است [25]. مصرف استاتین باعث کاهش اتصال به گیرنده استروژن-آلفا می شود که در نتیجه باعث کاهش تهاجم سلولی می شود [26]. سرطان های پستانی که به مهارکننده های آروماتاز مقاوم هستند، کلسترول درونی تولید می کنند که باعث فعال شدن گیرنده استروژن آلفا می شود [27]. علاوه بر این، افراد با سطح تولید کلسترول بالا، از داروی مهار کننده های آروماتاز کمتر بهره می برند [۲۸]. ارتباط بین کلسترول و مقاومت نسبت به تاموکسیفن، به عنوان یک نمونه دیگر در این زمینه می‌تواند ذکر شود. بیانABCA1 ، یک پمپ خروج کلسترول، در سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن کاهش یافته است و پروتئین فعال‌کننده پروکسیزوم افزایش یافته است.همچنین مطالعات نشان می‌دهد که تجمع کلسترول آزاد و لیپیدهای خنثی، از جمله استرهای کلسترول و تری‌گلیسرید، در سلول‌های مقاوم به دارو مشاهده می‌شود [29]. با توجه به اینکه بسیاری از مسیرهای مربوط به انواع متابولیسم‌های اسیدهای چرب با DEGs هر دو دیتاست شناسایی شده‌اند، هدف قرار دادن این ژن‌ها می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی تلقی شود تا یکی از مهمترین مسیرهای ارتباطی که به مقاومت نسبت به داروها منجر می‌شود را کاهش دهد.

در تحقیقات ما مشخص گردید که علاوه بر مسیرهای سیگنالینگ، ژن‌های عملکردی نیز ارتباط قابل‌توجهی با ایجاد مقاومت دارویی دارند. یکی از این ژن‌ها، ژن SLPI است که در میان ژن‌های کلیدی در مجموعه داده‌های مورد بررسی، رتبه اول را دارا بود SLPI .به پیشرفت و متاستاز برخی از بدخیمی ها کمک می‌کند. بیان SLPI در تومورهای متاستاتیک TNBC افزایش می‌یابد و بیان بالای SLPI با متاستاز ریه در حیوانات مدل مرتبط است. همچنین، افزایش سطح بیان SLPI با نتایج بالینی بدتر در میان بیماران TNBC مرتبط

است. این ژن، با پروتئین سرکوبگر تومور رتینوبلاستوما (Rb) به طور فیزیکی تعامل می‌کند و باعث می‌شود که FoxM1 از کمپلکس Rb-FoxM1 آزاد شود، که ممکن است باعث فعال شدن ژن‌های هدف FoxM1 و افزایش متاستاز سرطان پستان شود [۳۰]. تغییر در بیان این ژن در سرطان سینه در یک مطالعه انجام شده توسط Shi و همکاران [31] نیز مشاهده شده است. یکی از ژن‌های تازه کشف شده که به عنوان هدف درمانی برای سلول‌های CAR-T شناخته می‌شود، CEACAM6است. در واقع، این ژن به عنوان یک بایومارکر سلول‌های بنیادی سرطانی شناخته شده است که ممکن است با استفاده از درمان‌های دارویی هدفمند مانند ارسال دارو با استفاده از نانوذرات، به این جمعیت از سلول‌ها هدف گردد. این سلول‌ها به عنوان مهمترین عاملی که در افزایش مقاومت به دارو درگیر هستند، شناخته شده‌اند [۳۲]. همچنین ژن SDC1ممکن است در گسترش و متاستاز سرطان سینه نیز حائز اهمیت باشد. در ریزمحیط تومورهای سرطان سینه، این ژن بیان بالایی از خود نشان داده شده است و نشان داده شده است که SDC1 با فعال‌سازی مسیر سیگنالی Wnt، نفوذ سلول‌های توموری را تسهیل می‌کند [33]. علاوه بر این، ژن SDC1 ممکن است یک هدف قابل قبول برای درمان‌های هدفمند سلول‌های ایمنی باشد زیرا با نفوذ سلول‌های ایمنی به ریز محیط تومور در ارتباط است [۳۴]. با توجه به این موضوع که در تحقیقات ما ژنSULF2 ، در مقایسه با ژن های دیگر، نمونه خوبی از یک ژن با پتانسیل به عنوان نشانگر زیستی و درمان است، نتایج ما با مطالعه‌ی اخیر کومار و همکارانش همخوانی دارند. این ژن در مورد مقاومت دارویی در سرطان سینه، متاستاز و کسب صفات سلول‌های بنیادی مرتبط است [۳۵].

نتیجه گیری

در پایان، مطالعه کنونی فهرست جامعی از ژن ها را برای تحلیل جنبه های مختلف پدیده مقاومت در برابر دارو در تومورهای پستان شناسایی کرده است و تعدادی از مسیرهای ارتباطی مهم را شناسایی کرده است. هر کدام از این مسیرها، به تنهایی یا به همراه سایر ژن ها، می‌تواند نشانگری موثر برای پیش‌بینی

پیش‌آگهی، انتخاب بهترین درمان، یا تخمین میزان بقاء بیماران TNBC باشد. از سوی دیگر، ایـن ژن هـا و miRNAsمی‌توانند امکان درمان هـای هدفمنـد و فـردی را فـراهم کننـد تـا از مقاومـت در برابـر دارو کـه بزرگترین موانع در درمان سرطان است، عبور کنیم.

References:

1. Nardin S, Mora E, Varughese FM, D'Avanzo F, Vachanaram AR, Rossi V, et al. Breast cancer survivorship, quality of life, and late toxicities. Frontiers in oncology. 2020;10:864.
2. Wu J, Xie Z, Xiao Y, Wang B, Zhang P. Prognostic nomogram for female patients suffering from non-metastatic Her2 positive breast cancer: A SEER-based study. Medicine. 2022;101(40):e30922.
3. Sachdev JC, Sandoval AC, Jahanzeb M. Update on precision medicine in breast cancer. Precision medicine in cancer therapy. 2019:45-80.
4. Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. Cancer biology & medicine. 2015;12(2):106.
5. Bines J, Earl H, Buzaid A, Saad E. Anthracyclines and taxanes in the neo/adjuvant treatment of breast cancer: does the sequence matter? Annals of oncology. 2014;25(6):1079-85.
6. Lumachi F, Luisetto G, Mm Basso S, Basso U, Brunello A, Camozzi V. Endocrine therapy of breast cancer. Current medicinal chemistry. 2011;18(4):513-22.
7. Asif HM, Sultana S, Ahmed S, Akhtar N, Tariq M. HER-2 positive breast cancer-a mini-review. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2016;17(4):1609-15.
8. Ratti M, Lampis A, Ghidini M, Salati M, Mirchev MB, Valeri N, et al. MicroRNAs (miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs) as new tools for cancer therapy: first steps from bench to bedside. Targeted oncology. 2020;15:261-78.
9. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. Signal transduction and targeted therapy. 2016;1(1):1-9.
10. Fonseka P, Pathan M, Chitti SV, Kang T, Mathivanan S. FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. Journal of Molecular Biology. 2021;433(11):166747.
11. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. Nucleic Acids Research. 2023;51(D1):D638-D46.
12. Valavanidis A. Half of the World's Cancer Deaths are Preventable. Reductions of lifestyle-modifiable risk factors: smoking.

13. Reis-Filho J, Tutt A. Triple negative tumours: a critical review. Histopathology. 2008;52(1):108-18.
14. Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, Coates RJ, Leyland-Jones B, Brawley OW, et al. Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. Breast cancer research and treatment. 2009;113:357-70.
15. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. Archives of gynecology and obstetrics. 2016;293:247-69.
16. Plava J, Cihova M, Burikova M, Matuskova M, Kucerova L, Miklikova S. Recent advances in understanding tumor stroma-mediated chemoresistance in breast cancer. Molecular cancer. 2019;18:1-10.
17. Weng C-H, Chen L-Y, Lin Y-C, Shih J-Y, Lin Y-C, Tseng R-Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. Oncogene. 2019;38(4):455-68.
18. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. Nature reviews Molecular cell biology. 2019;20(2):69-84.
19. Boumahdi S, de Sauvage FJ. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. Nature reviews Drug discovery. 2020;19(1):39-56.
20. Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivas V, Au V, LaFramboise T, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. Nature genetics. 2012;44(8):852-60.
21. Kitai H, Ebi H, Tomida S, Floros KV, Kotani H, Adachi Y, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Defines Feedback Activation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling Induced by MEK Inhibition in KRAS-Mutant Lung CancerEMT Defines RTK Activation by MEKi in KRAS-Mutant Cancer. Cancer discovery. 2016;6(7):754-69.
22. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. Nature. 2015;527(7579):525-30.
23. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. Nature. 2015;527(7579):472-6.
24. Dhanasekaran SM, Alejandro Balbin O, Chen G, Nadal E, Kalyana-Sundaram S, Pan J, et al. Transcriptome meta-analysis of lung cancer reveals recurrent aberrations in NRG1 and Hippo pathway genes. Nature communications. 2014;5(1):5893.
25. Bradley R, Braybrooke J, Gray R, Hills RK, Liu Z, Pan H, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in premenopausal women with oestrogen receptor-positive early-stage breast cancer treated with ovarian suppression: a patient-level meta-analysis of 7030 women from four randomised trials. The Lancet Oncology. 2022;23(3):382-92.
26. Gómez-Coronado D, Lasunción MA, Martínez-Botas J, Fernández-Suárez ME, editors. Role of cholesterol metabolism in the anticancer pharmacology of selective estrogen receptor modulators. Seminars in cancer biology; 2021: Elsevier.
27. Khan MZI, Uzair M, Nazli A, Chen J-Z. An overview on estrogen receptors signaling and its ligands in breast cancer. European Journal of Medicinal Chemistry. 2022:114658.

28. Nguyen VT, Barozzi I, Faronato M, Lombardo Y, Steel JH, Patel N, et al. Differential epigenetic reprogramming in response to specific endocrine therapies promotes cholesterol biosynthesis and cellular invasion. Nature communications. 2015;6(1):10044.

29. Moon SY, Lee H, Kim S, Hong JH, Chun SH, Lee HY, et al. Inhibition of STAT3 enhances sensitivity to tamoxifen in tamoxifen-resistant breast cancer cells. BMC cancer. 202١٢,-١:(١)٢١;١

30. Kozin SV, Maimon N, Wang R, Gupta N, Munn L, Jain RK, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) as a potential target for inhibiting metastasis of triple-negative breast cancers. Oncotarget. 2017;8(65):108292.

31. Shi Y, Ye P, Long X. Differential expression profiles of the transcriptome in breast cancer cell lines revealed by next generation sequencing. Cellular Physiology and Biochemistry. 2017;44(2):804-16.

32. Schettini F, Barbao P, Brasó-Maristany F, Galván P, Martínez D, Paré L, et al. Identification of cell surface targets for CAR-T cell therapies and antibody–drug conjugates in breast cancer. ESMO open. 2021;6(3):100102.

33. Pham SH, Pratt K, Okolicsanyi RK, Oikari LE, Yu C, Peall IW, et al. Syndecan-1 and-4 influence Wnt signaling and cell migration in human breast cancers. Biochimie. 2022;198:60-75.

34.. Song Y, Lu M, Feng L, Chen Q, Huang H, Lin Q. Identification of potential immunotherapy biomarkers for breast cancer by bioinformatics analysis. Bioscience Reports. 2:(٢)٤٢;٠٢٢BSR20212035.

35. Kumar U, Castellanos-Uribe M, May ST, Yagüe E. Adaptive resistance is not responsible for long-term drug resistance in a cellular model of triple negative breast cancer. Gene. 2023;850:146930.

مقایسه تاثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و ترشحات آن بر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در بهبود زخم در رت های دیابتی

رضوان ایزدی[۱] ، سید حسام الدین حجازی*[۲] ، سیف اله بهرامی کیا[۳]

1- کارشناسی ارشد بیوشیمی ، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان .
salome.baran1919@gmail.com

2- استادیار ژنتیک مولکولی ،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه لرستان.

3- دانشیار بیوشیمی ،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه لرستان.
bahramikia.s@lu.ac.ir

- نویسنده مسئول : سید حسام الدین حجازی ، استادیار ژنتیک مولکولی ، دانشکده علوم ، دانشگاه لرستان hejazi.h@lu.ac.ir

چکیده:

زخم دیابتی یک عارضه مزمن شدید دیابت است و تاثیر منفی زخم های دیابتی بر کیفیت زندگی بیمار به گونه ای است که در صورت عدم مدیریت صحیح این زخم ها ممکن است منجر به قطع عضو یا حتی مرگ شود. سلول های بنیادی ، به طور خاصی بر روند بهبود زخم در شرایطی مانند زخم دیابت و سوختگی شدید تاثیر می گذارد. در این مطالعه به منظور بررسی اثر سلول های بنیادی مشتق از چربی (ASCs) و ترشحات آن بر ترمیم زخم پوستی در رت های دیابتی ۳۶ رت به طور تصادفی به ۴ گروه غیر دیابتی، کنترل دیابتی، دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات و دیابتی تجربی تحت درمان با ASCs تقسیم شدند. مقدار فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) توسط الایزا در بافت پوست تمام گروه ها بررسی شد. در گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات مقدار VEGF از تمامی گروه ها بالاتر بود. افزایش رگ زایی منجر به بهبود زخم دیابتی می شود.

واژه‌های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ، زخم دیابتی

Comparison of the effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and its secretions on vascular endothelial growth factor in improving wound healing in diabetic rats

Rezvan Izadi[1], Seyed Hesamaldin Hejazi[*2], Seifollah Bahramikia[3]

1-master of biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University

2-Assistant Professor of molecular genetic, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, hejazi.h@lu.ac.ir

3-Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University

Abstract

Diabetic wounds are a chronic and severe complication of diabetes that can have a negative impact on a patient's quality of life and if they are not managed properly may even lead to amputation or death, Stem cells, specifically, have an impact on the wound healing process in conditions such as diabetic ulcers and severe burns. In this study, 36 diabetic rats were randomly divided into four groups (non-diabetic control, diabetic control, experimental diabetes treated with secretions, and experimental diabetes treated with ASCs) to investigate the effect of adipose-derived stem cells (ASCs) and their secretions on skin wound healing. The amount of vascular endothelial growth factor (VEGF) was examined in the skin tissue of all groups using ELISA. In the experimental diabetes group treated with secretions, the level of VEGF was higher than that of all other groups. Increased angiogenesis leads to the improvement of diabetic wound healing.

Keywords:mesenchymal stem cells, vascular endothelial growth factor (VEGF), diabetic wound

[*] Corresponding author: Seyed Hesamaldin Hejazi, assistant professor of molecular genetics, biology department, faculty of basic sciences, Lorestan. Email: Hejazi.h@lu.ac.ir

۱. مقدمه

دیابت یک بیماری مزمن است که در صورت عدم کنترل مناسب، می‌تواند به مشکلات جدی از جمله بیماری‌های قلبی، عصبی، کلیوی و چشمی منجر شود و یکی از مهمترین عوارض آن زخم های دیابتی است که افزایش بیان فاکتورهای التهابی، کاهش تولید فاکتورهای رشد و کموکاین‌ها، کاهش رگ زایی و ترشح کلاژن در این بیماران منجر به تأخیر درترمیم زخم‌های دیابتی می شود [۱،۲]. برای درمان زخم‌های دیابتی از روش های مختلفی مانند، کنترل گلوکز خون، جراحی ،پانسمان‌های مخصوص، مهندسی بافت و سلول درمانی استفاده می شود. به نظر می رسد در بین انواع روش های درمانی استفاده از سلول های استرومایی مزانشیمی (MSCs) درمانی جدید و موثر برای زخم های دیابتی می باشد [۳،۴].

سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی(ASCs) سلول‌های مزانشیمی تمایز نیافته ای هستند که از بافت چربی استخراج می شوند و می‌توانند به انواع مختلفی از سلول‌های بالغ مانند استخوان، غضروف، عضله و عصب تبدیل شوند. این سلول ها در درمان بیماری های مختلف از جمله دیابت میلتوس و زخم های مزمن موثر هستند. ASCs اثر خود را برترمیم زخم از طریق ترشح پاراکرین فاکتورهای رشد مانند، فاکتور رشد اپیدرم (EGF)، فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1)، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) اعمال می کند. این فاکتور ها بر تعدیل سیستم ایمنی، تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌های درگیر در ترمیم زخم مانند فیبروبلاست، اندوتلیال و التهابی تاثیر میگذارند [۵-۷].

ASCs به دلیل ترشح فاکتور های رشد و سیتوکاین های بیشتر و متنوع تر به گزینه مناسبی برای سلول درمانی تبدیل شده اند[۸-۱۰].

ترشحات به طور خاصی بر روند بهبود زخم در شرایطی مانند زخم دیابتی و سوختگی تأثیر می‌گذارند. همچنین باعث پیشگیری از ایسکمی در بیماران دیابتی می شوند [۱۱،۱۲].استفاده از ترشحات مزایای بسیاری نسبت به سلول های بنیادی دارد از جمله، ایمنی زایی کمتر آن نسبت به استفاده از سلول و امکان نگهداری آن ها در دمای ۲۰ – [۱۳،۱۴].

هدف از این پژوهش بررسی تاثیر ASCs و ترشحات آن بر ترمیم زخم دیابتی بود که در این مطالعه اثر ASCs و ترشحات آن بر مقدار VEGF در زخم پوستی رت های دیابتی بررسی شد.

۲. مواد و روش ها

جداسازی و کشت ASCs

سه سر موش صحرایی نر سالم و بالغ آلبینو ویستار با میانگین وزنی ۲۰±۲۸۰ گرم و سن ۱۴ هفته از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شدند. رت ها با تزریق صفاقی دوز بالای کتامین- زایلازین قربانی شدند. چربی های هر دو سمت اپی دیدیم برداشته شد. به‌منظور هضم آنزیمی بافت چربی از آنزیم کلاژناز تیپ I استفاده و بافت چربی به مدت ۷۵min در ۳۷ C° انکوبه شد. سوسپانسیون از سل استرینر ۱۰۰ µm عبور داده شد و سه بار با دور ۱۵۰۰RPM برای ۵ min سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در ۲ ml محیط کشت DMEM High Glucose همراه با fetal bovine serum10% و ۱٪ penicillin-streptomycin حل کرده و سوسپانسیون سلولی به فلاسک های T25 منتقل شد. فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ C° ، رطوبت ۹۵% و CO2 ۵% قرارداده شدند. بعد از گذشت ۷ روز سلول ها ۹۰ درصد کف هر فلاسک را فراگرفتند. به هر فلاسک ml ۰/۵ آنزیم Tripsin / EDTA 0/25% افزوده و فلاسک‌ها به مدت min ۴ -۳ درون انکوباتور ۳۷ C° قرار گرفتند و سپس پاساژ داده شدند. سلول ها پس از پاساژ اول برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز فلوسایتومتری

برای تأیید حضور سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در کشت ، یک هفته بعد از پاساژ اول بیان نشانگرهای CD 90 و CD45 در سلول ها توسط فلوسایتومتری بررسی شد .

جداسازی ترشحات ASCs

سه روز بعد از پاساژ اول محیط کشت سلول‌ها را دور ریخته و دو مرتبه با بافر فسفات سالین (PBS) کف فلاسک‌ها شست‌وشو داده شد و سپس محیط کشت بدون سرم (DMEM High Glucose و PEN / STREP 1%) به هر فلاسک اضافه گردید. بعد از ۴۸ h محیط کشت سلول‌ها جمع‌آوری و دو بار با دور RPM ۲۰۰۰ به مدت min ۵ سانتریفیوژ شد. سه برابر حجم محیط کشت اتانول ٪ ۹۶ افزوده و برای یک ساعت در دمای ۲۰C ° - قرار داده شد. سپس از فیلتر µm ۰/۴۵ عبور داده و min ۲۰ با دور RPM ۲۰۰۰ در دمای ۴ C° سانتریفیوژ شد. رسوب توسط اتانول ۷۰% به حالت سوسپانسیون در آمد و برای min ۲۰ با دور ۲۰۰۰RPM و دمای ۴ C° درجه سانتریفیوژ انجام گرفت. سپس رسوب حاصل درون PBS حل و تا زمان استفاده در تانک ازت نگهداری شد.

حیوانات

۳۶ سر موش صحرایی نر سالم و بالغ آلبینو ویستار با میانگین وزنی ۲۰ ±۲۵۰ گرم و سن ۱۲ هفته از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شدند. موش های صحرایی در اتاق استریل مجزا از سایر حیوانات در دمای ۱ ±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰ درصد و سیکل منظم ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان نگهداری شدند. تمامی مراحل کار با موش‌های صحرایی طبق دستورالعمل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و با تایید کمیته اخلاق بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان (با کداخلاقLU.ECRA.2021/3) انجام گرفت.

ایجاد و تایید دیابت

برای ایجاد مدل دیابت ، مقدار mg/kg ۵۰ وزن بدن استرپتوزوسین ، بعد از ۱۲ ساعت ناشتا به‌صورت تک‌دوز و داخل صفاقی به ۲۷ سر موش صحرایی گروه های دیابتی، دیابتی تحت درمان با ترشحات، دیابتی تحت درمان با ASCs تزریق شد . بعد از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق استرپتوزوسین از قسمت انتهایی دم، قند خون موش‌های صحرایی بعد از ۱۲ ساعت ناشتا توسط دستگاه گلوکومتر سنجیده و موش‌های صحرایی با قند خون بالای mg/dl ۲۵۰ به‌عنوان موش صحرایی دیابتی تأیید شدند.

ایجاد زخم و اعمال درمان

ابتدا موش‌های صحرایی با تزریق صفاقی کتامین - زایلازین بیهوش شدند. زخمی به قطرmm ۵ توسط منگنه بیوپسی در سطح پشتی هر یک از موش‌های صحرایی ایجاد شد. بلافاصله بعد از ایجاد زخم µl ۲۰۰ PBS به هر یک از ۱۸ سر موش صحرایی کنترل دیابتی و غیر دیابتی تزریق شد. به هر یک از ۹ سر موش صحرایی دیابتی گروه سوم مقدار µl ۲۰۰ از ترشحات سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی موش صحرایی و به هر یک از ۹ سر موش صحرایی تحت درمان با ASCs ۸×۱۰^{۵} سلول بنیادی مشتق از بافت چربی موش صحرایی به همراه ۲۰۰ میکرولیتر PBS تزریق شد.تمام تزریق ها به صورت زیر جلدی در اطراف زخم انجام گرفت.

بافت‌برداری زخم‌ها

در هر یک از روزهای ۳، ۶ و ۹ بعد از ایجاد زخم، ۳ سر موش صحرایی از هر گروه با تزریق صفاقی دوز بالای کتامین - زایلازین قربانی شدند. سپس زخم و حاشیه آن برداشته و از آن برای بررسی VEGF توسط الایزا استفاده شد.

سنجش الایزا

بعد از هموژنه کردن بافت ها با بافر ریپا ،VEGF در بافت های هموژنه با کیت الایزای موشی طبق پروتکل کیت بررسی شد.

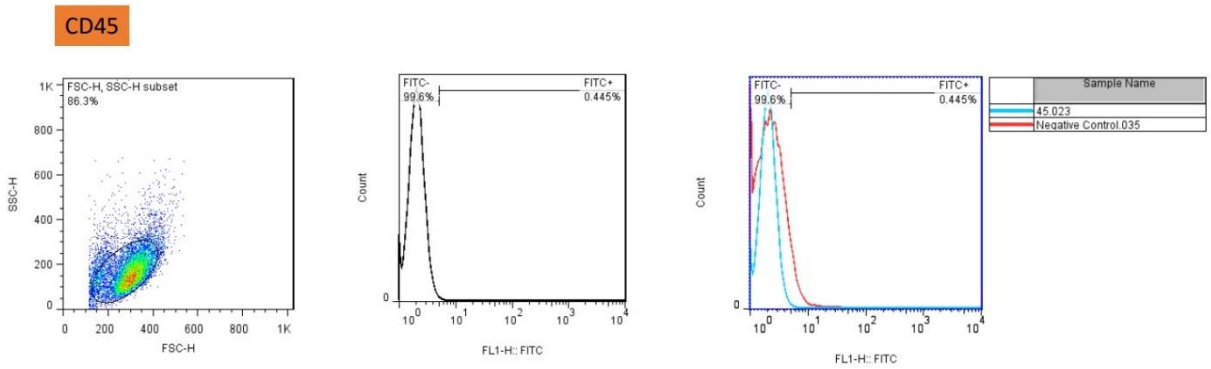
آنالیز آماری

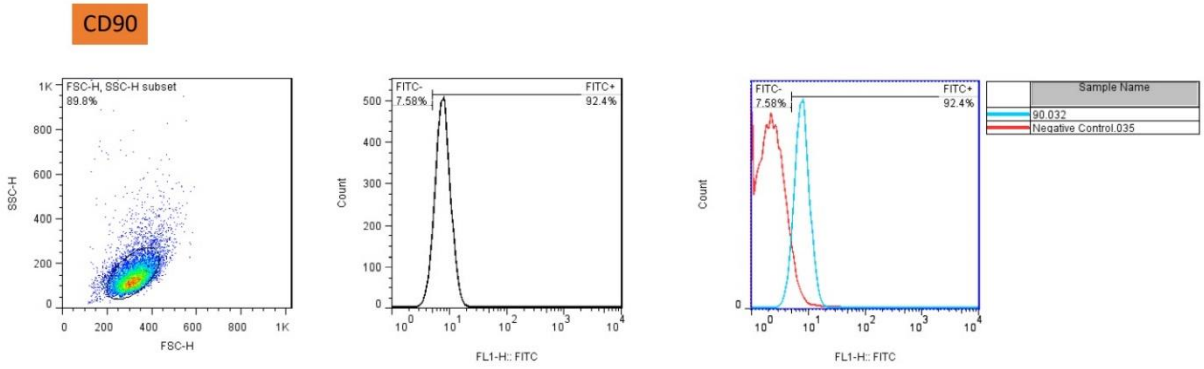
داده های الایزا توسط نرم افزار SPSS26 و با آزمون Tukey و ANOVA با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ آنالیز شد. نتایج فلوسایتومتری با نرم‌افزار Flow jo آنالیز گردید.

۳. نتایج

فلوسایتومتری

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی موش صحرایی (ASCs) حاصل از پاساژ اول، برای نشانگر CD45 ، ٪ ۰/۴۴۵ و برای نشانگر CD90، ٪ ۹۲/۴ بود.





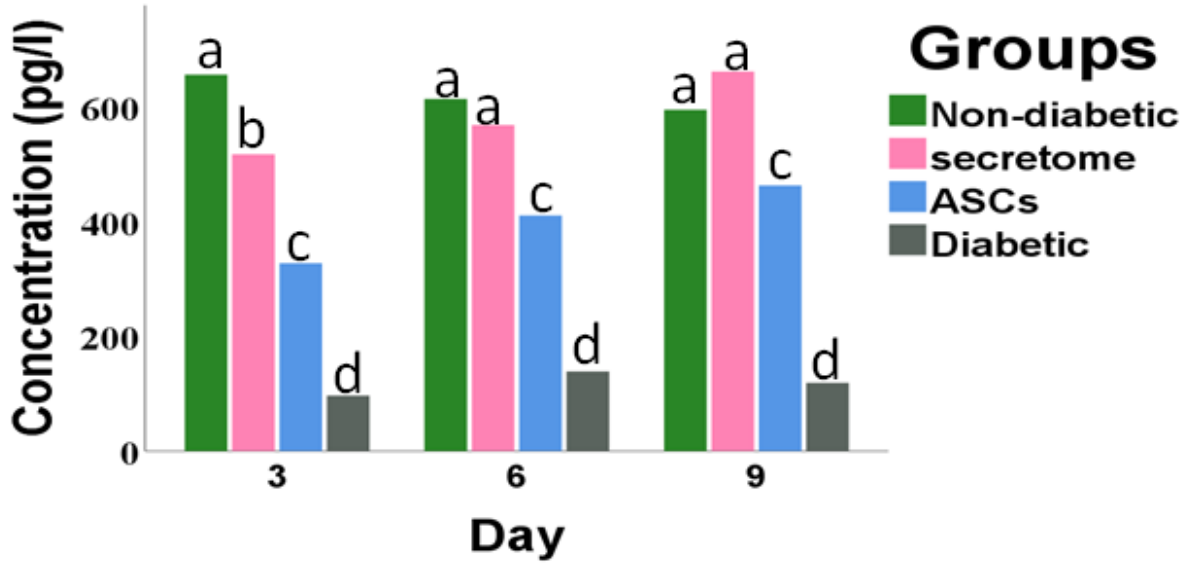
شکل ۱. فلوسایتومتری سلول های بنیادی مشتق از چربی نشان دهنده بیان مثبت نشانگرهای سطحی CD90 و بیان منفی نشانگرهای سطحی CD45 بود.

بررسی VEGFدر بافت پوست توسط الایزا

در روز سوم پس از ایجاد زخم VEGF به ترتیب بیشترین مقدار را در گروه‌های کنترل غیردیابتی، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با (ASCs) و گروه کنترل دیابتی داشت. مقدار VEGFدر مقایسه تمامی گروه ها با یک دیگر، دارای اختلاف معنی داری بود.

در روز ششم پس از ایجاد زخم VEGF به ترتیب بیشترین مقدار را در گروه های کنترل غیردیابتی، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با(ASCs) و گروه کنترل دیابتی داشت. در مقایسه مقدارVEGF بین گروه کنترل غیردیابتی و گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در مقایسه سایر گروه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دیده شد.

در روز نهم پس از ایجاد زخم VEGF به ترتیب بیشترین مقدار را در، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات، گروه کنترل غیردیابتی، گروه دیابتی تجربی تحت درمان با (ASCs) و گروه کنترل دیابتی داشت. در مقایسه مقدار VEGF بین گروه کنترل غیردیابتی و گروه دیابتی تجربی تحت درمان با ترشحات اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در مقایسه سایر گروه ها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دیده شد.



شکل۲ . مقدار VEGF در ۴ گروه مورد مطالعه در روزهای سوم، ششم و نهم بعد از ایجاد زخم .

بحث

بیماران دیابتی با زخم التیام ناپذیر ۲/۵ برابر بیشتر از سایر افراد در خطر مرگ طی ۵ سال قرار دارند و نرخ مرگ و میر دراین بیماران از بیماران مبتلا به سرطان های پستان و پروستات بیشتر است [۱۵،۱۶].التهاب مزمن از مشخصه های زخم دیابتی است که در نتیجه عدم تعادل بین سیتوکاین های پیش التهابی و ضدالتهابی است[۱۷].مصرف بالای اکسیژن در فاز التهابی طولانی مدت زخم های دیابتی در کنار اختلال عملکردی عروق در بیماران دیابتی باعث کاهش اکسیژن رسانی به بافت در حال ترمیم می شود[۱۸].
ترشحات قادر به برقراری تعادل بین سیتوکاین های پیش التهابی و ضد التهابی در بیماران دیابتی است و در نتیجه می تواند التهاب مزمن زخم های دیابتی را بهبود بخشد[۱۳].

سلول های بنیادی مشتق از چربی با بیان بالا و مثبت مارکرهای سطحی CD105 ، CD90 ، CD73 ، CD44 و بیان منفی و پایین مارکرهای سطحی CD34 ، CD45، CD19 ، CD14 مشخص می شوند [۱۹،۲۰].ما در این پژوهش از سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی که حاصل از پاساژ اول بودند استفاده و با توجه به نتایج فلوسیتومتری مبنی بر بیان بالا و مثبت CD90 و بیان پایین و منفی CD45 حضور سلول بنیادی در کشت را تایید کردیم.

VEGF توسط سلول های ماهیچه صاف ،اندوتلیال ، ماکروفاژ و فیبروبلاست تولید می شود و باعث افزایش تکثیر سلول های اندوتلیال می شود[۲۱].سلول های پیش ساز اندوتلیال (EPCs) در پاسخ به آسیب بافتی تحریک و برای شرکت در تشکیل عروق خونی جدید بسیج می شوند.اختلال در EPCs بیماران دیابتی در کنار کاهش مقدار این فاکتور در زخم های دیابتی منجر به کاهش رگ زایی در زخم های بیماران دیابتی می شود[۲۲،۲۳].در این پژوهش با توجه به نقش کلیدی VEGFدر رگ زایی و ترمیم زخم مقدار این فاکتور در در زخم ها و پوست حاشیه آن ها بررسی شد. ما تایید کردیم که تزریق ترشحات و ASCs باعث افزایش معنی دار سطح VEGF در گروه دریافت کننده ترشحات و ASCs نسبت به گروه کنترل دیابتی شد.

تزریق زیر جلدی روش مناسبی برای انتقال پروتئین های درمانی است . پروتئین های با اندازه کوچک جذب مویرگ های خونی ناحیه تزریق می شوند. ترشحات اندازه ی کوچکی دارند و می توانند به مویرگ های پوست وارد شوند.این نوع تزریق خطر عفونت سیستمیک کمتری در مقایسه با تزریق وریدی دارد [۲۴،۲۵].در مطالعه حاضر ترشحات و ASCs به صورت زیر جلدی و آهسته تزریق شدند ودر بررسی ماکروسکوپی زخم و اطراف آن هیچ آثاری از هماتوم و کبودی مشاهده نشد [۲۶].

نتیجه گیری

به نظر میرسد ترشحات سلول های بنیادی مشتق از چربی در مقایسه با ASCs می تواند از طریق افزایش رگ زایی و افزایش مهاجرت و تکثیر سلول های اندوتلیال باعث بهبود زخم های دیابتی شود. استفاده از ترشحات به صورت زیرجلدی بدون عارضه بوده و باعث افزایش سرعت بسته شدن زخم و به حداقل رساندن اسکار می شود.

منابع

[1] Hamada M, Iwata T, Kato Y, Washio K, Morikawa S, Sakurai H, et al. Xenogeneic transplantation of human adipose-derived stem cell sheets accelerate angiogenesis and the healing of skin wounds in a Zucker Diabetic Fatty rat model of obese diabetes. Regen Ther 2017;6:65–73. https://doi.org/10.1016/j.reth.2017.02.002.
[2] An R, Zhang Y, Qiao Y, Song L, Wang H, Dong X. Adipose stem cells isolated from diabetic mice improve cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. Stem Cell Res Ther 2020;11. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01621-x.
[3] O'Loughlin A, Kulkarni M, Creane M, Vaughan EE, Mooney E, Shaw G, et al. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. Diabetes 2013;62:2588–94. https://doi.org/10.2337/db12-1822.

[4] Chen S, SJ, ZM, CY, WX, ZL, TZ, YY, LQ, ZW, XM, ZL, ZL. Mesenchymal stem cell-laden anti-inflammatory hydrogel enhances diabetic wound healing. Scientific Reports 5 2015.
[5] Xu J, Zgheib C, Hodges MM, Caskey RC, Hu J, Liechty KW. Mesenchymal stem cells correct impaired diabetic wound healing by decreasing ECM proteolysis. Physiol Genomics 2017;49:541–8. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00090.2016.
[6] Trzyna A, Banaś-Ząbczyk A. Adipose-derived stem cells secretome and its potential application in "stem cell-free therapy." Biomolecules 2021;11. https://doi.org/10.3390/biom11060878.
[7] Guo X, Schaudinn C, Blume-Peytavi U, Vogt A, Rancan F. Effects of Adipose-Derived Stem Cells and Their Conditioned Medium in a Human Ex Vivo Wound Model. Cells 2022;11:1198. https://doi.org/10.3390/cells11071198.
[8] Jones RE, Foster DS, Hu MS, Longaker MT. Wound healing and fibrosis: current stem cell therapies. Transfusion (Paris) 2019;59:884–92. https://doi.org/10.1111/trf.14836.
[9] Hu L, Hu J, Zhao J, Liu J, Ouyang W, Yang C, et al. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Biomed Res Int 2013;2013. https://doi.org/10.1155/2013/438243.
[10] Moriyama M, Sahara S, Zaiki K, Ueno A, Nakaoji K, Hamada K, et al. Adipose-derived stromal/stem cells improve epidermal homeostasis. Sci Rep 2019;9:18371. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54797-5.
[11] An Y-H, Kim DH, Lee EJ, Lee D, Park MJ, Ko J, et al. High-Efficient Production of Adipose-Derived Stem Cell (ADSC) Secretome Through Maturation Process and Its Non-scarring Wound Healing Applications. Front Bioeng Biotechnol 2021;9. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.681501.
[12] Bari E, Perteghella S, Di Silvestre D, Sorlini M, Catenacci L, Sorrenti M, et al. Pilot Production of Mesenchymal Stem/Stromal Freeze-Dried Secretome for Cell-Free Regenerative Nanomedicine: A Validated GMP-Compliant Process. Cells 2018;7:190. https://doi.org/10.3390/cells7110190.
[13] Sumarwoto T, Suroto H, Mahyudin F, Utomo DN, Romaniyanto, Tinduh D, et al. Role of adipose mesenchymal stem cells and secretome in peripheral nerve regeneration. Annals of Medicine and Surgery 2021;67. https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102482.
[14] Foo JB, Looi QH, Chong PP, Hassan NH, Yeo GEC, Ng CY, et al. Comparing the Therapeutic Potential of Stem Cells and their Secretory Products in Regenerative Medicine. Stem Cells Int 2021;2021:1–30. https://doi.org/10.1155/2021/2616807.
[15] Wang J, Wu H, Peng Y, Zhao Y, Qin Y, Zhang Y, et al. Hypoxia adipose stem cell-derived exosomes promote high-quality healing of diabetic wound involves activation of PI3K/Akt pathways. J Nanobiotechnology 2021;19. https://doi.org/10.1186/s12951-021-00942-0.
[16] Kiritsi D, Nyström A. The role of TGFβ in wound healing pathologies. Mech Ageing Dev 2018;172:51–8. https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.004.
[17] Chen S, Shi J, Zhang M, Chen Y, Wang X, Zhang L, et al. Mesenchymal stem cell-laden anti-inflammatory hydrogel enhances diabetic wound healing. Sci Rep 2015;5:18104. https://doi.org/10.1038/srep18104.
[18] Bai Q, Han K, Dong K, Zheng C, Zhang Y, Long Q, et al. Potential applications of nanomaterials and technology for diabetic wound healing. Int J Nanomedicine 2020;15:9717–43. https://doi.org/10.2147/IJN.S276001.

[19] Navone SE, Pascucci L, Dossena M, Ferri A, Invernici G, Acerbi F, et al. Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice. Stem Cell Res Ther 2014;5:7. https://doi.org/10.1186/scrt396.
[20] Zeng Q-L, Liu D-W. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: An emerging therapeutic strategy for normal and chronic wound healing. World J Clin Cases 2021;9:6218–33. https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i22.6218.
[21] Guillamat-Prats R. The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. Cells 2021;10:1729. https://doi.org/10.3390/cells10071729.
[22] Hu Y, Tao R, Chen L, Xiong Y, Xue H, Hu L, et al. Exosomes derived from pioglitazone-pretreated MSCs accelerate diabetic wound healing through enhancing angiogenesis. J Nanobiotechnology 2021;19:150. https://doi.org/10.1186/s12951-021-00894-5.
[23] Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, et al. Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. Am J Pathol 2004;164:1935–47. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63754-6.
[24] Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, et al. Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. Stem Cells Int 2020;2020:8810813. https://doi.org/10.1155/2020/8810813.
[25] McDonald TA, Zepeda ML, Tomlinson MJ, Bee WH, Ivens IA. Subcutaneous administration of biotherapeutics: current experience in animal models. Curr Opin Mol Ther 2010;12:461–70.
[26] Kim H, Park H, Lee SJ. Effective method for drug injection into subcutaneous tissue. Sci Rep 2017;7:9613. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10110-w.

بررسی مباحث تشریحی روده باریک از دیدگاه طب سنتی و مقایسه تطبیقی با یافته های آناتومی طب نوین

شبنم محمدی[1*]، امیر پرویز توسلی[2]

دانشیار گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

دانش آموخته گروه طب ایرانی، دانشکده طب ایرانی ومکمل، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

*** ایمیل نویسنده مسئول mohammadish@mums.ac.ir**

چکیده

مقدمه

در منابع طب سنتی، علم تشریح لازمه و پایه دانش پزشکی شمرده می شده است و حکمای قدیم به آن توجه ویژه ای داشته اند. با توجه به اینکه داشتن علم آناتومی برای بررسی درمان و علاج بیماری ها لازم و ضروری می باشد. به علاوه بررسی توصیفات تشریحی، به لزوم استفاده بیشتر نسخه های خطی طب قدیم توسط پزشکان را تاکید می کند. لذا این تحقیق با هدف مقایسه تطبیقی تشریح روده باریک در متون طب قدیم و جدید انجام شد.

روش کار: این تحقیق مطالعه ای کتابخانه ای بود که از کتب معتبری شامل تشریح الأبدان از منصورِ طبیب شیرازی، قانون شیخ الرئیس ابوعلی سینا، ذخیره خوارزمشاهی از حکیم جرجانی و تشریح میرزا ابوالحسن خان بن عبدالوهاب تفرشی و در بخش طب نوین از کتاب آناتومی گری و اسنل استفاده شد. این کتب با توجه به درجه اعتبار، پیشنهاد اساتید محترم طب سنتی انتخاب شدند. مطالب مربوط به روده باریک از این کتب استخراج، دسته بندی و در قالب جداول مقایسه گردید.

نتایج و بحث: نتایج مقایسه تطبیقی تشریح روده باریک از نظر طب سنتی و نوین نشان می دهد که مطابقت مطالب این دو دیدگاه را در موقعیت، اجزاء، لایه های جدار، عروق و اعصاب نشان می دهد و تنها تفاوت مربوط به اصطلاحات و واژه های خاص آن زمان است. توصیفات تشریحی روده باریک با دقت و کامل

صورت گرفته و به همه جنبه های آناتومیک و مجاورات اشاره شده است. لذا تبحر و توجه حکما و دانشندان طب قدیم آن هم با وجود عدم دسترسی به تکنیک های تصویر برداری و پاراکلینیک را به علم تشریح نشان می دهد.

کلمات کلیدی: روده باریک، سنتی، طب، نوین، تشریح

Anatomy of the small intestine from the point of view of traditional medicine and its comparative with modern medicine

Shabnam Mohammadi[1], Amir parviz Tavassoli[2]

1Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Mohammadish@mums.ac.ir

2Department of Persian Medicine, Faculty of Persian and Complementary Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
tavassolyap1@mums.ac.ir

Introduction: In the sources of traditional medicine, the science of anatomy is considered necessary and the basis of medical knowledge, and ancient scientist paid special attention to it. Considering that having the science of anatomy is necessary to examine the treatment and cure of diseases. In addition, the examination of anatomical descriptions emphasizes the need for more use of ancient medicine by doctors. Therefore, this research was performed with the aim of comparative comparison of small intestine dissection in old and new medicine texts.

Method: This research was a library study, which included the authoritative books, including the description of al-Ibadan by Mansour Tabib Shirazi, the Canon of Ibn-sina, the Zakhireye Khwarazmshahi by Hakim Jorjani and the description of Mirza Abulhasan Khan bin Abdolvahab Tafreshi, and in the section of modern medicine by Gray and Snell's anatomy book was used. These books were selected according to the degree of validity, suggested by respected professors of traditional medicine. The contents related to the small intestine were extracted from these books, categorized and compared in the form of tables.

Results: The results of the comparative comparison of the anatomy of the small intestine from the point of view of traditional and modern medicine show that the contents of these two perspectives are consistent in the position, components, wall layers, vessels and nerves, and the only difference is related to the special terms and words of that time. .

Conclusion: Anatomical descriptions of the small intestine have been performed carefully and completely, and all anatomical aspects and adjacent have been mentioned. Therefore, the

1-Corresponding Author: Shabnam Mohammadi

expertise and attention of ancient medicine and scientists shows it to the science of anatomy despite the lack of access to imaging and paraclinical techniques.

Keywords: small intestine, traditional, medicine, modern, anatomy

مقدمه

دانش تشریح یکی از علوم پایه پزشکی به شمار می رود که پزشکان قدیم از جمله شیخ الرئیس و حکیم جرجانی آگاهی از علم تشریح و شناخت عملکرد اعضا را از جمله فنون چهار گانه اصلی علم طب می دانستند. در منابع طب ایرانی، علم تشریح لازمه دانش پزشکی شمرده می شده است و پزشکان به آن توجه ویژه ای داشته اند. علم تشریح عبارت از علمی بوده است که با کمک آن حقیقت اعضاء، از روی کمّیت و کیفیت و وضع؛ یعنی تعداد و صور و اشکال و وضع و موقع و نسبت آن‌ها با هم؛ از قُرب و بُعد و مشارکت و مُحاذات و غیرآن شناخته می شده است. روده باریک بخشی از لوله گوارشی است که مسئولیت اصلی جذب غذا را برعهده دارد. مری غذا را به معده منتقل می کند. معده آنرا برای هضم آماده می کند. ترشحات برون ریز کبد و پانکراس موجب آسان شدن هضم می گردد. هضم درون روده کوچک انجام می پذیرد و موارد هضم شده از طریق مخاط روده کوچک جذب می شود. بقایای زاید را کولون دفع می کند. روده کوچک از پیلور شروع و تا سکوم ادامه دارد. ژوژنوایلیوم از لیگامان تریتز شروع شده و به دریچه ایلیوسکال ختم می گردد. عموما" ژوژنوم قسمت فوقانی شکم را مخصوصا" در طرف چپ اشغال می کند و در تماس با پانکراس، طحال، کولون، کلیه چپ و آدرنال می باشد. گرفتاریهای این اعضا بر ژوژنوم تاثیر می گذارد. مثلا" پانکراتیت موجب ایلیوس موضعی ژوژنوم می گردد. ژوژنوم قطر بزرگتر از ایلیوم و قوس شریانی کمتری دارد. بجز اثنی عشر تمام روده کوچک از پریتوئن احشایی پوشیده می شود. مزانتر به طور مایل به جدار خلفی شکم متصل می شود که در بالا از چپ در ناحیه دومین مهره کمری شروع شده و بطور مایل به سمت راست و پایین طی مسیر می کند. بجز بخش ابتدایی اثنی عشر که توسط شاخه های تنه سلیاک تغذیه می شود بقیه قسمتهای روده کوچک را شریان مزانتریک فوقانی تغذیه می کند. گردش وریدی روده کوچک به موازات شریان ها می باشد. روده کوچک مقادیر زیاد انباره های لنفاوی در پلاک های پیر دارد. تمامی روده کوچک درناژ لنفاوی غنی دارد و وجود این مجاری نقش مهمی در جذب چربی دارد. با توجه به اهمیت روده باریک و درگیری آن در بیماری های متعددی مانند بیماری های التهابی مانند کرون، آنتریت سلی، آنتریت تیفوئیدی، نئوپلاسم های خوش خیم و بدخیم، بیماری های دیورتیکولی، سندرم ها، فیستول، انسداد و غیره در این پژوهش این ارگان انتخاب شد [Amoli et al, 2019]. مقایسه تطبیقی از منظر طب سنتی و طب نوین درباره آناتومی روده باریک باعث روشن شدن بیشتر سهم حکمای قدیم در رشد و توسعه دانش پزشکی و فراهم سازی زمینه مطالعه بیشتر منابع و کتب غنی توسط دانشجویان و پزشکان خواهد بود. لذا هدف از تحقیق حاضر مقایسه تطبیقی از منظر طب سنتی و طب نوین درباره تشریح روده باریک است.

روش کار

این تحقیق از نوع توصیفی- تحلیلی بود که در آن از کتب معتبری قانون شیخ الرئیس، تشریح منصوری، تشریح عبدالوهاب تفرشی و ذخیره خوارزمشاهی از حکیم جرجانی استفاده شد. این کتب با توجه به درجه اعتبار، پیشنهاد اساتید طب سنتی انتخاب شدند. مطالب مربوط به روده باریک از این کتب استخراج و نت برداری شد. سپس دسته بندی و در جدول آورده شد. در هر بخش معادل مطالب از کتب آناتومی گری و آناتومی اسنل استخراج شد و در قالب جداول مقایسه ای ارائه شد.

نتایج

به منظور خلاصه سازی و تسهیل بهتر درک مطالب مربوط به تشریح روده باریک از نظر دیدگاه طب سنتی و نوین را در قالب جدولی ارائه کردیم.

۱- محل روده باریک

۱-۱- دیدگاه طب سنتی: مجرای طولانی عضلانی و غشائیست در شکم که از بواب معده تا به ولوول دقاق و اعور کشیده شده است [Avicenna, 2007; Abu Sahl Al-Masihi, 2008; Abdolvahab Tafreshi, 1312; Jorjani, 2001]

۱-۲- دیدگاه طب امروزی: روده کوچک طویل ترین قسمت لوله گوارش است که از پیلور معده تا تقاطع دریچه ایلیوسکال امتداد یافته است. بخش اعظم هضم و جذب غذا در روده کوچک انجام می شود [Snell, 2012].

۲- بخشهای مختلف روده باریک

۱-۲- دیدگاه طب سنتی: مرکب از ۳ جزء اثنی عشر، صائم، دقاق است. اثنی عشر بصورت نعل اسب است که جز اولش مورب از راست به خلف به جانب عنق مراره و زیر کبد رفته جزء دومیش عمود در قدام گرده راست و در جانب راست فقرات سوم و سیستم قطن نازل شده است. روده صائم و دقاق به صورت حلقه هایی متحرک بواسطه ماساریقا به جدار خلفی شکم بسته شده است [Avicenna, 2007; Abu Sahl Al-Masihi, 2008; Abdolvahab Tafreshi, 1312; Jorjani, 2001]

در تشریح منصوری بخشهای مختلف با بیتی این گونه بیان شده است:

روده های آدمی اندر عدد شش بیش نیست کردم آن را جمله در یک بیت منظوم ای حکیم

اول است اثناعشر، پس صائم و آنگه دقاق وز پس او اعور و قولون و آنگه مستقیم

۲-۲- دیدگاه طب امروزی: روده کوچک دارای سه قسمت دئودنوم، ژوژنوم و ایلئوم می باشد. دئودنوم لوله ای C شکل به طول ۱۰ اینچ است که معده را به ژوژنوم متصل می کند و مجاری صفراوی و پانکراتیک به آن باز می شود. دئودنوم حول سر پانکراس دور می زند. قسمت اول دئودنوم توسط صفاق پوشیده شده و بقیه آن خلف صفاقی است. ژوژنوم و ایلیوم طولی حدود ۲۰ پا دارند. دو پنجم فوقانی متعلق به ژوژنوم است. ژوژنوم و ایلیوم ویژگی های مجزایی دارند و این ویژگی ها به تدریج از ژوژنوم به ایلیوم تغییر می کنند. ژوژنوم از خم دئودنوژوژنال شروع شده و ایلیوم در تقاطع دریچه ایلیوسکال خاتمه می یابد [Snell, 2012]

۳- صفاق پوشاننده روده باریک

۱-۳- دیدگاه طب سنتی: صفاق روده نازک ماساریقا است که در کنار مقعر روده محتوی رگ ها و اعصاب ماساریقا است. [Abdolvahab Tafreshi, 1312]

۲-۳- دیدگاه طب امروزی: قوس های ژوژنوم و ایلیوم آزادانه در حرکت هستند و به وسیله چین های بادبزنی شکل صفاق تحت عنوان مزانتر به جدار خلفی شکم متصل شده اند. لبه آزاد طویل این چین روده متحرک را در برمی گیرد. ریشه مزانتر محل عبور شاخه های شریان و ورید مزانتریک فوقانی، عروق لنفاوی و اعصاب هستند [Snell, 2012]

۴- لایه های روده باریک

۱-۴- دیدگاه طب سنتی: جدار روده نازک دارای چهار پرده است:

۱- غشاء سرز چینی است که ماساریقا که جزء قدامی اثنی عشر، صائم و دقاق را در برگرفته است.

۲- غشاء عضلانی که دارای طبقه بیرونی و دایره درونی می باشد.

۳- غشاء سلولی عبارتست از نسج ملتحمه که عروق و اعصاب در آن متفرقند.

۴- غشاء مخاط نرمتر از مخاط معده بارنگ خاکستری که در موقع هضم سرخ می گردد. ولوولهای روده نازک چینی از غشاء مخاط و شکلشان هلالی است. فزونی های مخاطی به نام خمل روده از دهان بوابی معده تا کنار آزاد ولوول صائم و دقاقی بصورت چماقی وجود دارد [Avicenna, 2007; Abu Sahl Al-Masihi, 2008; Abdolvahab Tafreshi, 1312; Jorjani, 2001]

۲-۴- دیدگاه طب امروزی: روده باریک دارای مخاط می باشد که چین های نیم هلالی حلقوی دارد. پوشش مخاط دارای برجستگی های مخاطی کوتاه به نام ویلوس است. زیر مخاط دارای عروق خونی و لنفاوی و نورون های منتشر و بهم پیوسته مربوط به شبکه عصبی مایسنر می باشد. لایه عضلانی روده باریک به خوبی تکامل یافته و از لایه حلقوی داخلی و لایه طولی خارجی و نورون های شبکه میانتریک یا اورباخ تشکیل شده است. روده باریک توسط یک سروز نازک از جنس مزوتلیوم که در امتداد مزانترها قرار گرفته است، پوشیده می شود [Anthony, 2020] .

۵- عروق روده باریک

۱-۵- دیدگاه طب سنتی: شرائین روده نازک شریان کبدی و ماساریقای فوقانی می باشد.

۲-۵- دیدگاه طب امروزی: خونرسانی روده باریک توسط شاخه های شریان مزانتریک فوقانی صورت می گیرد. شاخه های روده ای از کنار چپ شریان جدا شده و در مزانتر طی مسیر می کنند تا به لوله گوارش برسند. این شاخه ها با هم آناستوموز داده و یک سری قوس های شریانی می سازند. تحتانی ترین قسمت ایلیوم توسط شریان ایلیوسکال خونرسانی می شود [Snell, 2012].

۶- اعصاب روده باریک

۱-۶- دیدگاه طب سنتی: اعصاب روده نازک از شبکه آفتابی آمده و در تارهای عضلانی پخش شده است. [Abu Sahl Al-Masihi, 2008; Abdolvahab Tafreshi, 1312; Jorjani, 2001]

۲-۶- دیدگاه طب امروزی: اعصاب روده باریک از اعصاب سمپاتیک و پاراسمپاتیک واگ شبکه مزانتریک فوقانی تامین می شود. این شبکه امتداد قسمت تحتانی شبکه سلیاک است. رشته های سمپاتیک عملی حرکتی برای اسفنکتر ایلیوسکال دارد اما برای بقیه عضلات صاف روده باعث انبساط می شود [Snell, 2012].

جدول ۱- مقایسه محل، اجزاء، صفاق، لایه ها، عروق و اعصاب روده باریک از دیدگاه طب سنتی و نوین

توصیف محل، غشاء، مجاورات و بخش های روده از منظر طب سنتی و طب امروزی		
	طب سنتی	طب امروزی
نام	روده نازک	روده باریک
محل ارگان	در شکم از بواب معده تا اعور قولون	در شکم از پیلور معده تا دریچه ایلیوسکال
بخش های مختلف	اثنی عشر	دئودنوم
	صائم	ژوژنوم
	دقاق	ایلیوم
صفاق	ماساریقا	مزانتر
لایه ها از داخل به خارج	غشاء مخاط دارای خمل و ولول روده نازک	لایه مخاطی دارای ویلی و چین های حلقوی روده باریک
	غشاء سلولی	لایه زیر مخاط
	غشاء عضلانی بیرونی و درونی	لایه عضلانی طولی و حلقوی
	غشاء سرز	لایه سروزی
عروق	کبدی، ماساریقای فوقانی	هپاتیک، مزانتریک فوقانی
اعصاب	اعصاب آفتابی	انشعاب تحتانی شبکه سلیاک (شبکه مزانتریک فوقانی)

بحث

نتایج مقایسه تطبیقی تشریح روده باریک از نظر طب سنتی و نوین نشان می دهد که مطابقت مطالب این دو دیدگاه را در موقعیت، اجزاء، لایه های جدار، عروق و اعصاب نشان می دهد و تنها تفاوت مربوط به اصطلاحات و واژه های خاص آن زمان است. در این تحقیق از کتب معتبری شامل تشریح الأبدان از منصورِ طبیب شیرازی، ذخیرۀ خوارزمشاهی اثر سیّداسماعیل جرجانی، قانون شیخ الرئیس ابوعلی سینا و تشریح میرزا ابوالحسن خان بن عبدالوهاب تفرشی معروف به میرزا ابولحسن خان دکتر استفاده شده است. توصیفات تشریحی روده باریک با دقت و کامل صورت گرفته و به همه جنبه های آناتومیک و مجاورات اشاره شده است. لذا تبحر و توجه حکما و دانشندان طب قدیم آن هم با وجود عدم دسترسی به تکنیک های تصویر برداری و پاراکلینیک را به علم تشریح نشان می دهد.

فهرست مراجع

1. Dr. Hadi Ahmadi Amoli. Schwartz's Book of Principles of Surgery (2019). Artin-teb publication. p.189-229.
2. Snell R. (2012) Clinical Anatomy by Regions. 9th edition .Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; translator:Shirazi R, Esfandiari E. p. 230-235.
3. Anthony LM, (2020). Junqueira's Basic histology, 12th ed. McGraw-Hill companies, Newyork. P 395-401.
4. Avicenna. (2007). Al-Qanun fi al-Tibb (The Canon of Medicine). 1th edition. Translated by Masoudi A. Kashan: Morsel Publication. p. 512-515.
5. Abu Sahl Al-Masihi I. Tashrih-e Badan-e Ensan. (2008). Tehran: Institute of Medical History Studies, Islamic and Complementary Medicine, Iran University of Medical Sciences. p. 163-164
6. Abdolvahab Tafreshi MA. (1312). Anatomy. Medical History Studies institute publication. p. 288-292.
7. Jorjani IH. (2001). Zakhireye Khwarazmshahi. 1th ed. Tehran, Iranian Academy of Medical Sciences publication; p. 118- 125.

مطالعه داکینگ مولکولی و ADMET ترکیبات فلاونوئیدی به عنوان مهارکننده پروتئاز اصلی کروناویروس

حامد شهریارپور[1*]

۱. کارشناسی ارشد بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
*نویسنده مسئول: hamed_shahryarpour@modares.ac.ir

چکیده

اهمیت آنزیم پروتئاز اصلی (M^{pro}) در هضم پلی‌پروتئین‌های ویروسی، M^{pro} را به عنوان یک هدف دارویی جذاب برای طراحی داروهای ضد ویروسی معرفی می‌کند. این مطالعه با هدف مطالعه داکینگ مولکولی و پیش‌بینی خواص ADMET ترکیبات فلاونوئیدی به عنوان بازدارنده آنزیم M^{pro} انجام شده است. در این راستا، ما مطالعات داکینگ مولکولی کوئرستین، اپی گالوکاتچین گالات، کائمفرول، هسپریدین و میریستین را با استفاده از آتوداک وینا انجام دادیم. سپس به وسیله سرورهای آنلاین admetSAR و SwissADME، خصوصیات ADMET ترکیبات مورد مطالعه پیش‌بینی شد. مولکول N3 که پیش‌تر بعنوان یک بازدارنده بالقوه برای آنزیم M^{pro} معرفی شده بود در این مطالعه به عنوان مولکول مرجع در نظر گرفته شد. مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که هسپریدین نسبت به مولکول مرجع N3 و سایر ترکیبات انرژی اتصال بالاتری دارد. مطالعه ADMET نشان داد که کائمفرول، میریستین و کوئرستین خواص فیزیکوشیمیایی و فراهمی زیستی خوبی به عنوان یک دارو دارند ولی سمیت این ترکیبات برای ارگان‌ها و ژنتیک نسبت به ترکیب مرجع بیشتر بود. اگرچه ترکیب هسپریدین انرژی اتصال بالاتری نسبت به سایر ترکیبات داشت، ولی خواص فیزیکوشیمیایی و فراهمی زیستی خوبی به عنوان یک دارو ندارد. به طور کلی مطالعه حاضر جهت بررسی

اثر بخشی و بهینه سازی ترکیبات فلاونوئیدی به منظور بازدارندگی فعالیت آنزیم M^{pro} انجام شد و در نهایت مشخص شد که هسپریدین نسبت به ترکیب مرجع N3 نتیجه بهتری دارد، ولی باید بهینه‌تر شود.

کلمات کلیدی: کروناویروس، پروتئاز اصلی، فلاونوئید، داکینگ مولکولی، ADMET.

Molecular docking and ADMET study of flavonoid compounds as main protease inhibitors of coronavirus

Hamed Shahriarpour[1*]

1- MSc in Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: hamed_shahryarpour@modares.ac.ir

Abstract

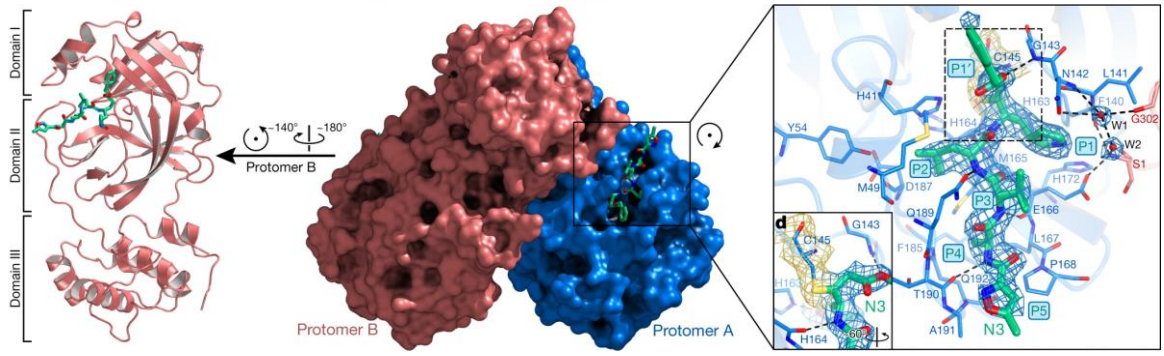
The importance of the main protease enzyme (M^{pro}) in the digestion of viral polyproteins makes M^{pro} an attractive drug target for the design of antiviral drugs. This study was conducted with the aim of studying molecular docking and predicting the ADMET properties of flavonoid compounds as M^{pro} enzyme inhibitors. In this regard, we performed molecular docking studies of Quercetin, Epigallocatechin gallate, Kaempferol, Hesperidin, and Myricetin using Autodock Vina. Then, the ADMET properties of the studied compounds were predicted by online servers admetSAR and SwissADME. N3 molecule, which was previously introduced as a potential inhibitor for M^{pro} enzyme, was considered as the reference molecule in this study. Molecular docking studies showed that Hesperidin has a higher binding energy than the reference molecule N3 and other compounds. The ADMET study showed that Kaempferol, Myricetin and Quercetin have good physicochemical properties and bioavailability as a drug, but the toxicity of these compounds for organs and genetics was higher than the reference compound. Although the Hesperidin compound had a higher binding energy than other compounds, it does not have good physicochemical properties and bioavailability as a drug. In general, the present study was conducted to evaluate the effectiveness and optimization of flavonoid compounds in order to inhibit M^{pro} enzyme activity, and finally it was found that Hesperidin has better results than reference compound N3, but it should be optimized.

Keywords: Coronavirus, Main protease, Flavonoid, Molecular docking, ADMET.

مقدمه

شیوع اخیر ویروس کروناویروس سندرم حاد تنفسی ۲ (SARS-CoV-2) و نوع دلتای آن (Omicron) تأثیر قابل توجهی بر بهداشت و اقتصاد تقریباً همه کشورهای جهان داشته است [۱،۲].انتقال سریع ویروس از انسان به انسان مهار آن را دشوار کرده است و در حال حاضر هیچ درمان شناخته شده‌ای برای کووید19 وجود ندارد [۳].هنگامی که ژنوم RNA ویروس کرونا یک سلول میزبان جدید را آلوده می‌کند، مانند یک پیام‌رسان عمل می‌کند و به سلول میزبان دستور می‌دهد تا پلی‌پروتئین‌هایی تولید کند که دستگاه تکثیر ویروس کرونا جدید را می‌سازد [۵].ژنوم SARS-CoV-2 دو نوع سیستئین پروتئاز تولید می‌کند، سیستئین پروتئاز شبیه پاپائین (PL^{Pro}) و سیستئین پروتئاز شبیه 3-کیموتریپسین ($3CL^{pro}$) یا پروتئاز اصلی (M^{pro}) [۵].در طول تکثیر ویروس، M^{pro} و PL^{pro} پلی‌پروتئین‌های ویروسی را که با استفاده از ماشین‌های انتقال سلول میزبان سنتز می‌شوند، پردازش می‌کنند تا یک مجتمع تکثیر ویروسی فعال برای بسته‌بندی در سلول‌های میزبان تولید کنند [۵،۶].از این رو، این پروتئازها اهداف جذابی برای مهارکننده‌های مولکولی ارائه می‌کنند. تکثیر SARS-CoV-2 توسط یک کمپلکس تشکیل شده از دو پلی‌پروتئینی که از RNA ویروسی ترجمه شده‌اند، انجام می‌شود. این پلی‌پروتئین‌ها در حداقل ۱۱ محل در اطراف انتهای C و ناحیه مرکزی توسط عمل باقی‌مانده‌های کاتالیزوری در M^{pro} شکسته می‌شوند و پروتئین‌های حیاتی مورد نیاز برای تکثیر ویروس را آزاد می‌کنند [۷]. M^{pro}، SARS-CoV-2 شامل دو پروتومر و سه دامنه است، دامنه I (باقی مانده ۸-۱۰۱)، دامنه II (باقی مانده ۱۰۲-۱۸۴) و دامنه III (باقی مانده ۲۰۱-۳۰۳) [۱۰].M^{pro} ویروس‌های SARS-CoV دارای یک دوتایی کاتالیزوری Cys145-His41 است که در محل اتصال به سوبسترا بین دامنه‌های I و II قرار دارد (شکل ۱) [۹].

N3 یک مهار کننده پپتید مانند است که نشان داده شده است در مهار فعالیت M^{pro} موثر است (شکل ۱) [۱۰].این مولکول یکی از بسیاری از مهارکننده‌های بالقوه‌ای است که برای درمان COVID-19 مورد مطالعه قرار گرفته است و تحقیقات بیشتری برای تعیین اثربخشی و ایمنی آن برای استفاده در انسان مورد نیاز است.



شکل ۱: ساختار کریستالی SARS-CoV-2 M^{pro} در کمپلکس با مولکول N3 [۱۰].

محصولات طبیعی منبع مهمی برای کشف و توسعه دارو هستند و دارای تنوع و پیچیدگی ساختاری هستند [۱۱].فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات گیاهی هستند که به دلیل خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی خود شناخته شده‌اند [۱۲].کوئرستین فلاونوئیدی است که در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات از جمله پیاز، سیب و انواع توت‌ها یافت می‌شود [۱۳].اپی گالوکاتچین گالات فلاونوئیدی است که در چای سبز یافت می‌شود [۱۴].کائمفرول یک فلاونوئید است که در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات از جمله کلم پیچ، کلم بروکلی و گریپ فروت یافت می‌شود [۱۵].هسپریدین فلاونوئیدی است که در مرکبات مانند پرتقال و لیمو وجود دارد [۱۶]. میریستین یک فلاونوئید است که در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات از جمله انواع توت‌ها، انگور و پیاز وجود دارد [۱۷].به طور کلی، فلاونوئیدها گروه مهمی از ترکیبات گیاهی‌اند که به دلیل خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی خود شناخته شده هستند و به دلیل مزایای بالقوه آن‌ها برای سلامتی، از جمله توانایی آن در کاهش التهاب و حمایت از سلامت مغز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۲].

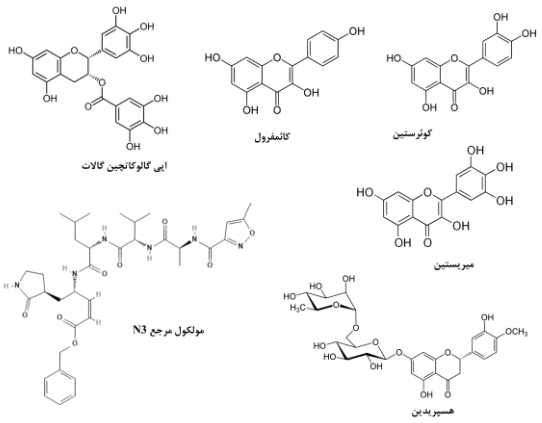
این پژوهش، پتانسیل ترکیبات فلاونوئیدی ذکر شده برای مهار M^{pro} با استفاده از مطالعات داکینگ مولکولی و ADMET را مورد بررسی قرار داده است. مولکول N3 که قبلا به عنوان یک مهارکننده بالقوه M^{pro} شناخته شده است در این مطالعه مرجع قرار داده شده است [۱۰].

