



دانشگاه آزاد اسلامی  
واحد شهرکرد

اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید

۹ اسفند ۱۴۰۲

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی  
دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد  
Islamic Azad University

# همایش ملی

## توسعه زیست فناوری و

## رشد تولید



دانشگاه آزاد اسلامی  
واحد شهرکرد

- زیست فناوری دریا
- زیست فناوری دارویی
- زیست فناوری پزشکی
- زیست فناوری میکروبی
- زیست فناوری کشاورزی
- زیست فناوری دامپزشکی
- زیست فناوری و کار آفرینی
- بیوانفورماتیک
- نانو زیست فناوری
- بازار یابی در زیست فناوری
- زیست فناوری محیط زیست
- زیست فناوری صنایع غذایی
- زیست فناوری تولید و صادرات



مقالات به هر دو صورت  
پژوهشی و مروری پذیرفته می شود.  
لینک ارسال مقالات:  
[b2n.ir/biotechprod2024](http://b2n.ir/biotechprod2024)

آخرین مهلت ارسال مقالات:  
۳۰ بهمن ۱۴۰۲  
زمان برگزاری همایش:  
۹ اسفند ۱۴۰۲

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

### اعضای کمیته علمی همایش:

- ۱- دکتر عباس دوستی / استاد تمام دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
- ۲- دکتر ابراهیم رحیمی / استاد تمام دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
- ۳- دکتر فرشید خیری / دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
- ۴- دکتر رضا میر فخرایی / استاد تمام دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۵- دکتر مریم طهماسبی بیرگانی / دانشیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
- ۶- دکتر صادق ولیان بروجنی / استاد تمام دانشگاه اصفهان
- ۷- دکتر مجید خیراللهی / دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- ۸- دکتر حسین خان احمد / استاد تمام دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- ۹- دکتر محمد کارگر / استاد تمام دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
- ۱۰- دکتر عباس اخوان سپهی / استاد تمام دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
- ۱۱- دکتر حسن ممتاز / استاد تمام دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
- ۱۲- دکتر مجید اسمعیلی زاده / استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
- ۱۳- دکتر محمد مهدی مغنی باشی / استادیار دانشگاه آزاد اسلامی کازرون
- ۱۴- دکتر رحمان عبدی زاده / دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
- ۱۵- دکتر الهه تاج بخش / دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
- ۱۶- دکتر محدثه لاری پور / استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
- ۱۷- دکتر نیلوفر نیسی / دانشیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
- ۱۸- دکتر حمید امانلو / استاد تمام دانشگاه زنجان

### هیات داوران ارزیاب مقالات:

دکتر لیلا روحی - دکتر پریسا محمدی نژاد - دکتر رحمان عبدی زاده - دکتر سمیه تیربخش - دکتر فرانک عالی - دکتر مریم صفرپور دهکردی - دکتر مریم پیمان - دکتر فرشاد یداللهی - دکتر پریسا بهشود - دکتر مصطفی شخصی نیایی - دکتر شهلا طاهری - دکتر ابراهیم ساعدی - دکتر کورش اشرفی دهکردی - دکتر فاطمه ملک پور - دکتر فاطمه طالبی ورنوسفادرانی - دکتر مصطفی فغانی - دکتر حسین سازگار - دکتر رویا چعبی - دکتر توحید پیری قراقیه - دکتر فرشید خیری - دکتر عباس دوستی

### اعضای کمیته اجرایی:

دکتر غلامرضا ابوطالبی - دکتر فرشید خیری - دکتر فرشاد یداللهی - دکتر سمیه تیربخش گوران - دکتر مریم صفرپور دهکردی - دکتر فرانک عالی - آقای مهدی شفییعی - آقای امیرحسین قوامی - خانم نسرین کثیری - آقای عباس رحیمی کاهکشی - خانم حدیثه اعرابی - خانم مریم امانی - خانم زهرا سیفی پور - خانم آذین محبی - آقای آرش ابراهیمی ناغانی



دبیر اجرایی همایش: دکتر فرشید خیری



دبیر علمی همایش: دکتر عباس دوستی

## بازرگانی ندا شیرین ایرانیان

شرکت بازرگانی ندا شیرین ایرانیان با ۲ تارنامه [nedashimi.com](http://nedashimi.com) و [azma-kala.com](http://azma-kala.com) با تجربه ده ساله و بهره مندی از حضور متخصصین و کارشناسان خبره با هدف تامین کلیه نیاز های آزمایشگاهی و پژوهشی و تولیدی در خدمت محققین و تولید کنندگان محترم مراکز معتر پژوهشی و تحقیقاتی، داروسازی ها، واکسن سازی ها و دانشگاه ها و ... می باشد.

### معرفی ندا شیمی



- واردات و فروش محصولات مولکولی و بیولوژی از برندهای *thermo fisher* ,  
*abcam, abnova, santa cruz, takara, biolegend, Invitrogen* و ...
- واردات و فروش ماده شیمیایی آزمایشگاهی از برند های *merck, sigma*  
*thermo fisher , applichem , TCI* و ...
- مشاوره و راه اندازی آزمایشگاه مولکولی و میکروبی و ...
- آدرس سایت : [www.nedashimi.com](http://www.nedashimi.com)
- صفحه اینستاگرام : [@neda\\_shimi](https://www.instagram.com/neda_shimi)
- شماره تماس ثابت : ۰۲۱۴۴۰۴۵۴۱۸
- شماره همراه : ۰۹۳۹۴۴۵۳۱۷۵



**آزمایشگاه پاتوبیولوژی  
و ژنتیک پزشکی  
(عج)**

# المهدی



مجهز به امکانات فوق مدرن و پیشرفته  
 تشخیص پزشکی و پاتولوژی  
 انجام آزمایشات روتین  
 تخصصی و فوق تخصصی



آزمایشگاه پاتوبیولوژی  
**دکتر طاهری**  
**دکتر شهلا طاهری**  
 بورد تخصصی کلینیکال و آناتومیال پاتولوژی  
 عضو آکادمی بین المللی پاتولوژی (IAP)



آزمایشگاه پاتوبیولوژی  
**دکتر طاهری**  
**دکتر الهام طاهری**  
 بورد تخصصی کلینیکال و آناتومیال پاتولوژی  
 فلوشیپ فوق تخصصی مولکولار پاتولوژی و سابتوژنتیک

همکاری مؤثر با شرکت های دانش بنیان در جهت انجام پژوهش های بیولوژیک



[www.Almahdilab.com](http://www.Almahdilab.com)



Almahdi\_laboratory

۰۳۸ - ۳۲ ۲۶ ۴۴ ۶۸  
 ۰۳۸ - ۳۲ ۲۲ ۷۳ ۴۸

شهرکرد : چهارراه دامپزشکی، کوچه ۴۴  
 جنب بیمارستان آیت اله کاشانی






نام محصول	نوع	ابعاد (mm)	تعداد در بسته	تعداد در کارتن
لام	ساده	۲۵.۴×۷۵.۲	۵۰ عدد	۵۰ بسته

کارایی کامل بین هر لام جهت سهولت در استفاده کاربرد

- ◀ دارای سطحی کاملاً صاف و شفاف
- ◀ دارای ضخامت مناسب و استحکام بالا
- ◀ تمیز، بدون گرد و غبار و آماده استفاده
- ◀ امکان ثبت اطلاعات با قلم الماس
- ◀ دارای لبه های ایمن جهت جلوگیری از آسیب به کاربر
- ◀ از جنس شیشه اپتیکی یا توری

سینا برنا آریا  
 Sina Borna Aria Co.

دفتر فروش: شهرکرد - میرآباد شرقی - بلوار امام خمینی (ره) - بعد از میدان شهید علم الهدی - پردیس یارک علم و فناوری  
 دفتر مرکزی: شهرکرد، میدان انقلاب، بلوار حافظ جنوبی، پلاک ۱۰۴، مجتمع توشیبا شرکت سینا برنا آریا (سبا)  
 آدرس کارخانه: شهرکرد، قطب صنعتی، فاز دو جنب تصفیه خانه پلاک ۴۷

تلفن: ۰۳۸-۳۲۲۸۸۵۰۷-۹ فکس: ۰۳۸-۳۲۲۸۸۵۱۰

کد پستی: ۸۸۱۵۹۴۳۱۵۷ [www.sabaco.co](http://www.sabaco.co)

ردیف	شماره صفحه	عنوان مقاله	نویسندگان
۱	۲۸-۱۳	بررسی میزان بیان lncRNA های <i>GHET1</i> و <i>CCAT1</i> در سلول های AGS ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب toxin pcDNA3.1(+)-Alpha	مهسا رحمانی، محمدرضا عسگری، فاطمه جهانبازی، غزاله کریمی، توحید پیری قراقیه
۲	۳۶-۲۵	بررسی ایمنی زایی واکسن ژنی کدکننده <i>UreB</i> بروسلا آبورتوس در موش های BALB/c	اسما عبدالهادی، محمدسعید جامی، عباس دوستی
۳	۴۴-۳۷	شناسایی پروفایل بیانی ژن های اختصاصی سرطان ریه بر اساس مطالعات بیوانفورماتیکی	نوشین صمیمی دهکردی، عباس دوستی، سید عباس میرزایی
۴	۵۷-۴۵	بررسی اثرات ژن کدکننده <i>Buforin II</i> بر بیان lncRNA های <i>GAS5</i> ، <i>ANCR</i> و <i>UCA1</i> در سلول های MCF-7	محمدعلی عباس فاضل، نازنین سلیمی بروجنی، سمیه تیربخش گوران، الهام دوستی
۵	۶۶-۵۸	تولید آنزیم نو ترکیب <i>Taq DNA polymerase</i> در باکتری <i>E. coli</i>	مرادعلی اسدی زاده، امیرارسلان جعفری، فرشاد یداللهی
۶	۷۶-۶۷	بررسی بیان میکرو RNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی و مقاومت دارویی چندگانه در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد	عاطفه زمانی، مسعود هوشمند
۷	۸۷-۷۷	بررسی بیان سایتوکین ها در موش های دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین تحت درمان با پروتئین های آب پنیر شتر	سیدحسین خادم حسینی، مهسا کاظمی رودسری، لیلا روحی
۸	۱۰۰-۸۸	بررسی بیان lncRNA های <i>PCA3</i> ، <i>MALAT1</i> و <i>GAS5</i> در سلول های PC3 ترانسفکت شده با ژن کدکننده <i>Dermaseptin-B2</i>	عباس سلام ناظم المحمید، امین تقیان، فرشاد یداللهی
۹	۱۰۸-۱۰۱	افزایش ترکیب دارویی متیل چاویکول در ریحان بنفش با استفاده از بیوپلیمر زیستی کیتوزان	فاطمه ملک پور
۱۰	۱۱۵-۱۰۹	ارزیابی تغییرات بیان کمی ژن <i>MUC2</i> تحت تاثیر مکمل سازی جیره با سطوح مختلف آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین در بلدرچین های ژاپنی گوشتی و تخم گذار	یاسر رحیمیان، فرشید خیری، مصطفی فغانی
۱۱	۱۲۴-۱۱۶	بررسی میزان بیان lncRNA های <i>GHET1</i> و <i>CCAT1</i> در سلول های AGS ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب حامل ژن انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس	شهره زارعی، نازنین سلیمی بروجنی، مهدی شفیعی، مریم صفرپور دهکردی
۱۲	۱۳۴-۱۲۵	بررسی اثرات آپوپتوزی ژن <i>Alpha toxin</i> باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر بیان ژن های <i>Bax</i> ، <i>Bcl-2</i> و <i>Survivin</i> در سلول های MCF-7	علی رفیعی طاقانکی، محمدفاضل گنجی، سمیه تیربخش گوران
۱۳	۱۴۳-۱۳۵	شناسایی lncRNA های اختصاصی سرطان کلورکتال بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک و تایید آزمایشگاهی بیان آنها در مدل سلولی	مرضیه علائی، لیلا روحی



دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

مطهره اسکندری، مریم رفیعی راد، سمیرا گودرزی	اثر عصاره هیدرو الکلی چویل بر فعالیت حرکتی، استرس و افسردگی در موش های ایسکمی	۱۴۴-۱۵۳	۱۴
لیلا جمالی، رایان جعفری، امیرحسین قوامی، فرانک عالی	بررسی اثرات ژن کد کننده سم انتروتوکسین H باکتری <i>S. aureus</i> بر بیان ژن های <i>Bax</i> و <i>Bcl-2</i> در سلول های ACHN	۱۵۴-۱۶۶	۱۵
زینب عبداللهی، عباس دوستی	کنترل رشد سلول های رده سرطان پستان در موش های مبتلا به سرطان پستان تجربی بوسیله ملیتین	۱۶۷-۱۷۶	۱۶
مهسا کاظمی رودسری، سیدحسین خادم حسینی، حسین سازگار	تأثیر همزمان ورزش مقاومتی و تزریق سلول های اجدادی اندوتلیال بر سطح ایمونوگلوبولین و لنفوسیت خون در رت های دیابتی القاء شده با استریتوزوتوسین	۱۷۷-۱۸۶	۱۷
مرضیه توکلی، حسین خان احمد	بررسی اثر خاموش کنندگی miR-148a بر بیان ژن و بروز پروتئین TIM3 در رده سلولی AM	۱۸۷-۱۹۵	۱۸
فروزان هادیان، رویا اکبری، مهدی شفیع، مریم صفرپور دهکردی	بررسی میزان بیان lncRNA های <i>GAS5</i> ، <i>NEAT1</i> و <i>SRA</i> در سلول های MCF-7 ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب <i>pcDNA3.1(+)-Alpha toxin</i>	۱۹۶-۲۰۵	۱۹
فرشید خیری، محمد امیدی زاده، مصطفی فغانی	اثر سطوح مختلف کوآنزیم Q10 بر سیستم ایمنی و بیان ژن میوستاتین بلدرچین ژاپنی	۲۰۶-۲۱۲	۲۰
پریسا بهشود، الهه تاج بخش، فاطمه طالبی ورنوسفادرانی	ردیابی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از عفونت های بیمارستانی در شهر اصفهان	۲۱۳-۲۲۰	۲۱
فاطمه ملک پور	افزایش مقاومت به خشکی ریحان بنفش ( <i>Ocimum basilicum</i> ) با استفاده از بیوپلیمر کیتوزان	۲۲۱-۲۳۱	۲۲
الهام برزویی سیله، فرشاد یداللهی	ساخت سازواره ژنی برای همسانه سازی بتاگلوکاناز در باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۲۳۲-۲۴۱	۲۳
مرضیه چراغ، عباس رحیمی کاهکشی، مریم صفرپور دهکردی	بررسی میزان بیان lncRNA های <i>GAS5</i> ، <i>NEAT1</i> و <i>SRA</i> در سلول های MCF-7 ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب حامل ژن انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس	۲۴۲-۲۵۲	۲۴
رامین شکری پور، علی محمد احدی، رامش رنجبر	بررسی تأثیر داروی ضد صرع فنیتوئین در نوزاد موش ها و بیان ژن مربوطه	۲۵۳-۲۶۲	۲۵
مریم کریمیان، ایمان محبی، فرانک عالی	بررسی القای آپوپتوز توسط ژن کد کننده سم <i>seh</i> باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در سلول های PC3	۲۶۳-۲۷۱	۲۶
محمدمسعود اسکندری، مهدی دهقانی زاهدان، بهین امیدی، حسین سازگار، فاطمه نصیرطوسی	جداسازی استرپتومایسس های خاکزی تولید کننده مواد ضد میکروبی به کنترل اشرفیا کلای مقاوم به جنتامایسین از جنگل بناب و پارک ملی بختگان	۲۷۲-۲۸۳	۲۷
علیرضا قراگزلو، فرشید خیری، مصطفی فغانی، جواد نصر	بررسی تاثیر سطوح متفاوت هسته وروغن هسته انار بر عملکرد، صفات کیفی تخم مرغ، متابولیت های سرم ومینرال های پلاسما، خون مرغان تخم گذار	۲۸۴-۲۹۸	۲۸
مریم امیری فارسانی، عباس دوستی	تغییر بیان ژن های مربوط به اتصالات سلولی در رده سلولی PC3 در حضور ژن توکسین <i>tssst-1</i> باکتری استافیلوکوکوس اورئوس	۲۹۹-۳۰۵	۲۹

دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

ایمان دهقانی چم پیری، زهرا بم زاده، ابراهیم رحیمی، لیلا روحی	اثر سایتوتوکسیسیستی سوپرناتانت <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT-29)	۳۱۵-۳۰۶	۳۰
مهرداد عطایی کچویی، الهام فخری، فاطمه خداوردی پور	مطالعه اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس بر برخی باکتری‌های مواد غذایی	۳۲۷-۳۱۶	۳۱
محمد گودرزی، شادی سلیمانی مطلق، محبوبه عباسلو، هستی مختاری، امیر غریب	بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی <i>Lagenaria siceraria</i> (opo squash) بر هایپرلیپیدمی ایجاد شده در اثر تریتون X-100 در موش های صحرایی نژاد ویستار	۳۳۶-۳۲۸	۳۲
رویا بختیاری، حدیثه اعرابی، مهدی شفیعی، فرانک عالی	بررسی میزان بیان lncRNA های <i>GHET1</i> و <i>CCAT1</i> در سلول های AGS ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب حامل ژن کد کننده سم TSST-1 استافیلوکوکوس اورئوس تغییر می کند	۳۴۵-۳۳۷	۳۳
معصومه عباسیان، آرش ابراهیمی ناغانی، فرانک عالی، امیرحسین قوامی	بررسی اثرات ژن کد کننده پپتید <i>Tachyplesin I</i> خرچنگ نعل اسبی بر بیان ژن های <i>Bcl-2</i> و <i>Bax</i> در سلول های ACHN	۳۵۴-۳۴۶	۳۴
سارا زابلی، نگین فرجی، سعید اکبرزاده، فهیمه نعمتی، حسین سازگار	بررسی تولید آنتی بیوتیک نئومایسین و جایگزینی منبع کربنی بومی در تولید توسط سویه تولید کننده <i>Streptomyces fradia</i>	۳۶۳-۳۵۵	۳۵
مائده اختری، سید علیرضا موسویان، الهام دوستی	اثرات ضد سرطانی تریپتولید بر بیان ژن CEA در رده سلول های سرطان ریه A549	۳۷۲-۳۶۴	۳۶
مهرناز رومی، ماندانا بهبهانی، حسین سازگار	کاهش میزان اکریل امید و نیترات در پروسه حرارت دهی به غلات ( جو- گندم و ذرت) با استفاده از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و عصاره گیاهان (تخم گشنیز- سیاهدانه - آویشن)	۳۸۱-۳۷۳	۳۷

فهرست مقالات مروری:

ردیف	شناسه	عنوان مقاله	نویسندگان
۱	۳۹۹-۳۸۲	رنگدانه های کروموزنیک: ویولاسین و پرودیجوسین	نیما بهادر، رضا کشاورز، مائده نوشادی، یاسمین محمد پور
۲	۴۱۶-۴۰۰	ایمونوتراپی با سلول های T گیرنده آنتی ژن کایمیریک ( CAR-T cells) فراتر از درمان سرطان	فرشاد یداللهی، آرش ابراهیمی ناغانی، زهرا خلیلی
۳	۴۳۰-۴۱۷	piRNA از تولید تا عملکرد	مریم صفربور دهکردی، فریبا شاکری، نوشین صمیمی دهکردی، مهدی روشنیان، امین بختیاری، پریسا محمدی نژاد
۴	۴۳۹-۴۳۱	برهمکنش های پروتئین-پروتئین	پویا مولائی دزکی، ندا جگرگوشه شیرین، رویا چعبی
۵	۴۵۲-۴۴۰	نقش بالقوه پپتید ضد میکروبی تاکیپلسین در کنترل انواع سرطان ها	فاطمه محمودی فیل آبادی، عباس دوستی
۶	۴۶۲-۴۵۳	اثر انجماد بر جذب زیستی مواد گوشتی	پرستو یآوری، سیده فاطمه احمدی، محمد حجت الاسلامی
۷	۴۷۴-۴۶۳	اسید نوکلئیک های پپتیدی (PNAs)	نازنین حیدری، فاطمه شایسته، رویا چعبی
۸	۴۸۰-۴۷۵	اپتوزنتیک	نجمه بهادری، پیام رازقی طهرانی
۹	۴۸۸-۴۸۱	lncRNAها در بیماری مولتیپل اسکلروزیس	نسرین نصیری، زهرا زمانزاده، زهره حجتی
۱۰	۴۹۸-۴۸۹	تاثیر فرایند حرارتی بر فراورده های پروتئینی	طاهره میرشکاریان، سیده فاطمه احمدی، محمد حجت الاسلامی
۱۱	۵۰۴-۴۹۹	مبارزه با بیماری ها به وسیله واکسن های مبتنی بر تکنولوژی RNA	علی آقا کوچکیان، مریم پیمانی
۱۲	۵۱۱-۵۰۵	کاربردهای ریزآرایه ها	نجمه بهادری، حمیدرضا خدایی
۱۳	۵۲۰-۵۱۲	تاثیر اشعه ایکس بر دسترسی زیستی مواد غذایی	طاهره میرشکاریان، محمد حجت الاسلامی، سیده فاطمه احمدی
۱۴	۵۲۸-۵۲۱	کاربرد های هوش مصنوعی در پژوهش های زیست فناوری و پزشکی	علی پورمقدم، شیرین کریمی
۱۵	۵۳۵-۵۲۹	کاربرد سلول های بنیادی در درمان آلزایمر	افروز یزدانی، سمیه تیربخش گوران
۱۶	۵۴۷-۵۳۶	کاربرد های میکروویو در فراوری و دسترسی زیستی مواد غذایی	پرستو یآوری، محمد حجت الاسلامی، سیده فاطمه احمدی

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

فاطمه طالبی و نونسفادرانی، پریسا بهشود	مروری بر خواص گیاهان به لیمو ( <i>Lippia citriodora L</i> )، روناس صخره‌زی ( <i>Rubia florida</i> )، آویشن باغی ( <i>Thymus vulgaris</i> )، بره موم ( <i>Propolis</i> )، بارهنگ ( <i>Plantago major</i> ) و پونه ( <i>Mentha aquatica</i> ) بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا	۵۵۴-۵۴۸	۱۷
عباس جعفری، سکینه قادری	بررسی آلودگی های زیست محیطی سیگار	۵۶۹-۵۵۵	۱۸
فاطمه ختوان، محمد رستمی	مروری بر اثر عصاره مالت جو بر عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و جمعیت میکروبی روده طیور	۵۷۵-۵۷۰	۱۹
کیمیا گلستان فر	چاپرون ها، مولکول های حیاتی میکروب ها در حفظ ساختار پروتئین ها	۵۹۳-۵۷۶	۲۰
الهام مقتدایی خوراسگانی، شیوا فقیه، شیما فقیه	نقش بیوتکنولوژی در توسعه و تولید داروهای جدید	۶۰۱-۵۹۴	۲۱
فاطمه مشهدی، سیده بیتا موسوی	کاربرد ملیتین در درمان سرطان	۶۱۱-۶۰۲	۲۲
شکیلا اسدپور، مریم پیمانی	stem cell Cancer و کاربرد آن در بیوتکنولوژی	۶۲۰-۶۱۲	۲۳
مهشید سمیع قهفرخی	نقش microRNA ها در توسعه و پیشرفت سرطان سینه	۶۲۶-۶۲۱	۲۴
علی دونیان	نانوتکنولوژی در زیست فناوری کاربردها و چالش‌ها	۶۳۶-۶۲۷	۲۵
فروغ عیدی خوش، عباس مریدنیا	جهش در ژن ATM در ارتباط با خطر ابتلا به سرطان معده	۶۴۱-۶۳۷	۲۶
زهرا رحیمی، مریم پیمانی	مکمل‌های پروبیوتیک: نگاهی به فواید درمانی و سلامتی گوارش در بدن انسان	۶۵۳-۶۴۲	۲۷
شقایق رحمانی، مریم پیمانی	تولید انرژی از منابع زیستی: پیشرفت‌ها در بیوانرژی	۶۶۴-۶۵۴	۲۸
شکیلا اسدپور، احمد مسیعی	کاربرد نانوتکنولوژی در تشخیص و درمان سرطان	۶۷۲-۶۶۵	۲۹
شهریار صالحی، حدیثه اعرابی، فاطمه بگوردی	سوخت زیستی و پتانسل نسل ۳ (جلبک‌ها)	۶۷۸-۶۷۳	۳۰
شهریار صالحی، عباس رحیمی کاهکشی	مروری کوتاه بر جهش‌زایی هدفمند یا سایت محور	۶۸۳-۶۷۹	۳۱
نازنین حیدری، پویا مولائی دزکی، پیام رازقی طهرانی	کاربردهای تشخیصی DNA آزاد در پلاسمای خون مادر (Cell Free DNA)	۶۹۰-۶۸۴	۳۲
ایمان دهقانی چم پیری، زهرا بم زاده	نقش باکتری‌ها در توسعه و پیشرفت نئوپلاسم دستگاه گوارش	۷۰۵-۶۹۱	۳۳
علی رضا نیکزاد، فاطمه شایسته	بیومارکرها	۷۱۱-۷۰۶	۳۴
سمیه امیرخانی، حمیدرضا خدایی	غربالگری با توان بالا	۷۱۷-۷۱۲	۳۵
آرام یوسفی، فرناز خیری	کاربرد آگزوزوم‌ها برای درمان سرطان	۷۲۵-۷۱۸	۳۶
مریم امانی، نیکتا امانی	کاربرد نانوتکنولوژی در دارورسانی	۷۳۲-۷۲۶	۳۷
مریم امانی	نقش متیلایسون DNA در سرطان	۷۳۸-۷۳۳	۳۸

## بررسی میزان IncRNA های $GHET1$ و $CCAT1$ در سلول ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب $pcDNA3.1(+)-Alpha-toxin$

مهسا رحمانی<sup>۱</sup>، محمدرضا عسگری<sup>۲</sup>، فاطمه جهانبازی<sup>۲</sup>، غزاله کریمی<sup>۲</sup>، توحید پیری قراقیه<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی زیست فناوری، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. دکتری زیست فناوری میکروبی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** معده به عنوان بخشی از اندام گوارشی در هنگام سرطانی شدن از عامل‌های مهم مرگ و میر می‌باشد. سم آلفاتوکسین توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تولید می‌شود. RNA های غیرکدکننده بلند، بخش وسیعی از بخش‌های غیرکدکننده پروتئین ژنوم انسان را در بر می‌گیرند که در هموستازی، اتصال و شکل‌دهی به ساختار ژنوم اثر می‌گذارند. دو نوع IncRNA،  $CCAT1$  و  $GHET1$  در اثر القای آپوپتوز کاهش می‌یابند. هدف بررسی اثرات ژن آلفاتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر بیان IncRNA های  $CCAT1$  و  $GHET1$  در سلول‌های رده AGS ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب  $pcDNA3.1(+)-Alpha-toxin$  به روش Real time RT-PCR می‌باشد.

**مواد و روش:** در این مطالعه ابتدا با ساخت وکتور نو ترکیب حاوی ژن آلفاتوکسین و ترانسفورماسیون آن در سلول مستعد باکتری E.coli و تخلیص‌سازی آن از این باکتری آغاز شد. در ادامه برای ترانسفکت سلول های AGS با وکتور نو ترکیب، از روش لیپوفکشن بهره گرفته شد. استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول‌های ترانسفکت شده انجام شد. در نهایت Real time RT-PCR به منظور بررسی تغییر بیان IncRNA های  $CCAT1$  و  $GHET1$  انجام شد.

**نتایج:** سلول‌های حاوی وکتور نو ترکیب در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین رشد می‌کنند. که بر اساس داده‌های Real time RT-PCR بیان IncRNA های  $CCAT1$  و  $GHET1$  به طور معنی داری در سلول سرطانی کاهش یافته است. **نتیجه گیری:** نتایج نشان داد، ژن سم  $Alpha-toxin$  موجب اثرات ضد سرطانی می‌گردد و با کاهش بیان IncRNA های ذکر شده، می‌تواند سلول را به سمت آپوپتوز هدایت کند.

**واژگان کلیدی:** سرطان معده، سم  $Alpha-toxin$ ، IncRNA های  $CCAT1$  و  $GHET1$ .

نشانی نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران شرق  
تلفن: ۰۲۱۶۴۶۸۸۷۹۰۵ همراه: ۰۹۱۲۰۸۷۶۶۷۳

پست الکترونیک: [tohidpirie@yahoo.com](mailto:tohidpirie@yahoo.com)

## Investigating the amount of lncRNAs GHET1 and CCAT1 in cells transfected with the recombinant vector pCDNA3.1(+)-*Alpha-toxin*

Mahsa Rahmani<sup>2</sup>, Mohammadreza Asgari<sup>2</sup>, Fatemeh Jahanbazi<sup>2</sup>, Ghazaleh karimi<sup>2</sup>, Tohid Piri-Gharaghie

1. Master's Degree in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Biology, Undergraduate student, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Ph.D in Microbial Biotechnology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background and purpose:** The stomach, as a part of the digestive organ, is one of the important factors of mortality when it becomes cancerous. *Alpha-toxin* is produced by *Staphylococcus aureus* bacteria. Long non-coding RNAs comprise a large part of the non-protein-coding parts of the human genome which affect homeostasis and connection and shaping of the genome structure. Two types of lncRNAs, *GHET1* and *CCAT1*, are decreased due to induction of apoptosis. The aim of the effects of the *Staphylococcus aureus Alpha-toxin* gene on the expression of *GHET1* and *CCAT1* lncRNAs in AGS cells transformed with the new pCDNA3.1(+)-*Alpha-toxin* vector by Real time RT-PCR method.

**Materials and methods:** This study, starts with the construction of the recombinant vector containing female *Alpha-toxin* and its transformation in the susceptible cell of *E.coli* bacteria and its purification from this bacterium. In the continuation of this article, to transfect AGS cells with the recombinant vector, the lipofection method was used. RNA extraction and cDNA synthesis were performed from transfected cells. Finally, Real time RT-PCR was performed to investigate the expression changes of *GHET1* and *CCAT1* lncRNAs.

**Results:** The cells containing the recombinant vector grow in the culture medium containing the antibiotic neomycin. According to Real time RT-PCR data, the expression of lncRNAs *CCAT1* and *GHET1* has decreased significantly compared to cancer cells.

**Conclusion:** The results show that the *Alpha-toxin* gene causes anti-cancer effects and by reducing the expression of the mentioned lncRNAs, it can lead the cell toward apoptosis.

**Keywords:** Gastric cancer, *Alpha-toxin*, *GHET1*, and *CCAT1* lncRNAs

### مقدمه

یک بدن سالم هنگامی که با یک سلول فرسوده، یک سلول در حال مرگ و یا مرگ سلول‌هایی پس جراحات روبه‌رو می‌باشد نیاز به سلول‌های سالم جایگزین دارد. سلول‌های سالم دارای توانایی تقسیم، سلول‌های جایگزین را تولید می‌کنند (۱). ویژگی‌های مشترک سلول‌های سرطانی رشد و تقسیم خارج از کنترل سلول‌های در حال تقسیم می‌باشد که این امر برعکس روال طبیعی بدن فرد سالم است. دلیل اصلی اینکه یک سلول سرطانی می‌شود آسیب به DNA سلول می‌باشد و از آنجایی که DNA مدیریت و تنظیم چرخه سلول را بر عهده دارد با آسیب وارده، سلول‌هایی متمایز از سلول‌های سالم بدن تولید می‌شود در صورتی که این سلول‌های متمایز یافته به خون و لنف ورود پیدا کنند می‌توانند به بافت‌هایی با عملکرد طبیعی حمله کرده و شروع به رشد و تکثیر تومورهای جدید در آن بافت کنند، این اتفاق را متاستاز می‌نامند. انواع مختلف سرطان رفتارهای متفاوتی از خود نشان می‌دهند. انواع سرطان‌ها به روش‌های مختلف رشد می‌کنند و پاسخ به درمان آنها متفاوت است به همین دلیل هر سرطان درمان خاص خود را دارد (۲ و ۳).

دستگاه گوارش از قسمت‌های مختلف تشکیل شده که در هر بخش امکان سرطانی شدن وجود دارد به عنوان مثال سرطان مری، سرطان روده باریک، سرطان لوزالمعده، سرطان مقعد، سرطان کبد، سرطان کیسه صفرا، سرطان آپاندیس و سرطان معده (۴).

معده کیسه عضلانی توخالی با قطر متغییر می‌باشد که از سمت ابتدایی با مری و از سمت انتهایی با دوازدهه در ارتباط است. معده دارای غدد برون‌ریز و درون‌ریز می‌باشد که در صورت سرطانی شدن دارای علائمی ابتدایی مانند ناراحتی معده است. نشانه‌هایی مثل سوزش معده، درد در ناحیه‌ی بالای شکمی، تهوع و استفراغ از جمله نشانه‌های اولیه است که در طی شدت روند بیماری با کاهش

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

شدید وزن، زردی پوست، مشکل بلع و مشاهده خون در مدفوع همراه است. در معده به دلیل ارتباط با سایر اندامها به راحتی امکان متاستاز وجود دارد. دلیل قطعی ابتلا به این بیماری هنوز شناخته نشده است اما هنگامی که سلولهای سرطانی بر روی پوشش داخلی معده ایجاد شدند به آن سرطان معده گفته می‌شود (۷ و ۵).

از فاکتورهای موثر بر این نوع سرطان جنسیت می‌باشد و شیوع آن در مردان بیشتر از زنان است. گروه خونی A مثبت بیشتر در معرض این نوع سرطان می‌باشند. افراد در رده سنی ۶۵ تا ۷۵ سال در خطر ابتلای بیشتر بیماری سرطان معده هستند. در قاره آفریقا این بیماری نسبت به سایر نقاط جهان شیوع بیشتری دارد. سیگار کشیدن، مصرف الکل، رژیم غذایی نامناسب و مواد غذایی حاوی نگهدارنده نیترات عوامل تاثیرگذار در این نوع سرطان می‌باشد (۱۶-۸).

این بیماری از نوع مارکرهای سلولی قابل تشخیص است به این صورت که با افزایش بیان *mir-14ba* با تحریک پروتئین P53، *STAT3*، *Rho* و *COX* با خارج کردن سلول از حالت طبیعی، سبب القای سرطان می‌شود (۱۷). که این نوع *micro RNA* به عنوان یک بیومارکر در تشخیص زود هنگام سرطان معده است. که وجود این بیماری با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی در هسته سلولهای سرطانی ردیابی می‌شود و به عنوان مارکر سرطانی قابل تشخیص می‌باشد (۱۸).

به طور کلی ژنوم انسان از دو بخش کد کننده و غیر کد کننده پروتئین تشکیل شده است. که در طی رونویسی از ژن انسان تنها یک پنجم آن به رونوشت‌های کد کننده پروتئین، رونویسی می‌شود که نشان‌دهنده این می‌باشد توالی غیر کد کننده حداقل چهار برابر توالی کد کننده است. تنها بخش کوچکی از سرطان‌ها به اختلالات تک ژنی وراثت‌پذیر نسبت داده می‌شود که شامل جهش‌های غیرهم معنا در توالی کدگذاری ژن‌های کدگذاری کننده پروتئین می‌باشد. اکثر سرطان‌ها از طریق جهش سوماتیک ایجاد می‌شود (۱۵).

بعد از کشف RNA های غیر کد کننده با روش ریز آرایه‌های بیانی در پژوهش‌های دیگر نکته قابل توجه این بود که این مولکول‌ها با تنوع وسیعی از سازوکار عملکردی در پیشبرد یا حتی مهار فرآیند تومورزایی همکاری می‌کنند (۲۰-۱۹).

مناطق کد کننده غیر پروتئینی ژنوم به عنوان سوبسترا برای پروتئین‌های متصل شونده به DNA عمل می‌کنند و بر روی شکل ساختاری ژنوم اثر می‌گذارند. دو نوع RNA با عنوان غیر کد کننده کوچک و RNA غیر کد کننده بزرگ در ژنوم، از طریق mRNA پلیمرز دو رونویسی می‌شوند. RNA غیر کد کننده بلند مکانیسم‌های عملکردی زیادی دارند و همچنین در تمایز سلول و هموستازی نقش مهمی ایفا می‌کنند. *CCATI* یکی از RNA های بلند غیر کد کننده می‌باشد که در کروموزوم شماره ۸، جایگاه *q21*، *q24* قرار گرفته است. در طی مطالعات اخیر نشان داده شده که میزان *CCATI* در افراد مبتلا به سرطان ریه، سرطان سینه، سرطان پانکراس افزایش یافته و نقش آنکوژنتیک دارد. میزان بیان *CCATI* در سرطان معده نیز افزایش به‌سزایی دارد. البته در نوع سرطان معده RNA غیر کد کننده دیگری به اسم *GHETI* نیز افزایش قابل توجه‌ای دارد. طی پژوهش‌های دیگر مشخص شده که *GHETI* با مرحله بیماری سرطان معده ارتباط مستقیم دارد و در استیج‌های بالا این بیماری *lncRNA* های نام برده شده افزایش بیان داشته است (۲۰).

بررسی اثر باکتری بروی سرطان از سال ۲۰۰۳ با تزریق باکتری سالمونلا ضعیف شده به بافت بدخیم شروع شد. در سال ۲۰۰۴ طی تحقیقاتی اتصال ایمونوتوکسین‌ها با لیگاندها بررسی شد اما در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضد توموری سالمونلا در موش دارای تومور زیرجلدی مورد تحقیق قرار گرفت که نتایج مثبتی بر کاهش اندازه تومور و افزایش طول عمر موش بود. در سال ۲۰۱۰ به طور رسمی اعلام شد که در سرطان، سموم باکتری باعث تداخل در تکثیر یا سطوح پایین‌تر فرآیندهای کنترل تکثیر، آپوپتوز و تمایز تداخل شوند (۱۳).

سموم پروتئینی در درمان سرطان در بسیار عمل کننده است البته با نقص اینکه برای عملکرد بهتر نیاز به جایگاه خاص بر سطح سلول‌های سرطانی دارند. این مشکل با دو روش کونژوگه کردن با آنتی‌بادی مونوکونال و عامل‌های رشد متصل‌شونده به سلول سرطانی قابل حل می‌باشد. برای تولید توکسین می‌توان از روش استخراج از خود باکتری استفاده کرد. توکسین باکتری توانایی

تشخیص تومور مورد هدف را دارد و می‌تواند به طور فعال در بافت نفوذ کند و به صورت کنترل شده باعث مسمومیت سلول شود که نکته جالب اثر سم این است که بر روی سلول با حالت طبیعی اثر نمی‌گذارد (۲۱ و ۲۲).

معروف‌ترین توکسین‌های آسیب‌زننده به غشا تولید شده توسط باکتری استافیلوکوکوس با واسطه ریسپتور آلفاتوکسین می‌باشد که از جمله اولین توکسین‌های ایجاد کننده لیز در گلبول‌های قرمز و برخی گلبول‌های سفید می‌باشد. این توکسین از ۲۹۳ اسید آمینه تشکیل شده است که ایجاد یک حفره هپتامریک برای تخلیه یون‌های تک‌ظرفیتی و در غلظت‌های بالا برای یون‌های دوظرفیتی می‌نماید. آلفاتوکسین‌ها باعث ایجاد آپوپتوز در مونسیت‌ها و سلول‌های B و T می‌گردند. از مهم‌ترین اثرات آلفاتوکسین می‌توان به گشاد شدن گپ‌ها و ورود یون کلسیم و خروج ATP که منجر به فعال شدن نوکلئاز های سلولی و آپوپتوز سلولی می‌شود، اشاره کرد در نتیجه می‌توان گفت که سموم باکتریایی اثرات ضد سرطانی دارند (۲۲).

هدف از این تحقیق بررسی اثرات ژن *Alpha-toxin* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* در سلول‌های AGS ترانسفکت شده با وکتور *pcDNA3.1(+)-Alpha-toxin* با روش Real time RT-PCR می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

تهیه سازواره (پلاسمید) نو ترکیب *pcDNA3.1(+)-Alpha-toxin*: در این مطالعه تجربی پلاسمید نو ترکیب *pcDNA3.1(+)-Alpha-toxin* و پلاسمید بدون ژن خارجی *pcDNA3.1(+)* مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید نو ترکیب *pcDNA3.1(+)* حامل ژن آلفاتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین پلاسمید *pcDNA3.1(+)* بدون ژن خارجی، از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد دریافت شد. جهت تکثیر و بررسی صحت پلاسمیدها، آنها در باکتری اشرشیاکلی سویه Top 10 با روش شوک حرارتی بارگذاری شدند. برای ترانسفورماسیون ابتدا بر روی سلول‌های پروکاریوتی باکتری اشرشیاکلی با استفاده از افزودن  $CaCl_2$  و رسوب‌گیری به وسیله سانتریفیوژ عمل مستعد سازی انجام شد.

ترانسفورماسیون: جهت ترانسفورماسیون ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد به همراه ۵ نانوگرم از پلاسمیدهای نو ترکیب درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس تیوپ ۲۰ دقیقه درون آب یخ و سپس ۹۰ ثانیه روی دستگاه تولید کننده گرما (Heater) در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از آن به مدت ۵ دقیقه روی آب یخ گذاشته شد. سپس بعد از اضافه کردن محیط LB-Broth، سلول‌های ترانسفورم شده به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. برای اطمینان از موفقیت ترانسفورماسیون پس از انجام مراحل ذکر شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روی محیط LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی-سیلین کشت داده شد و برای کنترل منفی از باکتری‌های فاقد پلاسمید بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت تک کلونی‌هایی به شکل ماتریکس رشد کردند و هیچ کلونی بر روی پلیت کنترل منفی مشاهده نشد.

**استخراج پلاسمید:** پس از کشت ماتریکس سلولی بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، جهت استخراج پلاسمید نو ترکیب از سلول‌های *E. coli*، محیط کشت حاوی باکتری به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری وارد و در چند مرحله به وسیله سانتریفیوژ رسوب‌گیری شد. سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (FAVORGEN، تایوان)، طبق دستورالعمل کیت، پلاسمیدها استخراج و خالص سازی گردید. در آخر برای تعیین کیفیت، ۲ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد و الکتروفورز انجام شد. برای تایید صحت استخراج پلاسمیدها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن آلفاتوکسین، بر روی پلاسمیدها تست PCR انجام شد و سپس محصول نهایی آن روی ژل الکتروفورز برده شد. برای تایید صحت استخراج پلاسمید به روش هضم آنزیمی، به پلاسمیدهای استخراج شده آنزیم‌های محدودالایر BamHI/EcoRV و بافر Tango(2X) و آب اضافه شد. سایت‌های برش آنزیم‌های محدودالایر BamHI/EcoRV در دو طرف ژن آلفاتوکسین واقع شده اند. محلول به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت برای مشخص شدن باندهای ژن مورد نظر محصول هضم آنزیمی، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.



سلول‌های رده‌ی AGS مورد استفاده در این مقاله از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد تهیه گردید و پس از دفریز شدن آنها، به میزان ۳ میلی لیتر محیط کشت (RPMI) حاوی ۱۰ درصد FBS و Pen-strep درون فالكون ۱۵ به آن اضافه گردید. پس از رسوب‌گیری به وسیله سانتریفیوژ و دور ریختن محلول رویی، به رسوب سلولی ۱ میلی لیتر محیط کشت اضافه شد و پس از مخلوط شدن به فلاسک ۲۵ حاوی محیط کشت انتقال یافت. فلاسک به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و غلظت ۵٪ CO<sub>2</sub> قرار گرفت. پس از بررسی و مشاهده فلاسک به وسیله میکروسکوپ و اطمینان از رشد و تکثیر سلول‌ها، پاساژ سلولی انجام شد. سپس سلول‌های پاساژ داده شده شمارش شدند. بدین منظور در ابتدا سلول‌ها تریپسینه شدند و پس از رنگ آمیزی روی لام نئوبار قرار داده و پس از لامل گذاری زیر میکروسکوپ شمارش شدند.

**انتقال پلاسمید به سلول هدف:** پس از آماده سازی سلول‌های AGS به روش گفته شده، میزان ۳۰۰۰۰۰ از سلول‌های شمارش شده در پلیت ۶ خانه، که در هر خانه آن دارای ۲ میلی لیتر محیط کشت بود، کشت داده شد و در انکوباتور در دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت.

در این مطالعه تجربی برای ترانسفکت سلول‌های AGS با وکتور نوترکیب، از روش لیپوفکشن بهره گرفته شد و در کنار آن دو دسته سلول دیگر به عنوان گروه‌های کنترل مثبت (شاهد) و کنترل منفی در نظر گرفته شد. گروه کنترل منفی بدون انتقال پلاسمید و گروه شاهد با انتقال پلاسمید pcDNA3.1(+) فاقد ژن هدف مورد آزمایش قرار گرفت. جهت ترانسفکشن پس از آماده سازی سلول‌ها به میزان ۲ میکرولیتر از محلول لیپوفکتامین با ۹۸ میکرولیتر از محیط کشت خام مخلوط شد و ۲ میکروگرم از هرکدام از پلاسمید نوترکیب و پلاسمید فاقد ژن هدف به صورت جداگانه با محیط کشت خام به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسید سپس محلول لیپوفکتامین و محلول آماده سازی شده‌ی پلاسمید با هم مخلوط و به خانه نمونه اضافه شد و در انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت ۶ ساعت، ۳ میلی لیتر محیط کشت RPMI حاوی FBS بیست درصد به خانه نمونه اضافه شد و دوباره در انکوباتور قرار گرفت. هر سه دسته سلول (تیمار، کنترل مثبت (شاهد) و کنترل منفی) در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک نئومایسین کشت داده شد. پس از اضافه کردن نئومایسین و غربالگری سلول‌ها، با رشد سلول‌های تیمار و شاهد، فرایند رسوب‌گیری انجام و محلول رویی تخلیه گردید و رسوب در ۱ میلی لیتر محیط کشت حل شد و سپس سوسپانسیون سلولی در ۲ فلاسک ۲۵ میلی لیتری تقسیم شد و پس از اضافه شدن ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی نئومایسین به هر فلاسک ۲۵ میلی لیتری، فلاسک‌ها درون انکوباتور قرار داده شدند. یک فلاسک برای استفاده و پاساژ انتخاب شد و از دیگری رسوب سلولی جهت ذخیره سازی تهیه شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA برای استخراج RNA از سلول ترانسفورم شده، از میکروتیوپ و سر سمپلر RNase Free/DNase Free استفاده شد. به این منظور سلول‌ها به وسیله سانتریفیوژ رسوب‌گیری شدند و سپس به رسوب حاصله میزان ۱ میلی لیتر محلول RNX-Plus اضافه شد. سپس محصول حاصله به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل و ورتکس شد. پس از نگهداری به مدت ۵ دقیقه در دمایی محیطی، به تیوپ مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه شد و پس از مخلوط شدن بلافاصله به روی یخ انتقال یافت. سپس محلول به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار با شرایط ۱۲۰۰۰rpm در دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه، تشکیل فاز داد. فاز رویی با دقت برداشته شد و پس از انتقال به تیوپ جدید، هم مقدار آن ایزوپروپانول اضافه گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمایی ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار با شرایط گفته شده رسوب‌گیری شد و محلول رویی دور ریخته شد. برای مرحله آب‌گیری میزان ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد به رسوب اضافه شد و به آرامی تکان داده شد و سپس به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار با شرایط ۷۵۰۰rpm در دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۸ دقیقه رسوب‌گیری شد و محلول رویی خارج شد. تیوپ به مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود خشک شد و سپس ۲۵ میکرولیتر DEPC water به تیوپ اضافه شد و رسوب در آن حل گردید. این گونه RNA استخراج، تخلیص و تغلیظ گردید. از RNA تخلیص شده در این مرحله جهت تولید cDNA، از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) استفاده شد و جهت تایید صحت و درستی cDNA سنتز شده با پرایمرهای ژن *GAPDH*، واکنش PCR انجام شد. سپس بر روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز انجام شد و نتایج با دستگاه ژل داک و با نور UV مورد بررسی قرار گرفت.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

**Real time RT-PCR:** جهت بررسی میزان تغییر بیان در ژن‌های مورد مطالعه در این مقاله، در دو سلول ترانسفکت شده (تیمار) و کنترل (شاهد) از جفت پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده، برای انجام Real time RT-PCR استفاده شد. از پرایمرهای ژن *GAPDH* به عنوان ژن رفرنس، استفاده شد. پس از پایان واکنش Real time RT-PCR و رسم نمودار منحنی ذوب، محصول اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه تجربی به شرح زیر است.

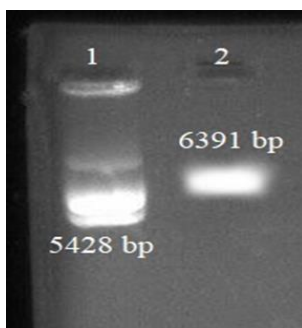
Gene	Primer sequence	Annealing Temperature	Size bp
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i> -F: 5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3' <i>GAPDH</i> -R: 5'-GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC-3'	64	183
<i>Alpha-Toxin</i>	<i>Alpha-Toxin</i> -F: 5'-ACACTGCTGCTCGGCCTCCATTC-3' <i>Alpha-Toxin</i> -R: 5'-ATGGTGCCCTTTGTGCGAATC-3'	64	227
<i>GHET1</i>	<i>GHET1</i> -F: 5'-AAAGCAGGTA AACATTGGCAGC -3' <i>GHET1</i> -R: 5'-AAGGCAGAGTGAAAGGTATAAACAAC -3'	64	132
<i>CCAT1</i>	<i>CCAT1</i> -F: 5'-CCATTCATTTCTCTTTCTACCACAG -3' <i>CCAT1</i> -R: 5'-GCCTTCATCTCATTTCAGTTTTCATC -3'	64	210

پس از انجام واکنش Real time RT-PCR و به دست آمدن و محاسبه شدن اعداد Ct، به روش  $\Delta\Delta Ct$  میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه، بررسی شد. برای این روش، Ct ژن مورد نظر در نمونه شاهد (سلول حاوی پلاسمید فاقد ژن)، Ct ژن مورد نظر در نمونه مورد آزمایش (سلول تیمار)، Ct ژن کنترل داخلی (*GAPDH*) در نمونه شاهد و Ct ژن کنترل داخلی در سلول تیمار، به ترتیب گفته شده به دست آورده شد و در رابطه ی  $(\Delta Ct \text{ treat} - \Delta Ct \text{ control}) = -\Delta\Delta Ct$  قرار داده شد. در این رابطه  $\Delta Ct$ ، اختلاف میان سیکل‌های *treat*، اختلاف میان سیکل‌های آستانه ژن هدف و کنترل داخلی در نمونه مورد آزمایش و  $\Delta Ct \text{ control}$ ، اختلاف میان سیکل‌های آستانه ژن هدف و کنترل داخلی در نمونه کنترل می‌باشد. عدد به دست آمده در رابطه (تغییر بیان  $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) قرار داده شد تا بیان نسبی ژن هدف را نشان دهد.

**آنالیز آماری:** بیان lncRNA های *GHET1 / CCAT1* با استفاده از نرم افزار GraphPad prism v8 و آزمون‌های آماری one-way ANOVA مقایسه شد. اگر  $P\text{-Value} \leq 0.05$  باشد، تفاوت داده‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب می‌شود.

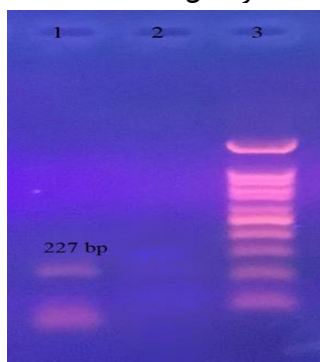
#### یافته‌ها

وکتور نوترکیب: طبق روش‌های گفته شده، پلاسمیدهای ترانسفکت شده درون باکتری، توسط کیت استخراج پلاسمید (FAVORGEN، تایوان) طبق دستورالعمل، استخراج شد. سپس میزان ۲ میکرولیتر از نمونه‌های پلاسمید استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ صحت استخراج پلاسمید را تایید کرد. پلاسمید pcDNA3.1(+)-*Alpha-toxin* فاقد ژن سم آلفاتوکسین با سایز ۵۴۲۸ جفت باز و ژن سم آلفاتوکسین به تنهایی ۹۶۳ جفت بازی است. پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1(+)-*Alpha-toxin* سایز نهایی ۶۳۹۱ جفت باز را نشان داد. نتایج الکتروفورز و تفاوت سایز باندهای پلاسمید دارای ژن و فاقد ژن، در شکل ۱ آمده است.



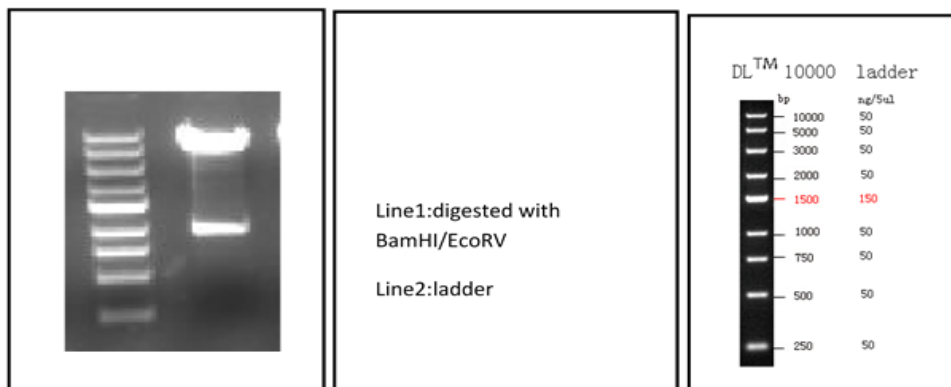
شکل ۱- چاهک شماره ۱ پلاسمید فاقد ژن و چاهک شماره ۲ پلاسمید دارای ژن سم.

در مرحله بعد صحت پلاسمیدها به وسیله PCR مورد سنجش قرار گرفت. حضور ژن آلفاتوکسین با پرایمرهای اختصاصی این ژن به روش PCR بر روی پلاسمید استخراج شده بررسی شد. حضور باند ۲۲۷ جفت بازی بر روی ژل آگارز، صحت تکثیر این ژن را تایید کرد. نتایج PCR بر روی پلاسمید استخراج شده در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲- چاهک ۱ ژن الفاتوکسین و چاهک ۲ کنترل منفی و چاهک شماره ۳ مارکر ۱۰۰ جفت بازی است.

در مرحله ای دیگر، پلاسمید استخراج شده برای تایید توسط هضم آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. در این روش، پس از هضم آنزیمی دو گانه صورت گرفته با آنزیمهای EcoRV /BamHI بر روی پلاسمیدها، نتایج نشان دهنده ی حضور قطعات ۹۶۳ جفت بازی ژن آلفاتوکسین و ۵۴۲۸ جفت بازی مربوط به وکتور (+)pcDNA3.1 بود. نتایج هضم آنزیمی وکتور حاوی ژن آلفاتوکسین در شکل ۳ آمده است.



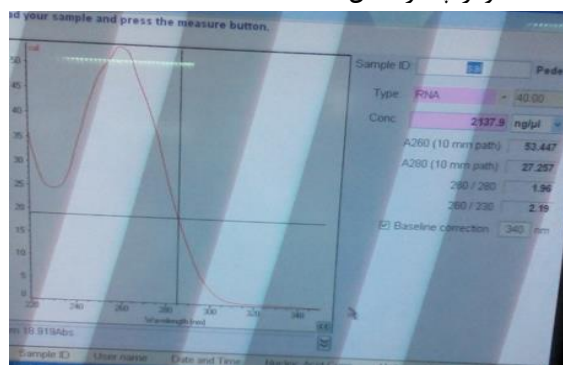
شکل ۳- قطعه سنگین ۵۴۲۸ جفت بازی مربوط به وکتور و قطعه ۹۶۳ جفت بازی مربوط به ژن آلفاتوکسین است.

نتایج ترانسفکشن: پس از بررسی صحت پلاسمیدهای نو ترکیب تخلیص شده به روش ذکر شده، لیپوفکشن (انتقال پلاسمید به سلول‌های AGS) صورت گرفت. جهت غربالگری سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده بودند، از آنتی‌بیوتیک نئومایسین استفاده شد و سلول‌ها کشت شدند. سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده بودند رشد کردند زیرا پلاسمید، ژن مقاومت به نئومایسین را دارا بود. تصویر سلول‌های کشت شده در شکل ۴ آمده است.



شکل ۴- زنده ماندن سلول‌ها پس از لیپوفکشن و افزودن آنتی‌بیوتیک نئومایسین (بزرگمایی ۱۰۰).

**Real time RT-PCR:** سلول‌های AGS ترانسفکت شده پس از تکثیر، تریپسینه شدند و سپس استخراج RNA صورت گرفت. مقدار غلظت RNA های استخراج شده، توسط دستگاه نانودراپ با شرایط نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ مورد بررسی قرار گرفت. تصویر مرحله نهایی تعیین غلظت توسط دستگاه نانودراپ در شکل ۵ آمده است.

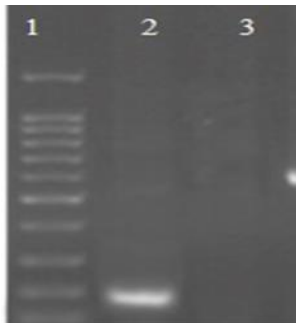


شکل ۵- تعیین غلظت RNA های استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ.

پس از استخراج RNA به روش‌های گفته شده، cDNA سنتز شد. برای بررسی صحت سنتز cDNA، واکنش PCR انجام شد و پس از انجام الکتروفورز بر روی محصولات PCR، حضور باند ۱۸۳ جفت بازی مربوط به ژن *GAPDH* بر روی ژل آگارز، صحت سنتز cDNA را تایید کرد. بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR در شکل ۶ آمده است.

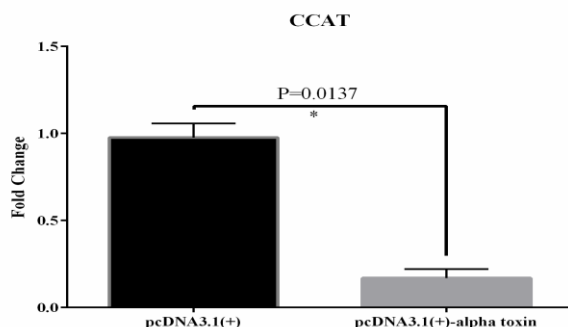
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

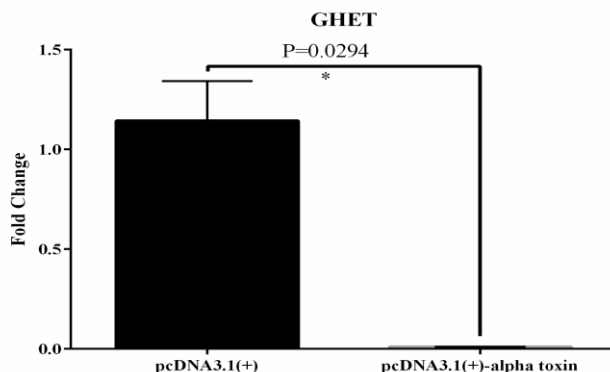


شکل ۶- چاهک ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲ باند ۱۸۳ جفت بازی ژن *GAPDH* و چاهک ۳ کنترل منفی است.

**نتایج Real time PCR:** پس از سنتز cDNA، واکنش Real time RT-PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی lncRNA های *GHET1 / CCAT1* انجام شد. آنالیز آماری lncRNA های *GHET1 / CCAT1* پس از به دست آوردن Ct هر نمونه و سپس بعد از نرمالایز کردن داده‌ها با ژن خانه‌دار و به دست آوردن میزان بیان، توسط نرم افزار GraphPad prism انجام شد و در نهایت نتایج به صورت نمودار نشان داده شد. در این آنالیز تغییر بیان هر دو lncRNA معنی‌دار بوده زیرا میزان P-value به دست آمده، کمتر از ۰/۰۵ بوده است. در واقع در اثر بیان سم آلفاتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس سلول به سمت آپوپتوز پیش رفته است. میزان تغییر بیان در نمودارهای زیر نشان داده شده است.



شکل ۹- آنالیز آماری lncRNA *CCAT1* بیان *CCAT1* در گروه لیپوفکت شده با ژن سم به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (P= 0.0137).



شکل ۱۰- آنالیز آماری lncRNA *GHET1* بیان *GHET1* در گروه لیپوفکت شده با ژن سم به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (P= 0.0294).

### بحث

سرطان را می‌توان یکی از شایع‌ترین و مرگ‌آورترین بیماری‌ها دانست. این بیماری که در همه رده‌های سنی دیده می‌شود، انواع مختلفی دارد. یکی از شناخته شده‌ترین نوع سرطان، سرطان معده می‌باشد که دومین عامل مرگ شناخته شده است. عوامل متفاوتی مانند ژنتیک، محیط، عوامل عفونی، سبک زندگی و تغذیه در ایجاد این بیماری نقش دارند (۲۳). بخش بزرگی از اتیلوژی ژنتیکی سرطان توسط نواحی غیر کدکننده همچون lncRNA صورت می‌گیرد. اختلال در این توالی منجر به سرطان شده لذا شناسایی این توالی ژنی و نحوه عملکرد آن در تشخیص، کنترل و درمان سرطان حائز اهمیت است (۲۴).

برای بررسی میزان بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* در سلول‌های *AGS* لیپوفکت شده با وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Alpha-toxin* لازم است پس از کشت سلول‌های سرطانی معده رده *AGS*، ژن آلفاتوکسین وارد شده بر وکتور *pcDNA3.1 (+)* توسط فرایند لیپوفیکشن وارد سلول‌های مورد نظر شود. سپس جهت غربالگری سلول‌های لیپوفکت شده، آنتی‌بیوتیک نوئومایسین (G418) به آنها اضافه شد و سلول‌هایی که وکتور نوترکیب را دریافت کرده بودند، توانایی رشد و تکثیر را داشتند و در نهایت رسوب‌گیری روی آنها اجرا شد.

استخراج RNA و انجام cDNA برای بررسی اثرات ژن آلفاتوکسین و Real time RT-PCR نیاز بود تا به این نتیجه رسید که سطح بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* در سلول‌های لیپوفکت شده مورد آزمایش، کاهش پیدا کرده.

مطالعاتی که در این جهت صورت گرفته به شرح ذیل است: پژوهشی توسط Hui-Ping Qiao و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در جهت تعیین ارتباط بیان lncRNA *GAS5* و سرطان کلیه صورت گرفت. در این مطالعه که روی ۱۲ بیمار صورت گرفت، مشخص شد که افراد مبتلا به سرطان کلیه نسبت به افراد نرمال بیان *GAS5* کمتری دارند. برای تایید صحت نتایج بدست آمده توسط تکنیک کلونینگ، توانستند وکتور حاوی ژن مربوط به *GAS5* را وارد سلول‌های سرطانی A498 کنند و این آزمایش نشان داد افزایش بیان *GAS5* مانع از تکثیر سلولی در سلول‌های سرطانی شده و همچنین سبب القای آپوپتوز می‌شود (۲۵). استفاده از lncRNA در این پژوهش سواى نوع آن در ارتباط با سرطان، با پژوهش ما مشابهت دارد و نشان دهنده اهمیت بالای lncRNA ها به عنوان مارکر مناسب در پژوهش‌های مربوط به سرطان است.

در پژوهشی که توسط Pickard M و همکارانش در ۲۰۱۳ صورت گرفت، پلاسمیدی همراه با ژن lncRNA *GAS5* طراحی و به سلول‌های سرطانی پروستات (PC3) منتقل شد و بررسی حیات سلول‌های آزمایشی صورت گرفت. و نتیجه آن پیشروی سلول‌های PC3 به سمت آپوپتوز توسط افزایش بیان *GAS5* بود (۲۶). اهمیت این تحقیق که همسو با عنوان پژوهش فعلی می‌باشد تمرکز بر ارزش lncRNA ها به عنوان نشانگر جدید و مناسب در تشخیص و درمان بیماری‌ها از جمله سرطان دارد.

در سال ۲۰۱۶ میرزایی و همکارانش بیان داشتند که ژن *hla*، آلفاتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را کد می‌کند که این توکسین توانایی ساخت منفذ و اثر سایتوتوکسیک روی طیف وسیعی از سلول‌های میزبان را دارد (۲۷). این مطالعه نتیجه ای مشابه با عنوان این پژوهش دارد و بر سایتوتوکسیک بودن آلفاتوکسین تاکید می‌کند و نشان دهنده اهمیت آلفاتوکسین به عنوان کاندیدای مناسب جهت القای آپوپتوز و بررسی میزان بیان ژن‌ها در حالت آپوپتوز می‌باشد.

### نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بیان ژن سم *Alpha-toxin* در سلول‌های سرطان معده رده *AGS* سبب کاهش بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT* شد. به عبارتی در این مطالعه، lncRNA های مورد بررسی قرار گرفت که در هنگام آپوپتوز بیان کاهش یافته دارند پس می‌توان نتیجه گرفت سم آلفاتوکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که باعث کاهش بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* می‌شود، می‌تواند سبب القای آپوپتوز شود.

### سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند.

### References:

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74.
2. American Cancer Society. *Cancer facts & figures*. Atlanta, American Cancer Society. 2014
3. Bae J, Lee E, Guyatt G. Citrus fruit intake and stomach cancer risk: A quantitative systematic review. *J G C*. 2008; 11: 23-32
4. Irvani S. Gastric cancer as a multifactorial disease. *J Army Univ Med Sci*. 2013; 11 (2): 157-164.
5. D'Souza G, Wiley D, Li X, Chmiel JS, Margolick JB, et al. Incidence and epidemiology of anal cancer in the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008; 48(4): 491-499.
6. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. 1975; 36: 2251-2270.
7. Pichlmayr R, Weimann A, Klempnauer J, Oldhafer KJ, Maschek H, et al. Surgical treatment in proximal bile duct cancer. A single-center experience. *Ann Surg*. 1996; 224(5): 628-638.
8. Azarhoosh R, Semnani S, Besharat S, Meftah N, RabiEi MR. Study of P53 expression with immunohistochemical method on Gorgan's 5<sup>th</sup> Azar hospital's gastric cancer patients. *Sabzevar Med Univ J*. 2006; 13(2): 74-79.
9. Kim DY, Joo JK, Ryu SY, Kim YJ, Kim SS. Clinicopathologic characteristics of gastric carcinoma in elderly patients: A comparison with young patients. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(1): 22-26.
10. Ogston A On abscesses. *Reviews of Infectious Diseases*, 1984; 6(1): 122-128.
11. Masalha M, Borovok I, Schreiber R, Aharonowitz, Y, Cohen, G. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J bacteriol*, 2001; 183(24): 7260-7272.
12. Garrity G M, Holt J G, Whitman W B, Keswani J, Boone D R, et al. Phylum All. *Euryarchaeota phy*. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* Springer New York. 2001; 211-355.
13. Berube BJ, Wardenburg JB. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*. 2013; 5(6): 1140-66.
14. Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 1259-1264.

15. Barranco SC, townsend CM, Casartelli C, Macik BG, Burger NL, et al. Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1983; 43: 1703-1709.
16. Barranco SC, Townsend CM, Quraishi MA, Burger NL, Nevill HC, et al. Heterogeneous responses of an in vitro model of human stomach cancer to anticancer drugs. *Invest New Drugs.* 1983; 1(2): 117-127.
17. Berube BJ, Wardenburg JB. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins.* 2013; 5(6): 1140-66.
18. Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 1259-1264.
19. Noori-Dalooi M R, Eshaghkhani Y. LncRNAs roles in cancer occurrence. *Medical sciences.* 2015; 25(3): 163-182
20. Mina BS, Noha YJ, Shin JH, Baeka SY, Ryua SR, et al. Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. *J Vir Meth.* 2006; 137: 286-280.
21. Rieder G, Hatz RA, Moran AP, Walz A, Stolte M, Enders G.. Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Infect Immun.* 1997; 65(9): 3622-3630.
22. Bamford. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer.* 2004; 91: 355-358.
23. Irvani S. Gastric cancer as a multifactorial disease. *J Army Univ Med Sci.* 2013; 11 (2): 157-164.
24. Cheetham SW, Gruhl F, Mattick J S, Dinger M E. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *B J C.* 2013; 108: 2419-2425.
25. Qiao HP, Gao WS, Huo JX, Yang ZS. Long Non-coding RNA GAS5 Functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev,* 2013; 14(2): 1077-1082.
26. Pickard M, Maarabouni MM, Williams GT. Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta,* 2013; 1832(10): 1613-1623.
27. Mirzaee M, Najarpisheh S. Identification Sec, Hla, Pvl and Tsst-1 toxins genes profile in of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Sci J ilam uni med.* 2016; 24(4): 32-40.



## بررسی ایمنی‌زایی واکسن ژنی کدکننده *UreB* بروسلا آبورتوس در موش‌های BALB/c

اسما عبدالهادی<sup>۱</sup>، محمدسعید جامی<sup>۲\*</sup>، عباس دوستی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی دیوید گفن در UCLA، لس‌آنجلس، کالیفرنیا، ایالات متحده آمریکا.
۳. استاد ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** بروسلاز به عنوان شایع‌ترین بیماری مشترک بین انسان و دام در تمام نقاط جهان وجود دارد. مناطق بسیاری از جمله خاورمیانه، آفریقا، آمریکای لاتین، آسیای مرکزی و حوزه مدیترانه هنوز با بروسلاز درگیر هستند. واکسیناسیون موثرترین و اقتصادی‌ترین روش پیشگیری از بیماری‌های عفونی مانند بروسلاز است. در پژوهش حاضر، ایمنی‌زایی واکسن ژنی کدکننده *UreB* بروسلا آبورتوس در موش‌های BALB/c ارزیابی شد.

**مواد و روش‌ها:** وکتور نوترکیب pcDNA3.1 به همراه ژن *UreB* طراحی و سنتز گردید. صحت سنتز پلاسمید نوترکیب توسط هضم آنزیمی و توالی‌یابی سنجیده شد. پلاسمید نوترکیب در باکتری *اشریشیا کلی* تکثیر و سپس خالص‌سازی شد. واکسیناسیون موش با pcDNA3.1 حاوی *UreB* (pcDNA3.1-UreB) و pcDNA3.1 فاقد ژن هدف انجام شد. تست real-time PCR برای تجزیه و تحلیل پاسخ ایمنی سلولی ۱۴ و ۲۸ روز پس از آخرین تجویز واکسن به منظور سنجش بیان سایتوکاین‌های IL-4، IL-10، TNF- $\alpha$  و IFN- $\gamma$  در طحال استفاده شد. در نهایت، پتانسیل محافظتی واکسن pcDNA3.1-UreB در موش‌های BALB/c با قرار دادن آن‌ها در معرض چالش با بروسلا آبورتوس ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** هضم آنزیمی پلاسمید تولید شده با استفاده از *EcoRI* و *XbaI* انجام شد. قطعات حاصل از هضم آنزیمی دوگانه بر روی ژل بررسی شد. تشکیل باند ۳۲۴ جفت بازی معرف ژن *UreB*، تولید موفق پلاسمید نوترکیب را تایید کرد. بیان IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  در موش‌هایی که واکسن pcDNA3.1-UreB را دریافت کرده بودند، در روز ۱۴ از سطح معنی‌داری بالاتری نسبت به IL-10 و IL-4 برخوردار بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر یک واکسن ژنی جدید را بر علیه بروسلا آبورتوس که عامل ایجاد تب مالت است، ارائه می‌کند. این روش می‌تواند به عنوان یک رویکرد جدید، امیدوارکننده، ایمن، پایدار و ساده برای جایگزینی با واکسن‌های زنده ضعیف شده که اکنون در دسترس‌اند، باشد.

**واژگان کلیدی:** عفونت بروسلاز، *UreB*، کلونینگ، واکسیناسیون

نشانی نویسنده مسئول: گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی دیوید گفن در UCLA، لس‌آنجلس، کالیفرنیا، ایالات متحده آمریکا.

همراه: ۰۹۱۳۴۱۳۸۶۲۸

پست الکترونیک: sjamif@gmail.com

## Evaluation of immunogenicity of DNA vaccine coding *UreB* gene of *Brucella abortus* in BALB/c mice

Asma Abdolhadi<sup>1</sup>, Mohammad-Saeid Jami<sup>2\*</sup>, Abbas Doosti<sup>3</sup>

1. M.Sc Student in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Neurology, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA., USA.
3. Professor in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

**Background:** Brucellosis is the most common disease between humans and animals in all parts of the world. Many regions, including the Middle East, Africa, Latin America, Central Asia, and the Mediterranean, are still affected by brucellosis. Vaccination is the most effective and economical way to prevent infectious diseases like brucellosis. In the present study, the *Brucella abortus UreB* coding gene vaccine immunogenicity was evaluated in BALB/c mice.

**Materials and methods:** pcDNA3.1 recombinant vector was designed and synthesized along with the *UreB* gene. The accuracy of recombinant plasmid synthesis was measured by enzymatic digestion and sequencing. The recombinant plasmid was propagated in *Escherichia coli* bacteria and then purified. Mice were vaccinated with pcDNA3.1 containing *UreB* (pcDNA3.1-*UreB*) and pcDNA3.1 lacking the target gene. A real-time PCR test was used to analyze the cellular immune response 14 and 28 days after the last vaccine administration to measure the expression of *IL-4*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$*  and *IFN- $\gamma$*  cytokines in the spleen. Finally, the protective potential of the pcDNA3.1-*UreB* vaccine was evaluated in BALB/c mice by challenging them with *Brucella abortus*.

**Results:** Enzymatic digestion of the generated plasmid was performed using *EcoRI* and *XbaI*. The fragments obtained from double enzymatic digestion were analyzed on the gel. The formation of a band of 324 bp representative of the *UreB* gene confirmed the successful production of the recombinant plasmid. The expression of *IFN- $\gamma$*  and *TNF- $\alpha$*  in mice that received the pcDNA3.1-*UreB* vaccine had a significantly higher level than *IL-10* and *IL-4* on day 14.

**Conclusion:** The present study presents a new gene vaccine against *Brucella abortus*, the causative agent of Malt fever. This method could be a new, promising, safe, stable, and specific approach to replacing the live attenuated vaccines that are available now.

**Keywords:** Brucellosis Infection, *UreB*, Cloning, Vaccination.

### مقدمه

بروسلوز توسط باکتری بروسلا که کوکوباسیل درون سلولی گرم منفی است، ایجاد می‌شود. این بیماری با نام‌های مختلفی مانند تب مالت، تب قبرس یا مدیترانه، حصبه متناوب، تب سنگ جبل الطارق و به طور معمول تب مواج شناخته می‌شود (۱). بروسلوز در چندین کشور پیشرفته از جمله استرالیا، ژاپن، نیوزیلند، کانادا و برخی از کشورهای اروپایی به طور قابل توجهی از بین رفته است، اما همچنان یک مشکل عمده بهداشت عمومی در مدیترانه، خاورمیانه، آفریقا و آمریکای لاتین است (۲). باکتری بروسلا دامنه وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی را درگیر می‌کند و موجب سقط جنین، کاهش شیر و نابرابری و در نتیجه خسارات اقتصادی زیادی در دام می‌شود (۳). همچنین بروسلا در انسان، بصورت حاد یا مزمن باعث عفونت‌های سیستمیک می‌شود. یافته‌های بالینی بیماری بروسلوز در انسان غیر اختصاصی و بسیار متغیر است. بیماران معمولاً دارای طیف وسیعی از علائم کلینیکی از جمله نارسایی حاد کلیه، اندوکاردیت، آبسه طحال، التهاب مفاصل، آرتروز و انسفالیت هستند (۴). کاملاً مشهود است که واکسیناسیون موثرترین و اقتصادی‌ترین روش پیشگیری از بیماری‌های عفونی مانند بروسلوز است (۵). هنوز هیچ واکسنی برای انسان در برابر بیماری بروسلوز وجود ندارد (۶). انواع گسترده‌ای از واکسن‌های کشته شده برای پیشگیری از بروسلوز حیوانات، با موفقیت و پذیرش نسبی، ایجاد شده است. استفاده از واکسن‌های زنده ضعیف شده علیه عملکرد نسبتاً خوب آن‌ها در کنترل بیماری بروسلوز در حیوانات، معایب خاصی مانند آلوده کردن شیر، خطر برای انسان، سقط جنین در حیوانات باردار و عود مجدد بیماری در موجود زنده را به دنبال دارد. با توجه به این اشکالات و نواقص، تقاضای دائمی برای تولید واکسن با کارایی و ایمنی بالا همواره وجود دارد. به نظر می‌رسد جایگزین

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

کردن واکسن‌های سنتی توسط واکسن‌های زیرواحدی ژنتیکی به دلیل ایمنی‌زایی خوبی که دارند مناسب است (۷). بسیاری از نقاط جهان از جمله خاورمیانه، آفریقا، آمریکای لاتین، آسیای مرکزی و حوزه مدیترانه هنوز با تب مالت درگیر هستند و برای این بیماری بومی محسوب می‌شوند. بیشتر مناطق ایران بومی این بیماری هستند، به ویژه مناطقی که انسان در تماس نزدیک با دام زندگی می‌کند. در مطالعه اخیر رستمی و همکاران بر روی ۱۶۹۸ بیمار از ۳۰ استان ایران، میانگین بروز بروسلوز ۲۹/۸۳ در ۱۰۰۰۰۰ جمعیت (۵۵ درصد مرد و ۴۵ درصد زن) گزارش شد. در پژوهشی دیگر، کسیری و همکاران نشان دادند که بروز بروسلوز در غرب ایران ۵۹/۳۱ در ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت (۳۴/۹ درصد زن و ۶۵/۱ درصد مرد) بوده و نزدیک به ۹۵/۲ درصد موارد انسانی در روستا و ۴/۸ درصد در مناطق شهری زندگی می‌کنند. همچنین میزان بروز تب مالت در کودکان این منطقه از ایران ۴۱/۴ در ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت (۶۸/۹ درصد پسر و ۳۱/۱ درصد دختر) بوده که از این میان ۸۷/۸ درصد در مناطق روستایی ساکن بوده‌اند. از سوی دیگر، گزارش بوکائی و همکاران میزان بروز تب مالت را ۳۷ نفر در ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت در شرق ایران نشان داد. در مورد شیوع بروسلوز بر حسب سن، میانگین سنی ۳۱/۳ سال توسط زینلیان دستجردی و همکاران گزارش شده است. شیوع بروسلوز در کشورهای صنعتی در مردان بیشتر از زنان است. اما در ایران به دلیل همکاری نزدیک زنان با مردان در مشاغل دامداری و کشاورزی، این بیماری در زنان نیز بسیار شایع است. علاوه بر این، بررسی جهانی الگوی فصلی تب مالت نشان می‌دهد که این بیماری در نیمه اول سال که فصل زاد و ولد دام است، شیوع بیشتری دارد. میزان تب مالت در فصل بهار و تابستان به دلیل عواملی مانند تماس مستقیم بین دامداران و جنین‌های سقط شده و همچنین مصرف لبنیات آلوده افزایش می‌یابد. در مقابل میزان ابتلا به این بیماری در نیمه دوم سال کاهش می‌یابد. تعیین الگوی فصلی بروسلوز در ایران با استفاده از متآنالیز نشان داد که بیشترین میزان بروز بروسلوز در فصل بهار و تابستان و کمترین آن در زمستان و پاییز رخ داده است (۸). آلفا توکسین عامل اصلی سیتوتوکسیک ساخته شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس*، اولین اگزوتوکسین باکتریایی بود که به عنوان عامل ایجاد منافذ شناسایی شد. این پروتئین به عنوان یک مولکول تک زنجیره‌ای و محلول در آب ترشح می‌شود. در غلظت‌های پایین (کمتر از ۱۰۰ نانومولار)، سم به مکان‌های پذیرنده هنوز ناشناخته و با میل ترکیبی بالا متصل می‌شود که روی سلول‌های مختلفی از جمله گلبول‌های قرمز خرگوش، پلاکت‌های انسانی، مونوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال شناسایی شده‌اند. در غلظت‌های بالا، سم علاوه بر این از طریق جذب غیر اختصاصی به دو لایه لیپیدی متصل می‌شود. بنابراین می‌تواند به سلول فاقد تعداد قابل توجهی از گیرنده و دولایه لیپیدی مصنوعی بدون پروتئین آسیب برساند. آسیب غشایی در هر دو مورد پس از برخورد مولکول‌های سم متصل به غشاء از طریق انتشار جانبی رخ می‌دهد تا هگزامرهای ساختار حلقه‌ای تشکیل دهند. دومی به طور خود به خود در دولایه لیپیدی وارد می‌شود تا منافذ گذرنده مجزا با قطر موثر ۱ تا ۲ نانومتر را تشکیل دهد. یک مدل فرضی پیشرفته است که در آن منافذ توسط ورقه‌های بتا آمفی‌فیلیک پوشانده شده‌اند، که یک سطح آن با لیپیدها تعامل دارد در حالی که سطح دیگر اجزای غشای آپولار را دفع می‌کند تا به زور یک گذرگاه آبی را باز کند. اثرات آلفا توکسین نه تنها به دلیل مرگ اهداف حساس است، بلکه به دلیل وجود واکنش‌های سلولی ثانویه است که می‌تواند از طریق هجوم  $Ca^{2+}$  از طریق منافذ ایجاد شود. پدیده‌هایی که به خوبی مطالعه شده‌اند شامل تحریک متابولیسم اسید آراشیدونیک، تحریک اگزوسیتوز گرانول و اختلال عملکرد انقباضی است. چنین فرآیندهایی باعث اختلالات عمیق طولانی مدت مانند ایجاد ادم ریوی و افزایش انعقاد خون می‌شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث عفونت‌های حاد و مزمن می‌شود که منجر به عوارض قابل توجهی می‌شود. اوره آز، آنزیمی که  $NH_3$  و  $CO_2$  را از اوره تولید می‌کند، کلید هموستاز pH در پاتوژن‌های باکتریایی تحت استرس اسیدی و محدودیت نیتروژن است (۹).

### مواد و روش‌ها

#### طراحی و تهیه سازواره pcDNA3.1-UreB

اطلاعات مربوط به توالی و کتور بیانی pcDNA3.1(+), از سایت Addgene بدست آمد و با استفاده از نرم افزار Gene Runner جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده مشخص شد. اندازه این وکتور ۵۴۲۸bp است و دارای یک مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک برای

پروکاریوت‌ها بنام آمپی سیلین به عنوان شاخص انتخابگر و یک جایگاه برش چندگانه برای ورود ژن است. در بالادست (MSC) Multiple Cloning Site یک پروموتور CMV و در پایین دست آن یک توالی پلی A بنام bGH وجود دارد. توالی ژن کدکننده *UreB* از بانک ژن جهانی NCBI با کد دسترسی SAOUHSC\_02559 و محصول PCR ۳۲۴ جفت بازی گرفته شد. ردیف ژنی مورد نظر، تحت پروموتور یوکاریوتی پلاسمید بیانی (+)pcDNA3.1 با کمک سایت‌های Addgene و Snapgene طراحی گردید و طراحی سازواره نهایی کامل شد. سپس ژن بصورت سنتتیک در وکتور بیانی (+)pcDNA3.1 توسط شرکت GENEray چین کلون شد. ژن کدکننده *UreB* در وکتور نوترکیب *UreB*-pcDNA3.1(+) با اندازه ۵۷۰۷ bp با استفاده از جایگاه‌های برش *XbaI* و *EcoRI* کلون شد. مراحل تهیه سلول مستعد یا Competent Cell طبق دستورالعمل Cohen انجام شد (۱۰).

### ترانسفورماسیون/شریشیا کلی سویه TOP10F با وکتور (+)pcDNA3.1 حاوی قطعه ژنی

انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد باکتریایی با استفاده از روش شوک حرارتی روشی بنیادین در زیست‌شناسی مولکولی است. پایه و اساس اکثر روش‌های ترانسفورماسیون باکتری‌ها بر پایه مشاهدات Mandel و Higa در سال ۱۹۷۰ طراحی شده است (۱۱). مقدار ۵ میکرولیتر از وکتور نوترکیب (غلظت ۰/۲ میکروگرم/میکرولیتر) به میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد *شریشیا کلی* سویه TOP10F (۱۰<sup>۸</sup>-۱۰<sup>۷</sup> سلول در ۱ میلی لیتر محیط کشت، OD600 = 0.4) افزوده شد و به همراه میکروتیوب کنترل منفی (حاوی فقط سلول مستعد) بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. اعمال شوک حرارتی به باکتری‌ها به وسیله دماهی ۴۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه و سپس بلافاصله میکروتیوب بر روی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. یک میلی لیتر محیط LB مایع استریل بدون آنتی بیوتیک به میکروتیوب‌ها افزوده شد و در دمای ۳۷ °C در انکوباتور شیکردار با دور ۲۵۰ rpm به مدت ۲ ساعت دماهی شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و سپس مایع رویی حذف و رسوب باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر باقیمانده از محیط حل شد. باکتری‌های ترانسفورم شده به محیط LB جامد حاوی آمپی سیلین با غلظت نهایی ۵۰ mg/ml منتقل و پس از کشت گسترده در انکوباتور ۳۷ °C به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد.

### تائید ترانسفورماسیون وکتور (+)pcDNA3.1 حاوی قطعه ژنی *UreB*

ترانسفورماسیون وکتور (+)pcDNA3.1 حاوی قطعه ژنی *UreB* به ۳ روش زیر تائید شد.

#### (۱) PCR: بیان ژن *UreB* در وکتور نوترکیب به منظور تایید صحت کلونینگ توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی *UreB*

تایید شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی لیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برای هر واکنش انجام شد که حاوی ۱ میکرولیتر از وکتور نوترکیب *UreB*-pcDNA3.1(+), ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR، ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بودند. کنترل منفی واکنش شامل تمامی مواد فوق به جز DNA الگو یا همان پلاسمید نوترکیب بود. جهت انجام مراحل دمایی تکثیر ژن‌ها، میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شدند. دماهای واکنش PCR شامل چرخه‌های زیر بودند: یک مرحله دناتوره شدن اولیه در ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری شامل ۳۰ ثانیه دناتوره شدن در ۹۴ °C، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۱ °C (برای ژن *UreB*) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس مرحله نهایی گسترش یا تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

#### (۲) هضم آنزیمی دوگانه: هضم آنزیمی توسط شرکت GENEray با استفاده از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *XbaI* انجام و

نتایج روی ژل آگارز الکتروفورز شده و باندها بررسی شدند. برای انجام برش وکتور بیانی ابتدا وکتور طبق دستورالعمل توسط کیت استخراج پلاسمید ستونی استخراج شد و سپس واکنش هضم با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده *EcoRI* و *XbaI* به طور همزمان (هضم دوگانه) طبق جدول ۱ انجام شد. محلول فوق به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C دماهی شده و نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

جدول ۱- نسبت مواد برای برش همزمان با دو آنزیم برشی

مواد واکنش	حجم (میکرولیتر)
پلاسمید استخراج شده	۸ میکرولیتر (غلظت $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
آنزیم <i>EcoRI</i>	$1 \mu\text{l}$ معادل ۱۰ واحد ( $10 \text{ u}/\mu\text{l}$ )
آنزیم <i>XbaI</i>	$1 \mu\text{l}$ معادل ۱۰ واحد ( $10 \text{ u}/\mu\text{l}$ )
بافر Tango (10X)	$2 \mu\text{l}$
آب مقطر DNAase free و استریل	$8 \mu\text{l}$
حجم نهایی	$20 \mu\text{l}$

۴) Sequencing: توالی یابی نوکلئوتیدی وکتور نوترکیب توسط شرکت GENEray انجام و داده‌های آن ارسال شد.

### پروتکل ایمن سازی و چالش با بروسلا آبورئوس

القای ایمنی با استفاده از پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1-UreB* به عنوان واکسن ژنی نوترکیب، *pcDNA3.1* فاقد ژن هدف و PBS به عنوان گروه کنترل منفی در مدل‌های موشی انجام گردید. در این مطالعه از موش‌های ماده نژاد BALB/c ۸-۹ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۵-۲۸ گرم جهت ایمن سازی استفاده شد. موش‌ها به صورت تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

۱. گروه اول: به این گروه به میزان  $200 \mu\text{l}$  از PBS بصورت درون صفاقی تزریق شد.

۲. گروه دوم:  $200 \mu\text{l}$  از پلاسمید *pcDNA3.1* فاقد ژن بصورت درون صفاقی تزریق شد.

۳. گروه سوم:  $200 \mu\text{l}$  از پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1-UreB* بصورت درون صفاقی تزریق شد.

ایمن‌سازی در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ انجام پذیرفت. دو هفته پس از پایان دوره ایمن‌سازی در روز ۲۸ موش‌ها تحت آزمایش چالش قرار گرفتند. چالش با تزریق زیر جلدی  $4 \times 10^4 \text{ CFU/ml}$  بروسلا آبورئوس انجام شد. این باکتری به صورت لیوفیلیزه از موسسه ی رازی تهران تهیه گردید.  $1 \text{ ml}$  از PBS استریل به باکتری اضافه و به خوبی حل شد. سپس سوسپانسیون حاصله در محیط کشت بروسلا آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی تازه کشت داده شد و در انکوباتور  $\text{CO}_2$  دار قرار گرفت. از باکتری رشد یافته یک کلونی برداشته و در محیط بروسلا مایع کشت داده شد. برای باکتری بروسلا آبورئوس زمانی که OD محیط کشت برابر با  $0.2$  شود مقدار  $10^9 \text{ CFU/ml}$  باکتری در محیط وجود دارد. لذا  $0.5$  میلی لیتر از این سوسپانسیون به  $49/5$  میلی لیتر PBS اضافه شد تا بدین ترتیب تعداد باکتری به  $10^7$  برسد و مجدداً از  $0.5$  میلی لیتر از این سوسپانسیون به  $49/5$  میلی لیتر PBS اضافه شد تا تعداد باکتری‌ها به  $10^5$  برسد. سرانجام  $200 \mu\text{l}$  از این سوسپانسیون به صورت درون صفاقی به موش‌ها تزریق شد.

### جمع آوری و آماده سازی نمونه‌ها

در روز ۲۸ (۱۴ روز پس از آخرین تزریق) ابتدا موش‌ها به ۲ گروه ۱۰ تایی چالش و غیرچالش تقسیم شدند. موش‌های گروه غیر چالش با استنشاق کلروفرم بی‌هوش شده و طحال آن‌ها برای بررسی‌های بعدی در تانک ازت مایع با دمای  $165^\circ\text{C}$  - نگهداری شد و از آن‌ها استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. موش‌های گروه چالش در روز ۲۸ با باکتری بروسلا آبورئوس بصورت تزریق زیرصفاقی مورد چالش قرار گرفتند و در روز ۴۲ با استنشاق کلروفرم بی‌هوش شده و طحال آن‌ها برای بررسی‌های بعدی در تانک ازت مایع با دمای  $165^\circ\text{C}$  - نگهداری شد و از آن‌ها استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل از طحال گروه چالش و غیر چالش ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب و نیز ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف pcDNA3.1(+) (گروه شاهد) و همچنین گروه دریافت کننده PBS (گروه کنترل) با استفاده از کیت RNX plus طبق دستورالعمل انجام شد. پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت RNA از باندهای 18s و rRNA 28s با الکتروفورز ژل آگارز ۱.۲٪ بررسی گردید. غلظت نمونه‌ی RNA تخلیص شده از مرحله‌ی قبل حدود ۱۰۰ نانوگرم در ۱ μl تشخیص داده شد و طبق پروتکل کیت برای سنتز cDNA به حداقل غلظت ۵۰۰ ng نیاز است. در این مرحله ۵ μl RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA استفاده شد.

### بررسی بیان نسبی سایتوکاین‌های IL-4، IL-10، TNF-α، IFN-γ با real time RT-PCR

برای بررسی اثرات وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-UreB بر روی بیان بیان نسبی سایتوکاین‌های IL-4، IL-10، TNF-α و IFN-γ در موش‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب حاوی ژن هدف در مقایسه با موش‌های دریافت کننده پلاسمید فاقد ژن هدف و گروه دریافت کننده PBS به عنوان گروه کنترل، از تکنیک PCR کمی یا real time RT-PCR استفاده شد. نام ژن‌ها و پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. تمامی پرایمرهای ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار Gene Runner نسخه ۳/۰۵ طراحی و سفارش داده شد. در این مطالعه، میزان بیان ژن‌های هدف با بیان ژن GAPDH (به عنوان کنترل داخلی) مقایسه و تجزیه و تحلیل منحنی استاندارد برای هر کدام از ژن‌ها انجام شد. شرایط دمایی زیر برای واکنش q-PCR مورد استفاده قرار گرفت: یک مرحله دناتوره شدن اولیه (Hold) در دمای ۹۵°C در مدت ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل تکراری شامل دناتوره شدن در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها (دمای متغییر) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه.

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای ژن‌های هدف برای انجام real-time RT-PCR

نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	اندازه محصول
<b>GAPDH</b>	GAPDH-F: 5'- TCCCGTAGACAAAATGGTGAAGG -3' GAPDH-R: 5'- ATGTTAGTGGGGTCTCGCTCCTG -3'	۶۵°C	۱۸۲bp
<b>IL-4</b>	IL4-F: 5'- TCACAGGAGAAGGGACGCCATG -3' IL4-R: 5'- TGGACTTGGACTCATTTCATGGTGC -3'	۶۷°C	۲۴۶bp
<b>IL-10</b>	IL10-F: 5'- CTGGACAACATACTGCTAACCAGACTC-3' IL10-R: 5'- TCTTCACCTGCTCCACTGCCTTG -3'	۶۷°C	۲۵۰bp
<b>TNF-α</b>	TNFα-F: 5'- GCCTCTTCTCATTCTGCTTGTG -3' TNFα-R: 5'- GTTTGCTACGACGTGGGCTACAG -3'	۶۵°C	۱۹۴bp
<b>IFN-γ</b>	IFNγ-F: 5'- GCCTAGCTCTGAGACAATGAACG -3' IFNγ-R: 5'- GCCAGTTCCTCCAGATATCCAAG -3'	۶۴°C	۱۸۸bp

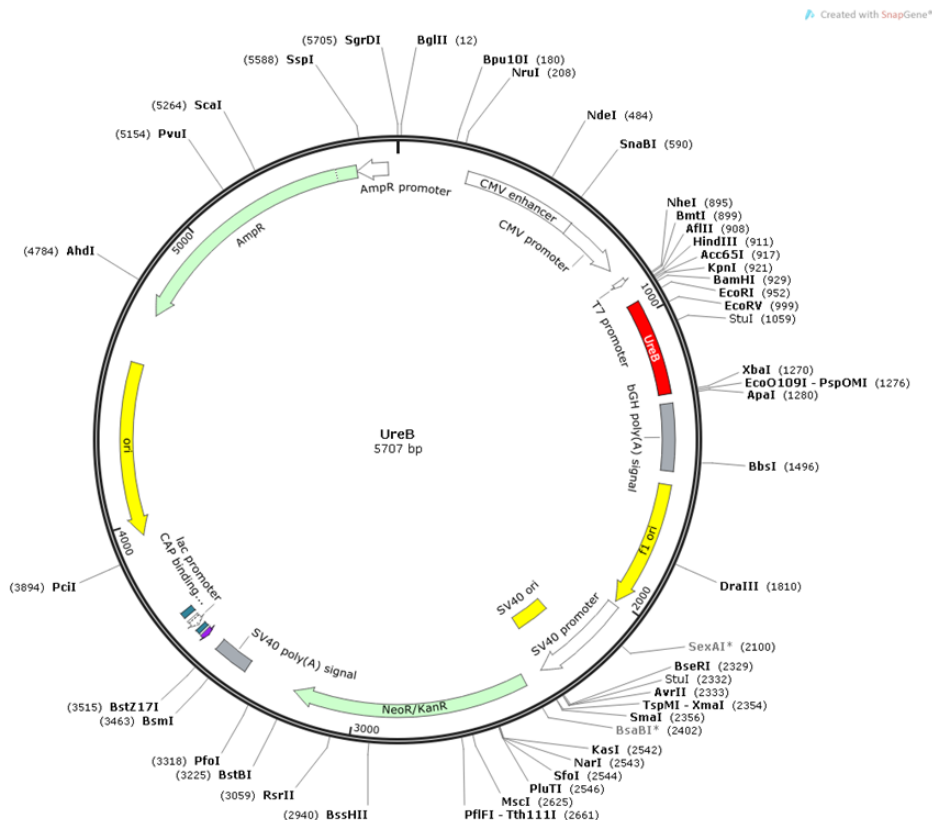
### آنالیز آماری

داده‌ها از نوع پارامتریک هستند و تمامی آزمایش‌ها در این پژوهش حداقل دو بار تکرار شدند و داده‌های real time PCR از طریق محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  به وسیله‌ی نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۰ (SPSS, Inc.)، شیکاگو، آمریکا) و Excel ۲۰۱۰ (Microsoft Corporation، آمریکا) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. میانگین تفاوت بین گروه‌ها جهت بررسی وجود ارتباط و میزان معنی‌داری داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری آزمون پارامتریک T مستقل و همچنین تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA یک طرفه) محاسبه شدند. تمامی نمودارها توسط نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۹ برای ویندوز (GraphPad, San Diego, California, www.graphpad.com) تهیه شدند. در این مطالعه مقدار  $p$  کوچکتر از ۰/۰۵ به لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سنتز سازواره نهایی *pcDNA3.1(+)-UreB*

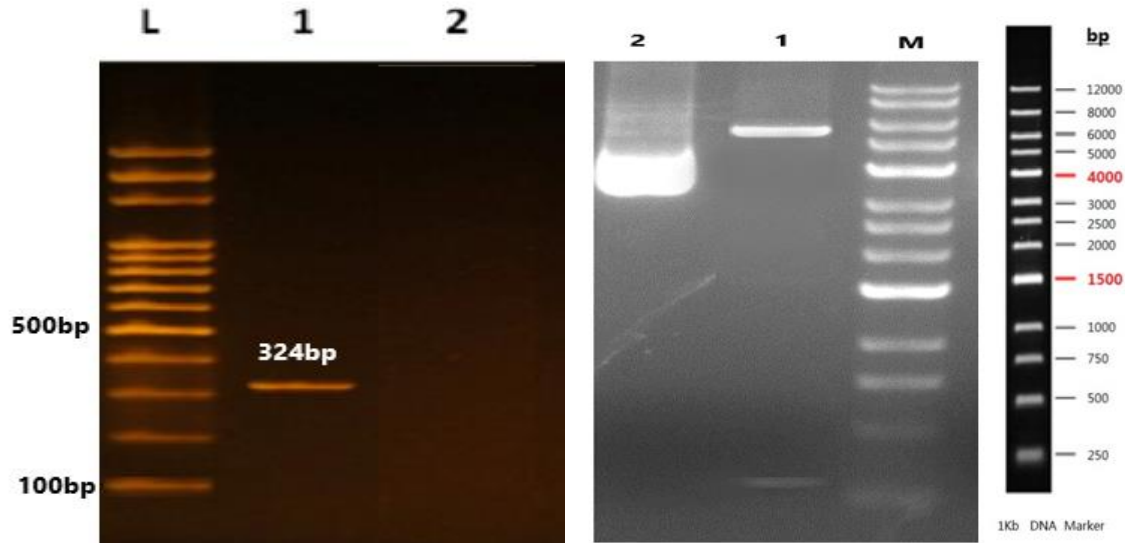
سازواره نهایی از کلون‌سازی ژن *UreB* در پلاسمید *pcDNA3.1(+)* و تولید پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1(+)-UreB* حاصل گردید. نمای شماتیک این پلاسمید نوترکیب در شکل ۱ مشاهده می‌شود. ژن کد کننده *UreB* در وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-UreB* با اندازه ۵۷۰۷ bp با استفاده از جایگاه‌های برش *EcoRI* و *XbaI* کلون شد.



شکل ۱- ساختار شماتیک پلاسمید *pcDNA3.1(+)-UreB*

تایید پلاسمید نوترکیب به روش ۲ PCR و هضم آنزیمی

انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *UreB* روی پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1(+)* سبب تکثیر یک قطعه DNA با اندازه ۳۲۴ جفت باز گردید، که تایید کننده صحت کلون‌سازی این ژن در وکتور بیانی می‌باشد (شکل ۲). صحت قرار گرفتن ژن *UreB* در وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)* توسط شرکت GENEray با استفاده از روش هضم آنزیمی دوگانه (با کمک آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *XbaI*) وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-UreB* تایید شد و نتیجه بصورت عکس ژل ارسال شد (شکل ۲).



شکل ۲- از سمت چپ؛ M: لدر 100bp (سیناکلون، ایران)، ۱: باند 324 bp ژن UreB، ۲: کنترل منفی.

شکل ۳- هضم آنزیمی دوگانه. M: مارکر 1Kb (Geneaid Biotech Ltd، تایوان)، ۱: هضم آنزیمی دوگانه که باند 324bp ژن را به همراه باند 5428bp مربوط به وکتور فاقد ژن هدف نشان می‌دهد. ۲: باندها از بالا به پایین فرم حلقوی برش

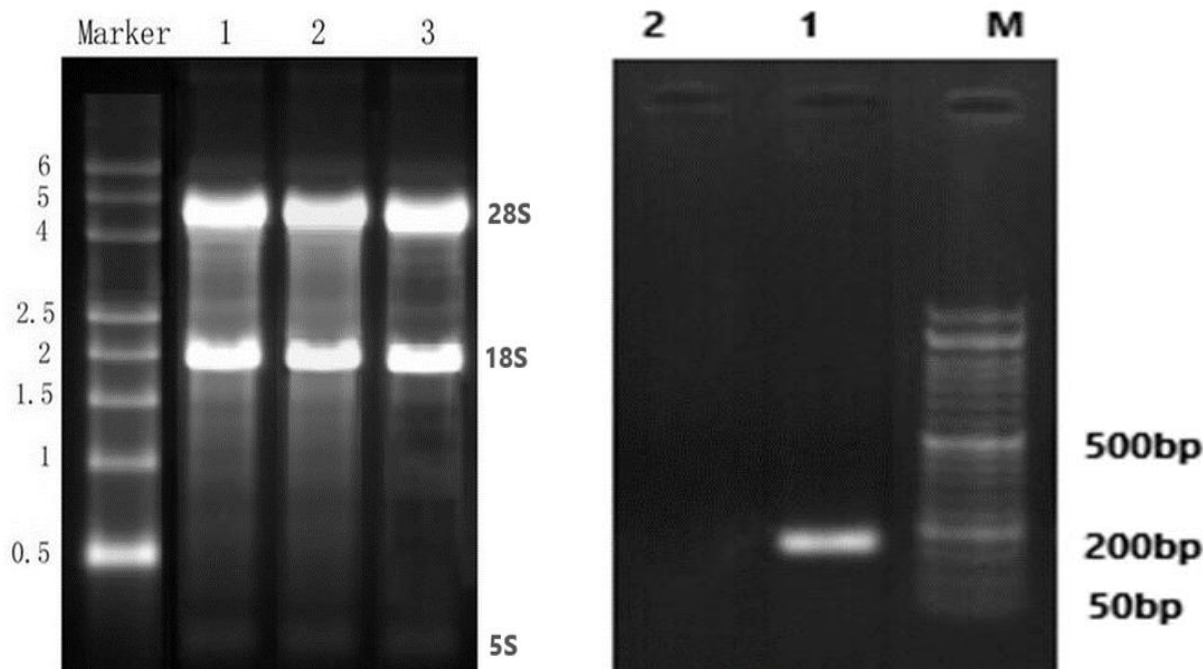
### تأیید RNA استخراج شده و DNA سنتز شده از طحال موش

RNA استخراج شده از طحال موش ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب حاوی *UreB* و وکتور فاقد ژن هدف به منظور بررسی کیفیت و مشاهده باندهای 18s و 28s الکتروفورز شد (شکل ۴). به منظور تعیین صحت cDNA سنتز شده از واکنش PCR استفاده شد. برای انجام این واکنش از پرایمر رفرنس ژن خانه دار *GAPDH* استفاده شد. مشاهده باند مربوط به ژن رفرنس در PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ به اندازه ۱۸۳bp به وسیله دستگاه ژل داگ تأیید شد. همچنین به منظور تأیید انجام واکنش و آلوده نبودن مواد از نمونه کنترل منفی استفاده شد که به جای cDNA از آب استفاده شد (شکل ۵).

### تغییرات بیان سایتوکین‌ها در طحال

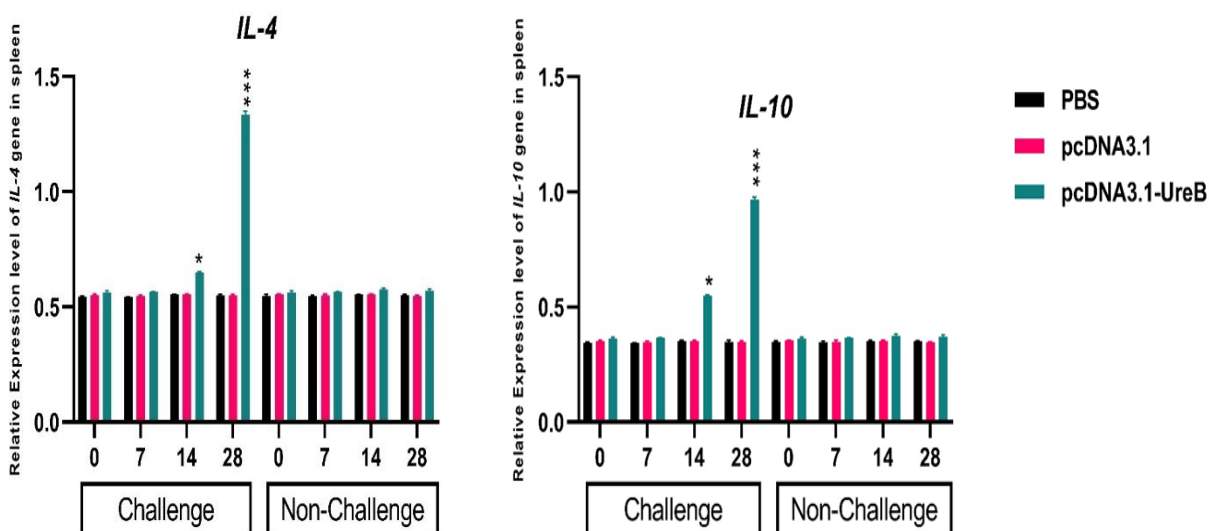
بیان سایتوکین‌های عملکردی ( $IFN-\gamma$  و  $TNF-\alpha$ ) و سایتوکین‌های مهارتی ( $IL-4$  و  $IL-10$ ) القا شده توسط پلاسمید نوترکیب در طحال مورد بررسی قرار گرفت. پاسخ ایمنی در گروه‌های چالش نسبت به گروه غیرچالش (شکل‌های ۴-۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴) و همچنین میزان بیان سایتوکین‌های عملکردی نسبت به سایتوکین‌های مهارتی در روز ۱۴ در طحال پس از ایمن زایی با پلاسمید نوترکیب در گروه چالش افزایش یافت که نشان دهنده نقش پررنگ طحال در ایمنی زایی است. در روز ۲۸ میزان بیان سایتوکین‌های عملکردی نسبت به سایتوکین‌های مهارتی کاهش یافت.



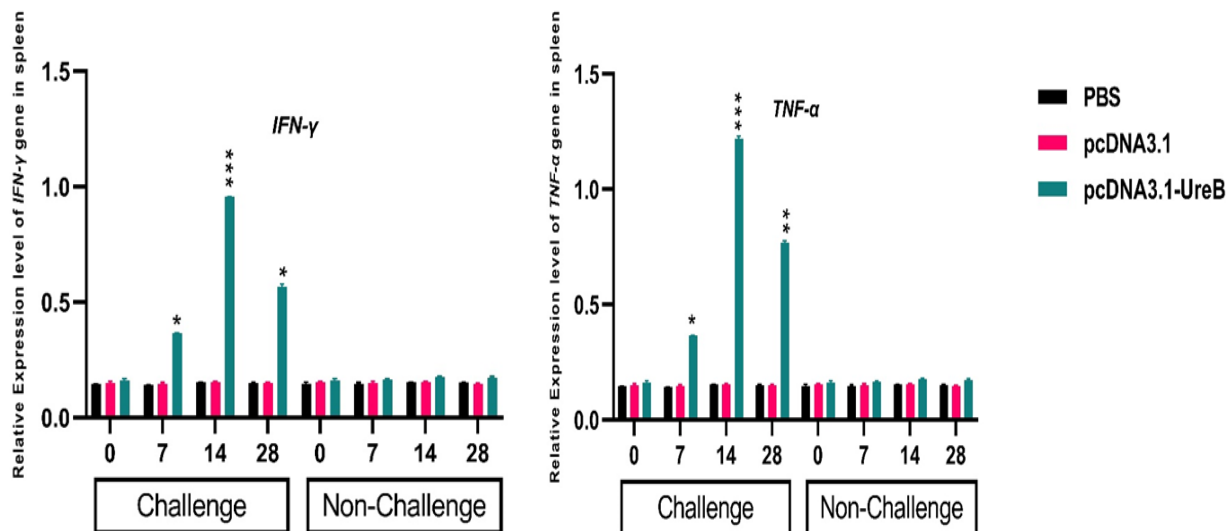


شکل ۴- حضور باندهای 28S و 18S ریبوزومی در RNA استخراج شده. M: مارکر (Kb) Geneaid Biotech (Ltd، تایوان) ، ۱ و ۲: RNA استخراج شده از طحال موش ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب، ۳: RNA استخراج شده از طحال موش ترانسفورم شده با پلاسمید فاقد ژن هدف

شکل ۵- تایید صحت cDNA به روش M: PCR. مارکر ۵۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران)، ۱: باند ۱۸۳ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن GAPDH، ۲ مربوط به کنترل منفی می باشد.



شکل ۶- سطح سایتوکین های مهاری IL-4 و IL-10 از طحال در ۲ گروه چالش و غیر چالش واکسینه شده توسط real time RT-PCR تعیین شد. PBS به عنوان شاهد استفاده شد. داده ها نشان دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار است.  $p < 0.05$ ،  $p < 0.01$ ،  $p < 0.001$  و  $p < 0.0001$



شکل ۷- سطح سایتوکین عملکردی IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  از طحال در ۲ گروه چالش و غیر چالش واکسینه شده توسط real time RT-PCR تعیین شد. به عنوان شاهد استفاده شد. داده‌ها نشان دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  و

#### بحث

برنامه واکسیناسیون علیه تب مالت به واکسن‌های خوب نیاز دارد. دو واکسن زنده، *B. melitensis* Rev. 1 و *B. abortus* S19 در دهه‌های گذشته با موفقیت زیادی برای کنترل بروسلوز نشخوارکنندگان کوچک و گاو در سراسر جهان استفاده شده‌اند. *B. abortus* RB51 نیز به عنوان یک واکسن برای بروسلوز گاوی پیشنهاد شده‌است، اما هیچ یک از واکسن‌های موجود کامل نیستند. آن‌ها باعث سقط جنین در حیوانات هدف و غیرهدف می‌شوند، می‌توانند توسط حیوانات واکسینه شده دفع شوند و همه آن‌ها باعث تب مالت در انسان شوند. در نتیجه ما به واکسن‌های مؤثر جدیدی نیاز داریم که برای حیوانات و جامعه بشری بی‌خطر باشند (۱۲). واکسن‌های مورد استفاده جهت پیشگیری و کنترل عوامل بیماری‌زا شامل DNA واکسن‌ها، واکسن‌های زیر واحدی، واکسن‌های زنده ضعیف شده و همچنین واکسن‌های مبتنی بر وکتور(حامل) هستند. واکسن‌های زنده ضعیف شده با وجود کارایی مناسب و خوب، برای انسان غیرایمن و بیماری‌زا هستند و منجر به بروز واکنش متقاطع و اختلال در آزمون‌های تشخیص آزمایشگاهی، مقاومت به آنتی بیوتیک در بعضی سویه‌ها و گاهی سقط جنین در حیوانات باردار هنگام تزریق می‌شوند. همچنین خطر برگشت پذیری بیماری به دلیل امکان بروز جهش برگشت پذیر در واکسن زنده قابل انتظار است. بنابراین توجه به توسعه واکسن تحت واحد جهت یافتن گزینه‌های جایگزین تولید واکسن جدید و عاری از معایب ناشی از واکسن‌های ضعیف شده علیه بیماری‌های عفونی، ضروری و منطقی به نظر می‌رسد. استراتژی‌های کنونی به توسعه واکسن‌های جدید علیه بیماری‌های عفونی، بر اساس شناسایی آنتی‌ژن‌های ایمونوژنیک قادر به بروز پاسخ ایمنی لازم جهت مقابله با عوامل بیماری‌زا و سیستم تحویل آن‌ها معطوف شده است (۱۳).

یوسفی و همکاران در مطالعات خود در سال ۲۰۱۶ بیان کردند که کلون سازی، بیان و تجزیه و تحلیل مولکولی یک آنتی ژن انتخابی از *B. melitensis* بنام *Omp25* به منظور طراحی یک واکسن نو ترکیب، علیه بیماری بروسلوز ایمنی زایی بسیار مناسبی دارد. به منظور تولید *rOmp25*، کلونینگ و بیان با موفقیت انجام شد و نتایج خوانش توالی و همچنین SDS-PAGE و وسترن بلات، *rOmp25* را تأیید کرد. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که ژن انتخاب شده، در گونه‌های مختلف بروسلا تقریباً مشابه و محافظت شده است. ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در برابر عفونت بروسلا ملیتسنسیس در موش‌ها، این آنتی ژن را به عنوان کاندید مناسبی برای واکسن‌های نو ترکیب زیر واحدی علیه تب مالت مطرح کرد (۱۴). رضایی و همکاران، پروتئین

omp16 را به دلیل آنتی ژنیسیته بالا، در دسترس بودن و حلقه‌های سطحی که توسط مطالعات جامع بیوانفورماتیک پیش بینی شده بود، به عنوان یک کاندید ایمنی‌زا برای تولید واکسن‌های موثر علیه بروسلوز در آینده انتخاب کردند. ویژگی قابل توجه *omp16* انتخاب شده در این مطالعه، این است که به عنوان یک جزء اگزوپروتئوم از باکتری بروسلا، در معرض قرار می‌گیرد و برای آنتی بادی‌های مونوکلونال قابل دسترسی است (۱۵). در مطالعات بی‌شماری، تولید و هدف قرار دادن برخی از پروتئین‌های درون سلولی بروسلا به عنوان مثال L7/L12، پروتئین شوک حرارتی GroEL، مس، روی سوپراکسیددیسموتاز در لاکتوکوکوس لاکتیس مورد بررسی قرار گرفته است. برخی از واکسن‌ها بر علیه بروسلوز متکی به شناسایی آنتی ژن‌های ایمنی غالب بر اساس پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs) هستند که قادر به ایجاد یک پاسخ ایمنی موثر هستند (۱۶). Luo و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعات خود دریافتند که گاوهای آلوده به گونه‌های بروسلا در طول بررسی اپیدمیولوژیک به BoHV-1 و BoHV-4 حساس بودند. این پدیده ممکن است با برخی از اجزای گونه‌های بروسلا مرتبط باشد، که می‌توانند تکثیر PRV و HSV-1 را از طریق سرکوب بیان IFN $\gamma$  ترویج کنند. بنابراین، آن‌ها نقش *omp25* را در این فرآیند بررسی کردند، زیرا *omp25* در مهار فعالیت سلول‌های T و ماکروفاژها در مطالعات قبلی آن‌ها نقش داشته است. در مطالعه حاضر *omp25* با افزایش بیان سایتوکین‌های عملکردی مانند IFN- $\gamma$ ، ایمنی زایی در طی واکسیناسیون خوراکی را به ما ثابت کرد (۱۷). در مطالعه دکتر محمودی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در وصف اهمیت واکسن‌های نو ترکیب اشاره می‌شود که، یکی از راهبردهای واکسیناسیون که در تعدادی از بیماری‌ها بررسی شده، استفاده از DNA پلاسمیدی کدکننده پروتئین‌های آنتی‌ژنی است که یک راست به داخل سلول گیرنده تزریق می‌شود، در نتیجه سلول‌ها DNA را برداشت کرده و آنتی ژن پروتئینی کد شده توسط آن را بیان می‌کنند، که منجر به هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی می‌شود. واکسن‌های DNA به سبب این که موجب بیان طولانی مدت آنتی‌ژن می‌شوند و ایمنی خاطر مناسب ایجاد می‌کنند به عنوان روش پیشگیری مطلوبی شناخته شده‌اند. در مطالعه حاضر از توالی کدکننده آنتی ژن *omp25* به منظور کلون سازی در پلاسمید مناسب استفاده شد که باعث افزایش ایمنی هومورال و سلولی شد (۱۸).

### نتیجه‌گیری

با بررسی یافته‌های پژوهشگران دیگر (موارد اشاره شده در بالا) به خوبی نشان داده می‌شود که مثال‌های متعددی از این دست در مورد نتایج مثبت واکسن‌های ژنی وجود دارد. در مطالعه ما، وکتور نو ترکیب *pcDNA3.1-UreB* سنتز و تایید نهایی شد. از این وکتور می‌توان در انجام تحقیقات واکسن علیه تب مالت استفاده کرد. با تکیه بر خاصیت آنتی ژنیسیته بالای محصول این ژن، به نظر می‌رسد می‌توان از *UraB* در مطالعات واکسن‌های زیر واحدی ژنتیکی علیه تب مالت استفاده کرد. مجموعه دستاوردهای حاصل از این نوع تحقیقات نشان می‌دهد که واکسن ژنی می‌تواند سبب تحریک مناسب سیستم ایمنی شود. بنابراین ایده واکسن‌های نسل سوم در آینده به تدریج گسترش می‌یابد. اثرات محافظتی این واکسن ژنی در برابر عفونت بروسلوز بسیار بالا است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که DNA پلاسمیدی یک فناوری حمل و آزاد کننده داروی ایمن و موثر با پتانسیل بسیار زیاد برای کاربردهای پزشکی در آینده است. تحقیقات گسترده‌تر با استفاده از آزمایش واکسن ژنی ممکن است به کنترل عفونت بروسلوز کمک کند. در این مطالعه یک واکسن ژنی جدید توصیف شد که توانایی القای ایمنی سلولی را دارد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، واکسن ژنی یک گزینه امیدوار کننده برای جلوگیری از عفونت بروسلوز است.

### سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند. همچنین از همکاری صمیمانه همکاران مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد کمال امتنان داریم.

## References:

1. Khan MZ, Zahoor M. An Overview of Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies. *Trop Med Infect Dis.* 2018;3(2):65.
2. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994;32(11):2660-2666.
3. McDermott J, Grace D, Zinsstag J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev Sci Tech.* 2013;32(1):249-261.
4. Dagli O, Dokur M, Guzeldag G, Ozmen Y. Acute renal failure due to *Brucella melitensis*. *J Infect Dev Ctries.* 2011;5(12):893-895.
5. Takahashi I, Nochi T, Yuki Y, Kiyono H. New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(3):352-358.
6. Vishnu US, Sankarasubramanian J, Gunasekaran P, Rajendhran J. Identification of potential antigens from non-classically secreted proteins and designing novel multipeptide vaccine candidate against *Brucella melitensis* through reverse vaccinology and immunoinformatics approach. *Infect Genet Evol.* 2017;55:151-158.
7. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):479-496.
8. Golshani M, Buozari S. A review of Brucellosis in Iran: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis, Control, and Prevention. *Iran Biomed J.* 2017;21(6):349-359.
9. Lemichez E, Barbieri JT. General aspects and recent advances on bacterial protein toxins. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2013;1;3(2):a013573.
10. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70(11):3240-3244.
11. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* 1970;53(1):159-162.
12. Blasco JM, Molina-Flores B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011;27(1):95-104.
13. Song AA, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):55.
14. Yousefi S, Tahmoorespur M, Sekhavati MH. Cloning, expression and molecular analysis of Iranian *Brucella melitensis* *Omp25* gene for designing a subunit vaccine. *Res Pharm Sci.* 2016;11(5):412-418.
15. Rezaei M, Rabbani-Khorasgani M, Zarkesh-Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H. Prediction of the *Omp16* Epitopes for the Development of an Epitope-based Vaccine Against Brucellosis. *Infect Disord Drug Targets.* 2019;19(1):36-45.
16. Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine.* 2012;30(7):1283-1290.
17. Luo X, Zhang X, Wu X, et al. *Brucella* Downregulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  to Promote Intracellular Survival via *Omp25* Regulation of Different MicroRNAs in Porcine and Murine Macrophages. *Front Immunol.* 2018;8:2013.
18. Mahmoudi Vashian Z, Doosti A. Cloning and gene expression of *ureG* gene as a DNA vaccine candidate against *Helicobacter pylori*. *Journal of Guilan University of Medical Sciences.* 2017;10;26(102):20-9

## شناسایی پروفایل بیانی ژن‌های اختصاصی سرطان ریه بر اساس مطالعات بیوانفورماتیکی

نوشین صمیمی دهکردی<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>، سید عباس میرزایی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های پیشرفته، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** سرطان ریه دومین سرطان رایج در بین زنان و مردان است. اگرچه با پیشرفت‌های اخیر در فناوری ترانسه‌های ژنی، ژن‌های متعدد مرتبط با سرطان ریه شناسایی شده است، با این حال، هیچ یک از این ژن‌ها نمی‌توانند به طور این سرطان را تشخیص دهند یا پیش‌بینی کنند. هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن‌های اختصاصی و RNAهای تنظیمی در سرطان ریه، به منظور شناسایی نشانگرهای زیستی تشخیصی یا عوامل تعیین کننده در پزشکی دقیق بر اساس بررسی بیان آنها در سطح RNA می‌باشد.

**روش کار:** در این مطالعه، ما از TCGA به عنوان مجموعه داده استفاده کردیم. در مرحله اول، ما یک شبکه ceRNA با استفاده از ژن‌های TCGA ساختیم که با پیش‌آگهی سرطان ریه مرتبط بود.

**نتایج:** نتایج حاصل از مطالعات *in silico* نشان داد که بیان ۶۸۳ lncRNA در سرطان ریه به صورت معناداری تغییر می‌کند (۴۰۳ lncRNA افزایش بیان و ۲۸۰ lncRNA کاهش بیان) ( $p < 0.05$ ). همچنین بیان ۳۰۸۸ mRNA افزایش و بیان ۳۸۹۳ mRNA کاهش معناداری یافته بود. نتایج تفاوت بیان miRNAها نیز نشان داد که بیان ۱۶۱ miRNA افزایش و بیان ۱۲۳ کاهش معنی‌دار داشتند ( $p < 0.05$ ). در شبکه ceRNA نیز سه lncRNA شامل SNHG7، H19 و CCHE1 با بیشترین برهمکنش با دیگر ژن‌های شناسایی شده شناسایی شد. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌های متابولیک نشان داد که ژن‌های مدل پیش‌آگهی در متابولیسم و مسیرهای مرتبط با سرطان فعالیت دارند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، می‌توان عنوان کرد که این سه lncRNA شناسایی شده می‌توانند در سرطان ریه تغییر بیان فاحشی داشته باشند.

**واژگان کلیدی:** سرطان ریه، بیوانفورماتیک، SNHG7، H19 و CCHE1.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰

پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

## Identifying the expression profile of lung cancer specific genes based on bioinformatics studies

Nooshin Samimi Dehkordi<sup>1</sup>, Abbas Doosti<sup>2\*</sup>, Seyed Abbas Mirzaei<sup>3</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. PhD in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Introduction and purpose:** Lung cancer is the second most common cancer among men and women. Although with recent advances in gene chip technology, numerous genes related to lung cancer have been identified, however, none of these genes can diagnose or predict this cancer. The purpose of this study is to investigate the expression of specific genes and regulatory RNAs in lung cancer, in order to identify diagnostic biomarkers or determinants in precision medicine based on their expression at the RNA level.

**Methods:** In this study, we used TCGA as a dataset. In the first step, we constructed a ceRNA network using TCGA genes that were associated with lung cancer prognosis.

**Results:** The results of the in silico studies showed that the expression of 683 lncRNAs significantly changes in lung cancer (403 lncRNAs increase in expression and 280 lncRNAs decrease in expression) ( $p < 0.05$ ). Also, the expression of 3088 mRNAs increased and the expression of 3893 mRNAs decreased significantly. The results of the difference in miRNA expression also showed that the expression of 161 miRNAs increased and the expression of 123 decreased significantly ( $p < 0.05$ ). In the ceRNA network, three lncRNAs including SNHG7, H19 and CCHE1 were identified with the highest interaction with other identified genes. Enrichment analysis of metabolic genes showed that prognostic model genes are active in cancer-related metabolism and pathways.

**Conclusion:** According to the results obtained in this study, it can be said that these three identified lncRNAs can have drastic expression changes in lung cancer.

**Keywords:** Lung cancer, Bioinformatics, SNHG7, H19, CCHE1

### مقدمه

سرطان ریه دومین سرطان رایج در بین زنان و مردان است و یکی از قابل پیشگیری ترین انواع سرطان می باشد. بطور کلی دو نوع سرطان ریه وجود دارد: سرطان ریه با سلول های کوچک (SCLC) و سرطان ریه با سلول های غیر کوچک (NSCLC). نحوه ی رشد و انتشار هر دو در بدن و نیز روش درمان آن ها متفاوت است. انواع سرطان ریه براساس نمای ظاهری سلول ها زیر میکروسکوپ طبقه بندی می شوند. سرطان ریه با سلول های غیر کوچک (NSCLC) نیز به سه دسته تقسیم بندی می شود: سرطان بافت سطحی، سرطان غدد تراوش کننده ی مخاط و رگ های لنفاوی (اپیتلیوم غده ای) و سرطان ریه با سلول های بزرگ (۲ و ۱). در بین افراد مبتلا به این نوع سرطان حدود ۹۰-۸۵٪ موارد از نوع NSCLC و حدود ۱۵-۱۰٪ موارد از نوع SCLC می باشد. شایع ترین علائم بالینی سرطان ریه شامل سرفه ی مداوم و مزمن، درد قفسه ی سینه، بی اشتها، کاهش وزن، خلط خونی، تنگی نفس، عفونت های تنفسی مثل برونشیت، شروع خس خس سینه و... می باشد، که معمولاً در مراحل اولیه ی بیماری ظاهر نمی شود. از این رو آمار مرگ و میر این نوع سرطان بسیار بالا است (۳). در طی چندین سال اخیر، دانشمندان پیشرفت های زیادی در شناسایی اثر عوامل خطر ساز بر روی تغییرات DNA و ژن ها که منجر به سرطانی شدن سلول ها می شوند، داشته اند. آن ها مراحل تولید سرطان ها را تعیین کرده اند که چندین ژن جهش دار در آن دخالت دارند این تغییرات ژنتیکی باعث از هم گسیخته شدن نظم طبیعی تقسیم و تمایز سلول ها می شود. سرطان ریه اغلب نتیجه ی یک سری تغییرات ژنتیکی شامل فعال شدن پروتئوکوزن ها و تبدیل آن ها به انکوژن ها، و غیر فعال شدن ژن های مهار کننده ی تومور (TSGs) و... است. پروتئوکوزن ها ژن هایی هستند که در حالت طبیعی مسئول تنظیم تقسیم و رشد سلول ها هستند و در صورتی که جهش ژنتیکی پیدا کنند انکوژن نامیده می شوند که بیان ژنی آن ها بسیار بالاست. و ژن های مهار کننده ی تومور ژن هایی هستند که تقسیم سلولی را کند کرده و زمان مرگ سلول ها را تعیین می کنند. فقدان ژن های مهار

کننده‌ی توموری باعث تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها می‌شود. انکوژن‌هایی که منجر به بیماری سرطان ریه می‌شوند شامل *c-myc*, *kras* جهش یافته (درهیچ کدام از موارد سرطان ریه از نوع SCLC مشاهده نمی‌شود ولی در ۲۰-۱۵٪ موارد سرطان ریه از نوع NSCLC و اکثر موارد اپیتلیوم غده‌ای مشاهده می‌شود)، ژن *egfr* بیش از حد بیان شده، *BCL2*, *cyclin D1* و ... هستند. ژن‌های مهارکننده‌ی تومور (TSGs) درگیر در اکثر موارد سرطان ریه شامل *p53* (در ۹۰٪ موارد سرطان ریه از نوع SCLC و ۵۰٪ موارد سرطان ریه از نوع NSCLC مشاهده می‌شود)، *Rb* (در ۹۰٪ SCLC و ۲۰٪ NSCLC مشاهده می‌شود)، *p16* (در بیش از ۵۰٪ NSCLC و کمتر از ۱٪ SCLC مشاهده می‌شود) و ... هستند. و ژن‌های *hTERT* و *hTR* تقریباً در همه‌ی انواع سرطان ریه به صورت یک مکانیسم نامیرایی بیان می‌شوند (۴).

هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن‌های اختصاصی و RNAهای تنظیمی در سرطان ریه، به منظور شناسایی نشانگرهای زیستی تشخیصی یا عوامل تعیین کننده در پزشکی دقیق بر اساس بررسی بیان آنها در سطح RNA می‌باشد.

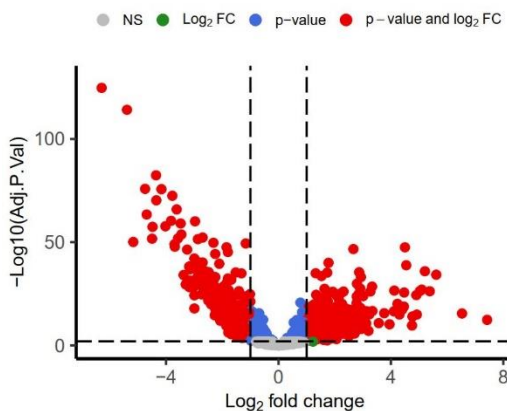
### مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی *miRNAs*, *mRNAs* و *lncRNAs*های دخیل در پیشرفت و پانژنیزم سرطان ریه از داده‌های TCGA استفاده شد. برای این هدف با استفاده از پکیج *TCGAbiolinks* داده‌های ترانسکریپتومی سرطان ریه (TCGA-COAD) در فرمت خام (*HTseq-Counts*) دانلود شد. در ادامه حذف ژن‌های با بیان صفر یا نزدیک به صفر بر اساس معیار *CPM* کمتر از ۱۰ در ۷۰ درصد نمونه‌ها به وسیله پکیج *edgeR* انجام گرفت. در مرحله بعد نرمال سازی داده‌های بر اساس روش *TMM* و پکیج *limma* بر روی داده‌ها اعمال شد. از ماتریکس بیان بدست آمده برای روند تمامی آنالیزهای استفاده شد. همچنین آخرین آپدیت اطلاعات کلینکی برای تمامی نمونه‌ها دانلود و برای روند آنالیزها از آنها استفاده شد. در ماتریکس بیان برای *mRNAs* و *lncRNA*، تعداد نمونه سرطانی و نرمال به ترتیب ۴۸۰ و ۴۱ بود. از طرفی دیگر در ماتریکس بیانی برای *miRNA*ها، تعداد نمونه‌های سرطانی و نرمال به ترتیب ۴۵۷ و ۸ نمونه بود. برای شناسایی *miRNA*, *mRNAs*, *lncRNA* که در نمونه‌های سرطانی ریه در مقایسه با نرمال به طور چشمگیر و معنی‌داری تغییرات بیان دارند، از ماتریکس بیانی نرمال سازی شده مرحله قبل استفاده شد. برای این هدف با استفاده از روش *linear model* تفاوت بیان بین گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و برای انتخاب ژن‌ها معیار  $|\log FC| > 1$  و  $FDR < 0.01$  مد نظر قرار گرفت. لیست و اطلاعات ژنی برای *mRNA* و *lncRNA* از طریق ابزار *BioMart* استخراج شد. همچنین تغییرات بیان از طریق نمودار *volcano* با استفاده از پکیج *EnhancedVolcano* نمایش داده شد. از ژن‌های که تفاوت بیان چشمگیری داشتند برای ساخت شبکه *ceRNA* استفاده شد. برای بررسی ارتباط *miRNA*ها با *mRNA*ها، از پایگاه *mirwalk* و *mirTarbase* استفاده شد و *miRNA-mRNA*هایی انتخاب شدند که توسط هر دو پایگاه تایید می‌شدند. برای ارتباط *miRNA-lncRNA* از پایگاه *DIANA-LncBase v3* استفاده شد و معیار *validation* *miRNA-conf.level=high* و *species=human* مد نظر قرار داده شد. در نهایی زوج *miRNA-mRNAs* و *miRNA-lncRNA* انتخاب شدند، که تفاوت بیان آنها در سرطان ریه به معیار  $|\log FC| > 1$  و  $FDR < 0.01$  از مراحل قبل مطابقت داشت. در نهایت با استفاده از ابزار *Cytoscape* داده‌ها به منظور رسم شبکه *ceRNA* ادغام شدند و برای انتخاب *lncRNA* با اهمیت در شبکه *ceRNA* از معیار  $degree > 12$  مد نظر قرار گرفت. از داده‌های کلینکی ریه (TCGA-COAD) برای بررسی ارتباط بیان *lncRNA*های کاندید با پیش آگهی بیماران استفاده شد. پیش پردازش‌های اولیه بر روی داده‌های کلینکی شامل حذف نمونه‌های نرمال، حذف نمونه‌های با تعداد روزهای زندمانی ۱ یا *NA* و حذف نمونه‌هایی با وضعیت مرگ بدون داشتن تومور در زمان مرگ بود. برای بررسی ارتباط بیان *lncRNA*های کاندید با پیش آگهی بیماران، در ابتدای بیان تمامی ژن‌های کاندید برای نمونه‌های که شرایط کلینکی ذکر شده را داشتند، استخراج شد. در ادامه بیان هر ژن در تمامی آن‌ها به صورت *Z-score* در آورده شد و از آزمون *univariate Cox regression* برای بررسی ارتباط بیان ژن‌های کاندید با پیش آگهی بیماران استفاده شد. همچنین برای تایید نتایج بدست آمده از نمودار *Kaplan-Meier* استفاده شد و مدین بیان ژن‌های کاندید در نمونه‌های سرطانی به عنوان *cut off* در نظر گرفته شد. در نهایت ژن‌های انتخاب شدند که سطح *logRank* آنها کمتر

از 0.05 بود. تمام پیش پردازش‌های اولیه و آنالیزهای داده‌ها توسط زبان برنامه نویسی R (V 4.0.2) انجام گرفت و برای رسم و نمایش نمودارها از نرم افزار Ghrpad (V 8) استفاده شد. برای محاسبه تفاوت بیان از روش linear model استفاده شد و محاسبه سطح معنی داری بین گروه‌ها از طریق multiple hypothesis testing انجام گرفت. در تمامی آنالیزهای سطح FDR<0.01 مد نظر قرار گرفت. برای بررسی ارتباط بیان ژن‌های کاندید با پیش آگهی بیماران از آزمون logRank استفاده شد و سطح logRank<0.05 مد نظر قرار داد شد. برای نمایش شبکه ceRNA و ارتباط ژن‌ها با lncRNA شناسایی شده از Cytoscape (V 4) استفاده شد.