روش کار

مطالعه داکینگ مولکولی

فایل مربوط به ساختار کریستالوگرافی اشعه ایکس پروتئاز اصلی M^{pro} از پایگاه داده پروتئین (PDB) بدست آمد (PDB ID: 6LU7). این فایل حاوی پروتومر A پروتئاز اصلی، مولکول N3 و مولکول‌های آب بود، برای خالص‌سازی آن با کمک نرم‌افزار دیسکاوری استودیو مولکول‌های N3 و آب از فایل حذف شدند و پروتئین خالص شد. سپس ساختار سه بعدی ترکیبات کوئرستین، اپی گالوکاتچین گالات، کائمفرول، هسپریدین، میریستین و N3 از PubChem دانلود شد (شکل ۲). مولفه بار و هیدروژن‌های قطبی با استفاده از ابزار آتوداک به مولکول پروتئین و ترکیبات مورد مطالعه اضافه شد و به فرمت PDBQT ذخیره شدند. به منظور

انجام داکینگ متمرکز در جایگاه فعال M^{pro} یک Grid Box با مرکزیت x=-12، y=11 و z=69 و اندازه‌های x=32، y=32 و z=28 ایجاد شد و سپس توسط نرم‌افزار آتوداک وینا فرایند داکینگ مولکولی اجرا شد.



شکل ۲: مولکول‌های مورد مطالعه.

مطالعه ADMET

سرورهای آنلاین، admetSAR و SwissADME، برای تجزیه و تحلیل و ارزیابی توصیفگرهای فیزیکوشیمیایی در ارتباط با خواص فارماکوکینتیک، سمیت و شباهت دارویی مورد استفاده قرار گرفتند. این سرورها به فرمت SMILES به عنوان ورودی نیاز دارند. فرمت SMILES مربوط به ترکیبات مورد مطالعه از پایگاه داده PubChem بدست آمد (جدول ۱). برای بررسی شباهت دارویی ترکیبات مورد مطالعه با در نظر گرفتن ۶ ویژگی فیزیکوشیمیایی و تشکیل یک رادار فراهمی زیستی با استفاده از ابزار SwissADME تجزیه و تحلیل شد. شش پارامتر در نظر گرفته شده: حلالیت، اندازه، قطبیت، چربی دوستی، انعطاف‌پذیری و اشباع.

جدول ۱: شناسه و فرمت SMILES ترکیبات مورد مطالعه.

ردیف	نام ترکیب	شناسه ترکیب در PubChem	SMILES
۱	کوئرستین	5280343	C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O
۲	اپی گالوکاتچین گالات	65064	C1C(C(OC2=CC(=CC(=C21)O)O)C3=CC(=C(C(=C3)O)O)O)OC(=O)C4=CC(=C(C(=C4)O)O)O
۳	کائمفرول	5280863	C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O
۴	هسپریدین	10621	CC1C(C(C(C(O1)OCC2C(C(C(C(O2)OC3=CC(=C4C(=O)CC(OC4=C3)C5=CC(=C(C=C5)OC)O)O)O)O)O)O)O)O
۵	میریستین	5281672	C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O
۶	ترکیب مرجع N3	146025593	CC1=CC(=1)C(=O)NC(C)C(=O)NC(C(C)C)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CC2CCNC2=O)C=CC(=O)OCC3=CC=CC=C3

نتایج

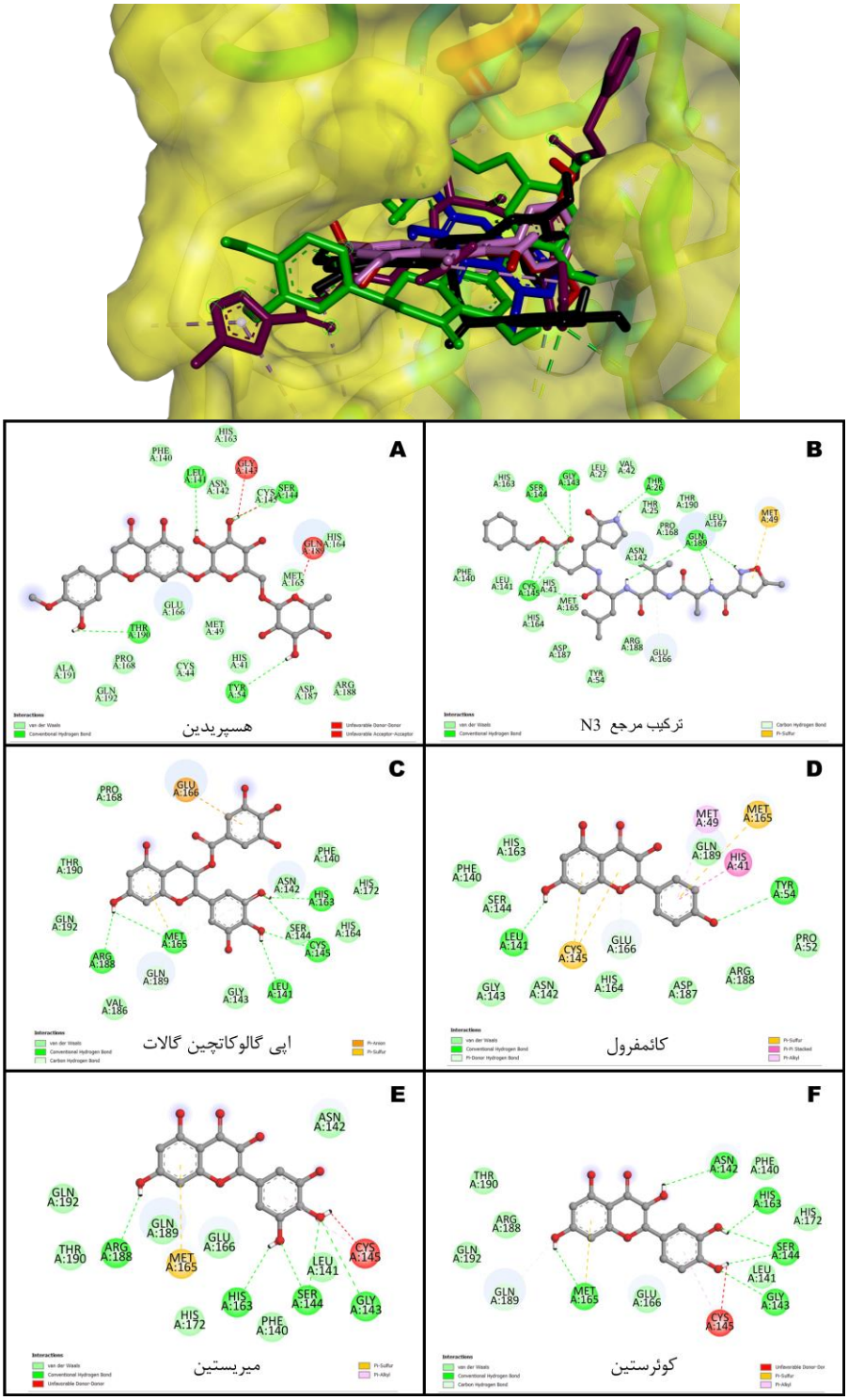
نتایج داکینگ مولکولی

داکینگ مولکولی یک ابزار محاسباتی ضروری در حوزه کشف دارو است [۱۸].این کار برای انتخاب بهتر ترکیبات بالقوه و مطالعه تشکیل پیوند در کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند در محل اتصال انجام می‌شود. جدول ۲ نتایج داکینگ مولکولی را براساس میل اتصال لیگاند به جایگاه فعال پروتئین M^{pro} و همچنین میان‌کنش‌هایی که بین لیگاند و پروتئین برقرار می‌شود را نشان می‌دهد. مولکلول N3، که یک مهارکننده بومی است، به عنوان کنترل و مطالعه مقایسه‌ای نتایج داکینگ استفاده شد. نتایج نشان داد که از ۵ ترکیب مورد مطالعه مولکلول هسپریدین میل اتصال بالاتری نسبت به N3 دارد. بررسی تصاویر سه بعدی و دو بعدی (شکل ۳) از میان‌کنش‌های بین ترکیبات مورد مطالعه و پروتئین M^{pro} نشان داد که این ترکیبات به خوبی در جایگاه فعال این آنزیم داک شده و میان‌کنش‌های متفاوتی با باقیمانده‌های آن دارند.

جدول ۲: امتیازات داکینگ مولکولی و میان‌کنش‌های بین پروتئین و لیگاند.

ردیف	نام ترکیب	میل اتصال (Kcal/Mol)	میان‌کنش‌های پروتئین-لیگاند
۱	هسپریدین	-۸,۷	پیوندهای هیدروژنی معمول: Ser144-Leu141-Thr190-Tyr54 نیروهای واندروالسی: His140-His163-Asn142-Cys145-His164-Met165-Arg188-Asp187-His41-Met49-Cys44-Glu166-Pro168-Gln192-Ala191 میان‌کنش‌های نامطلوب: Ser144-Gly143 (دهنده-دهنده)، Gln189 (پذیرنده-پذیرنده)
۲	ترکیب مرجع N3	-۸,۳	پیوندهای هیدروژنی معمول: Gly143, His164, Gln189, Thr190, Glu166, Glu166, Glu166, Phe140 نیروهای واندروالسی: Thr24, Thr25, Thr26, Ser144, Cys145, Gln192, Tyr54, Arg188, Asp187, His172, Leu141, Asn142, His163 پیوند کربن-هیدروژن: His172 پیوند الکیلی: Leu167, Met165, Ala191, Pro168, Met49, His41 پیوند کوالانسی: Cys145
۳	اپی گالوکاتچین گالات	-۷,۷	پیوندهای هیدروژنی معمول: Arg188, Met165, Leu141, Cys145, Cys145, His163 نیروهای واندروالسی: Val186-Gly143-Ser144-His164-His172-Asn142-Phe140-Pro168-Thr190-Gln192 پیوند کربن-هیدروژن: Gln189-Met165-Met165 پیوند پی: Glu166 (آنیون)، Met165 (سولفور)
۴	کائمفرول	-۷,۷	پیوندهای هیدروژنی معمول: Leu141-Tyr54 نیروهای واندروالسی: Phe140-Ser144-His163-Gln189-Pro52-Arg188-Asp187-His164-Asn142-Gly143 پیوند کربن-هیدروژن: Glu166 پیوند پی: Met49 (آلکیل)- His41 (پی-پی استک)- Met165-Cys145 (سولفور)
۵	میریستین	-۷,۳	پیوندهای هیدروژنی معمول: Arg188-His163-Ser144-Ser144-Gly143 نیروهای واندروالسی: Asn142-Leu141-Phe140glu166-His172-Gln189-Thr190-Gln192

			پیوند پی: Cys145 (آلکیل)- Met165 (سولفور) میان‌کنش‌های نامطلوب: Cys145 (دهنده-دهنده)
۶	کوئرستین	-۷,۳	پیوندهای هیدروژنی معمول: Met165-Asn142-His163-Ser144-Ser144-Gly143 نیروهای واندروالسی: Gln192-Arg188-Thr190-Phe140-His172-Leu141-Glu166 پیوند کربن-هیدروژن: Asn189 پیوند پی: Cys145 (آلکیل)– Met165 (سولفور) میان‌کنش‌های نامطلوب: Cys145 (دهنده-دهنده)



شکل ۳: نمای دو بعدی و سه بعدی از میان‌کنش‌های بین ترکیبات مورد مطالعه و پروتئین M^{pro}.

نتایج ADMET

ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی از طریق تجزیه و تحلیل ADMET برای ارزیابی اثربخشی نامزدهای دارویی بالقوه و پیش‌بینی خواص شباهت دارو ضروری است. خواص ADMET محاسبه شده و خواص فیزیکوشیمیایی پیش‌بینی شده ترکیبات مورد مطالعه در جدول ۳ آورده شده است. تمام پارامترهای آنالیز شده مانند وزن مولکولی، تعداد دهند و گیرنده پیوند هیدروژنی، TPSA، AlogP، تعداد پیوندهای قابل چرخش، جذب گوارشی، گذرنده از سد خونی-مغزی، مهارکنندگی انواع سیتوکروم‌ها، سرطان‌زایی و سمیت برای اندام‌های مختلف بدن و ژنتیک برای ترکیبات مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. طبق قانون لیپینسکی برای اینکه یک ترکیب به عنوان لیگاند واجد شرایط شود، باید وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون، چربی دوستی بالا، یعنی مقدار LogP کمتر از ۵، گیرندگی پیوند هیدروژنی کمتر از ۱۰ و دهندگی پیوند هیدروژنی کمتر از ۵ باشد [۱۹].اگر چه طبق این قانون ترکیبات کائمفرول، میریستین و کوئرستین در محدوده توصیه شده قرار دارند، ولی باید دقت شود که سمیت این ترکیبات برای ارگان‌های مختلف بدن و ژنتیک و همچنین توانایی بازدارندگی چند نوع سیتوکروم نسبت به ترکیب مرجع N3 بیشتر است. نسبت به ترکیب مرجع N3 که فقط یک پارامتر آن از محدوده خارج است (وزن مولکول بالاتر از ۵۰۰ دالتون)، ترکیب هسپریدین و اپی گالوکاتچین گالات به ترتیب ۳ و ۲ پارامتر از محدوده خارج دارند. از لحاظ سمیت و توانایی بازدارندگی سیتوکروم‌ها ترکیب هسپریدین بهترین نتیجه را نشان داده است.

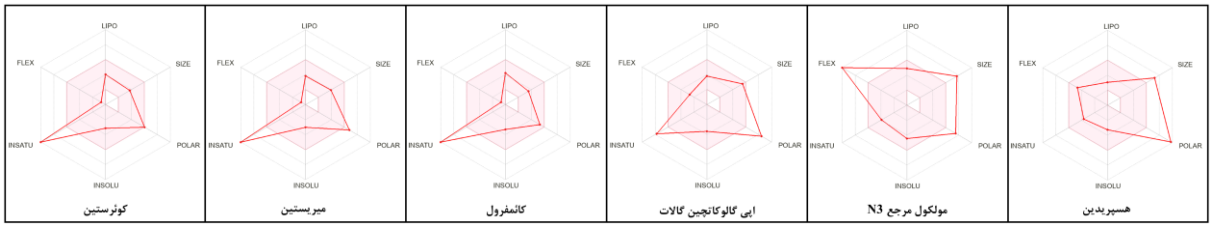
جدول ۳: پیش‌بینی‌های ADMET از ۶ ترکیب مورد مطالعه.

	نام ترکیب	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
۱	هسپریدین	610.56	8	15	234.29	-0.14	7	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
۲	ترکیب مرجع N3	680.79	5	9	197.83	3.35	22	↓	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
۳	اپی گالوکاتچین گالات	458.37	8	11	197.37	1.17	4	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
۴	کائمفرول	286.24	4	6	111.13	1.9	1	↑	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
۵	میریستین	318.24	6	8	151.59	1.18	1	↓	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
۶	کوئرستین	302.24	5	7	131.36	1.54	1	↑	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+

A: وزن مولکولی، B: تعداد دهنده پیوند هیدروژنی، C: تعداد پذیرنده پیوند هیدروژنی، D: TPSA، E: AlogP، F: تعداد پیوندهای قابل چرخش، G: جذب گوارشی، H: گذرنده از سد خونی-مغزی، I: مهارکننده CYP3A4، J: مهارکننده سیتوکروم CYP2D6، K: مهارکننده سیتوکروم CYP2C9، L: مهارکننده سیتوکروم CYP2C19، M: مهارکننده سیتوکروم CYP1A2، N: سرطان‌زایی، O: خوردگی چشم، P: سوزش چشم، Q: جهش‌زایی ایمز، R: ریزهسته‌ای، S:

سمیت کبدی، T: اتصال گیرنده آندروژن، U: گاما PPAR. *فعال= (+)، غیر فعال= (-) *سبز=در محدوده، قرمز=خارج از محدوده.

رادار فراهمی زیستی یک ابزار توصیفی برای بررسی شباهت دارویی لیگاندها بر اساس ۶ ویژگی فیزیکوشیمیایی است. ناحیه سایه‌دار صورتی مقادیر بهینه ۶ پارامتر را تعریف می‌کند و انحراف از این پارامترها در مقیاس بزرگ نشان‌دهنده عدم فراهمی زیستی لیگاند به صورت خوراکی است [۲۰].مطالعه نشان داد که ترکیبات کائمفرول، میریستین و کوئرستین نسبت به ترکیب مرجع N3 نتیجه بهتری دارند ولی به صورت کامل در ناحیه مطلوب قرار ندارند. ترکیبات هسپریدین، اپی گالوکاتچین گالات و ترکیب مرجع N3 در محدوده مطلوب قرار ندارند و فراهمی زیستی خوبی ندارند (شکل ۴).



شکل ۴: رادار فراهمی زیستی ترکیبات مورد مطالعه.

بحث

استفاده از روش‌های in silico و محصولات طبیعی می‌تواند کشف نامزدهای دارویی بالقوه را تا حد زیادی تسریع کند. علاوه بر این، یافته‌های این مطالعه اهمیت هدف قرار دادن آنزیم M^{pro} را در توسعه داروهای ضد ویروسی برجسته می‌کند. M^{pro} یک آنزیم بسیار حفاظت شده در بین کروناویروس‌ها است که آن را به یک هدف جذاب برای توسعه داروهای ضد ویروسی با طیف گسترده تبدیل می‌کند. علاوه بر این، جایگاه فعال M^{pro} بسیار خاص است و فرصت طراحی بازدارنده‌های انتخابی با حداقل اثرات خارج از هدف را فراهم می‌کند [۲۱].با این حال، هنوز چالش‌های زیادی وجود دارد که باید در توسعه مهارکننده‌های موثر M^{pro} مورد توجه قرار گیرد. یکی از چالش‌های اصلی بهینه‌سازی خواص فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک ترکیبات شناسایی شده است. بسیاری از محصولات طبیعی فراهمی زیستی ضعیفی دارند که کارایی آن‌ها را به عنوان کاندیدای دارو محدود می‌کند. بنابراین، بهینه‌سازی بیشتر ترکیبات شناسایی شده برای بهبود خواص فارماکوکینتیک آن‌ها مانند حلالیت، پایداری و نفوذپذیری ضروری است [۲۲].

در این پژوهش، ۵ تا از فلاونوئیدها انتخاب شدند. با استفاده از تکنیک داکینگ مولکولی انرژی اتصال و میان‌کنش‌های این ترکیبات با جایگاه فعال آنزیم M^{pro} بررسی شد. نتایج داکینگ مولکولی نسبت به بازدارنده مرجع N3 مقایسه شد و مشخص شد که ترکیب هسپریدین از نظر انرژی اتصال قوی‌تر دارد. سپس خواص فیزیکوشیمیایی این ترکیبات با استفاده از قانون لیپینسکی سنجیده شد و مشخص شد که ترکیبات کائمفرول، میریستین و کوئرستین در محدوده ای از پارامترهای فیزیکوشیمیایی قرار دارند که می‌توانند یک

داروی مناسب باشند ولی ترکیبات N3، اپی گالوکاتچین گالات و هسپریدین هر کدام ۱، ۲ و ۳ پارامتر خارج از محدوده دارند و نمی‌توانند یک داروی مناسب باشند و رادار فراهمی زیستی نیز همین نتیجه را نشان داد.

ترکیب هسپریدین نتیجه بهتری نسبت به ترکیب مرجع N3 در داکینگ مولکولی نشان داد و اگرچه طبق قانون لیپینسکی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این ترکیب، نمی‌تواند یک داروی مناسب باشد، بعضی از داروهای استفاده شده به صورت خوراکی از این قانون پیروی نمی‌کنند و میتوان گفت که این دارو نیز می‌تواند با بهینه‌سازی بعضی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن مورد استفاده قرار گیرد. برتری دیگر این ترکیب نسبت به دیگر ترکیبات مورد مطالعه و همچنین ترکیب مرجع N3 این است که سمیت کمتری برای ارگان‌ها و ژنتیک دارد و هیچکدام از سیتوکروم‌ها را مهار نمی‌کند.

مراجع

LAUXMANN, M., SANTUCCI, N., & AUTRÁN-GÓMEZ, A. M. (2020). El coronavirus SARS-CoV-2 y el brote de COVID-19. International braz j urol: revista oficial de la Sociedad Brasileña de Urología, 46, 6-18.

Karim, S. S. A., & Karim, Q. A. (2021). Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. The lancet, 398(10317), 2126-2128.

Shahreen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristic of human coronaviruses. J Adv Res, 24(7), 91-98.

Schmidt, N., Lareau, C. A., Keshishian, H., Ganskih, S., Schneider, C., Hennig, T., ... & Munschauer, M. (2021). The SARS-CoV-2 RNA–protein interactome in infected human cells. Nature microbiology, 6(3), 339-353.

Amin, S. A., Banerjee, S., Ghosh, K., Gayen, S., & Jha, T. (2021). Protease targeted COVID-19 drug discovery and its challenges: Insight into viral main protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro) inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry, 29, 115860.

Wabalo, E. K., Dubiwak, A. D., Gizaw, T. S., & Kotu, U. G. (2020). Role of structural and functional proteins of SARS-COV-2. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 12(3), 117-129.

Yang, H., & Rao, Z. (2021). Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. Nature Reviews Microbiology, 19(11), 685-700.

Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R., & Hilgenfeld, R. (2003). Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. Science, 300(5626), 1763-1767.

Yu, W., Wu, X., Zhao, Y., Chen, C., Yang, Z., Zhang, X., ... & Yuan, X. (2021). Computational simulation of HIV protease inhibitors to the main protease (Mpro) of SARS-CoV-2: Implications for COVID-19 drugs design. Molecules, 26(23), 7385.

Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., ... & Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. Nature, 582(7811), 289-293.

AG, X. A., Zotchev, S. B., & Dirsch, V. M. (2021). International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. Nat Rev Drug Discov, 20(3), 200-216.

Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. Int. J. Pharm. Sci. Res, 10(4), 1567-1574.

Mohite, S. S., Shedge, S. A., & Thorat, M. M. (2023). Perks of Quercetin. Pakistan Heart Journal, 56(1), 439-445.

Lange, K. W., Lange, K. M., & Nakamura, Y. (2022). Green tea, epigallocatechin gallate and the prevention of Alzheimer's disease: Clinical evidence. Food Science and Human Wellness, 11(4), 765-770.

Arumugam, T., Sona, C. L., & Maheswari, M. U. (2021). Fruits and vegetables as Superfoods: Scope and demand. J. Pharm. Innov, 10, 119-129.

Evans, J. A., Mendonca, P., & Soliman, K. F. (2022). Neuroprotective effects and therapeutic potential of the citrus flavonoid hesperetin in neurodegenerative diseases. Nutrients, 14(11), 2228.

Shahidi, F., Ramakrishnan, V. V., & Oh, W. Y. (2019). Bioavailability and metabolism of food bioactives and their health effects: A review. Journal of Food Bioactives, 8.

De Ruyck, J., Brysbaert, G., Blossey, R., & Lensink, M. F. (2016). Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry, 1-11.

Lipinski, C. A. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. Journal of pharmacological and toxicological methods, 44(1), 235-249.

Ritchie, T. J., Ertl, P., & Lewis, R. (2011). The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. Drug Discovery Today, 16(1-2), 65-72.

Hu, Q., Xiong, Y., Zhu, G. H., Zhang, Y. N., Zhang, Y. W., Huang, P., & Ge, G. B. (2022). The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. MedComm, 3(3), e151.

Amin, S. A., Banerjee, S., Ghosh, K., Gayen, S., & Jha, T. (2021). Protease targeted COVID-19 drug discovery and its challenges: Insight into viral main protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro) inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry, 29, 115860.

تهیه و بررسی نانوذرات لیپیدی جامد حاوی ماده مؤثره ی گیاه فلفل قرمز (کپساسین) با روش همگن سازی به کمک هموژنـایزر سـرعت بـالا بـه همـراه پـروب اولتراسونیک

معصومه رضائی[۱و۲]*،آسیه بیابانگرد[۳]، ام البنین شهرکی[۲]، مرضیه رضایی[۴]

۱.دانشگاه پیام نور استان خراسان رضوی واحد مشهد ، گروه شیمی ،دانشکده شیمی ، مشهد ، ایران

۲.مرکز تحقیقات فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۳. دانشگاه سیستان و بلوچستان گروه شیمی دانشکده ی علوم پایه ، زاهدان ، ایران

۴. دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده هنر ، گروه بافت ، زاهدان ، ایران

rezaemasoomeh@yahoo.com

چکیده:

کپسایسین، آنتی اکسیدانی است که خواص دارویی بسیاری دارد. با وجود اثرات برجسته دارویی و اثرات بیولوژیکی، حلالیت کم در آب و از بین رفتن سریع ، کاربردهای درمانی آن را محدود می‌کند، بنابراین استفاده از نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs) به عنوان یک سیستم دارورسان با خواص عالی مانند اندازه ذرات کوچک، زیست سازگاری، پایداری شیمیایی و فیزیکی و قابلیت کاربرد آسان، برای این پژوهش مناسب درنظر گرفته شد. هدف ازتهیه ی نانوذرات لیپیدی جامد حاوی کپسایسین تهیه یک سیستم نانوحامل جدید و کارآمد برای اثربخشی بیشترکپسایسین بود.

در پژوهش حاضر نانوذرات حاوی کپسایسین به روش همگن سازی به کمک هموژنـایزر سـرعت بـالا بـه همـراه پـروب اولتراسونیک ساخته شدند و سایز، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا مورد ارزیابی قرار گرفت از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای بررسی شـکل نـانو ذرات استفاده شد .همچنین پایداری نانوذرات لیپیدی جامد با FT-IR بررسی شد که نتایج مناسبی بدست آمد . سایز نانو ذرات حدود ۵۶۹ نانو متر با پتاسیل زتای منفی ۳۰ و شاخص پراکندگی ۰/۳ بدست آمد.

کلمات کلیدی : کپسایسین ، نانوذرات لیپیدی جامد (SLN)، دارورسانی

Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles containing the active substance of red pepper plant (capsaicin) by homogenization method with the help of high speed homogenizer with ultrasonic probe

Masoomeh Rezae[1,2 *], Asiyeh Biabangard[3] ,Omolbanin Shahraki[2] and Marziyeh Rezae[4]

1. Payam Noor University of Khorasan Razavi, Mashhad Branch, Department of Chemistry ,Faculty of Chemistry , Mashhad, Iran
2. Pharmacology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
3. University of Sistan and Baluchestan, Department of Chemistry, Faculty of Chemistry, Zahedan, Iran
4. University of Sistan and Baluchistan, Faculty of Arts, Department of Texture, Zahedan, Iran

rezaemasoomeh@yahoo.com

Abstract:

Capsaicin is an antioxidant that has many medicinal properties. Despite its outstanding medicinal and biological effects, its low solubility in water and rapid elimination limit its therapeutic applications. Therefore, the use of solid lipid nanoparticles (SLNs) as a drug delivery system with excellent properties such as small particle size, biocompatibility, chemical and physical stability and easy application was considered suitable for this research. The purpose of preparing solid lipid nanoparticles containing capsaicin was to prepare a new and efficient nanocarrier system for greater effectiveness of capsaicin. In the current study, nanoparticles containing capsaicin were made by homogenization using a high-speed homogenizer with an ultrasonic probe, and the size, dispersion index, and zeta potential were evaluated. A scanning electron microscope was used to examine the shape of nanoparticles. Also, the stability of solid lipid nanoparticles. investigated by FT-IR that good results were obtained. The size of nanoparticles was about 569 nanometers with a negative zeta potential of 30 and a dispersion index of 0.3.

Key words: capsaicin, solid lipid nanoparticles (SLN), drug delivery.

مقدمه

دارورسانی هدفمند در اصطلاح مجموعه فعالیتهایی است که منجر به تجمع مواد دارویی در یک منطقه خاص از بدن میشود. بسته به محل بیماری این فعالیتها ممکن است باعث رسیدن دارو به عضوی خاص، نوع خاصی از سلول و یا حتی برخی از اندامکهای درون سلولی باشد. اصلی ترین مزیت استفاده از دارورسانی هدفمند افزایش اثرات درمانی دارو بدون القای عوارض جانبی بر روی اندامکها، بافتها و یا سلولهای سالم است. در طول این سالها دارورسانی کم کم جایگاه خود را پیدا کرده و اهمیت آن آشکار شده است به طوری که امروزه بسیاری از دانشمندان تحقیقات خود را به توسعه استراتژیهای دارورسانی هدفمند برای درمان بیماریهای تهدیدکننده بشر اختصاص داده اند و چندین مورد آن نیز به بازار مصرف دارو وارد شده است[۱]. از لحاظ تئوری هر سیستم تحویل هدفمند دارو باید دو ویژگی داشته باشد: افزایش کارآیی دارو در بافت بیمار، کاهش سمیت دارو در دیگر بافتهای سالم. در عصر جدید داروسازی، دانشهای مختلفی نظیر فناوری نانو، شیمی پلیمر و زیست شناسی ملکولی با دارورسانی هدفمند ترکیب شده اند تا بتوانند این سیستمها را توسعه دهند.

نانوذرات لیپیدی جامد(SLN) ساختارهایی کلوئیدی هستند که میتوان آنها را با کمک امولسیون سازی تهیه نمود و با استفاده از نیروهای مکانیکی مانند انرژی فراصوت و هموژنایزر به اندازه ی زیر میکرومتر رساند. این سیستمها با جایگزینی فاز روغنی امولسیون (W/O) با روغن جامد یا مخلوطی از روغن های جامد، یعنی مخلوطی از ذرات ماتریکس لیپیدی که در دمای اتاق و در بدن جامد می باشند، تشکیل می شوند میانگین ذرات SLN محدوده ای بین ۴۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر را در بر می گیرد. مطالعات نشان داده که ویژگی های فیزیکوشیمیایی و پایداری داروهایی که در SLN بارگیری شده اند وابسته به خواص داروها و اجزاء به کار رفته در آن می باشد [۲]. این ساختارها توانایی حمل داروها و مواد فعال را در قسمت لیپیدی خود دارند که همین امر موجب محافظت ماده ی مورد نظر از آسیبهای محیطی میشود. در نتیجه این طیف از نانوذرات میتوانند در حمل داروها و طولانی نمودن اثربخشی آنها مورد استفاده قرار گیرند [۳].

فلفل قرمز گیاهی است یکساله، با نام علمی capsicam annuum L. و متعلق به تیره بادمجانیان میباشد. این گیاه حاوی مقادیر بالایی از فلاونوئیدها و فنولیک های طبیعی ، به خصوص کوئرستین، لوتئولین و کاپسایسیوئیدها می باشد[۴]. کپسایسین دارای کاربردهای درمانی بسیاری است و می تواند به عنوان ضد درد و ضد التهاب برای دستگاه گوارش و بیماری های قلبی و عروقی و تنفسی عمل کند [۵] .با این وجود حلالیت کم در آب و فراریت اثرات درمانی آن را کاهش می دهد نانوذرات لیپیدی جامد موجب پایداری

داروی افزایش یافته ،می شوند و به علت نداشتن سمیت حامل و رها شدن کنترل شده ی دارو و استفاده نکردن از حلال های آلی در روش تهیه برای انتقال هدفمند و کنترل شده ی داروی کپسایسین به کار می روند [۶]و [۷].

مواد و روش ها :

در این تحقیق برای ساخت نانوذرات جامد لیپیدی از روش همگن سازی به کمک هموژنایزر سرعت بالا به همراه پروب اولتراسونیک استفاده شد. سپس میانگین اندازه ذره ای، پتانسیل زتا و توزیع سایز ذرات مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از آن فرمولاسیون منتخب فریزدرای شد سایز، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی مورد مطالعه قرار گرفت و در پایان از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای بررسی شکل نانو ذرات استفاده شد. استئاریل الکل (ساخت شرکت sigma Aldrich آلمان)، کپسایسین از شرکت merc خریداری شد و توئین ۸۰ (ساخت شرکت PLC international-Croda انگلیس) در این پژوهش استفاده شد .

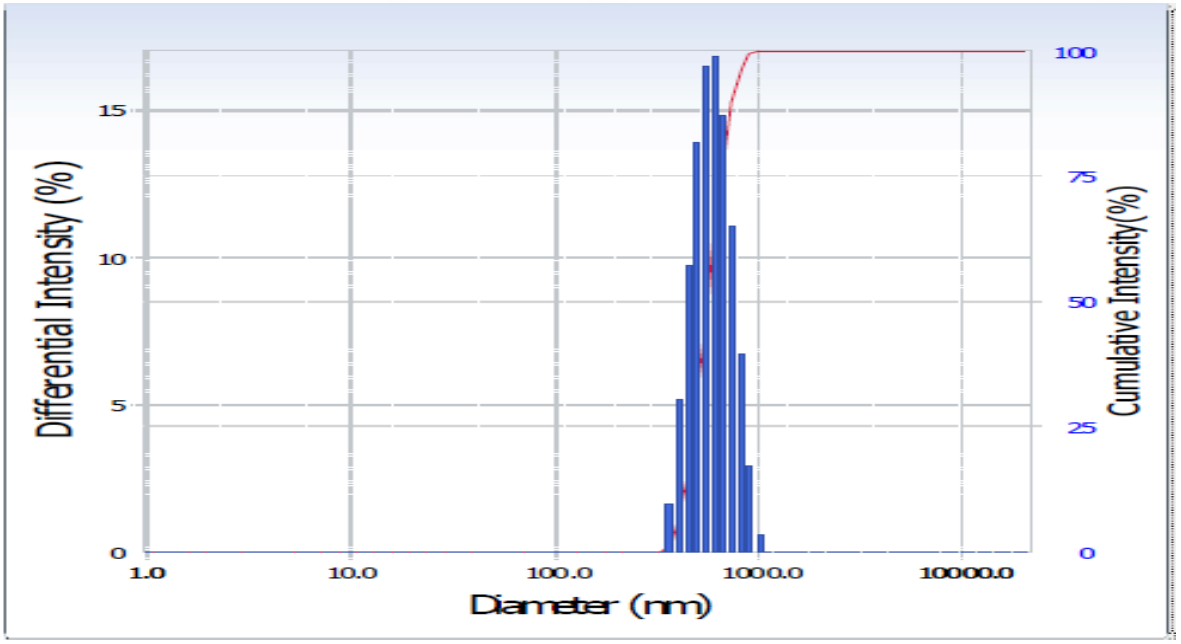
سنتز نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی داروی گیاهی کپسایسین :

تهیه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی داروی گیاهی کپسایسین به روش هموژناسیون تحت امواج التراسونیک (homogenization and ultrasound) انجام شد. برای تهیه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی داروی کپسایسین به این روش به دو فاز لیپیدی و آبی نیاز است .فاز چربی فرمولاسیون، استئاریل الکل بود که پس از دستیابی به فرمولاسیون نهایی ماده موثره نیز وارد همین فاز شد، کپسایسین محلول در چربی میباشد. فاز آبی شامل توئین ۸۰ (۸۰) Toween به همراه آب بود. بعد از توزین مواد مورد نیاز فرمولاسیون (لیپید، آب و امولسیفایر) با درصدهای مشخص (جدول شماره 1) ، فاز لیپیدی و آبی هرکدام به طور جداگانه در دو فالکون مجزا داخل بنماری قرارداده شد، بن ماری روی دمای°c 80 تنظیم شده و دو فالکون حاوی دو فاز داخل آن قرار داده شده تا فاز چربی ذوب شده و دو فاز همدما شوند. در این مرحله ابتداکپسایسین به فاز چربی اضافه و همزده شد ؛ پس از یک دقیقه دو فاز را از بنماری خارج کرده و فاز آبی به سرعت و به طور ناگهانی به فاز چربی اضافه شد. در این مرحله امولسیون سفید رنگی تشکیل شد (در هر بار حجمی برابر ۹ سی سی نمونه تهیه شد) و سپس با هموژنایزر مدل (DIAX900 ،ساخت شرکت Heidolphآلمان) به مدت ۶ دقیقه یکنواخت شد. بعد از هموژناسیون، ترکیب به دستگاه (prob sonicator) مدل (bandelin sonoplus) سونیکیتور پروب ساخت (MSE انگلستان) ۳سیکل و هر سیکل ۳۰ ثانیه منتقل شد. سپس مخلوط در دمای محیط قرار داده شد تا کاملاً سرد شده و با محیط همدما شود تا نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی کپسایسین (Capsicine-SLN) تشکیل شود [8].

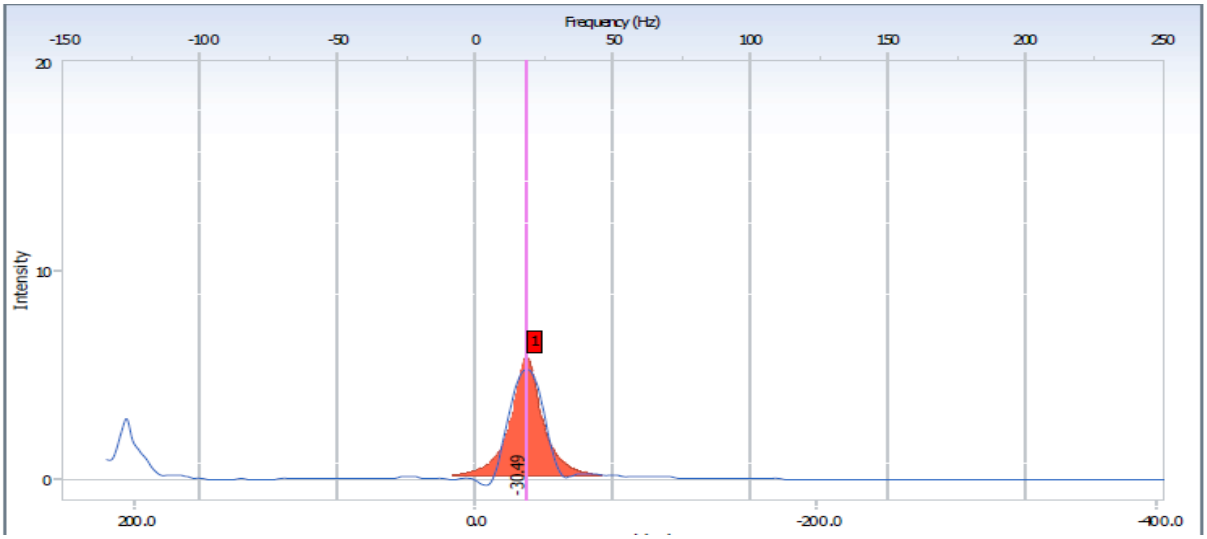
پس از ساخت فرمولاسیون ها بخشی از آنها فریزدرای شد . بدین منظور و با توجه به اینکه فریز درای کردن نانوذرات به طور مستقیم منجر به تخریب و صدمه احتمالی به ساختار ذرات می شود، از مانیتول به میزان ۵ w/w % به عنوان محافظ سرمایی یا (Cryoproctectant) در فرایند فریز درای کردن استفاده شد [9] .

بررسی اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا:

برای بررسی اندازه ذره ای و پتانسیل زتا از دستگاه آنالیز اندازه ذرات (bandelin sonoplus)،ساخت شرکت انگلستان استفاده شد. پتانسیل زتا در پایداری سیستمهای ذره ای اهمیت دارد. این پتانسیل میزان دامنه بین ذرات مجاور با بار مشابه را تعیین میکند. اگر پتانسیل زتا از حد خاصی پایینتر باشد نیروهای جاذبه بر دافعه غلبه کرده و ذرات با هم تجمع مییابند. میانگین اندازه ذره و توزیع آن اغلب یکی از مهمترین پارامترهای مرتبط با کیفیت است که سایر خواص ماکروسکوپی را تحت تأثیر قرار میدهد نانوذرات سنتز شده اندازه ای در حدود ۵۶۹ نانومتر با ضریب پراکندگی ۰/۲۸۱ و شارژ منفی در حدود ۳۰ میلی ولت داشتند شکل (۱) توزیع سایز ذرات را نشان می دهد. مقادیر PDI عددی بین صفر (برای یک نمونه کاملا یکنواخت با توجه به اندازه ذره) تا یک (برای یک نمونه کاملا پراکنده با جمعیت های اندازه ذرات متعدد) است در سیستم های دارورسانی بر پایه چربی مانند SLNs عدد ۰/۳ و پائین تر قابل قبول است [۱۰]. پتانسیل زتا ی منفی ۳۰ نشان دهنده ی پایداری قابل قبول نانوذرات است که در شکل (۲) نشان داده شده است . اندازه کوچک ذرات (کمتر از ۶۰۰ نانومتر) به بهبود فراهمی زیستی و جذب سلولی فرمولاسیون کمک می کند.



شکل ۱ : توزیع سایز نانو ذرات لیپیدی جامد Capsicine-SLN



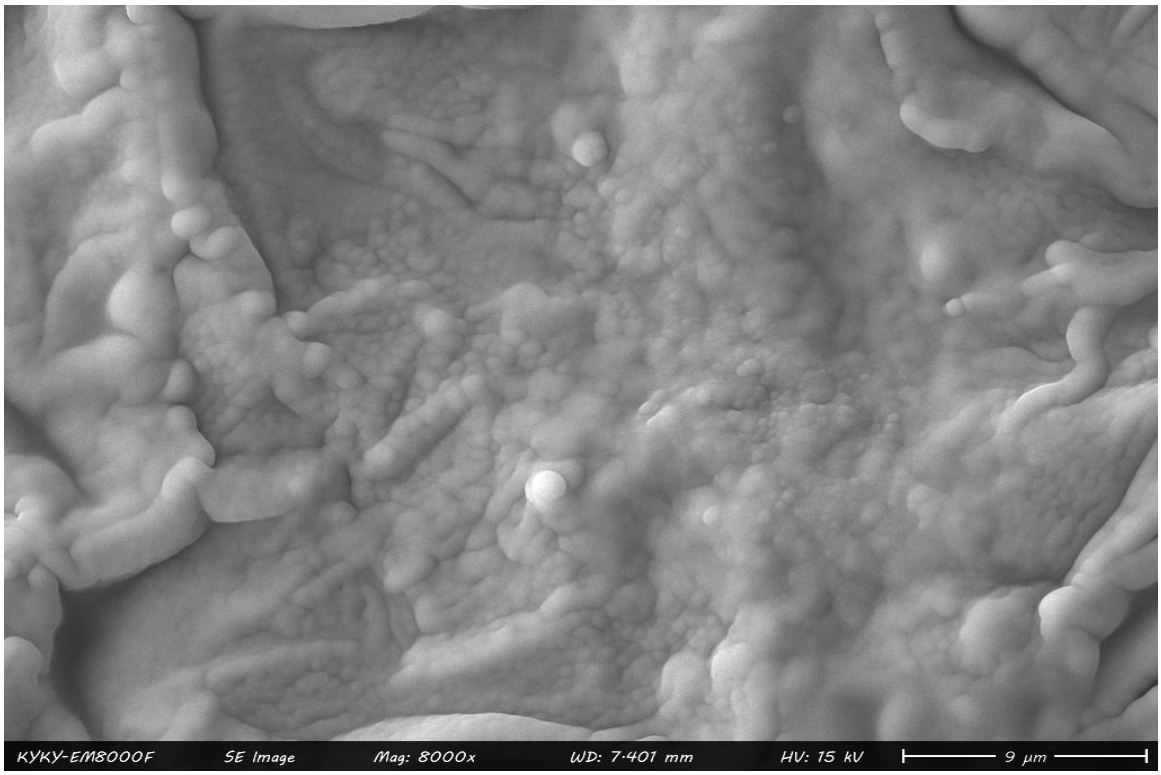
شکل ۲ :پتانسیل زتا نانو ذرات لیپیدی جامد Capsicine-SLN

جدول شماره ۱ :

فاز	اجزای فرمولاسیون	مقادیر وزنی – حجمی درصد
فاز چربی	استئاریل الکل ،کپسایسین	۳
فاز آبی	توئین ۸۰	۱/۵
	آب	تا ۱۰۰

بررسی مورفولوژی نانوذرات لیپیدی جامد :

برای عکسبرداری و بررسی مورفولوژی نانوذرات لیپیدی جامد از میکروسکوپ الکترونی روبشی (واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه سیستان و بلوچستان) استفاده شد. نتایج حاصل از عکسهای میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد اندازه ذره ای ذرات کمتر از 596 نانومتر بوده و شکل ذرات تقریباً کروی است ؛ کروی بودن نانو ذرات لیپیدی جامد باعث میشود که این ذرات بیشترین توانایی را جهت آزادسازی کنترل شده و محافظت از دارو را داشته باشند زیرا شکل کروی دارای طولانی ترین مسیر جهت حرکت دارو محبوس در نانو ذره و همچنین کمترین سطح تماس با محیط آبی فاز پراکنده، نسبت به سایر اشکال نانوذرات میباشد. در شکل شماره ۳ نتایج حاصل از FE-SEM نشان داده شده است . برای بررسی مورفولوژی نمونه ها فریز درای شدند.



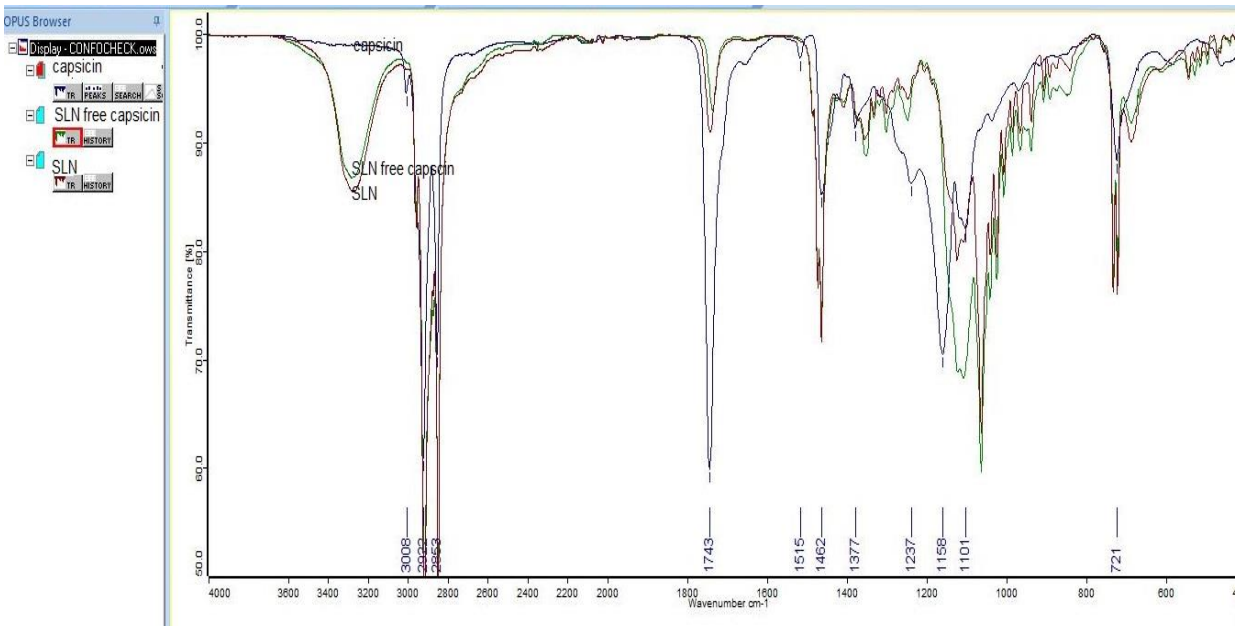
شکل ۳: بررسی مورفولوژی نانو ذرات لیپیدی جامد Capsicine-SLN با FE-SEM بعد از فریز درای

بررسی پایداری نانو حامل حاوی داروی گیاهی کپسایسین (Capsicine-SLN) :

به منظور بررسی پایداری ساختاری نانوحامل تولید شده عدم برهمکنش های شیمیایی نانوحامل با استفاده از تکنیک FT-IR مورد مطالعه قرار گرفت از کپسایسین(capsicine)و نانو ذرات لیپیدی جامد بدون ماده موثره ی کپسایسین (SLNs)و نانو ذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با ماده موثره ی کپسایسین (Capsicine-SLN) طیف FT-IR گرفته شد .

برخی از طیف های مربوط به کپسایسین عبارتند از ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن مربوط به باندهای CH_2 و CH_3 در ۳۰۰۰- ۲۸۰۰ ؛پیک مربوط به پیوند دوگانه C=C در ۲۲۰۰ ؛ پیک مربوط به NH آمیدی در ۳۱۰۰ ؛ باند کششی C=O در ۱۷۴۳ و ارتعاش کششی C-C در محدوده ی ۱۱۷۰-۹۶۰ می باشد. همانطور که مشاهده می شود پیک های مربوط به لیپید مصرفی بر روی شکل مشخص شده مقایسه ی نانوحامل های حاوی کپسایسین با نانو ذرات لیپیدی جامد بدون کپسایسین نشان داد که هیچگونه پیک

جدیدی در طیف نانوحامل های حاوی کپسایسین ایجاد نشده است این پدیده نشان دهنده ی عدم انجام واکنش شیمیایی بین کپسایسین و سایر ترکیبات فرمولاسیون می باشد و از طرفی افزایش شدت پیک در طیف نانوذرات لیپیدی حاوی کپسایسین نسبت به طیف بدون کپسایسین نشان دهنده ی لود شدن دارو در سیستم نانوحامل می باشد شکل (۴) طیف FT-IR مربوط به حالت های مختلف را نشان می دهد.



شکل ۴ :طیف FT-IR الف- کپسایسین ، ب- نانوذرات لیپیدی بدون داروی گیاهی کپسایسین ، پ- نانوذرات لیپیدی حاوی داروی گیاهی کپسایسین

نتیجه گیری :

نانوذره های لیپیدی جامد سامانه های حامل دارویی کلوئیدی با برتری های فیزیکو شیمیایی بالایی هستند که برای انتقال دارو به طور گسترده استفاده می شوند در مطالعه ی اخیر نانوذره ی لیپیدی بارگیری شده با داروی گیاهی کپسایسین تهیه و ارزیابی شد مطالعه ی میکروسکوپ الکترونی روبشی و FT-IR و پتانسیل زتا تولید نانوذرات لیپیدی جامد حاوی داروی گیاهی کپسایسین را در بازه قابل قبول تایید شد .

منابع :

[1]. Strebhardt, K. and A. Ullrich, *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress.* Nature Reviews Cancer, 2008, 8(6): p. 473-480.

[2]. Utreja, S. and N. Jain, *Solid lipid nanoparticles.* Advances in controlled and novel drug delivery, 2001: p. 408-424.

[3]. Saupe, A. and T. Rades, *Solid lipid nanoparticles*, in *Nanocarrier Technologies*. 2006, Springer. p. 41-50.

[4]. Materska M, Perucka I, 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (Capsicum annuum L), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(5): 1750-6.

[2]. Müller, R.H., Radtke, M. and Wissing, S.A. 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. Int. J. Pharm., 242: 121-128.

[3]. Golmohammadzadeh Sh, Mokhtari M and Jaafari MR. Preparation, characterization and evaluation of moisturizing and UV protecting effects of topical solid lipid nanoparticles. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2012; 48 (4): 683 - 90.

[4]. Bunjes H. Characterization of Solid Lipid Nano- and Microparticles. In: Lipospheres in drug targets and delivery. Edited by Nastruzzi C, Florida. 2005, pp: 41 - 66.

[5]. Anogianaki, A.; Negrev, N.N.; Shaik, Y.B.; Castellani, M.L.; Frydas, S.; Vecchiet, J.; Tete, S.; Salini, V.;De Amicis, D.; De Lutiis, M.A.; et al. Capsaicin: An irritant anti-inflammatory compound. J. Biol. Reg.Homeos. Agents **2007**, 21, 1–4.

[6]. Cirri M., Mennini N., Maestrelli F., Mura P., Ghelardini C., di Cesare Mannelli L., Development and in Vivo Evaluation of an Innovative "Hydrochlorothiazide-In Cyclodextrinsin Solid Lipid Nanoparticles" Formulation with Sustained Release and Enhanced Oral Bioavailability for Potential Hypertension Treatment in Pediatrics, Int. J. Pharm., 521(1): 73-83 (2017).

[7]. Li S., Zhao B., Wang F., Wang M., Xie S., Wang S., Han C., Zhu L., Zhou W., Yak InterferonAlpha Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Controlled Release, Res. Vet. Sci., 88(1): 148-153 (2010).

[8]. Wissing SA, Kayser O, Muller R H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2004; 56 (9): 1257 - 72.

[9]. Ghaffari S , Varshosaz J , Saadat A , Atyabi F. Stability and antimicrobial effect of amikacin -loaded solid lipid nanoparticles. Int J Nanomed 2011;6:35 -43.

[10]. Palombo M, Deshmukh M, Myers D, Gao J, Szekely Z, Sinko PJ. Pharmaceutical and toxicological properties of
engineered nanomaterials for drug delivery. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2014;54:581-98.

تولید بیوگاز از پسماند گیاهان دارویی و علف های هرز منطقه سیستان

عماد کیانی[1*]، عاطفه کشته گر[2]، محمدصدراجوکار[3]

1. دبیرستان استعدادهای درخشان حضرت محمد(ص)
(emadkian123@gmail.com)
۲. دبیر زیست شناسی فرزانگان
۳. دبیرستان استعدادهای درخشان حضرت محمد(ص)

چکیده

یکی از مهمترین مسایل پیش روی بشر محدودیت منابع و انرژی است حقیقتی که او را به کشف منابعی نو وادار ساخته است. انسان به مدد قوه ی تعقل و تفکر توانسته از منابع طبیعی اطرافش بهترین استفاده ها را ببرد؛ یکی از منابع نوظهور در این عرصه ، بیوگازها هستند. وقتی که مواد آلی پوسیده یا تجزیه می شوند؛ ترکیبی از دی اکسید کربن و متان تولید می کنند.این گازها «بیوگاز» یا «انرژی کاملا سبز» نامیده می شوند که می توانند به مصارف گوناگونی داشته باشند. استان پهناور سیستان و بلوچستان ظرفیت های فراوانی در زمینه توسعه، کشت،پرورش، فرآوری گیاهان دارویی دارد؛ اما نبود صنایع تبدیلی و فرآوری گیاهان دارویی در این استان باعث شده تا این تولیدات، بیش‌تر به شکل خام فروشی وارد بازار شوند و یا در دامان طبیعت بلا استفاده باقی بمانند. برای انجام این پژوهش، روش تحقیق آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. هدف اصلی پژوهش تولید بیوگاز از پسماند گیاهان دارویی برای یافتن منبعی تجدیدپذیر در قسمت بیومَس است. با استفاده از چراغ بونزن و گرما، مقدار بیوگاز تولیدی و میزان گاز متان در طی این آزمایش اندازه گیری شد؛ نتایج آزمایش بیانگر این است که مقدار بیوگاز تولیدی با طرح ریزی مناسب، به اندازه ای است که می تواند حرارت لازم برای پخت یک وعده غذایی را میسّر نماید. با تولید بیوگاز از پسماند گیاهان دارویی ضمن ارائه منبع جدید برای انرژی های تجدیدپذیر می توان گامی مؤثر در جهت حفظ محیط زیست و کاهش گازهای گلخانه ای برداشت همچنین بیوگاز تولیدی در مقیاس بزرگ می تواند جایگزینی برای انرژی های فسیلی باشد.

کلید واژگان : زیست توده، تولید بیوگاز، انرژی های تجدید پذیر، محیط زیست، گیاهان دارویی.

Abstract

One of the most important issues facing mankind is the limitation of resources and energy, a fact that has forced him to discover new resources. Man has been able to make the best use of the natural resources around him with the help of the power of reasoning and thinking; One of the emerging sources in this field is biogas. When organic matter decays or decomposes; They produce a combination of carbon dioxide and methane. These gases are called "biogas" or "completely green energy" that can be used for various purposes. The vast province of Sistan and Baluchistan has many capacities in the field of development, cultivation, cultivation, and processing of medicinal plants; But the lack of transformation and processing industries of medicinal plants in this province has caused these products to enter the market in the form of raw sales or remain unused in the lap of nature. To conduct this research, the laboratory research method was used. The main goal of the research is to produce biogas from the waste of medicinal plants to find a renewable source in the biomass part. Using a Bunsen lamp and heat, the amount of biogas produced and the amount of methane gas were measured during this experiment; The test results show that the amount of biogas produced with proper planning is enough to provide the heat needed to cook a meal. By producing biogas from the waste of medicinal plants, while providing a new source of renewable energy, an effective step can be taken to protect the environment and reduce greenhouse gases. Also, biogas produced on a large scale can be an alternative to fossil fuels.

Keywords: biomass, biogas production, renewable energy, environment, medicinal plants.

مقدمه

به دلیل استفاده بیش از حد از سوخت های فسیلی و آلودگی ناشی از آن ها گرمای جهانی و آلودگی محیط زیست ازمباحث بسیار مهمی است که محققان بسیاری را به تحقیق در این زمینه واداشته است. از سوی دیگر خالی شدن منابع سوخت های فسیلی و تقاضای روزافزون انرژی باعث بحران انرژی شده است که محققان را به سوی یافتن سوخت های جایگزین مناسب با اثرات زیست محیطی کمتر هدایت می کند. منابع انرژی های تجدیدپذیر شامل: انرژی خورشید ، باد ، زمین گرمایی ، برق آبی و بیومس هستند. بیوگازها از جمله منابع تجدیدپذیری هستند که می توان با مدیریت درست از آن هم در راستای تولید انرژی و هم حفظ محیط زیست گام برداشت.انرژی حاصل از بیوگاز علاوه بر خاصیت تجدیدپذیر بودن، سازگار با محیط زیست است. بیوگازها می‌توانند به انرژی الکتریسیته یا به صورت حامل هایی از انرژی مانند: سوخت‌های گازی یا مایع با توجه به نیاز بخش‌های مختلف جامعه تبدیل شوند.

در کشورهایی مانند: چین و هندوستان از بیوگاز به وفور استفاده می کنند، به طوری که در چین در فواصل سالهای ۱۹۲۰تا ۱۹۸۵بالغ بر هفت میلیون دستگاه تولید بیوگاز ساخته شده است که نیاز انرژی پنجاه میلیون روستایی را برطرف می کند و تا سال ۲۰۱۴بالغ بر ۴۲میلیون بیوراکتور روستایی در سطح روستاها نصب و راه اندازی شده است. در آمریکا نیز بالغ بر ۴۰۰ژنراتور بزرگ و کوچک بیوگازسوز به منظور مصارف خانگی و صنعتی استفاده می شود. بررسی های انجام شده در ایران نشان می دهد که به علت شرایط خاص اجتماعی، اقلیمی و کشاورزی، حجم عظیمی از فضولات حیوانی و انسانی و زباله تولید می شود که در مناطق روستایی با ساده ترین امکانات می توان سامانه های مناسبی برای تبدیل این مواد به بیوگاز احداث کرد. باقی مانده های تبدیل این مواد به بیوگاز نیز کود مرغوب و مناسبی است که ریشه گیاه راحت تر می تواند آن را جذب کند. این کود عاری از بوهای نامطبوع است و از نظر نیتروژن، پتاسیم و فسفر بسیار غنی است. از کود حاصل نیز می توان برای افزایش حاصلخیزی خاک بهره گرفت و آلودگی زیست محیطی را کاهش داد.

پیشینه پژوهش

تاریخچه تولید بیوگاز از زیست توده به اوایل سده ی نوزدهم بر می گردد که شخصی به نام دیوی در سال ۱۸۰۸ از طریق تخمیر کود گاوی و با استفاده از تقطیر در خلاء ۰/۳ لیتر گاز متان تولید نمود؛ اما در ایران، حمام شیخ بهایی (مربوط به قرن یازدهم هجری) احتمالاً نخستین حمام بوده که بوسیله گاز متان گرم می شده است؛ اما اولین هاضم تولید متان به صورت نوین در سال ۱۳۵۴ در روستای نیازآباد لرستان ساخته شد و در سال ۱۳۶۱ یک واحد ۳ مترمکعبی در دانشگاه صنعتی شریف مورد مطالعه قرار گرفت.در سال های ۱۳۶۱ -۱۳۶۵ مرکز تحقیقات انرژی های نو در سازمان انرژی اتمی، پژوهشهای ویژه ای را در این زمینه به

انجام رساند که از جمله می توان به احداث ۱۰ واحد بیوگاز در استانهای سیستان و بلوچستان، کردستان و ایلام اشاره کرد.دهه ۱۳۶۰ وزارت جهاد سازندگی نیز در این راه اقداماتی صورت داد. ابتدا در سال ۱۳۶۳ یک واحد آزمایشی در حیدر آباد کرج ساخته شد. سپس در سال ۱۳۶۴ یک نمونهٔ واقعی در روستای چین سیب لی از توابع بخش آق قلا در منطقه گرگان احداث گردید. این وزارتخانه ۴۰ هاضم دیگر در مناطق مختلف کشور ساخت که ۱۸ واحد آن به مرحله گازدهی رسید.همچنین مراکز دانشگاهی و تحقیقاتی در این زمینه گام هایی برداشته اند؛ از جمله می توان به واحد احداث شده توسط جهاد دانشگاهی دانشکده کشاورزی کرج در سالهای ۱۳۶۳-۱۳۶۵و واحد احداث شده در شاهین دژ آذربایجان در سال ۱۳۷۲ اشاره کرد. یک واحد بیوگاز برای هضم فاضلاب انسانی در جزیره کیش و یک واحد تخمیر فضولات دامی (گاوداری) در ماهدشت کرج بوده که هر دو توسط سازمان انرژی اتمی در سالهای ۱۳۷۷ -۱۳۷۸ طراحی و ساخته شده اند در مورد هاضم های لجن و رآکتور های تصفیه بی هوازی فاضلاب در ایران، باید گفت که متأسفانه هم اکنون از بیوگاز هاضم های لجن درهیچ یک از تصفیه خانه های فاضلاب شهری استفاده نمی گردد و رآکتورهای بی هوازی نیز کمتر از ۱۰ واحد بوده است.در ایران تا کنون به صورت عمده تاسیسات استخراج بیوگاز از دفنگاه زباله در سه شهر شیراز، مشهد و اصفهان به اجرا در آمده است و در دو نیروگاه از نوع لندفیل در دو شهر مشهد و شیراز به ظرفیت های ۶۵۰ کیلووات و ۱ مگاوات در سال ۱۳۸۸ به بهره برداری رسید. همچنین می توان به پروژه های بهره برداری شده از فضولات حیوانی در سال ۱۳۹۰ در شهر بلده مازندران و در سال ۱۳۹۱ در یکی از روستاهای شهرستان سربیشه خراسان جنوبی اشاره کرد(۵).

ضرورت پژوهش

با نگاهی به وضعیت جهانی استفاده از انرژی های تجدید پذیر در می یابیم که در میان این منابع انرژی زیست توده بیشترین سهم کاربرد جهانی را به خود اختصاص داده است؛ بیوگاز به عنوان یک منبع انرژی تاثیر گذار در سازمان مدیریت پسماند به شمار می رود. و استفاده از این انرژی بیش از پیش احساس می شود.چرا که استفاده از بیوگاز: ۱) موجب بهبود وضعیت سلامت و بهداشت برای عموم مردم می شود. ۲) از آن میتوان به عنوان کود بهبود دهنده خاک بهره برد.۳) موقعیت های شغلی ایجاد می کند.با توجه به پوشش گیاهی استان سیستان و بلوچستان و بهره وری از گیاهان برای مصارف متعدد ضرورت پرداختن به این چنین تحقیقاتی احساس می شود.

اهداف پژوهش

امکان سنجی تولید بیوگاز از پسماند گیاهان دارویی هدف اصلی این پژوهش است که در این مسیر بررسی و مدل سازی فرآیند تولید بیوگاز از پسماند گیاهان دارویی و میزان دستیابی به این مهم از اهداف جزیی پژوهش به شمار می آید.

سوال های پژوهش

۱) میزان حجم تقریبی بیوگاز تولیدی از پسماند گیاهان دارویی و علف ها چه مقدار است؟
۲) آیا تولید بیوگاز و استفاده از آن در تولید برق و انرژی روشی به صرفه است؟
۳) تولید بیوگاز از نظر اقتصادی و زیست محیطی برای منطقه چه کاربردی دارد؟
۴) ساده ترین روش تولید بیوگاز و استفاده از انرژی آن چیست؟

روش پژوهش

تحقیقات بسیاری در زمینه تولید ، مدل سازی ، بهینه سازی و شرایط ایده آل تولید بیوگاز از انواع مواد و در شرایط متفاوت انجام شده است. از دیدگاه رونالد فیشر ، آمارشناس، نژادشناس، زیست شناس و پدر طرّاحی آزمایشی مدرن، تحقیقات آزمایشی«تجربیاتی منحصربه فرد،دقیق وبه طور پیشرفته ای برنامه ریزی شده هستند و طرّاحی می شوند تا مبنای دانش جدید را تأمین کنند»(20). بر این اساس در این پژوهش قصد داریم با استفاده از روش های آزمایشگاهی میزان تولید بیوگاز از گیاهان دارویی و علف های خاص این منطقه را بررسی کنیم و به ارائه ی نتایج بپردازیم.

محدودیت های پژوهش

در این پژوهش تلاش شد تا با استفاده از گیاهان دارویی و علف ها به بیوگاز دست پیدا کنیم اما محدودیت زمانی به پژوهشگران اجازه نداد تا بتوانند گازهای حاصله را تفکیک نموده و تاثیر هر یک را مجزا محاسبه کنند.

بحث اصلی

زیست توده

کلمه زیست توده به ماده گیاهی اطلاق می گردد که به وسیله فتوسنتز ایجاد شده و در آن انرژی خورشید به آب و دی اکسیدکربن در مواد آلی تبدیل میشود، بنابراین مواد زیست توده به صورت مستقیم یاغیرمستقیم نتیجه رشد گیاهی است. اجزاء زیست توده شامل سلولز، نیمه سلولز، لیگنین ،عصاره ها، لیپیدها ،پروتئین ها، شکرهای ساده، نشاسته ها، آب، هیدروکربن ها، خاکستر و دیگر مخلوط ها است. از جمله منابع زیست توده می توان به محصولات چوبی، ضایعات کشاورزی، گونه های گیاهی که سریع رشد میکنند،ضایعات چوبی، پسماندهای صنعتی، کاغذ، ضایعات جامد شهری، خاک اره، زیست جامدات، علف، ضایعات فرآیندهای تغذیه، گیاهان آبزی و ضایعات حیوانی و جلبکی اشاره کرد. ضایعات حیوانی منبع زیست توده بالقوه قابل توجه دیگری برای تولید برق میباشد و مانند پسماندهای محصولات کشاورزی، کاربردهای زیادی مخصوصا در کشورهای در حال توسعه دارد. زیست توده به صورت ساده جایگزینی برای مواد نفتی

بوده و تجدیدپذیر میباشد (19) سوخت های فسیلی نیز میتوانند زیستتوده نامیده شوند، از آنجایی که بقایای فسیل شده گیاهانی هستند که میلیونها سال پیش رشد کردهاند. براساس چهارمین رده بندی زیست توده به عنوان یک منبع انرژی، حدودا ۵۹درصد از نیازهای انرژی جهانی را برآورد میکند، درحالی که این درصد در کشورهای پیشرفته ۹۳تا ۵۳درصد می باشد (همان ،۱۲۰) .منابع انرژی تجدیدپذیر شامل: زیست توده، انرژی آبی ،زمین گرمایی ،انرژی خورشیدی و باد هستند(21).

ساختار پایه ای زیست توده چوبی شامل سه پلیمر آلی یعنی: سلولز، نیمه سلولز و لیگنین در تنه، برگینه و پوست درخت است. علاوه بر این مواد، عصاره ها و مواد معدنی نیز در ساختار زیست توده وجود دارند. نسبت سه ساختار ذکر شده بین گونه های مختلف متفاوت است و تفاوت های آشکاری بین چوب های نرم و سخت وجود دارد. چوب های سخت نسبت بیشتری از سلولز و نیمه سلولز را دارند و دارای قابلیت عصاره کشی بیشتری می باشند در حالی که چوبهای نرم نسبت بالاتری از لیگنین را دارند. در حالت معمولی چوب های سخت حاوی ۹۰درصد سلولز، ۳۳درصد لیگنین و ۰۵درصد نیمه سلولز می باشند ولی چوبهای نرم حاوی ۹۰درصد سلولز، ۳۹درصد لیگنین و ۳۸درصد نیمه سلولز هستند(برپایه یک عصاره کشی آزاد) (همان ،۱۲۱) . زیست توده یک منبع انرژی تجدید پذیر و کاربردی با طیف گسترده جغرافیایی است که با استفاده از مواد سوختی جمع آوری شده از مزارع و نهالستان های طبیعی محصولات کشاورزی و جنگلی ضایعات مواد غذایی مواد زائد جامد شهری و همچنین ضایعات دامی برای تولید بیو انرژی به کار گرفته می‌شود (۲)

معرفی بیوگاز

بیوگاز, گازی است که حدود ۸۳درصد آن را متان تشکیل میدهد. علاوه بر مصارف معمول مانند سوزاندن, به عنوان ماده اولیه در برخی صنایع کاربرد گسترده دارد. بیومس حاصل از تجزیه مواد آلی یک کود بسیار مرغوب برای کشاورزی میباشد. استفاده از بیوگاز بی خطر و سود آور است و باعث کاهش آلودگی های زیست محیطی و هوا میشود. تولید بیوگاز در شرایط کنترل شده و در دستگاهی به نام هاضم صورت میگیرد . در داخل هاضم مواد آلی توسط میکروارگانیسم ها تجزیه شده و تبدیل به متان و دی اکسیدکربن می شوند که بخش قابل اشتعال بیوگاز متان می باشد که با سوختن یک فوت مکعب آن معادل ۳۵۳کیلوکالری انرژی آزاد میشود. در مدت زمان تولید بیوگاز کنترل درجه حرارت و نسبت کربن به نتروژن ضرورت دارد بهترین دما برای رشد باکتری ها ۵۰ درجه سانتیگراد است. در ایران پتانسیل های عمده ای برای تولید بیوگاز وجود دارد (۸۸۶۳میلیون متر مکعب در سال) که فضولات دامی, زائدات کشاورزی, فاضلابهای شهری و صنعتی و محل های دفن زباله را شامل می شود . متاسفانه با وجود چنین پتانسیل عظیمی به دلایلی هم چون ارزان بودن انرژی در ایران نبودن مرجع و متصدی مشخص برای بیوگاز و نبود روحیه مشارکت درمردم کشور ما از این منبع بهره ی کافی را نمی برد .تولید بیوگاز و متان زیستی از هضم بی

هوازی زیست توده های مختلف به طور فزاینده نقش مهمی مانند تبدیل میکروبی زیست تـوده تحـت هضـم بی هوازی که دارای چندین مزیت اقتصادی و زیست محیطی است ؛ایفا می کند.

بیوگاز به عنوان یکی از انرژی ها، از تجزیه و تخمیر زباله ها و سایر باقیمانده های کشاورزی، فضولات انسانی، حیوانی و فاضلاب های صنعتی و در واقع با تخمیر بی هوازی مواد آلی بوسیله باکتری های بی هوازی بویژه متانزا در یک محفظه تخمیر و با تولید گاز متان بدست می آید. بیوگاز بعنوان یک حامل انرژی بتواند جایگزین بسیار مناسبی برای سوخت های فسیلی باشد. بیوگاز سوخت تمیزی است که ایجاد آلودگی زیست محیطی نمیکند؛ در ضمن خطر انفجار بیوگاز کم است و با توجه به وجود گاز CO2در آن، به عنوان یک ضد آتش عمل می نماید. افزایش CO2در مخلوط بیوگاز، ارزش حرارتی و قابلیت اشتعال آنرا به شدت کاهش میدهد؛ لذا با استفاده از فیلترهایی جهت جداسازی CO2میزان ارزش حرارتی بیوگاز را افزایش می دهند. این مخلوط گازی که از تخمیر مواد زاید آلی در شرایط بی هوازی حاصل می شود دارای میزان ۶۰-۷۰درصد متان، ۳۰-۴۰درصد دی اکسید کربن و مقادیر ناچیزی از گازهای دیگر مانند هیدروژن، نیتروژن، اکسیژن، منواکسیدکربن و سولفید هیدروژن است و همانطور که مشخص است قسمت اعظم این گاز از متان و دی اکسیدکربن تشکیل شده است ولی در عین حال نسبت ترکیبات مختلف آن بستگی به نوع مواد اولیه و نیز تا حدودی بمیزان حرارت محیط و زمان توقف مواد در مخزن تخمیر دارد. بیوگاز منبع با ارزشی از انرژی است که اغلب به هدر می رود.

ترکیبات بیوگاز

بیوگاز به عنوان یکی از انرژی ها، از تجزیه و تخمیر زباله ها و سایر باقیمانده های کشاورزی، فضولات انسانی، حیوانی و فاضلاب های صنعتی و در واقع با تخمیر بی هوازی مواد آلی بوسیله باکتری های بی هوازی بویژه متان زا در یک محفظه تخمیر و با تولید گاز متان بدست می آید. بیوگاز بعنوان یک حامل انرژی میتواند جایگزین بسیار مناسبی برای سوختهای فسیلی باشد. بیوگاز سوخت تمیزی است که ایجاد آلودگی زیست محیطی نمیکند؛ در ضمن خطر انفجار بیوگاز کم است و با توجه به وجود گاز CO2 در آن، بعنوان یک ضد آتش عمل می نماید.افزایش CO2 در مخلوط بیوگاز، ارزش حرارتی و قابلیت اشتعال آن را به شدت کاهش میدهد؛ لذا با استفاده از فیلترهایی جهت جداسازی CO2 میزان ارزش حرارتی بیوگاز را افزایش میدهند. این مخلوط گازی که از تخمیر مواد زاید آلی در شرایط بی هوازی حاصل میشود دارای میزان ۷۰ -۶۰ درصد متان، ۴۰-۳۰ درصد دی اکسید کربن و مقادیر ناچیزی از گازهای دیگر مانند هیدروژن، نیتروژن، اکسیژن، منواکسیدکربن و سولفید هیدروژن است و همانطور که مشخص است قسمت اعظم این گاز از متان و دی اکسیدکربن تشکیل شده است ولی در عین حال نسبت ترکیبات مختلف آن بستگی به نوع مواد اولیه و نیز تا حدودی بمیزان حرارت محیط و زمان توقف مواد در مخزن تخمیر دارد. بیوگاز منبع با ارزشی از انرژی است که اغلب به هدر می رود.

بیوگاز از چه چیزی ساخته می شود؟

بیوگاز از مواد آلی ساخته می شود.در واقع فرآیند تخمیر طبیعی موادی همچون مواد زیر است که بیوگاز را تولید می کند:

- ضایعات مزرعه(کود و فضولات حیوانی)- مواد گیاهی- فاضلاب انسانی - بیومس(بیومس سوخت به دست آمده از موجودات گیاهی و حیوانی است که برای نمونه می توان چوب را مثال زد)

در کجا می توان از بیوگاز استفاده کرد؟

بیوگاز می تواند در مصارف زیر استفاده شود:

- روشنایی خانه ها و ساختمان ها- آشپزی(همچون پروپان)- به راه اندازی ژنراتورها و تولید برق- موتورهای احتراقی تولید نیرو

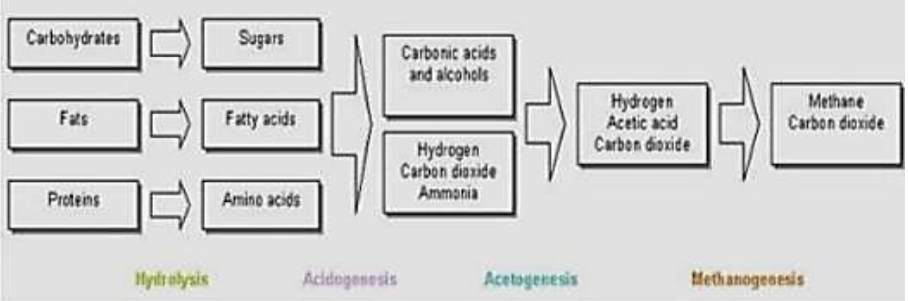
تولید بیوگاز موجب استفاده خوب از ضایعات شده و می تواند موجبات ارتقا سطح بهداشت را فراهم آورد.این کار با ایجاد انرژی قابل دسترس در کشورهای در حال توسعه مهیا می گردد.در امریکا مزرعه داران و کشاورزان تولید بیوگاز را راهی می بینند که موجبات استفاده فراوان از ضایعات گیاهی و حیوانی را فراهم می نماید.ورمونت جایی است که در آن از فضولات حیوانی برق تولید می شود و برق اضافی به همسایه هایی که در مجاورت آن قرار دارند فروخته می شود.

در کشورهایی مانند: چین و هندوستان از بیوگاز به وفور استفاده می کنند، به طوریکه در چین در فواصل سال های ۱۹۲۰تا ۱۹۸۵بالغ بر هفت میلیون دستگاه تولید بیوگاز ساخته شده است که نیاز انرژی پنجاه میلیون روستایی را برطرف میکند و تا سال ۲۰۱۴بالغ بر ۴۲میلیون بیوراکتور روستایی در سطح روستاها نصب و راه اندازی شده است. در آمریکا نیز بالغ بر ۴۰۰ژنراتور بزرگ و کوچک بیوگازسوز به منظور مصارف خانگی و صنعتی استفاده می شود. بررسی های انجام شده در ایران نشان میدهد که به علت شرایط خاص اجتماعی، اقلیمی و کشاورزی، حجم عظیمی فضولات حیوانی و انسانی و زباله تولید م یشود که در مناطق روستایی با ساده ترین امکانات می توان سامانه های مناسبی برای تبدیل این مواد به بیوگاز احداث کرد. باقیمانده های تبدیل این مواد به بیوگاز نیز کود مرغوب و مناسبی است که ریشه گیاه راحت تر میتواند آن را جذب کند.

مراحل تشکیل بیوگاز

تولید بیوگاز یک فرایند میکروبی است. کلیه میکروب هایی که در تولید بیوگاز نقش دارند در غیاب اکسیژن هوا زندگی می کنند . مهمترین میکروارگانیسم های غالب، باکتریها هستند. باکتری‌های متانوژن که واکنش

های تجزیه‌ای و بی هوازی را به منظور تولیدبیوگاز انجام می‌دهند قادر به شکستن و تجزیه مواد آلی پیچیده و ساده هستند که سرانجام به تولید بیوگاز منجر می شود .این باکتری‌ها ازدو دسته باکتری‌های‌مزوفیل وگرما دوست هستند و به ترتیب در دمای ۳۷ تا ۴۵ درجه سانتی گراد و ۵۰ تا ۵۲ درجه سانتی گراد می توانند زندگی کنند . در مورد باکتری های گرما دوست این حرارت می تواند تا ۷۰ درجه سانتی گراد افزایش یابد . در این دما باکتری‌ها بیشترین فعالیت آنزیمی را برای تجزیه موادآلی و تولید بیوگاز دارند. از شرایط مطلوب دیگر برای تولید بیوگاز، قلیایی بودنPH=7-8محیط واکنش است:فرایند تجزیه باکتری ها در طی ۴ مرحله :



شکل ۱ مراحل چهارگانه تولید گاز متان از مواد زاید آلی

مرحله‌اول: هیدرولیز مواد آلی‌پیچیده و نامحلول و تبدیل این مواد به ترکیبات محلول.

مرحله دوم:ترکیبات آلی محلول حاصل از مرحله اول به وسیله باکتری‌های اسیدساز شکسته شده و در نتیجه اسیدهای آلی‌تولیدمی‌شود.

مرحله سوم:معمولاً هیدروکربن‌های پنج و شش کربنی در آب حل شده و توسط باکتری‌های اسیدساز مورد مصرف واقع شده و به ترکیباتی از قبیل هیدروژن،فورمات، استات، پروپیونات و گاز کربنیک تبدیل می‌شوند.

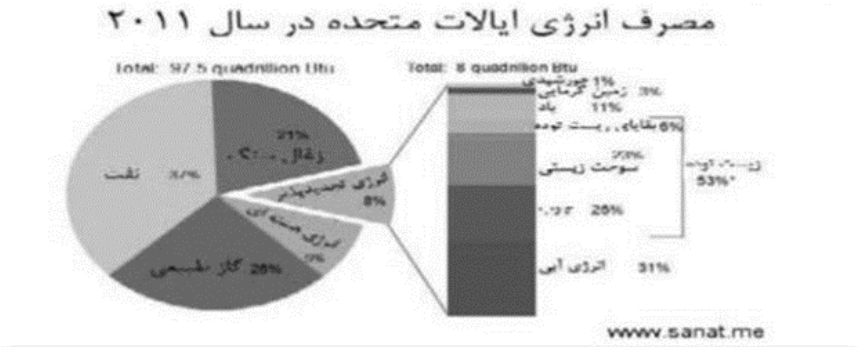
مرحله چهارم:تمام ترکیبات آلی و اسیدهای تولید شده در مرحله اسیدسازی توسط باکتری‌های متان ساز به بیوگاز تبدیل‌می‌شوند(۱۷)

کاربرد های فناوری بیوگاز

۱) ضرورت تولید بیوگاز برای جلوگیری از مخاطرات زیست محیطی :

افزایش گازهای گلخانه ای،افزایش دمای کره زمین، بالا آمدن سطح آب دریاها، تغییرات آب و هوایی، آلودگی بسترهای طبیعی و تاثیرات ویرانگر زیست محیطی بر جوامع انسانی و زیستگاه های طبیعی حاصل مصرف بی رویه سوختهای فسیلی و رشد صنایع از یک سو و محدود بودن این منابع و رشد روزافزون مصرف

انرژی که جوامع بشری را در آینده ای‌نه چندان دور با بحران انرژی مواجه خواهد ساخت از سوی دیگر، به طرح نوع جدیدی از توسعه با نام توسعه پایدار منجر شده است.یکی از ابعاد مطرح شده در توسعه پایدار که سبب توجه کشورها به توسعه و سرمایه گذاری در این زمینه شده، استفاده از منابع تجدید پذیر انرژی همچون انرژی خورشیدی، باد، زمین‌گرمایی، زیست توده، هیدروژن و ... است.



شکل ۲ - سهم انرژی های تجدیدپذیر در سبد انرژی در کشور آمریکا

براساس آمارهای کنونی ۸٪ درصد در سال ۲۰۱۱ در ایالات متحده آمریکا از انواع انرژی تجدید پذیر تامین گردیده که سهم منابع مختلف آن در شکل (۲) نشان داده شده است(۱۷).

در کشورمان نیز طی چند سال اخیر طر حهای مطالعاتی و تحقیقاتی در این زمینه انجام شده است که ماحصل آن اجرای پروژه هایی به منظور بهره برداری از منابع تجدید پذیر انرژی است. ضرورت و دلایل سرمایه گذاری و توسعه انرژی های تجدید پذیر در ایران را از دیدگاه انرژی میتوان چنین ذکرکرد(همان:۱۰۲)

انرژی زیست توده در میان انرژی های تجدیدپذیر، سهم قابل ملاحظه ای دارد و کشور ما نیز در بهره برداری از منابع مختلف آن از پتانسیل بالایی برخوردار است. امروزه برای منابع مختلف انرژیهای تجدیدپذیر، فناوریهای متنوعی توسعه یافته و یا در حال توسعه است که از آن جمله می توان فناوری بیوگاز در مدیریت و بازیافت فاضلاب شهری و روستایی را نام برد(همان:۱۰۳)از جمله مزایای بیوگاز می توان به سوخت خانگی، نیرو محرکه و تراکم گاز اشاره کرد که در ذیل در مورد آن ها توضیح داده شده است.

۱-پایان پذیر بودن ذخایر فسیلی در دنیا و افزایش قیمت نفت و گاز۲- گرم شدن کره زمین و مشکلات زیست محیطی استفاده از سوختهای فسیلی ۳-ذخیره انرژی۴-رویکردهای جهانی توسعه انرژیهای تجدیدپذیر۵- کاربرد سوخت خانگی

اخیرا، ضایعات حاصل از فعالیت های کشاورزی و مواد خشک شده پهن دامی بعنوان مواد سوختی پخت و پز در مناطق روستائی مورد استفاده قرار می گیرند. با توجه به اینکه ارزش حرارتی و سوختی اینگونه مواد تنها ۹-۱۲٪ می باشد، بنابراین استفاده از این مواد بعنوان ماده سوختی، کار بیهوده ای است. از طرفی سوزاندن

این مواد به علت ایجاد دود زیاد در آشپزخانه، برای سلامتی زنان و کودکان خطرناک بوده وهمچنین جمع آوری وذخیره سازی این مواد،به ویژه درفصول بارانی مشکل آفرین است(۲). واحد بیوگاز، از سوزاندن پهن دامی به عنوان ماده سوختی، جلوگیری می کند. بیوگاز یک ماده سوختی تمیز و کافی برای مقاصد پخت و پز بوده و از طرفی در مصرف نفت، ذغال و چوب صرفه جوئی به عمل می آید. بیوگاز، از جمع آوری چوب وشاخه های سوختی که در عین حال باعث به زحمت افتادن زنان و بچه های روستایی که هر روز مجبورند زمان زیادی از وقت وانرژی خودشان را به منظور جمع آوری مواد سوختی از مسیرهای طولانی صرف نمایند،جلوگیری می کند.بهترین کاربرد بیوگاز استفاده از آن درپخت و پز می باشد. برای به دست آوردن حداکثر ارزش گرمایی ازبیوگاز، بایستی آنرا دراجاق هائی که به طور صحیح طراحی شده اند استفاده نمود(۱۴).

۲)تراکم گاز

گاز متان بر خلاف گاز بوتان یا پروپان به صورت فشرده و کپسولی قابل دسترس نیست. گاز متان در فشار حدود -۴/۴۷ درجه سانتیگراد به مایع تبدیل می شود. علاوه براین، گاز باید برای ۱/۸۲کیلوگرم در سانتیمتر مربع و دمای بحرانی جلوگیری از خورندگی ظروف ذخیره، عاری از گاز هیدروژن سولفوره باشد. همچنین گاز دی اکسید کربن آن باید گرفته شود. چونکه تراکم این گاز هیچ مزیتی ندارد. بدیهی است با توجه به هزینه تصفیه گاز و تراکم آن، خرید ظروف ذخیره با فشار بالا و حمل ونقل ظروف سنگین ذخیره، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و عملی نیست(همان:۱۵۵).بیوگاز حاصل از هاضم شامل ۵۵ تا ۶۰ درصد متان ، ۳۰ تا ۴۵ درصد کربن دی اکسید و مقدار کمی هیدروژن سولفید و کسری از بخار آب است. توسط تعدادی از محققان برای بهبود کیفیت بیوگاز با حذف آلاینده ها از طریق ارتقادهی تلاش هایی شده است. این ارتقادهی شامل حذف مقدار قابل توجهی CO_2 و H_2S است. بسیاری از این فرایندها برای استفاده در گاز طبیعی و صنعت S۲ نفت توسعه یافته اند. مزیت های بیوگاز ارتقاء یافته سهولت در فشرده سازی، کاهش نیاز به مخازن برای برنامه های وسیعتر همانند سوخت خودرو، تولید برق کارامد، مواد اولیه برای صنایع شیمیایی، سلول های سوختی و غیره می باشد. پتانسیل های زیادی جهت افزایش انرژی به ازای واحد حجم، کاربرد گسترده و حمل ونقل راحتر وجود دارد اگر بیوگاز به بیش از ۹۵٪ ارتقا یابد. شستشو با آب روشی راحت و ساده برای تصفیه بیوگاز است(۳).

۳)ضرورت به کارگیری بیوگاز از دیدگاه زیست محیطی

طبیعت به عنوان خاستگاه انسان و سایر موجودات و بستر فعالیت های آنها، توانایی پذیرش و پالایش میزان معینی از آلاینده ها را دارد.امروزه با افزایش جمعیت تمرکز، به ویژه در کلان شهرها، روزانه شاهد تولید میلیونها تن ضایعات و آلاینده ها هستیم، که حجم بالایی از آنها بخصوص درکشورهای در حال توسعه و جهان سوم بدون نظارت خاصی وارد بسترهای‌طبیعی‌می شود.«در حال حاضر میزان آلاینده ها در محیط

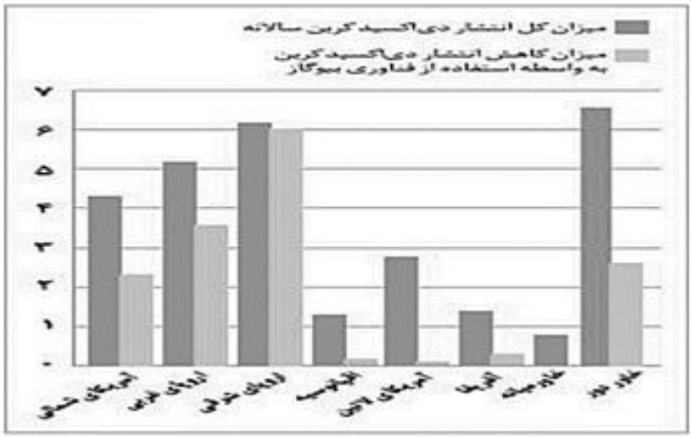
زیست رو به افزایش است ترکیبات نفتی که عمدتا این منبع انرژی می باشد که سبب آلودگی منابع آب و خاک می گردند(۹).پخش این آلاینده ها مشکلات زیست محیطی فراوانی را به همراه دارد که از میان آنها میتوان به موارد زیر اشاره کرد:

-تولیدوانتشار سالانه میلیونها تن دی اکسیدکربن وگازهای گلخانه ای از محل دفن این آلاینده ها (۷)

-آلودگی خاک و سفره های آب زیرزمینی بر اثر نفوذ مواد سمی، فاضلاب و شیره زباله ها، بخصوص در مناطق پربارش و دارای سطح بالای سفره های آبهای زیرزمینی(۱۲)

۴) تولید بیوگاز برای سلامت محیط زیست

درصد بالایی از ضایعات و آلاینده ها را مواد آلی تجزیه پذیر تشکیل می دهند که می توانند به عنوان ماده اولیه در میزان پتانسیل کاهش انتشار دی اکسید کربن به واسطه استفاده از فناوری بیوگاز را فناوری بیوگاز استفاده شوند. شکل ۳ نشان می دهد.



شکل ۳ - میزان پتانسیل کاهش انتشار دی اکسید کربن به واسطه استفاده ازفناوری بیوگاز (۱۳)

بهره گیری از فناوری بیوگاز نه تنها مشکلات دفع و تصفیه این آلاینده ها را حل می کند و آنها را به منابعی ارزشمند برای تولید انرژی پاک و ارزان تبدیل می سازد، بلکه دارای منافع زیست محیطی از قبیل تولید کود طبیعی با درصد بالای نیتروژن، تغذیه منابع و سفره های آبهای زیرزمینی با استفاده از پساب خروجی واحدهای بیوگاز، کاهش میزان تخریب منابع محیط زیست (کاهش جنگل زدایی) ،کاهش دی اکسید کربن با استفاده از فناوری تخمیر بیهوازی و فرسایش خاک نیز است (۱۷).

۵) کود برای کشاورزی

کشاورزان باور دارند که واحدهای بیوگازی در فراهم آوری مقادیر زیاد کود با کیفیت مرغوب اهمیت دارد. به بیان کلی، یک سوم تا نصف پهن دامی بصورت سوخت سوزانده شده و در خاک از بین می رود. در اکثر مواقع، یک واحد بیوگاز، قابلیت دسترسی به کود آلی را دو برابر افزایش می دهد. کود تولید شده از طریق یک واحد بیوگاز از لحاظ کمیت و کیفیت نسبت به کود معمولی دارای یک مزیت نسبی است. حدود ۷۰ تا ۷۵ درصد وزن اولیه پهن دامی در واحد بیوگاز حفظ می شود در صورتیکه در حوضچه های کمپوست سازی روباز ۵۰ درصد آن از بین می رود.به همین نسبت، تقریبا تمام نیتروژن موجود درکود گاوی حاصل از واحد بیوگاز باقی می ماند در صورتیکه در طول فرایند کمپوست سازی، بخش مهم نیتروژن از بین می رود. کود بیوگازی بعنوان یک دوغاب هضم شده معروف بوده که محتوی مقدار زیادی مواد مغذی گیاهی نیز می باشد. این موضوع در جدول ۱آمده است.

مواد مغذی گیاهی	مخلوط هضم شده بیوگازی(٪)	کود کمپوست خانگی(٪)
نیتروژن (N)	۲- ۱/۵	۱- ۰/۵
فسفر(P_2O_5)	۱	۰/۸- ۰/۵
پتاس(K_2O)	۱	۰/۸- ۰/۵

جدول ۱-مقدار مواد مغذی گیاهی در کود بیوگازی

کود حاصل از بیوگاز منبع خوبی از ریز مغذی هایی (میکرونوترینت هائی) مثل: روی، آهن منگنز و مس بوده که جزء فلزات کمیاب اکثر خاک های کشاورزی می باشند. هضم کامل پهن دامی در واحد بیوگاز باعث نابودی تخم علف های هرز شده و نیز ارگانیسم های عامل بیماری گیاهان براحتی از بین می روند.

ثابت شده است که استفاده از دوغاب هضم شده بیوگازی بعنوان کود، حاصل خیزی خاک را بهبود بخشیده و می تواند محصول تن در هکتار و در ۱۰-۲۰ درصد افزایش دهد. میزان کود مصرفی برای این منظور در زمین های آبی حدود ۱۰تن در هکتار و در زمین های دیمی ۵ تن در هکتار پیشنهاد می گردد. کود بیوگاز همچنین می تواند در مخلوط با کودهای شیمیایی در مقادیر مناسب مورد استفاده قرار گیرد. این عمل باعث می شود که کود بهتری تهیه شده و میزان اتلاف کودهای شیمیایی در خاک به حداقل برسد، همچنین با این عمل برای محصولات کشاورزی یک نوع تغذیه تعادلی تامین می گردد. دوغاب هضم شده بیوگازی برای تولید ماهی مفید است. ماهی کوچک رودخانه با سبوس برنج مخلوط با دوغاب هضم شده (با نسبت۱ :۳) و همچنین روغن‌خردل و سبوس برنج با نسبت۱ :۱ نیتروپن معادل تغذیه شد .ازمایش نشان داد که این ماهی در تغذیه با مخلوط سبوس برنج و دوغاب هضم شده بیوگازی رشد سریعتری دارد. غذای ایده آل پیشنهاد شده برای ماهی سینگی مقادیر مساوی از روغن خردل، سبوس برنج و کود بیوگازی می باشد(۱۲).

۶) به سازی و تامین بهداشت محیط

واحدهای بیوگاز وسیله مناسبی برای دفع بهداشتی مدفوع انسانی می باشند. در مناطق با چاه هـــــای توالت خشک با اتصال این توالت ها به واحد بیوگاز و انتقال مستقیم فضولات به داخل آن، از احداث چاههای توالت جلوگیری می شود. با هدایت مدفوع انسانی و حیوانی به واحد بیوگاز مشکل دفع فضولات در داخل منزل، حل می شود.. دوغاب هضم شده بیوگازی عاری از بوهای نامطلوب و کلیه پاتوژن ها است. پشه ها و مگس ها نمی توانند در دوغاب بیوگازی رشد و تکثیر نمایند. بنابراین واحدهای بیوگاز سبب ارتقا سطح بهداشت عمومی می شوند. چون سوزاندن بیوگاز هیچ دودی را درآشپزخانه ایجاد نمی کند بنابراین شیوع بیماریهای چشمی در بین زنان و کودکان نیز کاهش پیدا می کند. علاوه بر آن، بیوگاز، سوخت تمیزی است که باعث آلودگی هوا نمی شود. بیوگاز نسبت به گاز طبیعی و نفت خام به علت نداشتن گوگرد، سوخت بهتری می باشد. (همان :۴۱)

۷) ضرورت به کارگیری بیوگاز از دیدگاه اقتصادی-اجتماعی

فناوری بیوگاز مزایای اقتصادی فراوانی دارد که به پاره ای از آنها پرداخته می شود(۱۲)

-کاهش هزینه های جمع آوری و بازیافت فاضلاب و پساب

-ایجاد درآمد از طریق فروش انرژی، کود آلی و تامین آب قابل استفاده در کشاورزی و فضای سبز، برای مردم و دولت

-تصفیه فاضلاب بی آنکه در درازمدت پیامدهایی چون آلودگی آب و خاک و هزینه های ناشی از آن را داشته باشد.

-بهینه سازی خاک و بهره وری در صنعت کشاورزی به دلیل استفاده از کود آلی تولید شده در محفظه تخمیرهای بیهوازی بیوگاز و اثرات بلند مدت آن در اصلاح ساختار و حاصلخیزی خاک

-جلوگیری از خروج ارز با توجه به تولید کود آلی به‌منظور کاهش مصرف کود شیمیایی و کاهش تقاضا برای دفع آفات و علف هرزکش ها و همچنین کاهش تقاضا برای سوخت فسیلی

-دستیابی به فناوری ساخت تکنولوژی بیوگاز در کشور در مقیاس های مختلف و صدور آن به دیگر کشورهای علاقمند

-تولید متان و دی اکسید کربن به عنوان محصولات فرعی حاصل از تجزیه بی هوازی مواد آلی، به عنوان مواد اولیه صنعتی.

-تـــولید متان و دی اکسید کربن به عنوان محصولات فرعی حاصل از تجزیه بیهوازی مواد آلی، به عنوان مواد اولیه صنعتی.

متان ماده اولیه استیلن،الکل،متانول، آمونیاک، کود و حتی ویتامین B12و ... اســـت . از دی اکسیدکربن می توان در تهیه‌کود و یخ خشک و غیره استفاده کرد .

۸) امکان استفاده به عنوان سوخت وسایل نقلیه

-تامین سوخت مورد نیاز روستاهای دور از شبکه گاز کشور بدون نیاز به زیرساخت های هزینه بر

-سادگی، کم هزینه بودن، آسان بودن قابلیت نصب و راه اندازی دستگاههای تولید کننده بیوگاز در مقیاسهای کوچک در کنار آثار اقتصادی مذکور می توان به آثار اجتماعی آن نیزاشاره کرد:

-ایجاد اشتغال در بخشهای مختلف

-بهینه سازی وضعیت بهداشتی بخصوص در حاشیه شهرها، شهرهای کوچک و روستاها با از بین بردن درصد قابل توجهی از عوامل بیماری زا در فرآیند تصفیه بی هوازی

- کاهش بیماریهای تنفسی ناشی از دود چوب و یا استفاده از فضولات حیوانی به عنوان سوخت که بر اثر تماس مستقیم با فضولات به انسان انتقال می یابد.

-صرفه جویی در زمان و کاهش کار زنان روستایی، به دلیل استفاده از بیوگاز به عنوان سوختی تمیز،در دسترس و با ویژگی استفاده آسان و عدم نیاز به صرف وقت برای جمع آوری هیزم و یا آماده سازی فضولات حیوانی به منظور تهیه سوخت.

-بهینه سازی بسترهای طبیعی محل دفع زباله و فاضلاب

۹) ضرورت به کارگیری نیروگاههای تولید همزمان برق و حرارت بیوگاز سوز

ازدیاد روزافزون مواد زائد آلی حاصل از فعالیت های مختلف در کشور، یکی از عوامل اصلی آلودگی محیط زیست می باشد. امروزه با توجه به پایین بودن بازده بهره گیری روشهای سنتی، هزینه بالای دفن مواد زائد و آلودگی های زیست محیطی، استفاده از روش های مدرن نظیر هضم بی هوازی برای تولید بیوگاز متداول شده است. بیوگاز جمع آوری شده از فرآیند هضم بی هوازی، بعنوان یک منبع انرژی تجدیدپذیر مشابه با گاز طبیعی ولی با مقدار متان و ارزش حرارتی کمتر قابل استفاده می باشد(۱۶)

در حال حاضر بیوگاز بعنوان یکی از منابع عمده تأمین انرژی الکتریکی و حرارتی و ضمناً یک گزینه مناسب برای استفاده در موتور چهار ضربه ای، موتور دیزل، موتور استرلینگ، توربین گاز، میکرو توربین گازی وپیل های سوختی جهت تولید برق می باشد(۱۵)

استفاده از بیوگاز به علل متفاوتی که به مزایای اقتصادی، اجتماعی و زیست محیطی آن بر می گردد، در نیروگاههای تولید همزمان برق و حرارت برای تولید انرژی مورد توجه جهان واقع شده است(همان:۱۵۹)

تولید بیوگاز از فن آوری هضم بی هوازی و کاربرد آن در نیروگاههای CHP در ایران می تواند ضمن تأمین قسمتی از انرژی مورد نیاز کشور، حرکت در راستای توسعه پایدار را نیز محقق سازد. از آنجائیکه در فرآیند تولید برق معمو لاً حرارت نیز به موازات آن تولید می گردد بنابراین بازیافت حرارت در چنین فرآیندی امکان پذیر است. این چنین نیروگاههایی را نیروگاه یا واحدهای تولید همزمان برق و حرارت می نامند(۱۴). امروزه کشور های بسیاری در جهان به اهمیت این موضوع پی برده و در این زمینه فعالیت می نمایند. انگلستان در حال حاضر پیش از ۱۰۰ میلیون تن در سال مواد آلی شامل زائدات غذایی، لجن فاضلاب و محصولات انرژی زا تولید می نماید که برای ۱۰۰تولید بیوگاز مناسب است . برنامه ی این کشور تولید ۸/۰ تراوات ساعت برق در سال از طریق بیوگاز حاصل از هضم بی‌هوازی در نیروگاه های تولید همزمان برق و حرارت بیو گاز سوز می باشد(۳).

مهمترین علل عدم گسترش تولید بیوگاز در ایران

۱- ارزان بودن انرژی در ایران

انرژی های در دسترس در کشور به علت متکی بودن بر منابع زیرزمینی و تعلق یارانه به آنها، با بهای اندک به دست مصرف کننده می رسند (مقایسه شود قیمت انرژی در آمریکا ۱۲/۹ریال برمگاژول با قیمت انرژی در ایران ۲/۳ ریال برمگاژول با برابری هردلار ۱۳۰۰۰ ریال). این در حالی است که تولید هر انرژی غیرمتعارف جدید مانند انرژی خورشیدی، باد و زیست توده ، مستلزم صرف هزینه های به نسبت زیادی می باشد. از جملهٔ این هزینه ها می توان به هزینه های زیر اشاره کرد:

۱. هزینه های تحقیق و توسعه۲. هزینه های پشتیبانی مقدماتی

۳. هزینه های توسعه اقتصادی وفن آوری صنایع وابسته۴. هزینه های حفاظتی و مراقبتی

۵. تخفیف های مالیاتی و سایر هزینه های متعارف دیگر مانند سرمایه گذاری اولیه، هزینه های راهبری، مدیریت، تعمیرات و ... باید لحاظ شوند.

از طرف دیگر باید توجه داشت که حتی قیمت تمام شدهٔ انرژی های متعارف نظیر سوختهای فسیلی قیمت واقعی آنها نبوده و برای محاسبه قیمت های اصلی آنها، هزینه های دیگری را نیز باید درنظر داشت که در این کشور لحاظ نمی شوند. از مهمترین این هزینه ها، هزینه های رفع آلودگی ایجاد شده توسط نیروگاه ها، هزینه های زیست محیطی استفاده از سوخت های آلاینده و هزینه های تخریب منابع طبیعی می باشند. در هر حال بدون درنظر گرفتن عوامل فوق، قیمت هر گیگاژول انرژی معادل بیوگاز تولیدی در ایران را ۱۰ تا ۱۳ دلار برآورد کرده اند که در مقایسه با قیمت سوخت های دیگر، عدد بزرگی می باشد. مسئلهٔ دیگری که مطرح می شود این است که تغییر قیمت انرژی، مسئله ای بسیار پیچیده بوده که به عوامل گوناگون اقتصادی، سیاسی، اجتماعی در سطح ملی و جهانی بستگی دارد و هرگونه تغییر در قیمت انرژی ممکن است به بحران های اجتماعی و سیاسی بیانجامد و در نتیجه سیاستگذاری در امر انرژی مستلزم بررسی های کارشناسانه، دقیق و طولانی مدت بوده که در نهایت راه را برای جایگزین کردن سوختهای پاکیزه و تجدیدپذیر هموار کند(۷)

آزمایش تولید بیوگاز ازپسماند گیاهان دارویی و علف های خودرو منطقه سیستان

براساس تاریخچه بالا و پژوهش های انجام شده یافتیم که بیوگاز حاصل تخمیر مواد زیست تخریب پذیر می باشد موادی که دارای ساختار لیگنوسلولزی هستند. از طرفی از آنجا که ایران از معدود کشورهایی دارای آب و هوای مناسب برای رشد انواع متفاوت گونه های گیاهی با تنوع زیستی گیاهان بالغ بر ۸۰۰۰ نوع می باشد. در این میان رشد گیاهان دارویی نیز در ایران بسیار مطلوب بوده و این گیاهان برای انواع مصارف بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. به نحوی که هم به صورت خشک کردن و هم بصورت عرقگیری استفاده از آنها بسیار مرسوم است . گیاهان دارویی در بیشتر مناطق ایران رشد میکنند و بالطبع در نتیجه تقاضای این گیاهان به انواع مختلف کارخانه های فراوانی در اکثر نقاط ایران ایجاد شده اند. بعد از عرقگیری پسماند گیاهان بلااستفاده می باشند و از آنجا که این گیاهان نیز دارای ساختار لیگنوسلولزی میباشند برای هضم بی هوازی و تولید بیوگاز مناسب به نظر می آید. وسعت جغرافیایی و شرایط آب و هوایی خاص، استان سیستان و بلوچستان را به یکی از مراکز عمده تولید محصولات گیاهی، دارویی و صنعتی در کشور تبدیل کرده است، محصولاتی که افزایش تولیدات و بهره برداری مناسب و صادرات آنها می تواند این استان را متحول کند.برخی گونه های گیاهی این استان از انواع نادر، منحصر به فرد و با خواص بسیار ارزشمند دارویی محسوب می شوند.ویژگی های اقلیمی منحصر به فرد این استان سبب رویش بیش از ۳۹۲ گونه با ارزش گیاهی شده، گونه هایی که با توجه به موقعیت آب و هوایی این استان در جای دیگری یافت نمی شود.

اهمیت بالای گیاهان دارویی و نقش بی بدیل آنها در سلامت انسان بر کسی پوشیده نیست به همین سبب بهره برداری از این ذخایر ارزشمند و انجام کارهای تحقیقاتی و سرمایه گذاری در زمینه افزایش سطح زیر کشت و تولید بیشتر می تواند نقطه قوت استان محسوب شود. منطقه سیستان دارای گیاهان خودرو بسیاری

است که در زمین های کشاورزی و یا در بستر رود ها رویش می کنند. با بروز خشکسالی های مداوم بسیاری از این گیاهان از بین رفته و تنها تعداد محدودی از این گیاهان آن هم در موقعیت های فصلی خاص چون بهار دیده می شوند. پُ بَرَکَ، ریش بُزک، کَکُلَک، زیر بارَک، انگورکِ توره، شوتک، رازیانه و بادیوم از جمله گیاهان خودرو در سیستان است که علاوه بر طعم خوش دارای خواص بسیاری است که اصلی ترین آن رفع کم خونی و فقر آهن است.استان پهناور سیستان و بلوچستان ظرفیت های فراوانی در زمینه توسعه، کشت،پرورش، فرآوری و صنعت گیاهان دارویی دارد اما نبود صنایع تبدیلی و فرآوری گیاهان دارویی در این استان باعث شده تا تولیدات، بیش تر به شکل خام فروشی وارد بازار شود و یا در دامان طبیعت بلا استفاده بماند.گیاهان خودرو منطقه سیستان و هم چنین علف ها که بصورت خودرو رشد می کنند می توان برای انجام این پژوهش استفاده کرد. در یک سال بارانی، گیاهان خودرو منطقه سیستان در همه جا رشد می کنند؛ در کنار جاده ها، داخل مزارع، باغ ها و... برخی افراد علاقه ای به این علف ها و گیاهان خودرو ندارند و آن ها را کنده و دور می اندازند، در این شرایط می توانید علف ها و گیاهانی دور ریخته شده را جمع آوری کرده و مراحل گرفتن سوخت و انرژی از آن ها را شروع کنید.سوال ابتدایی این است که به چه روشی می توان از این گیاهان انرژی تولید کرد؟ پاسخ روش کشت بی هوازی علف ها و گیاهان ست که باعث می شود آن ها تجزیه شده و گاز متان متصاعد شود. متان گازی بی رنگ و بدون بو است که قابل اشتعال در طبیعت است. نتیجتا می توان از آن جهت روشنایی، پخت و پز، گرمایش، سوخت وسایل نقلیه و راه اندازی ژنراتورهای مولد الکتریسیته بهره برد .

روش کار:

فرآیند زیست گاز (تولید گاز از محصولات حیوانی و گیاهی موجود در محیط زیست) شامل سه مرحله است: هیدرولیز، پیدایش اسید (تخمیر) و پیدایش متان.

- جمع آوری علف ها و گیاهان بسته به ظرفیت منبع کشت دهنده یا هضم کننده (digester) که در اختیار دارید، بایستی به جمع آوری مقدار کافی گیاه بپردازید. ظرفیت منبع ما ۲۲۰ لیتر است و با در نظر گرفتن فضای خالی ۲۰ لیتر، بایستی حدود ۲۰۰ لیتر علف جمع آوری کنیم. با در نظر گرفتن زمان ۳۰ تا ۳۵ روزه برای استراحت گیاهان، روزانه می توانید بین ۱,۵ تا ۲ کیلوگرم گیاه را جمع آوری کرده و درون منبع جای دهید.

شکل۴- جمع آوری گیاه وعلف هرز

تولید بیوگاز از پسماند گیاهان دارویی نیازمند ایجاد شرایط مناسب می باشد برای این منظور حمام آبگرمی تهیه گردید که به منظور ایجاد شرایط مناسب برای رشد و زیست باکتری ها می بایست دمای حمام قابل کنترل باشد. . آزمایش مورد مطالعه در دمای 35 درجه سانتیگراد انجام گرفت بدین منظور برای ایجاد این دما یک ترموستات با دقت ۰/۱ در حمام آبگرم قرار گرفت و همچنین برای تعدیل دما در کل حمام ، یک عدد کنترلر دما و دو عدد پمپ آب در دو انتهای حمام تعبیه شد که باعث میشد آب همیشه در گردش و در نتیجه دمای آب یکنواخت باشد. هر ۲ کیلوگرم گیاه را باید با میزان کافی آب مخلوط کنید تا ۲۰ لیتر ماده سوختی حاصل شود.

شکل۵-اندازه گیری نمونه

این مخلوط باید حدود ۳۵ روز در منبع استراحت کند و بر جای بماند تا گاز متان آماده بهره برداری شود.

پرورش باکتری ها:

مقدار یک کیلوگرم محتویات شکمبه گاوی از یکی از قصابیهای روستای ژاله ای واقع در ۱۵کیلومتری شهرستان زهک تهیه شد و پس از جداکردن تکه های بزرگ و همگن کردن و اضافه کردن یک لیتر آب در آزمایشگاه به مدت یک ماه در دمای ۸۰ درجه داخل آون نگهداری شد. پس از یک ماه و موقع بارگذاری به ظرف حاوی کشت(هاضم) ، کل این محلول اضافه گردید. تزریق این باکتریهای غنی شده که از قبل در

شرایط مساعد زیستی نگهداری شده بودند در ابتدای آزمایش باعث تولید بیوگاز از ابتدای بارگیری شده است.

جمع آوری گیاهان و علف ها

- کندن ریشه ها و ریز کردن گیاهان وعلف ها :در تصاویر می توانید ببینید که ما چگونه ریشه ها و شاخه های زاید را دور ریخته ایم و به وسیله برش باغبانی، برگ ها را ریز کرده ایم. هر ۴ کیلوگرم از علف ها و گیاهان خودروی چیده شده و پسماند گیاهان بعد از دور ریختن بخش های زائد، حدود ۲,۵ کیلوگرم ماده سوختی می دهد. -برگ های ریز ریز شده را خوب می ساییم.مشاهده ما اینگونه بود که با ریختن برگ های ریز ریز شده در داخل منبع کشت، آن ها به خوبی هضم نشده و انرژی مورد انتظار از آن ها متصاعد نمی شود. بهتر است ابتدا برگ ها را خوب می ساییم و سپس آن ها را با آب کافی رقیق کرده و در منبع می ریزیم. می توان بجای آب لوله کشی، از پساب آشپزخانه نیز برای رقیق کردن مواد سوختی استفاده کرد . (توجه کنید که این آب نباید حاوی کف صابون یا دیگر مواد شوینده باشد). برای ساییدن ۲,۵ کیلوگرم برگ، ما از یک مخلوط کن (میکسر) ۵۰۰ واتی استفاده کرده و برگ ها را به ده بخش تقسیم کردیم که برای هربخش بین ۱۵ تا ۲۰ ثانیه طول می کشد تا عمل ساییده شدن به اتمام می رسانیم. زمان کل این عملیات چیزی بین ۳ تا ۴ دقیقه در هر روز است.

شکل۶-روش کار

اندازه گیری رطوبت و مقدار ماده خشک :

برای اندازه گیری رطوبت مواد مقدار ۱۰۰ گرم از هرکدام برداشته شده و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد داخل آون نگهداشته شده و با استفاده از فرمول زیر مقدار رطوبت نمونه محاسبه می گردید.

$$\text{درصد رطوبت } \% = \frac{\text{وزن نمونه تر} - \text{وزن نمونه خشک}}{\text{وزن نمونه تر}}$$

میزان رطوبت به دست آمده حدود ۷۵ درصد بود.

-مخلوط کردن مواد با آب و پر کردن منبع کشت

قرار شد هر روز ۲,۵ کیلو برگ را بساییم و آب کافی به آن اضافه کنیم تا حجم مخلوط به ۲۰ لیتر برسد.

این مخلوط سپس باید از طریق لوله مخصوص در منبع کشت ریخته شود . این عمل تکراری باید هر روز انجام شود تا درون منبع گاز کافی تولید شود.

-بررسی مقدار گاز تولید شده روزانه

برای اندازه گیری بیوگاز تولیدی لوله های شفاف (سرم) به درب محیط کشت(هاضم) وصل شد که بیوگاز تولیدی را به بطریهایی که حاوی آب میباشد هدایت کند. به بطریهای حاوی آب نیز سه شلنگ وصل است که یکی برای انتقال بیوگاز دومی به بطری خالی که مسیر انتقال آب میباشد و شلنگ سوم برای اندازه گیری مقدار متان است. گازتولیدی، به بطری مخصوص خود که حاوی آب است انتقال می باید و باعث جابه جایی آب به بطری خالی میشود. با مطالعه مقاله ها به این نتیجه رسیدیم که روش جابه جایی آب روشی علمی و استاندارد است از این رو در این آزمایش نیز از همین روش استفاده شده است. میزان انتقال آب میزان بیوگاز تولیدی است که با استفاده از ارلن های مندرج اندازه گیری و یادداشت شد و اینگونه دریافتیم که از هر ۲,۵ کیلوگرم علف و گیاه حدود ۰,۲ متر مکعب گاز (شامل متان و ناخالصی هایی چون دی اکسید کربن، نیتروژن و سولفید هیدروژن) تولید می شود.

شکل۷-اندازه گیری حجم گاز تولیدی

-اندازه گیری مقدار متان

برای اندازه گیری متان نیز از روش جابه جایی آب بهره گرفتیم به این صورت که ابتدا مسیر انتقال بیوگاز از راکتور به بطریهای حاوی آب بمنظور عدم بازگشت بیوگاز به محیط هاضم و دقت در اندازه گیری بسته میشد. روی هر بطری که حاوی آب بود و به منظور اندازه بیوگاز تعبیه شده بود سه شلنگ وصل است اولی برای انتقال بیوگاز از هاضم به بطری دومی برای انتقال آب در اثر فشار بیوگاز به بطری خالی و سومی برای زمانیکه متان اندازه گیری می شد و به بطری حاوی NaOHوصل می گردید. برای تهیه محلول NaOHهر ۷۵ گرم را در ۸،۵ لیتر آب حل کرده و کاملا هم زده شد. زمان اندازه گیری متان شلنگ سوم را بطری حاوی وصل کرده و از شلنگ دوم که برای انتقال آب تعبیه شده بود به منظور ریختن آب با فشار ثابت به داخل بطری که حاوی بیوگاز است استفاده می شود. بدین ترتیب بیوگاز در اثر فشار ثابت آب از مخزن خارج شده و بطری حاوی NaOHهدایت می گردد و پس از جذب CO2توسط NaOHمتان خالص به بطری حاوی آب انتقال میابد که در اثر ورود متان آب به بطری خالی هدایت می گردد و میزان جابه جایی آب برابر است با میزان متان تولیدی که با استفاده از ارلن مندرج اندازه گیری و یادداشت شد. با هر بار پر کردن منبع از مخلوط برگ های ساییده شده و آب، بایستی همان مقدار مایع ضایعاتی از خروجی منبع بیرون آید. می توان به کمک یک سطل، این مایع را جمع و از آن به عنوان کود برای گیاهان استفاده نمود.

- اندازه گیری PH

PHمعیاری جهت سنجیدن میزان اسیدی یا بازی (قلیایی) بودن یک ماده است. می توان به کمک نوارهای مخصوص سنجش PH، این معیار را برای مایع خروجی اندازه گیری کرد. PH چیزی بین عدد ۷و۸ به دست آمد که بیانگر کمی قلیایی بودن مخلوط به علت وجود مقداری ماده آمونیاک در آن است.« این به Ph پایین‌تر از ضایعات و انباشت اسیدهای چرب فرار (VFA[1]) مربوط می‌شود که فعالیت متالوژیک آن را کاهش می‌دهد (sibiys،۲۰۱۷: ۱۱۲).

شکل۸-اندازه گیری ph

[1] Volatile fatty acid

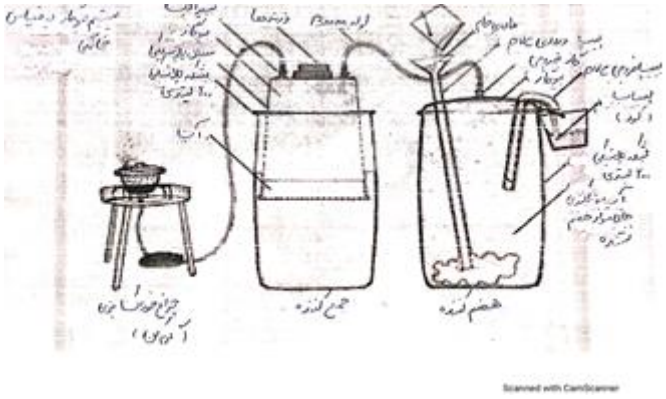
این مایع می تواند برای خاک های قرمز رنگ که کمی حالت اسیدی دارند، به عنوان کود استفاده شود . فرایند بی هوازی، کمی گرما و بخار آب نیز تولید کرده و این بخار با گاز تولیدی ممزوج می شود. ممکن است بخار آب متراکم شده و درون لوله گاز به دام بیافتد. برای جلوگیری از این اتفاق، سوپاپ خروجی منبع را بعد از استفاده از گاز بسته نگه دارید. بدین وسیله اکثر بخار آب متراکم شده به داخل منبع باز خواهد گشت. لوله گاز را نیز باید هفته ای یکبار از منبع جدا نموده و آب باقی مانده در آن را بطور کامل پاک کنید. بعلاوه، لوله خروجی پساب را نیز باید مرتب تمیز کنید و مانع از گرفتگی آن شوید. با انجام این مراحل بی هزینه، منبع کشت شما به مدت طولانی می تواند بدون مشکل کار کند .برای ما، حدودا روزانه ۱ ساعت زمان لازم بود تا مراحل فوق را انجام دهیم که زمانی کم و مناسب است. همچنین چیدن علف های هرز و جمع آوری پسماند گیاهان به صورت روزانه، باعث شادابی باغ و مزرعه شده و موجب می شود گیاهان دیگر بهتر رشد کنند.گفته می شود پساب منبع می تواند به عنوان کود برای گیاهان باغ استفاده شده و بیوگاز تولید شده حدود ۲۵ درصد از سوخت مورد نیاز برای پخت و پز یک خانوار ۴ نفره را تامین خواهد کرد.همچنین این فرایند هیچ هزینه ای جز برق مورد نیاز برای مخلوط کن نداشته و بطور کامل هماهنگ با محیط زیست است .

- سوزاندن بیوگاز خالص(چپ) و ترکیب شده با هوا(راست).شعله آبی تمیز و داغ است.

سوزاندن بیوگاز به تنهایی یک شعله دودگرفته زرد بزرگ تولید می کند که کف ظرف ها را سیاه می کند و گرمی موثری ندارد.این در حالی است که وقتی قبل از سوختن،هوا را با بیوگاز مخلوط نماییم، شعله ای آبی،تمیز و داغ خواهیم داشت.برای این منظور جهت تست تغییرات گنجانده شده،ما یک اجاق بونزن درست کردیم.

شکل۹-سوزاندن بیوگاز

ما هاضم بیوگاز خانگی خود را طراحی کردیم.در این طرح،جمع کننده بیوگاز یک بشکه پلاستیکی در نظر گرفته شده که این طرح به ما کمک می کند که یک سیستم سازگار جهت تولید بیوگاز کافی برای پختن یک وعده غذایی در روز ایجاد کرده و بنابراین منبع غالب انرژی مورد نیاز پخت و پز خانه را هاضم بیوگاز بگیریم.



شکل ۱۱-طرح هاضم بیوگاز،جمع کننده و اجاق

نتیجه گیری:

تحقیق حاضر برای بررسی تولید بیوگاز از گیاهان دارویی و خودرویی منطقه سیستان بوده است میزان حجم بیوگاز تولید شده را با اندازه گیری حجم آب خارج شده از لوله بدست آوردیم و هم چنین میزان ph در طی فرآیند هضم را که اندازه گرفته شد ، مشاهده شده که ph کاهش یافته که این کاهش موجبات حذف میکروب ها را فراهم می آورد و این مهم توسط خنثی کردن محیط اسیدی توسط بیکربنات کنترل گردید از آنجا که در اکثر مناطق سیستان از علف ها و گیاهان خودرو و یا پسماند گیاهان دارویی استفاده نمی شود پس می توان از این پسماندها برای تولید بیوگاز استفاده کردو به منظور حفاظت از محیط زیست و حفظ سلامتی انسان ها و سایر موجودات زنده اتخاذ راهکارهای لازم برای حل این معضل امری ضروری است توسعه واحدهای بیوگاز در این مناطق به عنوان یک روش مناسب برای جمع‌آوری و استفاده بهینه از علفهای هرز و گیاهان خودرو و فضولات دامی با کنترل و کاهش آلاینده های زیست‌محیطی ناشی از انباشت این ضایعات در کنار تولید انرژی به عنوان یک ضرورت باید بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد.

منابع:

۱. اربابی، محسن،۱۳۹۰، راهنمای عملی : فن آوری گاز زیستی (تکنولوژی بیوگاز)،تهران: انتشارات فن آوران.

۲. اقدم محمدپور، مهدی. نصیری خلیلی ، محمدعلی۱۳۹۱، امکان سنجی تولید انرژی زیستی از پسماندهای کشاورزی،اولین همایش سراسری محیط زیست، انرژی و پدافند زیستی.
۳. امین صالحی ، فرناز ، عبدلی، محمدعلی، ۱۳۸۸ ،ضرورت توسعه نیروگاههای تولید همزمان برق و حرارت بیوگاز سوز در کشور، نشریه انرژی ایران سال ۱۲ شماره ۳۰.
۴. ایمانی چگنی، سعید، ۱۳۸۷ ، بازیافت فضولات مرغداری های گوشتی جهت طراحی واحدهای بیوگاز، چهارمین همایش ملی مدیریت پسماند.
۵. ثقفی ، محمود، ۱۳۸۲، انرژی های تجدید پذیر نوین، چاپ دوم،تهران: انتشارات دانشگاه تهران.
۶. دعاگویی، علی، ۱۳۹۰، بررسی سینتیک و مدل سازی فرایند تولید بیوگاز از ضایعات گلاب گیری گل محمدی. مهندسی بیوسیستم ایران (علوم کشاورزی ایران). شماره ۴۲، جلد ۱.
۷. رسولی کوهی، مجتبی.صفائی، بتول .طالقانی، گیتی،۱۳۸۸،بررسی فنی اقتصادی فناوری بیوگاز درایران،دومین همایش بهینه سازی مصرف سوخت در بخش ساختمان.
۸. -----، -----، ۱۳۸۶ ، بررسی میزان تولید بیوگاز از ضایعات خانگی میوه در تلفیق با کود دامی به دو روش غیر پیوسته و نیمه پیوسته، پنجمین کنگره ملی مهندسی ماشینهای کشاورزی و مکانیزاسیون.
۹. ساسانی معصومه، خرم نژادیان شهرزاد، صفری رضا،۱۳۹۰، تجزیه هیدروکربنهای سه حلقه ای .مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان.
۱۰. ساسه، لودویک،۱۳۷۴، تاسیسات واحدهای بیوگاز، ترجمه نجف پور، قاسم،تهران: انتشارات دانشگاه صنعتی امیرکبیر.
۱۱. شیخ الاسلامی، سیدحسین، ۱۳۷۷ ،محاسبات و طراحی ساخت یک مخزن تخمیر.مجموعه مقالات سمینار بیوگاز در ایران.
۱۲. عمیق، مجید،۱۳۸۷،انرژیهای بازگشت ناپذیرانرژی بازگشت ناپذیر، تهران :انتشارات رسالت قلم.
۱۳. کریشنارائو، پینینتی.یاوری، رضا. ،۱۳۸۵،توسعه پایدار، اقتصاد و راه کارها،تهران:انتشارات دانشگاه تهران.
۱۴. مرندی ،عمید. دهدشتیان، مهین دخت،۱۳۸۷، بررسی امکان استفاده از بیوگاز در ایران،همایش ملی بیوگاز.
۱۵. میسمی، حمید،۱۳۸۸ ،جمع آوری و دفع پساب مجامع کوچک، شرکت مهندسی آب و پساب کشور.
۱۶. نصیری، جواد .کهربائیان، احمد.،۱۳۸۵ ،پتانسیل منابع زیست توده در ایران و اولویت بندی منابع بر مبنای قابلیت تولید برق .مجموعه مقالات سومین همایش بهین هسازی مصرف سوخت در ساختمان.

۱۷. وولورتون،بی سی،۱۳۸۶ ،با گیاهان آب را تصفیه کنیم، راه طبیعت برای زدودن آلودگی آب ها، ترجمه رضا روحانی، تهران: گروه مهندسین مشاور ره شهر.

18. D. Deublein, and A. Steinhauser, Biogas from waste and renewable resources: an introduction.John Wiley & Sons, 2011.
19. Dalkılıc, K., Ugurlu, A. 2015. Biogas production from chicken manure at different organic loading
rates in a mesophilic-thermopilic two stage anaerobic system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120:315-322.
20. Fisher, R. A. (1935). The design of experiments. London: Oliver & Boyd.
Fry, M., & Burr, G. (2001). Using the Delphi technique to design a self-reporting triage survey tool. Accident and Emergency Nursing, 9(4): 235-241.
21. N.Y. Amponsah, M. Troldborg, B.Kington,I.Aalders, and R.LHough,—Greenhouse gasemissions from renewable energy sources: A eview f lifecycle considerations, enewable andSustainable Energy Reviews, vol.39,pp.461-475, 2014.
22. Noxolo Thandeka Sibiya, Edison Muzenda, Member, IAENG, Charles Mbohwa. 2017.

تجزیه زیستی آنتراسن توسط یک باکتری اکستریم هالوفیل

امیرارسلان کاویانی‌فرد

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ۴۶۹۷-۱۳۹۵، ایران.

Email: kavyanifarda@pnu.ac.ir

چکیده

آنتراسن یک هیدروکربن پلی‌آروماتیک و از جمله آلاینده‌های محیطی در نظر گرفته می‌شود. این ماده از سمیت بالایی برخوردار بوده و میزان تجزیه‌ی زیستی آن بسیار کم است. باکتری *Haloferax*.sp KA3 یک سویه‌ی اکستریم هالوفیل است که قبلا از دریاچه نمکدان قشم جداسازی شد. هدف از این پژوهش تعیین میزان تجزیه زیستی آنتراسن توسط این باکتری بود. برای این منظور، از محیط کشت پایه نمکی حاوی آنتراسن استفاده شد. پس از یک دوره‌ی ۴ هفته‌ای، آنتراسن باقیمانده در محیط با استفاده از روش مایع-مایع استخراج و توسط HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز HPLC نشان داد باکتری مزبور می‌تواند در یک دوره‌ی انکوباسیون ۲۸، روزه ۸۶ درصد از آنتراسن را تجزیه کند. پس با توجه به قابلیت باکتری *Haloferax*.sp KA3 در تجزیه زیستی آنتراسن، می‌توان در مقیاس صنعتی از آن برای تیمار پساب‌های بسیار شور آلوده به این ترکیب استفاده کرد.

کلمات کلیدی: آنتراسن، اکستریم هالوفیل، *Haloferax*.sp KA3، HPLC.

Biodegradation of anthracene by an extreme halophile bacterium

Amirarsalan Kavyanifard

Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, 1395-4697, Iran.

E-mail: kavyanifarda@pnu.ac.ir

Abstract

Anthracene is a Polyaromatic hydrocarbon and is considered as environmental pollutants. This substance has high toxicity and its biodegradation rate is very low. *Haloferax* sp. KA3 is an extreme halophile strain that was previously isolated from Qeshm Namkdan lake. The aim of this research was to determine the rate of biodegradation of anthracene by this bacterium. For this purpose, saline base culture medium containing anthracene was used. After a period of 4 weeks, the remaining anthracene in the environment was extracted using liquid-liquid method and measured by HPLC. The results of HPLC analysis showed that the bacterium can degrade 86% of anthracene in a period of 28 days of incubation. Therefore, considering the ability of *Haloferax* sp. KA3 bacterium in biodegradation of anthracene, it can be applied at industrial scale to treat very salty wastewaters contaminated with this compound.

Keywords: anthracene, extreme halophile, *Haloferax* sp. KA3, HPLC

مقدمه

آنتراسن یک هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH[1]) جامد با فرمول $C_{14}H_{10}$ است که از سه حلقه بنزنِ به هم پیوسته، تشکیل شده است. این ترکیب سفیدرنگ در قطران زغال سنگ نیز یافت شده و حدود ۱٫۵٪ از زغال سنگ را تشکیل می‌دهد. آنتراسن در تولید رنگ قرمز آلیزارین و سایر رنگ ها استفاده میشود. آنتراسن بی رنگ است اما فلورسانس آبی (پیک ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر) را تحت تابش فرابنفش نشان می دهد. هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک فعالیت‌های صنعتی ایجاد و به عنوان ترکیبات سرطان‌زا و جهش‌زا در نظر می‌شوند. آنتراسن یک نوع از این آلاینده‌های خطرناک است. خوشبختانه باکتری‌های زیادی توانایی حذف این آلاینده را دارند [1].

یکی از اهداف سالم‌سازی پساب‌هایصنعتی، حذف ترکیبات هیدروکربنی پلی‌آروماتیک است. البته به دلیل سمیت بالای ترکیبات PAH و قابلیت تجزیه بیولوژیکی کم آنها، چالش‌های بزرگی در این مسیر وجود دارد. روش‌های فیزیکوشیمیایی مرسوم در تصفیه‌ی هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک، نمی‌تواند آنها را به‌طور کامل حذف کند و در مواردی حتی منجر به تولید محصولات خطرناک ناخوسته نیز می‌شود [2]. از بین روش‌های مختلفی که برای مقابله با آلودگی‌های هیدروکربنی به کار می‌روند، تیمار زیستی بدلیل زیست‌سازگار بودن با محیط و نداشتن پیامدهای ناخواسته؛ با اقبال بیشتری همراه بوده است. منظور از تجزیه‌ی زیستی، شکستن مولکول‌های آلاینده با کمک موجودات زنده به‌ویژه میکروارگانیزم‌هاست که در نتیجه‌ی آن، ترکیبات آلاینده به مواد غیر خطرناک تبدیل شده و سپس وارد چرخه‌های بیوشیمیای می-شوند [3]. میزان تجزیه‌ی زیستی تحت تاثیر فاکتورهای مختلف محیطی مختلف و از جمله تحت تاثیر غلظت نمک است. در محیط‌های شور، دسترسی زیستی به هیدروکربن‌ها کمتر است چرا که نمک‌های محلول در آب، باعث کاهش انحلال هیدروکربن‌ها در آب شده و هر چه غلظت نمک‌ها بالاتر رود، ترکیبات آلی تمایل دارند به ماتریکس جامد جذب شده و به این ترتیب از دسترس

[1] Polycyclic Aromatic Hydrocarbon

میکروارگانیزم‌ها خارج شوند [4]. همچنین در محیط‌های شور به دلیل کاهش میزان اکسیژن محلول در آب، از دسترسی ارگانیزم‌ها به اکسیژن نیز کاسته می‌شود. از آنجا که اکتری‌های اکستریم هالوفیل، از سازگاری تکاملیِ بالایی برای فعالیت در محیط‌های بسیار شور برخوردارند؛ بنابراین در مقایسه با دیگر ارگانیزم‌ها از قابلیت بالاتری برای تجزیه ترکیبات هیدروکربنی در محیط‌های بسیار شور برخوردارند [5]. این پژوهش با هدف بررسی قابلیت باکتری اکستریم هالوفیل *Haloferax* sp. KA3 در تجزیه زیستی آنتراسن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

محیط کشت مورد استفاده

از یک محیط پایه نمکی (pH=7) با فرمولاسیون زیر استفاده شد: ، ۲ گرمNH_4Cl ، ۰/۰۴ گرم $CaCl_2$، ۲۰۰ گرم NaCl، ۰/۲۴ گرم، Na_2HPO_4 و ۳۰ گرم $MgSO_4$ به همراه ۱ میلی‌لیتر محلول نمک-های کمیاب در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر. محلول نمک‌های کمیاب شامل ۱۰۰ میلی‌گرم کلرید نیکل، ۲۰۰ میلی‌گرم کلرید کبالت، ۲۶ میلی‌گرم سلنیت سدیم، ۲۰ میلی‌گرم کلرید مسII، ۵۰ میلی‌گرم مولیبدات سدیم، ۳۰ میلی‌گرم ولفرامات سدیم، ۱۰ میلی‌گرم وانادات سدیم و ۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲۵٪ در یک لیتر آب مقطر بود.

باکتری مورد مطالعه

باکتری مورد استفاده یک باکتری اکستریم هالوفیل بود و مطالعات قبلی از دریاچه نمکدان واقع در قشم جداسازی شده که با نام *Haloferax* sp. KA3 در بانک اطلاعاتی GenBank با شماره دسترسی KP343876 ثبت شده بود.

شرایط کشت و تجزیه آنتراسن

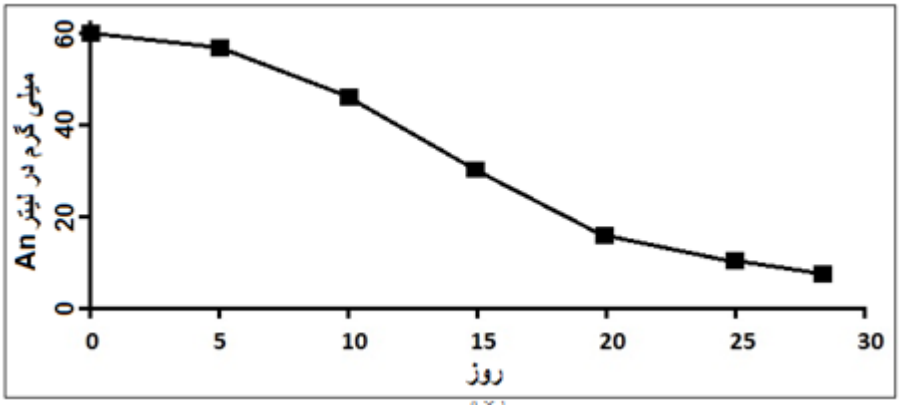
ابتدا استوکی از آنتراسن بدین ترتیب تهیه شد: ۱ گرم آنتراسن در ۱۰۰mL استون حل شد (غلظت ۱۰۰mg/L) و در دمای ۴°C نگهداری گردید. بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز آنتراسن، ابتدا اجازه داده شد تا حلال استونی تبخیر شود. سپس غلظتی معادل نیم مک‌فارلند از باکتری به ۱۰۰mLمحیط پایه نمکی تلقیح و مقدار ۵۰mg/L آنتراسن به آن اضافه شد. برای جلوگیری از فراریت و برقراری موازنه جرم، دهانه ارلن‌ها با پلی‌اورتان به ضخامت ۷-۵ سانتی‌متر بسته شد(پلی‌اورتان جاذب مواد آلی فرار است). ارلن‌های کشت شده در شیکرانکوباتور با دور ۱۱۰ RPM و دمای ۳۰°C به مدت ۲۸ روز قرار داده شدند. یک ارلن شاهد بدون تلقیح بامتری نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان آنتراسن با کمک HPLC

مقدار آنتراسن موجود در محیط کشت با روش استخراج مایع-مایع با کمک دی‌کلرومتان استخراج و با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد [6].