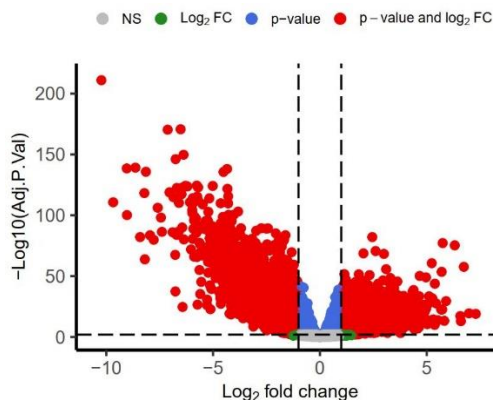
### نتایج

به منظور شناسایی lncRNA، miRNAها و mRNAهای مهم و دخیل در پیشرفت و توسعه سرطان ریه از داده‌های TCGA استفاده شد. در محله اول تفاوت بیان lncRNA، miRNAها و mRNA در نمونه‌های سرطانی در مقایسه با نرمال بر اساس داده‌های TCGA مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج اولیه نشان داد که به طور کلی ۱۸۴۶ lncRNA در داده‌های TCGA برای سرطان ریه بیان داشت که از این تعداد ۴۰۳ lncRNA افزایش و تعداد ۲۸۰ lncRNA به طور معنی دار و چشمگیری کاهش بیان را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- lncRNAهای درگیر در سرطان ریه. تعداد lncRNAهایی که در سرطان ریه افزایش و کاهش بیان دارند.

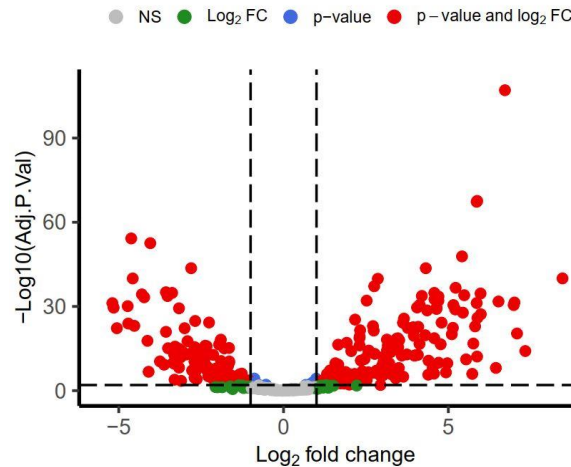
نتایج برای تفاوت بیان mRNAها نشان داد که ۳۰۸۸ mRNA افزایش و ۳۸۹۳ mRNA به طور معنی داری کاهش بیان داشت (شکل ۲).



شکل ۲- mRNAهای درگیر در سرطان ریه. تعداد mRNAهایی که در سرطان ریه افزایش و کاهش بیان دارند.



نتایج تفاوت بیان برای miRNAها نشان داد که به طور کلی ۱۶۱ miRNA افزایش و ۱۲۳ کاهش بیان معنی دار با معیار ذکر شده در بخش موادها و روشها را داشت (شکل ۳).



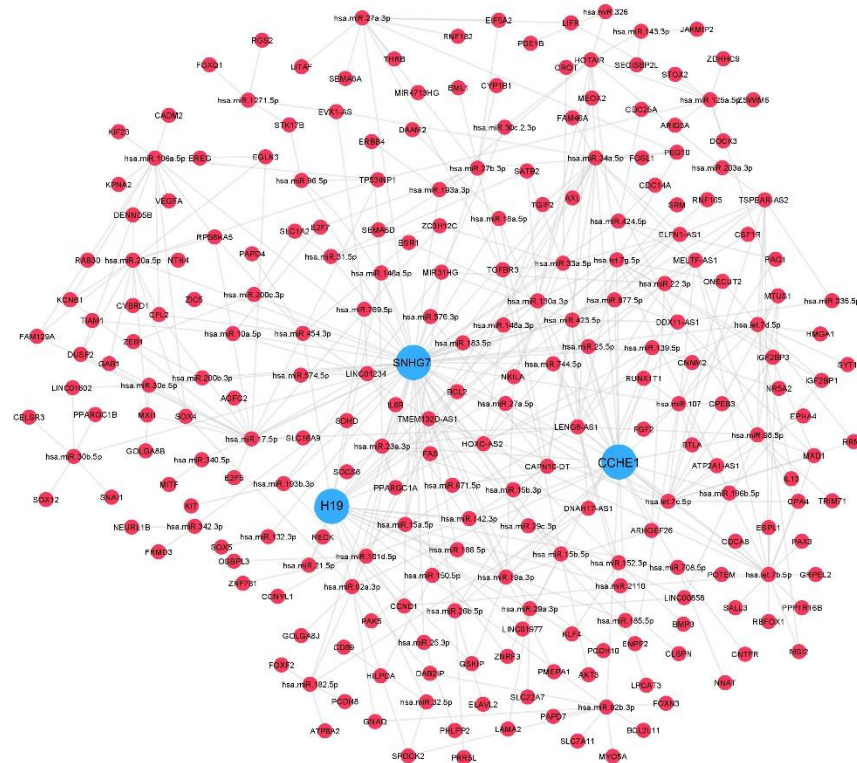
شکل ۳-miRNAهای درگیر در سرطان ریه. تعداد miRNAهایی که در سرطان ریه افزایش و کاهش بیان دارند.

این نتایج نشان می‌دهد که miRNA، lncRNA و mRNA بدست آمده می‌توانند نقش مهمی در پاتوژنز سرطان ریه داشته باشند. در ادامه ارتباط mRNA و lncRNAهایی شناسایی شده از مرحله قبل با نرخ مرگ و میر بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج برای ارتباط mRNAها با نرخ بقای بیماران نشان داد که mRNA ۱۲۶۹ با معیار  $HR > 1$  و  $\log Rank < 0.05$  با پیش آگهی ضعیف بیماران همراهی داشت و mRNA ۱۲۴ با معیار  $HR < 1$  و  $\log Rank < 0.05$  با پیش آگهی ضعیف بیماران همراهی داشت. در ادامه اشتراک mRNAهای افزایشی و کاهشی از مرحله قبل با mRNAهای شناسایی شده و مرتبط با بقا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که mRNA 209 وجود داشت که هم افزایش بیان دارند و هم با پیش آگهی ضعیف بیماران همراهی دارند. همچنین نتایج ما نشان داد که mRNA ۲۲ هم به طور معنی داری کاهش می‌یابند و هم با پیش آگهی خوب بیماران همراهی دارند. از طرفی دیگر اشتراک lncRNAهای افزایشی و کاهشی از مراحل قبل با lncRNAهای مرتبط با بقای بیماران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارتباط بیان lncRNAها با نرخ مرگ و میر بیماران نشان داد که به طور کلی lncRNA 142 با پیش آگهی ضعیف ( $HR > 1, \log Rank < 0.05$ ) و lncRNA ۱۷ با پیش آگهی خوب بیماران همراهی داشتند. نتایج اشتراک بین lncRNAهای افزایشی و lncRNAهایی که با پیش آگهی ضعیف همراهی داشتند نشان داد که lncRNA ۳۸ هم افزایش بیان چشمگیری در سرطان ریه دارند و هم با پیش آگهی ضعیف بیماران همراهی دارند. همچنین نتایج آنالیزهای ما نشان داد که ۳ lncRNA هم کاهش بیان دارند و هم با پیش آگهی خوب بیماران همراهی دارند. این نتایج پیشنهاد می‌دهد که lncRNA و mRNAهای شناسایی شده میتوانند نقش بارز تری در پیشرفت ریه داشته باشند. در ادامه به شناسایی شبکه ceRNA مرتبط با mRNA، miRNA و lncRNA شناسایی شده پرداخته شد. برای این هدف از ۱۶۱ miRNA افزایش و ۱۲۳ کاهشی استفاده شد. همچنین برای mRNA و lncRNAهای افزایشی و کاهشی آنهایی مد نظر قرار داده شدند که در مرحله قبل با نرخ مرگ و میر بیماران همراهی داشتند. در ابتدا شبکه مرتبط با miRNA-mRNA بررسی شد که ۲۲۴ جفت miRNA-mRNA شناسایی شد. همچنین ۲۷۲ جفت miRNA-lncRNA شناسایی شد. در نهایت با استفاده از ابزار cytoscape نتایج دو شبکه قبلی با همدیگر تلفیق شدند. نتایج تلفیق شبکه‌ها نشان داد که سه lncRNA شامل SNHG7، H19 و CCHE1 بیشترین

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

تعامل را با دیگر miRNAها و mRNAهای شناسایی شده داشتند (شکل ۴). علاوه بر این غنی‌سازی ژن‌های موجود در شبکه ceRNA نشان داد که بیشتر این ژن‌های در مسیرهای تکثیر سلولی، آپوپتوز و متاستازی درگیر هستند.



شکل ۴- شبکه ceRNA مرتبط با mRNA، miRNA و lncRNA شامل SNHG7، H19 و CCHE1 بیشترین تعامل را با دیگر mRNAها و miRNAهای شناسایی شده داشتند.

#### بحث

سرطان، بیماری پیچیده‌ای است که بیان ژن در آن به صورت نامتعادل انجام می‌پذیرد. عامل‌های ژنتیکی درگیر در ایجاد سرطان، به نحو قابل توجهی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. با این وجود، شواهد نشان داده‌اند که بخش چشم‌گیری از عامل‌های مستعد کننده به سرطان را نمی‌توان به تغییر در توالی‌های کدکننده پروتئین نسبت داد. شناسایی شمار زیادی از lncRNAها در انسان، به پرده‌برداری از جایگاه این مولکول‌ها در آسیب‌شناسی سرطان و نقش آن‌ها به عنوان اجزای مهم در تومورزایی، کمک شایانی نموده است. نقش lncRNAها به عنوان عامل‌های سرکوبگر تومور یا آنکوژن‌ها، در انواع متعددی از سرطان‌های شایع به اثبات رسیده است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که چندین جایگاه خطر موثر در ایجاد سرطان، به lncRNAها رونویسی می‌شوند و رونوشت‌های حاصل، نقش‌های کلیدی در فرایند تومورزایی ایفا می‌کنند (۵).

توسعه فناوری ریزآرایه‌ها و فناوری‌های توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا، سبب شده است که هزاران ژن در انسان شناسایی شوند، که منجر به بررسی ژن‌های کلیدی در سرطان‌زایی شود. در مطالعه حاضر، ما به بررسی lncRNAهای درگیر در سرطان ریه با تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های به دست آمده از پایگاه داده TCGA پرداختیم. بررسی مجدد ژن‌های موجود در پایگاه داده، کشف ژن‌های مبتنی بر شبکه ceRNA، و تجزیه و تحلیل بقا به طور گسترده، برای کشف بیومارکرهای زیستی بالقوه مرتبط با تشخیص و پیش‌آگهی سرطان ریه استفاده شد. ما دریافتیم که سه lncRNA شامل SNHG7، H19 و CCHE1 ممکن است به توسعه سرطان ریه کمک کنند و عملکردهای بالقوه آنها ممکن است با پیش‌آگهی سرطان ریه مرتبط باشند.

یک روش بیوانفورماتیک چند مرحله‌ای و یکپارچه برای نشان دادن ژن‌ها با بیان متغیر در سرطان ریه، استفاده شد. از آنجایی که مجموعه داده‌هایی که ما برای تجزیه و تحلیل داده‌های چندگانه خود انتخاب کردیم، بر اساس پلتفرم‌های مختلف، نمونه‌ها در روزهای مختلف، گروه‌های مختلف یا توسط افراد مختلف مورد بررسی قرار گرفتند، ما نرمال‌سازی را با استفاده از پکیج R انجام دادیم. ثابت شده است که ادغام داده‌های چندگانه ریزآرایه، برای تشخیص ژن‌ها با بیان متغیر، مؤثر است و به عنوان راه بهتری برای بررسی و مطمئن بودن نتایج نیز در نظر گرفته می‌شود. با دانش بر اینکه، تعداد محدود ژن با بیان متغیر، برای تجزیه و تحلیل‌های اساسی کافی نیستند، به همین منظور، ما از داده‌های TCGA استفاده کردیم و سپس بر روی داده‌ها نرمال‌سازی انجام گرفت. در مجموع، ۹۳۷ نمونه سرطانی و ۴۹ نمونه نرمال برای mRNA، lncRNA و miRNA‌های تغییر بیان یافته انتخاب شد. برای انتخاب ژن‌ها معیار  $|\log FC| > 1$  و  $FDR < 0.01$  مد نظر قرار گرفت.

۲۲۴ جفت miRNA-mRNA و ۲۷۲ جفت miRNA-lncRNA در شبکه ceRNA گنجانده شدند که از این بین، سه lncRNA شامل SNHG7، H19 و CCHE1 ممکن بیشترین تعامل را با دیگر miRNAها و mRNAهای شناسایی شده داشتند. غنی‌سازی ژن‌های موجود در شبکه ceRNA نشان داد که بیشتر این ژن‌ها در مسیرهای تکثیر سلولی، آپوپتوز و متاستاز درگیر هستند.

امروزه با وجود تحقیقات گسترده همچنان نقش عملکردی تعدادی از lncRNAها به عنوان بیومارکر در سرطان نامشخص است. اما با این وجود تعدادی از lncRNAها نیز به طور کامل مطالعه شده‌اند. لیو و همکارانش نشان دادند که HOTAIR به عنوان یک ceRNA عمل می‌کند و هدف miR-331-3p است، همچنین می‌تواند در تنظیمات پس از ترجمه فعالیت کند و ژن HER2 را فعال کند. بنابراین mRNAها، lncRNAها و miRNAها یک شبکه نظارتی را برای تعامل ژن‌ها نشان می‌دهند. از این رو با استفاده از این روش‌ها، می‌توان lncRNAهای مرتبط با بیماری‌های بیشتری را شناسایی کرد. مطالعه ما نیز دیدگاه جدیدی از مسیرهای مولکولی را در سرطان ریه فراهم آورده است. با این حال این مکانیسم‌ها محدودیت‌هایی نیز دارند. به عنوان مثال همه miRNAها نمی‌توانند همزمان در الگوریتم‌های نرم‌افزار پیش‌بینی شوند. از طرف دیگر، برای شبکه‌هایی که با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی پیشنهاد می‌شوند، مطالعات *in vivo* و *in vitro* مورد نیاز خواهد بود (۶).

اخیرا شبکه‌های بیان ژن به طور گسترده گسترش یافته‌اند تا نقش بالقوه lncRNAها را شناسایی کنند. به عنوان مثال جیانگ و همکاران بیان همزمان lncRNA-mRNA را در پیشرفت سرطان دهانه رحم گزارش کردند (۷). مشابه این تحقیق در مطالعه حاضر بر روی سرطان ریه انجام شد. ما در سرطان ریه در ابتداء شبکه مرتبط با miRNA-mRNA را بررسی کردیم، سپس همبستگی miRNA-lncRNA شناسایی شد. در نهایت با استفاده از ابزار cytoscape نتایج دو شبکه قبلی با همدیگر تلفیق شدند و شبکه ceRNA حاضر در این پژوهش رسم گردید و مشخص شد که سه lncRNA شامل SNHG7، H19 و CCHE1 ممکن بیشترین تعامل را در شبکه با سایر ژن‌ها دارند.

مطالعات اخیر نشان داده است که SNHG7 در پیشرفت چندین نوع سرطان نقش دارد. به عنوان مثال، ژنگ و همکاران گزارش کردند که SNHG7 به عنوان یک انکوژن برای پیشبرد تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطان دهانه رحم عمل می‌کند (۸). علاوه بر این، چنگ و همکاران نقش انکوژنی را برای SNHG7 در پیشبرد تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی پانکراس شناسایی کردند (۹).

مطابق با پژوهش‌های اخیر، نتایج پژوهش ما نیز (هم در فاز *in silico* و هم فاز *in vitro*) با یافته‌های مطالعات فوق‌الذکر مطابقت دارد و با حضور در شبکه ceRNA شناسایی شده در این پژوهش و افزایش بیان در نمونه‌های سرطان ریه نقش کلیدی را در این سرطان ایفا می‌کند. بنابراین می‌توان بیان کرد که SNHG7 ممکن است به عنوان یک lncRNA انکوژنیک برای پیشبرد تکثیر در سرطان ریه عمل کند.

### نتیجه گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که سه lncRNA شناسایی شده در این پژوهش (شامل *SNHG7*، *H19* و *CCHE1*) می‌توانند به عنوان ceRNA عمل کرده و پس از ارتباط با تعداد زیادی mRNA و miRNA، پیشرفت سرطان ریه را تقویت کنند. با استناد به نتایج حاصل، می‌توان این سه lncRNA را به عنوان بیومارکر در سرطان ریه معرفی کرد. در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق فوق امید است که این مطالعه راهکاری نوین در جهت مقابله با سرطان باشد.

### References:

1. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *Journal of clinical oncology*. 2005; 23(14): 3175-85.
2. Luo SY, Lam DC. Oncogenic driver mutations in lung cancer. *Translational respiratory medicine*. 2013; 1(1): 1-8.
3. Taher F, Werghi N, Al-Ahmad H, Donner C. Extraction and segmentation of sputum cells for lung cancer early diagnosis. *Algorithms*. 2013; 6(3): 512-31.
4. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. Focus on lung cancer. *Cancer cell*. 2002; 1(1): 49-52.
5. Qu Z, Adelson DL. Identification and comparative analysis of ncRNAs in human, mouse and zebrafish indicate a conserved role in regulation of genes expressed in brain. *PloS one*. 2012; 7(12): e52275.
6. Zhang X, Zhang W, Jiang Y, Liu K, Ran L, et al. Identification of functional lncRNAs in gastric cancer by integrative analysis of GEO and TCGA data. *Journal of cellular biochemistry*. 2019; 120(10): 17898-911.
7. Jiang L, Hong L, Yang W, Zhao Y, Tan A, et al. Co-expression network analysis of the lncRNAs and mRNAs associated with cervical cancer progression. *Archives of Medical Science*. 2019; 15(3): 754-64.
8. Zeng J, Ma Y, Liu Z, Zeng Y. LncRNA SNHG7 contributes to cell proliferation, invasion and prognosis of cervical cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019; 23(21): 9277-85
9. Cheng D, Fan J, Ma Y, Zhou Y, Qin K, et al. LncRNA SNHG7 promotes pancreatic cancer proliferation through ID4 by sponging miR-342-3p. *Cell & bioscience*. 2019; 9(1): 1-11.

## بررسی اثرات ژن کد کننده *Buforin II* بر بیان *LncRNA* های *UCA1* و *GAS5*، *ANCR* در سلول های MCF-7

محمدعلی عباس فاضل<sup>۱</sup>، نازنین سلیمی بروجنی<sup>۲</sup>، سمیه تیربخش گوران<sup>۳\*</sup>، الهام دوستی<sup>۴</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۴. کارشناسی ارشد صنایع غذایی، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** سرطان پستان بیش از یک میلیون مورد از ده میلیون نئوپلازی را که سالانه در سراسر دنیا تشخیص داده می‌شود به خود اختصاص می‌دهد. این سرطان شایع‌ترین سرطان بین زنان و دومین علت مرگ در زنان است. تنظیم میزان بیان *LncRNA* نقش مهمی در آپوپتوز و کنترل سرطان پستان دارد. *RNA* های بلند غیر کدکننده *GAS5*، *ANCR* و *UCA1* در القای آپوپتوز نقش دارند. بوفورین II یک پپتید ۲۱ اسید آمینه‌ای است. مطالعه حاضر اثرات تیمار با *pcDNA3.1-Buforin II* بر تغییرات سطح بیان ژن‌های *UCA1* و *GAS5 ANCR* در سلول‌های MCF-7 ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب و وکتور فاقد ژن هدف را توصیف می‌کند.

**مواد و روش‌ها:** توالی ژن کد کننده *Buforin II* از سایت NCBI گرفته شد و با کمک سایت‌های Addgene و Snapgene در وکتور بیانی *pcDNA3.1(+)* کلون شد. باکتری *اشریشیا کلی* سویه *TOP10F* توسط پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1(+)* در وکتور بیانی *Buforin II* ترانسفورم شد. پس از تکثیر پلاسمید نوترکیب در باکتری، خالص سازی آن انجام گرفت. رده سلول‌های سرطانی MCF-7 به کمک لیپوفکتامین ۲۰۰۰ توسط وکتور نوترکیب و وکتور فاقد ژن هدف ترانسفکت شدند. از سلول‌های ترانسفکت شده استخراج RNA صورت گرفت و cDNA سنتز شد. سطح بیان ژن‌های *UCA1* و *GAS5 ANCR* با روش real-time PCR و محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  تعیین شد. در مطالعه حاضر مقدار *p* کوچکتر از ۰/۰۵ به لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با *pcDNA3.1-Buforin II* پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ °C، سطح بیان ژن *ANCR* که در مهار تکثیر چرخه سلولی دخیل است را به طور معنی‌داری کاهش داده ( $p < 0.01$ ) شد. از طرفی تیمار با *pcDNA3.1-Buforin II* باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *GAS5* ( $p < 0.001$ ) و *UCA1* که در القای آپوپتوز نقش دارند، گردید ( $p < 0.0001$ ). تیمار رده سلولی MCF-7 با وکتور فاقد ژن هدف هیچ گونه تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** پژوهش حاضر تأیید می‌کند که *pcDNA3.1-Buforin II* با تنظیم بیان ژن‌های *UCA1* و *GAS5 ANCR* می‌تواند باعث القای آپوپتوز شود. نتایج این مطالعه به استفاده از بوفورین II به عنوان یک فاکتور درمانی جدید و موثر برای کنترل احتمالی پیشرفت سرطان پستان کمک می‌کند.

**واژگان کلیدی:** سرطان پستان، *Buforin II*، *UCA1*، *GAS5*، *ANCR*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۸۸۴۵۹۷۰۴

تلفن: ۰۳۱۳۳۳۴۵۶۷۴

پست الکترونیک: somayetirbakhsh@gmail.com

## Study the effects of *Buforin II* coding gene on the expression of *ANCR*, *GAS5* and *UCA1* LncRNAs in MCF-7 cells

Mohammed-Ali Abbas Fadhil<sup>1</sup>, Nazanin Salimi-Borujeni<sup>2</sup>, Somaye Tirbakhsh Gouran<sup>3\*</sup>, Elham Doosti<sup>4</sup>

1. M.Sc in Genetics, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. B.Sc Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. PhD in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
4. M.Sc in Food Industry, Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Breast cancer accounts for more than one million cases out of ten million neoplasias diagnosed annually worldwide. This cancer is the most common cancer among women and the second leading cause of death in women. Regulation of LncRNA expression plays an important role in apoptosis and control of breast cancer. Long non-coding RNAs *ANCR*, *GAS5* and *UCA1* are involved in the induction of apoptosis. *Buforin II* is a 21 amino acid peptide. The present study describes the effects of treatment with pcDNA3.1-*Buforin II* on the expression level changes of *ANCR*, *GAS5* and *UCA1* genes in MCF-7 cells transfected with recombinant vector and free vector.

**Materials and Methods:** The sequence of the *Buforin II* coding gene was obtained from the NCBI site and cloned into the expression vector pcDNA3.1(+) with the help of Addgene and Snapgene sites. *Escherichia coli* strain TOP10F was transformed by recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-*Buforin II*. After multiplying the recombinant plasmid in bacteria, its purification was done. MCF-7 cancer cell line was transfected with lipofectamine 2000 by recombinant vector and vector without target gene. RNA was extracted from the transfected cells and cDNA was synthesized. The expression level of *ANCR*, *GAS5* and *UCA1* genes was determined by real-time PCR method and  $\Delta\Delta C_t$  calculation. In the present study, p value smaller than 0.05 was considered statistically significant.

**Results:** The results of the present study showed that treatment with pcDNA3.1-*Buforin II* after 24 hours of incubation at 37 °C, significantly reduced the expression level of *ANCR* gene, which is involved in the inhibition of cell cycle proliferation ( $p < 0.01$ ). On the other hand, treatment with pcDNA3.1-*Buforin II* significantly increased the expression of *GAS5* ( $p < 0.001$ ) and *UCA1* genes, which play a role in apoptosis induction ( $p < 0.0001$ ). Treatment of MCF-7 cell line with the vector lacking the target gene did not show any significant changes compared to the control group.

**Conclusion:** The present study confirms that pcDNA3.1-*Buforin II* can induce apoptosis by regulating the expression of *ANCR*, *GAS5* and *UCA1* genes. The results of this study help to use *Buforin II* as a new and effective therapeutic factor for the possible control of breast cancer progression.

**Keywords:** Breast Cancer, *Buforin II*, *UCA1*, *GAS5*, *ANCR*.

### مقدمه

سرطان یکی از بیماری‌های مهم در جهان است که حاصل رشد بی‌رویه یک سلول است به نحوی که دچار تغییر در ژنوم خود شده و در نهایت باعث افزایش سرعت تکثیر و ناهماهنگی در برقراری رابطه آن سلول با دیگر سلول‌ها و محیط می‌گردد (۱ و ۲). هر ساله میلیون‌ها نفر از مبتلایان به انواع سرطان‌ها در سراسر دنیا تشخیص داده می‌شوند و بیش از نیمی از این افراد بر اثر سرطان می‌میرند. بر اساس پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی (WHO)، در سال ۲۰۳۰، تعداد زیادی از مردم، یعنی در حدود ۱۱/۴ میلیون نفر بر اثر ابتلا به سرطان خواهند مرد. در سال ۲۰۱۲، تعداد موارد گزارش شده سرطان ریه (۱/۸۲ میلیون)، سرطان پستان (۱/۶۷ میلیون) و سرطان روده بزرگ (۱/۳۶ میلیون) بوده و از مهم‌ترین انواع سرطان تشخیص داده شده‌اند (۳). سرطان پستان پنجمین علت اصلی مرگ و میر با متوسط ۵۲۲ هزار مورد در سال می‌باشد و ۲۸ درصد کل سرطان‌ها را شامل می‌شود. این سرطان هنوز هم رایج‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در کشورهای کمتر توسعه یافته و دومین سرطان پس از سرطان ریه در کشورهای توسعه یافته است. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان بعد از سرطان ریه در زنان می‌باشد و بالاترین بروز را در میان تمام سرطان‌ها در زنان داراست. ریسک سرطان پستان به نسبت‌های اپیدمیکی رسیده است به طوری که از هر ۸ زن، یک نفر به این سرطان مبتلا می‌شود. مردان هم

از این سرطان مصون نیستند و مواردی از ابتلای مردان به سرطان پستان نیز گزارش شده است. با تمام این اوصاف خوشبختانه از سال ۱۹۹۰ مرگ و میر این سرطان کاهش یافته است که این موفقیت را مرهون روش‌های جدید غربالگری هستیم. اتیولوژی سرطان پستان چند عاملی است و اگرچه چندین فاکتور خطر، برای این سرطان شناسایی شده‌اند، ولی همه آن‌ها تنها ۲۱٪ ریسک سرطان پستان در زنان ۳۰ تا ۵۴ سال و ۲۹٪ ریسک در زنان ۵۵ تا ۸۴ سال را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این تقریباً ۷۵٪ زنان مبتلا به سرطان پستان هیچ فاکتور خطری به جز سن و جنس ندارند و در نتیجه تمام زنان را باید در معرض خطر به حساب آورد (۴). با توجه به نیاز دائمی به بهبود یا یافتن عوامل درمانی جدید علیه سرطان و به ویژه آن‌هایی که قادر به فرار از مقاومت دارویی و سایر عوارض جانبی مهم هستند، پپتیدها به یکی از اهداف جدید تحقیقاتی تبدیل شده‌اند. گروهی از پپتیدهای منبع طبیعی جالب از پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides: AMPs) تشکیل شده است. آن‌ها از طیف گسترده‌ای از موجودات مانند میکروارگانیسم‌های تک سلولی، حشرات، گیاهان، پرندگان، ماهی‌ها، دوزیستان و پستانداران از جمله انسان جدا شده‌اند. AMPها در ابتدا به دلیل نقششان در پاکسازی میکروارگانیسم‌ها کشف شدند، آن‌ها در پاسخ به عفونت توسط یک فرآیند تنظیمی متفاوت آزاد می‌شوند. AMPها عمدتاً غشای پلاسمایی را هدف قرار می‌دهند و به سرعت میکروارگانیسم‌ها را در شرایط آزمایشگاهی (در عرض چند دقیقه) از بین می‌برند. این فعالیت کشنده طیف وسیعی از جمله باکتری‌های گرم مثبت و منفی، قارچ‌ها و تک یاخته‌ها را پوشش می‌دهد، بدون اینکه برای سلول‌های پستانداران در دوزهایی که فعالیت ضد میکروبی نشان داده‌اند سیتوتوکسیک باشد. علاوه بر این، AMPها پاتوژن‌هایی را می‌کشند که به آنتی‌بیوتیک‌های معمولی مقاوم هستند و از آنجایی که تغییر سازمان غشای پلاسمایی آن برای میکروارگانیسم بسیار دشوار است، سطوح بالقوه پایینی از مقاومت القایی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های معمولی رخ می‌دهد (۵). جالب توجه است، علاوه بر فعالیت‌های ذکر شده در بالا، تعداد فزاینده‌ای از مطالعات نشان داد که برخی از AMPهای کاتیونی طیف وسیعی از فعالیت سیتوتوکسیک را علیه سلول‌های سرطانی نشان می‌دهند (۶). Buforin I یک AMP ۳۹ اسید آمینه‌ای است که برای اولین بار از بافت معده وزغ آسیایی *Bufo bufo gargarizans* جدا شد. Buforin II یک پپتید ۲۱ آمینو اسیدی است که از بوفورین I مشتق شده است و فعالیت ضد سرطانی قوی‌تری از خود نشان می‌دهد. هر دو پپتید دارای هویت توالی کامل با ناحیه N ترمینال هیستون H2A هستند که مستقیماً با اسیدهای نوکلئیک در تعامل است. بوفورین I از هیستون H2A توسط پروتئولیز پپسین در سیتوپلاسم سلول‌های غده معده تولید می‌شود. پس از ترشح در مجرای معده، بوفورین I به بیوفیلیم مخاطی که معده را می‌پوشاند، چسبیده باقی می‌ماند، بنابراین یک پوشش ضد میکروبی محافظ ایجاد می‌کند. بوفورین‌ها که یک دامنه هلیکس-آلفا-هلیکس را در خود جای داده‌اند، یک میکروارگانیسم را با ورود به سلول بدون نفوذپذیری غشاء و در نتیجه اتصال به اسیدهای نوکلئیک از بین می‌برند. آلفای پرولین برای فعالیت نفوذ سلولی بوفورین‌ها بسیار مهم است. بوفورین‌ها همچنین دارای فعالیت‌های ضد اندوتوکسین و ضد سرطان هستند، بنابراین این پپتیدها را به عنوان معرف‌های جذاب برای کاربردهای دارویی تبدیل می‌کنند. RNA بلند غیر کدکننده (LncRNAs) عناصر ژنومی با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که به دلیل نداشتن چهارچوب خوانش کامل (Frame Reading Open: ORF) قادر به تولید پروتئین نمی‌باشند. این عناصر با تغییر ساختار یا اتصال به پروتئین‌های خاص، در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌ها در مرحله رونویسی و پس از رونویسی نقش دارند و به تبع آن انواع مختلف عملکردهای سلولی مانند تکثیر، تمایز، تهاجم و آپوپتوز را کنترل می‌کنند (۷). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اختلال در میزان بیان LncRNA با تومورزایی بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان پروستات، پستان، سرویکس، ریه و کبد در ارتباط هستند. این عامل حاکی از نقش مهم RNA بلند غیر کدکننده در تومورزایی و پیشرفت سرطان به عنوان انکوژن یا سرکوب‌کننده تومور می‌باشد (۸). از آنجایی که *UCA1*، *GAS5* و *ANCR* اختصاصاً در سرطان پستان تغییر بیان معناداری دارند تاکنون باهم مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها، اختلاف بیان بین گروه‌های شاهد و رده سلول سرطانی MCF-7 ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب و وکتور فاقد ژن هدف گرفته شد. بر این اساس بررسی بیان ژن‌های *UCA1*، *GAS5* و *ANCR* در سرطان سینه نسبت به گروه شاهد، تحت عنوان تاثیر بیان RNAهای بلند غیر کدکننده در رده MCF-7 سرطان سینه مورد هدف بوده است.

## مواد و روش‌ها

### طراحی و تهیه سازواره pcDNA3.1- *Buforin II*

اطلاعات مربوط به توالی و کتور بیانی (+)pcDNA3.1، از سایت Addgene بدست آمد و با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده مشخص شد. اندازه این وکتور ۵۴۲۸bp است و دارای یک مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک برای پروکاریوت‌ها به نام آمپی‌سیلین به عنوان شاخص انتخابگر و یک جایگاه برش چندگانه برای ورود ژن است. در بالادست (MSC) Multiple Cloning Site یک پروموتور CMV و در پایین دست آن یک توالی پلی A بنام bGH وجود دارد. توالی ژن کدکننده *Buforin II* از بانک ژن جهانی NCBI با کد دسترسی HW071250.1 و محصول PCR ۸۷ جفت بازی گرفته شد. ردیف ژنی مورد نظر، تحت پروموتور یوکاریوتی پلاسمید بیانی (+)pcDNA3.1 با کمک سایت‌های Addgene و Snapgene طراحی گردید و طراحی سازواره نهایی کامل شد. ژن بصورت سنتتیک در وکتور بیانی (+)pcDNA3.1 توسط شرکت GENEray چین کلون شد. ژن کدکننده *Buforin II* در وکتور نو ترکیب (+)pcDNA3.1-*Buforin II* با اندازه ۵۴۷۰bp با استفاده از جایگاه‌های برش *XbaI* و *EcoRI* کلون شد. برای انتقال وکتور مذکور به درون سلول‌های *اشریشیا کلی* سویه TOP10F، ابتدا باید سلول‌ها مستعد دریافت پلاسمید شوند. مراحل تهیه سلول مستعد یا Competent Cell طبق دستورالعمل Cohen انجام شد (۹).

### ترانسفورماسیون *اشریشیا کلی* سویه TOP10F با وکتور (+)pcDNA3.1 حاوی قطعه ژنی

انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد باکتریایی با استفاده از روش شوک حرارتی روشی بنیادین در زیست‌شناسی مولکولی است. پایه و اساس اکثر روش‌های ترانسفورماسیون باکتری‌ها بر پایه مشاهدات Higa و Mandel در سال ۱۹۷۰ طراحی شده است (۱۰). مقدار ۵ میکرولیتر از وکتور نو ترکیب (غلظت ۰/۲ میکروگرم/میکرولیتر) به میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد *اشریشیا کلی* سویه TOP10F (۱۰<sup>۷</sup>-۱۰<sup>۸</sup> سلول در ۱ میلی لیتر محیط کشت، OD600 = 0.4) افزوده شد و به همراه میکروتیوب کنترل منفی (حاوی فقط سلول مستعد) بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. اعمال شوک حرارتی به باکتری‌ها به وسیله دماهی ۴۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و سپس بلافاصله میکروتیوب بر روی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. یک میلی لیتر محیط LB مایع استریل بدون آنتی بیوتیک به میکروتیوب‌ها افزوده شد و در دمای ۳۷°C در انکوباتور شیکردار با دور ۲۵۰ rpm به مدت ۲ ساعت دماهی شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و سپس مایع رویی حذف و رسوب باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر باقیمانده از محیط حل شد. باکتری‌های ترانسفورم شده به محیط LB جامد حاوی آمپی سیلین با غلظت نهایی ۵۰ mg/ml منتقل و پس از کشت گسترده در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد.

### تأیید ترانسفورماسیون وکتور (+)pcDNA3.1 حاوی قطعه ژنی *Buforin II*

ترانسفورماسیون وکتور (+)pcDNA3.1 حاوی قطعه ژنی *Buforin II* به ۳ روش زیر تأیید شد.

(۵) **PCR:** بیان ژن *Buforin II* در وکتور نو ترکیب به منظور تأیید صحت کلونینگ توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی *Buforin II* شامل:

F: 5' ATGACAAGAAGCAGCAGAGCC3'

R: 5' CTTTCTCAGCAGTCTGTGCACTC3'

تأیید شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی لیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برای هر واکنش انجام شد که حاوی ۱ میکرولیتر از وکتور نو ترکیب (+)pcDNA3.1-*Buforin II*، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR، ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بودند. کنترل منفی واکنش شامل تمامی مواد فوق به جز DNA الگو یا همان پلاسمید نو ترکیب بود. جهت انجام مراحل دمایی تکثیر ژن‌ها، میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شدند. دماهای واکنش PCR شامل چرخه‌های زیر بودند: یک مرحله دناتوره شدن اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری شامل ۳۰ ثانیه دناتوره شدن در ۹۴°C، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۱°C (برای ژن *Buforin II*) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و سپس مرحله نهایی گسترش یا تکثیر در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

۶) **هضم آنزیمی دوگانه:** هضم آنزیمی توسط شرکت GENErAy با استفاده از آنزیم‌های برشی *XbaI* و *EcoRI* انجام و نتایج روی ژل آگارز الکتروفورز شده و باندها بررسی شدند. برای انجام برش وکتور بیانی ابتدا وکتور طبق دستورالعمل توسط کیت استخراج پلاسمید ستونی استخراج شد و سپس واکنش هضم با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده *XbaI* و *EcoRI* به طور همزمان (هضم دوگانه) طبق جدول ۱ انجام شد. محلول فوق به مدت ۴ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  دمادهی شده و نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

جدول ۱- نسبت مواد برای برش همزمان با دو آنزیم برشی

مواد واکنش	حجم (میکرولیتر)
پلاسمید استخراج شده	۸ میکرولیتر (غلظت $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
آنزیم <i>EcoRI</i>	$1 \mu\text{l}$ معادل ۱۰ واحد ( $1.0 \text{u}/\mu\text{l}$ )
آنزیم <i>XbaI</i>	$1 \mu\text{l}$ معادل ۱۰ واحد ( $1.0 \text{u}/\mu\text{l}$ )
بافر Tango (10X)	$2 \mu\text{l}$
آب مقطر DNAase free و استریل	$8 \mu\text{l}$
حجم نهایی	$20 \mu\text{l}$

۷) **Sequencing:** توالی‌یابی نوکلئوتیدی وکتور نوترکیب توسط شرکت GENErAy انجام و داده‌های آن ارسال شد.

### انتقال وکتورها (ترانسفکشن) به رده سلولی MCF-7

در این مطالعه به منظور بررسی اثرات وکتور نوترکیب بر سلول‌های سرطان پستان از رده سلولی MCF-7 که از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد شهر کرد دریافت شد، استفاده گردید. ابتدا تعداد  $10^5 \times 3$  سلول MCF-7 در هر چاهک پلیت ۶ خانهای کشت داده شدند و سپس وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Buforin II* و وکتور فاقد ژن هدف *pcDNA3.1(+)* (به عنوان کنترل) به صورت جداگانه با استفاده از کیت لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به رده سلولی MCF-7 ترانسفکت گردید. روش ترانسفکشن به این صورت بود: ابتدا  $7/5$  میکرولیتر از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به  $150$  میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 بدون سرم و آنتی‌بیوتیک اضافه شد. همچنین  $2/5$  میکروگرم در میکرولیتر DNA پلاسمیدی در  $150$  میکرولیتر از محیط بدون سرم و آنتی‌بیوتیک تهیه شد. سپس DNA پلاسمیدی رقیق شده و محلول لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر (به نسبت ۱:۱) مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از آن، محیط کامل (محیط RPMI دارای FBS و آنتی‌بیوتیک) روی سلول‌های کشت از هر چاهک پلیت ۶ خانهای خارج شد و هر چاهک برای حذف FBS یک بار با PBS شسته شد و به هر چاهک محیط حاوی DNA پلاسمیدی و مخلوط لیپوفکتامین رقیق شده اضافه گردید. برای این آزمایش سه گروه با حداقل سه بار تکرار شامل سلول‌های MCF-7 ترانسفکت شده توسط وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Buforin II*، وکتور *pcDNA3.1(+)* فاقد ژن هدف (گروه شاهد) و همچنین سلول‌های تحت تیمار با محلول لیپوفکتامین (گروه کنترل جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک محلول لیپوفکتامین) در نظر گرفته شد. ۳ تا ۴ ساعت بعد مقداری FBS ۱۰٪ (با توجه به محیط کشت هر چاهک) به چاهک‌های ترانسفکت شده (جهت ممانعت از از بین رفتن سلول‌ها) اضافه گردید. ۲۴ ساعت بعد محیط کشت RPMI 1640 حاوی آنتی‌بیوتیک و سرم ۱۰٪ و همچنین غلظت  $400$  میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسین به سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Buforin II* و نیز وکتور *pcDNA3.1(+)* فاقد ژن هدف اضافه شد. پلیت حاوی سلول‌های تیمار شده به مدت ۳ روز و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  جهت بررسی سلول‌ها و غربالگری سلول‌های ترانسفورم شده از غیر ترانسفورم در انکوباتور

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

CO<sub>2</sub> قرار گرفتند. در نهایت، پس از ۷۲ ساعت از تیمار با نئومایسین، سلول‌های هر گروه از کف هر چاهک پلیت با استفاده از آنزیم تریپسین-EDTA ۰/۲۵٪ جدا شدند و برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

سلول‌ها Stable هستند زیرا به منظور بیان ژن هدف هفتاد و دو ساعت پس از ترانسفکشن سلول در محیط حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین رشد می‌کنند. هفتاد و دو ساعت پس از ترانسفکشن، استخراج RNA کل از سلول‌های MCF-7 ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب و نیز ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف pcDNA3.1(+) و همچنین سلول‌های MCF-7 بدون تیمار (گروه کنترل) با استفاده از کیت RNX plus طبق دستورالعمل انجام شد. پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت RNA از باندهای 18s و 28s rRNA با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ بررسی گردید. غلظت نمونه‌ی RNA تخلیص شده از مرحله‌ی قبل حدود ۱۰۰ نانوگرم در ۱ μl تشخیص داده شد و طبق پروتکل کیت برای سنتز cDNA به حداقل غلظت ۵۰۰ ng نیاز است. در این مرحله ۵ μl RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA استفاده شد.

### بررسی بیان نسبی ژن‌های *ANCR*، *GAS5* و *UCA1* با real time RT-PCR

در این پژوهش به منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های *UCA1* و *ANCR*، *GAS5* از روش real time RT-PCR استفاده گردید. برای بررسی اثرات وکتور نو ترکیب *pcDNA3.1(+)-Buforin II* بر روی بیان نسبی ژن‌های *UCA1* و *ANCR*، *GAS5* در بافت‌های دریافت کننده پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن هدف در مقایسه با بافت‌های دریافت کننده پلاسمید دست نخورده و فاقد ژن هدف، بافت دریافت کننده PBS به عنوان گروه کنترل، از تکنیک PCR کمی یا real time PCR استفاده شد. نام ژن‌ها و پرایمرهای مورد استفاده برای هر واکنش در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. تمامی پرایمرهای ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار Gene Runner نسخه ۳/۰۵ طراحی و سفارش داده شد. توالی هر کدام از ژن‌ها از بانک اطلاعاتی GenBank در NCBI به دست آمد. در این مطالعه، میزان بیان ژن‌های هدف با بیان ژن *GAPDH* (به عنوان کنترل داخلی) مقایسه و تجزیه و تحلیل منحنی استاندارد برای هر کدام از ژن‌ها انجام شد.

شرایط دمایی زیر برای واکنش q-PCR مورد استفاده قرار گرفت: یک مرحله دناتوره شدن اولیه (Hold) در دمای ۹۵°C در مدت ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل تکراری شامل دناتوره شدن در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها (دمای متغییر) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه.

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای ژن‌های هدف برای انجام real-time RT-PCR

نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	اندازه محصول
<b>GAPDH</b>	GAPDH-F: 5'- TCCCGTACAAAATGGTGAAGG -3' GAPDH-R: 5'- ATGTTAGGGGGTCTCGCTCCTG -3'	۶۵°C	۲۶۱bp
<b>GAS5</b>	GAS5-F: 5'- ATTGGCACACAGGCATTAGACAG -3' GAS5-R: 5'- CTTCTTTAAACTTGCTCCACACAG -3'	۶۴°C	۲۰۶bp
<b>ANCR</b>	ANCR -F: 5'- GCCACTATGTAGCGGGTTTC -3' ANCR -R: 5'- ACCTGCGCTAAGAAGTGAAGG -3'	۶۰°C	۱۷۱bp
<b>UCA1</b>	UCA1 -F: 5'- ACTTGAAGCAGTCCGGAGAA-3' UCA1 -R: 5'- GGTCACAGGGGTTACAATGG -3'	۵۳°C	۲۱۵bp

### آنالیز آماری

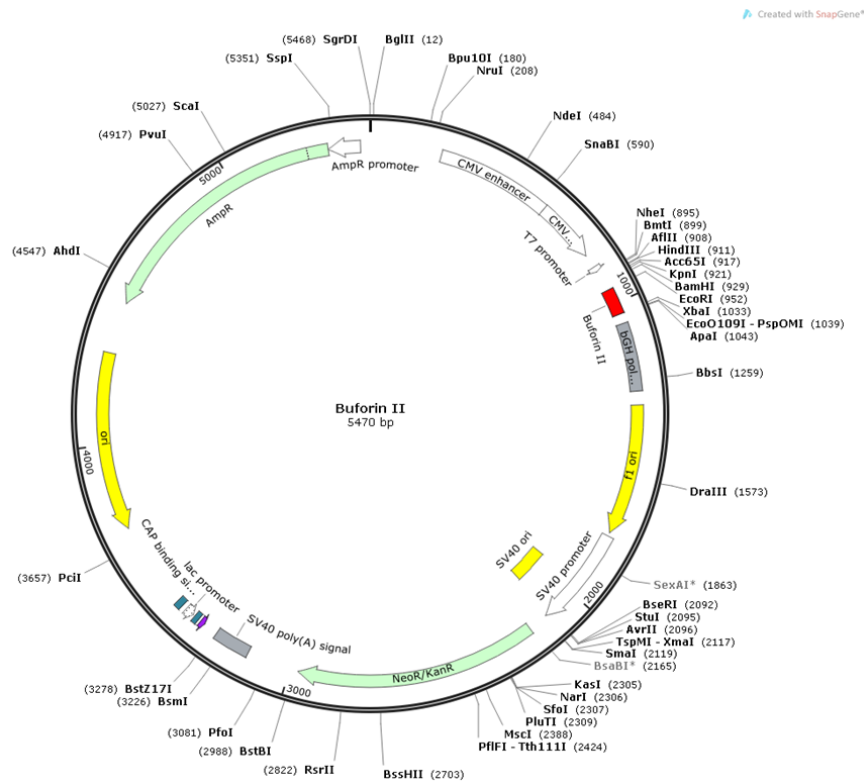
داده‌ها از نوع پارامتریک هستند و تمامی آزمایش‌ها در این پژوهش حداقل دو بار تکرار شدند و داده‌های real time PCR از طریق محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  به وسیله‌ی نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۰ (SPSS, Inc.)، شیکاگو، آمریکا) و Excel ۲۰۱۰ (Microsoft Corporation، آمریکا) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. میانگین تفاوت بین گروه‌ها جهت بررسی وجود

ارتباط و میزان معنی‌داری داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری آزمون پارامتریک T مستقل و همچنین تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA یک طرفه) محاسبه شدند. تمامی نمودارها توسط نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۹ برای ویندوز (GraphPad, San Diego, California, www.graphpad.com) تهیه شدند. در این مطالعه مقدار  $p$  کوچکتر از ۰/۰۵ به لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### سنتز سازواره نهایی *pcDNA3.1(+)-Buforin II*

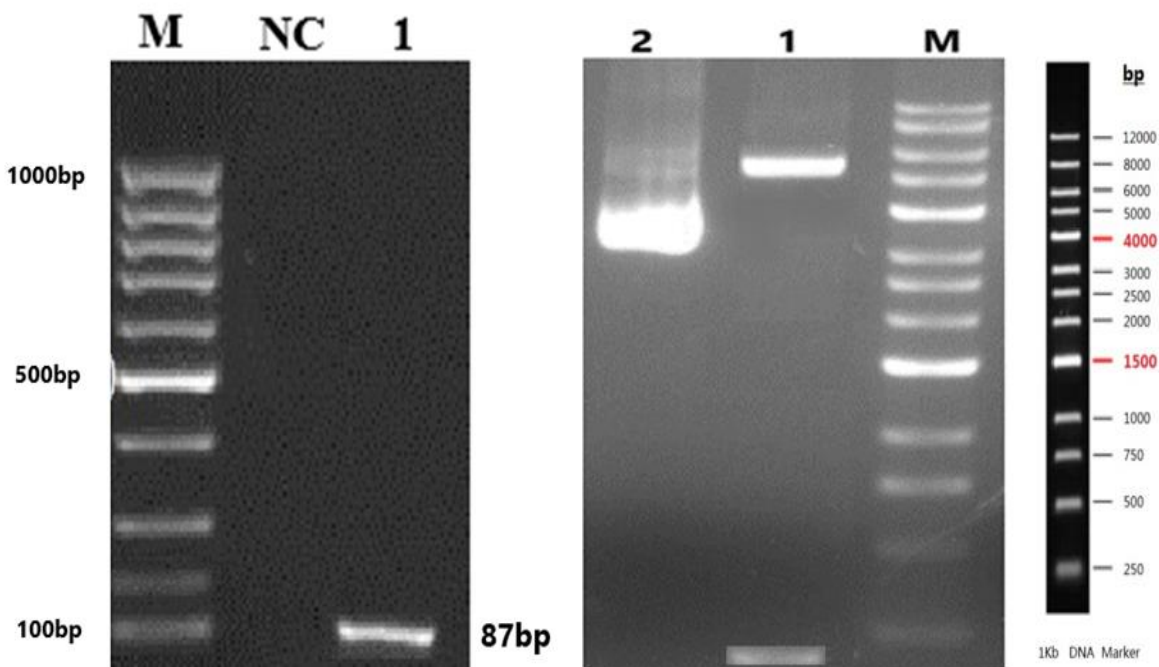
سازواره نهایی از کلون‌سازی ژن *Buforin II* در پلاسمید *pcDNA3.1(+)* و تولید پلاسمید نو ترکیب *pcDNA3.1(+)-Buforin II* حاصل گردید. نمای شماتیک این پلاسمید نو ترکیب در شکل ۱ مشاهده می‌شود. ژن کد کننده *Buforin II* در وکتور نو ترکیب *pcDNA3.1(+)-Buforin II* با اندازه ۵۴۷۰ bp با استفاده از جایگاه‌های برش *XbaI* و *EcoRI* کلون شد.



شکل ۱- ساختار شماتیک پلاسمید *pcDNA3.1(+)-Buforin II*

### تایید پلاسمید نو ترکیب به روش PCR و هضم آنزیمی

انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *Buforin II* روی پلاسمید نو ترکیب *pcDNA3.1(+)* سبب تکثیر یک قطعه DNA با اندازه ۸۷ جفت باز گردید، که تایید کننده صحت کلون‌سازی این ژن در وکتور بیانی می‌باشد (شکل ۲). صحت قرار گرفتن ژن *Buforin II* در وکتور نو ترکیب *pcDNA3.1(+)* توسط شرکت GENEray با استفاده از روش هضم آنزیمی دوگانه (با کمک آنزیم‌های محدود کننده *EcoRI* و *XbaI*) وکتور نو ترکیب *pcDNA3.1(+)-Buforin II* تایید شد و نتیجه به صورت عکس ژل ارسال شد (شکل ۳).



شکل ۳- هضم آنزیمی دوگانه. M: مارکر ۱Kb (Geneaid)

Biotech Ltd, تایوان), ۱: هضم آنزیمی دوگانه که باند ۸۷bp ژن

را به همراه باند ۵۴۲۸bp مربوط به وکتور فاقد ژن هدف نشان

می‌دهد. ۲: باندها از بالا به پایین فرم حلقوی برش خورده، فرم خطی

و فرم سوپرکویل وکتور هستند.

شکل ۲- از سمت چپ؛ M: لدر ۱۰۰bp (سیناکلون،

ایران)، NC: کنترل منفی، ۱: باند ۸۷ bp ژن *Buforin*

II

تایید RNA استخراج شده و DNA سنتز شده از سلول MCF-7 ترانسفکت شده

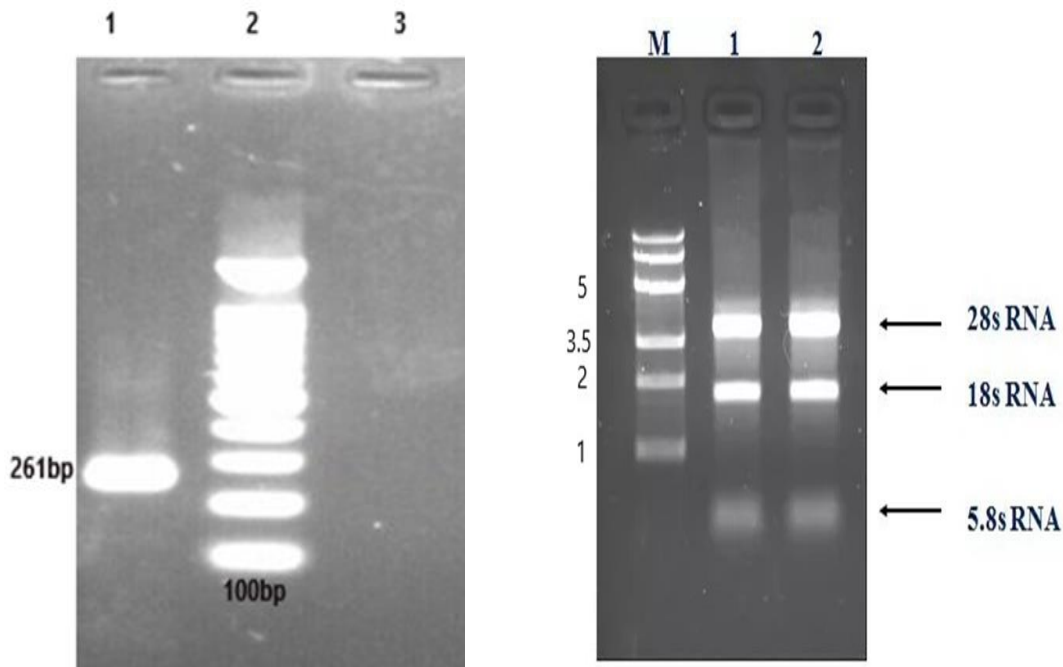
RNA استخراج شده از سلول MCF-7 ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب حاوی *Buforin II* و وکتور فاقد ژن هدف به منظور

بررسی کیفیت و مشاهده باندهای 18s و 28s الکتروفورز شد (شکل ۴). به منظور تعیین صحت cDNA سنتز شده از واکنش PCR

استفاده شد. برای انجام این واکنش از پرایمر رفرنس ژن خانه دار *GAPDH* استفاده شد. مشاهده باند مربوط به ژن رفرنس در

PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ به اندازه ۲۶۱bp به وسیله دستگاه ژل داک تأیید شد. هم چنین به منظور تأیید انجام واکنش و آلوده نبودن

مواد از نمونه کنترل منفی استفاده شد که به جای cDNA از آب استفاده شد (شکل ۵).

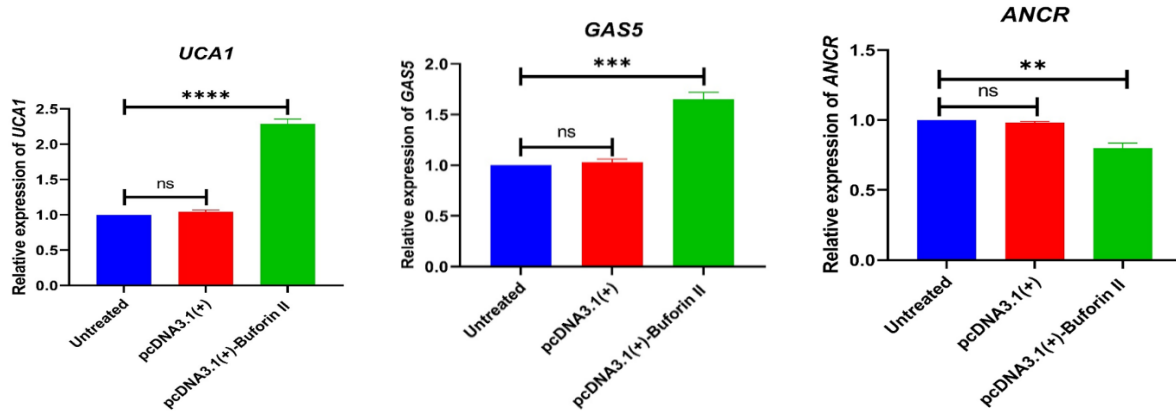


شکل ۵- تایید صحت cDNA به روش PCR. M: مارکر ۵۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران)، ۱: باند ۲۶۱ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن GAPDH، ۲: مربوط به کنترل منفی می باشد.

شکل ۴- حضور باندهای 28S و 18S ریبوزومی در RNA استخراج شده. M: مارکر ۱Kb (Geneaid Biotech Ltd، تایوان)، ۱: RNA استخراج شده از طحال موش ترانسفورم شده با پلاسמיד نوترکیب، ۲: RNA استخراج شده از طحال موش ترانسفورم شده با پلاسמיד فاقد ژن

### نتایج بررسی بیان ژن ها در سلول های رده ی MCF-7 سرطان پستان

مقایسه بررسی سطح بیان ژن های *GAS5*، *ANCR* و *UCA1* در سلول های رده ی MCF-7 سرطان پستان پس از نرمال سازی با ژن مرجع (*GAPDH*) با توجه به روش Livak صورت پذیرفت. طبق شکل ۶ نتایج حاکی از آن است که میزان سطح بیان ژن *ANCR* در رده سلول سرطانی MCF-7 تیمار شده با وکتور نوترکیب در مقایسه با سلول سرطانی دریافت کننده وکتور pcDNA3.1(+) فاقد ژن هدف و گروه شاهد از نظر آماری کاهش معنی دار یافته بود ( $p < 0.01$ ). همچنین نتایج نشان داد که سطح بیان ژن *GAS5* در رده سلول سرطانی MCF-7 تیمار شده با وکتور نوترکیب در مقایسه با رده سلول سرطانی دریافت کننده وکتور pcDNA3.1(+) فاقد ژن هدف و گروه شاهد از نظر آماری افزایش معنی دار یافته بود ( $p < 0.001$ ). همچنین نتایج نشان داد که سطح بیان ژن *UCA1* در رده سلول سرطانی MCF-7 تیمار شده با وکتور نوترکیب در مقایسه با رده سلول سرطانی دریافت کننده وکتور pcDNA3.1(+) فاقد ژن هدف و گروه شاهد از نظر آماری افزایش معنی دار یافته بود ( $p < 0.001$ ).



شکل ۶- سطح بیان *UCA1*، *GAS5* و *ANCR* در رده سلول MCF-7 سرطان پستان توسط real time RT-PCR تعیین شد. داده‌ها نشان

دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار است.  $p < 0.05$ ،  $p < 0.01$ ،  $p < 0.001$ ،  $p < 0.0001$  و  $p < 0.001$  \*\*\*\*

#### بحث

سرطان پستان بیش از یک میلیون مورد از ده میلیون نئوپلازی را که سالیانه در سراسر دنیا تشخیص داده می‌شود، به خود اختصاص می‌دهد. آمارهای جهانی نشان می‌دهد که شیوع سالانه سرطان پستان دارای روند رو به رشدی است. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان بین زنان است و دومین علت مرگ در زنان است. احتمال ابتلای زنان به سرطان مهاجم پستان در طول زندگی شان ۱ به ۸ (۱۳٪) است، در اصل یک هشتم زنان در طول عمر خود مبتلا به سرطان پستان می‌شوند. در نتیجه سالیانه در یک میلیون نفر از زنان در دنیا سرطان پستان تشخیص داده می‌شود. طبق بررسی‌های آماری، حدود نیمی از بیماران مبتلا به سرطان پستان بعد از درمان با آنتی تومورها دوباره با برگشت تومور مواجه می‌شوند. طبق بررسی‌های آماری، حدود نیمی از بیماران مبتلا به سرطان پستان بقیه عمر خود را بدون عود و متاستاز زندگی می‌کنند ولی یک سوم بیماران به علت بیماری فوت می‌کنند. در هر حال هیچ مقطع زمانی در دوران زندگی بیماران مبتلا به سرطان پستان وجود ندارد که بتوان بیمار را از آن تاریخ به بعد کاملاً به شفا اطمینان داد. بر اساس آخرین اطلاعات سرطان پستان، ۲۵٪ کل سرطان‌های زنان ایرانی را شامل می‌شود. هر ساله بیش از ۱ میلیون مورد جدید مبتلا به سرطان پستان در دنیا تشخیص داده می‌شود و ۵۰۲/۰۰۰ نفر بر اثر آن جان خود را از دست می‌دهند. میزان شیوع و مرگ و میر ناشی از آن در کشورهای آسیایی نسبت به کشورهای غربی کمتر می‌باشد. ولی سن ابتلا به آن در ایران و کشورهای آسیایی ۱۰ سال کمتر از دنیاست. الگوی سنی شیوع سرطان پستان در کشورهای آسیایی با کشورهای غربی تفاوت دارد، به طوری که بیشترین میزان شیوع در آسیا در ۴۵-۵۰ سالگی رخ می‌دهد در حالی که در کشورهای غربی اوج شیوع در سنین بالاتر می‌باشد (۱۱). Li و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند RNAهای طولانی غیر کد کننده (LncRNAs) به عنوان تنظیم کننده‌های حیاتی برای توسعه سرطان سینه شناخته شده‌اند و در کنترل اتوفازی نقش دارند. LncRNAها همچنین به عنوان عوامل پیش آگهی ارزشمند برای بیماران مبتلا به سرطان پستان هستند. شناسایی LncRNAهای مرتبط با اتوفازی با ارزش پیش آگهی در سرطان پستان بسیار مهم است (۱۲). Jin و همکاران (۲۰۲۱) طی مطالعه‌ای بیان کردند سرطان سینه یک تومور بدخیم است که میزان مرگ و میر بالایی دارد و بیشتر در زنان رخ می‌دهد. اگرچه پیشرفت قابل توجهی در اجرای استراتژی‌های درمانی شخصی برای زیرگروه‌های مولکولی در سرطان پستان حاصل شده است، اما پاسخ درمانی اغلب رضایت بخش نیست. مطالعات گزارش داده‌اند که RNAهای طولانی غیر کدکننده (LncRNAs) به طور غیر طبیعی در سرطان سینه بیان می‌شوند و ارتباط نزدیکی با بروز و توسعه سرطان پستان دارند. علاوه بر این، ویژگی بافت و نوع سلول، LncRNAها را به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی، عوامل پیش آگهی و اهداف درمانی خاص

جذاب می‌کند. بنابراین، درک عمیق مکانیسم‌های تنظیمی lncRNAها در سرطان سینه برای توسعه استراتژی‌های درمانی جدید ضروری است (۱۳).

در اصل تصور می‌شود که RNAهای طولانی غیرکدکننده (lncRNA) نويز رونوشت‌ها در ژنوم هستند و عملکرد بیولوژیکی ندارند. اخیراً، عملکرد lncRNAها شروع به جلب توجه گسترده کرده است (۱۴). مطالعات زیادی نشان داده است که lncRNAها با تنظیم رونویسی ژن و پردازش پس از رونویسی در جنبه‌های مختلف فرآیندهای فیزیولوژیکی سلولی، مانند تکثیر، تمایز، مهاجرت و آپوپتوز نقش دارند (۱۵ و ۱۶). علاوه بر این، lncRNAها ارتباط نزدیکی با وقوع، توسعه و پیش‌آگهی سرطان‌های مختلف مانند سرطان سینه، کبد، کولون و ریه و حتی سرطان خون دارند. با توجه به موقعیت ژنومی lncRNA، محلی سازی درون سلولی و عملکرد، آن‌ها را می‌توان به شش نوع تقسیم کرد. ۱. lncRNAهای تقویت کننده: از ناحیه تقویت کننده پروموتور مانند lncRNA-LEENE مشتق می‌شوند. ۲. lncRNAهای اینترون: از ناحیه اینترون ژن رونویسی می‌شوند. پروتئین کدکننده ژن به طور کامل حاوی lncRNA اینترون است که می‌تواند رونویسی را تثبیت کند یا پیوند جایگزین ژن کدکننده را تنظیم کند. ۳. lncRNA آنتی سنس: جهت رونویسی آن مخالف جهت رونویسی ژن کدکننده پروتئین مجاور است، مانند lncTALAM1. ۴. lncRNA سنس: جهت رونویسی آن با ژن کدکننده پروتئین مجاور مانند GAS5 و UCA1 یکسان است. ۵. lncRNA بین ژنی، که می‌تواند بین دو ژن کدکننده پروتئین رونویسی شود، یک RNA غیرکدکننده مستقل رونویسی شده است که با ژن کدکننده همپوشانی ندارد. مانند MALAT1 و ANCR. lncRNA دو طرفه: در نزدیکی رونوشت کدکننده رشته مقابل وجود دارد و می‌تواند به طور همزمان از جهات مشابه و مخالف ژن‌های کدکننده پروتئین مجاور مانند RNA غیرکدکننده بین ژنی بزرگ (linc) رونویسی کند (۱۷ و ۱۸). در مطالعه حاضر، اثر *Buforin II* روی بیان یک lncRNA بین ژنی بنام ANCR و دو lncRNA سنس بنام GAS5 و UCA1 بررسی شد.

### نتیجه‌گیری

آمارهای جهانی نشان می‌دهد که شیوع سالانه سرطان پستان دارای روند رو به رشدی است. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان بین زنان است و دومین علت مرگ در زنان است. احتمال ابتلای زنان به سرطان مهاجم پستان در طول زندگی‌شان ۱ به ۸ (۱۳٪) است، در اصل یک هشتم زنان در طول عمر خود مبتلا به سرطان پستان می‌شوند. در نتیجه سالیانه در یک میلیون نفر از زنان در دنیا سرطان پستان تشخیص داده می‌شود. بیش از ۴۰ درصد از مبتلایان به سرطان پستان بعد از درمان با آنتی تومورها دوباره با برگشت تومور مواجه می‌شوند. طبق بررسی‌های آماری، حدود نیمی از بیماران مبتلا به سرطان پستان بقیه عمر خود را بدون عود و متاستاز زندگی می‌کنند ولی یک سوم بیماران به علت بیماری فوت می‌کنند. در هر حال هیچ مقطع زمانی در دوران زندگی بیماران مبتلا به سرطان پستان وجود ندارد که بتوان بیمار را از آن تاریخ به بعد کاملاً به شفا اطمینان داد. بر اساس آخرین اطلاعات سرطان پستان، ۲۵٪ کل سرطان‌های زنان ایرانی را شامل می‌شود. هر ساله بیش از ۱ میلیون مورد جدید مبتلا به سرطان پستان در دنیا تشخیص داده می‌شود و ۵۰۲/۰۰۰ نفر بر اثر آن جان خود را از دست می‌دهند. میزان شیوع و مرگ و میر ناشی از آن در کشورهای آسیایی نسبت به کشورهای غربی کمتر می‌باشد. ولی سن ابتلا به آن در ایران و کشورهای آسیایی ۱۰ سال کمتر از دنیاست. الگوی سنی شیوع سرطان پستان در کشورهای آسیایی با کشورهای غربی تفاوت دارد، به طوری که بیشترین میزان شیوع در آسیا در ۴۵-۵۰ سالگی رخ می‌دهد در حالی که در کشورهای غربی اوج شیوع در سنین بالاتر می‌باشد. با توجه به تمام خصوصیات بوفورین II، در مطالعه حاضر، اثرات بوفورین II بر بیان ژن‌های GAS5، ANCR و UCA1 در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 ترانسفکت شده با pcDNA3.1(+)-*Buforin II* مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر موفق به ساخت وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-*Buforin II* القا کننده آپوپتوز علیه سرطان پستان شدید. اثرات درمانی این وکتور نوترکیب در برابر سرطان بالا است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که بوفورین II یک ترکیب طبیعی با پتانسیل بسیار زیاد برای کاربردهای پزشکی در آینده است.

### سیاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند. همچنین از همکاری صمیمانه همکاران مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد کمال امتنان داریم.

### References:

19. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. In Seminars in cancer biology 1999; 9(2): 125-138.
20. Chouaib S, Kieda C, Benlalam H, Noman MZ, Mami-Chouaib F, et al. Endothelial cells as key determinants of the tumor microenvironment: interaction with tumor cells, extracellular matrix and immune killer cells. Critical Reviews™ in Immunology. 2010; 30(6): 529-545.
21. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer. 2015; 136(5): e359-86.
22. Rock J, Jones H. Linde's Operative Gynecology. 10th ed. Lippincott Williams & Wilkins pub. p. 1057-8.
23. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2008; 1778(2): 357-75.
24. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. Front Microbiol. 2020; 11: 582779.
25. Xing YH, Yao RW, Zhang Y, Guo CJ, Jiang S, et al. SLERT regulates DDX21 rings associated with Pol I transcription. Cell. 2017; 4; 169(4): 664-78.
26. Ning L, Li Z, Wei D, Chen H, Yang C. LncRNA, NEAT1 is a prognosis biomarker and regulates cancer progression via epithelial-mesenchymal transition in clear cell renal cell carcinoma. Cancer Biomarkers. 2017; 1; 19(1): 75-83.
27. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973; 70(11): 3240-3244.
28. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J Mol Biol. 1970; 53(1): 159-162.
29. Ciampricotti M, Vrijland K, Hau CS, Pemovska T, Doornebal CW, et al. Development of metastatic HER2(+) breast cancer is independent of the adaptive immune system. J Pathol. 2011; 224(1): 56-66.
30. Li X, Jin F, Li Y. A novel autophagy-related lncRNA prognostic risk model for breast cancer. Journal of cellular and molecular medicine. 2021; 25(1): 4-14.
31. Jin H, Du W, Huang W, Yan J, Tang Q, et al. lncRNA and breast cancer: Progress from identifying mechanisms to challenges and opportunities of clinical treatment. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2021; 3; 25: 613-37.
32. Rion N, Rüegg MA. LncRNA-encoded peptides: more than translational noise?. Cell research. 2017; 27(5): 604-5.
33. Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. Cell. 2018 ; 25; 172(3): 393-407.



34. Pang B, Wang Q, Ning S, Wu J, Zhang X, et al. Landscape of tumor suppressor long noncoding RNAs in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019; 38: 1-8.
35. Zhang T, Hu H, Yan G, Wu T, Liu S, et al. Long non-coding RNA and breast cancer. *Technology in cancer research & treatment*. 2019; 18: 1533033819843889.
36. Kretz M, Webster DE, Flockhart RJ, Lee CS, Zehnder A, et al. Suppression of progenitor differentiation requires the long noncoding RNA ANCR. *Genes & development*. 2012; 26(4): 338-43.

## بررسی تولید آنزیم نو ترکیب *Taq DNA polymerase* در باکتری *E. coli*

مرادعلی اسدی زاده<sup>۱</sup>، امیرارسلان جعفری<sup>۲</sup>، فرشاد یداللهی<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. دکتری تخصصی ایمنولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

### چکیده

**مقدمه:** تکثیر DNA با استفاده از *Taq DNA polymerase* یکی از گسترده ترین تکنیک های مورد استفاده در زمینه فناوری DNA است. این آنزیم نقش بسیار مهمی در تکثیر ماده ژنتیکی موجودات زنده و ادامه حیات آنها دارد. هدف از این مطالعه طراحی و تولید قطعه کدکننده DNA پلیمراز Taq و بررسی بیان آن در باکتری *E. coli* است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، وکتور نو ترکیب pET-28a-TaQ طراحی و سنتز شد. سپس به روش CaCl<sub>2</sub> و شوک حرارتی وارد باکتری *شریشیا کلی* سویه Top10F شد و تخلیص گردید. در گام بعدی، واکنش ترانسفورماسیون وکتور نو ترکیب در باکتری *شریشیا کلی* سویه BL21(DE3) انجام شد. جهت القای بیان ژن نو ترکیب Taq از القاگر IPTG در زمان های مختلف استفاده گردید. برای تایید بیان در سطح RNA از تکنیک RT-PCR استفاده شد.

**یافته ها:** ترانسفورماسیون وکتور نو ترکیب در باکتری *E. coli* سویه TOP10F توسط واکنش PCR و هضم آنزیمی تایید شد. بیان موفقیت آمیز پروتئین Taq در باکتری BL21 توسط واکنش RT-PCR با رویت باند ۱۹۴ جفت بازی روی ژل آگارز، تأیید شد. **نتیجه گیری:** با توجه به بیان موفقیت آمیز قطعه Taq در باکتری *E. coli* سویه BL21، می توان این قطعه را در حجم بالا تولید کرد و به صورت تجاری در اختیار مصرف کننده قرار داد.

**کلمات کلیدی:** *شریشیا کلی*، DNA پلی مرز Taq، pET-28(+)

نشانی نویسنده مسئول: استان آذربایجان غربی، ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه. کد پستی: ۵۷۵۶۱۵۱۸۱۸

تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۵۲۷۴۱ همراه: ۰۹۱۳۲۸۲۸۴۷۳

ایمیل: yadollahi.farshad@gmail.com

## Investigating the production of recombinant Taq DNA polymerase enzyme in *E. coli* bacteria

Morad-Ali Asadizadeh<sup>1</sup>, Amir-Arsalan Jafari<sup>2</sup>, Farshad Yadollahi<sup>3\*</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

### Abstract

**Background:** DNA replication using Taq DNA polymerase is one of the most widely used techniques in the field of DNA technology. This enzyme plays a very important role in the reproduction of the genetic material of living organisms and their survival. The purpose of this study is to design and produce Taq DNA polymerase coding fragment and to investigate its expression in *E. coli* bacteria.

**Materials and methods:** In this experimental study, pET-28a-Taq recombinant vector was designed and synthesized. Then, by CaCl<sub>2</sub> method and heat shock, it entered *Escherichia coli* strain Top10F and was purified. In the next step, the transformation reaction of the recombinant vector was performed in *Escherichia coli* strain BL21(DE3). To induce the expression of Taq recombinant gene, IPTG inducer was used at different times. RT-PCR technique was used to confirm the expression at the RNA level.

**Results:** The transformation of the recombinant vector in *E. coli* strain TOP10F was confirmed by PCR reaction and enzymatic digestion. The successful expression of Taq protein in BL21 bacteria was confirmed by RT-PCR reaction with the visualization of 194 bp band on agarose gel.

**Conclusion:** Considering the successful expression of Taq fragment in *E. coli* strain BL21, this fragment can be produced in high volume and commercially available to consumers.

**Keywords:** *E. coli*, Taq polymerase, pET-28(+) vector.

### مقدمه

انتروباکتریاسه‌ها شایع‌ترین گروه باسیل‌های گرم منفی هستند که در آزمایشگاه‌های کلینیکی کشت داده می‌شوند. این باکتری‌ها گروه بزرگ و ناهمگونی هستند که محل زندگی طبیعی آن‌ها روده انسان و حیوانات است و قدرت بیماری‌زایی در انسان، حیوانات و گیاهان را دارند. مهم‌ترین جنس‌های این گروه اشیریشیا، شیگلا، سالمونلا، انتروباکتر، کلبسیلا، سراشیا، پروتئوس، اروینیا، سیتروباکتر، پروویدنسیا، مورگانلا و یرسینیا است که بر اساس طبقه‌بندی CDC در تیره‌های مختلف قرار می‌گیرند. بعضی از آن‌ها فرصت‌طلب هستند و بعضی مانند سالمونلا و شیگلا همیشه برای انسان بیماری‌زا هستند. این ارگانیزم‌ها بخش اصلی بی‌هوازی‌های اختیاری موجود در روده بزرگ را تشکیل می‌دهند. اگر چه در مقایسه با بی‌هوازی‌های اختیاری مانند باکترئیدها نسبت کمی را تشکیل می‌دهند، ولی آن‌ها در میان شایع‌ترین باکتری‌های ایجادکننده بیماری در کنار استافیلوکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها قرار دارند. اشیریشیا کلی یا به اختصار *E. coli*، نوعی باسیل گرم منفی بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل کلی‌فرم از سرده اشیریشیا و خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده جانوران خون‌گرم وجود دارد (۱). بیشتر سویه‌های اشیریشیا کلی، غیر بیماری‌زا هستند اما برخی از سروتیپ‌ها مانند O157:H7 موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شوند (۲). این سویه‌های غیر بیماری‌زا، بخشی از فلور طبیعی روده هستند. اشیریشیا کلی در سال ۱۸۸۵ توسط یک باکتری‌شناس آلمانی به نام «تئودور اشیریش» کشف شد. از آن زمان تاکنون، این باکتری، موضوع بحث پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه‌های ژنتیک، مهندسی ژنتیک و میکروبیولوژی بوده و امروزه به یکی از مهم‌ترین موجودات مدل در حوزه علوم زیستی تبدیل شده است (۳).

اشیریشیا کلی نخستین جاندار بود که با روش‌های مهندسی ژنتیک مورد دست‌ورزی ژن قرار گرفت. از این باکتری برای کلونینگ و بیان بسیاری از ژن‌ها و تولید محصولات نوترکیب استفاده شده است. به عنوان مثال، با استفاده از مهندسی ژنتیک، دانشمندان توانسته‌اند از اشیریشیا کلی، انسولین تولید کنند (۴). از *E. coli*‌های تغییر یافته برای تولید واکسن نیز استفاده شده است (۵). از

اشریشیا کلی به عنوان یک ارگانسیم مدل در پژوهش‌های ژنتیکی استفاده می‌شود. به عنوان مثال، اولین بار پدیده هم‌یوگی در آن دیده شد و هنوز هم در تحقیقات از آن استفاده می‌شود. برای بررسی اثرات فاژ بر باکتری‌ها، اولین بار از *E. coli* استفاده شد. از اشریشیا کلی سویه Nissle 1917 به عنوان پروبیوتیک در پزشکی برای درمان بیماری‌های روده‌ای مانند بیماری التهابی روده استفاده شده است (۶).

Taq، یک DNA پلیمرز مقاوم در برابر حرارت است. برای اولین بار از باکتری ساکن چشمه‌های آب گرم بنام *Thermus aquaticus* در سال ۱۹۷۶ جدا شد. چند سال بعد، این آنزیم به دلیل استفاده از آن در PCR معروف شد و در سال ۱۹۸۹ به عنوان مولکول سال انتخاب شد. این آنزیم در بسیاری از آزمایشگاه‌ها به عنوان عامل اصلی PCR باقی ماند. Taq یک پروتئین دو دومینی ۸۳۲ اسید آمینه را کد می‌کند (وزن مولکولی = ۹۳/۹ کیلو دالتون) که سه نوع فعالیت آنزیمی مختلف را نشان می‌دهد. ناحیه N ترمینال (اسید آمینه‌های ۱-۲۹۰) از نظر توالی و ساختار مشابه دامنه اگزونوکلئاز ۵' به ۳' اعضای خانواده پلیمرز I از DNA پلیمرزها (مثل DNA پلیمرز I/اشریشیا کلی و پلیمرزهای کدگذاری شده باکتریوفاژی مربوطه) است. چندین نمونه تجاری از Taq در دسترس هستند که فاقد فعالیت اگزونوکلئاز ۵' به ۳' هستند. این‌ها شامل قطعه Stoffel و جهش یافته در چندین سایت می‌باشد. به طور کلی، این آنزیم‌ها نسبت به Taq نوع وحشی کارایی کمتری دارند. دومین C ترمینال پلیمرز Taq (اسید آمینه‌های ۸۳۱-۴۲۴) بسیار شبیه به قطعه کلو DNA پلیمرز I اشریشیا کلی است (۷). واحدهای اسید آمینه حیاتی برای فعالیت کاتالیزوری در هر دو پلیمرز حفظ می‌شوند. Taq پلیمرز، مانند چندین DNA پلیمرز مقاوم در برابر حرارت، همچنین دارای فعالیت ترانسفراز مستقل اما کندی است که یک اسید آمینه بدون الگو به انتهای ۳' DNAهای تکثیر شده اضافه می‌کند. DNAهای خطی دو رشته‌ای، به استثنای آن‌هایی که انتهای ۳' بیرون زده دارند، می‌توانند توسط Taq به مولکول‌هایی با اورهنگ ۳'-A تبدیل شوند. وجود این اسید آمینه جفت نشده (A) کلون سازی قطعات DNA تکثیر شده را در وکتورهای دو رشته‌ای که یک اسید آمینه (T) جفت نشده را حمل می‌کنند، تسهیل می‌کند. در نهایت، انتهای کربوکسی ترمینال Taq (اسید آمینه‌های ۲۹۴-۴۲۲) حاوی یک اگزونوکلئاز ۳' به ۵' کاتالیزوری غیر فعال است. در نتیجه، این آنزیم، مانند DNA پلیمرزهای مقاوم در برابر حرارت، فاقد عملکرد تصحیح کننده است و میزان اتصال نادرست dNTPها به رشته الگو در آن بالا است. می‌توان انتظار داشت بیش از ۵۰ درصد از مولکول‌های DNA تولید شده پس از ۲۵ چرخه حامل جهش باشند. هنگامی که نیاز به تکثیر با صحت بالا است، بهتر است PCR را با مخلوطی تجاری از پلیمرزهای مقاوم در برابر حرارت کاتالیز کنید. به عنوان مثال، مخلوطی از DNA پلیمرز نو ترکیب Taq و پلیمرز *Pyrococcus GB-D* دارای توانایی تصحیح اشتباه است که دقت را تقریباً شش برابر افزایش می‌دهد. تصور می‌شود که پایداری حرارتی DNA پلیمرز Taq، ناشی از افزایش آبرگریزی هسته آنزیم، بهبود تثبیت نیروهای الکترواستاتیکی و افزایش تعامل با مولکول‌های حلال، به دلیل وجود اسید آمینه‌های پرولین اضافی در سطح آنزیم است. DNA پلیمرز مقاوم در برابر حرارت که در اصل توسط Chien جدا شد، کوچکتر از پروتئین کامل Taq بود، خواص کاتالیزوری کمی متفاوت داشت و به احتمال زیاد یک قطعه پروتئولیتیک فاقد بخشی از دومین N ترمینال بود، در *T. aquaticus*، Taq پلیمرز در سطوح پایینی (۰/۰۱ - ۰/۰۲٪ پروتئین سلولی) بیان می‌شود که تولید تجاری آن پیشنهاد مناسبی نیست. امروزه، آنزیم پلی‌مرز از نسخه‌هایی از ژن Taq تولید می‌شود که به گونه‌ای مهندسی شده‌اند که سطوح بالایی از بیان را در *E. coli* به دست می‌آورند. بیشتر این تغییرات شامل اصلاح توالی‌های DNA هستند که قبل و بلافاصله پس از کدون آغازگر ATG قرار می‌گیرند. از آنجا که کلون‌های مورد استفاده توسط تولیدکنندگان تجاری مختلف ممکن است به روش‌های مختلف مهندسی شده باشند و از آنجا که پروتکل‌های مورد استفاده برای خالص سازی آنزیم نیز ممکن است متفاوت باشند، پلیمرزهای به دست آمده از تولیدکنندگان مختلف لزوماً نتایج یکسانی را ارائه نمی‌دهند. در واقع، تغییراتی در بازده، طول و دقت محصول تکثیر شده توسط میکس‌های آماده تجاری مختلف Taq در PCRهای استاندارد گزارش شده است. با این حال، Taq پلیمرز اولیه، که تهیه آن ساده است، از کیفیت بالایی برخوردار است (۸).

واکنش زنجیره ای پلیمرز زیربنای تقریباً تمام همانندسازی‌های مولکولی مدرن است. با استفاده از PCR، یک توالی هدف تعریف شده که یک بار در یک DNA با پیچیدگی بالا و اندازه بزرگ رخ می‌دهد. برای مثال یک ژنوم کامل پستانداران می‌تواند به سرعت

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

و به طور انتخابی در یک واکنش زنجیره‌ای شبه نمایی که میلیون‌ها نسخه تولید می‌کند، تکثیر شود. راه‌اندازی واکنش ساده، ارزان و سریع است و تنها نیاز آن آگاهی از توالی‌های نوکلئوتیدی هدف است. PCR علاوه بر سادگی، قوی، سریع، انعطاف پذیر و حساس است. این فرایند از زمان توسعه اولیه خود در اوایل دهه ۱۹۸۰ (سایکی و همکاران در سال ۱۹۸۵، مولیس و فالونا در سال ۱۹۸۷ و مولیس در سال ۱۹۹۷)، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با طیف گسترده‌ای از وظایف در همانندسازی مولکولی، از جمله تعیین توالی DNA، جهش‌زایی آزمایشگاهی، تشخیص جهش، همانندسازی cDNA و DNA ژنومی معرفی شد. با چنین مجموعه گسترده‌ای از برنامه‌های کاربردی، جای تعجب نیست که مجلات و کتاب‌های کامل به این تکنیک اختصاص داده شده است. PCR از چرخه دما برای شروع و پایان دادن به سنتز DNA کاتالیز شده با آنزیم استفاده می‌کند، هر چرخه شامل سه مرحله است: دناتوره شدن، اتصال دو پرایمر و گسترش می‌باشد (۹).

پروموتور کمابیش در ۱۰ تا ۱۰۰ جفت باز بالادست مکان اتصال ریبوزوم حضور دارد که به وسیله یک ژن تنظیم کننده کنترل می‌شود. پروموتورهای هگز نوکلئوتیدی/اشریشیا کلی در محل ۳۵ جفت باز (ناحیه -۳۵) و ۶ جفت باز (ناحیه -۱۰) بالادست نقطه آغاز رونویسی حضور دارند. علاوه بر این پروموتورهای مشتق شده از باکتری گرم مثبت و باکتریوفاژها نیز در اشریشیا قرار دارند. حداقل نیاز یک ناقل بیانی کارآمد حضور توالی پروموتوری قوی با میل اتصال بالا به RNA پلیمرز که منتج به افزایش رونویسی ژن مطلوب گردد، است. ویژگی‌های یک پروموتور کارآمد عبارتند از (۱) قوی باشد تا بیان پروتئین مطلوب را افزایش دهد. (۲) بیان نشتی پایین و قابلیت تنظیمی بالایی داشته باشد که بیان پروتئین تحت کنترل قرار گیرد. (۳) در میزبان‌های مختلف فعال باشد (۴) القای آن ساده و مقرون به صرفه باشد (۱۰).

هدف از انجام این پژوهش بیان DNA پلی‌مراز Taq در باکتری *E. coli* با کلون کردن قطعه کدکننده این آنزیم در باکتری و ایجاد مقدمات این عملیات در آزمایشگاه می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

**مواد، باکتری، سلول و کیت‌ها:** در این مطالعه، پلاسمید نوترکیب pET-28a-Taq از شرکت Generay Biotech Co. Ltd چین سفارش داده شد و تهیه گردیدند. توالی قطعه Taq (با طول ۷۸۰۵ جفت باز) در ناحیه Sall / NcoI کلون شد و برای بیان بهتر در میزبان یوکاریوتی توسط این شرکت بهینه سازی کدون صورت پذیرفت. صحت سنتز ژن هدف با هضم آنزیمی توسط شرکت سازنده تایید گردید. همچنین از باکتری *E. coli* سویه TOP10 برای تکثیر پلاسمیدهای نامبرده و سویه BL21 (DE3) برای بیان آنزیم Taq بهره گرفته شد. شایان ذکر است که کیت استخراج پلاسمید (یکتا تجهیز آزما، ایران) برای تخلیص پلاسمید از باکتری *E. coli* به کار برده شد. برای انجام واکنش PCR از مواد و واکنش‌گرهای شرکت یکتا تجهیز آزما بهره گرفته شد.

**تهیه سلول مستعد:** باکتری *E. coli* سویه TOP10 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری و در محیط کشت Luria-Bertani (LB) (مرک، آلمان) کشت داده شد و سپس به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) انکوبه گردید. پلاسمید نوترکیب نامبرده با استفاده از روش کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) و شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار، حاوی کانامایسین (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) رشد کردند و انتخاب شدند. صحت انجام ترانسفورماسیون با استفاده از روش PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی تأیید شد. کلنی‌های ترانسفورم شده در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB Broth حاوی کانامایسین در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند. DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید یکتا تجهیز آزما طبق دستورالعمل کیت، خالص سازی شد. کیفیت پلاسمید استخراج شده توسط نانودراپ (ترموساینٹیفیک ۲۰۰۰، آمریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. در گام بعدی، پلاسمید استخراج شده به روش ذکر شده در قسمت قبل، وارد باکتری *E. coli* سویه BL21 شد. مراحل ترانسفورماسیون و تأیید آن، طبق روش گفته شده انجام شد.

**القای بیان پروتئین:** جهت القای بیان پروتئین نو ترکیب Taq در باکتری E.coli سویه BL21 از القاگر IPTG به غلظت ۱ میلی مولار استفاده شد. بدین منظور از کلون‌های نو ترکیب تازه رشد یافته بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین یک کلون انتخاب شده و در ۲۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کشت شبانه (۱۶ ساعت) درون انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۹۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از رسیدن به مقدار غلظت بهینه، مقدار ۵ میلی لیتر از محیط کشت را به عنوان شاهد (بدون القاگر) برداشته و الباقی محیط کشت را درون ۵ فالكون استریل محلول القاگر IPTG اضافه شد. سپس تمامی فالكون‌ها به انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در بازه زمانی ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ساعت منتقل گردید.

**استخراج RNA:** نمونه‌های رسوب باکتری به میکروتیوب RNase free و DNase free منتقل شده و مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر وایتیزول (یکتا تجهیز آزما، ایران) سرد به محتویات اضافه شد. سپس به شدت تکان داده شد تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند و یک محلول همگن به دست آید. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم برای جداسازی فازها به میکروتیوب حاوی وایتیزول اضافه و چند بار اینورت انجام شد. میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ کردن ۳ فاز تشکیل شد. لایه زیرین حاوی رسوب لاشه و اجزای سلول و لایه میانی حاوی رسوب سفید رنگ حاوی پروتئین‌های سلولی و فاز آبی رویی حاوی RNA می‌باشد. به آرامی و با دقت فاز رویی حاوی RNA را بدون برخورد به لایه زیرین توسط سر سمپلرهای RNase و DNase free به مقدار ۴۰۰ میکرولیتر برداشته و به یک میکروتیوب جدید ۱/۵ RNase, DNase free منتقل و سپس به همان مقدار (۴۰۰ میکرولیتر) ایزوپروپانول سرد به میکروتیوب افزوده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- انکوبه شد. برای به دست آوردن رسوب در این مرحله به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ انجام شد. فاز رویی به‌طور کامل توسط سر سمپلرهای RNase, DNase free تخلیه گردید تا فقط رسوب RNA در ته میکروتیوب باقی بماند. سپس به رسوب RNA، میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد برای شستشو اضافه گردید. مجدداً سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از سانتریفیوژ الکل به طور کامل خارج گردید. در مرحله بعد میکروتیوب بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت تا رسوب RNA کاملاً خشک گردد. بر اساس حجم کلاف به دست آمده در انتها به مقدار ۳۰-۵۰ میکرولیتر DEPC water اضافه گردید و پیپتینگ انجام گرفت تا رسوب RNA کاملاً حل شد. میکروتیوب حاوی RNA بلافاصله به فریزر ۷۰- منتقل گردید و تا زمان ساخت cDNA ذخیره شد.

**سنتز cDNA:** برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. سنتز cDNA طبق پروتکل این کیت صورت گرفت.

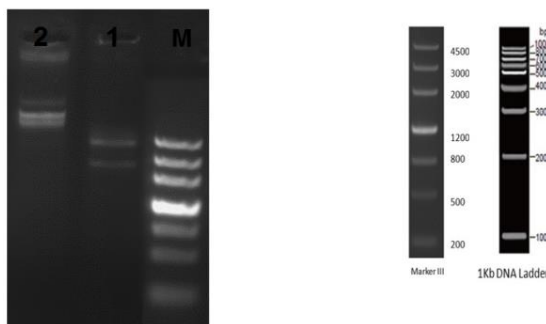
**PCR:** واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرو مول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرو مول Taq DNA Polymerase، ۱/۵ میکرومول Mgcl2 50mM، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) و ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول نهایی PCR در ژل آگارز یک درصد واجد اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شد و با اشعه ماورابنفش مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR ژن مورد نظر با استفاده از کیت خالص سازی (Bioneer، کره جنوبی) مطابق دستورالعمل شرکت، از ژل آگارز خالص سازی شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

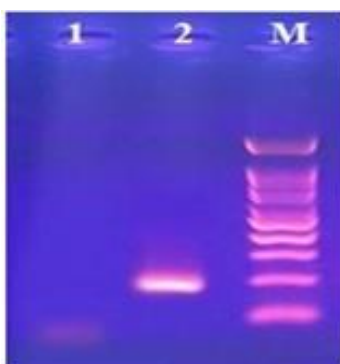
پرایمرها	توالی (5' to 3')	دمای اتصال پرایمر	اندازه محصول
Taq-F	ATGCTGCCCTCTTTGAGC	----	----
Taq-R1	TGGCGTCAAAGACCACGATC	۶۲°C	۱۹۶bp
Taq-R2	CTCCTTGGCGGAGAGACAG	۶۰°C	۲۴۸۷bp

یافته ها:

تأیید صحت ترانسفورماسیون: صحت سنتز پلاسمیدها توسط شرکت سازنده با استفاده از توالی یابی DNA و هضم آنزیمی تأیید شد (شکل ۱). پس از انتقال پلاسمید نوترکیب به *E. coli*، صحت ورود پلاسمید توسط کشت کلنی‌ها بر روی کانامایسین در مرحله نخست و سپس انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی قطعه Taq تأیید شد. حضور باند ۱۹۶ جفت بازی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F و R1 قطعه Taq مؤید صحت انتقال پلاسمید بود (شکل ۲).

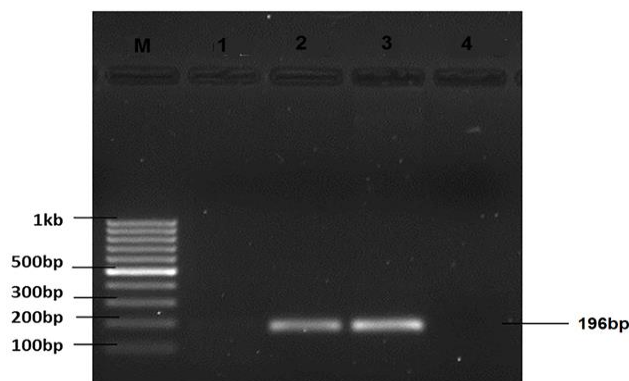


شکل ۱- نتیجه هضم آنزیمی بر روی وکتور نوترکیب M.pET-28a-Taq: مارکر DNA یک کیلو جفت بازی و مارکر III (Thermo Fisher Scientific، آمریکا)، شماره ۱: هضم آنزیمی دوگانه که باند ۲۵۵۹bp زن را نشان می‌دهد. ۲: باندها به ترتیب از بالا به پایین Nicked circular form، Linear form و Circular supercoiled form مربوط به وکتور



شکل ۲- واکنش PCR بر روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده. شماره ۱: وکتور خالی با پرایمرهای قطعه Taq، شماره ۲: باند ۱۹۶ جفت بازی مربوط به قسمتی از قطعه Taq بر روی وکتور pET-28a-Taq

**نتایج RT-PCR بر روی باکتری BL21:** پس از استخراج RNA از باکتری‌های BL21 ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pET-28a-Taq و باکتری‌های نرمال BL21 (غیر ترانسفورم)، سنتز cDNA برای آزمایش‌های مولکولی صورت پذیرفت. با کمک واکنش RT-PCR، بیان موفقیت آمیز ژن هدف Taq در سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب مشاهده شد. محصولات تکثیر یافته پس از جداسازی بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان دهنده قطعه‌ای به اندازه ۱۹۶ جفت بازی برای ژن Taq بود. نتایج RT-PCR صحت و دقت ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب و بیان ژن هدف در سلول‌های ترانسفورم شده را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- محصولات RT-PCR تکثیر یافته در سلول‌های BL21 ترانسفورم شده با وکتور Taq-pET-28a و القا شده با IPTG (غلظت ۰/۱ مولار) در زمان‌های مختلف و سلول‌های غیر ترانسفورم (سلول‌های کنترل) به منظور ارزیابی بیان ژن Taq بر روی ژل آگارز ۱ درصد (M: نشانگر مولکولی DNA 100 جفت بازی)، شماره ۱: قطعه تکثیر یافته مربوط به ژن Taq با طول ۱۹۶ جفت باز در سلول‌های BL21 ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب و القا شده با IPTG به مدت ۶ ساعت، شماره ۲: قطعه تکثیر یافته مربوط به ژن Taq با طول ۱۹۶ جفت باز در سلول‌های BL21 ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب و القا شده با IPTG به مدت ۱۲ ساعت، شماره ۳: قطعه تکثیر یافته مربوط به ژن Taq با طول ۱۹۶ جفت باز در سلول‌های BL21 ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب و القا شده با IPTG به مدت ۱۸ ساعت، شماره ۴: عدم حضور ژن Taq در سلول‌های BL21 القا نشده (کنترل منفی).

### بحث

از مهم‌ترین دستاوردهای بیوتکنولوژی در صنعت غذا، توسعه سویه‌های میکروبی جدید و استفاده از تکنیک (rdna) به منظور تولید آنزیم‌های صنعتی می‌باشد. امروزه از بین ۴۰۰۰ آنزیم شناخته شده در حدود ۲۰۰ نوع آن در صنایع مختلف کاربرد دارند که اکثراً از منابع میکروبی به وسیله فرمانتاسیون مواد با پایه زیستی حاصل شده‌اند. آنزیم‌های هیدرولیتیکی مانند پروتئازها، آمیلازها، امیلازها، استرازها و لیپازها بخش عمده‌ای از داد و ستد آنزیم‌های صنعتی (حداقل ۷۵٪) را در بر می‌گیرند. از مهم‌ترین محاسن آنزیم‌های نوترکیب، افزایش راندمان تولید آنزیم، تنوع آنزیم‌های تولید شده، بهبود خصوصیات آنزیم نظیر افزایش مقاومت حرارتی و تولید آنزیم‌های با خلوص بالاتر نسبت به روش‌های شیمیایی می‌باشد. آنزیم‌های صنعتی بعد از تکمیل فرایند ایزولاسیون، بازیافت و خالص سازی معمولاً همراه با رقیق کننده مناسب، نگهدارنده و پایدار کننده به بازار عرضه می‌گردد. البته تولید آنزیم صنعتی با خلوص ۱۰۰٪ بسیار پرهزینه بوده و جزء مراحل حساس و پیچیده فرایند تخمیر صنعتی محسوب می‌گردد. در بیشتر موارد آنزیم‌های صنعتی همراه با ناخالصی‌های ناچیز از جمله متابولیت‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم، بقایای مواد خام مصرفی در محیط تخمیر فرمانتور می‌باشد. با توجه به اهمیت آنزیم‌ها در صنعت و تشخیص بیماری‌ها (۱۱). پژوهش حاضر به منظور تهیه و تولید آنزیم نوترکیب Tag پلی‌مراز انجام گرفت. برای تولید این آنزیم ابتدا ساخت سازواره نوترکیب pET-28a-Taq انجام گرفت. به منظور



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

تکثیر و خالص سازی این سازواره نو ترکیب از *E. coli* TOP10F و برای بیان از *E. coli* BL21(DE3) به عنوان میزبان کلونینگ استفاده شد. در نهایت پس از القای پروموتور توسط IPTG، صحت بیان ژن کدکننده آنزیم Tag در سطح RNA و پروتئین به ترتیب توسط تکنیک‌های RT-PCR و SDS-PAGE سنجیده شد. نتایج RT-PCR نشان دهنده بیان موفقیت آمیز ژن Tag در سلول‌های BL21 ترانسفورم شده بود. مشاهده باند مربوط به بیان پروتئین Tag در باکتری ترانسفورم شده در مقایسه با باکتری ترانسفورم نشده و باکتری دریافت کننده وکتور فاقد ژن هدف بر روی ژل SDS-PAGE نشان دهنده بیان موفقیت آمیز این پروتئین بود. از کلون سازی ژن گرفته تا خالص سازی پروتئین، ابزارهای سلولی و مولکولی مورد نیاز در تمام مراحل به طور گسترده در دسترس هستند و جایگزین‌های زیادی نیز برای آن‌ها وجود دارد. با این حال، به دلیل سمیت پروتئین برای میزبان یا تجمع در اجسام آنکلوژن، شکست در به دست آوردن یک پروتئین نو ترکیب کاربردی غیر معمول نیست. به همین دلیل است که علاقه مداوم به رویکردهای جدیدی وجود دارد که تولید پروتئین نو ترکیب را در *E. coli* بهینه می‌کند.

تحقیقات ارائه شده در زیر نیز در راستای این مطالعه بوده و نتیجه‌ای مشابه کار ما دارند:

در مطالعه لوزانو و همکاران، بیان پروتئین فلورسنت زرد نو ترکیب (YFP) در *E. coli* BL21 (DE3) با استفاده از سیستم‌های بیان مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. بنابراین، PTac، P<sub>trc</sub>، PT7lac و PBAD به عنوان پروموتور برای کنترل بیان YFP انتخاب شدند. تفاوت بین این پروموتورها در بسیاری از کارها مورد مطالعه قرار گرفته است. در کار حاضر، پروموتورهای منتخب در یک وکتور از نوع pET با دو مبدا تکرار متفاوت (تعداد کپی زیاد و کم) کلون شدند. القایی با دو منبع کربن مختلف مورد مطالعه قرار گرفت: گلوکز و گلیسرول. علاوه بر این، سیستم بیان پروتئین در سویه *E. coli* BL21 مورد آزمایش قرار گرفت که تولید پروتئین نو ترکیب بالاتری را نسبت به سویه‌های دیگر نشان می‌دهد که دلیل آن تولید کم استات و در نتیجه کاهش دفع آن به محیط خارج سلولی است (۱۲). در این مطالعه از پروموتور PT7lac برای تولید آنزیم Tag استفاده شد.

میشرا و همکاران در سال ۲۰۱۸ به مطالعه بر روی بیان و خالص سازی آنزیم DNA پلیمراز Taq عاری از DNase و DNA پرداختند. ابتدا کلون DNA پلیمراز Taq نو ترکیب توسط PCR و تعیین توالی DNA و سپس آنالیز BLAST تأیید شد. سپس پروتئین نو ترکیب به شکل محلول و در سویه *E. coli* DH5α بیان شد. آنزیم با استفاده از روش جوش-لیز استخراج و پس از آن با کروماتوگرافی تبادل یونی و کروماتوگرافی به وسیله ستون سیلیس خالص سازی گردید تا آلودگی به پروتئین، DNase و DNA حذف شود. در پایان بازده تولید محاسبه گردید. نتایج نشان داد DNA پلیمراز Taq با کیفیت بالا با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی تبادل یونی و ستون سیلیس خالص گردیده است. بازدهی واکنش حدود ۴۵-۵۰ میلی گرم در لیتر و فعالیت U/μL ۱/۵ به دست آمد (۱۳).

### نتیجه گیری

طراحی و سنتز وکتور نو ترکیب در مطالعه حاضر و نوع پروموتور و القاکننده که سبب ساخت آنزیم Taq شده است، به طور موفقیت آمیز تأیید شد و امید است در آینده با انجام مطالعات تکمیلی بر روی این وکتور نو ترکیب، آنزیم Taq به صورت تجاری تولید شود و در اختیار مصرف کننده قرار گیرد.

### References:

1. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, et al. The population genetics of commensal Escherichia coli. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(3): 207-217.
2. Singleton P. Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. 5th ed: Wiley. 1999. pp. 444-54.
3. Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?. Clin Infect Dis. 2007; 45(8): 1025-1029.
4. Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harb Protoc. 2019; 2019(6): 10.1101

5. Harris S, Jones DB. Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci.* 1997; 54(3): 166-173
6. LEDERBERG J, TATUM EL. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature.* 1946; 158(4016): 558.
7. Merkens LS, Bryan SK, Moses RE. Inactivation of the 5'-3' exonuclease of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1264(2): 243-248.
8. Desai UJ, Pfaffle PK. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechniques.* 1995; 19(5): 780-784
9. Chehelgerdi M, Doosti A. Effect of the *cagW*-based gene vaccine on the immunologic properties of BALB/c mouse: an efficient candidate for *Helicobacter pylori* DNA vaccine. *Journal of Nanobiotechnology.* 2020; 18(1): 1-16.
10. Khamesipour F, Doosti A, Taheri H. Molecular Detection of *Brucella* spp. in the Semen, Testis and Blood Samples of Cattle and Sheep. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* 2013; 7: 495-500.
11. Doosti A, Pourabbas M, Arshi A, Chehelgerdi M, Kabiri H. TEM and SHV Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Cockroaches and Their Antimicrobial Resistance Pattern. *Osong Public Health and Research Perspectives.* 2015; 6(1): 3-8.
12. Lozano Terol G, Gallego-Jara J, Sola Martínez RA, Cánovas Díaz M, de Diego Puente T. Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains. *Microb Cell Fact.* 2019; 18(1): 151.
13. Mishra MN, Mohanraj J, Nisshanthini S D, Bhat S. High-level expression and purification of DNA and DNase free *taq* DNA polymerase. *Asian Journal of Research in Biochemistry.* 2018; 1-10.

## بررسی بیان میکرو RNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی و مقاومت دارویی چندگانه در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد

عاطفه زمانی<sup>۱</sup>، مسعود هوشمند<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران.

### چکیده

لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) یکی از شایع‌ترین سرطان‌های خونی در کودکان است و تقریباً ۲۵ درصد از تمام سرطان‌های کودکان را شامل می‌شود. با وجود پیشرفت‌های چشم‌گیر در درمان ALL، جمعیت کوچکی از بیماران هنوز به درمان‌های شیمی درمانی پاسخ نمی‌دهند که تعداد مرگ و میر در کودکان را افزایش می‌دهد. حمل‌کننده‌های ABC یکی از عوامل اصلی مقاومت چنددارویی (MDR) در سرطان‌ها هستند و ABCA3 به طور مستقیم با افزایش مقاومت شیمی درمانی در ALL کودکان مرتبط است. در اینجا، هدف ما شناسایی میکرو RNAها (miRNAs) بود که ممکن است بر روی بیان ABCA3 در لوسمی لنفوبلاستی حاد کودکان تأثیر بگذارند. نمونه‌های مغز استخوان از مجموعاً ۵۹ مورد ALL و ۵۰ مورد کنترل جمع‌آوری شدند و پس از جستجو و بررسی داده‌های بیوانفورماتیکی، miR-324-3p و miR-508-5p از فهرستی از miRNAهای احتمالی که به ABCA3 هدف می‌گیرند، انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل qPCR نشان داد که میزان بیان میکرو RNAهای انتخاب شده در بیماران کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد نسبت به کنترل‌های غیرسرطانی کمتر است. علاوه بر این، ما مشاهده کردیم که هر دو miR-324-3p و miR-508-5p به طور معنی‌داری در بین بیماران با MRD مثبت و منفی (MRD+ vs MRD-) پس از یک سال شیمی درمانی متفاوت بودند در حالی که تنها بیان miR-508-5p در بیماران با ALL کاهش یافته بود. علاوه بر این، یک ارتباط منفی بین بیان این دو miRNA و ABCA3 شناسایی شد که حمایت می‌کند از اثرات تنظیمی آنها بر مقاومت دارویی از طریق تعامل با ABCA3. همچنین، ما miR-508-5p و miR-324-3p را به عنوان شاخص‌های تشخیصی و مقاومت دارویی پتانسیلی در لوسمی لنفوبلاستی حاد کودکان پیشنهاد دادیم. علاوه بر این، یافته‌های ما نشان داد که miR-508-5p به عنوان یک نشانگر موثر در عود لوسمی لنفوبلاستی حاد کودکان عمل می‌کند که می‌تواند در توسعه استراتژی‌های درمانی نوآورانه مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** لوسمی لنفوبلاستیک کودکان، پمپ غشایی ABCA3، مقاومت دارویی چندگانه، miR-508-324-3p، miR-508-5p

نشانی نویسنده مسئول: اتوبان تهران - کرج، کیلومتر ۱۵، شهرک علم و فناوری پژوهش، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، کد پستی ۱۴۹۷۷۱۶۳۱۶

تلفن: ۴۴۷۸۷۳۰۱ پست الکترونیک: housh62@yahoo.com

## miR-324-3p and miR-508-5p expression levels could serve as potential diagnostic and multidrug-resistant biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia

Atefeh Zamani<sup>1</sup>, Massoud Houshmand<sup>2\*</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Medical Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

### Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most frequent hematological malignancies in children, representing approximately 25% of all pediatric cancers. Despite striking advances in ALL treatments, a small population of patients does not still respond to chemotherapy, raising the number of deaths in children. ABC transporters are one of the major causes of multidrug resistance (MDR) in cancers and overexpression of *ABCA3* is directly associated with increased chemo-resistance in pediatric ALL. Here, we aimed to identify the microRNAs (miRNAs) which may regulate the expression of *ABCA3* in childhood ALL. Bone marrow samples from a total of 50 ALLs and 59 controls were collected and after *in silico* and literature search, miR-324-3p and miR-508-5p were nominated from a list of putative miRNAs targeting *ABCA3*. Our qPCR analysis showed a low expression profile of selected miRNAs in pediatric ALL patients compared with non-cancer controls. Furthermore, we found that both miR-324-3p and miR-508-5p were significantly differentially expressed between patients with positive and negative minimal residual disease (MRD+ vs MRD-) after one year of chemotherapy while only miR-508-5p was underexpressed in relapsed ALL patients. Additionally, a negative correlation was identified between the expression of these two miRNAs and *ABCA3*, supporting the regulatory effect of them on drug resistance through interacting with *ABCA3*. Overall, we suggested miR-324-3p and miR-508-5p as potential diagnostic and drug-resistant biomarkers in pediatric ALL. Moreover, our findings presented miR-508-5p to behave as a promising relapsed indicator in childhood ALL which can be applied in the development of novel therapeutic strategies.

**Keywords:** Childhood acute lymphoblastic leukemia; *ABCA3* transporter; Multidrug resistance; miR-324-3p; miR-508-5p.

### مقدمه

لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) شایع‌ترین بیماری بدخیم کودکان است که حدود یک چهارم تمام سرطان‌های تشخیص داده شده در کودکان زیر ۱۵ سال را شامل می‌شود و ۷۸-۷۲ درصد موارد لوسمی کودکان را تشکیل می‌دهد (۲۰۱). ALL بیماری هتروژن است که عوامل و پیش‌زمینه‌های مختلف و اشکالات مولکولی باعث افزایش نابه‌جا و تغییرات غیرطبیعی سلول‌های پیش‌گام لنفوئیدی می‌شوند (۴ و ۳) و با نتایج بالینی مشخصی همراه است. اگرچه داروهای حاضر ضدلوسمی بهبود نرخ بقا کلی در لوسمی لنفوبلاستی حاد کودکان را به بیش از ۹۰ درصد ارتقا داده‌اند (۵ و ۶)، عود لوسمی همچنان علت اصلی مرگ و میر سرطان کودکان است (۴ و ۷). به طور کلی، مقاومت چنددارویی (MDR) منجر به بقا سلول‌های سرطانی در برابر داروهای مختلف ضدسرطان می‌شود (۸) و ویژگی کلیدی بیماران با عود لوسمی است (۹ و ۱۰). یکی از مهمترین علل مقاومت دارویی چندگانه افزایش پمپ‌های غشایی مانند پمپ‌های وابسته به ATP (پمپ‌های ABC) است (۱۱ و ۱۲). بررسی مکانیسم‌های تنظیمی اساسی بر بیان پمپ ABC می‌تواند درک ما از عود و ایجاد MDR را بهبود ببخشد و دیدگاه‌های جدیدی را در طراحی درمان‌های ALL فراهم کند. میکروRNAها (miRNAs)، RNAهای کوچک غیر کد کننده هستند که می‌توانند از طریق تنظیم ژن‌های هدف خود در یک مجموعه فرایندهای زیستی مشارکت کنند (۱۳). اخیراً، تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که miRNAs در بیان غیرطبیعی ژن‌های مرتبط با مقاومت دارویی نقش دارند (۱۴ و ۱۷). بنابراین، هدفگذاری این miRNAs می‌تواند به عنوان یک رویکرد درمانی برای غلبه بر مقاومت دارویی و در نتیجه افزایش واکنش‌پذیری به داروهای ضدسرطان مورد استفاده قرار گیرد. Aberuyi و همکاران (۱۷ و ۲۰) پیش‌تر *ABCA3* را عضوی از خانواده حمل‌کننده‌های ABC، به عنوان یک نشانگر قوی برای MDR در ALL کودکان نشان داده‌اند (۱۸). در این مطالعه ما به دنبال فهرستی از miRNAsهای تنظیم‌کننده *ABCA3* با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های بیوانفورماتیکی بودیم و در میان آن‌ها

دو miRNA (miR-508-5p و miR-324-3p) انتخاب شدند. miR-508-5p یک miRNA سرکوب کننده تومور است که با انواع مختلف سرطان‌ها مانند گلیوما (۱۹)، کارسینومای سلول‌های هپاتوسلولار (۲۰) و سرطان معده (۲۱) مرتبط است. علاوه بر این، می‌تواند از طریق هدفگیری از ABCB1 و ZNRD1، مقاومت دارویی در سرطان معده را تسهیل کند (۲۲). miR-324-3p نیز به عنوان یک نشانگر پیش‌بینی برای کارسینومای سلول‌های کبدی گزارش شده است (۲۳) و یک سرکوب کننده تومور در کارسینومای حلق (nasopharyngeal) (۲۴). علاوه بر این، مطالعه اخیر نقش مهمی برای ارتباط SLC25A21-AS1/miR-324-3p/IL-6 در MDR در کارسینومای حلق نشان داده است (۲۵). به دلیل اثر مهم miR-508-5p و miR-324-3p در سرطان و مقاومت دارویی و تعامل پیش‌بینی شده آن‌ها با ABCA3، هدف اصلی این مطالعه ارزیابی سطوح بیانی این دو miRNA در بیماران ALL کودکان است و بنابراین، بررسی ارتباط آن‌ها با پمپ غشایی ABCA3 می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌های بیمار و کنترل

تمام کودکانی که از سال ۲۰۱۵ تا ۲۰۱۶ به بیمارستان سیدالشهدا (اصفهان، ایران) جهت ارزیابی مغز استخوان ارجاع شدند، برای مطالعه حاضر انتخاب شدند. لوسمی لنفوبلاستی حاد برای مجموع ۵۹ بیمار با روش‌های بالینی و پاتولوژی تشخیص داده شد. علاوه بر این افرادی که این نوع از سرطان را نداشتند به عنوان کنترل‌ها (۵۰ نفر کنترل بیماری) در نظر گرفته شدند. وضعیت پاسخ به درمان با استفاده از حضور حداقل باقیمانده بیماری (MRD) پس از یک سال درمان در بیماران ALL ارزیابی شد. به این منظور، با استفاده از تکنیک PCR-SSCP، ژن IGH یا TCγR مورد ارزیابی قرار گرفت. MRD+ به معنای بیماران ALL با حضور باند ژن IGH یا TCγR است که مقاومت در برابر دارو را نشان می‌دهند در حالی که بیماران MRD- بعد از یک سال شیمی‌درمانی حساس به دارو هستند. پس از تشخیص، ۲-۵ میلی‌لیتر نمونه مغز استخوان همراه با هیپارین از تمام بیماران بدست آمد و سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از سانترفیوژ در شیب چگالی Lymphoprep (Axis-Shield، نروژ) طبق پروتوکول سازنده جدا شدند. با توجه به یافته‌های قبلی که نقش مثبت ABCA3 در MDR در ALL کودکان را نشان داده بود (۱۸)، فهرستی از miRNAهای پتانسیل برای هدفگیری پمپ ABCA3 بررسی شد. به این منظور، دو نرم‌افزار آنلاین شامل TargetScan7.1 ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)) و (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>) miRWalk 2.0 برای پیش‌بینی miRNAها استفاده شدند. همچنین می‌تواند تحلیل مقایسه‌ای جامعی را از طریق ترکیب اطلاعات پیش‌بینی هدفگیری miRNA از چندین برنامه موجود انجام دهد که شامل miRWalk، DIANA-microTv4.0، miRanda-rel2010، miRBridge، miRDB4.0، miRmap، RNAhybrid2.1، PITA، PicTar2 و غیره است. هر یک از این الگوریتم‌ها با پارامترهای خاصی مانند انرژی آزاد اتصال و دسترسی به مکان هدف برای پیش‌بینی خود اقدام می‌کنند (۲۶ و ۲۷)، با استفاده از تحلیل مقایسه‌ای از الگوریتم‌های مختلف تعامل miRNA هدف، بهترین miRNAهای پتانسیلی که توسط حداقل ۷ ابزار پیش‌بینی شده‌اند، برای بررسی الگوی بیان و درگیری در سرطان انتخاب شدند.

#### استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کلی از سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از تریزول (TRIzol) (Invitrogen، آلمان) استخراج شد و کیفیت و مقدار آن توسط نانودارپ (Eppendorf، آلمان) و الکتروفورز ژل بررسی شد. ۱ میکروگرم از RNA سپس برای سنتز cDNA از کیت Exiqon LNA™ miRCURY (دانمارک) به ترتیب با دمای تولید کننده (۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد.

### تجزیه و تحلیل بیان با qPCR

از پرایمرهای LNA اختصاصی (Exiqon، دانمارک) برای miR-324-3p و miR-508-5p استفاده شد. سطوح بیان نسبی miRNAs و ABCA3 به ترتیب به RNU6 و GAPDH به عنوان ژن‌های مرجع داخلی آنها با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  نرمال شدند. واکنش‌های qPCR با استفاده از کیت realtime-PCR (Takara Bio، ژاپن) در سیستم Chromo4 (Bio-Rad، آمریکا) انجام شد. تمام نمونه‌ها به صورت سه مرحله در ۴۰ سیکل به شرایط حرارتی زیر اجرا شدند (دنا تورا سیون اولیه: ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دنا تورا سیون: ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال: ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و گسترش: ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد).

### تحلیل آماری

تمام داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21.0 (SPSS Inc.، IL، آمریکا) تحلیل شدند. اهمیت آماری بیان miR-324-3p و miR-508-5p بین دو گروه با تست‌های دوتایی من-ویتنی اندازه‌گیری شد. منحنی‌های ROC و منطقه زیر منحنی ROC (AUC) برای محاسبه اختصاصیت و حساسیت miR-324-3p و miR-508-5p به عنوان یک بیومارکر تشخیصی و یا پیش‌بینی برای ALL استفاده شدند. ضریب همبستگی اسپیرمن برای محاسبه همبستگی بین پارامترها استفاده شد. تمام مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  SEM نمایش داده شده‌اند و مقدار  $p$ -value  $< 0.05$  به عنوان اهمیت آماری در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 7 (GraphPad، آمریکا) رسم شدند.

### نتایج

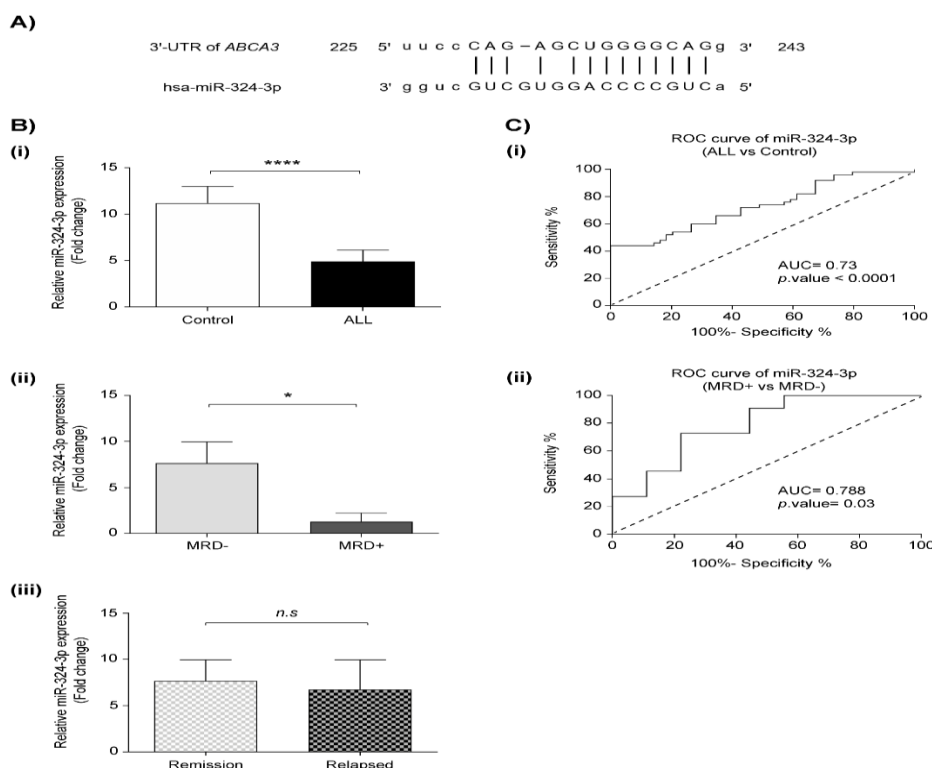
#### پیش‌بینی miRNAs تعاملی با ABCA3

با توجه به اینکه بیان پمپ‌های غشایی ABC در مقاومت دارویی بالا است و بیان پمپ ABCA3، در نمونه‌های دارای مقاومت دارویی ALL کودکان افزایش می‌یابد (۱۸)، هدف ما این بود که بیشترین miRNAs های تنظیمی را که ABCA3 را هدف می‌گیرند پیدا کنیم. به این منظور، از دو ابزار آنلاین عموماً در دسترس استفاده کردیم، از جمله TargetScan7.1 و miRWalk 2.0 که دومی همچنین یک پلتفرم مقایسه‌ای برای پیش‌بینی‌های جایگاه‌های وابستگی miRNA از برنامه‌های مختلف است. با توجه به الگوریتم‌های تعاملی یکپارچه، ۲۵ miRNAs برتر پیش‌بینی شده توسط حداقل ۷ برنامه انتخاب شدند. در نهایت، در میان تمام miRNAs های کاندید (۱۹ و ۲۵) کاوش جامع ما منجر به انتخاب miR-324-3p و miR-508-5p به عنوان بیومارکرهای تشخیصی و پیش‌بینی شده در ALL شد. (شکل ۱)

#### miR-324-3p میتواند یک بیومارکر تشخیصی جدید و دخیل در مقاومت دارویی چندگانه در ALL کودکان باشد

سطح بیان miR-324-3p در همه بیماران ALL کودکان ارزیابی شد و مشاهده شد که به طور قابل توجهی کمتر از سطح بیان در مقایسه با نمونه‌های کنترل بود (مقدار  $p < 0.0001$ ). بنابراین، miR-324-3p که پیش‌بینی می‌شد ABCA3 را هدف قرار دهد از این رو به عنوان یک مارکر در مکانیسم‌های مقاومت به دارو عمل می‌کند. در هماهنگی با این ایده، ما به طور دقیقتر سطح بیان نسبی miR-324-3p را بین گروه‌های MRD+ و MRD- مقایسه کردیم. یافته‌های ما نشان داد که افت اساسی در بیان miR-324-3p در بیماران MRD+ نسبت به MRD- وجود داشت (مقدار  $p = 0.03$ ) از آنجا که مقاومت دارویی عامل اصلی عود بیماری در بیماران ALL است، ما به طور دقیقتر سطح بیان نسبی miR-324-3p را در گروه‌های دچار عود نسبت به بهبود یافته بررسی کردیم، اما هیچ اختلال معناداری بین آنها مشاهده نشد (مقدار  $p = 0.44$ ). سپس، برای ارزیابی ارزش تشخیصی miR-324-3p بین آن گروه‌هایی که به طور معنادار کاهش یافته بود، ما تجزیه و تحلیل منحنی ROC انجام دادیم. نتایج به دست آمده نشان دادند که احتمال miR-324-3p به عنوان یک بیومارکر تشخیصی و مقاوم به دارو در ALL کودکان وجود دارد (تمامی بیماران ALL در مقایسه با کنترل‌ها:  $AUC = 0.788$ ,  $p$ -value  $< 0.0001$ ; MRD+ vs MRD- :  $AUC = 0.73$ ,  $p$ -value  $< 0.0001$ ).

این نتایج نشان دادند که miR-324-3p می‌تواند به عنوان یک بیومارکر تشخیصی و مقاوم به دارو در ALL کودکان در نظر گرفته شود. (value = 0.03)

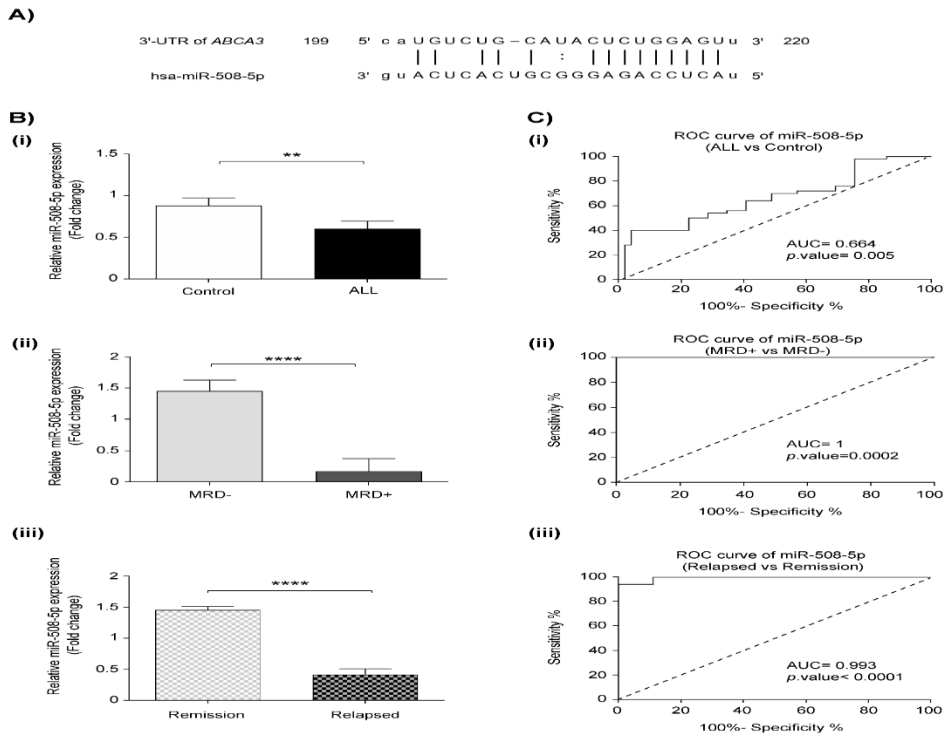


شکل ۱. بررسی بیان miR-324-3P به عنوان یک miRNA برای هدف گیری ABCA3 در کودکان مبتلا به ALL در مقایسه با گروه کنترل غیرسرطانی

miR-508-5p به عنوان یک عامل تشخیصی و یک مارکر دخیل در مقاومت دارویی چندگانه و عود در ALL کودکان پیشنهاد می‌شود

بیان miR-508-5p در تمام کودکان مبتلا به ALL تشخیص داده شد در مقایسه با کنترل‌ها انجام شد. سطح بیان miR-508-5p به طور قابل توجهی نسبت به کنترل‌ها کمتر بود (مقدار  $p = 0.005$ ) (شکل ۲). همچنین بیان miR-508-5p در گروه‌های MRD+ در مقایسه با MRD- (مقدار  $p < 0.0001$ ) و گروه‌های دچار عود در مقایسه با بهبودیافته (مقدار  $p < 0.0001$ ) به طور قابل توجهی کاهش یافته بود که به میزان بیشتری پتانسیل پیش‌بینی شونده برای مقاومت دارویی چندگانه و عود در ALL کودکان را تقویت می‌کند. علاوه بر این، تحلیل ROC برای نشان دادن توان بیومارکری miR-508-5p انجام شد. نتایج ما miR-508-5p را به عنوان یک بیومارکر قوی پیشنهاد می‌دهند برای تشخیص MRD+ و MRD- (AUC = 1) مقدار، مقدار کمترین کارایی کمتر در تمایز بین بیماران ALL دچار بازگشت و گروه بهبودیافته (AUC = 0.993) مقدار  $p < 0.0001$ ) و کمترین کارایی برای بیماران ALL در مقایسه با کنترل‌ها (AUC = 0.664) مقدار  $p = 0.005$ ) است. به طور کلی، این داده‌ها نشان می‌دهند که miR-508-5p می‌تواند به عنوان یک عامل تشخیصی جدید در مشارکت مکانیسم‌های مقاومت دارویی و عود ALL کودکان نسبت به miR-324-3p عمل کند.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۲. بررسی بیان miR-508-5P به عنوان یک miRNA برای هدف گیری ABCA3 در کودکان مبتلا به ALL در مقایسه با گروه کنترل غیرسرطانی

### بحث

ALL یکی از انواع اصلی سرطان‌های کودکان است که ناشی از افزایش نامنظم تکثیر سلول‌های لنفوسیتی است. در حال حاضر، با وجود افزایش نرخ بقا با استفاده از شیمی درمانی جدید برای ALL (۶)، زیرنوع‌های بی‌پاسخ و عود هنوز هم به عنوان علت اصلی مرگ در کودکان هستند (۴). miRNAs عوامل اساسی در فرایند تکثیر سلول‌های خونی هستند (۲۸) و تنظیم بی‌جای آن‌ها همچنین در انواع بدخیمی‌های B-cell و T-cell نشان داده شده است (۳۴ و ۲۹) علاوه بر این، پمپ‌های غشایی ABC نقش کلیدی در مقاومت دارویی در سرطان‌ها دارند (۳۶ و ۳۵) و سطوح بالای ABCA3 قبلاً توسط Aberuyi et al (۲۰۱۷) به عنوان مارکر مرتبط با MDR در ALL کودکانی گزارش شده بود (۱۹). در مطالعه حاضر، بررسی داده‌های بیوانفورماتیک منجر به انتخاب بیان این دو miRNA در کودکان هنوز مستند نشده است، این امر از اهمیت بسیاری برخوردار است که در این نوع سرطان مورد بررسی قرار گیرد. در این مطالعه، تحلیل ما بر اساس  $q^{PCR}$  نشان داد که بیان miR-508-5p و miR-324-3p در ALL نسبت به کنترل‌های سالم کمتر است. این نتایج پتانسیل این دو miRNA را به عنوان عوامل تشخیصی ممکن معرفی می‌کنند و نقش ضد توموری را در ALL کودکان بازی می‌کنند. هماهنگی با این نکته که miR-508-5p به عنوان یک miRNA ضد توموری با انواع مختلف سرطان‌ها ارتباط دارد، از جمله، گلیوما (۳۷ و ۱۹)، کارسینومای سلول‌های کبد (۲۰) و سرطان معده (۲۲). علاوه بر این، نشان داده شده است که miR-508-5p نقشی منفی در آغاز تومور و تهاجم سرطان تخمدان دارد (۳۹). اخیراً، Dang et al (۲۰۲۰) نشان دادند miR-508-5p ممکن است به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص، پیش‌بینی و درمان هدفمند در ملانوما باشد (۳۹). هر چند که تمام این داده‌ها نقشی از miR-508-5p به عنوان یک miRNA ضد توموری در انواع مختلف سرطان‌ها را پشتیبانی می‌کنند، نتایج در مورد نحوه عملکرد miR-324-3p در سرطان بسیار متضاد است. قابل توجه است که برخی مطالعات نقش miR-324-3p را به عنوان یک انکومیر (oncomir) در افزایش تکثیر سلولی در سرطان معده (۴۰)، ریه



(۴۱) و مثانه (۴۲) گزارش کرده‌اند در حالی که دیگران نقش ضد تومور برای miR-324-3p در سرطان حلق، روده بزرگ و پستان (۴۳ و ۴۴) ارائه داده‌اند. این تضاد ممکن است نشان دهنده نقش‌های مخالف برای miR-324-3p به عنوان انکو میر یا ضد توموری باشد که به وابستگی به انواع سرطان‌ها است و ممکن است اجرای miR-324-3p به عنوان یک هدف تشخیصی و درمانی را به چالش بکشاند. در این مطالعه، کاهش قابل توجه miR-324-3p در بیماران ALL ممکن است آن را به عنوان یک مهارکننده تومور در ALL کودکی معرفی کند. این یافته‌ها می‌توانند به عنوان داده‌های اولیه برای رویکردهای تشخیصی غیرتهاجمی بر مبنای miRNA در ALL کودکان محسوب شوند. با توجه به پیش‌بینی ما miR-324-3p و miR-508-5p ممکن است به ژن ABCA3 متصل شده و در نتیجه آن را تنظیم کنند، مشارکت ممکن این دو miRNA در مقاومت دارویی به دقت بررسی شده است. مهم‌ترین اینکه ما متوجه شدیم که مقادیر miR-324-3p و miR-508-5p بین بیماران MRD+ و افراد مبتلا به ALL که پس از یک سال درمان به داروهای شیمی درمانی پاسخ مثبت داشتند، به طرز قابل توجهی متفاوت است. همچنین نشان دادیم که در گروه عود، مقادیر miR-508-5p ولی نه miR-324-3p نسبت به بیمارانی که در حالت بهبود باقی مانده‌اند، به طرز قابل توجهی پایین‌تر است. با توجه به رابطه مستقیم بین مقاومت دارویی و بازگشت سرطان و همچنین ارزش پیش‌بینی بالاتر miR-508-5p نسبت به miR-324-3p برای تمایز بین شرایط MRD+ و MRD-؛ عود و بهبود، ما اقدام به اظهار این نظر کردیم که miR-508-5p ممکن است یک گزینه قوی‌تر برای ارتباط قوی با مقاومت دارویی در ALL کودکان باشد. با این حال، ما توانستیم نشان دهیم که هر دو این miRNA با مقادیر منفی در ارتباط با ژن ABCA3 در نمونه‌های کنترلی غیر سرطانی و بیماران مبتلا به ALL هستند. با توجه به این مشاهده ما فرض می‌کنیم که miR-324-3p و miR-508-5p ممکن است از طریق عملکردی روی ژن هدف ABCA3، تاثیرات مقاومت دارویی خود را داشته باشند. به طور جالب، یک مطالعه پیشین نشان داد که بیان بیش از حد miR-508-5p می‌تواند مقاومت سرطان معده را نسبت به چند داروی شیمی درمانی رو به کاهش برگرداند از طریق اثر مستقیم بر عضو دیگری از خانواده ABCB1 (۲۲). تأثیر مهارتی miRNA های ما بر ABCA3 نیز باید با اختصاصی بیشتر از طریق بررسی تجربی مستقیم میان miR-324-3p-ABCA3 و miR-508-5p-ABCA3 ارزیابی شود. به این منظور، یک سیستم مانند آزمایشگاهی کاربردی روش لوسیفراز لازم است (۴۵ و ۴۶).

### نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن مطالعه فعلی می‌توان پتانسیل تشخیصی و مقاومت دارویی miR-324-3p و miR-508-5p را در ALL کودکان نشان داد و از این رو رویکرد جدیدی برای شناسایی و درمان ALL کودکان و بیماران دارای لنفوبلاستیک لوسمی مقاوم به شیمی‌درمانی فراهم کرد.

### References:

1. Sabattini E, Bacci F, Sagrarnoso C, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: An overview. *Pathologica* 2010; 102: 83–87.
2. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: A review. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115: 138–145.
3. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017; 7: e577.
4. Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: A genetic update. *Experimental Hematology and Oncology* 2014; 3: 16.

5. Pui CH. Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers of Medicine* 2020; 14: 689–700.
6. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 2013; 381: 1943–1955.
7. Ghaderi S, Lie RT, Moster D, et al. Cancer in childhood, adolescence, and young adults: A population-based study of changes in risk of cancer death during four decades in Norway. *Cancer Causes Control* 2012; 23: 1297–1305.
8. Zahreddine H, Borden KLB. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*; 4 MAR. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.3389/fphar.2013.00028.
9. Styczynski J, Wysocki M, Debski R, et al. Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 875–893.
10. Klumper E, Pieters R, Veerman AJP, et al. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 3861–3868.
11. Cortez MAA, Scrideli CA, Yunes JA, et al. mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53: 996–1004.
12. Rahgozar S, Moafi A, Abedi M, et al. MRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer Biol Ther* 2014; 15: 35–41.
13. Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 2009; 7: 147–154.
14. Si W, Shen J, Zheng H, et al. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics* 2019; 11: 1–24.
15. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, et al. Implication of microRNAs in drug resistance for designing novel cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2010; 13: 57–66.
16. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, et al. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer* 2010; 127: 1785–1794.
17. van Jaarsveld MTM, Helleman J, Berns EMJJ, et al. MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2010; 42: 1282–1290.
18. Aberuyi N, Rahgozar S, Dehaghi ZK, et al. The translational expression of ABCA2 and ABCA3 is a strong prognostic biomarker for multidrug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 3373–3380.
19. Bao G, Wang N, Li R, et al. MiR-508-5p Inhibits the Progression of Glioma by Targeting Glycoprotein Non-metastatic Melanoma B. *Neurochem Res* 2016; 41: 1684–1690.
20. Wu SG, Huang YJ, Bao B, et al. MIR-508-5p acts as an anti-oncogene by targeting MESDC1 in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* 2017; 64: 40–47.
21. Duan X, Bai J, Wei J, et al. MicroRNA-508-5p suppresses metastasis in human gastric cancer by targeting S-phase kinase-associated protein 2. *Mol Med Rep* 2017; 16: 2163–2171.
22. Shang Y, Zhang Z, Liu Z, et al. MiR-508-5p regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting ABCB1 and ZNRD1. *Oncogene* 2014; 33: 3267–3276.
23. Wen Y, Han J, Chen J, et al. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2015; 137: 1679–1690.

24. Xu J, Ai Q, Cao H, et al. MiR-185-3p and miR-324-3p predict radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma and modulate cancer cell growth and apoptosis by targeting SMAD7. *Med Sci Monit* 2015; 21: 2828–2836.
25. Wang X, Wang C, Xu H, et al. Long Non-Coding RNA SLC25A21-AS1 Promotes Multidrug Resistance in Nasopharyngeal Carcinoma by Regulating miR-324-3p/IL-6 Axis. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.2147/CMAR.S251820.
26. Dweep H, Sticht C, Gretz N. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Curr Genomics* 2013; 14: 127–136.
27. M. Witkos T, Koscianska E, J. Krzyzosiak W. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med* 2011; 11: 93–109.
28. Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology* 2008; 15: 352–358.
29. Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia* 2015; 29: 1004–1017.
30. Gutierrez-Camino A, Garcia-Obregon S, Lopez-Lopez E, et al. MiRNA deregulation in childhood acute lymphoblastic leukemia: A systematic review. *Epigenomics* 2019; 12: 69–80.
31. Ultimo S, Martelli AM, Zauli G, et al. Roles and clinical implications of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol* 2018; 233: 5642–5654.
32. Mardani R, Jafari Najaf Abadi MH, Motieian M, et al. MicroRNA in leukemia: Tumor suppressors and oncogenes with prognostic potential. *J Cell Physiol* 2019; 234: 8465–8486.
33. Mets E, Van Peer G, Van der Meulen J, et al. MicroRNA-128-3p is a novel oncomiR targeting PHF6 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2014; 99: 1326–1333.
34. Ye F. MicroRNA expression and activity in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 2018; 9: 5445–5458.
35. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International* 2005; 5: 30.
36. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14: 3–9.
37. Liu YH, Li B, Meng FG, et al. MiR-508-5p is a prognostic marker and inhibits cell proliferation and migration in glioma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21: 76–81.
38. Chan CK, Pan Y, Nyberg K, et al. Tumour-suppressor microRNAs regulate ovarian cancer cell physical properties and invasive behaviour. *Open Biol*; 6. Epub ahead of print 2016.
39. Dang L, Wang Y, Shi C, et al. A Potential Tumor Suppressor Gene Named miR-508-5p Inhibited the Proliferation and Invasion of Human Melanoma Cells by Targeting KIT. *Technol Cancer Res Treat* 2020; 19: 153303382095180.
40. Sun GL, Li Z, Wang WZ, et al. miR-324-3p promotes gastric cancer development by activating Smad4-mediated Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Gastroenterol* 2018; 53: 725–739.
41. Lin MH, Chen YZ, Lee MY, et al. Comprehensive identification of microRNA arm selection preference in lung cancer: MiR-324-5p and -3p serve oncogenic functions in lung cancer. *Oncol Lett* 2018; 15: 9818–9826.
42. Tsai KW, Kuo WT, Jeng SY. MicroRNA-324 plays an oncogenic role in bladder cancer cell growth and motility. *Transl Cancer Res* 2020; 9: 707–716.
43. Liu C, Li G, Yang N, et al. miR-324-3p suppresses migration and invasion by targeting WNT2B in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell Int* 2017; 17: 2.
44. Kuo WT, Yu SY, Li SC, et al. MicroRNA-324 in human cancer: Mir-324-5p and mir-324-3p have distinct biological functions in human cancer. *Anticancer Res* 2016; 36: 5189–5196.

45. Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, et al. Experimental validation of miRNA targets. *Methods* 2008; 44: 47–54.
46. Martin MM, Lee EJ, Buckenberger JA, et al. MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblast. *J Biol Chem* 2006; 281: 18277–18284.

سخنرانی

## بررسی بیان سایتوکین‌ها در موش‌های دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین تحت درمان با پروتئین‌های آب پنیر شتر

سید حسین خادم حسینی<sup>۱\*</sup>، مهسا کاظمی رودسری<sup>۲</sup>، لیلا روحی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی میکروبی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** دیابت شیرین (Diabetes Mellitus: DM) با سطوح غیرطبیعی گلوکز خون مشخص می‌شود که ناشی از ترشح کم انسولین و افزایش مقاومت به آن است. شناسایی پروتئین‌هایی که به طور معمول پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کنند و روند بهبود زخم را در بیماران دیابتی افزایش می‌دهند، فرصتی برای توسعه استراتژی‌های درمانی جدید فراهم می‌کند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر پروتئین‌های آب پنیر شتر (Camel Whey Protein: CWP) بر سطح بیان سایتوکین‌ها در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار پس از القای دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین (Streptozotocin: STZ) طراحی شد.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه حاضر، اثرات مکمل CWP بر سطح بیان  $TNF-\alpha$ ،  $IL-6$  و  $IFN-\gamma$  در موش‌های دیابتی ناشی از STZ با استفاده از Real Time PCR بررسی گردید. جانور مدل موش در این مطالعه به سه گروه (هر گروه ۱۰ موش) تقسیم شد: گروه ۱: موش‌های غیر دیابتی (کنترل)، گروه ۲: موش‌های دیابتی و گروه ۳: موش‌های دیابتی که روزانه مکمل CWP (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را از طریق گاواژ خوراکی به مدت ۱ ماه دریافت کردند. پس از القای دیابت، یک زخم به ضخامت ۱ سانتی‌متر مربع در پشت هر حیوان ایجاد شد. نمونه‌های بافتی در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ پس از ایجاد ضایعه استخراج شد.

**یافته‌ها:** در مقایسه با موش‌های کنترل غیر دیابتی، موش‌های دیابتی افزایش سطح بیان  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  را در طحال نشان دادند که با کاهش  $IFN-\gamma$  همراه بود. جالب توجه است که در مقایسه با موش‌های دیابتی که مکمل CWP را دریافت نکردند، موش‌های دیابتی که مکمل CWP را روزانه طی یک ماه دریافت کردند، افزایش بیان  $IFN-\gamma$  را نشان دادند، در صورتی که سطح بیان  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  در آن‌ها کاهش یافته بود.

**بحث و نتیجه‌گیری:** اجزای CWP دارای اثرات مفید زیادی از جمله تحریک ایمنی سلولی و ذاتی و فعالیت‌های ضد التهابی هستند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که مکمل CWP با تنظیم و تعدیل سایتوکین‌ها می‌تواند برای بهبود سریع‌تر و ترمیم زخم‌های دیابتی مفید باشد.

**واژگان کلیدی:** دیابت، پروتئین آب پنیر شتر، سایتوکین

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، کد پستی

۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۱۲۹۲۱۷۳۰

پست الکترونیک: khademhoseini95@gmail.com

## Investigating the expression of cytokines in Streptozotocin-induced diabetic rats treated with Camel Whey Proteins

Seyed Hossein Khadem Hosseini<sup>1\*</sup>, Mahsa Kazemi-Roudsari<sup>2</sup>, Leila Rouhi<sup>3</sup>

1. Ph. D Student in Microbial Biotechnology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Ph. D Student in Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Diabetes Mellitus (DM) is characterized by abnormal blood glucose levels caused by low insulin secretion and increased insulin resistance. Identifying proteins that generally regulate the immune response and enhance the wound-healing process in diabetic patients provides an opportunity to develop new therapeutic strategies. The present study was designed to evaluate the effects of Camel Whey Protein (CWP) on the expression level of cytokines in Wistar rats after the induction diabetes caused by Streptozotocin (STZ).

**Materials and Methods:** In the present study, we investigated the effects of CWP supplementation on the expression levels of *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  and *IFN- $\gamma$*  in STZ-induced diabetic rats using Real-Time PCR. The mouse model animal in this study was divided into three groups (10 mice each): group 1: non-diabetic mice (control), group 2: diabetic mice, and group 3: diabetic mice that were supplemented with CWP (100 mg/kg body weight) daily through oral gavage for 1 month. After diabetes induction, a 1-cm<sup>2</sup> full-thickness wound was created on each animal's dorsum. Tissue samples were extracted on days 1, 4, 7, 10 and 14 after the creation of the lesion.

**Results:** Compared to non-diabetic control mice, diabetic mice showed increased levels of *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* expression, which was associated with decreased *IFN- $\gamma$* . Interestingly, compared to diabetic rats that did not receive CWP supplementation, diabetic rats that received CWP supplementation daily for one month showed increased expression of *IFN- $\gamma$* , while *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* expression had decreased.

**Conclusion:** CWP components have many beneficial effects including stimulation of cellular and innate immunity and anti-inflammatory activities. The results of the present study showed that CWP supplement can be useful for faster healing and closing of diabetic wounds by regulating and modulating cytokines.

**Keywords:** Diabetes, Camel Whey Protein, Cytokine

### مقدمه

دیابت یک بیماری متابولیک پیچیده است که با افزایش شیوع، سلامت مردم را در سرتاسر جهان مختل کرده است. Diabetes Mellitus: DM با افزایش مزمن سطح گلوکز خون مشخص می‌شود. در سال‌های اخیر، دیابت به دلیل افزایش شدید مرگ و میر و افزایش هزینه مراقبت‌های بهداشتی، به یکی از جدی‌ترین تهدیدهای سلامت عمومی در جهان تبدیل شده است. براساس اطلس اپیدمی دیابت ۲۰۱۹ فدراسیون بین‌المللی دیابت، در سال ۲۰۲۲، ۴۶۳ میلیون بیمار دیابتی در سراسر جهان وجود داشت و پیش‌بینی می‌شود این تعداد تا سال ۲۰۴۵ به ۷۰۰ میلیون نفر برسد (۱). خطرات دیابت با بسیاری از عوارض جدی از جمله بهبود ضعیف زخم، بیماری قلبی عروقی، بیماری چشم، آسیب عصبی و قطع اندام تحتانی به دلیل زخم پا همراه است. تقریباً ۲۰ درصد از بیماران دیابتی در جهان از ترمیم ضعیف زخم دیابت رنج می‌برند (۲). در زخم‌های دیابتی، بازسازی پوست اغلب مختل می‌شود و از بهبود طبیعی زخم‌ها جلوگیری می‌کند. بیش از نیمی از زخم‌های دیابتی به زخم‌های مزمن تبدیل می‌شوند و خطر قطع عضو و مرگ افزایش می‌یابد. علاوه بر این، ۶۰ تا ۷۰ درصد زخم‌های دیابتی احتمال دارد که عود کنند، که هزینه درمان هنگفتی را به بیماران تحمیل خواهد کرد (۳). بهبود طبیعی زخم معمولاً از طریق مراحل از جمله هموستاز، التهاب، تکثیر و بازسازی انجام می‌شود، در حالی که در زخم‌های دیابتی، این روند ممکن است به دلیل عوامل مختلف مختل شود یا به تأخیر بیفتد. اختلالات بیوشیمیایی و ایمونولوژی در زخم‌های دیابتی، از جمله هیپرگلیسمی، مقاومت به انسولین و اختلال در بیان سایتوکین‌های عملکردی و مهار

می تواند باعث آسیب بافتی شود که روند طبیعی بهبود زخم را مختل می کند (۴). اختلال در تنظیم بیان سایتوکین ها منجر به التهاب بیش از حد در زخم های دیابتی و به دنبال آن تخریب مداوم بافت زخم و طولانی تر شدن بهبود زخم می شود (۵). ناهنجاری سلول های ایمنی در زخم های دیابتی، سرکوب التهاب را دشوار می کند و حساسیت به عفونت را تا حد زیادی افزایش می دهد. هنگامی که یک زخم مزمن عفونی می شود، التهاب افزایش یافته باقی می ماند و زخم را در چرخه ثابت عفونت، التهاب و ترمیم ناکافی نگه می دارد (۶). چندین مطالعه استراتژی های درمانی جدیدی را برای بهبود زخم در دیابت بررسی کرده اند (۷). **Protein: Camel Whey (CWP)**، به عنوان یک مکمل غذایی از اسیدهای آمینه و پروتئین فعال بیولوژیکی، برای اعمال اثرات درمانی تحت شرایط مختلف پاتولوژیک ثبت شده است. اثرات مفید **CWP** شامل تحریک ایمنی ذاتی و ایمنی سلولی و همچنین فعالیت های ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد دیابتی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی است (۸). مکمل **CWP** می تواند با کاهش سطح قند خون، استرس اکسیداتیو و پاسخ التهابی، بهبود زخم در بیماران دیابتی را بهبود بخشد (۹). **CWP** به عنوان یک پروتئین ضد التهاب، آنتی اکسیدان و آنابولیک با ارزش بیولوژیکی بالا شناخته شده است که از  $\alpha$ -lactalbumin و  $\beta$ -lactoglobulins تشکیل شده است. **CWP** منبع اصلی اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری است و حاوی آمینواسیدهای شاخه دار و گلوتامین است (۱۰). محتوای سیستئین آن باعث افزایش غلظت گلوکاتیون می شود که وضعیت آنتی اکسیدانی و سیستم ایمنی را بهبود می بخشد شواهد مختلف نشان می دهد که **CWP** به عنوان یک ترکیب فعال زیستی در شیر و ۲۰ درصد محتوای پروتئین آن، نقش اساسی در بهبود فرآیند التهابی و مقابله با بیماری های مزمن مانند زخم های دیابتی دارد (۱۱).

**CWP** می تواند با سرکوب سایتوکین های التهابی، ظرفیت ترمیم زخم را در افراد دیابتی افزایش دهد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر پروتئین های **CWP** بر سطح بیان سایتوکین های  $TNF-\alpha$ ،  $IL-6$  و  $IFN-\gamma$  و ترمیم زخم در موش های صحرائی نر نژاد ویستار پس از چهار ماه دیابت نوع ۱ (Type 1 Diabetes: T1D) ناشی از استرپتوزوتوسین (Streptozotocin: STZ) طراحی شد.

## مواد و روش ها

### آماده سازی **CWP**

شیر خام شتر از شترهای ماده سالم از استان خوزستان ایران جمع آوری شد. سپس شیر در ۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا چربی آن خارج شود. شیر فاقد چربی به دست آمده با استفاده از  $HCl\ 1\ N$  در دمای اتاق به  $pH\ 4.3$  رسید و اسیدی شد و در دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا کازئین رسوب کند. مایع رویی حاوی پروتئین آب پنیر با سولفات آمونیوم (۷۰ درصد) اشباع شد و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پروتئین های آب پنیر رسوب شده با سانتریفیوژ جمع آوری شد و در آب مقطر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد با استفاده از غشای **Spectra/Pro®**، **MWCO 6000-8000**، **KDa** دیالیز شد. محصول دیالیز بدست آمده لیوفیلیز شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. محصول دیالیز حاوی پروتئین های آب پنیر غیر دناتوره تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (۱۲).

### مواد شیمیایی و القای دیابت

**STZ** (Sigma، ایالات متحده آمریکا) خریداری شد و در بافر سیترات سرد ۰/۰۱ مولار ( $pH\ 4.50$ ) حل شد و همیشه برای استفاده فوری (در عرض ۵ دقیقه) به تازگی آماده شد. دیابت با یک تزریق **STZ** تازه حل شده (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) در بافر سیترات ۰/۰۱ مولار در لیتر ( $pH\ 4.5$ ) به صفاق القا شد. موش های کنترل بافر سیترات دریافت کردند. هفت روز پس از تزریق **STZ**، موش ها از نظر سطح سرمی گلوکز غربالگری شدند. موش هایی با سطح سرمی گلوکز  $\leq 200$  میلی گرم در دسی لیتر پس از ۲ ساعت مصرف گلوکز، دیابتی در نظر گرفته شدند و برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند (۹ و ۱۲).

### حیوانات و طراحی آزمایشی

در مجموع ۳۰ موش نر نژاد ویستار ۱۰ هفته‌ای بالغ جنسی، که وزن هر یک از آن‌ها بین ۱۲۰ تا ۱۵۰ گرم بود، از خانه حیوانات مرکزی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دست آمد. تمام مراحل حیوانی مطابق با استانداردهای تعیین شده در دستورالعمل‌های مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشی توسط کمیته کنترل و نظارت بر آزمایشات روی حیوانات (CPCSEA) و مؤسسه ملی بهداشت (NIH) انجام شد. پروتکل مطالعه توسط کمیته اخلاق حیوانات دانشگاه آزاد شهرکرد مطابق با اصول اعلامیه هلسینکی تایید شد. به همه حیوانات به مدت ۲ هفته قبل از آزمایش اجازه داده شد تا با قفس‌های فلزی داخل یک اتاق با تهویه مناسب سازگار شوند. حیوانات تحت شرایط آزمایشگاهی استاندارد (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰-۷۰٪ و چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعته) نگهداری شدند، با رژیم غذایی از استاندارد تغذیه شدند و به طور آزاد به آب داده شد. همه موش‌ها قبل از القای دیابت به مدت ۲۰ ساعت ناشتا بودند. موش‌ها (n=۱۰) با تزریق داخل صفاقی (I.P.) یک دوز واحد STZ (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) در بافر سیترات ۰.۰۱ مولار (pH 4.5) دیابتی شدند. موش‌های گروه کنترل (n=۱۰) با بافر سیترات (۰.۰۱ مولار، pH 5/4) تزریق شدند. حیوانات به سه گروه آزمایشی تقسیم شدند: گروه ۱ موش‌های کنترل غیر دیابتی بودند که مکمل روزانه ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر را از طریق گاواژ خوراکی به مدت یک ماه دریافت کردند. گروه ۲ موش‌های دیابتی بودند که روزانه ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر را از طریق گاواژ خوراکی به مدت یک ماه دریافت کردند. و گروه ۳ موش‌های دیابتی بودند که روزانه به مدت یک ماه CWP (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) محلول در ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر از طریق گاواژ خوراکی به عنوان مکمل دریافت کردند. بنابراین حجم دریافتی روزانه توسط هر موش در سه گروه ثابت بود و از ۲۵۰ میکرولیتر بیشتر نبود. دوز بهینه CWP در آزمایشگاه بر اساس LD50 و چندین پارامتر اندازه‌گیری شده تعیین شد (۱۳).

### ایجاد زخم

به دنبال القای دیابت در گروه‌های ۲ و ۳، موش‌های هر گروه در سن ۱۱ هفته‌گی زخمی شدند. برای ایجاد زخم موش‌ها با تزریق کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. موهای پشت هر موش کوتاه شد و پس از آن با اتانول ۷۰ درصد پاک شد. شش زخم تمام ضخامت (قطر ۵ میلی‌متر، با فاصله ۳ تا ۴ میلی‌متر) در هر موش با ضخامت کامل بر روی پوست پشتی با برداشتن پوسته چین‌خورده در خط وسط و پانچ کردن دو لایه پوست با پانچ بیوپسی استریل یکبار مصرف به قطر ۵ میلی‌متر به صورت آسپتیکال ایجاد شد. دو زخم به قطر ۵ میلی‌متر به طور همزمان ایجاد شد، همین روش روی همان حیوانات سه بار تکرار شد و شش زخم ایجاد کرد که در هر طرف سه زخم وجود داشت. در روزهای ۰، ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ طحال از هر حیوان برای تجزیه و تحلیل RNA جمع‌آوری شد.

### مطالعات هیستوپاتولوژیک

یک نمونه از هر گروه موش در روز ۱۰ پس از ایجاد زخم برای بررسی هیستوپاتولوژیک جدا شد. نمونه‌های پوست بلافاصله در فرمالین بافر خنثی ۱۰٪ (v/v) تثبیت شدند و محلول تثبیت‌کننده هر ۲ روز یکبار تا زمانی که بافت‌ها سفت شوند تعویض شد. هر نمونه در یک بلوک پارافین جاسازی شد و مقاطع نازک (۳ میکرومتر) تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) برای مشاهده تغییرات مورفولوژیکی رنگ‌آمیزی شدند.

### تجزیه و تحلیل خون

سطح گلوکز خون با استفاده از سنسور AccuTrend (روش بیوشیمیایی، مانهایم، آلمان) تعیین شد. سطح انسولین سرم توسط Luminex (Düsseldorf, آلمان) طبق دستورالعمل سازنده آنالیز شد.

### Real-Time PCR

طحال پس از بیهوش شدن موش‌ها تحت شرایط آسپتیک استخراج و در نیتروژن مایع در دمای ۱۹۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس استخراج RNA و سنتز cDNA از بافت طحال طبق دستورالعمل کیت‌های YTA (یکتا تجهیز، ایران) انجام شد. real-time PCR به کمک YTA SYBR Green (یکتا تجهیز، ایران) انجام و از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

شد. ۱۵ میکرولیتر از حجم واکنش شامل ۰/۵ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر ریورس، ۱۰ میکرولیتر مخلوط اصلی مسترمیکس سایبرگرین و ۳/۵ میکرولیتر آب تقطیر دوگانه استریل استفاده شد. برنامه چرخه دما همچنین شامل دناتوره سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۴۰ ثانیه بود. بیان نسبی  $IL-6$  و  $TNF-\alpha$ ،  $IFN-\gamma$  با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه و توسط سطوح  $GAPDH$  در هر نمونه نرمالایز شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گنجانده شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای Real Time PCR

نام ژن	کد دسترسی ژن	توالی پرایمر (5'→3')	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (°C)
<i>IL-6</i>	NM_012589.2	F: TCTGGTCTTCTGGAGTTCCG R: AGCATTGGAAGTTGGGGTAGG	۱۷۴	۶۰
<i>TNF-α</i>	NM_012675.3	F: TAGCCCACGTCGTAGCAAAC R: GTGAGGAGCACGTAGTCGG	۱۹۰	۶۰
<i>IFN-γ</i>	NM_138880.3	F: TGGAGGAACTGGCAAAAGGAC R: AGTGATCAGGTGCGATTTCGAT	۱۴۱	۶۰
<i>GAPDH</i>	NM_017008.4	F: TGATGGGTGTGAACCACGAG R: TTCTGAGTGGCAGTGATGGC	۱۶۳	۶۰

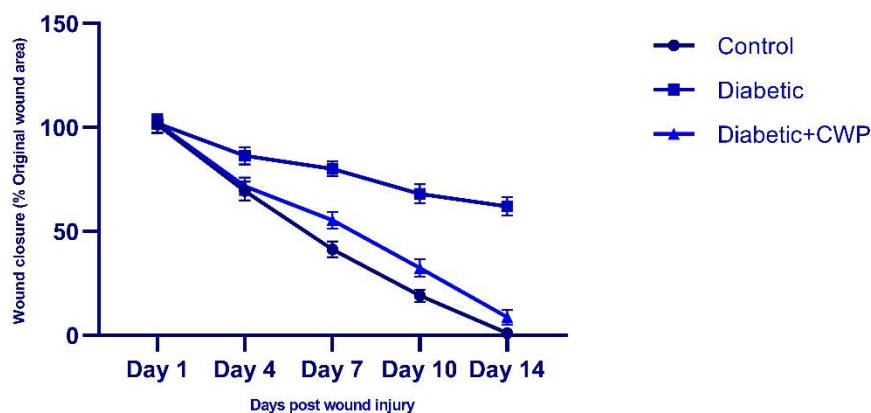
### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها ابتدا برای نرمال بودن (با استفاده از آزمون اندرسون دارلینگ) و همگنی واریانس قبل از هر گونه تجزیه و تحلیل آماری بیشتر مورد آزمایش قرار گرفتند. داده‌ها به طور معمول توزیع و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شدند. برای شناسایی تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با آزمون تعقیبی LSD استفاده شد (GraphPad Prism 5.0). تفاوت در  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

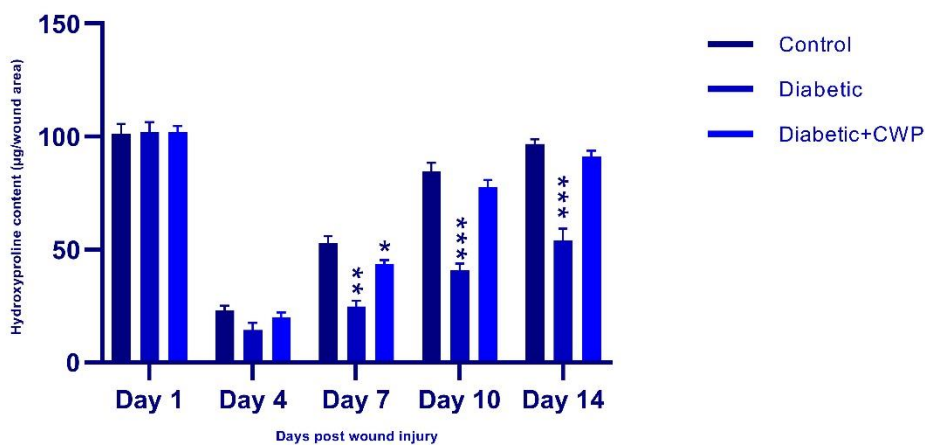
#### مکمل CWP ترمیم زخم را در موش‌های دیابتی بهبود بخشید.

تغییرات ماکروسکوپی در محل‌های زخم برش پوست موش‌های کنترل، موش‌های دیابتی و موش‌های دیابتی مکمل شده با WP ارزیابی شد. در روز ۱ تصاویر بلافاصله پس از ایجاد زخم گرفته شد. زخم موش‌ها در همه گروه‌های آزمایشی مورفولوژی مشابهی را در روز اول پس از آسیب نشان داد، در حالی که زخم‌های گروه دیابتی دریافت کننده مکمل CWP و گروه کنترل تقریباً به طور مشابه تا روز ۱۴ پس از آسیب بسته شدند. در مقابل، موش‌های گروه دیابتی بسته شدن زخم با تاخیر را نشان دادند. داده‌های ۱۰ موش جداگانه در هر گروه برای تعیین تغییرات در درصد بسته شدن زخم در هر نقطه زمانی در مقایسه با ناحیه زخم اصلی استفاده شد (شکل ۱). موش‌های دیابتی دریافت کننده مکمل CWP بسته شدن زخم و در نتیجه بهبودی نهایی را در مقایسه با موش‌های دیابتی که تاخیر بسته شدن زخم را نشان دادند، تسریع بخشیدند.



شکل ۱. تغییرات ماکروسکوپی در محل زخم برش پوست که بسته شدن زخم را تعیین می‌کند. تغییرات درصد بسته شدن زخم در هر نقطه زمانی پس از آسیب زخم نسبت به ناحیه زخم اصلی در روز ۱ اندازه‌گیری شد. داده‌های انباشته شده در مورد تغییرات بسته شدن زخم از ده موش جداگانه در هر گروه نشان داده شده است. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شدند.

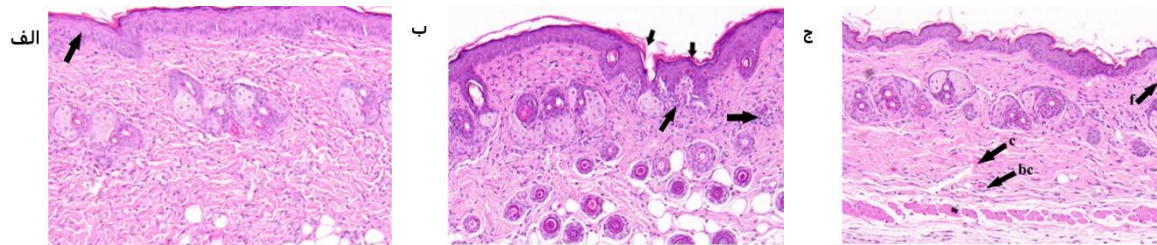
از آنجایی که هیدروکسی پرولین یک ترکیب اصلی است که تقریباً منحصراً در کلاژن یافت می‌شود، از محتوای آن به عنوان شاخصی از میزان کلاژن نوع I در محل زخم استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده از ۱۰ موش جداگانه در هر گروه نشان داد که در مقایسه با موش‌های کنترل، موش‌های دیابتی به طور قابل توجهی محتوای هیدروکسی پرولین کمتری داشتند و بسته شدن زخم را کاهش دادند (شکل ۲). در مقایسه با موش‌های کنترل، موش‌های دیابتی تجمع کلاژن کمتری را در محل‌های زخم نشان دادند که روند بهبودی با تاخیری را تایید کرد. با اینحال، در مقایسه با موش‌های دیابتی، موش‌های دیابتی دریافت کننده CWP، ترمیم قابل توجهی از محتوای هیدروکسی پرولین را نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که تولید کلاژن از طریق تجویز خوراکی CWP افزایش یافته است.



شکل ۲. محتوای هیدروکسی پرولین، به عنوان شاخصی از تجمع کلاژن در محل زخم تعیین شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شدند \* $p < 0.05$ ، \*\* $p < 0.01$ ، \*\*\* $p < 0.001$  و \*\*\*\* $p < 0.0001$

تأثیر مکمل CWP بر ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک زخم‌های التیام یافته موش‌های دیابتی

ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک زخم‌های التیام یافته در روز ۱۴ پس از زخم در شکل ۳ نشان داده شده است. گروه کنترل ترمیم خوب زخم با اپیتلیال مجدد کامل و بافت همبند خوب را نشان داد (شکل ۳-الف). برعکس، بافت به دست آمده از گروه دیابتی فیبروبلاست‌های نامرتب، فقدان رسوب فیبر کلژن و نفوذ سلول‌های التهابی را نشان داد (شکل ۳-ب). به طور جالب توجه، درجه بیشتری از بازسازی بافت در گروه دیابتی + CWP مشاهده شد، که با اپیتلیلیزاسیون کامل، رسوب کلژن به طور قابل توجهی افزایش یافت و وجود بافت‌های همبند نشان داده شد (شکل ۳-ج).



شکل ۳. تأثیر مکمل CWP بر ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک زخم‌های التیام یافته موش‌های دیابتی. بررسی بافت شناسی زخم بهبود یافته‌ی رنگ آمیزی شده با H&E. فتومیکروگراف‌ها بخش‌های زخم التیام یافته جدا شده از موش‌های گروه کنترل (الف)، دیابتی (ب) و دیابتی + CWP (ج) را در روز ۱۴ پس از زخم نشان می‌دهند. فتومیکروگراف‌ها با بزرگمایی  $\times 100$  به دست آمدند. اختصارات: bc، مویرگ‌های خونی؛ C، فیبرهای کلژن؛ f، فیبروبلاست.

CWP در موش‌های دیابتی باعث کاهش سطح گلوکز و افزایش سطح انسولین شد.

برای بهینه‌سازی تمام پارامترها و شرایط مدل‌های حیوانی در طول آزمایش‌ها، سطح گلوکز و انسولین خون موش‌ها در سه گروه در طول زمان‌های نشان داده شده پس از آسیب پایش شد (جدول ۲). سطح گلوکز خون موش‌های دیابتی تحت درمان با CWP به طور قابل توجهی کمتر از موش‌های دیابتی و بالاتر از موش‌های کنترل بود. همچنین، موش‌های دیابتی تحت درمان با CWP سطوح بالاتری از انسولین نسبت به موش‌های دیابتی درمان نشده در طول دوره بهبود زخم داشتند (جدول ۲).  $P < 0.05$  (\*)، دیابت در مقابل کنترل.  $P < 0.05$  (+)، دیابتی + CWP در مقابل کنترل.  $P < 0.05$  (#)، دیابت + CWP در مقابل دیابت.

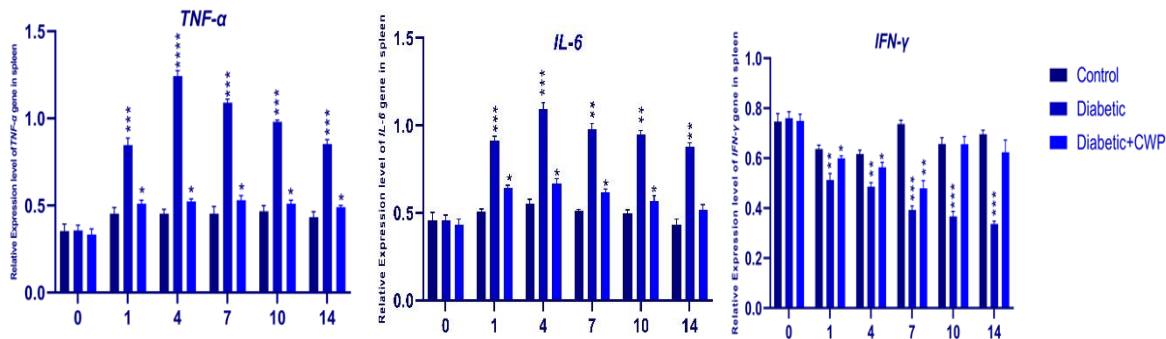
جدول ۲. سطح گلوکز و انسولین خون در سه گروه موش در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ پس از زخم بررسی شد.

روز پس از ایجاد زخم	گروه‌ها	گلوکز (mg/dl)	انسولین (ng/ml)
۱	کنترل	۱۳۷±۱۴	۵.۱±۰.۴۵
	دیابت	#*۴۱۹±۳۸	#*۱.۷±۰.۳۷
	دیابت+CWP	+۲۹۰±۱۸	+۳.۲±۰.۲۹
۴	کنترل	۱۴۴±۱۲	۶.۴±۰.۳۳
	دیابت	#*۳۹۷±۲۴	#*۱.۲±۰.۱۷
	دیابت+CWP	+۲۶۸±۳۱	+۳.۷±۰.۳۰
۷	کنترل	۱۱۰±۲۱	۶.۱±۰.۱۵
	دیابت	#*۳۷۶±۱۶	#*۱.۱±۰.۲۷
	دیابت+CWP	+۲۷۰±۱۱	+۴.۲±۰.۲۲
۱۰	کنترل	۱۰۰±۸	۷.۱±۰.۱۷
	دیابت	#*۴۲۰±۴۱	#*۱.۵±۰.۴۷
	دیابت+CWP	+۲۸۰±۱۷	+۴.۱±۰.۳۴
۱۴	کنترل	۱۱۵±۱۱	۶.۷±۰.۳۲
	دیابت	#*۳۸۴±۲۳	#*۱.۴±۰.۲۹
	دیابت+CWP	+۲۶۵±۱۶	+۳.۸±۰.۳۹

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

### تاثیر CWP بر سطح سایتوکاین‌ها در موش‌های دیابتی

سطح سیتوکین‌های پیش التهابی (IL-6 و TNF- $\alpha$ ) را که روند بهبود زخم را در بافت زخمی سه گروه موش کنترل می‌کنند، بررسی شد. داده‌های جمع آوری شده از ۱۰ موش جداگانه از هر گروه نشان داده شده است (شکل ۴). موش‌های دیابتی ۱ تا ۱۴ روز پس از آسیب، سطوح بالاتری از IL-6 (شکل ۴-الف) و TNF- $\alpha$  (شکل ۴-ب) نسبت به موش‌های دیابتی+CWP و گروه کنترل داشتند، که نشان می‌دهد که بهبود زخم در موش‌های دیابتی شامل یک مرحله پیش التهابی طولانی مدت است. در مقابل، سطح IFN- $\gamma$  (شکل ۴-ج) در موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های دیابتی+CWP و گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد. موش‌های دیابتی+CWP به طور قابل توجهی سطوح IL-6 و TNF- $\alpha$  را کاهش و سطح IFN- $\gamma$  را افزایش دادند.



شکل ۴. سطح سایتوکاین‌های *TNF- $\alpha$* ، *IL-6* و *IFN- $\gamma$*  از طحال در روزهای متفاوت توسط real time RT-PCR تعیین شد. داده‌ها نشان دهنده

میانگین  $\pm$  انحراف معیار است.  $p < 0.05$ ،  $p < 0.01$ ،  $p < 0.001$  و  $p < 0.0001$ \*\*\*

### بحث

پروتئین‌های آب پنیر شتر از معدود موادی (مکمل‌های غذایی) هستند که عملکرد تعدیل سیستم ایمنی آن‌ها با استفاده از مطالعات *in vitro* و *in vivo* اثبات شده است. CWP عملکردهای مختلف سلول‌های ایمنی مانند افزایش فعال سازی لنفوسیت‌ها، ترشح سیتوکین، تولید آنتی‌بادی، فعالیت فاگوسیتیک، و فعالیت گرانولوسیت را تعدیل می‌کند. همچنین تولید IL-1 $\beta$ ، IL-8، IL-6، پروتئین‌های التهابی ماکروفاژ (MIP-1 $\alpha$ ، MIP-1 $\beta$ ) و فاکتور نکروز تومور (TNF- $\alpha$ ) را افزایش می‌دهد (۱۵). CWP عملکرد سلول‌های ایمنی را در طول بیماری افزایش می‌دهد و نقش درمانی حیاتی در برخی از اختلالات خود ایمنی از جمله دیابت ایفا می‌کند. CWP بازآرایی‌های اسکلت سلولی و کموناسی را در سلول‌های B و T در طول دیابت افزایش می‌دهد، بنابراین پاسخ ایمنی را در موش‌های دیابتی بهبود می‌بخشد (۱۶). پپتیدهای آب پنیر دارای اثرات ضد سرطانی و اثرات ضد آپوپتوز در بیماران دیابتی است (۱۷). این امر فرصتی را برای محققان فراهم کرده است تا استراتژی‌های درمانی جدیدی را توسعه دهند. CWP تعداد ماست سل‌ها و تولید سیتوکین‌های مرتبط با آن‌ها و سایر واسطه‌های بیوشیمیایی را افزایش می‌دهد. CWP بیان TNF- $\alpha$  و mRNA های گیرنده مرگ سلولی (Fas) را تنظیم می‌کند و متعاقباً بسته شدن و بهبود زخم‌های دیابتی را افزایش می‌دهد (۱۸). به طور کلی، این ترکیبات تقویت‌کننده سیستم ایمنی هستند و طیف وسیعی از عملکردهای آن را تعدیل می‌کنند مانند اثرات پری بیوتیک، ارتقاء ترمیم بافت، حفظ یکپارچگی روده، تخریب پاتوژن‌ها و حذف سموم (۱۹). نشان داده شده است که افزودن WPC به رژیم غذایی به طور قابل توجهی پاسخ آنتی‌بادی اولیه و ثانویه دستگاه روده را به انواع آنتی ژن‌های مختلف بهبود می‌بخشد (۲۰). جوندگانی که رژیم غذایی حاوی ۲۰ درصد پروتئین WPC مصرف می‌کردند، پاسخ ایمنی قابل توجهی به واکسن آنفولانزا، سموم دیفتری و کزاز، واکسن فلج اطفال، اووالومین و سموم وبا نشان دادند (۲۲). علاوه بر این، مکمل CWP در موش‌های دیابتی ترمیم

بافت را از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و بازیابی سطوح سیتوکین‌های پیش التهابی و  $\beta$ -دفنسین، که بهبود زخم پوستی را تسریع می‌کند، ترویج می‌کند (۲۱).

اگرچه نقش تغذیه در بیماری‌های ایمنی و التهابی به خوبی ثابت شده است، نقش آن در فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی، مانند ترمیم زخم پوستی، به خوبی شناخته نشده است. بنابراین، مطالعات متعددی تلاش کرده‌اند تا نقایص اساسی در ترمیم زخم بیماران دیابتی را درک کنند. آنتی‌اکسیدان غذایی، مانند مکمل CWP، ممکن است از طریق تعدیل سطح گلوکز خون، استرس اکسیداتیو، فاکتورهای رشد و پاسخ التهابی، باعث تسریع در بهبود زخم در بیماران دیابتی شود. کاهش قابل توجهی در اندازه زخم که پس از درمان CWP در مطالعه حاضر مشاهده شد با یافته‌های هیستوپاتولوژیک مطالعات دیگر هم راستا بود: مانند افزایش بافت همبند، رگ‌زایی و بازسازی ماتریکس خارج سلولی. کلاژن نه تنها به ماتریکس بافت استحکام و یکپارچگی می‌بخشد، بلکه نقش مهمی در هموستاز و ترمیم اپیتلیال در مراحل بعدی ترمیم زخم دارد (۲۲).

کاهش رسوب کلاژن مختل در زخم‌های حاد بیماران دیابتی نوع ۱ به طور بالقوه به دلیل تکثیر فیبروبلاست است. سطح افزایش یافته هیدروکسی پرولین و در نتیجه افزایش سطح کلاژن احتمالاً بافت بازسازی شده را در موش‌های دیابتی دریافت کننده مکمل CWP تقویت می‌کند (۲۳). داده‌های ما نشان داد که تاخیر در ترمیم زخم مشاهده شده در موش‌های دیابتی با افزایش قابل توجهی در سطح گلوکز خون و کاهش آشکار سطح انسولین همراه بود. این اثرات با مصرف مکمل CWP معکوس شد. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که افزودن آب پنیر به وعده‌های غذایی باعث تحریک ترشح انسولین می‌شود. علاوه بر این، افزودن آب پنیر به یک وعده ناهار شامل پوره سیب زمینی و کوفته، میزان گلوکز خون پس از غذا را در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ کاهش می‌دهد (۲۴).

### نتیجه گیری

در این مطالعه، ما دریافتیم که تغییرات ماکروسکوپی و میزان بسته شدن زخم در موش‌های دیابتی دریافت کننده CWP به طور قابل توجهی کمتر از موش‌های دیابتی بدون مکمل بود. بسته شدن سریع زخم در موش‌های دیابتی تحت درمان با CWP ممکن است به تعدیل سطح سیتوکین‌ها و افزایش ایمنی سلولی نسبت داده شود. از آنجایی که هیدروکسی پرولین یک ترکیب اصلی است که تقریباً منحصراً در کلاژن یافت می‌شود، ما از محتوای آن به عنوان شاخصی برای میزان کلاژن نوع I در محل زخم استفاده کردیم. ما مشاهده کردیم که ترمیم زخم معیوب در موش‌های دیابتی با محتوای هیدروکسی پرولین کمتر همراه بود. با این حال، محتوای هیدروکسی پرولین پس از درمان CWP افزایش یافته است.

### سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌نمایند. همچنین از همکاری صمیمانه همکاران مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد کمال امتنان را داریم.

### References:

1. Dou Z, Liu C, Feng X, Xie Y, Yue H, Dong J, Zhao Z, Chen G, Yang J. Camel whey protein (CWP) ameliorates liver injury in type 2 diabetes mellitus rats and insulin resistance (IR) in HepG2 cells via activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Food & Function*. 2022; 13(1): 255-69.
2. Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 1;112:108615.

3. Schaper NC, Van Netten JJ, Apelqvist J, Lipsky BA, Bakker K, International Working Group on the Diabetic Foot. Prevention and management of foot problems in diabetes: A Summary Guidance for Daily Practice 2015, based on the IWGDF guidance documents. *Diabetes research and clinical practice*. 2017; 1;124:84-92.
4. Kido D, Mizutani K, Takeda K, Mikami R, Matsuura T, Iwasaki K, Izumi Y. Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress. *PLoS One*. 2017; 21; 12(12):e0189601.
5. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*. 2020; 30; 10(9): 200223.
6. Deng L, Du C, Song P, Chen T, Rui S, Armstrong DG, Deng W. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021; 4;2021.
7. Spampinato SF, Caruso GI, De Pasquale R, Sortino MA, Merlo S. The treatment of impaired wound healing in diabetes: looking among old drugs. *Pharmaceuticals*. 2020; 1; 13(4):60.
8. Badr G, Ramadan NK, Sayed LH, Badr BM, Omar HM, Selamoglu Z. Why whey? Camel whey protein as a new dietary approach to the management of free radicals and for the treatment of different health disorders. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2017; 20(4):338.
9. Badr G. Camel whey protein enhances diabetic wound healing in a streptozotocin-induced diabetic mouse model: the critical role of  $\beta$ -Defensin-1,-2 and-3. *Lipids in health and disease*. 2013; 12:1-1.
10. Nabuco HC, Tomeleri CM, Fernandes RR, Junior PS, Cavalcante EF, Cunha PM, Antunes M, Nunes JP, Venturini D, Barbosa DS, Burini RC. Effect of whey protein supplementation combined with resistance training on body composition, muscular strength, functional capacity, and plasma-metabolism biomarkers in older women with sarcopenic obesity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical nutrition ESPEN*. 2019; 1; 32: 88-95.
11. Jamshidi S, Mohsenpour MA, Masoumi SJ, Fatahi S, Nasimi N, Zahabi ES, Pourrajab B, Shidfar F. Effect of whey protein consumption on IL-6 and TNF- $\alpha$ : A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2022; 16(1):102372.
12. Ebaid H. Promotion of immune and glycaemic functions in streptozotocin-induced diabetic rats treated with un-denatured camel milk whey proteins. *Nutrition & metabolism*. 2014; 11(1):1-3.
13. Badr G, Bashandy S, Ebaid H, Mohany M, Sayed D. Vitamin C supplementation reconstitutes polyfunctional T cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of nutrition*. 2012; 51:623-33.
14. Mori R, Kondo T, Ohshima T, Ishida Y, Mukaida N. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *The FASEB journal*. 2002; 16(9):963-74.
15. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int Dairy J*. 2006; 16:1315–1323.
16. Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE. A bovine whey protein extract stimulates human neutrophils to generate bioactive il-1ra through a nf- $\kappa$ b-and mapk-dependent mechanism. *J Nutr*. 2010; 140:382–391.
17. Castro G, Maria D, Bouhallab S, Sgarbieri V. *In vitro* impact of a whey protein isolate (wpi) and collagen hydrolysates (chs) on b16f10 melanoma cells proliferation. *J Dermatol Sci*. 2009; 56: 51–57.
18. Ebaid H, Salem A, Sayed A, Metwalli A. Whey protein enhances normal inflammatory responses during cutaneous wound healing in diabetic rats. *Lipids Health Dis*. 2011; 10:1.
19. Low PPL, Rutherford KJ, Gill HS, Cross ML. Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/CMice. *Int Immunopharmacol*. 2003; 3: 393–401.

20. Laleye L, Jobe B, Wasesa A. Comparative study on heat stability and functionality of camel and bovine milk whey proteins. *JDairySci.* 2008; 91: 4527–4534.
21. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P. Whey proteins and peptides: Beneficial effects on immune health. 1st ed. Springer; 2006.
22. Ohura T, Nakajo T, Okada S, Omura K, Adachi K: Evaluation of effects of nutrition intervention on healing of pressure ulcers and nutritional states (randomized controlled trial). *Wound Repair Regen* 2011; 19: 330–336.
23. Black E, Vibe-Petersen J, Jorgensen LN, Madsen SM, Agren MS, Holstein PE, Perrild H, Gottrup F: Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control. *Arch Surg* 2003; 138: 34–40.
24. Frid AH, Nilsson M, Holst JJ, Björck IM: Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 69–75.

## بررسی بیان lncRNA های *PCNA3*، *MALAT1* و *GAS5* در سلول های *PC3* ترانسفکت شده با ژن کد کننده *Dermaseptin-B2*

عباس سلام ناظم المحمید<sup>۱</sup>، امین تقیان<sup>۲</sup>، فرشاد یداللهی<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. دکترای تخصصی ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** سرطان پروستات شایع ترین سرطان بین مردان در جهان است. این سرطان دومین سرطان شایع پس از سرطان ریه و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای پیشرفته می باشد. تنظیم میزان بیان lncRNA نقش مهمی در آپوپتوز و کنترل سرطان پروستات دارد. RNA های بلند غیر کد کننده *PCNA3*، *MALAT1* و *GAS5* در القای آپوپتوز نقش دارند. توسعه داروهای جدید ناشی از اکتشاف تنوع زیستی می تواند جایگزین های درمانی جدیدی را ایجاد کند. *Dermaseptin-B2* یک پپتید ضد میکروبی طبیعی است که از پوست قورباغه آمازون جدا می شود و دارای فعالیت ضد توموری است. مطالعه حاضر اثرات تیمار با *pCDNA3.1-Dermaseptin-B2* بر تغییرات سطح بیان ژن های *PCNA3*، *MALAT1* و *GAS5* در سلول های *PC3* انکوبه شده با سازواره نو ترکیب و سازواره فاقد ژن هدف را توصیف می کند.

**مواد و روش ها:** توالی ژن کد کننده *Dermaseptin-B2* از سایت NCBI گرفته شد و با کمک سایت های Addgene و Snapgene در وکتور بیانی *pCDNA3.1(+)* کلون شد. باکتری *اشریشیا کلی* سویه TOP10F توسط پلاسمید نو ترکیب *pCDNA3.1(+)-Dermaseptin-B2* ترانسفورم شد. پس از تکثیر پلاسمید نو ترکیب در باکتری، خالص سازی آن انجام گرفت. رده سلول های سرطانی *PC3* به کمک کیت لیپوفکتامین ۲۰۰۰ توسط وکتور نو ترکیب و وکتور فاقد ژن هدف ترانسفکت شد. از سلول های ترانسفکت شده استخراج RNA صورت گرفت و cDNA سنتز شد. سطح بیان ژن های *PCNA3*، *MALAT1* و *GAS5* با روش real-time RT-PCR و محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  تعیین شد. در مطالعه حاضر مقدار p کوچکتر از ۰/۰۵ به لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با *pCDNA3.1-Dermaseptin-B2* پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، سطح بیان ژن *PCNA3* که در مهار تکثیر چرخه سلولی دخیل است را به طور معنی داری کاهش داد ( $p < 0.01$ ) شد. از طرفی تیمار با *pCDNA3.1-Dermaseptin-B2* باعث افزایش بیان معنی دار ژن *GAS5* ( $p < 0.001$ ) و همچنین کاهش بیان معنی دار ژن *MALAT1* که در القای آپوپتوز نقش دارد، گردید ( $p < 0.0001$ ). تیمار رده سلولی *PC3* با وکتور فاقد ژن هدف هیچ گونه تغییر معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد.

**نتیجه گیری:** پژوهش حاضر تأیید می کند که *pCDNA3.1-Dermaseptin-B2* با تنظیم بیان ژن های *MALAT1*، *PCNA3* و *GAS5* آپوپتوز را القا می کند. نتایج این مطالعه به استفاده از *Dermaseptin-B2* به عنوان یک فاکتور درمانی پیشنهادی برای کاهش پیشرفت سرطان پروستات کمک می کند.

**کلمات کلیدی:** سرطان پروستات، *Dermaseptin-B2*، *GAS5*، *MALAT1*، *PCNA3*

نشانی نویسنده مسئول: استان آذربایجان غربی، ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه. کد پستی: ۵۷۵۶۱۵۱۸۱۸

همراه: ۰۹۱۳۲۸۲۸۴۷۳

تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۵۲۷۴۱

ایمیل: yadollahi.farshad@gmail.com



## Examining the expression of lncRNAs *PCA3*, *MALAT1* and *GAS5* in PC3 cells transfected with the gene encoding *Dermaseptin-B2*

Abbas Salam Nazim Almohaimid<sup>1</sup>, Amin Taghiyan<sup>2</sup>, Farshad Yadollahi<sup>3\*</sup>

1. M.sc in Genetics, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. B.Sc Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Ph.D. in immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

### Abstract

**Background:** Prostate cancer is the most common cancer among men in the world. This cancer is the second most common cancer after lung cancer and the third cause of cancer deaths in developed countries. Regulation of lncRNA expression plays an important role in apoptosis and control of prostate cancer. Long non-coding RNAs *PCA3*, *MALAT1* and *GAS5* are involved in apoptosis induction. The development of new drugs resulting from the discovery of biodiversity can create new therapeutic alternatives. *Dermaseptin-B2*, a natural antimicrobial peptide isolated from the skin of the Amazon frog, has antitumor activity. The present study describes the effects of treatment with pCDNA3.1-*Dermaseptin-B2* on changes in the expression level of *PCA3*, *MALAT1* and *GAS5* genes in PC3 cells incubated with the recombinant and free vector.

**Materials and methods:** The sequence of the *Dermaseptin-B2* coding gene was obtained from the NCBI site and cloned into the expression vector pCDNA3.1(+) with the help of Addgene and Snapgene sites. *Escherichia coli* strain TOP10F was transformed by pCDNA3.1(+)-*Dermaseptin-B2* recombinant plasmid. After multiplying the recombinant plasmid in bacteria, its purification was done. PC3 cancer cell line was transfected with the help of lipofectamine 2000 kit by recombinant vector and vector without the target gene. RNA was extracted from the transfected cells and cDNA was synthesized. The expression level of *PCA3*, *MALAT1* and *GAS5* genes was determined by real-time PCR method and  $\Delta\Delta C_t$  calculation. In the present study, p value smaller than 0.05 was considered statistically significant.

**Results:** The results of the present study showed that treatment with pCDNA3.1-*Dermaseptin-B2* after 24-hour incubation at 37 °C significantly reduced the expression level of *PCA3* gene, which is involved in the inhibition of cell cycle proliferation ( $p < 0.01$ ). became. On the other hand, treatment with pCDNA3.1-*Dermaseptin-B2* caused a significant increase in the expression of the *GAS5* gene ( $p < 0.001$ ) and also a significant decrease in the expression of the *MALAT1* gene, which plays a role in apoptosis induction ( $p < 0.0001$ ). Treatment of PC3 cell line with the vector lacking the target gene did not show any significant changes compared to the control group.

**Conclusion:** The present study confirms that pCDNA3.1-*Dermaseptin-B2* induces apoptosis by regulating the expression of *PCA3*, *MALAT1* and *GAS5* genes. The results of this study support the use of *Dermaseptin-B2* as a proposed therapeutic factor to reduce the progression of prostate cancer.

**Keywords:** Prostate cancer, *Dermaseptin-B2*, *GAS5*, *MALAT1*, *PCA3*.

### مقدمه

سرطان یکی از بیماری‌های مهم در جهان است که حاصل رشد بی رویه یک سلول است به نحوی که دچار تغییر در ژنوم خود شده و در نهایت باعث افزایش سرعت تکثیر و ناهماهنگی در برقراری رابطه آن سلول با دیگر سلول‌ها و محیط می‌گردد (۱ و ۲). هر ساله میلیون‌ها نفر از مبتلایان به انواع سرطان‌ها در سراسر دنیا تشخیص داده می‌شوند و بیش از نیمی از این افراد بر اثر سرطان می‌میرند. بر اساس پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی (WHO)، در سال ۲۰۳۰، تعداد زیادی از مردم، یعنی در حدود ۱۱/۴ میلیون نفر بر اثر ابتلا به سرطان خواهند مرد. پروستات یک اندام تناسلی به اندازه گردو است که در کانال لگنی به سمت مثانه تا آلت تناسلی قرار دارد. بروز سرطان پروستات در میان مردان بالاست و از هر ۷ مرد در ایالات متحده، ۱ نفر و در سراسر جهان ۱ نفر از هر ۲۵ نفر در طول زندگی خود به این بیماری بدخیم مبتلا می‌شوند (۳). بزرگ شدن پروستات که با افزایش سن رخ می‌دهد، هیپرپلازی خوش خیم پروستات (<sup>1</sup>BPH) نامیده می‌شود و با علائمی از جمله پلی اوری یا تکرر ادرار مشاهده شده در مردان بالای ۶۰ سال همراه است (۴). به دلیل شباهت در تظاهرات هیستوپاتولوژیک و مولکولی، BPH به عنوان مرحله‌ای در شروع تومور پروستات در نظر گرفته می‌شود. با این حال، مکانیسم دقیق مسئول ایجاد تومور پروستات از BPH به خوبی شناخته نشده است (۵). میزان بروز

<sup>1</sup>benign prostatic hyperplasia

سرطان پروستات در کشورهای توسعه یافته به دلیل در دسترس بودن آزمایش آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA<sup>2</sup>) برای تشخیص آن بیشتر است (۶). تومور پروستات از جمله تومورهای بدخیم در مردان است و آمارهای جدید منتشر شده نشان می‌دهد که میزان بروز آن در مقایسه با سال ۲۰۲۰، تعداد ۲۴۸۵۳۰ نفر افزایش یافته که منجر به مرگ ۳۴۱۳۰ نفر شده است. به لطف پیشرفت در زمینه پزشکی در سال‌های اخیر، به ویژه در کشورهای توسعه یافته، بهبود قابل توجهی در بقا و پیش آگهی بیماران مبتلا به تومور پروستات مشاهده شده است. سن، نژاد، ژنتیک، سابقه خانوادگی، چاقی و استعمال دخانیات، از جمله شایع‌ترین عوامل خطر ایجاد تومور پروستات هستند (۷ و ۸ و ۹). با توجه به نیاز دائمی به بهبود یا یافتن عوامل درمانی جدید علیه سرطان و به ویژه آن‌هایی که قادر به فرار از مقاومت دارویی و سایر عوارض جانبی مهم هستند، پپتیدها به یکی از اهداف جدید تحقیقاتی تبدیل شده‌اند. گروهی از پپتیدهای منبع طبیعی جالب از پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides: AMPs) تشکیل شده است. آن‌ها از طیف گسترده‌ای از موجودات مانند میکروارگانیسم‌های تک سلولی، حشرات، گیاهان، پرندگان، ماهی‌ها، دوزیستان و پستانداران از جمله انسان جدا شده‌اند. AMPها در ابتدا به دلیل نقششان در پاکسازی میکروارگانیسم‌ها کشف شدند، آن‌ها در پاسخ به عفونت توسط یک فرآیند تنظیمی متفاوت آزاد می‌شوند. AMPها عمدتاً غشای پلاسمایی را هدف قرار می‌دهند و به سرعت میکروارگانیسم‌ها را در شرایط آزمایشگاهی (در عرض چند دقیقه) از بین می‌برند. این فعالیت کشنده طیف وسیعی از جمله باکتری‌های گرم مثبت و منفی، قارچ‌ها و تک یاخته‌ها را پوشش می‌دهد، بدون اینکه برای سلول‌های پستانداران در دوزهایی که فعالیت ضد میکروبی نشان داده‌اند سیتوتوکسیک باشد. علاوه بر این، AMPها پاتوژن‌هایی را می‌کشند که به آنتی بیوتیک‌های معمولی مقاوم هستند و از آنجایی که تغییر سازمان غشای پلاسمایی آن برای میکروارگانیسم بسیار دشوار است، سطوح بالقوه پایینی از مقاومت القایی در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های معمولی رخ می‌دهد (۱۰). جالب توجه است، علاوه بر فعالیت‌های ذکر شده در بالا، تعداد فزاینده‌ای از مطالعات نشان داد که برخی از AMPهای کاتیونی طیف وسیعی از فعالیت سیتوتوکسیک را علیه سلول‌های سرطانی نشان می‌دهند (۱۱). ترشحات پوستی قورباغه درختی آمازونی *Phyllomedusa* دورنگ حاوی مولکول‌هایی با فعالیت ضد توموری و آنژیواستاتیک است و یکی از آن‌ها را به عنوان پپتید ضد میکروبی درماسپتین B2 (Drs) شناسایی شده است. Drs B2 از تکثیر و تشکیل کلنی انواع مختلف سلول‌های تومور انسانی، و تکثیر و تشکیل مویرگی سلول‌های اندوتلیال در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، Drs B2 رشد تومور رده سلولی PC3 آدنوکارسینوم پروستات انسانی را مهار می‌کند. تحقیقات در مورد مکانیسم اثر Drs B2 بر روی سلول‌های PC3 تومور، افزایش سریع مقدار سیتوزولی لاکتات دهیدروژناز، عدم فعال‌سازی کاسپاز-۳ و هیچ تغییری در پتانسیل غشای میتوکندری را نشان داد. تجزیه و تحلیل میکروسکوپ نشان داد که Drs B2 می‌تواند با سطح سلول تومور تعامل داشته باشد، سلول‌ها را جمع کرده و به آنها نفوذ کند. این داده‌ها با هم نشان می‌دهد که Drs B2 با آپوپتوز عمل نمی‌کند، بلکه احتمالاً با نکروز عمل می‌کند. در نتیجه، Drs B2 را می‌توان به عنوان یک مولکول پیشرو دارویی و درمانی جالب و امیدوارکننده برای درمان سرطان در نظر گرفت (۱۲). RNA بلند غیر کدکننده (LncRNAs) عناصر ژنومی با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که به دلیل نداشتن چهارچوب خوانش کامل (Frame Reading Open: ORF) قادر به تولید پروتئین نمی‌باشند. این عناصر با تغییر ساختار یا اتصال به پروتئین‌های خاص، در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌ها در مرحله رونویسی و پس از رونویسی نقش دارند و به تبع آن انواع مختلف عملکردهای سلولی مانند تکثیر، تمایز، تهاجم و آپوپتوز را کنترل می‌کنند (۱۳). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اختلال در میزان بیان LncRNA با تومورزایی بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان پروستات، پستان، سرویکس، ریه و کبد در ارتباط هستند. این عامل حاکی از نقش مهم RNA بلند غیر کدکننده در تومورزایی و پیشرفت سرطان به عنوان انکوژن یا سرکوب‌کننده تومور می‌باشد (۱۴). از آنجایی که *PCA3*، *GAS5* و *MALAT1* اختصاصاً در سرطان پروستات تغییر بیان معناداری دارند تاکنون باهم مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها، اختلاف بیان بین گروه‌های شاهد و رده سلول سرطانی PC3 ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب و وکتور فاقد ژن هدف گرفته شد. بر این اساس بررسی بیان ژن‌های

<sup>2</sup> prostate specific antigen

*PCA3* و *GAS5*, *MALATI* در سرطان پروستات نسبت به گروه شاهد، تحت عنوان تاثیر بیان RNAهای بلند غیر کدکننده در رده PC3 سرطان پروستات مورد هدف بوده است.

### مواد و روش‌ها

#### طراحی و تهیه سازواره *pcDNA3.1-Dermaseptin B2*

اطلاعات مربوط به توالی و کتور بیانی (+) *pcDNA3.1*، از سایت Addgene بدست آمد و با استفاده از نرم افزار Gene Runner جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده مشخص شد. اندازه این وکتور ۵۴۲۸bp است و دارای یک مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در پروکاریوت‌ها به عنوان شاخص انتخابگر و یک مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک در یوکاریوت‌ها به نام نئومایسین است. یک جایگاه برش چندگانه برای ورود ژن در بالادست (MSC) Multiple Cloning Site و یک پروموتور  $CMV^3$  که در پایین-دست آن یک توالی پلی A بنام bGH<sup>4</sup> وجود دارد. توالی ژن کدکننده پپتید *Dermaseptin-B2* از بانک ژن جهانی NCBI با کد دسترسی HW071719.1 و محصول ۲۶۴ جفت بازی گرفته شد. ردیف ژنی مورد نظر، تحت پروموتور پلاسمید بیانی (+) *pcDNA3.1* به صورت نرم افزاری طراحی گردید و سازواره نهایی طراحی شد. سپس ژن بصورت سنتتیک در وکتور بیانی (+) *pcDNA3.1* توسط شرکت GENEray چین کلون شد. در نهایت وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Dermaseptin-B2* با اندازه ۵۶۴۷ جفت باز با استفاده از جایگاه‌های برش *EcoRI* و *XbaI* ساخته شد. برای انتقال وکتور مذکور به درون سلول‌های *شریشیا کلی* سویه TOP10F، ابتدا باید سلول‌ها مستعد دریافت پلاسمید شوند. بنابراین در ابتدا نحوه تهیه سلول‌های مستعد و سپس مراحل ترانسفورماسیون ذکر می‌شود (۱۵).

#### ترانسفورماسیون *شریشیا کلی* سویه TOP10F با وکتور (+) *pcDNA3.1* حاوی قطعه ژنی

انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد باکتریایی با استفاده از روش شوک حرارتی روشی بنیادین در زیست‌شناسی مولکولی است. پایه و اساس اکثر روش‌های ترانسفورماسیون باکتری‌ها بر پایه مشاهدات Mandel و Higa در سال ۱۹۷۰ طراحی شده است (۱۶). مقدار ۵ میکرولیتر از وکتور نوترکیب (غلظت ۰/۲ میکروگرم/میکرولیتر) به میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد *شریشیا کلی* سویه TOP10F ( $10^7 - 10^8$  سلول در ۱ میلی لیتر محیط کشت،  $OD_{600} = 0.4$ ) افزوده شد و به همراه میکروتیوب کنترل منفی (حاوی فقط سلول مستعد) بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. اعمال شوک حرارتی به باکتری‌ها به وسیله دماهی  $42^{\circ}C$  به مدت ۹۰ ثانیه و سپس بلافاصله میکروتیوب بر روی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. یک میلی لیتر محیط LB مایع استریل بدون آنتی‌بیوتیک به میکروتیوب‌ها افزوده شد و در دمای  $37^{\circ}C$  در انکوباتور شیکردار با دور ۲۵۰ rpm به مدت ۲ ساعت دماهی شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و سپس مایع رویی حذف و رسوب باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر باقیمانده از محیط حل شد. باکتری‌های ترانسفورم شده به محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین با غلظت نهایی ۵۰ mg/ml منتقل و پس از کشت گسترده در انکوباتور  $37^{\circ}C$  به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد.

#### تأیید ترانسفورماسیون وکتور (+) *pcDNA3.1* حاوی قطعه ژنی *Dermaseptin B2*

ترانسفورماسیون وکتور (+) *pcDNA3.1* حاوی قطعه ژنی *Dermaseptin B2* به ۳ روش زیر تأیید شد.

۸) **PCR**: بیان ژن *Dermaseptin B2* در وکتور نوترکیب به منظور تایید صحت کلونینگ توسط PCR با پرایمرهای

اختصاصی *Dermaseptin B2* شامل:

F: 5'ATGGCTTCCCTGAAGAAGAGC 3'

R: 5'CTGCTCTCCCACAGCGTCTG 3'

تأیید شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برای هر واکنش انجام شد که حاوی ۱ میکرولیتر از وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Dermaseptin B2*، ۱ میکرولیتر از هر

<sup>3</sup> Human cytomegalovirus

<sup>4</sup> Bovine Growth Hormone Polyadenylation Signal

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

کدام از پرایمرهای F و R، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR، ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بودند. کنترل منفی واکنش شامل تمامی مواد فوق به جز DNA الگو یا همان پلاسمید نوترکیب بود. جهت انجام مراحل دمایی تکثیر ژن‌ها، میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شدند. دماهای واکنش PCR شامل چرخه‌های زیر بودند: یک مرحله دناتوره شدن اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری شامل ۳۰ ثانیه دناتوره شدن در ۹۴°C، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۲°C (برای ژن *Dermaseptin B2*) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس مرحله نهایی گسترش یا تکثیر در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

۹) **هضم آنزیمی دوگانه:** هضم آنزیمی توسط شرکت GENEray با استفاده از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *XbaI* انجام و نتایج روی ژل آگارز الکتروفورز شده و باندها بررسی شدند. برای انجام برش وکتور بیانی ابتدا وکتور طبق دستورالعمل توسط کیت استخراج پلاسمید ستونی استخراج شد و سپس واکنش هضم با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده *EcoRI* و *XbaI* به طور همزمان (هضم دوگانه) طبق جدول ۱ انجام شد. محلول فوق به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C دماهی شده و نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند.

جدول ۱: نسبت مواد برای برش همزمان با دو آنزیم برشی

مواد واکنش	حجم (میکرولیتر)
پلاسمید استخراج شده	۸ میکرولیتر (غلظت ۰/۵ μg/μl)
آنزیم <i>EcoRI</i>	۱ μl معادل ۱۰ واحد (۱۰ u/μl)
آنزیم <i>XbaI</i>	۱ μl معادل ۱۰ واحد (۱۰ u/μl)
بافر Tango (10X)	۲ μl
آب مقطر DNAase free و استریل	۸ μl
حجم نهایی	۲۰ μl

۱۰) **Sequencing:** توالی یابی نوکلئوتیدی وکتور نوترکیب توسط شرکت GENEray انجام و داده‌های آن ارسال شد.

### انتقال وکتورها (ترانسفکشن) به رده سلولی PC3

در این مطالعه به منظور بررسی اثرات وکتور نوترکیب بر سلول‌های سرطان پروستات از رده سلولی PC3 که از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد دریافت شد، استفاده گردید. ابتدا تعداد  $3 \times 10^5$  سلول PC3 در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شدند و سپس وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Dermaseptin B2* و وکتور فاقد ژن هدف *pcDNA3.1(+)* (به عنوان کنترل) به صورت جداگانه با استفاده از کیت لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به رده سلولی PC3 ترانسفکت گردید. روش ترانسفکشن به این صورت بود: ابتدا ۷/۵ میکرولیتر از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 بدون سرم و آنتی-بیوتیک اضافه شد. همچنین ۲/۵ میکروگرم در میکرولیتر DNA پلاسمیدی در ۱۵۰ میکرولیتر از محیط بدون سرم و آنتی-بیوتیک تهیه شد. سپس DNA پلاسمیدی رقیق شده و محلول لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر (به نسبت ۱:۱) مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از آن، محیط کامل (محیط RPMI دارای FBS و آنتی بیوتیک) روی سلول‌های کشت از هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای خارج شد و هر چاهک برای حذف FBS یک بار با PBS شسته شد و به هر چاهک محیط حاوی DNA پلاسمیدی و مخلوط لیپوفکتامین رقیق شده اضافه گردید. برای این آزمایش سه گروه با حداقل سه بار تکرار شامل سلول‌های PC3 ترانسفکت شده توسط وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Dermaseptin B2*، وکتور *pcDNA3.1(+)* فاقد ژن هدف (گروه شاهد) و همچنین سلول‌های تحت تیمار با محلول لیپوفکتامین (گروه کنترل جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک محلول لیپوفکتامین) در نظر گرفته شد. ۳ تا ۴ ساعت بعد مقداری FBS ۱۰٪ (با توجه به محیط کشت هر چاهک) به چاهک‌های ترانسفکت

شده (جهت ممانعت از از بین رفتن سلول‌ها) اضافه گردید. ۲۴ ساعت بعد محیط کشت RPMI 1640 حاوی آنتی‌بیوتیک و سرم ۱۰٪ و همچنین غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسین به سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Dermaseptin B2* و نیز وکتور *pcDNA3.1(+)* فاقد ژن هدف اضافه شد. پلیت حاوی سلول‌های تیمار شده به مدت ۳ روز و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت بررسی سلول‌ها و غربالگری سلول‌های ترانسفورم شده از غیر ترانسفورم در انکوباتور CO<sub>2</sub> قرار گرفتند. در نهایت، پس از ۷۲ ساعت از تیمار با نئومایسین، سلول‌های هر گروه از کف هر چاهک پلیت با استفاده از آنزیم تریپسین-EDTA ۰.۲۵٪ جدا شدند و برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

سلول‌ها Stable هستند زیرا به منظور بیان ژن هدف هفتاد و دو ساعت پس از ترانسفکشن سلول در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک نئومایسین رشد می‌کنند. هفتاد و دو ساعت پس از ترانسفکشن، استخراج RNA کل از سلول‌های PC3 ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب و نیز ترانسفورم شده با وکتور فاقد ژن هدف *pcDNA3.1(+)* و همچنین سلول‌های PC3 بدون تیمار (گروه کنترل) با استفاده از کیت RNX plus طبق دستورالعمل انجام شد. پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت RNA از باندهای 18s و 28s rRNA با الکتروفورز ژل آگارز ۱.۲٪ بررسی گردید. غلظت نمونه‌ی RNA تخلیص شده از مرحله‌ی قبل حدود ۱۰۰ نانوگرم در ۱ μl تشخیص داده شد و طبق پروتکل کیت برای سنتز cDNA به حداقل غلظت ۵۰۰ ng نیاز است. در این مرحله ۵ μl RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA استفاده شد.

### بررسی بیان نسبی ژن‌های *GAS5*، *MALAT1* و *PCA3* با real time RT-PCR

در این پژوهش به منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های *GAS5*، *MALAT1* و *PCA3* از روش real time RT-PCR استفاده گردید. برای بررسی اثرات وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Dermaseptin B2* بر روی بیان نسبی ژن‌های *MALAT1*، *GAS5* و *PCA3* در بافت‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب حاوی ژن هدف در مقایسه با بافت‌های دریافت کننده پلاسمید دست نخورده و فاقد ژن هدف، بافت دریافت کننده PBS به عنوان گروه کنترل، از تکنیک PCR کمی یا real time PCR استفاده شد. نام ژن‌ها و پرایمرهای مورد استفاده برای هر واکنش در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. تمامی پرایمرهای ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار Gene Runner نسخه ۳/۰۵ طراحی و سفارش داده شد. توالی هر کدام از ژن‌ها از بانک اطلاعاتی GenBank در NCBI بدست آمد. در این مطالعه، میزان بیان ژن‌های هدف با بیان ژن *GAPDH* (به عنوان کنترل داخلی) مقایسه و تجزیه و تحلیل منحنی استاندارد برای هر کدام از ژن‌ها انجام شد. شرایط دمایی زیر برای واکنش q-PCR مورد استفاده قرار گرفت: یک مرحله دناتوره شدن اولیه (Hold) در دمای ۹۵°C در مدت ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل تکراری شامل دناتوره شدن در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها (دمای متغییر) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه.

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای ژن‌های هدف برای انجام real-time RT-PCR

نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	اندازه محصول
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F: 5'- TCCCGTACAAAATGGTGAAGG -3' GAPDH-R: 5'- ATGTTAGGGGGTCTCGCTCCTG -3'	۶۵°C	۲۶۱bp
<i>MALAT1</i>	MALAT1-F: 5'- TAGATAAAACCACTCAAACCTCTGC-3' MALAT1-R: 5'- TTATGCCTGGTTAGGTATGAGC -3'	۵۸°C	۱۱۲bp
<i>PCA3</i>	PCA3 -F: 5'- ATTTCCTGACTACAAGTATCC -3' PCA3 -R: 5'- GTAGGAATAGAATGCACACAG -3'	۵۶°C	۱۹۳bp
<i>GAS5</i>	GAS5-F: 5'- ATTGGCACACAGGCATTAGACAG -3' GAS5-R: 5'- CTTCTTTAAACTTGCTCCACACAG -3'	۶۴°C	۲۰۶bp

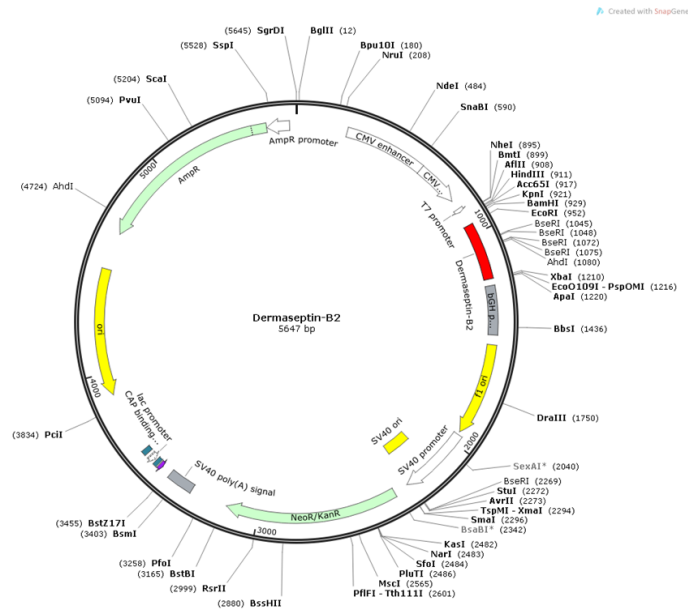
## آنالیز آماری

داده‌ها از نوع پارامتریک هستند و تمامی آزمایش‌ها در این پژوهش حداقل دو بار تکرار شدند و داده‌های real time PCR از طریق محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  به وسیله‌ی نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۰ (SPSS, Inc.)، شیکاگو، آمریکا) و Excel ۲۰۱۰ (Microsoft Corporation، آمریکا) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. میانگین تفاوت بین گروه‌ها جهت بررسی وجود ارتباط و میزان معنی‌داری داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری آزمون پارامتریک T مستقل و همچنین تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA یک طرفه) محاسبه شدند. تمامی نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹ برای ویندوز (GraphPad, San Diego, California, www.graphpad.com) تهیه شدند. در این مطالعه مقدار  $p$  کوچکتر از ۰/۰۵ به لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### سنتز سازواره نهایی pcDNA3.1(+)-*Dermaseptin B2*

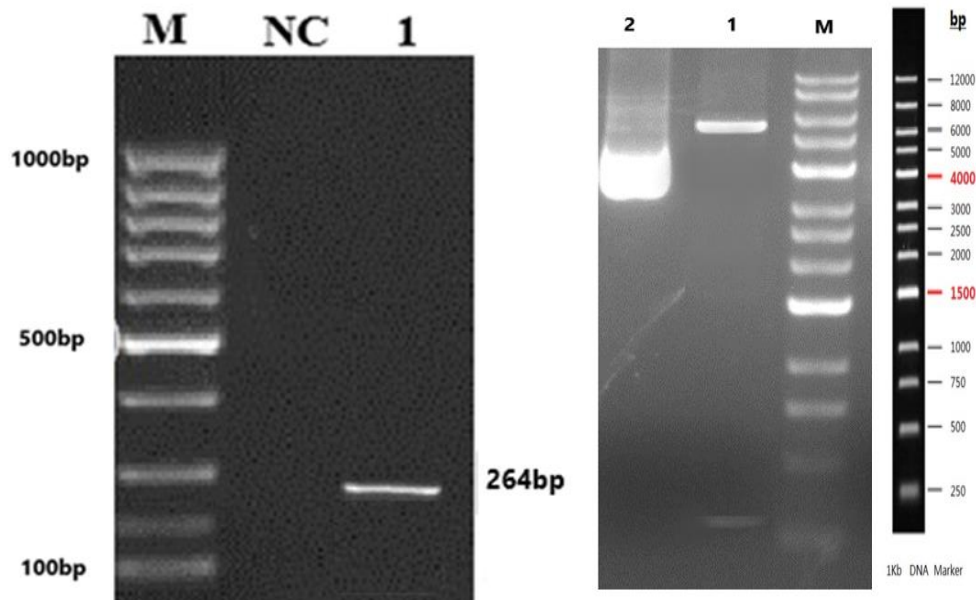
سازواره نهایی از کلون‌سازی ژن *Dermaseptin B2* در پلاسمید pcDNA3.1(+) و تولید پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1(+)-*Dermaseptin B2* حاصل گردید. نمای شماتیک این پلاسمید نو ترکیب در شکل ۱ مشاهده می‌شود. ژن کد کننده *Dermaseptin B2* در وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+)-*Dermaseptin B2* با اندازه ۵۶۴۷ bp استفاده از جایگاه‌های برش *XbaI* و *EcoRI* کلون شد.



شکل ۱: ساختار شماتیک پلاسمید pcDNA3.1(+)-*Dermaseptin B2*

### تایید پلاسمید نو ترکیب به روش PCR و هضم آنزیمی

انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *Dermaseptin B2* روی پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1(+) سبب تکثیر یک قطعه DNA با اندازه ۲۶۴ جفت باز گردید، که تایید کننده صحت کلون‌سازی این ژن در وکتور بیانی می‌باشد (شکل ۲). صحت قرار گرفتن ژن *Dermaseptin B2* در وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+) توسط شرکت GENEray با استفاده از روش هضم آنزیمی دوگانه (با کمک آنزیم‌های محدود کننده *XbaI* و *EcoRI*) وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+)-*Dermaseptin B2* تایید شد و نتیجه بصورت عکس ژل ارسال شد (شکل ۳).

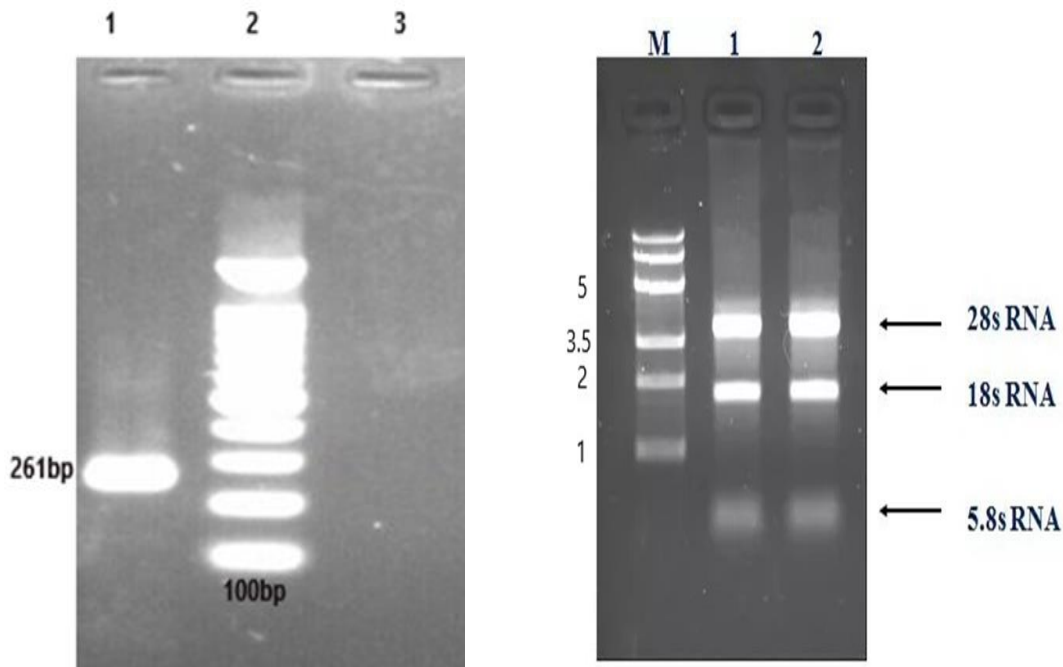


شکل ۳- هضم آنزیمی دوگانه. M: مارکر ۱ Kb (Geneaid) شکل ۲- از سمت چپ؛ M: لدر 100 bp (سیناکلون، ایران)،  
 1: هضم آنزیمی دوگانه که باند 264bp ژن *Dermaseptin B2* را به همراه باند 5647bp مربوط به وکتور فاقد ژن هدف نشان می‌دهد. 2: باندها از بالا به پایین فرم حلقوی برش خورده، فرم خطی

NC: کنترل منفی، 1: باند 264 bp ژن *Dermaseptin B2*

### تایید RNA استخراج شده و DNA سنتز شده از سلول PC3 ترانسفکت شده

RNA استخراج شده از سلول PC3 ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب *Dermaseptin B2* و وکتور فاقد ژن هدف به منظور بررسی کیفیت و مشاهده باندهای 18s و 28s الکتروفورز شد (شکل ۴). به منظور تعیین صحت cDNA سنتز شده از واکنش PCR استفاده شد. برای انجام این واکنش از پرایمر رفرنس ژن خانه دار *GAPDH* استفاده شد. مشاهده باند مربوط به ژن رفرنس در PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ به اندازه 261bp به وسیله دستگاه ژل داک تأیید شد. همچنین به منظور تأیید انجام واکنش و آلوده نبودن مواد از نمونه کنترل منفی استفاده شد که به جای cDNA از آب استفاده شد (شکل ۵).



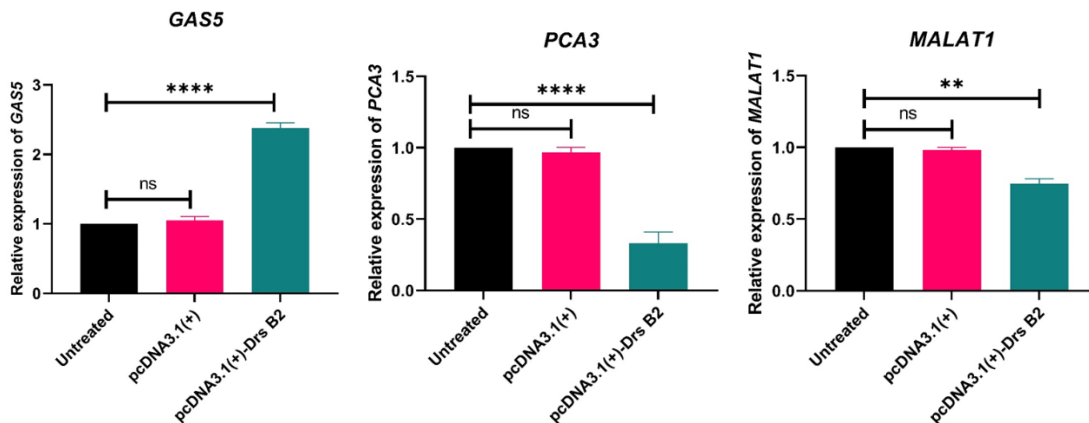
شکل ۵- تایید صحت cDNA به روش PCR. M: مارکر ۵۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران)، ۱: باند ۲۶۱ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن GAPDH. ۲: مربوط به کنترل منفی می‌باشد.

شکل ۴- حضور باندهای 28S و 18S ریبوزومی در RNA استخراج شده. M: مارکر 1 Kb (Geneaid Biotech Ltd، تایوان)، ۱: RNA استخراج شده از طحال موش ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب، ۲: RNA استخراج شده از طحال موش ترانسفورم شده با پلاسمید فاقد ژن هدف

### نتایج بررسی بیان ژن‌ها در سلول‌های رده‌ی PC3 سرطان پروستات

مقایسه بررسی سطح بیان ژن‌های *GAS5*، *MALATI* و *PCA3* در سلول‌های رده‌ی PC3 سرطان پروستات پس از نرمال‌سازی با ژن مرجع (*GAPDH*) با توجه به روش Livak صورت پذیرفت. طبق شکل ۶ نتایج حاکی از آن است که میزان سطح بیان ژن *MALATI* در رده سلول سرطانی PC3 تیمار شده با وکتور نوترکیب در مقایسه با سلول سرطانی دریافت کننده وکتور (+)pcDNA3.1 فاقد ژن هدف و گروه شاهد از نظر آماری کاهش معنی‌دار یافته بود ( $p < 0.001$ ). همچنین نتایج نشان داد که سطح بیان ژن *GAS5* در رده سلول سرطانی PC3 تیمار شده با وکتور نوترکیب در مقایسه با رده سلول سرطانی دریافت کننده وکتور (+)pcDNA3.1 فاقد ژن هدف و گروه شاهد از نظر آماری افزایش معنی‌دار یافته بود ( $p < 0.00001$ ). همچنین نتایج نشان داد که سطح بیان ژن *PCA3* در رده سلول سرطانی PC3 تیمار شده با وکتور نوترکیب در مقایسه با رده سلول سرطانی دریافت کننده وکتور (+)pcDNA3.1 فاقد ژن هدف و گروه شاهد از نظر آماری کاهش معنی‌دار یافته بود ( $p < 0.00001$ ).





شکل ۶- سطح بیان *GAS5*، *MALAT1* و *PCA3* در رده سلول PC3 سرطان پروستات توسط real time RT-PCR تعیین شد. داده‌ها نشان

دهنده مانگ،  $\pm$  انحراف معیار است.  $p < 0.05$ ،  $^{*}p < 0.01$ ،  $^{**}p < 0.001$ ،  $^{***}p < 0.0001$  و  $^{****}p < 0.0001$

### بحث

سرطان یک مسئله جهانی است و انتظار می‌رود که تأثیر عمده‌ای بر بحران بهداشت جهانی داشته باشد. با افزایش سن جمعیت، شاهد افزایش میزان بروز سرطان هستیم، اما تغییرات قابل توجهی در میزان بقا در مناطق مختلف جغرافیایی و انواع سرطان مشاهده می‌شود. هم سرطان سینه و هم سرطان پروستات از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان هستند. اگرچه آمار سرطان حاکی از بهبود در برخی از زمینه‌های پیشگیری، تشخیص و درمان سرطان سینه و پروستات است، اما چنین آماری به وضوح نیاز به بهبود درک ما از این بیماری، عوامل خطر و مداخلات را برای بهبود طول عمر و کیفیت زندگی برای همه بیماران نشان می‌دهد (۱۷).

بار جهانی بروز سرطان و مرگ و میر قابل توجه است و پیش بینی می‌شود علیرغم پیشرفت‌های صورت گرفته در تشخیص، درمان و مدیریت سرطان، افزایش یابد. از بین بیش از ۲۰۰ نوع مختلف سرطان انسانی، سرطان سینه (BC) و سرطان پروستات (PC) به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردشان از جمله منشاء، جهش‌های اکتسابی، الگوهای بیان ژن، شبکه‌های رونویسی و سیگنالی اصلاح‌شده، متابولیک، جزو سرطان‌های برتر هستند (۱۸).

برآوردهای سازمان جهانی بهداشت (WHO) نشان می‌دهد که سرطان در ۱۱۲ کشور از ۱۸۳ کشور یکی از دو عامل اصلی مرگ و میر است. در ۲۳ کشور دیگر، رتبه سوم یا چهارم را دارد. در سال ۲۰۲۰، ۱۹/۳ میلیون مورد سرطان جدید (۱۰/۱ میلیون مرد در مقابل ۹/۲ میلیون زن)، به اضافه ۹/۹ میلیون مرگ ناشی از سرطان (۵/۵ میلیون مرد در مقابل ۴/۴ میلیون زن) در سراسر جهان وجود داشت. تقریباً ۵۰ درصد موارد و بیش از ۵۰ درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان در آسیا رخ داده است، قاره‌ای با ۶۰ درصد جمعیت جهان. در مقابل، اروپا ۲۲/۸ درصد از کل موارد و ۱۹/۶ درصد از مرگ و میرها، و قاره آمریکا ۲۰/۹ درصد موارد و ۱۴/۲ درصد مرگ و میر داشته‌اند (۱۹).

Pickard و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند در حالی که نقش RNAهای غیر کدکننده کوچک، مانند miRNAها، در کنترل آپوپتوز به خوبی ثابت شده است، RNAهای طولانی غیر کدکننده (lncRNAها) کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. *GAS5* snoRNAهای متعددی را در داخل اینترون‌های خود رمزگذاری می‌کند، در حالی که توالی‌های اگزونیک lncRNA تولید می‌کنند که می‌تواند به عنوان رپرسور گلوکوکورتیکوئید و گیرنده‌های مرتبط عمل کند. *GAS5* به طور منفی بقای سلول‌های لنفاوی و پستان را تنظیم می‌کند و به طور نابجا در چندین سرطان بیان می‌شود. اگرچه سطح *GAS5* سلولی با به دست آوردن مقاومت در برابر اخته شدن سلول‌های سرطانی پروستات کاهش می‌یابد، تأثیر *GAS5* بر بقای سلول‌های پروستات مشخص نشده است. برای پاسخ به این سوال، رده‌های سلولی پروستات با پلاسמידهای کدکننده *GAS5* یا siRNAهای *GAS5* ترانسفکت شدند و بقای سلولی ارزیابی شد. آپوپتوز پایه افزایش یافت و بقای سلولی پس از ترانسفکشن سلول‌های Rv1۲۲ با پلاسמידهای کدکننده رونوشت‌های *GAS5*، از

جمله *IncRNA GAS5* بالغ، کاهش یافت. اثرات مشابهی در سلول‌های PC-3 مشاهده شد. بنابراین، *GAS5* آپوتوز سلول‌های پروستات را ارتقا می‌دهد و توالی اگزونیک، یعنی *GAS5 IncRNA*، برای این فعالیت کافی است. بنابراین سطوح پایین غیر طبیعی بیان *GAS5* ممکن است اثربخشی عوامل شیمی درمانی را کاهش دهد. اگرچه اخیراً نشان داده شده است که چندین *IncRNA* بقای سلول را کنترل می‌کنند (۲۰).

Chandra و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند *RNA*های طولانی غیر کد کننده (*IncRNA*) رونوشت‌های غیر کد کننده‌ای هستند که حاوی ۲۰۰ نوکلئوتید یا بیشتر هستند. در حالی که این رونوشت‌ها برای کدگذاری پروتئین‌ها کاربردی نیستند، تقریباً در تمام فرآیندهای بیولوژیکی از جمله بیان ژن، تنظیم چرخه سلولی، سنتز پروتئین و حمل و نقل سلولی شرکت می‌کنند. اخیراً *SNP*های *IncRNA* با سرطان مرتبط شناخته شده‌اند و ممکن است به عنوان یک عامل خطر دیگر برای *PCa* عمل کنند. نشان داده شده است که چندین *IncRNA* باعث متاستاز و تکثیر انواع مختلف سرطان می‌شوند، در حالی که برخی دیگر به عنوان سرکوب کننده تومور عمل می‌کنند. این ویژگی‌های *IncRNA* نشان می‌دهد که ممکن است به‌عنوان نشانگر زیستی امیدوارکننده *PCa* و همچنین هدفی برای درمان‌های درمانی بعدی باشد (۲۱).

Ghiam و همکاران (۲۰۱۷) سرطان انسان یک سندرم جامع است که در آن جهش‌های ژنتیکی مختلف و پروفایل‌های بیان ژنی تغییر یافته، ماکرومولکول‌های مختلفی را تولید می‌کنند که می‌توانند در تشخیص و درمان سرطان استفاده شوند. *LncRNA*ها عملکردهای متنوعی از تنظیم تکثیر سلولی، متاستاز و پیشرفت سرطان را نشان می‌دهند. آن‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص و درمان اولیه استفاده شده‌اند. و عملکردهای تنظیمی در رشد تومور از خود نشان داده‌اند. چندین خط از *IncRNA* نقش مهمی در عملکرد *PCa* دارند (۲۲).

Lemos و همکاران (۲۰۱۹) با بیان اینکه آنتی ژن سرطان پروستات ۳ (*PCA3*) یک *RNA* طولانی غیر کدکننده پروستات (*IncRNA*) است که بیش از حد بیان می‌شود. از ناحیه اینترونیک در بازوی بلند کروموزوم انسانی ۲۲-۲۱q۹ رونویسی شده است. *PCA3* بقای سلول‌های سرطان پروستات (*PCa*) را از طریق تعدیل سیگنال‌های گیرنده آندروژن (*AR*) تعدیل می‌کند، علاوه بر کنترل بیان چندین ژن پاسخگو به آندروژن و مرتبط با سرطان، از جمله نشانگرهای گذار اپیتلیال-مزانشیمی (*EMT*) و آن‌هایی که ژن را تنظیم می‌کنند. بیان و سیگنال دهی سلولی همچنین، سطح ادرار *PCA3* با موفقیت به عنوان نشانگر زیستی تشخیصی *PCa* استفاده شده است. در این بررسی، یافته‌های اخیر در مورد *PCA3*، پرداختن به ساختار ژنی آن، کاربردهای احتمالی به‌عنوان نشانگر زیستی، منشأ پیشنهادی این *IncRNA*، نقش‌ها در زیست‌شناسی و الگوهای بیان *PCa* را برجسته کرده‌اند. ما همچنین داده‌های مربوط به تعاملات *PCA3* با *miRNA*های مرتبط با سرطان و بیان در سایر بافت‌ها و بیماری‌های فراتر از پروستات را به‌روزرسانی کردیم. در مجموع، داده‌ها بیان ناهنجار و فعالیت بی‌نظم *PCA3* را نشان می‌دهند، که *PCA3* را به عنوان یک هدف مرتبط امیدوارکننده نشان می‌دهد که باید حتی بیشتر در مورد کاربرد آن برای تشخیص و مدیریت *PCa* ارزیابی شود (۲۳).

Hao و همکاران (۲۰۲۰) طی مطالعه‌ای بیان کردند که *MALAT1*، مانند *MEG3*، همچنین ممکن است با *EZH2* متصل شود و بیان ژن‌های فعال شده *EZH2* را تنظیم کند. نشان داده شد که ژن‌های هدف *EZH2* و همچنین مهاجم و مهاجرت با واسطه *EZH2* را تقویت می‌کند. نابودی این *IncRNA* حتی ژن‌های سرکوب شده *EZH2* را سرکوب کرده است. این نشان می‌دهد که *MALAT1* ممکن است نقش حیاتی در تعاملات *EZH2* داشته باشد، که به طور ویژه قابل توجه است زیرا *EZH2* اغلب در *CRPC* بیش از حد بیان می‌شود. شکست *MALAT1* باعث کاهش تومورزایی سرطان پروستات در موش‌ها می‌شود و نشان می‌دهد که *MALAT1* سیگنالینگ *AR* را از طریق *miR-320b* غیرفعال می‌کند. مطالعه دیگری نشان می‌دهد که *MALAT1* به عنوان یک *miR-140* است، زیرا *MALAT1* خاموش کننده *mRNA* تکرار *IAP* باکولوویروس حاوی ۶ (*BIRC6*)، یک مهارکننده آپوتوز را کاهش می‌دهد. معرفی بازدارنده *miR-140* این اثرات را کاهش داد، که نشان می‌دهد *MALAT1 miR-* ۱۴۰ اجازه تنظیم مثبت *BIRC6* را می‌دهد (۲۴).

### نتیجه گیری

یکی از بدخیم ترین تومورها در مردان سرطان پروستات است که به دلیل ماهیت ناهمگن و پیشرونده آن هنوز غیر قابل درمان است. تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی نقش مهمی در رشد آن دارند. مولکول های RNA با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید به عنوان lncRNA شناخته می شوند و این عوامل اپی ژنتیک پروتئین را رمزگذاری نمی کنند. آن ها بیان ژن را در سطوح رونویسی، پس از رونویسی و اپی ژنتیک تنظیم می کنند. LncRNA ها عملکردهای بیولوژیکی حیاتی را در سلول ها و در رویدادهای پاتولوژیک ایفا می کنند، از این رو بیان آن ها دچار اختلال در تنظیم می شود. با توجه به تمام خصوصیات Drs B2، در مطالعه حاضر، اثرات درماسپتین B2 بر بیان ژن های *PCA3*، *MALAT1* و *GAS5* در رده سلولی سرطان پروستات PC3 ترانسفکت شده با pcDNA3.1(+)-*Dermaseptin-B2* مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر موفق به ساخت وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-*Dermaseptin-B2* القا کننده آپوپتوز علیه سرطان پروستات شدیم. اثرات درمانی این وکتور نوترکیب در برابر سرطان بالا است. این یافته ها نشان می دهد که درماسپتین B2 یک ترکیب طبیعی با پتانسیل بسیار زیاد برای کاربردهای پزشکی در آینده است.

### سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه ی مقطع کارشناسی ارشد می باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند. همچنین از همکاری صمیمانه همکاران مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد کمال امتنان داریم.

### References:

37. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. In Seminars in cancer biology 1999; 9(2): 125-138.
38. Chouaib S, Kieda C, Benlalam H, Noman MZ, Mami-Chouaib F, et al. Endothelial cells as key determinants of the tumor microenvironment: interaction with tumor cells, extracellular matrix and immune killer cells. Critical Reviews™ in Immunology. 2010; 30(6).
39. Bray FF, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, et al. Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Ca Cancer J Clin. 2020; 70(4): 313.
40. Han WJ, Guo YG, Wang YQ, Wang JW. The effectiveness of electrical stimulation for the management of benign prostatic hyperplasia: A protocol for systematic review and meta analysis. Medicine. 2020; 99(19): e19921.
41. Miah S, Catto J. BPH and prostate cancer risk. Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India. 2014; 30(2): 214.
42. Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, et al. Prevention and early detection of prostate cancer. The lancet oncology. 2014; 15(11): e484-92.
43. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2022; 72(1): 7-33.
44. Barsouk A, Padala SA, Vakiti A, Mohammed A, Saginala K, et al. Epidemiology, staging and management of prostate cancer. Medical sciences. 2020; 8(3): 28.
45. Souod N, Kargar M, Doosti A, Ranjbar R, Sarshar M. Genetic Analysis of cagA and vacA Genes in Helicobacter Pylori Isolates and Their Relationship with Gastroduodenal Diseases in the West of Iran. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2013; 15(5): 371-6.

46. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015; 136(5): e359-86.
47. Rock J, Jones H. *Linde's Operative Gynecology*. 10th ed. Lippincott Williams & Wilkins pub. 2008; 1057-8.
48. Van zoggel H, Carpentier G, Dos Santos C, et al. Antitumor and angiostatic activities of the antimicrobial peptide dermaseptin B2. *PLoS One*. 2012; 7(9): e44351.
49. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*. 2020; 11: 582779.
50. Xing YH, Yao RW, Zhang Y, Guo CJ, Jiang S, et al. SLERT regulates DDX21 rings associated with Pol I transcription. *Cell*. 2017; 169(4): 664-78.
51. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(11): 3240-3244.
52. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*. 1970; 53(1): 159-162.
53. De Silva F, Alcorn J. A tale of two cancers: A current concise overview of breast and prostate cancer. *Cancers*. 2022; 14(12): 2954.
54. Doosti A, Zamani M, Ghasemi Dehkordi P, Taheri S, Banitalebi M, Mahmoudzadeh M. Association of the p53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in South West of Iran. *Scientific Research and Essays*. 2011; 6 (15): 3148-3152.
55. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*. 2021; 149(4): 778-89.
56. Pickard MR, Mourtada-Maarabouni M, Williams GT. Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013; 1832(10): 1613-23.
57. Chandra Gupta S, Nandan Tripathi Y. Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: from biomarkers to therapeutic targets. *International journal of cancer*. 2017; 140(9): 1955-67.
58. Ghiam AF, Vesprini D, Liu SK. Long non-coding RNAs: new frontiers for advancing personalized cancer medicine in prostate cancer. *Transl Androl Urol*. 2017; 6: 326–330.
59. Lemos AE, da Rocha Matos A, Ferreira LB, Gimba ER. The long non-coding RNA PCA3: an update of its functions and clinical applications as a biomarker in prostate cancer. *Oncotarget*. 2019; 10(61): 6589.
60. Hao T, Wang Z, Yang J, Zhang Y, Shang Y, et al. MALAT1 knockdown inhibits prostate cancer progression by regulating miR-140/BIRC6 axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020; 123: 109666.

## افزایش ترکیب دارویی متیل چاویکول در ریحان بنفش با استفاده از بیوپلیمر زیستی کیتوزان

فاطمه ملک پور<sup>۱\*</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** یکی از پلیمرهای زیست سازگار، با قابلیت تجزیه بیولوژیکی کیتوزان است. کیتین و کیتوزان به عنوان یک آمینو پلی ساکارید طبیعی که دارای ساختمان بی نظیر و خصوصیتی چند منظوره هستند، به طور وسیعی در پزشکی و صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می گیرند. کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، به عنوان یک الیسیتور زیستی، باعث بهبود بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر الیسیتور کیتوزان بر ترکیبات شیمیایی گیاه دارویی ریحان بنفش بود.

**مواد و روش‌ها:** این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. بدین منظور گیاه ریحان تحت تیمارهای مختلف، غلظت‌های ۰، ۰/۲ و ۰/۴ گرم در لیتر کیتوزان در سه مرحله رویشی، پیش‌گلدهی و گلدهی تیمار شد و یک هفته بعد از اعمال تیمار برداشت شدند. ترکیبات اسانس به وسیله کروماتوگرافی گازی (GC/MS) شناسایی شد. یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد میزان اسانس گیاه با محلول پاشی کیتوزان به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که میزان ترکیب متیل چاویکول به عنوان مهمترین ترکیب ثانویه ریحان، تحت تأثیر الیسیتور کیتوزان در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری یافت.

**نتیجه گیری:** از آنجایی که کیتوزان باعث افزایش میزان متیل چاویکول در ریحان می‌شود، بنابراین می‌توان از کیتوزان به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد برای افزایش ترکیبات فنیل پروپانوییدی که دارای خواص دارویی بیشماری هستند، استفاده کرد و می‌توان نتیجه گرفت که محلول پاشی کیتوزان به عنوان یک روش می‌تواند برای افزایش عملکرد اسانس و افزایش ترکیبات فنیل پروپانوییدی ریحان مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** گیاهان دارویی، ریحان بنفش، کیتوزان، متیل چاویکول

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۲۸۴۷۴۲۴

پست الکترونیک: Fmalekpoor87@yahoo.com

## Increasing the medicinal compound of methyl chavicol in purple basil using biopolymer chitosan

Fateme Malekpoor<sup>1\*</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Chitosan is one of the biocompatible polymers with the ability to biodegrade. Chitin and chitosan are widely used in medicine and pharmaceutical industry as a natural amino polysaccharide that has a unique structure and multifunctional properties. Chitosan, one of the main components of the cell wall of many fungal species, as a bioelastomer, improves the biosynthesis of secondary metabolites. The aim of this study was to evaluate the effect of chitosan elicitor on chemical compounds of purple basil.

**Materials and Methods:** This experiment was done as a factorial based on a completely randomized design with 3 replications. For this purpose, basil plants were treated with different treatments, concentrations of 0, 0.2 and 0.4 grams per liter of chitosan in three stages of vegetative, pre-flowering and flowering, and they were harvested one week after applying the treatment. Essential oil compounds were identified by gas chromatography (GC/MS).

**Results:** The results of variance analysis of the data showed that the amount of plant essential oil increased significantly with chitosan spraying. In addition, the results showed that the amount of methyl-chavicol compound, as the most important secondary compound of basil, increased significantly under the effect of chitosan elicitor in comparison with the control samples.

**Conclusion:** Since chitosan increases the amount of methyl chavicol in basil, therefore, chitosan can be used as an efficient biological elicitor to increase phenylpropanoid compounds that have numerous medicinal properties, and it can be concluded that the solution Spraying as a method can be used to increase the performance of essential oil and increase the phenylpropanoid compounds of basil.

**Keywords:** Medicinal plants, purple basil, chitosan, methyl chavicol

### مقدمه

کیتوزان یک پلی ساکارید گلوزامین مشتق شده از کیتین است که به عنوان الیسیتور زیستی برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود. کیتوزان در اسکلت خارجی بندپایان مانند حشرات، خرچنگ دریایی، میگوها، خرچنگ‌ها و دیواره سلولی نوع خاصی از جلبک‌ها وجود دارد (۱) که فعالیت زیستی از قبیل تحریک رشد، افزایش عملکرد و فعالیت‌های ضد قارچی آن بسته به درجه استیل (DD%) وزن مولکولی، غلظت کیتوزان و نوع گیاه متفاوت است (۲). کیتوزان به آسانی در آب و اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و اسید استیک قابل حل است، بنابراین می‌تواند به روش‌های مختلف مانند مخلوط کردن با خاک، محلول‌پاشی برگ (۳) و آغشته کردن به بذر (۴) در کشاورزی استفاده شود. استفاده از کیتوزان به‌عنوان محرک زیستی کارآمد در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان زیادی گزارش شده است (۵، ۶، ۷). گروهی از پژوهشگران اظهار داشتند که کاربرد کیتوزان منجر به افزایش ترکیبات فنلی در کتان *Linum album L.* شده است (۸).

ریحان بنفش (*Ocimum basilicum L.*) یک گیاه دارویی و معطر است که به لحاظ دارا بودن مقدار زیادی اسانس در اندامهای رویشی، کاربرد زیادی در درمان بسیاری از بیماریها از جمله ناراحتیهای کلیوی، سردرد، سرفه، اسهال، بزرگ شدن طحال و برخی ناراحتیهای قلبی دارد (۹). از طرف دیگر به خاطر اینکه منبع ترکیبات حلقوی است، عملکرد ضدباکتری، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی دارد و در صنایع غذایی، بهداشتی، آرایشی و غیره نیز کاربرد دارد (۱۰، ۱۱). اسانس ریحان شامل دوگروه ترپنها ( لیمونن، کامفور،

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

لینالول، ژرانیول و غیره) و فنیل پروپانوئیدها (اوتنول، چاویکول، متیل چاویکول، سینامات و غیره) است که مخصوصاً ترکیبات فنیل پروپانوئید آن نماینده صفات دارویی در این گیاه است (۱۲، ۱۳).

یکی از مهمترین ترکیبات فنیل پروپانوئیدی اسانس ریحان، متیل چاویکول یا استراگل است که یک مشتق آلایل فنول غیر ترپنوئیدی است. متیل چاویکول یک مایع بیرنگ است که در آب حل نمی شود و نقطه جوش آن ۲۱۵ تا ۲۱۶ درجه سانتی گراد می باشد. این ترکیب در صنعت داروسازی و عطرسازی کاربرد دارد و دارای خواص درمانی نظیر خاصیت ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضداسپاسم می باشد و نیز به عنوان حشره کش کاربرد دارد (۱۴، ۱۵). متیل چاویکول همچنین در ترکیب داروهایی وجود دارد که در درمان میگرن، سرماخوردگی، استفراغ، اسهال و دل درد به کار می رود. کیتوزان در بیوتکنولوژی برای تثبیت آنزیم ها و تجزیه کردن پروتئین استفاده می شود و همچنین در گیاهان دارویی با بیان ژن ها در مسیر بیوسنتزی منجر به افزایش تولید متابولیت های ثانویه می شود (۱۶).

تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر محلول پاشی الیسیتور کیتوزان بر کمیت و کیفیت مواد موثره و عملکرد اسانس ریحان بنفش انجام شد. ممکن است مصرف این الیسیتور بتواند راهکاری جهت افزایش و بهبود ماده مؤثره این گیاه شود.

### مواد و روش ها

جهت انجام تحقیق در اواسط اردیبهشت ماه اقدام به کاشت بذر ریحان بنفش، در گلخانه مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد گردید. بذر مورد نظر از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. برای کاشت آنها از گلدان های پلاستیکی (به ابعاد: ارتفاع ۱۴ سانتی متر و قطر دهانه ۱۶ سانتی متر) استفاده شد. خاک گلدان ها به صورت ترکیبی از خاک مزرعه با کود حیوانی پوسیده به نسبت ۳ به ۱ تهیه گردید. تعدادی بذر در هر گلدان کشت شد و بعد از کشت بذر با خاک برگ روی بذر را پوشانده، سپس با استفاده از مه پاش دستی اقدام به آبیاری گلدان ها گردید. در کف گلدان ها چندین منفذ کوچک وجود داشت، تا آب گلدان در حد ظرفیت زراعی باشد. پس از رشد گیاهچه ها تنک کردن آنها انجام شد. به مدت سه هفته هر روز دو بار با استفاده از مه پاش گلدان ها را آبیاری نموده و بعد از این که گیاهان به مرحله چهاربرگی رسیدند، گلدان ها از گلخانه به بیرون گلخانه منتقل گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در ۳ تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. محلول پاشی کیتوزان در ۴ سطح در سه مرحله از رشد (مرحله رویشی، قبل از گلدهی و شروع گلدهی) انجام شد. شاهد حلال (اسید استیک ۵ درصد) C1، کیتوزان (۰/۲ گرم در لیتر) C2، کیتوزان (۰/۴ گرم در لیتر) C3، شاهد آب مقطر C4. پس از برداشت، گیاهان به مدت دو هفته در شرایط سایه و تهویه مناسب و در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد کاملاً خشک شدند (نمونه باید ظاهر و رنگ طبیعی خود را حفظ می کرد). وزن خشک گیاهان بعد اینکه گیاهان کاملاً خشک شدند، به کمک ترازو با دقت ۰/۰۰۱ اندازه گیری شد.

**اسانس گیری:** از هر کرت آزمایشی یک نمونه ۱۰۰ گرمی تهیه و با استفاده از روش تقطیر با آب به وسیله دستگاه کلونجر اسانس گیری انجام شد. حجم اسانس به دست آمده به دقت یادداشت شد و در ظرف های مخصوص تا زمان تجزیه در یخچال نگهداری شد. **تجزیه فیتوشیمیایی اسانس:** شناسایی ترکیبات اسانس به کمک دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیفسنج جرمی (GC-MS) در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد انجام گرفت. تجزیه اسانس با دستگاه GC مدل Agilent 7890 A و نوع ستون 5% HP-5 MS (طول ستون ۳۰m، قطر داخلی ستون ۰/۲۵ μm، قطر بیرونی ستون ۰/۲۵mm) انجام شد. گاز هلیوم با سرعت ۰/۸ ml/min جریان داشت. دمای اولیه ستون C ۶۰° و دمای نهایی ستون C ۲۸۰° بود. برنامه ریزی دمایی به صورت ۴C/min برنامه ریزی شد. نسبت جداسازی ۱:۱۰۰ تنظیم شد. دمای تزریق کننده ۳۰۰C بود. خلوص گاز هلیوم ۹۹/۹۹٪ بود. جهت تزریق نمونه ها از میزان ۰/۱ میکرولیتر اسانس با استفاده از سرنگ همپلتون استفاده شد. تجزیه MS توسط دستگاه Agilent 5975 C انجام شد. انرژی یونیزاسیون در طیفسنج جرمی ۷۰ الکترون ولت انتخاب شد. طیف جرمی از ۵۰-۵۵۰ بود. شاخص های بازداری (IR) برای تمام اجزا با استفاده از یکسری هومولوگ از آن - الکانها (C5 - C25) که در شرایط مشابه نمونه ها تزریق

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

شدند، محاسبه گردید. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع (۱۷) و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری (Wiley and NIST) صورت گرفت.

**تجزیه آماری:** داده‌های بدست آمده حاصل از سنجش پارامترهای مختلف، به صورت طرح بلوک کامل تصادفی، با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تجزیه واریانس‌ها نیز با میزان اطمینان ۹۵ درصد ( $P \leq 0.05$ ) صورت گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2013 رسم شدند.

### یافته‌ها

نتایج تجزیه واریانس خصوصیات فیتوشیمیایی در جدول زیر آمده است.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس خصوصیات فیتوشیمیایی ریحان بنفش

(M.S) میانگین مربعات											منابع تغییر (S.O.V)	
$\beta$ -Caryophyllene	$\beta$ -Elemen	Beta.-Bourbonene	E-Citral	Geranial	Z-citral	Nerol	Methyl chavicol	Linalool	1,8-Cineole	Yield	درجه آزادی (d.f)	
۱۲/۱۸ <sup>**</sup>	۰/۵۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۱۵۳۲ <sup>**</sup>	۱۸/۴۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۴۶ <sup>ns</sup>	۱۳/۹۵ <sup>ns</sup>	۰/۲۹۴	۱۲۰/۹ <sup>ns</sup>	۱۰/۵۰ <sup>**</sup>	۰/۲۴۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۰۵ <sup>**</sup>	۳	کیتوزان (C)
۲/۴۷	۰/۲۴۵	۰/۰۲۸۸	۱۴/۰۷	۰/۱۳۴	۷/۲۶	۰/۴۰۱	۴۸/۵	۴/۶۴	۰/۳۹۱	۰/۰۰۶۹۴ <sup>**</sup>	۱۹	خطا
-	-	-	۹/۶۴	-	-	-	-	-	-	-	۲۲	کل
۳۲/۷۸	۴۸/۸۱	۳۵/۶۵	۴۴/۶۶	۴۵/۵۸	۴۴/۹۷	۴۰/۶۶	۲۰/۱۶	۳۶/۲۷	۴۷/۵۱	۱/۶۷		ضریب تغییرات (CV%)

<sup>ns</sup>: عدم اختلاف معنی‌دار

<sup>\*</sup>: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

<sup>\*\*</sup>: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

اثر کیتوزان بر عملکرد و ترکیبات مهم اسانس با تاکید بر ترکیب متیل چاویکول: مقدار کل اسانس، بر اساس مقدار اسانس موجود در ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد. تغییرات میزان اسانس و برخی از ترکیبات اسانس در تیمارهای مختلف از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ). نتایج تجزیه واریانس برای سطوح مختلف کیتوزان حاکی از آن بود که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین مقادیر مختلف محلول پاشی کیتوزان از نظر عملکرد اسانس و برخی از ترکیبات اسانس به دست آمد. به طوری که بیشترین و کمترین میزان عملکرد اسانس به ترتیب مربوط به محلول پاشی کیتوزان با غلظت ۰/۴ گرم در لیتر و عدم کاربرد کیتوزان بود. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان متیل چاویکول با کاربرد ۰/۲ گرم بر لیتر کیتوزان حاصل شد.

جدول ۲. اثرات کیتوزان بر خصوصیات فیتوشیمیایی

	Yield	1,8-Cineole	Linalool	Methyl chavicol	Nerol	Z-citral	Geraniol	E-Citral	$\beta$ -Bourbonene	$\beta$ -Elemen	trans-Caryophyllene
سطح کیتوزان											
آب مقطر	0.417c	1.278a	4.40b	34.51b	1.59a	5.97ab	0.81a	6.96ab	0.49a	0.99ab	4.44b
اسیداستیک	0.413d	1.277a	4.18b	32.87c	1.46a	5.39b	0.80a	6.24b	0.50a	1.10a	4.62b
کیتوزان ۰/۲	0.490b	1.401a	5.03a	36.02a	1.60a	6.15ab	0.76a	7.18ab	0.50a	0.90b	5.38a
کیتوزان ۰/۴	0.671a	1.306a	4.27b	34.77b	1.57a	6.44a	0.81a	7.42a	0.40b	1.05ab	4.71b
<b>Anova</b>	$P \leq 0.01$	ns	$P \leq 0.01$	$P \leq 0.01$	ns	ns	ns	ns	$P \leq 0.01$	ns	$P \leq 0.01$

\* بر اساس آزمون دانکن حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد.



### بحث

اسانس‌ها مخلوطی از ترکیبات مختلف با طعم، مزه یا بوی خاص هستند که در صنایع داروسازی، دخانیات، غذایی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و معمولاً به عنوان ترکیبات ثانویه شناخته می‌شوند. اسانس‌های فرار توسط انواعی از ساختارهای مزوفیلی و اپیدرمی سنتز و ذخیره شده و سپس در محیط آزاد می‌شوند. این ساختارها شامل سلول‌های اسانس، غده‌های ترشحی، تارهای ترشحی و کرک‌ها بوده و بیشتر در برگ، ساقه، ریشه و گل وجود دارند (۱۸). ریحان همانند دیگر گیاهان خانواده نعناعیان مانند نعناع، مریم گلی و مرزنجوش و آویشن به علت اسانسی که تولید می‌کند به طور وسیعی کشت می‌شود (۱۹).

در این پژوهش، اسانس حاصل از بخش‌های هوایی ریحان بنفش، تحت تیمار کیتوزان، مایع شفاف و زرد رنگ بود. مقدار کل اسانس، بر اساس مقدار اسانس موجود در ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد. نتایج تجزیه واریانس برای سطوح مختلف کیتوزان حاکی از آن است که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین مقادیر مختلف محلول پاشی کیتوزان از نظر عملکرد اسانس به دست آمد. نتایج ما نشان داد که کیتوزان در غلظت ۰/۴ گرم بر لیتر، حداکثر میزان اسانس (۰/۶۷ میلی‌لیتر در ۱۰۰ گرم) را تولید کرد. ثابت شده است که مولکول‌های سیگنال مانند کیتوزان محرک‌های بسیار بالقوه برای القای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند (۲۰). در سال‌های اخیر، استفاده از مولکول‌های علامت دهنده به عنوان الیسیتور، به عنوان یک استراتژی مؤثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه خاص در گیاه، افزایش یافته است. احتمالاً، بهبود در عملکرد اسانس با استفاده از کیتوزان ممکن است به دلیل افزایش در رشد چرخه، جذب مواد غذایی و یا تغییر در تعداد غده‌های ترشحی برگ و یا بیوسنتز مونوترپن‌ها باشد (۲۱).

ترکیبات شیمیایی اسانس توسط دستگاه GC/MS شناسایی شد. جدول ۲ اثر تیمارهای مختلف بر ترکیبات شیمیایی اسانس استخراج شده از ریحان را نشان می‌دهد. از تجزیه اسانس گیاه مشخص شد که ترکیبات تشکیل دهنده این گیاه عمدتاً از مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترین‌ها می‌باشند. اجزای اصلی در اسانس نمونه بنفش عبارتند از: متیل‌چاویکول، لینالول،  $\alpha$ -کادینول و ... مخلوط متیل‌چاویکول و لینالول که بیشترین درصد اسانس ریحان بنفش را تشکیل می‌دهد، مشابه ترکیبات اسانس گزارش شده از ریحان اروپایی و آفریقایی می‌باشد (۲۲).

به طور کلی، نتایج ما نشان داد که اسانس به دست آمده از نمونه‌های ریحان حاوی فنیل پروپانوئیدها (متیل‌چاویکول)، مونوترپن اکسیژن‌دار شده (لینالول، ژرانیال، و نرال) سزکوئی‌ترین‌ها هیدروکربنی ( $\beta$ -کاربوفیلین) و سزکوئی‌ترین‌های اکسیژنه ( $\alpha$ -کادینول) می‌باشند که برخی گزارش‌های قبلی که بیان می‌کردند گروه‌های شیمیایی عمده به دست آمده از بخش‌های هوایی ریحان شامل، فنیل پروپانوئیدها و مونوترپن اکسیژن‌دار می‌باشد (۹، ۲۱، ۲۳) را، تأیید می‌کند. در پژوهش حاضر مشخص شد که ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با الیسیتور کیتوزان تغییر کرد، به طوری که برخی ترکیبات از بین رفتند و برخی ترکیبات جدید تشکیل شدند. سطوح مختلف محلول پاشی کیتوزان اثرات قابل توجهی روی ترکیبات مهم اسانس داشت. کیتوزان در غلظت ۰/۲ گرم در لیتر بالاترین میزان متیل‌چاویکول (۳۶/۰۲٪)، لینالول (۵/۰۳٪) و  $\beta$ -کاربوفیلین (۵/۳۸٪)، اما کیتوزان در غلظت ۰/۴ گرم در لیتر، تولید بالاترین سطح از نرال (۶/۴۴٪) و ژرانیال (۷/۴۲٪) را باعث شد.

اثر کیتوزان روی تولید متیل‌چاویکول نشان داد که این ماده زیستی سبب افزایش تولید این متابولیت ثانویه در گیاه ریحان شد. مشابه این نتایج، نادری و همکاران (۲۴) گزارش کردند که ترکیب متیل‌چاویکول و متیل‌اوزنول و در کل، ترکیبات فنیل پروپانوئیدی ریحان تحت تأثیر کیتوزان افزایش یافته است. فن و همکاران (۲۵) گزارش کردند کیتوزان، در غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  تولید تری-ترپنوئیدها را تقریباً ۶-۲ برابر در *Betula platyphylla* افزایش داده است. در تحقیقات دیگر، آل‌طاها و همکاران (۲۶)، گزارش کردند که محلول پاشی کیتوزان درصد ایزوفلاون را در ذرت (*Glycine max* (L.) Merr) افزایش می‌دهد. همچنین کیان و همکاران (۲۷) گزارش کردند که محلول پاشی کیتوزان با غلظت  $100 \text{ mgL}^{-1}$  بیوسنتز آرتمیزین را در *A. annua* افزایش می‌دهد. واسکنسوله و همکاران (۲۸) نشان دادند که مکانیسم‌های سیگنالینگ اعمال شده توسط کیتوزان سبب افزایش آنتراکوئینون‌ها در گیاه *Rubia tinctorum* شد. در این تحقیق نشان داده شده که اثر این الیسیتور ممکن است از طریق فعال‌سازی آبشار PLC/PKC باشد. گفته

می شود علاوه بر MAP کینازها یا پروتئین کینازهای فعال کننده میتوزن های، PKC نیز در فعالیت ناشی از کیتوزان در سلول دخیل است.

هم چنین پاتالوم (۲۹) نشان دادند که کیتوزان باعث تولید آرتمیزین در ریشه های موئین گیاه *Artemisia annua* می شود. به طوری که میزان تولید این متابولیت ثانویه پس از گذشت ۶ روز و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان، شش برابر افزایش پیدا کرد. هم چنین در این تحقیق نشان داده شد که کیتوزان باعث افزایش رشد ریشه های موئین تیمار شده توسط کیتوزان می شود. درک مسیر پیام رسانی یکی از قدم های های لازم در جهت توجیه اثرات ایسیتورها می باشد. ایسیتورها ابتدا توسط گیرنده های گیاهی فعال می شوند و سپس خود سبب فعال سازی فاکتورهای مربوطه می شوند. مانند کانال های یونی، پروتئین های متصل شونده به GTP و پروتئین کینازها. فعال شدن فاکتورهای مربوطه باعث فرستادن پیام محرک به داخل سلول و به راه افتادن واکنش های فرودست می شود، مانند فسفریلاسیون و فسفریلاسیون برگشت پذیر پروتئین های غشای سلولی و پروتئین های ستیوزولی، افزایش  $Ca^{2+}$  درون سلولی، دپلاریزه شدن غشای سلولی، خروج یون های  $K^{+}$  و  $Cl^{-}$  و ورود یون های  $H^{+}$ ، قلیایی شدن محیط خارج سلول و اسیدی شدن سیتوپلاسم، فعال شدن پروتئین های MAP کیناز، NADPH اکسیداز و تولید گونه های فعال اکسیژن ROS، بیان اولیه ژن های دفاعی، تولید اتیلن و جاسمونات، بیان نهایی ژن های دفاعی و در پایان تولید متابولیت ثانویه. مسیر پیام رسانی محرک ها شبکه ای پیچیده با واکنش های متوالی جهت به راه اندازی سیستم دفاعی مؤثر و کارآمد می باشد.

### نتیجه گیری

عملکرد اسانس ریحان با استفاده از ایسیتور کیتوزان افزایش یافته است که از نقطه نظر صنعتی و داروسازی قابل توجه است. نه تنها عملکرد اسانس، بلکه درصد ترکیبات شیمیایی اسانس نیز تحت تأثیر ایسیتورها قرار گرفت و برخی از ترکیبات افزایش یافته و برخی ترکیبات کاهش یافته است. بالاترین میزان اسانس در تیمار ۰/۴ گرم در لیتر کیتوزان به دست آمد. ماده مؤثره متیل چاویکول نیز با به کار بردن ایسیتور کیتوزان افزایش یافت. از آنجایی که کیتوزان باعث افزایش میزان متیل چاویکول در ریحان می شود، بنابراین می توان از کیتوزان به عنوان ایسیتور زیستی کارآمد برای افزایش ترکیبات فنیل پروپانوئیدی که دارای خواص دارویی بیشماری هستند، استفاده کرد و به نظر می رسد این گامی با ارزش در جهت مهندسی متابولیت و تولید داروهای گیاهی باشد. در نهایت، می توان نتیجه گرفت که محلول پاشی به عنوان یک روش می تواند برای افزایش عملکرد اسانس و افزایش ترکیبات فنیل پروپانوئیدی ریحان مورد استفاده قرار گیرد.