نتایج

همچنانکه در شکل ۱ نشان داده شده است، نتایج آنالیز HPLC نشان داد میزان آنتراسن باقیمانده بعد از یک دوره انکوباسیون ۲۸ روزه برابر با ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که نشان می‌دهد باکتری *Haloferax* sp. KA3 توانسته طی یک بازه‌ی زمانی چهار هفته‌ای ۸۶٪ از آنتراسن را تجزیه کند.



شکل۱- نتایج آنالیز آنالیز HPLC نشان داد میزان آنتراسن باقیمانده بعد از ۲۸ روز.

بحث

هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک و از جمله آنتراسن، یکی از آلاینده‌های ناشی ازصنایع مختلف هستند که از توکسیسیته بالایی برخوردار بوده و در صورت ورود به محیط؛ پیامدهای بغرنجی به همراه دارند. پس بدیهی به‌نظر می‌رسد که تدابیر لازم برای چنین آلاینده‌های خطرناکی اندیشیده شود. تجزیه‌ی زیستی ترکیبات آلاینده، یک تکنولوژی زیست سازگار، کم هزینه و موثر در پاکسازی محیط‌های آلوده است. پژوهش‌های مختلف منجر به جداسازی و شناسایی باکتری‌های متفاوتی با قابلیت تجزیه‌ی ترکیبات PAH شده که هر کدام از آنها از توان و راندمان متفاوتی در تجزیه این ترکیبات برخوردارند [1]. ما در این مطالعه از باکتری اکستریم‌هالوفیل *Haloferax* sp KA3 ، برای تجزیه زیستی آنتراسن استفاده کردیم. اندازه‌گیری‌های کمی با استفاده از روش HPLC نشان داد که این باکتری می‌تواند در یک دوره ۲۸ روزه ۸۶٪ از آنتراسن را در محیط پایه نمکی حاوی ۲۰٪ نمک؛ تجزیه نماید که نشان‌دهنده راندمان نسبتاً بالای آن برای تجزیه‌ی آنتراسن است.

در پاکسازی محیط‌های بسیار شور؛ برای پرهیز از رقیق سازی، اسمز معکوس، تبادل یونی یا الکترودیالیز که فوق‌العاده هزینه بر هستند، بایستی از ارگانیزم‌های هالوفیل که اپتیمم فعالیتشان در این محدوده‌های نمکی قرار دارد استفاده شوند [7]. از آنجا که باکتری مورد مطالعه‌ی ما یک ارگانیزم اکستریم‌هالوفیل است، بنابراین می‌توان از آن برای تیمار زیستی محیط‌های بسیار شور که آلوده به آنتراسن هستند، بهره برد.

References

[1]. Wasfi R, Moussa HA, Bakr RO, Abdeltawab NF, Megahed SA. (2023). Anaerobic biodegradation of anthracene by oral Firmicutes isolates from smokers and its potential pathway. International Biodeterioration & Biodegradation. 180: 105598. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2023.105598

[2]. Bernard O, Michel M. (2005). Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, D.C. 1th edition. pp: 317-319.

[3]. Margesin R, Schinner F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl Microbiol Biotechnol, 56:650–663

[4]. Martins LF, Peixoto RS. (2012). Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Hypersaline Environments, Brazilian Journal of Microbiology, pp 865-872

[5]. Chang W. Akbari A. Snelgrove J. Frgon D, and Ghoshal S. (2013). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated clayey soils from a sub-arctic site: the role of aggregate size and microstructure. Chemosphere 91: 1620 – 1626.

[6]. AWWA. (2022). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Edition 24th Edition. Brand: American Waterworks Association.

[7]. Al-Mailem DM. Sorkhoh NA. Al-Awadhi H. Eliyas M. Radwan SS. (2010). Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. Extremophiles 14:321–328

بررسی اثر سمیت نانو ذرات سبز بیسموت اکساید بر روی رده سلولی سرطانی MCF-7 و سلول-های سالم بافت پستان

مائده خرمی[۱]، جواد سرگلزایی[۱]، امیر جلالی*

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
ایمیل نویسنده مسئول: a-jalali@araku.ac.ir

چکیده

بیسموت و ترکیبات مرتبط با آن، مانند نانوذرات اکسید بیسموت (NPs Bi2O3)، در حوزه علوم پزشکی، برای دارورسانی، درمان سرطان، تصویربرداری زیستی و مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار می‌گیرند. اخیراً توجه زیادی به سنتز سبز نانوذرات غیر سمی و سازگار با محیط زیست شده است زیرا بیشتر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در سنتز نانوذرات برای سلامت انسان و محیط زیست خطرناک هستند. در فرآیند بیوسنتز، به عنوان یک عامل تثبیت کننده و پوشاننده برای نانوذرات عصاره سلولی موجودات حاوی ترکیبات کاهش دهنده زیستی می شود. در این مطالعه از عصاره سلولی سیانوباکتری *Spirulina platensis* برای ساخت نانوذرات اکسید بیسموت (NPs Bi2O3) با استفاده از سنتز سبز استفاده شد. تجزیه و تحلیل پرتو ایکس پراکنده انرژی (EDX)، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FT-IR)، میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری و روبشی برای بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات Bi2O3 استفاده می‌شود. سپس در شرایط آزمایشگاهی، اثر ضد سرطانی و سیتوتوکسیک نانوذرات اکسید بیسموت علیه سلول‌های سرطان پستان MCF-7 و سلول‌های بافت سالم پستان MCF-10a با روش MTT مورد مطالعه قرار گرفت. اندازه و شکل نانوذرات Bi2O3 به آنها اجازه ورود به سلول‌های سرطانی را می‌دهد. بر اساس نتایج حاصل از MTT توانایی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم بافت پستان پس از قرارگرفتن در معرض نانوذرات مذکور، تغییری نیافت. بر اساس نتایج تحقیقات حاضر باتوجه به عدم سمیت نانو ذرات بر روی بافت سالم پستان، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات بیسموت اکساید می‌تواند به عنوان عامل بسیار مناسب جهت تشخیص سرطان و یا دارورسانی هدفمند به بافت سرطانی مورد استفاده قرارگیرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، نانوذرات، بیسموت اکساید، اثرات سیتوتوکسیک

Abstract

Bismuth and its derivatives, such as bismuth oxide nanoparticles (NPs Bi2O3), are used in the field of medical sciences for drug delivery, cancer treatment, bioimaging and elimination of pathogenic microorganisms. Recently, much attention has been paid to the green synthesis of non-toxic and environmentally friendly nanoparticles because most of the chemical compounds used in the synthesis of nanoparticles are hazardous to human health and the environment. In the process of biosynthesis, as a stabilizing and covering agent for nanoparticles, the cell extract of organisms contains bio-reducing compounds. In this study, the cell extract of cyanobacterium Spirulina platensis was used to make bismuth oxide nanoparticles (NPs Bi2O3) using green synthesis. Energy dispersive X-ray analysis (EDX), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), transmission and scanning electron microscopes are used to investigate the physical and chemical properties of Bi2O3 nanoparticles. Then, in laboratory conditions, the anticancer and cytotoxic effect of bismuth oxide nanoparticles against MCF-7 breast cancer cells and MCF-10a normal breast tissue cells was studied by MTT method. The size and shape of Bi2O3 nanoparticles allow them to enter cancer cells. According to the results of MTT, the survival ability of cancer cells and normal cells of breast tissue did not change after being exposed to the mentioned nanoparticles. Based on the results of the present research, considering the non-toxicity of nanoparticles on normal breast tissue, it can be concluded that bismuth oxide nanoparticles can be used as a very suitable agent for cancer diagnosis or targeted drug delivery to cancerous tissue.

Keyword: Breast cancer, nanoparticles, bismuth oxide, cytotoxic effects

مقدمه:

سالیان دراز است که محققان روی سرطان مطالعه می‌کنند و اطلاعات ارزشمندی در مورد چگونگی رشد و انتشار سرطان در سراسر بدن دریافته‌اند. با این حال، به دلیل عدم درمان قطعی، سالانه افراد زیادی در سراسر جهان بر اثر انواع سرطان جان خود را از دست می دهند[1]. طبق داده های GLOBOCAN 2020، در سال ۲۰۲۰، تعداد موارد جدید سرطان در سراسر جهان فارغ از جنس و سن به ۱۹,۳ میلیون و ۹,۹ میلیون مرگ افزایش خواهد یافت. در همین حال، سرطان سینه برای اولین بار با میزان تشخیص ۱۱,۷ درصد در مردان و زنان به شایع ترین نوع سرطان تبدیل شد[2]. در سال ۲۰۲۰، سرطان سینه شایع ترین و اصلی ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان و چهارمین عامل مرگ ناشی از سرطان در سراسر جهان بود که حدود ۷۰۰ مرگ را به خود اختصاص داد. این اطلاعات اهمیت بهبود روش‌های تشخیص زودهنگام مقرون‌به‌صرفه، مؤثرتر و ایمن‌تر کردن درمان‌های موجود و کاهش مرگ و میر ناشی از سرطان را برجسته می‌کند[3].

در طی سال‌های متمادی روش ها و داروهای مختلفی برای درمان سرطان استفاده شده است. با این حال، این روش ها دارای نقاط ضعفی هستند. در میان آنها، داروهای شیمی درمانی رایج علاوه بر غیرزیست سازگار بودن، به سرعت از طریق کلیه دفع شده و توزیع ناهموار و عوارض جانبی شدید نیز دارند. در عصر حاضر، نانوذرات مختلفی در حال حاضر در حال توسعه و استفاده برای دارورسانی، تشخیص زودهنگام بیماری و درمان هستند[4].

بیسموت (Bi) یک فلز سنگین نسبتا غیر سمی و ارزان با خواص عالی و کاربردهای زیست پزشکی فراوان است. بیسموت معمولاً به شکل نیترات ها، اکسیدها، هالیدها، اگزوهالیدها و مشتقات استفاده می شود[5]. ترکیبات مبتنی بر بیسموت استفاده گسترده ای به عنوان دارو برای درمان اختلالات گوارشی مانند سوء هاضمه، زخم معده و عفونت هلیکوباکتر پیلوری دارند. اخیراً کاربردهای پزشکی این فلز گسترش یافته و

شامل عفونت های ویروسی و میکروبی، سرطان و همچنین درمان های بالقوه برای تصویربرداری، سنجش زیستی و تحویل دارو می شود[6].

اگرچه سمیت ترکیبات مبتنی بر بیسموت سال ها مورد مطالعه قرار گرفته است، اما اطلاعات کمی در مورد اثرات سمی آنها بر سلول های سالم انسان وجود دارد و نگرانی های جدی در مورد عوارض جانبی این نانوذرات وجود دارد. بنابراین، هدف از این مطالعه سنتز سبز و شناسایی نانوذرات Bi2O3 با استفاده از *Spirulina platensis* و بررسی سمیت این نانوذرات برای سلول‌های سرطان سینه انسان (MCF-7) و سلول‌های سالم بافت سینه انسان است.

مواد و روش‌ها:

سیانوباکتریوم *Spirulina platensis* برای این مطالعه از شرکت ریزجلبک پارسیان، رشت، ایران تهیه شد. ۴۰ گرم پودر اسپیرولینا با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه همگن شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد. محلول در دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (اپندورف، هامبورگ، آلمان). مایع رویی از طریق کاغذ صافی Whatman شماره ۱ فیلتر شد و با یک پمپ خلاء اواپراتور دوار (اواپراتور چرخشی Rotavapor R-100، Büchi، Flawil، سوئیس) تغلیظ شد. سوپرناتانت استفاده شد، غلظت تعیین شد و محصول برای پردازش بیشتر در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

برای تهیه نانوذرات اکسید بیسموت، ۲ گرم نیترات بیسموت (Merk KGaA، آلمان) در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل شد و به طور مداوم در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد همزده شد. در مرحله بعد، ۲۰ میلی لیتر عصاره آبی سیانوباکتری ها در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد همزمان با هم زدن مداوم اضافه شد. . مخلوط بدست آمده برای ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۹۰ درجه سانتیگراد نگه‌داری و پس از ۲۴ ساعت از انکوباتور خارج و ۴ بار با آب مقطر شسته شد تا ناخالصی‌های آن از بین برود. سپس محصول چندین بار با

آب مقطر شسته شده و در خلاء خشک می شود. محصول در دمای ۵۵۰ درجه سانتیگراد در کوره و اتمسفر ساکن هوا به مدت ۵ ساعت حرارت داده شد تا از حذف ناخالصی ها اطمینان حاصل شود.

برای تایید و شناسایی نانو ذرات سنتز شده، برهمکنش‌های احتمالی بین نانوذرات و پروتئین‌های بیوسنتز شده توسط طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) با روش گلوله KBr توسط طیف‌سنج Shimadzu 8900 FT-IR تعیین شد. اندازه گیری ها در محدوده ۵۰۰-۴۰۰۰ سانتی متر-۱ با وضوح ۴ سانتی متر-۱ انجام شد. یک آنالایزر پراکنده انرژی ایکس (EDX) (سری MIRA3 FEG-SEM) که برای آنالیز عنصری استفاده می شود. اندازه و مورفولوژی نانوذرات Bi2O3 با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (KYKY-EM3200) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (Philips EM208S 100KV) مشخص شد.

جهت بررسی اثر سمیت نانوذره بیسموت اکساید بر روی رده سلولی MCF-7، آزمون MTT انجام شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با میزان سلول مورد نظر درون هر چاهک ظرف ۹۶ خانه ریخته شد و این سریال در سه ردیف تکرار شد. سلول ها به مدت یک شبانه روز در انکوباتور نگهداری شد تا به ته نشین شده و در کف ظرف قرارگیرند. پس از آن رقت های مورد نیاز نانوذرات بیسموت اکساید شامل ۲۵، ۳۷/۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر آماده شد و پس از فیلتر نمودن آن برای هر رقت سلول با سه بار تکرار در هر چاهک ماده افزوده شد. سلول‌ها بمدت ۱۲ تا ۴۸ ساعت بر اساس مدت زمان بهینه آزمایش برای سلول‌ها انکوبه شد. در این مرحله ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT فعال شده به هر چاهک اضافه شد و دوباره ظرف به مدت ۲ تا ۴ ساعت درون انکوباتور CO2 قرارگرفت. سپس با کمک میکروسکوپ اینورت حضور رسوبات نقطه‌ای ارغوانی رنگ بررسی گردید. پس از مشاهده رسوبات ارغوانی، محیط کشت چاهک‌ها کاملا تخلیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از حلال DMSO به هر چاهک اضافه شد و با ملایمت و حرکات چرخشی ملایم تکان داده شد و به مدت یک ساعت در تاریکی قرار داده شد و پس از پایان مدت انکوباسیون با مشاهده رسوب در کف ظرف، بوسیله سمپلر کاملا به حالت محلول درآورده شد.

سپس جذب چاهک‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. مقادیر جذب کمتر از جذب بلانک نشان دهنده کاهش سرعت رشد و مقادیر بالاتر از جذب بلانک نشان دهنده افزایش تکثیر سلولی است.

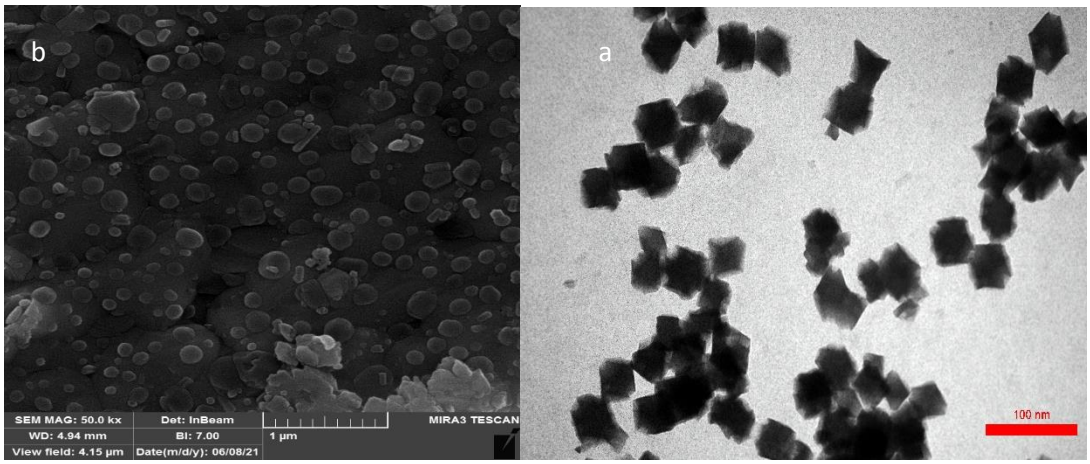
درصد بقاء سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات بیسموت اکساید از روابط ۱ و ۲ بدست آمد:

$$\%\ Cytotoxicity = 1 - \frac{mean\ absorbance\ of\ toxicant\ treated\ cells}{mean\ absorbance\ of\ negative\ control} \times 100 \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

$$\%\ \text{Viability} = 100 - \%\ \text{cytotoxicity} \qquad \text{(رابطه ۲)}$$

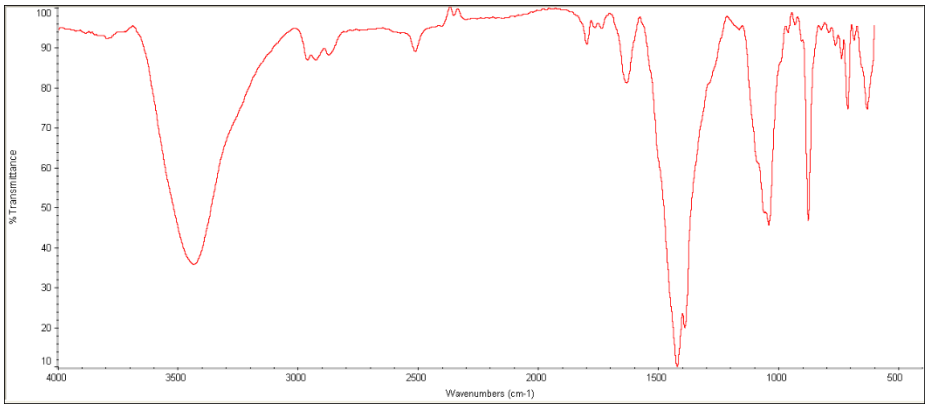
نتایج

مورفولوژی و اندازه نانوذره های اکسید بیسموت توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی ومیکروسکوپ الکترونی گذاره مشخص شد. نتایج این آنالیزها نشان داد که متوسط اندازه نانوذرات Bi2O3 ۴۵ نانومتر می-باشد.



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی. شکل (a) تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره شکل (b)

در نتایج حاصل از FTIR یک باند گسترده که در حدود ۳۴۳۴ cm-1 مشاهده شد که به دلیل همپوشانی ارتعاشات کششی گروه های آمینی اولیه و آروماتیک مولکول‌های عصاره سلولی سیانوباکتری و کشش O-H مولکول های آب جذب شده در سطح نانوذرات است. همچنین یک قله که در ۱۶۳۱ cm-1 مشاهده شد که مربوط به خم گروه های آمینی نوع اول (N-H) می‌باشد. این گروه عملکردی جزء زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها در ساختار پروتئین‌ها است. یک پیک وسیع در ۱۴۲۱ cm-1 دیده می‌شود که ناشی از دفرمه شدن C-H بوده که نشان‌دهنده قرارگیری مولکول‌های عصاره سلول سیانوباکتری بر روی سطح نانوذرات است. این پیک تایید کننده واکنش بین ترکیبات کربن‌دار با اکسیژن نانوذرات اکسید بیسموت است. همینطور پیک در ناحیه ۸۷۴ cm-1 مربوط به گروه Bi-O و پیک در ناحیه ۶۳۰ cm-1 در ارتباط با Bi-O non-bridging oxygen می‌باشد.

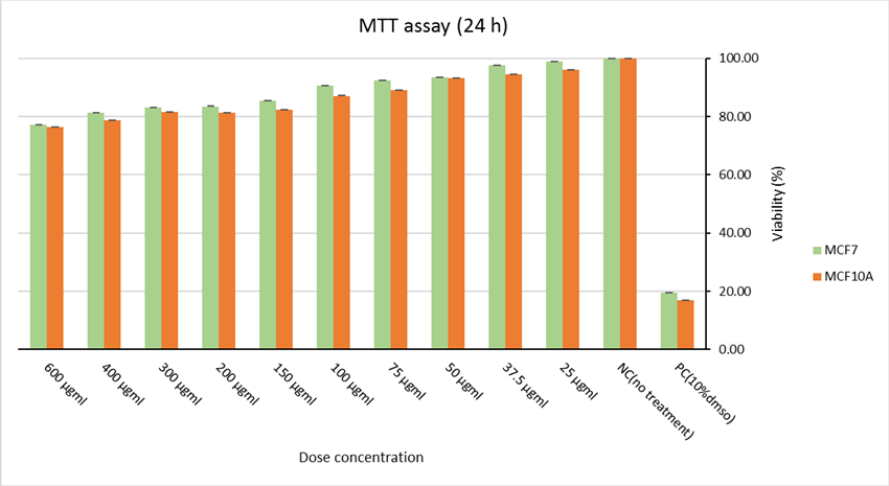


شکل ۲- نمودار نتایج آزمون FTIR. پیک‌های این نمودار گروه‌های عملکردی و تشکیل کیفی نانوذرات اکسید بیسموت را نشان می‌دهد.

نتایج آزمون رنگ شناسی MTT

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، توانایی زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 سرطان پستان که برای مدت ۲۴ ساعت در معرض دوزهای مختلف از این ماده که شامل ۲۵، ۳۷/۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و

۶۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر می‌باشد، قرار گرفته بودند تغییری نیافت و این ماده که به روش سبز سنتز شده بود، اثر سمیت نداشت. همانطور که در شکل۷-۳ مشاهده می‌شود، توانایی زنده‌مانی سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم بافت پستان پس از قرارگرفتن در معرض نانوذرات مذکور، تغییری نیافت.



شکل ۳- نمودار درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی و سالم بافت پستان

بحث و نتیجه گیری

به عنوان نتیجه گیری، در این مطالعه آزمایشگاهی، نانوذرات Bi2O3 با موفقیت به روش سبز با استفاده از عصاره آبی سیانوباکتری اسپیرولینا پلاتنسیس به عنوان یک عامل احیا کننده سنتز شدند. نتایج آزمایش‌های مشخصه‌یابی انجام‌شده بر روی نانوذرات Bi2O3 نشان داد که اندازه، شکل و مورفولوژی نانوذرات سنتز شده سبز برای نفوذ به داخل سلول‌های مورد مطالعه و تأثیر بر فعالیت‌های حیاتی آن‌ها مناسب است. علاوه بر این، بر اساس نتایج تحقیقات حاضر باتوجه به عدم سمیت نانو ذرات بر روی بافت سالم پستان، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات بیسموت اکساید می‌تواند به عنوان عامل بسیار مناسب جهت تشخیص سرطان و یا دارورسانی هدفمند به بافت سرطانی مورد استفاده قرارگیرد.

منابع

[1]. Ahamed, M., Akhtar, M.J., Khan, M.A.M., Alrokayan, S.A., & Alhadlaq, H.A. (2018). Oxidative stress mediated cytotoxicity and apoptosis response of bismuth oxide (Bi_2O_3) nanoparticles in human breast cancer (MCF-7) cells. Chemosphere. 216: 823-831.

[2]. Alamer, A., Ali, D., Alarifi, S., Alkahtane, A., Al-Zharani, M., Abdel-Daim, M.M., Albasher, G., Almeer, R., Al-Sultan, N.K., Almalik, A., Alhasan, A.H., Stournaras, C., Hasnain, S., & Alkahtani, S. (2020). Bismuth oxide nanoparticles induce oxidative stress and apoptosis in human breast cancer cells. Environ Sci Pollut Res Int. 28(6): 7379-7389.

[3]. E. Blowers and S. Foy, “Breast cancer overview: Current treatments,” Practice Nursing, vol. 20, no. 6, 2009, doi: 10.12968/pnur.2009.20.6.42553.

[4]. S. C. Cabral-Romero Claudio, “Bismuth nanoparticles: antimicrobials of broad-spectrum, low cost and safety,” Nanomedicine, pp. 430–437, 2014.

[5]. N. Motakef-Kazemi and M. Yaqoubi, “Green synthesis and characterization of bismuth oxide nanoparticle using mentha pulegium extract,” Iranian Journal of Pharmaceutical Research, vol. 19, no. 2, 2020, doi: 10.22037/ijpr.2019.15578.13190.

[6]. Y. Xin, M. Huang, W. W. Guo, Q. Huang, L. zhen Zhang, and G. Jiang, “Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy,” Molecular Cancer, vol. 16, no. 1. BioMed Central Ltd., Jul. 28, 2017. doi: 10.1186/s12943-017-0683-y.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

بررسی اثرات آلاینده ها بر ژنتیک جانداران دریایی

فیروزه انصاری[۱]، الیا فیلی پور[۱]، زهرا خوشنود[۲*]

۱.. کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران.

*۲. دکتری زیست شناسی دریا، گروه زیست شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران.
zkhoshnood@gmail.com

چکیده

آلودگی منابع آبی یکی ازمشکلات عمده درتمام دنیا می باشد آلاینده ها باورود به پیکره یک موجود زنده میتوانند به ماکرومولکولهای با ارزشی مثل پروتئین ها کربوهیدراتها لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب رسانده وموجبات تخریب آنها را فراهم نمایند یکی ازمهمترین اثرات ناشی ازآلاینده های مختلف برجانداران آبزی اسیب وارده به محتوای ژنتیکی است عوارض ناشی ازآسیب به محتوای ژنتیکی درآبزیان رامیتوان به صورت کاهش رشدنموغیرطبیعی و کاهش درمیزان بازماندگی لاروها و افراد بالغ مشاهده نمود تجمع آلودگی درماهیان بطور مستقیم ازطریق آب آلوده شده و یا غیرمستقیم ازطریق تغذیه ازارگانیسم های آلوده صورت میگیرد درماهیان اریتروسیت های خون و بافت آبشش عمدتا بعنوان نشانگرهای قرارگیر یا درمعرض مواد سمی مورداستفاده قرارمیگیرند.

یکی دیگر از اثار مهم آلودگی آب با منشا نفت، مشکلات زیست شناختی است که برای موجودات زنده دریایی بوجود می آید. نفت خام یک ماده خالص نیست و در آن انواع هیدروکربن ها با تفاوت های فیزیکی و شیمیایی مختلف وجود دارد، هنگامی که دریا را آلوده می سازد به اشکال گوناگون تبلور پیدا می کند که غالباً برای آبزیان مضر است. تکنیک های ژنتیکی یک رویکرد قدرتمند برای ارزیابی تغییرات ناشی از آلودگی در جمعیت ها ارائه می دهد. ما خلاصه‌ای از روش‌های ارزیابی ژنتیکی معاصر و مروری بر مطالعات منتشر شده در مورد اثرات ژنتیکی در موجودات آبزی در معرض مزرعه ارائه می‌کنیم. علاوه بر این، ارزیابی دقیق مواجهه مورد نیاز است، از جمله شیمی محل و بافت، پاسخ‌های نشانگرهای زیستی، و اندازه‌گیری اثرات بالقوه مضر، مانند آسیب DNA، یا کاهش تولید مثل یا بقا.

کلمات کلیدی: آلاینده ، تغیرات ژنتیکی ، آبزیان ، نفت

Investigating the effects of pollutants on the genetics of marine organisms

Firozeh Ansari1, Elia Fillipour1, Zahra Khoshnoud2*

1.. Molecular cell biology expert, Department of Biology, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran.
*2. PhD in Marine Biology, Department of Biology, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran.

Abstract

Pollution of water resources is one of the major problems in the whole world. Pollutants entering the body of a living organism can damage valuable macromolecules such as proteins, carbohydrates, lipids and nucleic acids and cause their destruction. One of the most important effects caused by various pollutants of aquatic organisms It is due to the genetic content. The effects caused by damage to the genetic content in aquatic animals can be seen in the form of a decrease in abnormal growth and a decrease in the survival rate of larvae and adults. The accumulation of contamination in fish is directly through contaminated water or indirectly through feeding contaminated organisms. In fish, blood erythrocytes and Gill tissues are mainly used as indicators of exposure or exposure to toxic substances.
Another important effect of water pollution with oil origin is the biological problems that arise for marine organisms. Crude oil is not a pure substance and contains various types of hydrocarbons with different physical and chemical differences. When it pollutes the sea, it crystallizes in various forms, which is often harmful to aquatic life. Genetic techniques provide a characteristic for evaluating effects in populations. We provide a summary of contemporary genetic assessment methods and a review of published studies on genetic genetics in farm-exposed aquatic organisms. In addition, careful evaluation is required, including site and tissue chemistry, biomarker responses, and measurement of potential harm, DNA damage, or reduced reproduction or survival.

Key words: pollutant, genetic changes, aquatic life, oil

مقدمه

محققان عمدتاً ارگانیسم های آزمایشی را که در محیط های آزمایشگاهی قرار گرفته‌اند مورد مطالعه قرار داده‌اند. این مفهوم که الگوهای ژنتیکی در جمعیت ها ممکن است با قرار گرفتن در معرض آلاینده ها تغییر کند، جدید نیست. برای چندین دهه، زیست شناسان شیلات و همچنین محققان متعدد آفات کشاورزی، کاهش جمعیت و به دنبال آن سازگاری را متذکر شده اند. [4,5]

انواع آلودگی های نفتی

نشت آلودگی از سکوهای نفتی داخل آب، عملیات نفت کش ها شامل شست وشوی مخازن و تخلیه آب مخزن تعادل، تصادف نفت کش ها، تجهیزات پالایشگاهی در سواحل و بسیاری عوامل دیگر همواره سلامت محیط زیست را تهدید می کرده و می کند. از طرفی وجود ذخائر عظیم گاز و نفت در دریا ها موجب شده فعالیت های حفاری، استخراج، پالایش، بارگیری و حمل فراورده های نفتی به شدت گسترش یابد.

نفت‌های سبک با نقطه جوش متوسط، اصلی ترین عوامل تغییر مزه و بو می باشند، اما تمام ترکیبات نفت خام، محصولات پالایشی، هرزآب های پالایشگاهی، فاضلاب ناشی از کمپلکس‌های پتروشیمیایی سبب ایجاد طعم نامطلوب در ماهیان و غذاهای دریایی شده و در سطوح پایین آلودگی حالت بدون طعم مشخص را ایجاد می کنند، که حداقل تاثیر آن، صدمه به بازار است. [2]

عوارض آلودگی ها (نفت) بر جانداران دریایی

صدف‌ها از طرق متفاوت تحت تاثیر قرار می گیرند. نفت ته نشین شده، صدف نرم‌تنان را بدون صدمه به آنها آلوده می کند، اما حتی یک مقدارناچیز نفت بر روی تعداد کمی از صدف‌های mussel (Mystiques) cockle (Cerastoderma)، یا صدف‌های حلزونی (Littorina) اثر می گذارد. [2]

نوع و میزان این مواد آلاینده نفتی در مکان های صنعتی ، کشاورزی و شهری متغیر است. برای حل مشکل ابتدا باید این مواد را در جمعیت ماهیان شناسایی کنیم و سپس این مواد را با ابزار و ادوات مطابق با تکنولوژی مناسب جداسازی کنیم . وجود لکه های نفتی بر ماهی ها باعث زیر میگردد که شامل:

عقب افتادگی تقسیم سلولی

تخم ریزی غیر طبیعی مولدین

واکنشهای بازدارنده جفت گیری

کاهش فعالیت های تغذیه ای در مولدین

مسدود شدن اندامهای تنفسی

تحریک و اختلال دستگاههای با اهمیت در تنفس

کاهش کیفیت مولدین و کاهش بازدهی آنها در کارگاهای تکثیر و محیط طبیعی

افزایش حساسیت ماهیها نسبت به بیماری ها

حساسیت زیاد تخم های رشد یافته ماهی به آلودگی نفتی

ایجاد مسمومیت برای تخم های رشد یافته دز غلظت های مختلف نفتی

از نشانه های بارز آلودگی نفتی بد طعم شدن گوشت ماهیان در غلظت های مختلف نفتی

از دیگرعوارض ناهنجار آلودگی نفتی، اختلال و کاهش باروری ماهیان و ترک نمودن زیستگاه های طبیعی خود همچنین تغییر حالات رفتاری آنها است مواد نفتی و مشتقات آن از طریق شبکه غذایی وارد بدن موجودات آبزی شده و در جگر و کیسه صفرا تجمع می یابد. مواد نفتی بلعیده شده مستقیما وارد معده میشود که پس از مصرف از طریق ادرار، مدفوع ماهی،در محیط آلوده خارج میگردد.

پوشیده شدن سطح آبششها به مواد نفتی و عدم امکان تبادل گازهای اکسیژن و کربن دی اکسید میان خون،هوا منجربه خفگی مرگ آنها میگردد.

بیشترین خسارات ناشی از آلودگی نفتی متوجه اجتماعات ماهیان جوان و بالغ میگردد که در آبهای کم عمق زیست می کنند. بررسی های به عمل آمده نشان داده که ماهیان صید شده آلوده به ترکیبات سبک نفتی دچار تغییرات ژنتیکی و سرطان پوست و آبشش شده اند. [2]

عوارض آلاینده ها (فلزات و پی اچ)

از جمله فاکتور هایی دیگر که بطور مستقیم و بدون پاسخ های استرسی درون بدن ماهی در کار تولید مثل اخلال ایجاد می کنند می توان به آلاینده های آب اشاره کرد مثال های فراوانی از نقش آلوده کننده ها ـ فلزات سنگین و پی اچ پایین آب روی کاهش استعداد هم آوری ـ کاهش درصد لقاح ـ کاهش بازماندگی

نوزادان و غیره در فیزیولوژی ماهی وجود دارند .یکی از مهم ترین پاسخ‌های غدد درون ریز به عوامل محیطی، پاسخ گنادهاست. در مورد هورمون‌های جنسی در اثر آلودگی های فلزات سنگین(کادمیوم، سرب و ...)، آفت‌کش‌ها(poly PCBs=Chlorinated Biphenyls) ، پساب کاغذسازی و نیز پساب کودهای شیمیایی، ترکیبات نفتی ،سطح هورمون‌های گنادوتروپین زیاد می شود. مطالعات بسیار زیادی در این زمینه بر روی ماهیان انجام شده است. مشخص شده که تغییر مقدار تستوسترون، شاخص خوبی برای آلودگی به ترکیبات استروژنیک است.دانشمندان دریافته اند که عوامل فیزیکی دیگری مانند کمبود O2 محلول و نیز میدان مغناطیسی ممکن است موجب آشفتگی در ترشح هورمون‌ها شود. کمبود O2 یا هیپوکسی(Hypoxia) ممکن است سبب آشفتگی های زیادی در ترشح هورمون‌های غدد درون ریز شود. فعالیت های انسانی، مواد آلی، کودهای استفاده شده در کشاورزی و عوامل گندزدا، به کاهش غلظت O2 محلول در رودخانه‌ها و دریاچه ها می انجامد. از طرف دیگر، کمبود O2 به کاهش رشد، کوچک ماندن جثه ماهی و همچنین توقف رشد تولید مثلی آن منجر می شود.آلودگی نفتی در زمینه های مختلف و یا از طرق مختلف به طور مستقیم و غیر مستقیم بر ماهی گیری و شیلات ، لطمه وارد می کند و یا با از بین بردن ماهی ها و یا موجوداتی که ماهی از آنها تغذیه می کند در میزان صید کاهش به وجود می آورد و یا با آلوده کردن محیط زیست یعنیآب دریا ، فعالیت صیادی و ماهی گیری را مشکل و غیر ممکن می سازد. [2]

نتیجه

اندازه گیری های الگوهای ژنتیکی داده‌هایی را فراهم می کنند که از آن‌ها می توان چندین پارامتر ژنتیکی را محاسبه کرد، از جمله بسیاری از شاخص‌های تنوع ژنتیکی، هتروزیگوسیتی، ژن‌ها و فراوانی های آللی، اما آنها پیوند مستقیمی با سندرم‌های ژنوتوکسیک ارائه نمیدهند، مگر اینکه صریحا به قرار گرفتن در معرضآلاینده ها مرتبط باشند. به همین دلیل، مطالعات ژنتیکی باید همراه با اعتبارسنجی قرار گرفتن در معرض کافی، و سایر اقدامات مستقیم تر آسیبی که شواهد حمایتی از تغیرات ژنتیکی را ارائه می دهند، انجام شود هر یک از روی کرد هایی که برای مطالعه اثرات ژنتیکی آلاینده ها در حیوانات در معرض مزرعه استفاده شده است، در نشان دادن اینکه اصولاً تغییر ژنتیکی می تواند رخ دهد موفق بوده است. [6,7,8]

مراجع :

4. P.L. Klerks, J.S. Weis, Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review, Environ. Pollut. 45 (1987) 173–205.

5. J.A. Bishop, L.M. Cook (Eds.), Genetic Consequences of Man Made Change, Academic Press, London, 1981, 409 pp.

6. C.W. Theodorakis, T. Elbl, L.R. Shugart, Genetic ecotoxicology. Part IV. Survival and DNA strand breakage is dependent on genotype in radionuclide-exposed mosquitofish, Aquat. Toxicol. 45 (1999) 279–291.

7. M.E. Roelke, J.S. Martenson, S.J. O'Brien, The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther, Curr. Biol. 3 (1993) 340–350.

8. G.T. Street, G.R. Lotufo, P.A. Montagna, J.W. Fleeger, Reduced genetic diversity in a meiobenthic copepod exposed to a xenobiotic, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 222 (1998) 93–111.

کمپلکسی جدید از Pd(II) با لیگاند مورفولین و بررسی برهمکنش آن با CT-DNA به کمک طیف سنجی جذب الکترونی

سعیده براهویی، خاطره عبدی*، حسن منصوری ترشیزی
گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
k.abdi@chem.usb.ac.ir

چکیده

در این تحقیق، کمپلکسی جدید از پالادیم(II) با فرمول کلی *cis*-[Pd(mor)$_2$Cl$_2$] (که در آن mor لیگاند مورفولین است) تهیه و به‌کمک روش‌های طیف‌سنجی FT-IR، ^{1}H-NMR و UV-Vis شناسایی گردید. برهم‌کنش کمپلکس سنتز شده با DNA غده تیموس گوساله (CT-DNA) به‌وسیله طیف‌سنجی جذب الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه، مقدار ثابت ظاهری پیوند (K_{app}) بین کمپلکس سنتز شده و CT-DNA در دمای ۳۱۰ کلوین معادل ۲/۶ × ۱۰^3 M^{-1} به‌دست آمد. همچنین مقادیر $L_{1/2}$ (غلظتی از کمپلکس که باعث تغییر صورت‌بندی نیمی از DNA موجود در محیط از حالت طبیعی به غیرطبیعی می‌شود) در دمای ۳۱۰ کلوین معادل ۰/۲۵ میلی‌مولار به‌دست آمد. نتایج به دست آمده از طیف سنجی UV-Vis حاکی از بر هم کنش نسبتاً قوی کمپلکس سنتز شده با CT-DNA بوده که پیشنهاد می‌شود به شیوه شیاری انجام می‌شود.

کلمات کلیدی: کمپلکس پالادیم، مورفولین، برهم‌کنش با DNA، طیف سنجی جذب الکترونی

A new Pd(II) complex with morpholine ligand and its interaction with CT-DNA by electronic absorption spectroscopy

ABSTRACT

In this research, a new palladium(II) complex with the general formula of cis-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ (where mor is the morpholine ligand) was prepared. The complex was characterized by FT-IR, UV-Vis and ^{1}H-NMR spectroscopies. The interaction of the synthesized complex with calf thymus DNA (CT-DNA) was studied by electronic absorption spectroscopy. Inn this study, the apparent binding constant (K_{app}) value in the interaction of the studied Pd(II) complex with DNA at 310 K were calculated to be 2.6×10^3 M^{-1}. Furthermore, the value of $L_{1/2}$ (the concentration of the Pd(II) complex at the midpoint transition of CT-DNA from nature to denature) was determined to be 0.25 mM at this temperature. The results obtained from UV-Vis spectroscopy indicate a moderately strong interaction between the Pd(II) complex and CT-DNA, which is probably occur via groove binding.

Keywords: Palladium complex, morpholine, DNA interaction, electronic absorption spectroscopys

۱- مقدمه

سرطان یکی از بزرگترین چالش‌های سلامت بشر بوده و پس از بیماری‌های قلبی-عروقی رتبه دوم علت مرگ و میر را در جهان دارد [۱]. سیس-پلاتین با فرمول شیمیایی *cis*-$[PtCl_2(NH_3)_2]$ اولین داروی فلزی ضدسرطان است که در درمان بالینی چندین تومور مانند سرطان بیضه و تخمدان، مری، روده بزرگ و غیره استفاده شده و هنوز هم استفاده می‌شود. اما عوارض جانبی و مقاومت دارویی از جمله مشکلات درمان سرطان بر پایه کمپلکس‌های پلاتین است. بر این اساس بیوشیمیست‌های معدنی به دنبال طراحی و سنتز داروهایی جدید با خاصیت ضدتوموری بهتر و با سمیت کمتر هستند [۲]. از جمله این داروها، داروهای ضدسرطان بر پایه فلزات مختلف منجمله فلز پالادیم می‌باشد. کمپلکس‌های پالادیم فعالیت ضدتومور بهتری نسبت به سیس-پلاتین دارند. به علت شباهت ترمودینامیکی و ساختاری آشکار بین کمپلکس‌های پلاتین (II) و پالادیم (II) می‌توان مشتقات پالادیم را به عنوان جایگزینی برای ترکیبات پلاتینی مورد بررسی قرار داد. با این حال سرعت تبادل لیگاند برای آن‌ها کاملاً متفاوت است. هیدرولیز کمپلکس‌های پالادیم نسبت به کمپلکس‌های پلاتین، 10^5 برابر سریع‌تر بوده و باعث تفکیک کمپلکس و تشکیل گونه‌های واکنش‌پذیر می‌شود که می‌توانند ترکیبات ضدتوموری فعالی باشند [۳]. هتروسیکل‌های حاوی نیتروژن مانند مورفولین، تیومورفولین و مشتقات آن‌ها در داروسازی و شیمی دارویی استفاده گسترده دارند. مهم‌ترین کاربردهای آن‌ها در سنتز انواع داروها منجمله داروهای آرام‌بخش، تحریک‌کننده‌های تنفسی و عروقی، مواد ضددرد، ضدمالاریا و ضداسپاسم می‌باشد. داروهای حاوی حلقه مورفولین در کاهش چربی خون، قند خون و نیز رفع چاقی نقش دارند. تعدادی از مشتقات مورفولین خواص ضدالتهابی از خود نشان می‌دهند و در بهبود و ترمیم زخم‌ها از آن استفاده می‌شود. این ترکیبات همچنین در به تاخیر انداختن علائم شیمی درمانی مانند حالت تهوع و استفراغ شدید در بیماران مؤثرند [۴،۵].دکستروآمید، یک داروی مسکن و ضددرد قوی حاوی حلقه مورفولین است که سه برابر قوی‌تر از مورفین بوده و زمان عمل آن کوتاه‌تر است [۶]. دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) یکی از مهم‌ترین ماکرومولکول‌های زیستی است.

نقش اصلی DNA ذخیره‌سازی اطلاعات ژنتیکی است که این اطلاعات جهت سنتز پروتئین‌ها در بدن استفاده می‌شود. از آنجایی‌که DNA ماکرومولکول هدف برای بسیاری از داروها و به‌ویژه داروهای ضدسرطان است، لذا بررسی برهم‌کنش بین کاندیداهای دارویی و DNA جهت تعیین مکانیسم اثر آنها از اهمیت فراوانی برخوردار است. بنابراین، در این تحقیق بر آن شدیم تا کمپلکسی جدید بر پایه یون پالادیم (II) با لیگاند مورفولین را طراحی، سنتز و شناسایی کرده و سپس به‌عنوان یک مطالعه بیولوژیکی مقدماتی، برهم-کنش آن با DNA که هدف درون سلولی برای بسیاری از داروهاست را به کمک طیف‌سنجی جذب الکترونی مورد بررسی قرار دهیم.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و دستگاه‌ها

واکنشگرهای مورد استفاده جهت تهیه کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ که عبارتند از پالادیم (II) کلرید، پتاسیم کلرید، پیرولیدین و هیدروکلریک‌اسید با درصد خلوص ۹۹٪ یا بیشتر، از شرکت مرک خریداری شدند. DNA غده تیموس گوساله (CT-DNA) با درجه پلیمریزاسیون بالا از شرکت سیگما- آلدریچ تهیه گردید. بافر تریس، اتیدیم برماید و حلال‌های DMF و دی‌اتیل‌اتر نیز از شرکت مرک خریداری شدند. طیف-های مادون قرمز با استفاده از دستگاه FT-IR شرکت بروکر، در محیط قرص KBr و در محدوده طیفی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ ثبت گردید. برای ثبت طیف ^{1}H-NMR کمپلکس سنتز شده از دستگاه FT-NMR شرکت بروکر مدل Avance 300 MHZ در محدوده ppm ۱۲-۰ در حلال DMSO-d_6 و در حضور TMS به عنوان استاندارد داخلی، استفاده شد. طیف‌های جذب الکترونی توسط دستگاه UV-Vis شرکت PG-Instrument مدل T80 ثبت شدند.

۲-۲- روش سنتز کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$

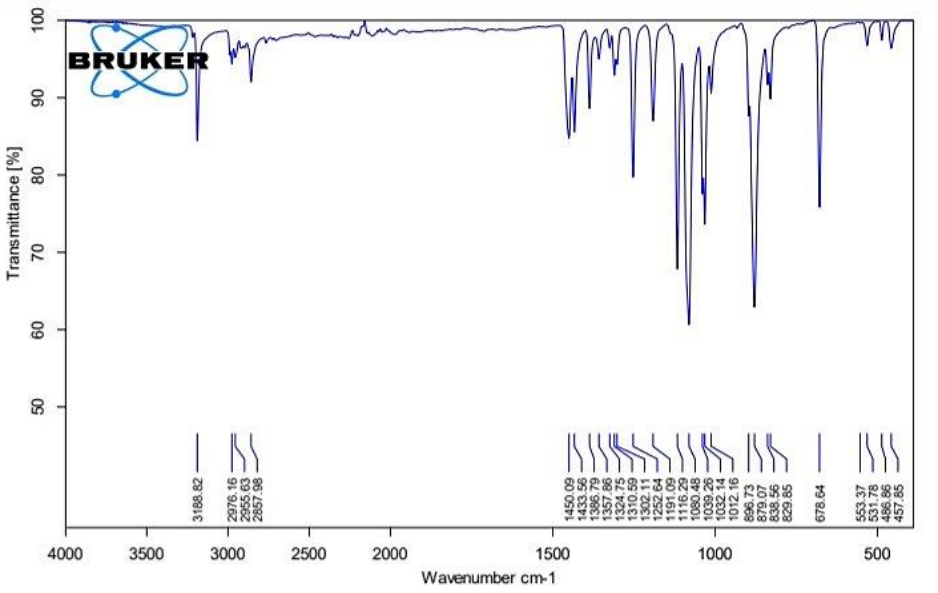
ابتدا در یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری، مقدار ۱/۵۰۰۰ گرم (معادل ۲۰ میلی‌مول) پتاسیم کلرید و ۰/۷۱۰۰ گرم (معادل ۴ میلی‌مول) پالادیم (II) کلرید به ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. این مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۷۰-۶۵ درجه سلسیوس هم‌زده شد و پس از سرد شدن، صاف شد. زیر صافی، محلول قهوه‌ای رنگ شفافی بود که در واقع محلول K_2PdCl_4 است [۷]. در بشری جداگانه، مقدار ۱میلی‌لیتر از مورفولین در۲۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. pH محلول با استفاده از محلول هیدروکلریک اسید یک مولار بر روی ۶ تنظیم شد. این محلول به‌آرامی به محلول $K_2[PdCl_4]$ که در حال هم خوردن است، اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد. در ظرفی جداگانه مجدداً مقدار ۱ میلی‌لیتر مورفولین در ۲۰میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل و به مخلوط واکنش درحال هم خوردن اضافه شد. سپس pH مخلوط توسط هیدروکلریک اسید یک مولار بادقت بر روی ۶ تنظیم شد. در این مرحله، رسوب‌های زرد رنگی مشاهده شد. مخلوط واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای محیط هم زده شد و سپس رسوب‌ها را صاف کرده و با آب دوبار تقطیر و اتانول سرد شستشو داده شد. رسوب حاصل در آون با دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک شد. وزن محصول ۱/۰۲۶۶ گرم، راندمان ۷۳٪ درصد و نقطه تجزیه ۲۴۰ درجه سلسیوس به دست آمد[۸].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- طیف مادون قرمز (IR)

طیف مادون قرمز کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ در محدوده طیفی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ ثبت شد (شکل ۱). نوار ظاهر شده در محدوده cm^{-1} ۳۱۸۸ مربوط به ارتعاش کششی پیوند N–H است. این ارتعاش در لیگاند آزاد در محدوده cm^{-1} ۳۳۲۵ ظاهر شده است. این نوار جابه‌جایی قابل توجهی را در کمپلکس نشان می‌دهد که نشان از کوئوردینه شدن اتم نیتروژن به یون پالادیم (II) است [۹].در کمپلکس سنتز شده، فرکانس کششی گروه C–H آلیفاتیک در محدوده cm^{-1} ۲۸۵۸-۲۹۷۶ ظاهر شده است. این ارتعاش در

لیگاند آزاد مورفولین در محدوده cm^{-1} ۲۷۵۱-۲۹۴۳ ظاهر شده است. این ارتعاش نسبت به لیگاند آزاد اندکی جابجا شده است که علت آن دور بودن از مرکز کوئوردیناسیون است. نوار ظاهر شده در محدوده cm^{-1} ۴۵۸ مربوط به ارتعاش کششی پیوند Pd–N است. بنابراین، مشاهده این نوار، کوئوردینه شدن اتم نیتروژن لیگاند مورفولین به یون پالادیم (II) را تایید می‌کند [۱۰].

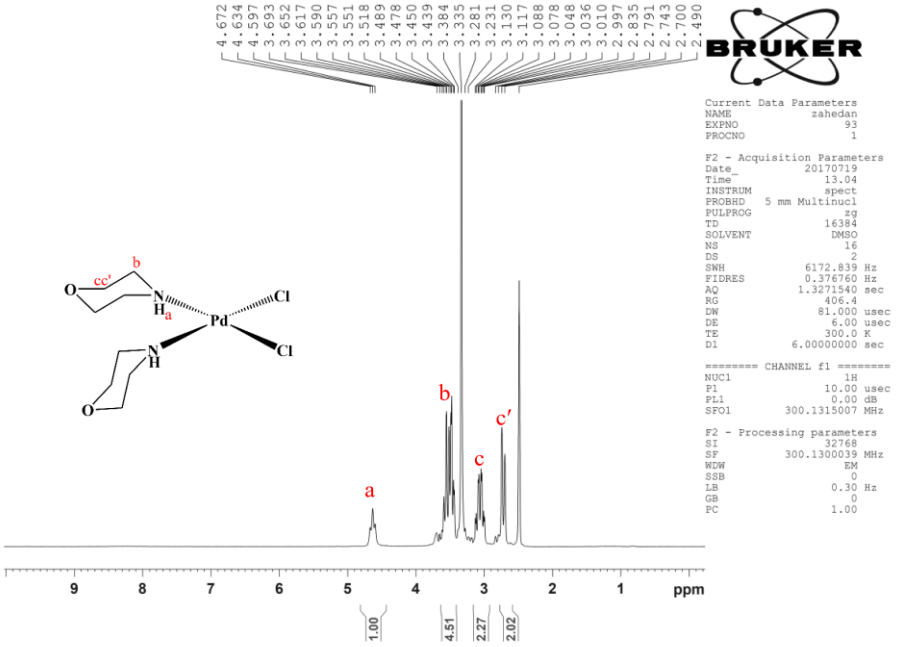


شکل ۱. طیف FT-IR کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$

۲-۳- طیف ^{1}H-NMR

طیف ^{1}H-NMR کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ در حلال DMSO-d_6 ثبت شد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل زیر مشاهده می‌شود در طیف ^{1}H-NMR کمپلکس $[Pd(mor)_2Cl_2]$ چهار مجموعه سیگنال ظاهر شده است. سیگنال‌های سه تایی پهن مشاهده شده در ناحیه ppm ۴/۶۰–۴/۶۷ به پروتون آمین لیگاندهای مورفولین نسبت داده می‌شود. این پروتون در لیگاند آزاد در ناحیه ppm ۲/۵۹ ظاهر شده است. بنابراین این پروتون در کمپلکس به مقدار چشمگیر ppm ۲/۰۴ نسبت به لیگاند آزاد به طرف میدان ضعیف جابه‌جا شده است که کوئوردینه شدن لیگاند از طریق نیتروژن را تایید می‌کند. این افزایش در جابجایی شیمیایی، به‌دلیل به اشتراک گذاشته شدن زوج الکترون غیرپیوندی نیتروژن با مرکز پالادیم (II) بوده که منجر به ناپوشیده

شدن پروتون‌های متصل به نیتروژن می‌گردد. مجموعه سیگنال‌های ظاهر شده در محدوده ppm ۳/۴۴–۳/۶۲ به پروتون‌های b نسبت داده می‌شود. دو مجموعه سیگنال مشاهده شده در محدوده‌های ppm ۳/۴۴–۳/۶۲ و ppm ۲/۷۰–۲/۷۴ به پروتون‌های c و c′ نسبت داده می‌شوند. این پروتونها به دلیل جهت-گیری فضایی متفاوت در جابه‌جایی‌های شیمیایی متفاوتی ظاهر شده‌اند. علت پوشیده‌تر بودن این پروتون‌ها نسبت به پروتون‌های a و b دورتر بودن آنها از مرکز کوئوردیناسیون است.



شکل۲. طیف ^{1}H-NMR کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$

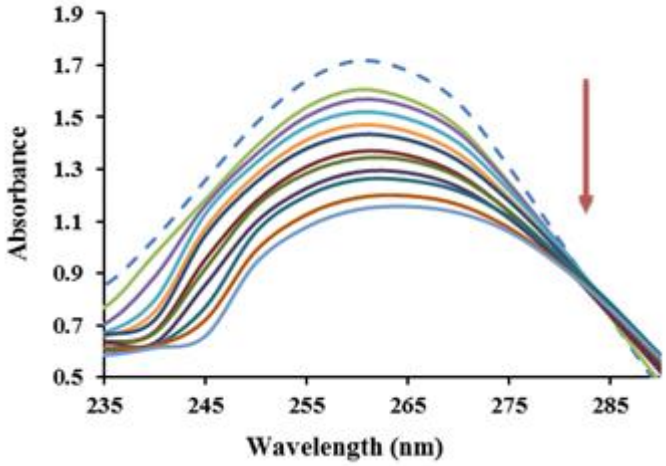
۳-۳- طیف جذب الکترونی

طیف جذب الکترونی کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ در حلال DMF ثبت شد. این کمپلکس در ناحیه UV یک نوار جذبی پرشدت در ۲۶۸ nm با ضریب جذب مولی ۱۲۴۰۵ $M^{-1}cm^{-1}$ نشان می‌دهد. این نوار به انتقال درون لیگاندی $n\rightarrow\sigma^*$ لیگاند مورفولین نسبت داده می‌شود. همچنین در طیف جذبی این کمپلکس، دو نوار جذبی پهن و کم‌شدت در حدود ۳۳۷ و ۴۰۸ nm به ترتیب با ضرایب جذب مولی ۷۰۲ و $M^{-1}cm^{-1}$

۳۲۳ مشاهده می‌شود که به صورت شانه ظاهر شده‌اند. این نوارها به انتقالات میدان لیگاند (انتقالات $d \rightarrow d$) یون Pd (II) نسبت داده می‌شود. بر طبق الگوی شکافتگی اوربیتال‌های d در میدان مربع مسطح، انتظار می‌رود که در کمپلکس‌های d^8 با ساختار مربع مسطح سه انتقال $d \rightarrow d$ ظاهر شود. احتمال می‌رود در طیف کمپلکس مورد مطالعه، نوار سوم در همپوشانی با دو نوار دیگر باشد [۱۱].

۴-۳- مطالعه برهم‌کنش کمپلکس *cis*-$[Pd(pyrr)_2Cl_2]$ با CT-DNA به کمک طیف‌سنجی جذب الکترونی

در آزمایش بررسی برهم‌کنش کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ با CT-DNA در دمای ۳۱۰ کلوین، بعد از هر بار تزریق محلول کمپلکس به محلول DNA، حداکثر جذب DNA کاهش یافت (شکل ۳ **Error! Reference source not found.**)، به عبارت دیگر پدیده هیپوکرومیک اتفاق می‌افتد. بررسی منابع نشان می‌دهد اگر کمپلکس فلزی به صورتی با DNA برهم‌کنش کند که ساختار DNA دو رشته‌ای از هم باز شده و بازهای پورینی و پیریمیدینی بیشتر در معرض نور UV قرار گیرند یا به بیان دیگر پدیده تاگشایی در کنفورماسیون DNA رخ دهد، حداکثر جذب DNA تغییر کرده و افزایش شدت جذب از خود نشان می‌دهد. اما اگر کمپلکس فلزی به صورتی با DNA برهم‌کنش کند که ساختار DNA بیشتر در هم بپیچد، بازهای پورینی و پیریمیدینی کمتر در معرض نور UV قرار می‌گیرند و حداکثر جذب DNA کاهش می‌یابد [۱۲].

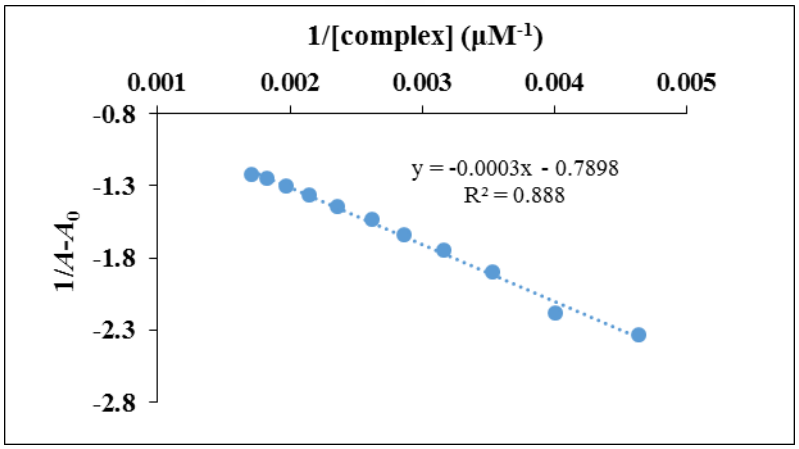


شکل ۳. طیف جذب الکترونی حاصل از تیتراسیون DNA با کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ در دو دمای ۳۱۰ کلوین.

با استفاده از معادله زیر داده های تیتراسیون UV آنالیز شدند:

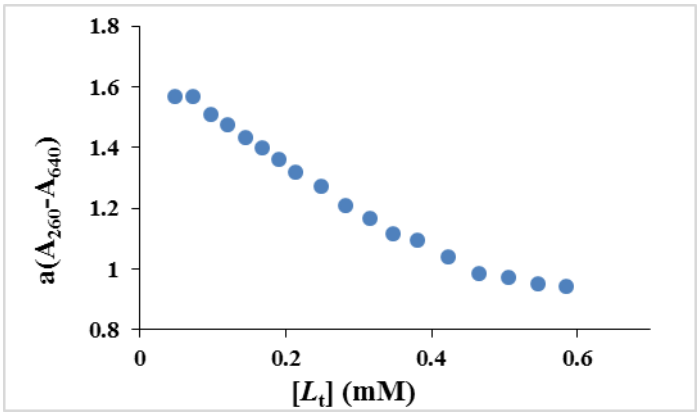
$$1/(A-A_0) = 1/(A_\infty-A_0)+1/K_{app}[A_\infty-A_0]\cdot 1/[\text{metal complex}]$$

در این معادله ، A_0، A وA_∞ به ترتیب عبارتند از بیشینه جذب DNA در ۲۶۰ نانومتر در غیاب کمپلکس، جذب DNA در ۲۶۰ نانومتر در حضور کمپلکس پس از هربار تیتراسیون و جذب نهایی DNA در ۲۶۰ نانومتر در آخرین نقطه تیتراسیون. با رسم نمودار $1/A-A_0$ بر حسب 1/[complex] که در شکل ۴ مشاهده می‌شود و بر اساس معادله خط به‌دست آمده، مقادیر K_{app} در برهم‌کنش بین کمپلکس سنتز شده و CT-DNA محاسبه شد که برابر $۲/۶ \times ۱۰^{۳}$ M^{-1} است. مقدار K_{app} معیاری از میزان برهم‌کنش کمپلکس با DNA است. در این بررسی با توجه به مقادیر K_{app} به دست آمده می توان گفت که کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ برهم‌کنش مناسبی با CT-DNA دارد و پیشنهاد می‌شود برهم‌کنش این کمپلکس از نوع غیراینترکلیشن و شیاری است [۸].



شکل ۳. نمودار $1/A–A_0$ بر حسب $1/[complex]$ جهت محاسبه K_{app} در برهم‌کنش کمپلکس cis-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ با CT-DNA در ۳۱۰ کلوین.

پارامتر $L_{1/2}$ غلظتی از کمپلکس در نقطه میانی تغییر DNA از صورت‌بندی طبیعی به غیرطبیعی می‌باشد. با استفاده از داده‌های حاصل از تیتراسیون UV در بررسی برهم‌کنش کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ با CT-DNA و با رسم نمودار $a(A_{260}-A_{640})$ برحسب $[L_t]$، در دمای ۳۱۰ کلوین نمودار سیگموئیدی کاهشی به دست آمد که در شکل ۴ شان داده شده است. با توجه به این نمودار مقدار $L_{1/2}$ تعیین شد که معادل ۰/۲۵ میلی‌مولار می‌باشد.



شکل ۴. نمودار $L_{1/2}$ کمپلکس *cis*-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ در برهم‌کنش باCT-DNA در دمای ۳۱۰ کلوین.

۴- نتیجه‌گیری

کمپلکس جدید پالادیم (II) با لیگاند مورفولین با فرمول cis-$[Pd(mor)_2Cl_2]$ سنتز و به‌کمک روش‌های طیف‌سنجی FT-IR، UV-Visible و ^{1}H-NMR شناسایی شد. در راستای اهداف این پایان‌نامه، به عنوان یک مطالعه مقدماتی اما کلیدی، برهم‌کنش کمپلکس سنتز شده با CT-DNA مورد بررسی قرار گرفته شد. این بررسی به‌کمک روش طیف‌سنجی جذب الکترونی انجام شد. نتایج تیتراسیون جذب الکترونی CT-DNA با کمپلکس Pd(II) نشان می‌دهد که بیشینه جذب DNA در حضور غلظت‌های افزایشی از کمپلکس کاهش می‌یابد که حاکی از وقوع نوعی برهم‌کنش بین کمپلکس و DNA است که منجر به تغییر در کنفورماسیون DNA می‌شود. با توجه به یافته‌های تیتراسیون جذب الکترونی، پارامترهای K_{app} و $L_{1/2}$ در دمای ۳۱۰ کلوین محاسبه شد. مقادیر به‌دست آمده برای این پارامترها بیانگر برهم‌کنش نسبتاً قوی کمپلکس با CT-DNA است که احتمالاً به شیوه شیاری انجام می‌شود.

قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه سیستان و بلوچستان به خاطر پشتیبانی مالی، مساعدت و همکاری های لازم سپاسگزاری می‌کنند.

مراجع

[1] David, A.R. and Zimmerman, M.R. (2010). “Cancer: an old disease, a new disease or something in between?” in: Nature Reviews Cancer, pp. 728–733.

[2] Caires, A.C.F. (2007). “Recent advances involving palladium (ii) complexes for the cancer therapy.” Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 7(5), 484–491.

[3] Iavicoli, I., Fontana, L., and Bergamaschi, A. (2011). “Palladium: exposure, uses, and human health effects.”

[4] Yar, M., McGarrigle, E.M., and Aggarwal, V.K. (2008). “An annulation reaction for the synthesis of morpholines, thiomorpholines, and piperazines from β-heteroatom amino compounds and vinyl sulfonium salts.” Angewandte Chemie. 120(20), 3844–3846.

[5] Lanman, B.A. and Myers, A.G. (2004). “Efficient, stereoselective synthesis of trans-2, 5-disubstituted morpholines.” Organic Letters. 6(6), 1045–1047.

[6] Baran, Y., Ozay, H., Esener, H., and Turkyilmaz, M. (2011). “Spectroscopic and structural properties of n-(acetamide) morpholinium bromide.” Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 81(1), 99–103.

[7] Dustkami, M. and Mansouri-Torshizi, H. (2017). “Refolding and unfolding of ct-dna by newly designed pd(ii) complexes. their synthesis, characterization and antitumor effects.” International Journal of Biological Macromolecules. 99(Ii), 319–334.

[8] Mohammadlou, F., Mansouri-Torshizi, H., and Abdi, K. (2021). “Interaction of bis (alkylamine) dichloropalladium (ii) complexes with ct-dna and bsa; their synthesis, characterization, antitumor, and antibacterial evaluations.” Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 39(4), 1354–1372.

[9] Khan, S.R.A., Guzman-Jimenez, I., Whitmire, K.H., and Khokhar, A.R. (2000). “Synthesis and characterization of piperidine platinum (ii) complexes with dicarboxylates: crystal and molecular structure of cis-[pt (piperidine) 2cl2]• h2o.” Polyhedron. 19(8), 975–981.

[10] Nakamoto, K. (2009). Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds, part b: applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry. John Wiley & Sons, .

[11] Lever, A.B.P. (1984). Inorganic electronic spectroscopy. second ed. Elsevier, Amsterdam.

[12] Zeglis, B.M., Pierre, V.C., and Barton, J.K. (2007). “Metallo-intercalators and metallo-insertors.” Chemical Communications. (44), 4565–4579.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

نقش ویروس‌های آنکوژنیک در تومورهای سرطانی: مکانیسم‌های ژنتیکی و مولکولی در تغییرات سلولی

امیرحسین قاسمی شوراب[1]، عارف ملایی قاسمی[1]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: AMIR.SGH.1380@GMAIL.COM

چکیده:

عفونت با ویروس‌های سرطان‌زای انسانی عامل تقریباً ۱۰,۸ درصد سرطان‌های انسان در سراسر جهان است. این ویروس‌ها با ایجاد جهش و تغییر در این ژن‌ها که منجر به ایجاد اختلال در عملکرد این ژن‌ها می‌شوند که نتیجه آن عدم کنترل در آپاپتوز و تقسیم سلولی است.این ویروس‌های ایجادکننده تومور انسانی، انکوژن‌های ویروسی یا ژن‌های دارای فعالیت انکوژنی را رمزگذاری می‌کنند و از یک ماشین سلولی برای بیان آنها و تبدیل سلول‌های میزبان استفاده می‌کنند. یکی از مراحل ضروری برای بیان یک انکوژن ویروسی، پیرایش RNA است که تقریباً برای همه ویروس‌های تومور برای تنوع رونوشت‌هایشان در طول عفونت ویروسی و انکوژنز مورد نیاز است. این بررسی پیشرفت‌های اخیر در درک انکوژن‌های ویروسی انسانی و اهمیت پیوند RNA برای بیان آنها را برجسته می‌کند. در این مقاله مروری، نقش ویروس‌های آنکوژنیک در تومورهای سرطانی مورد بررسی قرار می‌گیرد. ویروس‌های آنکوژنیک با ایجاد تغییرات ژنتیکی و مولکولی در سلول‌های میزبان، به تشکیل سرطان و تومورهای بدخیم کمک می‌کنند. در این مرور، عواملی که در تغییرات سلولی ناشی از ویروس‌های آنکوژنیک نقش دارند، به تفصیل بررسی خواهند شد.

کلیدواژه‌ها:انکوژنیک ویروس- انکوژن - ویروس هپاتیت - ویروس پاپیلومای انسانی - ویروس اپشتین بار- فرایندDDR – تشخیص عفونت

The role of oncogenic viruses in cancer tumors: genetic and molecular mechanisms in cellular changes

*Amirhossein Ghasemy Shorub, Aref Mollaei Ghasemy

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan

E-mail of the responsible auther: amir.sgh.1380@gmail.com

Abstract:

Approximately 10.8% of human cancers are associated with infection by an oncogenic virus. An oncovirus or oncogenic virus is a virus that can cause cancer. These viruses include human papillomavirus (HPV), Epstein–Barr virus (EBV), Merkel cell polyomavirus (MCV), human T-cell leukemia virus 1 (HTLV-1), Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV).