### References:

1. Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. J Sci & Indust Res 2004; 63: 20-31.
2. Dzung NA, Phuong Khanh VT, Dzung TT. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. Carbohydr Polym 2011; 84: 751-5.
3. Ramos-Garcia M, Ortega-Centeno S, Hernandez-Lauzardo AN, et al. Response of gladiolus (*Gladiolus* spp) plants after exposure corms to chitosan and hot water treatments. Sci Hort 2009; 121:480-4.
4. Chmielewski AG, Migdal W, Swietoslowski J, et al. Chemical radiation degradation of natural oligoamino-polysaccharides for agricultural application. Radiat Phys Chem 2007; 76: 1840-2.
5. Cheng X, Zhou U, Cui X. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor, Biotech J 2006; 121:253-60.

6. Ghassemi Pirbalouti A, Malekpoor F, Salimi A, et al. Effects of foliar of the application chitosan and reduced irrigation on essential oil yield, total phenol content and antioxidant activity of extracts from green and purple basil. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus* 2017; 16 (6): 177-86.
7. Emami Bistgani Z, Siadat SA, Bakhshandeh A, et al. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop J* 2017; 5 (5): 407- 15.
8. Esmailzadeh Bahabadi S, Sharifi M, Safaie N, et al. Enhancement of lignin and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culture. *J Plant Bio* 2012; 11:13-26 (In Farsi).
9. Sajjadi SE. Analysis of the essential oils of two cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran, DARU, *J of Pharm Sci* 2006; 14 (3): 128-30.
10. Juliani HR, Simon JE. Antioxidant activity of Basil, *Trends in new crops and new uses* 2002; 575- 9.
11. Labra M, Miele M, Ledda B, et al. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Sci* 2004; 167: 725-31.
12. Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, et al. Colocalization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4- Hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 2004; 16: 3098-109.
13. Iijima Y, Rikanati RD, Fridman E, et al. The biochemical and molecular basis for the divergent in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate gland of three cultivars of basil. *Plant Physiol* 2004; 136: 3724- 36.
14. Leung AY. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, 241-5. John Wiley and Sons, 1980; New York.
15. Okundada AL, Olaifa JA. Estragole: an acute toxic principle from the volatile oil of the leaves of *Clausena anisata*. *J Nat Prod* 1987 50: 990-91.
16. Suchada B, Meechouib S, Sarobol ED. Physiological and morphological responses of field corn seedlings to chitosan under hypoxic conditions. *Sci Asia* 2010; 36: 89-93.
17. Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, CarolStream, IL, 2007; USA.
18. Rodriguez E, Healy PL, Mehta I. *Biology and chemistry of plant trichomes*. Plenum Press. 1984. New York.
19. Lewinsohn E, Ziv-Raz I, Dudai N, et al. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. *Plant Sci* 2000, 160: 27-35.
20. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol adv* 2005, 23: 283-333.
21. Ghasemi Pirbalouti A, Rahimmalek M, Elikaei-Nejhad L, et al. Essential oil compositions of summer savory under foliar application of jasmonic acid and salicylic acid. *J Essent Oil Res* 2014; 26: 342-7.
22. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, et al. Antioxidant activity and total phenolic content of iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem* 2002; 83: 547-50.
23. Ghasemi Pirbalouti A, Mahdad E, Craker L. Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. *Food chem* 2013; 141: 2440-49.

24. Naderi S, Fakheri BA, Esmaeilzadeh Bahabadi S, et al. Increasing of phenyl alanine ammonia lyase (PAL) gene expression and phenylpropanoid compounds of basil (*Ocimum basilicum*) by chitosan. Mod Genet J 2014; 9(3): 259-66 (In Persian).
25. Fan G, Li X, Wang X, et al. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. Afr J Biotechnol 2010, 919: 2816-20.
26. Al-Tawaha AM, Seguin P, Smith DL, et al. Foliar application of elicitors alters isoflavone concentrations and other seed characteristics of field-grown soybean. Can J Plant Sci 2006; 86: 677-84.
27. Caiyan L, Dongming M, Gaobin P, et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Ind Crops Prod 2011; 33: 176-82.
28. Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Sci 2007; 172: 861-75.
29. Patalum A. Changes in the solutes contributing to osmotic potential during leaf ontogeny in grapevine leaves. Am J Enol Vitic 2000; 51(3): 223-6.

## ارزیابی تغییرات بیان کمی ژن MUC2 تحت تاثیر مکمل سازی جیره با سطوح مختلف آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین در بلدرچین های ژاپنی گوشتی و تخم گذار

یاسر رحیمیان<sup>۱</sup>، فرشید خیری<sup>۱\*</sup>، مصطفی فغانی<sup>۱</sup>

۱. گروه کشاورزی، دانشکده علوم دامی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** به منظور ارزیابی تغییرات بیان کمی ژن MUC2 تحت تاثیر مکمل سازی جیره با آلفاتوکوفول استات، سیزامین و تیموکوئینون در بلدرچین های ژاپنی گوشتی و تخم گذار از ۶ تیمار آزمایشی شامل گروه شاهد (بدون مکمل سازی) و گروه های مصرف کننده جیره های مکمل شده با سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم خوراک از ترکیبات آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین استفاده شد.

**روش کار:** نمونه های منجمد شده در نیتروژن مایع که در سنین ۳۵ روزگی و ۸۵ روزگی نمونه هایی از ژوژنوم دو قطعه بلدرچین ذبح شده جمع آوری شده بودند به منظور بررسی بیان کمی ژن MUC2 با استفاده از کیت استخراج RNA ساخته شده توسط شرکت فرمنتاز مورد استفاده قرار گرفتند. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ ترمو انجام شد. سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت فرمنتاز و ارزیابی، رقیق سازی و همسان سازی آن به صورت ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر صورت گرفت. در ادامه mRNA موجود با استفاده از RT-PCR و با استفاده از کیت سایبرگرین اندازه گیری شد. برای انجام آنالیز بیان ژن، پس از مراحل استخراج RNA و حذف باقی مانده های DNA ژنومی، اقدام به ساخت cDNA به عنوان الگوی اولیه برای واکنش های RT-PCR شد. تعیین کمیت نسبی در RT-PCR به وسیله افزایش تشعشع نور فلورسنت در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین صورت پذیرفت و مقادیر مربوط به چرخه آستانه (Ct) حاصل از تکرارهای زیستی و تکنیکی هر تیمار برای محاسبه میزان بیان کمی ژن MUC2 در بافت روده بلدرچین های مورد مطالعه ثبت گردید. میانگین Ct، برای تکرارهای تکنیکی ژن MUC2 و  $\beta$ -actin محاسبه شد و نهایتاً میزان  $\Delta$ CT توسط کسر (Ct) هدف و (Ct) مرجع برآورد و بیان کمی ژن MUC2 محاسبه گردید.

**یافته ها:** نتایج این مطالعه نشان دهنده افزایش معنی دار بیان کمی mRNA ژن MUC2 تحت تاثیر مصرف سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین در بلدرچین های ژاپنی گوشتی و تخم گذار بود ( $p \leq 0/05$ ). نتایج بررسی مقایسه میانگین ها بین اعمال مکمل سازی سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین نشان دهنده وجود اختلافات معنی دار آماری در بین گروه های مصرف کننده سطوح یکسان از آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین در بلدرچین های ژاپنی گوشتی و تخم گذار تحت آزمایش بود ( $p \leq 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** به طور کلی نتایج این مطالعه نشان دهنده افزایش بیان کمی ژن MUC2 تحت تاثیر مصرف جیره های مکمل شده با سطوح مختلف آلفاتوکوفول استات، سیزامین و تیموکوئینون بود و احتمالاً مکمل سازی جیره با ترکیبات فوق به وسیله تحریک انتخابی رشد و بهبود فعالیت باکتری های مفید دستگاه گوارش با حفاظت از پرزهای روده و افزایش تراکم سلول های جامی منجر به ایجاد تغییرات دینامیکی در ترشح موسین و ویسکوزیته موکوس و بیان کمی ژن MUC2 در بلدرچین های گوشتی و تخم گذار مورد آزمایش شد.

**واژگان کلیدی:** بلدرچین ژاپنی، بیان کمی ژن MUC2، تیموکوئینون، سیزامین، آلفاتوکوفول استات.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵  
تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۰۲۴۶۶۵۳۷۸  
پست الکترونیک: Farshid\_Kheiri@yahoo.com

## Evaluation of the quantitative expression changes of MUC2 gene under the influence of diet supplementation with different levels of alpha tocopherol acetate, thymoquinone and sesamin in broiler and laying Japanese quails

Yaser Rahimian<sup>1</sup>, Farshid Kheiri<sup>1\*</sup>, Mostafa Faghani<sup>1</sup>

1. Department of Agriculture, Faculty of Animal Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** The aim of current study was to investigate the effect of dietary alpha tocopherol acetate, sesamin and thymoquinone supplemented diets on of MUC2 gene expression in broiler and laying Japanese quails.

**Materials and Methods:** Experimental treatments whereas a control group and alpha tocopherol acetate, thymoquinone, and sesamin supplemented diets at levels of 100 and 200 mg/ kg. Evaluation of RNA quality and quantity was done using thermo nanodrop spectrophotometer. Then cDNA production was done using the kit made by Fermentase company and its evaluation, dilution and homogenization was done in the form of 300 ng per microliter. Then the available mRNA was measured using RT-PCR and using the Cyber Green kit. To perform gene expression analysis, after RNA extraction and removal of genomic DNA residues, cDNA was made as the initial template for RT-PCR reactions. Determination of the relative quantity in RT-PCR was done by increasing the fluorescent light radiation as a result of the binding of cyber green dye and the values related to the threshold cycle (Ct) obtained from the biological and technical repetitions of each treatment to calculate the quantitative expression of the MUC2 gene in the intestinal tissue of the broiler and layer experimental quails. The average Ct was calculated for the technical repetitions of MUC2 and  $\beta$ -actin gene, and finally, the amount of CTA was estimated by the fraction (Ct) of the target and (Ct) of the reference and the quantitative expression of the MUC2 gene was calculated.

**Results:** The results showed that under the influence of 100 and 200 mg/ kg of alpha tocopherol acetate, thymoquinone and sesamin, the MUC2 mRNA gene expression was increased in broiler and layer Japanese quails.

**Conclusion:** Overall, the results of the study showed that the beneficial effects of alpha tocopherol acetate, thymoquinone and sesamin supplemented diets m-RNA expression of MUC2 in broiler and laying Japanese quails. Probably, supplementing the quail's diet with the above compounds by selectively stimulating the growth and improving the activity of beneficial bacteria in the digestive tract by protecting the intestinal villi and increasing the density of goblet cells leads to dynamic changes in mucin secretion and mucus viscosity and better quantitative expression of the MUC2 gene in broiler and laying quails.

**Keywords:** Alpha tocopherol acetate, Japanese quails, Sesamin, Thymoquinone, MUC2 gene expression.

### مقدمه

موسین‌ها، گروهی از ترکیبات بیولوژیک بوده که از نظر ساختمان شیمیایی دارای دو جزء کربوهیدراتی و پروتئینی هستند و با پیوند گلیکوزیدی به هم اتصال دارند (۱). یکی از مهم‌ترین موسین‌های مترشحه در دستگاه گوارش، MUC2 نامیده می‌شود که توسط سلول‌های جامی تولید می‌شود. موسین پس از ترشح، لایه موکوس و مخاطی را در روده به وجود می‌آورد (۲). مهم‌ترین ژن تولید کننده موسین به فرم ژل که MUC2 نام دارد و بر روی کروموزوم شماره ۵ در روده پرندگان قرار دارد (۳). موسین به‌عنوان لیزکننده و همچنین به‌عنوان سد دفاعی برای بافت‌ها عمل می‌نماید و ساختمان شیمیایی موکوس نقش مهمی برای ایفای نقش آن به‌عنوان یک سد دفاعی در روده دارد، زیرا از یک طرف گلیکوپروتئین‌های موجود در ساختمان موکوس به‌وسیله زنجیرهای اولیگوساکاریدی هتروژن برای چسبیدن به باکتری‌های وارد شده به روده در رقابت هستند و مانع رسیدن عوامل پاتوژن به بافت زیر موکوس و ورود

آن به سلول‌های اپیتلیال می‌شوند و از طرفی دیگر به واسطه کربوهیدرات زیادی که در ساختمان خود دارد، محیط مناسبی را برای تکثیر میکروفلور خاص روده فراهم می‌آورد از این رو لایه موکوسی به‌عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی عمل کرده و حضور لایه موکوسی از اهمیت زیادی برخوردار است (۴). موسین در حفاظت از روده و همچنین انتقال مواد مغذی از درون کانال گوارشی به غشاء نقش دارد. کاهش ساخت موسین موجب آسیب روده و کاهش جذب مواد مغذی جیره می‌شود (۵). سیستم ایمنی از طریق ترشح پپتیدهای ضد میکروبی و سیتوکین‌های پیش‌التهابی نقش مهمی در بیان mRNA پروتیین‌ها دارد و بررسی‌ها نشان می‌دهد که سیتوکین‌ها سبب افزایش تولید موسین، ازدیاد سلول‌های جامی و ایجاد تغییر در گلیکوزیلاسیون موسین می‌شوند (۶). یافته‌های حاصل از مطالعات کاهش معنی‌داری در بیان ژن MUC2 در جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره پایه و بدون مکمل گیاه دارویی را نشان داده است. شناسایی پروموتورهای روده‌ای خاص نه تنها عناصر و عوامل مهمی را که نقش مهمی در تنظیم ژن‌های خاص روده ایفا می‌کنند را روشن می‌کند، بلکه می‌تواند مکانیسم‌های مسئول الگوهای تمایز منحصر به فرد مشاهده شده در اپیتلیوم مخاط روده را نیز روشن کند و این مطالعات سیستماتیک روی توالی‌های تنظیمی MUC2 همچنین درک بهتری از نقش مستقیم و دقیق توالی‌های تنظیم‌کننده در تعدیل بیان فاکتورهای کدکننده گوارش روده و جنبه‌های غدد درون‌ریز و ترشحات فیزیولوژی روده ارائه می‌کنند (۷). امروزه یکی از کاربردهای احتمالی و جالب توالی پروموتور MUC2 برای دام‌های تراریخته به‌منظور تولید حیواناتی است که پروتیین‌های مطلوب را در دستگاه گوارش بیان می‌کنند (۲)؛ و مطالعه میزان نسخه‌برداری MUC2 به درک مکانیزم عواملی که بر ساخت آن نقش دارند کمک می‌کند (۷). از آنجایی که تا هم اکنون هیچ نوع آزمایش مقایسه‌ای برای بررسی اثرات ترکیبات فعال سیزامین و تیموکوئینون مشتق از گیاهان دارویی کنجد و سیاه‌دانه بر روی عملکرد، سلامت، تولید گوشت و تخم و همچنین بیان ژن MUC2 در بلدرچین‌های ژاپنی صورت نپذیرفته است، لذا هدف پژوهش حاضر بررسی ارزیابی تغییرات بیان کمی ژن MUC2 تحت تاثیر مکمل سازی جیره با سطوح مختلف آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین در بلدرچین‌های ژاپنی گوشتی و تخم گذار بود.

### مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی بیان کمی mRNA ژن MUC2، بلافاصله بعد از کشتار در سنین ۳۵ روزگی و ۸۵ روزگی نمونه‌هایی از ژوژنوم دو قطعه بلدرچین ذبح شده جمع‌آوری شده و به وسیله نیتروژن مایع منجمد شد. بررسی بیان کمی ژن MUC2 با استفاده از کیت استخراج RNA ساخته شده توسط شرکت فرمنتاز صورت گرفت و بدین منظور مجموع RNA مورد نیاز از بافت روده استخراج گردید. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ ترمو انجام شد. سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت فرمنتاز و ارزیابی، رقیق‌سازی و همسان‌سازی آن به صورت ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر صورت گرفت. در ادامه mRNA موجود با استفاده از RT-PCR و با استفاده از کیت سایبرگرین اندازه‌گیری شد. برای انجام آنالیز بیان ژن، پس از مراحل استخراج RNA و حذف باقی‌مانده‌های DNA ژنومی، اقدام به ساخت cDNA به‌عنوان الگوی اولیه برای واکنش‌های RT-PCR گردید. تعیین کمیت نسبی در RT-PCR به‌وسیله افزایش تشعشع نور فلورسنت در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین صورت پذیرفت و مقادیر مربوط به چرخه آستانه (Ct) حاصل از تکرارهای زیستی و تکنیکی هر تیمار برای محاسبه میزان بیان کمی ژن MUC2 در بافت روده بلدرچین‌های مورد مطالعه ثبت گردید. میانگین Ct، برای تکرارهای تکنیکی ژن MUC2 و  $\beta$ -actin محاسبه شد و نهایتاً میزان  $\Delta$ CT توسط کسر (Ct) هدف و (Ct) مرجع برآورد و بیان کمی ژن MUC2 محاسبه گردید (۸).

جدول ۱- پرایمرهای انتخابی برای بررسی کمی بیان mRNA ژن MUC2 در بلدرچین‌های آزمایشی گوشتی و تخم گذار

ژن هدف	ثبت بانک ژن	توالی رفت (3' به 5')	توالی برگشت (3' به 5')
MUC-2	NM_001318434	CCACAAGTCCTCCAGTACCTACA	AGGTTTCATAGTCACCACCATCTTC
Beta-actin	NM_205518	CTGGCACCTAGCACAATGAA	CTGGTTGCTGATCCACATCT

یافته‌ها

جدول ۲- نتایج استفاده از سطوح مختلف آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین بر بیان کمی mRNA ژن MUC2 بلدرچین‌های آزمایشی

بیان کمی ژن MUC2	$\Delta\Delta CT$ ( $\Delta CT - \Delta CT_0$ )	$\Delta CT$ (MUC2- $\beta$ -actin)	$\beta$ -actin average CT	MUC2 average CT	مکمل سازی (گرم بر کیلو گرم)	گروه/ صفت
گوشتی						
۲/۳۵d	۰	۳/۱۱	۱۲/۵۱	۱۵/۵۱	۰	شاهد
۲/۴۹c	-۰/۱۸	۳/۲۶	۱۲/۳۴	۱۵/۶۲	۱۰۰	آلفاتوکوفول
۲/۷۱a	-۰/۲۰	۳/۴۵	۱۲/۴۲	۱۵/۹۱	۲۰۰	استات
۲/۵۳bc	-۰/۲۲	۳/۳۷	۱۲/۲۵	۱۵/۵۷	۱۰۰	سیزامین
۲/۶۱b	-۰/۲۳	۳/۵۲	۱۲/۳۱	۱۵/۸۲	۲۰۰	
۲/۴۵c	-۰/۲۵	۳/۲۶	۱۲/۳۷	۱۵/۶۴	۱۰۰	تیموکوئینون
۲/۷۸a	-۰/۲۷	۳/۵۴	۱۲/۴۴	۱۵/۹۶	۲۰۰	
۰/۰۳۲	----	-----	----	----	-----	SEM**
تخم گذار						
۲/۵۰c	۰	۳/۱۹	۱۲/۵۸	۱۵/۵۷	۰	شاهد
۲/۶۱c	-۰/۲۰	۳/۳۲	۱۲/۳۷	۱۵/۶۵	۱۰۰	آلفاتوکوفول
۲/۶۷b	-۰/۲۳	۳/۵۲	۱۲/۴۵	۱۵/۹۵	۲۰۰	استات
۲/۶۳c	-۰/۲۴	۳/۴۱	۱۲/۲۹	۱۵/۵۹	۱۰۰	سیزامین
۲/۶۹b	-۰/۲۵	۳/۵۵	۱۲/۳۸	۱۵/۸۵	۲۰۰	
۲/۶۸b	-۰/۲۸	۳/۳۲	۱۲/۴۱	۱۵/۶۷	۱۰۰	تیموکوئینون
۲/۷۵a	-۰/۲۹	۳/۵۹	۱۲/۵۲	۱۶/۰۲	۲۰۰	
۰/۰۱۲	----	-----	----	----	-----	SEM**

\*تفاوت میانگین‌ها در هر ستون باحروف غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌داری است ( $p \leq 0.05$ ). SEM\*\*: میانگین خطای استاندارد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار ماکروسافت اکسل (۲۰۱۰) دسته‌بندی شده و با استفاده از بسته نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۶/۱۸ سال ۲۰۰۹ با رویه مدل خطی عمومی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه بین میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (۱۹۹۵) در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت ( $p \geq 0.05$ ). مدل آماری آزمایش به شرح زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

و در آن  $Y_{ij}$ : مقدار هر مشاهده.  $\mu$ : میانگین جامعه.  $\alpha_i$ : اثر مکمل‌سازی با آلفاتوکوفول استات، سیزامین، تیموکوئینون و  $e_{ij}$ : اثر اشتباه در آزمایش، بودند.

نتایج استفاده از مکمل‌سازی جیره‌ها با سطوح مختلف آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین بر بیان کمی mRNA ژن MUC2 بلدرچین‌های آزمایشی در دو دوره گوشتی و تخم‌گذاری در جدول ذیل نشان داده شده‌است. نتایج بررسی‌های صورت‌گرفته



نشان دهنده افزایش معنی دار بیان کمی mRNA مucin 2 تحت تأثیر مصرف سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین مشاهده گردید ( $p \leq 0.05$ ). نتایج بررسی مقایسه میانگین ها بین اعمال مکمل سازی سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین نشان دهنده وجود اختلافات معنی دار آماری در بین گروه های مصرف کننده سطوح یکسان از آلفاتوکوفول استات، تیموکوئینون و سیزامین بود ( $p \leq 0.05$ ).

#### بحث

نتایج برخی تحقیقات نشان داد استفاده از مکمل سیاه دانه به علت برخورداری از خاصیت ضدالتهابی و پاد اکسندگی ترکیبات آن قادر به تنظیم کاهشی عوامل پیش التهابی و میانجی گروه های تکثیر سلولی مانند سیکلوژناز و فاکتورهای نکروز کننده تومور و پروتیین کیناز در شرایط پاتولوژیک می شود (۹). بررسی های صورت گرفته نشان داد که مصرف مکمل های گیاهی که به طور طبیعی حاوی برخی باکتری های مفید روده می باشد قادر است سبب تحریک بیان ژن موسین در سلول های اپیتلیال روده شود (۱۰). نتایج برخی مطالعات بر روی تجویز خوراکی روغن سیاه دانه باعث کاهش هیستامین ها، بهبود زخم دستگاه گوارش و افزایش سطح گلوکوتائین و افزایش غلظت موسین شد (۱۱). تغییر در ساخت و ترشح موسین سبب تغییر ضخامت، ویسکوزیته و ساختمان موکوس روده می شود و کاهش ساخت موسین، میزان استحکام لایه موکوسی و انتقال مواد مغذی را به سطح آپیکال سلول های پرز روده تحت تأثیر قرار داده و همچنین وظیفه کانال گوارشی را به عنوان بخشی از سیستم ایمنی بدن تحت تأثیر قرار می دهد (۱۲). سیستم ایمنی از طریق ترشح پپتیدهای ضد میکروبی و سایتوکین های پیش التهابی نقش مهمی در بیان mRNA پروتیین ها دارد و بررسی ها نشان می دهد که سایتوکین ها سبب افزایش تولید موسین، ازدیاد سلول های جامی و ایجاد تغییر در گلیکوزیلاسیون مواد مترشحه می شوند (۱۳). مطالعات دیگر در این خصوص نشان داد استفاده از سطوح مختلف مکمل زردچوبه، آویشن و دارچین در جوجه های گوشتی باعث افزایش بیان mRNA مucin 2 در ژوژنوم شد (۴). طالبی و همکاران با بررسی اثرات تیمار سطوح مختلف اسانس اسطوخودوس در جیره های حاوی سطوح مختلف انرژی و پروتیین، نشان دادند مصرف اسانس اسطوخودوس باعث توسعه فلور روده و افزایش ترشح MUC2 گردید و این امر احتمالاً به دلیل نقش پروبیوتیکی این گیاه دارویی در بهبود سیستم ایمنی و جلوگیری از بیماری ها و همچنین اثرات مثبتی که بر سلامت دستگاه گوارش، بود (۱۴). در مطالعه اعظم و همکاران، با افزایش سطح ترئونین جیره از ۰/۴۸ تا ۰/۸۵ بیان mRNA مucin 2 به طور خطی در ژوژنوم و ایلئوم جوجه های گوشتی افزایش یافت (۱۵) و در مطالعه لاو همکاران، افزایش ترئونین جیره سبب افزایش فراوانی mRNA و بیان ژن MUC2 در ۱۴ روزگی شد (۶). با توجه به آن که آلفاتوکوفول استات، سیزامین و تیموکوئین احتمالاً سبب بهبود سیستم هضمی و دسترسی بیشتر مواد مغذی نظیر پروتیین و آمینو اسیدها برای پرنده می شوند، افزایش بیان ژن MUC2 در مطالعه حاضر منطقی به نظر می رسد (۸). مانتیج و همکاران نشان دادند، تنظیم بیولوژیک میزان گلیکوزیله شدن کربوهیدرات و پروتیین به منظور ساخت موسین تحت تأثیر عواملی چون قابلیت دسترسی سوبستراهای آنزیم های گلیکوزیل ترانسفراز، انتقال گلیکوپروتیین ها و تجزیه آن ها قرار دارد (۷) و بررسی های به عمل آمده توسط اسمیرینوف و همکاران، با استفاده از گلوکز نشان دار شده نشان داد که سلول های جامی با استفاده از گلوکز و تبدیل آن به کربوهیدراتی که توانایی شرکت در ساختمان نوکلئوتید را دارد، برای گلیکولیزه نمودن پروتیین موسین استفاده می نمایند (۲). در مطالعه حاضر به استناد شواهد فوق الذکر به نظر می رسد استفاده از جیره های مکمل با سطوح مختلف آلفاتوکوفول استات، سیزامین و تیموکوئین سبب بهبود کارایی استفاده از کربوهیدرات و پروتیین و به پیروی از آن افزایش تولید ترشح MUC2 در ژوژنوم شد. نتایج مطالعه سپهری مقدم و همکاران، نشان دهنده افزایش و بهبود الگوی بیان ژن MUC2 در جوجه های مصرف کننده محرک رشد پاد زیستی یا پروبیوتیک تغذیه شده در مقایسه با گروه شاهد بود (۵). اسمیرینوف و همکاران نشان دادند، میکروفلور روده می تواند روی ترکیب موکوس سلول های جامی تأثیر بگذارد (۱۰)، ولی در بررسی های صورت گرفته توسط سایر محققان دیگر نتایج نشان داد تعداد سلول های جامی محتوی موسین های اسیدی و خنثی در ژوژنوم و ایلئوم تحت تأثیر فلور میکروبی محیط تغییری ننمود. نتایج این مطالعه، در راستای نتایج مطالعه مونتیج و همکاران بود (۷)، که نشان داد هر جزء غذایی یا محیطی باعث تغییر بیان ژن MUC2

می‌شود و احتمالاً تنظیم ژن MUC2 بر تعادل بین فاکتورهای رونویسی تنظیمی مثبت و منفی استوار است که این پتانسیل را دارد تا بر یکپارچگی لایه مخاطی و جذب مواد مغذی تأثیر بگذارد و معمولاً تحت تأثیر فاکتور و عامل شروع ۵ که بر میزان چرخش و ترن‌آور mRNA مؤثر است، واقع می‌شود. سایتوکین‌ها، فاکتورهای محرک رشد، تولیدات باکتریایی (۱۶) و هر عاملی که باعث ایجاد تغییر در سلول‌های جامی‌شود، می‌توانند بیان ژن MUC2 را تحت تأثیر قرار دهند (۱۷). ترکیبات فعال موجود در گیاهان ممکن است با اثرات تجمعی بر Hap A که یک پروتئیناز خارج سلولی است سبب افزایش و تجمع MUC2 در مجرای گوارشی شوند (۱). برخی دیگر محققان نیز در این راستا بیان کردند که احتمالاً افزایش بیان MUC2 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل گیاهان دارویی می‌تواند به علت تأثیر مواد مؤثر موجود با تولید یا تغییر فعالیت فاکتورهای رونویسی مؤثر در رونوشت‌برداری ژن MUC2 از جمله FOX و GATA باشد (۱۳).

### نتیجه گیری

یافته‌های نشان دهنده افزایش بیان کمی ژن MUC2 و اثر مثبت مصرف جیره‌های مکمل‌شده با سطوح مختلف آلفا توکوفرول استات، سیزامین و تیموکوئینون نسبت به گروه شاهد بود. مکمل سازی جیره با ترکیبات فوق احتمالاً از طریق تحریک انتخابی رشد و بهبود فعالیت باکتری‌های مفید دستگاه گوارش همراه با حفاظت از پرزهای روده و افزایش تراکم سلول‌های جامی منجر به ایجاد تغییرات دینامیکی در ترشح موسین و ویسکوزیته موکوس و اثر مفید بر افزایش بیان کمی ژن MUC2 در بلدرچین‌های گوشتی و تخم‌گذار تحت آزمایش شد.

### References:

1. Smirnov A, Perez R, Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *The Journal of Nutrition*. 2005; 135(2): 187-92.
2. Smirnov A, Sklan D, Uni Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. *The Journal of nutrition*. 2004; 134(4): 736-42.
3. Cheadle C, Fan J, CHO-CHUNG YS, Werner T, Ray J, Do L, et al. Stability regulation of mRNA and the control of gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005; 1058(1): 196-204.
4. Kamali Sangani A, Masoudi AA, Hosseini SA. The effects of herbal plants on Mucin 2 gene expression and performance in ascetic broilers. *Iran J Vet Med*. 2014; 8: 47-52.
5. Moghaddam H, Moghaddam HN, Kermanshahi H, Moussavi AH, Raji A. The effect of vitamin A on mucin2 gene expression, histological and performance of broiler chicken. *Global Veterinaria*. 2010; 5(3): 168-74.
6. Law GK, Bertolo RF, Adjiri-Awere A, Pencharz PB, Ball RO. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2007; 292(5): 1293-301.
7. Montagne L, Piel C, Lalles JP. Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. *Nutrition reviews*. 2004; 62(3): 105-14.
8. Emadina A, Toghyani M, Foroozandeh AD, Tabeidian SA, Ostadsharif M. Growth performance, jejunum morphology and mucin-2 gene expression of broiler Japanese quails fed low-protein diets supplemented with threonine. *Italian Journal of Animal Science*. 2020; 19(1): 667-75.

9. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 40: 839-47.
10. Smirnov A, Tako E, Ferket P, Uni Z. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in ovo feeding of carbohydrates. *Poultry science*. 2006; 85(4): 669-73.
11. Khan SH, Anjum MA, Parveen A, Khawaja T, Ashraf NM. Effects of black cumin seed (*Nigella sativa* L.) on performance and immune system in newly evolved crossbred laying hens. *Veterinary Quarterly*. 2013; 33(1): 13-9.
12. Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013; 10(6): 352-61.
13. van Der Sluis M, Vincent A, Bouma J, Korteland-Van Male A, van Goudoever JB, Renes IB, et al. Forkhead box transcription factors Foxa1 and Foxa2 are important regulators of Muc2 mucin expression in intestinal epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008; 369(4): 1108-13.
14. Talebi A, Maham M, Asri-Rezaei S, Pournaghi P, Khorrami M-S, Derakhshan A. Effects of *Nigella sativa* on performance, blood profiles, and antibody titer against Newcastle disease in broilers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021; 2021: 1-15.
15. Azzam M, Zou X, Dong X, Xie P. Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. *Poultry Science*. 2011; 90(10): 2251-6.
16. Kondamudi PK, Kovelamudi H, Mathew G, Nayak PG, Rao CM, Shenoy RR. Modulatory effects of sesamol in dinitrochlorobenzene-induced inflammatory bowel disorder in albino rats. *Pharmacological Reports*. 2013; 65(3): 658-65.
17. Forder R, Howarth G, Tivey D, Hughes R. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poultry science*. 2007; 86(11): 2396-403.

## بررسی میزان بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* در سلول‌های AGS ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب حامل ژن انتروتوکسین B/ستافیلوکوکوس اورئوس

شهره زارعی<sup>۱</sup>، نازنین سلیمی بروجنی<sup>۲</sup>، مهدی شفیعی<sup>۲</sup>، مریم صفرپور دهکردی<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** از نظر تاریخی آدنوکاسینوم معده یکی از علل عمده مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان بوده است. انتروتوکسین B یکی از بزرگ‌ترین سوپرآنتی‌ژن‌ها می‌باشد و جزء مولکول‌های مهاجمی به حساب می‌آید و همچنین در سرطان‌های مختلف نقش مهمی در القای آپوپتوز داشته است. شواهد نشان داده‌اند که بخش چشم‌گیری از عامل‌های مستعدکننده به سرطان را نمی‌توان به تغییر در توالی‌های کدکننده پروتئین نسبت داد. شناسایی شمار زیادی از RNAهای غیر کدکننده (lncRNAs) با طول بیشتر از ۲۰۰ جفت باز در انسان، به پرده‌برداری از جایگاه این مولکول‌ها در آسیب‌شناسی سرطان و نقش آن‌ها به عنوان اجزای مهم در تومورزایی، کمک شایانی نموده است. هدف از انجام این پژوهش بررسی تغییر بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* بعد از تیمار سلول سرطان معده با سم انتروتوکسین B باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی، سازواره‌ی ژنی *pcDNA3.1(+)-SEB* پس از تکثیر در باکتری *E. coli* سویه‌ی TOP10F و استخراج، به روش لیپوفکشن وارد سلول‌های رده‌ی AGS شد و پس از تیمار با آنتی‌بیوتیک نئومایسین (۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، RNA سلولی استخراج و cDNA ساخته شد. سپس برای lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* واکنش real time RT-PCR انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج به دست آمده حاکی از آن است که پس از واکنش لیپوفکشن و ورود پلاسمید درون سلول‌ها و همچنین سنتز cDNA، کاهش بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* تحت تاثیر بیان ژن سم، در سطح معناداری بوده است. به این صورت که در مقایسه با سلول AGS که ژن *SEB* را دریافت نکرده بودند، سلول‌های حاوی ژن سم کاهش بیان بیشتری نشان دادند. **نتیجه‌گیری:** با توجه به کاهش بیان lncRNA های نامبرده، به نظر می‌رسد سم انتروتوکسین B باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با بیان در سلول‌های سرطان معده سبب تغییر بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* در این رده سلولی می‌شود.

**واژگان کلیدی:** سرطان معده، سم انتروتوکسین B، lncRNA های *GHET1* و *CCAT1*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۳۸۲۳۶۳۸

پست الکترونیک: msafarpour84@yahoo.com

## Evaluation of the expression of *GHET1* and *CCAT1* lncRNAs in the AGS cells that transfected with recombinant vector contain enterotoxin B gene of *Staphylococcus aureus*

Shohreh Zarei<sup>1</sup>, Nazanin Salimi-Borujeni<sup>2</sup>, Mahdi Shafie<sup>2</sup>, Maryam Safarpour-Dehkordi<sup>3\*</sup>

1. M.Sc in Genetics, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. B.Sc Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Ph.D. in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

**Background and Aim:** Historically, gastric adenocarcinoma has been one of the major causes of cancer deaths in the world. Enterotoxin B is one of the largest superantigens and is considered as an invasive molecule and has also played an important role in inducing apoptosis in various cancers. The purpose of this study was to investigate the changes in the expression of lncRNAs from *GHET1* and *CCAT1* after gastric cancer treatment with enterotoxin B poison.

**Materials and Methods:** In this experimental study, the pcDNA3.1 (+) - *SEB* gene after amplification of *E. coli* strain TOP10F and extracted from *E. coli* strain was introduced into AGS cells by lipofection method. After treatment with antibiotic neomycin, cellular RNA CdNA extraction was made. Then, real time RT-PCR reaction was performed for lncRNAs of *GHET1* and *CCAT1*.

**Results:** The results showed that decreasing the expression of *CCAT1* and *GHET1* lncRNAs after the effect of enterotoxin was significant. Compared to the AGS cell that did not receive the *SEB* gene, the cells containing the enterotoxin gene were more likely to go to apoptosis.

**Conclusion:** enterotoxin B induced apoptosis in this cell line by expression in gastric cancer cells.

**Keywords:** Gastric cancer, Enterotoxin B, lncRNA *GHET1*, lncRNA *CCAT1*

### مقدمه

RNAهای غیر کد کننده (ncRNAs) گروه جدیدی از ژن‌های شناخته شده در ژنوم انسان هستند که در تنظیم فرآیندهای مختلف زیستی نقش دارند. همچنین اخیراً به نقش این RNAها در بیماری‌های پیچیده انسانی از جمله سرطان و بیماری‌های عصبی توجه زیادی شده است. طی سال‌های اخیر و با چندین طرح غربالگری مختلف، شمار شگفت‌آوری از ژن‌های lncRNAها شناسایی شده‌اند. از مدت‌ها پیش مشخص شده است که lncRNAهای کوچک و بلند از طریق توالی‌های ویژه‌ای با نواحی تنظیم کننده برهمکنش داشته و به این ترتیب در تنظیم بیان ژن دخیل دانسته شده‌اند. مطالعات گسترده ترانس کریپتومیک ژنومی (مطالعه کل RNAهای کد شونده و غیر کد شونده) نشان داده است رونویسی در ژنوم پستانداران به وفور انجام می‌گیرد، که حداقل ۸۰٪ این رونویسی منحصر در ارتباط با lncRNAها هستند. اگر چه lncRNAها اغلب به عنوان شی بازسازی شده کروماتینی نادیده گرفته می‌شوند، اما مطالعات زیادی نشان داده است که lncRNAها به عنوان ژن‌های کد کننده پروتئینی کوچک ایفای نقش می‌کنند. lncRNAها به طور کلی RNAهای غیر کد کننده بالای ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشند. lncRNAها بر خاموشی ژن، سیگنال‌های آدنیلایسیون و فاکتورهای موثر بر رونویسی تاثیر دارند (۱). از جمله lncRNAهای *GHET1* و *CCAT1* را نام برد که در ادامه به شرح آن‌ها می‌پردازیم. ژن کد کننده *CCAT1* lncRNA در کروموزوم شماره ۸ و در جایگاه q24.21 قرار گرفته است. مطالعات اخیر پژوهشگران نشان داده که میزان بیان *CCAT1* در افراد مبتلا به سرطان ریه، سرطان سینه و بیماران مبتلا به سرطان پانکراس افزایش یافته است و در روند ابتلا به این سرطان‌ها نقش آنکوژنیک ایفا کرده است. در مطالعاتی که پژوهشگران در رابطه با تغییرات بیان برخی از lncRNAها در بیماران مبتلا به سرطان معده انجام دادند متوجه شدند که یک lncRNA به نام *GHET1* در این بیماران افزایش بیان بالایی از خود نشان داده است و باعث تشدید سرطان معده در این افراد شده است. محققان در آنالیزهای پاتولوژیکی که در این زمینه انجام دادند متوجه شدند که میزان بیان *GHET1* در افراد مبتلا به

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

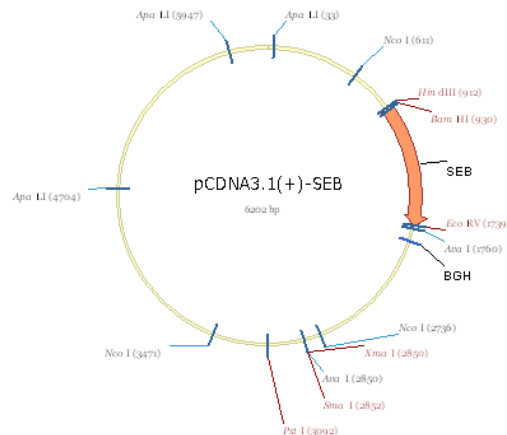
سرطان معده با مرحله‌ی بیماری ارتباط مستقیم داشته و در استیج‌های بالای بیماری بیان این *lncRNA* نیز افزایش بیان داشته است. عملکرد *GHET1* به این شکل است که در ابتدا به پروتئین *IGF2BP1* متصل شده و باعث افزایش میل اتصال آن به مولکول *c-Myc* می‌شود و نهایتاً برهمکنش این دو باعث افزایش تکثیر سلول‌های توموری در افراد مبتلا به سرطان معده می‌شود (۳ و ۲).  
 انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۹-۲۶ کیلو دالتون هستند که به وسیله استافیلوکوک کوآگولاز مثبت تولید می‌شوند (۴). انتروتوکسین تیپ B مهم‌ترین انترو توکسین‌ها می‌باشد که به دلیل خصوصیات ویژه‌اش مورد توجه است. طی سال‌های ۱۹۶۰ به بعد زمانی که آمریکا برنامه حمله بیولوژیکی را طراحی کرد این توکسین را یک ناتوان کننده بیولوژیکی مورد مطالعه قرار داد. این توکسین به عنوان یک عامل بیولوژیکی خیلی جالب توجه است، زیرا علاوه بر اینکه مانند سایر تیپ‌های انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس از طریق گوارشی جذب می‌شود، بر خلاف آن‌ها از طریق تنفسی و به صورت آئروسول نیز انتقال می‌یابد. قدرت ناتوان کنندگی این انتروتوکسین و انتشار آن توسط راه تنفسی این ماده را به عنوان یک عامل بیولوژیک مطرح می‌کند (۵ و ۶).

هدف از این تحقیق بررسی میزان بیان *lncRNA*های *GHET1* و *CCAT1* در سلول‌های *AGS* ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب حامل ژن انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس است.

#### مواد و روش‌ها

**کشت سلول:** سلول‌های رده‌ی سلولی *AGS* از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه گردید. ابتدا محیط کشت RPMI 1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد و انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شد. سپس سلول‌های رده *AGS* درون فلاسک T25 کشت داده شد. به این صورت که کرایوتیوب حاوی سلول پس از ذوب، درون ۳ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی *FBS* و *Pen-Srep* ریخته و سانتریفیوژ در شرایط ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد. رسوب حاصل را درون فلاسک T25 حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه کرده و فلاسک در انکوباتور قرار گرفت.

**پلاسمیدها:** پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1(+)* حامل ژن انتروتوکسین B باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین پلاسمید *pcDNA3.1(+)* بدون ژن خارجی از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، تهیه شد.



تصویر ۱- نمای شماتیکی پلاسمید *pcDNA3.1(+)-SEB* با اندازه ۵۴۲۸ جفت باز پلاسمید به همراه ۸۱۳ جفت باز مربوط به ژن *SEB*.

باکتری *E. coli* سویه TOP10 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری و در محیط کشت Luria-Bertani (LB) (سیگما) کشت داده شد و سپس به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) انکوبه گردید. پلاسمید نوترکیب نامبرده و پلاسمید خالی با استفاده از روش کلرید کلسیم و شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار (سیگما)، حاوی آمپیسیلین (۳۰ میلی گرم در میلی لیتر) رشد کردند و انتخاب شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB Broth حاوی آمپیسیلین در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند. DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (فیورجین، تایوان) طبق دستورالعمل کیت، خالص سازی شد.

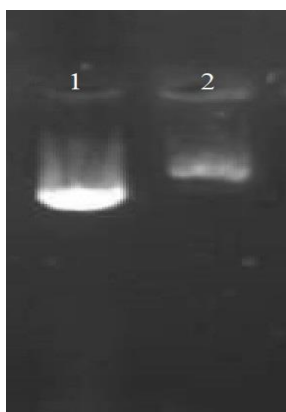
پلاسمیدها درون سلول‌های سرطانی ترنسفکت گردید و در نهایت دو گروه سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌های AGS ترنسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-SEB و سلول‌های AGS ترنسفکت شده با پلاسمید خالی. سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (اینویتروزن) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، با پلاسمیدهای نامبرده ترانسفکت شدند. به طور خلاصه،  $۱۰^۶ \times ۰/۳$  سلول در خانه‌های پلیت ۶ خانه کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت (هنگامی که سلول‌ها به تراکم ۵۰-۷۵ درصد رسیدند) مخلوط حجمی حجمی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (۷/۵ میلی گرم در هر چاهک) و پلاسمید (۲/۵ میلی گرم در هر چاهک) در حجم نهایی  $۳۰۰ \mu\text{L}$  از محیط کشت RPMI (بدون آنتی بیوتیک و FBS) به سلول‌ها افزوده شد. پلیت کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با  $5\% \text{ CO}_2$  به مدت ۴ ساعت انکوبه شد و سپس FBS به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت کشت مجدد به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط انکوبه شد. محیط کشت حاوی ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر نئومایسین برای غربالگری سلول‌های ترانسفکت شده از غیر ترانسفکت شده اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت سلول‌ها انکوبه شدند. سرانجام، سلول‌های هر گروه با استفاده از  $۰/۲۵$  درصد آنزیم-Trypsin EDTA (اینویتروزن) جدا شده و در محیط کشت با  $10\% \text{ FBS}$  کشت شدند.

**Reverse transcriptase PCR (RT-PCR): RNA** تام سلولی از سلول‌های ترنسفکت شده، توسط کیت استخراج RNA (RNX-plus، سیناکلون، تهران، ایران) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده به وسیله نانودراپ (ترموساینتیفیک، امریکا) در طول موج  $260/280$  نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از انجام *DNase Treatment* به منظور غیرفعال شدن آنزیم *DNase*، نمونه موجود به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سلسیوس گرما دهی شد. از EDTA ( $2 \mu\text{l}$ ) EDTA ( $50 \text{ mM}$ ) جهت محافظت از RNA در دمای بالا استفاده شد. سپس، ۱ میکروگرم از RNA تام سلولی استخراج شده از هر گروه، ۱ میکرولیتر از oligoDt و random hexamer ( $50 \mu\text{M}$ ) جهت سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. سنتز شده جهت واکنش RT-PCR و Real time PCR استفاده شد.

q-PCR: از روش q-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های سلول‌های ترنسفورم شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-SEB در مقایسه با سلول‌های ترنسفورم شده با وکتور خالی استفاده شد. ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. cDNA هر گروه در رقت سریال‌های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه گردید. حجم نهایی برای هر واکنش  $13 \mu\text{L}$  بود که حاوی:  $1 \mu\text{L}$  از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)،  $6/5$  میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران)،  $0/5$  میکرولیتر از هر دو پرایمرهای F/R، و  $4/5$  میکرولیتر آب مقطر. همه واکنش‌ها به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سانتیگراد به ۹۵ درجه سانتیگراد (۱ درجه سانتیگراد در ثانیه) رسم شد. جهت محاسبه بیان ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم افزار Rotor-Gene Real-time analysis نسخه ۶ رسم شد. تغییرات نسبی بیان mRNA توسط روش لیواک  $2^{-\text{DDCt}}$  با مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد. با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری t بیان ژن‌ها بررسی و مقایسه شد. مقدار  $P\text{-Value} \leq 0.05$ ، از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

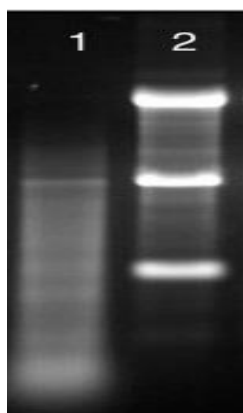
### یافته‌ها

نتایج استخراج پلاسمیدها و تعیین غلظت: از نمونه ماتریکس‌های رشد یافته، درون محیط LB-Broth حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. سپس پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید شرکت یکتا تجهیز آزما طبق دستورالعمل کیت، استخراج شد. غلظت پلاسمیدهای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ به ترتیب برای پلاسمید فاقد ژن و پلاسمید دارای ژن،  $147/6$  و  $252$  ng/ $\mu$ L ثبت شد. بارگذاری میزان  $5$   $\mu$ L از نمونه‌های پلاسمید استخراج شده بر روی ژل آگارز با غلظت  $1\%$  نیز صحت استخراج پلاسمید را تایید کرد (شکل ۲). این پلاسمید استخراج شده در مرحله بعد برای تایید توسط هضم آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲- نتایج استخراج پلاسمیدها. چاهک شماره ۱ حاوی پلاسمید pcDNA3.1(+), فاقد ژن *SEB* و چاهک شماره ۲ حاوی پلاسمید pcDNA3.1(+), دارای ژن *SEB*.

نتایج انتقال پلاسمید به سلول‌ها: پس از واکنش لیپوفکشن و انتقال پلاسمید به سلول‌های AGS، جهت غربالگری سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده بودند، آنتی بیوتیک نئومایسین افزوده شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. به دلیل اینکه پلاسمید ژن مقاومت به نئومایسین را دارا بود، سلول‌هایی که پلاسمید دریافت کرده بودند توانایی رشد و تکثیر را داشتند. پس از تریپسینه کردن، درون فلاسک T25 حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین پاساژ داده شدند. نتایج استخراج RNA: پس از تکثیر، سلول‌های لیپوفکت شده تریپسینه شدند و استخراج RNA انجام شد. پس از استخراج RNA، غلظت RNAهای حاصل توسط دستگاه نانودراپ مشخص گردید. همچنین صحت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز بررسی شد (شکل ۳).



تصویر ۳- نتایج استخراج RNA. چاهک شماره ۲ حاوی RNA استخراج شده و چاهک ۱ حاوی مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

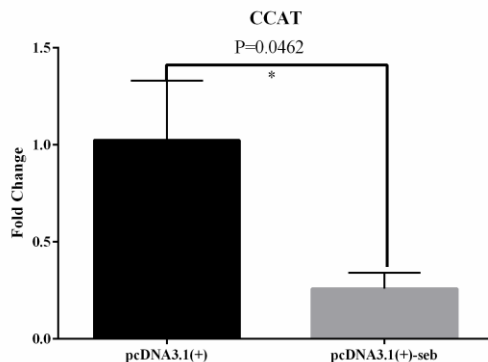


بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR: پس از سنتز cDNA توسط دستورالعمل کیت شرکت یکتا تجهیز آزما، صحت آن توسط واکنش PCR تایید گردید. بدین منظور بر روی cDNA سنتز شده، توسط پرایمرهای اختصاصی ژن *GAPDH* واکنش PCR انجام شد. حضور باند ۱۸۳ bp پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، صحت ساخت cDNA را تایید کرد (شکل ۴).



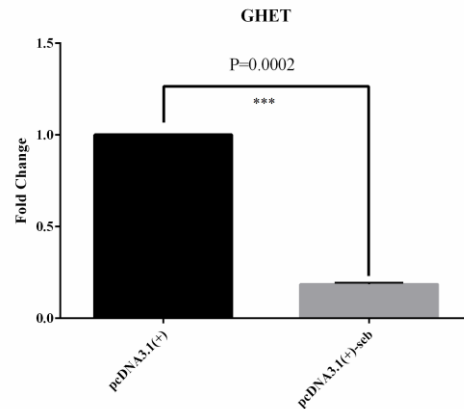
شکل ۴- تایید صحت سنتز cDNA به روش PCR. چاهک شماره ۱ و ۲ نتیجه PCR ژن *GAPDH* بر روی cDNA سنتز شده، چاهک شماره ۳ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

**نتایج انجام real time RT-PCR:** واکنش *real time RT-PCR* بر روی RNAهای استخراج شده از سلول‌های کنترل و سلول‌های دارای ژن سم به طور جداگانه انجام شد. نتایج آنالیز آماری مربوط به *lncRNA* های *CCAT1* و *GHET1* به وسیله نرم افزار SPSS انجام شد. برای انجام این آنالیز، Ct هر نمونه (هم نمونه ژن مورد نظر و هم نمونه ژن کنترل داخلی) به صورت جداگانه برای انجام آنالیز و بدست آوردن تغییر بیان، یادداشت گردید. پس از نرمالایز کردن داده‌ها با ژن خانه‌دار و بدست آوردن میزان بیان، برای نرم افزار تعریف می‌شود و در نهایت نتایج به صورت نمودار قابل مشاهده می‌باشد. ستاره بر روی نمودار ضریب اطمینان جهت قبولی فرض آزمایش است. یک ستاره کمتر یا مساوی ۵ دهم است و نشان دهنده این است که فرض آزمایش با ۹۵ درصد قابل قبول است. دو ستاره کمتر از یک هزارم است و نشان دهنده این است که فرض آزمایش ۹۹ درصد قابل قبول است و سه ستاره کمتر از یک ده هزارم است و فرض آزمایش ۹۹/۹ درصد قابل قبول است. در این آنالیز تغییر بیان هر دو *lncRNA* معنی‌دار بود. در واقع اثر بیان ژن سم *SEB* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، سلول به سمت آپوپتوز پیش رفته است. میزان تغییر بیان در نمودارهای زیر نشان داده شده است.



شکل ۵- بیان *lncRNA* *CCAT1* به طور معنی داری در گروه ترنسفکت شده با ژن سم *SEB* نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است ( $P=0.0462$ ).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد



شکل ۶- بیان lncRNA *GHET1* به طور معنی داری در گروه ترنسفکت شده با ژن سم *SEB* نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است ( $P=0.0002$ ).

### بحث

سرطان معده یکی از بیماری‌هایی است که عوامل مختلفی در بروز آن تاثیر دارند، از جمله عوامل خطرزا می‌توان به عفونت هلیکوباکتر پیلوری و مصرف الکل اشاره کرد. هرکدام از این عوامل می‌توانند در مستعد ساختن افراد در ابتلا به سرطان نقش‌های متفاوتی داشته باشند. بعضی از این عوامل از طریق ایجاد التهاب و زخم معده زمینه را برای ابتلا به سرطان معده فراهم می‌کند (۷). جراحی‌های سرطان معده و به دنبال آن شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی می‌تواند در مراحل اولیه سبب بهبود سرطان شود. به منظور جلوگیری از بروز این سرطان بهتر است به تغذیه و شرایط و سبک زندگی اهمیت خاصی داده شود. مصرف غذاهای نمکی و چرب و عدم استفاده از میوه‌ها و سبزیجات و ریزمغذی‌ها می‌تواند ریسک بروز این سرطان را افزایش دهد. مصرف کاروتنوئیدها و ویتامین C و چای سبز رابطه‌ی معکوس با ریسک بروز سرطان معده را نشان می‌دهند. اشخاص با توده‌ی بدنی بالا و افرادی که بیشتر در معرض اشعه‌های یونیزه‌کننده قرار می‌گیرند نیز این ریسک را در خود پرورش می‌دهند (۹ و ۸). سم انتروتوکسین B که یک توکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. در صورتی که وارد بدن شود به گیرنده‌های T-cell متصل شده و سبب ایجاد سندروم شوک سمی می‌شود و اغلب مسمومیت‌های غذایی را بر عهده دارد. دانشمندان با تغییراتی که در ساختار این سم ایجاد کردند موفق به طراحی واکسنی شدند که پس از ورود به بدن باعث ایجاد طوفان سیتوکاینی نمی‌شود (۱۱ و ۱۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز بنابر اهمیتی که درمان سرطان در جامعه‌ی امروزی دارا می‌باشد، تصمیم بر کشف راهی برای کنترل و درمان سرطان معده در رده‌ی AGS گرفته شد. طی این مطالعه‌ی تجربی پلاسمید pcDNA3.1(+) که حاوی ژن سم *SEB* باشد طراحی شد و به صورت تجاری خریداری گردید. پس از تکثیر این پلاسمید در باکتری *E. coli* سویه‌ی *TOP10F*، این پلاسمید توسط کیت‌های اختصاصی استخراج پلاسمید، استخراج و خالص‌سازی شد که توسط تکنیک لیپوفکشن این سازواره وارد سلول‌های AGS شد. این سازواره پس از بیان در سلول‌های یوکاریوتی، این سلول‌ها را به نئومایسین مقاوم کرد که به عنوان مارکری برای جداسازی سلول‌های دارای ژن سم از سایر سلول‌ها شد. پس از تیمار سلول‌ها با نئومایسین و رشد و تکثیر آن‌ها، RNA سلول‌ها برای آنالیزهای بیان ژن استخراج شد و با کیت مخصوص از روی آن cDNA تهیه شد. real time RT-PCR برای lncRNAهای *GHET1* و *CCAT1* انجام شد. برای مقایسه از ژن رفرنس *GAPDH* نیز استفاده شد و بیان سایر ژن‌ها با آن‌ها مقایسه شد. در نهایت مقایسه با سلولی که ژن سم را دریافت نکرده بود، انجام شد و این مقایسات توسط نرم‌افزارهای آماری آنالیز شدند. نتایج حاصل از این تست حاکی از آن می‌باشد که بیان lncRNAهای *GHET1* و *CCAT1* تحت تاثیر بیان ژن سم *SEB* کاهش معنی داری یافته بود.

طبق نتایج به دست آمده می‌توان این مطلب را عنوان کرد که این سم توانایی القای آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی معده رده AGS را داراست.

تحقیقات ارائه شده در زیر نیز در راستای این مطالعه بوده و صداقت نتایج حاصل شده از پژوهش حاضر را اثبات می‌نمایند:

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

Beth A. Pulaski و همکاران در سال ۲۰۰۰ جهت بررسی خاصیت سم *SEB* بر روی سلول‌های سرطانی سینه آزمایشی به شرح زیر طراحی شد. وکتوری مبتنی بر ژن سم *SEB* ساخته و به موش‌های سرطانی تزریق شد. نتایج مطالعه حاکی از افزایش بقای موش‌ها و جلوگیری از متاستاز بود (۱۲).

Pflegler و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از باکتری‌ها مطالعاتی بر روی درمان سرطان انجام داده‌اند. این بررسی خلاصه و نتایج ۱۳۸ سال گذشته را در تومور درمانی با استفاده از باکتری‌ها، مطالعات کلاسیک تا مطالعات کلینیکی امروز را شامل می‌شود. در این راستا، چندین دیدگاه مورد بحث قرار گرفته است که باکتری‌ها علاوه بر خاصیت ضد توموری ذاتی خود می‌توانند به عنوان وکتور مورد استفاده قرار گیرند و ترکیبات درمانی را به تومور منتقل کنند. در این تحقیق راه کارهای راهبردی بیان شده، کاربرد بیشتر باکتری‌ها را فراهم می‌سازد که ممکن است محدودیت‌های درمان معمول را برطرف کند (۱۳).

بهزادی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ در دانشگاه پزشکی بقیه‌الله تهران با استفاده از سموم باکتری‌ها نشان دادند که این سموم در بدن مدل‌های آزمایشی ایجاد پاسخ ایمنی می‌کنند. آن‌ها نشان دادند که *DNA* واکسن‌ها که دمین اول قسمت *C* نوروکسین تتانوس که با توالی آنتی‌ژن تومور جفت می‌شود بر علیه سرطان کولون پاسخ ایمنی شدیدی را به دنبال دارد (۱۴).

تحقیقی در سال ۲۰۱۷ توسط Miao و همکاران جهت بررسی انترتوکسین *SEB* بر روی سلول‌های *Sqc* انجام شد. نتایج گویای این مطلب بود که *SEB* می‌تواند به عنوان یک ماده‌ی بالقوه برای آسان‌سازی برخی ایمنی‌تراپی‌ها عمل کند. *SEB* قادر است که رشد سلول‌های *Sqc* را در مدل‌های موشی مهار کند (۱۵).

Ejtehadifar و همکاران در سال ۲۰۱۷ با تحقیقی که بر روی رده‌ی سلولی *U266* که همزمان با سلول‌های ریشه‌های مزانشیمی کشت شده بودند، انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تأثیر ژن سم *SEB* بر این سلول‌ها می‌تواند سبب افزایش بیان در ژنهای *IL-10*، *IL-6* و *IKKb* شود و نرخ زنده‌مانی و تکثیر در این سلول‌ها را کاهش دهد. این سم بر روی ژن  $TGF-\beta$  بی تأثیر گزارش شد. در نهایت این تیم تحقیقاتی گزارش کردند که *SEB* می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب برای کاهش تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های سرطانی و تغییر دهنده‌ی بیان ژن‌ها در *U266* باشد که البته نیازمند تحقیقات مولکولی بیش‌تری هستند (۱۶).

### نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر با توجه به کاهش بیان *lncRNA*های مذکور، می‌تواند نشان دهنده موثر بودن سم *SEB* بر القای روند آپوپتوز سلول‌های سرطانی معده باشد. بر همین راستا ما بیان دو مورد از *lncRNA*هایی را که در سلول در حال آپوپتوز کاهش بیان دارند، بررسی کردیم. بر طبق نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های حاصل از واکنش *real time RT-PCR*، بیان *lncRNA*های *CCAT1* و *GHET1* کاهش یافته‌اند. به همین جهت از داده‌های آماری این نتیجه حاصل می‌شود که سم *SEB* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، در نهایت منجر به القای آپوپتوز و حذف توده‌ی توموری می‌شود. بر طبق این نتایج، *lncRNA*های *CCAT1* و *GHET1* که در سلول‌های سرطانی بیان بالایی دارند، پس از لیپوفکشن و تأثیر سم *SEB* بر سلول‌ها، به طور معنی داری کاهش یافت.

### References:

1. Meng J, Li P, Zhang Q, Yang Z, Fu S. A four-long non-coding RNA signature in predicting breast cancer survival. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2014; 33(1): 1-0.
2. Chen LL. Linking long noncoding RNA localization and function. *Trends in biochemical sciences*. 2016; 41(9): 761-72.
3. Doosti A, Zamani M, Ghasemi Dehkordi P, Taheri S, Banitalebi M, Mahmoudzadeh M. Association of the p53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in South West of Iran. *Scientific Research and Essays*. 2011; 6(15): 3148-3152.

4. Barati B, Shirazi M, Saadati M, Soltanpour M. Detection of staphylococcus aureus enterotoxin type C isolated from healthy carriers by PCR. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 1970; 14(2): 117-27.
5. Souod N, Kargar M, Doosti A, Ranjbar R, Sarshar M. Genetic Analysis of *cagA* and *vacA* Genes in *Helicobacter Pylori* Isolates and Their Relationship with Gastrointestinal Diseases in the West of Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2013; 15(5): 371-6.
6. Hosseini SA, Ebrahimi F, Nazarian S, Hamidi M. Recombinant Expression of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Type B as a Vaccine Candidate. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2018; 16(6): 653-64.
7. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2006; 12(3): 354.
8. Fukao A, Tsubono Y, Tsuji I, Hisamichi S, Sugahara N, et al. The evaluation of screening for gastric cancer in Miyagi prefecture, Japan: a population-based case-control study. *International journal of cancer*. 1995; 60(1): 45-8.
9. Saghier AA, Kabanja JH, Afreen S, Sagar M. Gastric cancer: environmental risk factors, treatment and prevention. *J Carcinogene Mutagene*. 2013; 14(8):
10. Jeong WH, Song DH, Hur GH, Jeong ST. Structure of the staphylococcal enterotoxin B vaccine candidate S19 showing eliminated superantigen activity. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. 2017; 73(11): 595-600.
11. Krakauer T. FDA-approved immunosuppressants targeting staphylococcal superantigens: mechanisms and insights. *ImmunoTargets and Therapy*. 2017: 17-29.
12. Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E, Ostrand-Rosenberg S. Cooperativity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer research*. 2000; 60(10): 2710-5.
13. Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, Keasling JD. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nature biotechnology*. 2006; 24(8): 1027-32.
14. Behzadi E, Halabian R, Hosseini HM, Fooladi AA. Bacterial toxin's DNA vaccine serves as a strategy for the treatment of cancer, infectious and autoimmune diseases. *Microbial pathogenesis*. 2016; 100: 184-94.
15. Miao BP, Zhang RS, Sun HJ, Yu YP, Chen T, et al. Inhibition of squamous cancer growth in a mouse model by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B-triggered Th9 cell expansion. *Cellular & molecular immunology*. 2017; 14(4): 371-9.
16. Ejtehadifar M, Halabian R, Fooladi AA, Ghazavi A, Mosayebi G. Anti-cancer effects of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin type B on U266 cells co-cultured with Mesenchymal Stem Cells. *Microbial pathogenesis*. 2017; 113: 438-44.

## بررسی اثرات ژن *Alpha toxin* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بر بیان ژن های *BAX*، *BCL-2* و *Survivin* در سلول های *MCF-7*

علی رفیعی طاقانکی<sup>۱</sup>، محمد فاضل گنجی<sup>۲</sup>، سمیه تیربخش گوران<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلول ها، و در اثر عوامل محیطی و اختلال های ژنتیکی به وجود می آید. تومور مجموعه ای از سلول هاست که به دلیل رشد و تقسیم خارج از کنترل آن ها ایجاد می شود. مرگ سلولی یک مکانیسم یا مجموعه ای از وقایع برنامه ریزی شده ی ژنتیکی می باشد که طی آن سلول به خودکشی واداشته می شود. هدف از انجام این پژوهش بررسی تغییر بیان ژن های آپوپتوزی بعد از تیمار سلول سرطان سینه با سم آلفاتوکسین می باشد.

**مواد و روش ها:** پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *Alpha toxin* به روش شوک حرارتی وارد باکتری *E.coli* سویه *TOP10* شد و پس از تکثیر، پلاسمید نو ترکیب استخراج شد. سلول های *MCF-7* مراحل کشت آن ها انجام شد و آماده سازی آن ها صورت گرفت. سپس مراحل لیپوفکشن به منظور وارد کردن پلاسمید به این سلول ها انجام شد و پس از غربالگری توسط آنتی بیوتیک نتوماپسین آماده استخراج RNA شدند. سپس استخراج RNA انجام شد و cDNA توسط کیت یکتا تجهیز آزما سنتز شد و در نهایت Real time RT-PCR به منظور بررسی تغییر بیان ژن های *Bax*، *Bcl-2* و *Survivin* انجام شد.

**نتیجه گیری:** بیان ژن *Alpha toxin* در سلول های سرطان سینه در رده *MCF-7* سبب کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوزی *Bcl-2* همچنین افزایش بیان ژن پرو آپوپتوزی *Bax* و کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوزی *Survivin* می شود که در نهایت منجر به القای آپوپتوز و حذف توده توموری می شود.

**واژگان کلیدی:** سرطان سینه، آپوپتوز، آلفاتوکسین.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۸۸۴۵۹۷۰۴

پست الکترونیک: Somayetirbakhsh@gmail.com

## Investigating the effects of *Staphylococcus aureus* Alpha toxin gene on the expression of BCL-2, BAX and Survivin genes in MCF-7 cells

Ali Rafieci-Taghanki<sup>1</sup>, Mohammad Fazel Ganji<sup>2</sup>, Somaye Tirbakhsh-Gouran<sup>3\*</sup>

1. M.Sc. in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. B.Sc. Student Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. PhD in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background and objective:** Uncontrolled cell division, in addition to genetic disorders and environmental factors, can lead to cancer. A tumor is a group of cells that result from uncontrolled cell growth and division. Cell death is a process or sequence of genetically predetermined events that force a cell to die. This study aims to look into the changes in apoptotic gene expression following alpha-toxin treatment of breast cancer cells.

**Materials and methods:** *E. coli* strain TOP10 was inoculated with a recombinant plasmid carrying the Alpha toxin gene using the heat shock method. Following multiplication, the recombinant plasmid was removed. The MCF-7 cells were produced and cultivated. Following the insertion of the plasmid into these cells via lipofection, they were screened with the antibiotic neomycin and prepared for RNA extraction. After RNA extraction and cDNA synthesis using the Yekta Tehiz Azma kit, real-time RT-PCR was carried out to look at changes in the expression of the Bcl-2, Bax, and Survivin genes.

**Conclusion:** The expression of the alpha toxin gene in MCF-7 breast cancer cells results in the induction of apoptosis and the removal of the tumor mass by decreasing the expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2, increasing the expression of the pro-apoptotic gene Bax, and decreasing the expression of the anti-apoptotic gene Survivin.

**Keywords:** Cancer, Apoptosis, Alpha toxin.

### مقدمه

در اذهان عمومی سرطان یک بیماری کشنده و مرگ آور است که همراه با درد و زجر بسیار همراه بوده است. سه عامل باعث افزایش ابتلای فرد به سرطان می‌شوند که عبارتند از: نحوه زندگی، محیط و وراثت. پیش بینی می‌شود نحوه زندگی و عوامل محیطی ۹۰٪ در ایجاد سرطان نقش دارند. بخش زیادی از این رفتارها تحت کنترل اشخاص است مانند: استعمال دخانیات، مصرف مشروبات الکلی، رژیم غذایی، قرار گرفتن مداوم در نور خورشید، بهداشت فردی و عمومی. پس می‌توان گفت که سرطان‌ها قابل پیشگیری هستند (۱).

سرطان به بیماری گفته می‌شود که روابط و نظم بین سلولی را دچار اختلال می‌کند و ژن‌های حیاتی و مهم را وادار به نافرمانی می‌کند (۲). در هنگام بروز سرطان اتفاقات مولکولی متعددی به وجود می‌آید که به دلیل ایجاد تغییرات بنیادین در ویژگی‌های عادی سلول نمایان می‌شوند. در سلول‌های سرطانی این اتفاق پیش می‌آید که سیستم‌های کنترل معمول سرطان که از رشد بی‌رویه سلول و هجوم به دیگر بافت‌ها جلوگیری می‌کند دیگر از کار افتاده‌اند (۳).

این سلول‌ها همگام با رشد، ویژگی‌های جدیدی در خود ایجاد می‌کنند که این تغییرات شامل: ساختار سلول، کاهش چسبندگی و تولید آنزیم‌های جدید می‌شود. این تغییرات قابل توارث، به سلول و سلول‌های تقسیم یافته از آن اجازه می‌دهد که حتی در حضور سلول‌های نرمال که عموماً مانع رشد سلول‌های مجاور می‌شوند، تقسیم شده و رشد می‌کنند (۳).

سرطان به علت تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها در اثر عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی به وجود می‌آید. سرطان به چهار دسته کلیدی تقسیم می‌شود که شامل ژن‌های توده‌زا، ژن‌های مهارکننده توموری، ژن‌های ترمیم‌کننده و ژن‌های مرگ برنامه‌ریزی شده، است (۴).

به کمک روش‌های مختلف مولکولی و طیف‌سنجی جرمی می‌توان قدرت بیان ژن‌ها و تولید پروتئین‌های دچار اختلال را تشخیص داد. بعضاً تعدادی از سرطان‌ها به کمک بیومارکرهای نوین به سرعت تشخیص داده می‌شوند و به بهبود و درمان بیماری کمک‌های شایانی می‌کنند. پس از تشخیص شکل‌های فضایی پروتئین‌های معیوب می‌توان داروهای ضد سرطان جدید و نوینی ساخت که بتوان سلول‌هایی که در حال سرطانی شدن هستند را قبل از وقوع این اتفاق هدف گرفت و از این اتفاق جلوگیری کرد. برای بهبود و درمان بیماری‌های سرطانی می‌توان از چند روش کمک گرفت که شامل: جراحی، شیمی‌درمانی، پرتو درمانی، ایمونودرمانی و ژن درمانی (پیوند استخوان) می‌شود. رایج‌ترین روش درمان سرطان شیمی‌درمانی است که اصلی‌ترین مشکل این روش درمانی مقاوم بودن سلول‌های سرطانی و عوارض زیاد داروهای استفاده شده می‌باشد. به همین دلیل است که کشف داروهای سرطانی جدید همچنان در حال انجام است. یکی از رایج‌ترین داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی، داروهای القاء‌کننده آپوپتوز است. این مدل از داروها با القاء کردن آپوپتوز و شروع مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، منجر به از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌شوند (۵).

شایع‌ترین سرطان در بین زنان سرطان سینه است. این سرطان یکی از انواع پیچیده سرطان است که تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی می‌باشد. این سرطان جزء دسته تومورهای بدخیم است. سرطان سینه ۱۰ درصد از کل سرطان‌های موجود در دنیا را شامل می‌شود و ۳۰ درصد از کل سرطان‌های زنان را در بر می‌گیرد (۶).

ژن‌های گوناگون و عوامل محیطی مختلف به کمک یکدیگر نقش مهمی در افزایش تعداد ابتلا به این بیماری در زنان ایفا می‌کنند. این عوامل شامل: سن، سن اولین قاعدگی، سن شروع یائسگی، سن اولین زایمان، مدت زمان شیردهی، سقط جنین و استفاده از قرص‌های ضد بارداری می‌باشد (۷).

سم *Alpha toxin* بنام آلفاهمولیزین شناخته شده است. عامل اصلی سیتوتوکسیک آزاد شده توسط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است. این سم به طور عمده شامل ۶۸٪ ساختار صفحات بتا و حدود ۱۰ درصد صفحات آلفا است. ژن *hla* که از ژنوم *استافیلوکوکوس اورئوس* رمز می‌شود دارای محصول پروتئینی واجد ۲۹۳ اسید آمینه می‌باشد (۸). تحقیقات نشان می‌دهد که سم *Alpha toxin* نقش مهمی در بیماری‌زایی دارد و فقدان ژن *hla* سبب کاهش ویروانس باکتری می‌گردد (۹).

نقش این سم در کنترل سرطان این است که بیان ژن *Alpha toxin* در سلول‌های سرطان سینه در رده *MCF-7* سبب کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوزی *BCL-2* و همچنین افزایش بیان ژن پروآپوپتوزی *BAX* و کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوزی *Survivin* می‌شود. که در نهایت منجر به القای آپوپتوز و حذف توده توموری می‌شود (۱۰).

آنکوژن *BCL-2* روی کروموزوم ۱۸ قرار گرفته و یک پروتئین ۲۴ کیلودالتونی را رمز می‌کند که این پروتئین در غشا هسته، شبکه‌اندوپلاسمی و غشای میتوکندری‌ها تظاهر پیدا می‌کند (۱۱)، میزان بالای تظاهر *BCL-2* با کاهش مرحله‌ای که به مرگ سلول منتهی می‌شوند، موجب افزایش طول عمر سلول از طریق کاهش آپوپتوز می‌گردد (۱۲).

ژن *BAX* بر روی کروموزوم ۷ است، که این ژن می‌تواند در مسیرهای داخلی و یا همچنین مسیر میتوکندریایی که در آپوپتوز نقش دارد دخالت کند. در این مسیر سیتوکروم C از فضای بین دو غشاء میتوکندری به درون سیتوپلاسم آزاد می‌شود. نفوذپذیری غشاء میتوکندری به سیتوکروم C به واسطه‌های پروآپتوتیک و آنتی‌آپتوتیک تعیین می‌شود. مولکول‌های پروآپتوتیک مانند *BAX* و *BAK* باعث نفوذپذیری غشاء میتوکندری می‌شوند. هنگام ورود سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوپلاسم، با *۱-PTA*، *fapA*، پروکاسپاز-۹ تعامل کرده و آپوپتوزوم ایجاد می‌شود (۱۳).

*Survivin* یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز است که ژن آن بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ در جایگاه ۲۵ می‌باشد و بیان آن منجر به رمز شدن پروتئینی با ۱۴۲ اسید آمینه می‌شود. این پروتئین بر خلاف سایر پروتئین‌های مهارکننده

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

آپوپتوز که در بافت‌های بالغ یافت می‌شوند، فقط در بافت‌های جنینی و تعدادی از بافت‌های بالغ مثل جفت، تیموس و بیضه دیده می‌شود (۱۴).

هدف از این تحقیق بررسی اثرات ژن *Alpha Toxin* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بر بیان ژن های *BAX*، *BCL-2* و *Survivin* در سلول های MCF-7 او تحقیق و بررسی تغییرات بیان ژن های *Bax*، *Bcl-2* و *Survivin* در سلول های MCF-7 است.

### روش کار

در آغاز از بانک ژن جهانی توالی ژن سم *Alpha toxin* دریافت گردید. یک سازه ژنی با وارد کردن این توالی به پلاسمید (+)pcDNA3.1 ایجاد شد.

برای تولید این توالی شرکت *Generay biotechnology* انتخاب شد. سازه‌ی ژنی مورد نظر در میکروتیوب‌هایی به آزمایشگاه ارسال شد. آنزیم محدودکننده *BamH1* و *Ecor1* برای هضم آنزیمی استفاده شد و از ورود ژن به پلاسمید اطمینان حاصل گردید و توسط ژل الکتروفورز مشاهده شد.

برای تکثیر سازه‌های ژنی آن‌ها را وارد میزبان می‌کنیم که این میزبان باکتری‌هایی هستند که رشد سریع دارند. از باکتری‌های *E.coli* سویه‌ی *TOP10F* که مستعد پذیرش‌اند به‌منظور ورود سازه‌ی ژنی استفاده شد.

ترانفورماسیون برای ورود پلاسمیدهای نو ترکیب به باکتری، از باکتری‌های اشرشیا کلای سویه‌ی *TOP10F* که مستعد پذیرش شده‌اند استفاده شد. ابتدا یک کلنی از باکتری *E.coli* سویه‌ی *TOP10F* در یک لوله‌ی حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع *LB-Broth* کشت داده شد. با گذشت ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با شرایط ۲۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد سلول‌ها وارد فاز رشد نمایی شدند. سپس محلول با شرایط ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ قرار گرفت که سلول‌ها ته‌نشین شدند و محلول رویی دور ریخته شد. سپس با محلول *CaCl2* با غلظت ۰/۱ مولار که در شرایط سرد و استریل سلول‌ها مستعد شد به تیوب میزان ۵ میکرولیتر پلاسمید نو ترکیب اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی آب و یخ قرار گرفت. در مرحله بعد مرحله شوک حرارتی انجام شد که سلول‌ها ۱/۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بلافاصله اما به آرامی ۲ دقیقه روی آب و یخ برده شدند. در این حالت پلاسمید‌های نو ترکیب وارد *E.coli* شده است. بعد یکساعت در انکوباتور قرار داده شد و سپس روی محیط امپی سیلین دار کشت داده شد و سپس از کلونی‌ها در محیط مایع آنتی بیوتیک دار کشت داده شد و سپس استخراج پلاسمید انجام گرفت.

انتقال پلاسمید به سلول (لیپوفکشن) وقتی صورت گرفت که سلول‌های *MCF-7* به تراکم ۷۰٪ رسیدند از آن‌ها رسوب سلولی تهیه شد و در ۱ میلی‌لیتر از محیط سوسپانسیون سلولی تهیه شد. سپس نوبت به شمارش سلول رسید که ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی لام نفوبار قرار گرفت و لامل گذاری شد و شمارش شد و تعداد سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد. سپس به ۳ خانه پلیت ۶ خانه میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و مقداری از سوسپانسیون که حاوی ۳۰۰۰۰۰ سلول بود محاسبه و به هر خانه اضافه شد. خانه اول بعنوان خانه دریافت کننده پلاسمید حاوی ژن *Alpha toxin*، خانه دوم بعنوان دریافت کننده پلاسمید فاقد ژن *Alpha toxin* و خانه سوم هیچ پلاسمیدی دریافت نکرد. سپس به مدت ۱ دقیقه حرکت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۵٪ و غلظت ۵٪ *Co2* به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس بعد از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت خانه‌ها تخلیه شد و خانه‌ای که به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود با ۰/۵ میلی‌لیتر *PBS* شستشو و تخلیه شد و میزان ۳ میلی‌لیتر محیط کشت *RPMI* حاوی ۱۰٪ *FBS* و ۱٪ *Pen-strep* اضافه شد. سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر *RPMI* خام به خانه‌هایی که برای انجام لیپوفکشن انتخاب شده بودند اضافه شد و به آن شستشو داده شد و تخلیه گردید سپس میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت *RPMI* خام اضافه شد و ۳۰ تا ۴۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط کشت تخلیه شد و مرحله شستشو با



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

۰/۵ میلی لیتر از محیط کشت RPMI خام تکرار شد. سپس حدود ۱ میلی لیتر از محیط کشت خام که تنها روی سلول‌ها رو پوشاند به خانه نمونه اضافه شد. همزمان با این مرحله ۹۸/۵ میکرولیتر از کشت خام با ۱/۵ میکرولیتر از محلول لیپوفکتامین مخلوط شد و ۲ میکروگرم از پلاسمید با محیط کشت خام به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسید و سپس محلول لیپوفکتامین و محلول آماده‌سازی شده پلاسمید باهم به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند و به خانه نمونه اضافه شد و پلیت به مدت ۴ تا ۶ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. بعد از گذشت زمان موردنظر به خانه نمونه ۲ میلی لیتر محیط کشت RPMI حاوی ۲۰٪ FBS و فاقد آنتی‌بیوتیک اضافه شد و پلیت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت ۲۴ ساعت بعد با آنتی بیوتیک نئومایسین غربال شدند و بعد از یک هفته از سلول‌ها استخراج RNA انجام گرفت. برای این کار سلول‌های مرحله قبل را به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند که محیط رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل ۱ میلی‌متر محلول RNXplus اضافه شد و باهم مخلوط شدند و بعد به تیوب ۱/۵ میلی‌متری منتقل شدند. به تیوب ۱۰ ثانیه ورتکس داده شد و بعد ۵ دقیقه به حالت استراحت در دمای محیط قرار گرفت. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به تیوب‌ها اضافه شد و به آرامی وارونه شدند. سپس تیوب‌ها بلافاصله به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و در ادامه سانتریفیوژ روی ۱۲۰۰۰ rpm تنظیم شد و تیوب‌ها به مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز رویی با سمپلر جدا شد و به تیوب جدید انتقال پیدا و به میزان حجم ایزوپروپانول به آن اضافه گردید. سپس تیوب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۱۵-۲۰ دقیقه قرار گرفت و بعد سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و محلول رویی دور ریخته شد. در ادامه اتانول ۷۵٪ به میزان ۱ میلی‌متر به رسوب اضافه و به آرامی تکان می‌دهیم. دوباره سانتریفیوژ با دور ۷۵۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۸ دقیقه قرار می‌گیرد و محلول‌های رویی خارج شد سپس تیوب به مدت زمان ۱۵ دقیقه زیر هود قرار گرفت تا خشک شد در ادامه میزان ۲۵ میکرولیتر آب تزریق به تیوب اضافه شد تا RNA در آن شناور شود. سپس RNA خالص شده با دستگاه نانودراپ غلظت آن مشخص شد که غلظت RNA حدود ۰/۱۶ گرم در میکرولیتر تشخیص داده شد. سپس در محله بعدی برای دستیابی به ۴ میکروگرم RNA محلول حاوی RNA استفاده شد. برای سنتز cdNA از کیت یکتا تجهیزآزما برای تولید cdNA استفاده شد که نمونه تخلیص شده از مرحله قبل حدود ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر تشخیص داده شد و طبق پروتکل کیت میزان ۵ میکرولیتر از نمونه جهت به دست آمدن ۵۰۰ نانوگرم از نمونه به میکروبیوب ۰/۲ میلی‌متری اضافه گشت. در ادامه مقدار ۱ میکرولیتر از پرایمر Random Hexamer به میکروبیوب اضافه و حجم محیط واکنش توسط DEPC- treated water به ۱۳/۴ میکرولیتر رسانده شد. در ادامه مخلوط حاصل شده را spin شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله روی یخ گذاشته شد در ادامه یکبار دریگر spin انجام و دوباره روی یخ قرار گرفت. میزان ۰/۵ میکرولیتر RNasin (۴۰ واحد بر میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر 5x first-strand buffer میکرولیتر M-<sup>1</sup> MLV (۲۰۰ واحد بر میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار) به میکروبیوب اول اضافه و spin شد. در ادامه میکس به دست آمده به مدت ۶ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای اینکه مطمئن شویم cdNA به درستی سنتز شده ابتدا PCR با پرایمرهای مناسب انجام شد و نتایج روی ژل الکتروفورز مشاهده شد و در نهایت Real Time RT-PCR با همان ژن‌ها صورت گرفت.

Real Time RT-PCR: در این مرحله از جفت پرایمرهای forward و revers طراحی شده برای انجام Real time RT-PCR استفاده شد. که برای بررسی میزان تغییر بیان در ژن‌های cdNA در سلول‌های رده‌ی سلول MCF7 در 2 سلول ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده به کار می‌رود. که ابتدا در هر میکروبیوب مقدار ۷/۵ میکرولیتر mastermix و ۰/۴ میکرولیتر از هر پرایمر و ۱ میکرو لیتر cdNA اضافه شد و حجم مخلوط واکنش توسط آب تزریق به ۱۵ میکرولیتر رسید. برای ایجاد منحنی استاندارد از غلظت‌های ۱ و ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ استفاده شد.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

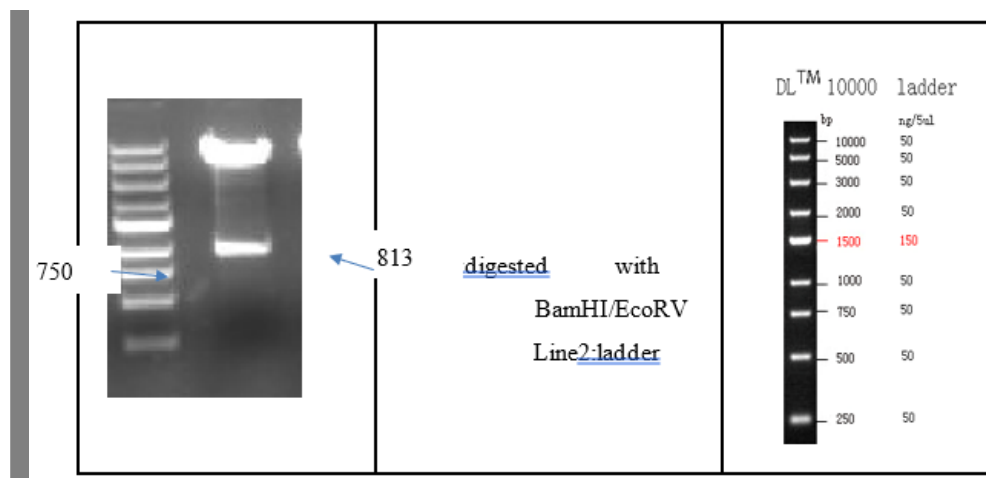
جدول ۱- پرایمر های مورد استفاده در این پژوهش

نام پرایمر	دمای اتصال	سایز باند	توالی
<i>Alpha-toxin-F</i>	۶۷	۲۲۷	ACACTGCTGCTCGGCTCCATTC
<i>Alpha-toxin-R</i>	۶۷	۲۲۷	ATGGTGCCCTTTGTGCGAATC
<i>Survivin-F</i>	۶۴	۱۷۰	AGAACTGGCCCTTGGAGG
<i>Survivin-R</i>	۶۴	۱۷۰	CTTTTTATGTTCTCTATGGGGTC
<i>Bcl2-F</i>	۶۵	۲۴۵	GACGACTTCTCCCGCCGCTAC
<i>Bcl2-R</i>	۶۵	۲۴۵	CGGTCAGGTACTCAGTCATCCAC
<i>Bax-F</i>	۶۵	۲۳۴	AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC
<i>Bax-R</i>	۶۵	۲۳۴	GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG
<i>GAPD-F</i>	۶۴	۱۸۳	GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC
<i>GAPD-R</i>	۶۴	۱۸۳	GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC

آنالیز آماری: برای آنالیز تغییر بیان ژن ها بعد از تیمار با سم *Alpha toxin* در سلول های رده MCF-7 از نرم افزار REST 2009 برای محاسبه افزایش و کاهش بیان استفاده شد و نتایج به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته ها

صحت وکتور نو ترکیب: هضم آنزیمی بوسیله ۲ آنزیم اندونوکلاز *BamHI* و *EcoRV* انجام شد و روی ژل برده شد و نتایج زیر بدست آمد.



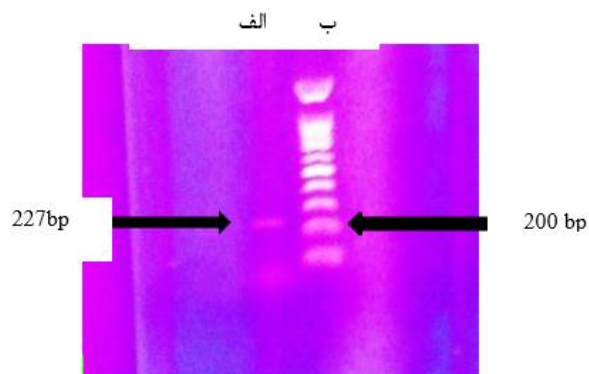
شکل ۱- تصویر تأیید حضور ژن *Alpha toxin* در پلاسمید pcDNA3.1(+) به روش هضم آنزیمی. باند ۸۱۳ bp مربوط به ژن *Alpha toxin* پس از هضم آنزیمی است.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

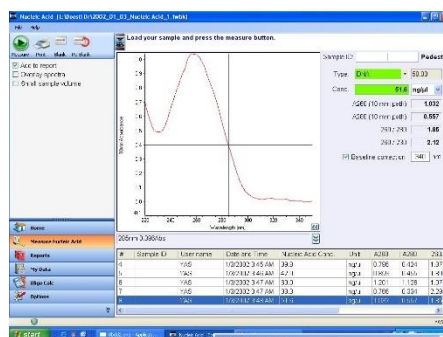
PCR: PCR برای ژن سم *Alpha toxin* توسط پرایمرهای اختصاصی این ژن انجام گرفت و نتیجه‌ی آن بر روی ژل الکتروفورز

برده شد.



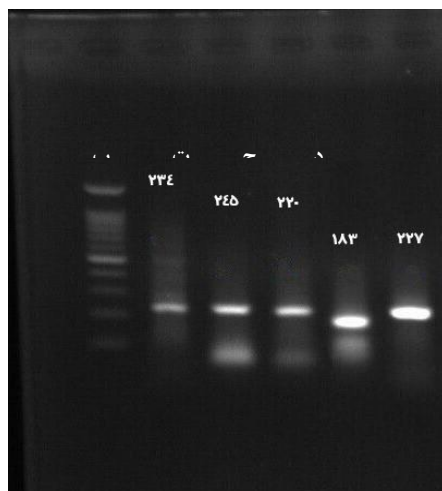
شکل ۲- تصویر محصول PCR ژن سم *Alpha toxin* با اندازه ۲۲۷bp (الف) و DNA Ladder (ب)

### نتایج تعیین غلظت توسط دستگاه نانودراپ



شکل ۳- نتایج نانودراپ سازواره ژنی

### نتایج RT-PCR تایید صحت cDNA سنتز شده:

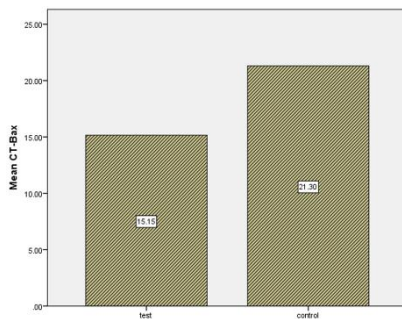


شکل ۴- نتایج PCR ژن های *GAPDH, Bax, Bcl-2, Survivin, Alpha toxin*

الف - DNA Ladder

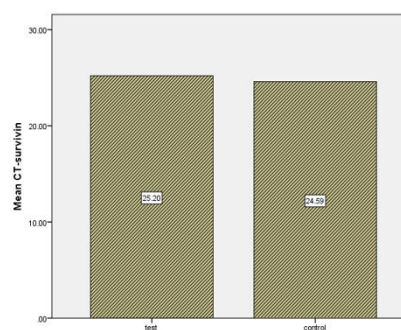
- ب- باند ۲۳۴bp مربوط به ژن *Bax*      پ- باند ۲۴۵ bp مربوط به ژن *Bcl-2*  
ت- باند ۲۲۰ bp مربوط به ژن *Survivin*      ج- باند ۱۸۳ bp مربوط به ژن *GAPDH*  
د- باند ۲۲۷bp مربوط به ژن *Alpha toxin*

**نتایج انجام Real time PCR:** بعد از اطمینان از اینکه سلول ژن سم را دریافت کرده است جهت بررسی ژن‌های درگیر در سرطان که در این تحقیق مورد بررسی قرار می‌گیرند از Real time PCR استفاده می‌کنیم که نتایج ریل‌تایم این ژن‌ها به این صورت است. در نتیجه آنالیز آماری ژن *BCL2* در سلول کنترل نسبت به سلول تست کاهش بیان معنی داری داشته و ژن *Survivin* در سلول کنترل نسبت به سلول تست کاهش بیانی داشته که معنی دار نیست. در ادامه ژن *Bax* در سلول کنترل نسبت به سلول تست افزایش بیان معنی داری داشته است.

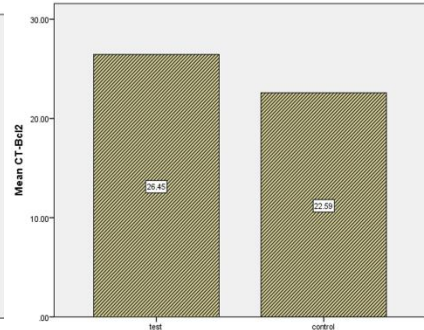


شکل ۷ - نمودار بیان ژن

2



شکل ۶- نمودار بیان ژن *Bcl-2*  
شکل ۵- نمودار بیان ژن *Bax*



**بحث**

سرطان یک بیماری کشنده است که نحوه‌ی زندگی و عواملی محیطی و وراثت به عنوان سه عامل مهم و تاثیر گذار در ایجاد آن نقش دارند؛ از جمله‌ی عوامل محیطی موثر در ایجاد سرطان می‌توان به مصرف دخانیات، رژیم غذایی و بهداشت فردی و عمومی اشاره کرد (۱۵). پلاسمید حاوی ژن *Alpha toxin* با استفاده از شوک حرارتی وارد باکتری *E. coli* سویه *TOP10* شد. پس از کشت سلول های *MCF-7* مراحل لیپوفکشن به دلیل وارد کردن پلاسمید به آن انجام شد. برای استخراج RNA غربالگری توسط آنتی‌بیوتیک نئوماپسین انجام شد. پس از انجام استخراج RNA، سنتز cDNA توسط کیت یکتا تجهیزآزما صورت گرفت. در نهایت بررسی تغییر ژن‌های *Bcl-2*، *Bax* و *Survivin* به روش Real Time RT-PCR صورت گرفت. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد بیان ژن *Alpha toxin* در سلول‌های سرطان سینه رده *MCF-7* باعث کاهش بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی *Bcl-2* و *Survivin* شد و همچنین باعث افزایش بیان ژن پروآپوپتوزی *Bax* شد که در نهایت منجر به القای آپوپتوز و حذف توده توموری می‌شود. لی و همکارانش در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثرات ماتریکس بر تکثیر و آپاپتوز در سلول‌های سرطانی انسانی *MCF7* و مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با آن پرداختند و نتیجه گرفتند که ماتریکس به طور قابل توجهی رشد می‌کند و باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های

سرطان سینه MCF7 می شود که به *Bax* مرتبط است. در مطالعه ما نیز به این نتیجه رسیدیم که افزایش بیان ژن *Bax* موجب آپوپتوز سلول های سرطان سینه رده MCF-7 می شود (۱۶).  
بی خوف و همکاران در سال ۲۰۱۶ خاصیت آنتی توموری ایندولوکینازولین بر روی رده سلولی سرطانی MCF7 مورد تحقیق قرار دادند. در این مطالعه اثرات آنتی توموری ترکیبات ایندولوکینازولین سنتز شده بر روی رده سلولی سرطان سینه در مقایسه با سیس پلاتین بررسی گردید و نتایج تحقیق آن ها نشان داد ترکیبات ایندولوکینازولین، سایتوتوکسیک تر از سیس پلاتین بر روی رده MCF7 است. این محقق مانند ما روی MCF-7 کار کرد (۱۷).  
میرزایی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ بیان داشتند که: *Alpha toxin* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط ژن *hla<sup>3</sup>* کد می شود و یک توکسین منفذ ساز است و روی طیف وسیعی از سلول های میزبان از جمله اریتروسیت ها و ماکروفاژها اثر سایتوتوکسیک دارد این محققان مانند ما بر روی *Alpha toxin* کار کردند (۱۷).

### نتیجه گیری

بیان ژن سم *Alpha toxin* در سلول های سرطان سینه رده MCF-7 سبب کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوزی *Bcl-2* و افزایش بیان ژن پرو آپوپتوزی *Bax* و همچنین کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوزی *Survivin* می شود که در نهایت منجر به القای آپوپتوز و حذف توده های توموری می شود.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد می باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام می نمایم.

### References:

1. Etebary, M., Jahanzadeh, I., Mohagheghi, M. A., & Azizi, E. Immunohistochemical analysis of P53 and its correlation to the other Prognostic factors in breast cancer. *Acta Medica Iranica*, 2002; 40(2), 88-94.
2. katzung, BG. And Masters. SB. Basic and clinical pharmacology. *Norwalk, appleton & lange* 1997; 6: 409-425.
3. Schneider, K. Cell Biology and Cancer. *Rediscovering. Biology* 2001; 3(16): 1-17.
4. Hanahan, D. and Weinberg. RA. The Hallmarks of Cancer Cell. *Cell* 2000; 100: 57-70.
5. Albreht, T. and Mckee. M. Making progress against cancer in Europe in. *Eurology Journal cancer* 2008; 44: 1451-6.
6. Thomas, RK. "High-throuphut oncogene mutation profiling in human cancer. *Nature Genetics* 2007; 39: 347-51.
7. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures .Am Can Soci, 2010; 43(4):120-126.
8. Bhakdi, S., & Tranum-Jensen, J. Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. *Microbiological reviews*, 1991; 55(4), 733-751.

9. Wardenburg, J. B., & Schneewind, O. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Journal of Experimental Medicine*, 2008; 205(2), 287-294.
10. Bantel, H., Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., & Jänicke, R. U.  $\alpha$ -Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *The Journal of cell biology*, 2001; 155(4), 637-648.
11. Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990; 348(6299), 334.
12. Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 1988; 335(6189), 440-442.
13. Parsa, N. Environmental factors of genes in the occurrence of cancers. *Nasha Alam magazine*. 1390; 2(1): 12-19. Mazoochi, T., Salehnia, M., & Khamechian, T. Expression of Two Survivin Variants in Different Developmental Stages of Mouse Ovaries. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences*, 2009; 15(4), 14-20.
14. Li, H., Li, X., Bai, M., Suo, Y., Zhang, G., & Cao, X. Matrine inhibited proliferation and increased apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells via upregulation of Bax and downregulation of Bcl-2. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015; 8(11), 14793.
15. BIKHOF, T. M., SHAABANZADEH, M., & AZADIAN, S. EVALUATION OF ANTI TUMOR PROPERTIES OF INDOLOQUINAZOLINE ON MCF-7 CELL LINE. 2016
16. Mirzaee, M., & Najarpisheh, S. Identification Sec, Hla, Pvl and Tsst-1 Toxins Genes Profile in of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *scientific journal of ilam university of medical sciences*, 2016; 24(4), 32-40.

## شناسایی lncRNAهای اختصاصی سرطان کولورکتال بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک و تایید آزمایشگاهی بیان آنها در مدل سلولی

مرضیه علایی<sup>۱</sup>، لیلا روحی<sup>۲\*</sup>

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد زرقان، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

۵. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان شامل مجموعه‌ای از بیماری‌های ژنتیکی است که با رشد و تکثیر غیرقابل کنترل سلول‌ها و انتشار آنها در بدن همراه است. هدف از این مطالعه مقایسه میزان بیان lncRNAهای *CCATI* و *CRNDE* در نمونه‌های توموری و نرمال افراد مبتلا به سرطان کولورکتال (CRC) بود.

**مواد و روش‌ها:** در ابتدا با استفاده از دیتابیس‌های آنلاین و مطالعات بیوانفورماتیک دو lncRNA در سرطان کولورکتال کاندید شدند. سپس، سلول‌های رده سرطانی کولورکتال SW948 و نرمال HDF تهیه گردید و پس از کشت سلول و استخراج RNA تام سلولی، cDNA سنتز گردید و تغییر سطح بیان این دو lncRNA در سلول‌های سرطانی و نرمال با استفاده از روش real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد که lncRNAهای *CCATI* و *CRNDE* بیشترین تغییر بیان را در سرطان کولورکتال دارند و کاندید مطالعات مولکولی شدند. سپس تغییرات سطح بیان lncRNAهای کاندید شده در رده‌های سلولی SW948 در مقایسه با رده HDF به کمک روش RT-qPCR بررسی شد ( $p < 0.05$ ). واکنش real time RT-PCR نشان داد که بیان هر دو *CRNDE* ( $P=0.0272$ ) و *CCATI* ( $P=0.0033$ ) در سلول سرطانی نسبت به نرمال افزایش بیان نشان داده است.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، می‌توان عنوان کرد این دو lncRNA در سرطان کولورکتال افزایش بیان معنی‌داری را نشان می‌دهند و می‌توانند به عنوان بیومارکر در سرطان کولورکتال معرفی شوند.

**واژگان کلیدی:** سرطان کولورکتال، بیوانفورماتیک، *CRNDE*، *CCATI*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۲۶۰۴۳۳۰۵

پست الکترونیک: lrouhi59@gmail.com

## Identification of colorectal cancer-specific lncRNAs based on bioinformatics studies and laboratory confirmation of their expression in cell models

Marzieh Alaei<sup>1</sup>, Leila Rohi<sup>2\*</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background and Objective:** Cancer includes a set of genetic diseases that are associated with the uncontrollable growth and proliferation of cells and their spread in the body. The aim of this study was to compare the expression levels of *CCAT1* and *CRNDE* lncRNAs in tumor and normal samples of people with colorectal cancer (CRC).

**Materials and methods:** At first, using online databases and bioinformatics studies, two lncRNAs were candidates in colorectal cancer. Then, SW948 and normal HDF colorectal cancer cells were prepared and after cell culture and total cell RNA extraction, cDNA was synthesized and the change in the expression level of these two lncRNAs in cancer and normal cells using real time PCR method, was investigated.

**Results:** Bioinformatics studies showed that lncRNAs *CCAT1* and *CRNDE* have the most expression changes in colorectal cancer and became candidates for molecular studies. Then, changes in the expression level of candidate lncRNAs in SW948 cell lines compared to HDF line were investigated using RT-qPCR method ( $p < 0.05$ ). The real time RT-PCR reaction showed that the expression of both lncRNA *CRNDE* ( $P = 0.0272$ ) and lncRNA *CCAT1* ( $P = 0.0033$ ) increased in cancer cells compared to normal.

**Conclusion:** According to the results obtained in this study, it can be said that these two lncRNAs show a significant increase in expression in colorectal cancer and can be introduced as biomarkers in colorectal cancer.

**Keywords:** colorectal cancer, bioinformatics, *CCAT1*, *CRNDE*.

### مقدمه

سرطان بزرگ‌ترین تهدید برای زندگی انسان است و اکنون به کانون تحقیقات دانشگاهی در سراسر جهان تبدیل شده است. گزارش آماری حاکی از آن است که سالانه ۱۶۶۵۵۴۰ مورد سرطان جدید و ۵۸۵۷۲۰ مورد مرگ ناشی از سرطان در ایالات متحده وجود دارد. وقوع این سرطان در مناطق مختلف جهان بسیار متفاوت است. بالاترین میزان بروز سرطان کولورکتال مربوط به آمریکای شمالی، استرالیا، نیوزیلند، اروپای غربی و ژاپن می‌باشد. همچنین میزان بروز متوسط مربوط به مناطق جنوبی آمریکای جنوبی و کمترین میزان مربوط به آفریقا، آسیای جنوبی و مرکزی است. بررسی میزان بروز و شیوع سرطان‌ها در ایران طی سال‌های ۶۵ تا ۷۵ بیانگر افزایش سرطان کولورکتال بوده است، به طوری که از رتبه نهم به رتبه پنجم صعود کرده است. در حال حاضر یکی از شایع‌ترین سرطان‌های دستگاه گوارش در ایران سرطان کولورکتال است که از نظر بروز در مردان ایرانی رتبه سوم و در زنان ایرانی رتبه چهارم را به خود اختصاص داده است (۱). در این میان، سرطان کولورکتال دومین سرطان شایع در زنان و سومین سرطان در مردان با وقوع بیش از یک میلیون مورد جدید و نیم میلیون مرگ بر اساس آمار جهانی سرطان است (۲). در چین، بروز CRC در رتبه سوم و مرگ و میر آن در رتبه چهارم در سرطان‌های مختلف قرار دارد (۳). اگرچه پیشرفت‌های قابل توجهی در علم پزشکی انجام شده است، شیوع و مرگ و میر CRC همچنان در حال افزایش است. بنابراین، یافتن بیومارکرهای جدید برای تشخیص زودهنگام و درمان هدفمند برای بیماران CRC ضروری است. RNAهای طولانی غیرکدکننده (lncRNA) دسته جدیدی از رونوشت‌ها هستند که به طور فزاینده‌ای با بیماری‌های انسانی مرتبط هستند (۴ و ۵). lncRNAها دارای توالی طولانی‌تر از ۲۰۰ جفت باز، دم poly-A و پروموتورها در ساختار پس از اتصال هستند. در فرآیندهای مختلف تمایز و توسعه بافت، اکثر lncRNAها آشکارا دارای توالی خاصی هستند. علاوه بر این، الگوهای بیان متفاوتی در قسمت‌های مختلف بافت انسان دارند (۶ و ۷).



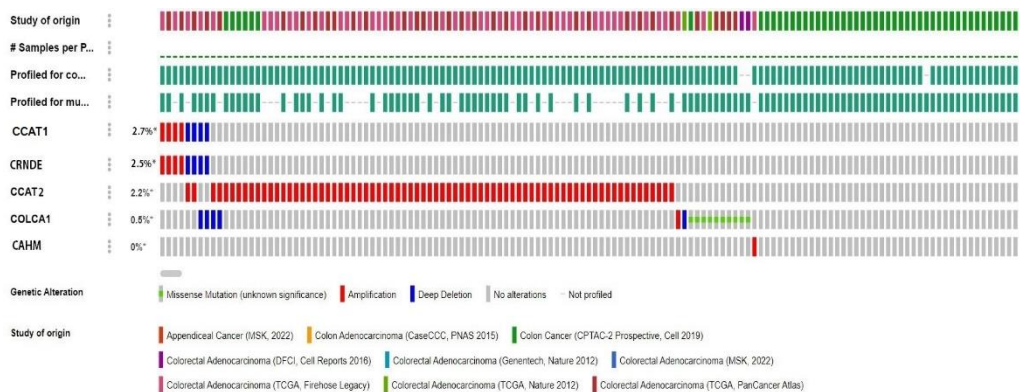
با توسعه سریع فناوری تراشه و توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا، بیومارکرهای ژنتیکی در تومورها به‌طور فزاینده‌ای ارزشمند شده‌اند. تعداد زیادی از تحقیقات نشان می‌دهد که lncRNAها نقش مهمی در بیماری‌های مختلف انسانی، به ویژه در سرطان‌ها ایفا می‌کنند که برخی از آن‌ها به کانون‌های تحقیقاتی کلاسیک تبدیل شوند و به‌طور جامع‌تری مورد مطالعه قرار گیرند (۸). در سال‌های اخیر، مطالعات زیادی در مورد lncRNAها در CRC انجام شده است. به عنوان مثال، *lncRNA CRNDE* نه تنها با تشخیص و پیش‌آگهی CRC مرتبط است، بلکه باعث افزایش تکثیر سلولی CRC و مقاومت شیمیایی نیز می‌شود (۹ و ۱۰). با این حال، می‌توان گفت lncRNAها دارای بیان متفاوت هستند و نقش مهمی در سرطان‌های دیگر مانند گلیوما، سرطان تخمدان و کارسینوم کبد دارند. بنابراین، lncRNAهای جدید مرتبط با CRC باید در برنامه‌های آینده پیدا و شناسایی شوند (۱۱). توسعه سریع فناوری بیوانفورماتیک، شناسایی و مطالعه lncRNAهای جدید بیشتری را ممکن می‌سازد. بسیاری از محققان از طریق داده‌کاوی از پایگاه‌های داده عمومی، ژن‌هایی با بیان متفاوت را کاندید می‌کنند. سپس، تأیید تجربی ژن‌های هدف برای درمان و اهداف بالینی، تشخیص زودهنگام بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲). در این تحقیق سعی بر آن است تا با مطالعات آزمایشگاهی و همچنین مطالعات بیوانفورماتیکی انواع lncRNA دخیل در سرطان کولورکتال شناسایی شود و تأیید شوند.

#### مواد و روش‌ها

با استفاده از پایگاه داده OMIM داده‌های مربوط به نمونه‌های سرطانی کولورکتال دانلود گردید. در ادامه مسیر کاندید کردن lncRNA از سایت Hugo استفاده شد. در این سایت IDهای گرفته شده از سایت OMIM را کپی کرده و گزینه GO کلیک شد. نتیجه این فرآیند این بود که نام lncRNAهایی که در کولورکتال دخیل هستند را به دست آورده و سپس در سایت LncRNA Disease چک شدند. همچنین برای اطمینان بیشتر مجدداً در سایت Cbioportal چک گردیدند و در نهایت lncRNAهایی که بالاترین تغییر بیان را داشتند، انتخاب شدند. در فاز مولکولی، دو رده سلولی SW948 و HDF از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. و در فلاسک کشت بافت، حاوی محیط DMEM (بیوایده، ایران) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS، بیوایده، ایران) و ۱۰۰ واحد آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین در هر ۱ میلی لیتر، کشت شد. فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در فشار ۵ درصد CO<sub>2</sub> تا زمانی که سلول‌ها به تراکم ۷۰-۸۰ درصد برسند، انکوبه شد. سرانجام، سلول‌های هر گروه با استفاده از ۰/۲۵ درصد آنزیم Trypsin-EDTA (ترموفیشر، آمریکا) جدا شده و در محیط کشت با ۱۰٪ FBS کشت شدند. RNA تام سلولی در هر دو رده سلولی، با استفاده از محلول RNX-Plus (سینا کلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و پرایمرهای رندوم هگزامر سنتز شد. از روش real time RT-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان lncRNAها در رده سلولس سرطانی در مقابل رده سلولی نرمال، استفاده شد. ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۳ μL بود که حاوی: ۱ از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۵ μL از هر دو پرایمرهای F/R و ۴/۵ μL آب مقطر. همه واکنش‌ها به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سانتی‌گراد به ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۱ درجه سانتی‌گراد در ثانیه) رسم شد. جهت محاسبه بیان ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم افزار Rotor-Gene Real-time analysis نسخه ۶ رسم شد. تغییرات نسبی بیان ژن‌ها توسط روش لیواک 2<sup>-DDCt</sup> با مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد. تمامی آزمون‌های انجام شده به صورت سه بار تکرار بودند و نتایج آزمون آماری توصیفی به شکل میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. جهت بررسی وجود یا عدم وجود ارتباط معنادار از آزمون t-test استفاده گردید. نمودارها به کمک نرم افزار GraphPad Prism رسم شد و تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

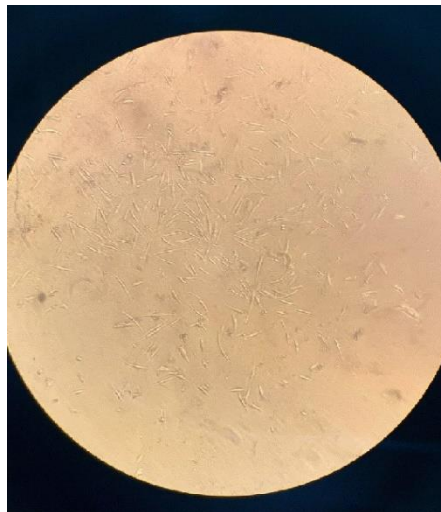
## یافته‌ها

نتایج مطالعات بیوانفورماتیک: به منظور شناسایی lncRNAهای مهم و دخیل در پیشرفت و توسعه سرطان کولورکتال از ابزارهای بیوانفورماتیک از جمله پایگاه‌های داده آنلاین استفاده شد. همانطور که در فصل قبل گفته شد از یک پایگاه داده جهت پیش‌بینی differentially expression ژن‌ها استفاده شد و lncRNAهای سرطان کولورکتال تعیین شدند. نمادها و نام هر lncRNA از پایگاه داده HUGO Gene Nomenclature Committee گرفته شد. اسامی lncRNAهای به دست آمده در پایگاه داده Cbioportal کپی شد و lncRNAهایی که بالاترین Alternation را داشتند کاندید شدند. فرمت FASTA هر lncRNA به پایگاه داده LncDisease داده شد و lncRNAهای دارای پروفایل بیانی بالاتر انتخاب شدند. تعداد ۲۰۴ ژن دخیل در سرطان کولورکتال شناسایی شد. نتایج اولیه نشان داد که ۵ مورد lncRNA با پروفایل بیانی بالای ۲ شامل CAHM، (colon adenocarcinoma hypermethylated) CCAT1، (colon cancer associated transcript 1)، (colorectal neoplasia differentially expressed) CRNDE، (colorectal cancer associated 1) COLCA1 و CCAT2 (colon cancer associated transcript 2) بیشترین نقش را در سرطان کولورکتال ایفا می‌کنند (شکل ۱). در مرحله بعد دو lncRNAی CCAT1 و CRNDE که پروفایل بیانی بالای ۲/۵ را داشتند کاندید مطالعات مولکولی شدند.



شکل ۱- انتخاب lncRNA در سرطان کولورکتال. lncRNAهایی که پروفایل بیانی بالای ۲/۵ داشتند انتخاب شدند.

نتایج کشت سلول: سلول‌های SW948 و HDF در محیط DMEM به منظور بدست آمدن غلظت مناسبی از سلول‌ها برای تست‌های بعدی کشت داده شد. تصویر سلول‌های کشت یافته در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

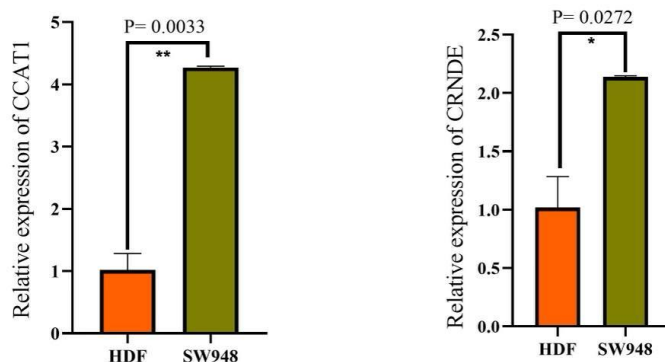


شکل ۲- کشت سلول‌های HDF. بزرگنمایی 10x میکروسکوپ اینورت.



شکل ۳- کشت سلول‌های SW948. بزرگنمایی 10x میکروسکوپ اینورت.

**بررسی بیان lncRNA های هدف:** بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک، دو lncRNA به نام‌های *CCAT1* و *CRNDE* جهت مطالعات مولکولی انتخاب شدند. تغییر بیان این دو lncRNA در سلول‌های رده سرطانی کلورکتال SW948 948 در مقایسه با رده سلولی نرمال HDF مورد بررسی قرار گرفتند. پس از سنتز cDNA، واکنش real time RT-PCR برای lncRNA های *CCAT1* و *CRNDE* به کمک پرایمرهای اختصاصی آن‌ها انجام شد. نتایج میزان تغییر بیان *CCAT1* و *CRNDE* در شکل ۴ نشان داده شده است. در این آنالیز تغییر بیان هر دو lncRNA معنی‌دار بود و در نمونه‌های رده سرطانی SW948 مقایسه با رده سلولی نرمال HDF افزایش بیان داشتند. میزان P Value قابل قبول بوده است به طوری که میزان  $P=0.0272$  برای ژن *CRNDE* و  $P=0.0033$  برای ژن *CCAT1* محاسبه شد.



شکل ۴- تغییر سطح بیان *CCATI* و *CRNDE*. تغییر بیان در رده سلولی سرطانی SW948 در مقایسه با رده نرمال HDF.

### بحث

سرطان، دومین عامل مرگ و میر در جهان می باشد که تغییرات بیان ژن ها جزء عوامل دخیل در توموری شدن سلول ها می باشد. یافته های حاصل از این پژوهش و تحقیقات مشابه می تواند در آینده نزدیک پژوهشگران را در انتخاب *LncRNA* های سودمند در تشخیص و درمان زود هنگام سرطان روده بزرگ یاری نماید (۱۳).

*LncRNA* ها گروهی از *RNA* ها هستند که با هدف قرار دادن توالی های غیر کد کننده سمت ۳ ژن های هدف خود، بیان آن ها را تنظیم می کنند. مطالعات گذشته نشان داده است که فعالیت حدود ۱۸ درصد از ژن های غیر کد کننده *LncRNA* ها با انواع سرطان ها مرتبط است، در حالی که تنها ۹ درصد از ژن های کد کننده پروتئین های انسانی در ارتباط با سرطان های مختلف هستند. شواهد نشان می دهد که تغییر بیان *LncRNA* ها با شکل گیری تومور همراه است (۱۴ و ۱۳).

مطالعات اخیر نشان داده است که *LncRNA* ها نقش تنظیمی در پیشرفت سرطان های بدخیم مانند سرطان سینه، سرطان معده، سرطان ریه و *CRC* دارند. در سال های اخیر، تعداد زیادی از *LncRNA* ها با استفاده از بیوانفورماتیک و روش های پرتوان شناسایی شده اند. با این حال، هنوز تعداد زیادی *LncRNA* با عملکردهای ناشناخته وجود دارد. بنابراین، تحقیقات بیشتری برای تعیین اهداف تشخیصی و درمانی جدید مورد نیاز است. اشکال متنوعی از *RNA* از جمله *mRNA* و *LncRNA* می توانند به راحتی استخراج، ذخیره و در مایعات مختلف بدن مورد مطالعه قرار گیرند. در سرطان، رونویسی *RNA* تا حد زیادی تنظیم نادرستی دارد. بنابراین *RNA* برا مطالعه بر روی عملکرد سلول گزینه مناسبی است. برخی مطالعات ژن هایی را به عنوان بیومارکرهایی برای ارزیابی خطر *CRC* معرفی کرده اند و در واقع استفاده از بیومارکرهای *CRC* با اختصاصیت بالا در مراحل مختلف توسعه بیماری می توانند جایگزین روش های غربالگری با هزینه بالا شوند. بنابراین، شناسایی بیومارکرهای جدید و مفیدی که بتوانند با مشخصات کلینیکوپاتولوژیکی مرتبط باشند، پیش آگاهی را تعیین و ارزیابی کنند، و یا حتی راهبردهای درمانی جدیدی را فراهم کنند، ضروری است (۱۴).

در سال های اخیر مشخص شده است که بیان بی قاعده برخی از *lncRNA* ها نقش مهمی در شکل گیری و پیشرفت سرطان روده بزرگ ایفا می کند. به عنوان مثال مشخص شده است که افزایش بیان *lncRNA* های *CCATI*، *PVT1*، *MALATI* و *HOTAIR* در سلول های سرطان روده بزرگ می تواند نقش مهمی در شکل گیری تومور و متاستاز آن به بافت های دیگر داشته باشد. *Cui* و همکاران نشان دادند که *LncRNA HEIH* با تغییر عملکرد *miR-939/Bcl-XI* باعث افزایش تکثیر سلول های تومور روده بزرگ می شود (۱۴). علاوه بر این *Iguchi* و همکاران ثابت کردند *LncRNA ATB* به طور مشخصی با رشد سلول های تومور روده بزرگ و رگ زایی در بافت سرطانی ارتباط دارد (۱۵). *Xu* و همکاران نیز تایید کردند که کاهش سطوح *LncRNA SNHG1* در سلول های

سرطان روده بزرگ، از راه تنظیم *miR-154-5P* باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شد. با این حال lncRNAها در سرطان روده بزرگ همواره با افزایش همراه نیست، مطالعات نشان داده است که کاهش بیان lncRNAهای *Evf-2* و *GAS5* در این سلول‌ها می‌تواند عامل جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی و آغاز مرگ برنامه ریزی شده در سلول‌های سرطان روده بزرگ باشد (۱۶). علاوه بر این در مطالعه‌ای خلفیان و همکاران، پژوهشی بر روی سطح رونوشت *FGF11* در سرطان کلورکتال داشتند و دریافتند که پیشرفت سرطان کلورکتال رابطه مستقیمی با افزایش سطح رونوشت *FGF11* داشت (۱۷). غلامی‌نژاد و همکاران در طی بررسی‌های انجام شده نشان دادند که بررسی سطوح *CRNDE* در نمونه‌های توموری و نرمال افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ با استفاده از روش‌های *real time PCR* نشان داد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین میزان بیان این lncRNA در دو گروه سلولی وجود دارد. بنابراین شاید بتوان از اندازه‌گیری مقادیر این lncRNA در خون محیطی افراد مستعد یا مشکوک به ابتلا به سرطان روده بزرگ به عنوان یک روش غیر تهاجمی برای تشخیص زود هنگام بیماری استفاده کرد (۱۸). یافته‌های این پژوهش با یافته‌های پژوهش انجام گرفته، هم راستا می‌باشد که می‌تواند تاییدی بر صحت کار انجام گرفته باشد. علاوه بر این نتایج تحقیقات Ding و همکاران نیز نشان داد *CRNDE* از طریق مهار بیان *DUSP5/CDKNIA* باعث تکثیر سلول‌های توموری روده بزرگ می‌شود. همچنین افزایش بیان *CRNDE* و ارتباط آن با تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی و مهار مرگ برنامه ریزی شده در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۱۹). به عنوان مثال Tang و همکاران نشان دادند که این lncRNA از راه افزایش بیان *SIX1* در پیشرفت کارسینوم سلول‌های کبدی نقش دارد. همچنین Zhu و همکاران نشان دادند *CRNDE* با افزایش مسیر سیگنالینگ Wnt/beta-catenin در شکل‌گیری کارسینوم کبدی شرکت می‌کند همچنین تایید کردند که این lncRNA به واسطه *miR-136-5P* باعث افزایش بیان *IRX5* و تحریک تشکیل سلول‌های سرطانی می‌شود. علاوه بر این غیرفعال شدن ژن کد کننده *CRNDE* ممکن است با افزایش مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های سرطانی روده بزرگ در شرایط *in vitro* و *in vivo* همراه باشد (۲۰). هم‌سو با مطالعات پیشین در این مطالعه نیز، در ابتدا به کمک آنالیزهای بیوانفورماتیک دو lncRNA کاندید گردید. سپس، تکنیک *real time PCR* به منظور کمی نمودن بیان این ژن‌ها به کار برده شد. نتایج حاصل از این پژوهش مشخص کرد که میانگین بیان نسبی ژن‌های *CCAT1* و *CRNDE* در بافت‌های توموری نسبت به غیر توموری به طور معناداری بالاتر است. از آنجایی که بیان *CCAT1* و *CRNDE* افزایش معناداری در نمونه‌های توموری نسبت به نرمال نشان داده است، این ژن‌ها می‌توانند به عنوان بیومارکری در راستای تشخیص و درمان کولورکتال در تحقیقات آینده در نظر گرفته شود.

### نتیجه‌گیری

آینده‌ی شناسایی انکولوژی بر شناسایی زیر مجموعه‌های سرطان متکی است، برای پی بردن به مسیرهای سرطانی که منجر به سرطان کلورکتال می‌شود این امر ضروری است که ابزارهای غربالگری و مارکرهای مولکولی استفاده شود. بررسی سطوح بیان *CRNDE* و *CCAT1* در سلول‌های سرطانی و نرمال افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ با استفاده از روش *real Time-PCR* نشان داد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین میزان بیان این lncRNA در دو گروه سلولی وجود دارد. بنابراین شاید بتوان از اندازه‌گیری مقادیر این lncRNA در خون محیطی افراد مستعد یا مشکوک به ابتلا به سرطان روده بزرگ به عنوان یک روش غیر تهاجمی برای تشخیص زود هنگام بیماری استفاده کرد. علاوه بر این استفاده از یافته‌های دریافت شده از مطالعه بیوانفورماتیکی در کنار تکنیک‌های نوین می‌تواند در افزایش سرعت و شناسایی دقیق این عوامل کمک کننده باشد. در این مطالعه، نتایج بیوانفورماتیک نیز با مطالعات آزمایشگاهی همخوانی داشت.

## References:

1. Wirth S, Syleouni ME, Karavasiloglou N, Rinaldi S, Korol D, et al. Incidence and mortality trends of thyroid cancer from 1980 to 2016. *Swiss Medical Weekly*. 2021; 151(4344): w30029.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018; 68(6): 394-424.
3. Chen W, Zheng R, Zeng H, Zhang S, He J. Annual report on status of cancer in China, 2011. *Chinese journal of cancer research*. 2015; 27(1): 2.
4. Zullig LL, Smith VA, Jackson GL, Danus S, Schnell M, et al. Colorectal cancer statistics from the veterans affairs central cancer registry. *Clinical colorectal cancer*. 2016; 15(4): e199-204.
5. Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends in cell biology*. 2011; 21(6): 354-61.
6. Sun M, Kraus WL. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease. *Endocrine reviews*. 2015; 36(1): 25-64.
7. Kanduri C. Long noncoding RNAs: Lessons from genomic imprinting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2016; 1859(1): 102-11.
8. Zhu X, Tian X, Yu C, Shen C, Yan T, et al. A long non-coding RNA signature to improve prognosis prediction of gastric cancer. *Molecular cancer*. 2016; 15: 1-6.
9. Hu Y, Chen HY, Yu CY, Xu J, Wang JL, et al. A long non-coding RNA signature to improve prognosis prediction of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2014; 5(8): 2230.
10. Zhou M, Guo M, He D, Wang X, Cui Y, et al. A potential signature of eight long non-coding RNAs predicts survival in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of translational medicine*. 2015; 13: 1-3.
11. Zhang K, Sun X, Zhou X, Han L, Chen L, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner. *Oncotarget*. 2015; 6(1): 537.
12. Zhou M, Sun Y, Sun Y, Xu W, Zhang Z, et al. Comprehensive analysis of lncRNA expression profiles reveals a novel lncRNA signature to discriminate nonequivalent outcomes in patients with ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(22): 32433.
13. Wang L, Cho KB, Li Y, Tao G, Xie Z, et al. Long noncoding RNA (lncRNA)-mediated competing endogenous RNA networks provide novel potential biomarkers and therapeutic targets for colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(22): 5758.
14. Cui C, Zhai D, Cai L, Duan Q, Xie L, et al. Long noncoding RNA HEIH promotes colorectal cancer tumorigenesis via counteracting miR-939 mediated transcriptional repression of Bcl-xL. *Cancer Res Treat*. 2018; 50(3): 992-1008.
15. Iguchi T, Uchi R, Nambara S, Saito T, Komatsu H, et al. A long noncoding RNA, lncRNA-ATB, is involved in the progression and prognosis of colorectal cancer. *Anticancer research*. 2015; 35(3): 1385-8.
16. Xu M, Chen X, Lin K, Zeng K, Liu X, et al. B. The long noncoding RNA SNHG1 regulates colorectal cancer cell growth through interactions with EZH2 and miR-154-5p. *Molecular cancer*. 2018; 17: 1-6.
17. Khalafian G, Entezari M, Bikhof Torbati M. Investigating FGF11 gene transcription level in cancer cells among colorectal cancer patients. *Medical Science Journal of Islamic Azad University-Tehran Medical Branch*. 2020; 30(1): 51-8.

18. Gholaminejad S, Deilami Khiabani Z, Salehzadeh A, Jalali A. Investigation of Long Non-coding RNA CRNDE Expression in Iranian Patients with Colorectal cancer. *Cell and Tissue Journal*. 2021; 11(4): 293-301.
19. Yin D, He X, Zhang E, Kong R, De W, et al. Long noncoding RNA GAS5 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Medical oncology*. 2014; (11)31:1-8.
20. Tang D, Zhao L, Peng C, Ran K, Mu R, et al. LncRNA CRNDE promotes hepatocellular carcinoma progression by upregulating SIX1 through modulating miR-337-3p. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019; 120(9): 16128-42.

## اثر عصاره هیدرو الکلی چویل بر فعالیت حرکتی، استرس و افسردگی در موش‌های ایسکمی

مطهره اسکندری<sup>۱</sup>، مریم رفیعی راد<sup>۲\*</sup>، سمیرا گودرزی<sup>۲</sup>

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** ایسکمی در مغز موش موجب ایجاد آسیب‌های نورونی شدید و به دنبال آن موجب اختلالات استرس و افسردگی می‌گردد. عصاره گیاه چویل ترکیبات فنلی دارد و آنتی اکسیدان قوی است که نقش بسیار مهمی در حفاظت از سلول‌های عصبی ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی عصاره گیاه چویل بر استرس و افسردگی در مدل ایسکمی در موش‌های نر است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق ۵۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به طور تصادفی در ۵ گروه، سالم (کنترل)، ایسکمی هیپوپرفیوژن بدون دریافت عصاره و سه گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن، به مدت ۱۴ روز، روزانه مقدار ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره چویل را به روش تجویز داخل معدی یا گاوژ دریافت نمودند. برای ایجاد ایسکمی شریان‌های کاروتید عمومی دو طرفه جدا شده، از دو قسمت مسدود و از بخش میانی قطع شدند. ارزیابی استرس و اضطراب در طی آزمون شنای اجباری و تست جعبه باز انجام گرفت.

**یافته‌ها:** در موش‌های ایسکمی افزایش اضطراب و استرس یا کاهش فعالیت‌های حرکتی در طی آزمون شنای اجباری و تست جعبه باز مشاهده گردید. و تجویز دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم عصاره گیاه چویل به ویژه، دوز ۴۰۰ و ۲۰۰ منجر به بهبود نقایص ایجاد شده در استرس و افسردگی گردید ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** عصاره چویل باعث کاهش اضطراب و افسردگی در مدل حیوانی ایسکمی شده است، که احتمالاً به علت وجود بعضی از فنل‌ها و فعالیت آنتی اکسیدانی آن می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** چویل، ایسکمی، افسردگی، اضطراب، موش صحرایی

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۶۳۱۱۶۵۴۲

پست الکترونیک: Rafieirad.m@gmail.com



## the effect of Chuvil hydroalcoholic extract on motor activity, stress and depression in ischemic rats

Motahareh Eskandari<sup>1</sup>, Maryam Rafiei Rad<sup>2\*</sup>, Samira Goudarzi<sup>2</sup>

1. Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, Iran

### Abstract

**Background and purpose:** Ischemia in the brain of mice causes severe neuronal damage, followed by stress and depression disorders. Chuvil plant extract contains phenolic compounds and is a strong antioxidant that plays a very important role in protecting nerve cells. The aim of this study is to investigate the protective effect of Chuvil plant extract on stress and depression in ischemia model in male rats.

**Materials and methods:** In this research, 50 Wistar rats weighing between 200 and 250 grams were randomly divided into 5 groups, healthy (control), hypoperfusion ischemia without extract and three hypoperfusion ischemia groups, for 14 days, 100 per day. They received 200 and 400 mg/kg of Chuvil extract by intragastric administration or gavage. To create ischemia, bilateral common carotid arteries were isolated, blocked from two parts and cut from the middle part. Assessment of stress and anxiety was done during forced swimming test and open box test.

**Results:** An increase in anxiety and stress or a decrease in movement activity was observed in ischemic rats during the forced swimming test and the open box test. And the administration of doses of 100, 200 and 400 mg/kg of chuvil plant extract, especially, doses of 400 and 200 led to the improvement of defects caused by stress and depression ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Chuvil extract has reduced anxiety and depression in an animal model of ischemia, which is probably due to the presence of some phenols and its antioxidant activity.