These tumor-inducing human viruses encode viral oncogenes or genes with oncogenic activities and utilize cellular machinery for their expression and the transformation of host cells. One of the indispensable steps for viral oncogene expression is RNA splicing, which is essential for almost all tumor viruses to diversify their transcriptomes during virus infection and oncogenesis. This review will highlight the recent advances in understanding of human viral oncogenes and the importance of RNA splicing in their expression.

Keywords: oncogenic virus, Oncogene, Hepatitis virus - human papilloma virus - Epstein-Barr virus - DDR process - diagnosis of infection

مقدمه:

عفونت با ویروس‌های سرطان‌زای انسانی عامل تقریباً ۱۰,۸ درصد سرطان‌های انسان در سراسر جهان است [1]. اولین ویروس انکوژن شناسایی شده، ویروس سارکوم روس، توسط پیتون روس در سال ۱۹۱۱ کشف شد.[2] انکوویروس یا ویروس انکوژنیک ویروسی است که می تواند باعث سرطان شود.

انکوژن‌ها پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که تکثیر سلولی، آپوپتوز یا هر دو را کنترل می‌کنند. آنها می‌توانند با تغییرات ساختاری ناشی از جهش یا همجوشی ژن فعال شوند [۳]. این ویروس‌ها با ایجاد جهش و تغییر در این ژن‌ها که منجر به ایجاد اختلال در عملکرد این ژن‌ها می‌شوند که نتیجه آن عدم کنترل در آپاپتوز و تقسیم سلولی است. هنگامی که مکانیسم‌های کنترل رشد سلولی طبیعی مختل می‌شوند، برخی از سلول‌ها ممکن است تکثیر کنترل نشده‌ای نشان دهند و از انجام عملکردهای خاص بافتی خود دست بردارند که منجر به ایجاد سرطان می‌شود. تصور می‌شود که عفونت توسط ویروس‌های انکوژن عامل ۱۵ تا ۲۰ درصد از سرطان‌های انسانی است [۴].

درک جامع از اصول انکوژنز ویروسی ممکن است شناسایی علل عفونی ناشناخته سرطان و توسعه استراتژی‌های درمانی یا پیشگیرانه برای سرطان‌های مرتبط با ویروس را امکان‌پذیر کند[۵]

ویروس‌های آنکوژنیک شناخته شده:

ویروس‌ها پاپیلومای انسانی

HPVها گروهی از ویروس‌های DNA بدون پوشش و دو رشته‌ای هستند که عمدتاً سلول‌های لایه بازال پوست و بافت‌های مخاطی را عمدتاً از طریق میکرو تروما یا تماس نزدیک آلوده می‌کنند. بیش از ۱۸۰ ژنوتیپ HPV گزارش شده است.HPV های مرتبط با سرطان، HPVهای پرخطر هستند و آن‌هایی که با زگیل‌های خوش‌خیم آنوژنیتال یا پوستی مرتبط هستند، HPVهای کم‌خطر هستند.[۶, ۷] تا به امروز، بیش از ۹۵ درصد سرطان‌های دهانه رحم، ۵۰ تا ۹۰ درصد سایر سرطان‌های آلت تناسلی و ۲۰ تا ۳۰ درصد سرطان‌های دهان و حلق با عفونت پایدار و ادغام ژنومی HPV پرخطر مرتبط هستند.[8,9,10]

ویروس‌های اپشتین بار

EBV یک ویروس γ-هرپس انسانی است که بیشتر به‌عنوان عامل مونونوکلئوز عفونی شناخته می‌شود ۱۱، اما با لنفوم بورکیت، کارسینوم نازوفارنکس آسیای جنوب شرقی، لوسمی سلولی کشنده طبیعی (NK)، لنفوم سلول NK-T خارج گره و لنفوم هوچکین همراه است و لنفوم‌های غیر هوچکین که حدود ۱٪ از سرطان‌های انسان را در سراسر جهان تشکیل می‌دهند.[11,12]

در بیشتر موارد، EBV بر لنفوسیت‌های B تأثیر می‌گذارد. پس از عفونت با EBV، لنفوسیت‌های B به لنفوبلاست تبدیل شده و جاودانه می‌شوند. به‌ندرت، EBV نیز با آلوده‌کردن سلول‌های T و سلول‌های NK باعث بدخیمی می‌شود.[۱۴, ۱۵ ,۱۶]

ویروس هپاتیت B

بیش از ۵۰ درصد موارد سرطان کبد در سراسر جهان با عفونت HBV مرتبط است. HBV یک ویروس حاوی DNA است که ژنوم DNA نیم‌دایره‌ای دو رشته‌ای آن ~۳,۲ kbp است. پوشیده از یک هسته نوکلئوکپسید و یک غشای لیپیدی خارجی. پوشش HBV از پروتئین‌های پوششی کوچک (S)، متوسط (M) و بزرگ (L) تشکیل شده است که پروتئین‌های گذرنده متعددی هستند که دامنه C ترمینال یکسانی (مطابق با پروتئین S) را به اشتراک می‌گذارند؛ اما دامنه‌های N ترمینال متفاوتی دارند. تداوم عفونت مزمن HBV برای چندین دهه با سیروز کبدی و ایجاد کارسینوم کبدی (HCC) مرتبط است. اگرچه عفونت HBV در سراسر جهان گسترده است، عفونت مزمن HBV در شرق آسیا از طریق انتقال پری ناتال و در آفریقا از طریق عفونت دوران کودکی شایع است.[17 ,18, 19]

ویروس هپاتیت C

عفونت مزمن ویروس هپاتیت C (HCV) یکی از علل اصلی بیماری مزمن کبد در سراسر جهان است [۲۰] تخمین زده می‌شود که ۸۰ تا ۱۶۰ میلیون نفر در سراسر جهان به طور مزمن به HCV مبتلا هستند. [۲۱]پیگیری طولانی‌مدت HCV مزمن بسیار متغیر است که از تغییرات بافتی تا فیبروز گسترده با سیروز یا بدون سیروز را شامل می‌شود.

مسیرهای سلولی انکوویروس ها:

استفاده از سیستم پاسخ به dna آسیب‌دیده در میزبان:

سیستم پاسخ آسیب DNA میزبان (DDR) شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای سیگنالینگ است که به طور جمعی آسیب DNA ناشی از تکثیر DNA، متابولیسم سلولی و آسیب‌های برون‌زا مانند تشعشع و عفونت ویروسی را نظارت و ترمیم می‌کند.[۲۲] ویروس‌ها اغلب باعث ایجاد DDRهای میزبان می‌شوند. بااین‌حال، آنها مکانیسم‌هایی را برای تضعیف این واکنش‌ها و دستکاری آنها به نفع خود توسعه داده‌اند. [۲۳, ۲۴]

در فرآیند فعال‌سازی مکانیسم DDR، برخی از ویروس‌ها محیط سلولی را برای تکثیر خود بهینه می‌کنند و انتقال به فاز S را ارتقا می‌دهند و آپوپتوز را مهار می‌کنند.[۲۵, ۲۶] علاوه بر این، ویروس‌های DNA مانند HPV و MCPyV فاکتورهای DDR مرتبط با ATM و ATR را فعال می‌کنند و آنها را به کانون‌های تکثیر DNA ویروسی جذب می‌کنند و همانندسازی DNA ویروسی را تقویت می‌کنند.[۲۷, ۲۸, ۲۹]

دخالت مداوم فاکتورهای DDR و ایجاد حالت همانندسازی توسط ویروس‌های انکوژن منجر به بی‌ثباتی ژنوم می‌شود. به طور معمول، عفونت ویروسی انکوژن، سرعت شکستن DNA را هنگامی که فاکتورهای میزبان که یکپارچگی ژنوم را حفظ می‌کنند کاهش می‌یابد، افزایش می‌دهد.[۳۰]

اختلال در ادراک، سیگنال‌دهی یا ترمیم DNA آسیب‌دیده می‌تواند به سلول‌ها اجازه دهد تا جهش‌هایی را به دست آورند که بر موانع سرکوبگر تومور در طول پیشرفت انکوژن غلبه کنند.[۳۱]

دستکاری پاسخ‌های ایمنی میزبان:

ویروس‌های انکوژنیک در طول عفونت‌های پایدار با سیستم ایمنی میزبان تعامل دارند. شواهد اپیدمیولوژیک نان می‌دهد که مکانیسم‌های فرار شناسایی و حذف آنها با فشار ثابت میزبان سازگار است [۳۲, ۳۳, ۳۴]

به طور معمول، ویروس‌ها برای فرار از محدودیت‌های داخلی، اجتناب از پاسخ‌های التهابی و جلوگیری از کشتن هدفمند سلول‌های میزبان خود تکامل می‌یابند [۳۵]

استراتژی‌های منحصربه‌فرد فرار ایمنی برای مراحل مختلف مانند مراحل نهفته و لیتیک چرخه زندگی ویروس استفاده می‌شود. شواهد نوظهور نشان می‌دهد که براندازی ویروسی سیستم ایمنی، توسعه سرطان را

تقویت می‌کند، زیرا همان تاکتیک‌های تعدیل‌کننده ایمنی برای فرار از تشخیص یا افزایش تعداد ویروس‌ها نیز ممکن است از نظارت کافی بر سلول‌های تبدیل شده جلوگیری کند یا تکثیر سلولی را افزایش دهد.

برای شروع پاسخ به عفونت یا سلول‌های نابجا، میزبان ابتدا باید چیزی غیرمعمول برای عملکرد سلولی سالم را حس کند.DNA سیتوزولی یک سیگنال خطر برای سلول است، چه به‌صورت درون‌زا یا به دلیل یک ویروس DNA مهاجم رخ دهد. ازآنجایی‌که DNA معمولاً در هسته و میتوکندری تکه‌تکه می‌شود، ازدست‌دادن یکپارچگی اندامک یا ژنوم، یا وجود DNA خارجی، سیگنال ایده‌آلی برای تحریک پاسخ ایمنی است.

سیکلیک GMP-AMP سنتاز (cGAS) یک سنسور DNA سیتوزولی است که یک دی نوکلئوتید حلقوی (حلقه‌ای (GMP-AMP (cGAMP) را پس از اتصال به DNA دوبلکس سنتز می‌کند. cGAMP، علاوه بر پیام‌رسان‌های دوم آزاد شده توسط باکتری‌های داخل سلولی، یک پروتئین محرک ساکن ژن‌های اینترفرون شبکه آندوپلاسمی (STING) را فعال می‌کند.STING و مبدل سیگنال ژانوس کیناز (JAK) و فعال‌کننده سیگنال رونویسی (STAT) برنامه‌های ضدویروسی وابسته به اینترفرون را فعال می‌کنند.[36]

ویروس‌های DNA انکوژنیک مسیر cGAS-STING را خنثی می‌کنند تا از محدودیت ناشی از اینترفرون جلوگیری کنند . KSHV چندین اثرگذاری را ایجاد کرده است که این مسیر را مهار می‌کنند، از جمله: ORF52، LANA، و فاکتور تنظیم‌کننده اینترفرون ویروسی . [۳۸, ۳۷]

ORF52 به طور مستقیم به cGAS متصل می‌شود و فعالیت آنزیمی آن را مهار می‌کند.[۳۹] LANA ، به‌ویژه ایزوفرم سیتوپلاسمی آن، مستقیماً به cGAS متصل می‌شود و با فعال‌شدن اجزای پایین‌دست آن مقابله می‌کند.[۴۰]

vIRF1 تعامل بین STING و پروتئین سرین/ترئونین بالادست TBK1 را مسدود می‌کند، در نتیجه از فسفوریلاسیون STING و فعال‌شدن سیگنال‌دهی پایین‌دست جلوگیری می‌کند. [۴۱]

مهار cGAS-STING توسط این انکوپروتئین‌های KSHV نه‌تنها به ایجاد یک عفونت نهفته، بلکه به فعال‌شدن مجدد از یک عفونت نهفته نیز کمک می‌کند.[۴۲, ۴۳] که هم برای انتشار ویروس عفونی و هم برای تقویت رشد تومور حیاتی است[44]

روش های مختلفی برای تشخیص عفونت با انکوویروس ها وجود دارد. در اینجا برخی از روش های ذکر شده در نتایج جستجو آمده است:

۱.حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی: استراتژی‌های حسگر الکتروشیمیایی مانند حسگرهای ژنی، سنجش‌های تشخیص مبتنی بر CRISPR، حسگرهای زیستی مبتنی بر آپتامر و حسگرهای ایمنی برای شناسایی انکوویروس‌ها استفاده می‌شوند.[45]

۲.سرودیاگنوز: تشخیص سروی شامل تشخیص آنتی بادی های خاص ویروس در خون است.[46]

۳. کشت سلولی: رشد ویروس در کشت سلولی از نمونه بیمار می تواند عفونت های ویروسی را تایید و بررسی کند.[47]

۴. تشخیص آنتی ژن: تشخیص آنتی ژن های ویروسی را می توان با استفاده از الایزا در بافت ها و مایعات انجام داد.[47]

۵.تشخیص اسید نوکلئیک: واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) می تواند برای تشخیص عفونت با شناسایی اسید نوکلئیک ویروس استفاده شود.[46]

۶. مشاهده ذرات ویروسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی: این روش شامل مشاهده ذرات ویروس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی است.[47]

۷. علائم: در برخی موارد، علائم ممکن است نشان دهنده عفونت انکوویروس باشد. [48]توجه به این نکته ضروری است که نتیجه آزمایش منفی لزوماً عفونت را رد نمی کند.[49]

روش‌های پیشگیری و درمان:

۱.واکسن‌های پیشگیری از عفونت با ویروس‌های آنکوژنیک

۲.شناسایی عامل ویروسی سرطان فرصتی عالی برای پیشگیری از سرطان با پیشگیری یا درمان عفونت ویروسی زمینه‌ای فراهم می‌کند.

۳.واکسن‌های انکوویروس یک استراتژی مداخله‌ای با شانس معقول برای دستیابی به جمعیت‌های محروم از نظر اقتصادی که در آن سرطان‌های مرتبط با بیماری‌های عفونی شایع‌تر هستند، نشان می‌دهند. ازآنجایی‌که

سرطان‌های ناشی از انکوویروس‌ها معمولاً سال‌ها طول می‌کشد تا ایجاد شوند، درصورتی‌که انکوویروس در مدت کوتاهی پس از عفونت باعث ایجاد بیماری‌های غیر سرطانی قابل‌توجهی نیز شود، انگیزه ساخت واکسن پیشگیرانه بیشتر خواهد بود.

معرفی گسترده واکسن HBV پیشگیرانه در نوزادان منجر به کاهش قابل‌توجهی در بروز بیماری مزمن کبدی و HCC شده است.در کارآزمایی‌های بالینی، واکسن‌های پیشگیری‌کننده HPV که اخیراً معرفی شده‌اند، در پیشگیری از عفونت‌های پایدار و نئوپلازی‌های پیش سرطانی ناشی از انواع HPV هدف‌گیری شده توسط واکسن‌ها مؤثر بوده‌اند.تلاش‌ها برای تولید و آزمایش واکسن علیه HCV و EBV در حال انجام است. واکسن‌های مؤثر احتمالاً محصولات تجاری قابل‌دوام هستند.

تلاش‌ها برای تولید واکسن‌های KSHV اندک بوده است، تا حدی به این دلیل که درمان‌های مؤثر HIV باعث کاهش بروز سرطان‌های مرتبط با KSHV در کشورهای توسعه‌یافته شده است.

سرمایه‌گذاری نسبتاً کمی در واکسن‌های HTLV پیشگیرانه انجام شده است؛ زیرا عفونت اولیه HTLV بدون علامت است و سرطان‌های ناشی از آن نسبتاً نادر هستند.[50]

نتیجه گیری:

در این متن با موضوع ویروس‌های آنکوژنیک و تأثیر آن‌ها بر سلول‌ها و تومورهای سرطانی، عوامل مؤثر بر تغییرات ژنتیکی و مولکولی سلول‌های میزبان ،روش تشخیص عفونت این ویروس ها و واکسن‌های پیشگیری‌کننده مورد بررسی قرار گرفت. این ویروس‌های ایجادکننده تومور انسانی، انکوژن‌های ویروسی یا ژن‌های دارای فعالیت انکوژنی را رمزگذاری می‌کنند و از یک ماشین سلولی برای بیان آنها و تبدیل سلول‌های میزبان استفاده می‌کنند. یکی از مراحل ضروری برای بیان یک انکوژن ویروسی، پیرایش RNA است که تقریباً برای همه ویروس‌های تومور برای تنوع رونوشت‌هایشان در طول عفونت ویروسی و انکوژنز مورد نیاز است. با بررسی این مکانیسم‌ها و تحقیق بیشتر در این حوزه، می‌توان روش‌های پیشگیری و درمان سرطان‌های ناشی از ویروس‌های آنکوژنیک را بهبود بخشید.

منابع:

1. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S *et al*.Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. Lancet Oncol2012;13: 607–615. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]
2. Rous P.A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J Exp Med1911;13: 397–411. [Crossref], [Google Scholar]
3. Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. Science 1985;229:1390-1393
4. zur Hausen H & de Villiers EM Cancer "causation" by infections — individual contributions and synergistic networks. *Semin. Oncol* 41, 860–875 (2014). [PubMed] [Google Scholar]
5. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6336458/#R1:~:text=Viral%20infection%20is,development%20of%20cancer.
6. Howley PM, Lowy DR.Papillomaviruses.In: Knipe DM, Howley PM (ed.) Fields virology.5th ed.Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2299–2354. [Google Scholar]
7. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM *et al*.Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol1999;189: 12–19. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM *et al*.Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol1999;189: 12–19. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]
9. Forman D, de Martel C, Lacey CJ *et al*.Global burden of human papillomavirus and related diseases. Vaccine2012;30: F12–F23. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]
10. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S *et al*.Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med2003;348: 518–527. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]
11. Henle W, Henle G.Epidemiologic aspects of Epstein–Barr virus (EBV)-associated diseases. Ann NY Acad Sci1980;354: 326–331. [Crossref], [Google Scholar]
12. Cesarman E.Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. Annu Rev Pathol2014;9: 349–372. [Crossref], [Google Scholar]
13. Young LS, Rickinson AB.Epstein–Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cancer2004;4: 757–768. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]
14. Jones JF, Shurin S, Abramowsky C *et al*.T-cell lymphomas containing Epstein–Barr viral DNA in patients with chronic Epstein–Barr virus infections. N Engl J Med1988;318: 733–741. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]

15. affe ES, Krenacs L, Raffeld M.Classification of cytotoxic T-cell and natural killer cell lymphomas. Semin Hematol2003;40: 175–184. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]

16. Su IJ, Chen JY.The role of Epstein–Barr virus in lymphoid malignancies. Crit Rev Oncol Hematol1997;26: 25–41. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]
17. Nie J, Li J, Sun K *et al*.HBV/D1: a major HBV subgenotype circulating in Uyghur patients with chronic HBV infection in Xinjiang, China. Arch Virol2012;157: 1541–1549. [Crossref], [Google Scholar]
18. nui A, Komatsu H, Sogo T, Nagai T, Abe K, Fujisawa T.Hepatitis B virus genotypes in children and adolescents in Japan: before and after immunization for the prevention of mother to infant transmission of hepatitis B virus. J Med Virol2007;79: 670–675. [Crossref], [Google Scholar]
19. Coursaget P, Yvonnet B, Chotard J *et al*.Age- and sex-related study of hepatitis B virus chronic carrier state in infants from an endemic area (Senegal). J Med Virol1987;22: 1–5. [Crossref], [Web of Science ®], [Google Scholar]
20. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:107–115. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
21. European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2014. *J Hepatol.* 2014;61:373–395. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
22. Ciccia A & Elledge SJ The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204 (2010). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
23. Lilley CE, Schwartz R. a. & Weitzman MD Using or abusing: viruses and the cellular DNA damage response. *Trends Microbiol* 15, 119–126 (2007). [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
24. Weitzman MD, Lilley CE & Chaurushiya MS Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annu. Rev. Microbiol* 64, 61–81 (2010). [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
25. Fradet-Turcotte A et al. Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response. *J. Virol* 85, 8996–9012 (2011). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
26. Sowd GA, Li NY & Fanning E ATM and ATR activities maintain replication fork integrity during SV40 chromatin replication. *PLoS Pathog* 9, e1003283 (2013). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
27. Gillespie KA, Mehta KP, Laimins LA & Moody CA Human papillomaviruses recruit cellular DNA repair and homologous recombination factors to viral replication centers. *J. Virol* 86, 9520–9526 (2012). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]

28. Sakakibara N, Mitra R & McBride AA The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J. Virol* 85, 8981–8995 (2011). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
29. Tsang SH, Wang X, Li J, Buck CB & You J Host DNA damage response factors localize to Merkel cell polyomavirus DNA replication sites to support efficient viral DNA replication. *J. Virol* 88, 3285–3297 (2014). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
30. Weitzman MD & Weitzman JB What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell Host Microbe* 15, 283–294 (2014). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
31. Lilley CE, Schwartz R. a. & Weitzman MD Using or abusing: viruses and the cellular DNA damage response. *Trends Microbiol* 15, 119–126 (2007). [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
32. Morales-Sanchez A & Fuentes-Panana EM Human viruses and cancer. *Viruses* 6, 4047–4079 (2014). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
33. Liu W, MacDonald M & You J Merkel cell polyomavirus infection and Merkel cell carcinoma. *Curr. Opin. Virol* 20, 20–27 (2016). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
34. Thorley-Lawson DA EBV persistence — introducing the virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 390, 151–209 (2015). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
35. Hopcraft SE & Damania B Tumour viruses and innate immunity. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160267 (2017). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
36. Chen Q, Sun L & Chen ZJ Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol* 17, 1142–1149 (2016). [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
37. Ma Z et al. Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, E4306–4315 (2015). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
38. Zhang G et al. Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, E1034–E1043 (2016). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
39. Wu JJ et al. Inhibition of cGAS DNA sensing by a herpesvirus virion protein. *Cell Host Microbe* 18, 333–344 (2015). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
40. Zhang G et al. Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, E1034–E1043 (2016). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
41. Ma Z et al. Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, E4306–4315 (2015). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]

42. Ma Z et al. Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, E4306–4315 (2015). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
43. Zhang G et al. Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, E1034–E1043 (2016). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
44. Guito J & Lukac DM KSHV reactivation and novel implications of protein isomerization on lytic switch control. *Viruses* 7, 72–109 (2015). [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
45. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590137022001534
46. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387312/
47. https://www.wikidoc.org/index.php/Laboratory_diagnosis_of_virus
48. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.27924
49. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/testing.html
50. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6264788/#:~:text=Identification%20of%20a%20viral%20cause%20of%20a%20cancer%20provides%20an%20excellent%20opportunity%20to%20prevent%20the%20cancer%20by%20preventing%20or%20treating%20the%20associated%20viral%20infection.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲
دانشگاه سیستان و بلوچستان
سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
ISC
کد اختصاصی: ۰۲۲۳۰-۵۲۶۳۲

ارتباط بین میکروارگانیسم‌ها با بیوتروریسم

سیدنوید موسوی[1*]، معین شیرین‌کام[1*]

ایمیل نویسنده مسئول: snmsve@gmail.com

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه سیستان‌وبلوچستان، زاهدان

چکیده:

حقوق بشر که مجموعه‌ای از تمام ارزش‌ها، قوانین و مفاهیم است برای یک سری اهداف خاص تغییر می‌کنند. DNA که امروزه به‌شدت موردتوجه زیست‌شناسان قرار دارد می‌تواند توسط یک فرد یا گروهی از افراد متخصص، دست خوش تغییراتی شود؛ اما اگر این تغییرات در راستای افزایش رفاه نباشند چه خواهد شد؟ شاید به‌ظاهر دور از تصورات باشد؛ اما درگذشته و امروز بوده و هستند افرادی که خواستار گسترش ترس، بیماری یا حتی مرگ در جوامع مختلف انسانی بوده‌اند. بیماری‌ای که سلامتی را گرفته، می‌تواند به‌واسطه یک میکروارگانیسم[1] و یا سم آن‌ها رخ‌داده باشد. قطعاً وقتی یک عامل به‌صورت اپیدمی[2] ظاهر شود ترس زیادی را در بین عوام ایجاد خواهد کرد. در اواخر سال ۲۰۱۹ خبر گسترده‌ای در سراسر جهان مبنی بر گسترش یک بیماری ویروسی به نام کووید-۱۹ توسط ویروس کرونا[3] منتشر شد. بااطلاع به این که ممکن است این ویروس موجب مرگ شود، ترس گسترش بیشتری پیدا کرد. گاهی اپیدمی‌هایی مانند طاعون و تب سیاه به‌عمد در جهان‌گسترش داده می‌شدند که برای اهداف حکومتی بوده است. در سال‌های گوناگون انواعی از تفاهم‌نامه‌ها، قراردادها و پیمان‌ها به‌منظور جلوگیری و یا اتمام یک جنگ بیولوژیکی[4] به امضا رسیده است؛ اما همواره بوده‌اند افراد و حکومت‌هایی که بدون توجه به این قراردادها و همچنین حقوق بشر،

[1] - Microorganism
[2] - Epidemic
[3] - Coronavirus
[4] - Biological warfare

اقدام به ایجاد بلایای زیستی و حملات بیوتروریسم[1] کرده‌اند. بیوتروریسم به نوعی از جنگ گفته می‌شود که سمت تاریک علم زیست‌شناسی را نشان می‌دهد و موجب زیر پا گذاشتن اخلاق زیستی[2] می‌شود.

کلمات کلیدی: بیوتروریسم، حقوق بشر، کووید-۱۹، میکروارگانیسم، کریسپر

[1]- Bioterrorism
[2] - Bioethique

مقدمه:

در مقابل هر سفید، سیاهی نیز وجود دارد. تاریخ نشان داده میل استفاده از بخش تیره همواره وجود داشته است. بیوتروریسم، استفاده از میکروارگانیسم‌هایی مثل ویروس، باکتری و یا هر چیز دیگری که می‌تواند موجب بیماری یا مرگ در انسان، حیوان یا گیاه شود.[1] در پشت این نوع تروریسم که جنایت زیستی عنوان می‌شود، هدف صرفاً بالابردن آمار مرگ‌ومیر نیست؛ بلکه ایجاد یک اختلال اجتماعی یا زیان اقتصادی کافی است و هرچه گستره ایجاد رعب و وحشت آن بیشتر باشد، حمله بیوتروریسم قوی‌تر قلمداد می‌شود. عواملی که سبب می‌شود یک شخص، دسته یا دولت تصمیم به انجام یک حمله بیوتروریسمی بگیرد می‌تواند غرایض شخصی، انتقام و یا پول باشند که توأم با عقاید مذهبی ایدئولوژیک یا سیاسی شده است.[1.2] در تمام علوم از جمله زیست‌شناسی بهترین راه برای پیشگیری از ورود اشخاص به بعد تاریک یک علم، آموزش صحیح در استفاده از امکانات است. در مقابل بیوتروریسم، دفاع زیستی قرار دارد که مهم‌ترین قسمت آن آگاه‌سازی مردم است. وجود گروه‌های مجهز پزشکی و بهداشتی برای کاهش خطرات پیش، وپس از حمله بیوتروریسم بسیار مهم است.[3] بسیاری از سیاستمداران و گروه‌های پزشکی احتمال اینکه کروناویروس یک عامل بیوتروریسم باشد را داده‌اند؛ اما هنوز به طور مستند ثابت نشده است.[4]

بیوتکنولوژی سیاه:

بیوتکنولوژی سیاه، تمام کارهای تحقیقاتی و عملی میکروارگانیسم‌ها علیه رفاه انسان و موجودات است که شامل سلاح زیستی[1]، جنگ زیستی و بیوتروریسم می‌باشد.[1,2,4] سلاح زیستی به هر عامل یا میکروارگانیسمی گفته می‌شود که موجب بیماری، مرگ و عوارض در انسان، حیوان یا گیاه می‌شود. پنج

[1] - Biological weapons

دسته کلی برای سلاح‌های زیستی وجود دارد که عبارت‌اند از: ۱- باکتری‌ها، مثل عامل سیاه‌زخم[۱]، تولارمی[۲]، بوتولیسم[۳] و ۲- ویروس‌ها، مثل انسفالیت اسب ونزوئلایی[۴] ۳- ریکتزیا ها، مثل تیفوس[۵] تب کیو[۶] ۴- قارچ‌ها، مثل بلاست برنج[۷]، زنگ غلات[۸] ، لکه گندم[۹] و سوختگی سیب‌زمینی[۱۰] ۵- سموم، مثل ریسین (استریسین که پروتئینی سمی و فشرده داخل دانه‌های گیاه کرچک است و به دلیل دردسترس‌بودن جزو پراستفاده‌ترین سلاح‌های زیستی است.). جنگ زیستی، جنگی است که در آن علاوه بر سلاح‌های مرسوم از سلاح‌های زیستی نیز استفاده می‌شود که در چنین جنگ‌هایی حتی پس از گذشت سال‌ها از پایان جنگ، باز هم نمودهای استفاده از این سلاح‌ها همچنان دیده می‌شود. بیوتروریسم، نوعی از انواع تروریسم است که در آن از سلاح‌های زیستی طی جنگ زیستی استفاده می‌شود، نمونه دیگر تروریسم، نوع هسته‌ای آن است که امروزه بسیار خطرناک قلمداد می‌شود و تدابیر زیادی برای پیشگیری از رخدادن آن صورت می‌گیرد.[5,6,7,8]

عوامل بیولوژیکی و نحوه فعالیت آن‌ها:

۱- **سیاه‌زخم:** توسط باکتری باسیلوس آنتراسیس[۱۱] در گیاه‌خواران اهلی بیماری‌زا است. در اثر تماس انسان با محصولات یا حیوانات آلوده به این باکتری، شخص نیز دچار این بیماری می‌شود. سیاه‌زخم جزء بیماری‌های بدخیم است که هنوز هم به‌صورت اپیدمی در مناطقی از آمریکای مرکزی و آفریقا دیده می‌شود. به‌عنوان سلاح بیولوژیکی در قرون‌وسطی، اروپاییان از جسد حیوانات آلوده به سیاه‌زخم استفاده می‌کردند.[9,10]

[1] - Anthrax
[2] - Tularemia
[3] - Botulism
[4] - Venezuelan equine encephalitis virus
[5] - Typhus
[6] - Q Fever
[7] - Magnaporthe grisea
[8] - Puccinia graminis
[9] - Pyrenophora tritici-repentis
[10] - Phytophthora infestans
[11] - Anthrax bacterium

۲- **تولارمی:** بیماری عفونی ناشی از باکتری فرانسیسلا تولارنسیس[۱] ، می‌باشد که با نام تب خرگوش[۲] شناخته می‌شود و اغلب منبع آن خرگوش و کنه درماسنتور اندرسونی[۳] می‌باشد. پراکندگی این بیماری بیشتر در آمریکای شمالی و اروپا دیده شده است. کشورهای ایالت متحده، شوروی و ژاپن بارها به استفاده از آن روی آوردند. به چند دلیل خاص استفاده از تولارمی به‌عنوان یک جنگ‌افزار بیولوژیکی، عاملی جذاب در نظر گرفته می‌شود، از جمله آئروسل[۴] کردن آسان و عفونت زیاد آن در حدی که فقط ۱۰ تا ۵۰ باکتری برای آلوده‌کردن قربانی کافی است. تا به امروز آمریکا بارها تولارمی را به‌عنوان یک سلاح بیولوژیکی مورد آزمایش قرار داده است [9,10].

۳- **بوتولیسم:** یک بیماری فلج‌کننده عضلات است که به‌وسیله سم حاصل از باکتری کلستریدیوم بوتولینوم[۵] ایجاد می‌شود. تا کنون ۷ نوع از آن شناسایی شده که نوع A و B آن در انسان بیماری‌زا هستند. تا کنون استفاده گسترده‌ای از این عامل بیولوژیکی در بیوتروریسم اتفاق نیفتاده است و بیشتر جنبه مثبت و درمانی مورداستفاده است. یکی از موارد استفاده آن، به‌صورت بوتاکس[۶] که شل‌کننده موضعی عضلات و درمان‌های گوناگون است. سم بوتولیسم[۷] درصورتی‌که در یک حمله بیولوژیکی به کار رود، تنها انتشار ۱ گرم از آن در هوا می‌تواند دست‌کم موجب مرگ یک میلیون نفر بشود [9,10].

۴- **انسفالیت اسب ونزوئلایی:** انسفالیت، التهاب حاد بافت مغزی است. علت آن، ویروس، باکتری، قارچ،

[1] - Francisella tularensis
[2] - Rabbit fever
[3] - Dermacentor albipictus andersoni
[4] - Aerosol(به توزیع مخفیانه عامله بیماری زا گفته می‌شود.)
[5] - Clostridium botulinum
[6] - Botox
[7] - Botulinum toxin

ریکتزیا و بیماری خودایمنی[۱] می‌باشد. در نوع انسفالیت ویروسی[۲]، مغز بیمار پس از ابتلا به یک بیماری ویروسی مثل آبله گاوی[۳]، سرخجه[۴] و آبله‌مرغان[۵] دچار التهاب می‌شود. انسفالیت اسب ونزوئلایی یا Encephalomyelitis از یک پشه منتقل می‌شود و اسب، الاغ و گورخر را تحت‌تأثیر می‌گذارد. این ویروس در صورت انتقال به انسان، علائم مشابه آنفولانزا بروز می‌دهد. کشورهای ایالت متحده و شوروی در طول جنگ سرد به تجهیز سلاح‌های زیستی خود با این ویروس روی آوردند.[9,10]

۵- **تب کیو:** تب کیو یا تب پرسشجو ناشی از عفونت باکتری کوکسیلا بورنتی[۶] است. در انسان و حیوانات دیده می‌شود. این بیماری از کنه به حیوان و از حیوان به یک شخص منتقل می‌شود، بااین‌حال شواهد حاکی از آن است که فقط از بز به انسان قابل انتقال می‌باشد. ایالات متحده در دهه ۱۹۵۰، آزمایشاتی مبنی بر استانداردسازی تب کیو برای استفاده به‌عنوان سلاح بیولوژیکی انجام داد و در حال حاضر در رده B عوامل بیولوژیکی و بیماری‌زایی قرارداد..

۶- **تیفوس:** تیفوس یا تب محرقه یک بیماری با تب شدید است که از باکتری انگل زی بندپایان به انسان منتقل می‌شود؛ اما از فردی به فرد دیگر قابل‌انتقال نمی‌باشد. اولین توصیف قابل استناد به کشف این بیماری به سال ۱۴۸۹ و طی جنگ گرانادا که از سال ۱۴۸۲ تا ۱۴۹۲ بوده، ظاهر شده است.[9,10]

۷- **طاعون:** . یک بیماری باکتریایی است که کشف عامل آن در سال ۱۸۹۴ توسط الکساندر یرسین[۷] در انستیتو پاستور اتفاق افتاد. طاعون بارها در جهان همه‌گیر شد؛ اما امروزه از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر بیماری

[1] - Autoimmune disease
[2] - Viral encephalitis
[3] - Cowpox
[4] - Rubella
[5] - Chickenpox
[6] - Coxiella burneti
[7] - Alexandre Émile Jean Yersin

از جمله استرپتومایسین[1] استفاده می‌شود. یکی از کشنده‌ترین دوران همه‌گیری طاعون به سال ۱۳۴۷ میلادی برمی‌گردد، جایی که یک‌چهارم تا یک‌سوم جمعیت اروپا در اثر طاعون جان باختند. به این اپیدمی، مرگ سیاه[2] می‌گویند. آخرین همه‌گیری طاعون به سال ۱۸۹۴ بازمی‌گردد، جایی که طاعون در چین گسترش یافت و در نتیجه آن باسیل یرسینیا پستیس[3] کشف شد. طاعون خیارکی[4] یا بوبونیک متداول‌ترین حالت آن است. دو نوع شایع دیگر آن، طاعون عفونتی خون و طاعون ریوی است. از طاعون ریوی بارها به‌عنوان یک سلاح زیستی؛ مانند بمب‌های حاوی کک‌های آلوده به طاعون در طی جنگ جهانی دوم توسط ژاپن استفاده شده است و همچنین چین باستان و اروپای قرون‌وسطی از لاشه حیوانات آلوده مثل گاو و اسب و لاشه انسان برای آلوده‌سازی منابع آب استفاده کردند. امروزه باتوجه‌به دستیابی به داروهای درمانی و پیشگیری‌کننده طاعون، دیگر نمی‌توان از آن به‌عنوان سلاح بیولوژیکی استفاده کرد.[9,10]

۸- **جذام:** جذام با عناوین خوره، لپرسی[5] و یا بیماری هانسن[6] شناخته می‌شود و توسط مایکوباکتریوم لپره[7] و مایکوباکتریوم لپروماتوسیس[8] ایجاد می‌شود. از سری علائم آن عدم احساس درد است اما امروزه درمان آن کشف شده است. قدمت جذام باتوجه‌به مستندات به سال‌های ۴۱۵-۵۴۵ میلادی در جنوب شرق انگلستان برمی‌گردد. تا پیش از دستیابی به راه‌های درمان جذام از آن بارها به‌عنوان سلاح بیولوژیکی استفاده شد [9,10].

[1] - Streptomycin
[2] - Black Death
[3] - Yersinia pestis
[4] - Bubonic plague
[5] - Leprosy
[6] - Hansen's disease
[7] - Mycobacterium leprae
[8] - Mycobacterium lepromatosis

۹- **آبله:** سال ۱۹۸۰ ریشه‌کن‌شدن آن توسط سازمان جهانی بهداشت[1] اعلام شد. گونه ویروسی که این بیماری را ایجاد می‌کند واریولاورا[2] است که علائم ابتدایی آن تب و استفراغ و سپس زخم‌هایی در دهان و روی پوست می‌باشد. تا پیش از ریشه‌کن‌شدن این بیماری بارها از آن به‌عنوان سلاح بیولوژیکی مورداستفاده قرار گرفت. ژاپن نیز در طی جنگ جهانی دوم از آبله به‌عنوان سلاح زیستی استفاده کرد؛ اما هیچگاه نتوانست آن را به تولید انبوه برساند. شوروی نیز در سال ۱۹۴۷ یک کارخانه ساخت سلاح آبله را تأسیس کرد.[9,10]

۱۰- **قانقاریا:** گانگرن[3] یا سیاه مردگی بیماری عفونتی‌ای است که به‌واسطه باکتری کلسریدیوم پرفرنژنس[4] ایجاد می‌شود، این باکتری در زباله‌های خانگی نیز دیده می‌شود. اغلب، این بیماری در افراد دیابتی یا افرادی که مشکلات شریانی محیطی دارند رخ می‌دهد. قانقاریا انواع گوناگونی دارد که از کشنده‌ترین انواع آن، قانقاریای گازی می‌باشد. در تاریخ، ژاپن آزمایشاتی برای تبدیل قانقاریا به سلاح زیستی انجام داده است.[9,10,11]

۱۱- **حصبه:** حصبه[5] یا تب تیفوئید در اثر عفونت باکتری سالمونلا انتریکا[6] ایجاد می‌شود. این بیماری مختص انسان است و شیوع آن بیشتر در جنوب شرق آسیا، آسیای مرکزی و جنوب آفریقا می‌باشد. از علائم آن شروع تدریجی تب به همراه ضعف، درد شکم، یبوست، سردرد و استفراغ خفیف است. حصبه به طور گسترده در جنگ‌های بیوتروریسم استفاده نشده است.[9]

[1] - World Health Organization
[2] - Variola vera
[3] - Gangrene
[4] - Clostridium perfringens
[5] - Typhoid fever
[6] - Salmonella enterica

با آگاهی یا بدون آگاهی:

به عوامل بیماری‌زایی مانند باکتری‌ها که زنده هستند یا سم ارگانوفسفات[1] که غیرزنده عنوان می‌شود، پاتوژن[2] می‌گویند.[1] یکی از عواملی که در نتیجه حضور انسان در زیستگاه حیوانات افزایش پیدا می‌کند بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که به این نوع بیماری‌ها زئونوز[3] گفته می‌شود. طبق آخرین تحقیقات، ۷۵ درصد بیماری‌های نوظهور، زئونوز هستند مانند کووید-۱۹، سارس[4] و مرس[5] که بر اساس نتایج حاصله از حیوان به انسان منتقل می‌شوند.[1,3] بیوتروریسم ممکن است توسط دو گروه صورت بگیرد، گروه اول افرادی هستند که آگاهی کامل از نتیجه عمل خود نسبت به محیط‌زیست ندارند. نوع خطرناک‌تر بیوتروریسم انجام جنگ بیولوژیکی با آگاهی است که چون یک فرد یا دولت با دانش و جنون چنین کاری انجام می‌دهد، برای کره‌زمین خطرآفرین تلقی می‌شود. تأثیر میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان منابع بیولوژیکی از نظر نامرئی‌بودن و تأخیری بودن منحصربه‌فرد است. این عوامل به کسانی که از آن‌ها استفاده می‌کنند کمک می‌کند که ترس و سردرگمی را بین قربانیان ایجاد کند و بدون شناسایی‌شدن به کار خود ادامه دهند یا فرار کند. آلوده‌کردن دام‌ها، محصولات کشاورزی، ساختمان‌ها و اشیا با آئروسل کردن یا توزیع مخفیانه عامل بیماری صورت می‌گیرد.[1,2,12]

[1] - Organophosphate
[2] - Pathogen
[3] - Zoonosis
[4] - Severe acute respiratory syndrome
[5] - Middle East respiratory syndrome

نگاهی به تاریخچه بیوتروریسم:

۱- ۶۰۰ سال قبل از میلاد، اولین مورداستفاده از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا توسط آشوری‌ها[1] صورت گرفت، آن‌ها به‌عمد هاگ قارچ تولیدکننده سم آرگوت[2] را در چاه آب دشمنان خود می‌ریختند. ۲- در سال ۱۱۵۵ میلادی، امپراتور باربا‌روسا چاه‌های آب در ترنتوی[3] ایتالیا را با اجساد انسان آلوده کرد. ۳- سال ۱۳۴۷ میلادی، مغول‌ها از منجنیق‌های دارای اجساد آلوده به طاعون برای حمله به اوکراین استفاده کردند که در طی چهار سال منجر به مرگ ۲۵ میلیون نفر در اثر طاعون شد. ۴- سال ۱۴۲۲ ارتش لیتوانی کود تهیه شده از افراد آلوده را به شهر بوهیمیا پرتاب کرد. ۵- سال ۱۴۹۵ اسپانیایی‌ها در ناپل ایتالیا شراب را با خون افراد مبتلا به جذام مخلوط کردند . ۶- سال ۱۶۵۰ ارتش لهستان بزاق سگ‌ها را به سمت دشمنان شلیک می‌کرد . ۷- سال ۱۷۱۰ روسیه اجساد آلوده به طاعون را به داخل شهرهای سوئد پرتاب می‌کرد . ۸- سال ۱۷۶۳ نیروهای بریتانیا در پیترزبورگ کنونی در شورش پونتیاک[4] پتوهای آلوده به آبله را بین سرخ‌پوستان پخش کردند. ۹- سال ۱۷۸۵ نیروهای تونس در محاصره لاکاله از لباس‌های آلوده به طاعون استفاده کردند . ۱۰- سال ۱۹۱۴-۱۹۱۸ در جنگ جهانی اول نیروهای آلمان، اسب و گاوها را به عوامل عفونی سیاه‌زخم مبتلا می‌کردند و همچنین یک سال پس از آغاز جنگ، طاعون را در روسیه گسترش دادند، در انتهای این جنگ حدود ۱۸ میلیون نفر کشته شدند. ۱۱- سال ۱۹۳۷-۱۹۴۵ ژاپن بر روی ۳۰۰۰ اسیر چینی سلاح‌های بیولوژیکی را تست می‌کرد؛ مانند سیاه‌زخم، تیفوس، قانقاریا و طاعون. ژاپن همچنین در چین، بمب‌های دارای کک‌های آلوده به طاعون را مورداستفاده قرارداد و ۵۸۰ هزار چینی در نهایت کشته شدند. ۱۲- سال ۱۹۳۹-۱۹۴۵ در جنگ جهانی دوم به‌صورت گسترده از عوامل بیولوژیکی استفاده شد که

[1] - Assyrian people
[2] - Ergot
[3] - Trento
[4] - Pontiac's War

آغاز عصر هسته‌ای نیز می‌باشد. در طی این جنگ ۷۵ میلیون نفر کشته شدند . ۱۳- اواسط دهه ۱۹۷۰ تا اواسط دهه ۱۹۸۰ در جنوب شرقی آسیا و در ویتنام و لائوس، هواپیماهایی مواد زردرنگ را بر سر مردم شهرها می‌ریختند و از آن به‌عنوان باران زرد[1] یاد می‌شود که موجب خونریزی از بینی و لثه، لرزش، تشنج، کوری و یا حتی مرگ می‌شود؛ اما همچنان عوامل این عملیات مشخص نشدند . ۱۴- سال ۱۹۸۴ باگوان شری راجنیش[2] برای پیروزی در انتخابات محلی سالادهای مراسم رقیب را به حصبه آلوده کرد که در نهایت ۴۳ کشته و ۷۵۱ مسموم به‌جای گذاشت. ۱۵- سال ۱۹۸۰-۱۹۸۸ عراق از گاز خردل، سارین و تابون در جنگ علیه ایران، استفاده کرد. ۱۶- سال ۱۹۹۵ گاز سارین (GB) توسط فرقه اوم شرینکو در ژاپن استفاده شد که ۱۳۰ نفر کشته، ۵۰ نفر مجروح و هزاران نفر دچار عوارض جسمی شدند. آنان این گاز را که یک ترکیب فسفری مخرب سیستم اعصاب و بسیار سمی و مرگبار و مایعی بی‌رنگ، شفاف و بی بو است را در متروی توکیو به کار گرفتند. آن‌ها در استرالیا مزرعه گوسفند داشتند و آزمایشات خود را در آن جا انجام می‌دادند که سارین و vx در آنجا ساخته شده بود. ۱۷- سال ۲۰۰۱ هاگ سیاه‌زخم توسط اشخاص ناشناس با نامه به سناتورها، روزنامه‌نگارها و عوامل رسانه‌ای ارسال شد که ۵ کشته به‌جای گذاشت.[13]

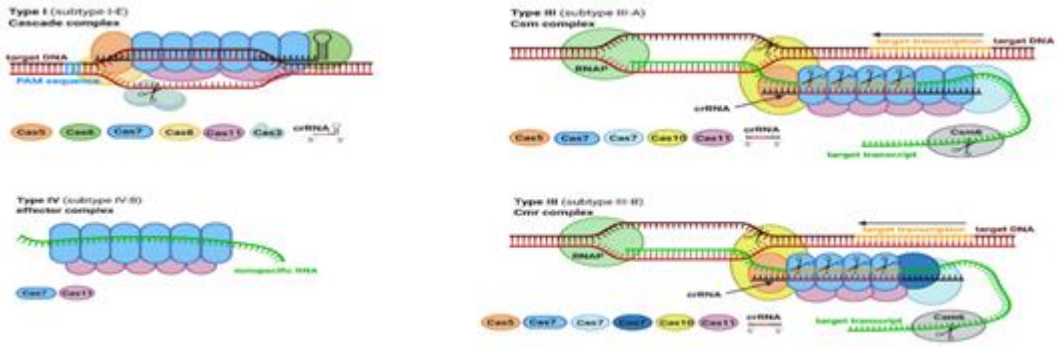
آیا فناوری کریسپر می‌تواند نقشی در بیوتروریسم داشته باشد؟

از گذشته تا امروز نگرانی‌هایی در برخی موارد مانند تولد اولین پستاندار شبیه‌سازی‌شده یعنی دالی[3] ، تکمیل پروژه ژنوم انسانی و کشف استفاده از کریسپر[4] که یک تغییردهنده بازی در زمینه ویرایش ژنوم است، داشته‌ایم. کریسپر نوعی تکنولوژی جدید در خصوص ایجاد تغییرات ژنتیکی است و به قسمتی از DNA سلول‌های پروکاریوتی مخصوصاً آرکی‌ها و باکتری گفته می‌شود که دارای توالی‌های تکرارشونده‌اند و

[1] - Yellow rain
[2] - Bhagwan Shree Rajneesh
[3] - اولین گوسفند شبیه سازی شده از سلول پستان گوسفند ماده.
[4] Clustered Regularly Interspaced Short - Palindromic Repeats

در بین آنها فضاهای غیر تکرارشونده قرار دارد. توالی‌های تکرارشونده حدود ۲۰ باز آلی نیتروژن‌دار دارند. امروزه از این روش برای انجام اصلاح ژنتیکی در باکتری‌ها استفاده می‌شود بدین صورت که قسمت خاصی از DNA باکتری توسط آنزیم CAS-9 برش داده می‌شود و ژن موردنظر در آنجا قرار می‌گیرد.[14,15] کریسپرها سیستم‌های دفاعی ضدویروس تطبیقی هستند.این روش از سال ۲۰۱۲ ایجاد شده است و به‌طورکلی امکان سو استفاده بالقوه و استفاده از فناوری ویرایش ژن، می‌تواند برای توسعه سلاح‌های زیستی استفاده شود و یک تهدید بزرگ محسوب شود، بدین‌گونه که با افزایش ویرولانس[1] آن، خطر یک عامل بیماری‌زا افزایش می‌یابد و در نتیجه، درمانی برای آن کشف نمی‌شود. علوم کشاورزی، بهداشت و صنعت بخش‌هایی هستند که این علم را به خود جذب کرده‌اند.[16,17] وجه تشابه سلاح‌های بیولوژیکی مهندسی شده با سایر سلاح‌ها در ارزان‌بودن آن است؛ اما نسبت به سایر عوامل بیولوژیکی دقیق‌تر و قوی‌تر هستند. علت ارزان‌بودن این روش قیمت تقریبی ۱۵۰ دلاری یک کیت کریسپر است؛ اما قوانین اخلاق زیستی مانع گسترش بخش تیره می‌شوند.[14]

[1] - Virulence



شکل۱_ مراحل کریسپر

نقش کووید-۱۹ در جنگ های زیستی :

ویروس کووید یا nCov-2019 ویروسی است که باعث بیماری تنفسی در افراد می‌شود و می‌تواند از فردی به فرد دیگر منتقل شود. این ویروس برای اولین‌بار طی تحقیقات مربوط به شیوع بیماری در شهر ووهان چین شناسایی شد که ابتدا از منبع حیوانی گزارش شد و اکنون به طور دقیق مشخص نیست این ویروس از چه طریقی بین افراد گسترش می‌یابد.[18] طبق اطلاعات به‌دست‌آمده توسط Maj Regan F. Lyon، بحران بهداشت عمومی که با ویروس کرونا-۲ که مرتبط با سارس است، به وجود آمده. او آسیب‌پذیری سلاح‌های زیستی را در صحنه بین‌المللی بررسی کرده و به گفته‌اش تأثیرات فاجعه باری بر امنیت ملی دارد. SARS-Cov2 جدید، دارای ویژگی‌های یک سلاح بیولوژیکی ایده‌آل، از جمله سرعت انتقال بالا، دوره کمون طولانی، انتقال از طریق هوا و مرگ‌ومیر قابل‌توجه است. ناتوانی در دسترسی به منابع ضروری PPE یا تجهیزات حفاظت شخصی به دلیل خارج‌شدن از زنجیره تأمین و احتکار عمومی باعث ایجاد یک اثر موج‌دار در سیستم مراقبت‌های بهداشتی شد. از دلایل همه‌گیری این ویروس، عدم رعایت بهداشت عمومی و اقدامات حفاظتی توصیه شده از جمله واکسن‌ها می‌باشد. اقدامات بهداشت عمومی مانند فاصله‌گذاری

اجتماعی، بهداشت تهاجمی و دستورات پوشیدن ماسک، نمونه‌ای از تاکتیک‌های دفاعی در مقابل کووید-۱۹ هستند.[19,20] مقاومت در برابر واکسیناسیون از گذشته تا به امروز همواره اتفاق افتاده است، اپیدمی آبله قرن ۱۹ در بریتانیا و همچنین شیوع سرخک ایالت متحده در سال ۲۰۱۹، نمونه‌های دیگری از مقاومت در مقابل واکسیناسیون است. اگرچه کنوانسیون ژنو[1] در سال ۱۹۷۵ استفاده از سلاح‌های بیولوژیکی را منع کرده؛ اما به دلیل پتانسیل بالای بیوتروریسم، در سال ۲۰۱۸ یعنی تقریباً ۴۰ سال پس از معاهده ژنو، تفاهم‌نامه جدیدی برای اقدامات پیشگیرانه و مقابله با تهدید در چین ایجاد شد.[20]

پیشگیری از عوامل بیولوژیکی:

عوامل بیولوژیکی به سه دسته تقسیم می‌شوند: ۱- عواملی که فقط بر انسان تأثیر می‌گذارند. ۲- عواملی که بر حیوان و گیاه تأثیر می‌گذارد. ۳- عواملی که بر هر دو اثر می‌گذارند.[21] در آمریکا نوعی باکتری بی‌ضرر به نام سراتیا مارسسنس[2] در فضای باز به‌منظور بررسی احتمال شیوع یک عامل بیولوژیکی مورد آزمایش قرار گرفت به این صورت که توسط هواپیماهایی در سطح شهر سانفرانسیسکو پخش شدند و در نتیجه ۸۰۰ هزار نفر دارای آثار این باکتری شدند. نمونه‌ی دیگری از این آزمایشات استفاده از لامپ آلوده به باکتری بی‌ضرر بر روی ریل قطار بود که در مدت‌زمان ۲۰ دقیقه باکتری در سراسر مسیر ریل قطار منتشر شد.[22] طبق گزارشات کنسرسیوم ملی از سال ۱۹۸۹ افزایش حملات بیوتروریسم را داشته‌ایم؛ اما اغلب با شکست مواجه شدند. در اوایل سال ۱۹۲۵ پروتکل ژنو به امضا رسید و از سال ۱۹۲۸ به اجرا درآمد که طبق این پروتکل استفاده از سلاح‌های بیولوژیکی و شیمیایی ممنوع گشت، این پروتکل بارها از طرف دولت‌های مختلف نقض شد.[21,23] با امضای سند WHO تمرکز بر شناسایی و واکنش به شیوع بیماری و همچنین

[1] - Geneva Conventions
[2] - Serratia marcescens

جلوگیری از بروز بیماری نسبت به سلاح‌های بیولوژیکی و شیمیایی افزایش یافت.[23] CDC[1] مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری، سه رده برای عوامل بیولوژیکی در نظر گرفته است.

رده A :عوامل، پاتوژن‌ها و ارگانیسم‌ها بیشترین خطر را برای جامعه و سلامت عمومی ایجاد می‌کنند؛ زیرا به‌راحتی منتشر و از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شود. احتمال مرگ‌ومیر در آن بالاست و موجب وحشت و اختلال اجتماعی می‌شود؛ مانند سیاه‌زخم، ابله، طاعون بوبونیک، تب خرگوش، سم بوتولینوم، ابولا و دنگی.

رده B : پس از رده A دارای اولویت است که عوامل آن کمتر باعث مرگ‌ومیر می‌شوند و انتشار آنها نسبتاً آسان است مثل بروسلا، کوکسیلا بورنتی، ریسین، سم اپسیلون[2] ، استافیلوکوک آنتی‌توکسین[3] B، تب تیفوس و ... .

رده C : شامل عوامل نوظهور می‌شوند که به دلیل سهولت در تولید و انتقال می‌توانند برای انتشار انبوه در آینده مهندسی شوند. آن‌ها می‌توانند با گذر زمان به رده A یا B جابه‌جا شوند؛ مانند ویروس کرونا. از دیگر نمونه‌های این رده ویروس آنفولانزا، سل، هاری، پریون ها، هرپس و... است.[24] استفاده از ماسک یکی از راه‌های جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زاست همچنین واکسینه شدن نیز می‌تواند کمک کند. از حسگرها برای شناسایی محیط‌های آلوده استفاده می‌شود.[22]

[1] - Centers for Disease Control and Prevention
[2] - Epsilon toxin
[3] - Staphylococcus Antitoxin

Category	Biological Agents
A	Anthrax(bacillus anthracis) Botulism(clostridium botulinuum toxin) Plague (Yersinia pestis) - Smallpox (variola major) Tularemia (francisela tularencis) Viral hemorrhagic fever: including Crimean-congo fever and ebola virus inf
B	Brucellosis(brucella spp) Epsilon toxin of clostridium perfringens Food safety threats(salmonella spp – E coli –shigella Glanders -Melioidosis -Psittacosis -Q fever - Ricin toxin(castor beans) - Staphylococcal enterotoxin B Typhus fever - Viral encephalitis
C	Emerging infectious disease such as: hanta virus –Nipah –SARS or MERcorona virus and pandemic influenza

جدول۱_ طبقه‌بندی عوامل بیولوژیک براساس معیارهای **CDC**

نتیجه‌گیری:

بیوتکنولوژیست‌ها در خط مقدم انقلاب علوم زیستی هستند که در نهایت آینده جامعه را تشکیل خواهند داد. بیوتکنولوژی مبتنی بر DNA در پیشرفت فناوری به مرکزیت تبدیل شده است؛ بنابراین برای متخصصان این رشته مهم است که از پیامدهای بالقوه تلاش‌های علمی خود بر جامعه و افراد آن آگاه باشند. برای چالش‌های ناشی از بیوتکنولوژی پایه یا کاربردی می‌توانیم از اصول اخلاق برای بحث و تحلیل استفاده کنیم و با درنظرگرفتن آن‌ها به‌عنوان راهنما می‌توان به‌راحتی در مورداستفاده از ابزارهای بیوتکنولوژی برای توسعه سلاح در بیوتروریسم توصیه کرد که آسیبی نبینند. در رابطه به مسائل عدالت مهم است که تأکید شود درحالی‌که نگرانی‌های اولیه جهان توسعه‌یافته در حال حاضر بر ویرایش ژنوم انسان متمرکز است. این نگرانی‌ها اگرچه برای اقتصاد نوظهور نیز معتبر هستند؛ اما سایر مسائل اخلاق زیستی را تحت‌الشعاع قرار

می‌دهند که فوریت آن‌ها بیشتر است و می‌توان به نمونه‌هایی از آن مانند جمعیت، کنترل و دزدی زیستی که در آن عدم تعادل قدرت اقتصادی و سیاسی نقش مهمی ایفا می‌کند، اشاره کرد. بیوتکنولوژی در کشورهای درحال‌توسعه، با سرعت خیلی بالا درحال‌رشد است؛ ازاین‌رو آگاهی و مهارت برای ارزیابی تأثیر پیشرفت بیوتکنولوژی در پرتوی ارزش‌ها و نیازهای پایه جامعه حائز اهمیت است.

Refrence:

1- Biosecurity & Bioterrorism, Containing and Preventing Biological Threats, Jeffrey R. Ryan, 2nd edition, 2016

2- Bioterrorism Preparedness & Response A Proposed Model for Bioterrorism Response: Initial Operations and Characterization

3- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2018. Biodefense in the Age of Synthetic Biology. Washington, DC

4- Maj Regan F. Lyon, MC, USAF., The COVID-19 Response Has Uncovered and Increased Our Vulnerability to Biological Warfare. MILITARY MEDICINE, 186, 7/8:193, 2021

5- Public health response to biological and chemical weapons: WHO guidance (2004)

6- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF., III ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas based methods for genome engineering. Trends Biotechnol.

7- NCo B., Emerging Biotechnologies: Technology, Choice and the Public Good. London: Nuffield Council on Bioethics, 2012

8- O'Mathúna D.P. 2007. Bioethics and biotechnology.Cytotechnology, 2007, 53(1-3), 113-9

9- Jawetz , Melnick & Adelberg's Medical Microbiology 2019 , 28 th Edition

10- Pennington H (2003). "Smallpox and bioterrorism. Bulletin of the World Health Organization. 81 (10): 762–67. PMC 2572332. PMID 14758439.

11- Gas Gangrene. The Lecturio Medical Concept Library. Retrieved 22 July 2021.

12- Pellegrino E.D., The origins and evolution of bioethics: some personal reflections. Kennedy Inst. Ethics J., 1999, 9(1), 73-88

13- Joel O. Almosara, Lt Col, BSC, USAF. The Counterproliferation Papers Future Warfare Series No. 53 USAF Counterproliferation Center

14- Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective

Transgenic Res. 2017; 26(5): 709–713
15- Sinkins S.P., Gould F., Gene drive systems for insect disease vectors.Nat.Rev Genet.2006
16- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., et al., The sequence of the human genome. Science, 2001, 291(5507), 1304-51
17- Mariscal C., Petropanagos A., CRISPR as a driving force: the Model T of biotechnology. Monash Bioeth. Rev., 2016, 1-6
18- Giuseppe Lippi, Fabian Sanchis-Gomar, Brandon M. Henry,. COVID-19: unravelling the clinical progression of nature's virtually perfect biological weapon
19- Halacli B, Kaya A, Topeli A. Critically-ill COVID-19 patient. Turk J Med Sci 2020;50:585-91.
20- Willyard C. Coronavirus blood-clot mystery intensifies. Nature 2020. doi: 10.1038
21- Sinclair K.D., Corr S.A., Gutierrez C.G., Fisher P.A., Lee J.H., Rathbone A.J., et al., Healthy ageing of cloned sheep. Nat. Commun., 2016, 26, 7
22- Kumar S,Biosafety & biosecurity issues in biotechnology research.Biosafety,2015,4,e153
23- Biorisk management Laboratory biosecurity guidance, WHO September 2006
24- Bioterrorism Agents/Diseases. https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp

Evaluating the prognostic value of RUNX3 gene promoter methylation in ovarian cancer

Ameneh Jeddi[1*], robabeh faraghaneh[2]

[1] Department of Genetics, Faculty of Science, Islamic Azad University Bonab Branch, Bonab, Iran. Tel. +989148245431; email: amenehjeddi@gmail.com

[2] Department of Genetics, Faculty of Science, Islamic Azad University Bonab Branch, Bonab,

, Iran. Tel. +989031501225; email: robabefaraghaneh@gmail.com

Abstract

Ovarian cancer is the fourth leading cause of death in women worldwide. In recent studies, it has been found that several epigenetic changes, such as methylation, occur specifically in cancer cells. The *RUNX3* gene, as a tumor suppressor gene, is crucial for cell survival. The RUNX3 protein, by its inhibitory effect on β-catenin, inhibits cancer cell division. This study aimed to determine the methylation rate of the *RUNX3* gene in tumor and non-tumor tissue of ovarian cancer patients using the Quantitative Methylation Specific PCR technique. Besides, *RUNX3* promoter methylation status as a prognostic marker for ovarian cancer was evaluated. In this study 40 tumor samples along with 40 normal samples were collected. The samples were bisulfite-treated and methylation-specific primers for the interested region were designed. Finally, the methylation rate of the *RUNX3* promoter was investigated by qMSP method. Furthermore, the receiver operating characteristics curve was used to evaluate *RUNX3* methylation as a prognostic diagnosis. Results showed a significant methylation elevation in tumor specimens compared to marginal tumor samples ($p < 0.0001$). Even though, no significant relationship observed between *RUNX3* gene methylation and demographic characteristics such as age, gender, tumor size, primary tumor location and stage of the tumor ($p > 0.05$). However, at a cut-off value of 52.08, sensitivity and specificity were 80% and 60%, respectively. In conclusion, the elevated methylation rate of tumor samples compared to marginal tissues (80%) and area under the curve of 69.30% revealed poor prognosis potential of *RUNX3* methylation status.

Keywords: qMSP, methylation, *RUNX3*, epigenetics, ovarian cancer.

Introduction

Ovarian cancer risk

Cancer is the most common cause of mortality worldwide and currently is the most common obstacle for life expectancy in most countries. Ovarian cancer is the third common gynecologic cancers and accounts annually for an estimated 239,000 new cases and 152,000 deaths worldwide [1]. It is responsible for 2.5% of all malignancies among females but 5% of female cancer deaths due to the low survival rates, caused by late-stage diagnoses. In the United States, 1 in 78 women has a risk of developing ovarian cancer which average annual ovarian cancer incidence rate was 11.5 per 100,00 women during 2010-2014 [2].

Epigenetic modifications

Epigenetic regulatory elements are comprised of post-translationally modified cytosines, non-coding RNAs, and histone modifications. These regulatory elements effects do not change the underlying DNA sequence, but can be inherited and regulate how genome interacts with the environment [3]. DNA methylation (methyl CpG) is the most commonly studied epigenetic modification, whereby a methyl group is attached in the C5 position of cytosines (5mC), usually, a cytosine which is followed by a guanine (CpG) context. The process of DNA methylation is performed by an enzyme family known as methyltransferases (DNMTs) [4]. Widely expressed genes have CpG-rich sequences in their promoters, known as CpG islands, which are normally methylation protected. Epigenome studies revealed that in 5-10% of the cancer genome CpG islands methylation occurs abnormally, which this *de novo* methylation contributes to silencing various tumor suppressor genes, as well as other crucial genes that are needed for cell growth, angiogenesis, DNA repair and cell cycle regulation [5]. Hypermethylation has been found to be associated with silencing TSGs in ovarian cancer including *P53*, *MLH1*, *HIC1*, *BRCA1*, *P16*, *APC*, etc [6-8].

RUNX3 gene

RUNX3 (RUNX Family Transcription Factor 3) is a transcription factor and functions as a tumor suppressor gene. It is one of the crucial mediators in the Notch and Wnt signaling pathway thus involved in the control of cellular proliferation and differentiation and its role in tumorigenesis has been elucidated [9]. The genomic region surrounded P2-promoter of *RUNX3* comprises of a large CpG island (4.2 kb) and has a GC content of 64% [10]. RUNX3 promoter Hypermethylation and its following inactivation have been reported for ovarian, breast, lung, colorectal, gastric, glioblastoma cancers and hepatocellular carcinoma [11-17].

Objective

The purpose of this study was to evaluate the methylation status of the *RUNX3* gene promoter in patients with ovarian cancer and to assess its potential as an epigenetic prognostic marker in ovarian cancer. Also, *RUNX3* methylation status was investigated with the demographic characteristics of patients.

Materials and Methods

Tissue samples

The exclusion criteria were chemotherapy and radiotherapy in which patients who had performed chemotherapy and radiotherapy were excluded from the study. After applying the exclusion criteria the total of 40 tumor tissues and 40 corresponding adjacent nonmalignant tissues were collected from patients with ovarian cancer hospitalized at Alzahra hospital, Tabriz, Iran from 2013 to 2014 with their written consent. All specimens were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80˚C until use.

DNA extraction

Genomic DNA extraction was done using the salting-out technique. Total DNA content was quantified by UV absorbance measured at A260 and A280, and the DNA was then diluted to a concentration of 1 µg/100 µL.

Quantitative methylation-specific PCR (qMSP)

DNA from tissue samples were subjected to bisulfite treatment using the EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research, Orange, CA, USA) following the manufacturer's instruction. The qMSP primers were designed using "gene runner" software and synthesized by Macrogen (Geumcheon-gu, Seoul, Rep. of Korea). Sequences, Tm, and product length of each primer used for qMSP analysis are summarized in Table 1. The real-time PCR was performed by Steponeplus instrument using Mastermix SYBER-GREEN (Takara, USA). Reaction conditions were as follows for a total volume of 10 µl containing 5.2λ of Mastermix, 2.2λ of DDW and 0.6λ of primer: one cycle of 95˚C for 10 min, 40 cycles of 96˚C for 30s, 60˚C s for 30s and 72˚C for 60s. The ct level of the samples was obtained after amplification reaction, then the level of methylated to non-methylated ct_s was calculated using the following formula (equation 1) and expressed as a percentage.

Equation 1: $100/ [1+2^{(ctTG-ctCG)}] * 100\%$

Table 1. Sequences of primers used for methylation

Gene	Primer name	Sequence (5′ to 3′)	T_m (˚C)	Length (bp)
RUNX3	Methylated Forward	GAGAGCGGGGTATGTATC	59	89
	Methylated Reverse	CCCTAAACTATTACTCACCGCG	58	
	Unmethylated Forward	TTTAGAGTGGGGTATGGTATTG	61	92
	Unmethylated Reverse	CCCTAAACTATTACTCACCACA	57	

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS 18. Fisher's exact test and/or the χ^2 test were used to compare the RUNX3 methylation status among cases and between various demographic variables. The data were analyzed by student t-test and NPar test. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to evaluate the sensitivity and

specificity of *RUNX3* gene promoter status as a biomarker. A value of P<0.05 was considered statistically significant.

Results

Clinicopathologic findings of patients

The patients consisted of different clinical stages: stage I (n=6), stage II (n=15), stage III (n=14) and stage IV (n=5). The initial tumor site in our studied population was left ovary (n=17) and right ovary (n=23). A total of 8 patients had <50 and 32 patients had ≥32 years old. Of 40 patients, 20 had a tumor size of <5 cm and 20 had ≥5 cm. The methylation results from ovarian cancer were compared with demographic characteristics from these patients including age, initial tumor site, tumor size, and stage. No significant correlation (*P*<0.05) between *RUNX3* methylation and any of these parameters was observed in ovarian cancer patients (Table 2).

Table 2. Methylation status of RUNX3 with clinicopathologic features of the studied population

Clinicopathologic characteristics	Frequency (N)	Correlation with RUX3 methylation (P-value)
Age		
<50	8	0.778
≥50	32	
Initial tumor site		
Left ovary	17	0.748
Right ovary	23	
Tumor size		
<5 cm	20	0.602
≥5 cm	20	
Tumor stage		
I	6	0.177
II	15	
III	14	
IV	5	

Methylation status evaluation using qMSP-PCR

In order to analyze the methylation status of the *RUNX3* promoter, the qMSP-PCR was applied and the methylation percentage of samples was deduced. Comparing the methylation percentage of paired tumor and margin samples enabled us to determine methylation status. Our findings showed the average *RUNX3* promoter methylation of 9.92±13.01 and 7.27±15.38 in tumor and marginal normal tissues, respectively (Table 3).

Table 3. Promoter methylation status of *RUNX3* gene in ovarian cancer patients

Tissue type	Methylation ave.(%)	Std. deviation (%)	Min. (%)	Max. (%)
Tumor	9.92	13.01	0.02	54.50
Margin	7.27	15.38	0.01	48.87

Evaluating *RUNX3* methylation as a prognostic marker using ROC analysis

Sensitivity and specificity of *RUNX3* methylation were evaluated using ROC curve analysis to investigate its potential implicate as a diagnostic marker in ovarian cancer. Promoter methylation status for the *RUNX3* promoter showed poor sensitivity and specificity values as shown in table 4 and figure 1. With selecting the best cut-off value of 52.08 for methylation percentage of the analyzed promoter, the sensitivity and specificity were 80% and 60 %, respectively. These results suggest a poor prognostic implication for *RUNX3* in discrimination of ovarian cancer.

Table 4. *RUNX3* methylation status as a prognostic marker for ovarian cancer in terms of sensitivity and specificity

Gene	Cut-off value (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
RUNX3	52.08	80.0	60.0

Discussion

Transformation of endometriosis into malignant tissue is a long, complicated process involving various genes and steps. Epigenetic inactivation of cancer-associated genes, by DNA hypermethylation, has been observed often in most human cancers. Hypermethylation in CpG islands of promoters of regulated genes, such as RUNX3, is recognized as one of the mechanisms that contribute to a gene loss of function and leads to tumor initiation and progression. It is important to note that silencing a tumor suppressor gene via hypermethylation is an epigenomic change in premalignant tissues as part of the carcinogenetic process in some cancers such as ovarian cancer [18, 19].

This study was conducted using the qMSP technique to evaluate the methylation status of CpC islands of *RUNX3* promoter of ovarian cancer tumor tissues compared to corresponding

nonmalignant adjacent tissues to determine whether inactivation of *RUNX3* by methylation can be defined as ovarian cancer characteristic. We detected a high percentage of hypermethylation (80%) for the *RUNX3* gene with significant differences (P <0.0001) in tumor tissues compared with corresponding nonmalignant adjacent tissues. These differences in methylation frequency suggest that hypermethylation in the *RUNX3* promoter as a tumor suppresser gene acts as an important step for transformation into a malignant cell.

Similar to our findings, Zhang S. et al. using the qMSP technique detected a significant difference in hypermethylation of CpG islands of *RUNX3* promoter in ovarian cancer tissue compared to normal ovarian tissue. In addition to the mentioned consistency with our results, they also did not show any significant relationship between *RUNX3* gene methylation and demographic characteristics. This consistency might occur because of the small number of individuals included in the two studies and a close relation of the two studied ethnics.

Our results, also, are consistent with Ren F. et al. results which demonstrated *RUNX3* beside *RASSF2*, *GSTZ1*, *CYP2A*, *GBGT1*, *NDUFS1*, *SPOCK2*, *ADAM22*, and *TRIM36* as candidate genes for ovarian tissue transformation into malignant tissue [20].

Also, another study examined the role of promoter hypermethylation in the *RUNX3* gene in granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin and revealed that promoter methylation was associated with *RUNX3* gene silencing in GCTs, which strongly support our results regarding the role of *RUNX3* methylation in tumor progression [21].
Mori T. et al. [22] revealed that hypermethylation of the *RUNX3* promoter region has a significant association with demographic variables in hepatocellular carcinoma. However, we did not find any significant correlation between *RUNX3* methylation status and the demographic characteristics of ovarian cancer patients. Nevertheless, our studied population was relatively small; therefore, a study with a larger population is necessary to determine whether *RUNX3* methylation can affect the prognosis of ovarian cancer patients.
With AUC of 69.30%, Sensitivity and specificity of 80% and 60% with the best cut-off value of 52.08%, ROC curse analysis demonstrated a poor prognostic marker of *RUNX3* gene promoter methylation in ovarian cancer. Similar to our findings, a study assessed the *RUNX3* gene promoter methylation in 106 clear cell renal cell carcinoma ccRCC population. They mentioned that this marker for ccRCC showed a moderate potential prognostic value to distinguish hypermethylation in tumor tissues compared with normal tissues, with the cut-off value of 53% and AUC of 0.725 (95% CI 0.623–0.827) [23].

Investigating RUNX3 gene promoter hypermethylation as a sensitive and specific marker for many cancers has been conducted. A study conducted by evaluated 8 regions in the RUNX3 gene promoter region and showed that 6 of them had a higher methylation status compared to normal tissues. The high AUC of ROC curve analysis for these six regions (0.73-0.86) proposed this gene methylation status as a good prognostic marker with relatively excellent sensitivity and specificity for distinguishing tumor from normal tissues [24]. Our results differed from this study and it may be due to different studied ethnics/populations and different tissues which they investigated.

Epigenetic changes, such as DNA methylation are reversible by the use of therapeutic interventions. Thus, they are of great importance as therapeutic targets. However, therapeutic

opportunities are not applicable in treatment until we are able to provide a reliable prognostic epigenetic marker as a target.

Systemic evaluation of gene methylation is greatly important in the early diagnosis and treatment of diseases. Thomas R. et al. identified a novel panel of methylation alterations commonly occur in ovarian cancer. They demonstrated that the methylation status of a set of genes can be implicated as a prognostic marker for distinguishing malignant from benign ovarian tissue [25]. Therefore, epigenetic modifications, particularly DNA methylation, provide exciting new opportunities in the study of the malignant transformation of endometriosis and might enlighten epigenomic treatment avenues. Our findings introduce the *RUNX3* gene as a poor prognostic marker to be used as a methylation marker in ovarian cancer.

Conclusion

In conclusion, we demonstrated that *RUNX3* gene methylation status is a poor predictive epigenetic marker in ovarian cancer patients. Our results also suggest that epigenetic inactivation of *RUNX3* might play a role in the occurrence and development of malignant transformation of ovarian tissue through the corruption of *RUNX3* related signaling pathways; which need to be elucidated by further studies.

Declarations of interest: none.

Funding source

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Author contributions

AJ: Conceptualization; Supervision; Methodology Data curation; Formal analysis; Writing - original draft; Investigation, Project administration; Validation. **MRM**: Writing - review & editing.

Acknowledgement

We are grateful to appreciate the help of Sepehr Abdolahi for his contribution on language editing of the manuscript.

References

[1] Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. International journal of women's health 2019;11:287-299. 10.2147/IJWH.S197604.

[2] Torre L A, Trabert B, DeSantis C E, Miller K D, Samimi G, Runowicz C D, Gaudet M M, Jemal A, Siegel R L. Ovarian cancer statistics, 2018. CA Cancer J. Clin. 2018;68(4):284-296. 10.3322/caac.21456.

[3] Natanzon Y, Goode E L, Cunningham J M. Epigenetics in ovarian cancer. Semin. Cancer Biol. 2018;51:160-169. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.003.

[4] Smith H J, Straughn J M, Buchsbaum D J, Arend R C. Epigenetic therapy for the treatment of epithelial ovarian cancer: A clinical review. Gynecologic Oncology Reports 2017;20:81-86. https://doi.org/10.1016/j.gore.2017.03.007.

[5] Dawson Mark A, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. Cell 2012;150(1):12-27. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013.

[6] Strathdee G, Appleton K, Illand M, Millan D W M, Sargent J, Paul J, Brown R. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. The American journal of pathology 2001;158(3):1121-1127.

[7] Makarla P B, Saboorian M H, Ashfaq R, Toyooka K O, Toyooka S, Minna J D, Gazdar A F, Schorge J O. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms. Clinical cancer research 2005;11(15):5365-5369.

[8] Chmelarova M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Beranek M, Palicka V. Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer. Clinical and Translational Oncology 2013;15(2):160-163.

[9] Zhou W-N, Du Y-F, Bai J, Song X-M, Zheng Y, Yuan H, Zhang W, Zhang Z-D, Wu Y-N. RUNX3 plays a tumor suppressor role by inhibiting cell migration, invasion and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. Oncol. Rep. 2017;38(4):2378-2386.

[10] Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y, Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene – sequence, structure and regulated expression. Gene 2001;279(2):221-232. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00760-0.

[11] Zhang S, Wei L, Zhang A, Zhang L, Yu H. RUNX3 gene methylation in epithelial ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines. OMICS A Journal of Integrative Biology 2009;13(4):307-311.

[12] Lau Q C, Raja E, Salto-Tellez M, Liu Q, Ito K, Inoue M, Putti T C, Loh M, Ko T K, Huang C. RUNX3 is frequently inactivated by dual mechanisms of protein mislocalization and promoter hypermethylation in breast cancer. Cancer Res. 2006;66(13):6512-6520.

[13] Li Q-L, Kim H-R, Kim W-J, Choi J-K, Lee Y H, Kim H-M, Li L S, Kim H, Chang J, Ito Y. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. Biochemical and biophysical research communications 2004;314(1):223-228.

[14] Ku J-L, Kang S-B, Shin Y-K, Kang H C, Hong S-H, Kim I-J, Shin J-H, Han I-O, Park J-G. Promoter hypermethylation downregulates RUNX3 gene expression in colorectal cancer cell lines. Oncogene 2004;23(40):6736-6742.

[15] Lai K W, Koh K X, Loh M, Tada K, Subramaniam M M, Lim X Y, Vaithilingam A, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Ito Y. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. Eur. J. Cancer 2010;46(8):1456-1463.

[16] Mueller W, Nutt C L, Ehrich M, Riemenschneider M J, Von Deimling A, Van Den Boom D, Louis D N. Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. Oncogene 2007;26(4):583-593.

[17] Xiao W-H, Liu W-W. Hemizygous deletion and hypermethylation of RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma. World J. Gastroenterol. 2004;10(3):376.

[18] Park S Y, Kwon H J, Lee H E, Ryu H S, Kim S-W, Kim J H, Kim I A, Jung N, Cho N-Y, Kang G H. Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression. Virchows Archiv 2011;458(1):73-84.

[19] Sung H Y, Yang S-D, Ju W, Ahn J-H. Aberrant epigenetic regulation of GABRP associates with aggressive phenotype of ovarian cancer. Exp. Mol. Med. 2017;49(5):e335-e335. 10.1038/emm.2017.62.

[20] Ren F, Wang D B, Li T, Chen Y H, Li Y. Identification of differentially methylated genes in the malignant transformation of ovarian endometriosis. J Ovarian Res 2014;7:73. 10.1186/1757-2215-7-73.

[21] Dhillon V S, Shahid M, Husain S A. CpG methylation of the FHIT, FANCF, cyclin-D2, BRCA2 and RUNX3 genes in Granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin. Mol. Cancer 2004;3:33. 10.1186/1476-4598-3-33.

[22] Mori T, Nomoto S, Koshikawa K, Fujii T, Sakai M, Nishikawa Y, Inoue S, Takeda S, Kaneko T, Nakao A. Decreased expression and frequent allelic inactivation of the RUNX3 gene at 1p36 in human hepatocellular carcinoma. Liver International 2005;25(2):380-388. 10.1111/j.1478-3231.2005.1059.x.

[23] Cen D, Xu L, Zhang S, Chen Z, Huang Y, Li Z, Liang B. Renal cell carcinoma: predicting RUNX3 methylation level and its consequences on survival with CT features. Eur. Radiol. 2019;29(10):5415-5422.

[24] Wang N, Sui F, Ma J, Su X, Liu J, Yao D, Shi B, Hou P, Yang Q. Site-specific hypermethylation of RUNX3 predicts poor prognosis in gastric cancer. Arch. Med. Res. 2016;47(4):285-292.

[25] Pisanic T R, Cope L M, Lin S-F, Yen T-T, Athamanolap P, Asaka R, Nakayama K, Fader A N, Wang T-H, Shih I-M, Wang T-L. Methylomic Analysis of Ovarian Cancers Identifies Tumor-Specific Alterations Readily Detectable in Early Precursor Lesions. Clinical Cancer Research 2018;24(24):6536. 10.1158/1078-0432.CCR-18-1199.

Investigating the growth and differentiation of mouse osteoblast cells on synthesized bone scaffolds

Sara Sharifi Ghombavani [1], Hamid Reza Samadikhah[1,2*], Soheila Zamanlui Benisi[2,3]

[1]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Stem Cell and Cell Therapy Research Center, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Institute, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Department of Biomedical Engineering, Islamic Azad university, Central Tehran Branch, Tehran, Iran.

Abstract

Scaffolds are three-dimensional structures that provide the necessary conditions for cell proliferation and differentiation, and their structure determines the final shape of the tissue. The purpose of the project is to investigate the effect of nanohydroxyapatite-sodium alginate-based bone scaffolds on the growth and differentiation of mouse osteoblast cells and compare it with synthesized nanohydroxyapatite-sodium alginate scaffolds loaded with gold nanoparticles. Therefore, after the synthesis of bone scaffolds and its characterization (destruction, swelling, porosity), osteoblast cells were cultured on the scaffolds and in order to examine the morphology of the cells on the scaffold, SEM test, cell viability, MTT test and the amount The expression of ALP, COL1 and RUNX2 genes was tested by real-time PCR.The results showed that the HA-Au-alginate and HA-alginate nanocomposites synthesized with the new formulation increased the level of osteogenic genes compared to the control, which indicates an increase in the growth and differentiation of cells. The presence of gold nanoparticles in synthetic composites increases the porosity and swelling of these scaffolds, and then leads to an increase in cell viability and differentiation, as a result, composites containing gold nanoparticles have more optimal activity than samples without nanoparticles.

Keywords: cell scaffold, alkaline phosphatase, osteoblast, gold nanoparticles, hydroxyapatite

1. Introduction

Hydroxyapatite is widely used in tissue engineering due to its chemical structure very similar to carbonate apatite of bone mineral phase and is important (1). Scaffolds based on hydroxyapatite are well known for their favorable biological properties, including: biocompatibility, bioactivity, and bone conduction, as well as bone conduction, bone induction, and bone stimulation (2). It is widely used as an artificial bone substitute. These scaffolds cause osteoblast progenitor cells to differentiate into osteoblast cells in growing bone(3). Hydroxyapatite is a known biomaterial that is found as a main component of bone and teeth(4) and has been used since the 1950s as an effective scaffold to fill bone defects(5). It has been reported that the addition of hydroxyapatite to polymer scaffolds increases the survival and proliferation and differentiation of cells in this scaffold (6) or improves the mechanical properties and cell attachment of alginate scaffolds(7). Therefore, hydroxyapatite scaffolds can be used to increase biological activity and mechanical properties, some polymer composites and active biomaterials have been developed for bone tissue engineering(8) , which is a bone scaffold, a three-dimensional matrix that supports the proliferation of cells. It increases bone formation and differentiation of these cells in its levels (9). Designed bone scaffolds have the following features: 1 -Biocompatibility that plays a role in cell attachment and proliferation and should not cause toxic reactions and inflammation for cells. 2 - Biodegradability for planned safe replacement of scaffold materials with osteoid deposition. 3 -Mechanical properties to withstand weight and pressure on them during the treatment period. 4 -Proper structure in terms of porosity and pore size, which is very important for cell penetration, nutrients, transfer of waste materials and angiogenesis. 5 -Delivery and controlled release of biologically active molecules or drugs(10) . According to the cases mentioned for the synthesized bioactive scaffolds, it causes the formation of a layer of biologically active hydroxyapatite carbonate, which is structurally very similar to the mineral phase in bone, which creates a surface bond between minerals and tissue that It is the mostimportant(11). Major bone injuries are still one of the most challenging musculoskeletal problems and the use of tissue engineering - stem cells - biomaterials, scaffolds and biofactors can help solve this problem (12). In addition, stem cells and biomaterials (growth factors and extracellular vesicles) are important in bone regeneration and their use in bone scaffolds, as well as the requirements and different types of biomaterials used to construct scaffolds in many biomedical fields. including tissue engineering for bone (13) and nerve (14)has been studied and discussed. Due to the rapid development of nanoscience and technology in the past decades, nanoparticle-based biomaterials have attracted widespread attention in the fields of tissue engineering, biological technology, and biomedical sciences, among which hydroxyapatite is the most popular biomaterial. It has been mentioned in many biomedical applications, especially in bone tissue engineering, because of its special properties(15) . Gold nanoparticles, due to their unique optical properties, superior

biocompatibility, easy synthesis method and various strategies for surface modification, have been considered as outstanding nanomaterials in the field of biomedicine. The use of gold nanoparticles can be promising for bone induction for bone tissue engineering and regeneration. It was also found that gold nanoparticles prevent the osteogenic differentiation of mouse osteoblast (MC3T3-E1), inhibit the differentiation of lipids after endocytosis into the cytoplasm, and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway plays an important role in this process. showed that the bone induction properties of gold nanoparticles with different sizes and shapes are completely different, and more research is needed to improve the performance of gold nanoparticles for bone regeneration and tissue engineering(15) .

2. Material and method

2.1.Synthesis of nano hydroxyapatite-sodium alginate scaffold

A bone scaffold composed of nano hydroxyapatite and alginate was synthesized by mixing alginate powder and dissolving it in deionized water solution to a concentration of 1%, after creating a homogeneous solution, it was slowly added to it with nano hydroxyapatite powder to a concentration of 4%. To cross-link the solution, 3 mmol of calcium chloride solution was added to it. After cross-linking, they were placed in a -80°C freezer for 24 hours, and after scaffolding, they were placed in dry freezing conditions.

2.2.Characterization of scaffolds

2.2.1. Porosity test by liquid displacement method

The apparent porosity of the scaffold made by freeze-drying method was measured using the Archimedes method according to the standard ISO 39231/1-1979(E) with the principle of liquid displacement. In this way, the porosity (IP) of the constructed scaffold was checked using the following relationship:

(1) $$\text{Interconnected porosity} = \frac{W^2 - W^1}{W^2 - W^3} \times 100$$

where W1 is the weight of the dry scaffold, W2 is the weight of the scaffold after removal from absolute alcohol, and W3 is the weight of the scaffold after immersion in absolute alcohol.

2.2.2. Degradation evaluation by weight loss method

Biological degradation of bone scaffolds (nanohydroxyapatite and alginate) was evaluated in phosphate buffered saline solution with pH = 7.4 and body conditions (37°C and 5% carbon dioxide gas). Scaffolds were immersed in phosphate buffered saline and placed in a shaking incubator at 37°C. The samples were collected after three weeks and dried in a vacuum oven for 24 hours. The percentage of weight loss was measured with the following equation:

(2) $$\text{Weight loss (\%)} = \frac{W^1 - W^2}{W^1} \times 100$$

2.2.3.Degradation evaluation by weight loss method

The prepared scaffold was examined with a scanning electron microscope (MIRA3 model manufactured by TESCAN company with a resolution of 1.5 nm at a voltage of 15 kV and 4.5 nm at a voltage of 1 kV in Iran). These analyzes were used to evaluate microstructural morphology, distribution of hydroxyapatite and alginate nanoparticles, pore shape, size. For evaluation, the sample was fixed at a current of 40 mA for 60 seconds.

2.2.4.The swelling behavior of the scaffolds

The swelling behavior of prepared scaffolds in distilled water was evaluated for one, two, 4, 6 and 8 hours. This test is done to check the absorption of nutrients for the growth of the cells in the scaffold to ensure the growth of the cells on the scaffold.

2.2.5.Testing the mechanical behavior of scaffolds

The compressive mechanical strength of the hydroxyapatite-alginate scaffold was measured by Instron 5542 mechanical tester (Santam Machine, (STM-20) , Iran). this device is used to measure the mechanical strength and modulus of scaffolds. (compressive strength and modulus) The samples were placed between the handles of the Instron machine and compressed in the axial direction at a speed of 1 mm/min.

2.2.6.The evaluation of the physical and chemical properties of the scaffolds is analyzed by the FTIR-ATR (reflective mode) Fourier transfer spectrometer (to identify the spectrum of biomaterials)

The Fourier transform device (with reflective mode) was used to identify the chemical structure and functional groups of the scaffold, and to determine the presence of diffusion and expansion of the materials, the radiation spectrum of each sub-region of the scaffold was examined. First, one to two grams of sample powder (50 mg for powder samples) is mixed with a larger amount of powder (KBr) and mixed with The machine presses, compresses and transforms it into tablets and is studied by the machine with reflective radiation. The infrared absorption peaks resulting from the vibrations of bonds were observed in the wave number between 600 and 4000 cm^{-1} and were identified by comparing with the data bank of wave peaks, bonds and functional groups.

2.3. Culture of mouse osteoblast progenitor cells on scaffolds

Culture of mouse osteoblast progenitor cells - 250,000 cells per well were cultured in 48 plates. The samples were cultured in two groups: 1/ sample with bone scaffold 2/ control sample (without bone scaffold).

2.3.1. MTT assay

Biocompatibility behavior of hydroxyapatite-sodium alginate scaffolds was evaluated and survival percentage was calculated with the following formula.

(3) $$\%\text{Viability} = \frac{OD_{test}}{OD_{control}} \times 100$$

Finally, the effect of different groups of hydroxyapatite-sodium alginate scaffold on the expression of 3 main bone-related genes including RUNX2, collagen I and alkaline phosphatase was evaluated by polymerase chain reaction.

Table 1 - Primer Sequences for qRT-PCR.

GENE		primer sequences
ALP	Forward primer	5-GGGGACATGCAGTATGAATT -3´
	Reverse primer	5´GGCCTGGTAGTTGTTGTGAG-3"
Collagen 1	Forward primer	5´CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC3´
	Reverse primer	5CAGAAGGACCTTGTTTGCCAGG -3´
RUNX2	Forward primer	5´CCTGAACTCTGCACCAAGTCCT3´
	Reverse primer	5´TCATCTGGCTCAGATAGGAGGG3´

3. Results

3.1. Results of liquid transfer (porosity) test with absolute alcohol

In Figure 1, the synthesized scaffolds of hydroxyapatite and sodium alginate were calculated with an average porosity of 76.5%. Also, scaffolds containing 1% and 3% gold nanoparticles had an average porosity of 90.3% and 78.03%, respectively. As shown in Figure 1, the optimal percentage of gold nanoparticles used in the synthesis of bone scaffolds is 1%, which has increased the porosity of the scaffolds by a few percent.

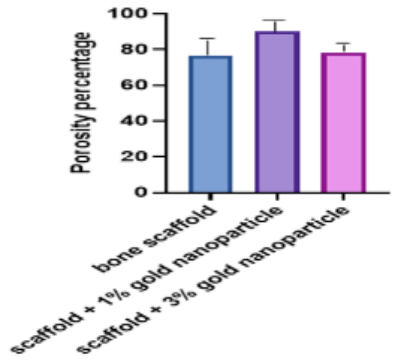


Fig. 1 - Porosity percentage graph in synthesized bone scaffolds - The top graph is average porosity in: blue column of hydroxyapatite-sodium alginate bone scaffolds without nanoparticles. Purple column of hydroxyapatite-sodium alginate bone scaffolds with 1% gold nanoparticles. The pink column shows bone hydroxyapatite-sodium alginate scaffolds with 3% gold nanoparticles.

3.2. Degradation test results

Scaffold destruction in tissue engineering is one of the essentials in scaffold design. After placing and establishing the scaffold in the body environment, it is necessary to replace the above structure after some time in the environment, cell secretions and tissue secretions. Gradually and at the same time, the natural scaffolding is built and the structure of the scaffolding is replaced and destroyed, and a new tissue is created instead of the previous one. According to Figure 2, it has been shown that the scaffolding has increased destruction by 69.57% from the first to the seventh day, and by the twenty-first day, 73.13% of the destruction was done and only 26.87% of the scaffolding volume remained.

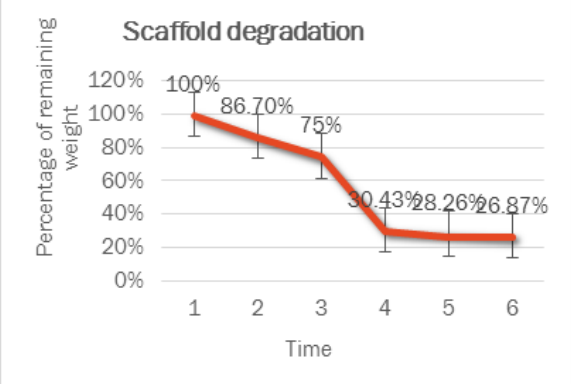


Fig. 2 - Scaffold degradation curve: In the first 24 hours, all layers have similar degradation rates. Between 24 h and 72 h, a stable degradation rate track is observed between all scaffolds. Between the third and seventh days (72 hours to 168 hours), the degradability and speed of the bone scaffold with nanoparticles show less.

3.3. The results of the morphological examination of the cells on the scaffold through the scanning electron microscope test

By using this test, which shows the adhesion and morphology of the cells on the scaffolds through a scanning electron microscope, it can be seen that nano hydroxyapatite and nano sodium alginate scaffolds have special anchors and suitable porosity and a suitable structure for cell adhesion, growth and differentiation. Figure 4 shows that the cells have grown in masses and clusters along the pore walls.

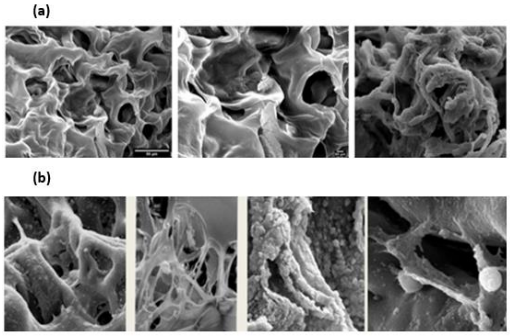


Fig. 3 - (a) SEM images of HA. (b) MC3T3-E1 cell adhesion and morphology on HA scaffolds (scale bar, 50 nm).

3.4. Results of swelling test of scaffolds

The swelling of alginate and nanohydroxyapatite bone-building scaffolds increased in the early hours, and the penetration and absorption of the environment gradually reached the saturation level.

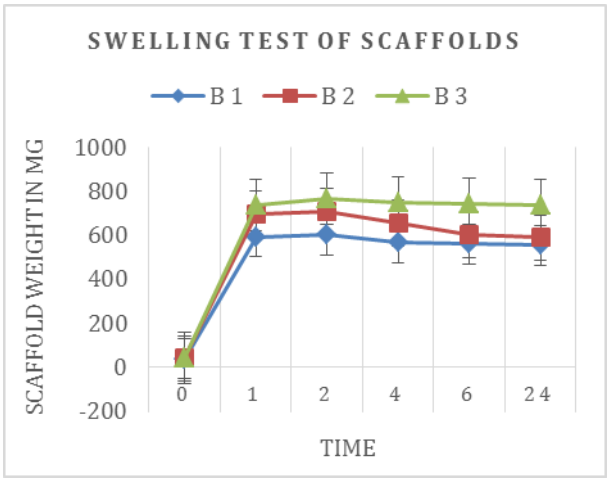


Fig. 4 - Swelling diagram of scaffolds

3.5. Mechanical strength test results

Using the diagram above, it can be seen that the presence of nano hydroxyapatite in the structure of scaffolds increases their mechanical strength compared to the diagram of scaffolds without nano hydroxyapatite. The mechanical properties of the scaffolds were investigated by means of a pressure test, and the yield stress was reported to be 3.43 MPa and the Young's modulus was reported to be 28.7 MPa, which are in the range of cancellous bone.

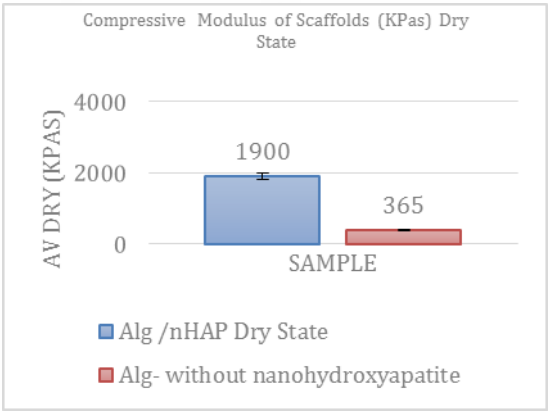


Fig. 5 - Mechanical testing of scaffolds: blue column / scaffold with hydroxyapatite nanoparticles and sodium alginate. red column: sodium alginate only.

3.6. FTIR-ATR evaluation results

According to the result obtained from the FTIR spectrum, functional groups present in the synthesized scaffolds can be seen in the graphs below.

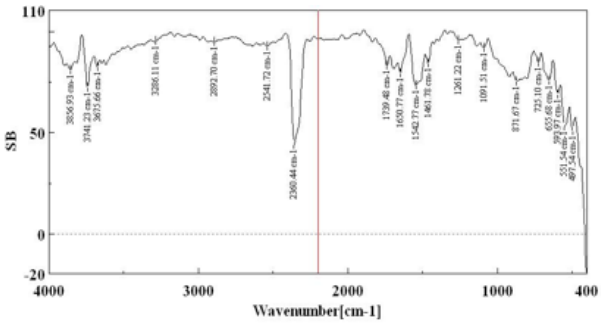


Fig. 6 - FTIR infrared spectroscopy analysis of the scaffold and its structural materials.

3.7. The results of toxicity and cell viability

According to Figure 5, the percentage of cell viability of cultured cells on nanohydroxyapatite scaffolds was obtained in 24 hours ($P < 0.05$), which did not increase significantly compared to the control group. However, the percentage of cell viability of the cultured cells on nanohydroxyapatite scaffolds was obtained at 48 and 72 hours ($P < 0.05$), which has increased significantly compared to the control group and shows that the scaffolds have increased the proliferation and differentiation of mouse osteoblast cells. Scaffolds containing gold nanoparticles increased the survival, growth and differentiation of mouse osteoblast cells by 29% compared to scaffolds without nanoparticles on the 14th day.

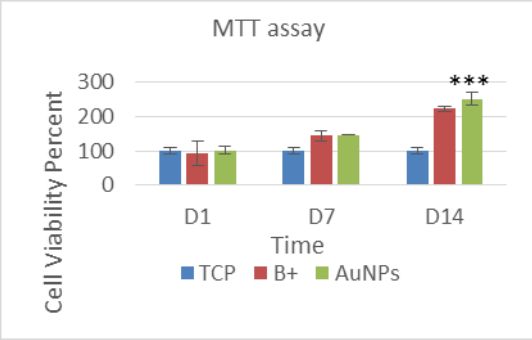


Fig. 7 - MTT test: investigating the effect of bone scaffolds containing nano hydroxyapatite in the period of 24-48-72 hours on the survival of mouse osteoblast progenitor cell line. control cell (blue column); (red column) osteoblast cells cultured on hydroxyapatite-sodium alginate scaffolds. Cultured osteoblast cells (green column) on hydroxyapatite-sodium alginate scaffolds with gold nanoparticles. The results are expressed as mean percentage of cell viability ± standard deviation (* P-Value<0.05, ** P-Value <0.01 and *** P-Value <0.001).

3.8. Gene expression results

Synthesized bone scaffolds with a new formulation increase cell growth and control the survival and expression of alkaline phosphatase and collagen 1 genes in relation to cells.

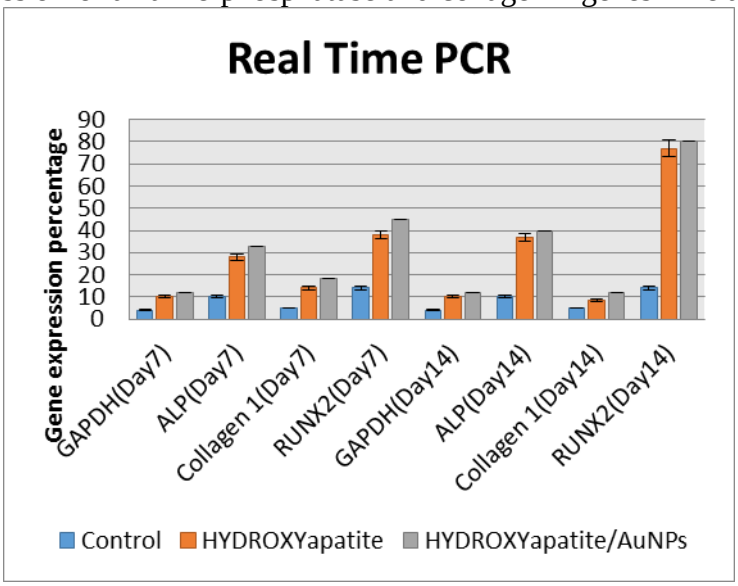


Fig. 8 - Expression of specific bone differentiation genes (ALP, Runx2, COL1) in mouse osteoblast progenitor cells after incubation. (Black columns) Expression of bone differentiation genes in osteoblast cells cultured on hydroxyapatite-sodium alginate scaffolds. (gray columns) Expression of bone differentiation genes in osteoblast cells cultured on hydroxyapatite-sodium alginate scaffold with gold nanoparticles.

4. Discussion

The resulting research is a study on scaffolds synthesized with a new formulation that increases the growth of mouse osteoblastic cells, and during this process, the gene expression of growth factors col1, Runx2 and especially alkaline phosphatase increases. Examining the graphs shows that the level of alkaline phosphatase expression and the amount of alkaline phosphatase protein increased from the 14th to the 21st day of cell culture and caused the proliferation and differentiation of cells, and then its level decreased again, which indicates a decrease in the proliferation and differentiation of cells. In a 1994 study by Maria E. Norman et al., entitled In Vitro Evaluation of Coral Porous Hydroxyapatite as a Scaffold for Osteoblast Growth, it was shown that coral HA supports the growth of osteoblast-like cells.

The results suggest that HA can provide support for osteoblast cells as part of a matrix that may prove to be osteogenic in vivo and, accordingly, enhance the bone repair process(16). In the study by Fang and Hemakaran in 2009, entitled Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells on Hydroxyapatite/Bacterial Cellulose Nanocomposite Scaffolds, it was shown that reverse transcription PCR results showed that hBMSC alkaline phosphatase (ALP) activity and osteopentin expression. Osteocalcin, bone sialoprotein and ALP mRNA were higher up to 7 days for hBMSC cultured on nanocomposites than those cultured alone. These results show that adhesion, proliferation and differentiation in cultured hBMSC can be modulated by the properties of HAp/BC nanocomposite scaffold(17). The results of this study showed that the hydroxyapatite-sodium alginate scaffold has a potential role in the process of proliferation and differentiation of osteoblast progenitor cells and can be used as a suitable therapeutic solution in the healing of extensive bone lesions. The amount of calcium and the activity of alkaline phosphatase enzyme in mesenchymal cells and osteoblasts are different from each other. Also, as shown in the figures, gold nanoparticles in hydroxyapatite and sodium alginate scaffolds increased the viability of mouse osteoblast progenitor cells and showed less toxicity.

References

1. Raquel Z. Apatites in biological systems. Progress in Crystal Growth and Characterization. 1981;4:1-45.6.

2. Ma PX, Zhang R, Xiao G, Franceschi R. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly (α-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials. 2001;54(2):284-93.

3. Liu S, Pang S, Na W, Su X. Near-infrared fluorescence probe for the determination of alkaline phosphatase. Biosensors and bioelectronics. 2014;55:249-54.

4. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clinical Orthopaedics and Related Research®. 1981;157:259-78.

5. Dubok VA. Bioceramics—yesterday, today, tomorrow. Powder Metallurgy and Metal Ceramics. 2000;39(7):381-94.

6. Rizzi S, Heath D, Coombes A, Bock N, Textor M, Downes S. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. 2001;55(4):475-86.

7. Lin HR, Yeh YJ. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. 2004;71(1):52-65.

8. Rezwan K, Chen Q, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2006;27(18):3413-31.

9. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. Chemical reviews. 2008;108(11):4742-53.

10. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. Biotechnology progress. 2009;25(6):1539-60.

11. Bose S, Avila M, Bandyopadhyay A, editors. Processing of bioceramic implants via fused deposition process. 1998 International Solid Freeform Fabrication Symposium; 1998.

12. Leung K, Fung K, Sher A, Li C, Lee K. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. The Journal of bone and joint surgery British volume. 1993;75(2):288-92.

13. Cao W, Cheng M, Ao Q, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Physical, mechanical and degradation properties, and Schwann cell affinity of cross-linked chitosan films. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2005;16(6):791-807.

14. Cao W, Wang A, Jing D, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Novel biodegradable films and scaffolds of chitosan blended with poly (3-hydroxybutyrate). Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2005;16(11):1379-94.

15. Liang H, Xu X, Feng X, Ma L, Deng X, Wu S, et al. Gold nanoparticles-loaded hydroxyapatite composites guide osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through Wnt/β-catenin signaling pathway. International Journal of Nanomedicine. 2019;14:6151.

16. Norman ME, Elgendy HM, Shors EC, El-Amin SF, Laurencin CT. An in-vitro evaluation of coralline porous hydroxyapatite as a scaffold for osteoblast growth. Clinical materials. 1994;17(2):85-91.

17. Fang B, Wan Y-Z, Tang T-T, Gao C, Dai K-R. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells on hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposite scaffolds. Tissue Engineering Part A. 2009;15(5):1091-8.

Preparation of peppermint essential oil nanoemulsion via sonication and thermal synthesis for potential hydrophobic drug delivery application

Nafise Sepahdoost[1], Elnaz Tamjid [1,*], Maliheh Soodi[2]

[1]Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

[2]Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding Author: Tamjid@modares.ac.ir

Abstract

Nanoemulsions are dispersions of small liquid droplets of one phase dispersed in another liquid known as continuous phase. They have potential applications in medical treatments due to their ability to enhance the solubility of polar substances in non-polar ones and vice versa. In this study, Design Expert software was used to prepare oil-in-water nanoemulsions with different weight percentages of peppermint essential oil and non-ionic surfactant (Tween 80) and co-surfactant (PEG 400) using the sonication method at 70^0C. The optimal drug-loading nanoemulsion formulation based on particle size and stability after one month was aimed to be obtained. The optimal nanoemulsion formulation had weight values of 11.25 wt% surfactant, 1.25 wt% co-surfactant and 12.5 wt% peppermint essential oil. It had a suitable size (<200 nm), high stability during one month at 25^0C. This formulation can be used to produce nanoemulsions for loading hydrophobic drugs soluble in peppermint essential oil.

Keywords: Peppermint Oil; Oil-in-water Nanoemulsion; Tween 80; PEG 400; Drug Delivery; Sonication

Introduction

Peppermint essential oil (PO) is an aromatic substance extracted from the herb Mentha piperita, Lamiaceae family. PO has various uses in therapy, cosmetics, and agriculture, because it has properties that are antioxidant, antibacterial, antifungal, insecticidal, and larvicidal, as well as beneficial effects on human health. PO mainly contains menthol and menthone, along with other monoterpenes and oxygenated monoterpenes. Although PO has some drawbacks like poor water solubility, high volatility, and strong aroma, which may affect its efficacy and stability, it can be used as a botanical pesticide to control insects and weeds, as well as a therapeutic agent for migraine, dizziness, and insomnia [1-5].

Nanoemulsions are a type of small droplets that can hold and transport substances that have biological effects, such as natural oils extracted from plants. They are kinetically stable dispersions of liquid droplets in another liquid, with a particle size ranging from 10 nm to about 100 nm, and sometimes up to 300 nm in some researches and applications. This small size of particles results in a high surface-to-volume ratio and also enhances their stability. Since the size of nanoemulsions is smaller than the wavelength of visible light, their appearance is transparent to milky. Nanoemulsions typically consist of oil, water and one or two emulsifiers. Nanoemulsion essential oil (NEO) is a type of oil-in-water (o/w) nanoemulsion that can encapsulate and deliver essential oils (EOs) in a stable and effective mode. Compared to conventional emulsions or commercial oils, NEO offers several advantages, such as increased bioavailability, reduced toxicity, enhanced functionality, and improved organoleptic properties. NEO is a potential solution to overcome the limitations of EOs in different applications, including food preservation, crop protection, disease management, and pharmaceuticals. In addition, NEO can enhance the antimicrobial and antioxidant activities of EOs against various microorganisms and oxidative agents. The preparation of NEO can be achieved using high-energy emulsification methods such as high-pressure homogenization or sonication. The physicochemical properties and stability of NEO depend on the oil phase composition and nature, the emulsifier system, and the environmental conditions. Optimization of NEO formulation can be achieved using response surface methodology or other statistical tools [6-13].

In the present research, 20 different formulations were synthesized according to the data extracted from the Design Expert software at 70℃, then the formulation was optimized by examining the particle size using dynamic light scattering (DLS) analysis to investigate their visual stability for up to one month. Finally, the optimum formulation was selected based on the higher oil content to increase the solubility of the drug in the hydrophobic phase and lower surfactant and co-surfactant content to reduce possible toxicity effects. Furthermore, the optimum formulation was analyzed using Fourier transform infrared (FTIR) analysis to evaluate the functional groups available on the surface of the NEO.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Polyethylene glycol 400 (PEG 400), and non-ionic surfactant Tween 80 were purchased from Merck (USA), and Merck KGaA (Germany), respectively. Deionized water was supplied by Seblan (Iran), and the Peppermint essential oil was kindly donated by Dineh Pharmaceutical Company (Iran) for the present research.

2.2 NEO preparation and characterization

2.2.1 Design of Experiment

To find the optimal NEO system for drug loading, experimental design was performed using Design Expert (Version 12.0. Minneapolis: Stat-Ease, 2020). In this design, the minimum and maximum amounts of surfactant, co-surfactant and essential oil were specified in Table 1. Then, the combination of these three materials was determined as the first variable, SCO, and the water content as the second variable. These values were also specified in Table 1. Finally, the proportions of surfactant, co-surfactant and EO were calculated based on the specified percentage for SCO. Then the samples with high percentages of surfactant and co-surfactant were eliminated and finally 20 tests were selected for the next stage.

Table 1- Minimum and maximum values of surfactant, co-surfactant, PEO, SCO and water input in Design Expert software

Name	Type	Low	High
Sur	Component	5	80
CoSur	Component	5	80
PEO	Component	10	85
SCO	Component	10	40
Water	Component	60	90

2.2.2 NEO preparation

For the NEO synthesis, the percentages found in 20 experiments specified by the Design Expert software were used. First, the amounts of surfactant and co-surfactant specified by the scale were weighed with an accuracy of 0.001 g and added to the mixture, called S-mix[1]. Then, it was thoroughly stirred at 900 rpm for 5 minutes on a stirrer at 70°C. Next, the weighed amount of EO was added to the solution and mixed for 15 minutes at 900 rpm at the same temperature. Since the EO contained volatile substances, the lid of the beaker was completely sealed with parafilm from this point on. After that, a specific volume of deionized water was dropwise added to the solution over a period of three minutes, and then sonicated

[1] Surfactant mixture

for 10 minutes with duty cycle of 80%. Therefore, the NEOs were stored in microtubes for further tests.

2.2.3 Mean particle size determination

After synthesizing 20 designed formulations, each NEO was diluted with deionized water at a ratio of 1:100 and the mean particle size of the nanoparticles was measured using a DLS device at a temperature of 25°C with an angle of 90°. It is worthy to note that the mean particle size of the NEOs does not change by diluting the formulation after synthesis [14, 15].

2.2.4 Nanoemulsion stability

The stability of 20 NEO formulations was visually assessed by keeping them at room temperature for one month. Finally, the best sample was selected based on the three criteria of remaining as a single phase, desired size, and having the maximum amount of EO to increase the solubility of the drug.

2.2.5 Fourier transform infrared spectroscopy:

Finally, FTIR analysis was used to analyze the surface functional groups in the selected NEO. For this analysis, 200 µL of the synthesized NEOs were poured into a microtube and dried for 48 hours by freeze-drying method, and then the absorption spectrum of the substance was measured with an FTIR device (Spectrum 1, PerkinElmer, USA).

3 Results and Discussions

3.1 NEO Synthesis and Characterization

3.1.1 Design of Experiment and Mean Particle Size Determination

The composition of NEOs, based on the final formulations obtained from Design Expert software, are summarized in Table 2. The particle size of synthesized NEOs measured by DLS, and the visual stability of the NEOs evaluated for up to one month, are presented in Table 2. Fig 1a shows the images of the stability of NEOs.

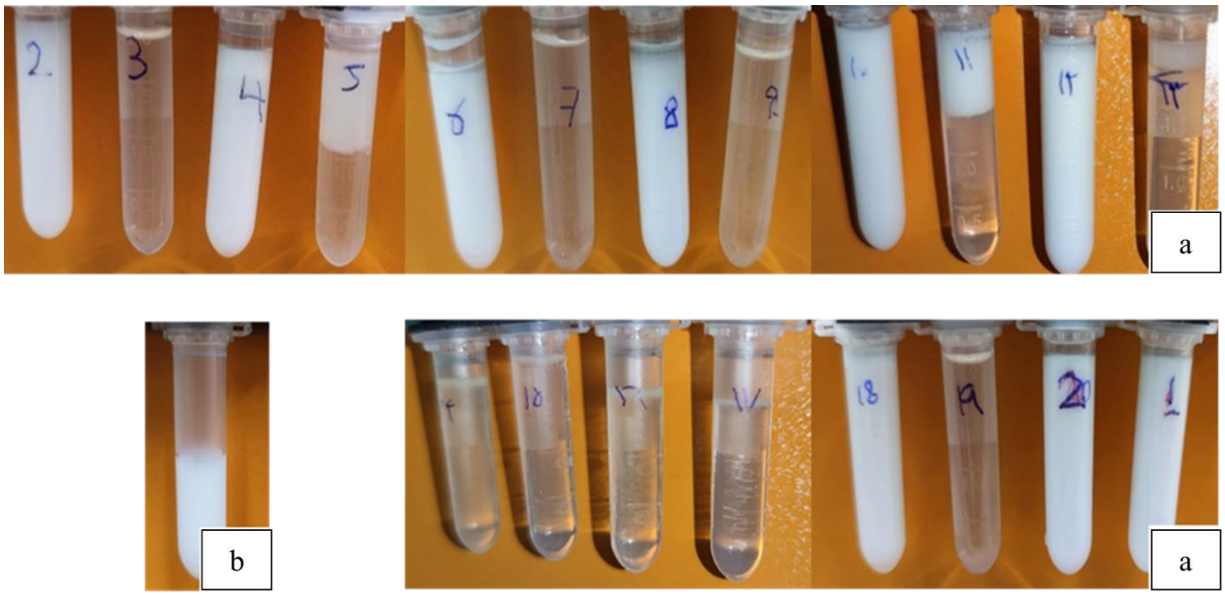


Figure 1. (a) Stability results of 20 formulations obtained from Design Expert software after one month. (b) The selected NEO.

Table 2- Size and stability of 20 NEO formulations obtained from Design Expert software and DLS device

Run	A:Sur (g)	B:CoSur (g)	C:Oil (g)	E:Water (ml)	Size (nm)	Stability
1	0.25	0.125	2.125	7.5	483.5	Milky one-phase
2	0.554	0.554	0.642	8.25	30.2	Milky one-phase
3	1.4	0.49	0.614	7.5	15.04	Transparent one-phase
4	1.03	1.03	1.19	6.75	73.49	Milky two-phase
5	1.8	1.8	0.4	6	82.94	Milky two-phase
6	0.05	0.1	0.85	9	240	Milky one-phase
7	0.45	0.05	0.5	9	477.7	Transparent one-phase
8	0.2	0.4	3.4	6	216.3	Milky one-phase
9	2	0.25	0.25	7.5	59.76	Transparent one-phase
10	1.125	0.125	1.25	7.5	58.35	Milky one-phase
11	1.8	0.2	2	6	88.51	Milky two-phase
12	0.2	0.4	3.4	6	294.4	Transparent one-phase
13	1.125	1.125	0.25	7.5	168.6	Milky two-phase
14	3.2	0.2	0.6	6	370.7	Milky one-phase

15	0.8	0.05	0.15	9	200.6	Transparent one-phase
16	3.2	0.2	0.6	6	249.7	Transparent two-phase
17	0.56	0.199	0.246	9	28.78	Transparent one-phase
18	0.78	2.23	0.98	6	503.8	Milky two phase
19	0.45	0.45	0.1	9	685.7	Transparent one-phase
20	0.05	0.1	0.85	9	273.4	Transparent one-phase

As shown in Table 2, the particle size of NEOs varied among the 20 formulations. Only samples 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 13 and 17 had a size of less than 200 nm, which was within the desired range. However, among these samples, only 2, 3, 9, 10 and 17 remained as one-phase and stable after one month. The others exhibited biphasic behavior, indicating their instability. It is worthy to note that the final criterion for selecting the optimal formulation was the minimum amount of surfactant and co-surfactant and the maximum amount of EO. Based on this criterion, samples 9 and 17 were eliminated due to their low EO content. Sample 3 also had a high S-mix to EO ratio. Therefore, sample 10 was chosen as the final formulation, as it had a suitable size (< 200 nm), stability for up to one month, and no precipitation or phase separation of the NEO. Table 3 shows the particle size measurement via DLS for selected NEOs.

Table 3- Particle size measurement results with DLS for selected NEOs[1]

Run	Size (nm)	PDI	A:Sur (g)	B:CoSur (g)	C:Oil (g)	D:DI Water (ml)
10.1	58.35	0.264	1.125	0.125	1.25	7.5
10.2	85.62	0.214	1.125	0.125	1.25	7.5
10.3	75.35	0.322	1.125	0.125	1.25	7.5
Mean±SD	73.11±13.77	0.2667±0.05405	-	-	-	-

After finding the optimal formulation, the synthesis was repeated twice for formulation 10 to ensure its reproducibility. In Table 3, the first, second and third repetitions of formulation 10 are marked with 10.1, 10.2 and 10.3, respectively. The average size of the NEO droplets was 73.11±13.77 nm with a particle dispersion index (PDI) of 0.2667±0.05405. The PDI was within the acceptable range ($\leq$ 0.3 or less) [16].

1

3.1.2 FTIR

The chemical composition of the NEOs were examined by FTIR spectroscopy. The spectra shown in the Figure. 2, demonstrated the characteristic peaks that corresponded to the functional groups of the surfactant, co-surfactant, and EO molecules. PEO has various terpenoids and aromatic compounds that have peaks in the range of 1300-1700 cm^{-1} due to C=C and C-H vibrations. It also has a broad peak in the range of 3100-3700 cm^{-1} due to O-H vibrations of phenols and alcohols. Tween80 is a nonionic surfactant that has an ester group and a polyethylene glycol chain that have peaks at 1735 cm^{-1} and 1000-1200 cm^{-1} due to C=O and C-O vibrations, respectively. PEG400 is a water-soluble polymer that has repeating $-OCH_2CH_2-$ units that have peaks in the range of 2850-2940 cm^{-1} and 1247 cm^{-1} due to C-H and C-O vibrations, respectively. These results suggest that the emulsifiers and EO were successfully incorporated into the NEO.

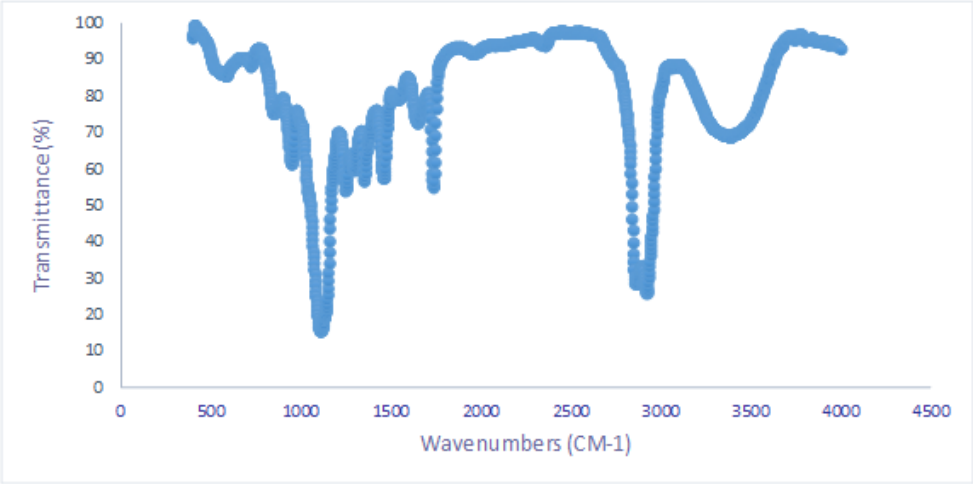


Figure2. FTIR spectrum of the stable NEO sample 10.

Conclusions

The particle size, stability after one month and the minimum amount of surfactant and co-surfactant in relation to oil were examined for different samples. Sample 10, with 11.25% w/w of surfactant, 1.25 % w/w of co-surfactant and 12.5 % w/w of PEO, had the best percentages for NEO synthesis. Using a temperature of 70°C for the synthesis of NEOs will help to dissolve drugs with crystalline forms, which will leave their crystalline state and dissolve in PO up to this temperature. This formulation can be used to load lipophilic drugs that have good solubility in the EO due to its appropriate particle size (< 200 nm), stability during 30 days, and the high ratio of oil to surfactant and co-surfactant. The oil-in-water formulation developed in this study is of potential interest for drug delivery systems of any hydrophobic drug soluble in PEO.

References

1. Liu, Q., et al., *Preparation of peppermint oil nanoemulsions: Investigation of stability, antibacterial mechanism and apoptosis effects.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021. **201**: p. 111626.
2. Liang, R., et al., *Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions.* Journal of agricultural and food chemistry, 2012. **60**(30): p. 7548-7555.
3. Heydari, M., et al., *Eco-friendly pesticide based on peppermint oil nanoemulsion: Preparation, physicochemical properties, and its aphicidal activity against cotton aphid.* Environmental Science and Pollution Research, 2020. **27**: p. 6667-6679.
4. Maurya, A., et al., *Essential oil nanoemulsion as eco-friendly and safe preservative: Bioefficacy against microbial food deterioration and toxin secretion, mode of action, and future opportunities.* Frontiers in Microbiology, 2021: p. 3326.
5. Franklyne, J., A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran, *Essential oil micro-and nanoemulsions: promising roles in antimicrobial therapy targeting human pathogens.* Letters in applied microbiology, 2016. **63**(5): p. 322-334.
6. Falleh, H., et al., *Peppermint and Myrtle nanoemulsions: Formulation, stability, and antimicrobial activity.* LWT, 2021. **152**: p. 112377.
7. Barzegar, H., et al., *Fabrication of peppermint essential oil nanoemulsions by spontaneous method: Effect of preparing conditions on droplet size.* Flavour and Fragrance Journal, 2018. **33**(5): p. 351-356.
8. Yakoubi, S., et al., *Essential-oil-loaded nanoemulsion lipidic-phase optimization and modeling by response surface methodology (RSM): Enhancement of Their antimicrobial potential and bioavailability in nanoscale food delivery system.* Foods, 2021. **10**(12): p. 3149.
9. Sugumar, S., et al., *Essential oil-based nanoemulsion formation by low-and high-energy methods and their application in food preservation against food spoilage microorganisms,* in *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. 2016, Elsevier. p. 93-100.

10. Salvia-Trujillo, L., et al., *Edible nanoemulsions as carriers of active ingredients: A review.* Annual review of food science and technology, 2017. **8**: p. 439-466.
11. Harwansh, R.K., R. Deshmukh, and M.A. Rahman, *Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives.* Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2019. **51**: p. 224-233.
12. Rys, M., et al., *Bio-herbicidal potential of nanoemulsions with peppermint oil on barnyard grass and maize.* Molecules, 2022. **27**(11): p. 3480.
13. da Silva, B.D., et al., *Essential oil nanoemulsions: Properties, development, and application in meat and meat products.* Trends in Food Science & Technology, 2022.
14. Chen, C.-Y., T.-Y. Tsai, and B.-H. Chen, *Effects of black garlic extract and Nanoemulsion on the deoxy corticosterone acetate-salt induced hypertension and its associated mild cognitive impairment in rats.* Antioxidants, 2021. **10**(10): p. 1611.
15. Pangeni, R., et al., *Oral delivery of quercetin in oil-in-water nanoemulsion: In vitro characterization and in vivo anti-obesity efficacy in mice.* Journal of functional foods, 2017. **38**: p. 571-581.
16. Cunha, S., et al., *Improving drug delivery for Alzheimer's disease through nose-to-brain delivery using nanoemulsions, Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and in situ hydrogels.* International journal of nanomedicine, 2021: p. 4373-4390.

Cobalt nanostructures as potential materials for glucose sensors

Asma Khoobi*

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan 98135-674, Iran

Corresponding Author's E-mail Address: a.khoobi@science.usb.ac.ir

Abstract

The remarkable importance of electrode materials in energy, industrial processes, sustainability and diabetes monitoring has captivated scientists to improve advance nanostructured materials for the benefit of life across the globe. Glucose sensors have been widely developed due to their wide applications, especially in diabetes diagnosis. Electrochemical enzymatic glucose sensors are generally applied in daily life for glucose monitoring and commercially successful as glucose-meters because they display high reliability, excellent selectivity, and can be handled under physiological pH conditions. However, because of some disadvantages of enzymes, such as high cost and poor stability, non-enzymatic glucose sensors have attracted increasing research interest in recent years because of their low high stability, cost, low detection limit, and prompt response. Additionally, the growth of nanotechnology has also presented new opportunities to design nanostructured sensors for glucose sensing applications. With distinguished advantages, metals and metals oxides have garnered broad effort in the development of cost effective electrodes with high sensitivity, stability, and quick response for the detection of glucose by electrochemical oxidation. Therefore, various non-enzymatic glucose electrodes based on different metals and metals oxides such as Co_3O_4, CuO/Cu_2O, ZnO, NiO, MnO_2, etc. and their nanocomposites have been reported in literature.

Keywords: Glucose sensors, material electrodes, Pt nanostructures, Diabetes

1. Introduction

The last few decades have seen tremendous research interests on synthesis, characterization, molecular designing, and functionalization of novel nanostructured materials. Usually, materials with sizes less than 100 nm in at least one dimension with enhancement properties are known as nanostructured materials. The properties of nanostructured materials are obtained by organizing of atoms within the crystal lattice and therefore, specific surface area is obtained. These materials usually hold many voids in atomic, molecular or nanometer dimensions and have controllable sizes which permit them to interact more capably with their environment. Recently, there are many reports about the construction of electrochemical transducer platforms. However, nanostructured materials have been used to create numerous functions in the design of biosensors [1]. Biosensors were first presented by Leland Clark in 1962 [2]. A biosensor is introduced as an analytical device which relies on the immobilization of bio-molecules on a transducer surface. Many attempts have been accomplished which have aimed to improve novel biosensor assemblies and immobilization schemes based on the integration of innovative materials [3]. A biosensor must be cost-effective, fast, and stable for selective and sensitive detection of the analyte. Among the different groups of biosensors, electrochemical biosensors have gained special attention in the scientific community [4]. The capability of electrochemical biosensors to replace bulky and expensive analytical apparatuses has motivated scientists to study this field by theoretical and experimental mechanisms.

Electrochemical biosensors contain two groups: potentiometric and amperometric sensors. Biosensors based on potentiometric techniques use in ion-selective electrodes to transduce the biological reaction into an electrical response. In the simplest terms this involves of an immobilized enzyme membrane surrounding the probe from a pH-meter, where the catalyzed reaction generates or absorbs hydrogen ions. The amperometric technique is the usually applied in electrochemical biosensors. Amperometric biosensors act based on the redox output electrochemical response under a potential. Amperometric biosensors act by the creation of a current when a defined potential is used between electrodes and the analyte undergoes, or is involved in, a redox reaction that can be performed by measuring the current in an electrochemical cell [5]. The analytical figures of merit of an electrochemical biosensor are connected with the properties of the transducer surface. For instance, changing in the ionic condition and pH of media can change the response of electrochemical biosensors [6]. The area has received significant attention in recent years but there is many address to improve the analytical responses of the electrochemical biosensors. Therefore, researchers have organized the transducer surface with nanostructured materials to overcome the aforementioned problems. Also, nanostructured materials are recognized to amplify the electrochemical signal in the design of biosensors. Nanostructured materials are characterized by improved catalytic properties, large surface area, and ease of surface modification with a change of functional groups. Their large surface area allows the effective immobilization of the biomolecules on the transducer surface, resulting in improved sensitivity of the biosensors. Additionally, nanostructured materials are considered to promote the electron transfer rate of the transducer surface. Various nanostructured materials have been generally explored to organize electrodes of interest for many fields. These nanostructured materials contain carbon-based, metal/metal oxide, and composite nanoparticles. Different morphologies, shapes, sizes, and compositions of nanostructured materials are estimated to offer a major role in performing numerous functions in sensing

systems. However, controlled synthesis of nanostructured materials is key to obtaining the desired functions [7].

2. Diabetes

Diabetes is a metabolic disorder and a main world health problem. This epidemic not only threatens individual health but also presents one of the greatest current barriers to sustainable development and economic growth. The key to diagnosis and organization of diabetic patients is to precisely control and monitor the glucose level in the body [8]. The physiological glucose level has to be repeatedly tested to avoid complications and diabetic emergency, such as hypoglycaemia (low blood sugar less than 3 mM) [9]. With respect to the notably large financial burden caused by diabetes and serious complications, glucose monitoring has become important in terms of battling diabetes and reducing financial loss. Thus, the development of reliable low-cost glucose sensors with high selectivity and sensitivity has profound economic and social significance, and has aroused worldwide interest for decades.

3. Glucose Monitoring

The monitoring of blood glucose levels for the continuous care of patients with diabetes is achieved by different glucose biosensors. Since the happening of diabetes is growing, novel glucose biosensors based on point of care testing (POCT), for instance wearable sweet-based sensors and non-invasive methods for glucose detection, have been reported [10]. The significance of glucose sensing based on POCT has been widely well-known by medical professionals and by patients. Additionally, optical sensors have been organized for the visual detection of glucose. Optical methods can be suitable for qualitative analysis but are characterized by poor sensitivity for quantitative determinations. Also, conventional analytical methods need complex instruments and skilled personnel to control them and they are unsuitable for on-site analysis. Therefore, glucose biosensors have been introduced for consistent, accurate, fast, and easy to operate monitoring of glucose levels. Nanostructured materials have been used to replace the enzyme in the detection of glucose [11]. Non-enzymatic electrochemical sensors apply nano-hybrids such as metal, metal oxide, carbon based materials and etc. [12]. Although such constructs are non-enzymatic, they are characterized by transducer surface fouling, low selectivity, and the non-specific adsorption of the sample matrix. Despite notable improvements in glucose detection, there are still some limits associated with the fabrication of consistent glucose analysis. Therefore, the past nearly 50 years have observed incredible development in the development of electrochemical glucose devices using nanotechnology. Thus, with improvements in nanotechnology, numerous nanostructured materials have been explored with unique characteristics including large surface area, low cost, robustness to harsh conditions, and ease of manipulation to construct electrochemical glucose biosensors. In this context, researchers have been developed the integration of various nanostructured materials to design glucose biosensors. Zhu et al. reported a review paper based on carbon materials for electrochemical glucose biosensors [13]. Rahman et al. reported the role of different nanostructured materials metal-oxides for glucose biosensors [14].

4. Cobalt based non-enzymatic glucose sensors

Cobalt oxide is a main group of metal oxides used in enzymeless glucose sensors, and has three polymorphs containing CoO, Co_2O_3 and Co_3O_4 [15]. Co_3O_4 compared with two other polymorphs, has involved extra interest in many fields. For non-enzymatic glucose sensors, Co_3O_4 has been established as a promising material due to its environmentally benign nature, low cost, relatively good electrocatalytic and conductivity properties [16].Y. Ding et al. were report a non-enzymatic glucose sensor based on Co_3O_4. In the paper, Co_3O_4 nanofibers were designed by a two-step process containing of electrospinning and calcination. The results indicated that the electrochemical redox reaction of Co_3O_4 needs the involvement of hydroxide ion. Also, they proposed a mechanism to present the electrochemical oxidation of glucose at the surface of Co_3O_4 nafion/glassy carbon electrode, proposing that such oxidation of glucose was generally mediated by the CoO_2/CoOOH redox pair rather than Co_3O_4/CoOOH on the surface of working electrode in alkaline electrolyte media. Furthermore, the glucose does not dissociate upon adsorption onto the active site on Co_3O_4 while it is generally consumed by the electrooxidation process. The as-prepared Co_3O_4 nanofibers based glucose sensor presented a low limit of detection of 0.97 mM (S/N = 3). The results suggested that the low limit of detection and high sensitivity can be attributed to the excellent catalytic properties of the Co_3O_4 nanofibers. The effect can be attributed to the highly porous 3D network of Co_3O_4 nanofibers which can create high specific surface area and numerous active sites that increases the access of analytes to the active catalytic sites with minimal diffusion resistance. Furthermore, the Co_3O_4 nanofibers modified sensor was free from poisoning even at high level of concentration of NaCl [17]. L. Kang et al. reported synthesis of nanoporous Co_3O_4 nanowires (NCoNWs) by a two-step procedure containing hydrothermal growth of Co NW precursors and following calcination of the precursors in air. The Co NW precursors presented diameters ranging from 200- 300 nm with a smooth surface. Then, annealing step was happened and porous Co_3O_4 NWs were formed with a rough surface and reduced length compared with the Co_3O_4 NW precursors. Under the optimized conditions, the modified electrode showed a low limit of detection of 5 mM (S/N = 3) [18]. C. Guo et al. reported Co_3O_4 microspheres that synthesized by a hydrothermal process and studied as a non-enzymatic glucose electrode. The Co_3O_4 samples exhibited a quasi-spherical structure with 8 mm in diameter, where the CTAB-Co_3O_4 sample presented urchin-like microspheres with the diameter of 9.5 mm. Also, individual microspheres were assembled with various free-standing nanofibers. The CTAB-Co_3O_4 modified sensor showed a higher sensitivity containing 1440 μA mM^{-1} cm^{-2} than the Co_3O_4 electrode containing 670.5 μA mM^{-1} cm^{-2} because of the large transport channels and improved contact area of the CTAB-Co_3O_4 sample, and therefore, a faster response time of 2 s than 3 s for Co_3O_4 [19]. Also, further improve the overall performance of the Co_3O_4-based electrocatalyst for glucose monitoring has been obtained by the formation of hybrids with other metals, oxides, carbon, and etc. [20-24].

Among the previous reports, researchers applied various controllable procedures to design different Co_3O_4 nanostructures with different morphologies such as nanorods, nanofibers, nanoflowers, and etc. Actually, most of the nanostructured materials were aggregates of large amounts of nanoparticles, only in a regular way. The nanostructured materials create a high surface area with more channels for electron transfer and therefore, increase accessibility of analytes to the electrocatalysts. In contrast, bulk Co_3O_4 cannot be exhibit a sufficient performance for glucose monitoring because of the lack of sufficient active sites. Thus,

tailoring the size and designing the nanostructure materials can be a promising strategy to generate large electroactive sites which would advantage the electrocatalytic performance as electrodes for glucose sensors. Further, application the nanostructured materials with conductive supports, such as carbonaceous materials, metals, or other compounds, can be another approach to increase the electron transfer, therefore improving the overall conductivity of the modified electrodes in glucose sensors [25].

5. Conclusions

This study introduced the current and developing state of technology concerning nanostructured cobalt-based glucose sensors. Metal oxides have many illustrious characteristics in view of their own intrinsic properties, such as diversity, low-cost, facile preparation, stability, biocompatibility, and functionalization among others. However, compared with metallic catalysts, lower conductivity and electrocatalytic activity are the key obstacles to the commercialization of metal oxide based glucose sensors. Therefore, much effort has been launched to conjugate metals and heterogeneous metal oxides in order to avoid such drawbacks and increase their overall performance in applications of non-enzymatic glucose electrodes. Currently, a variability of nanostructured materials such as cobalt nanostructures have been fabricated and introduced by researchers throughout the world, and their special properties will offer new opportunities and inspirations for further improvement of metal oxide based enzyme-free glucose sensors.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support from the Research Council of the University of Sistan and Baluchestan.