**Keywords:** Chuvil, Ischemia, Depression, Anxiety, Rat

### مقدمه

*Ferulago angulate* با نام فارسی چویل، متعلق به خانواده چتریان (*Umbelliferae*) می باشد که خانواده ای گسترده شامل ۳۰۰ جنس و ۳۰۰۰ گونه گیاهی معطر است (۱). عصاره گیاه چویل دارای ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و از گیاهان دارویی مهم ایران محسوب می شود (۱ و ۳). ترکیبات فنلی به دلیل دارا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی قادرند رادیکالهای آزاد را مهار کنند به همین دلیل میتوانند در پیشگیری از بسیاری از بیماریهای مانند سرطان، بیماری های قلبی عروقی و بیماری های عصبی موثر باشند و نقش مهمی در حفظ سلامتی انسان ایفا نمایند (۳). استفاده از آنتی اکسیدانها به منظور کند کردن سرعت اکسیداسیون برای سلامتی ضروری به نظر می رسند. استرس عاملی است که با اثر بر موجودات زنده منجر به واکنش هایی می شود که این واکنش ها سبب تقویت توانایی موجود در تطابق و تنظیم محیط داخلی بدن (homeostasis) می گردد (۴). با این وجود زمانی که استرس طولانی و یا تکراری می شود می تواند بسیار مضر باشد (۵). شایع ترین علت سکتة مغزی ایسکمیک فقدان جریان خون کافی برای رسیدن به بافت مغزی است. قطع جریان خون رو به جلو در هر نقطه ای می تواند منجر به آسیب عصبی غیر قابل برگشت شود (۶) و سکتة مغزی بسته به موضع ضایعه، اندازه منطقه محروم از جریان خون و یا وسعت خونریزی ایجاد شده می تواند سبب طیف وسیعی از نقایص نورولوژیکی شود (۴). کاهش اکسیژن بافتی در ناحیه ایسکمی مغز، سبب اختلال در عملکرد میتوکندری ها و تولید رادیکال های آزاد می شود (۷) و کاهش فعالیت و ظرفیت آنزیمهای آنتی اکسیدانتی و افزایش رادیکال های آزاد منجر به وارد شدن آسیب جدی به اجزای تشکیل دهنده سلول نظیر لیپید، پروتئین و اسیدنوکلئیک شده و در نهایت باعث مرگ سلولی میگردد (۸). با گذشت زمان عوارض متعدد ایسکمی مانند اختلالات حافظه و یادگیری، انواعی از درد، اضطراب، ترس، اختلال تولیدمثلی و

افسردگی بروز می کند (۵). کاهش دادن این تغییرات در حالت ایسکمی با استفاده از مواد موثره گیاهی با خاصیت ضد ایسکمی و آنتی اکسیدانی از اهمیت بالینی زیادی برخوردار است (۹). بنابراین در مطالعه حاضر، اثرات عصاره چویل در مدل حیوانی هیپوپرفیوژن ایسکمی مغزی از طریق بررسی اثر آن بر افسردگی و اضطراب و فعالیت های حرکتی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

### مواد و روش ها

تحقیق حاضر، با استفاده از موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار تولیدی مرکز تکثیر و نگهداری خانه ی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اهواز با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در شرایط استاندارد  $20 \pm 2$  درجه ی سانتی گراد و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (روشنایی از ۷ صبح آغاز می شود) و دسترسی کافی به غذا فشرده شرکت های دام پارس تهران و چاودانه شهرضای اصفهان و آب لوله کشی تصفیه ی شهر ایذه و در مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه در درون قفس های استاندارد به صورت گروه های چهارتایی نگهداری شدند. برای آسان شدن کار و سازش با شرایط محیط و آزمایش کننده، حیوانات، از قبل روزانه به مدت چند دقیقه دست آموز می شدند. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و در کمیته ی اخلاق دانشگاه به تصویب رسید.

در این تحقیق ۵۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به طور تصادفی در ۵ گروه

۱- گروه سالم (کنترل) بدون القای ایسکمی و بدون دریافت دارو (کنترل)

۲- گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن بدون دریافت عصاره (ایسکمی)

۳- گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن، به مدت ۱۴ روز، روزانه مقدار ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره چویل را به روش تجویز داخل معدی یا گاوژ دریافت نمودند (Ischemia+F.A E100 mg/kg)

۴- گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن، به مدت ۱۴ روز، روزانه مقدار ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره چویل را به روش تجویز داخل معدی یا گاوژ دریافت نمودند (Ischemia+F.A E 200 mg/kg)

۵- گروه ایسکمی هیپوپرفیوژن، به مدت ۱۴ روز، روزانه مقدار ۴۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره چویل را به روش تجویز داخل معدی یا گاوژ دریافت نمودند (Ischemia+F.A E 400 mg/kg) (۱۰).

روش تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه چویل: در اوایل اردیبهشت ماه، گیاه چویل از رشته کوههای زاگرس در استان خوزستان جمع آوری شد. سرشاخه های گیاه در محیط خشک و تاریک به مدت دو هفته جهت خشک شدن نگهداری شد. پس از خشک شدن و آسیاب نمودن، در اتانول ۷۲٪ قرار داده و پس از سه روز نگهداری در دمای محیط، و صاف کردن جهت خشک شدن پهن کردیم. پس از آن دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ عصاره چویل، بوسیله سالیین نرمال و بر اساس وزن تهیه و از طریق گاوژ به مدت ۱۴ روز هرروز در یک ساعت معین (۷-۸ صبح) تجویز گردید (۱۰).

### ایجاد ایسکمی مغزی

#### روش CCAO

در این مطالعه از روش سچتی (۲۰۱۰) با کمی اصلاحات استفاده شده است (۱۱) به این صورت که پس از بیهوش کردن موش با کتامین، زایلازین (۱۰/۹۰ میلی گرم / کیلوگرم، رتها) و برش خط وسط گردن، عروق کاروتید را نمایان کرده و سپس به آرامی از واگ جدا شدو عروق کاروتید بافاصله یک هفته ازهمدیگر، مسدود شدند .

#### تست شنای اجباری (forced swimming test) fst:

تستی برای ارزیابی افسردگی است. سلیندری بی رنگ به اندازه ۳۰\*۶۰ (ارتفاع\*قطر داخلی) که با آب ۲۳ درجه با ارتفاع ۴۰ سانتی متر پر شد استفاده گردید. موشها را به صورت انفرادی از ارتفاع ۲۰ سانتی متر و به ملایمت در این سلیندر سرباز انداخته. در این شرایط، حیوانات برای حفظ پایداری خود در آب شنا می کردند. پس از مدتی، حیوانات با قطع حرکات دست و پای خود از تحرک و فعالیت باز می ماندند که به طور قرار دادی بعنوان زمان بی حرکتی (Immobility time) ارزیابی شد (۱۲). برای اندازه

گیری زمان بی حرکتی، مدت زمان بی حرکتی حیوان در طی محدود زمان مشخص توسط کرومومتر ثبت می‌گردید. زمان گیری تمام نمونه‌ها توسط یک فرد اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل گردید. شرایط محیط برای تمام گروه‌ها یکسان و زمان آزمایش ۶ دقیقه بود. در این حالت، افزایش زمان بی حرکتی را معادل افسردگی و کاهش آن را به عنوان اثر بخشی درمان ضد افسردگی ارزیابی شد.

#### تست جعبه باز (open field)

تستی برای ارزیابی استرس و فعالیت‌های حرکتی است. این تست پیش از انجام تست شنای اجباری، برای ارزیابی سیستم حرکتی انجام می‌شود و هدف از آن اطمینان از این است که تغییر در مدت بی حرکتی موش‌ها در نتیجه تغییری که در سیستم حرکتی رخ می‌دهد نیست. روش آزمایش به این صورت بود که یک جعبه چوبی به اندازه ۷۲\*۷۲ سانتی‌متر که به ۱۶ خانه (۱۸\*۱۸ سانتی‌متر) مساوی تقسیم می‌شود و دارای دیوارهای با ارتفاع ۳۶ سانتی‌متر و سفید رنگ می‌باشد (۱۲). در وسط جعبه باز یک خانه مرکزی ۱۸\*۱۸ سانتی‌متری کشیده شده است. موش‌ها را به صورت انفرادی درون میدان مرکزی قرار داده می‌شد. در این شرایط حیوانات از خطوط مرکزی و بیرونی عبور می‌کردند. و بین دو تست محیط مورد نظر با پنبه آغشته به الکل تمیز می‌شد. برای اندازه‌گیری زمان سیستم حرکتی، مدت زمان حرکتی و بی حرکتی حیوان در طی محدود زمان مشخص توسط کرومومتر ثبت می‌گردید. شرایط محیط برای تمام گروه‌ها یکسان و زمان آزمایش ۱۰ دقیقه بود. در این حالت، افزایش حرکات درونی و بیرونی را معادل کاهش ارزیابی می‌شد (۱۲).

#### یافته‌ها

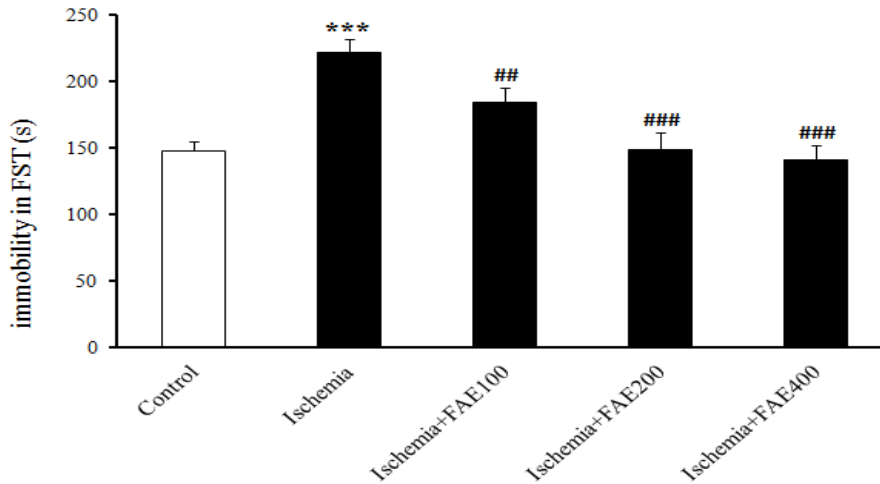
##### تاثیر ایسکمی و عصاره چویل بر میزان افسردگی

در این بررسی میزان افسردگی در حیوانات تحت تیمار به کمک آزمون شنای اجباری انجام شد. در این آزمون دو پارامتر زمان شنا و بی تحرکی ارزیابی گردید. طی این مطالعه ایسکمی منجر به افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) مدت زمان بی تحرکی در مقایسه با حیوانات گروه کنترل گردید. که این امر نشان از افزایش میزان افسردگی در حیوانات ایسکمی بود. در حالی که مدت زمان سپری شده برای شنا در حیوانات ایسکمی بطور معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود. گاوآژ روزانه عصاره چویل به حیوانات ایسکمی شاخص‌های رفتاری مذکور را به طور معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) در مقایسه با حیوانات گروه ایسکمی تعدیل نمود. با این وجود عصاره چویل تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های زمانی حرکات شنا و بی حرکتی در حیوانات ایسکمی دریافت‌کننده دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ عصاره چویل داشت.

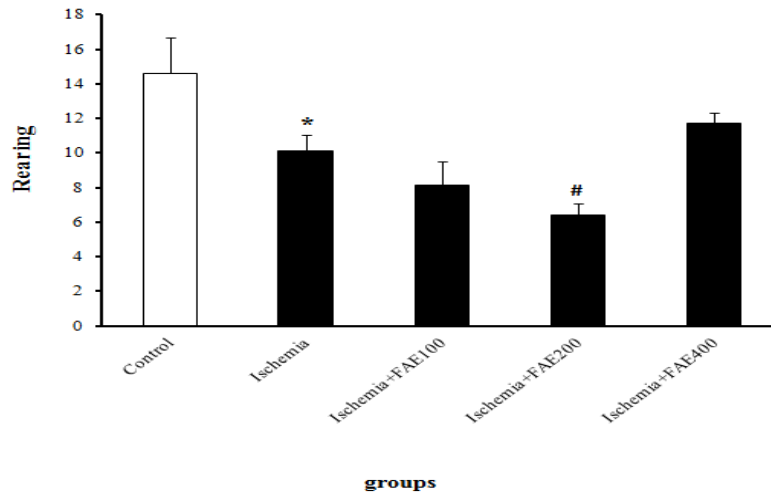
##### تاثیر ایسکمی و عصاره چویل بر فعالیت حرکتی و استرس

فعالیت حرکتی حیوانات به وسیله دستگاه open field مورد بررسی قرار گرفت. تعداد واحدهای حرکتی طی آزمون جعبه باز در حیوانات گروه ایسکمی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌دار کاهش یافته بود ( $p < 0.05$ ). در ارزیابی افسردگی، بین گروه کنترل و ایسکمی تفاوت معنی‌دار است که نشان‌دهنده افزایش افسردگی در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل است. و همچنین در بین گروه‌های دریافت‌کننده عصاره چویل به مدت ۱۴ روز بصورت خوراکی (گاوآژ) دوز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ دارای تفاوت معنی‌دار با گروه ایسکمی می‌باشد که نشان‌دهنده این است که عصاره چویل در این دوز باعث حداکثر کاهش افسردگی (زمان بی حرکتی) شده است و افزایش تعداد دفع نشانه افزایش میزان استرس است.

اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲  
 دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

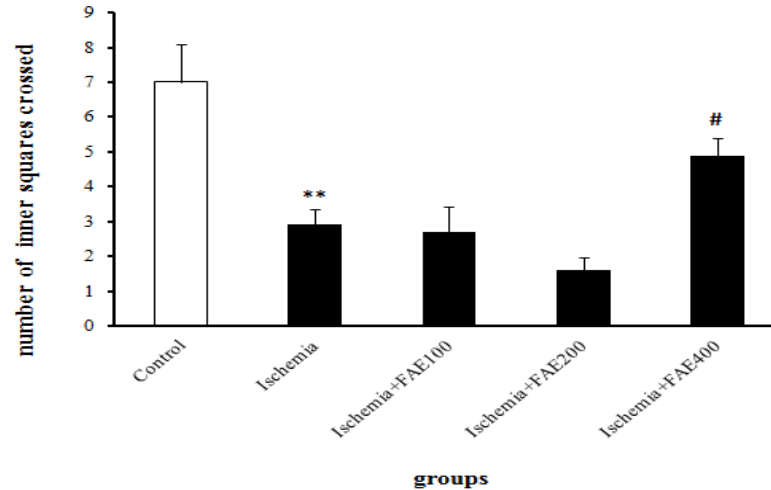


نمودار ۱- مقایسه افسردگی (زمان بی حرکتی درون شنا اجباری) در بین گروه های در یافت کننده مقادیر مختلف عصاره چویل با گروه ایسکمی و کنترل. نمودار بر حسب ( میانگین انحراف استاندارد) رسم شده است. همانطور که مشاهده می شود، عصاره چویل در دوز ۴۰۰ باعث حداکثر کاهش افسردگی است. علامت (\*) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل و علامت (#) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه ایسکمی است.

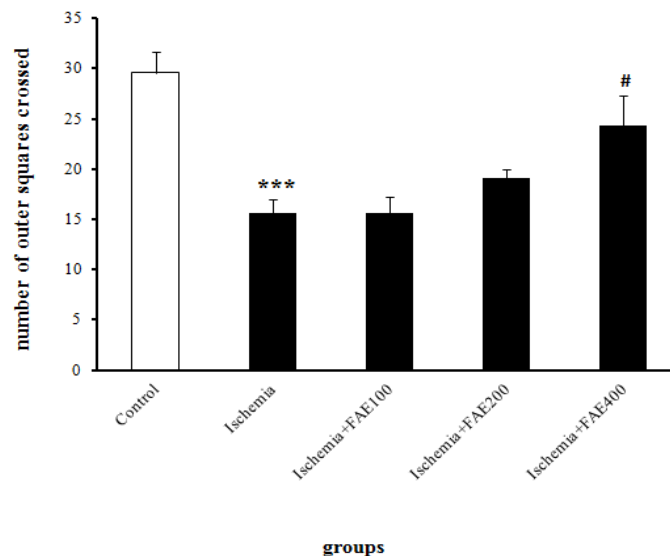


نمودار ۲- مقایسه میانگین اضطراب (تعداد بالا بردن دستها) در بین گروه های دریافت کننده مقادیر مختلف عصاره چویل با گروه ایسکمی و کنترل. نمودار بر حسب ( میانگین انحراف استاندارد) رسم شده است. همانطور که مشاهده می شود، عصاره چویل در دوز ۲۰۰ mg/kg باعث حداکثر کاهش اضطراب شده است. علامت (\*) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل و علامت (#) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه ایسکمی است. و دوزهای دیگر عصاره (۱۰۰ و ۴۰۰ mg/kg) تفاوت معنی داری را با گروه ایسکمی نشان نمی دهند.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



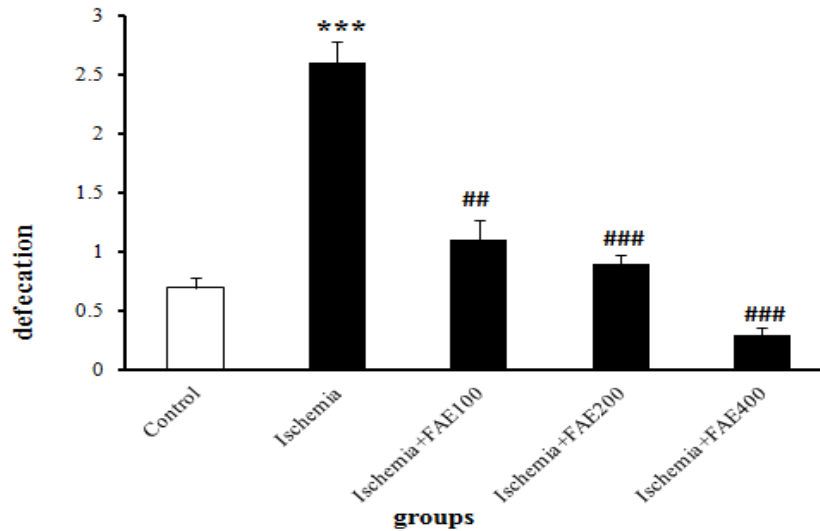
نمودار ۳- مقایسه میانگین فعالیتهای حرکتی (تعداد حرکت در بین خانه های مرکزی در جعبه باز) در بین گروه های دریافت کننده مقادیر مختلف عصاره چویل با گروه ایسکمی و کنترل. نمودار برحسب (میانگین انحراف استاندارد) رسم شده است. همانطور که مشاهده می شود، عصاره چویل در دوز ۴۰۰ باعث حداکثر افزایش فعالیت های حرکتی شده است. علامت (\*) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل و علامت (#) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه ایسکمی است. و دوزهای دیگر عصاره (۱۰۰ و ۲۰۰) تفاوت معنی داری را با گروه ایسکمی نشان نمی دهند.



نمودار ۴- مقایسه میانگین فعالیتهای حرکتی (تعداد حرکت در بین خانه های حاشیه در جعبه باز) در بین گروه های دریافت کننده مقادیر مختلف عصاره چویل با گروه ایسکمی و کنترل. نمودار برحسب (میانگین انحراف استاندارد) رسم شده است. همانطور که مشاهده می شود، عصاره چویل در دوز ۴۰۰ باعث حداکثر افزایش فعالیت های حرکتی شده است. علامت (\*) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل و علامت (#) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه ایسکمی است. و دوزهای دیگر عصاره (۱۰۰ و ۲۰۰) تفاوت معنی داری را با گروه ایسکمی نشان نمی دهند.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



نمودار ۵- مقایسه میانگین تعداد دفع (اضطراب) در تست جعبه باز در بین گروه های دریافت کننده مقادیر مختلف عصاره چویل با گروه ایسکمی و کنترل . نمودار برحسب (میانگین انحراف استاندارد) رسم شده است. همانطور که مشاهده می شود، عصاره چویل در دوز ۴۰۰ باعث حداکثر کاهش اضطراب شده است. علامت (\*) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل و علامت (#) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه ایسکمی است.

#### بحث

با توجه به یافته های ما ایسکمی استرس و افسردگی در موش صحرائی نر را افزایش داد، و تجویز خوراکی ۱۴ روز عصاره گیاه چویل به موش های مدل ایسکمی، اضطراب و افسردگی را بهبود بخشید. ایسکمی مغزی منجر به اختلالات عصبی همچون اختلالات روانی و شناختی، اختلالات رفتاری شامل اختلال اضطراب، شیدایی و اختلال دو قطبی (۱۳). استرس اکسیداتیو به عنوان یک عامل عمده ناشی از ایسکمی مغزی، سبب اختلال در تعادل اکسیدان-آنتی اکسیدانی شده و منجر به آسیب های احتمالی می گردد (۶) و همچنین نقش محوری در پاتوژنز بیماریهای نورودژنراتیو و نورولوژیک نظیر، آلزایمر، پارکینسون، تروما و سکته مغزی دارد (۱۴). مطالعات متعدد نشان داده است که پس از ایسکمی تولید رادیکالهای آزاد افزایش قابل توجهی می یابد و سیسجو در سال ۱۹۸۴ پیشنهاد نمود مسیرهای زیادی وجود دارد که در آن رادیکال های آزاد از جمله پراکسی نیتريت در طول ایسکمی تولید می شوند (۱۴). شواهد پژوهشی نشان می دهند، رادیکال های آزاد نقش انکارناپذیری در تشکیل، گسترش ادم و ضایعات ثانویه مغزی پس از سکته مغزی دارند (۱۵). استرس اکسیداتیو به واسطه ی عدم تعادل میان تشکیل ROS و سیستم دفاعی آنتی اکسیدان سلولی به وجود می آید و مغز نسبت به استرس اکسیداتیو بسیار حساس است. ژن های آنزیم های آنتی اکسیدانی در محیط طبیعی (مثل سوپراکسید دسیموتاز و گلووتایتون پراکسیداز و گلووتایتون رداکتاز) معمولاً در پاسخ به تولید کنترل نشده ی ROS بسیار افزایش می یابند (۱۶). سطح بالای اضطراب با تولید قابل توجه گونه های اکسیژنی واکنشی ROS در لنفوسیت های خون، گرانولوسیتها و مونوسیتها در موش گزارش داده شده است. این نتایج تایید می کنند که رابطه میان سطح Ros درون سلولی در سلول های خون و رفتار مرتبط با اضطراب در موش وجود دارد. علاوه بر این yasunari و دیگران (۲۰۰۶) یک رابطه معنا دار را میان اضطراب و تشکیل ROS در مونوسیت های افراد ارائه داد (۱۷). در تحقیقات اخیر رابطه ی نزدیکی میان استرس اکسیداتیو و اضطراب هم در انسان هائی که از اختلالات اضطرابی رنج می برند (اختلال وسواس فکری عملی و اختلال وحشت زدگی) و هم در حیوانات و انسان هائی که اضطراب بالائی را نشان داده اند مشاهده شده است (۱۸). ترکیبات فنلی به عنوان دهنده الکترون عمل نموده و ممکن است واکنشهای ناخواسته ایجاد شده توسط رادیکال های آزاد در بدن را خنثی کنند (۱۹). همچنین دارای فعالیت بیولوژیک متنوع از جمله آنتی اکسیدانی، آنتی رادیکالی آنتی میکروبی و ضد التهاب می باشند (۲۰) و به همین دلیل در توقف روند تخریب سیستم

عصبی و پیشگیری و درمان بسیاری از بیماریها از جمله ایسکمی از طریق مهار رادیکالهای آزاد و محافظت از سلولها در برابر واکنش های اکسیداتیو موثر می باشد (۲۱ و ۲۲). بنابراین با توجه به شیوع بالای بیماریهای مزمن و فرسایشی منطقی است که برای تأمین آنتی اکسیدان های مورد نیاز بدن از گیاهان استفاده شود و به خصوص گیاهانی که فنل و فلاونوئید بالایی داشته باشند (۲۰). بر طبق مطالعات فراوان انجام شده در راستای شناسایی و استخراج تمامی مواد آنتی اکسیدانی چویل از جمله مطالعات قاسم پور<sup>۵</sup> (۲۰۰۷) و خان احمدی<sup>۶</sup> (۲۰۱۰) (۲۳ و ۲۴) می توان چنین گفت که عصاره چویل با دارا بودن خاصیت فنلی و آنتی اکسیدانی این پتانسیل را دارد که به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد (۱). و علاوه بر دارا بودن خواص ضد انگل و ضد میکروبی و ضد دیابتی در صنایع لوازم آرایشی و بهداشتی نیز کاربرد دارد (۲۵). بر طبق مطالعات انجام شده توسط مجتبی تاران<sup>۷</sup> و همکاران (۲۰۰۹)، یک زیرگونه از این گیاه بنام *subsp. Ferulago angulate carduchorum* دارای خواص ضد باکتری و ضد قارچی (از طریق مهار میکروارگانسیم ها) و ضد میکروبی در برابر میکروب های مختلف عفونی است که از جمله ترکیبات موجود در آن با خاصیت ضد باکتری و ضد قارچی، بتا پینن، کاربوفیلین اکسید، آلفا ترپینئول، و ۴-ترپینئول می باشد (۳). اما بطور کلی گونه *F.angulata* خواص ضد میکروبی قوی تری نسبت به سایر گونه های این خانواده (چتریان) دارد (۳). در مطالعات گذشته ما این گونه توانست فاکتورهای استرس اکسیداتیو را بصورت کاملا معنی داری هم در مدل ایسکمی (۲۶) و هم پارکینسون (۲۷) کاهش دهد.

#### نتیجه گیری

احتمالا ترکیبات فنولی عصاره گیاه چویل، با جاروب کردن مواد اکسیدانی و رادیکالهای آزاد ناشی از روند ایسکمی مغز، موجب بهبودی اختلالات رفتاری از جمله استرس و افسردگی متعاقب ایسکمی می شود.

#### References:

1. Hosseini N, Akbari M, R.Ghafarzagdegan, Ashtiyani SC, Shahmohammadi R. Total Phenol, Antioxidant and Antibacterial Activity of the Essential Oil and Extracts of *Ferulago angulata* ssp. *Angulate*. *Journal of Medicinal Plants*. 2012;11:80-9.
2. Demetzos C, Perdetzoglou D, Gazouli M, Tan K, Economakis C. Chemical analysis and antimicrobial studies on three species of *Ferulago* from Greece. *Planta Med*. 2000;66(6):560-3.
3. Mojtaba T, Hamid R, Ebrahim S. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2010;3:10-4.
4. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*. 2002; 53(4): 71-865
5. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2001;21(1):2-14.
6. Tarawneh R, Galvin JE. Potential future neuroprotective therapies for neurodegenerative disorders and stroke. *Clinics in geriatric medicine*. 2010;26(1):125-47

5-Ghasempour

6-Khanahmadi

7-Taran

7. Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends in neurosciences*. 2001;24(2):91-8.
8. Chan P. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:2-14.
9. Sarkaki A, Farbood Y, Hashemi S, Rafiei Rad M. Pomegranate seed hydroalcoholic extract improves memory deficits in ovariectomized rats with permanent cerebral hypoperfusion /ischemia. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2015;5(1):43-55.
10. Mirzapour S, Rafieirad M, Rouhi L. Hydroalcoholic Extract of *Ferulago angulata* Improves Memory and Pain in Brain Hypoperfusion Ischemia in Rats. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*. 2015;10(1):e17451.
11. Sarkaki A, Rafieirad M, Farbood Y, Mansouri S, F. M. Cognitive deficiency induced by cerebral hypoperfusion/ischemia improves by exercise and grape seed extract. *Health Med J* 2012;6(4):1097-105.
12. Rafieirad M, Zangeneh Nezhad Z, E. A. Neuroprotective Effects of Oral Ellagic Acid on Locomotor Activity and Anxiety-Induced by Ischemia/Hypoperfusion in Rat. *Advances in Environmental Biology*. 2014;8(1):83-8.
13. Acikgoz O, Gonenc S, Kayatekin BM, Uysal N, Pekcetin C, Semin I, et al. Methamphetamine causes lipid peroxidation and an increase in superoxide dismutase activity in the rat striatum. *Brain research*. 1998;813(1):200-2.
14. Siesjo BK. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *Acta psychiatrica Scandinavica Supplementum*. 1984;313: 57-91.
15. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free radical biology & medicine*. 2005; 39(1):51-70.
16. Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, et al. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature*. 2005; 438(7068): 662-6.
17. Yasunari K, Watanabe T, Nakamura M. Reactive oxygen species formation by polymorphonuclear cells and mononuclear cells as a risk factor of cardiovascular diseases. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2006; 7(2):73-80.
18. Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009;2(2):63-7.
19. Rajesh M, Nagarajan A, Perumal S, M. S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis*, *Ficus bengalensis* and *Ficus racemosa*. *Food Chemistry*. 2008: 1000(8): 7-107
20. Jamshidi M, Ahmadi HR, Rezazadeh Sh, Fathi F, M. M. Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. *Journal of Medicinal Plants*. 2010;9(34):177-83.
21. Gupta R, Singh M, Sharma A. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacological research*. 2003;48(2):209-15.
22. Helbecque N, Cottel D, Codron V, Berr C, Amouyel P. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and dementia in humans. *Neuroscience letters*. 2004;358(1):41-4.
23. Khanahmadi M, Janfeshan K. Study on antioxidation property of *Ferulago angulata* plant. *Asian J Plant Sci*. 2006;5:521-6.
24. Ghasempour H, Shirinpour E, Heidari H. THE Constituents of essential oils of *Ferulago angulata* (SCHLECHT) boiss at two different habitate, nevakoh and shahoo, zagross



mountain, western IRAN. Iranian Journal of Science and Technology, Transaction. 2007;31:814-7.

25. Baser KH, Demirci B, Demirci F, Hashimoto T, Asakawa Y, Noma Y. Ferulagone: a new monoterpene ester from *Ferulago thirkeana* essential oil. *Planta Med.* 2002; 68(6):564-7.
26. Rafieirad M, Zangenehnezhad Z, Eydipour Z. Effects of oral *Ferulago angulate* hydroalcoholic extract on lipid peroxidation induced by ischemia hypoperfusion in the hippocampus rat. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences.* 2014;3(2):157-64.
27. Sharifi F, Rafieirad M, H S. Effects of *Ferulago angulata* Extract Against Oxidative Stress Induced by 6-hydroxydopamine in Rats. *journal of medical plants.* 2015; 1(53): 34-44.

## اثرات ژن کد کننده انتروتوکسین H باکتری *S. aureus* بر بیان ژن های *Bax*، *Bcl-2* و *Bak* در سلول های رده سرطان کلیه ACHN

لیلا جمالی<sup>۱</sup>، رایان جعفری<sup>۲</sup>، امیرحسین قوامی<sup>۳</sup>، فرانک عالی<sup>۴\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی زیست فناوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۴. دانشجوی دکتری ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان کلیه به عنوان یکی از ۱۰ سرطان شایع در دنیا شناخته شده است. شایع ترین سرطان کلیه در بزرگسالان، کارسینوم سلول های کلیه است. به طور کلی خطر ابتلا به سرطان کلیه با تشخیص و درمان به موقع قابل کنترل و درمان است. *استافیلوکوکوس اورئوس* فاکتورهای زیادی را ترشح می کند که *Seh* از آن دسته می باشد. طبق مطالعات انجام شده سم انتروتوکسین H باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در سرطان کلیه نقش مهمی در القای آپوپتوز داشته است. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثرات ژن کد کننده سم انتروتوکسین H باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در سلول های ACHN می باشد.

**مواد و روش ها:** سلول های ACHN از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سپس در محیط RPMI به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو کشت داده شدند. توالی ژن سم انتروتوکسین H در وکتور pcDNA3 کلون شد. برای تراریزش سلول ها از روش لیپوفکشن بهره گرفته شد. استخراج RNA انجام شد و تهیه cDNA صورت گرفت. آزمایش real time RT-PCR برای بررسی میزان بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز نظیر *BAX*، *BCL-2* و *BAK* در سلول های گروه آزمایش و گروه شاهد انجام شد.

**نتایج:** نتایج به دست آمده حاکی از افزایش بیان ژن های *BAK* و *BAX* ( $p < 0.01$ ) و کاهش بیان ژن های *BCL-2* ( $p < 0.05$ ) در سطح معناداری بوده است. به این صورت که در مقایسه با سلول های ACHN که ژن *Seh* را دریافت نکردند مشخص شد که سلول های دارای ژن، بیشتر به سمت آپوپتوزی پیش رفته بودند.

**نتیجه گیری:** انتروتوکسین H با بیان در سلول های سرطان کلیه سبب افزایش بیان ژن های پروآپوپتوزی و کاهش بیان ژن های آنتی آپوپتوزی می شود. بر طبق شواهد به دست آمده این سم می تواند به عنوان یک فاکتور ضد سرطانی در رده ACHN عمل کند.

**واژگان کلیدی:** سرطان کلیه، سم انتروتوکسین H، *Bax*، *Bcl-2* و *Bak*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۴۸۰۹۲۶۱

پست الکترونیک: faranakaali1361@gmail.com

## Investigating the effects of the gene coding for enterotoxin H of *Staphylococcus aureus* bacteria on the expression of *Bax*, *Bcl-2* and *Bak* genes in ACHN cells

Leila Jamali<sup>\*1</sup>, Ryan Jafari<sup>2</sup>, Amirhossein Ghavami<sup>3</sup>, Faranak Aali<sup>4</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. B.Sc. Student Biotechnology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. B.Sc. Student Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
4. Ph.D. Student in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background and Target:** The Kidney cancer is known as one of the 10 common cancers in the world. The most common Kidney cancer in adults is Kidney cells Carcinome. Generally the hazard of the Kidney cancer infection is both controlable and curable through distinguishing and remedy on time. *Staphylococcus aureus* secretes a lot of factors that Seh is one of those categories. According to accomplished studies, the Enterotoxin poison type H of the *S. aureus* has a significant role in Kidney cancer in Apoptosis induction. The target of checking effects of Enterotoxin type H poison of *S. aureus* is placed in ACHN cells.

**Materials and Methods:** ACHN cells have been provided from Institute Pasteur in Iran. Then, they've been cultured in RPMI environment with %10 FBS. The sequence of Enterotoxin poison type H has been colonized in the pcDNA3 vector. For the discharge of cells, the Lipofection method has been used. Then, the RNA extraction and cDNA providing has done. The real time RT\_PCR experiment is accomplished for reviewing an amount of Genes coding about Apoptosis like *BAX*, *BCL-2* and *BAK* in experimental and control groups.

**Results:** The received results according to increasing of *BAX* and *BAK* genes ( $p < 0.01$ ) coding and decreasing of *BCL-2* ( $p < 0.05$ ) gene coding have been in a meaningful level. Like this that in comparison with ACHN cells that have not received Seh gene has been distinguished that cells with gene have been changed in Apoptosis format.

**Conclusion:** The Enterotoxin type H causes the increasing of gene proapoptosis coding through coding in kidney's cancer cells and decreasing of the Antiapoptosis genes coding. According to received evidences, this poison can work as an anticancer factor in ACHN group.

**Keywords:** Kidney's cancer, Enterotoxin type H poison, *BAX*, *BCL-2*, *BAK*

### مقدمه

سرطان گروهی متشکل از بیش از ۱۰۰ بیماری متمایز که با رشد کنترل نشده سلول‌های غیرطبیعی در بدن مشخص می‌شود. اگرچه سرطان از دوران باستان شناخته شده است، برخی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در درک دانشمندان از آن از اواسط قرن بیستم انجام شده است. این پیشرفت‌ها منجر به پیشرفت‌های عمده در درمان سرطان، عمدتاً از طریق توسعه روش‌هایی برای تشخیص به موقع و دقیق، جراحی انتخابی، پرتودرمانی، داروهای شیمی درمانی و درمان‌های هدفمند (عوامل طراحی شده علیه مولکول‌های خاص درگیر در سرطان) شد (۱).

سرطان کلیه در سطح جهان سالانه عامل بیش از ۱۳۱۰۰۰ مرگ و میر است و مشخص شده است که بار اقتصادی زیادی را بر جامعه تحمیل می‌کند. با این حال اخیراً هیچ مقاله‌ای در مورد میزان سرطان کلیه در سراسر جهان وجود ندارد. هدف از این مطالعه ارائه یک گزارش وضعیت در مورد بروز، مرگ و میر و سال‌های زندگی کاهش یافته با ناتوانی مرتبط با سرطان کلیه در ۱۹۵ کشور، از سال ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۷ بود. در سطح جهانی تعداد موارد سرطان از ۳/۱۸ میلیون در سال ۲۰۰۷ به ۲۴/۵ میلیون در سال ۲۰۱۷ افزایش یافته است. سرطان‌ها همچنین ۹/۶ میلیون مرگ و میر در سال ۲۰۱۷ یا ۱۷ درصد از کل مرگ و میرها را تشکیل می‌دهند (۲).

اکثر مطالعات در مورد لنفوم غیر هوچکین و لوسمی ارتباط مثبتی با قرار گرفتن در معرض آفت‌کش‌ها نشان دادند. برخی رابطه دوز پاسخ را نشان دادند و تعداد کمی توانستند آفت‌کش‌های خاصی را شناسایی کنند. بسیاری از مطالعات ارتباط مثبتی را بین قرار

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

گرفتن در معرض آفت کش ها و تومورهای جامد نشان دادند. ثابت ترین ارتباط برای سرطان مغز و پروستات یافت شد. همچنین ارتباطی بین سرطان کلیه در کودکان و مواجهه والدین آن ها با آفت کش ها در محل کار یافت شد. نقاط ضعف خاص و محدودیت های ذاتی در مطالعات اپیدمیولوژیک، به ویژه در مورد تعیین اینکه آیا قرار گرفتن در معرض و چه مقدار قرار گرفته است (۲).

برای بیماران مبتلا به شایع ترین نوع سرطان کلیه، اکنون یک استفاده تایید شده جدید از درمان هدفمند cabozantinib وجود دارد. در دسامبر ۲۰۱۷، سازمان غذا و دارو (FDA) استفاده از این دارو را به عنوان درمان اولیه یا خط اول برای بیماران مبتلا به سرطان سلول کلیوی پیشرفته (RCC) تایید کرد. Cabozantinib در ابتدا در سال ۲۰۱۶ برای بیماران مبتلا به RCC متاستاتیک که تومورهای آن ها به اولین درمان آن ها پاسخ نداده یا پس از درمان قبلی عود کرده بودند تأیید شد. در سال ۲۰۱۲ فرمول متفاوتی از دارو با نام تجاری کامتريك برای درمان بیماران مبتلا به کارسینوم مدولاری تیروئید تایید شد (۳).

*استافیلوکوکوس اورئوس* (جنس استافیلوکوک) گروهی از باکتری های کروی شکل که شناخته شده ترین گونه های آن در سطح جهانی به تعداد زیاد روی غشاهای مخاطی و پوست انسان ها و سایر حیوانات خونگرم وجود دارد. اصطلاح استافیلوکوک که عموماً برای همه گونه های آن استفاده می شود، به عادت سلول ها به تجمع در خوشه های انگور اشاره دارد. استافیلوکوک ها از نظر میکروبیولوژیکی به عنوان گرم مثبت (در کشت های جوان)، غیر اسپورساز، غیر متحرک، بی هوازی اختیاری مشخص می شوند. استافیلوکوک ها به طور معمول روی پوست و غشاهای مخاطی انسان با تقریباً ۲۰-۳۰٪ برای کلونیزاسیون مداوم و ۶۰٪ برای کلونیزاسیون متناوب وجود دارند (۴). کنترل کننده های مواد غذایی که با استافیلوکوک های انتروتوکسیژن کلونیزه شده اند به عنوان منبع اصلی آلودگی مواد غذایی از طریق تماس مستقیم با محصولات یا سطوح تماس در نظر گرفته می شوند. حیواناتی مانند گاوهای شیری نیز می توانند ناقل استافیلوکوک باشند و می توانند منبع آلودگی شیر و فرآورده های شیری باشند. در نهایت، استافیلوکوک های موجود در محیط می توانند به محصولات غذایی که منبع بالقوه آلودگی هستند، منتقل شوند (۵).

*استافیلوکوکوس اورئوس* یک کوکسی گرم مثبت که تقریباً یک میکرومتر قطر دارد و خوشه ها را تشکیل می دهد و مسئول بیماری های شایع و جدی است (۶). این بیماری ها عبارتند از مسمومیت غذایی و سندروم شوک سمی که ناشی از عصاره های تولید شده توسط *S. aureus* است. انتروتوکسین های باکتری استافیلوکوک اعضای یک خانواده بیش از ۲۰ نوع می باشند، که به لحاظ کارکردی همخوانی دارند. از بین این ۲۰ نوع، *Sea* و *Seb* بهترین مشخصه انتروتوکسین ها هستند و همچنین به دلیل توانایی آن ها برای اتصال به مولکول های MHC کلاس ۱۱ در سلول های ارائه دهنده آنتی ژنی و نیز، همچنین تحریک جمعیت های زیادی از سلول های T که مناطق متغیر در بتا زنجیره ای هستند، از بهترین نمونه های انتروتوکسین ها می باشند. نتیجه این فعال سازی عظیم سلول های T، یک سیتوتوکسین است که منجر به یک شوک سمی حاد می شود. این پروتئین باکتریایی شناخته شده با بیماری های قابل توجه انسان مرتبط است که شامل مسمومیت غذایی و سندروم شوک سمی است. استافیلوکوک اورئوس یک فاکتور ناپایدار است که کلنی های زرد را در محیط غنی ایجاد می کند و موجب همولیز بتا و آلفا بر روی صفحات آگار خون می شود. اکثر ژن های کدگذاری شده برای *Sea* بر روی عناصر پلاسمید مانند باکتریوفاژها یا جزایر پاتوژنیک قرار دارند. اگر چه بیش از ۲۰ نوع انتروتوکسین استافیلوکوک متمایزی وجود دارد، تنها تعدادی کمی از آن ها در عمق مورد مطالعه قرار گرفته اند. شایع ترین انتروتوکسین استافیلوکوک *Sea* و *Seb* است. *Sea* شایع ترین سم در مسمومیت با مواد غذایی مرتبط با استافیلوکوک است. *Seb* در حالی که با مسمومیت غذایی مرتبط است، برای استفاده بالقوه مورد استفاده قرار می گیرد. *Sed* بعد از *Sea* و *Seb* پیشنهاد می شود که دومین سم شایع استافیلوکوک همراه با مسمومیت غذایی در سراسر جهان می باشد و یک مطالعه نشان می دهد تنها مقداری کمی از این سم برای مسمومیت غذایی مورد نیاز می باشد. *Seb* در بعضی موارد مسمومیت شناخته شده است در حالی که *Sef* در سندروم شوک سمی دخیل است. *Seh*، *Sei* و *Seg* هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته اند اما با شیوع یکی از مسمومیت های غذایی در تایوان همراه بوده است. *Seh* نیز به عنوان یکی از علل مسمومیت غذایی عظیم همراه با مصرف شیر بازسازی شده در ژاپن در سال ۲۰۰۰ شناخته شده است. این انتروتوکسین ها دارای توانایی های قابل توجهی در برابر حرارت و اسید می باشد. این ها باعث ایجاد التهاب و

گاستروآنتریت و همچنین سوپر آنتی ژنیک می‌شوند. این‌ها از طریق پروتئازهای گوارشی از جمله پپسین، تریپسین و رنین مقاوم به انقباض هستند، بنابراین این‌ها به آسانی می‌توانند از باکتری‌هایی که آن‌ها را تولید کرده خارج شوند (۷). کارسینوم سلول‌های کلیه سلول‌های خونی که در واقع همان سلول‌های روشن هستند (ccRCC) شایع‌ترین و ظاهراً پر خطرترین نوع RCC است. حدود ۷۰٪ تا ۸۰٪ از سرطان کلیه از سلول‌های روشن تشکیل شده است. سلول‌های ACHN نوعی از (ccRCC) هستند. در سال ۱۹۷۲ از تخمدان پلورال بدخیم مرد ۲۲ ساله قفقازی با آدنو کارسینوم کلیوی متاستاز آغاز شد. مطالعه سان و همکارانش با هدف بررسی اثر miR-497 بر سلول‌های سرطانی کلیه انجام شده است. آن‌ها سلول‌های روشن و بافت‌های مجاور طبیعی بیماران توسط شیمی درمانی و رادیوتراپی دریافت کردند. RT-PCR برای تشخیص بیان miR-497 در بافت (ccRCC) انجام شد. اثرات miR-497 بر قابلیت زنده ماندن، آپوپتوز و تهاجم در سلول‌های ACHN شناسایی شد و دریافتند که miR-497 در بافت (ccRCC) کاهش می‌یابد. سلول‌های ACHN با miR-497 را در آزمایشات شیمیایی و مهارکننده‌ها آزمایش کردند و دریافتند که miR-497 آپوپتوز سلول‌های ACHN را افزایش می‌دهد. مطالعات نشان داده‌اند که miR-497 مانع از زنده ماندن سلول‌های ACHN می‌شود. miR-497 آپوپتوز این سلول‌ها از طریق تاثیر بر تعادل پروتئین‌های وابسته به آپوپتوز و مهار رفتار تهاجمی افزایش می‌دهد (۸).

سموم باکتریایی از طریق کشتن سلول‌ها و تغییر فرایندهای سلولی کنترل کننده تکثیر، آپوپتوز و تمایز که با سرطان در ارتباط است عمل می‌کند. شکل دیگر کاربرد باکتری‌ها، اسپور می‌باشد که اشکال بسیار مقاوم باکتریایی هستند و از طریق لایه‌هایی نظیر کورتکس کراتینی و COAT محافظت می‌شوند. کاربرد دیگر باکتری‌ها به شکل DNA واکسن می‌باشد که از طریق ارائه آنتی ژن‌های سرطانی سیستم ایمنی را علیه سلول سرطانی به کار می‌گیرند و از زوش‌های ترانسفکشن و ترانسفورماسیون این کار ممکن خواهد بود (۹).

### معرفی ژن‌های *BAX*, *BAK* و *BCL-2*

مطالعه سندروم‌های سرطانی ارثی منجر به شناسایی ژن‌های مرتبط با سرطان کلیه فامیلی، سرطان کروموفوب کلیه فامیلی، سرطان پاپیلری نوع ۱ و ۲ و کارسینومای ناهنجار کلیوی خانوادگی است. تمام سرطان اساساً ژنتیکی است (۱۰). انتروتوکسین بر بیان ژن‌های *BCL-2*, *BAX* و *BAK* در سلول‌های ACHN تاثیر دارد. پژوهشگران دریافته‌اند که مصرف میوه جات می‌تواند بیان یکی از ژن‌های نام برده شده را افزایش و بیان ژن دیگر را کاهش دهد. برای مثال مصرف زردآلو می‌تواند بیان ژن *Bax* را افزایش داده و بیان ژن *BCL-2* را کاهش دهد (۱۱). هدف از این پژوهش علمی بررسی تاثیر سم انتروتوکسین H بر میزان بیان ژن‌های *Bak*, *BCL-2* و *Bax* در سلول‌های ACHN می‌باشد.

### مواد و روش کار

#### تهیه سلول مورد استفاده

سلول‌های رده‌ی سلولی ACHN از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. ابتدا میزان ۳۰ میلی‌گرم از آنتی‌بیوتیک نفومایسین در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ Penstrep (۱۰۰ IU/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ Mg/mL استرپتومایسین) حل شد و محلول نفومایسین (سیگما، آلمان) با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. میزان ۶۰۰ میکرولیتر از محلول نفومایسین با ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ Penstrep مخلوط شد و پس از تخلیه محیط کشت خانه حاوی کنترل، شاهد و تیمار در نمونه پلیت ۶ خانه جایگزین آن شد. زمانی که محیط کشت به رنگ زرد تبدیل شد، محیط کشتی که حاوی نفومایسین بود، جایگزین آن شد و این فرآیند به مدت ۷ تا ۱۰ روز تکرار شد. پس از رشد سلول‌ها، تمامی خانه‌ها اعم از شاهد و نمونه توسط ۰/۵ میلی‌لیتر PBS شست و شو داده شد و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر تریپسین اضافه شد و پلیت به مدت ۱-۲ دقیقه در انکوباتور (FINEPCR، آلمان) قرار گرفت تا سلول‌ها از پلیت جدا شدند. با یک میلی‌لیتر محیط کشت، تریپسین

خنثی شد و تمامی محتویات خانه شاهد و تیمار به درون دو فالكون استریل مجزا توسط سمپلر (اپندورف، آلمان) منتقل شدند. محتویات فالكون به مدت ۵ دقیقه با شرایط rpm ۱۲۰۰ و گرانش ۲۳۱ سانتریفوژ (سیگما، آلمان) شد و محیط رویی تخلیه گردید و رسوب در ۱ میلی لیتر محیط کشت سوسپانسی شد. سوسپانسیون سلولی در ۴ فلاسک ۲۵ میلی لیتری که شامل ۲ فلاسک تیمار و ۲ فلاسک شاهد است تقسیم شد و به هر فلاسک ۵ میلی لیتر محیط کشت اضافه شد و به مدت یک روز در انکوباتور قرار گرفت تا رشد کرد. یک فلاسک به عنوان شاهد و یک فلاسک به عنوان شاهد برای استفاده مداوم انتخاب شد و از آن پاساژ تهیه شد و از فلاسک دیگر ۲ رسوب سلولی برای ذخیره تهیه شد که یکی از رسوبها که مرده مستقیماً در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت (رسوب مرده). رسوب دیگر با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO و ۹۰۰ میکرولیتر FBS مخلوط شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد فریزر قرار گرفت (رسوب زنده).

### وکتور

پلاسمید نوترکیب (+) pcDNA 3.1 از شرکت Generay biotechnology تهیه شد. به منظور اطمینان از ورود ژن به پلاسمید، توسط شرکت مورد نظر هضم آنزیمی از طریق دو آنزیم محدودکننده EcoR1 و BamH1 انجام گرفت و توسط ژل الکتروفورز بررسی شد. برای تکثیر و تأیید پلاسمیدهای نوترکیب باید آن‌ها را در میزبان باکتریایی که رشد سریع دارند وارد کرد. یکی از ویژگی‌های این پلاسمیدهای نوترکیب این است که دارای نقطه‌ی شروع رونویسی هم در میزبان پروکاریوتی و هم در میزبان یوکاریوتی می‌باشند. برای ورود پلاسمیدهای نوترکیب به باکتری، از باکتری‌های اشرشیا کلای سوبه‌ی TOP10F که مستعد پذیرش شده‌اند استفاده شد. ابتدا یک کلنی از باکتری تازه برداشته شد و در یک لوله‌ی حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع LB-Broth کشت داده شد. با گذشت ۳ تا ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با شرایط rpm ۱۸۰ تا rpm ۲۵۰ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد سلول‌ها وارد فاز رشد نمایی شدند. سپس محلول با شرایط rpm ۹۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ قرار گرفت که سلول‌ها ته‌نشین شدند و محلول رویی دور ریخته شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول CaCl<sub>2</sub> با غلظت ۰/۱ مولار که در شرایط سرد و استریل قرار داشت، به رسوب باکتری اضافه شد و سلول‌ها در آن حل شدند و به مدت ۳۰ دقیقه روی آب و یخ قرار دادند. سپس سانتریفوژ با شرایط rpm ۹۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت و محلول رویی دور ریخته شد. در این مرحله مانند مرحله قبل از CaCl<sub>2</sub> سرد و استریل یک بار با غلظت ۷۰۰ میکرولیتر و بار دوم با غلظت ۳۰۰ میکرولیتر تکرار شد که در نهایت ۳۰۰ میکرولیتر سلول مستعد پذیرش پلاسمید نوترکیب به دست آمد (OD<sub>600</sub>=4/0) که در ۳ تیوب استریل مجزا قرار داده شدند. یک تیوب برای ذخیره در یخچال در نظر گرفته شد. تیوب دوم به عنوان شاهد قرار داده شد. به تیوب سوم میزان ۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی آب و یخ قرار گرفت. در این مرحله شوک حرارتی باید ایجاد کرد که سلول‌ها ۱/۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و بلافاصله اما به آرامی ۲ دقیقه روی آب و یخ برده شدند. در این حالت پلاسمید-های نوترکیب وارد *E. coli* شده است.

### تکثیر سلول‌ها

۱ میلی لیتر محیط کشت که فاقد آنتی بیوتیک بود به تیوب‌ها اضافه شد. تیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از رشد و ترمیم باکتری‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی پلیت‌های حاوی محیط LB-Agar که دارای آنتی بیوتیک آمپی سیلین است پخش شد. به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از مدتی روی پلیت حاوی باکتری‌های تیوب شاهد، کلنی دیده نشد اما روی پلیتی که باکتری‌های ترانسفرم شده وجود داشت به علت ژن مقاومت به آمپی سیلین که روی پلاسمیدهای نوترکیب وجود داشت، کلنی‌هایی دیده شد که نشان دهنده وجود پلاسمیدهای نوترکیب در آن‌ها بود. برای این که این کلنی‌ها حفظ شوند می‌توان ماتریکسی حاوی محیط کشت LB-Agar که دارای آمپی سیلین می‌باشد تهیه کرد و این کلنی‌ها را به ماتریکس انتقال داد و بعد از گذشت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد، از هر خانه ماتریکس در محیط LB-Broth کشت انجام داد و در انکوباتور قرار داد تا تعداد کلنی‌ها بالا رفته و برای استخراج پلاسمید نوترکیب مناسب شوند.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

### ترانسفکشن (لیپوفکشن)

نام دیگر این روش تحویل ژن می‌باشید. در این روش توالی ژنی وارد سلول میزبان می‌شود و با افزوده شدن به پلاسمید، می‌توان به تولید محصول مورد نظر دست یافت.

### ترانسفورماسیون

روشی ساده و آسان است که می‌تواند برای مهندسی ژنتیک باکتری انجام شود. ترانسفورماسیون نام دیگر نو ترکیبی است. در ترانسفورماسیون توالی جدیدی به پلاسمید باکتری افزوده می‌شود که از طریق آن می‌توان سموم نام برده شده را تولید کرد.

### استخراج RNA

سلول‌هایی که از مرحله‌ی قبل بدست آمد در زمان ۵ دقیقه با شرایط  $12000 \text{ rpm}$  سانتریفوژ شد و محیط رویی دور ریخته شد. به رسوب بدست آمده ۱ میلی لیتر محلول RNX-Plus اضافه شد و با هم مخلوط شدند تا سلول‌ها کاملاً در هم حل شدند و سپس به تیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شدند. تیوب به مدت ۱۰-۵ ثانیه ورتکس شد و ۵ دقیقه در دمای محیط نگاه‌داری شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به تیوب‌ها اضافه شد و آرام اینورت شد. بلافاصله تیوب‌ها بر روی یخ انتقال یافتند و ۵ دقیقه روی یخ ماندند. تیوب‌ها با شرایط  $12000 \text{ rpm}$  به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و فاز رویی توسط سمپلر به دقت برداشته شد و به تیوب جدید انتقال یافت. هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. سپس تیوب برای مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با شرایط  $12000 \text{ rpm}$  در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و محلول رویی در محلول رویی دور ریخته شد. اتانول ۷۵٪ به میزان ۱ میلی لیتر به رسوب اضافه شد و به آرامی تکان داده شد و دوباره به مدت ۸ دقیقه با شرایط  $7500 \text{ rpm}$  در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و محلول رویی خارج شد. تیوب به مدت ۱۵ دقیقه زیر هود قرار گرفت تا خشک شد. میزان ۲۵ میکرولیتر آب تزریق به تیوب اضافه شد تا RNA در آن شناور شد. جهت حذف DNA از RNA های استخراج شده از آنزیم DNase استفاده شد، به‌صورتیکه به ازای هر میکرولیتر از RNA 10 واحد آنزیم DNase و ۲ میکرولیتر بافر X10 مخصوص آن اضافه شد و با آب DEPC به حجم ۳۰ میکرولیتر رسید. سپس مخلوط به‌دست آمده به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور حذف DNase 2 میکرولیتر محلول ۵۰ میلی مولار EDTA اضافه شد (جهت حفاظت از RNA در برابر حرارت) و به مدت زمان ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. RNA تخلیص شده با دستگاه نانودراپ تعیین غلظت شد. غلظت RNA در حدود ۰/۱۶ میکروگرم در میکرولیتر تشخیص داده شد. برای مرحله‌ی بعد به منظور دستیابی به ۴ میکروگرم RNA از ۲۵ میکرولیتر محلول حاوی RNA استخراج شده استفاده شد.

### سنتز cDNA

تولید cDNA طبق پروتکل کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آما، ایران) صورت گرفت.

### PCR

برای اثبات درستی cDNA سنتز شده، ابتدا PCR با پرایمرهای ژن GAPDH صورت گرفت. سپس برای تعیین دمای دقیق Anneling پرایمرها ابتدا PCR با پرایمرهای مناسب صورت گرفت (جدول ۱). برای انجام واکنش PCR مخلوطی شامل ۶/۵ میکرولیتر Taq 2x Master Mix (۱/۵ میلی مولار) به میزان ۶/۵، ۰/۶ میکرولیتر پرایمر رفت (۰/۳ نانومول)، ۰/۶ پرایمر برگشت (۰/۳ نانومول)، ۱/۵ میکرولیتر cDNA و ۳/۸ میکرولیتر آب تزریق به حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر تهیه گشت. سپس در میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری گرفت و در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) قرار گرفت. برنامه دمایی PCR به صورت یک سیکل (۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه)، ۳۲ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه) و یک سیکل (۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه) می‌باشد.

### Real time PCR

به منظور بررسی میزان تغییر بیان در ژن‌های مورد مطالعه cDNA ساخته شده از RNA های بیان شده در سلول‌های رده‌ی سلولی ACHN در دو سلول ترانسفرم شده و ترانسفرم نشده از جفت پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده برای انجام real time-RT

PCR استفاده شد. همچنین از *GAPDH* به عنوان ژن رفرنس استفاده شد. ابتدا به ازای هر نمونه ۵/۳ میکرولیتر آب استریل به تیوب اضافه شد. سپس به میزان ۰/۶ میکرولیتر پرایمر رفت و ۰/۶ میکرولیتر پرایمر برگشت به تیوب اضافه شد. میزان ۶/۵ میکرولیتر مستر میکس X2 به تیوب منتقل شد. به میزان ۱/۵ میکرولیتر نمونه به تیوبی که حاوی محلول بالا است اضافه شد. جهت ایجاد منحنی استاندارد از غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میکروگرم بر میکرولیتر که توسط آب تزریق ایجاد شده بودند استفاده شد. این میکروتیوب‌ها که با دقت‌های مختلف ساخته شد در دستگاه real time PCR قرار گرفت. پس از ۹۰ دقیقه منحنی‌هایی بر روی مانیتور ایجاد شد که نشان دهنده نتیجه کار بودند.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	ژن	دمای اتصال (°C)	اندازه قطعه (bp)	پرایمر (5'-3')
۱	<i>Bax</i>	۶۵	۱۴۴	F: 5'-AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC-3' R: 5'-GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG-3'
۲	<i>BCL-2</i>	۶۵	۱۶۸	F: 5'-GACGACTTCTCCCGCCGCTAC-3' R: 5'-CGGTCAGGTACTCAGTCATCCAC-3'
۳	<i>GAPDH</i>	۶۴	۱۶۱	F: 5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3' R: 5'-GGTCACGAGTCCTTCCACGATAAC-3'
۴	<i>BAK</i>	۶۶	۱۹۴	F: 5'-CGTTTTTTACCGCCATCAGCAG-3' R: 5'-ATAGCGTCGGTTGATGTCGTCC-3'
۵	<i>She</i>	۶۵	۶۶	F: 5'-AGTGCAGAGAAGATCAGCGAGAAC-3' R: 5'-ATCTTCCCGAATCTTAATGTCCAGC-3'

### آنالیز آماری

به منظور آنالیز آماری تغییرات بیان ژن‌ها قبل و بعد از تیمار با سم *Seh* در سلول‌های رده‌ی ACHN از نرم‌افزار REST 2009 که نرم‌افزاری مناسب برای محاسبه‌ی تغییرات بیان می‌باشد استفاده شد. سپس نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS 22.0 مورد تحلیل آماری قرار گرفت. برای بررسی وجود یا عدم وجود ارتباط معنادار و میزان معنی از آزمون‌های LSD و Independent T-test استفاده شد. تمامی داده‌ها به صورت means + S.E.M در سطح معنی داری  $p < 0/05$  در نظر گرفته شدند.

### یافته‌ها

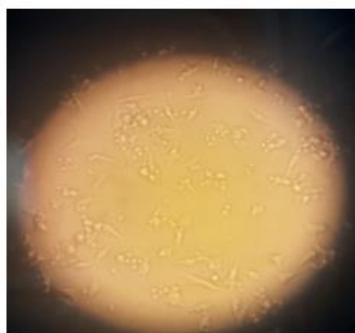
#### نتایج کشت باکتری

باکتری‌های ترانسفورم شده‌ای که حاوی ژن *Seh* بودند، به علت دارا بودن ژن مقاومت به آمپی‌سیلین روی محیط LB Agar حاوی آمپی‌سیلین دارای کلنی بودند.

#### نتایج کشت و شمارش سلول‌ها

بعد از اینکه سلول رده‌ی ACHN کشت داده شد و در زمان‌های ۲۴ ساعته، ۴۸ ساعته و ۷۲ ساعته مشاهده شدند مشخص شد که سلول در زمان ۷۲ ساعت دارای بالاترین و بیشترین تراکم بوده و برای لیپوفکشن بسیار مناسب است.

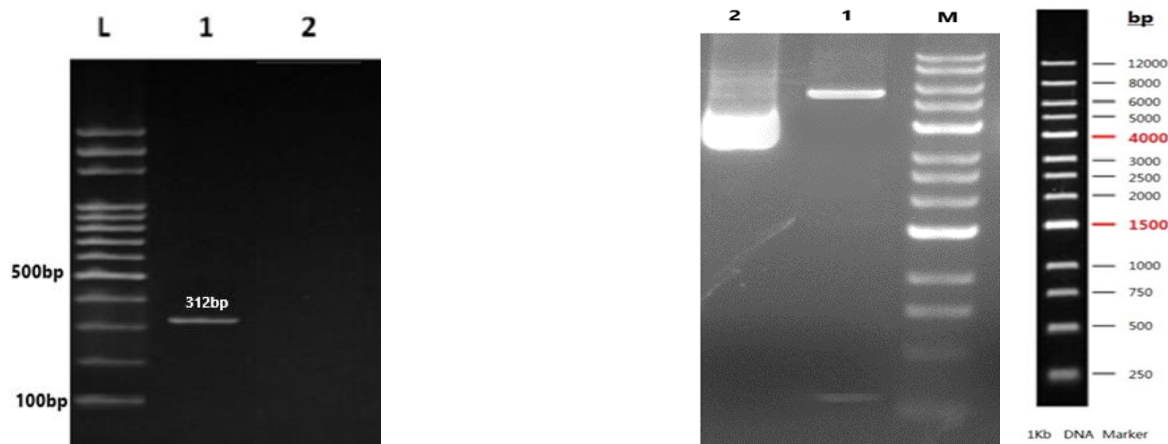




شکل ۱- تصویر میکروسکوپی از سلول ACHN

### تایید پلاسمید نوترکیب به روش PCR و هضم آنزیمی

انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *She* روی پلاسمید نوترکیب (+)pcDNA3.1 سبب تکثیر یک قطعه DNA با اندازه ۶۶ جفت باز گردید، که تایید کننده صحت کلون سازی این ژن در وکتور بیانی می باشد (شکل ۲). صحت قرار گرفتن ژن *Seh* در وکتور نوترکیب pcDNA3.1 توسط شرکت GENEray با استفاده از روش هضم آنزیمی دوگانه (با کمک آنزیمهای محدود کننده *XbaI* و *EcoRI*) وکتور نوترکیب (+)-*She*-pcDNA3.1 تایید شد و نتیجه بصورت عکس ژل ارسال شد (شکل ۳).

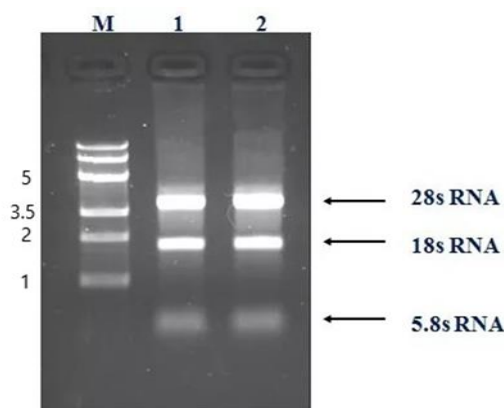


شکل ۲- از سمت چپ؛ L: لدر ۵۰۰bp (سیناکلون، ایران)، ۱: باند ۳۱۲ bp ژن *Seh*، ۲: کنترل منفی.

شکل ۳- هضم آنزیمی دوگانه. M: مارکر 1Kb (Geneaid Biotech Ltd، تایوان)، ۱: هضم آنزیمی دوگانه که باند ۳۱۲bp ژن را به همراه باند ۵۴۲۸bp مربوط به وکتور فاقد ژن هدف نشان می دهد. ۲: باندها به ترتیب از بالا به پایین Nicked circular form، Circular supercoiled form و Linear form مربوط به وکتور هستند.

### نتایج استخراج RNA

بعد از استخراج توسط پروتکل RNX PLUS جهت اطمینان یافتن از استخراج صحیح RNA میزان ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده روی ژل الکتروفورز برده شد که باندهای تشکیل شده به وضوح نشان دهنده انواع مختلفی از RNAها با سایزهای مختلف در سلول می باشد.



شکل ۴- حضور باندهای 28S و 18S ریبوزومی در RNA کل استخراج شده. M: مارکر 1 Kb (Geneaid Biotech Ltd، تایوان) ، ۱: RNA استخراج شده از سلول ACHN ترانسفکت شده با پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *Seh*، ۲: RNA استخراج شده از سلول ACHN ترانسفکت شده با پلاسمید فاقد ژن هدف

### نتایج استخراج پلاسمید و تعیین غلظت آن

بعد از اینکه پلاسمید در باکتری تکثیر یافت، استخراج از آن انجام شد و سپس روی ژل الکتروفورز برده و مشاهده شد و توسط دستگاه نانو دراپ تعیین غلظت انجام گرفت.

### نتایج RT\_PCR روی RNAهای استخراج شده و تایید صحت cDNA

برای تایید صحیح بودن کار PCR با پرایمر های اختصاصی ژن های *BAK, BAX, GADPH* و *BCL-2* انجام شد و محصولات آنها نیز روی ژل الکتروفورز برده شد و مشاهده شد که همه باند ها صحیح و مورد تایید بودند.

### نتایج Real time PCR و نمودار تایین سطح معنی دار

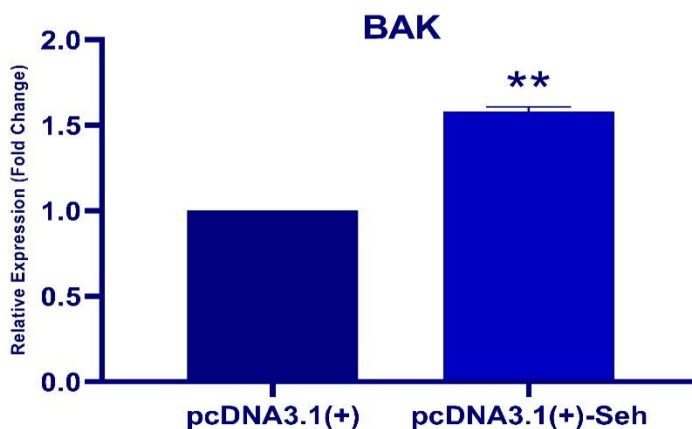
واکنش real time PCR بر روی ژن استخراج شده از سلول ACHN با ژن های آپوپتوزی نظیر *BAX, BCL-2, BAK* و *GAPDH* انجام شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج آنالیز آماری

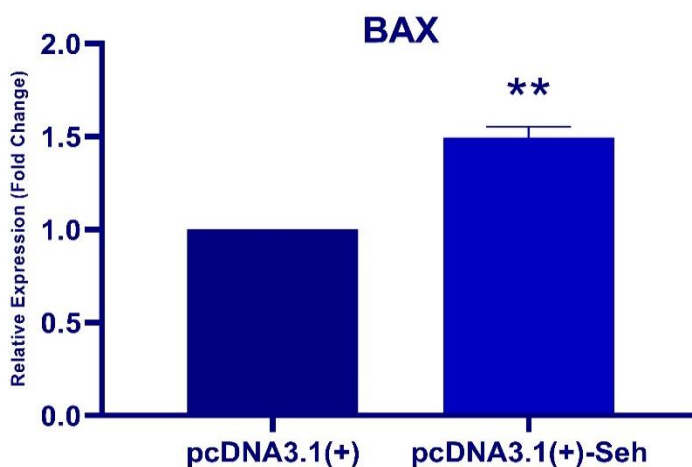
با انجام آزمون و بررسی بر روی  $\Delta Ct$  گروه تیمار و گروه شاهد نتایج زیر به دست آمد:

اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

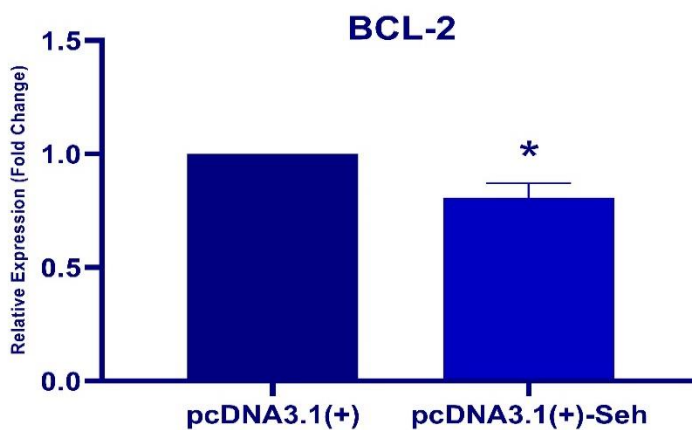
دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



نمودار ۱- مقایسه میانگین بیان در ژن *BAK* در دو گروه تیمار و شاهد ( $p < 0.0001$ \*\*\*\*,  $p < 0.001$ \*\*\*,  $p < 0.01$ \*\* ,  $p < 0.05$ \*)



نمودار ۲- مقایسه میانگین بیان در ژن *BAX* در دو گروه تیمار و شاهد ( $p < 0.0001$ \*\*\*\*,  $p < 0.001$ \*\*\*,  $p < 0.01$ \*\* ,  $p < 0.05$ \*)



نمودار ۳- مقایسه میانگین بیان در ژن *BCL-2* در دو گروه تیمار و شاهد ( $p < 0.0001$ \*\*\*\*,  $p < 0.001$ \*\*\*,  $p < 0.01$ \*\* ,  $p < 0.05$ \*)

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

### بحث

سرطان مجموعه‌ای از بیماری‌های بسیار هتروژن و مهاجم بوده که سالانه زندگی میلیون‌ها نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سرطان با ایجاد اختلال ژنتیکی در فرآیند کنترل تکثیر سلولی، تمایز و مرگ سلولی آغاز شده و با ایجاد سلول‌های مهاجم موجب تشکیل تومورهای سلولی می‌گردد که به آن کارسینوما گفته می‌شود (۱۲).

سرطان کلیه یکی از شایع‌ترین نئوپلاسم‌ها در دستگاه ادراری است. این یکی از اساسی‌ترین و یکی از انواع مکرر سرطان است. که مدیریت و نتیجه آن بستگی به مرحله بیماری دارد. در سال‌های اخیر میزان این بیماری رو به افزایش است و میزان بروز این بیماری بالاتر رفته است. تحقیقات نشان داده است که فعالیت بدنی، سیگار کشیدن، چاقی، فشار خون، مقاومت به انسولین و پر اکسیداسیون لیپید مربوط به سرطان کلیه است و اگر این مسائل کنترل و کاهش یابد احتمال بروز سرطان کلیه نیز کاهش می‌یابد (۱۳).

در چند دهه گذشته پیشرفت‌های ژنتیک مولکولی مسیرهای ژنی سرطان کلیه را روشن کرده است. سرطان کلیه یک اختلال ناهمگون است هر نوع خاصی از سرطان کلیه دارای ویژگی‌های بافت‌شناسی خود، ژن و دوره بالینی اختصاصی به خود است (۱۴). راه‌های درمان سرطان که از قدیم تاکنون مورد استفاده بوده است شامل شیمی‌درمانی و رادیوتراپی می‌باشد، که این روش‌ها بیشتر از خود سرطان باعث از بین بردن سیستم دفاعی بدن می‌شود (۱۵).

سرطان کلیه بی صدا پیشروی می‌کند، اما با این حال نشانه‌هایی دارد که از جمله از طریق رنگ ادرار، رنگ پوست، درد پهلوها، درد استخوان‌ها، ضعف و خستگی، نشانگرهای تومور و همچنین معاینات فیزیکی نیز قابل تشخیص می‌باشد (۱۴).

باکتری مورد مطالعه ما استافیلوکوک اورئوس است که کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است. این باکتری دارای ۴۰ گونه می‌باشد که این باکتری با تولید انتروتوکسین‌ها باعث ایجاد مسمومیت غذایی و شوک سمی می‌باشد (۱۶).

انتروتوکسین‌های استافیلوکوک اعضای یک خانواده ۲۰ نوع می‌باشد. گرچه ۲۰ نوع انتروتوکسین وجود دارد اما تنها مقدار کمی از آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶).

جونلی و همکارانش در سال‌های ۲۰۰۹-۱۹۹۰ براساس آزمایشی که با متغیرهای جنس و سن و منطقه در نژاد آمریکایی، هندی، بومی آلاسکا و جمعیت سفید پوستان انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که میزان روند بروز سرطان کلیه و مرگ و میر خیلی بیشتر از سفید پوستان است (۱۷).

پور نامدار و همکارانش در دهه‌های اخیر بررسی کردند که سرطان کلیه افزایش یافته است. با مطالعه به این نتیجه رسیدند که از ۵۹۴ بیمار در سال ۲۰۰۳ به ۱۳۷۷ بیمار در سال ۲۰۰۹ افزایش یافته است. این مطالعات نشان می‌دهد که خطر ابتلا به سرطان با افزایش آلودگی هوا نیز زیاد می‌شود (۱۸).

سعادت و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با مطالعه بر روی ژن‌های See، Seq و Sec استافیلوکوکوس اورئوس از طریق روش PCR، که تست بسیار حساس و دارای اختصاصیت بسیار زیاد می‌باشد، به این نتیجه رسیدند که از ۱۵۰ سویه بدست آمده از بین ناقلین سالم ۹۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده است. که برای شناسایی ژن انتروتوکسین استافیلوکوک نوع A، C و Q از سیستم PCR استفاده کردند. ژن Nuc به عنوان مارکر جهت شناسایی این باکتری استفاده شد. بنابراین آزمایش PCR می‌تواند برای شناسایی سویه‌های واجد ژن انتروتوکسین A، C و Q مفید باشد (۱۹).

سالار شریف و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با مطالعه بر روی ردیابی ژن‌های انتروتوکسین A و B باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تعدادی از نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه کننده به این نتیجه رسیدند که از ۴۰ نمونه که به صورت جداگانه از هر یک از محل‌های زخم، خون، گوش، بینی، اسفراغ و ادرار گرفته شد، نمونه‌ها آلوده به انتروتوکسین A و B بوده پس شناسایی انتروتوکسین A و B نقش مهم این توکسین‌ها در ایجاد عفونت‌های ثانویه در بیماران می‌باشد (۲۰).

یانگ و همکارانش با مطالعه بر روی روند بروز سرطان‌های مثانه و کلیه در سال ۲۰۱۳ در شهر شانگهای به این نتیجه رسیدند که سرطان کلیه در مردان از ۱/۶ به ۵/۴ افزایش یافته و در زنان از ۰/۸۵ به ۳/۳۳ در سال افزایش یافته است. بنابر این افزایش سرطان کلیه و مثانه را در پی داشته است (۲۱).

شفارد و همکارانش در سال ۲۰۱۳ سرطان کلیه را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که وقتی علائم اضافی وجود داشته باشد، خطر افزایش می‌یابد. به عنوان مثال اگر در کنار ابتلا به سرطان مثانه، سرطان کلیه قرار بگیرد، این خطر بسیار افزایش می‌یابد (۲۲). گلیسون و همکارانش در سال ۲۰۱۶ در مورد تاثیر استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متیسیلین در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین می‌تواند تاثیر قابل توجهی در بیماران پیشرفته سرطان و خانواده آنها داشته باشد (۲۳).

گلوریا و همکارانش با مطالعه بر روی بیان ژن‌های کد کننده انتروتوکسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین جدا شده از بیماران همودیالیزی به این نتیجه رسیدند که به احتمال زیاد ژن‌های *Seg*, *Seh*, *Sei*, *Eta*, *Etb* و توکسین‌های *Hia* ممکن است نقش مهمی در عفونت‌ها داشته باشد. در نظر گرفتن این سموم در توسعه‌ی یک واکسن یا به عنوان یک هدف برای درمان آنتی‌بادی منوکلونال می‌تواند یک راهبرد درمانی عفونت‌های مرتبط در بیماران همودیالیز باشد (۲۴).

### نتیجه گیری

در این تحقیق طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که بیان ژن سم انتروتوکسین *H* در سلول‌های سرطان کلیه سبب کاهش بیان ژن آنتی‌آپوپتوزی *BCL-2* و افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوزی *BAX* و *BAK* می‌شود که در نهایت منجر به القای آپوپتوز و حذف توده‌ی توموری می‌شود که در نهایت می‌توان با استفاده از آن راه حل‌هایی برای درمان سرطان کلیه ارائه داد.

### تقدیر و تشکر

محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌نمایند.

### References:

1. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health National Cancer Institute, What is cancer? -NCBI of Health National.2023
2. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health National Cancer Institute, Kidney (Renal Cell) Cancer—Patient Version-NCBI.2023
3. Dragan Trivanović,<sup>1,2</sup> Krešimir Pavelić,<sup>2</sup> and Željka Peršurić<sup>3</sup>, Fighting Cancer with Bacteria and Their Toxins, FDA
4. Torre L, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Tiewent J, et al. Global cancer statistics : CA Cancer J Clin. 2015; 65(2): 87-108.
5. Suzan Colon, Britannica Staphylococcus aureus | Characteristics, Infections and...,2024
6. Pinchuk I, Beswick E, Reyes V. Staphylococcal enterotoxins. Toxins (Basel). 2010; 2(8): 2177-97. Nori m , Fazelati h, tabrezi m. Cancer metastasis, genetic and microenvironmental factors of secondary tissue : Tehran University of Medical Sciences. 2013 ; 7(11):671-673.
7. Khorramizadeh M, Saberi A, Tahmasebi M, Shokrani P, Amouhedari A, et al. Impact of Prolonged Fraction Delivery Time Modelling Stereotactic Body Radiation Therapy with High Dose Hypofractionation on the Killing of Cultured ACHN Renal Cell. J Biomed Phys Eng. 2017 Sep; 7(3): 205–216.
8. Pengcheng S, Ziqi W, Luyao Y, Xiangwei Z, Liang L, et al. MicroRNA-497 suppresses renal cell carcinoma by targeting VEGFR-2 in ACHN cells. Biosci Rep. 2017 Jun 30; 37(3).

9. Yaghoobi H, Bandhepour M, Kazemi B. Application of bacteria in cancer therapy. *NCMBJ*. 2016; 6 (24) :97-100.
10. Marston W , Laura S. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol*. 2010 ; 7(5): 277–285.
11. Alfredo D, Matthew A, Sanjaya Swai, Murugesan M. The role of epigenetics in kidney malignancies. *Cent European J Urol*. 2015; 68(2): 157–164.
12. Ayati M , Nikoofar P. Guide for treatment of renal cell carcinoma. *Tehran University of Medical Sciences*. 2010 ; 25(1).
13. Alkhateeb S, Alkhateeb JM, Alrashidi EA. Increasing trends in kidney cancer over the last 2 decades in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2015; 36(6):698-703.
14. Sultan S, Jawaher M, Eman A. Increasing trends in kidney cancer over the last 2 decades in Saudi Arabia. *Saudi med j*. 2015; 36(6): 698–703.
15. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10(3): 505-20.
16. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. *Staphylococcal enterotoxins*. *Toxins (Basel)*. 2010; 2(8): 2177-97.
17. Li J, Weir HK, Jim MA, King SM, Wilson R, et al. Kidney cancer incidence and mortality among American Indians and Alaska Natives in the United States, 1990-2009. *Am J Public Health*. 2014; 104(3) :396-403.
18. Pournamdar, Z Mirzaei M, Salehiniya H. Epidemiology and Trends in Incidence of Kidney Cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(14): 61-8.
19. Saadate M, Barate B, Shiraze M. Detection of sea, sec and seq genes in *Staphylococcus aureus* nasal sampling acquiring from healthy carrier. *Iran South Med J*. 2009 ;12(1):16-21.
20. Salare-sharif A, Satare M, Moradi M, Shahrokhade R. Detection of enterotoxin A and B genes of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens referring to the medical centers of Kerman and Rafsanjan by molecular method. *J Rafsanjan Uni Med Sci*. 2012; 11:(1): 128-33.
21. Yang Y, Xie L, Zheng JL, Tan YT, Zhang W, et al . Incidence trends of urinary bladder and kidney cancers in urban Shanghai, 1973-2005. *PLoS One*. 2013; 8(12): e82430.
22. Shephard E, Neal R, Rose P, Walter F, Hamilton WT. Clinical features of kidney cancer in primary care: a case-control study using primary care records. *Br J Gen Pract*. 2013; 63(609): e250-5.
23. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Vaca-Paniagua F, Rodríguez-Moctezuma JR, Vaca S. Expression of enterotoxin-coding genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Mexican haemodialysis patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014; 13:55-62.
24. Gleeson A ,Larkin P ,O'Sullivan N. The impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on patients with advanced cancer and their family members: A qualitative study. *Palliat Med*. 2016; 30(4):382-91.

سخنرانی

## کنترل رشد سلول های رده سرطان پستان در موش های مبتلا به سرطان پستان تجربی بوسیله ملیتین

زینب عبدالهی<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. استاد ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان یکی از مهم ترین عوامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. سرطان پستان شایع ترین سرطان در جهان می باشد و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان خانم ها است که سالیانه ۱ میلیون مورد جدید از این بیماری تشخیص داده می شود. ملیتین القاء کننده قوی آپوپتوز و دارای اثرات ضدسرطانی قابل توجهی می باشد. هدف از این تحقیق بررسی نقش سازواره ژنی حامل ژن کد کننده ملیتین بر رشد سلول های سرطانی MC4-L2 در موش های مبتلا به سرطان پستان تجربی بود. **مواد و روش:** پلاسمید pcDNA3.1(+)-Melittin کد کننده Melittin، تهیه شد. سپس به منظور تکثیر، با روش شوک حرارتی و کلسیم کلراید وارد باکتری شد و استخراج پلاسمید انجام گرفت. رده سلولی سرطان پستان MC4-L2 پس از کشت و شمارش سلولی، به صورت زیر جلدی به عضله ران بیست و چهار موش BALB/c تزریق شد. ۱۴ روز پس از تزریق، تومور در ناحیه تزریق شده قابل لمس بود. بعد از ۴۹ روز استخراج RNA و سنتز cDNA انجام گرفت. سپس اندازه گیری سطح بیان نسبی ژن های *Bcl2*، *Bax* و *IL-6* به روش real-time PCR سنجیده شد. برای بررسی در گروه های متفاوت از تست ANOVA و آنالیز واریانس متعاقب Tukey's post hoc test استفاده شد (سطح معناداری  $p < 0.05$ ).

**یافته ها:** یافته های این مطالعه نشان داد که وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+)-Melittin در موش های BALB/c سرطانی شده با رده سلولی MC4-L2 سبب مهار رشد سلول های سرطان پستانی شد. این عمل از طریق کنترل ژن های تنظیم کننده چرخه سلولی و افزایش بیان ژن های آپوپتوز اولیه و *BAX* و کاهش بیان *BCL-2* انجام شد. همچنین موش های BALB/c تحت تیمار با ملیتین، توان بالقوه در تحریک سیستم ایمنی با افزایش بیان ژن های سیتوکین مانند *IL6* شده است. **نتیجه گیری:** ملیتین با کاهش طول عمر سلول های سرطان پستان می تواند سلول های سرطانی را مهار می کند. این ماده همچنین اندازه تومور را کاهش داده و رشد تومور در درون بدن موجود زنده را محدود می کند. مطابق شواهد حاصل، ملیتین می تواند به عنوان یک ماده ضد سرطان عمل کند.

**واژگان کلیدی:** *Melittin*، MC4-L2، آپوپتوز، *BAX*، *BCL-2*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰

پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

## Control of the growth of breast cancer cells in mice with experimental breast cancer by *Melittin*

Zaynab Abdolahi<sup>1</sup>, Abbas Doosti<sup>2\*</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Professor in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background and objective:** Cancer is one of the most important causes of death worldwide. Breast cancer is the most common cancer in the world and it is the second leading cause of cancer deaths among women, with 1 million new cases diagnosed annually. Melittin is a strong inducer of apoptosis and has significant anticancer safety. The purpose of this research was to investigate the role of Melittin coding gene structure on the growth of MC4-L2 cancer cells in mice with experimental breast cancer.

**Materials and methods:** The plasmid pcDNA3.1(+)-*Melittin* encoding Melittin was prepared. Then, in order to multiply, it was introduced into the bacteria by thermal shock and calcium chloride method, and plasmid extraction was done. MC4-L2 breast cancer cell line was injected subcutaneously into the thigh muscle of twenty-four BALB/c mice after culture and cell counting. 14 days after injection, the tumor was palpable in the injected area. After 49 days, RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Then, the relative expression level of Bcl2, Bax and IL-6 genes was measured by real-time PCR method. ANOVA test and Tukey's post hoc test were used to investigate different groups (significance level  $p < 0.05$ ).

**Results:** The findings of this study showed that pcDNA3.1(+)-*Melittin* recombinant vector inhibited the growth of breast cancer cells in BALB/c mice with MC4-L2 cell line. This operation was done by controlling cell cycle regulatory genes and increasing the expression of early apoptosis genes and *BAX* and decreasing the expression of *BCL-2*. Also, BALB/c mice treated with Melittin have the potential to stimulate the immune system by increasing the expression of cytokine genes such as *IL6*.

**Conclusion:** Melittin can inhibit cancer cells by reducing the lifespan of breast cancer cells. This substance also reduces the size of the tumor and limits the growth of the tumor inside the living organism. According to the evidence, Melittin can act as an anti-cancer agent.

**Keywords:** Melittin, MC4-L2, apoptosis, *BAX*, *BCL-2*

### مقدمه

سرطان بیماری است که ارتباطات بین سلولی را مختل می‌کند و ممکن است علل ژنتیکی یا محیطی داشته باشد. در نتیجه این اختلالات سلول‌ها به شکل غیر قابل کنترلی رشد نموده و بسیار خطرناک می‌شوند زیرا توانایی حمله به بافت‌های مجاور را دارا بوده و همچنین می‌توانند از طریق لنف و خون به نقاط دیگری از بدن انتقال پیدا کرده و در آنجا نیز سبب بروز مشکل شوند (۱). تقسیم سلولی به شدت توسط چندین مکانیسم کنترل چرخه سلولی حفظ شده از نظر تکاملی تنظیم می‌شود تا از تولید دو سلول ژنتیکی یکسان اطمینان حاصل شود. پست‌های بازرسی چرخه سلولی به عنوان مکانیسم‌های نظارتی DNA عمل می‌کنند که از تجمع و انتشار خطاهای ژنتیکی در طول تقسیم سلولی جلوگیری می‌کند. نقاط بازرسی می‌توانند پیشرفت چرخه سلولی را به تاخیر بیندازند یا در پاسخ به آسیب غیرقابل جبران DNA، خروج چرخه سلولی یا مرگ سلولی را القا کنند (۲).

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ و میر فراوانی می‌شود و علیرغم پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته است کماکان در صدر علل مرگ به علت سرطان در بین زنان است (۳). سرطان سینه بر اساس تقسیم بندی هیستوپاتولوژی به دو دسته تقسیم می‌شود. در نوع سرطان سینه مهاجم اگر سرطان در بافت‌های نرمال رشد کند، قادر است از طریق خون یا سیستم لنفی به بافت‌های دیگر منتقل شود. وقتی انتقال صورت گرفت به آن سرطان سینه متاستاتیک می‌گویند. و سرطان سینه غیرمهاجم که در این نوع سرطان، سلول‌های سرطانی فقط در داخل داکت‌ها



و یا لوبول‌ها باقی می‌ماند و در بافت‌های نرمال درون سینه و یا پشت آن رشد نمی‌کند. سرطان سینه غیرمهاجم همچنین با نام‌های Pre-cancers و یا *in situ* نیز شناسایی می‌شود. به صورتی که هر دسته شامل دو گروه داکتال یا لوبولار است (۴). MC4-L2 یک رده سلولی سرطان پستان است و از ساب کلونینگ رده سلولی MC4-L1 که از تومور موشی وابسته به پروژسترون CC4-HD به دست آمده است. این رده سلولی می‌تواند استروژن و پروژسترون ترشح کند. در موش‌های ۴ BALB/c تا ۸ هفته‌ای، ۳ هفته پس از تزریق زیرجلدی MC4-L2، تومور ظاهر می‌شود. پس از گذشت ۲ ماه از تزریق MC4-L2، اندازه تومور افزایش یافته و پس از ۳ ماه متاستاز شروع می‌شود (۵).

درمان‌های مرسوم در مبارزه با سرطان سینه، مانند شیمی‌درمانی، با توجه به اثربخشی آن‌ها به چالش کشیده شده‌اند. بنابراین، استراتژی‌های درمان سرطان پستان برای دستیابی به نتیجه بهتر بیمار باید به طور مداوم اصلاح شود. ما می‌دانیم که تعدادی از باکتری‌ها بیماری‌زا هستند و برخی حتی با رشد تومور مرتبط هستند، با این حال، مطالعات اخیر نتایج جالبی را نشان داده‌اند که نشان می‌دهد برخی از باکتری‌ها ممکن است پتانسیل درمان سرطان را داشته باشند. بنابراین نقش درمانی باکتری‌ها در مطالعات پزشکی و دارویی مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، مهندسی ژنتیک در درمان باکتریایی استفاده شده است و ممکن است منجر به اثربخشی بیشتر با عوارض جانبی کم شود. باکتری‌ها و فرآورده‌های آن‌ها از جمله پپتیدهای باکتریایی، باکتریوسین‌ها و سموم در درمان سرطان سینه است نقش موثری دارند (۶).

ملیتین ماده اصلی تشکیل دهنده سم زنبور عسل اروپایی *Apis mellifera* است. ملیتین تترامر در غلظت‌های موجود در کیسه زهر زنبور عسل غالب است، اما تغییر در غلظت پپتید و قدرت یونی منجر به تفکیک تترامر به مونومر می‌شود. ملیتین با غشای سلولی تعامل دارد و باعث ایجاد منافذ در غلظت‌های میکرومولار می‌شود و در نتیجه عملکرد غشاء را مختل کرده و لیز سلولی را آغاز می‌کند. علیرغم برخی نگرانی‌ها در مورد خواص سیتوتوکسیک ملیتین، شواهد زیادی در مورد ارزش درمانی آن وجود دارد. خواص ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد میکروبی، ضد بیوفیلیم و کمکی ملیتین نشان داده شده است (۷). اثرات سیتولیتیک ملیتین غیرانتخابی است و بر انتقال سیگنال و مسیرهای تنظیمی تأثیر می‌گذارد. به این ترتیب، ملیتین مکانیسم‌های مرگ سلولی متعددی از جمله آپوپتوز، مهار تکثیر و رگزایی، توقف چرخه سلولی، و مهار تحرک، مهاجرت، متاستاز و تهاجم سرطان را القا می‌کند. در درمان سرطان، فعالیت ملیتین بر روی انواع مختلف سلول در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است (۸). هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات سازواره نو ترکیب کد کننده پپتید ملیتین بر رشد سلول‌های سرطانی و همچنین فاکتورهای موثر در رگزایی تومور در سرطان پستان القاء شده به واسطه رده سلولی MC4-L2 می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

**سلول مورد استفاده:** رده سلولی MC4-L2 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. رده سلول‌های MC4-L2 در محیط RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS)، پنی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. بعد از آن سلول‌ها در انکوباتور با دی‌اکسید کربن ۵ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰ درصد قرار داده شد و در پایان برای نگهداری طولانی مدت سلول‌های MC4-L2 در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد در کرایوتیوب‌های مخصوص نگهداری شدند. برای کشت در ابتدا کرایوتیوب حاوی سلول از تانک نیتروژن خارج شد. کرایوتیوب داخل بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یا در دست نگه‌داشته شد تا دو سوم محتویات یخ‌زده آن به تدریج باز شد. سپس مواد و سلول‌های درون کرایوتیوب در شرایط کاملاً استریل و زیر هود بیولوژی کلاس ۲، به داخل یک فالكون ۱۵ میلی‌لیتری که حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI به همراه ۱۰ درصد FBS بود ریخته شد. رسوب‌گیری سلول‌ها با انجام سانتریفیوژ با شرایط 1200 rpm به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت و در نهایت محلول رویی دور ریخته شد. در مرحله بعد رسوب سلول‌ها در ۴ تا ۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل RPMI حل شدند. سوسپانسیون سلولی حاصل به فلاسک T25 منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

شد. بعد از یک شب وضعیت سلول‌ها به لحاظ رشد و آلودگی در زیر میکروسکوپ بررسی شدند و محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS تعویض شد.

**وکتورها:** در این مطالعه ابتدا پلاسمید نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Melittin* حامل ژن کد کننده *Melittin* طراحی گردید و ژن سنتز شده به صورت کلون شده در وکتور *pcDNA3.1(+)* از شرکت چینی با کلون ID V25435 خریداری گردید. پلاسمید *pcDNA3.1* بدون درج هیچ ژنی، به عنوان پلاسمید کنترل در نظر گرفته شد.

**ترانسفورماسیون:** برای ترانسفورم کردن با استفاده از شوک حرارتی در غشا حفره ایجاد شد و سپس از پلاسمید مورد نظر *pcDNA3.1(+)-Melittin* به مقدار ۵ میکرولیتر با ۱۰۰ میکرولیتر از سلول مستعد مخلوط شد و روی یخ به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه قرار گرفت و بدون ضربه خوردن و آهسته از ظرف آب و یخ خارج گردید و در هیتر حدوداً ۹۰ ثانیه قرار گرفت. سپس مجدد در درون ظرف آب و یخ قرار گرفت که همین باعث پاره شدن غشاء و ورود وکتور به سلول باکتریایی می‌شود. برای تثبیت پلاسمید در باکتری و ترمیم غشاء پاره شده به مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع اضافه شد و در درون انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت، تا به طور کامل غشاء ترمیم گردد. و از آن روی محیط کشت آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین به صورت کشت پهن در کنار شعله و شرایط استریل کشت داده شد. بر روی پلیت تاریخ زده شد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۱۸ ساعت به علت مقاوم بودن وکتور ما به آمپی سیلین تک کلونی‌هایی بر روی پلیت مشاهده گردید که به احتمال زیاد وکتور را دریافت کردند. چراکه خود باکتری‌های سویه موردنظر توانایی رشد روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین را ندارند.

**استخراج پلاسمید:** برای استخراج پلاسمید از کیت *favorgen* ساخت کشور تایوان استفاده شد. ابتدا برای آماده‌سازی کیت همه پودر *RNase* در دمای ۲۰- سانتی گراد نگهداری و به مقدار ۰/۵ میلی لیتر از بافر *FAPD1* به تیوپ *RNaseA* اضافه شد و پس از انجام ورتکس و مخلوط شدن کامل، به درون بطری *FAPD1* اضافه گردید و بافر در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای استخراج پلاسمید نوترکیب از سلول *E. coli* محیط کشت دارای باکتری در تیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری وارد شد و سانتریفیوژ در شرایط ۱۲۰۰۰ rpm انجام شد تا میزان رسوب به حداکثر برسد. برای استخراج پلاسمید از کیت مخصوص استخراج پلاسمید نوترکیب با عنوان *favorgen* استفاده شد. برای صحت استخراج پلاسمید هضم آنزیمی با کمک آنزیم‌های موجود بر اساس نقشه وکتور نوترکیب توسط شرکت سازنده وکتور انجام شد.

**گروه‌بندی موش‌ها:** طبق مطالعات معتبر در کارهای حیوانی معمولاً حیوانات به گروه‌های ده‌تایی تقسیم بندی شدند. لذا در مطالعه حاضر به منظور تعیین جامعه آماری تعداد گروه‌های تیمار جهت انجام واکسیناسیون، موش‌ها به صورت تصادفی به ۳ گروه ۱۰ تایی و هر گروه به ۲ زیر گروه چالش و غیرچالش تقسیم شد. در این پژوهش برای انتخاب تعداد موش‌ها و تعداد تجویزها و ایجاد یک *pilot* و به منظور تعیین تعداد گروه‌ها از فرمول شارل کوکران استفاده شد.

تعداد بیست و چهار عدد موش ماده *BALB/c* از مرکز نگهداری و تکثیر حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد تهیه شد. و در قفس‌های استاندارد و تحت دمای استاندارد ( $22 \pm 2^\circ C$ )، رطوبت (۵۰-۵۵٪) و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. در این مطالعه موش‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شد:

- ۱- موش‌های سرطانی درمان شده با PBS فاقد وکتور *Melittin*
- ۲- موش‌های سرطانی درمان شده با سازواره ژنتیکی *pcDNA3.1(+)-Melittin*
- ۳- موش غیر سرطانی دریافت کننده سازواره ژنتیکی *pcDNA3.1(+)-Melittin*
- ۴- موش‌های سالم غیر سرطانی

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

**مقادیر و برنامه تزریق واکسن ژنی:** روزهای ۰، ۷، ۱۵ تزریق در عضله چهارسر ران موش BALB/c انجام شد (برای هر سه گروه ذکر شده). به این صورت که روز ۰ اولین روز تزریق در نظر گرفته شد. پس از اولین مرحله تزریق، ۷ روز بعد، مرحله دوم تزریق انجام گرفت، ۱۵ روز بعد از مرحله اول، تزریق انجام گردید.

**میزان تزریق:** مقدار ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمید، در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS، به عضله چهار سر ران پای راست موش ها، طبق برنامه تزریقی ذکر شده تزریق شد.

**نمونه‌های مورد نیاز از هر موش:** خون کامل همراه ماده ضد انعقاد EDTA (۱/۵ میلی لیتر)، این نمونه بلافاصله به فریزر ۷۰- منتقل شد. بافت محل تزریق واکسن با استفاده از لوله‌های موئینه استریل از قلب هر موش انجام گرفت و بلافاصله به فریزر ۷۰- منتقل شد.

**استخراج RNA:** مراحل استخراج در شرایط عاری از RNase صورت گرفت (زیر هود) و از وسایل عاری از نوکلئاز استفاده شد. نمونه خون اول بافی کوت با سه بار شستشوی خون کامل با آب مقطر جداسازی شد. سپس یک میلی لیتر از محلول وایتیزول روی یخ به نمونه در میکروتیوب ۲ میلی لیتری اضافه شد. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. میکروتیوب برای ۱۵ ثانیه با تکان دادن شدید مخلوط شد. سپس 1200 rpm دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. تا سه فاز تشکیل شود. فاز مایع رویی به یک تیوب ۱/۵ میلی لیتر عاری از RNase منتقل شد به طوری که فاز میانی به هم نریزد و به همان حجم ایزوپروپانول اضافه شد. ۳۰ دقیقه تا یک ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد. به منظور رسوب دهی مخلوط در ۱۲۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. برای جدا کردن رسوب، مایع رویی را دور ریخته و ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه شد، ورتکس کوتاه شد. برای خالص سازی RNA در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۸ دقیقه و ۷۵۰۰ دور سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و اجازه داده شد تا رسوب حاصل در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه تا ۱ ساعت خشک شود. سپس رسوب در ۳۰ میکرولیتر DEPC water حل شد.

**سنتر cdNA:** به منظور تولید cdNA از کیت سنتر cdNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) استفاده گردید. نمونه RNA تخلیص شده از مرحله قبل حدود ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر تشخیص داده شد و طبق پروتکل کیت میزان ۵ میکرولیتر از نمونه جهت حصول ۵۰۰ نانوگرم از نمونه به میکروتیوب ۰/۵ میلی لیتری اضافه شد. سپس ۱ میکرولیتر از پرایمر هگزامر تصادفی و ۱ میکرولیتر از پرایمر الیگو (dT) به درون یک میکروتیوب منتقل شدند و با آب دی اتیل پیرو کربنات (DEPC) به حجم ۱۳/۴ میکرولیتر رسانده شد سپس به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر تحت دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، پس از گذراندن مرحله قبل، میکروتیوب بلافاصله بر روی یخ قرار گرفت، سپس به میکروتیوب مورد نظر مقدارهای ۴ میکرولیتر بافر 5X، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۰/۵ میکرولیتر مهار کننده آنزیم RNase و ۱ میکرولیتر M-MLV اضافه شدند، پس از مخلوط کردن محتویات داخل میکروتیوب، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد، پس از اتمام این مراحل cdNA مورد نظر ساخته شده است و می‌توان از آن استفاده کرد. جهت نگهداری کوتاه مدت می‌توان میکروتیوب حاوی cdNA ساخته شده را در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد و برای نگهداری در مدت زمان طولانی‌تر می‌توان آن را در فریزر ۷۰- سانتی‌گراد قرار داد.

**PCR:** برای اطمینان از کیفیت cdNA ساخته شده، یک واکنش PCR برای ژن خانه‌دار GAPDH انجام شد مواد و مقادیر لازم برای انجام PCR در جدول آورده شده است. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل ۱ درصد آگارز بررسی شدند. به همین منظور مواد ۰/۵ میکرولیتر پرایمر F (۵ pmol/μL)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر R (۵ pmol/μL)، ۱/۵ میکرولیتر cdNA (۵ ng/μL)، ۲۵، ۶/۵ میکرولیتر PCR Master Mix و ۵ میکرولیتر آب تزریق با حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر مخلوط شدند. در آخر پس از اضافه کردن حجم‌های مورد نظر در داخل میکروتیوب ۰/۲ با برنامه دمایی ۱ سیکل (۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه)، ۳۲ سیکل

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

(۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ ثانیه) و ۱ سیکل (۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه) در دستگاه PCR قرار داده شد. پس از آن محصول PCR با ژل ۱٪ آگارز الکتروفورز شد. **Real time RT-PCR**: واکنش Real time RT-PCR بر روی RNAهای استخراج شده از buffy coat خون موش‌های واکسینه شده و همچنین بافت محل تزریق به طور جداگانه، درون دستگاه Real Rotor Gene 6000 انجام شد. مقایسه بررسی سطح بیان ژن‌های (*IL-6* و *Bax*, *BCL-2*) در نمونه‌های خون پس از نرمال‌سازی با ژن مرجع (*GAPDH*) با توجه به روش Livak صورت پذیرفت. میزان سطح بیان ژن‌های *Bcl2*, *Bax* و *IL-6* در هر سه دسته موش‌های گروهی که وکتور مورد نظر تزریق شده بود در مقایسه با موش‌های دریافت کننده وکتور خالی به عنوان شاهد و همچنین موش‌های سالم تیمار شده با PBS از نظر آماری بررسی شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

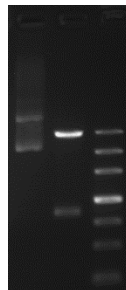
Gene	Primer sequence	Anneling Temperatur	Size bp
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH-F</i> : 5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3' <i>GAPDH-R</i> : 5'-GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC-3'	64	183
<i>Bax</i>	<i>Bax-F</i> : 5'-AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC-3' <i>Bax-R</i> : 5'-GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG-3'	65	234
<i>BCL-2</i>	<i>BCL-2-F</i> : 5'-GTGGATGACTGAGTACCT-3' <i>BCL-2-R</i> : 5'-CCAGGAGAAATCAAACAGAG-3'	64	118
<i>IL-6</i>	<i>IL-6-F</i> : 5'-CTTGGGACTGATGCTGGTGAC-3' <i>IL-6-R</i> : 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'	61	162
<i>Melittin</i>	<i>Melittin-F</i> : 5'-ATGGGAATTGGAGCTGTGC-3' <i>Melittin-R</i> : 5'-CTGCTGTCTCTTCTCTTGATC-3'	57	53

**آنالیز آماری:** به منظور مطالعه آماری میزان تغییرات بیان ژن‌ها بعد از تزریق واکسن ژنی، به موش‌های سرطانی شده توسط سلول‌های سرطانی و موش‌های کنترل ارتباط بین گروه‌ها با کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ (Inc., Chicago, IL, USA) و آزمون آماری One-way ANOVA به همراه آزمون تعقیبی توکی (Tukey's Post Hoc Test) بررسی شد. تفاوت معنی‌دار بین پارامترها در سطح  $p \leq 0.05$  مورد قبول قرار گرفت.

#### یافته‌ها

**نتایج ترانسفورم وکتورها در باکتری:** به منظور تکثیر وکتور pcDNA3.1(+) حاوی ژن *Melittin* به باکتری *E. coli* Top10 ترانسفورم شد. باکتری‌های واجد pcDNA3.1(+)-*Melittin* در محیط جامد دارای آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. از تک کلونی‌های حاصل ماتریکس تهیه شد.

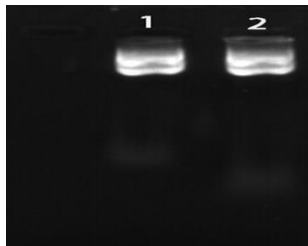
**تأیید صحت ترانسفورماسیون:** نتایج تأیید مراحل کلونینگ و ورود DNA نو ترکیب به درون پلاسمید و تست‌های تأییدی هم‌آنزیمی و توالی‌یابی با روش Sanger Sequencing توسط شرکت Genaray انجام شد.



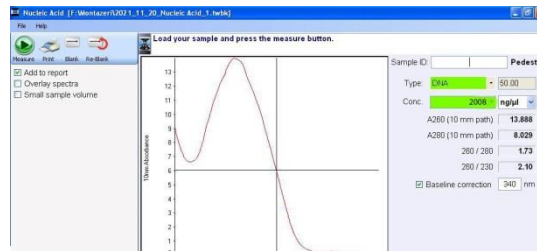
شکل ۱- هم‌آنزیمی با دو آنزیم BamHI/EcoRV توسط شرکت سازنده وکتور انجام شد.

**نتایج ترانسفورم وکتورها در باکتری:** از وکتور pcDNA3.1 حاوی ژن در این مطالعه استفاده شد. به منظور تکثیر و تأیید وجود ژن در وکتور، به باکتری *E. coli* Top10 ترانسفورم شد. باکتری‌های واجد pcDNA3.1(+)-*Melittin* در محیط جامد

دارای آنتی بیوتیک کشت داده شدند. از تک کلونی‌های حاصل ماتریکس تهیه شد. ذخیره سازی در گلیسرول نیز انجام شد. برای باکتری‌های ترانسفورم شده یک گروه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. گروه کنترل باکتری ترانسفورم نشده در محیط کشت جامد دارای آنتی بیوتیک بود. عدم رشد گروه کنترل دلیلی بر حضور وکتور در باکتری گروه‌های تیمار است که مقاومت به آنتی بیوتیک را به باکتری داده است. از تک کلونی‌های حامل وکتورها به طور مجزا ماتریکس تهیه شد. پس از ترانسفورم کردن پلاسمید باکتری نوترکیب و ماتریکس آن به منظور استخراج پلاسمید است. هر باکتری حاوی وکتور خاص خود به منظور تکثیر و افزایش غلظت پلاسمید درونش، به طور جداگانه در محیط کشت LB براث واجد آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد. سپس با دستورالعمل عنوان شده، باکتری‌ها تخریب و پلاسمیدها درون آن‌ها استخراج گردید. کمیت DNA پلاسمید استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ تایید شد (شکل ۲). الکتروفورز روی ژل آگارز نیز تایید کرد که DNA پلاسمیدی به خوبی استخراج شده است (شکل ۳).

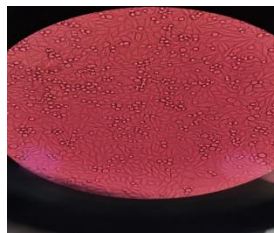


حاوی ژن pcDNA3.1(+)- الکتروفورز پلاسمید



نتایج اسپکتروفتومتری برای وکتور

دارای ژن میلیتین در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ به *Melittin* ۲۳۰ نانومتر بین ۱/۷ تا ۲/۰۷ نشان از خلوص بالای پلاسمید و آلوده نبودن را نشان آن دارد غلظت پلاسمید استخراج شده ۲۰۰۸ نانوگرم بر میکرو لیتر بوده



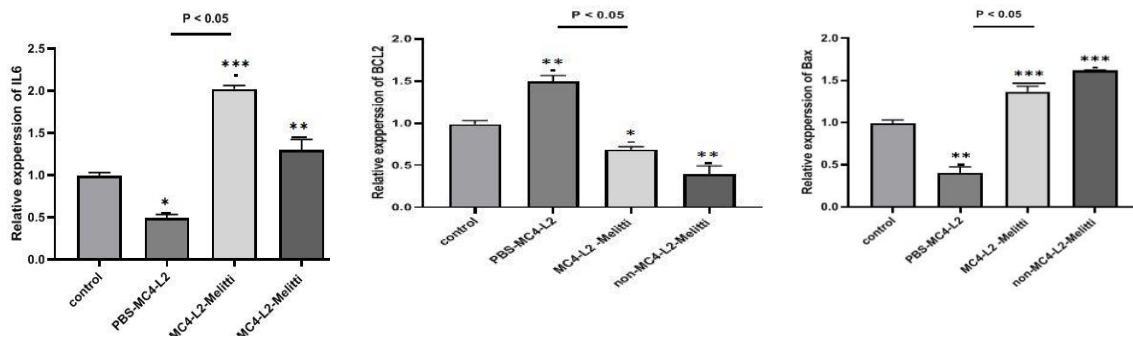
شکل ۴- عکس سلول‌های کشت شده

نتایج بررسی بیان ژن‌های هدف در بافت محل تزریق: بعد از جداسازی بافت توسط تیغ اسکالپل از محل تزریق موش‌های BALB/c در همه گروه‌ها، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. سپس RT-PCR کیفی برای تأیید بیان ژن *Melittin* در بافت عضله چهار سر ران حیوان استفاده شد. در مرحله بعد محصولات PCR الکتروفورز شد باندهای حاصل با طول‌های ۹۶ در موش‌هایی که وکتور نوترکیب *Melittin*-pcDNA3.1(+)- را دریافت کرده بودن دیده شد که نشان از بیان ژن *Melittin* در این بافت‌ها بود.

نتایج Real-time RT-PCR: دستگاه Real time PCR با خاصیت فلورسنسی سایبر گرین (SYBR Green) برای هر نمونه یک گراف یا منحنی تکثیر ترسیم می‌کند که هر نقطه از این گراف نشان دهنده میزان اتصال سایبرگرین به رشته DNA می‌باشد حد آستانه، این میزان نشان دهنده میزان DNA بیان شده در هر نمونه می‌باشد. منحنی‌های ذوب جهت اعتبار بخشی محصول منفرد پرایمر آنالیز شد. از جمله مزایای Real time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR انجام

می‌شود. دمای ذوب DNA یک پارامتر ویژه می‌باشد و به ساختمان DNA و عواملی نظیر طول و تعداد نوکلئوتید، درصد GC بستگی دارد. از آنجایی که SYBR Green نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل باشد می‌توان با استفاده از منحنی ذوب تنوع محصولات را در فرآیند PCR مشخص کرد

بیان ژن‌ها با استفاده از روش real time PCR اندازه‌گیری شد CT برای هر نمونه به صورت جداگانه توسط دستگاه گزارش شد. برای محاسبه  $\Delta CT$  ابتدا برای هر ژن به‌طور جداگانه ((ژن -) CT ( *GAPDH* ) ژن موردنظر [CT] محاسبه شد. سپس  $\Delta\Delta CT$  فرمول ( [ سلول شاهد ( $\Delta CT$ ) - سلول تیمار ( $\Delta CT$ ) ] محاسبه شد و به روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  نمودارها رسم گردید. طبق گروه بندی موش‌های BALB/c در موش‌ها با رده سلولی MC4-L2 سرطان سینه ایجاد شد. پس از واکنش‌های پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)-*Melittin* مورد درمان قرار گرفتند نتایج زیر حاصل بررسی بیان ژن‌ها در گروه‌های مختلف سرطانی شده و غیر سرطانی است.



افزایش *BAX* و *IL6* نمودار نشان می‌دهد که بیان ژن‌های *IL6*، *BAX* و *BCL-2* شکل ۵- نمودار آنالیز آماری برای ژن‌های کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است. *BCL-2* معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است. همچنین بیان ژن

## بحث

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ و میر فراوانی می‌شود و علیرغم پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته است کماکان در صدر علل مرگ به علت سرطان در بین زنان است (۳). در این مطالعه تجربی که در ارتباط با رده سلولی MC4-L2 صورت گرفت پلاسمید نوترکیب pcDNA.31(+)-*Melittin* حاوی ژن ملیتین به روش شوک حرارتی وارد باکتری *E.coli* سویه TOP10 شد. سپس موش‌های مورد آزمایش در این تحقیق به چهار گروه موش‌های سرطانی درمان شده با PBS فاقد وکتور *Melittin*، موش‌های سرطانی درمان شده با سازواره ژنتیکی pcDNA3.1(+)-*Melittin*، موش غیر سرطانی دریافت کننده سازواره ژنتیکی pcDNA3.1(+)-*Melittin* و موش‌های سالم غیر سرطانی تقسیم شدند. رده سلولی MC4-L2 پس از کشت و شمارش به عضله ران موش‌ها تزریق شد. ۱۴ روز پس از تزریق تومور در قسمت تزریق شده قابل مشاهده بود. استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. سپس اندازه‌گیری سطح بیان ژن به روش real time PCR صورت گرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بیان ژن‌های *IL-6* و *BAX* افزایش معنی‌دار و بیان ژن *BCL-2* کاهش بیان معناداری نسبت به گروه شاهد داشته است.

پژوهش‌هایی که همسو با تحقیقات ما بوده و صحت نتایج کار ما را تایید می‌کند:

در سال ۲۰۱۱ Park و همکاران به بررسی خواص ضد سرطانی ملیتین در سرطان پروستات پرداختند. شواهد این مطالعه حاکی از آن است که زهر زنبور عسل و ملیتین رشد سلول‌های سرطانی را از طریق القای مرگ سلولی آپوپتوتیک در سلول‌های سرطان

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

پرورسات انسانی LNCaP، DU145 و PC-3 مهار کردند. این اثرات با سرکوب فاکتور رونوشت برداری NF-kB واسطه شد. زهر زنبور عسل و ملیتین باعث کاهش پروتئین‌های ضد آپوپتوز، اما القای پروتئین‌های پروآپوپتوتیک شدند (۹). Jo و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که زهر زنبور عسل و ملیتین رشد سلول‌های سرطان تخمدان SKOV3 و PA-1 را با القای مرگ سلولی آپوپتوز به روشی وابسته به دوز مهار کردند. مطابق با مرگ سلولی آپوپتوز، بیان گیرنده مرگ 3 (DR) و DR6 در هر دو سلول سرطانی افزایش یافت، اما بیان DR4 تنها در سلول‌های PA-1 افزایش یافت. مسیر STAT3 نیز در این سلول‌های سرطانی مهار شد (۱۰).

یافته‌های Chang و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نشان داد که ملیتین زنده ماندن رده‌های سلولی سرطان پستان T14 و MCF-7 را با غلظت متوسط ۵۰٪ مقدار بازدارنده (IC50) به ترتیب ۱/۷۰ و ۱/۵۱ میکرومولار مهار کرد. درمان با ملیتین منجر به کاهش کلونوژنسی با نسبت افزایش حساسیت ۱/۰۶ - ۱/۱۵ شد. ملیتین به علاوه تابش باعث افزایش قابل توجهی در نسبت Bax/Bcl-2 شد. مطالعه *in vivo* نشان داد که تزریق داخل صفاقی ملیتین به طور قابل توجهی رشد سرطان سینه را در موش‌های حامل تومور T14 کاهش داد. هنگام ارزیابی نتایج *in vivo*، گروه پرتودهی ملیتین به علاوه افزایش نرخ مهار رشد تومور (۹/۸۳) را در مقابل گروه بدون درمان (شاهد) نشان داد. علاوه بر این، گروه پرتودهی ملیتین به علاوه بیشترین تأثیر را بر مهار رشد تومور با طولانی‌ترین 28.3 RTV5 روز داشت. پرتودهی به تنهایی، ملیتین به تنهایی و گروه کنترل RTV5 را به ترتیب ۲۴.۸ روز، ۱۶.۲ روز و ۱۳.۶ روز نشان دادند (۱۱).

### نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که وکتور نوترکیب *Melittin*-pcDNA3.1(+) در موش‌های BALB/c سرطانی شده با رده سلول‌های MC4-L2 سبب مهار رشد سلول‌های سرطان پستانی از طریق کنترل ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی و افزایش بیان ژن‌های آپوپتوز اولیه BAX و کاهش بیان BCL-2 می‌شود. همچنین یافته‌ها نشان داد که وکتور نوترکیبی که در این مطالعه تهیه و استفاده شده است، به عنوان یک واکسن ژنی یا زیر واحدی از طریق بیان ژن *Melittin* در موش‌های BALB/c تحت تیمار با رده سلول‌های MC4-L2 توان بالقوه در تحریک سیستم ایمنی حیوان با افزایش بیان ژن‌های سیتوکین‌ها مانند *IL6* بوده. همچنین نتایج این پژوهش کمک شایانی به معرفی روش‌ها و رویکردهای جدید درمانی، به منظور جلوگیری از تکثیر و گسترش سلول‌ها و تومورهای سرطانی خواهد کرد و نیز در درمان این بدخیمی در آینده‌ای نزدیک، امیدوار کننده است.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد اعلام نمایند.

## References:

1. DeSantis CE, Ma J, Goding Sauer A, Newman LA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(6): 439-448.
2. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022; 23(1): 74-88.
3. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103(3): 250-263.
4. O'Leary R, Hawkins K, Beazley JC, Lansdown MR, Hanby AM. Agreement between preoperative core needle biopsy and postoperative invasive breast cancer histopathology is not dependent on the amount of clinical material obtained. *J Clin Pathol.* 2004; 57(2): 193-195.
5. Lanari C, Lüthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, et al. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res.* 2001; 61(1): 293-302.
6. Yaghoubi A, Khazaei M, Hasanian SM, Avan A, Cho WC, et al. Bacteriotherapy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(23): 5880.
7. Memariani H, Memariani M, Moravvej H, Shahidi-Dadras M. Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39(1): 5-17.
8. Mahmoodzadeh A, Zarrinnahad H, Bagheri KP, Moradia A, Shahbazzadeh D. First report on the isolation of melittin from Iranian honey bee venom and evaluation of its toxicity on gastric cancer AGS cells. *J Chin Med Assoc.* 2015; 78(10): 574-583.
9. Park MH, Choi MS, Kwak DH, Oh KW, Yoon DY, et al. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- $\kappa$ B. *The Prostate.* 2011; 71(8): 801-12.
10. Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and applied pharmacology.* 2012; 258(1): 72-81.
11. Chang SN, Kim HJ, Lee, KC. Melittin, a major polypeptide of bee venom, increases radiosensitivity of breast cancer in vitro and in vivo. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.* 2020; 108(3): e527.



## تأثیر همزمان ورزش مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر سطح ایمونوگلوبولین و نفوسیت خون در رت‌های دیابتی القاء شده با استرپتوزوتوسین

مهسا کاظمی رودسری<sup>۱</sup>، سید حسین خادم حسینی<sup>۲\*</sup>، حسین سازگار<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی میکروبی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه:** دیابت به عنوان یک بیماری پیشرونده، میتواند منجر به کاهش عملکرد دستگاه ایمنی شود. از اینرو؛ هدف پژوهش حاضر تعیین اثر همزمان ورزش مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر بیان ایمونوگلوبولین‌های (*IgG, IgM, IgA*) رت‌های دیابتی القاء شده با استرپتوزوتوسین بود.

**روش‌ها:** ۵۰ سر موش صحرایی (با سن ۶ هفته و میانگین وزنی  $20 \pm 20$  گرم)، به صورت تصادفی در گروه‌هایی شامل؛ دیابت+تزریق سلول‌های بنیادی+ورزش مقاومتی ( $n=10$ )، دیابت+ورزش مقاومتی ( $n=10$ )، دیابت+تزریق سلول بنیادی ( $n=10$ )، دیابتی کنترل ( $n=10$ ) و سالم پایه ( $n=10$ ) تقسیم شدند. جهت بررسی تغییرات ایمونوگلوبولین‌ها از روش وسترن real time PCR استفاده شد. همچنین، برای مقایسه بین و درون گروهی از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه استفاده شد و برای درک بهتر نتایج نیز، اندازه اثر و مقدار فاصله اطمینان ۹۵٪ آورده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد میران بیان *IgG* ( $P=0/045$ ) و *IgM* ( $P=0/017$ ) *IgA* ( $P=0/022$ ) بین گروه‌ها تغییرات معنی‌داری داشت. همچنین، اختلاف معنی‌داری در هر سه متغیر بین گروه دیابت کنترل و گروه دیابت+ورزش مقاومتی+تزریق وجود داشت ( $p \geq 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با جمع‌بندی نتایج تحقیق حاضر می‌توان گفت ورزش مقاومتی و تزریق همزمان سلول‌های اجدادی اندوتلیال موجب بهبود وضعیت ایمونوگلوبولین‌ها در اثر تمرین و تزریق می‌شود. این یافته‌ها ادعا می‌کند که ورزش مقاومتی و تزریق می‌تواند به عنوان یک روش درمانی، موجب بهبود عملکرد دستگاه ایمنی ناشی از بیماری دیابت شود.

**واژگان کلیدی:** دیابت نوع یک، ورزش مقاومتی، سلول‌های اجدادی اندوتلیال، سلول درمانی، ایمونوگلوبولین‌ها

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، کد پستی

۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۱۲۹۲۱۷۳۰

پست الکترونیک: khademhoseini95@gmail.com

## Simultaneous Effect of Resistance Training and Endothelial Progenitor Cell Injection on Immunoglobulin and Blood Lymphocyte Levels in Diabetic Rats Induced with Streptozotocin

Mahsa Kazemi-Roudsari<sup>1</sup>, Seyed Hossein Khadem Hosseini<sup>2\*</sup>, Hossein Sazgar<sup>3</sup>

1. Ph. D Student in Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Ph. D Student in Microbial Biotechnology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Diabetes, as a progressive disease, can lead to decreased immune function. therefore, the aim of this study was to determine the simultaneous effect of resistance training and endothelial progenitor cell injection on immunoglobulins (*IgA*, *IgM*, *IgG*) of streptozotocin-induced diabetic rats.

**Methods:** 50 rats (aged 6 weeks with a mean weight of 200±20 g) were randomly divided into groups including Diabetes + stem cell injection + resistance training (n = 10), diabetes + resistance training (n = 10), diabetes + stem cell injection (n = 10), control diabetes (n = 10) and healthy basal (n = 10) Were divided. Real time PCR was used to evaluate the changes in immunoglobulins. Also, two-way analysis of variance was used for comparison between and within the group, and for better understanding of the results, the effect size, and the amount of 95% confidence interval were given.

**Results:** The results showed that *IgA* (P = 0.022), *IgM* (P = 0.017), *IgG* (P = 0.045) had significant changes between groups. Also, there was a significant difference in all three variables between the control diabetes group and the diabetes + resistance training + injection group (P≤0.05).

**Conclusion:** Summarizing the results of the present study, it can probably be said that resistance training and simultaneous injection of endothelial progenitor cells improve the status of immunoglobulins by training and injection. These findings suggest that resistance training and injections can be used as a treatment to improve the function of the immune system due to diabetes.

**Keywords:** Type 1 diabetes, Resistance training, Endothelial progenitor cells, Cell therapy, Immunoglobulins

### مقدمه

دیابت از جمله بیماری‌های اختلالات متابولیکی به‌شمار می‌رود. قرار گرفتن درازمدت در معرض سطح بالای گلوکز، به‌عنوان یکی از عمده‌ترین عوامل بروز دیابت شناخته شده است. علامت مشخصه آن میزان قند خون بالای ۱۲۰ میلی‌گرم در دسی لیتر در حالت ناشتا است و از دیگر نشانه‌های آن پرخوری و پرنوشی است. دیابت در اثر کاهش تولید انسولین در بدن یا کم شدن اثر انسولین در سوخت و ساز مواد قندی حاصل می‌شود. دیابت نوع ۱ (وابسته به انسولین) معمولاً قبل از ۳۰ سالگی ظاهر می‌شود و علت آن فقدان یا کمبود انسولین می‌باشد، اکثر این بیماران لاغر می‌باشند و نیاز به تزریق انسولین دارند (۱). دیابت نوع ۲ (غیر وابسته به انسولین) معمولاً در بزرگسالی (سنین بالای ۴۰ سال) دیده می‌شود. تقریباً ۲/۳ اشخاص چاق می‌باشند. در بروز دیابت نوع ۲ عوامل متعددی چون اضافه وزن و چاقی (بخصوص چاقی داخل شکمی) عدم فعالیت بدنی، سن بالای ۴۰ سال، رژیم غذایی نامناسب (غذای پرکالری و غیر مغذی) و وراثت نقش دارد. در درمان دیابت رژیم غذایی و ورزش از اهمیت خاصی برخوردار است، بخصوص در بیماران دیابتی نوع ۲ که تقریباً ۸۰ درصد آنان چاق می‌باشند و داروی پایین آورنده قند خون به‌عنوان یک درمان کمکی (نه یک درمان اصلی) در کنار رژیم غذایی مناسب و ورزش به کار گرفته می‌شود. با اینحال، عوامل زیادی ممکن است در این بیماری دخیل باشند (۲). عوامل

محیطی؛ از جمله عدم فعالیت بدنی همراه با چاقی، استرس و عوامل ژنتیکی از دیگر عوامل ایجاد کننده دیابت هستند. این موضوع می تواند روی ساختار و عملکرد برخی از دستگاه های بدن، مانند؛ دستگاه ایمنی تأثیر بگذارد (۳). اکثر پژوهشگران بر این باورند، که دیابت علاوه بر تغییر الگوی سایتوکاینی Th2 به سمت Th1، موجب افزایش کارکرد دستگاه ایمنی و در نهایت افزایش سطح التهاب در این دسته از بیماران می شود (۴). دستگاه ایمنی شامل ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی است، که ایمنی اکتسابی شامل؛ دو گروه ایمنی هومورال و ایمنی سلولی است (۵). در ایمنی هومورال لنفوسیت های B، آنتی بادی هایی به نام ایمونوگلوبولین (IgA, IgG, IgM)، را ترشح می کنند (۶). ایمونوگلوبولین ها وزن مولکولی بین ۱۶۰۰۰۰ تا ۹۷۰۰۰۰ دالتون دارند، که حدود ۲۰ درصد از پروتئین های پلاسما را تشکیل می دهند (۷). ایمونوگلوبولین ها در سرم و سایر مایعات بدن مثل اشک و بزاق وجود دارند و بر مبنای خواص فیزیکی، شیمیایی و ایمنی به پنج گروه عمده تقسیم می شوند که عبارتند از A, M, G, D و E. A اصلی ترین آنتی بادی موجود در بدن است که در بزاق، اشک و موکوس روده ها دیده می شود. ایمونوگلوبولین G، اصلیت ترین آنتی بادی در خون است که در هنگام پاسخ های ایمنی اولیه و ثانویه، از طریق فعال کردن ماکروفاژها، ظاهر می شود. ایمونوگلوبولین M بزرگترین آنتی بادی دستگاه گردش خون است، که به عنوان اولین آنتی بادی در معرض آنتی ژن قرار می گیرد (۸). مطالعات نشان داده اند دستگاه ایمنی اکتسابی قابلیت تغییر از طریق فعالیت های ورزشی را دارد (۹). در راستای این مطالعات مشخص گردیده که فعالیت های ورزشی بر دستگاه ایمنی تأثیری دوگانه دارند، به طوری که فعالیت های ورزشی متوسط به عنوان تقویت کننده این دستگاه و افزایش مقاومت در برابر استرس ها شناخته شده اند (۱۰). حال آن که فعالیت شدید می تواند منجر به تضعیف عملکرد ایمنی شود. در این راستا می توان به کاهش تعداد لنفوسیت ها، تعداد و فعالیت سلول های کشنده طبیعی و تولید آنتی بادی ها اشاره نمود (۱۱). به علاوه، شدت فعالیت بدنی از عوامل تنظیم گر و تغییر دهنده آنتی بادی های سرم است، به گونه ای که در اثر شدت فعالیت بدنی، نسبت سلول های لنفوئیدی داخل گردش خون و بافت های لنفوئیدی تغییر می یابد و موجب افزایش یا کاهش ایمونوگلوبولین های سرم می شود (۱۲). در سال های اخیر، دیابت به دلیل افزایش شدید مرگ و میر و افزایش هزینه مراقبت های بهداشتی، به یکی از جدی ترین تهدیدهای سلامت عمومی در جهان تبدیل شده است. بر اساس اطلس اپیدمی دیابت ۲۰۱۹ فدراسیون بین المللی دیابت، در سال ۲۰۲۲، ۴۶۳ میلیون بیمار دیابتی در سراسر جهان وجود داشت و پیش بینی می شود این تعداد تا سال ۲۰۴۵ به ۷۰۰ میلیون نفر برسد (۱۳). Hosseini و همکاران، در مطالعه ای که روی زنان میانسال غیرفعال انجام دادند، مشاهده کردند که یک جلسه فعالیت مقاومتی و استقامتی به مدت ۴۵ دقیقه موجب کاهش معنی دار IgA، در هر دو گروه نسبت به قبل از فعالیت می شود. به نظر می رسد که در تمام مطالعات انجام شده، مدت زمان، نوع و شدت فعالیت متغیرهایی هستند که توسط محققین دستکاری می شوند (۱۴). این مطالعات بر اهمیت ورزش مقاومتی بر تعدیل ایمونوگلوبولین ها صحنه می گذارد. علاوه بر تأیید مطالب فوق که از ورزش مقاومتی به عنوان یکی از روش های تعدیل گر دستگاه ایمنی یاد شد، یکی از روش های درمانی که امروزه به طور شایع در بین پژوهشگران رواج دارد، سلول درمانی است (۱۵). در سال های اخیر، از سلول درمانی برای جبران سلول های از دست رفته استفاده می کنند. پژوهش ها چشم انداز وسیعی را در علم ایجاد کرده اند؛ اما همواره کاربرد آن ها به صورت علمی با چالش هایی همراه بوده است (۱۶). این راهکارهای درمانی در مطالعات زیادی بر روی نمونه های حیوانی مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مثبتی نیز نشان داده است و قدم بعدی برای این مطالعات، طراحی مطالعات انسانی با پیدا کردن بهترین نوع سلول برای تزریق است (۱۷). همچنین مطالعات اخیر نشان داده اند که سلول درمانی می تواند فعالیت بافتی را در بافت های افراد دیابتی بهبود بخشد (۱۸). بنابراین، این پیشنهاد می تواند امکان ایجاد یک رویکرد درمانی بدون دارو را فراهم کند و در درمان عوارض دیابت مؤثر باشد. تا به امروز برای درمان با سلول های کلونیساز اندوتلیال به آزمایش های بالینی بیشتری ادامه نداده اند، بنابراین برای درمان عوارض دیابت با این سلول ها به تحقیقات بیشتری نیاز است. با توجه به اهمیت ورزش مقاومتی در بیماران دیابتی و نتایج مثبت سلول درمانی، این سؤال در ذهن پژوهشگران متبادر شده که تلفیق دو روش ورزش مقاومتی و تزریق سلول های اجدادی اندوتلیال، چه اثری بر ایمونوگلوبولین و لنفوسیت در خون رت های دیابتی القا شده با STZ می گذارد؟

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی و القای دیابت

Streptozotocin: STZ (Sigma، ایالات متحده آمریکا) خریداری شد و در بافر سیترات سرد ۰.۰۱ مولار (pH 4.50) حل شد و همیشه برای استفاده فوری (در عرض ۵ دقیقه) به تازگی آماده شد. دیابت با یک تزریق STZ تازه حل شده (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) در بافر سیترات ۰.۰۱ مولار در لیتر (pH 4.5) به صفاق القا شد. موش‌های کنترل بافر سیترات دریافت کردند. هفت روز پس از تزریق STZ، موش‌ها از نظر سطح سرمی گلوکز غربالگری شدند. ۲ ساعت پس از تزریق، با ایجاد جراحت کوچک بر ورید دمی رت‌ها توسط لانس، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتر گذاشته شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر تایوان خوانده شد. موش‌هایی با سطح سرمی گلوکز  $\leq 200$  میلی گرم در دسی لیتر پس از ۲ ساعت مصرف گلوکز، دیابتی در نظر گرفته شدند و برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند (۱۹).