References

[1] Clark Jr, L. C., Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, *102*(1), 29-45.

[2] Sagadevan, S., Periasamy, M. (2014). Recent trends in nanobiosensors and their applications-a review. Rev Adv Mater Sci, 36(2014), 62-69.

[3] Kalcher, K. (2017). Renaissances and current trends with electrochemical sensors and biosensors. Int. J. Biosens. Bioelectron, 3, 00083.

[4] Batool, R., Rhouati, A., Nawaz, M. H., Hayat, A., Marty, J. L. (2019). A review of the construction of nano-hybrids for electrochemical biosensing of glucose. Biosensors, 9(1), 46.

[5] D'Orazio, P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. Clinica chimica acta, 334(1-2), 41-69.

[6] Schöning, M. J., Poghossian, A. (2002). Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs). Analyst, 127(9), 1137-1151.

[7] Zhu, H., Li, L., Zhou, W., Shao, Z., Chen, X. (2016). Advances in non-enzymatic glucose sensors based on metal oxides. Journal of Materials Chemistry B, 4(46), 7333-7349.

[8] Zhu, Z., Garcia-Gancedo, L., Flewitt, A. J., Xie, H., Moussy, F., Milne, W. I. (2012). A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene. Sensors, 12(5), 5996-6022.

[9] Lin, T., Gal, A., Mayzel, Y., Horman, K., Bahartan, K. (2017). Non-invasive glucose monitoring: a review of challenges and recent advances. Curr. Trends Biomed. Eng. Biosci, 6(5), 1-8.

[10] Nasir, M., Nawaz, M. H., Latif, U., Yaqub, M., Hayat, A., Rahim, A. (2017). An overview on enzyme-mimicking nanomaterials for use in electrochemical and optical assays. Microchimica Acta, 184, 323-342.

[11] Su, S., Lu, Z., Li, J., Hao, Q., Liu, W., Zhu, C. Wang, L. (2018). MoS 2–Au@ Pt nanohybrids as a sensing platform for electrochemical nonenzymatic glucose detection. New Journal of Chemistry, 42(9), 6750-6755.

[12] Zhu, Z., Garcia-Gancedo, L., Flewitt, A. J., Xie, H., Moussy, F., Milne, W. I. (2012). A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene. Sensors, 12(5), 5996-6022.

[13] Rahman, M.M.; Ahammad, A.J.S.; Jin, J.H.; Ahn, S.J.; Lee, J.J. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. Sensors 2010, 10, 4855–4886.

[14] Shinde, V. R., Mahadik, S. B., Gujar, T. P., Lokhande, C. D. (2006). Supercapacitive cobalt oxide (Co3O4) thin films by spray pyrolysis. Applied Surface Science, 252(20), 7487-7492.

[15] [15] Q. Balouch, Z. H. Ibupoto, G.Q. Khaskheli, R. A. Soomro, Sirajuddin, M. K. Samoon and V. K. Deewani, J. Electron.Mater., 2015, 44, 3724–3732.

[16] Ding, Y., Wang, Y., Su, L., Bellagamba, M., Zhang, H., Lei, Y. (2010). Electrospun Co3O4 nanofibers for sensitive and selective glucose detection. Biosensors and Bioelectronics, 26(2), 542-548.

[17] Kang, L., He, D., Bie, L., Jiang, P. (2015). Nanoporous cobalt oxide nanowires for non-enzymatic electrochemical glucose detection. Sensors and Actuators B: Chemical, 220, 888-894.

[18] Guo, C., Zhang, X., Huo, H., Xu, C., Han, X. (2013). Co_3O_4 microspheres with free-standing nanofibers for high performance non-enzymatic glucose sensor. Analyst, 138(22), 6727-6731.

[19] Madhu, R., Veeramani, V., Chen, S. M., Manikandan, A., Lo, A. Y., Chueh, Y. L. (2015). Honeycomb-like porous carbon–cobalt oxide nanocomposite for high-performance enzymeless glucose sensor and supercapacitor applications. ACS applied materials & interfaces, 7(29), 15812-15820.

[20] Wang, X., Dong, X., Wen, Y., Li, C., Xiong, Q., Chen, P. (2012). A graphene–cobalt oxide based needle electrode for non-enzymatic glucose detection in micro-droplets. Chemical Communications, 48(52), 6490-6492.

[21] Lang, X. Y., Fu, H. Y., Hou, C., Han, G. F., Yang, P., Liu, Y. B., Jiang, Q. (2013). Nanoporous gold supported cobalt oxide microelectrodes as high-performance electrochemical biosensors. Nature communications, 4(1), 2169.

[22] Chen, T., Li, X., Qiu, C., Zhu, W., Ma, H., Chen, S., Meng, O. (2014). Electrochemical sensing of glucose by carbon cloth-supported Co_3O_4/PbO_2 core-shell nanorod arrays. Biosensors and Bioelectronics, 53, 200-206.

[23] Ramasamy, R., Ramachandran, K., Philip, G. G., Ramachandran, R., Therese, H. A. (2015). Design and development of Co_3O_4/NiO composite nanofibers for the application of highly sensitive and selective non-enzymatic glucose sensors. RSC Advances, 5(93), 76538-76547.

[24] Haldorai, Y., Kim, J.Y., Vilian, A.E., Heo, N.S., Huh, Y.S. and Han, Y.K., 2016. An enzyme-free electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/Co3O4 nanospindle composite for sensitive detection of nitrite. Sensors and Actuators B: Chemical, 227, pp.92-99.

[25] Naikoo, G. A., Arshad, F., Hassan, I. U., Omar, F. B., Tambuwala, M. M., Mustaqeem, M., Saleh, T. A. (2023). Trends in bimetallic nanomaterials and methods for fourth-generation glucose sensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 117042.

The Role of Microalgae in Drug Delivery

Javad Karimi [1,2]*

[1]Department of Biology, School of Science, Shiraz University, Shiraz, 71454, Iran
[2]Centre for Environmental Studies and Emerging Pollutants (ZISTANO), Shiraz University, Shiraz, 714545, Iran

*Corresponding author: javadkarimi@shirazu.ac.ir

Abstract

Microalgae have emerged as a promising platform for drug delivery due to their unique properties such as high surface area, biocompatibility, and ability to produce various bioactive compounds. This article provides a brief overview of the role of microalgae in drug delivery systems. This article discusses various strategies employed to inhibit the potential of microalgae, including encapsulation, surface modification, and targeted delivery. In addition, it examines the challenges and future prospects in this rapidly evolving field. In general, drug delivery systems based on microalgae hold great promise for improving the efficacy and safety of therapeutic agents.

Key words: Role, Microalgae, Drug Delivery, Biocompatibility, Bioactive Compounds.

1- Introduction

Microalgae, a diverse group of photosynthetic microorganisms, have gained significant attention in various fields due to their potential applications in biotechnology and medicine. In recent years, researchers have explored the use of microalgae in drug delivery systems to overcome the limitations of conventional drug delivery platforms. Types of Microalgae Used in Drug Delivery Microalgae encompass a wide range of species, including *Chlorella*, *Spirulina*, and *Dunaliella*, among others. Each species possesses distinct characteristics that can be exploited for drug delivery purposes.

2- Advantages of Microalgae for Drug Delivery

Microalgae offer several advantages as drug delivery vehicles. These include their large surface area, biocompatibility, ease of cultivation, and ability to synthesize bioactive compounds [1]. This subsection highlights the key advantages of microalgae that make them well-suited for drug delivery applications. Selection and isolation of microalgae strains with desirable properties are significant for the successful development of drug delivery systems [2]. Strategies used to select and isolate microalgae strains for drug delivery, including screening techniques, genetic engineering, and optimization of culture conditions, are essential [3]. Microalgae have inherent encapsulation properties that make them suitable for drug delivery applications [4]. Aspects such as composition of microalgal cell walls, entrapment of drugs in microalgal biomass, and protection and controlled release of encapsulated drugs are important [4, 5]. Encapsulation Techniques for Drug Loading Various encapsulation techniques have been used to load drugs into microalgae [4]. Physical encapsulation, chemical composition, and bioengineering approaches, their advantages, limitations, and potential applications in drug delivery are a detailed discussion that is beyond the scope of this study [6].

3- Controlled Release Systems Using Microalgae

Controlled release is a critical aspect of drug delivery systems to ensure sustained therapeutic effects and reduce side effects [7]. This subsection focuses on various strategies used to achieve controlled release using microalgae, such as modulation of microalgae cell wall properties, responsive release systems, and environmental stimuli for drug release [8]. Surface engineering approaches of surface modification of microalgae can increase their drug delivery capabilities by improving stability, targeting and biocompatibility [9]. Various surface engineering approaches, including physical and chemical modifications, surface coating, and compounding techniques should be explored [10, 11]. The goal of drug delivery is to deliver therapeutic agents to specific tissues or cells, improve treatment efficacy, and minimize systemic side effects [12]. This subsection covers functionalization techniques used to introduce targeting ligands onto microalgae surfaces, such as antibodies, peptides, aptamers, and small molecules [13].

4- Biocompatibility of Microalgae-based Drug

Algae demonstrate remarkable biocompatibility, positioning them as a highly promising platform for drug delivery applications [14]. Their inherent properties make them advantageous over traditional drug delivery systems [15]. Algae-based materials are known to be non-toxic and exhibit low immunogenicity, significantly reducing the likelihood of adverse reactions when used in therapeutic interventions [16]. Additionally, algae possess a high surface area-to-volume ratio, facilitating efficient loading and encapsulation of a diverse range of drugs and therapeutic agents [17]. Their biodegradability ensures safe clearance from the body after drug release, minimizing the risk of long-term accumulation or potential toxicity [15]. Furthermore, algae's natural abundance and ease of cultivation make them a cost-effective and environmentally sustainable option for large-scale production [18]. With their inherent biocompatibility and versatile drug delivery capabilities, algae hold tremendous potential in advancing the field of biomedicine and improving patient outcomes [19].

5- Enhanced Permeability and Retention (EPR) in Drug Delivery

Microalgae possess unique characteristics that make them suitable for this purpose [20]. Firstly, they have a high surface area-to-volume ratio, allowing for efficient loading and encapsulation of therapeutic agents [21]. This enables the delivery of a wide range of drugs, including anticancer agents, to tumor sites [22]. In addition to acting as drug delivery vehicles, microalgae can be engineered to express specific ligands or targeting moieties on their surface [23]. These modifications enable active targeting of tumor tissues by enhancing the interaction between the microalgae carriers and cancer cells, thereby improving drug accumulation in the tumor site while reducing off-target effects [24]. Furthermore, microalgae possess the ability to respond to environmental stimuli, such as changes in temperature, pH, or light conditions [25]. This property can be leveraged to design smart drug delivery systems, where drug release is triggered by specific environmental cues within the tumor microenvironment [26]. This approach ensures localized drug delivery, reducing systemic toxicity and enhancing therapeutic efficacy [27]. Overall, microalgae offer a promising platform for EPR-based drug delivery, capitalizing on their unique properties and potential for customization [28]. Continuing research and development in this field has the potential to create growth in targeted drug delivery and improve treatment results in various diseases, including cancer [29, 30].

6- Challenges and Future Perspectives

Challenges of bioprocessing and scaling up the production of microalgae for drug delivery purposes bring several challenges, including optimizing culture conditions, developing cost-effective bioprocessing methods, and ensuring reproducibility [31]. Also, the regulatory landscape for microalgae-based drug delivery systems is still evolving [32]. Regulatory considerations, safety assessments, and quality control measures are required for the development and commercialization of microalgae-based drug delivery platforms [33].

7- Conclusion

In summary, this paper discussed various strategies to utilize the potential of microalgae including encapsulation, surface modification, and targeted delivery for drug delivery [34]. In addition, the challenges and future perspectives in this field were also mentioned. In any case, with more investigation and research, we can hope that microalgae and its derivatives will have a suitable place in the drug delivery system in the future.

References

1. Tiwari, A., et al., *Therapeutic attributes and applied aspects of biological macromolecules (polypeptides, fucoxanthin, sterols, fatty acids, polysaccharides, and polyphenols) from diatoms—A review.* 2021. **171**: p. 398-413.
2. Russell, C., C. Rodriguez, and M.J.A.R. Yaseen, *Microalgae for lipid production: Cultivation, extraction & detection.* 2022. **66**: p. 102765.
3. Ghosh, A., et al., *Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: A review.* 2016. **113**: p. 104-118.
4. Vieira, M.V., L.M. Pastrana, and P.J.M.d. Fuciños, *Microalgae encapsulation systems for food, pharmaceutical and cosmetics applications.* 2020. **18**(12): p. 644.
5. Noreen, A., et al., *A critical review of algal biomass: A versatile platform of bio-based polyesters from renewable resources.* 2016. **86**: p. 937-949.
6. Vega-Vásquez, P., et al., *Nanoscale drug delivery systems: from medicine to agriculture.* 2020. **8**: p. 79.
7. Rahoui, N., et al., *Spatio-temporal control strategy of drug delivery systems based nano structures.* 2017. **255**: p. 176-201.
8. Choi, J., et al., *Recent progress in magnetically actuated microrobots for targeted delivery of therapeutic agents.* 2021. **10**(6): p. 2001596.
9. Terracciano, M., L. De Stefano, and I.J.P. Rea, *Diatoms green nanotechnology for biosilica-based drug delivery systems.* 2018. **10**(4): p. 242.
10. Holmberg, K. and A. Matthews, *Coatings tribology: properties, mechanisms, techniques and applications in surface engineering*. 2009: Elsevier.
11. Zhecheva, A., et al., *Enhancing the microstructure and properties of titanium alloys through nitriding and other surface engineering methods.* 2005. **200**(7): p. 2192-2207.
12. Jin, S. and K.J.B.p. Ye, *Nanoparticle-mediated drug delivery and gene therapy.* 2007. **23**(1): p. 32-41.
13. Tahir, M.A., et al., *Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis and diagnosis.* 2021. **13**(27): p. 11593-11634.
14. Zhang, S., et al., *Algal Polysaccharides-Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery Applications.* 2022. **74**(7-8): p. 2200014.
15. Bhatia, S., *Natural polymer drug delivery systems: Nanoparticles, plants, and algae*. 2016: Springer.

16. Majee, S.B., et al., *Pharmacological, pharmaceutical, cosmetic and diagnostic applications of sulfated polysaccharides from marine algae and bacteria.* 2017. **11**(5): p. 68-77.
17. Costa, S.M., R. Fangueiro, and D.P.J.M.B. Ferreira, *Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy: The Potentiality and Versatility of Electrospun Nanofibers.* 2022. **22**(5): p. 2100512.
18. Jacob, J.M., et al., *Microalgae: A prospective low cost green alternative for nanoparticle synthesis.* 2021. **20**: p. 100163.
19. Shah, S.A., et al., *Biopolymer-based biomaterials for accelerated diabetic wound healing: A critical review.* 2019. **139**: p. 975-993.
20. Bi, Z. and B.B.J.T.o.t.A. He, *Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production.* 2013. **56**(4): p. 1529-1539.
21. Siddiki, S.Y.A., et al., *Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept.* 2022. **307**: p. 121782.
22. Akolpoglu, M.B., et al., *High-yield production of biohybrid microalgae for on-demand cargo delivery.* 2020. **7**(16): p. 2001256.
23. Chen, Q.-W., et al., *Customized materials-assisted microorganisms in tumor therapeutics.* 2021. **50**(22): p. 12576-12615.
24. Yi, W., et al., *Recent advances in developing active targeting and multi-functional drug delivery systems via bioorthogonal chemistry.* 2022. **7**(1): p. 386.
25. Jaiswal, K.K., et al., *Ecological stress stimulus to improve microalgae biofuel generation: a review.* 2020. **8**: p. 48-54.
26. He, Q., et al., *Tumor microenvironment responsive drug delivery systems.* 2020. **15**(4): p. 416-448.
27. Wischhusen, J. and F.J.I. Padilla, *Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) for localized drug delivery into tumor tissue.* 2019. **40**(1): p. 10-15.
28. Giri, P.M., A. Banerjee, and B.J.C. Layek, *A Recent Review on Cancer Nanomedicine.* 2023. **15**(8): p. 2256.
29. Wang, J., et al., *Volbots: Volvox Microalgae-Based Robots for Multimode Precision Imaging and Therapy.* 2022: p. 2201800.
30. Zhuang, D., et al., *Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics.* 2022. **291**: p. 132932.
31. Harun, R., et al., *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products.* 2010. **14**(3): p. 1037-1047.
32. Enzing, C., et al., *Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe.* 2014: p. 19-37.
33. Bajpai, V.K., et al., *Developments of cyanobacteria for nano-marine drugs: Relevance of nanoformulations in cancer therapies.* 2018. **16**(6): p. 179.
34. Zhong, D., et al., *Biodegradable microalgae-based carriers for targeted delivery and imaging-guided therapy toward lung metastasis of breast cancer.* 2020. **16**(20): p. 2000819.

Investigation of pathogenic molecular mechanisms of alcoholic liver disease through meta-omics analysis

Seyedeh Shima Moosavi[1], Samaneh reiszadeh Jahromi[2]

[1]University of Sistan & Baluchestan

[2]University of Sistan & Baluchestan

s.reiszadeh@science.usb.ac.ir

Abstract

Triglycerides build up in hepatocytes during the early stages of Alcoholic Liver Disease (ALD), which results in steatosis. Steatosis can develop into steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis, and potentially hepatocellular cancer if alcohol consumption is sustained [1]. In the current study, hub genes and pathways involved in the pathogenesis of ALD were found using a transcriptomics analysis (meta-omics approach). In the GEO database, we looked for array gene expression datasets. The datasets analysis was implemented using the R language. We performed transcription factors (TFs) and functional enrichment analysis to find dysregulated TFs and pathways. In this study, we found that dysregulation of 20 TFs expression could be a pathogenic molecular mechanism of dysregulation of gene expression profile in the hepatitis group in comparison to control group. Also, we found one significantly module with involvement in complement and coagulation cascades in the cirrhosis in comparison to control group, four modules for downregulated genes with the function in cell cycle, retinol metabolism, ECM-receptor interaction and pathways in cancer in hepatitis in comparison to control group and two significant modules for upregulated genes with the function in pathways in cancer and chemical carcinogenesis.

Keywords: Alcoholic liver disease, transcriptomics, TFs enrichment, functional enrichment, protein-protein interaction network

Introduction

In America, alcohol is the substance that is most frequently abused. Cirrhosis of the liver is the most significant of the terrible after-effects of prolonged intake. Alcoholic hepatitis is a clinical illness of liver failure and jaundice that typically develops after years of frequent drinking. The patient will frequently stop drinking alcohol weeks before any symptoms appear [2]. Although moderate alcohol consumption may help prevent ischemic heart disease. Alcoholic liver disease (ALD) risk is dose-dependently increased by alcohol consumption. While consumption of alcohol has climbed in China and the US over the past 20 years, it has fallen marginally in other European nations. ALD prevalence has risen concurrently and is predicted to continue to rise [3].

This paper provides a broad overview of alterations in gene expression that refer to AUD. analysis of the transcriptome can improve our comprehension of the molecular mechanisms responsible for AUD, by identifying associated gene expression patterns. Previous research has suggested that several genes, transcription factors (TFs), biological processes, and signaling pathways are involved in the emergence of AUD. Long-term exposure to alcohol and drug causes extensive transcriptional alterations in genes involved in a wide range of cellular processes, including ion transport, chromosomal remodeling, stress and immunological response, cell adhesion, cell cycle, apoptosis, protein and lipid metabolism, and mitochondrial functions [4].

Methods

The strategies used in our study predominantly contained microarray data collection, coding/non-coding expression profiling, integrative analysis of mRNA expression signature, functional and pathway enrichment analysis, Transcription Factors (TFs) enrichment and identification of hub genes/pathways.

We searched Gene Expression Omnibus (GEO-http:///www.ncbi.nlm. nih.gov/geo/) and ArrayExpress database (https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) for mRNA expression datasets. The search criteria included liver samples from Alcoholic Use Disorder (AUD) patients with cirrhosis and hepatitis diseases and normal liver as control group. The pre-processing of the microarray datasets was implemented using the R statistical programming language (www.r-project.org). Bioconductor project (www.bioconductor.org) provides additional R packages for microarray data analysis.

The pre-processing stage consisted of background correction followed by normalization. Thus, the applied background correction is a convolution of normal and exponential distributions that are fitted to the foreground intensities using the background intensities as a covariate, as explained in the limma manual [5]. Data collected from gene expression profiles provides clues on how cells are regulated by the activity of transcription factors. We could link transcription factors to gene expression changes by computing binding site over-representation via ChIP-X data. To find biological mechanisms underlying the genes analyzed above, we conducted GO term and pathway enrichment analysis using the enrich R package.

Results

Identification of genes expression pattern in alcoholic cirrhosis and alcoholic hepatitis

Our analysis of the mRNA datasets indicated that 26 genes were differentially expressed, involving one upregulated genes and 25 downregulated genes in the alcoholic cirrhosis compared to control group. A total of 1985 DEGs were identified when alcoholic hepatitis samples were compared with control samples, including 1062 upregulated genes and 923 downregulated genes.

Functional enrichment of dysregulated genes in alcoholic cirrhosis and hepatitis

In this part of our study, we aimed to functional enrichment analysis to find dysregulated pathways and cellular functions in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. we found that cellular response to zinc ion (GO:0071294, P = 3.76E-09) and extracellular matrix organization (GO:0030198, P = 3.53E-09) were the most significant pathways in GO biological processes of DEGs in the AC vs. HC and AH vs. HC groups, separately. Meanwhile, mineral absorption (map04978, P = 5.13E-07), PI3K-Akt signaling pathway (map04151, P = 4.62E-06) were the most significant pathways in KEGG signaling pathways of DEGs in the alcoholic cirrhosis vs. control and alcoholic hepatitis vs. control groups, separately.

Discussion

cellular response to zinc ion was a significance pathway in our study. Based on observations in previous researches in patients with inflammatory liver disease, zinc deficiency may have a negative effect on hepatocyte function and immune response. Liver cirrhosis represents the most advanced stage of chronic liver diseases and is the common outcome of chronic liver injury. Zinc deficiency occurs in many types of liver diseases, especially in more advanced disease, and its complications, ascites, hepatic encephalopathy and hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis, zinc supplementation could be highly effective and, in well defined, inexpensive daily dose limits, it could be quite safer [6].

An important pathway in the hepatitis-control group was the PI3K-Akt signaling pathway. One of the researches related to this pathway stated that an important factor in the occurrence of alcoholic hepatitis in the liver tissue is epithelial cell attachment molecule (EPCAM). Other researches have mentioned that, silencing EPCAM or inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway inhibited liver fibrosis and hepatic stellate cell proliferation and induced hepatic stellate cell apoptosis. Overall, silencing EPCAM by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway may prevent the progression of alcoholic hepatitis [7].

According to these results, the effect of PI3K inhibition on alcohol consumption is due to the inhibition of AKT by this gene.

References

1. Farooq, M.O. and R. Bataller, *Pathogenesis and management of alcoholic liver disease.* Digestive diseases, 2016. **34**(4): p. 347-355.
2. Castillo-Carniglia, A., et al., *Psychiatric comorbidities in alcohol use disorder.* The Lancet Psychiatry, 2019. **6**(12): p. 1068-1080.
3. Rangaswamy, M. and B. Porjesz, *Understanding alcohol use disorders with neuroelectrophysiology.* Handbook of clinical neurology, 2014. **125**: p. 383-414.
4. Yin, L., et al., *Identification of key pathways and genes in the dynamic progression of HCC based on WGCNA.* Genes, 2018. **9**(2): p. 92.

5. Ritchie, M.E., et al., *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies.* Nucleic acids research, 2015. **43**(7): p. e47-e47.
6. Grüngreiff, K., D. Reinhold, and H. Wedemeyer, *The role of zinc in liver cirrhosis.* Annals of hepatology, 2016. **15**(1): p. 7-16.
7. Zhang, Z., et al., *Silencing of EPCAM suppresses hepatic fibrosis and hepatic stellate cell proliferation in mice with alcoholic hepatitis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.* Cell Cycle, 2019. **18**(18): p. 2239-2254.

DNA biosensors based on gold nanostructures

Asma Khoobi*

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan 98135-674, Iran

Corresponding Author's E-mail Address: a.khoobi@science.usb.ac.ir

Abstract

DNA biosensors based on nucleic acid hybridization have been actively developed due to their portability, speed, specificity, and low cost. Recently, using nanostructured materials for DNA biosensors are interest and important. The materials are favorite because of excellent biological compatibilities and their high surface-to volume ratios. Therefore, the nano-materials are used to increase the amount of DNA immobilization. Also, DNA bound to nanostructured materials can maintain its biological activity. Additionally, signal amplification by labeling a targeted analyte with nanostructured materials has also been obtained for DNA biosensors in many reports. This present study summarizes the applications of numerous nanostructured materials for DNA biosensors. The reports have been shown that nanostructured materials due to small sizes were advantageous as substrates for DNA attachment or as labels for signal amplification; and application of nanocomposites in the biosensors can be enhanced their overall quality and to overcome the deficiencies of the individual nano-components. Two main signal amplification approaches have been used containing labeling double-stranded DNA (ds-DNA) with either a reversible electron transfer mediator or a nanocatalyst that can mediate the electrolysis of a large quantity of substrate and increasing the loading of electroactive species, often by metallic or semiconductor nanoparticle labels, e.g. Au, Ag, ZnS, CdS, and PbS. In these cases, the large amount of metal atoms per nanoparticle label creates significant signal amplification. Furthermore, the application of different nanostructured materials for different target analyte offers excellent multiplexing capabilities. However, additional development of nanostructured materials with smaller size and with enhanced chemical and biological properties would substantially improve the selectivity, accuracy and sensitivity of DNA biosensors.

Keywords: DNA, Biosensor, Nanomaterials, Gold nanostructures

1. Introduction

DNA biosensors have received significant attention because of their potential applications, containing forensic study, clinical diagnostics, and environmental monitoring [1]. Electrochemical, piezoelectric, and optical methods have been established to obtain highly sensitive DNA detection [2]. The electrochemical methods have been shown particular interest, because of the advantages such as simplicity, low cost, prompt detection, high sensitivity, and amenability to miniaturization on a chip [3]. Developments in DNA biosensor have been recognized with the development of surface DNA probe immobilization in conjunction with hybridization method between complementary DNA [4]. Since the concentration of the target DNA is very low, the sensitivity of DNA biosensor has to be very high to detect DNA directly. Also, tuning the hybridization efficiency of the biosensor, different research groups have used signal amplification strategies to increase the sensitivity of the electrochemical biosensors [5].

DNA biosensors based on nucleic acid hybridization have been strongly pursued. DNA biosensors are defined as analytical devices incorporating a single-stranded oligonucleotide (probe) intimately associated with or integrated within a physicochemical transducer or transducing microsystem, which may be electrochemical, optical, piezoelectric, thermometric, magnetic or micromechanical. The purpose of a DNA biosensor typically is to create either discrete or continuous measurable signals, which are proportional to the concentration of target DNA sequence. Due to their speed, specificity, portability, and low cost, DNA biosensors offer exciting opportunities for sequence-specific DNA analysis. In order to obtain high detection sensitivity, researchers have proposed numerous methods to improve the response of DNA biosensors by modification of the sensors with different materials [6]. Within the nanotechnology, great attention has been paid in recent years to nanostructured materials with different chemical composition. Nanostructured materials have larger size than individual atoms and molecules but have smaller size than bulk solids. Therefore, they follow neither absolute quantum chemistry nor the laws of classical physics and show properties that differ significantly from those expected due to two major phenomena containing high dispersity and size quantization and arises of nanostructured materials. As the size of a crystal reduces, the number of atoms at the surface of the crystal compared to the number of atoms in the crystal itself, increases [7]. In nanostructured materials the edge of the valance and conduction bands split into discrete, quantized, electronic levels due to the spatial confinement of the charge carriers. These electronic levels are similar to in atoms and molecules. Because of these two unique phenomena which happen in nanostructured materials, their properties such as chemical, mechanical, electrical, optical, and magnetic behaviour can be selectively controlled by engineering the morphology, size, and composition of the particles. These new substances will have improved or completely different properties from their parent materials [8].

The nanostructured materials used in DNA biosensors containing nanoparticles, like gold (Au), silver (Ag), cadmium sulfide (CdS); nanowires like silicon (Si), nanotubes like carbon nanotubes, etc. There are generally two goals for application of nanostructured materials in DNA biosensors that contain as substrates for DNA attachment and as signal amplifiers for hybridization. The aim of the present study is to present Ag nanostructures used in DNA biosensors based on the two purposes in recent years, including the information on applications and future prospects.

2. Nanostructured materials as substrates for DNA

The most critical step while organizing a DNA biosensor is the immobilization of DNA probe on the surface of a sensing device for example an electrode. The amount of immobilized DNA probe will affect the sensitivity, accuracy, selectivity, and life of a DNA biosensor directly. Due to the excellent biological compatibility and the high surface-to-volume ratio, nanostructured material can increase the sensing surface area to enhance the amount of immobilized DNA greatly, and the DNA mixed with Nanostructured material can keep its biological activity well.

3. Nanoparticles

Over the past decade, the unique properties of nanoparticles have continued to attract significant research attention. Nanoparticles, especially metal nanoparticles, suggest excellent prospects for biological and chemical sensing due to their unique electrical, optical, thermal, and catalytic properties [9]. The nanoparticles were synthesized generally through reduction reactions in aqueous solutions containing the electrochemical depositions on inert bases, corresponding chloro-metallate anions, sol-gel, metal vapor synthesis routes, and deposition-precipitation [10]. The surface and geometry of nanoparticles can be tailored to bind a subset of biomarkers selectively.

4. Gold nanoparticles

Gold nanoparticles (GNPs) show a main role in DNA biosensors and they are a hot study topic lately. Thiol-Au linkages generally are used to bind GNPs covalently with solid electrodes or DNA due to the strong affinity of covalent bonds between gold and sulfur atoms. In a research Jin et al. immobilized the calf thymus DNA on the surface of GNPs which were co-immobilized at an Au electrode through 4,4'-bis(methanethiol)biphenyl molecules by an assembly procedure. Their results showed that the GNPs modified Au electrode can increase the electrode surface area and improve the amount of immobilized single stranded DNA greatly, and the surface coverage value of DNA molecules reduced as the size of the Au nanoparticles increased [11]. Also, Fu et al. prepared a GNPs modified DNA biosensor though thiol-Au linkages. The thiol groups of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) served as binding sites for the covalent attachment of MPTS to an Au electrode surface. After hydrolysation and condensation, the polymerized monolayer, one-dimensional network of MPTS was joint together into a two-dimensional sol-gel network. The second silane layer was organized by immersing the electrode back into the MPTS solution, and then the GNPs were chemisorbed onto the thiol groups of the second silane layer. Finally, the mercapto oligonucleotide was self-assembled onto the surface via the GNPs. The results indicated that oligonucleotide immobilized in this way exhibits a good selectivity, sensitivity, stability and a long-term maintenance of bioactivity [12]. Ahmed Mishaal Mohammed reported the preparation of a biosensor by silicon oxide for biomedical applications, and using for the analysis of target DNA hybridization. An electrochemical DNA biosensor was fabricated using (3-aminopropyl) tri-ethoxysilane (APTES) as a linker molecule joint with GNPs on a thermally oxidized SiO_2 thin film. The size of the GNPs was obtained by UV-VIS data with an average particle size was reported within the range of 30±5 nm [13]. Spadavecchia et al. deposited the GNPs directly onto the surface of Si and Al_2O_3 substrates by a physical way to design a DNA biosensor [14]. Pan proposed a DNA biosensor by self-assembling horseradish peroxidase-linked single-stranded DNA onto GNPs

modified composite membrane at a carbon paste electrode [15]. Yang et al. prepared the GNPs by lectropolymerizing 2,6-pyridinedicarboxylic acid on the glassy carbon electrode, and then DNA probe was immobilized on the GNPs by the interaction of Au with DNA [16]. Kim et al. deposited GNPs onto a porous anodic alumina layer chip surface to design a "caplike" layer on the top of the oxide nanostructures in an orderly fashion [17].

5. Gold nanoparticles as signal amplifier for hybridization

When it is detected that small-molecule ligands of biomedical interest, ligand binding may not meaningfully perturb the biosensor interface. In this cases, signal amplification can be useful. Signal amplification by labeling the analyte with nanostructured materials has been reported for DNA biosensors in many papers. GNPs have been applied as signal amplifiers in numerous electrochemical DNA biosensors because of their electrochemical properties. Electrochemical DNA-based biosensors are promising method for sequence-specific DNA diagnosis and detection because of its sensitivity, cheapness, and speediness. With the growth of the biosensors, DNA immobilization methods for a highly dense and stable DNA recognition layer on the electrode surface become more important. Metal nanostructures, especially GNPs can be applied to improve the amount of immobilized DNA and cause lower the limit of detection for DNA biosensors, due to its strong ability to form Au S bond and its ultrahigh surface area [18] .Wang et al. demonstrated that the saturated oligonucleotide surface coverage of 30-base oligonucleotide on the similar modified Au electrode was 2.67×10^{14} molecules/cm^2, and this transducer permitted detecting as low as 5 pmol/L of the target oligonucleotides [19]. However, without GNPs modification, the density of 5'-mercaptohexyl group ending DNA on the Au gold electrode obtained in the range of 1-4×10^{13} molecules/cm^2 and the detection limit was calculated about 5 nmol/L [20]. Wang et al. used a catalytic enlargement of the metal nanoparticle tags containing Au enhanced Ag nanoparticles and an novel biomagnetic removal method based on magnetic particles to analysis DNA target at fmol level [21]. Wang et al. presented that GNPs amplified the electrochemical impedance for the model fluorescein/antifluorescein system. Immobilization of fluorescein onto gold electrode through formation of a self-assembled monolayer, goat antifluorescein conjugated with 10 nm GNPs was presented into the system. Therefore, an increase in the capacitance about 400 nF/cm^2 was obtained, whereas no change observed for goat antifluorescein without the GNPs conjugate. This permitted construction of high-sensitivity electrochemical impedance biosensors at a single low frequency, where the signal was sensitive to the interfacial R_{ct}. This enhancement in the electrochemical impedance spectra of binding to goat antifluorescein conjugated with GNPs attributed to the much higher electrochemical activity of gold surfaces relative to the underlying organic layer [22]. Li et al. introduced an electrochemical method for analyzing sequence-specific DNA by ferrocene-capped GNPs/streptavidin conjugates. Thiolated DNA probes were covalently immobilized on an Au electrode with hexanethiol (HT) forming mixed self-assembled monolayer and hybridized with target DNA, containing a complementary sequence. Duplex DNA formed on the Au surface. Then, functional gold nanoparticles were presented by strong interaction effect between biotin and streptavidin. The electrochemical response of ferrocene covering on the GNPs improved in cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry [23]. Sakshi Pareek et al. designed a sensitive electrochemical DNA biosensor for detection Human papillomavirus-16 (HPV-16) by a graphene oxide/Ag/Au nano-biohybrid system. The hybridization between the probe and DNA was studid by a reduction

in current, mediated by methylene blue. The biosensor presented a qualitative inequity between the probe and target HPV-16 DNA. The biosensor presented high sensitivity as 0.54 mA/aM for the determination of HPV-16. In a linear range of 100 aM to 1 μM with limit of detection of 100 aM [24].

6. Conclusions

Owing to their unique chemical and physical properties, metal nanostructures are opening novel horizons for the biological and chemical sensing, including DNA biosensing. The present work aims at presenting advances in metal nanoparticle-based DNA biosensors using metal nanoparticles especially GNPs as hybridization indicators and modifying transducer surface with metal nanostructures. When nanostructured materials are applied as substrates for DNA attachment, the smaller particle size the materials is, the better result a DNA biosensor can provide. As the size of a particle is decreased, the surface-to-volume ratio is increased, therefore, it can enlarge the electrode surface area to significantly improve the amount of immobilized DNA. Also, application of two or more types of nanostructured materials can enhance the good qualities and offset the insufficiency of each individual nanostructured material, which can create better results than that using only one type of nanostructures due to the diverse properties of different nano-materials. The fabricated biosensors successfully differentiated the detection of DNA immobilization and hybridization using the measurement of dielectric and conductivity properties in a blinded, label free approach, suggesting their potential utility in low-cost biodiagnostics, food analysis, forensic testing, and environmental monitoring.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support from the Research Council of the University of Sistan and Baluchestan.

References

[1] Lomae, A., Preechakasedkit, P., Hanpanich, O., Ozer, T., Henry, C. S., Maruyama, A., Ngamrojanavanich, N. (2023). Label free electrochemical DNA biosensor for COVID-19 diagnosis. Talanta, 253, 123992.

[2] Williamson, P., Piskunen, P., Ijäs, H., Butterworth, A., Linko, V., & Corrigan, D. K. (2023). Signal amplification in electrochemical DNA biosensors using target-capturing DNA origami tiles. ACS sensors, 8(4), 1471-1480.

[3] Bayraktepe, D. E., Yıldız, C., & Yazan, Z. (2023). The development of electrochemical DNA biosensor based on poly-l-methionine and bimetallic AuPt nanoparticles coating: Picomolar detection of Imatinib and Erlotinib. Talanta, 257, 124361.

[4] Zhong, Y., Hu, X. G., Zuo, S. Y., Liu, A. L., & Lei, Y. (2023). A microscale electrochemical DNA biosensor based on sandwich structure and enzyme-mediated electrocatalysis for sensitive determination of hand, foot and mouth disease-related gene. Microchemical Journal, 108837.

[5] Ghasemi, L., Jahani, S., Ghazizadeh, M., & Foroughi, M. M. (2023). A novel and ultrasensitive electrochemical DNA biosensor for Pralatrexate detection. Analytical Methods.

[6] Kim, Y., & Kang, E. (2023). A graphitic nano-onion/molybdenum disulfide nanosheet composite as a platform for HPV-associated cancer-detecting DNA biosensors.
[7] Choi, H. K., & Yoon, J. (2023). Nanotechnology-assisted biosensors for the detection of viral nucleic acids: An Overview. Biosensors, 13(2), 208.
[8] Xu, K., Huang, J., Ye, Z., Ying, Y., & Li, Y. (2009). Recent development of nano-materials used in DNA biosensors. Sensors, 9(7), 5534-5557.
[9] Srivastava, C., Nikles, D. E., Harrell, J. W., & Thompson, G. B. (2010). Composition distributions in FePt (Au) nanoparticles. Journal of Nanoparticle Research, 12,
[10] Fang, Y., Xu, Y., & He, P. (2005). DNA biosensors based on metal nanoparticles. Journal of Biomedical Nanotechnology, 1(3), 276-285.
[11] Jin, B., Ji, X., & Nakamura, T. (2004). Voltammetric study of interaction of Co (phen) 33+ with DNA at gold nanoparticle self-assembly electrode. Electrochimica acta, 50(4), 1049-1055.
[12] Fu, Y., Yuan, R., Xu, L., Chai, Y., Zhong, X., & Tang, D. (2005). Indicator free DNA hybridization detection via EIS based on self-assembled gold nanoparticles and bilayer two-dimensional 3-mercaptopropyltrimethoxysilane onto a gold substrate. Biochemical engineering journal, 23(1), 37-44.
[13] Mohammed, A. M. (2016). Fabrication and characterization of gold nano particles for DNA biosensor applications. Chinese Chemical Letters, 27(5), 801-806.
[14] Spadavecchia, J., Prete, P., Lovergine, N., Tapfer, L., & Rella, R. (2005). Au nanoparticles prepared by physical method on Si and sapphire substrates for biosensor applications. The Journal of Physical Chemistry B, 109(37), 17347-17349.
[15] Pan, J. (2007). Voltammetric detection of DNA hybridization using a non-competitive enzyme linked assay. Biochemical engineering journal, 35(2), 183-190.
[16] Yang, J., Yang, T., Feng, Y., & Jiao, K. (2007). A DNA electrochemical sensor based on nanogold-modified poly-2, 6-pyridinedicarboxylic acid film and detection of PAT gene fragment. Analytical biochemistry, 365(1), 24-30.
[17] Kim, D. K., Kerman, K., Saito, M., Sathuluri, R. R., Endo, T., Yamamura, S, Tamiya, E. (2007). Label-free DNA biosensor based on localized surface plasmon resonance coupled with interferometry. Analytical Chemistry, 79(5), 1855-1864.
[18] Cai, H., Xu, C., He, P., & Fang, Y. (2001). Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. Journal of electroanalytical chemistry, 510(1-2), 78-85.
[19] Wang, M., Sun, C., Wang, L., Ji, X., Bai, Y., Li, T., & Li, J. (2003). Electrochemical detection of DNA immobilized on gold colloid particles modified self-assembled monolayer electrode with silver nanoparticle label. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 33(5), 1117-1125.
[20] Wang, M., Sun, C., Wang, L., Ji, X., Bai, Y., Li, T., & Li, J. (2003). Electrochemical detection of DNA immobilized on gold colloid particles modified self-assembled monolayer electrode with silver nanoparticle label. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 33(5), 1117-1125.
[21] Wang, J., Xu, D., Kawde, A. N., & Polsky, R. (2001). Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. Analytical chemistry, 73(22), 5576-5581.

[22] Wang, J., Profitt, J. A., Pugia, M. J., & Suni, I. I. (2006). Au nanoparticle conjugation for impedance and capacitance signal amplification in biosensors. Analytical chemistry, 78(6), 1769-1773.

[23] Li, J. H., & Hu, J. B. (2004). Functional gold nanoparticle-enhanced electrochemical determination of DNA hybridization and sequence-specific analysis. ACTA CHIMICA SINICA-CHINESE EDITION-, 62(20), 2081-2088.

[24] Pareek, S., Jain, U., Bharadwaj, M., Saxena, K., Roy, S., & Chauhan, N. (2023). An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor for monitoring Human papillomavirus-16 (HPV-16) using graphene oxide/Ag/Au nano-biohybrids. Analytical Biochemistry, 663, 115015.

Low-level laser therapy synergistically improves the effects of natural killer cell-mediated immunotherapy in cancer

Najmeh Malekzadeh Gonabadi[1], Sahar Shojaei[2], Seyed Mehdi Alavi[3],Dor Mohammad Kordi Tamandani[1,*], Mehdi Shamsara[4,*]

1. Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.

2. Middle East Gene and Cell Therapy Company, Tehran, Iran.

3. Department of Plant Biotechnology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology. Tehran, Iran.

4. Department of Animal Biotechnology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology**,** Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1119-5758, Email: shamsa@nigeb.ac.ir, Fax: 009802144787399**.**

*Corresponding authors:

Mohammad Kordi Tamandani (Email: Dor_kordi@yahoo.com) and Mehdi Shamsara (Email: Email: shamsa@nigeb.ac.ir)

Abstract

Different kinds of treatments have been developed to fight cancers. The types of treatments that patients receive will be dependent on the cancer type and how advanced it is. Some patients are treated with only one way, but most patients receive combination therapies, such as surgery followed by chemotherapy, immunotherapy and/or radiation therapy. low-level laser therapy (LLLT), also known as photobiomodulation (PBM) therapy, is a low-power monochromatic and coherent light that has been used successfully for healing injuries and combat malignancies. Immune cell therapy is a promising approach that is applied to fight cancers using cellular immune system. In this regard, natural killer (NK) cells belonging to innate immunity are widely used to kill cancer cells. In this article, we hypothesize to explain how PBM therapy can enforce the effect of NK cell-mediated immunotherapy on cancers.

Keywords: cancer, immune cell therapy, natural killer cell, low-level laser therapy, photobiomodulation

Introduction

laser therapy

Laser (mild amplification through stimulated emission of radiation) is a tool that generates a quite uniform wavelength, phase and polarization electromagnetic radiation [1]. Advances in laser sciences have brought laser application to different branches of medicine. For example, low-level laser therapy (LLLT) has been developed to use in wound healing, tissue regeneration, pain reduction, inflammation and neurodegenerative illnesses [2]. In addition, the application of laser had been mentioned in the remediation of diverse cancers [3].

Cellular effects of LLLT

LLLT, also named photobiomodulation (PBM) therapy, is a light beam that can impact cellular activities in living systems. Unlike other medical lasers, PBM has no longer ablative or thermal effects on biological systems, instead, the photochemical effects are conducted by light absorption resulting in biochemical changes [4]. One of the cellular targets of PBM located in mitochondria is cytochrome c oxidase enzyme [5]. This protein contains four redox-active metal centers for absorbance of laser light. Under laser light radiation, cytochrome c oxidase mediates the exchange of electrons from cytochrome c to molecular oxygen in the respiratory chain and promotes ATP generation [6]. These changes result in release of free oxygen radicals (known as ROS) by mitochondria and induce the activation of kinds of transcription factors [7] [8]. PBM diminishes nitric oxide (NO) by mitochondria leading to ATP generation [9]. In addition, modulation of calcium channels after PBM modifies the electrostatic state of cell membrane and conformation of membrane protein. These events cause changes in cell physiology and communication [10].

Apart from mitochondrion, PBM promotes angiogenesis in granulosa and HUVEC cells as well as skin flap animal models by upregulation of angiogenesis markers such as VEGF and hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and downregulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) [11, 12]. The promotion of angiogenesis might be the route by which PBM accelerates wound healing [13].

Previous studies have proved the beneficial effects of PBM on neurodegenerative disorders. For example, in Alzheimer's disease, laser treatment provokes mesenchymal stem cells (MSCs) to phagocytize accumulated amyloid-beta (Aβ) fibrils in the brain. It is supposing that laser activates MSCs and induces their migration from bone marrow into bloodstream. The circulating MSCs then infiltrate into the brain and attack the Aβ particles [14, 15].

Investigating the effects of laser on the cultured tumor cell lines has generated conflicting results and a few of them are consistent with the behavior of tumor cells *in vivo* [16]. Ottaviani and coworkers showed that laser irradiation inhibits tumor progression, induces tumor angiogenesis and stimulates immune system to produce type I interferons. Their study proved the safety of laser-based therapies in cancers [17]. Another study by Xia et al. revealed that blue laser dose-dependently decreased the cell viability in bladder cancer. Moreover, reduced cell migration and invasion were observed possibly due to suppression of the MAPK/MEK/ERK pathway [18].

Immune system components

Immune system is a network of biological processes for fighting a wide variety of pathogens and malignant cells. Immune system is divided into innate and adaptive immune responses. Innate immunity supplies a rough recognition and quick first-line of defense. It can react

against all pathogens and cancer cells and it is categorized into three defense mechanisms including physical barriers, cellular components, and humoral responses. Contrary to the innate immune response, the adaptive immune system responds very effectively to each specific pathogen. The adaptive immune system consists of humoral and cellular components. B cells are key elements of the humoral adaptive immune response, while T cells are key elements of cellular adaptive immunity.

Anti-tumoral function of NK cells

NK cells are a part of the innate immune system. In humans, NK cells are usually characterized in flow cytometry by the absence of CD3 and the presence of CD56 on their surface. The natural cytotoxic receptor NKp46 is mostly used to recognize NK cells in combination with the absence of CD3 expression[19]. NK cells come from CD34+ hematopoietic stem cells. Bone marrow is supposed to be the primary site of NK development. However, a recent finding has shown that NK cells can also develop and mature in secondary lymphoid organs, including tonsils, spleen and lymph nodes [20]. Unlike B cells and T cells, NK cells express stochastic combinations of activating receptors and inhibitory receptors. The net balance of stimulatory versus suppressive signals through these various receptors results in either a response to or tolerance of the target cells [21].

In innate immunity, NK cells are the primary effector cells against tumors. They can detect the absence of "self" MHC class-I molecules on cancer cells, which is known as the "missing self-hypothesis." [22]. Later, this premise was supported following the discovery of inhibitory [23] and activating NK receptors [24]. According to the literature, the most important NK inhibitory receptors are the killer Ig-like receptors (KIRs), which recognize allotypic determinants shared by groups of HLA class-I alleles. [25], and CD94/NKG2A heterodimer [26] which recognizes the non-classical HLA-E molecule. A variety of non-HLA-specific receptors and co-receptors capable of eliciting NK cell stimulation via direct interaction with ligands overexpressed or expressed de novo on malignant cells are included among the activating NK cell receptors. [27, 28].

In the context of cancer immunotherapy, whether for solid tumors or hematological malignancies, NK cell-based immunotherapy has emerged as a promising and advanced scientific research topic [29]. By releasing cytotoxic granules containing granzymes and perforin, NK cells can cause target cell death. [29]. Furthermore, NK cells engage in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) via the membrane receptor CD16, as well as an apoptotic axis via Fas ligand (FasL) or tumor necrosis factor-alpha (TNF-)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [30, 31]. NK cells also play immunomodulatory functions by secreting chemokines and cytokines, such as RANTES and interferon-gamma (IFN-γ) [32, 33]. Despite the fact that NK cells can identify and eliminate tumor cells, malignant cells continue to develop mechanisms to avoid detection by NK cells or to limit NK cell activity. Tumor cell immune evasion is thought to be primarily dependent on the production of immunosuppressive cytokines or chemokines ranging from IL-10 and TGF- to the soluble IL-2 receptor (sCD25), CXCL9, and CXCL10. [34-36]. As well, transformed cells can attenuate the expression of tumor-associated antigens (TAAs) [37] and also raise the expression of MHC class I-related molecules [38] to obstruct NK cell activation.

Anti-cancer mechanisms of PBM

Low-level lasers with different wavelengths and power have different effects on biological systems [39]. Following PBM, photochemical and physical changes occur in the mitochondrial membrane and cell metabolism switch to oxidative phosphorylation [40, 41]. Cancer cell metabolism alters from oxidative phosphorylation to glycolysis because glycolysis consumes much less oxygen than oxidative phosphorylation. This effect, which is known as the Warburg effect, leads to resistance of cancer cells to chronic hypoxia caused by fast growth of tumors. Because of the Warburg effect, the malignant cells might behave differently from the normal cells in response to PBM [42]. In cancer cells in which the supply of ATP is quite limited, the increased amount of ATP by PBM might allow the cancer cells to respond to pro-apoptotic stimuli. However, in healthy cells with adequate supply of ATP after PBM, the membrane potential is reduced due to oxidative stress. The membrane potential then returns to a normal state and ROS production is stopped [43-45].

Laser therapy also increases the phagocytic and antitumor properties of macrophages by inducing IFN-γ [46]. Moreover, ATP produced after PBM causes activation of protein kinase A and stabilization of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) which is key enzyme in biosynthesis of Melatonin from tryptophan [47] . Activation of the nuclear factor kappa B (NF-κβ) has been shown to occur after PBM [48] . The NF-κβ induces expression of the *AANAT* gene in macrophages, followed by synthesis of melatonin [49]. Melatonin is a powerful anticancer agent and its efficiency has been widely documented. Melatonin applies its anticancer abilities through affecting various mechanisms including angiogenesis, apoptosis, autophagy, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. Melatonin also has anti-inflammatory impacts [50]. It can attenuate inflammatory cytokines secreted in the tumor microenvironment that facilitate tumor growing up.

Ottaviani et al. demonstrated that laser treatment not only inhibited tumor growth but also effectively reduced lesion size and altered the tumor microenvironment in melanoma and oral carcinogenesis mouse models. In the cultured cells, however, the laser treatment produced different results. They demonstrated that the effect of laser light on cancer cell growth differed between cultured and transplanted cells. To begin, laser light slows tumor progression while increasing the metabolism of cultured cells. Second, PBM produced a more structured and functional vascular network. Finally, they demonstrated that laser light has a powerful effect on immune modulation and DC activation, which is mediated by type I IFNs. [17]. Type I IFNs, with their anti-proliferative, pro-apoptotic, and anti-angiogenic properties, are critical for cancer immune surveillance and are already being used clinically in a variety of cancer [51] M1-related cytokine and chemokine expression, as well as M1 monocyte polarization Laser light stimulates mitochondrial biogenesis and increases levels of complex I-V transcripts. Polarization of M1 monocytes is associated with histone modification at the promoter region of TNF- and IL-10 genes, which results in gene transcription activation [52]. TNF-α plays critical roles in anti-tumor activity by (1) induction of cellular apoptosis via binding to tumor cell surface receptors; (2) activation of macrophage and NK cells; (3) disruption of neoangiogenesis and inhibition of microvasculature in tumor; (4) alteration of tumor-associated macrophages fates to M1 anti-tumor stage; (5) Increasing the count of neutrophils and monocytes in tumor microenvironment; and finally, (6) Inhibition of tumor-

induced monocyte differentiation to immunosuppressive phenotypes by decreasing of IL-13 [53]. IL-10 can exert immunostimulatory effects by activation of NK cells, lymphocytes T and macrophages. In other words, increasing local IL-10 concentrations in the tumor microenvironment causes the increase of CD8+ T cell numbers and secretion of IFN-γ and induces tumor-specific immunity as well [54-56].

Endogenous chromophores, such as cytochrome c oxidase (CCO), located in the target cell's mitochondrial membrane, absorb laser light. The light energy absorbed stimulates the electron transport chain in the mitochondria, increasing ATP production. Increased ATP levels benefit cellular metabolism and function, including immune system cells. One possibility is that the LLLT increases free nitric oxide (NO) through photolysis of the nitrosyl complex and accelerates programmed cell death via oxidative stress, disrupted energy metabolism, DNA damage, activation of poly(ADP-ribose) polymerase, or dysregulation of cytosolic calcium. Depending on the severity and context of the damage, such disruptions can result in either apoptotic or necrotic cell death. [57-59].

Moreover, PBM activates several transcription factors by stimulating the production of reactive oxygen species (ROS) [60]. ROS is a group of highly reactive molecules that have evolved as regulators of important signaling pathways. The generation of moderate level of ROS by PBM at very low energy densities can initiate redox-signaling and activate redox-sensitive transcription factors such as the Akt/GSK3beta pathway and NF-κβ [48, 61, 62]. These transcription factors stimulate anti-apoptotic and/or cell survival responses. However, PBM at high energy densities that produce a cytotoxic level of ROS can induce pro-apoptotic effects and inhibit proliferation in vitro via inactivation of the Akt/GSK3beta signaling pathway [63-65].

LLLT boosts chemotherapy's anticancer effect. Heymann et al. discovered that LLLT could boost the anticancer effects of cisplatin or zoledronic acid (ZA) in cultured Hela cells. Depending on the tumor microenvironment, tumor cells can switch between glycolysis and mitochondrial metabolism (oxidative phosphorylation). Cisplatin and ZA both have anti-glycolytic activities and the cancer cells fight with such drugs by switching their metabolism from glycolysis to mitochondrial oxidative phosphorylation. Hence, the growth of Hela cells increased when the cells were only exposed to cisplatin or ZA. [66].

Does laser cause tumor growth and proliferation?

Many of the pathways discussed here have been strongly linked to cancer-related behaviors. The PI3-Kinase pathway was first linked to cancer nearly 30 years ago. It is especially relevant to head and neck cancers (HNCs) because it is a component of the PI3K/Akt/mTOR pathway. The PI3K/mTOR pathway has been identified as a potential target for intervention due to its importance in tumor behavior. In colon cancer models, inhibiting the PI3K/mTOR pathway proved effective as a radiosensitizer. Similarly, Leikeret al. used cell culture and animal xenograft models of head and neck SCC (HNSCC). PI3K/mTOR inhibition was found to preferentially radiosensitize human HNSCC cells over normal human fibroblasts. The same PI3K/mTOR inhibitor also inhibited tumor regrowth in a nude mouse xenograft model. Chang also discussed how the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway affected radiosensitivity in prostate cancer cell lines. Not only were these cells radioresistant, but they were also linked to more aggressive tumor invasion and stem cell formation EMT and cancer stem cell

(CSC) formation were also linked to PI3K/Akt/mTOR signaling inhibition, which improved radiosensitivity and reduced EMT and CSC phenotypes.. PI3K/Akt signaling can also activate downstream pathways and genes, including ERK. Significant for upper aerodigestive tract cancers, ERK/MAPK-activation of EGFR, a component of LLLT activity ,has been identified as potentially important in tumor progression, most likely through the promotion of VEGF and endothelial cell proliferation. Although there is no direct relationship between LLLT and epithelial adhesion molecule (EpCAM), EpCAM's association with the PI3K/Akt/mTOR pathway is well documented. LLLT is responsible for numerous anti-apoptotic activities, which may influence tumor survival and treatment resistance. As previously stated, higher energy LLLT promotes collagen synthesis via the TGF-b/Smad pathway.In oncogenesis, this pathway, which normally inhibits proliferation and induces apoptosis, is frequently inactivated. TGF-tumor b's suppressive roles in early stage tumors change to promote tumor progression in advanced tumors, depending on the tumor stage.[67, 68]

LLLT can increase the likelihood of metastasis, invasion, and treatment resistance

LLLT stimulates or activates many factors that contribute to tumor migration, invasion, and metastatic potential. Many LLLT-induced cytokines, including VEGF and PDGF, are involved in cell proliferation, tumor angiogenesis, local spread, and metastasis. Laser-induced upregulation of HSP-90 in studies suggests that laser therapy may promote tumor growth while decreasing radiosensitivity. Enhancement of MMP activation by laser may support tumor invasion and/or reduce cancer therapeutic response. Survivin, a protein of the apoptosis inhibitor family, is upregulated by high-power laser irradiation. This molecule promotes cell proliferation, inhibits apoptosis, increases PI3K/Akt and ERK signaling, and decreases PTEN function. Chu et al. Human lung adenocarcinoma cells were studied. showed that LLL radiation induced survivin and affected tumor survival after survivin activation. Also, stimulation of TLR 4 expressed on HNSCC by laser promotes tumor growth and protects tumor immunity[69].

PBM and NK cells, a synergistic combination

NK cells are generated from hematopoietic stem cells (HSCs) residing in the bone marrow (BM) similar to other blood cells [43, 70]. It seems that PBM could help the process of NK cell generation by increasing the proliferation of HSCs. PBM directs this function by provoking mitochondrial biogenesis resulting in the production of ROS. The balanced levels of ROS are crucial for switching stem cells, including HSCs from dormancy to proliferation state followed by differentiation to the immune cells like NK cells [43, 71-73]. The produced NK cells then target and lyse tumor cells. On the other hand, overstimulation by PBM can cause high levels of ROS which in turn induce permeabilization of the mitochondrial outer membrane and, subsequently, the release of cytochrome c and caspase cascade reaction. These events activate mitochondrial apoptosis pathway, alter cell cycle, inhibit cell proliferation and cause cell death [43]. A recent study has reported that induction of mitochondrial apoptosis pathway is essential for efficient killing of the tumor cells in NK cell immunotherapy (78).

Tumor microenvironment is critical for immune cell activities. Increasing the number of immune cells in the tumor area exclusively is not enough for tumor regression. The tumor environment is hypoxic and NK cell function is inhibited at low oxygen pressure. PBM modulates the intratumoral hypoxic condition by induction of VEGF expression that enhances angiogenesis and improves blood circulation within the tumor. These events allow the activity of tumor-infiltrated NK cells as the result of increasing oxygen pressure and weakening hypoxic conditions within the tumor [74]. Moreover, PBM-induced vessel growth eases the infiltration of immune cells like NK cells into the tumor microenvironment [75, 76].Secretion of growth-stimulating cytokines into the tumor inflammatory microenvironment can promote tumor progression. For instance, transforming growth factor-β (TGF-β) plays a major role under inflammatory conditions [77] and can promote tumorigenesis due to secretion of growth factors, cytokines and chemokines [78] Moreover, TGF-β is one of the most well-known NK inhibitory cytokine that is secreted in the tumor microenvironment [79-82]. However, PBM reduces inflammation reactions around the tumor by increasing the secretion of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 [83]. IL-10 increases the expression of activation cytokines and cytotoxicity-related genes within the NK cells which promotes the tumor lysis [84]. Therefore, PBM can suppress tumor-extrinsic inflammation by the secretion of anti-inflammatory cytokines and aid in tumor regression by NK cell activation. PBM increases the production of melatonin. As mentioned above, melatonin has several anti-cancer mechanisms. It stimulates the production of progenitor cells for granulocytes-macrophages. It also promotes the production of NK and helper CD4+ cells but inhibits cytotoxic CD8+ cells. Melatonin also causes the secretion of various cytokines from NK cells and T-helper lymphocytes that enhance NK cell activity [47, 85]. This showed that the PBM can stimulate the production of NK cells via the path of melatonin.

Altogether, the above descriptions apprehend that the application of LLLT could enhance the effectiveness of the tumor's immune cell therapies using NK cells through the balanced levels of ROS, stimulation of NK cell production and secretion of cytokines.

Testing Hypothesis

To prove the hypothesis presented in this paper, the effect of laser is tested in the xenotransplanted colorectal cancer mouse models. In the first approach, nude mice will be randomly divided into four experimental groups. The first group will be received serum and albumin as control, and three other groups will be treated with NK cells, PBM and combination of PBM and NK cells. The size of tumors will be measured among the four groups to determine the effects of immune cell therapy, laser therapy and combination therapy on the tumor growth. The mice will be sacrificed at the end of experiments and the count of NK cells and the cytokine levels will be calculated and compared between the groups.

In the second approach, the mice will be divided into four groups, as mentioned above. However, this time, the proliferation of cultured NK cells will be first stimulated with a laser beam at 600-800 nm. Simultaneously, the transplanted colorectal cancer mouse models will be irradiated with a blue laser 805nm at 5 J/cm2 for induction of apoptosis in the tumor cells. The provoked NK cells will be perfused into the grouped mice and the tumor mass regression, NK cell count and cytokine levels will be compared among the groups. Moreover,

the results of the two mentioned approaches will be compared to each other for comprehension of the effectiveness of provoked and unprovoked NK cells.

Result and conclusion :

A cancer treatment approach known as immune cell therapy has become a popular approach in the medical field. In the recent years, NK cell-based immunotherapy has emerged as a promising therapeutic approach for solid tumors. Kinds of therapeutic strategies has been proposed for enhancement of the influence of NK cell therapies. Individually, low-level laser therapy and NK cell therapy possess antitumor effects. Here based on the literature review, we have hypothesized that a compound therapy with PBM (Effective wavelength) and NK cells could synergistically improve anticancer outcomes for them both. In our study, four experimental groups were subjected to cell therapy and laser therapy respectively, and one group was subjected to a combination of both, and the other group was the control group. In the present study, According to the results of this study, the immunohistochemical test showed the best tumor status in the group that combined both treatments. To improve the effectiveness of treatmentIt is suggested that chemotherapy should be performed before cell therapy, and it is suggested that cell therapy should be performed at a more appropriate time so that the solid tumor does not become resistant to treatment. Another suggestion to improve the effect of the treatment is to use CAR NK so that the penetration and effect of the cells in the face of the tumor can be done in a more effective way.

Acknowledgement

The Authors express their thanks from the Middle East Gene Therapy Company for its supports.

Conflict of interest statement

The authors state no conflicts of interest regarding this study.

References

1. TH Maiman: Stimulated Optical Radiation in Ruby. Nature 1960, 187(4736):493-494.
2. BJV Adeir Moreira Rocha Júnior , Luís Carlos Ferreira de Andrade, Fernando Monteiro Aarestrup: Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro
and in vivo experimental studies. Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vascular 2007, 6:258-266.
3. B Azadgoli, RY Baker: Laser applications in surgery. Ann Transl Med 2016, 4(23):452.
4. YY Huang, AC Chen, JD Carroll, MR Hamblin: Biphasic dose response in low level light therapy. Dose Response 2009, 7(4):358-383.
5. TI Karu: Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. IUBMB Life 2010, 62(8):607-610.
6. H Chung, T Dai, SK Sharma, YY Huang, JD Carroll, MR Hamblin: The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. Ann Biomed Eng 2012, 40(2):516-533.
7. YY Huang, SK Sharma, J Carroll, MR Hamblin: Biphasic dose response in low level light therapy - an update. Dose Response 2011, 9(4):602-618.

8. KJ Campbell, ND Perkins: Regulation of NF-kappaB function. Biochem Soc Symp 2006(73):165-180.
9. JA Zecha, JE Raber-Durlacher, RG Nair, JB Epstein, S Elad, MR Hamblin, A Barasch, CA Migliorati, DM Milstein, MT Genot et al: Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. Support Care Cancer 2016, 24(6):2793-2805.
10. A Amaroli, S Ferrando, S Benedicenti: Photobiomodulation Affects Key Cellular Pathways of all Life-Forms: Considerations on Old and New Laser Light Targets and the Calcium Issue. Photochem Photobiol 2019, 95(1):455-459.
11. SML Terena, RA Mesquita-Ferrari, AM de Siqueira Araujo, KPS Fernandes, MH Fernandes: Photobiomodulation alters the viability of HUVECs cells. Lasers Med Sci 2021, 36(1):83-90.
12. Y Kawano, Y Utsunomiya-Kai, K Kai, I Miyakawa, T Ohshiro, H Narahara: The production of VEGF involving MAP kinase activation by low level laser therapy in human granulosa cells. Laser Ther 2012, 21(4):269-274.
13. BG Gasparyan L, Makela A: Activation of angiogenesis under influence of red low level laser radiation. Proc SPIE. 2005:45-50.
14. AR Simard, D Soulet, G Gowing, JP Julien, S Rivest: Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. Neuron 2006, 49(4):489-502.
15. O Butovsky, G Kunis, M Koronyo-Hamaoui, M Schwartz: Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. Eur J Neurosci 2007, 26(2):413-416.
16. L Frigo, JS Luppi, GM Favero, DA Maria, SC Penna, JM Bjordal, RJ Bensadoun, RA Lopes-Martins: The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. BMC Cancer 2009, 9:404.
17. G Ottaviani, V Martinelli, K Rupel, N Caronni, A Naseem, L Zandonà, G Perinetti, M Gobbo, R Di Lenarda, R Bussani et al: Laser Therapy Inhibits Tumor Growth in Mice by Promoting Immune Surveillance and Vessel Normalization. EBioMedicine 2016, 11:165-172.
18. Y Xia, W Yu, F Cheng, TJ Rao, Y Ruan, R Yuan, J Ning, X Zhou, F Lin, D Zheng: Photobiomodulation With Blue Laser Inhibits Bladder Cancer Progression. Frontiers in Oncology 2021, 11.
19. H Spits, D Artis, M Colonna, A Diefenbach, JP Di Santo, G Eberl, S Koyasu, RM Locksley, ANJ McKenzie, RE Mebius et al: Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. Nature Reviews Immunology 2013, 13(2):145-149.
20. AM Abel, C Yang, MS Thakar, S Malarkannan: Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. Front Immunol 2018, 9:1869.
21. YT Bryceson, ME March, HG Ljunggren, EO Long: Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. Immunol Rev 2006, 214:73-91.
22. HG Ljunggren, K Karre: Experimental strategies and interpretations in the analysis of changes in MHC gene expression during tumour progression. Opposing influences of T cell and natural killer mediated resistance? J Immunogenet 1986, 13(2-3):141-151.

23. A Moretta, C Bottino, M Vitale, D Pende, R Biassoni, MC Mingari, L Moretta: Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. Annu Rev Immunol 1996, 14:619-648.
24. A Moretta, G Tambussi, C Bottino, G Tripodi, A Merli, E Ciccone, G Pantaleo, L Moretta: A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. J Exp Med 1990, 171(3):695-714.
25. HG Hilton, P Parham: Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize HLA-C. Immunogenetics 2017, 69(8-9):567-579.
26. M Jinushi, T Takehara, T Tatsumi, T Kanto, T Miyagi, T Suzuki, Y Kanazawa, N Hiramatsu, N Hayashi: Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. The Journal of Immunology 2004, 173(10):6072-6081.
27. LL Lanier, B Corliss, J Wu, JH Phillips: Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. Immunity 1998, 8(6):693-701.
28. C Zhang, Y Liu: Targeting NK Cell Checkpoint Receptors or Molecules for Cancer Immunotherapy. Front Immunol 2020, 11:1295.
29. MJ Smyth, E Cretney, JM Kelly, JA Westwood, SE Street, H Yagita, K Takeda, SL van Dommelen, MA Degli-Esposti, Y Hayakawa: Activation of NK cell cytotoxicity. Mol Immunol 2005, 42(4):501-510.
30. T Bald, MF Krummel, MJ Smyth, KC Barry: The NK cell-cancer cycle: advances and new challenges in NK cell-based immunotherapies. Nat Immunol 2020, 21(8):835-847.
31. W Widowati, DK Jasaputra, SB Sumitro, MA Widodo, T Mozef, R Rizal, HSW Kusuma, DR Laksmitawati, H Murti, I Bachtiar et al: Effect of interleukins (IL-2, IL-15, IL-18) on receptors activation and cytotoxic activity of natural killer cells in breast cancer cell. Afr Health Sci 2020, 20(2):822-832.
32. MJ Smyth, E Cretney, JM Kelly, JA Westwood, SEA Street, H Yagita, K Takeda, SLHv Dommelen, MA Degli-Esposti, Y Hayakawa: Activation of NK cell cytotoxicity. Molecular Immunology 2005, 42(4):501-510.
33. JP Böttcher, E Bonavita, P Chakravarty, H Blees, M Cabeza-Cabrerizo, S Sammicheli, NC Rogers, E Sahai, S Zelenay, C Reis e Sousa: NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. Cell 2018, 172(5):1022-1037.e1014.
34. J Chiu, DM Ernst, A Keating: Acquired Natural Killer Cell Dysfunction in the Tumor Microenvironment of Classic Hodgkin Lymphoma. Front Immunol 2018, 9:267.
35. TL Whiteside: Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). Biochem Soc Trans 2013, 41(1):245-251.
36. HL Yang, WJ Zhou, KK Chang, J Mei, LQ Huang, MY Wang, Y Meng, SY Ha, DJ Li, MQ Li: The crosstalk between endometrial stromal cells and macrophages impairs cytotoxicity of NK cells in endometriosis by secreting IL-10 and TGF-beta. Reproduction 2017, 154(6):815-825.
37. T Vanichapol, S Chutipongtanate, U Anurathapan, S Hongeng: Immune Escape Mechanisms and Future Prospects for Immunotherapy in Neuroblastoma. Biomed Res Int 2018, 2018:1812535.