### کشت سلول‌های بنیادی

به منظور کشت سلول‌های اجدادی دوهفته قبل از شروع پروتکل تمرین پس از آزمایش‌های لازم در زمینه سالم بودن رت‌ها کار استخراج سلول انجام شد. برای این منظور موش‌ها را پس از بیهوشی با استفاده از کتامین و زایلین، با روش جابجایی گردن یوتانایز شد. سپس استخوان فمور آنها به صورت استریل جدا شده و پس از برداشت بافت‌های عضلانی و پیوندی اضافی، دو سر استخوان اپی فیز به وسیله پنس استخوان بر ۲ قطع نموده شد. سپس با استفاده از سوزن شماره ۱۸ متصل به سرنگ که حاوی محیط کشت M199 (USA, Invitrogen-GIBCO) بود، از یک سر استخوان وارد کرده و سر دیگر آن را درون یک عدد پتری دیش ۳۵ میلی متری (USA, one-Bio Greiner) قرار داده شد و محتویات استخوان را با محیط کشت شستشو داده شد. سپس محیط کشت M199 مغز استخوان را بر روی حجم مساوی از فایکول-هاییک (USA, aldrich-Sigma) درون یک فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه با دور 400g سانتریفیوژ (Eppendorf, R 5702 # Model) شدند. بعد از سانتریفیوژ سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان که در محل تلاقی دو فاز به صورت هاله شیری رنگ متمایز بودند، به آرامی توسط سمپلر برداشته شد و دو بار با PBS شستشو داده شدند و متعاقباً سلول‌ها را در محیط کشت M199، هیدوکورتیزول و اسید آسکوربیک به همراه ۱۰۰ واحد پنسیلین و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۳٪ سرم جنین گاوی در انکوباتور با دمای ۳۷°C و رطوبت نسبی ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ کشت داده شد. محیط کشت به منظور حذف سلول‌های مرده و معلق در ۲۴ ساعت اول تعویض شد. در نهایت محیط کشت هر ۲ روز تعویض شد و سلول‌های اجدادی اندوتلیال اولیه برای مطالعه استفاده شدند. سلول‌ها توسط دستگاه سل کانتر شمارش شده و ۱ میلیون سلول در حجم ۱۰۰ لاندا در محلول PBS استریل از طریق ورید دمی به صورت آهسته توسط سرنگ انسولین به دو گروه دیابت+سلول اجدادی و دیابت به همراه ورزش مقاومتی و سلول اجدادی تزریق گردید (۲۰).

### حیوانات و طراحی آزمایشی

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود، که آزمودنی‌ها شامل ۵۰ سر رت نر نژاد ویستار با سن ۶ هفته و با محدودی وزنی  $200 \pm 20$  گرم بودند، که از میان رت‌های موجود در آزمایشگاه دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد شهرکرد به طور تصادفی از میان ۵۰۰ سر رت طی سال ۱۴۰۲ انتخاب و پس از انتقال به حیوان خانه آزمایشگاه در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند و یک هفته با محیط جدید آشنا و به صورت تصادفی در گروه‌هایی شامل؛ دیابت+تزریق سلول‌های بنیادی+ورزش مقاومتی، دیابت+ورزش مقاومتی، دیابت+تزریق سلول بنیادی، دیابتی کنترل و سالم پایه (n=10) در دمای کنترل شده ۲۲ درجه و رطوبت ۵۰ و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته با آب و غذای مخصوص موش تقسیم شدند. در این مطالعه در صورت کاهش وزن رت‌ها به زیر ۵۰ درصد، رت مذکور ابتدا بیهوش و کشته و سپس کلیه آزمایش‌های مورد مطالعه انجام شد. در این مطالعه تنها در گروه دیابت تلفات وجود داشت که وزن ۲ عدد از رت‌ها به زیر ۵۰ درصد رسید و در سایر گروه‌ها تلفات وجود نداشت. کلیه پروتکل‌های کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و در شرایطی که رت‌ها ۱۲ ساعت در حالت ناشتا بودند، کار خونگیری از رت‌ها انجام گردید.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

انجام آزمایش‌های مورد مطالعه شروع و رت‌ها با ترکیبی از کتامین (۵۰-۳۰ میلی گرم در کیلوگرم به صورت داخل عضلانی) و زایلین (۵-۳ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس خونگیری جهت انجام آزمایش از رت‌ها انجام گردید.

### Real-Time PCR

خونگیری پس از بیهوش شدن موش‌ها برای بررسی میزان لنفوسیت انجام شد. مقداری از خون به منظور دستیابی به سرم برای بررسی ایمونوگلوبولین‌ها سانترفیوژ شد. سپس استخراج RNA و سنتز cDNA از سره طبق دستورالعمل کیت‌های YTA (یکتا تجهیز، ایران) انجام شد. real-time PCR به کمک YTA SYBR Green (یکتا تجهیز، ایران) انجام و از ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. ۱۵ میکرولیتر از حجم واکنش شامل ۰.۵ میکرولیتر cDNA، ۰.۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۰.۵ میکرولیتر پرایمر ریورس، ۱۰ میکرولیتر مخلوط اصلی مستر میکس سایبر گرین و ۳.۵ میکرولیتر آب تقطیر دوگانه استریل استفاده شد. برنامه چرخه دما همچنین شامل دناتوره سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه بود. بیان نسبی  $\gamma$ -*IFN*،  $\alpha$ -*TNF* و *IL-6* با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه و توسط سطوح *GAPDH* در هر نمونه نرمالایز شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گنجانده شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای real time PCR

نام ژن	کد دسترسی ژن	توالی پرایمر (5'→3')	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (°C)
<i>IgG</i>	AH002186.2	F: TCTGGTCTTCTGGAGTTCCG R: AGCATTGGAAGTTGGGGTAGG	۱۵۰	۶۰
<i>IgM</i>	AH002185.2	F: TAGCCCACGTTCGTAGCAAAC R: GTGAGGAGCACGTAGTCCG	۱۷۴	۶۰
<i>IgA</i>	AB109766.1	F: TGGAGGAACTGGCAAAGGAC R: AGTGATCAGGTGCGATTTCGAT	۱۴۹	۶۰
<i>GAPDH</i>	NM_017008.4	F: TGATGGGTGTGAACCACGAG R: TTCTGAGTGGCAGTGATGGC	۱۶۸	۶۰

### پروتکل تمرین

موش‌های صحرایی به مدت ۵ هفته در مجموع ۱۷ جلسه تمرین مقاومتی داشتند. دوره آشنایی موش‌های صحرایی با این نوع تمرین ۶ روز بود و ۴۸ ساعت قبل از تزریق STZ صورت گرفت. تمرین به وسیله یک نردبان با ارتفاع ۱ متر و با ۲۶ پله انجام شد. هر جلسه تمرین شامل ۵ ست با ۴ تکرار بود، فاصله زمانی استراحت بین تکرارها ۶۰ ثانیه و بین ست‌ها ۳ دقیقه بود و استراحت بین هر جلسه تمرین‌ها ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. شدت تمرین در ۳ جلسه اول ۳۰٪ وزن بدن موش‌های صحرایی، در جلسه‌های ۴-۶ ۵۰٪ وزن بدن، در جلسه‌های ۷-۹ ۷۰٪ وزن بدن و در جلسه‌های ۱۰-۱۴ ۱۰۰٪ وزن بدن بود. در جلسه‌های ۱۷-۱۵ موش‌ها ۱۲۰٪ وزن بدن را حمل کردند. در برنامه تمرینی از هیچ‌گونه شوک الکتریکی استفاده نشد (۲۱).

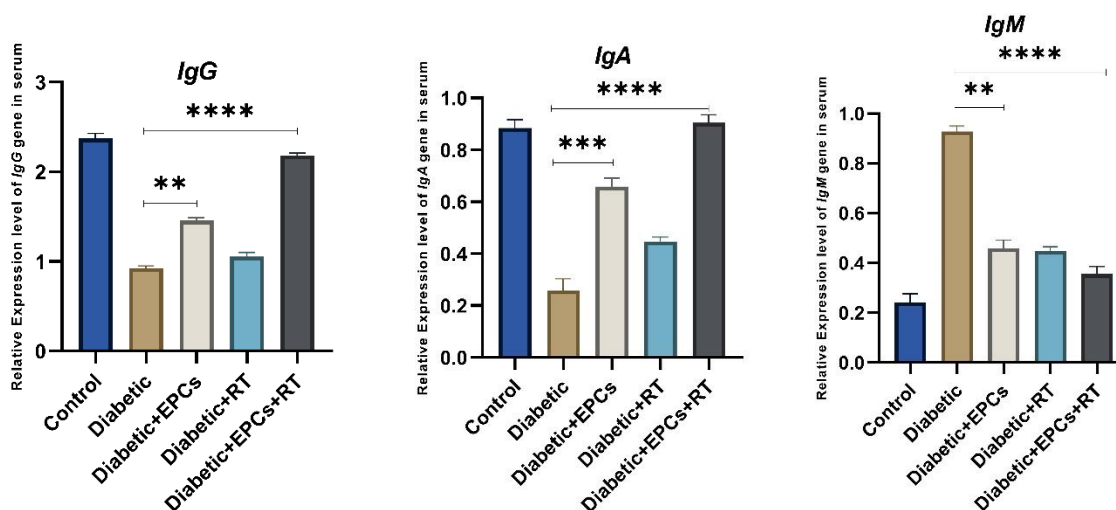
### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها ابتدا برای نرمال بودن (با استفاده از آزمون اندرسون دارلینگ) و همگنی واریانس قبل از هر گونه تجزیه و تحلیل آماری بیشتر مورد آزمایش قرار گرفتند. داده‌ها به طور معمول توزیع و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شدند. برای شناسایی تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با آزمون تعقیبی LSD استفاده شد (GraphPad Prism 5.0). تفاوت در  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### بررسی بیان ایمنوگلوبولین‌ها با real time PCR

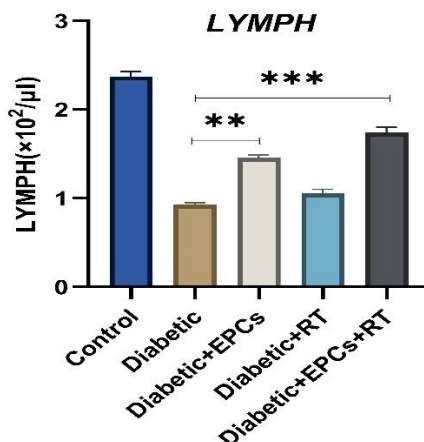
میزان بیان ایمنوگلوبولین‌ها در نمودارهای شکل ۱ ارائه شده است. داده‌ها نشان داد بیان *IgA* بین گروه‌ها تغییرات معنی‌داری داشت. همچنین نشان داده شد، بین گروه دیابت و دو گروه دیگر دیابت+تمرین مقاومتی و دیابت+تمرین مقاومتی+تزریق (اختلاف معنی‌داری وجود دارد. برای متغیر *IgM* نیز، اختلاف معنی‌دار بین گروهی مشاهده شد که گروه دیابتی با دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت. به ترتیب اختلاف معنی‌داری بیشتر، گروه دیابتی+تمرین مقاومتی+تزریق، گروه دیابتی+تمرین مقاومتی و گروه دیابتی+تزریق. در نهایت اختلاف معنی‌دار بین گروهی برای متغیر *IgG* مشاهده شد. که فقط اختلاف معنی‌دار بین گروه دیابتی و گروه دیابتی+تمرین مقاومتی+تزریق مشاهده شد.



شکل ۱: Control: گروه کنترل، Diabetic: گروه دیابتی، Diabetic+EPCs: گروه دیابتی+تزریق، RT+Diabetic: گروه دیابتی+تمرین مقاومتی، Diabetic+EPCs+RT+Diabetic: گروه دیابتی+تمرین مقاومتی+تزریق. \*: اختلاف معنی‌دار ۰.۰۵، \*\*: اختلاف معنی‌دار ۰.۰۱، \*\*\*: اختلاف معنی‌دار ۰.۰۰۱، \*\*\*\*: اختلاف معنی‌دار ۰.۰۰۰۱.

### بررسی تیتر لنفوسیت در گروه‌های مختلف

در گروه دیابت نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجه و معنی‌داری در تیتر لنفوسیت‌ها که برای فعالیت سیستم ایمنی ذاتی ضروری هستند، مشاهده شد. پس از تزریق سلول EPC به موش، شاهد افزایش تیتر لنفوسیت و برگشت آن به حالت پایه در گروه کنترل بودیم.



شکل ۲: Control: گروه کنترل، Diabetic: گروه دیابتی، EPCs+Diabetic: گروه دیابتی+تزریق، RT+Diabetic: گروه دیابتی+تمرین مقاومتی، Diabetic+EPCs+RT+Diabetic: گروه دیابتی+تمرین مقاومتی+تزریق. \*: اختلاف معنی دار ۰.۰۵، \*\*: اختلاف معنی دار ۰.۰۱، \*\*\*: اختلاف معنی دار ۰.۰۰۱

### بحث

هدف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر همزمان تمرین‌های مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر بیان ایمونوگلوبولین‌های *IgG* و *IgM* در سرم خون رت‌های دیابتی القا شده با STZ بود. نتایج پژوهش نشان داد که روش تمرین مقاومتی همراه با تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال بر ایمونوگلوبولین‌ها در رت‌های دیابتی تأثیر معنی‌داری داشتند، اگر چه این تغییرات در گروه‌ها و متغیرها یکسان نبود، اما گروه دیابتی+تمرین مقاومتی+تزریق بهبودی بیشتری در ایمونوگلوبولین‌ها نسبت به دیگر گروه‌ها داشت که این تعادل فعالیت ورزشی و تزریق سلول‌های بنیادی یک روش کاربردی جدید در زمینه بهبود وضعیت دستگاه ایمنی اکتسابی افراد مبتلا به دیابت است. اثر همزمان تزریق سلول‌های بنیادی و تمرین مقاومتی اثر دوجندانی بر وضعیت ایمونوگلوبولین *IgA*، گذاشت. این پژوهش با پژوهش Babaei و همکاران، همسو بود، به نوعی که در مطالعه‌ای که روی ۲۱ دانشجو پسر انجام دادند، مشاهده کردند که یک جلسه فعالیت شدید هوازی شامل تست بروس تا مرز خستگی (۹۰ درصد ضربان قلب)، موجب کاهش معنی‌دار میانگین سطوح *IgA* سرم پس از فعالیت می‌شود (۲۲). با این حال، با مطالعه‌های Filaire و همکاران (۲۳) و Nunes و همکاران (۲۴) ناهمسو بود. Filaire و همکاران، نشان دادند تمرین‌های شدید باعث تحریک و افزایش مقدار کورتیزول می‌شود، ولی *IgA* در یک فصل رقابتی با تغییر معنی‌داری همراه نیست. همچنین، Nunes و همکاران، در زمینه پاسخ‌های ایمنی به سه طرح فعالیت مقاومتی (استقامتی-هایپرتروفیک-توانی) در زنان بستکتبالیست نخبه نشان دادند که تغییر معنی‌داری در غلظت *IgA* بزاقی پس از فعالیت دیده نمی‌شود. از دلیل این عدم همسویی می‌توان به نوع آزمودنی و میزان آمادگی اشاره کرد، که در پژوهش‌های Filaire و همکاران و Nunes و همکاران، آزمودنی‌ها از نوع انسان و ورزشکاران نخبه بودند، که همین امر می‌تواند تفاوتی بین سطوح ایمونوگلوبولین‌های بیماران دیابتی و ورزشکاران باشد (۲۵). یکی از هدف‌های مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی در بهبود وضعیت ایمونوگلوبولین‌ها و عوارض دیابت بود و نشان داد این سلول‌ها می‌توانند در بهبود دیابت مؤثر واقع شوند. در راستای این مفهوم Sun و همکاران (۲۶) در مطالعه‌ای به بررسی اثر استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مدل دیابتی رت‌هایی که از طریق رژیم غذایی پُرچرب و STZ به دیابت نوع دو دچار بودند، پرداختند و مشاهده کردند که تزریق وریدی این سلول‌ها سطح گلوکز خون را کاهش داده و مقاومت به انسولین را در دیابت نوع دو معکوس می‌نماید و بدینوسیله می‌تواند یک روش درمانی و جایگزین برای درمان دیابت باشد. از تلفیق نتایج پژوهش حاضر و پژوهش Sun و همکاران، اینگونه می‌توان استنباط کرد که تزریق سلول‌های بنیادی در مبتلایان به دیابت، خود به تنهایی موجب بهبود عوارض دیابت می‌شود، که اگر این تزریق با فعالیت ورزشی همراه باشد،

بهبودی دوچندان می‌شود. برای متغیر IgM نیز، اختلاف معنی‌دار بین گروهی مشاهده شد که گروه دیابتی با دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت، که این نتیجه با پژوهش Back و همکاران، همسو بود. Back و همکاران، طی پژوهشی، برنامه تمرینی پیلاتس سه جلسه در هفته به مدت ۸ هفته در زنان میانسال را انجام دادند. نتایج نشان داد، ایمونوگلوبولین IgM افزایش یافته است و اثرات متقابل را از طریق برنامه‌های تمرینی پیلاتس نشان داده است، البته نتایج پژوهش Khajei و همکاران، عدم همسویی را نشان می‌داد، به نوعی که مشاهده کردند که ۹۵ دقیقه فعالیت ویژه آماده سازی، موجب کاهش مقادیر ایمونوگلوبولین IgM می‌شود (۲۷) همینطور که پیش از این نیز اشاره شد، تغییرات ایمونوگلوبولین‌ها در ورزشکاران حرفه‌ای کمی سخت است و احتمال ناهمسویی پژوهش خواجه‌ای نیز ورزشکاران حرفه‌ای کوهنوردی است. البته از دیگر دلایل می‌توان به اندازه‌گیری در پاسخ اشاره کرد که بلافاصله پس از تمرین‌های کوهنوردی، ایمونوگلوبولین IgM اندازه‌گیری شد، در حالی که در پژوهش حاضر سازگاری مدنظر بود. در نهایت، نتایج ۵ هفته تمرین مقاومتی رت‌های مبتلا به دیابت، اختلاف معنی‌دار بین گروهی برای متغیر IgG نشان داد که فقط اختلاف معنی‌دار بین گروه دیابتی و گروه دیابتی+تمرین مقاومتی+تزریق مشاهده شد. این نتیجه اهمیت تزریق سلول‌های بنیادی و تمرین مقاومتی را نشان می‌دهد. در همین راستا، Nieman و همکاران، پژوهش همسو انجام دادند. در این پژوهش، آزمودنی‌ها ۲ ساعت تمرین قدرتی انجام دادند و وضعیت دستگاه ایمنی بهبود معنی‌داری یافت. با این حال، پژوهش Shirvani و همکاران، ناهمسو بود (۲۸). آنها در مطالعه‌ای که روی ۲۴ بازیکن فوتبال انجام دادند، مشاهده کردند که انجام یک جلسه فعالیت تناوبی شدید ۹۰ دقیقه‌ای در بازیکنان جوان فوتبال، باعث کاهش معنی‌داری در غلظت سرمی ایمونوگلوبولین IgG می‌شود؛ به نظر می‌رسد نوع فعالیت یکی از عوامل مؤثر بر پاسخ‌های ایمونوگلوبولین باشد، به علاوه، مدت زمان فعالیت در ارتباط با پاسخ ایمونوگلوبولین‌های سرم نیز می‌تواند یک عامل تعیین کننده باشد. مسئله دیگر تعداد جلسه‌های فعالیت در هفته است. اگرچه تعدادی از پژوهش‌ها نیز تنها با تعداد اندک جلسه‌های فعالیتی توانسته‌اند استرس و یا تغییری را در ایمونوگلوبولین‌ها به وجود آورند (۲۹). که آن نیز به علت شدت تمرین بوده که توسط پژوهشگران طراحی و آزمودنی‌های پژوهش آن را اجرا کرده‌اند. در خصوص سازکارهای اثر تعاملی متغییرهای وابسته پژوهش مشخص شده است، بهبود وضعیت ایمونوگلوبولین‌ها می‌تواند در نهایت باعث جلوگیری از عوارض ناشی از دیابت شود. بنابراین تعادل تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال همراه با انجام تمرین‌های مقاومتی می‌تواند یک راهکار درمانی برای کاهش آسیب‌های ناشی از بیماری دیابت باشد. نتایج ما ممکن است چشم اندازی برای جلوگیری از کاهش عملکرد دستگاه ایمنی در افراد مبتلا به بیماری دیابت باشد اما برای بررسی سازکارهای مولکولی درگیر در فرآیند وضعیت ایمونوگلوبولین‌های دستگاه ایمنی نیاز به مطالعات دقیق‌تری است. بنابراین پیشنهاد میشود تأثیر تمرین مقاومتی بر سایر فاکتورهای دستگاه ایمنی در بیماران مبتلا به دیابت نیز بررسی شود، همچنین پیشنهاد می‌شود از مدل‌های دیگر سلول‌های پیشساز و بنیادی جهت سلول درمانی در مطالعات بر روی رت‌های دیابتی استفاده شود تا بهترین نوع سلول‌ها برای کمک به درمان دیابت شناسایی شود و نیز می‌توان بر روی تأثیر تمرین مقاومتی و تزریق سلول اجدادی بر فاکتورهای دیگر اندام‌های بدن از قبیل؛ دستگاه عضلانی و دستگاه عصبی در بیماران مبتلا به دیابت مطالعه شود.

### نتیجه‌گیری

با جمع‌بندی نتایج تحقیق حاضر احتمالاً می‌توان گفت پنج هفته تمرین مقاومتی و تزریق همزمان سلول‌های اجدادی اندوتلیال موجب بهبود وضعیت ایمونوگلوبولین‌ها در اثر تمرین یا تزریق شد و این بهبود در اثر تعاملی تمرین و تزریق نیز بهبود معنی‌دار نشان داد. این یافته‌ها با احتیاط بیان می‌کند که تمرین مقاومتی و تزریق سلول‌های اجدادی اندوتلیال می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی در شرایط کاهش عملکرد دستگاه ایمنی ناشی از بیماری دیابت به کار رود. اگرچه سازکارهای مؤثر در این مسیر نیاز به بررسی و مطالعات بیشتری دارد.

### سپاسگزاری

پژوهشگران بدینوسیله از کلیه افرادی که همکاری خالصانه‌ای در جهت اجرای این پروژه داشتند، صمیمانه قدردانی می‌نمایند.



### References:

1. Thomas D, Elliott E. Exercise for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; 9(16):24–39.
2. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018 ;391(10138):2449–62.
3. Steinbacher P, Eckl P. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolecules* 2015; 5(2):356–77.
4. Milanez VF, Ramos SP, Okuno NM, Boullosa DA, Nakamura FY. Evidence of a non-linear doseresponse relationship between training load and stress markers in elite female futsal players. *J Sport Sci Med* 2014; 13(1):22–9.
5. White TA, Lebrasseur NK. Myostatin and sarcopenia: Opportunities and challenges - A mini-review. *Gerontology* 2014; 60(4):289–93.
6. Schmidt T, Jonat W, Wesch D, Oberg HH, Adam Klages S, Keller L, et al. Influence of physical activity on the immune system in breast cancer patients during chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; 144(3):579–86.
7. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States: The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988– 2004. *Clin Infect Dis* 2010; 50(11):1439–47.
8. P. S, P. E. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 2015; 5(2):356–77.
9. Engels HJ, Kendall BJ, Fahlman MM, Gothe NP, Bourbeau KC. Salivary immunoglobulin A in healthy adolescent females: effects of maximal exercise, physical activity, body composition, and diet. *J Sports Med Phys Fitness* 2017; 10(4): 14-21.
10. Kurz A, Pernecky R. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Prog NeuroPsychopharmacology Biol Psychiatry* 2011; 35(2):373–9.
11. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, et al. Immunosenescence and InflammAging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol* 2018;10;8.
12. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* 2016; 532(7600):512–6.
13. Rahimi E, Mirdar SH BH. The effect of ginseng supplementation on the levels of IGF-1 and myostatin in the Karate girls after a simulated match. *Metab Exercice* 2015; 3(2):167–79.
14. Chen GQ, Mou CY, Yang YQ, Wang S, Zhao ZW. Exercise training has beneficial anti-atrophy effects by inhibiting oxidative stress-induced MuRF1 upregulation in rats with diabetes. *Life Sci* 2011; 89(1–2):44–9.
15. De Oliveira MFM, Caputo F, Corvino RB, Denadai BS. Short-term low-intensity blood flow restricted interval training improves both aerobic fitness and muscle strength. *Scand J Med Sci Sports* 2016; 26(9):1017–25.
15. Kim K-H, Kim H-M, Park J-S, Kim Y-J. Differential Transcriptome Profile and Exercise Capacity in Cardiac Remodeling by Pressure Overload versus Volume Overload. *J Cardiovasc Imaging* 2019; 27(1):50.
16. Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 2007; 75(6):3055–61.

17. Barra NG, Fan IY, Gillen JB, Chew M, Marcinko K, Steinberg GR, et al. High Intensity Interval Training Increases Natural Killer Cell Number and Function in Obese Breast Cancer-challenged Mice and Obese Women. *J Cancer Prev* 2017; 22(4):260–6.
18. Faigenbaum D. A, Lloyd S. R, Myer D. G, Faigenbaum AD, Lloyd RS, Myer GD. Youth
19. Resistance Training: Past Practices, New Perspectives, and Future Directions. *Pediatr Exerc Sci* 2013; 25(4):591–604.
20. Kohrt WM, Wherry SJ, Wolfe P, Sherk VD, Wellington T, Swanson CM, et al. Maintenance of Serum Ionized Calcium During Exercise Attenuates Parathyroid Hormone and Bone Resorption Responses. *J Bone Miner Res* 2018; 33(7):1326–34.
21. Carey AL, Febbraio MA. Interleukin-6 and insulin sensitivity: Friend or foe? *Diabetologia* 2004; 47(7):1135–42.
22. Bird SP, Tarpenning KM, Marino FE. Designing Resistance Training Programmes to Enhance Muscular Fitness. *Sport Med* 2005; 35(10):841–51.
23. Hosseini Masoumeh, Rostami Reza, Farzanegi P. EAR. Effect Of Resistance And Endurance Trainings On Salivary Immunoglobulin A, Cortisol And Dehydroepiandrosterone Concentration In Untrained Females. *J BABOL Univ Med Sci* 2010; 11(50):38–44.
24. Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Lee Sweeney H. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 2002; 157(1):137–47.
25. Wu Y, Wu M, Zhang Y, Li W, Gao Y, Li Z, et al. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *J Neurosci Methods*. 2017;293(3):103–7.
26. Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 2000; 57(1):16–25.
27. Almeida CF, Fernandes SA, Ribeiro Junior AF, Keith Okamoto O, Vainzof M. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem Cells Int* 2016; 2016:1–14.
28. Huang I, Lim MA, Pranata R. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia – A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 2020; 14(4):395–403.
29. Molanouri Shamsi M, Hassan ZH, Gharakhanlou R, Quinn LS, Azadmanesh K, Baghersad L, et al. Expression of interleukin-15 and inflammatory cytokines in skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats: Effect of resistance exercise training. *Endocrine* 2014; 46(1):60–9.

## بررسی اثر خاموش کنندگی miR-148a بر بیان ژن و بروز پروتئین TIM3 در رده سلولی AM

مرضیه توکلی<sup>۱</sup>، دکتر حسین خان احمد<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. استاد، گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

### چکیده

در لوسمی میلوییدی حاد AML که تحت عنوان لوسمی غیر لنفوییدی نیز شناخته می شود. سلول های میلوییدی نابالغ LSC در مغز استخوان و در نهایت درخون و اندام ها تجمع می یابند و با تولید سلول های خونی نرمال تداخل ایجاد می کند. تهیه پروفایل بیانی تفکیکی برای LSC و HSC های AML منجر به کشف TIM3 به عنوان یک مولکول سطحی اختصاصی سلول های LSC شد. میکروRNA یک مسیر تازه کشف شده هستند که بیان ژن ها را تنظیم می کند و در توسعه بافت و تنظیم کنندگی خون بد خیم و طبیعی نقش دارد. میکروRNA از ۲۲ نوکلئوتید تشکیل شده اند که به ناحیه 3'UTR, mRNA هدف متصل می شوند و بیان ژن مورد نظر را در سطح رونویسی تنظیم منفی می کند. میکروRNAها از طریق پنج مکانیسم متفاوت در بیماری زایی AML نقش دارند. تغییرات تعداد کپی، تغییر در نزدیک به ناحیه ژنومی انکوژنیک به دلیل جا به جایی کروموزومی، تغییرات اپی ژنتیکی هدف گیری نا به جای نواحی پروموتور miRNA توسط فاکتورهای رونویسی با انکوپروتئین های تغییر یافته و در نهایت پردازش miRNA های نامنظم. با توجه به توضیحات فوق و مطالعات پیوسته ای که بر روی عملکرد درمانی miRNA داشتیم و با استناد به پژوهش های پیشین مبتنی بر افزایش بیان TIM3 در سلول های سرطانی AML بر آن شدیم تا با به کار گیری آزمایش های علمی و دقیق تاثیر miRNA-148a را بر بیان پروتئین TIM3 در سرطان AML مشاهده کنیم. با استفاده از پایگاه mirbase متوجه شدیم miRNA148a می تواند روی TIM3 تاثیر داشته باشد. در این مطالعه نقش miR-148a در خاموش کنندگی TIM3 اندازه گیری شد. سلول های HL-60 کشت داده شده و بعد از تحریک با PMA بیان TIM3 با دستگاه فلوسایتومتری اندازه گیری شد. میزان بیان TIM3 بعد از ترانسفکشن با miR-148a به روش ریل تایم PCR نیز بررسی شده و میزان خاموش کنندگی این میکروRNA روی ژن TIM3 مشخص شد. نتایج ما نشان داد که miRNA-148a بر کاهش میزان بیان پروتئین Tim3 تاثیر به سزایی دارد.

واژگان کلیدی: Tim3, HL60, miR-148a

نشانی نویسنده مسئول: اصفهان، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، گروه ژنتیک

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: Hosseinkhanahmad@gmail.com , Marzietavakolighanoni@gmail.com

## Investigating the effect of silencing miR-148a on expression of TIM3 in AM cell line

Marzieh Tavakoli<sup>1</sup>, Hossein Khanahmad<sup>2\*</sup>

1. PhD Student in Genetics. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Professor, Department of Genetics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

### Abstract

Acute myeloid leukemia is a heterogenic malignant disease in which differentiation of cells is impaired and immature leukemic cells accumulate in blood circulation, bone marrow and other organs. In AML, Stem cells consist of hematopoietic and leukemic ones. Treatments of cancers such as chemotherapy just targets leukemic cells but does not affect on LSCs and LSCs continue to grow and produce leukemic cells and the disease relapses. There are some markers on the surface of LSCs that could be subjects for targeting such as Tim3. Tim3 just expresses on LSCs and could be silenced by using miRNAs. They are small non coding RNAs that can regulate gene expression by Inhibiting translation or mRNA cleavage. There are some bioinformatics programs that predict targets of miRNAs. Some of them indicate that miR-148a can target TIM3. In this study the role of miR-148a in silencing of tim3 was evaluated experimentally. HL-60 cell line was cultured and induced by PMA to express Tim3. On the next day expression of Tim3 was measured by flow cytometry. Then PMA treated cells were cultured in 24 well plate in four groups and transfected by miR-148a mimic, scramble FITC, transfection reagent and cell culture medium as negative control respectively. After a day scramble FITC group was observed by Fluorescent microscope and the next day the expression of Tim3 was evaluated by flow cytometry in all groups. Finally the mRNA of Tim3 was quantified by qPCR. Our results showed that miR-148a can reduce Tim3 in protein and mRNA's quantity significantly. Therefore bioinformatics prediction data were confirmed by experiment. Targeting of Tim3 could be considered as a therapeutic methods in some cancers and auto immune diseases by using miRNA or lock nucleic acids (LNA).

**Keywords:** Tim3, HL60, miR-148a

### مقدمه

لوسمی میلوئیدی حاد یک بیماری مربوط به مغز استخوان است. یک اختلال در سلولهای بنیادی خون ساز به دلیل تغییرات ژنتیکی در پیش سازهای سلولهای خونی که منجر به تولید بیش از حد سلولهای بنیادی میلوئیدی کلونال نیوپلاستیک می شود (۱). سلولهای بنیادی مشترک خون ساز (HSC)، سلولهای چند استعدادی<sup>8</sup> می باشند، به این مفهوم که یک سلول HSC قادر است همه انواع سلولهای خونی را تولید نماید. همچنین دارای خاصیت تجدید شوندگی هستند زیرا هر زمان که آنها تقسیم می شوند حداقل یک سلول دختری، خصوصیات یک سلول بنیادی را حفظ می کند، در حالی که دیگری می تواند در یک رده خاصی تمایز یابد (۲). سلولهای HSC منشا دو نوع سلول پیش ساز چند استعدادی می باشد که یکی از آنها سلولهای لنفوئیدی و برخی از سلولهای میلوئیدی را تولید می کند و دیگری، بیشتر سلولهای میلوئیدی، اریتروسیتها و پلاکتها را تولید می نماید. (۲). در لوسمی

<sup>8</sup> -pluripotent

میلوئیدی حاد (AML)، که تحت عنوان لوسمی غیرلنفوئیدی نیز شناخته می‌شود، سلول‌های میلوئیدی نابالغ در مغز استخوان و در نهایت در خون و اندام‌ها تجمع می‌یابند و با تولید سلول‌های خونی نرمال تداخل ایجاد می‌کنند (۳۳). در لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، که تحت عنوان لوسمی غیرلنفوئیدی نیز شناخته می‌شود، سلول‌های میلوئیدی نابالغ در مغز استخوان و در نهایت در خون و اندام‌ها تجمع می‌یابند و با تولید سلول‌های خونی نرمال تداخل ایجاد می‌کنند (۴). به منظور ریشه‌کن کردن سلول‌های LSC ای AML بدون آسیب به سلول‌های HSC نرمال، یافتن مولکولی که در این سلول‌ها به طور اختصاصی بیان می‌شود یا عملکرد اختصاصی دارد، امری ضروری می‌باشد. تحقیقات اخیر منجر به کشف مولکول‌هایی شده‌است که ترجیحاً در سلول‌های AML بیان می‌شوند مانند: CD47، CD96، CD44، CD32، CD25، CD133، CD40، CD117، CD123، ALDH1، CLL-1، TIM3 و اما این مولکول‌ها به علت بیان ناکافی به منظور تفکیک دقیق LSC‌ها، بیان شدن بر روی HSC‌ها و یا بیان شدن در برخی از گروه‌های AML به منظور هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های بنیادین AML مناسب نیستند (۵). تهیه پروفایل بیانی تفکیکی برای HSC و LSC‌های AML منجر به کشف TIM3<sup>1</sup> به عنوان یک مولکول سطحی اختصاصی سلول-های LSC ای AML برای هدف‌گیری اختصاصی این سلول‌ها به وسیله آنتی‌بادی‌ها شد. TIM3 در سطح LSC‌های CD34+CD38- و سلول‌های زاینده‌ی CD34+CD38- در هم‌هی زیرگروه‌های AML در تقسیم‌بندی FAB (به جز M<sub>3</sub>) بیان می‌شود. بنابراین TIM3 یکی از مهم‌ترین هدف مابرای درمان لوکمی باشد (۶).

### TIM3

گیرنده‌های مهاری (IR) که بر روی سلول‌های T واقع شده، ایمنی ذاتی و سازگار را در عفونت‌های ویروسی و سرطان تنظیم می‌کند. سلول‌های T در معرض آنتی ژنی مزمن ناکارآمد و فرسوده می‌شوند و سطح IRS‌ها را بالا می‌برند از جمله گیرنده مرگ برنامه ریزی شده (PD1)<sup>۱</sup>، Tcell immunoglobulin mucin-3 (Tim3)، TIGTP). در همان زمان لیگاند گیرنده‌های مهاری (IR) توسط سلول‌های توموری و ارائه دهنده آنتی ژن (APCs) در محیط تومور (TME) بیان می‌شوند. Tim3 (CD366, HAVCR2) معمولاً به عنوان یک پروتئین غشایی توسط ایتروفون کاما (IFN- $\gamma$ ) و سلول‌های T کمک کننده CD4+ و سلول‌های T سیتوتوکسیک CD8+ بیان می‌شوند (۷). ژن‌های خانواده تیم هشت عضو را در موش (Tim1-Tim8) و سه عضو را در انسان (Tim1, Tim3, Tim4) کد می‌کنند. ژن‌های خانواده Tim در ناحیه کروموزومی 5q32.2 در انسان و 11B1.1 در موش قرار دارند که به آتوپیی و خود ایمنی ارتباط داده شده است (25). ۴ نوع لیگاند در ارتباط با Tim3 وجود دارد که در ایمنی ضد تومور فعال می‌شوند. ۱- Galectin9 (Gal9) -۲ (CEACAM1) -۳ فسفاتیدیل سرین ۴- (HMGB1). Gal9 یک نوع لکتین C هست که اولین لیگاند شناخته شده برای Tim3 به حساب می‌آید. این لکتین در سلول‌های میلوئیدی، سلول‌های T، سلول‌های B، ماست سل‌ها و سلول‌های توموری و در فضای بین سلولی ترشح می‌شود (۸). به عنوان یک مارکر سطحی تازه تشخیص داده شده در LSC‌ها نقش اساسی در تشخیص بیماری AML ایفا می‌کند. مشخص شده که بیان بالای Tim3 می‌تواند به عنوان یک کاندیدای پیش‌آگهی ضعیف در بیماران AML نقش داشته باشد (۹).

### microRNAs

میکرو RNA‌ها مولکول‌های RNA کوچکی هستند که تقریباً از ۲۲ نوکئوتید ساخته شده‌اند که به ناحیه 3'UTR در mRNA هدف متصل می‌شوند و بیان ژن هدف را در سطح رونویسی تنظیم منفی می‌کنند. میکرو RNA یک مسیر تازه کشف شده هستند که بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کند و در توسعه بافت و تنظیم‌کنندگی خون بدخیم و طبیعی نقش دارند. تاکنون بیش از ۵۰۰ نوع از آن‌ها شناسایی شده‌اند و هر میرنا می‌تواند چندصد ژن را به علت ناقص جفت شدن بازها و اتصال به مناطق مختلف مورد هدف قرار دهد (۱۰).

<sup>1</sup> -Tcell immunoglobulin mucin-3

### محل ژن و بیان miRNA148a :

خانواده miR148/miR-152 از سه ناحیه محافظت شده بالا تشکیل شده و miRNA بالغ با توالی شبیه به هم ساختاروناحیه Seed یکسان شامل توالی miR-148a ، mir148b و mir152. در کروموزوم انسانی ، miR-148a با ۶۸ نوکلئوتید بر روی کروموزوم 7p15.2 قرار گرفته و ساختار ساقه حلقه آن بر روی رشته منفی کروموزوم ۷ واقع شده است . در شرایط فیزیولوژیکی نرمال ، ژن miRNA148a در بافت های مختلف شامل مغز ، قلب ، کبد ، پانکراس ، کلیه ، جفت ، رحم ، تخمدان و سلولهای خونساز بیان می شوند(۱۱).

### مداخله Mir148a در سرطان

اهمیت کلینیکال بیان پایین miR148a در سرطان های مختلف شامل معده ، کولورکتال ، پانکراس ، کبد ، حلق ، پستان ، سلولهای غیر کوچک ریه ، سرطانهای اندام جنسی مشخص شده ، همچنین بیان بالای miR148a در گلیوما و سرطان استخوان دیده شده که سطح بیان miR148a با طبقه بندی کلینیکی ، پیش بینی و اثر تومور ارتباط واضحی دارد. در اصل miR148a از طریق توالی ۷ نوکلئوتیدی در ناحیه Seed روی ژنهای هدف مختلف تاثیر گذاشته و باعث تومورزایی در قسمت های مختلف شود ( ۱۲).

### مواد و روش ها

به منظور بررسی میزان بیان TIM3 در سطح سلول های HL60 تحت درمان با PMA و نمونه ی کنترل، تکنیک فلوسایتومتری با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال (کونژوگه با PE) ضد (PEantihumanCD366(TIM3) Biolegend) و TIM3 در کنار ایزوتایپ کنترل مربوطه طبق پروتکل شرکت تولیدکننده آنتی بادیهای مذکور انجام شد در این تحقیق چهار گروه آزمایش داریم. در همه این گروه ها سلول مورد آزمایش سلولی است که تحت تیمار PMA به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و بیان بالای TIM3 در آن به اثبات رسیده است.

گروه اول سلولها با Scramble کونژوگه با FITC ترانسفکت گردید. در این گروه ۱۲ خانه از پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد و همه ۱۲ خانه ترانسفکت گردید سه خانه برای بررسی کارایی ترانسفکشن با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فلوسایتومتری در ۱۲ ساعت بعد از ترانسفکشن و سه خانه برای فلوسایتومتری با آنتی بادی ضد TIM3 کونژوگه با PE ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن و سه خانه برای بررسی بیان TIM3 در سطح RNA با Real time PCR ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن و سه خانه برای بررسی میزان بقای سلولها و بررسی اثر سمیت مواد با روش MTT assay استفاده گردید. گروه دوم شامل ۹ خانه از پلیت ۲۴ خانه است که هر ۹ خانه با miR-148 mimic و با پروتکل قید شده در ادامه ترانسفکت گردید. در این گروه نیز سه خانه برای بررسی بیان TIM3 ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن با استفاده از فلوسایتومتری و سه خانه برای بررسی بیان TIM3 در سطح RNA با Real time PCR ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن و سه خانه برای بررسی میزان بقای سلولها و بررسی اثر سمیت مواد با روش MTT assay استفاده گردید.

گروه سوم شامل ۹ خانه از پلیت ۲۴ خانه است که هر ۹ خانه با X-tremegene و با پروتکل قید شده در ادامه ترانسفکت گردید. در این گروه نیز سه خانه برای بررسی بیان TIM3 ، ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن با استفاده از فلوسایتومتری و سه خانه برای بررسی بیان TIM3 در سطح RNA با Real time PCR ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن و سه خانه برای بررسی میزان بقای سلولها و بررسی اثر سمیت مواد با روش MTT assay استفاده گردید.

گروه چهارم شامل ۹ خانه از پلیت ۲۴ خانه است که به هر ۹ خانه فقط محیط کشت اضافه گردید. در این گروه نیز سه خانه برای بررسی بیان TIM3 ، ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن با استفاده از فلوسایتومتری و سه خانه برای بررسی بیان TIM3 در سطح RNA با Real time PCR ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن و سه خانه برای بررسی میزان بقای سلولها و بررسی اثر سمیت مواد با روش MTT assay استفاده گردید یک روز بعد از تحریک سلول ها با PMA و اطمینان از افزایش بیان TIM3 با استفاده از روش فلوسایتومتری، سلول ها شمارش شده و به میزان ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه، کشت داده شد و به میزان ۴۰۰ μl

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

محیط کشت بدون سرم و آنتی بیوتیک به هر چاهک اضافه گشت. در مورد گروه چهارم میزان ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه گردید.

در ابتدا در ۱۲ خانه از پلیت ۲۴ خانه تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول HL-60 بیان کننده TIM3 کاشته شد. تعداد سلول فوق در ۴۰۰ میکرو لیتر محیط کشت RPMI فاقد سرم و آنتی بیوتیک سوسپانسیون شده بود. برای تهیه کمپلکس scramble و ماده ترانسفکت کننده X-Tremegene دو تیوب ۱.۵ میلی لیتری استریل و عاری از RNase برداشته و در یکی میزان ۳۰۰ میکرولیتر از scrambled رقیق شده در مرحله قبل (1μM) ریخته و به آن ۳۰۰ میکرولیتر محیط optimum از شرکت Invitrogen(USA) نیز اضافه و به آرامی مخلوط شد. در تیوب دیگر میزان ۶۰ میکرولیتر X-tremegene و ۵۴۰ میکرولیتر محیط optimum اضافه و به آرامی مخلوط شد. سپس محتویات لوله اول به لوله دوم اضافه و به آرامی مخلوط شد و مخلوط فوق به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط فوق را به ۱۲ خانه به صورت قطره قطره اضافه شد پس از ترانسفکشن سلولها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس محیط آنها تعویض شد. تمام مراحل به دورازتابش نور انجام شد.

برای تهیه کمپلکس miRNA-148 mimic و ماده ترانسفکت کننده X-tremegene دو تیوب ۱.۵ میلی لیتری استریل و عاری از RNase برداشته و در یکی میزان ۱۱.۲۵ میکرولیتر از miRNA-148mimic رقیق شده در مرحله قبل (20μM) ریخته و به آن ۴۳۸.۷۵ میکرولیتر محیط optimum از شرکت Invitrogen(USA) نیز اضافه و به آرامی مخلوط شد. در تیوب دیگر میزان ۴۵ میکرولیتر X-tremegene و ۴۰۵ میکرولیتر محیط optimum اضافه و به آرامی مخلوط شد. سپس محتویات لوله اول به لوله دوم اضافه و به آرامی مخلوط شد و مخلوط فوق به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط فوق را به ۹ خانه به صورت قطره قطره اضافه شد پس از ترانسفکشن سلولها بمدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس محیط آنها تعویض شد. پس از ۴۸ ساعت سه خانه برای بررسی بیان TIM3، ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن با استفاده از فلوسایتومتری و سه خانه برای بررسی بیان TIM3 در سطح RNA با Real time PCR ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن استفاده گردید.

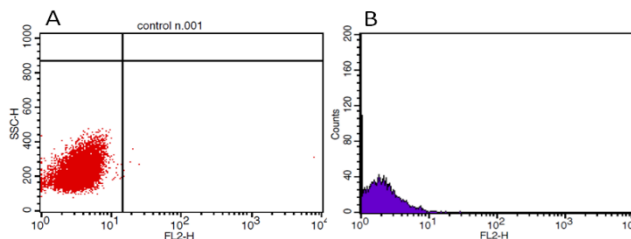
در مورد گروه سوم (Mock) ۹ خانه کشت سلول HL60 با بیان بالای TIM3 داده شد. سپس در یک تیوب ۱.۵ میلی لیتری میزان ۴۵ میکرولیتر X-tremegen ریخته شد و ۸۵۵ میکرولیتر Optimum به آن اضافه و مخلوط شد و به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط فوق را به ۹ خانه به صورت قطره قطره اضافه شد پس از ترانسفکشن سلولها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس محیط آنها تعویض شد. و سپس سه خانه برای بررسی بیان TIM3، ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن با استفاده از فلوسایتومتری و سه خانه برای بررسی بیان TIM3 در سطح RNA با Real time PCR ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن استفاده گردید و سه خانه برای بررسی میزان بقای سلولها و بررسی اثر سمیت مواد با روش MTT assay استفاده گردید.

در مورد گروه چهارم ۹ خانه کشت سلول HL60 با بیان بالای TIM3 داده شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر optimum به هر خانه اضافه شد. پس از ترانسفکشن سلولها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس محیط آنها تعویض شد. و پس از ۴۸ ساعت سه خانه برای بررسی بیان TIM3، ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن با استفاده از فلوسایتومتری و سه خانه برای بررسی بیان TIM3 در سطح RNA با Real time PCR ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن استفاده گردید. لازم به ذکر است بعد از ۴ تا ۶ ساعت از ترانسفکشن به میزان ۶۰ میکرولیتر FBS+Pen/Strep به هر یک از چاهک ها در تمام گروه ها اضافه کرده و دوباره انکوبه شدند.

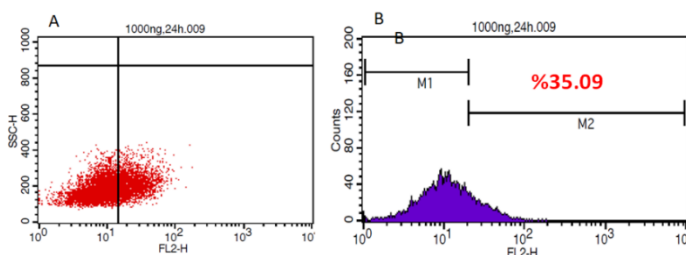
نتایج

آنالیزهای بیوانفورماتیکی

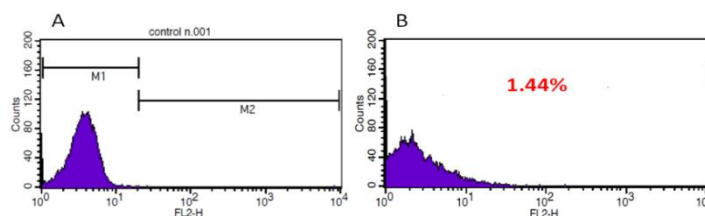
با استفاده از نرم افزارهایی چون Target scan miRbase و miRwalk پیش بینی کردیم که hsa-miR- 148a با احتمال بیش از ۸۰٪ می تواند سبب خاموشی بیان ژن TIM-3 شود و این کار را از طریق یک ناحیه نشیمن (seed region) ۸ تایی انجام می دهد. همچنین بر اساس اطلاعات موجود در همین سرویس ها و دیگر پایگاه های اینترنتی مشخص شد که اثر خاموش کنندگی این miRNA بر روی TIM-3 تا کنون در آزمایشگاه آزموده و اثبات نگردیده است. بررسی بیان پروتئین TIM-3 بر روی رده ی سلولی HL-60 بدون تیمار با PMA.



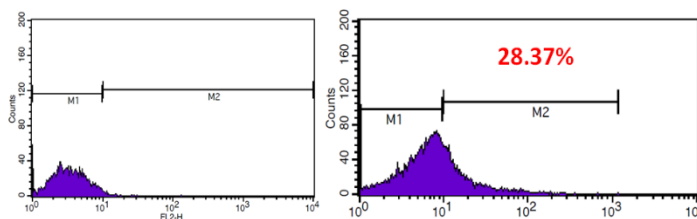
در حدود ۳۵.۰۹٪ درصد سلول های HL-60 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در برابر PMA، آنتی ژن TIM-3 را بروز داده اند.



بررسی بروز پروتئین TIM-3 بر روی سلول های HL-60 ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با mimic-148a به وسیله فلوسایتومتری:



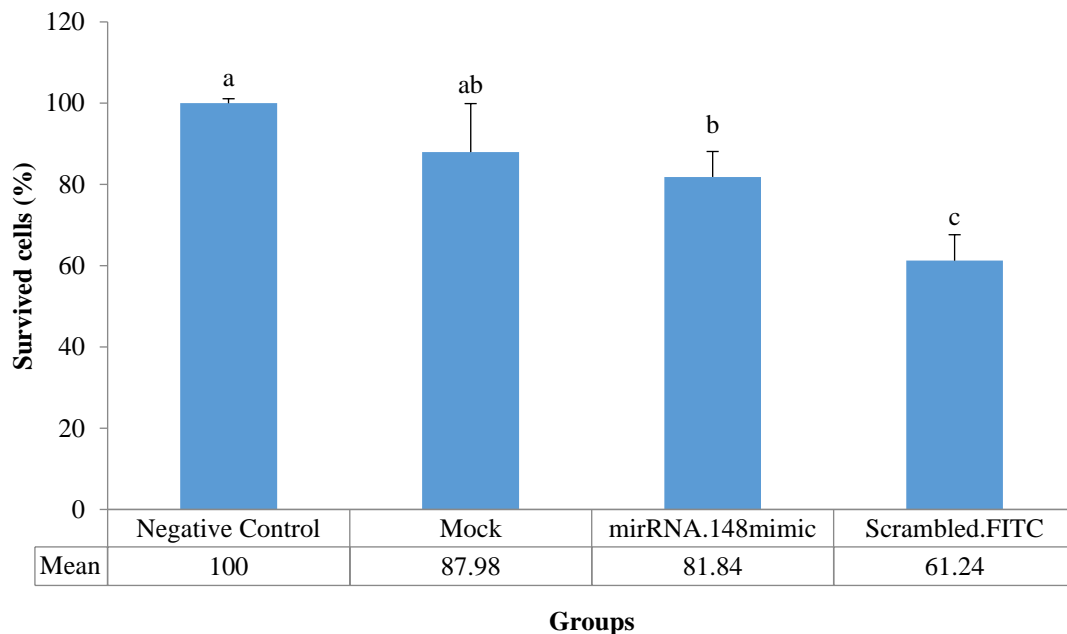
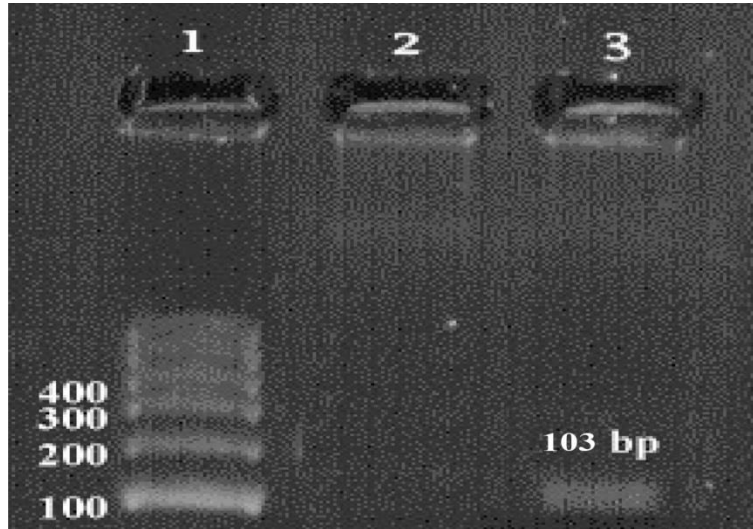
بررسی بروز پروتئین TIM-3 بر روی سلول های HL-60، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با Scrambled FITC به وسیله فلوسایتومتری:



نمایش باند محصول RT-PCR مولکول TIM3103 جفت بازی بر روی ژل آگارز ۲٪ در چاهک شماره ۳ و نمونه کنترل منفی در چاهک شماره ۲ و Ladder 100 bp (Fermentase) در چاهک شماره ۱



اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲  
 دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۳-۱۵: مقایسه نمونه ترانسفکت شده با miR148a mimic، نمونه ترانسفکت شده با Scrambled siRNA، نمونه Mock و کنترل منفی با استفاده از روش MTT assay می باشد. میزان زنده ماندن سلول ها پس از اثر miR-148a در مقایسه با چاهک های Scrambled. نمونه Mock و کنترل منفی تفاوت معنی داری داشته است ( $P < 0.05$ ).

### بحث و نتیجه گیری

TIM3 یک پروتئین سطح سلول است که به عنوان یک نشانگر سطح سلول های بنیادی لوسمی میلوئیدی (AML-LSC) شناخته شده است. این پروتئین یک کاندیدای بالقوه برای هدف های درمانی با انتی بادی مونوکلونال شناسایی شده است. با این حال، عملکرد Tim3 روی LSCs، بلاست ها و بیماریزایی AML در حال حاضر مشخص نیست. قبلا نشان داده شده که در سلول های T، Tim3 از طریق فعال سازی Akt (pAkt) و فسفریلاسیون پروتئین S6 ریبوزوم رشد و بقای سلول های

طبیعی را تنظیم می‌کند. در تحقیقات بعدی به طور مشابه فرض بر این شد که Tim3 ممکن است از طریق فعال سازی Akt و PS6 در LSCs و بلاست‌های لوکمیایی به بقای AML کمک کند (۱۲). بسیاری از مطالعات بیان غیر طبیعی miRNAها را در بدخیمی‌های میلوئیدی نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند. در مطالعات قبلی تاثیر miRNA-148a در بیماران ریزایی سرطان خون معلوم شده است و در سلول‌های HL-60 مشتق شده از لوسمی میلوئیدی حاد بیان پایین این میکرو RNA مورد تأیید قرار گرفته است همچنین بررسی‌های گذشته بیان بالای پروتئین Tim3 را در سرطان AML نشان داده اند (۱۳). در نتیجه با توجه به تاثیر مشترک miRNA-148a و پروتئین Tim3 در مسیر PI3K/AKT، در صدد برآمدیم تا تاثیر miRNA-148a را بر روند بیان پروتئین Tim3 در سلول‌های AML رده HL-60 بررسی کنیم. در این پژوهش از miRNA-148a mimic استفاده شده که نسبت به روش‌های قبلی انتقال وکتور بسیار با صرفه تر و ساده تر می‌باشد. با استفاده از روش فلوسایتومتری میزان بیان پروتئین Tim3 را قبل و بعد از ترانسفکت miRNA-148a mimic در سلول‌های HL-60 تیمار شده با PMA سنجیدیم. قبلاً نشان داده شده که در طول تمایز ناشی از PMA در سلول‌های HL-60 بیان Tim3 به حداقل دو برابر می‌رسد. در این مطالعه نیز نتایج فلوسایتومتری نشان دهنده افزایش بیان Tim3 بعد از تیمار با PMA است. به دلیل این که در سلول‌های AML نسبت به سایر سلول‌های میلوئیدی، Tim3 به طور چشمگیری در سطح سلول بیان می‌شود. انتخاب روش فلوسایتومتری برای سنجش آن بسیار مناسب و مقرون به صرفه است. همچنین کاهش پروتئین Tim3 بر سطح سلول‌ها بعد از ترانسفکت miRNA-148a mimic با استفاده از روش فلوسایتومتری در این مطالعه تأیید شد که نشان دهنده تاثیر miRNA-148a mimic در سطح رونویسی و یا ترجمه ژن Tim3 می‌باشد. همچنین از روش Real-timePCR نیز برای بررسی بیان ژن Tim3 در سطح mRNA بعد از ترانسفکت miRNA-148a mimic استفاده کردیم. نتایج حاصل کاهش شدید بیان ژن Tim3 در سطح miRNA را نشان داد که مکانیسم اثر احتمالاً همانند یک siRNA بوده و بیش از این که مانع ترجمه mRNA Tim3 شود باعث تخریب آن شده است. آن چه از مطالعه MTT در سلول‌های HL-60 بعد از ترانسفکت با miRNA-148a mimic و Scrambled و mock به دست آمده نشان می‌دهد که ارائه miRNA-148a اثر معنی داری بر زنده ماندن سلول در مقایسه با سایر گروه‌های mimic و Scrambled و یا ماده ترانسفکشن گذاشته و تفاوت معنی داری با گروه کنترل مشاهده شده که این تأیید کننده اثر اختصاصی miRNA-148a در بیان ژن Tim3 و اثر کاهش بیان Tim3 بر چرخه سلولی و رشد سلولها می‌باشد.

## References:

1. Acute Myeloid Leukemia: A Review. Pelcovits A, Niroula R. *R I Med J* (2013). 2020;103(3):38-40. PMID: 32236160.
2. Abol K, et al. *cellular and molecular immunology*. 8th ed. Tehran: Artin teb publishers; 2015.
3. Chandra Kumar C. Genetic Abnormalities and Challenges in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Genes & Cancer* 2011; 2(2):95-107 DOI: 10.1177/1947601911408076.
4. Denis Kasper, Estefan Huser, et al. *Harrisons principles of internal medicine*. Mohammad Hossein Osareh. Tehran: arjmanr book, 1394
5. Martens, Joost HA, Henk G. Stunnenberg. "The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia." *FEBS letters*. 12(2010) ;584:2662-2669.
6. Kikushige, Yoshikane, et al. "TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells." *Cell stem cell* 7.6(2010) ; 708-717.
7. Natalia Sauer<sup>1</sup> · Natalia Janicka<sup>1</sup> · Wojciech Szlasa<sup>2</sup> · Bartłomiej Skinderowicz<sup>3</sup> · Katarzyna Kołodzińska<sup>3</sup> · Wioletta Dwernicka<sup>4</sup> · Małgorzata Oślizło<sup>2</sup> · Julita Kulbacka<sup>5,6</sup> · Vitalij Novickij<sup>5,7</sup> · Katarzyna Karłowicz-Bodalska<sup>8</sup> TIM-3 as a promising target for cancer immunotherapy in a wide range of tumors Received: 30 June 2023 / Accepted: 2 August 2023 / Published online: 11 August 2023 © The Author(s) 2023
8. Zhiding Wang<sup>1,2,3†</sup>, Jinghong Chen<sup>1†</sup>, Mengzhen Wang<sup>3</sup>, Linlin Zhang<sup>3</sup> and Li Yu<sup>1,3</sup> One Stone, Two Birds: The Roles of Tim-3 in Acute Myeloid Leukemia REVIEW published: 01 April 2021 doi: 10.3389/fimmu.2021.618710
9. Erhu Cao, Xingxing Za, Udupi A, James L, et al. AlmoT Cell Immunoglobulin Mucin-3 Crystal Structure Reveals a Galectin-9-Independent Ligand-Binding Surface. 2007; DOI 10.1016/j.immuni.
10. Richard A. Larson. Micro-RNAs and copy number changes: New levels of gene regulation in acute myeloid leukemia. *Chemico-Biological Interactions* 184 (2010) ;21-25.
11. Zheng Bi, Liang Li, Wang Chu, Huang She, Xi Cao, Ruopeng Zha, et al. MicroRNA-148a Suppresses Tumor Cell Invasion and Metastasis by Downregulating ROCK1 in Gastric Cancer. 2011; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1714
12. Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, Shengand H, Lai M. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death and Differentiation* 2011 ; 18:1702-1710.
13. Xiaojie Xu, Zhongyi Fan, Lei Kang, Juqiang Han, Chengying Ji, Xiaofei Zhe. Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2013; 123(2):630-645.

## بررسی میزان بیان lncRNA های *GAS5*، *NEATI* و *SRA* در سلول های MCF-7 ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب *pcDNA3.1(+)-Alpha toxin*

فروزان هادیان<sup>۱</sup>، رویا اکبری<sup>۲</sup>، مهدی شفیعی<sup>۲</sup>، مریم صفرپور دهکردی<sup>۳\*</sup>

۴. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۵. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۶. دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** سرطان در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلول ها و در اثر عوامل محیطی و اختلال های ژنتیکی به وجود می آید. تومور مجموعه ای از سلول هاست که به دلیل رشد و تقسیم خارج از کنترل آن ها ایجاد می شود. مطالعات اخیر نشان می دهد که چندین جایگاه خطر موثر در ایجاد سرطان، به lncRNA ها رونویسی می شوند و رونوشت های حاصل، نقش های کلیدی در فرایند تومورزایی ایفا می کنند. هدف از انجام این پژوهش بررسی تغییر بیان lncRNA های *SRA*، *NEATI* و *GAS5* بعد از تیمار سلول سرطان سینه با سم آلفاتوکسین باکتری / استافیلوکوکوس / اورئوس می باشد.

**مواد و روش ها:** پلاسمید نو ترکیب *pcDNA3(+)* حاوی ژن آلفاتوکسین به روش شوک حرارتی وارد باکتری *E. coli* سویه *TOP10* شد و سپس تخلیص شد. وکتور نو ترکیب حاوی ژن آلفاتوکسین به روش لیپوفکشن وارد سلول های MCF-7 شد و غربالگری توسط آنتی بیوتیک نئومایسین انجام گرفت. استخراج RNA و سنتز cdNA از سلول های ترانسفکت شده انجام شد. در نهایت real time RT-PCR به منظور بررسی تغییر بیان lncRNA های *SRA*، *NEATI* و *GAS5* انجام شد.

**نتایج:** پس از لیپوفکشن سلول ها در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین رشد کردند. سپس استخراج RNA و سنتز cdNA انجام شد. واکنش real time RT-PCR نشان داد که بیان ژن آلفاتوکسین در سلول های سرطان سینه رده MCF-7 سبب کاهش بیان lncRNA های *NEATI* و *SRA* نسبت به گروه شاهد و همچنین افزایش بیان *GAS5* شد. **نتیجه گیری:** با توجه به این که *GAS5* lncRNA باعث افزایش معنی دار بیان و lncRNA های *NEATI* و *SRA* کاهش بیان را نشان داده اند در نتیجه موجب اثرات ضد سرطانی می گردند و سلول را می توانند به سمت آپوپتوز هدایت کنند.

**واژگان کلیدی:** سرطان سینه، سم آلفاتوکسین، *GAS5*، *NEATI*، *SRA*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۳۸۲۳۶۳۸

پست الکترونیک: msafarpour84@yahoo.com

## Study of the expression of GAS5, NEAT1 and SRA lncRNAs in MCF-7 cells transfected with pcDNA3.1(+)-*Alpha toxin* recombinant vector

Forozan Hadiyan<sup>1</sup>, Roya Akbari<sup>2</sup>, Mahdi Shafie<sup>2</sup>, Maryam Safarpour-Dehkordi<sup>3\*</sup>

1. M.Sc. in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. B.Sc Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. PhD in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Cancer is the result of uncontrolled cell division and is caused by environmental factors and genetic disorders. A tumor is a collection of cells that are caused by their growth and division beyond their control. Cell death is a mechanism or set of genetically engineered events in which the cell is forced into suicide. The aim of this study was to investigate the change of expression of *SRA*, *NEAT1* and *GAS5* lncRNAs after treatment of breast cancer cells with *alpha toxin*.

**Materials and Methods:** The recombinant plasmid containing alpha toxin gene was introduced into the *E. coli* strain of *TOP10* by thermal shock method and then purified. The recombinant vector was introduced into the MCF-7 cells by lipofection method and screening was done by neomycin antibiotic. Extracting RNA and synthesizing cDNA from transfected cells. Finally, real time RT-PCR was performed to investigate the change of expression of *SRA*, *NEAT1* and *GAS5* lncRNA expressions.

**Results:** The expression of *alpha toxin* gene in MCF-7 breast cancer cells reduced the expression of *SRA*, *NEAT1* and *GAS5* lncRNA expressions compared to the control group.

**Conclusion:** The results indicate that the *alpha toxin* gene causes anticancer effects and leads the cell to apoptosis.

**Keywords:** Breast Cancer, *Alpha Toxin*, Gene Expression, lncRNA

### مقدمه

سرطان یک بیماری است که به رشد غیر قابل کنترل و گسترش سلول‌های غیرطبیعی شناخته می‌شود. سلول‌های سرطانی بر چرخه سلولی کنترلی ندارند و به طور مداوم به تکثیر ادامه می‌دهند. اگر این گسترش کنترل نشود به مرگ میزبان ختم می‌شود. بدون در نظر گرفتن عامل شروع کننده، گسترش بیماری از تغییری ژنتیکی در سلول یک بافت آغاز خواهد شد (۱). سرطان دومین عامل شایع مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و سومین عامل مرگ و میر در کشورهای کم توسعه یافته است (۲).

سرطان پستان طبق تقسیم بندی هیستوپاتولوژی به دو دسته تقسیم می‌شود. سرطان سینه مهاجم (اگر سرطان در بافت‌های نرمال رشد کند، می‌تواند توسط خون یا سیستم لنفی به بافت‌های دیگر منتقل شود. وقتی انتقال صورت گرفت به آن سرطان سینه متاستاتیک می‌گویند) و سرطان سینه غیر مهاجم (در این نوع سرطان، سلول‌های سرطانی فقط در داخل داکت‌ها و یا لوبول‌ها باقی می‌ماند و در بافت‌های نرمال درون سینه و یا پشت آن رشد نمی‌کند. سرطان سینه غیر مهاجم با نام‌های Pre-cancers و یا in situ نیز شناخته می‌شود). به صورتی که هر دسته شامل داکتال یا لوبولار است (۳). خطر مبتلا شدن به سرطان پستان با افزایش سن افزایش می‌یابد. برای مثال خطر مبتلا شدن به این بیماری بعد از سنین ۴۰-۵۰ سالگی افزایش می‌یابد (۴). تحقیقات نشان می‌دهد که این سن در کشور ما تقریباً ۱۰-۱۵ سال کمتر از سایر کشورهاست (۵).

مطالعات گسترده ترانس کریپتومیک ژنومی (مطالعه کل RNAهای کد شونده و غیر کد شونده) مشخص کرده است که رونویسی در ژنوم پستانداران به فراوانی انجام می‌شود، که حداقل ۸۰٪ این رونویسی به طور اختصاصی با lncRNAها ارتباط دارد. اگر چه lncRNAها اغلب به عنوان شی بازسازی شده کروماتینی نادیده گرفته می‌شوند اما مطالعات زیادی مشخص کرده است که lncRNAها به عنوان ژن‌های کد کننده پروتئینی کوچک عمل می‌کنند. اخیراً به نقش این RNAها در بیماری‌های پیچیده انسانی از جمله سرطان و بیماری‌های عصبی توجه بسیاری شده است. lncRNAها به‌طور کلی RNAهای غیر کد کننده بالای ۲۰۰

نوکلئوتید می‌باشند. lncRNAها بر خاموشی ژن، سیگنال‌های آدنیلایسیون و فاکتورهای مؤثر بر رونویسی اثر دارند. از جمله lncRNAها می‌توان به *GAS5*، *NEATI* و *SRA* اشاره کرد (۶ و ۷).

یکی از lncRNAهای شناخته شده توسط پژوهشگران *GAS5* نام دارد. ژن کد کننده این RNA غیر کد شونده در جایگاه 1q25 قرار گرفته است. *GAS5* در انسان ۱۲ اگزون دارد. در مطالعاتی که دانشمندان جهت بررسی تأثیر عملکرد *GAS5* در چرخه سلولی انجام داده‌اند دریافته‌اند که *GAS5* به عنوان یک سرکوبگر تومور فعالیت کرده و باعث توقف رشد سلول‌های توموری در فرد مبتلا به سرطان می‌شود (۸). یکی دیگر از lncRNAهایی که پژوهشگران در افراد مبتلا به سرطان بررسی کرده‌اند، *NEATI* است. ژن کد کننده این RNA غیر کد شونده بر روی کروموزوم شماره ۱۱ قرار گرفته است. این lncRNA یکی از تنظیم کننده‌های مسیر سیگنالی *Era* می‌باشد. در مطالعات اخیر دانشمندان متوجه شده‌اند که در افراد مبتلا به بیماری سرطان به خصوص سرطان پروستات *NEATI* از افزایش بیان بالایی برخوردار است و در نتیجه این مطالعات آن‌ها بیان کرده‌اند که در افراد مبتلا به سرطان پروستات *NEATI* باعث تشدید روند بیماری‌زایی شده است و به عنوان یک آنکوژن فعالیت می‌کند (۹). یک نمونه دیگر از lncRNAها *SRA* است که در پاتوژنز تومور نقش دارد. جایگاه ژنتیکی این RNA، 5q31.3 می‌باشد و شامل ۵ اگزون و ۴ اینترون است. مقدار این lncRNA در سرطان پستان افزایش می‌یابد (۱۰).

لاین سلولی MCF-7 از مایع جنب یک زن ۶۹ ساله دارای مورفولوژی شبه اپی‌تللیال تهیه شده است که از ویژگی‌های آن می‌توان به سنتز استرادیول اشاره کرد. محیط کشت این لاین سلولی (EBSS) DEMEM به همراه ۱۰ درصد FBS رشد می‌کند. البته این لاین سلولی در محیط کشت RPMI +10% FBS نیز سازگار است که در بانک سلولی ایران کد آن C135 است، خصوصیات این لاین سلولی جهت تشخیص در بررسی ایزو آنزیمی *G6PD*، *LDH* ثبت شده است (۱۱).

در یک قرن گذشته محققان از سموم باکتریایی برای درمان سرطان بهره برده‌اند. آن‌ها به این نتیجه رسیده‌اند که عفونت باکتریایی این توانایی را دارد که به طور ناخواسته برخی سرطان‌ها را درمان کند. سمومی که توسط باکتری تولید می‌شوند، می‌توانند باعث از بین رفتن تومور بشوند و توانایی درمان سرطان را دارا می‌باشند. با استفاده از این سموم می‌توان برای سرطان واکسن تولید کرد (۱۲).

عامل اصلی سیتوتوکسیته که توسط استافیلوکوکوس اورئوس تولید می‌شود آلفاتوکسین است. به عنوان اولین اگزوتوکسین‌ها معرفی می‌شود. ژن آلفاتوکسین اولین بار به دست Kehoe و همکاران کلون و تعیین توالی شد و پروتئینی با ۲۹۳ اسید آمینه است و پروتئینی آب دوست می‌باشد. ژن این توکسین به صورت یک کپی در ژنوم باکتریایی واقع شده است. این توکسین عمدتاً (۶۸ درصد) ساختار B-sheet و ندرتاً (۱۰ درصد) ساختار a-helix دارد. تحقیقات اخیر نشان داده است که سم آلفاتوکسین در سلول‌های اپی‌تللیالی سبب افزایش آپوپتوز می‌شود (۱۳).

هدف از این تحقیق بررسی اثرات ژن *Alpha toxin* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر بیان lncRNAهای *GAS5*، *NEATI* و *SRA* در سلول‌های MCF-7 ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+)-*Alpha toxin* به روش real time RT-PCR می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

**سلول مورد استفاده:** سلول‌های رده سلولی MCF-7 از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه شد. ابتدا محیط کشت RPMI 1640 (مرک، آلمان) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS)، پنی سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آماده شد. سپس در انکوباتور (ممرت، آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفت. سلول‌های MCF-7 از فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد خارج شدند. پس از آن که محتویات کاربوتیب ذوب شدند، مواد ذوب شده به فالكون ۱۵ منتقل شدند. سپس به میزان ۳ میلی لیتر محیط کشت حاوی 10% FBS و Pen-strep درون فالكون ۱۵ به آن افزوده شد و فالكون به مدت ۵ دقیقه در شرایط 1200rpm سانتریفیوژ

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی با ۱ میلی لیتر محیط کشت مخلوط شد و داخل فلاسک ۲۵ (بیوفایل، چین) حاوی محیط کشت قرار داده شد. فلاسک به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ و غلظت دی‌اکسید کربن ۵٪ قرار داده شد.

**وکتورها:** در این پژوهش از پلاسمید نوترکیب (+)pcDNA3.1 حامل ژن نوترکیب آلفاتوکسین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و همینطور پلاسمید (+)pcDNA3.1 بدون ژن خارجی که از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد تهیه شدند، استفاده گردید.

**ترانسفورماسیون:** پس از تهیه سلول مستعد، ترانسفورماسیون به این ترتیب انجام می‌شود. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سلول مستعد داخل تیوب ۱/۵ ریخته شد و ۵ نانوگرم پلاسمید به آن افزوده شد. تیوب به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه بر روی آب یخ قرار داده شد. بعد از آن به مدت ۹۰ ثانیه با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به تیوب گرما داده شد. سپس ۳-۵ دقیقه روی آب یخ قرار داده شد. در کنار شعله ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB-Broth به آن افزوده شد. درب تیوب با استفاده از پارافیلیم بسته شد و یک ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی روی محیط کشت LB-Agar دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (مرک، آلمان)، کشت داده شد. پلیت (بیوفایل) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای اطمینان از درستی انجام کار یک پلیت به عنوان کنترل منفی قرار گرفت که در این پلیت پلاسمیدی وارد نشد. بعد از ۲۴ ساعت تک کلونی‌های رشد کرده به شکل ماتریکس در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، کشت داده شدند. پلیت ماتریکس ۱۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

**لیپوفکشن:** سلول‌های MCF-7 رشد یافته با وکتور نوترکیب دارای ژن و فاقد ژن سم، ترانسفکت شد. برای ترانسفکت این سلول‌ها از روش لیپوفکشن استفاده شد. برای این کار، ۲۴ ساعت محیط کشت تمام خانه‌ها تخلیه شد و خانه‌ای که به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود با ۰/۵ میلی‌لیتر PBS شستشو و پس از آن تخلیه شد و مقدار ۳ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI حاوی FBS 10% و Pen-strep اضافه شد. به خانه‌هایی که برای انجام لیپوفکشن انتخاب شده بودند ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI خام افزوده و شستشو داده شد و تخلیه گردید. پس از آن مقدار ۲ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI خام افزوده و ۳۰ تا ۴۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. محیط کشت تخلیه شد و شستشو با ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI خام تکرار شد. پس از آن تقریباً ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت خام که تنها روی سلول‌ها را پوشاند به خانه نمونه اضافه شد. همزمان با این مرحله ۲ میکرولیتر از محلول لیپوفکتامین با ۹۸ میکرولیتر از محیط کشت خام مخلوط شد و ۲ میکروگرم از هر کدام از پلاسمید نوترکیب و پلاسمید فاقد ژن (شاهد) به صورت جداگانه با محیط کشت خام به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسید. سپس محلول لیپوفکتامین و محلول آماده سازی شده‌ی پلاسمید با هم به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند و به خانه نمونه افزوده شد و پلیت ۴-۶ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از این مدت به خانه نمونه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI حاوی FBS 10% و فاقد آنتی‌بیوتیک افزوده و پلیت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت.

در این تحقیق از روش PCR و هضم آنزیمی برای تایید صحت سازواره نوترکیب استفاده شد. برای انجام هضم آنزیمی از آنزیم‌های EcoRV/BamHI که دو طرف ژن طراحی شده استفاده شد. مخلوطی شامل ۲ میکرولیتر (+)pcDNA3.1-a toxin، ۲ میکرولیتر بافر Tango 2x، ۱/۵ میکرولیتر آنزیم BamHI، ۱/۵ میکرولیتر آنزیم EcoRV و ۱۳ میکرولیتر آب به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. سپس این مخلوط به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز شد.

**استخراج RNA:** برای استخراج RNA از کیت استخراج RNA (سیناژن، ایران) استفاده شد. استخراج RNA طبق پروتکل کیت مورد استفاده انجام گرفت.

**سنتز cDNA:** به منظور تولید cDNA از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) استفاده گردید. نمونه‌ی RNA تخلیص شده از مرحله قبل حدود ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر تشخیص داده شد و طبق پروتکل کیت میزان ۵ میکرولیتر از نمونه برای ساخته شدن ۵۰۰ نانوگرم از RNA به میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتر افزوده شد. میزان ۱ میکرولیتر از پرایمر Random Hexamer (۷۴ نانومول) (Genray، چین) به میکروتیوب افزوده شد و حجم محیط واکنش توسط DEPC-treated water به ۱۳/۴ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط ایجاد شده بعد از spin به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس روی یخ قرار داده شد. پس از آن دوباره spin شد و دوباره روی یخ قرار گرفت. میزان ۴ میکرولیتر 5x first-strand buffer، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر RNasin (۴۰ واحد بر میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر M-MLV (۲۰۰ واحد بر میکرولیتر) به تیوب افزوده و Spin صورت گرفت. مخلوط ایجاد شده ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

**PCR:** برای اثبات درستی cDNA سنتز شده، ابتدا RCR با پرایمرهای ژن *GAPDH* صورت گرفت. پس از آن برای تعیین دمای دقیق Anneling پرایمرها ابتدا PCR با پرایمرهای مناسب انجام گرفت. (جدول ۱) به این منظور مخلوطی شامل ۷ میکرولیتر PCR Master Mix (۱/۵ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward (۰/۳ نانومول)، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse (۰/۳ نانومول)، ۴ میکرولیتر آب تزریق و ۲ میکرولیتر DNA به حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر تهیه شد. سپس در میکرولیتر ۰/۲ میلی لیتری مخلوط شد و در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت.

برنامه دمایی PCR در چهار مرحله صورت گرفت. مرحله اول ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم شامل ۳۲ چرخه سه قسمتی بود. قسمت اول ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، قسمت دوم ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و قسمت سوم ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه بود. مرحله سوم ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و مرحله چهارم ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. سپس بررسی محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ صورت گرفت.

پس از ساخت ژل ۱٪ آگارز و قرار گیری آن در تانک حاوی بافر TBE 10x (مرک، آلمان)، نمونه‌ها در هر چاهک ژل ریخته شدند و یکی از چاهک‌ها با DNA ladder 1000bp (سیناژن، ایران) قرار گرفت و ۵ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ و ۲۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ران شدند و پس از پایان این زمان ژل در زیر نور UV مشاهده شد.

**Real time PCR:** برای بررسی مقدار تغییرات بیان در ژن *GAS5*، *NEAT1* و *SRA* در سلول‌های رده سلولی MCF-7 در دو سلول ترانسفورم شده و شاهد از جفت پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده برای انجام real time PCR استفاده شد. همچنین از پرایمرهایی برای بررسی میزان تغییر بیان ژن خانه‌دار *GAPDH* به عنوان ژن رفرنس استفاده گردید. سپس ۰/۴ میکرولیتر پرایمر F (۰/۳ نانومول)، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر R (۰/۳ نانومول)، ۴/۷ میکرولیتر ddH<sub>2</sub>O، ۷/۵ میکرولیتر SYBER Green master mix و ۲ میکرولیتر cDNA را با هم مخلوط کرده و درون دستگاه قرار گرفت.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

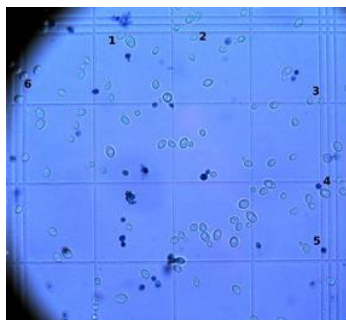
Gene	Primer sequence	Anneling Temperatur	Size bp
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i> -F: 5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3' <i>GAPDH</i> -R: 5'-GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC-3'	64	183
<i>NEAT1</i>	<i>NEAT1</i> -F: 5'-CTGGTCTTGTGGAAGTGAAGTACTAGC-3' <i>NEAT1</i> -R: 5'-AACTCCACATCACTCCTCAGACCAC-3'	65	184
<i>GAS5</i>	<i>GAS5</i> -F: 5'-ATTGGCACACAGGCATTAGACAG-3' <i>GAS5</i> -R: 5'-CTTCTTTAAACTTGCTCCACACAG-3'	64	206
<i>SRA1</i>	<i>SRA1</i> -F: 5'-AGCCCACAAGTTTCCCAGTCG-3' <i>SRA1</i> -R: 5'-GGTATTGACAACCTTTCCTCCAGCC-3'	65	172
<i>Alpha-Toxin</i>	<i>Alpha-Toxin</i> -F: 5'- ACACTGCTGCTCGGCCTCCATTC-3' <i>Alpha-Toxin</i> -R: 5'- ATGGTGCCCTTTGTGCGAATC-3'	64	227



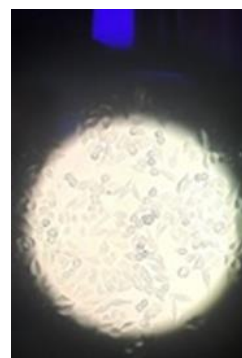
آنالیز آماری: با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری t بیا IncRNAهای *GAS5*، *NEAT1* و *SRA* بررسی و مقایسه گردید. اگر  $P\text{-Value} \leq 0/05$  باشد، تفاوت داده‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب می‌شود.

### یافته‌ها

نتایج کشت و شمارش سلول‌ها: کشت سلول‌های رده MCF-7 تا چندین پاساژ ادامه یافت (شکل ۱) و بخشی از سلول‌ها، با انجماد در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با کاربرد تریپسین، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام نئوبار برده شد و شمارش صورت گرفت. میزان ۳۰۰۰۰۰ سلول که برابر ۸۲ میکرولیتر بود، درون چاهک‌های پلیت ۶ خانه seed شد (شکل ۲).

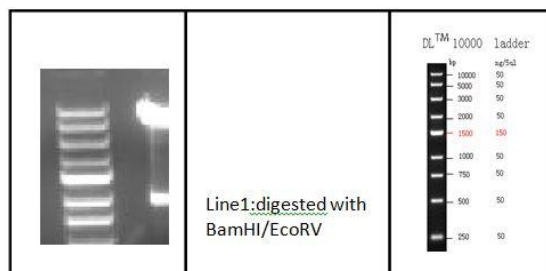


شکل ۲- شمارش سلولی توسط لام نئوبار



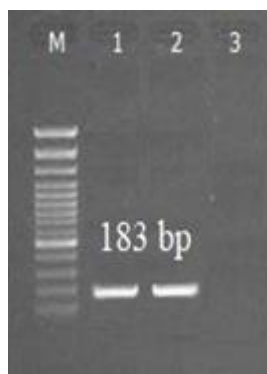
شکل ۱- کشت سلول‌های MCF-7

نتایج تأیید صحت پلاسمید: پلاسمیدهای نوترکیب (*pcDNA3.1(+)-Alpha toxin*) و پلاسمید فاقد ژن هدف (کنترل) برای تأیید حضور یا عدم حضور ژن آلفا توکسین مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن آلفا توکسین روی پلاسمید نوترکیب، سبب تشکیل باند ۲۲۷ جفت بازی شد. در صورتی که در مورد پلاسمید فاقد ژن هدف، این باند تشکیل نشد. نتایج هضم آنزیمی با دو آنزیم *BamHI* و *EcoRV* (ترموفیشر، آمریکا) در شکل ۳ ملاحظه می‌شود. در این قسمت، پس از انجام هضم آنزیمی روی پلاسمید نوترکیب، دو باند تشکیل شد. باند کوچکتر به اندازه ۹۶۳ مربوط به ژن آلفا توکسین و باند بزرگتر به اندازه ۵۴۲۸، مربوط به وکتور بود که روی ژل قابل مشاهده است (شکل ۳). علاوه بر آن، نتایج تعیین توالی وکتور نوترکیب، نشان دهنده صحت توالی کلون شده بود.



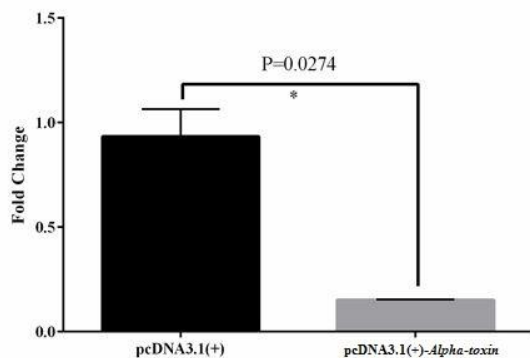
شکل ۳- هضم آنزیمی وکتور *pcDNA3.1(+)* حاوی ژن آلفاتوکسین. باند سنگین ۵۴۲۸ جفت بازی مربوط به وکتور و باند ۹۶۳ جفت باز مربوط به ژن آلفاتوکسین است.

نتایج تأیید کارایی cDNA سنتز شده: بعد از ساخت cDNA، صحت سنتز به کمک واکنش PCR تأیید شد. نتایج انجام PCR روی ژن *GAPDH*، سبب تشکیل باند ۱۸۳ جفت بازی گردید (شکل ۴).

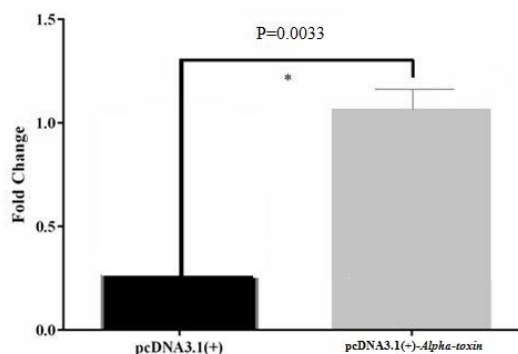


شکل ۴- بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR. چاهک ۱ و ۲ باند ۱۸۳ جفت بازی مربوط به ژن *GAPDH* پس از واکنش PCR بر روی cDNA سنتز شده، چاهک ۳ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

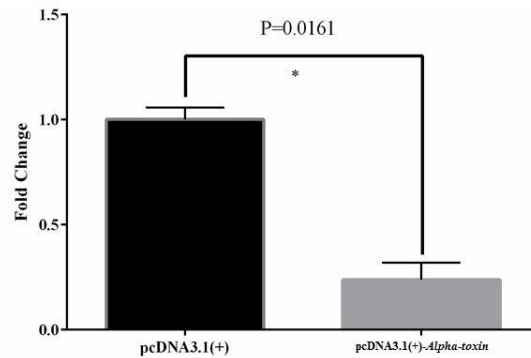
**نتایج بررسی بیان ژن:** پس از سنتز cDNA، واکنش real time RT-PCR برای lncRNAهای *GAS5*، *NEAT1* و *SRA* به کمک پرایمرهای اختصاصی آنها انجام شد. نتایج آنالیز آماری مربوط به lncRNAهای *GAS5*، *NEAT1* و *SRA* توسط نرم افزار SPSS به دست آمد. برای انجام این آنالیز، Ct هر نمونه به صورت جداگانه برای انجام آنالیز آماری و به دست آوردن تغییر بیان ژن یادداشت شد. بعد از نرمالیزه کردن داده‌ها با ژن خانه‌دار و به دست آوردن مقدار بیان، برای نرم افزار تعریف می‌شود و در آخر نتایج به صورت نمودار قابل رؤیت می‌باشد. در این آنالیز تغییر بیان هر سه lncRNA معنی‌دار بوده است. همچنین P Value قابل قبول بوده است. نتیجه می‌گیریم که در اثر بیان ژن سم آلفاتوکسین باکتری / استافیلوکوکوس اورئوس، سلول به سمت آپوپتوز پیش رفته است. میزان تغییر بیان در نمودارهای زیر (شکل ۵ و ۶ و ۷) نشان داده شده است.



ی lncRNA بیان *NEAT1* شکل ۶- آنالیز آماری در سلول‌های ترنسفکت شده با ژن سم *NEAT1* آلفاتوکسین به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد  $P=0.0274$  کاهش یافته است )



ی lncRNA بیان *GAS5* شکل ۵- آنالیز آماری در سلول‌های ترنسفکت شده با ژن سم *GAS5* آلفاتوکسین به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد



ی IncRNA بیان *SRA* شکل ۷-۷ آنالیز آماری  
در سلول‌های ترنسفکت شده با ژن سم *SRA*  
آلفاتوکسین به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد  
( $P=0.0161$  کاهش یافته است)

### بحث

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ و میر فراوانی در بین افراد می‌شود و علیرغم پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته است کماکان سردسته علل مرگ به علت سرطان در بین زنان است (۱۴). در این پژوهش که در ارتباط با رده سلولی MCF-7 انجام شد پلاسمید نوترکیب (+)pcDNA.31 حاوی ژن آلفاتوکسین به روش شوک حرارتی وارد باکتری *E.coli* سویه *TOP10* شد. وکتور نوترکیب حاوی ژن آلفاتوکسین به روش لیپوفکشن وارد سلولهای MCF-7 شد. در نهایت RT-PCR real time به منظور بررسی تغییر بیان *lncRNA* های *SRA*، *NEATI* و *GAS5* انجام شد. در این پژوهش به این نتیجه دست یافتیم که بیان ژن آلفاتوکسین در سلول‌های سرطان سینه رده MCF-7 باعث کاهش بیان *lncRNA* های *NEATI* و *SRA* و همین‌طور افزایش بیان *GAS5* شد.

Reiter در سال ۲۰۰۱ در مقاله تحقیقی، یکی از روش‌های جدید سرطان، یعنی تحویل هدف‌دار مواد سمی به سلول‌های سرطانی را بیان می‌کند. در این پژوهش گفته می‌شود که سلول‌های سرطانی گیرنده‌های سطحی دیگری را بروز می‌دارند که آن‌ها را از سلول‌های اطراف خود متفاوت می‌کند. یکی از روش‌های جدید، از بین بردن سلول‌های سرطانی با استفاده از سموم گیاهی و باکتریایی است. این پژوهش از نظر استفاده از سموم باکتریایی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی به تحقیقات ما شباهت دارد (۱۵).

پیکارد و همکارانش در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی عملکرد و تغییرات بیان *GAS5* در افراد مبتلا به سرطان پستان و تاثیر آن در روند شیمی درمانی تحقیقاتی انجام دادند. یکی از ۳ رده سلولی انتخابی در این تحقیقات MCF-7 بود و روش پیشنهادی این پژوهشگران برای بررسی بیان *GAS5* تکنیک RT-qPCR بود. در این مطالعه میزان بیان *GAS5* در ۲۳۱ نمونه بیمار بررسی گردید. در نتیجه این مطالعات مشخص شد که افزایش بیان *GAS5* در سلول موجب عملکرد بهتر درمان از طریق روش شیمی درمانی شده و پاسخ به داروها در این سلول‌ها بهتر بوده است. این مطالعه از این نظر که بر روی میزان بیان *GAS5* در رده سلولی MCF-7 تحقیق می‌کند به کار ما شباهت دارد. همین‌طور مانند کار ما به این نتیجه رسیده است که افزایش بیان *GAS5* در روند درمان سرطان نقش دارد (۱۶).

Ke و همکارانش در سال ۲۰۱۶ روی بررسی ارتباط بیان *NEATI* و miR-548 در افراد مبتلا به سرطان پستان تحقیقاتی انجام دادند. در این تحقیقات آن‌ها از رده سلولی MCF-7 استفاده کردند. روش پیشنهادی این محققان در این مطالعه تکنیک RT-qPCR بود. در نتیجه این آزمایشات آن‌ها نتیجه گرفتند که افزایش بیان miR-548 در بیماران مبتلا به سرطان پستان باعث

کاهش بیان *NEATI* شده و نهایتاً منجر به القای آپوپتوز و مرگ سلول سرطانی در این افراد می‌شود. در این پژوهش همانند کار ما بیان *NEATI* کاهش یافت و سلول به سمت آپوپتوز هدایت شد (۱۷).  
Eoh و همکارانش تحقیقاتی در مورد ارتباط *lncRNA-SRA* با مسیر سیگنالی *NOTCH* در افراد مبتلا به سرطان دهانه رحم، در سال ۲۰۱۷ انجام دادند. روش این محققان برای بررسی تغییرات بیان *SRA* تکنیک *RT-qPCR* بود. پس از انجام تحقیقات آن‌ها به این نتیجه رسیدند که افزایش بیان *SRA* باعث تشدید فعالیت مسیر سیگنالی *NOTCH* شده و سبب افزایش تهاجم و مهاجرت در سلول‌های سرطانی می‌شود. در این صورت می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که *SRA* در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم نقش آنکوژن ایفا می‌کند. این مطالعه از آنجایی که بر روی میزان بیان *SRA* در بیماران مبتلا به سرطان تحقیق می‌کند به کار ما شباهت دارد (۱۸).

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز آماری و همینطور مشاهدات میکروسکوپی کشت سلولی، می‌توان اینگونه اعلام کرد که ژن سم آلفاتوکسین پس از انجام فرآیند لیپوفکشن، درون سلول‌های سرطانی بیان می‌شود و بر روی رشد و نمو سلول و همین‌طور القای آپوپتوز سلولی مؤثر است. بر اساس نتایج آماری این پژوهش، بیان ژن سم *Alpha toxin* در سلول‌های سرطان سینه رده *MCF-7* سبب تغییر معنی‌داری در بیان *lncRNA GAS5*، *NEATI* و *SRA* می‌شود که بر طبق تغییر بیان *lncRNA*‌های ذکر شده می‌توان این مطلب را بیان کرد که منجر به القای آپوپتوز و حذف توده‌ی توموری می‌شود.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، بخصوص سرکار خانم فرانک عالی و آقای علیرضا نوید که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند.

### References:

1. Doosti A, Zamani M, Ghasemi Dehkordi P, Taheri S, Banitalebi M, et al. Association of the p53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in South West of Iran. *Scientific Research and Essays*. 2011; 6 (15): 3148-3152.
2. Chen YC, David J. Hunter MD. *Molecular Epidemiology of Cancer*. CA Cancer J Clin. 2005; 55: 45-54.
3. O'Leary R, Hawkins K, Beazley JCS, Lansdown MRJ, Hanby AM. Agreement between preoperative core needle biopsy and postoperative invasive breast cancer histopathology is not dependent on the amount of clinical material obtained. *J Clin Pathol*. 2004; 57(2): 193-195.
4. Shamsa AZ, Mohagheghi AM. Final report of the national project for cancer registry. *Islamic Institute*. 2007; 43: 432-437.
5. Mousavi SM. Breast cancer in iran epidemiological review. *Breast J*. 2007; 13(4): 383-391.
6. Washietl S, Hofacker IL, Lukasser M, Huttenhofer A, Stadler PF. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 1383-1390.
7. Furuno M, Pang KC, Ninomiya N, Fukuda S, Frith MC, et al. Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genet*. 2006; 2(4): e37.

8. Pickard MR, Mourtada-Maarabouni M, Williams GT. Long non-coding RNA *GAS5* regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013; 1832(10): 1613-23.
9. Chakravarty D, Sboner A, Nair SS, Giannopoulou E, Li R, et al. The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA *NEATI* is a critical modulator of prostate cancer. *NAT COMMUN*. 2014; 5(3): 5383.
10. Yan R, Wang K, Peng R, Wang S, Cao J, et al. Genetic variants in lncRNA *SRA* and risk of breast cancer. *Oncotarget*. 2016; 19; 7(16): 22486–22496.
11. Soule HD, Vazquez J, Long A, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Nat Cancer Inst*. 1973; 51: 1409.
12. Heidari M, Doosti A. Staphylococcus aureus enterotoxin type B (*SEB*) and *Alpha-toxin* induced apoptosis in KB cell line. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*. 2023; 11(2): 96-102.
13. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. Staphylococcus aureus *α-Toxin*: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins*. 2013; 5(6): 1140-1166.
14. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *JNCI*. 2011; 103(3): 250-263.
15. Reiter Y. Recombinant immunotoxins in targeted cancer cell therapy. *Adv Cancer Res*. 2001; 81: 93-124.
16. Pickard MR, Mourtada-Maarabouni M, Williams GT. Long non-coding RNA *GAS5* regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013; 1832(10):1613-23.
17. Ke H, Zhao L, Feng X, Xu H, Zou L, et al. *NEATI* is required for survival of breast cancer cells through *FUS* and miR-548. *Gene regulation and systems biology*. 2016; 127(8): 1785-94.
18. Eoh KJ, Paek J, Kim SW, Kim HJ, Lee HY, et al. Long non-coding RNA, steroid receptor RNA activator (*SRA*), induces tumor proliferation and invasion through the *NOTCH* pathway in cervical cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2017; 38(6): 3481-8.

## اثر سطوح مختلف کوآنزیم Q10 بر سیستم ایمنی و بیان ژن میوستاتین بلدرچین ژاپنی

فرشید خیری<sup>۱\*</sup>، محمد امیدی زاده<sup>۲</sup>، مصطفی فغانی<sup>۳</sup>

۱. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. فارغ‌التحصیل دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** کوآنزیم Q10 یک ماده نسبتاً محلول در چربی و شبه ویتامین بوده که عمدتاً در میتوکندری سلول‌های یوکاریوت‌ها تولید می‌شود. این ماده به طور کارآمدی از اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها جلوگیری نموده و به طور مستمر توسط سیستم‌های احیا کننده بازسازی می‌شود. یوبی کوینون که فرم احیا شده آن می‌باشد، می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم در مراقبت از مولکول‌های غشاهای سلولی از اکسیداسیون عمل کند. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی کوآنزیم Q10 بر عملکرد برخی فراسنجه‌های خونی، سیستم ایمنی و خواص ارگانولپتیک و توسعه دستگاه گوارش جنس نر بلدرچین ژاپنی می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** به منظور بررسی اثر سطوح مختلف کوآنزیم Q10 بر سیستم ایمنی، بیان ژن میوستاتین و توسعه دستگاه گوارش بلدرچین‌های ژاپنی آزمایشی با استفاده از ۶۰۵ قطعه بلدرچین ژاپنی یک روزه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۱ تیمار و پنج تکرار از سن ۱ تا سن ۳۵ روزگی انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد منفی (جیره پایه فاقد ویتامین E)، شاهد (جیره پایه)، شاهد مثبت (جیره پایه مکمل شده با ۱۰۰ واحد بین المللی ویتامین E) و سطوح ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰، ۱۰۵ و ۲۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوآنزیم Q10 در جیره بودند. همچنین تیتراژ آنتی‌بادی علیه واکسن نیوکاسل و آنفولانزا و همچنین سوسپانسیون گلبول قرمز خون گوسفند (SRBC) در سن ۳۰ روزگی اندازه‌گیری شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان دادند با افزایش سطح کوآنزیم Q10 در جیره، تیتراژ آنتی‌بادی علیه نیوکاسل و آنفولانزا و همچنین SRBC به صورت معنی‌داری افزایش ( $P < 0/01$ ) یافت. غلظت گلبول‌های سفید و قرمز خون در بلدرچین‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی کوآنزیم Q10 نسبت به تیمار شاهد منفی بیشتر ( $P < 0/01$ ) بود. بیان ژن میوستاتین در پرندگان تغذیه شده با جیره پایه حاوی ۱۰۰ واحد بین المللی ویتامین E در مقایسه با بلدرچین‌های تغذیه شده با جیره پایه بدون ویتامین E یا سطح ۲۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، کوآنزیم Q10 بیشتر ( $P < 0/01$ ) بود.

**نتیجه‌گیری:** در این آزمایش مصرف کوآنزیم Q10 به دلیل ایفای نقش در زنجیره انتقال الکترون و تولید انرژی بیشتر به شکل ATP باعث بهبود صفات مورد بررسی شد. در نتیجه کوآنزیم Q10 می‌تواند جایگزین ویتامین E از نظر پاسخ ایمنی شود.

**واژگان کلیدی:** کوآنزیم Q10، ویتامین E، ژن میوستاتین، پاسخ ایمنی.

\*نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۳۱۱۴۹۱۷۲

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: f.kheiri@gmail.com

## the Effect of different levels of coenzyme Q10 on the immune system and myostatin of Japanese gene quail

Farshid Kheiri<sup>1\*</sup>, Mohammad Omidi Zadeh<sup>2</sup>, Mostafa Faghani<sup>3</sup>

1. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Ph. D, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

**Background:** Coenzyme Q10 is a relatively fat-soluble and vitamin-like substance that is mainly produced in the mitochondria of eukaryotic cells. This substance effectively prevents the oxidation of lipids and proteins and is continuously regenerated by regenerative systems. Ubiquinone, which is its reduced form, can act as an important antioxidant in protecting cell membrane molecules from oxidation. Therefore, the purpose of this research is to investigate the antioxidant role of coenzyme Q10 on the function of some blood parameters, immune system, organoleptic properties and development of the digestive system of male Japanese quail.

**Materials and Methods:** In order to investigate the effect of different levels of coenzyme Q10 on the immune system, myostatin gene expression and the development of the digestive system of experimental Japanese quails using 605 one-day-old Japanese quails in a completely randomized design with 11 treatments and five replications from the age of 1 to It was done at 35 days of age. Experimental treatments included the negative control group (basic diet without vitamin E), control (basic diet), positive control (basic diet supplemented with 100 international units of vitamin E) and levels of 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 210 mg/kg of coenzyme Q10 in the diet. Antibody titers against Newcastle and influenza vaccine as well as sheep red blood cell suspension (SRBC) were measured at the age of 30 days.

**Results:** The results showed that by increasing the level of coenzyme Q10 in the diet, the antibody titer against Newcastle and influenza as well as SRBC increased significantly ( $P < 0.01$ ). The concentration of white and red blood cells in quail fed diets containing coenzyme Q10 was higher than the negative control treatment ( $P < 0.01$ ). Myostatin gene expression was higher in birds fed basal diet containing 100 international units of vitamin E compared to quails fed basal diet without vitamin E or 210 mg/kg level, coenzyme Q10 ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** In this experiment, the consumption of coenzyme Q10 improved the examined traits due to its role in the electron transport chain and the production of more energy in the form of ATP. As a result, coenzyme Q10 can replace vitamin E in terms of immune response.

**Keywords:** coenzyme Q10, vitamin E, myostatin gene, immune response.

### مقدمه

امروزه پرورش طیور با عوامل استرس‌زای مختلف نظیر ازدحام، تهویه نامناسب، واکسیناسیون، بیماری، تغییرات دمایی و... مواجه است. این عوامل باعث تضعیف سیستم ایمنی و تغییر در عملکرد غدد درون ریز، متابولیسم مواد مغذی، جمعیت میکروبی و ریخت شناسی روده می‌شود. همچنین عوامل تنش‌زا، منجر به واکنش‌های اکسیداتیو می‌شوند و واکنش‌های اکسیداتیو با تولید رادیکال‌های آزاد، سبب فساد اکسیداتیو و کاهش کیفیت لاشه می‌گردند. واکنش‌های اکسیداتیو طی فرایند و ذخیره سازی، منجر به ایجاد تغییرات نامطلوب در گوشت می‌گردند (۱). جهت محافظت در برابر تنش‌های اکسیداتیو، موجودات زنده سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی دارند که شامل ترکیبات سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند (۲).

کوآنزیم Q10 یک ماده نسبتاً محلول در چربی و شبه ویتامین است که در سلول‌های اکثر یوکاریوت‌ها و عمدتاً میتوکندری سلول‌ها تولید می‌شود و برای عملکرد سلول‌ها ضروری است. کوآنزیم Q10 از اجزای زنجیره انتقال الکترون بوده و در تنفس هوازی سلولی و تولید انرژی به صورت ATP شرکت می‌کند. ارگان‌هایی که نیاز بیشتر به انرژی دارند (قلب و کبد) بیشترین میزان کوآنزیم Q10

را دارند و این کوآنزیم به دلیل نقشی که در انتقال الکترون دارد، خنثی کننده رادیکال آزاد می‌باشد (۳). کوآنزیم Q10 به طور کارآمدی از اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها جلوگیری نموده و به طور مستمر توسط سیستم‌های احیا کننده بازسازی می‌شود. یوبی‌کوینون شکل احیا شده کوآنزیم Q10 است که می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم در مراقبت از مولکول‌های غشاهای سلولی از اکسیداسیون عمل کند (۲ و ۴). بنابراین هدف از این پژوهش بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی کوآنزیم Q10 بر عملکرد برخی فراسنجه‌های خونی، سیستم ایمنی و خواص ارگانولپتیک و توسعه دستگاه گوارش جنس نر بلدرچین ژاپنی بود.

### مواد و روش‌ها

از ۶۰۵ قطعه جوجه بلدرچین ژاپنی یک روزه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۱ تیمار و ۵ تکرار و تعداد ۱۱ قطعه در هر تکرار استفاده شد. آزمایش تا سن ۳۵ روزگی ادامه یافت. تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد منفی (جیره پایه فاقد ویتامین E)، شاهد (جیره پایه)، شاهد مثبت (جیره پایه حاوی ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E) و سطوح ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰، ۱۰۵، ۲۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوآنزیم Q10 بود. خوراک مصرفی بر پایه ذرت و کنجاله سویا بر اساس توصیه انجمن علمی تحقیقات آمریکا (NRC1994) توسط نرم افزار UFFDA تنظیم شد و کوآنزیم Q10 به صورت افزودنی به جیره پایه اضافه شد (جدول ۱). جوجه‌ها در طول دوره آزمایش به صورت آزادانه به آب و خوراک دسترسی داشتند و برنامه نوردی در طول دوره ۲۳ ساعت روشنایی و ۱ ساعت خاموشی بود. واکسیناسیون جوجه‌ها در برابر نیوکاسل و آنفلانزا در سن ۹ روزگی انجام شد و سپس به منظور مطالعه تیترا واکسیناسیون دوگانه در ۳۰ روزگی، خونگیری انجام شد. تیترا آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن ویروس بیماری آنفلانزا و نیوکاسل به روش HI انجام شد (۵). برای اندازه‌گیری میزان پاسخ اولیه، تیترا آنتی‌بادی به تزریق گلبول قرمز شسته شده گوسفندی (SRBC) در ۲۵ روزگی، ۲ قطعه پرندۀ از هر تکرار مشخص و مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر SRBC ۱ درصد در ماهیچه سینه تزریق شد. پس از یک هفته خونگیری انجام شده و پس از جدا کردن سرم میزان تیترا آنتی‌بادی سرم اندازه‌گیری شد (۶). استخراج mRNA از تمام نمونه‌ها با روش دستی طبق پروتوکول Roche توسط تریبیور انجام گردید. با استفاده از روش اسپکتروفتومتر و ژل آگارز یک درصد، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. mRNAهای استخراج شده از نظر کمیت و کیفیت یک دست نبودند، به طوری که بعد از بار گذاری نمونه‌ها در ژل آگارز در بعضی از نمونه‌ها باند شارپ و در بعضی از نمونه‌های دیگر باندهای ضعیف مشاهده شدند. نمونه‌هایی که باندهای خیلی ضعیف نشان می‌دادند، مورد استخراج مجدد قرار می‌گرفتند. پر رنگ بودن باندها، دلیل بر غلظت بالای mRNA استخراجی بود. تعیین خلوص mRNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ، نتایج حاصل از ژل آگارز را تأیید کرد. برای تأیید سنتز cDNA از mRNA استخراج شده، واکنش PCR با پرایمر ژن مرجع انجام شد، زیرا ژن مرجع به عنوان یک ژن کنترل بوده و در همه نمونه‌ها و سلول‌ها بیان می‌شود. کیفیت و کمیت تمامی نمونه‌ها بعد از استخراج به روش دستی، توسط نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت و سپس برای هر ژن توسط پرایمر و پروب مخصوص آن ژن، واکنش RT-PCR انجام شد. در پایان داده‌های جمع‌آوری شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹.۱ و رویه GLM آنالیز گردید و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن (۸) در سطح (p<۰/۰۱) انجام پذیرفت.

مدل آماری آزمایش به شرح زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  = مقدار عددی هر مشاهده

$\mu$  = میانگین جامعه

$\alpha_i$  = اثر سطح i ام فاکتور A مربوط به کوآنزیم Q10 جیره

$e_{ij}$  = خطای آزمایشی



جدول ۱- ترکیبات جیره غذایی مورد استفاده در بلدرچین ژاپنی در طول دوره

Ingredient, g/kg	Growth period
Corn	510.42
Soybean meal 44% CP	401
Wheat Bran	45
Soybean oil	5
DL-Methionine	0.1
L-Lysine	0.2
L-Threonine	1
Choline Chloride 60%	1.68
Monocalcium Phosphate 15 Ca, 22.5 P	6.1
CaCO <sub>3</sub>	14.3
NaCl	1.9
NaHco <sub>3</sub>	1.3
Trace mineral premix 1	1
Vitamin premix 2	1
Sand	10
Calculated composition	
ME, kcal	2,720
CP, %	22.5
Lysine	1.22
Methionine + Cysteine	0.7
Threonine	0.956
Calcium, %	0.75
Nonphytate P, %	0.28
Na, %	0.14
Cl, %	0.18

### یافته‌ها و بحث

نتایج به دست آمده از اثر سطح کوآنزیم Q10 بر فاکتورهای ایمنی خون، برخی فراسنجه‌های خونی و اندام‌های موثر بر سیستم ایمنی جنس نر بلدرچین ژاپنی در جدول ۲ قابل مشاهده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش سطح کوآنزیم Q10 مقدار تیترا آنتی بادی علیه واکسن نیوکاسل و آنفلانزا و SRBC بیشتر شد. هر عاملی که سلامت حیوان را با خطر مواجه کند با تضعیف عمومی بدن و تحلیل عملکرد بافت‌های مختلف سبب کاهش رشد می‌شود. عوامل پاتوژن باعث می‌شوند که سیستم ایمنی بدن پرنده تحریک و در نتیجه به جای اینکه مواد مغذی جهت ساختن پروتئین در عضلات به کار رود، در سیستم ایمنی پرنده مصرف شود (۶). اثبات نقش کوآنزیم Q10 در افزایش فعالیت ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها منجر به افزایش مقاومت بدن نسبت به عوامل بیماری‌زا شده، در نتیجه شرایط را برای رشد مطلوب پرنده فراهم می‌کند. تیترا آنتی‌بادی علیه نیوکاسل و آنفلانزا در گروه‌های که کوآنزیم بیشتری دریافت نمودند، نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری بالا بود که این موضوع با نتایج حاصل از تحقیق فریدمن و همکاران<sup>۹</sup> (۱۹۹۸) مطابقت دارد (۴). همچنین نتایج حاصل از اثر کوآنزیم Q10 بر وزن بورس فابرسیوس و طحال در جدول ۴ نشان داده شده است که با افزایش سطح کوآنزیم Q10، وزن بورس فابرسیوس و طحال افزایش معنی‌داری داشت. این افزایش به دلیل افزایش اندازه لوپول‌های درون بورس فابرسیوس و کاهش سطح کورتیکوسترون‌های پلاسما و گردش بهتر آنتی‌بادی‌ها بود (۵ و ۷). پاسخ تکثیر لنفوسیت‌ها در حضور میتوزن به عنوان روشی مناسب برای میزان تکثیر لنفوسیت‌ها و بررسی پاسخ وابسته به ایمنی و لنفوسیت‌های T ارزیابی می‌شود که کوآنزیم Q10 سبب کاهش پاسخ حساسیت و کاهش نسبت لنفوسیت به هتروفیل

<sup>9</sup> Friedman et al.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

نسبت به گروه شاهد شد. افزودن کوآنزیم Q10 باعث کاهش تکثیر لنفوسیت‌ها شده و می‌تواند ظرفیت دفاعی بدن را افزایش دهد و به طور کلی با بهبود وزن طحال، می‌تواند وضعیت سیستم ایمنی را بهبود ببخشد. نتایج به دست آمده از اثر سطح کوآنزیم Q10 بر میزان کراتینین، نیتروژن اوره خون، گلبول‌های سفید و قرمز خون در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان دادند که با افزایش سطح کوآنزیم Q10 میزان کراتینین و نیتروژن اوره خون کاهش معنی‌داری داشت و گلبول‌های سفید و قرمز خون افزایش معنی‌داری داشتند. نتایج به دست آمده از اثر سطوح مختلف کوآنزیم Q10 (میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر بیان ژن میوستاتین سینه جنس ماده بلدرچین ژاپنی در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که داده‌ها نشان داد، بیان ژن میوستاتین در پرندگان تغذیه شده با جیره پایه حاوی ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E در مقایسه با بلدرچین‌های تغذیه شده با جیره پایه بدون ویتامین E ( $p < 0.01$ ) بیشتر بود.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف کوآنزیم Q10 (میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر فاکتورهای ایمنی خون، فراسنجه‌های خونی و اندام‌های موثر بر ایمنی جنس نر بلدرچین ژاپنی.

نسبت هتروفیل به لنفوسیت (درصد)	تعداد گلبول‌های قرمز خون	تعداد گلبول‌های سفید خون	نیتروژن اوره ای خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	HA (لگاریتم*۳)	HI (لگاریتم*۳)	سطوح کوآنزیم Q10
۰/۴۲ab	۲/۶۳b	۲۵/۰۴c	۰/۴۷a	۳/۱۶c	۴/۹۲c	شاهد منفی
۰/۳۶c	۲/۶۹a	۲۷/۹۸b	۰/۴۱b	۳/۵۲ab	۵/۱۶bc	شاهد
۰/۴۲ab	۲/۶۹a	۲۸/۶۹a	۰/۴۱b	۳/۳bc	۵/۵۲a	شاهد مثبت
۰/۴ab	۲/۶۹a	۲۸/۳۸a	۰/۴۳ab	۳/۳۶abc	۵/۱۶bc	۱۵
۰/۴abc	۲/۶۹a	۲۸/۵۱a	۰/۴۱b	۳/۳۲abc	۵/۱۶bc	۳۰
۰/۴۱ab	۲/۷a	۲۸/۴۵a	۰/۴۱b	۳/۳۶abc	۵/۰۸bc	۴۵
۰/۴۳a	۲/۶۹a	۲۸/۵۷a	۰/۴b	۳/۴۴ab	۵/۲۴ab	۶۰
۰/۴۲ab	۲/۶۹a	۲۸/۶۸a	۰/۳۹b	۳/۵۶a	۵/۳۶ab	۷۵
۰/۳۹abc	۲/۶۹a	۲۸/۴۳a	۰/۴۱b	۳/۴۴ab	۵/۲۸ab	۹۰
۰/۳۸bc	۲/۷a	۲۸/۴۲a	۰/۴۲b	۳/۴۸ab	۵/۲۴ab	۱۰۵
۰/۳۹abc	۲/۶a	۲۸/۳۴a	۰/۴۲b	۳/۴abc	۵/۱۶bc	۲۱۰
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	P value
۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۶	SEM

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، P value: مقدار احتمال، a، b و c: حروف متفاوت بر روی اعداد هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ( $p < 0.01$ ).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

جدول ۳- اثر سطوح مختلف کوآنزیم Q10 (میلی گرم بر کیلوگرم) بر بیان ژن میوستاتین سینه جنس ماده بلدرچین ژاپنی.

ژن میوستاتین	ژن رفرنس (GAPDH)	کوآنزیم Q10 (میلی گرم/کیلوگرم)
۰/۷۴b	۱۹/۶۳	شاهد منفی
۱/۰۹ab	۱۹/۵۸	شاهد
۱/۶۳a	۱۹/۳۵	شاهد مثبت
۱/۱۱ab	۱۷/۱۸	۱۵
۱/۰۲ab	۱۷/۵۵	۳۰
۱/۱۳ab	۱۹/۳۲	۴۵
۱/۳۹ab	۱۸/۴۵	۶۰
۱/۲۲ab	۲۰/۰۲	۷۵
۰/۹۱ab	۱۸/۴۴	۹۰
۰/۸۴ab	۱۸/۵۶	۱۰۵
۰/۸۸ab	۱۷/۹۰	۲۱۰
۰/۰۲۱	۰/۰۷۸	P value
۰/۵۷۷	۰/۶۷۹	SEM

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، P value: مقدار احتمال، a و b: حروف متفاوت بر روی اعداد هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۱).

### نتیجه گیری

در این آزمایش مصرف کوآنزیم Q10 به دلیل ایفای نقش در زنجیره انتقال الکترون و تولید انرژی بیشتر به شکل ATP باعث بهبود صفات مورد بررسی شد. در نتیجه کوآنزیم Q10 می‌تواند جایگزین ویتامین E از نظر فاکتورهای ایمنی خون، فراسنجه‌های خونی و اندام‌های موثر بر ایمنی شود.

References:

1. SA AF E-SM, El-Mednay N, Abdel-Azeem F. Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *Int J Poultr Sci.* 2008; 7(3): 215-22.
2. Altan Ö, Pabuçcuoğlu A, Altan A, Konyalioğlu S, Bayraktar H. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British poultry science.* 2003; 44(4): 545-50.
3. Botsoglou N, Florou-Paneri P, Christaki E, Fletouris D, Spais A. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *British poultry science.* 2002; 43(2): 223-30.
4. Friedman A, Bartov I, Sklan D. Humoral immune response impairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey. *Poultry Science.* 1998; 77(7): 956-62.
5. Kumar A, Kaur H, Devi P, Mohan V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. *Pharmacology & therapeutics.* 2009; 124(3): 259-68.
6. Kamboh A, Zhu W-Y. Effect of increasing levels of bioflavonoids in broiler feed on plasma anti-oxidative potential, lipid metabolites, and fatty acid composition of meat. *Poultry Science.* 2013; 92(2): 454-61.
7. Kamiński P, Kurhalyuk N, Szady-Grad M. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress and Changes in Physiological Process of Free Radicals in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) Chicks in Polluted Areas. *Polish Journal of Environmental Studies.* 2007; 16(4): 555-62.
8. SPSS (2011). *Statistical Package for Social Sciences Study.* SPSS for windows, version 18. Chicago SPSS Inc., USA.

## ردیابی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در شهر اصفهان

پریسا بهشود<sup>۱</sup>، الهه تاج بخش<sup>۲</sup>، فاطمه طالبی ورنوسفادرانی<sup>۱\*</sup>

۱. دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** امروزه استافیلوکوکوس اورئوس‌ها، بخاطر مقاومت به گروه‌های مختلف آنتی بیوتیکی، با مشکل درمان روبرو هستند. آمینوگلیکوزیدها عوامل باکتری‌سیدال قدرتمندی هستند که اغلب به صورت ترکیبی همراه با بتالاکتام‌ها یا گلیکوپپتیدها به خصوص در درمان اندوکاردیت استافیلوکوکوسی مصرف می شوند. هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن‌های  $[aac(6')-Ie-aph(2'')]$  و  $[aph(3')-IIIa]$  به روش مولکولی PCR در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بود.

**مواد و روش‌ها:** در یک بازه زمانی ۹ ماهه، ۱۵۰ نمونه بالینی از بیمارستان‌های اصفهان جمع آوری شد. پس از تعیین هویت جدایه‌ها، حساسیت آنتی بیوتیکی آن‌ها به روش انتشار دیسک تعیین شد. در این مطالعه از دیسک‌های آنتی بیوتیکی با رعایت اصول CLSI استفاده شد. برای تشخیص ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی از روش Multiplex PCR استفاده شد.

**یافته‌ها:** بیشترین میزان مقاومت در مقابل آمینوگلیکوزیدها به ترتیب در کانامایسین (۴۷ درصد)، جنتامایسین (۴۶ درصد) و بیشترین میزان مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌های غیر آمینوگلیکوزیدی استفاده شده در این مطالعه به ترتیب، داکسی سایکلین ۵۰ درصد، سیپروفلوکساسین ۴۹ درصد، ریفاپیسین ۳۵ درصد مشاهده شد. در روش PCR فراوانی ژن‌های  $[aac(6')-Ie-aph(2'')]$ ،  $[aac(6')-Ie-aph(2'')]$  و  $[aph(3')-IIIa]$  به ترتیب ۶۰، ۳۵ و ۹ درصد بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که ژن  $[aac(6')-Ie-aph(2'')]$  فراوان‌ترین ژن کد کننده آنزیم‌های آمینوگلیکوزیدی است. با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی‌رویه این داروها تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، آمینوگلیکوزیدها، مقاومت آنتی بیوتیکی.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۲۳۳۲۸۶۹

پست الکترونیک: ftalebiv@yahoo.com

## Detection of antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolated from hospital infections in Isfahan city

Parisa Behshood<sup>1</sup>, Elahe Tajbakhsh<sup>2</sup>, Fatemeh Talebi Varnosfadrani<sup>1\*</sup>

1. Ph.D. in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Today, *Staphylococcus aureus* faces the problem of treatment due to resistance to different groups of antibiotics. Aminoglycosides are powerful bactericidal agents that are often used in combination with beta-lactams or glycopeptides, especially in the treatment of staphylococcal endocarditis. The main goal of the current research is to determine the frequency of genes [aac(6')-Ie-aph(2'')], ant(4')-Ia aph(3')-IIIa by molecular PCR method in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.

**Materials and methods:** In a period of 9 months, 150 clinical samples were collected from Isfahan hospitals. After identifying the isolates, their antibiotic sensitivity was determined by disk diffusion method. In this study, antibiotic discs were used in compliance with CLSI principles. Multiplex PCR method was used to detect aminoglycoside resistance genes.

**Results:** The highest level of resistance against aminoglycosides is respectively in kanamycin (47%), gentamicin (46%) and the highest level of resistance against non-aminoglycoside antibiotics used in this study, respectively, doxycycline (50%) and ciprofloxacin (49%) Rifampicin (35%) was observed. In the PCR method, the frequency of [aac(6')-Ie-aph(2'')], ant(4')-Ia and aph(3')-IIIa genes was 60%, 35% and 9%, respectively.

**Conclusion:** The results of this study showed that the [aac(6')-Ie-aph(2'')] gene is the most abundant gene encoding aminoglycoside enzymes. Due to the increase in the prevalence of resistance to aminoglycoside antibiotics, in parallel with excessive and indiscriminate clinical use of these drugs, quick and timely detection of resistant strains is essential in order to choose appropriate treatment options and prevent the spread of resistance It seems

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, aminoglycosides, antibiotic resistance.

### مقدمه

هر چند باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جزو فلور میکروبی بدن انسان است، اما یکی از علت‌های مهم عفونت‌های بیمارستانی، استافیلوکوکوس‌ها می‌باشند که عامل مرگ و میر در ایران و جهان شده‌اند. استافیلوکوکوس‌ها از گروه‌های عمده باکتری‌ها هستند که در پوست غدد و غشای موکوسی پوست انسان و حیوانات وجود دارند. طیف میزبان و جایگاه آن‌ها بر حسب گونه ممکن است محدود و یا وسیع باشد. همچنین این باکتری‌ها می‌توانند در منابع طبیعی مانند آب گرد و خاک هوا، ظروف و وسایل معمولی و نیز محصولات حیوانی مانند شیر، گوشت، پنیر یافت شوند. استافیلوکوکوس‌ها معمولاً ارتباط بی‌خطری با میزبان خود دارند ولی در صورت آسیب دیدگی پوست، در اثر ضربه یا خراش وارد پوست می‌شوند و می‌توانند بیماری‌زایی را آغاز کنند (۱ و ۲). این پاتوژن‌ها، بخاطر مقاومت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی، با مشکل درمان روبرو هستند. استافیلوکوکوس اورئوس‌ها امروزه، نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکوئینولون‌ها و ماکرولیدها مقاومت نشان می‌دهند. از این رو امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها، همچون ونکومايسين و تیکوپلانیین به عنوان داروهای ضد استافیلوکوکوسی برای درمان این نوع عفونت‌ها در دسترس می‌باشند (۱ و ۲). بروز عفونت‌های استافیلوکوکوسی در سال‌های اخیر به دلیل انتشار سویه‌های مقاوم، افزایش بیماران باضعف ایمنی و استفاده بیش از حد از وسایل پزشکی مانند کاتتر و مداخلات تهاجمی پزشکی رو به افزایش است (۳).

علت شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به سبب کسب فاکتورهای مقاومتی متعدد می‌باشد. طی چند دهه‌ی اخیر افزایش قابل توجهی در ظهور سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و سایر آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به پنی‌سیلین‌ها به ویژه در عفونت‌های بیمارستانی مشاهده شده است (۴). مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری‌های گرم منفی

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

و هم در گرم مثبت‌ها گزارش شده است. سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال‌سازی آنزیماتیک دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها می‌باشند. از این بین غیرفعال‌سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهنده‌ی آمینوگلیکوزیدها (AMEs) اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در گونه‌های استافیلوکوکوسی می‌باشند (۵). این آنزیم‌ها به سه رده‌ی مختلف بر اساس فعالیت تغییردهندگی‌شان طبقه‌بندی می‌شوند که شامل آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها (AAC)، آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (APH) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (ANT) یا آمینوگلیکوزید آدنیل ترانسفرازها (AAD) می‌باشند (۵ و ۶). در میان کوکسی‌های گرم مثبتی چون استافیلوکوکوس‌ها، انتروکوکوس‌ها و استرپتوکوکوس‌ها پنج نوع از آنزیم‌های تغییردهنده‌ی آمینوگلیکوزیدها وجود دارد. از این میان سه آنزیم  $ANT(4')-I$ ،  $AAC(6')/APH(2'')$  و  $APH(3')-III$  که به ترتیب توسط ژن‌های  $ant(4')-Ia$ ،  $aac(6')-Ie/aph(2'')$  یا  $aph(3')-IIIa$  و  $aadD$  کد می‌شوند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، زیرا آن‌ها جزء شایع‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده در گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس‌ها می‌باشند و علاوه بر این باعث غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌شوند که دارای اهمیت درمانی و بالینی هستند (۸ و ۷ و ۶ و ۵). از آنجایی که سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین به سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام و سفالوسپورین‌ها نیز مقاوم می‌باشند، لذا در درمان بیماران مبتلا به عفونت با این سویه‌ها از رژیم‌های درمانی حاوی ونکومايسين و آمینوگلیکوزیدها و سایر آنتی‌بیوتیک‌های غیربتا لاکتام بایستی استفاده شود (۱۰ و ۹). از آنجایی که با استفاده از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده از کلینیک و ناقلین هر منطقه را می‌توان به داروی‌های موثر در درمان دست یافت. لذا هدف از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس و میزان شیوع ژن‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها است.

### مواد و روش‌ها

در یک بازه زمانی ۹ ماهه در سال ۱۴۰۰، ۱۵۰ نمونه بالینی مشکوک به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان‌های اصفهان جمع آوری شد. کلیه نمونه‌ها ابتدا به منظور حصول اطمینان از خالص بودن، در محیط بلاداآگار (مرک، آلمان) تجدید کشت و ایزوله شدند. پس از آن به منظور تعیین هویت قطعی و تشخیص، از آزمایشات اختصاصی معمول نظیر آزمایش کاتالاز، کوآگولاز و DNase برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد.

### روش تشخیص مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس

برای تایید قطعی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جمع آوری شده از PCR ژن *femA* که در تمامی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس حضور دارد، استفاده شد. جدول شماره ۱ توالی این پرایمرها را نشان می‌دهد. برای استخراج DNA از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (سیناژن، ایران)، ۱/۵ میلی مول در لیتر MgCL<sub>2</sub> (سیناژن، ایران)، ۰/۵ واحد آنزیم Taq (سیناژن، ایران) و ۵۰ نانوگرم DNA الگو بود. تکثیر ژن مذکور تحت شرایط جدول ۱ با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر انجام شد. تمامی واکنش‌ها در ۳۵ سیکل انجام گردید.

### تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

جهت تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از دیسک‌های جنتامایسین (10 µg)، کانامایسین (30 µg)، توبرامایسین (10 µg)، آمیکاسین (30 µg)، سیپروفلوکساسین (5 µg)، داکسی سایکلین (30 µg)، ریفامپیسین (5 µg)، (Padtan Teb, Iran) با رعایت اصول CLSI استفاده شد استفاده شد.

### PCR ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی تمامی ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا سازی شده بر روی ژن‌های  $ant(4')-Ia$ ،  $aph(3')-IIIa$  و  $[aac(6')-Ie-aph(2'')]$  انجام گرفت.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

پرایمرهای ژن‌های *ant(4')-Ia*، *aph(3')-IIIa* و [*aac(6')-Ie-aph-(2'')*] در جدول شماره ۱ آورده شده است. برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استفاده شد (۱۱ و ۱۲).

واکنش PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۰/۴ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۱ میکرومول از هر جفت پرایمر ۰/۷۵ میکرومول MgCL<sub>2</sub> (سیناژن، ایران)، ۰/۲ واحد آنزیم Taq (سیناژن، ساخت ایران) و ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۷/۹ میکرولیتر آب دیونیزه استریل بود. تکثیر ژن مذکور تحت شرایط جدول ۲ با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (Applied Biosystem, USA) انجام شد. تمامی واکنش‌ها در ۳۵ سیکل انجام گردید.

### روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از جمع آوری داده‌ها یافته‌ها در قالب جداول فراوانی نمودار و شاخص‌های عددی ارائه گردید. داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن‌های *aph(3')-IIIa*، *ant(4')-Ia*، *aac(6')-Ie-aph-(2'')*، *femA*

Gene	Primers (5'-3')	Size of amplified product (bp)	References
<i>femA</i>	F-AAAAAAGCACATAACAAGCG R-GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	17
<i>aph(3')-IIIa</i>	F- AAATACCGCTGCGTA R- CATACTCTTCCGAGCAA	242	18
<i>ant(4')-Ia</i>	F- AATCGGTAGAAGCCCAA RGCACCTGCCATTGCTA	135	18
<i>aac(6')-Ie-aph-(2'')</i>	F- GAAGTACGCAGAAGAG R- ACATGGCAAGCTCTAGA	491	18

جدول ۲- شرایط دمایی PCR ژن‌های *aac(6')-Ie-aph-(2'')*، *ant(4')-Ia*، *aph(3')-IIIa*، *femA*

Gene	initial denaturation	Denaturation	annealing	extension	final extension
<i>femA</i>	94°C for 5 min	94°C for 2 min	°C for 2 min $\Delta$ 8	72°C for 2 min	72°C for 7 min
<i>aph(3')-IIIa</i>	95°C for 3 min	95°C for 40s	52°C for 40s $\Delta$ 5	72°C for 10 min	72°C for 7 min
<i>ant(4')-Ia</i>	94°C for 5 min	94°C for 2 min	52°C for 40s $\Delta$ 5	72°C for 10 min	72°C for 7 min
[ <i>aac(6')-Ie-aph-(2'')</i> ]	94°C for 5 min	94°C for 2 min	56°C for 20s	72°C for 10 min	72°C for 7 min

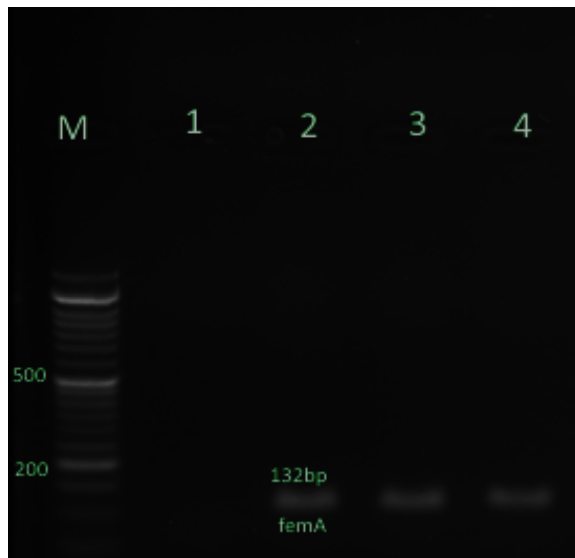
### یافته‌ها

در این مطالعه ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۱۵۰ نمونه بیمارستانی جداسازی شد. تمام ۱۰۰ *استافیلوکوکوس اورئوس* ایزوله شده از عفونت بیمارستانی به وسیله PCR ژن *femA* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تایید شدند (شکل ۱).



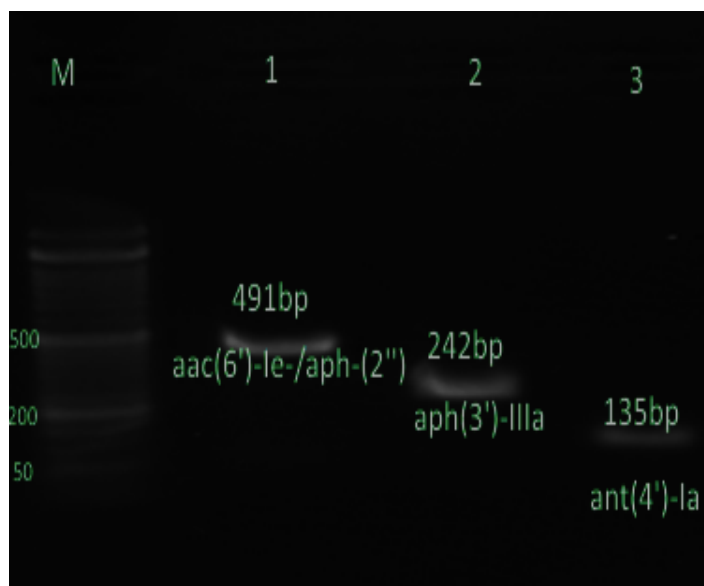
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۱- ژل الکتروفورز ژن *femA* ردیف M مارکر ۵۰ bp. ستون ۱ کنترل منفی، ستون شماره ۲ کنترل مثبت (*ATCC 25923*)، ستون ۳ و ۴ ایزوله-های بالینی

در این مطالعه فراوانی ژن‌های [*aac(6')-Ie-aph(2'')*، *ant(4')-Ia* و *aph(3')-IIIa*] به ترتیب ۶۰، ۳۵ و ۹ درصد بود (شکل ۲).



شکل ۲- مولتی پلکس PCR ژن‌های [*aac(6')-Ie-/aph-(2'')*، *ant(4')-Ia*، *aph(3')-IIIa*]

در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت در مقابل آمینوگلیکوزیدها به ترتیب در کانامایسین (۴۷ درصد)، جنتامایسین و توبرامایسین (۴۶ درصد) و بیشترین میزان مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های غیر آمینوگلیکوزیدی استفاده شده در این مطالعه به ترتیب، داکسی سایکلین ۵۰ درصد، سیپروفلوکساسین ۴۹ درصد، ریفاپیسین ۳۵ درصد مشاهده شد. جدول زیر ارزیابی فنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها را نشان می دهد.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

جدول ۳- نتایج مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس

مقاوم (%)	حدواسط (%)	حساس (%)	آنتی بیوتیک
۴۷ (۴۷)	۱۴ (۱۴)	۳۹ (۳۹)	کانامایسین
۴۶ (۴۶)	۱ (۱)	۵۳ (۵۳)	توبرامایسین
۴۶ (۴۶)	۳ (۳)	۵۱ (۵۱)	جنتامایسین
۴۵ (۴۵)	۵ (۵)	۵۰ (۵۰)	آمیکاسین
۵۰ (۵۰)	۷ (۷)	۴۳ (۴۳)	داکسی سایکلین
۴۹ (۴۹)	۶ (۶)	۴۵ (۴۵)	سیپروفلوکساسین
۳۵ (۳۵)	۴ (۴)	۶۱ (۶۱)	ریفامپیسین

#### بحث

استافیلوکوکوس اورئوس به روشنی به عنوان یک عامل بیماری زای قدرتمند که عفونت های متعددی را ایجاد می کند شناخته شده است. استافیلوکوکوس اورئوس همچنین یکی از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چند گانه ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین ها، فلوروکوئینولون ها و ماکرولیدها کسب کرده است (۹ و ۱۰). بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در مجموع از ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی ۵۰ ایزوله (۵۰ درصد) قابلیت تولید حداقل یکی از ژن های *aph(3')-IIIa*، *ant(4')-Ia* و *aac(6')-[aac(2'')-Ie/aph(2'')]* کد کننده آمینوگلیکوزیدها را داشتند.

نتایج مطالعات انجام شده در سایر کشورها نشان داده که ژن [*aac(6')-Ie/aph(2'')*] فراوان ترین ژن کد کننده آنزیم های آمینوگلیکوزیدها در ایزوله های بالینی در کشورهای اروپایی است. نتایج حاصل از این مطالعه به مطالعه ما شباهت داشت (۱۴ و ۱۳). Choi و همکاران با بررسی ای که روی ۹۲ ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس انجام دادند، مشاهده کردند که ۶۵٪ ایزوله ها ژن *aac(6')-Ie/aph(2'')* ۴۱٪ ژن *ant(4')-Ia* و ۹٪ نیز ژن *aph(3')-IIIa* را حمل می کردند. نتایج حاصل از این مطالعه به مطالعه ما شباهت داشت (۱۵).

همچنین طی مطالعه ای که توسط Ardıc و همکارانش روی ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی انجام شد، درصد فراوانی ژن های *aac(6')-Ie/aph(2'')* و *ant(4')-Ia* و *aph(3')-IIIa* به ترتیب ۶۶٪، ۲۴٪ و ۸٪ گزارش شد. نتایج حاصل از این مطالعه به مطالعه ما شباهت داشت (۱۶). Ida و همکاران طی تحقیقی که در ژاپن انجام دادند نتایجی متفاوت با آنچه که در کشورهای اروپایی به دست آمده بود گرفتند. در این بررسی ژن *ant(4')-Ia* با فراوانی ۸۴/۵٪ بیشترین شیوع را داشت و ژن های *aac(6')-Ie/aph(2'')* و *aph(3')-IIIa* هر کدام به ترتیب با ۶۱/۷٪ و ۸/۹٪ در کل ایزوله ها شناسایی شدند. تنها نتایج حاصل از ژن های *aac(6')-Ie/aph(2'')* و *aph(3')-IIIa* به مطالعه ما شباهت داشت (۱۷).

در ایران در مطالعه ای که توسط یادگار و همکاران بر روی ایزوله های جمع آوری شده از تهران صورت گرفت از میان ژن های کدکننده آمینوگلیکوزیدی، ژن *ant(4')-Ia* شایع ترین ژن (۵۸٪) در میان ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جمع آوری شده می باشد و پس از آن ژن های *aac(6')-Ie/aph(2'')* و *aph(3')-IIIa* هر کدام به ترتیب در ۴۶٪ و ۶٪ سویه ها شناسایی شدند. به طور کل ۶۳٪ سویه ها حداقل یکی از ژن های کدکننده آنزیم های AME را دارا بودند (۱۸).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

در بررسی اچ نی نی و همکاران در سال ۲۰۲۳ حساسیت ضد میکروبی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس منشاء ورم پستان گاوی متعلق به ۳۷ گله در شمال غرب پرتغال مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این، ژن‌های کدکننده نشانگرهای مقاومت در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند در این مطالعه، مقاومت فنوتیپی بالاتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین (۰/۷۵/۰)، اریترومایسین (۰/۶۷/۳) و آمیکاسین (۰/۴۲/۳) برای آنتی بیوتیک‌های آزمایش شده مشاهده شد. علاوه بر این، درصد مقاومت ژن‌های *aph(3')-IIIa* و *tet(M)* و *ant(4')-Ia* به ترتیب برابر با ۶۳/۵، ۵۷/۷ و ۳۰/۸ درصد بود (۱۹). طی مطالعه‌ای که توسط فتح الله زاده و همکارانش در داخل کشور انجام دادند، میزان مقاومت ۱۰۹ ایزوله MRSA نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به روش انتشار از دیسک بررسی کردند. در این مطالعه ۹۷ درصد سویه‌ها مقاوم به کانامایسین، ۹۶ درصد مقاوم به توپرامایسین، ۸۷ درصد مقاوم به جنتامایسین، ۹۳ درصد مقاوم به آمیکاسین و ۸۰ درصد مقاوم به نتیل مایسین گزارش شدند. همچنین در این بررسی با استفاده از روش PCR فراوانی ژن‌های AME تعیین و به این صورت گزارش شد که ژن [*aac(6')-Ie/aph(2'')*] با فراوانی ۸۳ درصد دارای بیشترین شیوع و پس از آن ژن‌های *aph(3')-IIIa* و *ant(4')-Ia* هر کدام به ترتیب با فراوانی ۷۱ و ۲۶ درصد در کل ایزوله‌ها شناسایی شدند که در این مطالعه میزان مقاومت و فراوانی ژنها نسبت نه مطالعه ما بالاتر است (۲۰).

### نتیجه گیری

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی‌رویه این داروها، تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد.

### سپاس و قدردانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آزمایشگاه‌های بیمارستان استان اصفهان که جهت گرفتن نمونه ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند.

### References:

1. Behshood P, Karbasizade V, Naghavi NS. A Survey of Frequency and pattern of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from nosocomial infections. Medical Laboratory Journal. 2015; 9(2): 85-90.
2. Reza zadeh M, Yousefi Mashouf R, Sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. Arak Medical University Journal (AMUJ). 2013; 16(71): 29-37.
3. Mayhall, CG. Hospital Epidemiology and Infection Control. United States. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2004; 444-445.
4. Chang FY, Peacock JE Jr, Musher DM, Triplett P, MacDonald BB, et al. Staphylococcus aureus Bacteremia Recurrence and the Impact of Antibiotic Treatment in a Prospective Multicenter Study. Medicine. 2003; 333-339.
5. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 1003-1012.
6. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, et al. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from two hospitals in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents 2009; 33: 264-265.
7. Gray GS, Huang RT, Davies J. Aminocyclitol resistance in Staphylococcus aureus: presence of plasmids and aminocyclitol modifying enzymes. Plasmid. 1983; 9: 147-158.

8. Abdal N, Ghaznavirad E, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. *koomesh*. 2014; 16(1): 82-89
9. King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova, EV, Ray SM, et al. Emergence of Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus USA 300 Clone as the Predominant Cause of Skin and Soft-Tissue Infections. *Annals of Internal Medicine*. 2006; 144: 309-317
10. Siripornmongkolchai T, Chomvarin C, Chaicumpar K, Limpaboon T, Wongkhum C. Evaluation of different primers for detecting mecA gene by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Southeast Asian Trop Med Public Health*. 2002; 33(4):758-763.
11. Picot S, Rakotomalala R, Farny K, Simac C, Michault A. [Evolution of resistance to antibiotics from 1997 to 2005 in the Reunion Island]. *Med Mal Infect*. 2010; 40(11): 617-624.
12. Abdal N, Ghaznavirad E, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. *Koomesh*. 2014; 16(1): 82-89.
13. Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen H, Eleonora H. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates of epidemic phage types. *J Med Microbiol*. 1994; 41: 282-290.
14. Mahdiyoun SM, Ahanjan M, Goudarzi M, Rezaee R. Prevalence of antibiotic resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus and determining aminoglycoside resistance gene by PCR in Sari and Tehran hospitals. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2015; 25(128): 97-107.
15. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, et al. Multiplex PCR for the Detection of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Methicillin Resistance among Staphylococcus Species. *J Korean Med Sci*. 2003; 18: 631-636.
16. Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiol Res* 2006; 161: 49-54.
17. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, et al. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9): 3115-3121.
18. Yadegar A, Sattari M, Goudarzi Gh. Prevalence of the Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Methicillin Resistance Among Clinical Isolates of Staphylococcus aureus in Tehran, Iran. *Microbial Drug Resistance*. 2009; 15(2):109-13.
19. Hnini R, Silva E, Pinho L, Najimi M, Thompson G. Phenotypic Characterization and Resistance Genes Detection of Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Mastitis in the Northwest of Portugal. *Acta Veterinaria Eurasia*. 2023; 49(3): 127-36.
20. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, et al. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33(3): 264-265.

## افزایش مقاومت به خشکی ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*) با استفاده از بیوپلیمر کیتوزان

فاطمه ملک پور<sup>۱\*</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** خشکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید گیاهان بوده که تأثیر عمده‌ای بر رشد و نمو گیاهان دارویی دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که باعث تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان می‌شود. کیتوزان، به عنوان یک بیوپلیمر زیستی، از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی به دست می‌آید.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش گیاه ریحان تحت تیمارهای مختلف تنش خشکی (۱۰۰، ۶۰ و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی)، با غلظت‌های ۰، ۰/۲ و ۰/۴ گرم در لیتر کیتوزان در سه مرحله رویشی، پیش‌گلدهی و گلدهی تیمار شد و یک هفته بعد از اعمال تیمار برداشت شدند. پارامترهای مختلف مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی برای تیمارهای مختلف بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد سطوح مختلف خشکی و کیتوزان بر برخی پارامترهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه مؤثر بودند. الیسیتور کیتوزان اثر معنی‌داری بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد. مصرف کیتوزان سبب افزایش قابل ملاحظه کلروفیل a و b و کارتنوئیدها نسبت به شاهد شد. میزان کلروفیل a با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۲ به ۰/۴ گرم در لیتر روند افزایشی داشته است، به طوری که حداکثر مقدار کلروفیل a و کارتنوئیدها در غلظت ۰/۴ گرم در لیتر کیتوزان مشاهده شد. حداکثر مقدار کلروفیل b نیز با به کار بردن غلظت ۰/۲ گرم در لیتر کیتوزان به دست آمد.

**نتیجه گیری:** با توجه به اینکه خشکی از ویژگی‌های بارز جغرافیایی کشورماست و از این پدیده‌ی طبیعی و غیرقابل تغییر، گریزی نیست و از طرفی مصرف منابع انرژی (آب و مواد غذایی) به طور روزافزون در جامعه افزایش می‌یابد، لذا در جهت مقابله و کاهش خسارت کمبود آب استفاده از الیسیتورها به خصوص پلیمر زیستی کیتوزان، به عنوان ماده طبیعی کاهش دهنده آثار تنش خشکی در گیاه ریحان، حائز اهمیت می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** ریحان (*Ocimum basilicum*)، کیتوزان، تنش خشکی، پارامترهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۲۸۴۷۴۲۴

پست الکترونیک: Fmalekpoor87@yahoo.com

## Increasing drought resistance of purple basil (*Ocimum basilicum*) using chitosan biopolymer

Fateme Malekpoor<sup>1\*</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Drought is one of the most important factors limiting the production of plants, which has a major effect on the growth and development of medicinal plants. Elicitors are compounds of biological or non-biological origin that cause physiological and morphological changes in plants. Chitosan, as a biological biopolymer, is obtained from the main components of the cell wall of many fungal species.

**Materials and Methods:** For this purpose, the basil plant was treated under different treatments of drought stress (100, 60 and 30% of agricultural capacity), with concentrations of 0, 0.2 and 0.4 grams per liter of chitosan in three stages of vegetative, pre-flowering and flowering. They were harvested one week after treatment. Different morphological and physiological parameters were investigated for different treatments.

**Results:** The results of data variance analysis showed that different levels of dryness and chitosan were effective on some morphological and physiological parameters of the plant. Chitosan elicitor showed a significant effect on the amount of photosynthetic pigments. Consumption of chitosan caused a significant increase in chlorophyll a and b and carotenoids compared to the control. The amount of chlorophyll a increased with the increase of chitosan concentration from 0.2 to 0.4 g/l, so that the maximum amount of chlorophyll a and carotenoids was observed at the concentration of 0.4 g/l chitosan. The maximum amount of chlorophyll b was also obtained by using the concentration of 0.2 g per liter of chitosan.

**Conclusion:** Considering that drought is one of the prominent geographical features of our country and there is no escape from this natural and unchangeable phenomenon, and on the other hand, the consumption of energy resources (water and food) is increasing day by day in the society, so in order to deal with and reduce the damage of shortage The use of elicitors, especially biopolymer chitosan, is important as a natural substance that reduces the effects of drought stress in basil.

**Keywords:** Basil (*Ocimum basilicum*), chitosan, drought stress, morphological and physiological parameters.

### مقدمه

کشور ما در بخشی از کره زمین قرار گرفته که در بسیاری از نقاط آن نزولات جوی نیاز آبی گیاهان زراعی و دارویی را تأمین نمی کند (۱). خشکی یکی از مهم ترین عوامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی بوده که تأثیر عمده ای بر رشد، نمو و مواد مؤثره گیاهان دارویی دارد (۲). به طور کلی خشکی، کاهش قابلیت دسترسی آب در خاک است که به صورت کاهش پتانسیل شیمیایی آب تعریف شده و حرکت آب بین سیستم گیاه و خاک را تحت تأثیر قرار می دهد (۳). تنش خشکی ضمن کاهش محتوای آب در بافت های گیاهان باعث محدود شدن رشد و برخی تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی در آن ها می گردد و می تواند صدمات سنگینی به رشد و نمو و همچنین بر مواد مؤثره دارویی گیاهان وارد نماید (۴). به نظر می رسد که گیاهان دارویی واکنش های متفاوتی نسبت به تنش خشکی در عملکرد و مواد مؤثر تولیدی داشته باشند.

ریحان سبزی خوراکی است و برگ های تازه و خشک شده آن به مصرف تغذیه می رسد، همچنین به عنوان دمنوش دارویی مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر این، به عنوان طعم دهنده و خوشبو کننده به بسیاری از غذاها افزوده می شود (۵). از گذشته های دور از ریحان به عنوان یک گیاه دارویی در درمان بیماری های زیادی از جمله سردرد، سرفه، اسهال، انگل، زگیل ها و ناراحتی های کلیوی استفاده می شده است (۵). همچنین در پزشکی قدیم از برگ ها و گل های ریحان به عنوان ضدنفخ، افزایش دهنده شیر، درمان برخی ناراحتی های قلبی، اشتها آور، ضد تشنج و برای مداوای بزرگ شدن طحال استفاده می شده است (۶). همچنین خواص ضد التهابی، ضد اسپاسمی، ضدنفخی، ضد استرسی، ضد مالاریا، تقویت سیستم ایمنی، ضد سرطان، کاهش دهنده چربی خون، التیام دهنده زخم معده، تسکین دهنده درد، تب ر و محرک بودن آن نیز به اثبات رسیده است (۷).

الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی می‌باشند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی و همچنین تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان می‌شوند. الیسیتورها شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، پلی-ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، گیاهان (سلولز، پکین)، میکروارگانیزم‌ها (کیتین، گلوکان)، برخی عوامل تنشی مانند اشعه ماوراءبنفش، تنش فیزیکی، اسمزی، فشار، نمک فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی می‌باشند (۸). از دیگر الیسیتورها می‌توان کیتوزان را نام برد که از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، میگو، خرچنگ و غیره می‌باشد و برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی زیادی تأیید شده است (۹).

کیتوزان با فرمول شیمیایی  $(C_5H_{11}NO_5)_n$  و با نام علمی پلی بتا-(۱→۴)-۲-آمینو-۲-داکسی-D-گلوکوپیرانوز) پس از حذف گروه استیل کیتین حاصل می‌شود. برای اولین بار از یک نوع قارچ از خانواده موکور توسط تارت استخراج و شناسایی گردید که در این قارچ کیتین به صورت آنزیمی به کیتوزان تبدیل می‌شود. کیتوزان از پلی‌ساکاریدهای نیتروژن‌دار است که با واکنش‌های استیل‌زدایی کیتین به صورت طبیعی ایجاد می‌شود در این پدیده گروه N استیل موجود روی کربن شماره دو کیتین به گروه آمینی  $NH_3$  تبدیل می‌شود (۱۰).

از آنجایی که بیشتر مناطق ایران جز اقلیم خشک و نیمه‌خشک می‌باشد و طی چند سال اخیر کاهش بارندگی منجر به خشکسالی و سبب خسارات فراوانی بر تولید محصولات کشاورزی در کشور شده است، در این تحقیق اثر تنش خشکی بر گیاه دارویی ریحان همراه با کاربرد محلول‌پاشی کیتوزان مورد بررسی قرار می‌گیرد. ممکن است مصرف این الیسیتور بتواند راهکاری جهت افزایش تحمل گیاه به تنش خشکی مطرح باشد و همچنین مصرف این الیسیتور شاید با کاهش اثرات منفی تنش خشکی، سبب بهبود ماده مؤثره این گیاه در شرایط عادی و خشکی شود.

### مواد و روش‌ها

بذر مورد نظر از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. کاشت بذرها در گلدان‌های پلاستیکی انجام شد. خاک گلدان‌ها به صورت ترکیبی از خاک مزرعه با کود حیوانی پوسیده به نسبت ۳ به ۱ تهیه گردید. تعدادی بذر در هر گلدان کشت شد و بعد از کشت بذر با خاک برگ روی بذرها را پوشانده، سپس با استفاده از مه‌پاش دستی اقدام به آبیاری گلدان‌ها گردید. به مدت سه هفته هر روز دو بار با استفاده از مه‌پاش گلدان‌ها را آبیاری نموده و بعد از این که گیاهان به مرحله چهاربرگی رسیدند، گلدان‌ها از گلخانه به بیرون گلخانه منتقل گردید.

تیمارهای آزمایش: آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل زیر در ۳ تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تنش خشکی در ۳ سطح: شاهد (آبیاری در حد ظرفیت‌زراعی گلدان) I1، تنش ملایم (آبیاری در حد ۶۰ درصد ظرفیت‌زراعی گلدان) I2، تنش شدید (آبیاری در حد ۳۰ درصد ظرفیت‌زراعی گلدان) I3 محلول‌پاشی کیتوزان در ۴ سطح در سه مرحله از رشد (مرحله رویشی، قبل از گلدهی و شروع گلدهی): شاهد حلال (اسید استیک ۵ درصد) C1، کیتوزان (۰/۲ گرم در لیتر) C2، کیتوزان (۰/۴ گرم در لیتر) C3، شاهد آب مقطر C4 اندازه‌گیری صفات مورد ارزیابی:

صفات مختلف مورد نظر، نظیر ارتفاع بوته، تعداد برگ، تعداد شاخه‌های فرعی، طول گل‌آذین و شاخص سطح برگ در پایان مرحله گلدهی، با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه، اندام هوایی گیاه از ۱ سانتی‌متری کف خاک گلدان به کمک قیچی باغبانی برداشت شد. پس از برداشت برخی از سنجش‌ها بلافاصله انجام شد، وزن تر بخش‌های هوایی به کمک ترازو با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد. بخشی از نمونه‌ها برای بررسی سایر سنجش‌های فیزیولوژیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: سنجش کلروفیل‌ها: اندازه‌گیری میزان کلروفیل a و b به روش آرنون (۱۱) انجام گرفت. مقدار ۰/۵ گرم از ماده تر گیاهی را در هاون چینی ریخته، سپس با استفاده از نیتروژن مایع آن را خرد کرده و به خوبی له می‌کنیم. ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به نمونه اضافه، سپس در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار می‌دهیم. عصاره جدا

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

شده فوقانی حاصل از سانتریفیوژ را به بالن شیشه‌ای منتقل می‌نماییم. مقداری از نمونه داخل بالن را در کووت اسپکتروفوتومتر ریخته و سپس به‌طور جداگانه در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ توسط اسپکتروفوتومتر مقدار جذب را قرائت می‌نماییم. در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان کلروفیل a و b بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه ( $\text{mg g}^{-1} \text{ F.W}$ ) به دست می‌آید (۱۱).

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) V / 1000W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V / 1000W$$

$V$  = حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)

$A$  = جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر

$W$  = وزن تر نمونه بر حسب گرم

سنجش کاروتنوئیدها: کاروتنوئیدها نیز همانند کلروفیل‌ها با توجه به حجم عصاره و وزن نمونه‌ها بر اساس واحد میلی‌گرم بر گرم وزن تر ( $\text{mg g}^{-1} \text{ F.W}$ ) بیان شد. برای سنجش مقدار کاروتنوئیدها میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر جذبی بر حسب میلی‌گرم بر لیتر، در فرمول گذاشته شد (۱۱).

$$\text{Carotenoides} = 100(A_{470}) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b}) / 227$$

$A_{470}$  میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر است.

اندازه‌گیری میزان پرولین: ۰/۵ گرم ماده تر گیاهی از تیمارهای مختلف را در هاون خرد کرده و درون یک فالکون ریخته شد، سپس ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ آماده شده را به آن اضافه نموده و نمونه درون یخ قرار داده شد. تیوپ را در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ نموده تا مواد اضافی از محلول جدا گردید. مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده را درون فالکون جدید ریخته و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال به آن افزوده و سپس خوب مخلوط شد. همزمان منحنی استاندارد پرولین ترسیم گردید. برای این منظور، مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول‌های استاندارد صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین را درون فالکون‌های جدید ریخته و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال به آن‌ها افزوده و سپس خوب مخلوط شد. نمونه‌ها را در حمام آب گرم به مدت ۱ ساعت حرارت داده و سپس درون حمام یخ قرار داده شدند. استانداردهای پرولین محلول را به اندازه لازم در کووت دستگاه اسپکتروفوتومتر ریخته و مقدار پرولین را در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت کرده و بر اساس داده‌های بدست آمده، منحنی استاندارد رسم شد. سپس میزان جذب نمونه‌های گیاهی را در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت نموده و با قراردادن آن در معادله خط، مقدار پرولین نمونه‌ها به دست آمد (۱۲).

اندازه‌گیری میزان کل قندهای محلول: اندازه‌گیری میزان کل قندهای محلول به روش تغییر داده شده اشلیگل (۱۳) انجام گردید. نمونه‌های خشک شده مربوط به تیمارهای مختلف، از الک عبور داده و ۰/۱ گرم از نمونه آسیاب شده وزن و درون فالکون ریخته شد. مقدار ۱۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ که قبلاً آن را گرم نموده‌ایم به ارلن اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز مایع جدا شده برای اندازه‌گیری قند نگره‌داری گردیدند. فالکون‌های حاوی عصاره به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگره‌داری شده تا اتانول آن‌ها تبخیر شود. پس از تبخیر الک، فقط جرم زردرنگ یا سفیدرنگی در کف پتری‌ها باقی ماند، که با ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده و درون فالکون ۵۰ میلی‌لیتر ریخته شد. به منظور حذف رسوبات اضافی و دیگر ترکیبات، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول ۵٪ سولفات روی و ۴/۷ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسیدباریم ۳/۰ نرمال کاملاً ورتکس و به فالکون اضافه گردید. فالکون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره فاز مایع بعد از سانتریفیوژ به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل شد. به هر لوله آزمایش ۱ میلی‌لیتر محلول ۵٪ فنل اضافه نموده، سپس به شدت تکان داده تا کف در آن ظاهر شود. مقدار ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸٪ به داخل هر یک از نمونه‌ها اضافه شد. پس از آماده سازی محلول‌ها ۴۵ دقیقه صبر نمودیم تا رنگ محلول تثبیت گردد. از طرف دیگر، استانداردهای قند محلول در کووت دستگاه اسپکتروفوتومتر ریخته و مقدار جذب در طول موج ۴۸۵ نانومتر



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

قرائت و منحنی استاندارد رسم شد. سپس میزان جذب نمونه‌های گیاهی را در طول موج ۴۸۵ قرائت نموده و با قرار دادن در معادله خط استاندارد مقدار قند نمونه‌ها به دست آمد (۱۳).

عملیات آماری: در این طرح برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های بدست آمده حاصل از سنجش پارامترهای مختلف، به صورت طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از نرم افزارهای SAS و آزمون LSD مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تجزیه واریانس‌ها نیز با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ( $P \leq 0.05$ ) صورت گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2010 رسم شدند.

### یافته‌ها

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل برای شاخص‌های کمی رشد در جدول ۱ آمده است؛ به‌طور کلی آنچه که می‌توان از این جداول نتیجه گرفت آن است که شرایط رطوبتی تأثیر به‌سزایی بر شاخص‌های کمی رشد گیاه داشته است. مقایسه میانگین طول ساقه نشان داد که بیشترین طول ساقه مربوط به تیمارهای آبیاری ۱۰۰٪ با سطوح مختلف کیتوزان می‌باشند. بیشترین طول گل‌آذین مربوط به تیمار I1C1 می‌باشد که مربوط به تیمار شاهد می‌باشد. در مورد اثر متقابل آبیاری و کیتوزان بر تعداد شاخه‌های جانبی می‌بینیم که بیشترین تعداد شاخه جانبی مربوط به تیمار I1C1 می‌باشد و کمترین تعداد شاخه جانبی نیز مربوط به تیمار I2C2 می‌باشد. در مورد اثر متقابل آبیاری و کیتوزان بر سطح برگ می‌بینیم که بیشترین سطح برگ مربوط به تیمار I1C3 می‌باشد و کمترین آن مربوط به تیمارهای I3 با غلظت‌های مختلف کیتوزان می‌باشد که همگی در یک گروه آماری قرار می‌گیرند. همان‌طور که از نتایج مشخص می‌شود در سطوح آبیاری معمولی و ۶۰٪ ظرفیت زراعی کیتوزان باعث افزایش سطح برگ می‌شود. در مورد اثر متقابل آبیاری و کیتوزان بر وزن تر و خشک ریشه می‌بینیم که بیشترین وزن ریشه مربوط به تیمار I1C2 می‌باشد و تنش‌های خشکی باعث کاهش معنی‌دار میزان وزن تر و خشک ریشه می‌شود. همچنین در مورد وزن تر و خشک می‌بینیم که بیشترین وزن تر و خشک مربوط به تیمار I1C3 می‌باشد.

جدول ۱- اثرات متقابل آبیاری × کیتوزان بر شاخص‌های کمی رشد ریحان بنفش

	طول ساقه (m)	طول گل- آذین (m)	تعداد شاخه جانبی	سطح برگ (cm <sup>2</sup> )	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ریشه (g)	وزن تر اندام هوایی (g)	وزن خشک اندام هوایی (g)
I1C1	39.75 a*	13.95a	15.25a	4.75c	1.65b	1.06c	12.16c	2.44b
I1C2	39.02ab	13.95a	14.91a	4.83b	1.74a	1.13a	12.55b	2.44b
I1C3	39.70a	11.83c	15.04a	5.03a	1.63b	1.11b	12.88a	2.62a
I1C4	40.37a	12.83b	14.75a	4.76c	1.55c	1.02d	12.18c	2.49b
I2C1	32.39de	9.75d	11.20bc	4.14e	1.01e	0.56e	9.93e	2.12c
I2C2	34.91cd	9.56d	10.08d	4.20de	0.96f	0.56e	9.86f	2.08c
I2C3	36.41bc	11.33c	10.54cd	4.17de	1.06d	0.51g	10.12d	2.10c
I2C4	33.47d	10.16d	11.70b	4.23d	1.02e	0.55f	9.70g	2.10c
I3C1	28.29f	4.37f	11.29b	3.64f	0.59h	0.13ij	7.71j	1.07e
I3C2	29.31f	3.87f	11.45b	3.63f	0.59gh	0.13j	7.96i	1.05e
I3C3	30.16ef	5.62e	11.54b	3.66f	0.61g	0.16h	8.25h	1.17d
I3C4	29.08f	4.25f	11.75b	3.63f	0.59h	0.14i	7.68j	1.07e

\* بر اساس آزمون دانکن حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس در خصوص اثرات متقابل آبیاری و کیتوزان (I×C) نشان داد که بین اثرات متقابل از نظر همه شاخص‌های فیزیولوژیکی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.01$ ). نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفات مختلف فیزیولوژیکی در جدول ۲ آمده است؛ به‌طور کلی آنچه که می‌توان از این جداول نتیجه گرفت آن است که شرایط رطوبتی تأثیر به‌سزایی در شاخص‌های

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

فیزیولوژیکی گیاه داشته است و به مراتب اثرات کاربرد کیتوزان نسبت به سطوح مختلف آبیاری بر شاخص‌های فیزیولوژیکی کمتر بوده است.

جدول ۲- اثرات متقابل آبیاری × کیتوزان بر شاخص‌های فیزیولوژیکی ریحان

اساس		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	پروکلین	قندهای محلول	* بر
دانکن		(mg g <sup>-1</sup> F.W)	(mg g <sup>-1</sup> F.W)	(mg g <sup>-1</sup> F.W)	(mg g <sup>-1</sup> F.W)	(mg g <sup>-1</sup> F.W)	%	آزمون
غیر								حروف
بیانگر	I1C1	1.23a	0.47a	1.70a	6.13c	11.82i	0.88e	مشابه
	I1C2	1.20c	0.45b	1.66b	6.19a	11.51j	0.89e	
	I1C3	1.22b	0.43c	1.66b	6.20a	11.05k	0.85f	
	I1C4	1.23a	0.40d	1.60c	6.15b	12.28h	0.85f	
	I2C1	1.08d	0.38e	1.46d	5.54f	13.84f	0.93d	
	I2C2	1.04f	0.34g	1.38f	5.56e	13.64g	0.94d	
	I2C3	1.03g	0.34g	1.37f	5.62d	14.61d	0.94d	
	I2C4	1.07e	0.35f	1.43e	5.54f	13.32e	0.94d	
	I3C1	0.87i	0.24i	1.11gh	4.66h	17.34b	1.12c	
	I3C2	0.86j	0.25h	1.11g	4.76g	17.17c	1.23a	
	I3C3	0.88h	0.22j	1.10h	4.62i	17.58a	1.17b	
	I3C4	0.87h	0.23ij	1.11gh	4.63i	17.27bc	1.16b	

اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد.

#### بحث

به‌طور کلی، اولین واکنش گیاهان در برابر تنش خشکی کاهش رشد رویشی آن‌ها است. رشد سلول مهم‌ترین فرآیند است که با تنش آبی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. کاهش رشد سلول منجر به کاهش ارتفاع گیاه می‌شود. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس صفات نشان داد که تنش کم‌آبی بر تمام صفات مورد ارزیابی اثر معنی‌داری داشته است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با کاهش رطوبت یا به عبارتی افزایش سطح تنش خشکی ارتفاع بوته گیاه ریحان کاهش یافت که نشان دهنده کاهش تقسیم و رشد سلولی گیاه در طی تنش خشکی می‌باشد. یافته‌های سایر محققان نیز حاکی از آن است که ارتفاع ساقه در گیاه لوبیا (۱۴) و سویا (۱۵) به طور معنی‌داری در شرایط تنش کم‌آبی کاهش یافته است. پس به نظر می‌رسد کاهش در ارتفاع بوته در شرایط تنش خشکی به علت جلوگیری از توسعه و رشد سلول در واکنش به فشار تورگر پایین باشد (۱۶). از طرف دیگر تنش خشکی می‌تواند موجب آسیب‌پذیری کلروپلاست، تورم اضافی، بی‌نظمی‌های تیغه لاملا و ایجاد قطرات چربی در کلروپلاست شود که می‌تواند منجر به کاهش شدت فتوسنتز و در نتیجه کاهش رشد گیاه شود (۱۷).

نتایج سایر تحقیقات نیز مؤید این مطلب است که کاهش رطوبت با اثر منفی بر فتوسنتز سبب کاهش رشد گیاهان شده و با کاهش تقسیم و آماس سلولی سبب کاهش طول ساقه در گیاهان می‌شود. پس علت کاهش در ارتفاع گیاه در شرایط تنش خشکی می‌تواند فشار تورگر پایین همراه با کاهش رشد سلول باشد (۱۸).

علاوه بر آن جدول مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد سطح برگ‌ها نیز به صورت معنی‌داری با اعمال تیمار تنش خشکی کاهش یافت، به طوری که بیشترین و کمترین سطح برگ به ترتیب در شرایط نرمال و ۳۰٪ ظرفیت زراعی به‌دست آمد. نتیجه مطالعات متعدد نیز نشان می‌دهد که تنش خشکی باعث کاهش سطح برگ می‌شود، زیرا که گسترش سطح برگ به تورژسانس برگ بستگی دارد که تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد (۱۹). یافته‌های ما با یافته‌های Manivannan و همکاران (۱۴) مطابقت دارد. آنها نیز کاهش سطح برگ را به عنوان یک نتیجه از اثر فاکتورهای محیطی مثل تنش آب بیان کردند. علت کاهش سطح برگ در شرایط تنش خشکی می‌تواند پیری بیشتر برگ همراه با کاهش رشد سلول باشد (۱۸). در حقیقت در شروع تنش آب، ممانعت از رشد سلولی

منجر به کاهش توسعه برگ‌ها می‌شود. توسعه سطح برگ برای فتوسنتز و عملکرد ماده خشک مهم است، بنابراین کاهش در سطح برگ توسط تنش آب یکی از عوامل مهم کاهش عملکرد از طریق کاهش فتوسنتز می‌باشد (۲۰).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش شدید تعداد شاخه‌های جانبی می‌گردد. شاخه‌دهی زیاد تحت شرایط تنش خشکی یک صفت نامطلوب به حساب می‌آید، زیرا باعث مصرف بی‌هوده رطوبت خاک می‌گردد. محدود شدن شاخه‌دهی در شرایط تنش خشکی در گیاه می‌تواند به عنوان یک مکانیسم سازگاری باشد که به وسیله آن گیاه تلاش می‌کند تا آب را برای مرحله بحرانی‌تر نمو نظیر مرحله گل‌دهی حفظ نماید (۱۸).

همچنین جدول مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار میزان وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گردید. به طوری که بیشترین و کمترین مقدار در صفات مذکور به ترتیب در تیمارهای شاهد و ۳۰٪ ظرفیت زراعی گزارش شد. به طور کلی، تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی می‌باشد که باعث کاهش رشد گیاهان و در نتیجه کاهش عملکرد آنها می‌شود. نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد تنش خشکی با کاهش رشد اندام هوایی سبب کاهش عملکرد ماده خشک در گیاهان مختلف می‌شود. کاهش وزن ریشه و اندام هوایی گیاه را همچنین می‌توان به کاهش فتوسنتز نسبت داد. کاهش فتوسنتز در شرایط تنش خشکی به علت بسته شدن روزنه‌ها، کاهش سطح برگ‌ها و یا کاهش فعالیت پروتوپلاسم رخ می‌دهد. کاهش سطح برگ، به دنبال آن کاهش سطح جذب نور خورشید و به دنبال آن کاهش سطح فتوسنتزی گیاه اتفاق می‌افتد و نهایتاً منجر به کاهش تولید ماده تر و خشک گیاه می‌گردد (۲۱).

شاخص‌های فیزیولوژیکی که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند، میزان کلروفیل a، b، کاروتنوئیدها، میزان پرولین، کربوهیدرات‌های محلول و غیره بودند که تغییرات آنها در اینجا مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده و متقابل سطوح آبیاری و کیتوزان بر اکثر صفات فیزیولوژیکی که مورد ارزیابی قرار گرفتند، معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ).

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس صفات نشان داد که تنش کم‌آبی بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a و b) اثر معنی‌دار داشته است. نتایج به دست آمده از آنالیز رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که در گیاه ریحان بنفش با افزایش شدت تنش خشکی به‌طور معنی‌داری از میزان رنگیزه‌های کلروفیل a و b کاسته شد ( $P < 0.01$ ). نتایج ما مشابه نتایج به‌دست آمده در گیاه پنبه (۲۲)، *Catharanthus roseus* (۱۶) است. کاهش کلروفیل در شرایط خشکی تا حدودی به علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن است که باعث پراکسیداسیون این رنگیزه‌ها و سرانجام تجزیه شیمیایی آنها می‌شود. از طرف دیگر، فعالیت آنزیم گلوتامات کیناز که اولین آنزیم مسیر بیوسنتز کلروفیل است، با تنش خشکی بسیار کاهش می‌یابد (۲۳).

الیسیتور کیتوزان نیز اثر معنی‌داری بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد (جدول ۲). مصرف کیتوزان سبب افزایش قابل ملاحظه کلروفیل a و b نسبت به شاهد شد (جدول ۲). میزان کلروفیل a با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۲ به ۰/۴ گرم در لیتر روند افزایشی داشته است، به طوری که حداکثر مقدار کلروفیل a در غلظت ۰/۴ گرم در لیتر کیتوزان مشاهده شد. حداکثر مقدار کلروفیل b نیز با به‌کار بردن غلظت ۰/۲ گرم در لیتر کیتوزان به‌دست آمد (جدول ۲). با توجه به وجود عنصر نیتروژن در الیسیتور کیتوزان و نقش ساختاری این عنصر در حلقه‌های تتراپیرولی کلروفیل، چنین افزایشی توجیه‌پذیر می‌باشد. از طرف دیگر، احتمالاً مصرف کیتوزان با تأثیر بر روی ژن‌های مسئول سازنده کلروفیل، تولید کلروفیل را زیاد نموده است.

تنش خشکی معمولاً محتوای کلروفیل a و b و کلروفیل کل را در گیاهان عالی کاهش می‌دهد، اما کاروتنوئیدها را کمتر تحت تأثیر قرار می‌دهد. به طور کلی، بررسی‌ها مؤید این است که کاروتنوئیدها نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش خشکی دارند و بنابراین در افزایش مقاومت به تنش خشکی نقش مؤثری دارند (۱۶). در پژوهش ما نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی، در سطح یک درصد بر محتوای کاروتنوئیدها معنی‌دار بوده است. مقدار کاروتنوئید در شرایط تنش خشکی در ریحان بنفش کاهش یافت و بیشترین مقدار کاروتنوئید در شرایط بدون تنش گزارش گردید.

البسیطور کیتوزان نیز اثر معنی داری بر میزان کاروتنوئیدها نشان داد. مصرف کیتوزان باعث افزایش میزان کاروتنوئیدها نسبت به شاهد شد. میزان این رنگیزه‌ها با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۲ به ۰/۴ گرم در لیتر روند افزایشی داشته است، به طوری که حداکثر مقدار کاروتنوئیدها در غلظت ۰/۴ گرم در لیتر کیتوزان مشاهده شد. دزنگ و همکاران (۱۰) گزارش کردند کاربرد کیتوزان محتوی کاروتنوئیدها را در برگ‌های قهوه افزایش داد. آنچه می‌توان گفت این است که کیتوزان در شرایط تنش خشکی می‌تواند باعث افزایش میزان کاروتنوئید شود و اثرات کاهش ناشی از تنش خشکی را تا حدودی جبران نماید.

در این پژوهش نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل تنش کم‌آبی، کیتوزان بر میزان پرولین معنی‌دار بود. پرولین یکی از مهمترین اسمولیت‌های تجمع یافته در گیاهان قرار گرفته در معرض تنش خشکی است. پرولین نه تنها به عنوان یک اسمولیت، بلکه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی در گیاهان، جانوران و میکروبا در نظر گرفته می‌شود که اثرات نامطلوب ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال را کاهش می‌دهد و به عنوان بازدارنده مرگ سلولی شناخته می‌شود (۲۴) و آسیب نوری در غشای تیلاکوئید را نیز کاهش می‌دهد.

در این پژوهش، میزان پرولین در گیاهان تحت تنش کم‌آبی افزایش معنی‌داری داشت. این افزایش در سطح ۳۰٪ ظرفیت زراعی به حداکثر مقدار خود رسید. افزایش پرولین باعث می‌شود که گیاه پتانسیل آبی خود را بیشتر حفظ کند. از عوامل مؤثر در افزایش پرولین تجزیه پروتئین‌ها و عدم سنتز پروتئین است (۲۵). محلول پاشی گیاهان با کیتوزان نیز تا حدی منجر به افزایش این صفت شد (جدول ۲). به طور کلی، گیاهان می‌توانند خودشان را تا اندازه‌ای در مقابل تنش خشکی ملایم توسط تجمع اسمولیت‌ها به خصوص پرولین محافظت کنند. می‌توان گفت، تجمع پرولین در زمان تنش، به علت تغییر در سرعت اکسیداسیون پرولین به گلوتامات یا عدم دخالت آن در سنتز پروتئین و یا مجموعه این عوامل می‌باشد (۲۶). پرولین می‌تواند به عنوان یک سیگنال مولکولی برای بیان ژنهای ویژه‌ای برای برگشت گیاه از تنش عمل کند (۲۷).

به نظر می‌رسد که تجمع پرولین در تنش‌های اسمزی نه تنها فعالیت‌های شیمیایی را متوقف نمی‌کند، بلکه به عنوان یک محافظ اسمزی ایفای نقش می‌کند. میزان پرولین در گیاهان محلول‌پاشی شده با کیتوزان، نسبت به شاهد بیشتر بود و اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت کیتوزان مشاهده شد (جدول ۲). افزایش محتوی پرولین در گیاهچه‌های ذرت (۲۸) تیمار شده با کیتوزان نیز گزارش شده است. به نظر می‌رسد کیتوزان در شرایط تنش خشکی توانسته به عنوان جاذب الرطوبه عمل کند و با مواد مداخله‌گری که ممکن است در خود داشته باشد، مقدار پرولین را افزایش دهد.

در این بررسی افزایش محتوای قندهای محلول تحت تنش خشکی مشاهده شد که احتمالاً به دلیل هیدرولیز نشاسته و افزایش قندهای محلول حاصل از آن است. گزارش شده است که در شرایط تنش، تجمع قندها از طریق تنظیم اسمزی و نگهداری تورژسانس و همچنین پایداری غشاهای پروتئین‌ها از سلول‌ها محافظت می‌کنند (۲۹).

معمولاً گیاهان در مواجه شدن با تنش خشکی کاربرد کربن را تغییر می‌دهند و وضعیت کربوهیدرات‌های برگ تغییر می‌کند. این مسئله می‌تواند به عنوان یک سیگنال کاتابولیکی در پاسخ به تنش عمل کند (۳۰). البته عدم کاهش قند در شرایط تنش خشکی ممکن است به دلیل تجزیه نشاسته و کاهش آن باشد. افزایش میزان قند محلول در شرایط تنش خشکی از راه تجزیه کربوهیدرات‌ها می‌تواند سبب افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی و همچنین حفظ فعالیت متابولیکی گیاه در این شرایط گردد (۳۱).

مکانیسم عمل کربوهیدرات‌ها در برابر تنش خشکی به این صورت نیز می‌تواند باشد که، گروه‌های هیدروکسیل کربوهیدرات‌ها جانشین آب شده و موجب حفظ برهم‌کنش‌های هیدروفیلی در غشاهای پروتئین‌ها در طول تنش می‌شوند. بنابراین کربوهیدرات‌ها از طریق باندهای هیدروژن با پروتئین‌ها و غشاهای برهم‌کنش داشته و مانع تخریب آن‌ها می‌شوند (۳۲). نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد اثر کیتوزان نیز در سطح یک درصد بر میزان کربوهیدرات‌های محلول معنی‌دار بوده است. در گیاهان بدون تنش و تنش ملایم با محلول پاشی کیتوزان اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر میزان کربوهیدرات‌های محلول مشاهده نشد، در حالی که در گیاهان تنش‌دیده محلول پاشی با کیتوزان میزان این صفت را افزایش داد (جدول ۲). محققان دریافتند که محلول پاشی گیاه برنج با کیتوزان در شرایط تنش سبب افزایش کربوهیدرات‌های محلول می‌شود (۳۳) که با نتایج این بررسی مطابقت دارد. بنابراین کیتوزان

ممکن است با افزایش کربوهیدرات‌های محلول در گیاهان تنش دیده و در نتیجه تنظیم اسمزی و حفظ پتانسیل آب سلول، در کاهش اثرات زینبار تنش کم‌آبی روی گیاهان مؤثر واقع شود.

### نتیجه گیری

تنش خشکی به عنوان یک فاکتور محیطی مهم رشد و عملکرد گیاه ریحان را تحت تأثیر قرار داد و تغییرات بسیاری در ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، ریحان ایجاد کرد. استفاده از تیمار کیتوزان موجب تعدیل اثرات منفی تنش خشکی شد. می‌توان گفت کیتوزان اثرات مضر حاصل از تنش کمبود آب را کاهش داده و سبب بهبود رشد گیاه در شرایط تنش می‌شود.

### References:

1. Hasani A, Omidbeigi R. Effects of drought stress on some morphological, physiological and metabolic characteristics of basil plant. J Agric Sci. 2002; 12(3): 472.
2. Zhua Z, Lianga Z, Hana R, Wang Xin WX. Impact of fertilization on drought response in the medicinal herb *Bupleurum chinense* DC: Growth and saikosaponin production. Ind Crop Prod. 2009; 29(2-3): 629-33.
3. Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant J. 2006; 45: 523-39.
4. Zobayed SMA, Afreen F, Kozai T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. Environ Exp Bot. 2007; 59(2): 109-16.
5. Labra M, Miele M, Ledda B, Grassi F, Mazzei M, et al. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivares, Plant Sci. 2004; 167:725-31.
6. Sajjadi SE. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) From Iran. DARU J Pharm Sci. 2006; 14:128-30.
7. Gupta P, Yadav DK, Siripurapu KB, Palit G, Maurya R. Constituents of *Ocimum sanctum* with antistress activity. J Nat Prod. 2007; 70: 1410-16.
8. Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharm. 2007; 1: 69-79.
9. Cheng X, Zhou U, Cui X. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor, Biotechnol J. 2006; 121: 253-60.
10. Dzong NA. Enhancing Crop Production with Chitosan and Its Derivatives. In: Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, Kim, Se-kwon . Taylor and Francis. Boca Raton London New York. 2011; pp: 643.
11. Arnon AN. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agron J. 1967; 23: 112-121.
12. Bates LS, Waldern RP, Tear ID. Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant Soil. 1973; 39: 205-7.
13. Sheligl HQ. Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. Planta J. 1986; 47-51.
14. Manivannan P, Jaleel CA, Sankar B, Kishorekumar A, Somasundaram R, et al. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. Colloids Surf. B: Biointerf. 2007; 59: 141-9.

15. Zhang M, Duan L, Zhai Z, Li J, Tian X, et al. 2004. Effects of plant growth regulators on water deficit-induced yield loss in soybean. Proceedings of the Fourth International Congress of Agricultural Sciences. 26 Sep-1 Oct, Brisbane, Australia. 252-256.
16. Jaleel CA, Manivannan P, Lakshmanan GM, Gomathinayagam M, Panneerselvam R. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. Coll. Surf. B: Biointeraction. 2008; 61: 298-303.
17. Kaiser WM, Stepper W, Urbach W. Photosynthesis of isolated chloroplasts and protoplasts under osmotic stress. Reversible swelling of chloroplasts by hypotonic treatment, and its effect on photosynthesis. Planta. 1981; 151: 375-80.
18. Ogbonnaya CI, Sarr B, Brou C, Diouf O, Diop NN, et al. Selection of cowpea in hydroponics, pots and field for drought tolerance. Crop Sci. 2003; 43: 1114-20.
19. Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Plant Physiol 2004; 161: 1189-202.
20. Kramer PJ. Water Relations of Plants. Academic Press, 1983.
21. Wullschlegel S, Loewith R, Oppliger W, Hall MN. Molecular organization of TOR complex 2. The Journal of Biological Chemistry. 2005; 280: 30697-704.
22. Massacci A, Nabiev SM, Pietrosanti L, Nematov SK, Chernikova TN, et al. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. Plant Physiol Biochem. 2008; 46: 189-95.
23. Boyer GL, Sullivan JJ, Andersen RJ, Harrison PJ, Taylor FJ. Effects of nutrient limitation on toxic production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. Mar Biol. 1987; 96: 123-8.
24. Chen C, Dickman M. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*, Papers in Plant Pathology. 2005; 102(9): 3459-64.
25. Fendia IS, Georgieva K, Grigova I. Light-dark changes proline content of barley leaves under salt stress. Planarum. 2003; 45: 59-63.
26. Khan MN, Siddiqui MH, Mohammad F, Khan MM, Naeem M. Salinity induced changes in growth, enzyme activities, photosynthesis, proline accumulation and yield in linseed genotypes. World J Agric Sci. 2007; 3: 685-95.
27. Szabados L, Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. Trends Plant Sci. 2009; 15: 89-97.
28. Guan YJ, Hu J, Wang XJ, Shao CX. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. J Zhejiang Univ Sci B. 2009; 10: 427-433.
29. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell. 1995; 7: 1099-1111.
30. Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, et al. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. Plant Physiol. 2010; 154: 357-72.
31. Patakas A. Changes in the solutes contributing to osmotic potential during leaf ontogeny in grapevine leaves. Am J Enol Vitic. 2000; 51(3): 223-226.
32. Leopold AC, Sun WQ, Bernal-Lugo I. The glassy state in seeds: analysis and function. Seed Sci Technol. 1994; 4: 267-274.

33. Boonlertnirun S. Effects of chitosan on agronomic characters and some physiological responses of rice [*Oryza sativa* L.] cultivar Suphanburi 1 under drought condition. Bangkok: Kasetsart University 2006; 89

## ساخت سازواره ژنی برای همسانه سازی بتاگلوکاناز در باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

الهام برزویی سیله<sup>۱</sup>، فرشاد بدالاهی<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دکترای تخصصی ایمنولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** پلی ساکارید غیرنشاسته بتاگلوکاناز از اجزای دیواره سلولی آندوسپرم غلات است که یک عامل ضد تغذیه‌ای بوده و با ایجاد شرایط چسبنده در روده، هضم و جذب سایر مواد مغذی را در پرندگان به طور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد و مدفوع پرندگان را بسیار مرطوب و چسبنک می‌کند. لذا هدف این تحقیق ساخت سازواره ژنی جهت انتقال ژن کد کننده آنزیم بتاگلوکاناز در باکتری فلور روده پرنده انتخاب گردید.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق ژن کد کننده آنزیم بتاگلوکاناز (EC 3.2.1.73) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ژنوم باکتری باسیلوس سوبتلیس جداسازی و تکثیر گردید و به روش همسانه سازی T/A در حامل pGEM-T Easy کلون و به درون اشریشیاکلی ترانسفورم گردید. همچنین توالی فرادست و فرودست ژن *slp* از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز به صورت جداگانه در پلاسمید pGEM همسانه سازی شدند. سپس سه ژن به روش ساب کلونینگ به ترتیب فرادست-بتاگلوکاناز-فرودست در پلاسمید pET32 همسانه سازی شد.

**یافته‌ها:** تأیید صحت کلون ژن‌ها با دو روش PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی گرفت. و صحت ساب کلونینگ با روش‌های PCR و هضم آنزیمی با آنزیم‌های XhoI و XbaI مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت.

**نتیجه‌گیری:** سازه ژنی حاصل این امکان را فراهم می‌آورد که در تحقیقات آینده بتوان ژن بتاگلوکاناز را درون ژنوم باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به روش نوترکیبی همسان درج نمود.

**واژگان کلیدی:** پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بتاگلوکاناز، بتاگلوکاناز

نشانی نویسنده مسئول: استان آذربایجان غربی، ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه. کد پستی: ۵۷۵۶۱۵۱۸۱۸

تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۵۲۷۴۱ همراه: ۰۹۱۳۲۸۲۸۴۷۳

ایمیل: yadollahi.farshad@gmail.com



## Generation of gene construct to insertion of beta-glucanase gene in *Lactobacillus acidophilus* bacteria

Elham Borzoei Sileh<sup>1</sup>, Abbas Doosti<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

### Abstract

**Background:** non-starch polysaccharide beta-glucan is one of the components of the cell wall of cereal endosperm, which is an anti-nutritional agent and by creating sticky conditions in the intestine, it negatively affects the digestion and absorption of other nutrients in birds, and feces It makes the birds very moist and sticky. Therefore, the goal of this research was to construct a gene system for the transfer of the gene encoding the beta-glucanase enzyme in the intestinal flora of birds.

**Materials and methods:** In this research, the gene coding for beta-glucanase enzyme (EC 3.2.1.73) was isolated and amplified from the genome of *Bacillus subtilis* bacterium using polymerase chain reaction, and by T/A homogenization method in pGEM-T carrier. Easy was cloned and transformed into *Escherichia coli*. Also, the upstream and downstream sequences of the slp gene from *Lactobacillus acidophilus* were also cloned separately in pGEM plasmid. Then three genes were homogenized by subcloning in the order of upstream-beta-glucanase-downstream in pET32 plasmid.

**Results:** Confirmation of the authenticity of gene clones was investigated by two methods, PCR and enzyme digestion. And the correctness of subcloning was evaluated and confirmed by PCR methods and enzyme digestion with *XhoI* and *XbaI* enzymes.

**Conclusion:** The resulting gene structure makes it possible to insert the beta-glucanase gene into the genome of *Lactobacillus acidophilus* by homologous recombination in future research.

**Keywords:** Probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, Beta-glucan, Beta-glucanase

### مقدمه

امروزه مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلاتی از قبیل مقاومت باکتریایی، برهم زدن تعادل میکروبی دستگاه گوارش، ناهنجاری‌های مادرزادی، بیماری‌های مزمن، آلایندگی محیط زیست و تهدید سلامت مصرف‌کنندگان را به وجود آورده است (۱). به دلیل خواص درمانی شناخته شده باکتری‌های پروبیوتیک، تحقیقات در مورد استفاده از آن‌ها به جای آنتی‌بیوتیک‌ها، به صورت گسترده‌ای در سرتاسر جهان رو به افزایش است (۲). پروبیوتیک‌ها به طور عمده در روده کوچک فعال هستند. باکتری‌های پروبیوتیک مواد مختلفی را تولید می‌کنند که هم بر روی باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی اثر مهارکننده دارند. این مواد نه تنها تعداد سلول‌های زنده پاتوژن‌ها را کم می‌کنند، بلکه ممکن است متابولیسم باکتری‌ها یا تولید سموم توسط آنها را نیز تحت تاثیر قرار دهند (۳). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس یکی از شناخته شده ترین گونه‌ی لاکتوباسیلوس است و یک پروبیوتیک تجاری است که توانایی تحمل اسید معده و نمک‌های صفرای و قابلیت جایگزین شدن در روده را دارد و امروزه به عنوان جایگزین مناسبی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شود (۴). بهترین راه انتقال این باکتری، مصرف دهانی غذاهای ویژه‌ای تحت عنوان فرآورده‌های پروبیوتیک است (۵). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به طور عمده در فلور میکروبی دهان، واژن و دستگاه گوارش انسان و همه حیوانات خونگرم از جمله پرندگان زندگی می‌کنند (۶).

بتاگلوکان از عمده کربوهیدرات‌های دیواره سلولی مخمرها، باکتری‌ها، جلبک‌ها، قارچ‌ها و گیاهان (مخصوصاً با نسبت بالایی در غلات مثل جو و چاودار) بوده و یک هموپلیمر خطی از واحدهای دی‌گلوکزی است که با فرم بتا توسط باندهای  $\beta$ -۱,۳ و  $\beta$ -۱,۴ به یکدیگر اتصال می‌یابند (۷). بتاگلوکان توسط آنزیم‌های ترشح شده در دستگاه گوارشی پرندگان هضم نمی‌شود و اگر چه سبب ایجاد علائم آشکار و مشخص مسمومیت نمی‌شود اما دارای خواص ضد مغذی بوده که عملکرد جوجه‌های گوشتی و مرغ‌های تخم‌گذار را

تحت تاثیر قرار می‌دهد. بتاگلوکان هضم نشده موجب چسبندگی مدفوع در حیوان می‌شود که وضعیت بستر را نامطلوب می‌سازد. این مورد در پرندگان تخم گذار باعث افزایش تخم‌مرغ‌های کثیف می‌گردد. بنابراین استفاده از آنزیم تجزیه کننده بتاگلوکان (بتاگلوکاناز) در جیره‌های حاوی غلات (جو، یولاف، چاودار و گندم)، جهت حداکثر بهره‌وری از مواد مغذی موجود در این غلات لازم به نظر می‌رسد (۸). از آنجایی که پانکراس نقش مهمی در تولید آنزیم و آزادسازی آنزیم‌های گوارشی در بخش آغازین روده‌ی باریک برعهده دارد، در نتیجه استفاده از جیره‌های حاوی بتاگلوکان، فعالیت پانکراس جهت تولید آنزیم برای شکستن پیوندهای شیمیایی بتاگلوکان بیشتر شده و دچار هایپرتروفی می‌شود. بنابراین افزودن آنزیم بتاگلوکاناز به این جیره می‌تواند پرکاری پانکراس را کاهش داده و مانع افزایش اندازه آن شود (۹ و ۱۰). آنزیم بتاگلوکاناز توسط بعضی از گونه‌های باکتریایی و قارچ‌ها و همچنین گیاهان تولید می‌شود. این آنزیم پیوندهای گلیکوزیدی در بتاگلوکان را تجزیه و تولید قطعات کوتاه الیگوساکاریدی می‌کند (۱۱). وزن مولکولی این آنزیم به طور معمول بین ۲۰ تا ۸۰ کیلو دالتون متغیر است (۱۲). آنزیم بتا ۱،۳- ۱،۴- گلوکاناز در باسیلوس سوبتیلیس توسط ژن *bglS* با ۷۶۷ نوکلئوتید کد می‌شود. این آنزیم دارای ۲۴۵ اسید آمینه و وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتون با ساختار سه بعدی و ویژگی‌های کاتالیزوری شناخته شده است. آنزیم بتا ۱،۳- ۱،۴- گلوکاناز هیدرولیزکننده پیوند بتا ۱،۳- ۱،۴- گلیکوزیدی پلی ساکارید بتاگلوکان موجود در دیواره‌ی سلولی گیاهان و آندوسپرم غلات می‌باشد و حضور این آنزیم (بتاگلوکاناز) مشکل تجزیه بتاگلوکان را حل می‌کند (۱۳). بنابراین، هدف از این پژوهش، استخراج ژن *بتاگلوکاناز* از باکتری باسیلوس سوبتیلیس و کلون کردن آن در باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، به عنوان یک باکتری پروبیوتیک، است.

#### مواد و روش‌ها

**سویه‌های باکتریایی:** سویه‌های استاندارد باکتریایی باسیلوس سوبتیلیس جهت استخراج ژن بتاگلوکاناز، از بخش میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران؛ باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 (به عنوان باکتری پروبیوتیک) برای تکثیر توالی فرادست و فرودست ژن *slp* (جهت نوترکیبی همسان) از مرکز کلکسیون ملی قارچ و باکتری‌های ایران و باکتری اشریشا کلی سویه Top10 جهت اهداف کلون سازی و تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه شدند. به منظور همسانه سازی محصولات PCR به روش کلون سازی T/A، از کیت شرکت Promega که حاوی حامل pGEM است، بهره گرفته شد. اندازه این وکتور ۳۰۱۵ جفت باز است. از وکتور بیانی pET32a به عنوان وکتور بیان شونده در سیستم پروکاریوتی استفاده شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر دو حامل به آمپی‌سیلین برای انتخاب سلول‌های باکتریایی ترانسفرم شده، از ویژگی‌های این وکتورها است. اندازه وکتور pET32a، ۷۶۱۱ جفت باز می‌باشد.

استخراج DNA و تکثیر ژن‌های *bglS*، *slp-up* و *slp-down*: به منظور استخراج DNA ژنومی باسیلوس سوبتیلیس از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران، استفاده شد. توالی ژن *bglS* به منظور طراحی پرایمر از بانک ژن جهانی NCBI گرفته شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق که برای تکثیر و جداسازی ژن‌ها مورد نیاز هستند، با کمک نرم افزار Gene runner طراحی شدند. برای ژن *bglS* پرایمر رفت دارای توالی 5'-TTAGGTACCATGCCTTATCTGAAACGA و پرایمر برگشت 3'-TACGAGCTCAGGTTCTTTCACATTTGG-5' است. به منظور سهولت کلون سازی و یا خارج ساختن ژن *bglS* از یک وکتور و کلون سازی مجدد آن در وکتورهای متفاوت دیگر، در انتهای ۵-پرایمر هر یک از پرایمرهای طراحی شده، سایت برش آنزیمی در نظر گرفته شد. به طوری که جایگاه برش در توالی پرایمر رفت سایت GGTACC برای آنزیم KpnI و در توالی پرایمر برگشت سایت آنزیمی GAGCTC برای آنزیم SacI قرار داده شد. پرایمرهای مذکور توسط شرکت سیناژن تولید شدند.

ژن *bglS* درون ژن *slp* از باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس قرار خواهد گرفت. به همین منظور، توالی دو سر ژن *slp* نیز تکثیر و استخراج گردید. پرایمر *slp-up* برای قسمت ابتدایی ژن و پرایمر *slp-down* برای قسمت انتهایی ژن طراحی شد. پرایمر رفت *slp-up* دارای توالی 3'-TTGTCTAGAGTGCCGTACCTGTAAGTGCTG-5' (سایت برش XbaI) و پرایمر برگشت 3'-AGTGGTACCTTGACCATTACAGTGTGCTTC-5' (سایت برش KpnI) است. پرایمر

رفت *slp-down* دارای توالی '5'-TGCGAGCTCTAGCAACTTACAGCATTACGG-3' (سایت برش SacI) و پرایمر برگشت '3'-TGACTCGAGGTGATGTTGGTGACGCTGAC-5' (سایت برش XhoI) است. تکثیر ژن-های مذکور با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) انجام شد. برای این کار ابتدا میکس ساخته شد که حاوی مقدار ۱۲۵ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت 10X به همراه ۵۰ میکرولیتر  $MgCl_2$  با غلظت ۵۰ میلی مولار و ۲۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار مخلوط شد و با ۸۰۰ میکرولیتر آب تزریق به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. به طوری که به ازای هر میکروتیوپ واکنش، ۲۰ میکرولیتر از مخلوط ذکر شده (میکس)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (۰/۱ میکرومولار از هر پرایمر)، همچنین ۱ میکرولیتر آنزیم Taq رقیق (مقدار ۱/۲۵ واحد آنزیم شامل ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمرز Taq 5u/ul بعلاوه ۰/۷۵ میکرولیتر آب مقطر) در یک میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتری، مخلوط شدند. در آخر ۲ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از DNA باسیلوس سوبتلیس برای تکثیر *bglS* به مخلوط واکنش اضافه شد. از ژنوم استخراجی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز به عنوان الگو جهت تکثیر توالی فرادست و فرودست ژن *slp* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید. برای جلوگیری از تبخیر، یک قطره (۲۰ میکرولیتر) روغن معدنی استریل به هر میکروتیوپ اضافه شد. برنامه دمایی PCR در سه مرحله انجام شد. مرحله اول شامل حرارت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم متشکل از ۳۰ چرخه سه قسمتی بود. قسمت اول جهت دناتوره کردن (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ژن *bglS* و ۶۶ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های *slp-up* و *slp-down* به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه انجام شد. بررسی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه Uvdoc صورت پذیرفت. برای استخراج DNA از ژل، از کیت استخراج DNA شرکت Bioneer استفاده گردید.

**کلون سازی T/A:** برای کلون سازی ژن‌های *slp-down* و *slp-up*، *bglS* در پلاسمید pGEM ابتدا محصول PCR به همراه کمترین مقدار ممکن از آگارز همراه آن، با تیغ اسکالپل از روی ژل بریده شد. سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل، خالص سازی گردید. محصول PCR تخلیص شده، با استفاده از کیت T/A، بر اساس دستور کار کیت، وارد وکتور pGEM گردید. به این منظور واکنش اتصال بین هر کدام از ژن‌ها و پلاسمید pGEM انجام شد. در مرحله بعد هر یک از محصولات حاصل از همسانه سازی T/A (*pGEM\_slp-up*، *pGEM\_bglS* و *pGEM\_slp-down*) به صورت جداگانه در سلول مستعد (در باکتری‌های *E. coli* سویه *TOP10F* که به روش شیمیایی با استفاده از کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) مستعد شده بودند) ترانسفورم گردید. سپس باکتری‌های ترانسفرم شده روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شبانه داده شدند. پس از مشاهده کلنی‌ها، به منظور حفظ و تکثیر باکتری‌های ترانسفرم شده، تعداد ۲۰ کلنی به صورت تصادفی انتخاب و از آنها روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ماتریکس تهیه شد. ماتریکس‌های حاصل به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از بین ماتریکس‌های رشد یافته، تعدادی به صورت تصادفی انتخاب و در لوله‌های حاوی ۵ میلی لیتر محیط LB-Broth همراه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شدند. از باکتری‌های رشد یافته در این مرحله، با استفاده از کیت (Bioneer، کره جوبی)، تخلیص پلاسمید صورت گرفت و تایید اولیه درستی کلون سازی ژن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌ها و انجام PCR، همچنین هضم آنزیمی با آنزیم‌های اختصاصی هر ژن انجام شد.

**کلون سازی ژن در وکتور بیانی:** بعد از این که ژن‌های *bglS* و *slp-down* و *slp-up* به صورت جداگانه در حامل pGEM کلون شد، هر یک از ژن‌های مذکور برای ساب کلون شدن وارد حامل pET32 شد. به این صورت که، ژن *slp-up* با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر *XbaI* و *KpnI* از پلاسمید pGEM استخراج شده جداسازی شد. باند مربوط به ژن *slp-up* روی ژل آگارز با تیغ اسکالپل برش داده شد و ژن *slp-up* از حامل pGEM به روش استخراج DNA از ژل جداسازی گردید. برای اتصال ژن *slp-up* به حامل pET32 ابتدا حامل pET32 با آنزیم‌های محدودالتر *XbaI* و *KpnI* مربوط به این ژن، برش داده شد. محلول حاصل

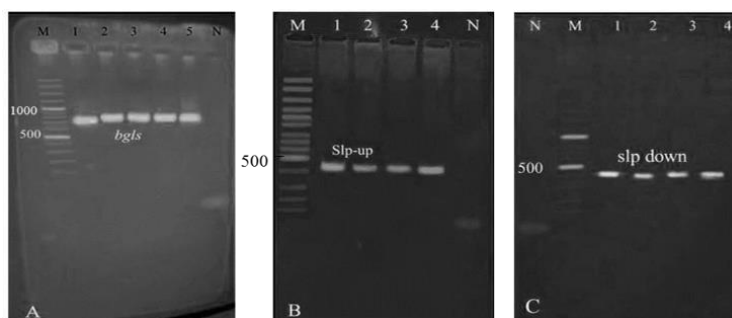
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

روی ژل آگارز الکتروفورز شد. تک باند مشاهده شده نشان دهنده برش حامل pET32 توسط آنزیم‌ها است. باند مورد نظر برش و خالص سازی شد. سپس حامل pET32 برش داده شده و ژن *slp-up* خالص شده مخلوط گردید و با آنزیم T4 لیگاز اتصال ژن به وکتور انجام شد و در نهایت این سازه وارد باکتری E.coli گردید. هر یک از مراحل فوق برای ژن‌های *bgls* و *slp-down* نیز انجام شد با این تفاوت که با آنزیم‌های مخصوص هر ژن برش داده شد. جهت تایید نهایی ساخت سازواره-*slp-up\_bgls\_slp-down* pET32 پس از ترانسفورماسیون، DNA استخراج گردید و PCR با پرایمر مستقیم ژن *slp-up* و پرایمر معکوس ژن *slp-down* انجام گرفت. مشاهده باند مورد نظر (اندازه سه ژن) پس از الکتروفورز نشان دهنده اتصال هر سه قطعه ژن بود. هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودالایتر XhoI و XbaI انجام گرفت. مشاهده دو باند مربوط به حامل pET32 و سازه ژنی صحت ساخت سازواره را تایید کرد.

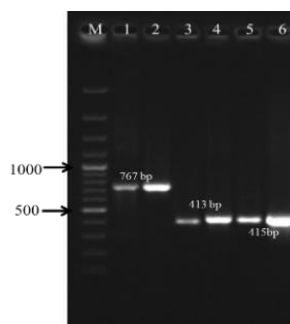
### یافته‌ها

نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های *bgls* و *slp-up* و *slp-down*: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای هر یک از ژن‌های *bgls* و *slp-up* و *slp-down* انجام شد و محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شد و به ترتیب محصولاتی با اندازه‌های ۷۶۷، ۴۱۳، ۴۱۵ جفت باز برای ژن‌های مذکور مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی نتایج محصول PCR (A) باند مربوط به ژن *bgls* با اندازه ۷۶۷ جفت باز (B) باند ۴۱۳ جفت باز مربوط به توالی فرادست ژن *slp* (C) باند با اندازه ۴۱۵ جفت باز مربوط به توالی فرودست ژن *slp*. N در تمام نمونه‌ها کنترل منفی و M مارکر ۱۰۰ bp شرکت فرمنتاز.

نتایج حاصل از استخراج DNA از ژل: قطعه ژن مورد نظر با موفقیت از ژل تخلیص گردید و برای تائید صحت تخلیص DNA از ژل به میزان ۲ میکرولیتر از هر سه ژن روی ژل آگارز الکتروفورز شد (شکل ۲).

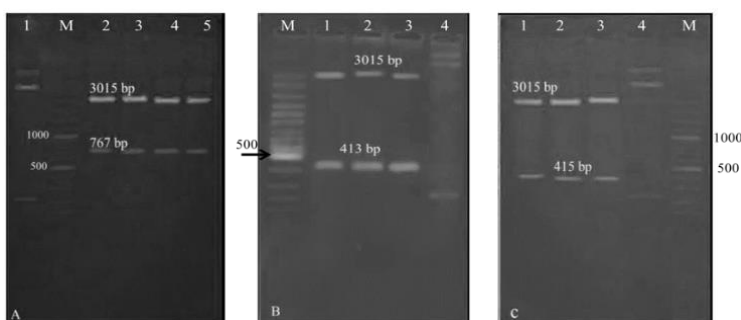


شکل ۲- بررسی نتایج استخراج DNA از ژل. چاهک‌های ۱ و ۲ باند ۷۶۷ جفت بازی مربوط به ژن *bgls* چاهک‌های ۳ و ۴ باند ۴۱۳ جفت بازی مربوط به ژن *slp-up* و چاهک‌های ۵ و ۶ باند مربوط به ژن *slp-down*. M مارکر ۱۰۰ bp شرکت فرمنتاز.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

نتایج مربوط به انجام واکنش T/A کلونینگ و ترانسفورماسیون: از DNA تخلیص شده، برای انجام T/A کلونینگ استفاده شد. ژن‌های *slp-up*, *slp-down* و *bgls* به صورت جداگانه در حامل pGEM با موفقیت کلون گردید و پس از کشت تک کلونی‌های حاصل به صورت ماتریکس، استخراج DNA انجام گرفت. برای تأیید صحت T/A کلونینگ PCR انجام گردید. با انجام این آزمون اندازه‌های ۷۶۷ bp برای *bgls*، ۴۱۳ bp برای توالی فرادست ژن *slp* و اندازه قطعه ۴۱۵ برای توالی فرودست ژن *slp* مشاهده گردید حضور این باندها بیان کننده صحت کلون این ژن‌ها در حامل pGEM می‌باشد. صحت انجام کلونینگ علاوه بر آزمون PCR، با برش آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده نیز تأیید گردید. حامل‌های pGEM حاوی ژن‌های *slp-up*, *slp-down* و *bgls* تحت برش با آنزیم‌های اختصاصی قرار گرفتند و محصول حاصل روی ژل آگارز الکتروفورز شد. مشاهده باندهای ۳۰۱۵ جفت بازی برای حامل pGEM و باندهای ۷۶۷، ۴۱۳ و ۴۱۵ جفت بازی به ترتیب برای *slp-up*, *bgls* و *slp-down* صحت انجام کلونینگ را تأیید کرد (شکل ۳).

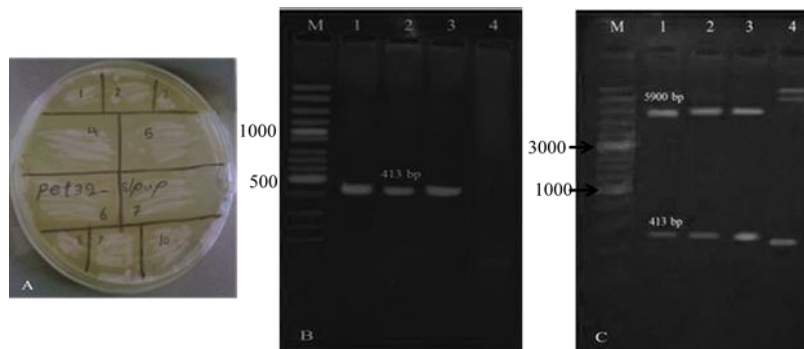


شکل ۳- نتایج کلونینگ *slp-up*, *bgls* و *slp-down* در حامل pGEM به روش هضم آنزیمی. (A) حضور دو باند ۳۰۱۵ مربوط به حامل pGEM و باند ۷۶۷ مربوط به ژن *bgls*. چاهک ۱ حامل pGEM برش نیافته حاوی ژن *bgls*. (B) حضور دو باند ۳۰۱۵ مربوط به حامل pGEM و باند ۴۱۳ مربوط به ژن *slp-up* و چاهک شماره ۵ حامل pGEM برش نیافته حاوی ژن *slp-up*. (C) حضور دو باند ۳۰۱۵ مربوط به حامل pGEM و باند ۴۱۵ مربوط به ژن *slp-down*. چاهک ۴ شماره حامل pGEM برش نیافته حاوی ژن *slp-down*. مارکر M ۱۰۰ bp شرکت فرمنتاز.

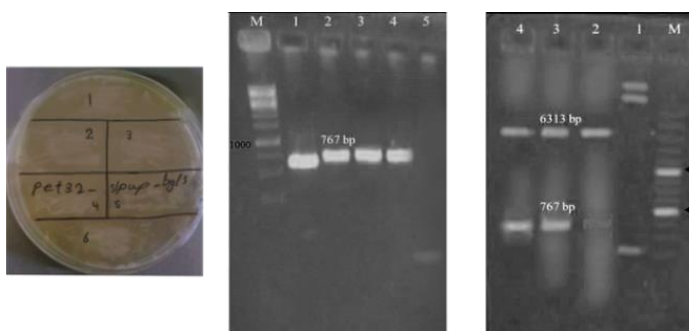
نتایج ساب کلونینگ ژن *slp-up* در حامل pET32: ژن *slp-up* در حامل pET32 ساب کلون و به درون باکتری *اشریشیا کلی* سویه *TOP10* با موفقیت ترانسفورم شد. سپس استخراج پلاسمید انجام گرفت و صحت ساب کلونینگ آن با دو روش PCR و هضم آنزیمی تأیید گردید. حضور باندهای ۵۹۰۰ برای حامل pET32 و باند ۴۱۳ برای توالی فرادست ژن *slp* بیان کننده صحت انجام ساب کلونینگ می‌باشد (شکل ۴). در مرحله بعد ژن *bgls* با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر و آنزیم T4 لیگاز در حامل pET32 به ژن *slp-up* متصل گردید. با الکتروفورز کردن محصول حاصل روی ژل آگارز، یک قطعه به طول ۶۳۱۳ bp برای حامل pET32 و ژن *slp-up* و یک قطعه به طول ۷۶۷ برای ژن *bgls* مشاهده گردید (شکل ۵). در نهایت ژن *slp-down* نیز مطابق روش فوق به دو ژن *slp-up\_bgls* متصل گردید. حضور باندهای ۷۰۸۰ جفت بازی مربوط به *slp-up\_bgls* pET32 و باندهای ۴۱۵ جفت بازی مربوط به ژن *slp-down* در روش هضم آنزیمی بیانگر صحت ساب کلونینگ است (شکل ۶).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

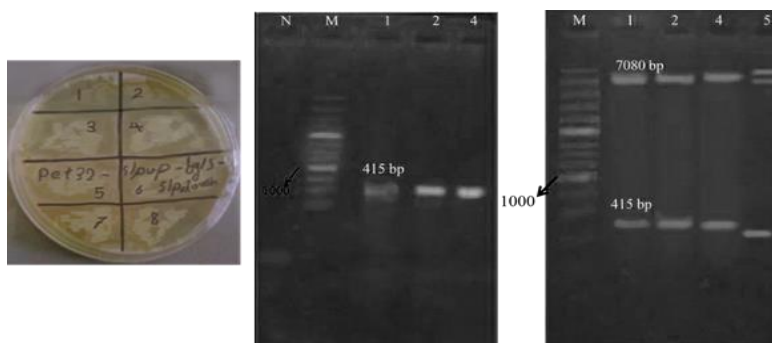
### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد



شکل ۴- نتایج ساب کلونینگ ژن *slp-up* (A) ماتریکس تهیه شده از ساب کلونینگ ژن *slp-up* در حامل pET32 (B) تایید صحت ساب کلونینگ به روش PCR و مشاهده باند ۴۱۳ جفت بازی مربوط به ژن *slp-up* .M مارکر ۱۰۰ bp شرکت فرمنتاز (C) تایید صحت ساب کلونینگ به روش هضم آنزیمی و مشاهده دو باند ۵۹۰۰ bp مربوط به حامل pET32 و باند ۴۱۳ bp برای توالی فرادست ژن *slp* چاهک شماره ۴ حامل برش نیافته حاوی ژن *slp-up* .M در تمام نمونه‌ها مارکر ۱ kb شرکت فرمنتاز.



شکل ۵- نتایج اتصال ژن *bgls* به ژن *slp-up* در حامل pET32 (A) ماتریکس تهیه شده از ساب کلونینگ ژن *slp-up-bgls* در حامل pET32 (B) تایید صحت اتصال ژن *bgls* به ژن *slp-up* در حامل pET32 به روش PCR و مشاهده باند ۷۶۷ جفت بازی مربوط به ژن *bgls* (C) تایید صحت اتصال ژن *bgls* به ژن *slp-up* در حامل pET32 به روش هضم آنزیمی و مشاهده دو باند ۶۳۱۳ bp مربوط به حامل pET32 و ژن *slp-up* و مشاهده باند ۴۱۳ bp برای توالی فرادست ژن *slp* چاهک ۱ حامل برش نیافته حاوی ژن *slp-up-bgls* .M در تمام نمونه‌ها مارکر ۱ kb شرکت فرمنتاز.

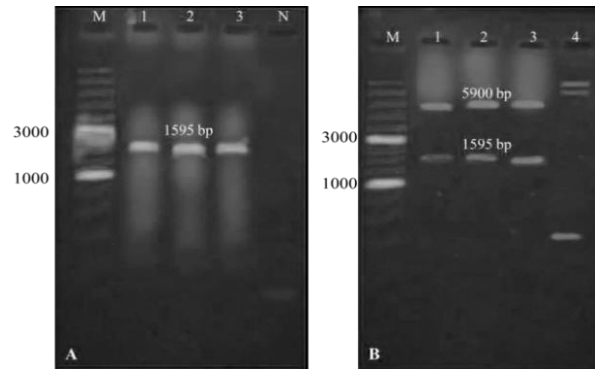


شکل ۶- نتایج اتصال ژن *slp-down* به دو ژن *slp-up-bgls* در حامل pET32 (A) ماتریکس تهیه شده از ساب کلونینگ ژن *slp-up-bgls-slp-down* در حامل pET32 (B) تایید صحت اتصال ژن *slp-down* به دو ژن *slp-up-bgls* در حامل pET32 به روش PCR و مشاهده باند ۴۱۵ جفت بازی مربوط به ژن *slp-down* و N کنترل منفی. (C) تایید صحت اتصال ژن *slp-down* به دو ژن *slp-up-bgls* در حامل pET32 به روش هضم آنزیمی و مشاهده دو باند ۷۰۸۰ bp مربوط به حامل pET32 و دو ژن *slp-up-bgls* و مشاهده باند ۴۱۵ bp برای توالی فرودست ژن *slp* و چاهک شماره ۵ حامل برش نیافته حاوی ژن‌های *slp-up-bgls-slp-down* .M در تمام نمونه‌ها مارکر ۱ kb شرکت فرمنتاز.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

تایید نهایی ساخت سازواره ژنی *slp-up\_bgls\_slp-down* برای تایید نهایی ساخت سازواره، علاوه بر PCR که با پرایمر مستقیم ژن *slp-up* و پرایمر معکوس ژن *slp-down* انجام گرفت، هضم آنزیمی از سازه حاصل با استفاده از آنزیم‌های محدودالثر *XhoI* و *XbaI* نیز انجام گرفت. نتایج حاصل نشان داد ژن بتاگلوکاناز با موفقیت در میان ژن *slp* درج گردید (شکل ۷).



شکل ۷- تایید ساخت سازواره ژنی. (A) روش PCR و باند ۱۵۹۵ bp مربوط به سازه ژنی و N کنترل منفی. (B) روش هضم آنزیمی و مشاهده باند bp ۱۵۹۵ مربوط به سازه ژنی و چاهک ۴ حامل برش نیافته حاوی سازه ژنی *slp-up\_bgls\_slp-down*. M مارکر ۱ kb شرکت فرمنتاز.

### بحث

به طور کلی، حضور بتاگلوکان‌ها در جیره غذایی نشخوارکنندگان، با توجه به تولید آنزیم‌های تجزیه کننده بتاگلوکان‌ها توسط جمعیت میکروبی شکمبه، مشکلات چندانی را ایجاد نمی‌کند. اما دام‌های تک معده‌ای مانند پرندگان فاقد آنزیم‌های هیدرولاز کننده بتاگلوکان‌ها هستند. استفاده از دانه‌هایی مانند جو در جیره غذایی پرندگان معمولاً از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است و اغلب توجه مرغداران را جلب می‌نموده است. اما وجود مقادیر قابل توجهی از بتاگلوکان‌ها در جو، به کارگیری مقادیر بالای این دانه را در جیره با مشکل مواجه ساخته است (۱۴).

تحقیقات نشان داده که استفاده از آنزیم‌هایی همچون بتاگلوکاناز و زایلاناز در جیره‌های غذایی حاوی جو و گندم، سبب تخریب پلی ساکاریدهای ساختمانی آن‌ها شده، عملکرد پرنده را بهبود بخشیده و قابلیت هضم مواد مغذی را افزایش می‌دهند. این آنزیم‌ها گرانروی را کاهش و قابلیت هضم مواد مغذی را افزایش می‌دهد (۱۵). برنز و همکاران با استفاده از آنزیم در جیره‌های غذایی بر پایه جو و گندم جوجه‌های گوشتی به این نتیجه رسیدند که افزودن آنزیم به جیره موجب بهبود عملکرد و کاهش وزن نسبی روده کوچک و لوزالمعده می‌شود. افزایش در وزن نسبی روده کوچک و لوزالمعده در حالت عدم استفاده از آنزیم بیانگر عکس‌العمل تطابقی به افزایش نیاز به آنزیم می‌باشد ولی نمی‌تواند اثرات منفی عوامل ضد تغذیه‌ای را به طور کامل خنثی نماید. با استفاده از آنزیم بتاگلوکاناز در جیره‌های غذایی بر پایه جو در جوجه‌های گوشتی، افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی به طور معنی داری بهبود یافته و وزن روده کوچک کاهش یافت (۱۶). نحاس و لفرانکوئیس نشان دادند افزودن آنزیم بتاگلوکاناز در جیره‌های حاوی جو باعث افزایش وزن جوجه‌های گوشتی از طریق افزایش مصرف خوراک می‌شود (۱۷).

راویندران و همکاران با انجام آزمایشی روی چهار نوع وارپته جو نشان دادند استفاده از آنزیم بتاگلوکاناز انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری و قابلیت هضم ظاهری ایلئومی پروتئین و اسیدهای آمینه را بهبود می‌بخشد (۱۸). این تحقیقات مشابه مطالعه ما بودند. در همین راستا، این پژوهش انجام شد. در این مطالعه ژن بتاگلوکاناز جدا شده از باسیلوس سوبتلیس کلون گردید و یک سازه ژنی جهت بیان آنزیم بتاگلوکاناز ساخته شد.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس که فلور طبیعی روده است انتخاب گردید، و برای انجام فرایند نوترکیب همسان ژن کد کننده پروتئین لایه سطحی (*slp*) که به میزان بالایی در باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیان می‌شود و به صورت خارج

سلولی ترشح می‌شوند در نظر گرفته شد. ژن بتاگلوکاناز به صورت *slp-up-bgls-slp-down* در پلاسمید pET32a به روش ساب کلونینگ همسانه سازی شد. سازه ژنی حاصل این امکان را فراهم می‌آورد که در تحقیقات آینده بتوان ژن بتاگلوکاناز را درون ژنوم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس که یک پروبیوتیک فلور روده دام و طیور است به روش نو ترکیبی همسان درج نمود و از این طریق اثرات ضد تغذیه‌ای بتاگلوکان را از بین برد.

## References:

1. White WB, Bird HR, Sunde ML, Marlett JA, PRENTICE NA, et al. Viscosity of  $\beta$ -D-glucan as a factor in the enzymatic improvement of barley for chicks. Poultry Science. 1983; 62(5): 853-62.
2. Desmond C, Corcoran BM, Coakley M, Fitzgerald GF. Development of dairy-based functional foods containing probiotics and prebiotics. Australian Journal of Dairy Technology. 2005; 60(2): 121.
3. Ebrahimi MT, MA H. Antagonistic ability of acid and bile tolerance Lactobacillus were isolated from dairy products. 2009; 17-27.
4. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. Annals of biological research. 2010; 1(4): 218-28.
5. Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. The Journal of nutrition. 2000; 130(2): 384S-90S.
6. Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. Immunology and cell biology. 2000; 78(1): 80-8.
7. Furtado GP, Ribeiro LF, Lourenzoni MR, Ward RJ. A designed bifunctional laccase/ $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. Protein Engineering, Design & Selection. 2013; 26(1): 15-23.
8. Dalmo RA, Børgwald J.  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies. Fish & shellfish immunology. 2008; 25(4): 384-96.
9. Tabari DG, Rezvani MR, Zamiri MJ, Dadpasand M. The effect of oregano and thyme based essential oils and  $\beta$ -glucanase on performance and nutrients digestibility in broiler chicks fed barley-based diets. Journal of Veterinary Research. 2013; 68(3): 241-8.
10. Almirall M, Francesch M, Perez-Vendrell AM, Brufau J, Esteve-Garcia E. The differences in intestinal viscosity produced by barley and  $\beta$ -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. The Journal of nutrition. 1995; 125(4): 947-55.
11. Mansouri M, Hosseini Pour A, Sharifi Sirchi GR, Masoumi H. Changes in chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase transcript levels in sweet orange (*Citrus sinensis*) in response to treatment with *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. Agricultural Biotechnology Journal. 2010; 1(2): 39-52.
12. Pitson SM, Seviour R8, McDougall BM. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. Enzyme and microbial technology. 1993; 15(3): 178-92.
13. Furtado GP, Ribeiro LF, Santos CR, Tonoli CC, De Souza AR, et al. Biochemical and structural characterization of a  $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. Process Biochemistry. 2011; 46(5): 1202-6.
14. Furtado GP, Ribeiro LF, Lourenzoni MR, Ward RJ. A designed bifunctional laccase/ $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. Protein Engineering, Design & Selection. 2013; 26(1): 15-23.



15. Patience JF, Bedford MR, Classen HL, Inbarr J. The effect of dietary enzyme supplementation of rye-and barley-based diets on digestion and subsequent performance in weanling pigs. *Canadian Journal of Animal Science*. 1992; 72(1): 97-105.
16. Brenes A, Smith M, Guenter W, Marquardt RR. Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat-and barley-based diets. *Poultry science*. 1993; 72(9): 1731-9.
17. Nahas J, Lefrancois MR. Effects of feeding locally grown whole barley with or without enzyme addition and whole wheat on broiler performance and carcass traits. *Poultry Science*. 2001; 80(2): 195-202.
18. Ravindran V, Selle PH, Bryden WL. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poultry Science*. 1999; 78(11): 1588-95.

## میزان بیان lncRNA های *GAS5*، *NEAT1* و *SRA* در سلول‌های *MCF-7* ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب حامل ژن انترو توکسین *B/stafylokokوکوس/اورئوس* تغییر می یابد

مرضیه چراخ<sup>۱</sup>، عباس رحیمی کاهکشی<sup>۲</sup>، مریم صفرپور دهکردی<sup>۳\*</sup>

۶. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۷. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۸. دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان سینه یک بیماری ژنتیکی است که حدود ۵ تا ۱۰ درصد احتمال دارد به ارث برسد. این بیماری به عنوان رایج‌ترین نوع سرطان بعد از سرطان پوست در زنان می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که در افراد مبتلا به بیماری سرطان، بیان lncRNA ها کاهش و یا افزایش بیان دارا هستند. هدف از این تحقیق بررسی اثرات ژن *SEB* باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* بیان lncRNA های *GAS5*، *NEAT1* و *SRA* در سلول‌های *MCF-7* ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب -pcDNA3.1(+)*SEB* به روش Real time RT-PCR می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *SEB* به روش شوک حرارتی وارد باکتری *E.coli* سویه TOP10 شد و سپس تخلیص شد. وکتور نو ترکیب به روش لیپوفکشن وارد سلول‌های *MCF-7* شد و غربالگری توسط آنتی‌بیوتیک نئومایسین (۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) انجام گرفت. استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول‌های ترانسفکت شده انجام شد. در نهایت real time RT-PCR به منظور بررسی تغییر بیان lncRNA های نامبرده انجام شد.

**نتایج:** پس از انجام واکنش لیپوفکشن، سلول‌هایی که پلاسمید نو ترکیب را دریافت کرده بودند در محیط کشت حلوی نئومایسین رشد کردند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، واکنش real time RT-PCR انجام گرفت و تغییر بیان lncRNA های مربوطه تایید شد. بیان lncRNA های *SRA* و *NEAT1* به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش و *GAS5* افزایش داشته‌اند.

**نتیجه‌گیری:** ژن سم *SEB* موجب اثرات ضد سرطانی می‌گردد و با توجه به تغییر بیان lncRNA های ذکر شده به نظر می‌رسد سلول را به سمت آپوپتوز هدایت می‌کند.

**واژگان کلیدی:** سرطان سینه، سم *SEB*، *SRA*، *NEAT1* و *GAS5*.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۳۸۲۳۶۳۸

پست الکترونیک: msafarpour84@yahoo.com

## The expression levels of lncRNAs GAS5, NEAT1 and SRA are changed in MCF-7 cells transfected with *Staphylococcus aureus* SEB Gene were changed

Marziye CharraKh<sup>1</sup>, Abbas Rahimi-Kahkeshi<sup>2</sup>, Maryam Safarpour-Dehkordi<sup>3\*</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. B.Sc Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Ph.D. in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Breast cancer is a genetic disorder that can be inherited from about 5 to 10 percent. This disease is the most common type of cancer after skin cancer in women. The purpose of this study was to investigate the effects of SEB gene expression on the expression of *GAS5*, *NEAT1* and *SRA* lncRNAs in MCF-7 cells transfected with the new vector pcDNA3.1(+)-SEB via Real Time RT-PCR method.

**Materials and Methods:** The recombinant plasmid containing *SEB* gene was introduced into the *E. coli* strain of TOP10 by thermal shock method and then purified. The recombinant vector was introduced into the MCF-7 cells by lipofection method and screening was done by neomycin antibiotic. Extracting RNA and synthesizing cDNA from transfected cells was performed. Finally, real time RT-PCR was performed to investigate the change of expression of these lncRNAs.

**Results:** The change of expression of relevant lncRNAs was confirmed. The expression of *SRA* and *NEAT1* significantly decreased in comparison with the control group and *GAS5* increased.

**Conclusion:** The results indicate that the *SEB* enterotoxin gene causes anticancer effects and leads the cell to apoptosis.

**Keywords:** Breast cancer, *SEB*, gene expression, lncRNA.

### مقدمه

سرطان به عنوان یک بیماری کشنده و مرگ‌آور توام با درد و ناتوانی در اذهان مردم جای گرفته است، لذا تشخیص سرطان یک بحران جدی زندگی فرد تلقی می‌شود و موجب به هم خوردن تعادل زندگی وی می‌گردد. سرطان سینه بیماری پیچیده‌ای است که تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی می‌باشد و به عنوان یکی از شایع‌ترین تومورهای بدخیم در بین زنان شناخته شده است. سرطان سینه ۱۰ درصد از کل سرطان‌های موجود در دنیا را شامل می‌گردد و از زنان مبتلاء به انواع سرطان‌ها ۳۰ درصد مبتلا به سرطان سینه هستند (۱). بنا بر گزارش‌های منتشر شده علاوه بر افزایش تعداد مبتلایان به این بیماری در سال‌های اخیر، میزان خطر ابتلاء به این سرطان نیز دو برابر شده است (۲). ژن‌های زیادی به همراه عوامل محیطی متفاوتی در ایجاد سرطان سینه دخالت دارند که هر یک نقش مهمی در افزایش خطر ابتلا به این نوع بیماری در زنان ایفا می‌کنند. از جمله این عوامل می‌توان به سن، سن اولین قاعدگی، سن شروع یائسگی، سن اولین زایمان، مدت زمان شیردهی، سقط جنین و استفاده از قرص‌های ضد بارداری اشاره کرد. خطر ابتلا به سرطان سینه با افزایش سن، افزایش می‌یابد. به عنوان مثال خطر ابتلا به این بیماری، بعد از سنین ۴۰ و ۵۰ سالگی افزایش می‌یابد. نتایج تحقیقی که توسط موسوی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ایران انجام شد، نشان داد که این سن در کشور ما حدود ۱۰ تا ۱۵ سال کمتر از سایر کشورها است (۳). دخترانی که اولین عادت ماهانه آن‌ها قبل از سن ۱۲ سالگی شروع می‌شود نسبت به آن‌هایی که شروع قاعدگی دیرتری دارند، در معرض خطر بیشتری هستند زیرا هورمون استروژن که پس از بلوغ در خون دختران افزایش می‌یابد، در ایجاد سرطان سینه نقش دارد. هر چه تعداد سال‌هایی که یک زن عادت ماهانه می‌شود بیشتر باشد او به مدت طولانی‌تری در معرض هورمون استروژن قرار گرفته و امکان ابتلا به سرطان سینه افزایش می‌یابد (۴). زنانی که سن یائسگی آن‌ها نسبت به میانگین جامعه بالاتر است نسبت به آن‌ها که زودتر یائسه می‌شوند در معرض خطر بیشتری هستند. هرچه یائسگی دیرتر باشد، بافت سینه مدت بیشتری در معرض هورمون‌ها قرار گرفته و خطر ابتلا به سرطان سینه افزایش می‌یابد (۵). مطالعات

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

نشان می‌دهد که زنانی که هرگز بچه‌دار نشده‌اند یا زنانی که اولین زایمان آن‌ها بعد از سن ۳۰ سالگی بوده در معرض خطر بیشتری هستند. چرا که حاملگی در سنین پایین‌تر، تغییراتی در بافت سینه ایجاد می‌کند که فرد را نسبت به این نوع سرطان مقاوم می‌کند (۶). خطر ابتلا به سرطان در زنانی که تا ۱۲ ماه به کودکان خود شیر داده‌اند، نسبت به مدت شیردهی کمتر از ۶ ماه، حدود ۲۸ درصد کاهش می‌یابد این میزان در افرادی که طول مدت شیردهی آن‌ها بین ۲۴-۱۳ ماه باشد نیز تا ۴۰ درصد کاهش می‌یابد (۷). از آنجایی که سقط جنین موجب قطع چرخه طبیعی هورمون‌های دوران بارداری می‌شود، لذا خطر ابتلا به سرطان سینه را افزایش می‌دهد. بر اساس تحقیقاتی که در مجله‌های سرطان چاپ شده است افرادی که سقط جنین داشته‌اند، ۱/۳ بار بیشتر از سایر زنان در معرض ابتلا به این سرطان هستند (۸). از طرفی ترکیب اصلی قرص‌های ضد بارداری، هورمون‌های استروژن و پروژسترون می‌باشد و با تاثیر مستقیم روی همین هورمون‌ها در بدن خطر ابتلا به بیماری سرطان سینه را افزایش می‌دهند (۹).

RNAهای غیر کد کننده گروه جدیدی از ژن‌های شناخته شده در ژنوم انسان هستند که در تنظیم فرآیندهای مختلف زیستی نقش دارند. همچنین اخیراً به نقش این RNAها در بیماری‌های پیچیده انسانی از جمله سرطان و بیماری‌های عصبی توجه زیادی شده است. طی سال‌های اخیر و با چندین طرح غربالگری مختلف، شمار شگفت‌آوری از ژن‌های ncRNAها شناسایی شده‌اند (۱۰ و ۱۱). از مدت‌ها پیش مشخص شده است که ncRNAهای کوچک و بلند از طریق توالی‌های ویژه‌ای با نواحی تنظیم کننده برهمکنش داشته و به این ترتیب در تنظیم بیان ژن دخیل دانسته شده‌اند. این ncRNAها بر اساس تعداد نوکلئوتید و عملکردی که در بدن دارند در دسته‌های مختلف قرار می‌گیرند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ریز RNAها، siRNAها، piRNAها و RNAهای غیر کد کننده بلند اشاره کرد. در ژنوم انسان بیش از ۷۰۰ miRNA، صدها siRNA و میلیون‌ها piRNA منحصر به فرد توالی‌یابی شده است (۱۲). مطالعات گسترده ترانس کریپتومیک ژنومی (مطالعه کل RNAهای کد شونده و غیر کد شونده) نشان داده است رونویسی در ژنوم پستانداران به وفور انجام می‌گیرد، که حداقل ۸۰٪ این رونویسی منحصر در ارتباط با lncRNAها هستند. اگرچه lncRNAها اغلب به عنوان شی بازسازی شده کروماتینی نادیده گرفته می‌شوند اما مطالعات زیادی نشان داده است که lncRNAها بعنوان ژن‌های کد کننده پروتئینی کوچک ایفای نقش می‌کنند (۱۳). lncRNAها به‌طور کلی RNAهای غیر کد کننده بالای ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشند. lncRNAها بر خاموشی ژن، سیگنال‌های آدنیلایسون و فاکتورهای موثر بر رونویسی تاثیر دارند. از جمله lncRNAها می‌توان *NEATI*، *SRA*، *H19*، *GAS5*، *MALATI*، *HOTAIR*، *XIST* و *NEATI* را نام برد (۱۴ و ۱۵).

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا و بسیار شایع در انسان می‌باشد. این باکتری یکی از عوامل اصلی در بروز آسیب‌های پوستی و همچنین عفونت‌های بافت نرم در انسان‌ها می‌باشد (۱۶). استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط خاص مثل وجود استرس، بیماری‌های ویروسی، آسیب‌های بافتی و عوامل بروز ضعف در سیستم ایمنی می‌تواند باعث ایجاد عفونت‌های پوستی، مسمومیت غذایی، شوک خطرناک و اختلالات خودایمنی در بدن فرد شود. عملکرد این عامل پاتوژن بدین شکل است که با ترشح سموم مختلف همچون آنترتوکسین سندرم شوک سمی و سموم سیتولیتیک باعث تهاجم به میزبان خود می‌شود (۱۷). باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای توکسین‌های متعددی می‌باشد که در بین آن‌ها آنترتوکسین از اهمیت بالاتری برخوردار بوده و مصرف غذاهای آلوده به این توکسین باعث ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در انسان می‌شود. آنترتوکسین‌های استافیلوکوکی بر مبنای خصوصیات بیولوژیکی و سرولوژیکی به ۲۳ نوع مختلف طبقه‌بندی می‌شوند. آنترتوکسین B جزء دسته‌ی کلاسیک می‌باشد (۱۸). این سم ۲۸ کیلودالتونی از دو دومین تشکیل شده است: دومین I که حاوی آمینواسیدهای شماره‌ی ۳۰ تا ۱۲۰ است و دومین II که حاوی آمینواسیدهای ۱۲۷ تا ۲۳۹ می‌باشد (۱۹). هدف از این تحقیق بررسی میزان بیان lncRNAهای *GAS5*، *NEATI* و *SRA* در سلول‌های MCF7 ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب حامل ژن آنترتوکسین B/استافیلوکوکوس اورئوس است.

### مواد و روش‌ها

**سلول مورد استفاده:** سلول‌های رده سلولی MCF-7 از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه گردید. ابتدا محیط کشت RPMI 1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آماده شد و انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در رطوبت ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شد.

**پلاسمیدها:** پلاسمید نو ترکیب (+)pcDNA3.1 حامل ژن انتروتوکسین B باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین پلاسمید (+)pcDNA3.1 بدون ژن خارجی از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد، تهیه شد.

**تکثیر پلاسمید:** برای تکثیر و تأیید پلاسمیدها باید آن‌ها را درون میزبان باکتریایی که رشد سریع دارند وارد کرد که به این فرآیند ترانسفورماسیون گفته می‌شود. این پلاسمیدها دارای نقطه‌ی شروع همانندسازی هم در میزبان پروکاریوتی و هم در میزبان یوکاریوتی می‌باشد. جهت انجام ترانسفورماسیون در ابتدا لازم است که سلول مستعد ساخته شود. تهیه سلول مستعد به روش شوک حرارتی و  $CaCl_2$  انجام شد.

**استخراج پلاسمید:** به منظور استخراج پلاسمید نو ترکیب از سلول‌های *E. coli* ابتدا از ماتریکس‌ها، درون ۵ میلی لیتر محیط کشت LB-Broth حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر کشت داده شد و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکردار قرار داده شدند. محیط کشت حاوی باکتری را در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری وارد و میکروتیوب در شرایط ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و این کار برای تمام محیط کشت انجام داده شد. سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید FAVORGEN، پلاسمیدها استخراج گردید.

تأیید صحت استخراج پلاسمید به روش PCR: روی پلاسمیدهای استخراج شده PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *SEB* انجام شد. در نهایت محصول آن روی ژل الکتروفورز برده شد و صحت استخراج پلاسمید بررسی شد.

روش انتقال پلاسمید به سلول (لیپوفکشن): سلول‌های MCF-7 رشد یافته با وکتور نو ترکیب، تراریزش (ترانسفکت) شد. برای تراریزش این سلول‌ها از روش لیپوفکشن بهره گرفته شد. در کنار آن‌ها، دو دسته سلول دیگر به عنوان گروه‌های شاهد و کنترل در نظر گرفته شد. گروه کنترل بدون انتقال پلاسمید و گروه شاهد با انتقال پلاسمید (+)pcDNA3.1 فاقد ژن هدف مورد آزمایش قرار گرفت.

**برداشت سلول‌ها:** هر سه دسته سلول (تیمار، کنترل و شاهد)، در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک نئومایسین رشد داده شد. انتظار می‌رود سلول‌های گروه کنترل (فاقد پلاسمید)، در اثر آنتی‌بیوتیک نئومایسین از بین بروند. به این منظور، روز بعد، میزان ۳۰ میلی گرم از آنتی‌بیوتیک نئومایسین در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS و Pen-strep حل شد و محلول نئومایسین با غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه گردید. پس از تخلیه محیط کشت پلیت ۶ خانه، محیط حاوی نئومایسین جایگزین آن شد. پس از رشد سلول‌ها، توسط ۰/۵ میلی لیتر PBS شست و شو داده شد و سپس ۰/۵ میلی لیتر تریپسین اضافه شد و پلیت به مدت ۱-۲ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا سلول‌ها از ته پلیت جدا شدند. تریپسین توسط ۱ میلی لیتر محیط کشت خنثی شد و تمامی محتویات هر خانه پلیت توسط سمپلر به درون یک فالكون استریل مستقل منتقل شد. محتویات فالكون به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ شد و محیط رویی تخلیه گردید و رسوب در ۱ میلی لیتر محیط کشت حل شد. سوسپانسیون سلولی در ۲ فلاسک T25 تقسیم شد و به هر فلاسک، ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک نئومایسین اضافه شد و در انکوباتور قرار گرفت تا سلول‌ها رشد کردند. یک فلاسک برای استفاده مداوم انتخاب شد و از آن پاساژ تهیه شد و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت. از فلاسک دیگر ۲ رسوب سلولی به منظور ذخیره تهیه شد.

**RNA: Reverse transcriptase PCR (RT-PCR):** تام سلولی از سلول‌های ترانسفکت شده، توسط کیت استخراج RNA (RNX-plus، سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده به وسیله نانودراپ (ترموساینتیفیک، امریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از انجام *DNase Treatment* به منظور غیرفعال شدن آنزیم *DNase*، نمونه موجود به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سلسیوس گرما دهی شد. از EDTA (۲  $\mu$ l) EDTA (۵۰ mM) جهت محافظت از RNA در دمای بالا استفاده شد. سپس، ۱ میکروگرم از RNA تام سلولی استخراج شده از هر گروه، ۱ میکرولیتر از oligoDt و random hexamer (۵۰  $\mu$ M) جهت سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. cDNA

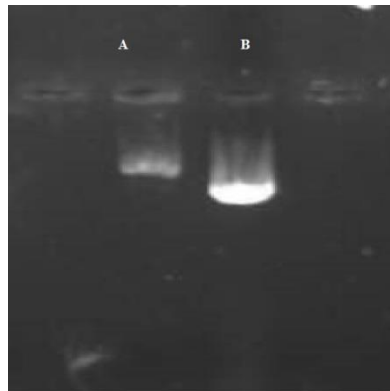
سنتز شده جهت واکنش RT-PCR و Real time PCR استفاده شد. برای اثبات درستی cDNA سنتز شده ابتدا PCR با پرایمرهای ژن *GAPDH* انجام شد.

q-PCR: از روش q-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های سلول‌های ترنسفورم شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-SEB در مقایسه با سلول‌های ترنسفورم شده با وکتور خالی استفاده شد. ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. cDNA هر گروه در رقت سریال‌های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه گردید. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۳  $\mu\text{L}$  بود که حاوی: ۱  $\mu\text{L}$  از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر دو پرایمرهای F/R، و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر. همه واکنش‌ها به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سانتیگراد به ۹۵ درجه سانتیگراد (۱ درجه سانتیگراد در ثانیه) رسم شد. جهت محاسبه بیان ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم افزار Rotor-Gene Real-time analysis نسخه ۶ رسم شد. تغییرات نسبی بیان mRNA ها توسط روش لیبواک  $2^{-DDCt}$  با مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد. با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری t بیان ژن‌ها بررسی و مقایسه شد. مقدار  $P\text{-Value} \leq 0.05$ ، از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

#### یافته‌ها

نتایج کشت و شمارش سلول‌ها: سلول‌های رده MCF-7 کشت داده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت بررسی شد. طبق مشاهدات میکروسکوپی فلاسک، سلول‌ها حدود ۸۰ درصد رشد کرده بودند. بعد از تریپسینه کردن فلاسک و سانتریفیوژ، سوسپانسیون سلولی در محیط کشت تهیه و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام نئو بار برده شد و شمارش صورت گرفت. میزان ۳۰۰۰۰۰ سلول که برابر ۸۲ میکرولیتر بود، درون چاهک‌های پلیت ۶ خانه seed شد.

نتایج استخراج پلاسمید: بعد از تکثیر پلاسمید در باکتری *E.coli*، استخراج توسط کیت استخراج پلاسمید انجام شد و ۳ میکرولیتر از آن روی ژل آگارز الکتروفورز شد (شکل ۱).



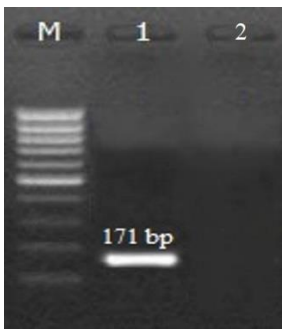
شکل ۱- چاهک A حاوی پلاسمید pcDNA3.1(+)-SEB دارای ژن *SEB* و چاهک B حاوی پلاسمید فاقد ژن *SEB*

۳-۴- نتایج تایید صحت پلاسمید ها به روش PCR

حضور ژن *SEB* با پرایمرهای اختصاصی این ژن به روش PCR بر روی پلاسمید استخراج شده تایید شد (شکل ۲).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

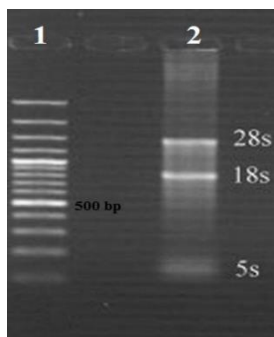
### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۲- چاهک شماره ۱ محصول PCR ژن سم *SEB* با اندازه‌ی ۱۷۱ bp، چاهک شماره ۲ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

**نتایج انتقال پلاسمید به سلول‌ها:** پس از انجام واکنش لیپوفکشن، سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده‌اند به آنتی‌بیوتیک نئومایسین مقاوم شدند و پس از افزودن محیط کشت حاوی نئومایسین زنده ماندند. پس از تکثیر سلول‌ها درون پلیت ۶ خانه، به فلاسک T25 منتقل شدند. پس از رسیدن تراکم فلاسک به حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد، رسوب سلولی جهت استخراج RNA تهیه گردید.

**نتایج استخراج RNA:** پس از استخراج RNA از سلول‌های سرطانی حاوی پلاسمیدهای نو ترکیب، میزان ۵ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز RNA استخراج شده برای تایید حضور RNA در سلول‌های سرطانی حاوی پلاسمید در شکل ۳ نشان داده شده است.

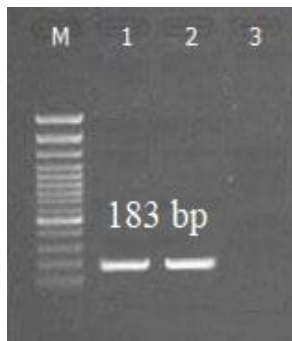


شکل ۳- نتایج حاصل از الکتروفورز RNA ژن انترتوکسین B در سلول‌های سرطانی. چاهک شماره ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی و چاهک شماره ۲ نتایج RNA تام سلولی.

بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *GAPDH* انجام شد و محصولات آن روی ژل الکتروفورز مشاهده شد. باند حاصل نشان دهنده صحت سنتز cDNA بود (شکل ۴).

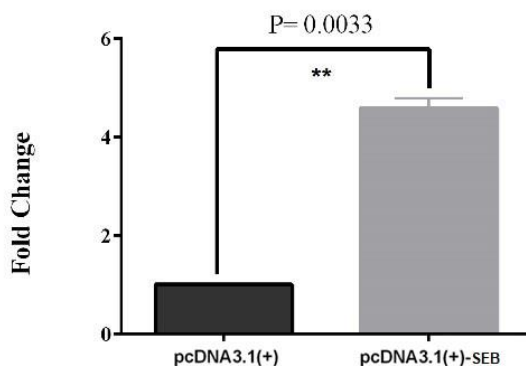
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۴- چاهک شماره ۱ و ۲ نتیجه PCR ژن *GAPDH* بر روی cDNA سنتز شده، چاهک شماره ۳ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

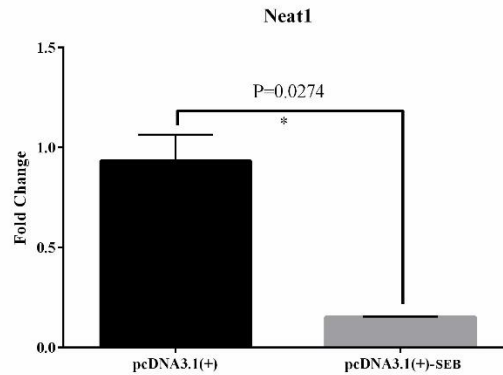
نتایج انجام real time RT-PCR جهت بررسی ارتباط تغییرات بیان *lncRNA* های *GAS5*، *NEAT1* و *SRA* در پاسخ به بیان سم انتروتوکسین B در سلول‌های سرطانی از تکنیک real Time RT-PCR استفاده شد. در این مطالعه از ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. جهت بررسی آماری تغییرات بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز از آزمون آماری T مستقل استفاده شد. نتایج آنالیز آماری مربوط به *lncRNA* های *GAS5*، *NEAT1* و *SRA* به وسیله نرم افزار SPSS انجام شد. برای انجام این آنالیز، Ct هر نمونه (هم نمونه ژن مورد نظر و هم نمونه ژن کنترل داخلی) به صورت جداگانه برای انجام آنالیز و بدست آوردن تغییر بیان ژن‌ها، یادداشت گردید. پس از نرمالایز کردن داده‌ها با ژن خانه‌دار و بدست آوردن میزان بیان، برای نرم افزار تعریف می‌شود و در نهایت نتایج به صورت نمودار قابل مشاهده می‌باشد. یک ستاره کمتر یا مساوی ۵ دهم است و نشان دهنده این است که فرض آزمایش با ۹۵ درصد قابل قبول است. دو ستاره کمتر از یک هزارم است و نشان دهنده این است که فرض آزمایش ۹۹ درصد قابل قبول است و سه ستاره کمتر از یک ده هزارم است و فرض آزمایش ۹۹/۹ درصد قابل قبول است. در این آنالیز تغییر بیان هر سه *lncRNA* معنی‌دار بود و میزان P Value قابل قبول بوده است. در واقع در اثر بیان ژن سم *SEB* باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس، سلول به سمت آپوپتوز پیش رفته است. میزان تغییر بیان در نمودارهای زیر (شکل ۵ و ۶ و ۷) نشان داده شده است.



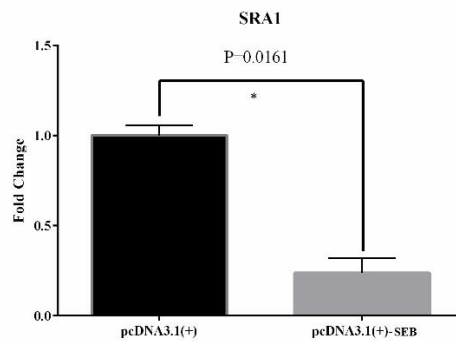
شکل ۵- آنالیز آماری *lncRNA* ی *GAS5*. بیان *GAS5* به طور معنی داری در سلول‌های ترانسفکت شده با ژن سم *SEB* باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس، نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است ( $P=0.0033$ ).



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۶- آنالیز آماری lncRNA *NEATI* بیان *NEATI* به طور معنی داری در سلول‌های ترانسفکت شده با ژن سم *SEB* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (P= 0.0274).



شکل ۷- آنالیز آماری lncRNA *SRA* بیان *SRA* به طور معنی داری در سلول‌های ترانسفکت شده با ژن سم *SEB* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (P= 0.0161).

### بحث

هر ساله بیش از ۱/۲ میلیون بیمار مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده شده و بیش از ۵۰۰ هزار نفر در اثر این بیماری فوت می‌کنند و میزان ابتلا بر خلاف ایالات متحده، در کشورهای در حال رشد رو به افزایش است. کشور ایران نیز از این امر مستثنی نیست. چنانکه این سرطان عامل ۲۱/۴ درصد از کل بدخیمی‌ها و شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی است. علاوه بر شیوع بالای سرطان پستان در ایران، توجه به این مساله که زنان ایرانی در مقایسه با کشورهای توسعه یافته، حداقل یک دهه زودتر به این بیماری مبتلا می‌شوند، اهمیت آن را دوچندان می‌کند. میزان وقوع سرطان پستان با افزایش سن بالا رفته به طوری که از ۱ در ۲۳۰ مورد در دهه چهارم به ۱ در ۳۰ در دهه هفتم افزایش می‌یابد. در بین سرطان‌های مهاجم پستان داکتال مهاجم شایع‌ترین (۷۰ درصد) نوع سرطان است. و پس از آن سرطان لوبلار، توبولار و مدولاری قرار دارند (۲۰). در سال‌های اخیر مکانیسم‌های درگیر در آپوپتوز سلول‌های سرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است و بر همین اساس مطالعات فراوانی برای افزایش آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطانی در حال انجام است. به صورت کلی بررسی مکانیسم‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز نشان می‌دهد که ژن‌های مختلفی در القاء شروع و یا مهار آپوپتوز سلولی نقش دارند (۲۱). مطالعات اخیر مشخص شده است که lncRNAها از طریق مکانیسم‌های درون سلولی در مسیرهای سرطانی دخیل هستند. مکانیسم‌هایی که از طریق آن‌ها lncRNA در شبکه‌های تنظیمی ایفای نقش کرده و پایه و اساس توسعه سرطان را شامل می‌شوند، متنوع می‌باشند. طیف وسیعی از شواهد نشان می‌دهد که نقش اصلی lncRNAs، هدایت کمپلکس‌های اصلاح کننده کروماتین در برابر تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌باشد (۲۳ و ۲۲). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ توسط

Lu Han و همکارانش انجام شد، اهمیت بالینی lncRNA GAS5 در بیماران مبتلا به سرطان پستان از طریق واکنش real Time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحقیقات آزمایشگاهی این تیم تحقیقاتی مشخص کرد که میزان بیان GAS5 lncRNA در بیماران سرطانی نسبت به افراد سالم در سطح بالاتری قرار دارد (۲۴). مطالعه‌ای توسط M. ZHANG و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی میزان بیان lncRNA NEAT1 صورت گرفت. در این تحقیق، بیان NEAT1 با تکنیک qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. جهت تشخیص اثر NEAT1 در تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی پستان، از روش‌های مختلف آزمایشگاهی نظیر MTT و وسترن بلات استفاده شد. نتایج این تحقیق بیانگر این مطلب بود که حضور MALAT1 به عنوان آنکوژن در سرطان پستان عمل می‌کند و می‌تواند تکثیر و متاستاز را افزایش دهد (۲۵). مطالعات حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی اثرات ترکیبات پروآپتوتیک طراحی شده بر پایه انتروتوکسین B/ستافیلوکوکوس نشان داد که ترکیبات طراحی شده بر پایه انتروتوکسین می‌توانند موجب شروع فرآیندهای آپتوزی در سلول‌های توموری در سرطان پانکراس گردند. در این مطالعه که با استفاده از تست MTT بر روی سلول‌های سرطانی صورت گرفت، میزان بقا سلولی در بازه‌های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته مورد بررسی قرار گرفت و همچنین میزان تغییرات بیان ژن‌های دخیل در آپتوز از جمله *Bax*، *Bak* و *Bcl-2* در دو گروه تیمار و شاهد اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تیمار ۲۴ ساعته سلول‌های سرطانی با دوزهای ۰/۵ و ۲/۵ میکروگرم بر صد میکرولیتر از داروی طراحی شده موجب افزایش بیان ژن‌های *Bax* و *Bak* می‌گردد. از سوی دیگر نتایج این تحقیق نشان داد تیمار با داروهای بر پایه انتروتوکسین دارای اثر معناداری بر بیان *Bcl-2* در سلول‌های توموری در سرطان پانکراس ندارد. به علاوه نتایج به دست آمده نشان داد که تیمار ۴۸ ساعته سلول‌های سرطانی با داروی مذکور می‌تواند موجب فعال شدن فعالیت کاسپاز ۳ گردد. در نهایت بررسی تست MTT برای سلول‌های توموری نشان داد که داروی طراحی شده بر پایه انتروتوکسین به صورت موثری موجب شروع آپتوز در سلول‌های توموری می‌گردد (۲۶). با توجه به سمیت بالای سم انتروتوکسین B استخراج شده از استافیلوکوک اورئوس و با در نظر گرفتن میزان شیوع و مرگ و میر بالای سرطان پستان، این مطالعه با هدف بررسی نقش انتروتوکسین B در القای آپتوز و تغییر بیان lncRNA‌های درگیر در آپتوز طراحی و اجرا شد. طی این مطالعه تجربی پلاسمید pcDNA3.1(+)*TOP10F*، این پلاسمید توسط کیت‌های اختصاصی استخراج پلاسمید، استخراج و خالص‌سازی شد که توسط تکنیک لیپوفکشن این سازواره وارد سلول‌های MCF-7 شد. این سازواره پس از بیان در سلول‌های یوکاریوتی، این سلول‌ها را به نئومایسین مقاوم کرد که به عنوان مارکری برای جداسازی سلول‌های دارای ژن سم از سایر سلول‌ها شد. پس از تیمار سلول‌ها با نئومایسین و رشد و تکثیر آن‌ها، RNA سلول‌ها برای آنالیزهای بیان ژن استخراج شد و با کیت مخصوص، از روی آن cDNA تهیه شد. real time RT-PCR برای lncRNA‌های *NEAT1* و *GAS5* انجام شد. برای مقایسه از ژن رفرنس *GAPDH* نیز استفاده شد و بیان سایر ژن‌ها با آن‌ها مقایسه شد. در نهایت مقایسه با سلولی که ژن سم را دریافت نکرده بود، انجام شد و این مقایسات توسط نرم‌افزارهای آماری آنالیز شدند. نتایج حاصل از این تست حاکی از آن می‌باشد که بیان lncRNA‌های *NEAT1* و *SRA* تحت تاثیر بیان ژن سم *SEB* کاهش معنی داری یافته بودند. همچنین بیان lncRNA *GAS5* نسبت به گروه شاهد افزایش بیان معنی داری را نشان داد. در واقع می‌توان گفت که حضور انتروتوکسین B در سلول‌های سرطانی می‌تواند موجب تغییرات بیان lncRNA‌های دخیل در آپتوز با هدف شروع فرآیند مرگ سلولی گردد. در همین راستا مطالعه حاضر نشان داد که پس از بیان ژن سم در سلول‌های سرطانی، بیان lncRNA‌های سرطانی *SRA* و *NEAT1* نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار و *GAS5* افزایش معنی‌داری را نشان دادند. در واقع بیان این سم در سلول‌ها سبب هدایت سلول سرطانی به سمت آپتوز شد.

### نتیجه گیری

نتایج آنالیز آماری حاصل از واکنش real time RT-PCR و همچنین نتایج کشت سلولی گویای این مطلب بود که بیان ژن سم *SEB* در سلول‌های سرطان سینه رده MCF-7 سبب می‌شود که بیان lncRNA های سرطانی *SRA* و *NEATI* کاهش معنی‌دار و *GAS5* افزایش معنی‌داری پیدا کنند و با توجه به این تغییر بیان lncRNA ها می‌توان چنین نتیجه گرفت که منجر به القای آپوپتوز و حذف توده‌ی توموری می‌شود.

### References:

1. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*. 2003; 72(5): 1117-30.
2. Doosti A, Zamani M, Ghasemi Dehkordi P, Taheri S, Banitalebi M, Mahmoudzadeh M. Association of the p53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in South West of Iran. *Scientific Research and Essays*. 2011; 6 (15): 3148-3152.
3. 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.
4. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *International journal of cancer*. 1990; 46(5): 796-800.
5. Humpel, N. and Jonnes. S.C. Women's reasons for breast cancer risk estimation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2004; 5(4): 428-432.
6. Langsenlehner U, Wolf G, Langsenlehner T, Gerger A, Hofmann G, et al. Genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer risk. The Austrian "tumor of breast tissue: incidence, genetics, and environmental risk factors" study. *Breast cancer research and treatment*. 2008; 109: 297-304.
7. Tang MT, Weiss NS, Malone KE. Induced abortion in relation to breast cancer among parous women: a birth certificate registry study. *Epidemiology*. 2000: 177-80.
8. Nicholson RI, Gee JM. Oestrogen and growth factor cross-talk and endocrine insensitivity and acquired resistance in breast cancer. *British journal of cancer*. 2000; 82(3): 501-13.
9. Su X, Malouf GG, Chen Y, Zhang J, Yao H, et al. Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in human breast cancer clinical subtypes. *Oncotarget*. 2014; 5(20): 9864.
10. Eddy SR. Computational genomics of noncoding RNA genes. *Cell*. 2002; 109(2): 137-40.
11. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*. 2009; 458(7235): 223-7.
12. Washietl S, Hofacker IL, Lukasser M, Hüttenhofer A, Stadler PF. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nature biotechnology*. 2005; 23(11): 1383-90.
13. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009; 136(4): 642-55.
14. Furuno M, Pang KC, Ninomiya N, Fukuda S, Frith MC, et al. Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS genetics*. 2006; 2(4): e37.
15. Meng J, Li P, Zhang Q, Yang Z, Fu S. A four-long non-coding RNA signature in predicting breast cancer survival. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2014; 33(1): 1-0.

16. Adhikari RP, Thompson CD, Aman MJ, Lee JC. Protective efficacy of a novel alpha hemolysin subunit vaccine (AT62) against *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Vaccine*. 2016; 34(50): 6402-7.
17. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*. 2000; 13(1): 16-34.
18. Asgarpoor D, Bahrami M, Daneshamooz S, Ghasemi M. Identification of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Genes of sea, seb and sec among Healthy Carriers in Ardabil City. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2018; 11(6): 149-57.
19. Jeong WH, Song DH, Hur GH, Jeong ST. Structure of the staphylococcal enterotoxin B vaccine candidate S19 showing eliminated superantigen activity. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. 2017; 73(11): 595-600.
20. Moghni M, Mokhtariyan K. Correlations of estrogen or progesterone receptors with grade of invasive ductal carcinomas of the breast in women referred to pathology center in Chaharmahal va Bakhtiari province Iran. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2009; 11(3): 40-5.
21. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*. 2010; 9(45): 145-52.
22. Mattick JS, Gagen MJ. The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. *Molecular biology and evolution*. 2001; 18(9): 1611-30.
23. Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF. RNA regulation of epigenetic processes. *Bioessays*. 2009; 31(1): 51-9.
24. Han L, Ma P, Liu SM, Zhou X. Circulating long noncoding RNA GAS5 as a potential biomarker in breast cancer for assessing the surgical effects. *Tumor Biology*. 2016; 37: 6847-54.
25. Zhang M, Wu WB, Wang ZW, Wang XH. lncRNA NEAT1 is closely related with progression of breast cancer via promoting proliferation and EMT. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2017; 21(5): 1020-1026.
26. Hosseini HM, Fooladi AA, Soleimanirad J, Nourani MR, Mahdavi M. Exosome/staphylococcal enterotoxin B, an anti tumor compound against pancreatic cancer. *Journal of BUON*. 2014; 19(2): 440-8.

## بررسی تأثیر داروی ضد صرع فنیتوئین در نوزاد موش‌ها و بیان ژن مربوطه

رامین شکری پور<sup>۱\*</sup>، علی محمد احدی<sup>۲</sup>، رامش رنجبر<sup>۳</sup>

۹. گروه ژنتیک، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.
۱۰. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۱۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

بیماری صرع یک اختلال سیستم عصبی مرکزی (اختلال نورولوژیکی) است که در آن فعالیت سلول‌های عصبی در مغز مختل شده و منجر به تشنج می‌گردد که طی آن رفتار، علائم و احساسات غیر طبیعی از جمله از دست رفتن هوشیاری رخ می‌دهد. طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی بیش از ۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به صرع هستند. داروهای زیادی هستند که در درمان این بیماری مؤثرند، فنیتوئین یکی از رایجترین این داروها است. مصرف داروی فنیتوئین و داروهای مشابه که برای درمان صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌تواند اثرات چشمگیری در روند تمایز تخمدان و مشکلات بعدی به وجود آورند. در این تحقیق ۲ گروه ۷ تایی موش ماده نژاد BALB/c دو ماهه تحت عنوان گروه کنترل و گروه تیمار، مورد آزمایش قرار گرفتند. موش‌های ماده گروه تیمار تحت درمان با داروی فنیتوئین با دوز ۱۰۰ mg/kg قرار گرفته و نوزادان متولد شده از این موش‌ها در سن ۲۰ روزگی، هیستوکتومی شده و با استخراج RNA از بافت رحم، تحت بررسی میزان بیان ژن *SOX9* قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های Real Time RT-PCR نشان داد که در جنین‌های موش‌های تیمار در پاسخ به دارو، نسبت به موش‌های کنترل، ژن *SOX9* به میزان ۴ برابر افزایش بیان داشته ولی بیان آن معنی‌دار نمی‌باشد ( $P>0/05$ ). در این مطالعه برای اولین بار پیشنهاد می‌کنیم، با توجه به اینکه فنیتوئین در بیان ژن‌های مهم تکوین تخمدان و باروری جنس ماده تأثیر گذار است، بهتر است در روند درمان صرع برای مادران باردار، از داروهای جایگزینی که اثرات جانبی کمتری روی تمایز جنسی و جنسیت جنین دارند، استفاده گردد.

واژگان کلیدی: صرع، فنیتوئین، *SOX9*

نشانی نویسنده مسئول: اصفهان، خیابان مشتاق اول، کوچه سپهر، ساختمان سپهر، واحد ۲۱ کد پستی: ۸۱۵۳۶۸۴۳۱۱

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۲۰۵۲۲۸۳۳

پست الکترونیک: Shokripour.ramin@gmail.com

## Investigating the effect of antiepileptic epilepsy on ovarian distinction in mouse fetus and expressing some relevant gene

Ramin Shokripour<sup>1\*</sup>, Ali Mohammad Ahadi<sup>2</sup>, Ramesh Ranjbar<sup>3</sup>

1. Department of genetics, Faculty of Basic science, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
2. Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

### Abstract

Epilepsy is a central nervous system disorder (neurological disorder) in which the activity of nerve cells in the brain disrupts and leads to seizures in which abnormal symptoms, symptoms, and emotions, including loss of consciousness, occur. According to the World Health Organization, more than 50 million people worldwide have epilepsy. There are many drugs that are effective in the treatment of this disease, phenytoin is one of the most common drugs. The use of phenytoin and similar drugs used to treat epilepsy can have significant effects on the process of ovarian distinction and subsequent problems.

In this research, 2 groups of 7 female BALB/c mice were tested under the name of control group and treatment group. The female mice of the treatment group were treated with phenytoin at a dose of 100 mg/kg and the babies born from these mice were hysterectomized at the age of 20 days and the expression level of SOX9 gene was examined by extracting RNA from the uterine tissue. The results of the statistical analysis of Real Time RT-PCR data showed that in the embryos of the treated mice, in response to the drug, compared to the control mice, the expression of the SOX9 gene increased by 4 times, but its expression was not significant ( $P > 0.05$ ).