38. B Seliger, T Cabrera, F Garrido, S Ferrone: HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. Semin Cancer Biol 2002, 12(1):3-13.
39. PV Peplow, TY Chung, B Ryan, GD Baxter: Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. Photomed Laser Surg 2011, 29(5):285-304.
40. A Lynnyk, M Lunova, M Jirsa, D Egorova, A Kulikov, Š Kubinová, O Lunov, A Dejneka: Manipulating the mitochondria activity in human hepatic cell line Huh7 by low-power laser irradiation. Biomed Opt Express 2018, 9(3):1283-1300.
41. K Mortezaee, Y Potes, H Mirtavoos-Mahyari, E Motevaseli, D Shabeeb, AE Musa, M Najafi, B Farhood: Boosting immune system against cancer by melatonin: A mechanistic viewpoint. Life Sci 2019, 238:116960.
42. MR Hamblin, ST Nelson, JR Strahan: Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth? Photomed Laser Surg 2018, 36(5):241-245.
43. MR Hamblin: Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. Photochem Photobiol 2018, 94(2):199-212.
44. D Odinokov, MR Hamblin: Aging of lymphoid organs: Can photobiomodulation reverse age-associated thymic involution via stimulation of extrapineal melatonin synthesis and bone marrow stem cells? J Biophotonics 2018, 11(8):e201700282-e201700282.
45. K Rupel, L Zupin, A Colliva, A Kamada, A Poropat, G Ottaviani, M Gobbo, L Fanfoni, R Gratton, M Santoro et al: Photobiomodulation at Multiple Wavelengths Differentially Modulates Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. Oxid Med Cell Longev 2018, 2018:6510159.
46. LF de Freitas, MR Hamblin: Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. IEEE J Sel Top Quantum Electron 2016, 22(3).
47. D Odinokov, MR Hamblin: Aging of lymphoid organs: Can photobiomodulation reverse age-associated thymic involution via stimulation of extrapineal melatonin synthesis and bone marrow stem cells? J Biophotonics 2018, 11(8):e201700282.
48. AC Chen, PR Arany, YY Huang, EM Tomkinson, SK Sharma, GB Kharkwal, T Saleem, D Mooney, FE Yull, TS Blackwell et al: Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. PLoS One 2011, 6(7):e22453.
49. SM Muxel, MA Pires-Lapa, AW Monteiro, E Cecon, EK Tamura, LM Floeter-Winter, RP Markus: NF-kappaB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. PLoS One 2012, 7(12):e52010.
50. S Mehrzadi, MH Pourhanifeh, A Mirzaei, F Moradian, A Hosseinzadeh: An updated review of mechanistic potentials of melatonin against cancer: pivotal roles in angiogenesis, apoptosis, autophagy, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. Cancer Cell International 2021, 21(1):188.
51. L Zitvogel, L Galluzzi, O Kepp, MJ Smyth, G Kroemer: Type I interferons in anticancer immunity. Nat Rev Immunol 2015, 15(7):405-414.
52. CH Chen, CZ Wang, YH Wang, WT Liao, YJ Chen, CH Kuo, HF Kuo, CH Hung: Effects of low-level laser therapy on M1-related cytokine expression in monocytes via histone modification. Mediators Inflamm 2014, 2014:625048.

53. SF Josephs, TE Ichim, SM Prince, S Kesari, FM Marincola, AR Escobedo, A Jafri: Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. J Transl Med 2018, 16(1):242.
54. F Berti, K Brajão de Oliveira: IL-10 in cancer: Just a classical immunosuppressive factor or also an immunostimulating one? AIMS Allergy and Immunology 2018, 2:88-97.
55. KS Rallis, AE Corrigan, H Dadah, AM George, SM Keshwara, M Sideris, B Szabados: Cytokine-based Cancer Immunotherapy: Challenges and Opportunities for IL-10. Anticancer Res 2021, 41(7):3247-3252.
56. M González-Garza, D Cruz-Vega, C Bernal: IL10 as Cancer Biomarker; 2020.
57. S Farivar, T Malekshahabi, R Shiari: Biological effects of low level laser therapy. J Lasers Med Sci 2014, 5(2):58-62.
58. AN Osipov, TV Machneva, EA Buravlev, YA Vladimirov: Effects of Laser Radiation on Mitochondria and Mitochondrial Proteins Subjected to Nitric Oxide. Front Med (Lausanne) 2018, 5:112-112.
59. MP Murphy: Nitric oxide and cell death. Biochim Biophys Acta 1999, 1411(2-3):401-414.
60. J Robijns, S Censabella, P Bulens, A Maes, L Noé, M Brosens, L Bergh, S Claes, J Mebis: The role of photobiomodulation therapy in the care of cancer patients: review of the literature. 2017.
61. G Shefer, I Barash, U Oron, O Halevy: Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. Biochim Biophys Acta 2003, 1593(2-3):131-139.
62. L Zhang, Y Zhang, D Xing: LPLI inhibits apoptosis upstream of Bax translocation via a GSK-3beta-inactivation mechanism. J Cell Physiol 2010, 224(1):218-228.
63. L Huang, S Wu, D Xing: High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3β signaling pathway. J Cell Physiol 2011, 226(3):588-601.
64. J Chu, S Wu, D Xing: Survivin mediates self-protection through ROS/cdc25c/CDK1 signaling pathway during tumor cell apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation. Cancer Lett 2010, 297(2):207-219.
65. X Sun, S Wu, D Xing: The reactive oxygen species-Src-Stat3 pathway provokes negative feedback inhibition of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation. Febs j 2010, 277(22):4789-4802.
66. PGB Heymann, KSE Henkenius, T Ziebart, A Braun, K Hirthammer, F Halling, A Neff, R Mandic: Modulation of Tumor Cell Metabolism by Laser Photochemotherapy with Cisplatin or Zoledronic Acid In Vitro. Anticancer Res 2018, 38(3):1291-1301.
67. P Rola, S Włodarczak, M Lesiak, A Doroszko, A Włodarczak: Changes in Cell Biology under the Influence of Low-Level Laser Therapy. In: Photonics. vol. 9; 2022.
68. C Kara, H Selamet, C Gokmenoglu, N Kara: Low level laser therapy induces increased viability and proliferation in isolated cancer cells. Cell Prolif 2018, 51(2):e12417.
69. ST Sonis, S Hashemi, JB Epstein, RG Nair, JE Raber-Durlacher: Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. Oral Oncol 2016, 54:7-14.

70. F Bozzano, C Perrone, L Moretta, A De Maria: NK Cell Precursors in Human Bone Marrow in Health and Inflammation. Frontiers in Immunology 2019, 10.
71. D de Villiers, M Potgieter, MA Ambele, L Adam, C Durandt, MS Pepper: The Role of Reactive Oxygen Species in Adipogenic Differentiation. In: Stem Cells: Biology and Engineering: 2018// 2018; Cham: Springer International Publishing; 2018: 125-144.
72. H Peng, R Sun: Liver-resident NK cells and their potential functions. Cell Mol Immunol 2017, 14(11):890-894.
73. A Ludin, S Gur-Cohen, K Golan, KB Kaufmann, T Itkin, C Medaglia, XJ Lu, G Ledergor, O Kollet, T Lapidot: Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. Antioxid Redox Signal 2014, 21(11):1605-1619.
74. S Murray, A Lundqvist: Targeting the tumor microenvironment to improve natural killer cell-based immunotherapies: On being in the right place at the right time, with resilience. Hum Vaccin Immunother 2016, 12(3):607-611.
75. MCdC Deluca, RK Scarparo, M Aspesi, BF Matte, LM Brand, FS Grecca, L Casagrande, PMP Kopper: Cytotoxic, Migration, and Angiogenic Effects of Photodynamic Therapy and Photobiomodulation Associated with a Revascularization Protocol. Journal of Endodontics 2021, 47(1):69-77.
76. R Winter, P Dungel, FMJ Reischies, S Rohringer, P Slezak, C Smolle, S Spendel, LP Kamolz, N Ghaffari-Tabrizi-Wizsy, K Schicho: Photobiomodulation (PBM) promotes angiogenesis in-vitro and in chick embryo chorioallantoic membrane model. Sci Rep 2018, 8(1):17080.
77. S Sanjabi, LA Zenewicz, M Kamanaka, RA Flavell: Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. Curr Opin Pharmacol 2009, 9(4):447-453.
78. B Bierie, HL Moses: Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. Cytokine Growth Factor Rev 2010, 21(1):49-59.
79. E Batlle, J Massagué: Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer. Immunity 2019, 50(4):924-940.
80. G Bellone, M Aste-Amezaga, G Trinchieri, U Rodeck: Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. J Immunol 1995, 155(3):1066-1073.
81. L Bergmann, DK Schui, J Brieger, E Weidmann, PS Mitrou, D Hoelzer: The inhibition of lymphokine-activated killer cells in acute myeloblastic leukemia is mediated by transforming growth factor-beta 1. Exp Hematol 1995, 23(14):1574-1580.
82. V Zaiatz-Bittencourt, DK Finlay, CM Gardiner: Canonical TGF-β Signaling Pathway Represses Human NK Cell Metabolism. The Journal of Immunology 2018, 200(12):3934-3941.
83. MR Hamblin: Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. AIMS Biophys 2017, 4(3):337-361.
84. Z Wang, D Guan, J Huo, SK Biswas, Y Huang, Y Yang, S Xu, KP Lam: IL-10 Enhances Human Natural Killer Cell Effector Functions via Metabolic Reprogramming Regulated by mTORC1 Signaling. Front Immunol 2021, 12:619195.

85. SC Miller, SR Pandi-Perumal, AI Esquifino, DP Cardinali, GJ Maestroni: The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. Int J Exp Pathol 2006, 87(2):81-87.

سومین کنفرانس ملی یافته های نوین زیست شناسی
3rd National Conference On New Biological Findings
۳ الی ۵ خرداد ۱۴۰۲

Comparative investigation of the antibacterial effect of the leaf and stem extracts of the Passiflora caerulea by broth microdilution method

Hadis Tavafi[1]*, Narges Tork[2]

[1]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran

[2]Master's student of Industrial Microbiology, Faculty of Sciences, Razi University Kermanshah, Kermanshah, Iran

*Corresponding author: Hadis Tavafi, Assistant Professor, PhD in microbiology, Malayer University. hadistavafai@yahoo.com

Abstract:

Introduction: Today, the use of medicinal plants with the aim of improving respiratory problems, treating infections, reducing the side effects of synthetic-chemical compounds and bacterial resistance to antibiotics has become very important. Passionflower (*Passiflora caerulea* L.) is a valuable medicinal plant and has potential antibacterial compounds. The phenolic compounds present in *Passiflora caerulea* have a very important role in inhibiting the growth of bacteria. These compounds are a good alternative to chemical antimicrobial compounds. The present study was conducted with the aim of comparing the antimicrobial effects of the extracts of the leaves and stems of the *P. caerulea* against human pathogens. **Methods**: The antibacterial properties of the leaf and stem extracts of the *P. caerulea* was tested against four human pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, by broth microdilution method. Minimum Inhibitory concentration (MIC) and Minimum Bactericidal concentration (MBC) were measured to evaluate the antibacterial effects of *P. Caerulea* extracts. **Results**: The analyzed results showed that the ethanol extract of the leaf compared to the stem extract has the highest growth inhibition rate against the tested bacterial species. **Conclusion**: Therefore, the results of the study can help as a new strategy for the development of new drugs against pathogenic microbes and progress in the future of the pharmaceutical industry.

Keywords: *Passiflora caerulea* L., Antibacterial, Microdilution broth, MIC, MBC

Introduction

The use of herbal medicines for the treatment of various diseases has existed since prehistoric times. Medicinal plants are the "backbone" of traditional medicine, meaning that more than 3.3 billion people in less developed countries use medicinal plants regularly. Bioactive compounds extracted from medicinal plants can be used as stimulants, hallucinogens, insecticides, poisons, therapeutic agents, antimicrobial agents, food additives, pesticides, colors, flavorings, cosmetics and pharmaceuticals [1].

Passiflora caerulea is a woody vine that can grow up to 25 meters tall where supporting trees are available. The leaves are alternate, palmately five-lobed (sometimes three, seven or nine-lobed) and up to 10 cm long while being 1-6 oblong in shape. The base of each leaf has a 5-10 cm long flagellated twin tendril that wraps around the vegetation to hold the plant up. The flower of the plant is complex, about 10 cm in diameter, with five sepals and similar petals, white in color, covered by a corolla of blue or purple filaments, then five greenish-yellow stamens and three stamens, Purple stigmas. The fruit is an oval yellow-orange berry, 6 cm long by 4 cm in diameter, containing numerous seeds. The presence of antimicrobial activity in a particular part of a particular species may be due to the presence of one or more bioactive compounds such as alkaloids, glycosides, flavonoids, steroids, saponins, etc. [2].

The aim of this study is to investigate the antibacterial activity of *P. caerulea* leaf and stem extracts on the growth of gram-negative and gram-positive pathogenic bacteria, which was performed by broth microdilution method.

Materials and Methods

Preliminary preparation of *Passiflora caerulea* plant

First, fresh leaves and stems of *Passiflora caerulea* (Melayer University herbarium number 3604, *Passiflora caerulea*) were washed with distilled water and disinfected with 70% alcohol. The stems were divided into small pieces and finally the leaves and chopped stems were dried at 40-50°C for 5 days. After the leaves and stems were completely dry, they were ground.

Preparation of leaf and stem extracts of *P. caerulea*

25 grams of powdered plant material were mixed with 100 ml of acetone (100%, Merck), ethanol (70%, Merck), methanol (100%, Merck) and water and kept for 72 hours at room temperature (25-28°C) and the bottles were shaken several times during this period of time. After 72 hours, the extracts were separated by sterile cleaning, and then each of the extracts was filtered by Whatman No. 1 paper. Then the filtered extracts were placed in a steam bath at a temperature of 65-70°C to evaporate the solvent and dry the extracts completely. The dried extracts were collected in powder form and re-dissolved in solvent: distilled water at a ratio of 50:50 and stored at 4°C for further analysis.

Bacterial strains studied

In this study, bacterial strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Escherichia coli* (ATCC 8739) and *Pseudomonas aeruginosa*

(ATCC 27853) were used, which were obtained from Iran's Biological Resources Center. Each of the strains were cultured in Mueller Hinton agar (MHA) medium and finally, bacterial stock was prepared from each strain using 50% glycerol and stored at -20°C for antibacterial studies.

Evaluation of the antibacterial activity of the leaf and stem extracts of the *P. caerulea* by broth microdilution method

Determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by Broth Microdilution method

To determine the MIC of the leaf and stem extracts of the *P. caerulea* on the growth of the studied bacteria, the microdilution method was used in the Microtiter plate. MIC was determined according to the CLSI M100-S22 standard method.

S. aureus, *S. pyogenes*, *E. coli* and *P. aeruginosa* were removed from the -20°C freezer and cultured in MHA medium. After one day and night heating period at 37°C, a few colonies were removed from the culture medium of each bacterium with a loop and heated in 5 ml of Mueller Hinton Broth (MHB) medium for one night at 37°C and 150 rpm speed. Using sterile MHB medium, a dilution equal to 0.5 McFarland was prepared for each of the studied bacteria. The obtained dilutions were diluted 150 times using sterile physiological serum.

Then, 100 µl of the sterile MHB medium was added to each well of the microtitre plate and a dilution series of 0.078-40 mg/ml was prepared from the extracts at a concentration of 80 mg/ml in each row of the plate (10 wells). Then McFarland's 0.5 suspensions, which was diluted 150 times, were added to each well with a volume of 100 µl. Wells 11 and 12 were considered as control of bacterial growth (positive control) and control of sterility of culture medium (negative control), respectively. 3 replicates were done for each extract. After the heating period (24 hours at 37°C), the growth rate of bacteria in the wells was checked. The lowest dilution of extracts that inhibited bacterial growth was considered as MIC.

Determination of MBC of planktonic cells

To determine the MBC of bacteria, 10 µl of wells without turbidity were cultured on MHA medium and heated at 37°C for 24 hours.

Statistical analysis

Significant differences were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) with pairwise comparisons using Tukey's test. The $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. The statistical analysis was performed by Prism5 and Minitab17 software.

Results

The results of determining the MIC of the studied bacteria by Broth Microdilution method

In order to check the MIC of the studied extracts (acetone, ethanol, methanol, and aqueous extracts of the leaves and stems of the *P. caerulea*) of 4 strains of *S. aureus*, *S.pyogenes*, *E. coli* and *P. aeruginosa* were used. The lowest concentration in which no turbidity was observed in the presence of extracts was considered as the MIC. Table 1 shows the results of

this study. Fig 1 is an example of a 96-well microplate that shows the MIC results of ethanolic leaf extract on the growth of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. pyogenes* bacteria.

Table 1: MIC of the examined extracts for the studied bacteria in the MHB

extracts	concentration range (mg/mL)	MIC (mg/mL)			
		P.aeruginosa	*E.coli*	*S.aureus*	*S.pyogenes*
Acetanonic extract from the leaves	0.078- 40	40	20	40	20
Ethanolic extract from the leaves	0.078- 40	10	10	10	5
Methanolic extract from the leaves	0.078- 40	40	40	40	20
Water extract from the leaves	0.078- 40	20	20	20	40
Acetanonic extract from the stems	0.078- 40	>40	>40	>40	>40
Ethanolic extract from the stems	0.078- 40	40	40	20	20
Methanolic extract from the stems	0.078- 40	40	>40	40	>40
Water extract from the stems	0.078- 40	>40	>40	40	>40

*The results showed that stem extracts showed weaker growth inhibitory power on bacteria than leaf extracts. Among the leaf extracts, the ethanol extract of the leaves showed a significant effect on inhibiting the growth of bacterial cells and was more effective than other extracts ($p \leq 0.05$).

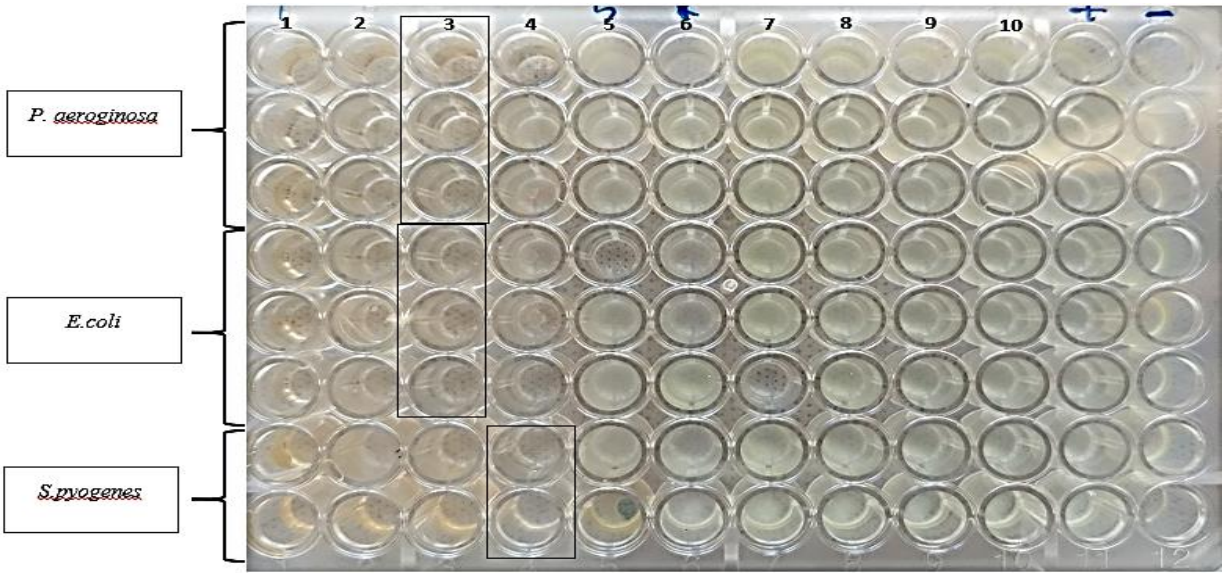


Figure 1: 96-well microplate sample of MIC of leaf ethanol extract on the studied bacteria. Well number 3 in *P.aeroginosa* and *E.coli* showed a concentration of 10 mg/ml and well number 4 in *S.pyogenes* showed a concentration of 5 mg/ml, which were considered as MIC.

Results of determination of MBC of bacterial cells

After determining the MIC, wells without turbidity were cultured on MHA medium and the results were analyzed after 24 hours. The lowest concentration that causes the death of 99.9% of the inoculated bacteria was considered as the MBC (Table 2).

Table 2: MBC of the examined extracts for the studied bacteria on MHA medium

extracts	concentration range (mg/mL)	MBC (mg/mL)			
		P.aeruginosa	*E.coli*	*S.aureus*	*S.pyogenes*
Acetanonic extract from the leaves	0.078- 40	MBC>MIC	MBC=MIC	MBC=MIC	MBC=MIC
Ethanolic extract from the leaves	0.078- 40	MBC=MIC	20	20	20
Methanolic extract from the leaves	0.078- 40	MBC=MIC	MBC>MIC	MBC>MIC	MBC=MIC
Water extract from the leaves	0.078- 40	MBC>MIC	MBC>MIC	MBC=MIC	MBC>MIC
Acetanonic extract from the stems	0.078- 40	MBC>MIC	MBC>MIC	MBC>MIC	MBC>MIC

Ethanolic extract from the stems	0.078- 40	MBC>MIC	MBC=MIC	MBC=MIC	40
Methanolic extract from the stems	0.078- 40	MBC>MIC	MBC>MIC	MBC=MIC	MBC>MIC
Water extract from the stems	0.078- 40	MBC>MIC	MBC>MIC	MBC>MIC	MBC>MIC

*The results showed that stem extracts showed less bactericidal power on bacteria than leaf extracts. Among the leaf extracts, the ethanol extract of the leaves showed a significant effect on the lethality of bacterial cells compared to other extracts ($p \leq 0.05$).

Discussion:

In microbial studies, *P. caerulea* extracts contain complex compounds that make microbial compatibility difficult. According to the results obtained from the studies, the antimicrobial activity of the tested plant extracts depends on the type of extract and the part of the plant used. In the present study, *P. caerulea* leaf and stem extracts were used and the results showed that the highest efficiency of antibacterial activity was related to the extracts extracted from *P. caerulea* leaves and the ethanolic extract had antibacterial activity compared to other extracts. Badalova et al in 2022, extracted extracts from different parts of the *P. caerulea* (*passiflora* fruit and leaves) and reported that the ethanolic leaf extract showed more antibacterial activity, which is similar to the results of this study [3]. Al-Rubaey in 2019, reported that the methanolic extract of *P.caerulea* leaves showed maximum growth inhibition against *B.cereus* [2]. In our study, the ethanolic leaf extract showed more antibacterial properties. The effectiveness of the extract largely depends on the type of solvent used in the extraction. It is widely hypothesized that the inhibition of each extract is attributed to the presence of phenolic compounds because phenolics sensitize the phospholipid bilayer of the microbial cytoplasmic membrane, which increases membrane permeability and disrupts bacterial enzymes, and they make it sensitive [4].

In the present study, the extracts of *P. caerulea* was tested against 4 pathogenic strains and showed antibacterial activity against all species. The results showed that the extracted extracts of the leaves and stem of *P. caerulea* in organic solvents, i.e. ethanol, methanol and acetone, show more antimicrobial activity than the aqueous solvent because the antimicrobial compounds were polar or non-polar, and they were through The organic solvent medium was extracted at its highest level. Organic solvent extraction is suitable for confirming the antimicrobial properties of medicinal plants and they were supported by many researchers [5,6]. According to the results of our research and Ramaiya et al. in 2014, it was reported that methanol extracts followed by ethanol and acetone were all three determined as effective solvents for the extraction of antibacterial compounds from plant tissues [4]. According to previous studies and the present study, it justifies the claimed uses of marigold in the medical system to treat various infectious diseases caused by bacteria [6]. Today, in order to increase the widespread use of marigold extracts of medicines, more research is needed to find active compounds from raw marigold extracts as well as their chemical structures, mode of operation and effectiveness.

Acknowledgements: This research project has been supported by Biology laboratory of Malayer University.

References

1: Prithviraj H.S, Hemanth Kumar N.K, Basavaraj G.L, Nataraj K, Shobha Jagannath. (2023).Preliminary phytochemical analysis and antibacterial activity of leaf and leaf derived callus extracts of *Passiflora caerulea*: An important medicinal plant. World Journal of Advanced Research and Reviews, 17(01), 203–209

2: AL-Rubaey N KF, Abbas FM, Hameed IH. (2019).Antibacterial and Anti-Fungal Activity of Methanolic Extract of *Passiflora caerulea.* Indian Journal of Public Health Research & Development, Vol. 10, No. 01

3: Badalova V., Suleymanov T., Mammadov R., Atay M. (2022). Determination of the antimicrobial activity of ethanolic extracts of some *passiflora* l. species, first introduced in azerbaijan.Bulletin of Science and Practice.2022. 92-101.no.5.

4: Ramaiya ShD, Bujang JS, Zakaria MH. (2014).Assessment of Total Phenolic, Antioxidant,and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. Scientific World Journal. Volume 2014, Article ID 167309, 10 pages

5:Natarajan , S.John Britto , K. Srinivasan , N. Nagamurugan , C. Mohanasundari , G. Perum al. (2005).Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*—A rare medicinal herb. Journal of Ethnopharmacology. 102(1), 123-126.

6: C. Mohanasundari, D. Natarajan, K. Srinivasan, S. Umamaheswari A. Ramachandran. (2007). Antibacterial properties of Passiflora foetida L. – a common exotic medicinal plant. African Journal of Biotechnology. 6 (23), pp. 2650-2653.

Drug delivery based on bio-based nanostructured materials in coronavirus disease

Asma Khoobi*

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan 98135-674, Iran
Corresponding Author's E-mail Address: a.khoobi@science.usb.ac.ir

Abstract

Nanostructured materials have been widely used in drug delivery systems. Covid-19 is an acronym for Coronavirus Disease- 2019. The global healthcare sector has been dealing with a situation known as a novel severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2) since 2019. Nanostructured materials have been shown numerous advantageous effects like safety, increasing the efficacy of the drug, and etc. In the present work, the effect of nanomaterials during drug delivery system in Covid-19 is presented. Bio-based nanostructured materials can be deliver drugs to the specific target site. This work presents insights about application of bio-based nanostructured materials drug delivery systems for the treatment of COVID-19 for increasing the bioavailability of current drugs, reducing their toxicity, and for enhancement of their efficiency.

Keywords: Drug delivery, Nanostructured materials, Coronavirus

1. Introduction

A globally spreading disease recognized as a novel severe acute respiratory syndrome called coronavirus 2 (SARS-CoV-2, COVID-19) pandemic starts since the end of 2019. Subsequent, the World Health Organization (WHO) statement of SARS-COV-2 as a public health challenge of global concern, the international committee on Taxonomy of Viruses has classified SARS-COV-2 as the seventh member of the corona virus family associated with human infection [1,2]. This classification follows prior outbreaks associated with Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus or SARS-CoV in 2002 and Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus (MERS-CoV) in 2012. The original name of the new pathogen was 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) as the pathogen associated with the infection [3]. The Covid-19 outbreak has spread throughout the world; it is currently a threat of morbidity and mortality worldwide. Therefore, reports of human-to-human transmission of the virus skyrocketed, as subsequent diagnosis of Covid-19 infection occurred among individuals who had no exposure to animals [4].

Nanotechnology is defined as the study, manipulation, design, control, synthesis, and formation of different systems through control of matter at 1-100 nm with a novel phenomenon and enhanced properties [5]. Nanostructure drug formulations production a key role in pulmonary drug delivery. In dispersed liquid droplets form and in dry powder form different nanostructures complex shows beneficial result involving the high potential for drug delivery, and improving dissolution properties makes very uncourageous results to deliver the drug through the lungs [6]. New advances of science in drug delivery systems are very concerned upon polymers and their types as they exert salient features and distinct biological functions. Biopolymeric nanostructures such as gelatin and chitosan can be applied to deliver different drugs, similarly, to deliver the drug in the case of COVID-19 [7,8]. The loading of the drug on the nanostructured materials is defined and based upon the amount of drug per mass of the polymer. Different methods can be applied for analysis such as gel filtration, HPLC, spectroscopy, chromatography, and etc. This work presents the potential role of studying topical intranasal delivery of drugs and agents known to have antiviral properties in COVID-19 based on bio-nanomaterials.

2. SARS-CoV-2 pathogenesis

Coronaviruses as a group have high genetic variability and recombination rates that assist generation of pathogenic and highly contagious strains [9.10]. Although the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection remains poorly understood, the virus is genetically and structurally related to SARS-COV. Therefore, a focus on the mechanisms underlying MERS-CoV and SARS-CoV pathogenesis may elucidate critical factors associated with COVID-19 [11]. SARS-CoV-2 reaches the alveolar epithelial cells of the lower lung by transit through the respiratory tract, start with mucous membranes in the nasopharynx [12,13].

3. Clinical presentation of COVID-19

The clinical spectrum of COVID-19 infection includes a wide range and varies from asymptomatic to the most severe manifestations containing hospitalization and respiratory support. The incubation period for COVID-19 is currently reported about 14 days following exposure [11]. Recent publications contain reports of symptoms that differ from mild to

severe. The most common clinical features associated with COVID-19 are cough, fever, sore throat, severe dyspnea, muscle soreness, expectoration, and fatigue; other symptoms noted less frequently are hemoptysis, rhinorrhea, headache, and gastrointestinal symptoms, involving diarrhea, nausea, and vomiting [12-14]. Clinical diagnosis of COVID-19 infection is based on epidemiological history, clinical presentation, the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect virus-specific nucleic acid, blood cultures, computed tomography (CT) scan, and immunological testing for virus antigen or serum COVID-19 antibodies [11].

4. Prevention of COVID-19

The main strategies used to prevent COVID-19 infection focus on blocking the route of transmission, avoiding exposure to individuals who might be infected, and providing protection for the highly susceptible individuals [15]. Fundamental standard ways contain being careful to prevent touching one's face with unwashed hands, application of a face mask when in public, covering coughs and sneezes with tissues, frequent hand washing with soap and water for at least 20 seconds, use of hand sanitizer that contains at least 60% alcohol, and maintaining a distance from suspected or confirmed cases [16]. Also, there are some drugs or vaccines for treatment of COVID-19. In biomedical science, the common prevailing routes are the drug-resistance of some infectious viruses, output growth protocols, and their efficiency in courses of toxicity, remedial time, and side impacts on the individual cells. Furthermore, discovering the infection-causing viral pathogen, monitoring the disease, and inhibition of some fatal diseases are essential for public health [17].

A recent study has been shown that silver nanoparticles have excellent antiviral effects and can be an exceptional choice for future development [18]. Nanofiber-based face respirators loaded with silver nanoparticles functioned as notably successful antimicrobial and antiviral disinfectants and are the principal individual defensive agents that used to prevent the spread of the infection. Additionally, there are several broad-based researches in progress that focus on the application of nano-based materials as part of an immunization approach for COVID-19. With respect to diagnostics, nanotechnology has extensively been applied for the development of sensors that may accelerate the rate of current COVID-19 tests [19]. Preliminary researches have also focused on nano-based medicines. Silver nanoparticles may have some benefits over the traditional biological solutions for cleaning and disinfection due to lower volatility. Furthermore, silver nanoparticles can be play a main role in viral disinfection, and bacterial because of their capability to enrich for reactive oxygen species [20] for example, silver nanoparticles can effectively produce extracellular reactive oxygen species which could destroy influenza virus (IV) infection [21]. Serious research is required to verify these properties to deploy these agents in the fight against COVID-19.

5. Bio-based nanostructures in COVID-19 treatment

There are numerous ways used for the synthesis of the bio-based nanostructures, such as, desolvation [22], electro spraying [23], spray-drying [24], freeze-drying [25], layer-by-layer self-assembly [26], microemulsion [7], and supercritical fluid extraction [27]. All methods have been shown advantages and drawbacks. Among the methodes, desolvation is the simple way for the preparation of protein-based nanostructures by solvents such as acetone or ethanol. In the method, biopolymeric nanostructures are manufactured by the mixing of solvents in an aqueous solution using stirring. The dimensions of the nanostructures is

maintained using controlling the flow rate of the amount of a desolvating agent [28]. Electrospray method is a single step, moderate, and multipurpose way with more yield and reliability. To produce particles from size nanometer/micrometer range it applies the electrostatic force to break liquid from a macroscopic mass [29]. Freeze-drying is an appropriate process for the materials which are heat and pressure-sensitive, dried porous particles are obtained when solvents are sublimed. But the method was shown is a time-consuming and costly method, and the obtained particle having size is usually larger [30]. The new layer-by-layer self-assembly strategy multilayer is useful for sequential multilayer film formation, which is completed from side to electrostatic interactions, side hydrophobic, and hydrogen bonding are among the films. The nanoscopic features like thickness, surface characteristics, and composition for a film can be reached by interactions that help to deposit alternate layers of oppositely charged biomaterials and supply precise control to create [31]. Also, using emulsifiers or surfactants microemulsions the synthesis of nanostructures is performed by dispersing a biopolymer in two immiscible phases of liquids. The nanomaterials that can be obtained by the method have high drug solubilizing property, are normally optically transparent, isotropic, and thermodynamically stable [7].

6. Role of Bio-based nanostructures

Chitosan nanostructures have been shown a stamped propensity to aggregate in numerous tumors. One of the potential explanations behind this marvel may be the brokenness of tumor vasculature. Nanostructured materials can be controlled intravenously due to the distance across the littlest blood hair is around 4 μm. Chitosan polymer groups significantly lower harmfulness than poly-L-lysine and PEI is less immunogenic and requires mutational potential. It upgrades the vehicle of medication across cell film. To design the transfection efficiency, cells focusing on ligands were combined to the chitosan particles. Chitosan-TPP nanostructures display a lot of potential as reasonable vector contenders for more secure and financially savvy siRNA conveyance. The chitosan nanostructures have also been used as non-viral vectors for the quality conveyance or as conveyance transporters for protein particles. Chitosan has generally been studied for the application for DNA mucosal immunizations. A chitosan-based DNA flu antibody has been reported by Illum et al. that indicated a high counteracting agent level in mice after intranasal organization. The relationship of immunizations to a portion of the particulate frameworks as nanostructures has appeared to upgrade the antigen take-up by mucosal lymphoid tissues, in this manner actuating solid foundational and mucosal safe reactions against the antigens. Since chitosan is a low poisonous material, ophthalmic definition dependent on chitosan has displayed a phenomenal resistance after applied chitosan onto the hare's corneal surface. Other than utilizing chitosan NP to improve tranquilizes transport employing visual, chitosan-covered nanoparticles is likewise used as it displays capacity to upgrade the corneal infiltration [32,33].

7. Bio-based nanostructures drug delivery systems

Nanomedicine is a novel and quickly developing area, and new nanostructures can be used in drug formulations because of their security, pharmacokinetics, efficiency, and targeting capability. Bio-based nanostructures drug delivery systems have afforded one-of-a-kind potentials to develop the therapeutic efficiency of cancer and COVID-19 vaccines, while molecular nano-carriers and or nano-adjuvants are commonly used in nanovaccines. In

melanoma, colon cancer, and human papillomavirus E6/E7, nano-vaccines have caused important immune responses that prevented tumor growth [34]. COVID-19 vaccines have been designed unprecedentedly, which would not have been possible without decades of fundamental research on delivery nanotechnology. Lipid-based nanostructures have implemented a crucial part in the progress of COVID-19 vaccines have been regarded as the frontrunner in nanoscale drug delivery systems [35,36]. Poly ethylene glycol is usually applied as a gold standard in nanomedicine and bio-conjugation to prolong blood circulation time and improve drug efficacy. The conjugation of poly ethylene glycol to peptides, proteins, oligonucleotides (DNA, small interfering RNA, microRNA) and nanoparticles is a well-established method known as PEGylation. We must note the importance of PEGylation in selective organ targeting of NPs, provides new insights into the structure–property relationship of LNPs, and offers a novel, simple, and practical poly ethylene glycol technology to design the next generation of effective and safe nanovaccines against COVID-19 [37].

8. Conclusions

In recent researches, it has been shown that nanostructures can demonstrate very helpful in the drug delivery systems for COVID-19. In many studies, it has been seen that patients, where drugs are delivered with the help of nanostructures, produced very few side effects. Several drugs have been applied to prevent COVID-19 infection counting interferon α, lopinavir/ ritonavir, chloroquine phosphate, arbidol, and ribavirin. The all drugs should be delivered into the human body at a specific range. Biopolymeric nanostructures can be applied to deliver these kinds of drugs by decreasing the risk of toxicity, with low solubility, and increasing feasible delivery of a drug. Chitosan nanostructures will be the most emergent field to study drug delivery systems and novel drug discovery. In pulmonary drug delivery, drugs are administered directly to the lungs, offering a wide surface area, which is a benefit for chitosan nanostructures, allowing them to be utilized to treat COVID-19. The studies reveal that nanostructures may show very helpful in the delivery of drugs for COVID-19 treatment.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support from the Research Council of the University of Sistan and Baluchestan.

References

[1] Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., Bhattacharya, M., Lee, S. S. (2020). SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 24(7), 4016-4026.

[2] WHO, World Health Organization, Geneva, 2020.

[3] M. Cascella, M. Rajnik, A. Cuomo, S. C. Dulebohn and R. Di Napoli, in Statpearls [internet], StatPearls Publishing, 2020.

[4] Yang, J., Zheng, Y., Gou, X., Pu, K., Chen, Z., Guo, Q. Zhou, Y. (2020). Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis, 94(1), 91-95.

[5] Rytting, E., Nguyen, J., Wang, X., Kissel, T. (2008). Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. Expert opinion on drug delivery, 5(6), 629-639.

[6] Bailey, M. M., Berkland, C. J. (2009). Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. Medicinal research reviews, 29(1), 196-212.

[7] Abdolazimi, O., Salehi Esfandarani, M., Salehi, M., Shishebori, D., & Shakhsi-Niaei, M. (2023). Development of sustainable and resilient healthcare and non-cold pharmaceutical distribution supply chain for COVID-19 pandemic: a case study. The International Journal of Logistics Management, 34(2), 363-389.

[8] Dillen, K., Bozdag, S. İ. B. E. L., Vandervoort, J., Ludwig, A. (2007). Evaluation of the physicochemical characteristics and activity of various kinds of ciprofloxacin HCl-loaded cationic nanoparticles. Journal of drug delivery science and technology, 17(1), 49-56.

[9] Fehr, A. R., Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Coronaviruses: methods and protocols, 1-23.

[10] Di Gennaro, F., Pizzol, D., Marotta, C., Antunes, M., Racalbuto, V., Veronese, N., Smith, L. (2020). Coronavirus diseases (COVID-19) current status and future perspectives: a narrative review. International journal of environmental research and public health, 17(8), 2690.

[11] Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., Lu, S. (2020). Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. Journal of pharmaceutical analysis, 10(2), 102-108.

[12] Alipour, S., Mahmoudi, L., Ahmadi, F. (2023). Pulmonary drug delivery: an effective and convenient delivery route to combat COVID-19. Drug delivery and translational research, 13(3), 705-715.

[13] Bennardo, F., Buffone, C., Giudice, A. (2020). New therapeutic opportunities for COVID-19 patients with Tocilizumab: Possible correlation of interleukin-6 receptor inhibitors with osteonecrosis of the jaws. Oral Oncology, 106, 104659.

[14] Lupia, T., Scabini, S., Pinna, S. M., Di Perri, G., De Rosa, F. G., Corcione, S. (2020). 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak: A new challenge. Journal of global antimicrobial resistance, 21, 22-27.

[15] Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., Steinmann, E. (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. Journal of hospital infection, 104(3), 246-251.

[16] Adhikari, S. P., Meng, S., Wu, Y. J., Mao, Y. P., Ye, R. X., Wang, Q. Z. (2020). Sun c, Sylvia S, Rozelle S, Raat H and Zhou H: Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (cOVId-19) during the early outbreak period: A scoping review. Infect dis Poverty, 9, 29.

[17] Robson, B. (2020). COVID-19 Coronavirus spike protein analysis for synthetic vaccines, a peptidomimetic antagonist, and therapeutic drugs, and analysis of a proposed achilles' heel conserved region to minimize probability of escape mutations and drug resistance. Computers in biology and medicine, 121, 103749.

[18] Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., Delekar, S. D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. Materials Science and Engineering: C, 97, 954-965.

[19] Yi, J., Mudumbai, R., Xu, W. (2020). Low-cost and high-throughput testing of COVID-19 viruses and antibodies via compressed sensing: System concepts and computational experiments. arXiv preprint arXiv:2004.05759.

[20] El-Batal, A. I., Mosallam, F. M., El-Sayyad, G. S. (2018). Synthesis of metallic silver nanoparticles by fluconazole drug and gamma rays to inhibit the growth of multidrug-resistant microbes. Journal of Cluster Science, 29(6), 1003-1015.

[21] Abd Elkodous, M., Olojede, S. O., Morsi, M., El-Sayyad, G. S. (2021). Nanomaterial-based drug delivery systems as promising carriers for patients with COVID-19. RSC advances, 11(43), 26463-26480.

[22] 22 Fu, C., Ding, C., Sun, X., Fu, A. (2018). Curcumin nanocapsules stabilized by bovine serum albumin-capped gold nanoclusters (BSA-AuNCs) for drug delivery and theranosis. Materials Science and Engineering: C, 87, 149-154.

[23] Bakhsheshi-Rad, H. R., Hadisi, Z., Hamzah, E., Ismail, A. F., Aziz, M., Kashefian, M. (2017). Drug delivery and cytocompatibility of ciprofloxacin loaded gelatin nanofibers-coated Mg alloy. Materials Letters, 207, 179-182.

[24] Jiang, W. Z., Cai, Y., Li, H. Y. (2017). Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. Powder technology, 312, 124-132.

[25] Iwao, Y., Tomiguchi, I., Domura, A., Mantaira, Y., Minami, A., Suzuki, T., Itai, S. (2018). Inflamed site-specific drug delivery system based on the interaction of human serum albumin nanoparticles with myeloperoxidase in a murine model of experimental colitis. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 125, 141-147.

[26] Shiraki, K., Daikoku, T. (2020). Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. Pharmacology therapeutics, 209, 107512.

[27] Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature, 581(7809), 465-469.

[28] Ungaro, F., Catanzano, O., d'Angelo, I., Diaz-Gomez, L., Concheiro, A., Miro, A., Quaglia, F. (2017). Microparticle-embedded fibroin/alginate beads for prolonged local release of simvastatin hydroxyacid to mesenchymal stem cells. Carbohydrate polymers, 175, 645-653.

[29] Liu, X., Wang, X. J. (2020). Potential inhibitors against 2019-nCoV coronavirus M protease from clinically approved medicines. Journal of Genetics and Genomics, 47(2), 119.

[30] Sivasankarapillai, V. S., Pillai, A. M., Rahdar, A., Sobha, A. P., Das, S. S., Mitropoulos, A. C., Kyzas, G. Z. (2020). On facing the SARS-CoV-2 (COVID-19) with combination of nanomaterials and medicine: possible strategies and first challenges. Nanomaterials, 10(5), 852.

[31] G., Li, L., Huo, D., Li, Y., Wu, Y., Zeng, L., Zhu, C. (2017). A VEGF delivery system targeting MI improves angiogenesis and cardiac function based on the tropism of MSCs and layer-by-layer self-assembly. Biomaterials, 127, 117-131.

[32] Moreno, J. A. S., Mendes, A. C., Stephansen, K., Engwer, C., Goycoolea, F. M., Boisen, A., Chronakis, I. S. (2018). Development of electrosprayed mucoadhesive chitosan microparticles. Carbohydrate polymers, 190, 240-247.

[33] Chowdhury, N. K., Choudhury, R., Sonawane, G. A., Mavinamar, S., Lyu, X., Pandey, R. P., Chang, C. M. (2021). Nanoparticles as an effective drug delivery system in COVID-19. Biomedicine & Pharmacotherapy, 143, 112162.

[34] Yin, W. M., Li, Y. W., Gu, Y. Q., Luo, M. (2020). Nanoengineered targeting strategy for cancer immunotherapy. Acta Pharmacologica Sinica, 41(7), 902-910.

[35] Abd Elkodous, M., Olojede, S. O., Morsi, M., El-Sayyad, G. S. (2021). Nanomaterial-based drug delivery systems as promising carriers for patients with COVID-19. RSC advances, 11(43), 26463-26480.

[36] Abd Elkodous, M., Olojede, S. O., Morsi, M., El-Sayyad, G. S. (2021). Nanomaterial-based drug delivery systems as promising carriers for patients with COVID-19. RSC advances, 11(43), 26463-26480.

[37] 37 Hoang Thi, T. T., Pilkington, E. H., Nguyen, D. H., Lee, J. S., Park, K. D., Truong, N. P. (2020). The importance of poly (ethylene glycol) alternatives for overcoming PEG immunogenicity in drug delivery and bioconjugation. Polymers, 12(2), 298.

The Effects of the COVID-19 Pandemic on Antimicrobial Resistance

Ali Qasemi[1,*], Naghme Shahba[1], Bita Zamen[1]

[1] Depatment of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

* Corresponding author: Ali Qasemi, Depatment of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran. Email: Qasemi@science.usb.ac.ir

Abstract

The COVID-19 pandemic has had profound effects on global health systems, economies, and societies worldwide. However, its impact on antimicrobial resistance (AMR) has received limited attention. This review paper aims to explore and analyze the effects of the COVID-19 pandemic on AMR, including the challenges faced, potential drivers of AMR, and mitigation strategies. Through an extensive literature review, this paper examines the relationship between the pandemic and AMR, highlighting the need for a comprehensive approach to combat both crises. The findings emphasize the importance of strengthening antimicrobial stewardship programs, improving infection prevention and control measures, and promoting research and development of new antibiotics. This paper provides insights into the complex interplay between COVID-19 and AMR and proposes strategies to mitigate the long-term consequences of these intertwined global challenges.

Keywords: COVID-19 pandemic, antimicrobial resistance, antibiotics, antimicrobial stewardship, infection prevention and control, global health

Introduction

The emergence of the COVID-19 pandemic has presented significant challenges to healthcare systems worldwide. The rapid spread of the novel coronavirus, SARS-CoV-2, has strained healthcare resources, overwhelmed hospitals, and led to millions of infections and deaths globally. While the direct impact of COVID-19 on human health and the global economy has been extensively studied, the repercussions on antimicrobial resistance (AMR) have received relatively limited attention (1, 2).

Antimicrobial resistance is a pressing global health threat characterized by the ability of microorganisms, such as bacteria, viruses, fungi, and parasites, to withstand the effects of antimicrobial drugs. The rise of AMR has been fueled by various factors, including the overuse and misuse of antibiotics, inadequate infection prevention and control practices, and a lack of development of new antimicrobial agents. The consequences of AMR are far-reaching, with increased morbidity, mortality, healthcare costs, and societal burden (3).

The COVID-19 pandemic has brought into focus the delicate balance between infectious diseases and the efficacy of antimicrobial treatment. The widespread use of antibiotics during the pandemic, both justified and unjustified, has raised concerns about the potential acceleration of AMR. Furthermore, disruptions to routine healthcare services, including routine surveillance and antimicrobial stewardship programs, have created an environment that may promote the emergence and spread of resistant pathogens (4).

This review paper aims to investigate the effects of the COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance. By examining the existing literature, we will explore the potential drivers of AMR during the pandemic, the challenges faced in AMR surveillance, and the implications for global health and public policy. Additionally, this paper will propose mitigation strategies and interventions to address the complex interplay between COVID-19 and AMR (5).

Understanding the relationship between the COVID-19 pandemic and AMR is crucial for developing comprehensive approaches to tackle these intertwined global challenges. By shedding light on the consequences of the pandemic on AMR and proposing strategies for mitigation, this review aims to contribute to the ongoing efforts to safeguard effective antimicrobial treatment options and protect global health (6).

Overall, this paper seeks to highlight the urgent need for a coordinated and multidisciplinary approach to address both the COVID-19 pandemic and the growing threat of antimicrobial resistance. By integrating effective infection prevention and control measures, strengthening antimicrobial stewardship programs, promoting research and development of new antibiotics, and enhancing public health education and awareness, we can work towards mitigating the long-term consequences of these intertwined global crises (7).

The Link between COVID-19 and antimicrobial resistance

The increased demand for healthcare services during the pandemic has led to a rise in antibiotic prescribing rates. Antibiotics have been frequently prescribed to COVID-19 patients, both to cover potential bacterial co-infections or secondary infections and due to the desire to provide comprehensive care. However, the routine use of antibiotics for viral respiratory infections is ineffective and unnecessary, and the misuse and overuse of antibiotics can fuel the development of antibiotic-resistant bacteria. The consequences of increased antibiotic use during the pandemic include the selection and dissemination of antimicrobial-resistant pathogens, limiting treatment options and increasing morbidity and mortality rates (8).

AMR surveillance has faced significant challenges during the pandemic. The overwhelming demand on healthcare systems has diverted attention and resources away from routine surveillance activities, reducing the capacity to collect and analyze clinical specimens for resistance patterns. Disruptions in laboratory services, including the reallocation of resources for COVID-19 testing, have resulted in delayed or deferred analysis of specimens, leading to potential gaps in data on AMR trends. The lack of standardized reporting mechanisms and data harmonization hampers the ability to analyze and compare data at different levels. Changes in patient care-seeking behavior and healthcare delivery models have also impacted the representativeness of AMR surveillance data (9).

Healthcare disruptions during the pandemic have inadvertently promoted AMR. Repurposing healthcare facilities for COVID-19 care has led to overcrowding and increased patient-to-patient contact, facilitating the transmission of resistant pathogens. Resource constraints and workforce challenges have strained the capacity to implement effective infection prevention and control practices, leading to breaches in standard precautions and compromised sterilization and disinfection practices. Delays or deferrals of non-COVID-19 healthcare services have increased the risk of healthcare-associated infections and the indiscriminate use of antibiotics. Workforce challenges have impacted healthcare providers' ability to adhere to best practices in antimicrobial prescribing and stewardship efforts have been hampered (10).

Mitigating the impact of the COVID-19 pandemic on AMR requires a coordinated and multidisciplinary approach. Robust antimicrobial stewardship programs should be implemented and strengthened to promote judicious antibiotic prescribing practices and prevent the emergence and spread of resistance. Innovative approaches to AMR surveillance, such as remote data collection and enhanced data sharing, can improve the timeliness and completeness of data. Strengthening infection prevention and control practices, ensuring adequate availability of resources and PPE, and providing training and support to healthcare providers are crucial steps. Additionally, investment in healthcare workforce resilience can help maintain optimal patient care and minimize the impact on AMR (11).

In conclusion, the COVID-19 pandemic has had significant implications for AMR. The increased use of antibiotics, disruptions in AMR surveillance, and healthcare disruptions have collectively contributed to the promotion of AMR. Addressing these challenges requires comprehensive approaches that encompass antimicrobial stewardship, innovative surveillance

methods, infection prevention and control, resource allocation, and healthcare workforce support. By doing so, we can mitigate the impact of the pandemic on AMR and safeguard effective antimicrobial treatment options for future generations (12).

Drivers of Antimicrobial Resistance during the Pandemic

The COVID-19 pandemic has had a significant impact on antimicrobial resistance (AMR) due to various factors. Inadequate implementation of infection prevention and control measures has been a key contributor to the promotion of AMR. The focus on preventing COVID-19 transmission has sometimes led to neglect of other infectious diseases, resulting in lapses in standard precautions and hand hygiene. Additionally, the scarcity of personal protective equipment (PPE) during the early stages of the pandemic compromised IPC efforts, leading to suboptimal infection control practices. Overcrowding and compromised physical distancing measures in healthcare facilities have facilitated the transmission of multidrug-resistant organisms (MDROs) and other pathogens (13).

The increased use of broad-spectrum antibiotics during the pandemic has also contributed to AMR. Patients with COVID-19 often receive antibiotics without clear evidence of bacterial infection, leading to unnecessary antibiotic exposure and the potential selection of resistant strains. Diagnostic uncertainty and the fear of secondary bacterial infections have further fueled the overuse of antibiotics. Disruptions in healthcare services have resulted in postponed or delayed treatments, necessitating the use of broad-spectrum antibiotics for prophylaxis or treatment, which contributes to the development of AMR (13).

The misuse of antimicrobials in COVID-19 treatment has been another concern. Diagnostic uncertainty, especially in the early stages of the pandemic, led to the prescription of antibiotics as a precautionary measure, even in the absence of bacterial co-infections. The lack of specific antiviral treatments for COVID-19 has also prompted the exploration of various antimicrobial agents without clear evidence of their efficacy. Global demand for healthcare resources has put pressure on healthcare systems, leading to suboptimal use of antimicrobials in some cases (14).

The disruptions caused by the pandemic have also affected AMR stewardship programs. Resources and attention have been diverted toward COVID-19 response, reducing focus on AMR-related activities. The reconfiguration of healthcare facilities, implementation of infection control measures, and increased workloads have strained healthcare systems' capacity to sustain AMR stewardship efforts. Educational and training programs have also been disrupted, hindering the dissemination of best practices in antimicrobial use (15).

To address these challenges, it is crucial to prioritize and strengthen infection prevention and control efforts. Adequate availability and appropriate use of PPE, as well as strict adherence to hand hygiene practices and surface disinfection, are essential. Improving diagnostic capabilities for respiratory infections, implementing antimicrobial stewardship programs, and raising public awareness about appropriate antimicrobial use are also key strategies. Collaboration among healthcare institutions, policymakers, and researchers is vital for developing evidence-based guidelines and protocols (16).

In conclusion, the COVID-19 pandemic has significantly impacted AMR due to inadequate implementation of infection prevention and control measures, increased use of broad-spectrum antibiotics, and the misuse of antimicrobials in COVID-19 treatment. Addressing these challenges requires a multifaceted approach that includes prioritizing IPC efforts, improving diagnostic capabilities, implementing antimicrobial stewardship programs, and promoting public awareness. By taking these measures, healthcare systems can mitigate the impact of AMR and improve patient outcomes during the pandemic (17).

Mitigation Strategies

The COVID-19 pandemic has highlighted the need to strengthen antimicrobial stewardship programs (ASPs) to address the challenges posed by antimicrobial resistance (AMR). Strengthening ASPs during the pandemic requires evidence-based guidelines, education and training, collaboration, technology utilization, monitoring of AMR, extending stewardship efforts to various healthcare settings, and sustained commitment from healthcare leadership. These measures aim to promote appropriate use of antimicrobials, optimize patient outcomes, and preserve the effectiveness of these agents (18).

To strengthen ASPs, evidence-based guidelines and protocols should be developed and implemented. These guidelines should provide clear recommendations for antimicrobial prescribing in the context of COVID-19, considering the diagnostic challenges and uncertainties associated with the disease. Diagnostic stewardship should be emphasized, highlighting the appropriate use of tests to differentiate between viral and bacterial infections. Regular updates and wide dissemination of guidelines are important (19).

Education and training are crucial for effective ASPs. Healthcare providers should receive targeted education on appropriate antimicrobial use in the context of COVID-19, raising awareness about antimicrobial overuse risks and limitations of antimicrobial therapy for viral infections. Various modalities like webinars and online courses can be used for education to ensure accessibility and engagement (20).

Collaboration and multidisciplinary engagement enhance ASPs. Involving specialists from infectious diseases, pharmacists, microbiologists, and infection preventionists can strengthen ASPs. These teams can develop stewardship strategies, conduct surveillance, monitor prescribing practices, and provide feedback to healthcare providers. Collaboration facilitates sharing of experiences and best practices. Technology and data analytics can enhance ASP effectiveness. Electronic health records (EHRs) and clinical decision support systems (CDSS) can provide real-time alerts, guidelines, and patient-specific recommendations, promoting evidence-based prescribing. Data analytics can identify patterns of antimicrobial use, detect deviations from guidelines, and facilitate targeted interventions (21).

Monitoring and surveillance of AMR are crucial. Robust surveillance systems can identify emerging resistance patterns, detect outbreaks of resistant infections, and guide treatment choices. Collaboration with laboratory professionals and public health agencies is vital for effective surveillance and response. ASP efforts should extend beyond acute care settings.

Implementing stewardship interventions in long-term care facilities, ambulatory care, and community settings can mitigate the spread of AMR (22).

Sustained commitment from healthcare leadership, policymakers, and funding agencies is essential. Allocating resources, integrating ASPs into healthcare policies and regulations, and supporting research and innovation are critical for sustainability and effectiveness. Enhancing infection prevention and control (IPC) measures is crucial in mitigating the impact of AMR during the pandemic. Strict adherence to standard and transmission-based precautions, robust surveillance systems, effective communication and education, innovative approaches, collaboration, and regular monitoring and evaluation are important for IPC (7).

Promoting research and development (R&D) of new antibiotics is vital in addressing the threat of AMR. Increasing investment and funding, fostering collaboration, creating supportive regulatory frameworks, exploring alternative therapeutic approaches, researching stewardship and infection prevention, facilitating global surveillance and data sharing, and promoting public awareness are key strategies to promote antibiotic R&D (23).

Public health education and awareness are essential in combating AMR. Initiatives should focus on increasing awareness about AMR, promoting appropriate antibiotic use, emphasizing infection prevention measures, facilitating behavior change, fostering collaborations, monitoring effectiveness, and utilizing digital platforms. By implementing these strategies, healthcare systems can enhance ASPs, promote responsible antimicrobial use, reduce the spread of AMR, and address the challenges posed by the COVID-19 pandemic (24).

Global Collaboration and Policy Implications

International cooperation is crucial in addressing the challenges of antimicrobial resistance (AMR) and the COVID-19 pandemic. By collaborating in surveillance, research, policy development, resource sharing, and capacity building, countries can collectively combat AMR and strengthen pandemic preparedness. Sharing surveillance data and information on AMR and COVID-19 enables the identification of resistance patterns, monitoring of disease transmission, and assessment of interventions. Research collaboration facilitates the advancement of scientific knowledge, development of strategies, and exploration of interactions between AMR and COVID-19. Policy coordination and harmonization lead to consistent guidelines and a coordinated response. Resource sharing and capacity building support low- and middle-income countries in implementing effective AMR and infection control programs. International platforms and forums promote collaboration, knowledge exchange, and the sharing of best practices (25).

Policy implications and recommendations for addressing the impact of COVID-19 on AMR are discussed. Policymakers should prioritize the implementation and enhancement of antimicrobial stewardship programs, promote infection prevention and control measures, support surveillance and data sharing, regulate antibiotic use and sales, encourage research and development, integrate AMR considerations into pandemic response plans, promote public awareness and education, and strengthen international cooperation. Strengthening

antibiotic stewardship programs involves developing guidelines, promoting education and training, and establishing monitoring systems. Enhancing infection prevention and control includes ensuring resources and adopting evidence-based practices. Promoting surveillance and data sharing involves investing in laboratory capacity and facilitating collaboration. Regulating antibiotic use and sales requires enforcing regulations and collaborating with stakeholders. Encouraging research and development involves funding, streamlining processes, and fostering partnerships. Integrating AMR considerations into pandemic response plans requires collaboration and strengthened infection control measures. Promoting public awareness and education involves investing in campaigns and collaborating with various organizations. Strengthening international cooperation involves participating in initiatives, platforms, and collaborations (26).

Overall, policymakers play a critical role in mitigating the impact of COVID-19 on AMR. Comprehensive policy measures that prioritize stewardship programs, infection prevention and control, surveillance, regulation, research and development, integration of AMR into response plans, public awareness, and international cooperation are essential to address the challenges of AMR and safeguard public health (27).

Conclusion

The COVID-19 pandemic has brought forth numerous challenges, including its impact on antimicrobial resistance (AMR). The convergence of these two global health crises calls for urgent and coordinated actions to mitigate the exacerbation of AMR. This review has highlighted the effects of the COVID-19 pandemic on AMR, including changes in antibiotic use patterns, challenges in surveillance, healthcare disruptions, and the potential misuse of antimicrobials.

The pandemic has led to increased antibiotic use, driven by various factors such as the need for empirical treatment, co-infections, and the fear of secondary bacterial infections. This surge in antibiotic consumption poses a significant risk for the development and spread of resistant bacteria. Moreover, healthcare disruptions, inadequate infection prevention and control measures, and the potential misuse of antimicrobials in COVID-19 treatment further compound the challenges in combating AMR.

To address these issues, various strategies and interventions are recommended. Strengthening antimicrobial stewardship programs is crucial to ensure appropriate antibiotic use and optimize patient outcomes. Enhancing infection prevention and control measures can reduce the transmission of infections and minimize the reliance on antibiotics. Promoting research and development efforts for new antibiotics, diagnostics, and alternative therapies is essential to combat emerging resistance. Additionally, public health education and awareness campaigns play a vital role in empowering individuals and communities to make informed decisions regarding antibiotic use and infection prevention.

International cooperation is fundamental in tackling the intertwined challenges of AMR and the COVID-19 pandemic. Collaboration in surveillance, research, policy development, resource sharing, and capacity building can strengthen global efforts and ensure a coordinated

response. Policy implications and recommendations have been outlined to guide policymakers in implementing effective measures, including the integration of AMR considerations into pandemic response plans, regulating antibiotic use, and promoting public awareness.

It is imperative to recognize that addressing AMR requires a multi-sectoral and One Health approach, involving collaboration between human health, animal health, and environmental sectors. Continued monitoring, evaluation, and adaptation of strategies are crucial to ensure their effectiveness and sustainability.

In conclusion, the COVID-19 pandemic poses significant challenges to antimicrobial resistance. However, through concerted efforts, including strong policy measures, enhanced surveillance, responsible antibiotic use, and public awareness, it is possible to mitigate the impact of the pandemic on AMR. By prioritizing collaboration, innovation, and sustainable interventions, we can strive to protect the efficacy of antimicrobials and safeguard public health for generations to come.

References:

1. Segala FV, Bavaro DF, Di Gennaro F, Salvati F, Marotta C, Saracino A, et al. Impact of SARS-CoV-2 Epidemic on Antimicrobial Resistance: A Literature Review. Viruses. 2021;13(11).
2. Davis B, Bankhead-Kendall BK, Dumas RP. A review of COVID-19's impact on modern medical systems from a health organization management perspective. Health Technol (Berl). 2022;12(4):815-24.
3. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infect Drug Resist. 2018;11:1645-58.
4. Arshad AR, Ijaz F, Siddiqui MS, Khalid S, Fatima A, Aftab RK. COVID-19 pandemic and antimicrobial resistance in developing countries. Discoveries (Craiova). 2021;9(2):e127.
5. Foley M, Cooper R. Workplace gender equality in the post-pandemic era: Where to next? : SAGE Publications Sage UK: London, England; 2021. p. 463-76.
6. Azcona G, Bhatt A, Encarnacion J, Plazaola-Castaño J, Seck P, Staab S, et al. From insights to action: Gender equality in the wake of COVID-19: United Nations Entity for Gender Equality and the Empowerment of Women (UN …; 2020.
7. Harun MGD, Anwar MMU, Sumon SA, Hassan MZ, Mohona TM, Rahman A, et al. Rationale and guidance for strengthening infection prevention and control measures and antimicrobial stewardship programs in Bangladesh: a study protocol. BMC Health Serv Res. 2022;22(1):1239.
8. Malik SS, Mundra S. Increasing Consumption of Antibiotics during the COVID-19 Pandemic: Implications for Patient Health and Emerging Anti-Microbial Resistance. Antibiotics (Basel). 2022;12(1).
9. Knight GM, Glover RE, McQuaid CF, Olaru ID, Gallandat K, Leclerc QJ, et al. Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications. Elife. 2021;10.

10. Ezzati F, Mosadeghrad AM, Jaafaripooyan E. Resiliency of the Iranian healthcare facilities against the Covid-19 pandemic: challenges and solutions. BMC Health Serv Res. 2023;23(1):207.
11. Haseeb A, Saleem Z, Maqadmi AF, Allehyani RA, Mahrous AJ, Elrggal ME, et al. Ongoing Strategies to Improve Antimicrobial Utilization in Hospitals across the Middle East and North Africa (MENA): Findings and Implications. Antibiotics. 2023;12(5):827.
12. Azcona G, Bhatt A, Davies SE, Harman S, Smith J, Wenham C. Spotlight on gender, COVID-19 and the SDGs: Will the pandemic derail hard-won progress on gender equality? 2020.
13. Rodríguez-Baño J, Rossolini GM, Schultsz C, Tacconelli E, Murthy S, Ohmagari N, et al. Key considerations on the potential impacts of the COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance research and surveillance. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2021;115(10):1122-9.
14. Rusic D, Vilovic M, Bukic J, Leskur D, Seselja Perisin A, Kumric M, et al. Implications of COVID-19 Pandemic on the Emergence of Antimicrobial Resistance: Adjusting the Response to Future Outbreaks. Life (Basel). 2021;11(3).
15. Adebisi YA, Alaran AJ, Okereke M, Oke GI, Amos OA, Olaoye OC, et al. COVID-19 and Antimicrobial Resistance: A Review. Infect Dis (Auckl). 2021;14:11786337211033870.
16. Harun M, Dostogir G, Anwar MMU, Sumon SA, Hassan M, Mohona TM, et al. Rationale and guidance for strengthening infection prevention and control measures and antimicrobial stewardship programs in Bangladesh: a study protocol. BMC Health Services Research. 2022;22(1):1-11.
17. Murray AK, Stanton I, Gaze WH, Snape J. Dawning of a new ERA: Environmental Risk Assessment of antibiotics and their potential to select for antimicrobial resistance. Water Research. 2021;200:117233.
18. Goff DA, Gauthier TP, Langford BJ, Prusakov P, Ubaka Chukwuemka M, Nwomeh BC, et al. Global resilience and new strategies needed for antimicrobial stewardship during the COVID-19 pandemic and beyond. J Am Coll Clin Pharm. 2022;5(7):707-15.
19. López-Medrano F, Moreno-Ramos F, de Cueto M, Mora-Rillo M, Salavert M. How to assist clinicians in improving antimicrobial prescribing: tools and interventions provided by stewardship programs. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2013;31:38-44.
20. Khor WP, Olaoye O, D'Arcy N, Krockow EM, Elshenawy RA, Rutter V, et al. The Need for Ongoing Antimicrobial Stewardship during the COVID-19 Pandemic and Actionable Recommendations. Antibiotics (Basel). 2020;9(12).
21. Tinker NJ, Foster RA, Webb BJ, Haydoura S, Buckel WR, Stenehjem EA. Interventions to optimize antimicrobial stewardship. Antimicrob Steward Healthc Epidemiol. 2021;1(1):e46.
22. Johnson AP. Surveillance of antibiotic resistance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015;370(1670):20140080.
23. Wasan H, Singh D, Reeta KH, Gupta YK. Landscape of Push Funding in Antibiotic Research: Current Status and Way Forward. Biology (Basel). 2023;12(1).
24. Mathew P, Sivaraman S, Chandy S. Communication strategies for improving public awareness on appropriate antibiotic use: Bridging a vital gap for action on antibiotic resistance. J Family Med Prim Care. 2019;8(6):1867-71.

25. Shrestha P, He S, Legido-Quigley H. Antimicrobial Resistance Research Collaborations in Asia: Challenges and Opportunities to Equitable Partnerships. Antibiotics (Basel). 2022;11(6).
26. Rawson TM, Ming D, Ahmad R, Moore LS, Holmes AH. Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. Nature Reviews Microbiology. 2020;18(8):409-10.
27. Shomuyiwa DO, Lucero-Prisno DE, 3rd, Manirambona E, Suleman MH, Rayan RA, Huang J, et al. Curbing antimicrobial resistance in post-COVID Africa: Challenges, actions and recommendations. Health Sci Rep. 2022;5(5):e771.