In this study, for the first time, we suggest that considering that phenytoin is effective in the expression of important genes of ovarian growth and female fertility, it is better to use alternative drugs which have less complications in sex differentiation and gender of the fetus for the treatment of pregnant mothers with epilepsy.

**Keywords:** Epilepsy, phenytoin, SOX9

### مقدمه

بیماری صرع یک اختلال سیستم عصبی مرکزی است که در آن فعالیت سلول های عصبی در مغز مختل شده و منجر به تشنج می گردد که طی آن رفتار، علائم و احساسات غیرطبیعی از جمله از دست رفتن هوشیاری رخ می دهد. طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی بیش از ۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به صرع هستند. داروهای زیادی هستند که در درمان این بیماری مؤثرند. در حال حاضر، بیش از ۲۵ دارو مجاز به عنوان نسل اول، دوم یا سوم جهت کنترل این بیماری وجود دارد که فنیتوئین یکی از رایج ترین این داروها است. این دارو با هدف اصلاح واکنش های تحریکی و یا مهار از طریق کانال سدیم وارد سلول می شود و در سطوح مختلف سیناپس عمل می کنند (۱ و ۲ و ۳). داروهای ضد صرع کمی هستند که ایمن بودن مصرف آنها در طول دوران بارداری و شیردهی به اثبات رسیده که یکی از این داروها فنیتوئین است. مطالعات تجربی بر روی این دارو نادر است و ممکن است موجب اختلالات جنسی و ناباروری در جنین و نوزادان و همچنین خود فرد شود. در حالی که علامت مهم صرع تشنج است، اما داشتن تشنج همیشه به معنای ابتلا به صرع نیست. علائمی مانند سردرگمی، لرزهای عضلانی، طلسم خیره کننده، از دست دادن آگاهی و اختلال خلقی و عملکردهای ذهنی می تواند در هنگام تشنج رخ دهد (۴). برای درمان می توان از داروی فنیتوئین استفاده نمود، داروی فنیتوئین در غلظت های درمانی، کانال های سدیم را مسدود می کند، بعد از آن پتانسیل عمل ایجاد شده را مهار می کند و در نتیجه انتشار تشنج را کاهش می دهد. امروزه داروهای زیادی جهت درمان صرع در دسترس هستند، اما در کنار درمان از وجود عوارض آن نمی توان غافل شد. با توجه به اینکه امروزه ناباروری بسیار شایع شده است، یکی از دلایل آن مصرف بعضی داروهاست،

بنابراین هدف ما در این مطالعه بررسی اثر فنیتوئین بر ناباروری می باشد. ناباروری در اثر عوامل مختلفی از جمله نارسایی تخمدان، آسیب لوله‌های فالوپ و... ایجاد می شود. مهمترین اندام مؤثر در ناباروری زنان تخمدان می باشد (۵). داروها و روش های درمان بیماری صرع: یکی از راه های درمانی این بیماری جراحی است، به این صورت که بخشی از مغز که درگیر بیماری است را خارج می کنند. این در صورتی اتفاق می افتد که جراحی کردن آن قسمت آسیبی به تکلم، حرکت و... وارد نکند. استفاده از داروهای ضد صرع که این داروها مولکول هایی هستند که با هدف اصلاح واکنش های تحریکی یا مهار از طریق مکانیسم های مختلف در سطوح مختلف سیناپس عمل می کنند. مکانیسم های عملکرد آنها متنوع است، همانطور که شکل نشان می دهد، هر کدام از داروها در محل سیناپس از کانال هایی متعددی وارد سلول می شوند، برای مثال: داروهای فنیتوئین، لاموتریجین، لاکسامید و... از طریق کانال سدیم وارد سلول می شوند، داروی پرامپانل از طریق نورون پس سیناپسی عمل می کند (۶ و ۷).

### مواد و روش ها

در این تحقیق ۲ گروه ۷ تایی موش نژاد BALB/C دو ماهه (پژوهشکده رویان، اصفهان) تهیه گردید و تحت عنوان گروه کنترل و گروه تیمار مورد آزمایش قرار گرفت. تمام این موش ها در شرایط استاندارد و یکسان طبق پروتکل هلسینکی نگهداری و تغذیه شدند. تعیین دوز داروی فنیتوئین برای یک انسان بالغ با وزن متوسط ۶۰ کیلوگرم به میزان ۱۰۰ میلی گرم مناسب است. موش های مورد مطالعه تقریباً ۲۵ گرم هستند. طبق مطالعات صورت گرفته و با برقراری تناسب ریاضی، دوزهایی از این دارو که باعث عدم سقط و مرگ و میر در موش ها می گردد، تعیین شد. تعیین دوز دارو به این صورت بود که به عدد کپسول فنیتوئین ۱۰۰ mg/kg را در ۱ سی سی آب مقطر حل کردیم، سپس ۱۰۰ میکرولیتر آن را با آب مقطری که ۲۰۰ گرم غذای موش پودر شده را خمیری کرده، مخلوط کردیم. در ابتدا برای یک موش سوری، نصف دوز تعیین شده (۵۰ میکرولیتر) از دارو برای آداپته شدن موش تعیین شد. میزان غذای مصرفی یک موش در یک روز تقریباً ۱۰ گرم است. طبق این موضوع ۲۰۰-۱۸۰ گرم غذای موش همراه با ۱۰۰ میکرولیتر از داروی فنیتوئین و آب مقطر مخلوط شد تا زمانی که به صورت خمیر شکل پذیر شد و پس از آن به صورت استوانه های شکل داده شد و پس از یک روز به خمیر فرصت داده شد تا خشک شود.

در گروه تیمار، موش های مادرتوسط داروی فنیتوئین حل شده در آب مقطر بصورت مخلوط با غذای روزانه به صورت خوراکی تغذیه شدند. گروه کنترل توسط غذای استاندارد موش فاقد هر گونه دارویی تغذیه شدند.

سرانجام پس از گذشت سه روز از آداپته شدن موش ها با داروی فنیتوئین، ۲ موش ماده و ۱ موش نر در هر یک از قفس ها قرار گرفتند تا جفتگیری انجام شود. دوره بارداری این نژاد موش ۲۱ روزه است. حضور اسپرم در اسمیرهای واژن روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. سرانجام پس از زایمان موش های ماده جدایی از موش های نر نگهداری شدند.

نحوه نمونه گیری بدین صورت بود که پس از متولد شدن نوزاد موش ها، بعد از گذشت ۲۰ روز به آزمایشگاه منتقل شدند و در ابتدا در یک بشر حاوی پنبه آغشته به کلروفرم قرار داده شده و بچه موش ها را داخل بشر قرار دادیم تا از هوش رفتند. سپس بر روی بچه موش ها عملیات تشریح صورت گرفت. برای حفظ نمونه RNA، نمونه ها بر روی یخ قرار داده شدند و تا هنگام استخراج RNA در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جهت استخراج RNA و به منظور انجام Real Time-PCR تهیه نمونه RNA با کیفیت بالا ضروری است. در این آزمایش جهت استخراج RNA از کیت RNX-Plus شرکت سیناکلون و طبق پروتکل استفاده شد. جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. الکتروفورز روی ژل آگارز از متداولترین و سریع ترین روش های بررسی محصولات PCR است. سنتز cDNA از mRNA تم با استفاده از کیت شرکت VIVANTIS و بر اساس پروتکل شرکت انجام شد.

جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی برای انجام RT-PCR توالی ژن SOX9 از بانک اطلاعاتی ژنومی NCBI با شماره دستیابی NM\_011448.4 برای ژن SOX9 به دست آمد و سپس به کمک نرم افزار GENERUNNER، پرایمرهای مورد نظر طراحی شدند. یکی از پرایمرها از مرز بین دو اگزون طراحی شد تا آلودگی احتمالی DNA روی واکنش ما تأثیر نداشته باشد. همچنین از

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

ژن *ActinB* به عنوان ژن کنترل داخلی پرایمر با شماره دستیابی NM-007393.5 طراحی شد. سطوح بیان این ژن با روش Real Time RT-PCR اندازه گیری شد. واکنش ها برای ژن *SOX9* با استفاده از کیت Biofact و مطابق پروتکل انجام شد. آنالیز آماری نتایج Real Time RT-PCR توسط نرم افزار REST 2009 انجام شد.  $CT$ ، سیکلی از واکنش تعریف شده که سیگنال فلورسانس از Threshold عبور می کند و تفاوت  $CT$  بین ژن مورد نظر و ژن رفرنس به عنوان  $\Delta CT$  تعریف شد. تفاوت  $\Delta CT$  بین نمونه های تیمار و کنترل است.  $Folding\ change$  از رابطه  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  به توان  $-\Delta\Delta Ct$  از طریق نرم افزار  $rest$  به دست آمد. فرمول های مورد استفاده جهت مقایسه افزایش بیان ژن های هدف نسبت به ژن مرجع به شرح زیر است:

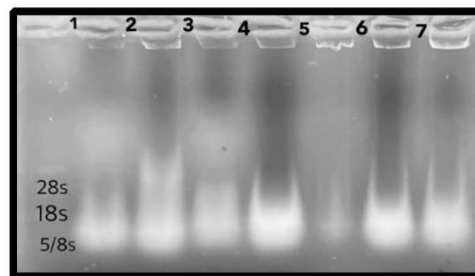
$$\Delta mCT = CT - \text{ژن هدف}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT - \text{ژن تیمار}$$

$$Fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### نتایج

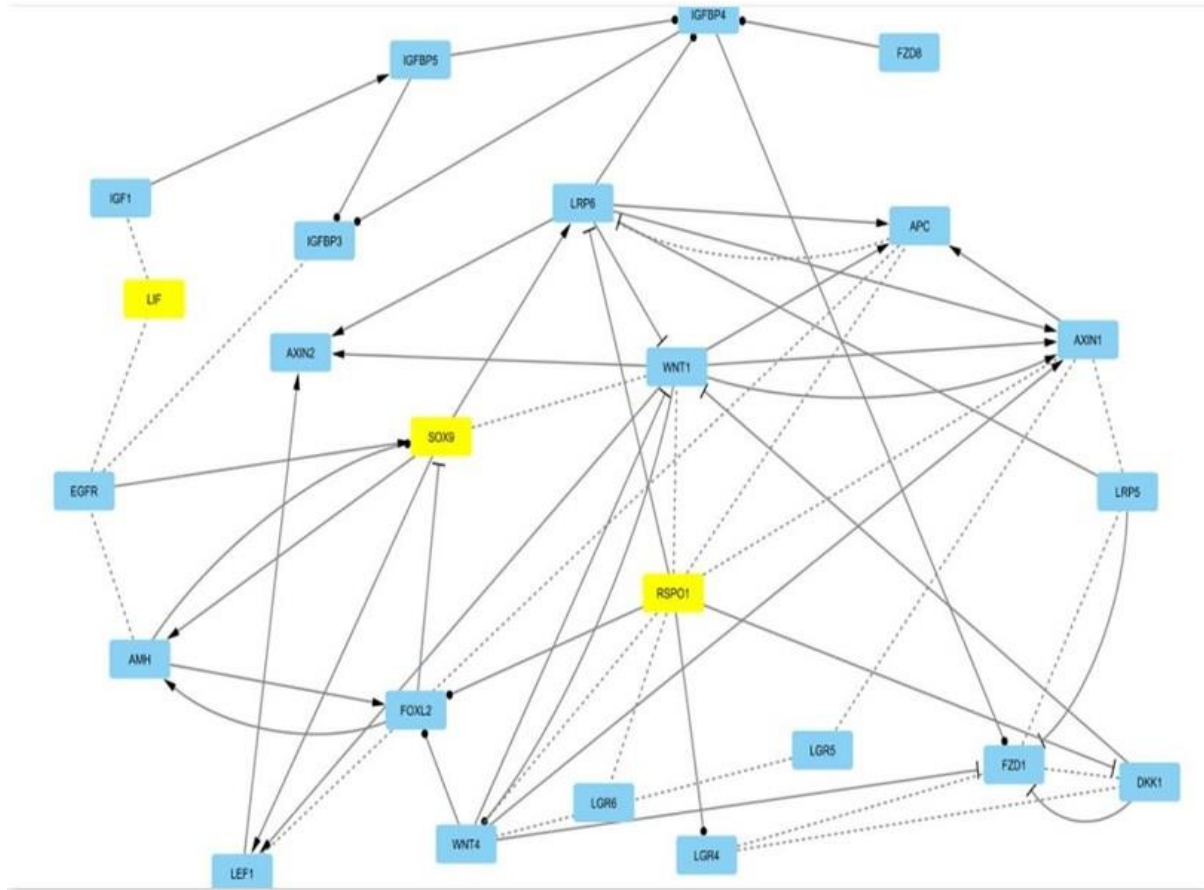
جامعه آماری این آزمایش شامل ۲ گروه ۷ تایی موش نژاد BALB/c دو ماهه بود که طبق پروتکل هلسینگی نگهداری شدند. گروه تیمار تحت درمان با داروی فنیتوئین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم قرار گرفتند و پس از بارداری بچه موش ها در ۲۰ روزگی تشریح شده و تخمدان بچه موش های ماده خارج شد. در طی این مطالعه هیچ موش بارداری فوت نکرد اما وضعیت سلامت عمومی آنها تایید نشد، چرا که بارداری آن ها به نسبت گروه تیمار دیرتر صورت گرفت. تعداد موش های باردار کمتر از گروه تیمار بود که این علت می تواند کاهش میل جنسی آنها را تایید کند. همچنین تعداد نوزادان متولد شده از هر مادر نسبت به گروه کنترل کمتر بود. به کمک کیت استخراج RNA از شرکت سیناکلون طبق پروتکل مربوطه، استخراج RNA از نمونه های بافت تخمدان نوزادان گروه کنترل و تیمار انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد. نتیجه الکتروفورز چند نمونه در شکل ۱ ارائه شده است. غلظت نمونه های به دست آمده همگی در حد مطلوب بود و سه باند 28s، 18s و 5/8s به صورت تک باند مشاهده شد.



شکل ۱- RNA استخراج شده از نمونه ها را روی ژل برده و سه باند مشاهده شد. نمونه ۱ تا ۷ RNA استخراج شده که ۳ میکرولیتر آن در ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

شبکه ی ژنی ژن *SOX9* با استفاده از نرم افزار سایتواسکیپ (sytoscape) رسم شد (شکل ۲).





شکل ۲- شبکه ی ژنی و ارتباط سه ژن *RSP01*, *LIF*, *SOX9*

شبکه ی ژنی رسم شده نشان می دهد که ارتباط این ژن از طریق مهار یا تحریک ژن های بسیاری صورت می گیرد. ژن *SOX9* با اثر بر سه ژن *LEF1* و *LRP6* و *AMH* آنها را فعال می کند. *AMH* خود با *EGFR* و *EGFR* نیز با ژن *LIF* در ارتباط هستند. *EGFR* به طور مستقیم *SOX9* را مهار می کند. ارتباط دو ژن *SOX9* و *LIF* از طریق *AMH* و *EGFR* می باشد. ژن *FOXL2* مستقیماً باعث مهار *SOX9* می شود. مهار شدن یا نشدن این ژن در جنسیت جنین تأثیر گذار است و اگر مهار شود امکان ماده شدن قطعا بیشتر خواهد شد. همچنین *FOXL2* با ژن *RSP01* ارتباط برقرار می کند و پل ارتباطی *RSP01* و *SOX9* ژن *FOXL2* می باشد. *FOXL2* و *AMH* به طور متقابل یکدیگر را فعال می کنند. ژن *FOXL2* با ژن *LEF1* که توسط *SOX9* فعال شده بود نیز در ارتباط است. *WNT4* هم ارتباط نزدیکی با *FOXL2* دارد. ارتباط *SOX9* و *RSP01* فقط به *FOXL2* خلاصه نمی شود. این دو ژن با ارتباط با ژن های *LRP6* و *WNT1* می توانند با هم مرتبط شوند. *RSP01* با ژن های *LGR6*، *WNT1*، *WNT4*، *LGR4*، *WNT1*، *WNT4*، *LGR6*، *LGR5*، *FZD1* و *DKK1* به طور مستقیم تعامل برقرار می کنند. همچنین می تواند دو ژن *DKK1* و *LRP6* را بدون واسطه مهار کند. *RSP01* از طریق ژن های *FOXL2*، *WNT1*، *LRP6* و *WNT4* به صورت غیر مستقیم با ژن *LIF* در ارتباط است (۸ و ۹ و ۱۰).

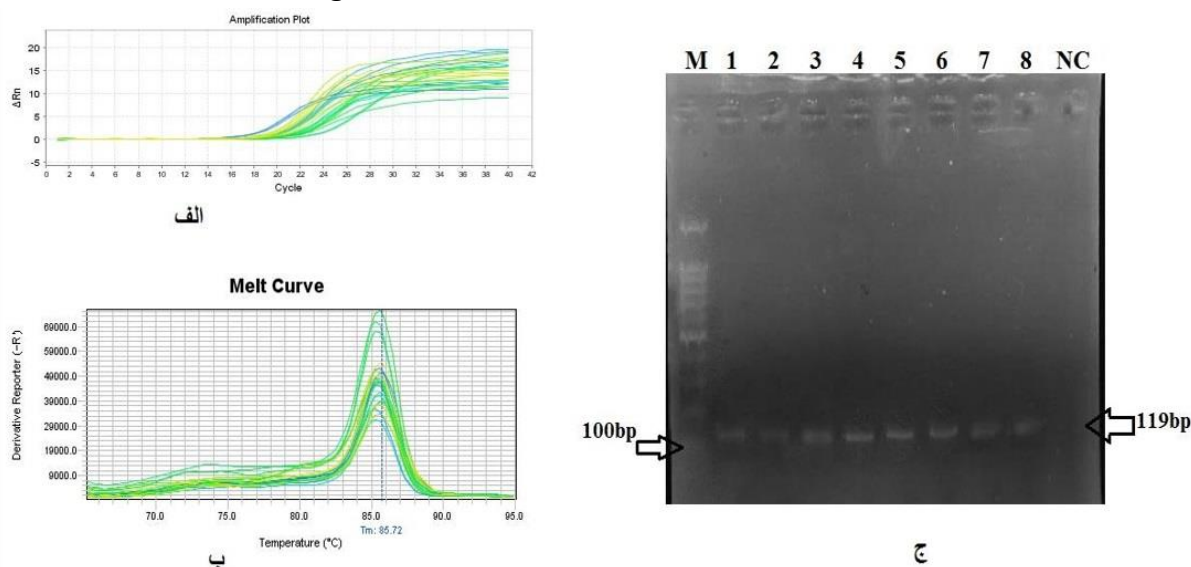
*RSP01* از طریق *LRP6* به ژن *IGFBP4* مرتبط می شود. *IGFBP4* با ژن های *IGFBP3* و *IGFBP5* ارتباط دارند. *IGFBP5* خود توسط ژن *IGF1* فعال می شود. ژن *IGF1* مستقیماً با *LIF* در ارتباط می باشد. ژن *IGFBP3* نیز از طریق *EGFR* با *LIF* در ارتباط است. *RSP01* با *WNT4* در ارتباط است. *FOXL2* با *WNT4* ارتباط دارد. *FOXL2* نیز با ژن های *SOX9*، *AMH* و *EGFR* به ژن *LIF* مرتبط می شود. *RSP01* در ارتباط نزدیکی با *WNT1* می باشد. *WNT1* با ژن *SOX9*

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

ارتباط دارد. نتیجه ی این ارتباط همانطور که گفته شد به *LIF* ختم خواهد شد. *WNT1* توسط سه ژن *WNT4*، *LRP6* و *DKK1* در این شبکه مهار می شود. همچنین *FZD1* توسط سه ژن *WNT4*، *DKK1*، *LRP5* و *APC* نیز توسط سه ژن *WNT1*، *LRP6* و *AXINI* در این شبکه فعال می شود. *AXINI* توسط سه ژن *WNT1*، *LRP6* و *WNT4* فعال می شود (۸ و ۱۱ و ۱۲). (شکل ۲).

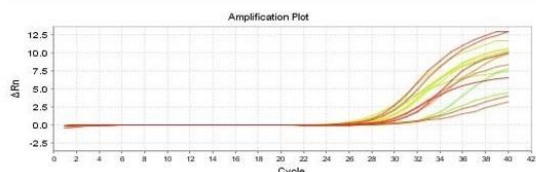
نتایج بررسی منحنی ذوب، منحنی تکثیر و محصولات PCR هر ژن در ژل الکتروفورز: محصولات PCR ژن در ژل الکتروفورز بارگذاری شد و تصویر ژل الکتروفورز، باندهای مربوط به تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تأیید نمود. Ladder با اندازه مناسب به عنوان شاخص اندازه ملکولی، به میزان مناسب در این آزمایش ۱۰۰bp در یک چاهک قرار داده شده است که برای ژن *SOX9*، ۱۰۰bp و ژن *B-actin*، ۱۱۹bp مشاهده شده است (قسمت ج، شکل ۳).



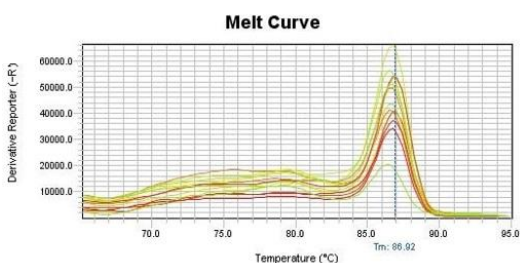
شکل ۳- منحنی تکثیر(الف)، منحنی ذوب (ب)، بررسی الکتروفورزی محصول Realtime RT-PCR ژن *B-ACTIN* (NC: کنترل منفی).

منحنی ذوب این ژن که بر اساس دما و مشتق سیگنال فلورسنت دستگاه Real-Time PCR ترسیم می شود در قسمت ب از شکل ۴ نمایش داده شده است.

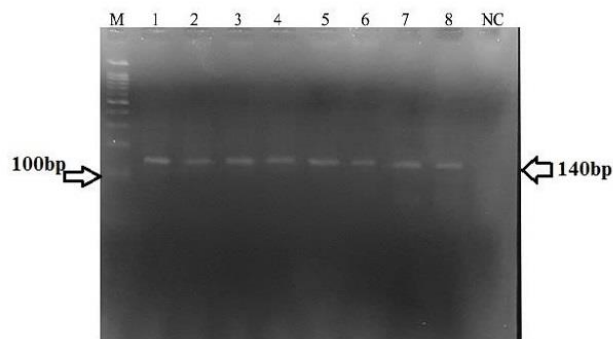
نتایج حاصل از آنالیز آماری داده های Real Time RT-PCR نشان داده است که در جنین های موش های تیمار در پاسخ به دارو، نسبت به موش های کنترل، ژن *SOX9* به میزان ۴ برابر افزایش بیان داشته اما به دلیل اینکه P value آن کمتر از ۰/۰۵ نگردیده است (P-value=۰/۱۷۴)، بیان آن معنی دار نمی باشد (شکل ۵).



الف



ب

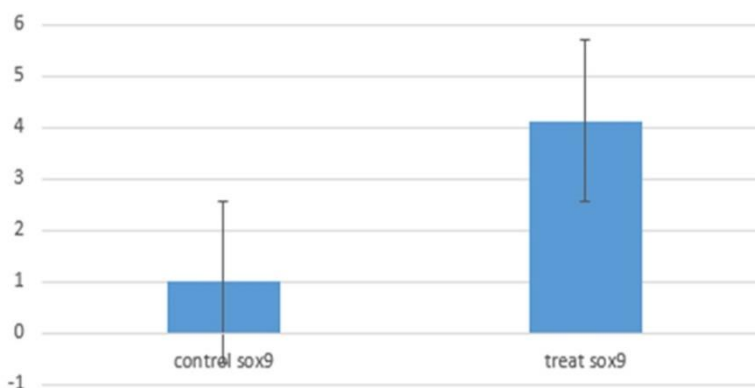


ج

شکل

۴- منحنی تکثیر (الف)، منحنی ذوب (ب) و بررسی الکتروفورزی محصول Realtime RT-PCR ژن *SOX9*

آنالیز آماری بیان ژن توسط نرم افزار REST 2009 انجام شد و مقایسه میان بیان ژن *SOX9* در موش های تیمار نسبت به کنترل به صورت نمودار نمایش داده شده است (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه Fold Change ژن *SOX9* در موش های تیمار نسبت به کنترل. افزایش بیان ژن *SOX9* که معنادار نیست.

### بحث

در این مطالعه داروی ضد صرع فنیتوئین انتخاب شده است. دلیل انتخاب شدن این دارو به این خاطر است که این دارو یکی از داروهای انتخابی در درمان بیماری صرع در بسیاری از بیماران به ویژه زنان می باشد. هدف از این مطالعه بررسی امکان ایجاد ناباروری یا مشکلات تخمدانی در نوزادانی بود که در زمان مصرف دارو توسط مادر به عنوان جنین در رحم مادر قرار داشتند. در این آزمایش به بررسی تأثیر داروی فنیتوئین بر تمایز تخمدان جنین موش و سنجش بیان یک ژن کلیدی اثرگذار در تکوین تخمدان پرداخته شده است. ژن مورد مطالعه ی ما *SOX9* می باشد که نقش ژن *SOX9* عامل اصلی در تعیین جنسیت در جنس نر می باشد (۱۱).

در این پژوهش ۲ گروه ۷ تایی موش نژاد BALB/c مورد آزمایش قرار گرفتند. گروه تیمار ۳-۴ روز قبل از بارداری تا تولد نوزادان تحت تیمار با داروی فنیتوئین قرار گرفتند و نمونه گیری از بافت تخمدان انجام شد. در نهایت از بافت های مورد نظر RNA استخراج شد. سپس cDNA آنها ساخته شد و با استفاده از تکنیک Real Time RT-PCR بیان ژن *SOX9* اندازه گیری شد. برای تحلیل میزان بیان ژن از نرم افزار rest 2009 استفاده گردید.

در این مطالعه بیان ژن *SOX9* که جز ژن های کلیدی و مهم در تعیین جنسیت می باشد، تحت تأثیر فنیتوئین بررسی شد و با توجه به آنالیز آماری در ژن *SOX9* که دارای افزایش بیان ۴ برابری شده بود، ولی این افزایش بیان معنا دار نیست. از اثرات جانبی این دارو می توان گفت که فنیتوئین باعث کاهش میل جنسی و کاهش کیفیت باروری در موش های مادر تحت تیمار شد به این صورت که، حتی طول دوره بارداری این موش ها افزایش پیدا کرد. یا اینکه موش های گروه تیمار ممکن است به علت کم شدن میل جنسی در آنها دیرتر از موش های گروه کنترل لقاح انجام داده باشند (موش های تیمار حدود ۵ الی ۷ روز بعد از موش های گروه کنترل، زایمان کردند). پس از زایمان تعداد نوزادان گروه تیمار متولد شده کمتر از گروه کنترل بود و مرگ و میر نوزادان موش در گروه تیمار بسیار زیاد بود (به طوری که برای تشریح فقط ۴ موش نوزاد باقی مانده بود). با توجه به این عوارض توصیه می شود، مصرف فنیتوئین به ویژه در زنان باردار قطع و دارویی ایمن تر جایگزین آن گردد.

گلدیکن و همکاران<sup>۱۰</sup> در یک مطالعه بر روی داروی فنیتوئین بیان داشتند که اثر ایمنی فنیتوئین مورد ارزیابی قرار گرفت که هدف آن، بررسی ایمنی فنیتوئین از نظر عوارض جانبی قلبی عروقی بوده است. در گزارش های موردی، میزان سریع تزریق (کمتر از ۵۰ میلی گرم در دقیقه) فنیتوئین را به عنوان علت اصلی افزایش مرگ و میر در نظر داشتند. در مقابل، هیچگونه عوارض جانبی جدی قلبی عروقی منجر به مرگ در کار آزمایشی های بالینی قابل توجه نبود. نتیجه بررسی این بود که میزان تزریق بیشتر از ۵۰ میلی گرم برای بیماران خطرناک گزارش شده است. برای بیماران مسن و بیماران مبتلا به همبستگی قلبی عروقی، که ضربان قلب آنها کندتر خواهد بود، این میزان باید کمتر باشد (۱۳).

در مطالعه ی تکوز و همکاران<sup>۱۱</sup> که بر روی این دارو انجام شده بود، بیانگر این مطلب است که از داروی فنیتوئین برای درمان بیماری هایی به غیر از صرع نیز استفاده شده است. در یکی از تحقیقات تأثیر تزریق فنیتوئین بر روند بهبود زخم در موش های دارای آسیب طناب صوتی به روش های هیستوپاتولوژیک بررسی گردید و مشخص گردید که تزریق فنیتوئین در موش های صحرایی پس از آسیب طناب صوتی باعث افزایش معنی دار ضخامت لایه پروپریا و تراکم فیبروبلاست و کلاژن منظم و بالغ در لایه پروپریا شد (۱۴).

ارگان اصلی در اختلال ناباروری، تخمدان می باشد که اگر مورد آسیب واقع شود، اعمال خود را در قبال آزاد سازی به موقع تخمک و ترشح به موقع هورمون زنانه انجام نخواهد داد. شروع شکل گیری تخمدان در روز ۱۲/۵ بارداری می باشد که این سلول ها به صورت کیست به هم پیوسته ایجاد می شوند و ارتباط آن ها از طریق پل های سیتوپلاسمی می باشد. فاکتور هایی که در به وجود آمدن تخمدان نقش دارند *gata4* و *gata6* هستند که در فرایند میوز ۲ که بعد از تولد تکمیل می شود، این دو فاکتور حضور دارند (۱۲ و ۱۵).

ژن هایی بسیاری در شکل گیری و تکوین تخمدان در حیوانات و به ویژه انسان نقش دارند. از جمله ی این ژن ها *LIF*، *RSPO* و *SOX9* می باشند. ژن *RSPO1* در رشد تخمدان موثر است. همچنین بیان ژن *RSPO1* در تخمدان در چندین گونه مهره دار ثبت شده است و این نشان می دهد که نقش تعیین کننده تخمدان در آن بسیار محفوظ است (۱۶ و ۱۷ و ۱۸).

در مطالعاتی که طی ۶ تا ۹ هفته به طول انجامید و در آن غدد جنین انسان مورد مطالعه قرار گرفت، بیان سه ژن *RSPO1*، *WNT4* و *CTNNT1* در بیضه و تخمدان مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتیجه ی آن به این صورت گزارش شد:

<sup>10</sup> Guldiken et al.

<sup>11</sup> Tokgöz et al.

بیان *RSPO1* در مراحل اصلی رشد اولیه تخمدان انسان افزایش یافت. تجزیه و تحلیل *WNT4*، *CTNNB1* و *RSPO1* در عدد جنین انسان بین ۶-۹ هفته پس از برداشت افزایش بیان معنی داری در ژن *RSPO1* در تخمدان در حال توسعه در مقایسه با بیضه را نشان داد، در حالی که تفاوت معنی داری در بیان دو ژن *CTNNB1* و *WNT4* دیده نشد. *RSPO1* در بیضه در حال توسعه دارای بیان کمتری بود و در تمام این مراحل رشد اساسی بیضه تغییر نکرد (۹ و ۱۰ و ۱۹).

پروتئین حاصل از ترجمه ژن *LIF* ممکن است به بهبود میزان لانه گزینی در زنان مبتلا به ناباروری کمک کند. در یک مطالعه ای که انجام شده است، در آن ناباروری و بیان ژن *LIF* مورد بررسی قرار گرفته است، مطالعه ای انجام شده از نوع مشاهده ای آینده نگر از مارس ۲۰۱۳ تا فوریه ۲۰۱۶ می باشد. زنان نابارور از گروه بیمار و زنان بارور از گروه کنترل بودند. بیان ژن *LIF* در بیماران مبتلا به ناباروری تفاوت معناداری با گروه کنترل داشتند، نتیجه ی آن کاهش بیان ژن *LIF* در همه ی زیرگروه های ناباروری بود (۸ و ۲۰ و ۲۱).

مطالعه ی حاضر با توجه به تعداد نمونه و سطح آزمایشات شاید نتواند قوانین کلی در رابطه با تأثیر داروی فنیتوئین در بیان ژن مورد نظر را ارائه کند اما به عنوان یک آزمایش مقدماتی تایید کرد که مصرف داروی فنیتوئین و داروهای مشابه که برای درمان صرع مورد استفاده قرار می گیرند، می توانند اثرات چشمگیری در روند تمایز تخمدان و مشکلات بعدی به وجود آورند. نتایج ما نشان می دهد که تأثیر داروی فنیتوئین حتی در حد بسیار کم و در شرایطی که حتی معنادار نیست، اما تغییراتی وجود دارد که ممکن است بتواند با مکانیسم های تصاعدی یا آبخاری باعث افزایش یا کاهش بیان ژن های پایین دست و اثرات متقابل بین مولکول های درگیر در روند تکوین تخمدان شود. لذا در این مطالعه برای اولین بار پیشنهاد می کنیم مصرف فنیتوئین با توجه به بیان ژن مهم در تکوین تخمدان و باروری جنس ماده، مد نظر قرار گیرد و در روند درمان، داروهای جایگزین که اثرات جانبی کمتری رو تمایز جنسی یا جنسیت جنین مادرانی که مبتلا به صرع هستند و از این نوع داروها استفاده می کنند، در نظر گرفته شود.

## References:

1. Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. Current neurology and neuroscience reports. 2007; 7(4): 348-54.
2. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015; 5(6): 1-18.
3. Shneker BF FN. SEpilepsy. Dis Mon. 2003; 49(7): 426-78.
4. Inaji M, Maehara T. PET, SPECT, and MEG in the diagnosis of epilepsy. Nihon rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine. 2014; 72(5): 827-33.
5. Kulju T, Haapasalo J, Verner R, Dibué-Adjei M, Lehtimäki K, et al. Frequency of automatic stimulations in responsive vagal nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. Neuromodulation: Technology at the Neural Interface. 2020; 23(6): 852-8.
6. Moavero R, Pisani LR, Pisani F, Curatolo P. Safety and tolerability profile of new antiepileptic drug treatment in children with epilepsy. Expert opinion on drug safety. 2018; 17(10): 1015-28.
7. Liu X, Carney PR, Bussing R, Segal R, Cottler LB. Trends in antiepileptic drug use in children and adolescents with epilepsy. Pediatric Neurology. 2017; 74:32-40.
8. Arend RC, Londoño-Joshi AI, Straughn Jr JM, Buchsbaum DJ. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ovarian cancer: a review. Gynecologic oncology. 2013; 131(3): 772-9.
9. Chassot A-A, Bradford ST, Auguste A, Gregoire EP, Pailhoux E, et al. WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. Development. 2012; 139(23): 4461-72.

10. Pannetier M, Chassot A-A, Chaboissier M-C, Pailhoux E. Involvement of FOXL2 and RSPO1 in ovarian determination, development, and maintenance in mammals. *Sexual Development*. 2016; 10(4): 167-84.
11. Tan Z, Niu B, Tsang KY, Melhado IG, Ohba S, et al. Synergistic co-regulation and competition by a SOX9-GLI-FOXA phasic transcriptional network coordinate chondrocyte differentiation transitions. *PLoS genetics*. 2018; 14(4): e1007346.
12. Pellegrino M, Maiorino R, Schonauer S. WNT4 signaling in female gonadal development. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*. 2010; 10(2): 168-74.
13. Guldiken B, Rémi J, Noachtar S. Cardiovascular adverse effects of phenytoin. *Journal of neurology*. 2016; 263: 861-70.
14. Tokgöz SA, Saka C, Akin I, KÖYBAŞIOĞLU FF, Kilicaslan S, et al. Effects of phenytoin injection on vocal cord healing after mechanical trauma: An experimental study. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2019; 49(5): 1577-81.
15. Tevosian S. Genetic control of ovarian development. *Sexual Development*. 2012; 7(1-3): 33-45.
16. Martínez-Juárez A, López-Luna MA, Porrás-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. Expression of the Sox9, Foxl2, Vasa and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2018; 330(3): 148-64.
17. Rahmoun M, Lavery R, Laurent-Chaballier S, Bellora N, Philip GK, et al. In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic acids research*. 2017; 45(12): 7191-211.
18. Nicol B, Yao HH-C. Gonadal identity in the absence of pro-testis factor SOX9 and pro-ovary factor beta-catenin in mice. *Biology of Reproduction*. 2015; 93(2): 35, 1-12.
19. Tomaselli S, Megiorni F, Lin L, Mazzilli MC, Gerrelli D, et al. Human RSPO1/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments  $\beta$ -catenin signaling. *PloS one*. 2011; 6(1): e16366.
20. Taniguchi T, Miyagawa T, Tamaki Z, Nakamura K, Yamashita T, et al. A possible implication of reduced levels of LIF, LIFR, and gp130 in vasculopathy related to systemic sclerosis. *Archives of dermatological research*. 2017; 309: 833-42.
21. Margioulas-Siarkou C, Prapas Y, Petousis S, Miliadis S, Ravanos K, et al. LIF endometrial expression is impaired in women with unexplained infertility while LIF-R expression in all infertility sub-groups. *Cytokine*. 2017; 96: 166-72.

## بررسی القای آپوپتوز توسط ژن کد کننده سم *seh* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در سلول‌های PC3

مریم کریمیان<sup>۱</sup>، ایمان محبی<sup>۲</sup>، فرانک عالی<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۱.۳. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۱.۴. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** در این تحقیق، تاثیر سم *seh* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر میزان آپوپتوز در رده سلولی PC-3 در سرطان پروستات انجام گرفت *seh*. یکی از اعضای سموم مهم باکتریایی است. *Bax* و *Bcl-2* دو پروتئین مداخله کننده در مسیر داخلی آپوپتوز و *SURVIVIN* به عنوان عملکرد دوگانه آن هم به عنوان مهار کننده آپوپتوز و هم تنظیم کننده میتوز، شناخته شده است. **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق توالی ژن سم از طریق سایت NCBI به دست آمد و در وکتور pcDNA3.1(+). کلون شد. وکتور نو ترکیب به درون باکتری *E. coli* سویه TOP10 به کمک شوک حرارتی منتقل شد. سلول‌های رده PC-3 تهیه شده از انستیتو پاستور با وکتور نو ترکیب به روش لیپوفکشن ترانسفورم شد. پس از برداشت سلول‌ها، RNA استخراج و cDNA ساخته شد. *real time PCR* برای بررسی میزان بیان بر روی این سلول‌ها و ژن‌های آپوپتوزی و یک گروه به عنوان شاهد صورت گرفت. از ژن رفرنس *GAPDH* استفاده شد.

**نتایج:** نتایج حاصل نشان دهنده بیان افزایش ژن *BAX* و کاهش بیان *BCL-2* و *SURVIVIN* بود. به صورتی که با تزریق پلاسمید حاوی *seh* به رده سلولی PC-3 و پس از آن انجام *real time PCR* و بررسی نتایج آن نسبت به ژن رفرنس، مشخص شد که *seh* بر روی بیان ژن‌های آپوپتوزی در رده سلولی PC-3 تأثیر دارد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** سم انتروتوکسین H باکتری استافیلوکوکوس می‌تواند اثرات مفیدی بر بیان ژن‌های آپوپتوزی در سرطان پروستات داشته باشد. به صورتی که بیان ژن‌های آنتی آپوپتوتیک مثل *BCL-2* و *SURVIVIN* را کاهش، و بیان ژن *BAX* را افزایش دهد.

**واژگان کلیدی:** انتروتوکسین H، سرطان پروستات، ژن‌های آپوپتوزی *BAX*، *BCL-2* و *SURVIVIN*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۳۴۸۰۹۲۶۱

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: faranakaali1361@gmail.com

## Investigation of induction of apoptosis by *she* venom coding gene of *Staphylococcus aureus* PC-3 cell

Maryam Karimiyan<sup>1</sup>, Iman Mohebbi<sup>2</sup>, Faranak Aali<sup>3\*</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. B.Sc. Student Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3. Ph.D. Student in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

Prostate cancer is one of the most common cancers among men to show certain symptoms prior to metastasis. Therefore, proper diagnosis and early detection in disease control and selection of therapeutic methods are important. In this study, the effect of *Staphylococcus aureus* was performed by *Staphylococcus aureus* on the PC – 3 cell level.

**Materials and methods:** In this study, the sequence of the venom gene was obtained through the NCBI site and cloned into the vector pcDNA3.1 (+). The recombinant vector was transferred to *E. coli* strain TOP10 with thermal shock. PC-3 cells prepared from the Pasteur Institute with a recombinant vector transfected with lipofection. After removal of the cells, the RNA and cDNA RNA was constructed. Real-time RT-PCR for expression of these cells and apoptotic genes and one group as control. Reference GAPDH Gene was used.

**Result:** The results showed that in seh-treated PC3 cell lines, the expression of BAX gene was increased statistically significant ( $P < 0.05$ ) in compared to control PC3 cell lines (transfected by empty pcDNA3.1(+)). As well, the reduces of BCL-2 expression was observed in pcDNA3.1(+)-seh transfected cells in compare with control group. So, these finding showed that changing in mRNA expression of BCL-2 and BAX genes support cell apoptosis.

**Conclusion:** SEH toxin of *S. aureus* has useful effects on the expression of BAX gene as a pro-apoptotic factor. On the other hand, anti-apoptotic BCL-2 gene was down-regulated after SEH toxin treatment of PC3 cancer cell lines. So, it seems that the SEH toxin of *S. aureus* has a high potential for cancer treatment.

**Keyword:** Enterotoxin H, prostate cancer, apoptotic genes Bcl-2, Bax and Survivin

### مقدمه

از گذشته تا به امروز انسان‌های زیادی در سراسر دنیا به سرطان مبتلا شده‌اند و جان خود را از دست داده‌اند. آمار مبتلایان به این بیماری در جهان روز به روز افزایش می‌یابد. سرطان بیماری متنوعی در سطوح بافتی، توموری و سلولی است. به همین دلیل این گوناگونی سبب ایجاد چالش در تشخیص اختصاصی این بیماری شده است. بنابراین مطالعات گسترده در زمینه تشخیص اختصاصی و درمان مناسب این بیماری امری حیاتی است (۱). معمولاً سرطان در اثر نقص عملکرد مکانیسم‌های تنظیمی رشد و تقسیم سلولی ایجاد می‌شود. این نقص‌های عملکردی در اثر ایجاد آسیب‌های ژنتیکی که بیشتر به وسیله هورمون‌ها، مواد شیمیایی و برخی مواقع ویروس‌ها به وجود می‌آیند. پس زمانی سرطان اتفاق می‌افتد که مکانیسم‌های مسئول تثبیت روند رشد سلول‌ها، دچار مشکل می‌شوند (۲ و ۳). سرطان پروستات یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها در مردان است. در کشورهای توسعه یافته دومین سرطان رایج پس از سرطان پستان و دومین سرطان مرگ آور بعد از سرطان ریه، سرطان پروستات است. در دنیا از هر ۶ مرد یک نفر به این سرطان مبتلا می‌شود (۴). سرطان پروستات نوعی بیماری است که در آن سلول‌های بدخیم از بافت پروستات نشأت می‌گیرند و به طور فزاینده و نامنظمی تکثیر می‌شوند و موجب افزایش حجم هریک از اجزای سلولی غده پروستات می‌شوند (۵).

به روش‌های مختلفی می‌توان از باکتری‌ها برای درمان سرطان استفاده کرد. این روش‌ها به شکل اثرات مستقیم ضد توموری و یا انتقال عواملی دارای این آثار عمل می‌کنند. استفاده از باکتری‌ها به عنوان وکتور به دو روش است، ۱- همانند سازی باکتریایی اختصاصی تومور. ۲- انتقال پلاسمید داخل سلولی. سموم باکتریایی با از بین بردن یاخته‌ها و تغییر فرایندهای سلولی کنترل کننده



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

تکثیر، آپوپتوز و تمایز که با سرطان مرتبط است عمل می‌کنند. نوع دیگر عملکرد باکتری‌ها اسپور است انواع بسیار مستحکم باکتریایی هستند. در تحقیقات مختلف مشخص شد که ۱۵ تا ۱۸ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس که از منابع مختلف جدا می‌شوند، توانایی تولید انتروتوکسین را دارند. میزان ژن‌های انتروتوکسین با توجه به اینکه منشأ باکتری انسان، حیوان، غذا، عفونت‌ها و یا محیط باشد، متفاوت است (۶). امروزه برای شناسایی ژن‌های انتروتوکسین از روش‌های مولکولی مثل Multiplex PCR و PCR استفاده می‌شود که شامل انواع A, B, C, D, H, I و J است (۷). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس از آگزوتوکسین‌های تولید شده توسط این باکتری هستند. این سموم به ۵ نوع مختلف طبقه بندی می‌شود که شامل؛ *sea*, *sec*, *seb*, *sed* و *see* است. با این حال انواع جدیدی از آنها در سال‌های اخیر کشف شده که شامل *shg*, *she* و *shj* هستند (۸). انتروتوکسین H، یکی از اعضای سموم مهم باکتریایی است که توسط انواع مختلفی از گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولید می‌شود. این سم مسئول بیماری‌های انسانی است که به عنوان مسمومیت غذایی استافیلوکوکی شناخته می‌شود و تنها این سم توانایی این را دارد که موجب اختلالات با شروع سریع علائم مسمومیت باشد (۹).

انواع مختلف انتروتوکسین‌های باکتریایی بخصوص سموم استافیلوکوکی نقش مهمی در القای آپوپتوز دارند. آپوپتوز نوعی مرگ برنامه ریزی شده سلول است که در درمان سرطان از اهمیت بسزایی برخوردار است. هرگاه سلول‌ها در ایجاد آپوپتوز دچار مشکل شوند، انواع بیماری‌ها از جمله سرطان بروز می‌کند. بنابراین یکی از بهترین راه کارهای کنترل سرطان، القای آپوپتوز است که این امر ممکن است با استفاده از سموم باکتریایی قابل انجام باشد (۱۰).

رده سلولی PC3 در سال ۱۹۷۹ از متاستاز استخوانی درجه ۴ سرطان پروستات در یک مرد ۶۲ ساله قفقازی ایجاد شد. این سلول‌ها به آندروژن‌ها، گلوکوکورتيكوئیدها یا فاکتورهای رشد فیبروبلاست پاسخ نمی‌دهند، اما نتایج نشان می‌دهد که سلول‌ها تحت تأثیر عوامل رشد اپیدرمی قرار دارند (۱۱). هدف از این تحقیق بررسی القای آپوپتوز توسط ژن کدکننده سم انتروتوکسین H باکتری استافیلوکوکوس در رده سلولی PC3 می‌باشد.

### روش کار

ابتدا برای استخراج توالی رمز گذار سم SEH از بانک ژن، وارد سایت [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) شده و از قسمت نوکلئوتید اقدام به دریافت توالی این ژن شد. به منظور ایجاد پلاسمید نوترکیب، توالی استخراج شده برای ورود به پلاسمید pcDNA3.1(+) طراحی شد. جهت سنتز ژن و تشکیل وکتور نوترکیب، سازواره مورد نظر به شرکت Genery biotechnology سفارش داده شد. از روش‌های هضم آنزیمی و PCR برای تایید صحت سازواره نوترکیب استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن seh انجام شد (جدول ۱). هضم آنزیمی پلاسمید مذکور با دو آنزیم محدود کننده BamH1 و EcoRV انجام شد و توسط ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت سازواره ژنی مورد تعیین توالی قرار گرفت. به منظور تکثیر سازواره نوترکیب، ابتدا سلول‌ها با کشتی شریشیا کلی سویه Top10 به روش شیمیایی حاصل شد. از کلنی‌های رشد یافته، در محیط ۵ میلی لیتری لوریا برتانی مایع کشت داده شد و استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (سیناکلون، ایران)، بر اساس روش کار کیت، انجام شد. کمیته و کیفیت استخراج پلاسمید با دستگاه نانودراپ (ترموفیشر، آلمان)، اندازه گیری شد. همچنین برای تعیین کیفیت پلاسمید از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد.

رده سلولی PC3 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهیه شد. برای کشت و تکثیر این سلول‌ها از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ مخلوط آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین/استرپتومایسین استفاده شد. برای ترانسفکت کردن سلول‌ها با پلاسمید نوترکیب و پلاسمید فاقد ژن هدف (گروه کنترل) از روش لیپوفکشن بهره گرفته شد. به این منظور، از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (ترموفیشر، آلمان) استفاده شد. انتخاب سلول‌های سرطانی دریافت کننده پلاسمید، با روش مقاومت آنتی بیوتیکی انجام شد. در این راستا از آنتی بیوتیک نئومایسین (۶۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) استفاده شد.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

استخراج RNA از هر دو گروه سلول (گروه آزمایش و گروه کنترل) با استفاده از محلول RNX-Plus (سیناکلون، ایران)، صورت پذیرفت و کیفیت و کمیت RNA تخلیص شده با دستگاه نانودراپ انجام شد.

سنتز cDNA با کیت (یکتا تجهیز آزما، ایران) بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. جهت سنجش صحت سنتز cDNA، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ژن خانه داری GAPDH انجام شد (جدول ۱). به این منظور واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر محلول PCR Master Mix 2X، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (۵ پیکومول از هر پرایمر)، ۲ میکرولیتر از cDNA، و با استفاده از آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس مواد و واکنشگرها طی چرخه دمایی زیر در دستگاه PCR (اپندرف، آلمان) قرار داده شدند.

برنامه دمایی PCR در سه مرحله انجام شد. مرحله اول شامل حرارت اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم متشکل از ۳۲ چرخه سه قسمتی بود. مرحله اول جهت دناتوره کردن (۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه)، مرحله دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (۶۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه) و مرحله سوم جهت تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه) بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه انجام شد. بررسی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه Uvdoc صورت پذیرفت.

به منظور بررسی میزان بیان هر یک از ژن های *BCL-2*، *SURVIVIN*، *BAX* از روش *real time PCR* استفاده شد. به این منظور، میزان تغییرات بیان در cDNA ساخته شده از روی RNA های بیان شده در رده سلولی PC3، هر دو سلول گروه های آزمایش و کنترل بررسی شد. از پرایمرهای اختصاصی ژن های فوق الذکر (جدول ۱)، در این مورد بهره گرفته شد و ژن خانه دار *GAPDH* به عنوان ژن رفرنس به کار رفت.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق.

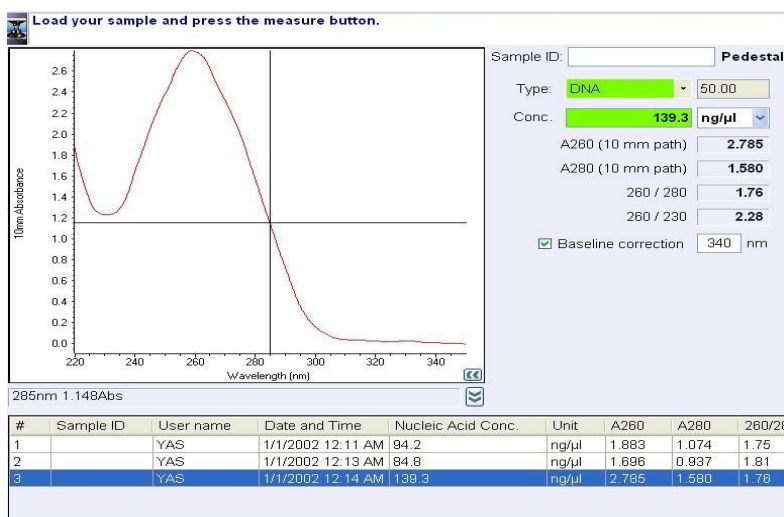
اندازه محصول	پرایمر	دمای اتصال	ژن	ردیف
۱۸۳bp	F: 5'- GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC -3' R: 5'- GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC -3'	۶۴	<i>GAPDH</i>	۱
۲۳۴bp	F: 5'- AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC -3' R: 5'- GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG -3'	۶۵	<i>BAX</i>	۲
۱۷۳bp	F: 5'- AGAACTGGCCCTTCTTGGAGG -3' R: 5'- CTTTTATGTTTCCTCTATGGGGTC -3'	۶۴	<i>SURVIVIN</i>	۳
۲۴۵bp	F: 5'- GACGACTTCTCCCGCCGCTAC -3' R: 5'- CGGTTTCAGGTAAGTACTCAGTCATCCAC -3'	۶۵	<i>BCL-2</i>	۴
۱۹۳bp	F: 5'- AGTGCGAGAAGATCAGCGAGAAC -3' R: 5'- ATCTTCCGAATCTTAATGTCCAGC -3'	۶۵	<i>seh</i>	۵

در این تحقیق برای بررسی میزان تغییرات بیان ژن های آپوپتوزی در سلول های رده PC-3 که با سم *seh* ترانسفورم شدند، و سلول های ترانسفورم نشده از نرم افزار SPSS 22 استفاده شد و همچنین از آزمون T-test برای بررسی وجود میزان معنی داری داده ها استفاده گردید که در سطح معنی داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شدند.

یافته ها

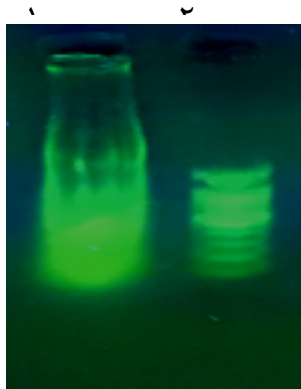
پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1(+)-she پس از تخلیص با روش PCR مورد تایید قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده حضور باند ۱۹۳ جفت بازی مربوط به این ژن می باشد. علاوه بر آن، با انجام هضم آنزیمی با دو آنزیم BamHI/EcoRV، دو باند با اندازه های ۵۴۲۸ جفت بازی و ۷۳۸ جفت بازی به ترتیب برای وکتور و ژن کلون شده ایجاد شد. در نهایت تعیین توالی ژن کلون شده، نشان دهنده صحت کلون سازی ژن و عدم وجود تغییر و جهش در این ژن بود.

بررسی غلظت و میزان خلوص پلاسمید استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری با دستگاه نانودراپ نشان داد که پلاسمید مذکور از درجه خلوص نسبتا بالایی برخوردار است. به طوری که سنجش نسبت OD در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ عدد ۱/۷۶ را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- تعیین غلظت پلاسمید با استفاده از نانودراپ. نتایج نشان داد که نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برابر ۱/۷۶ بود که درجه بالایی از خلوص پلاسمید را نشان می دهد. همچنین غلظت آن برابر ۱۳۹/۳ نانوگرم در هر ماکرولیتر بود.

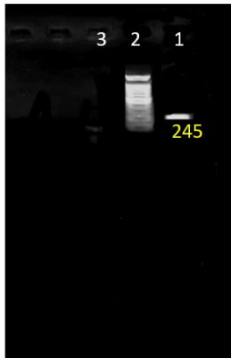
سلول های PC3 در محیط RPMI در شرایط مساعد دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۵ درصد CO2 رشد کردند. این سلول ها در هر دو گروه آزمایش و کنترل پس از ترانسفکت شدن به ترتیب با پلاسمید نو ترکیب و پلاسمید فاقد ژن هدف، برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. از هر دو گروه سلول، استخراج RNA صورت گرفت (شکل ۲). نتایج بررسی با نانودراپ نشان دهنده درجه خلوص و غلظت مناسب RNA تخلیص شده بود.



شکل ۲- ژل الکتروفورز استخراج RNA تام سلول PC-3. چاهک شماره ۱، RNA استخراج شده و حالت شعله شمعی آن

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

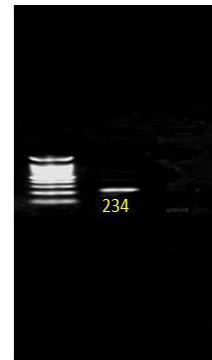
صحت سنتز cDNA از روی RNA های تخلیص شده از هر دو گروه سلول، با انجام RT-PCR صورت پذیرفت. نتایج نشان دهنده تشکیل باند ۱۸۳ جفت بازی مربوط به ژن *GAPDH* بود. همچنین هر کدام از ژن های *BAX*، *SURVIVIN* و *BCL-2* به ترتیب باند های ۲۳۴ جفت بازی، ۱۷۳ جفت بازی و ۲۴۵ جفت بازی تشکیل دادند. عمل real time PCR بر روی cDNA سنتز شده به کمک کیت (سیناکلون، ایران) صورت گرفت. در این پژوهش ژن *GAPDH* به عنوان ژن رفرنس مورد استفاده قرار گرفت.



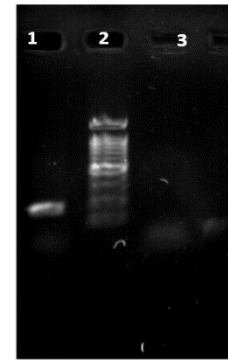
شکل ۶- ژل الکتروفورز PCR ژن *BCL-2*  
۲. چاهک شماره ۱ ژن و باند آن ۲۴۵  
تأیید شد و چاهک ۳ شاهد است.  
چاهک ۲ مارکر ۱۰۰ جفت بازی



شکل ۵- ژل الکتروفورز PCR  
ژن *SURVIVIN*، چاهک  
شماره ۲ ژن و با اندازه باند آن  
۱۷۳ و تأیید شد و چاهک ۳  
شاهد است. چاهک ۱ مارکر  
۱۰۰ جفت بازی



شکل ۴- ژل الکتروفورز  
PCR ژن *BAX*، چاهک  
شماره ۲ ژن که اندازه باند  
آن ۲۳۴ و تأیید شد و  
چاهک ۳ شاهد است.  
چاهک ۱ مارکر ۱۰۰ جفت  
بازی

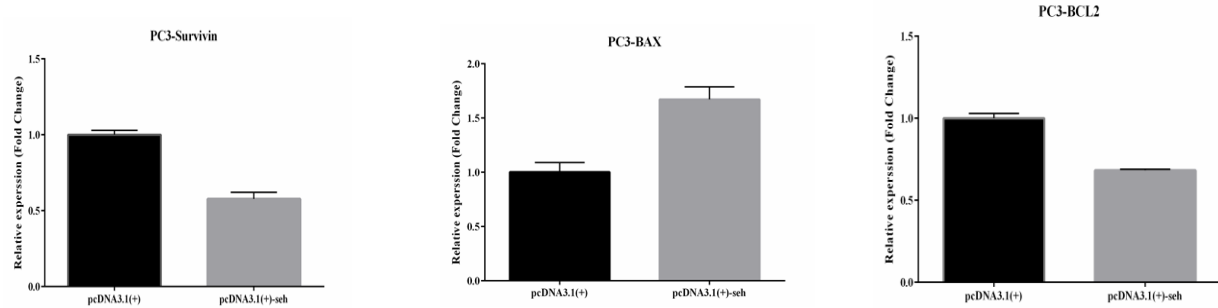


شکل ۳- ژل الکتروفورز PCR  
ژن *GAPDH*، چاهک شماره ۱ ژن  
که اندازه باند آن ۱۸۳ و تأیید  
شد و چاهک ۳ شاهد است.  
چاهک ۲ مارکر ۱۰۰ جفت بازی

انجام real time PRC بر روی cDNA ساخته شده با استفاده از کیت (سیناکلون، ایران) انجام شد. لازم به ذکر است که برای انجام real time از ژن های خانه داری که در شرایط زیستی بیان ثابتی دارند، جهت اعتبار سنجی و به منظور کنترل استفاده میشوند. در این تحقیق از *GAPDH* به عنوان ژن رفرنس استفاده شد. real time PCR در غلظت های ۰/۱ و ۰/۰۱ بر روی ژن های *GAPDH*، *BCL-2*، *BAX* و *SURVIVIN* انجام شد. در این پژوهش به منظور بررسی بیان ژن ها در دو غلظت استفاده شده، سیکل آستانه (Ct) مورد بررسی قرار گرفت. در آنالیز نمودارهای تکثیر، نقطه شروع سیکل آستانه با میزان بیان ژن رابطه وارون دارد. میزان بیان ژن با استفاده از ( $\Delta\Delta Ct$ ) مورد بررسی قرار گرفت.

با بررسی های انجام شده بر  $\Delta Ct$  گروه تیمار و گروه شاهد نتایج به صورت زیر حاصل و ارائه شد. میزان  $\Delta Ct$  *BCL-2* گروه تیمار از میزان  $\Delta Ct$  *BCL-2* گروه شاهد بزرگ تر است ( $p\text{-value} = 0/0045$ ). میزان  $\Delta Ct$  *BAX* گروه تیمار از میزان  $\Delta Ct$  *BAX* گروه شاهد بزرگ تر است ( $p\text{-value} = 0/025$ ). میزان  $\Delta Ct$  *SURVIVIN* گروه تیمار از میزان  $\Delta Ct$  *SURVIVIN* گروه شاهد کوچک تر است ( $p\text{-value} = 0/0073$ ).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکورد



نمودار ۲- بیان ژن *SURVIVIN* بر اساس Ct در سلول PC-3

نمودار ۲- بیان ژن *BAX* بر اساس Ct در سلول PC-3

نمودار ۱- بیان ژن *BCL-2* بر اساس Ct در سلول PC-3

### بحث

یکی از عوامل مرگ و میر در میان مردان و زنان سرطان است که زمانی ایجاد می‌شود که سلول‌ها خارج از چهارچوب طبیعی رشد می‌کنند و توده‌ای به نام تومور را ایجاد می‌کنند. در حالت عادی سلول‌های بدن طی روند کنترل شده‌ای تکثیر می‌شوند ولی وقتی رشد سلول‌ها در بعضی از اعضا و یا بافت‌ها، از کنترل خارج می‌شود سرطان ایجاد می‌شود (۱۲). سرطان شامل گروهی از بیماری‌هاست که ویژگی اصلی آن‌ها رشد سلولی تنظیم نشده و انتشار سلول‌ها به سایر نقاط بدن است (۱۳). اثرات سم انتروتوکسین H باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *BCL-2*, *BAX* و *SURVIVIN* در رده سلولی PC-3 سرطان پروستات انجام گرفت. به صورتی که سم به پلاسמיד وارد شده، پلاسמיד نو ترکیب به درون سویه باکتری وارد شد. پس از استخراج، پلاسמידهای نو ترکیب به سلول‌های PC-3 انتقال، RNA استخراج cDNA ساخته شد و *real time PCR* و *PCR* صورت گرفت و نتیجه به دست آمده نشان داد که *seh* بر بیان ژن‌های آپوپتوزی تاثیر دارد به صورتی که باعث افزایش بیان در ژن‌های القا کننده آپوپتوز باشد و از طرفی باعث کاهش بیان در ژن‌های *BCL-2* و *SURVIVIN* که باعث مهار آپوپتوز می‌شوند، شد.

والتر و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سموم باکتری برای درمان سرطان مفید هستند. ایشان تولید سلول‌های بیان شده با *CPE cDNA* را در درمان تومورهای *Claudine-3* و 4 بیش از حد بیان کردند و نشان دادند سلول‌های *MCF7* و *HCT116* با بیان بالای *Claudine-4* حساسیت قابل توجهی به سمیت *CPE* داشته و در نتیجه انتقال ژن *Opt CPE* موجب کاهش رشد تومور در موش‌های مورد آزمایش شد (۱۴). ما نیز در این مطالعه نشان دادیم که اثرات سم باکتری استاف بر بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های سرطان پروستات تاثیر دارد. نشان دادیم که *seh* باعث افزایش بیان در ژن *BAX* شده و القای آپوپتوز را به همراه دارد از طرفی بیان را در ژن‌های *BCL-2* و *SURVIVIN* کاهش داده و از کاهش آپوپتوز جلوگیری می‌کند.

رومانو و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که بیشتر سلول‌های سرطان پروستات بیش از حد *Claudine-3,4* را بیان می‌کنند و این سلول‌ها هم به گیرنده سطحی برای انتروتوکسین یا *CPE* حساس اند. یک پروتوکسین علیه سمیت *CPE* ساختند که سلول‌های سرطانی حاوی *PSA* را لیز کرده و از بین برد (۱۵). در این تحقیق نیز به جلوگیری از بیان بیش از حد ژن‌های *BCL-2* و *SURVIVIN* که ژن‌های آنتی آپوپتوتیکی هستند، در سرطان پروستات پرداختیم. نشان دادیم که با اثر سم *seh* بر بیان این ژن‌ها می‌توان از بیان بیش از حد آن‌ها جلوگیری و فعالیت آپوپتوزی را افزایش داد.

عقیلی و همکاران در سال ۲۰۱۶ از انتروتوکسین A در سلول‌های لنفوم موش استفاده کردند. مشاهده کردند که باعث القای آپوپتوز و فعال شدن لنفوسیت‌ها در این سلول‌های سرطانی شد (۱۶). در این تحقیق ما از اثرات انتروتوکسین H بر آپوپتوز در رده سلولی

PC-3 در سرطان پروستات استفاده کردیم و اثرات چشم‌گیر آن را در کنترل آپوپتوز در ژن‌های *BAX*, *BCL-2* و *SURVIVIN* مشاهده کردیم.

### نتیجه گیری

در این تحقیق حاضر و طبق نتایج به دست آمده از real time PCR، مشخص شد که سموم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به خصوص سم *seh* که مورد مطالعه در این تحقیق بود، اثرات مفیدی بر القای آپوپتوز از طریق کاهش یا افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی همانند سرطان پروستات دارد و می‌توان با استفاده از آن‌ها راه حل‌های مفیدی برای درمان سرطان پروستات ارائه داد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، بخصوص آقای علیرضا نوید که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند.

### References:

1. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*.501(7467):328-37.2013
2. Fisher, R., Puztai, L., & Swanton, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *British journal of cancer*, 2013; 108(3), 479.
3. Siegel, R., DeSantis, C., & Jemal, A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2014; 64(2), 104-117.
4. Mokhtari Mohammadjavad, Shokarzar Mohammadali, Motamed Nasreen, Akbarzadeh Azim, Momani Moghaddam Majeed, Kamyab Ahmadreza, ... & Amanzadeh Amir. How does CD82 appear in PC-3 prostate cancer caused by silibinin.2010.13 (3) 41-52
5. Maia, M. C., & Hansen, A. R. A comprehensive review of immunotherapies in prostate cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2017; 113, 292-303.
6. Ertas, N., Gonulalan, Z., Yildirim, Y., & Kum, E. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *International journal of food microbiology*, 2010; 142(1-2), 74-77.
7. ADWAN, G. M., Abu-Shanab, B., & Adwan, K. Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw milk in the North of Palestine. *Turkish Journal of Biology*, 2006; 29(4), 229-232.
8. Sakai, F., Ihara, H., Aoyama, K., Igarashi, H., Yanahira, S., Ohkubo, T., ... & Kozaki, S. Characteristics of Enterotoxin H-Producing Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Cases and Properties of the Enterotoxin Productivity. *Journal of food protection*, 2008; 71(9), 1855-1860.
9. Růžičková, V., Karpíšková, R., Pantůček, R., Pospíšilová, M., Černíková, P., & Doškař, J. Genotype analysis of enterotoxin H-positive Staphylococcus aureus strains isolated from food

- samples in the Czech Republic. *International journal of food microbiology*, 2008; 121(1), 60-65.
10. Gall LT, Cornblat MW. Breast Cancer Survivors Give Voice: A Qualitive Analysisof Spiritual Factors in Long-Term Adjustment. *Psycho-Oncology* 2002; 11(6): 524-35.
  11. Hu J, Shen W, Qu Q, Fei X, Miao Y, Huang X, Liu J, Wu Y, Li B. NES1/KLK10 and hNIS gene therapy enhanced iodine-131 internal radiation in PC3 proliferation inhibition. *Front Med.* 2019;13(6):646-657.Fddf
  12. Pecorino, L. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics, 3 ed New York: Oxford university press.* 2012: 52-62.
  13. Walther W, Petkov S, Kuvardina ON, Aumann J, Koblet D, et al. Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of Claudine-3 and -4-overexpressing tumors. *Gene There.* 2012; 19(5): 494-503.
  14. Romano V, Shard TC, Waltzer WC, Gabi TG. A Claudine 3 and Claudine 4-targeted Clostridium perfringens protoxin is selectively cytotoxic to PSA-producing prostate cancer cells. *Cancer Lott.* 2014; 351(2): 260-264.
  15. Agheli R, Emkanian B, Halabian R, Fallah J, Imani AA. Recombinant Staphylococcal Enterotoxin Type A Stimulate Anititumoral Cytokines. 2016; 16: 125-132.

## جداسازی استرپتومایسس های خاکزی تولید کننده مواد ضد میکروبی به کنترل اشرشیا کلای مقاوم به جنتامایسین از جنگل بناب و پارک ملی بختگان

محمد مسعود اسکندری<sup>۱\*</sup>، مهدی دهقانی زاهدانی<sup>۲</sup>، بهین امیدی<sup>۳</sup>، حسین سازگار<sup>۴</sup>، فاطمه نصیرطوسی<sup>۵</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.
۳. استادیار گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۴. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۵. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی است. /شرشیاکلی ارگانیزی است که در اکثر بیماران باعث عفونت ادراری می‌شود. مقاومت دارویی زیادی گزارش شده است، متأسفانه مقاومت دارویی به جنتامایسین در حال افزایش است. محققان به دنبال جایگزینی برای داروهای رایج هستند. یکی از جایگزین‌های مناسب متابولیت‌های تولید شده از استرپتومایسس هستند. /استرپتومایسس‌ها باکتری‌های رشته‌ای هستند که از خاک و آب جدا می‌شوند. برخی از گونه‌های آن‌ها می‌توانند آنتی‌بیوتیک‌ها یا متابولیت‌های دیگری ترشح کنند که باعث از بین رفتن یا مهار رشد سایر عوامل بیماری‌زا می‌شود. در این مطالعه ما در حال غربالگری /استرپتومایسس‌هایی بودیم که دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری /شرشیاکلی مقاوم به جنتامایسین از دریاچه بختگان بودند.

**مواد و روش‌ها:** برای جداسازی /استرپتومایسس، نمونه‌ها به روش رقت‌سازی و کشت در نشاسته کازئین آگار مورد بررسی قرار گرفتند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز انکوبه شدند. کلنی‌های گچی و پودری شکل شناسایی شدند. برای جداسازی و خالص سازی باکتری و متابولیت تولید شده، باکتری‌های جدا شده در محیط ISP2 در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۷ روز در انکوباتور شیکر دار کشت داده شدند. سپس سانتریفیوژ شده و به همان حجم، اتیل استات اضافه شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت انکوبه شد. سپس مایع به قیف جداکننده منتقل شد. فاز رویی به دستگاه تقطیر منتقل شد. این مایع برای آزمایشات ضد میکروبی استفاده شد. مقاومت به جنتامایسین و سایر آنتی‌بیوتیک‌های رایج از ۵۰ بیمار منتخب مورد بررسی قرار گرفت. سپس متابولیت‌های جدا شده از استرپتومایسس به روش دیسک دیفیوژن بر روی این باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، /استرپتومایسس‌ها توسط srRNA۱۶ شناسایی شدند.

**یافته‌ها:** ۱۷ /استرپتومایسس از دریاچه بختگان جدا شد. یکی از آن‌ها اثر ضد میکروبی نشان داده است. قطر هاله بدون رشد  $19 \pm 1.24$  بود، نتایج حاصل از srRNA۱۶ نشان می‌دهد که این باکتری ۹۹/۹٪ شبیه به *Streptomyces Streptomyces sp* است. سویه K402۱۱.

**بحث و نتیجه گیری:** /استرپتومایسس‌ها توانایی بالایی در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی را دارند. با جداسازی و خالص سازی این متابولیت‌ها می‌توان از آن‌ها به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای عوامل رایج استفاده کرد.  
**واژگان کلیدی:** /استرپتومایسس، اکتینومیست، دریاچه بختگان، آنتی‌بیوتیک، /شرشیاکلی، مقاومت به جنتامایسین



## Isolation of soil *Streptomyces* with antimicrobial effect on Gentamicin resistance *Escherichia coli*, from Bonab forest and Bakhtegan Nation Park

Mohamad Masoud Eskandari<sup>\*1</sup>, Mehdi Dehghani Zahedani<sup>2</sup>, Behin Omid<sup>3</sup>, Hosein Sazgar<sup>4</sup>, Fatemeh Nasirtousi<sup>5</sup>

1. PhD student in Microbial Biotechnology, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Assistance professor of Plant protection Department, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.
3. Assistance professor of Biology Department, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Assistance professor of Biology Department, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
5. M. Sc student in Genetics, Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

### Abstract

**Background:** Urinary tract infections are one of the most clinical bacterial infections. *Escherichia coli* is the organism that causes UTIs in most patients. Many drugs resistance has been reported, unfortunately, drug gentamicin resistance increasing. "Researchers are looking for alternative to replace common drug. One of alternatives are the metabolites produced from *Streptomyces*. *Streptomyces* are filamentous bacteria that isolation from soil and water. Some species of them can secretion antibiotics or other metabolites that kill or inhibit the growth of other microorganism. In this study we were screening for *Streptomyces* that had antimicrobial effect on Gentamycin resistance *E. coli*, from Bakhtegan Lake.

**Materials and Methods:** For isolation of *Streptomyces* samples were tested by serial dilution method and culture in starch casein agar then incubated in 28°C for 7 days. Gypsum and powder colonies were detected. For metabolite produced isolated bacteria were cultured in ISP2 broth in 28 °C and 150 rpm for 7 days. Then centrifuged and the same volume, ethyl acetate was added and incubated in 28°C for 5h. Then liquid transferred to Separator funnel. The supernatant phase was transferred to distiller. This liquid used for antimicrobial tests. Resistance to Gentamicin and other common antibiotics was studied from 50 selected patients. Then, the isolated metabolites from *Streptomyces* were examined by disc diffusion method on these bacteria. Finally, *streptomyces* were identified by 16srRNA.

**Results:** 17 *Streptomyces* were isolated from Bakhtegan Lake. One of them has shown antimicrobial effect. The diameter of the non-growth zone was 19±1.24, Results from 16srRNA indicate bacteria is 99.9% similar to *Streptomyces Streptomyces sp. strain 11K402*.

**Conclusion:** *Streptomyces* have high ability to produce antimicrobial metabolites. By purification and formulation these metabolites, they can be used of them as an alternative to common antibiotics or antiagents.

**Keywords:** *Streptomyces*, *Actinomycete*, Bakhtegan Lake, Antibiotic, *Escherichia coli*, Gentamicin resistance

### مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها مواد شیمیایی هستند که در باکتری و موجود زنده تولید می‌شوند و اغلب روی خود میکروارگانیسم تولید کننده اثر ندارند. آنتی‌بیوتیک‌ها، فرآورده متابولیسمی میکروارگانیسم‌ها هستند. آنتی‌بیوتیک‌ها باید برای سلول‌های بدن، بدون سمیت و یا دارای سمیت کم و برعکس برای میکروارگانیسم‌های مهاجم و انگلی کاملاً سمی باشند. با توجه به مقاوم شدن میکروارگانیسم‌های سمی و انگلی که در اثر مصرف بی رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک اتفاق می‌افتد و یا ممکن است در اثر جهش ژنتیکی و مقاوم شدن میکروارگانیسم مهاجم به داروهای پیشین باشد، تولید و شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های جدید و اثربخش، امری اجتناب ناپذیر است (۱). جامعه میکروبی و خانواده اکتینومایست‌ها که در حال حاضر بیشترین تولید آنتی‌بیوتیک را دارند و با توجه به فراوانی و گستردگی که دارند می‌توانند جایگزین آنتی‌بیوتیک‌هایی شوند که سویه‌های باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به آن‌ها مقاوم شده‌اند (۲).

از میان اکتینومایست‌ها، استرپتومایس‌ها گسترش فراوانی در خاک دارند و گونه‌های بسیار اندکی از آن‌ها برای پستانداران بیماری‌زا هستند و بقیه فیتوپاتوزن می‌باشند. استرپتومایس‌ها در بسیاری از زیستگاه‌های طبیعی پراکنده‌اند ولی جایگاه اصلی آن‌ها خاک

است. این میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی در تجزیه پلیمرهای آلی ایفا می‌کنند. دارای مقاومت بالایی به فلزات سنگین نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های موجود در خاک که اثر سمی دارند می‌باشند. همچنین دارای حساسیت بیشتری به لیزوزیم هستند (۳). این میکروارگانیسم‌ها در چرخه تبدیل کربن به ماکرومولکول‌های پلیمری نیز نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند و در واقع سازگاری فیزیولوژیک و مورفولوژیک پیچیده‌ای در خاک ایجاد می‌نمایند، بنابراین ممکن است نسبت به سایر گروه‌های میکروبی کمتر تحت تاثیر عوامل نامساعد محیطی قرار گیرند و این مقوله تولید از امتیازات تولید انبوه و تجاری این گروه از باکتری‌ها می‌باشد. از محدودیت‌های تولید انبوه/استرپتومایسس‌ها می‌توان به دوره رشد کند آن‌ها و وجود طیف محدود مواد غذایی برای این باکتری‌ها اشاره نمود (۴).

یکی از مکانیسم‌های تاثیر باکتری‌های/استرپتومایسس تولید آنتی‌بیوتیک می‌باشد. از جمله این موارد می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، تتراسایکلین، سیکلوهگزامید و سایر متابولیت‌های ثانویه اشاره کرد. تولید متابولیت ثانویه در تمایز سلولی/استرپتومایسس‌ها به وسیله ترکیبات یا فاکتورهای شیمیایی باوزن مولکولی پایین، خودتنظیم می‌باشد و در پاسخ به تحریکات محیط آغاز و کنترل می‌شود (۵).

در سال‌های اخیر وجود سویه‌های مقاوم به/شرشیاکلای موجب نگرانی بسیاری از محافل بهداشتی و درمانی گردیده و نیاز به تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید به شدت حس می‌شود به ویژه زمانی که بدانیم بسیاری از این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های قوی همانند جنتامایسین نیز مقاوم‌اند. براساس مطالعات آراین پور (۱۳۸۶)/شرشیاکلای فلور طبیعی روده بوده و بخش اعظم باکتری‌های هوای روده را تشکیل می‌دهد. اکثر کلی باسیل‌ها، تا وقتی در روده وجود دارند، بیماری‌زا نیستند ولی اگر در قسمت‌های دیگر بدن از قبیل دستگاه ادراری-تناسلی، آپاندیس، صفاق، کیسه صفرا، اطراف مقعد، زخم‌ها، دستگاه تنفسی، منژ، بافت ملتحمه چشم، اندوکارد، رحم و واژن وارد شوند می‌توانند به تنهایی یا همراه با سایر باکتری‌ها عفونت ایجاد کنند. امکان ورود به خون و ایجاد سپتی سمی در شرایطی که دفاع بدن دستخوش اختلال باشد وجود دارد. برخی از کلی‌باسیل‌ها نیز می‌توانند در روده به عنوان پاتوژن عمل نمایند. محسنی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی فعالیت ضد قارچی اکتینومایست‌های جدا شده از رسوبات بستر دریای مازندران تعداد ۲۰ اکتینومایست جداسازی و شناسایی کردند. در غربالگری اولیه ۷ جدایه به عنوان اکتینومایست فعال شناسایی شد. نتایج مرحله دوم غربالگری نشان داد که ایزوله‌های فعال جدا شده، فعالیت ضد قارچی مناسبی علیه گونه‌های کاندیدا و اسپریژیلوس داشتند. نتایج نشان داد که جدایه‌های MN1، MN2 و MN3 فعالیت ضدقارچی بیشتری نسبت به بقیه جدایه‌های فعال داشتند. در مطالعه دیگری که توسط کیخا و همکاران در سال ۱۳۹۱ انجام گرفت به بررسی اثر ضد قارچی اکتینومایست‌های خاکری علیه میکروسپوروم جیپسئوم در شرایط آزمایشگاهی پرداخته شد؛ ۱۰۰ جدایه اکتینومایست خاکری از خاک‌های مناطق مختلف شهرستان کرمان جداسازی گردید، سه اکتینومایست جدا شده بیشترین اثر آنتاگونیستی را علیه میکروسپوروم جیپسئوم در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند و بقیه جدایه‌ها فاقد اثر ضد قارچی بودند.

محیط‌های طبیعی همواره الهام بخش پژوهشگران حوزه زیست‌شناسی در جهت کشف و استفاده از چنانداران تک سلولی و پر سلولی بوده است. جنگل بناب در شمال دریاچه بختگان در استان فارس واقع شده است. جنگل‌های بلوط زاگرس در این منطقه به علت افزایش درجه حرارت به جنگل‌های بنه و بادام کوهی تبدیل می‌شوند. از شمال دریاچه طشک تا حوالی ارسنجان بخشی از انبوه‌ترین جنگل‌های بنه استان و کشور دیده می‌شود. منطقه جنگلی بناب و دریاچه بختگان به علت شرایط اکولوژیک و زیست بوم مناسب و کمتر شناخته شده‌ای که دارد مکانی مناسب و قابل مطالعه جهت پژوهش و نمونه برداری و شناسایی انواع گونه‌های باکتریایی به ویژه اکتینومایست هاست (۶).

در این تحقیق سویه‌های/استرپتومایسس از جنگل بناب برداشت گردید و با روش PCR (واکنش زنجیره ای پلیمرز) گونه‌های مورد نظر شناسایی گردید. امکان سنجی توانایی مهارکنندگی یا کشندگی سویه‌های استخراج شده/استرپتومایسس علیه/شرشیا کلی مقاوم به جنتامایسین مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها**

### نمونه برداری

عمق نمونه برداری اکتینومایست ها از خاک از عمق ده سانتی متری سطح خاک انجام گرفت. نمونه‌ها از طریق قاشق استریل جمع آوری شدند. با توجه به مقاومت نسبی اکتینومایست‌ها نسبت به شرایط محیط در مقایسه با سایر باکتری‌ها، نمونه‌های خاک به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت هوای آزاد و دمای اتاق قرار گرفت. این عمل برای کاهش جمعیت باکتری‌های ناخواسته مثل باسیل‌های گرم منفی که تولید کلونی‌های موکوئیدی و پخش شونده می‌کنند امری ضروری بود.



شکل ۱- نمونه برداری از خاک

### تهیه سری رقت از نمونه خاکی

جهت تهیه رقت‌های متوالی از نمونه‌های خاکی ۱ گرم از نمونه را که از صافی عبور داده شده و اجسام با قطر بزرگتر از ۱ میلی متر آن جدا شده را در ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی سوسپانسیون گردید. سپس از سوسپانسیون رقت‌های متوالی تا ۴ سری در ۱۰ سی سی آب دو بار تقطیر تهیه گردید. جهت تهیه رقت، ۱ سی سی از سوسپانسیون اول به لوله دوم ریخته شد و لوله در دستگاه وورتکس قرار داده شد تا به خوبی و به طور یکنواخت حل شود. ۱ سی سی از سوسپانسیون دوم را به لوله سوم و ۱ سی سی از سوسپانسیون سوم به لوله‌ی چهارم انتقال داده شد. در نهایت مقدار ۱ سی سی محلول از لوله‌ها برداشته شد و در محیط کشت‌ها به روش خطی و چمنی، کشت داده شد.

### انتقال نمونه‌های خاکی به محیط کشت جهت جداسازی اکتینومایست‌ها

در این مرحله از نمونه‌های خاکی که ۷ روز در معرض هوا بودند بی میزان کافی رقت تهیه شد و از سوسپانسیون‌های به دست آمده هرکدام میزان ۱ میلی لیتر به محیط‌های کشت انتقال داده شد سپس نمونه‌های مورد نظر در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز نگه داری شدند. پس از این مرحله باکتری‌ها بر اساس خصوصیات مرفولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند. محیط‌های کشت مورد استفاده در این تحقیق شامل پنج محیط کشت جنسن، محیط کشت استرپتومایسس اکتیویتی، محیط کشت تخمیری کازبین، محیط کشت گلیسرول کازبین آگار و محیط کشت استرپتومایسس اکتیویتی کازبین دار بودند.

بررسی اولیه خاصیت ضد میکروبی/استریتومایسس های خالص سازی شده

در این مرحله ابتدا باکتری های/استریتومایسس خالص سازی شده به طریق عمودی در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در مرحله بعد باکتری نمونه را با زاویه ۹۰ درجه نسبت به استریتومایسس کشت داده شد. در شیوه‌ای دیگر موسوم به کشت باکتری خالص سازی شده با پاتوزن/اکتینومایسس خالص سازی شده در پلیت کشت داده شد و پس از آن باکتری پاتوزن را به شیوه چمنی کشت داده شد. در نهایت اثر ضد میکروبی سوبه/استریتومایسس از رشد یا عدم رشد باکتری نمونه با بررسی هاله عدم رشد در اطراف آن مشخص گردید (شکل ۲).



شکل ۲. هاله عدم رشد باکتری پاتوزن در حضور اکتینومایسس

جداسازی متابولیت‌های ثانویه

به منظور جداسازی متابولیت‌های ثانویه‌ای که خاصیت ضد میکروبی دارند، ابتدا خالص سازی باکتری انجام گرفت سپس به محیط کشت انتقال یافت. پس از بررسی اولیه مثبت بودن خاصیت ضد میکروبی متابولیت‌های ثانویه جداسازی گردید. مراحل جدا سازی متابولیت‌های ثانویه در این تحقیق به شرح زیر انجام شد:

۱. تهیه کشت خالص از/استریتومایسس
  ۲. بررسی اولیه خاصیت ضد میکروبی (به وسیله کشت عمودی در محیط مولد هینتون یا قطر هاله عدم رشد در پلیت).
  ۳. انتقال باکتری خالص سازی شده به محیط کشت مایع (محیط مایع تخمیری نشاسته و محیط مایع ISP2)
  ۴. انتقال ۴۰ سی سی سوسپانسیون باکتری خالص و محیط کشت به ارلن شیشه‌ای استریل با حجم ۵۰ سی سی
  ۵. انکوبه کردن نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و سانتریفیوژ در دور ۱۸۰ rpm به مدت ۷-۱۰ روز
- به طور کلی هدف از انجام این مرحله از آزمایش‌ها ایجاد تنش در باکتری و ترشح حداکثری متابولیت‌های ثانویه بود. پس از انجام مراحل فوق و جهت جداسازی متابولیت‌های ترشح شده پس از گذشت مدت زمان تعیین شده نمونه‌ها را از انکوباتور شیکردار بیرون آورده شد و جهت جداسازی متابولیت ثانویه به ترتیب و به صورت زیر عمل گردید:
۱. شیک کردن نمونه‌های خالص به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور ۱۸۰ rpm در انکوباتور شیکردار
  ۲. انتقال نمونه‌ها به ارلن با حجم ۱۰۰ سی سی استریل شده و پنبه گذاری
  ۳. اضافه کردن اتیل استات به میزان و حجم برابر با نمونه انتقال داده شده (۳۵ تا ۴۰ سی سی به هر لوله)
  ۴. شیک کردن نمونه‌ها که اتیل استات به آن‌ها اضافه شده است در دستگاه شیکر به مدت ۲ ساعت
  ۵. انتقال جداگانه هر نمونه جهت تقطیر به دستگاه تقطیر جهت جداسازی متابولیت‌های ترشح شده هر نمونه (شکل ۳).
  ۶. جداسازی مایع سطحی حاصل از تقطیر
  ۷. سانتریفیوژ هر نمونه به مدت ۲ ساعت با دور ۱۲۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰
  ۸. جدا کردن مایع سطحی حاصل از سانتریفیوژ یا همان متابولیت ثانویه مدنظر در تحقیق



شکل ۳. استریپتوما ایسس همراه با متابولیت ترشح شده

### تست آنتی بیوگرام یا اثر بخشی متابولیت‌های استخراج شده

پس از ساخت محیط کشت مولر هینتون آگار و تهیه سوسپانسیون که حاوی باکتری بیماری‌زای مورد نظر بود از محیط کشت مخصوص باکتری اشرشیا کلای برداشته شد و مطابق با استاندارد و کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. میزان کدورت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. سپس پلیت‌ها مدت ۳ تا ۵ دقیقه (حداکثر ۱۵ دقیقه) در محل مناسبی قرار گرفت تا مایع اضافی آن جذب شده و به درون آگار نفوذ کند.

در گام بعد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی توسط آنس ظرفی که قبلاً در الکل گرفته و بعد با شعله استریل و سرد شده، برداشته شد و در سطح پلیت قرار داده شد. در این ارتباط می‌بایست به کمک آنس، دیسک‌ها را مختصری فشار داد تا کاملاً با سطح محیط کشت تماس یابند این مرحله شامل انتقال دیسک‌های بلانک که به مدت نیم ساعت در محلول جدا شده از باکتری یا همان متابولیت ثانویه قرار داده شده است و میزان حساسیت آن قرار است مورد بررسی قرار گیرد، می‌شود جهت انتقال هر دیسک، آنس مجدداً استریل شد. در گام بعدی پلیت‌ها را در حالت معکوس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور و دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌ها در زیر نور بررسی شده و قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری گردید. در خوانش قطر هاله عدم رشد در پلیت‌ها کم‌ترین فاصله کلنی تا دیسک در نظر گرفته شده و ثبت گردید.

### آنالیز DNA و توالی یابی

جهت شناسایی باکتری و تعیین سویه‌های مورد نظر/استریپتوما ایسس، بررسی توالی اختصاصی srRNA<sub>۱۶</sub> انجام شد. برای این کار DNA نمونه‌های مورد نظر استخراج گردید و نتایج به دست آمده پس از طراحی پرایمر ثبت گردیده و قطعات حاصل از PCR جهت توالی یابی به شرکت Learn Genetics فرستاده شد.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

چرخه PCR در توای یابی/استریتوما یسیس ها با دور ۳۲ دور و تنظیم زمان و دما در ترموسایکلر به صورت زیر انجام گرفت:

Stage	Temperature	Time
Pre denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	1 min
Annealing	54°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Final Extension	72°C	5 min

### نتایج

از مجموع ۱۵ نمونه خاک تعداد ۷۸ سویه شناسایی گردیدند (شکل ۴). در بین تمام ۷۸ سویه جدا شده از خاک پس از قرار دادن آن‌ها در شیکر انکوباتور تعداد زیادی از آن‌ها متابولیت ترشح کردند. پس از جداسازی متابولیت‌های ترشح شده و انجام تست آنتی‌بیوگرام ۲۵ عدد از باکتری‌ها متابولیت ترشح کردند که ۱۸ عدد از متابولیت‌های جدا شده حداقل بر روی یکی از پنج سویه پاتوژن اشرشیا کلای که همگی مقاوم به جنتامایسین بودند اما نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت متفاوتی داشتند، دارای تاثیر مثبت بودند (جدول ۱).

جدول ۱. اثر بخشی و قطر هاله عدم رشد هر یک از متابولیت‌های جدا شده

۵	۴	۳	۲	۱	شماره پاتوژن	
منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	۷۳	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	مثبت ۱۱ میلی‌متر	منفی	۶۳	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	منفی	مثبت ۱۲ میلی‌متر	مثبت ۱۱ میلی‌متر	منفی	۵۱	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	منفی	مثبت ۹ میلی‌متر	منفی	منفی	۳۲	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	۲	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	مثبت ۱۰ میلی‌متر	منفی	منفی	مثبت ۱۱ میلی‌متر	۵۶	شماره باکتری و قطر هاله
مثبت ۱۲ میلی‌متر	منفی	منفی	مثبت ۱۱ میلی‌متر	مثبت ۱۳ میلی‌متر	۷۲	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	منفی	مثبت ۱۲ میلی‌متر	مثبت ۱۲ میلی‌متر	منفی	۸۵	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	منفی	مثبت ۱۲ میلی‌متر	مثبت ۱۲ میلی‌متر	مثبت ۱۱ میلی‌متر	۷۴	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	مثبت ۱۰ میلی‌متر	مثبت ۱۴ میلی‌متر	۱۰	شماره باکتری و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	مثبت ۸ میلی‌متر	منفی	۵۰	شماره باکتری و قطر هاله

دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

منفی	منفی	مثبت ۱۰ میلی متر	منفی	منفی	۸۰	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	منفی	مثبت ۹ میلی متر	منفی	منفی	۱	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت ۸ میلی متر	۲۶	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	مثبت ۱۰ میلی متر	مثبت ۸ میلی متر	مثبت ۱۳ میلی متر	مثبت ۱۰ میلی متر	۵	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	۴	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	مثبت ۹ میلی متر	مثبت ۱۱ میلی متر	۵۵	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	مثبت ۸ میلی متر	منفی	منفی	منفی	۵۹	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	منفی	مثبت ۱۱ میلی متر	منفی	منفی	۶	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
مثبت ۹ میلی متر	منفی	منفی	مثبت ۷ میلی متر	مثبت ۱۱ میلی متر	۷۷	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
مثبت ۸ میلی متر	منفی	منفی	منفی	مثبت ۱۱ میلی متر	۵۲	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	۳۳	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	۱۳	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله
منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	۲۵	شماره باکتری و متابولیت و قطر هاله

در نهایت از ۷۸ سویه ۲۱ سویه متابولیت ثانویه تولید نموده و تعداد ۱۷ عدد از متابولیت‌های جدا شده از این باکتری‌ها بر سویه‌های مختلف باکتری عفونت‌زای /شرشیا کلای اثر بخش بود. در میان سویه‌های بیماری‌زا همان طور که در جدول ۱ نیز مشخص است، سویه شماره ۴ بر تمامی داروها مقاوم بوده و سویه بیماری‌زای شماره ۵ تنها به یک آنتی‌بیوتیک حساسیت نشان داد که نشان دهنده مقاومت بسیار بالای این پاتوژن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج است. در میان /استرپتومایسس های خاکی جدا شده و بررسی اثر بخشی متابولیت‌های آن‌ها علیه پنج سویه متفاوت باکتری /شرشیا کلای طبق جدول ۱ شاهد آن بودیم که تعدادی از /استرپتومایسس ها و متابولیت جدا شده از آن‌ها بر روی باکتری پاتوژن بسیار اثربخش و مفید بوده‌اند. با توجه به داده‌های حاصل از پژوهش در جدول ۱ این باکتری‌ها با شماره‌های ۵۲، ۷۷، ۵، ۷۴ و ۷۲ مشخص هستند که به همراه باکتری شماره ۵۶ و جهت شناسایی تعیین توالی شدند. نتایج توالی یابی در جدول ۴-۴ آورده شده است. در میان باکتری‌های شناسایی شده طبق داده‌های جدول ۴-۴ می‌توان از *Streptomyces viridocyaneus*، *Streptomyces aurantiacus*، *Streptomyces rectiviolaceus* و *Streptomyces longisporoflavus* نام برد.

### مقایسه اثر بخشی متابولیت‌های جدا شده با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با نرم افزار SPSS

با توجه به اینکه تست‌ها با سه بار تکرار انجام شد و قطر هاله به دست آمده حاصل از متابولیت جدا شده میانگینی از سه بار انجام تست است، تمام متابولیت‌هایی که اثر بخشی داشته‌اند با آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش شده تک به تک مقایسه شده‌اند که در صورت معنادار بودن در مقایسه نرم افزار SPSS به عنوان آنتی‌بیوتیک موثر در جدول ۲ آورده شده‌اند. به دلیل گستردگی نتایج به دست آمده در نرم افزار SPSS از ذکر نتایج مقایسه‌ای بین هر متابولیت و آنتی‌بیوتیک خودداری شد و نتایج به طور خلاصه در جدول زیر که حاصل قرار داده شد. در جدول زیر قطر هاله‌های متابولیت جدا شده موثر تفاوت معناداری با قطر هاله‌های آنتی‌بیوتیک‌های تست شده نداشته‌اند و اثربخش بوده‌اند آورده شده است. همچنین متابولیت‌های کم اثر و دارای تفاوت معنادار نیز مشخص شده است.

جدول ۲: مقایسه اثر بخشی متابولیت‌های جدا شده با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با نرم افزار SPSS

شماره سویه اشرشیا کلای بیماری زا	شماره متابولیت جدا شده موثر	متابولیت کم اثر
سویه ۱	۷۲ - ۷۴ - ۱۰ - ۵۵ - ۷۷ - ۵۲	۱۰ - ۲۶
سویه ۲	۵ - ۷۴ - ۸۵ - ۷۲ - ۶۳ - ۵۱	۱۰ - ۵۰ - ۵۵ - ۷۷
سویه ۳	۵۱ - ۸۵ - ۷۴ - ۸۰ - ۶	۵ - ۱ - ۳۲
سویه ۴	۵۹ - ۵	
سویه ۵	۵۲ - ۷۷ - ۷۲	

نتایج به دست آمده حاصل انجام تست آنتی‌بیوگرام و مقایسه این نتایج با آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف در بازار حاکی از این است که متابولیت‌های جدا شده بسیار موثر بوده تا جایی که سویه بیماری‌زای شماره ۴ که به تمام پنج آنتی‌بیوتیک تست شده مقاوم بود به دو متابولیت جدا شده (متابولیت‌های شماره ۵ و ۵۹) حساسیت نشان داد. همچنین سه متابولیت جدا شده بر روی سویه شماره ۵، پنج متابولیت بر روی سویه ۳، شش متابولیت بر روی سویه ۱ و شش متابولیت بر روی سویه شماره ۲ موثر بوده‌اند. همچنین متابولیت‌های شماره ۷۲، ۵، ۷۷، ۵۱، ۵۹ و ۸۵ از جمله موثرترین متابولیت‌های جدا شده بودند.

### بحث

امروزه بی‌شک مصرف بی‌رویه و خودسرانه داروها و در پی آن مقاوم شدن باکتری‌ها به این داروها به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها از مهم‌ترین مشکلات جوامع انسانی در بهداشت و سلامت می‌باشد. بررسی‌های اخیر حاکی از آن است که سیستم‌های ژنتیکی در سلول‌های زنده میکروارگانیسم‌ها قادر به برنامه ریزی در جهت مقابله با عوامل تهدید کننده حیات سلول هستند. بر این اساس گونه‌های مقاوم شناخته شده هر روز در حال ایجاد و گسترش‌اند این موضوع می‌تواند بشر را در آستانه ورود به یک فاجعه پزشکی قرار دارد و چه بسا یک عفونت کوچک به دلیل نبودن داروهای موثر تبدیل به بیماری مرگباری شود. از سوی دیگر هنوز تعدادی از بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و انگلی وجود دارد که داروی موثر علیه آن‌ها شناخته نشده است. از این رو حتی در آغاز قرن ۲۱ با آن که اصل طلایی آنتی‌بیوتیک‌ها سپری شده است اما هنوز متابولیسم ثانویه میکروبی زمینه مناسبی برای تحقیقات کاربردی به شمار می‌رود. در این میان کشف و توسعه عوامل ضد میکروبی جدید از این متابولیت‌های ثانویه جایگاه خود را حفظ کرده است. از این رو بین موجودات زنده میکروارگانیسم‌ها و دسته/ستری‌تومایسس‌ها از جهت اهمیتی که در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها دارند همواره مورد توجه بوده‌اند و برخی تولید آنتی‌بیوتیک به وسیله این میکروارگانیسم‌ها را مهم‌ترین ویژگی آن‌ها می‌دانند. در ایران نیز به دلیل عدم مدیریت مناسب و اطلاع رسانی کافی به افشار مختلف جامعه این مشکل فراگیر است. بیماری‌های عفونی و مقاوم شدن باکتری‌های پاتوژن به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی طبق مطالعات انجام شده در طول سال‌های گذشته رو به افزایش است. عفونت ادراری نیز که اغلب توسط باکتری‌های همزیست در دستگاه گوارش و روده از جمله باکتری/اشرشیا کلای ایجاد می‌شوند از جمله مشکلاتی است که به ویژه در زنان رو به افزایش است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بی اثر شدن آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار، باعث آسیب پذیری



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

بیشتر بدن و دستگاه ایمنی فرد در مقابل باکتری‌های پاتوژن می‌شود. از این رو اقدام برای یافتن داروی ضد میکروبی موثر امری بدیهی و اجتناب ناپذیر است.

در این میان جوامع میکروبی از بهترین و ارزان‌ترین منابع بیولوژیکی فعال هستند که همواره در دسترس هستند. در کمتر نقطه‌ای از طبیعت هست که حضور میکروارگانیسم‌ها گزارش نشده باشد. مکان‌هایی که بشر هنوز در آن‌ها پا نگذاشته از گودال‌های عمیق اقیانوس‌ها گرفته تا نقاط آتش‌فشانی، از خاک گرفته تا آب حتی صدها متر در اعماق یخ‌های قطبی، میکروارگانیسم‌ها در همه جا حضور دارند. این موجودات برای بقا و به طور طبیعی از خود ترکیبات شیمیایی مختلف و آنتاگونیستی ترشح می‌کنند که این متابولیت‌ها همواره منبعی مناسب جهت بررسی و استفاده به شمار می‌آیند. وجود این میکروارگانیسم‌ها هم از حیث اکولوژیکی و هم اقتصادی بسیار مهم و با اهمیت است.

تحقیقات نشان داده که بیش از ۷۰٪ آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط خانواده/کتینوماایست‌هاست. امروزه از گونه‌های/کتینوماایست به ویژه جنس/ستریپتوماایس داروهای بسیاری جداسازی می‌گردد که مهم‌ترین آن‌ها استریپتوماایسین، نیستاتین، آمفوتریسین می‌باشند (۷).

بر اساس مطالعات صورت گرفته و همان‌طور که اشاره شد، باکتری‌های/ستریپتوماایس، بزرگ‌ترین گروه باکتری‌های تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه هستند. به ویژه مواد ضد باکتریایی و ضد قارچی که به آنتی‌بیوتیک معروفند (۸).

به منظور استحصال این مواد صدها مرکز و گروه تحقیقاتی، در گوشه و کنار دنیا بر روی این ارگانیسم‌ها تحقیق می‌کنند. از طرفی این مسئله زمانی اهمیت می‌یابد که بدانیم عوامل بیماری‌زا با گذشت زمان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس از خود مقاومت نشان می‌دهند و عملاً این مواد از حیطه درمان خارج می‌شوند. جهت مقابله به این مقاومت نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های جدید است که واقعاً می‌توان گفت تنها ابزار و منبع موجود برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های موثر، میکروارگانیسم‌ها به ویژه/ستریپتوماایس‌ها هستند (۹).

تنها تا سال ۱۹۸۴ حدود ۳۴۷۷ آنتی‌بیوتیک که توسط/ستریپتوماایس‌ها تولید شده‌اند گزارش شد. در سال ۱۳۸۳ نیز سلامی از ۲۳۰/ستریپتوماایس جدا شده از قسمت‌های مختلف ایران برای تعیین قدرت ضد میکروبی از روش تعیین حساسیت میکروبی و انتشار دیسک استفاده کرد که در نهایت ۱۶ سویه با فعالیت آنتی‌بیوتیکی مشخص شدند (۱۰).

به همین علت و با هدف جداسازی و غربال‌گری/ستریپتوماایس‌های فعال و اهمیت این باکتری‌ها در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه و انواع آنتی‌بیوتیک، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی/ستریپتوماایس‌های آبی و خاکری مستعد و فعال مولد این مواد که می‌توانند دارای خاصیت ضد میکروبی و اثرات آنتاگونیستی علیه باکتری اشرشیا کلای مقاوم به جنتامایسین که از عوامل مهم عفونت ادراری انسانی است باشند از آب دریاچه بختگان و خاک جنگل بناب صورت پذیرفت و مورد ارزیابی قرار گرفت.

در سال ۲۰۰۹ در هند از بین ۱۰۰/کتینوماایست مورد مطالعه جدا شده از محیط‌های نمکی ایزوله دارای فعالیت ضد درماتوفیتی بوده‌اند (۱۱). در بانکوک سال ۲۰۰۸ از مطالعه‌ی ۱۴۶ نمونه/کتینوماایست به سوی فعالیت ضد قارچی علیه قارچ پاتوژن داشتند. در مطالعه دیگری از ۱۱ نمونه خاک ۱۵/ستریپتوماایس متفاوت به دست آمد که ۱۲ سوی فعالیت ضد کاندیدیایی داشتند (۱۲). در سال ۱۳۹۳ نیز امیرمظفری و همکاران از ۵۱ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف آستارا ۹۶ ایزوله اکتینوماایست جداسازی کردند که در غربالگری اولیه ۹ ایزوله فعالیت ضد باکتریایی نشان دادند و از این تعداد ۳ ایزوله فعال بودند (۱۳). کفیل زاده و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳/کتینوماایست‌های سواحل جنگل‌های حرا در جنوب ایران را جداسازی نمودند. بیش از ۸۰٪ سویه‌های جداسازی شده دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر ۶ باکتری بیماری‌زای انسانی بودند (۱۴).

منادی و همکاران در سال ۲۰۱۴/کتینوماایست‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک را از نمونه‌های آب و رسوبات نواحی شمالی خلیج فارس جداسازی نمودند. در این مطالعه ۵۷ درصد از سویه‌های جداسازی شده فعالیت ضد باکتریایی در برابر حداقل یکی از باکتری‌های بررسی شده از خود نشان دادند اثر ضدباکتریایی عصاره/کتینوماایست‌ها در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از گرم مثبت گزارش گردید (۱۵).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

با توجه به پژوهش‌های پیشین و انجام شده برای جداسازی اکتینومایست‌ها از آب و خاک و اثرات آنتاگونیستی این جدایه‌ها، پژوهش حاضر نیز برای جداسازی و شناسایی اکتینومایست‌ها از خاک انجام گرفته است. تعداد استریپتومایس‌های به دست آمده از این پژوهش نسبت به اکثریت پژوهش‌های انجام شده بیشتر بوده که قابل قبول است. رطوبت خاک و شرایط آب هوایی مناسب تاثیر بسزایی در فراوانی جمعیت اکتینومایست‌ها دارد. در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۳ در چین نیز صورت پذیرفت، نتایج به دست آمده حاکی از آن است که اکتینومایست‌های آبی مقاوم به نمک سازگاری بسیار زیادی با یون‌های پتاسیم (K)، منیزیم (Mg) و سدیم (Na) دارند (۱۶).

بدیهی است خصوصیات خاک هر منطقه از اسیدیته خاک گرفته تا میزان شوری و دیگر موارد نیز بر فراوانی اکتینومایست‌ها تاثیر مستقیم دارد. طبق مطالعات انجام شده توسط Kutzner که در سال ۱۹۷۶ انجام گرفت، در خاک غنی از مواد عالی بیشترین تعداد استریپتومایس‌ها وجود دارد. فصل و اقلیم نیز تعداد استریپتومایس‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد، برای استریپتومایس مالاچیچیکوس پراکندگی ژئوگرافیکی ویژه‌ای ذکر گردیده که عمدتاً در مناطق اقلیمی گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می‌شود (۱۷). مطالعات بر روی خاک‌های مناطق مختلف نشان داد که مناطق بکر نظیر ارتفاعات و خاک‌های دست نخورده که در آن‌ها کشت و زرع نمی‌شود دارای پتانسیل جمعیتی بالا و درعین حال متنوعی از باکتری‌هاست که این موضوع با بررسی‌های اوسکای و همکاران در سال ۲۰۰۴ که در مناطق جنگلی و کشاورزی کشور ترکیه انجام شده مطابقت دارد. دامنه اسیدیته نمونه‌های خاک مورد آزمایش در این بررسی بین ۵ تا ۸ و در آب بین ۵ تا ۷ بود. استریپتومایس‌های جدا شده از خاک در کشت‌های خالص، محیط‌های pH خنثی تا کمی قلیایی را ترجیح می‌دهند. با این وجود تعداد کمی از استریپتومایس‌ها در خاک‌های اسیدی مشاهده شده‌اند. همچنین گزارشاتی از اکتینومایست‌های قلیا دوست و حساس به اسید وجود دارد، مانند مطالعه باسیلیو در سال ۲۰۰۲ که گونه‌های استریپتومایس و برخی اکتینومایست‌ها را از خاک‌های مادری اسپانیا جداسازی نمود (۱۸).

در سال ۱۳۹۱ نجفی پور و همکارانش با بررسی طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری پاتوژن اشرشیا کلای در بیمارستان فسا به این نتیجه رسیدند که مقاومت میکروبی به سرعت در حال افزایش است و لزوم به توجه بیشتر و عدم مصرف خودسرانه دارو امری ضروری است. در مطالعه و پژوهش انجام شده نیز تعداد ۹۷ جدایه اکتینومایست جداسازی شد و نمونه‌ها بر اساس تکثیر توالی srRNA۱۶ مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۱۵ استریپتومایس شناسایی شدند. جهت جداسازی نیز از محیط‌های خاص این گونه باکتری‌ها از جمله استریپتومایس آنتی‌بیوتیک اکتیویته مورد استفاده قرار گرفت (۱۹).

### نتیجه گیری

جوامع میکروبی از بهترین و ارزان‌ترین منابع بیولوژیکی فعال هستند که همواره در دسترس هستند. برای جداسازی متابولیت فعال علیه باکتری پاتوژن نیز از محیط مایع ISP2 و و حلال اتیل استات استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های جدا شده بر روی ۵ سویه مختلف باکتری اشرشیا کلای که همگی به جنتامایسین مقاوم بوده و هر یک میزان حساسیت متفاوتی نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آمیکاسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکول و سفکسیم داشتند بررسی شد. با استناد به نتایج به دست آمده می‌توان گفت متابولیت‌های جدا شده توان بسیار زیادی در مقابله با سویه‌های اشرشیا کلای از خود نشان دادند. این بدان معناست که باکتری‌های استریپتومایس تنوع و قدرت بسیار زیادی در تولید متابولیت ثانویه علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا دارند.

### References

1. Omura S. Isolation and Strature of a New Antibiotic Viridomycin F Produced by Streptomyces sp. 1999; 52(1): 61-64.
2. Kokare CR, Mahadik KR, Kadam SS. Isolation of bioactive marine Actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coast lines India. 2004; 248- 256.

3. Eshraghi s. Evaluation of the potent inhibitory Effects of Royal jelly Fractions Against Streptomyces Bacteria. 2005; 63-68. [In Persian]
4. Geremcser M.A. Actinomyces arachinia and Streptomyces. (In:Medicall Microbiology – 3<sup>th</sup>edn). 1991; 21(1): 415-450.
5. Silver L. and K. Bostian, Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1993; 37(3): 377.
6. Eskandari MM, Omidi B. Isolation of *Streptomyces* with antimicrobial effect on Gentamicin resistance *Escherichia coli*, from bakhtegan lake and Bonab forest, M. Sc, Islamic Azad University Central Tehran Branch. [In Persian]
7. Makimura K. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. Journal of clinical microbiology. 1999; 37(4): 920-924.
8. Chellapandi P, HM. Jani. Production of endoglucanase by the native strains of Streptomyces isolates in submerged fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, 2008; 39: 122-127.
9. Hopwood DA. Streptomyces in nature and medicine the antibiotic makers. 2007: Oxford University Press.
10. Salami F. Iranian reserch organization of science of technology (I.R.O.S.T). Biotechnology department Tehran, Iran. 2004. [In Persian]
11. Deepika T. Lakshmipathy and Krishnan Kannabiran a Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic Streptomyces Sp. Isolated from saltpan Enivironment. American Journal of Infectious Diseases 2009. 5(3): 200-206.
12. Prapagdee B, Kuekulovng Ch, Mongkolsuk S. Antifungal Pottential of Extracellular Metabolites Produced by Streotomyces hygrosopicus against Phytopathogenic Fungi. Int J Biol Sci. Ivyspring International Publisher, 2008; 4(5): 330-337.
13. Amirmozaffari N, Darvishi vizaneh S, Taheri AR. Isolation of actinomycetes producng antibacteril against methicilin-resistant staphylococcus aureus from soils of astara region. Qom Univ Med Sci J. 2014. [In Persian]
14. Kafilzadeh F, Dehdari F, Namdar N. Isolation and evaluatin of marine actinomycetes from mangrove forests in south of Iran against some human bacterial pathogens. J Ardabil Univ Med Sci. 2013; 13(1): 69-77.
15. Monadi M, Roayaei M, Najafzadeh H. Isolation and characterization of antibiotic producer actinomycetes from the Persian Gulf. Iran J Public Health. 2014; 43: 138.
16. Tang SK, Li WG, Dong W, Zhang YG, Xu LH, et al. Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. Actinomycetologica, 2003; 17(1): 6-10.
17. Stackebrandt E, Liesack W, Webb R, Witt D. Towards a molecular identification of Streptomyces species in pure culture and in environmental samples. Actinomycetologica, 1991; 5(1): 38-44.
18. Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. Journal of applied microbiology, 2003; 95(4): 814-823.
19. Atlas RM, Bartha R. Microbial ecology. (Fundamental and application) 2<sup>nd</sup> edition. 1987; 101-129.

## بررسی تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر عملکرد، صفات کیفی تخم مرغ، متابولیت‌های سرم و مینرال‌های پلاسما خون مرغان تخم‌گذار

علیرضا قراگزلو<sup>۱\*</sup>، فرشید خیری<sup>۲</sup>، مصطفی فغانی<sup>۲</sup>، جواد نصر<sup>۳</sup>

۱. دانش آموخته دکترای علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل افزایش آثار سمی و افزایش بیماری سرطانی باید کاهش یابند و استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آنها برای کاهش و یا به تاخیر انداختن اکسیداسیون چربی‌ها و بهبود سیستم ایمنی پرندگان افزایش یافته است. به منظور بررسی تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر عملکرد، صفات کیفی تخم‌مرغ، متابولیت‌های سرم و مینرال‌های پلاسما خون مرغان تخم‌گذار، این آزمایش طراحی و انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۴۴ قطعه مرغ تخم‌گذار از نژاد لگهورن سفید آمیخته تجاری (های -لاین w80) در ۹ تیمار، چهار تکرار و چهار قطعه مرغ در هر تکرار توزیع شده‌اند. آزمایش فوق در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار سطح هسته انار و چهار سطح روغن هسته انار به مدت ده هفته از سن ۲۵ لغایت تا ۳۵ هفتگی انجام گرفت. جیره‌ها از نظر انرژی و پروتئین یکسان و بر اساس احتیاجات غذایی، NRC 1994 و با توجه به توصیه‌های شرکت مرغک تنظیم شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که استفاده از سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر وزن تخم مرغ، وزن توده تخم مرغ، درصد تولید تخم مرغ، ضریب تبدیل، واحد‌ها، وزن پوسته و استحکام و ضخامت پوسته تخم مرغ تاثیر معنی‌داری نداشت. ولی شاخص سفیده، شاخص زرده، وزن مخصوص تخم مرغ تحت تاثیر معنی‌داری قرار گرفت ( $P < 0.05$ ) میزان کلسترول، تری‌گلیسرید و غلظت لیپوپروتئین با چگالی پایین خون مرغ‌ها با افزایش میزان مصرف هسته و روغن هسته انار کاهش یافتند ( $P < 0.05$ ). میزان غلظت لیپوپروتئین با چگالی زیاد خون مرغ‌ها با افزایش هسته و روغن هسته انار افزایش یافت. ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** باتوجه به یافته‌های مطالعه حاضر پیشنهاد می‌گردد جهت ارتقاء سلامت جامعه انسانی، کاهش هزینه‌های تولید و کاهش آلودگی محیط زیست با توجه به عدم کاهش تولید و تاثیر مثبت بر متابولیت‌های خونی مرغ‌ها، از هسته و روغن هسته انار در خوراک مرغ‌های تخم‌گذار استفاده شود.

**واژگان کلیدی:** هسته انار، مینرال‌های پلاسما، اسیدهای چرب، مرغ تخم‌گذار، کیفیت تخم مرغ

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵  
همراه: ۰۹۰۳۲۷۱۳۷۷۲

پست الکترونیک: Alireza-gh514@yahoo.com

## Investigating the effect of different levels of pomegranate kernel and oil on performance, egg quality traits, serum metabolites and blood plasma minerals of laying hens

Alireza Gharagzlou<sup>1\*</sup>, Farshid Kheiri<sup>2</sup>, Mustafa Faghani<sup>2</sup>, Javad Nasr<sup>3</sup>

1. PhD in Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Saveh branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

### Abstract

**Introduction and purpose:** The use of synthetic antibiotics and antioxidants should be reduced due to the increase in toxic effects and the increase in cancer, and the use of medicinal plants and their antioxidant compounds to reduce or delay the oxidation of fats and improve the immune system of birds has increased. In order to investigate the effect of different levels of pomegranate kernel and kernel oil on performance, egg quality, serum metabolites and blood plasma minerals of laying hens, this experiment was designed and carried out.

**Materials and methods:** A number of 144 laying hens of commercial mixed white leghorn breed (Hi-linew80) were distributed in 9 treatments, four replicates and four chicken pieces in each replicate. The above experiment was conducted in the form of a completely randomized design with four levels of pomegranate seeds and four levels of pomegranate seed oil for ten weeks from the age of 25 to 35 weeks. The rations were the same in terms of energy and protein and were adjusted based on nutritional requirements, NRC 1994 and according to the recommendations of the poultry company.

**Findings:** The results showed that the use of different levels of pomegranate kernel and kernel oil had no significant effect on egg weight, egg mass weight, egg production percentage, conversion factor, Haw unit, shell weight, and egg shell strength and thickness. But the white index, yolk index, specific weight of eggs were significantly affected ( $P < 0.05$ ). The amount of cholesterol, triglyceride and low density lipoprotein concentration in the blood of chickens decreased with the increase in the consumption of pomegranate seeds and oil ( $P < 0.05$ ). The concentration of high-density lipoprotein in the blood of chickens increased with the increase of pomegranate kernels. ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** According to the findings of the present study, it is suggested to improve the health of human society, reduce production costs and reduce environmental pollution due to the lack of reduction in production and the positive effect on the blood metabolites of chickens, from the seeds and oil of pomegranate seeds in chicken feed. Laying is used.

**Keywords:** pomegranate seeds, plasma minerals, fatty acids, laying hen, egg quality

### مقدمه

تعداد زیادی از مردم جهان از سوء تغذیه رنج می برند، جمعیت جهان در حال افزایش است و انتظارات غذایی مردم از جمله نیاز به پروتئین حیوانی افزایش یافته است. در سال های اخیر این افزایش تولید برای تامین نیازهای غذایی انسان ها ضروری است (۱). از آنجایی که هزینه خوراک تقریباً ۶۰ تا ۷۰ درصد از کل هزینه تولید مرغ های تخمگذار را شامل می شود (۲). استفاده از پسماندهای کشاورزی، دامی و صنعتی در تغذیه طیور امری الزامی و علمی است. استفاده از پسماندها علاوه بر کاهش هزینه جیره، آلودگی زیست محیطی را نیز کاهش خواهد داد. از میان ضایعات صنایع تبدیلی کشاورزی، هسته های انار و بقایای گیاه انار است، تولید سالانه انار ایران ۹۹۰ هزار تن است و ایران یکی از مهم ترین کشورهای تولیدکننده انار در جهان است (۳). در فرآوری صنعتی انارو فرآیندمحصولاتی مانند آب انار، رب، کنسانتره و شربت انارمقدار زیادی ضایعات (پوست میوه انار و هسته انار) تولید میشود که حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد وزن میوه می باشند (۴). انار دارای ترکیبات چون: پلی فنلی شامل اسید الایجیک<sup>۱۲</sup> و مشتقات آن پونیکا لاجین<sup>۱۳</sup> و پونیکا لین<sup>۱۴</sup> می باشد، که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند (۵). پونیکا لاجین خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد

<sup>12</sup> Ellagic acid

<sup>13</sup> Punicallgin

<sup>14</sup> Punicallin

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

میکروبی و ضد قارچی دارد (۶ و ۷) استفاده از تفاله انار در جیره مرغ تخم‌گذار تا سطح ۴/۵ درصد اثر منفی بر شاخص‌های عملکردی شامل: درصد تولید تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ، میانگین وزن تخم‌مرغ و صفات کیفی تخم‌مرغ شامل؛ واحد‌ها، کیفیت پوسته تخم‌مرغ نداشته است (۸). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل افزایش آثار سمی و افزایش بیماری سرطانی باید کاهش یابند و استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آنها برای کاهش و یا به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی‌ها و بهبود سیستم ایمنی پرندگان افزایش یافته است (۹). بهبود پاسخ ایمنی و تعادل اکسیدانی جوجه‌های گوشتی در اثر تغذیه تفاله هسته انار تا سطح ۱۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد گزارش شده است (۱۰). مصرف تفاله انار باعث کاهش کلسترول خون مرغان تخم‌گذار و جوجه‌های گوشتی شده است (۱۱ و ۱۲). (برت و همکاران) گزارش کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن هسته انار استخراج سرد شده، به دلیل ترکیبات ارزشمندش بطور چشمگیری بالاتر از شراب قرمز، چای سبز و آنتی‌اکسیدان سنتزی (BHA<sup>15</sup>) بود (۱۳ و ۱۴). با توجه به مطالب بالا، هدف از تحقیق حاضر، بررسی تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر عملکرد، صفات کیفی تخم‌مرغ و متابولیت‌های سرم مینرال‌های پلاسما خون مرغ‌های تخم‌گذار است.

### مواد و روش‌ها

#### جیره و طرح آزمایشی

این پژوهش در فارم تحقیقاتی مرغ تخم‌گذار مرکز آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان انجام گرفت. مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر عملکرد، صفات کمی و کیفی تخم‌مرغ، متابولیت‌های سرم و مینرال‌های پلاسما خون مرغان تخم‌گذار، به مدت ده هفته طرح‌ریزی و انجام شد. تعداد ۱۴۴ قطعه مرغ تخم‌گذار های لاین (W-80) در ۹ تیمار، ۴ تکرار و ۴ پرند در هر تکرار (۳۶ قفس چهارتایی) از سن ۲۵ هفتگی تا ۳۵ هفتگی با میانگین وزنی برابر و میانگین وزن تخم‌مرغ و درصد تولید یکسان استفاده شد.

جیره تیمارها از نظر انرژی و پروتئین یکسان و بر اساس احتیاجات غذایی، 1994 NRC (بر پایه ذرت - کنجاله سویا) و با توجه به توصیه‌های شرکت مرغک تنظیم شدند. که درصد ماده خشک، پروتئین خام، سطح لیزین، آرژینین، متیونین، الیاف خام، چربی خام، کلسیم، فسفر و سدیم، کل آن‌ها براساس توصیه‌های جدول 1994 NRC و با استفاده از نرم افزار جیره نویسی UFFDA یکسان‌سازی شدند درصد مواد خوراکی جیره در جدول شماره ۱ آورده شده است.

#### تیمارهای آزمایش

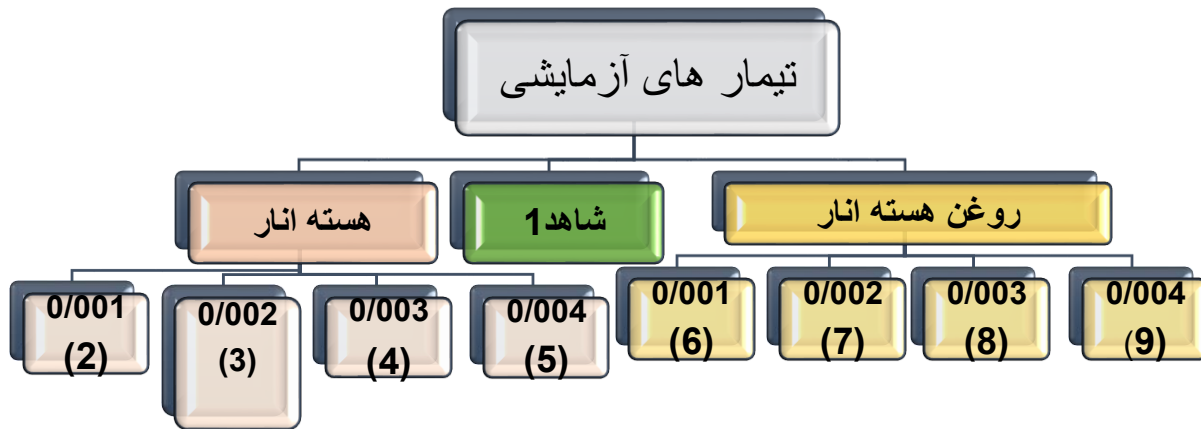
(۱) بدون استفاده از هسته و روغن هسته انار (گروه شاهد)، (۲) استفاده از ۰/۰۰۱ هسته انار، (۳) استفاده از ۰/۰۰۲ هسته انار، (۴) استفاده از ۰/۰۰۳ هسته انار، (۵) استفاده از ۰/۰۰۴ هسته انار، (۶) استفاده از ۰/۰۰۱ روغن هسته انار، (۷) استفاده از ۰/۰۰۲ روغن هسته انار، (۸) استفاده از ۰/۰۰۳ روغن هسته انار، (۹) استفاده از ۰/۰۰۴ روغن هسته انار.

آب و خوارک در طول مدت آزمایش به طور آزاد در اختیار مرغ‌ها قرار داشت. برنامه نوری سالن شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. مرغ‌ها در ۹ تیمار آزمایشی با ۴ تکرار و ۴ قطعه مرغ در هر تکرار تقسیم شدن این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی طراحی و اجرا شد.

<sup>15</sup> Butylated Hydroxy Anisole

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



نمودار ۱\_ تیمارهای تغذیه ای بررسی تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر عملکرد، صفات کیفی تخم مرغ، متابولیت های سرم و مینرال های پلاسما خون مرغان تخم گذار

جدول ۱- ساختار اسید های چرب روغن استحصالی از هسته انار جهت انجام آزمایش

روغن هسته انار				هسته انار				شاهد	اجزا خوراکی
۰/۴ درصد	۰/۳ درصد	۰/۲ درصد	۰/۱ درصد	۰/۴ درصد	۰/۳ درصد	۰/۲ درصد	۰/۱ درصد		
599.25	599.35	599.45	599.55	627.55	620.45	613.45	606.75	599.95	ذرت (۸ درصد)
214.4	214.4	214.4	214.4	214.9	214.8	214.7	214.5	214	سویا (۴۴ درصد)
36	36	36	36	36	36	36	36	36	سبوس گندم
0	0	0	0	4	3	2	1	0	پودر انار
98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	کربنات کلسیم
21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	دی کلسیم فسفات
2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	مکمل معدنی
2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	مکمل ویتامینه
2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	متیونین
1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	لیزین
1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	نمک
2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	جوش شیرین
8.5	10.6	12.6	14.6	8.5	10.6	12.6	14.6	16.7	روغن (۹۴۰۰)
4	3	2	1	0	0	0	0	0	روغن انار (۹۰۰۰)
0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	کولین کلراید
									آنالیز محاسبه ای
2711	2711	2711	2711	2711	2711	2711	2711	2711	انرژی قابل سوخت و ساز

دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

15.05	15.05	15.05	15.05	15.05	15.05	15.05	15.05	15.05	پروتئین %
0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	لیزین %
0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	متیونین +سیستئین %
4.27	4.27	4.27	4.27	4.27	4.27	4.27	4.27	4.27	کلسیم %
0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	فسفر قابل دسترس %
0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	سدیم %
0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	کلر %
3	3	3	3	3	3	3	3	3	فیبر خام %
1.851	1.927	2.003	2.079	1.851	1.927	2.003	2.079	2.15	لینو لنیک اسید %

مکمل معدنی به ازای هر کیلوگرم از جیره ۲/۴ میلی گرم مس، ۳۴/۱ میلی گرم ید، ۳۰ میلی گرم آهن، ۲۹/۷۶ میلی گرم منگنز، ۰/۰۸ میلی گرم سلنیوم، ۲۵/۸۷ میلی گرم روی. مکمل ویتامینی به ازای هر کیلوگرم از جیره  $lu_{3520}$  ویتامین A، ۵۹/۱ میلی گرم ویتامین B1 و ۱/۶ میلی گرم ویتامین B2، ۱۳/۸۶ میلی گرم نیاسین، ۳/۱۳ میلی گرم پانتوتنیک، ۱ میلی گرم B6، ۰/۰۶ میلی گرم بیوتین، ۸۰ میلی گرم کولین، ۰/۰۴ میلی گرم ویتامین B12، ۱۹/۱ میلی گرم B9، ۱۰۰۰ IU، ویتامین D3، ۸/۸ IU، ویتامین E، ۸۸/۱ میلی گرم ویتامین K. همه محاسبات براساس نیازمندی‌های سال (۱۹۹۴) NRC ارزیابی شده است.

مواد گیاهی

نمونه انار مورد استفاده در این مطالعه از رقم ملس شیرین با وزن تقریبی هر میوه ۲۰۰ گرم، با شاخص رسیدگی تجاری از منطقه ساوه تهیه گردید.

جداسازی هسته از میوه

پس از شستشو و برش میوه به قطعات کوچک‌تر دانه‌ها با دست از بافت جدا و از طریق مالش ملایم بر روی توری فلزی عصاره آن استخراج گردید و به منظور جداسازی ذرات باقی‌مانده گوشت، هسته‌ها با آب شستشو و سپس بر روی پارچه‌ای تمیز پهن و در اتاق خشک گردید (به دور از نور خورشید)، هسته‌ها پس از خشک شدن با کیسه کتان تا زمان مصرف و روغن گیری در فریزر (۱۸-) درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج روغن

هسته‌های انار با روش پرس سرد، روغن گیری شد و روغن فوق تا زمان آزمایش در دمای یخچال (+۴) نگهداری شد.

بررسی پروفایل اسیدهای چرب روغن هسته انار استخراج شده

اسیدهای چرب روغن با دستگاه گاز کروماتوگرافی ساخت شرکت YOUNG LIN ACME کره جنوبی با ستون ۶۰ متر طول، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر و ۰/۲۵ میکرومتر اندازه ذرات شناسایی شدند (جدول شماره ۲).

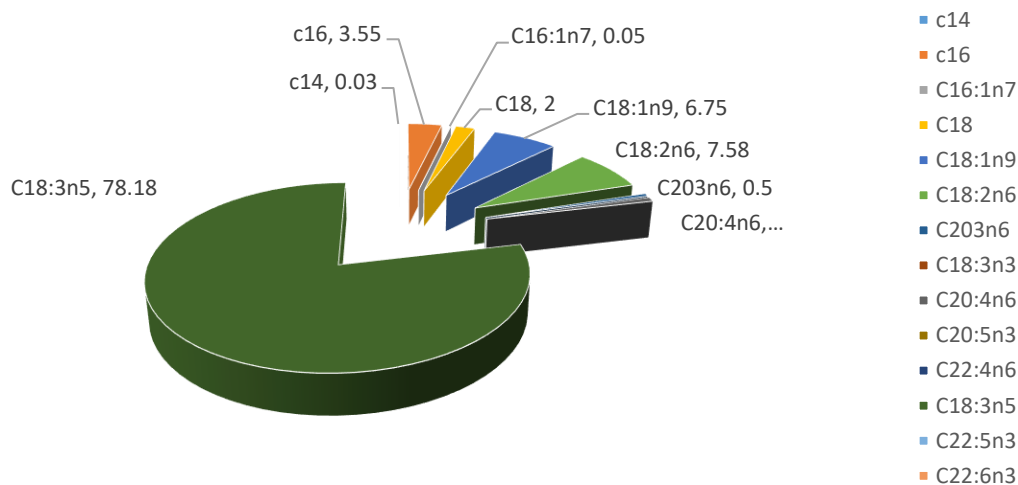
جدول ۲- ساختار اسیدهای چرب روغن استحصالی از هسته انار جهت انجام آزمایش

C22:6n3	C22:5n3	C18:3n5	C22:4n6	C20:5n3	C20:4n6	C18:3n3	C203n6	C18:2n6	C18:1n9	C18	C16:1n7	C16	C4:0	اسید چرب
0	0	78.18	0	0	0.78	0	0.5	7.58	6.75	2	0.05	3.55	0.03	درصد



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



نمودار ۲- ساختار اسید های چرب روغن استحصالی از هسته انار جهت انجام آزمایش

### رکوردگیری

در طول دوره آزمایش، تولید تخم مرغ در تمامی واحدهای آزمایشی ثبت و رکورد گیری شد. متوسط درصد تخمگذاری، تولید توده تخم مرغ (روز/پرنده/گرم)، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل به صورت هفتگی محاسبه و ثبت شد.

### خصوصیات کیفی تخم مرغ

در پایان دوره آزمایش، از هر قفس تعداد ۲ عدد تخم مرغ جهت تعیین صفات کیفی خارجی (استحکام پوسته، ضخامت و درصد پوسته) و صفات کیفی داخلی (واحد هاو<sup>۱۶</sup>، ارتفاع سفیده، درصد زرده، درصد سفیده، رنگ زرده و وزن زرده) مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت تعیین مقاومت پوسته بر حسب کیلو گرم بر سانتی متر مربع از دستگاه دیجیتالی اندازه گیری مقاومت پوسته به روش Force Gauge استفاده شد. ضخامت پوسته با دستگاه ضخامت سنج و بوسیله امواج مافوق صوت اندازه گیری شد. خصوصیات داخلی تخم مرغها نیز با دستگاه EMT-5200 مورد آزمایش و محاسبه قرار گرفت.

### متابولیت های خونی

در پایان دوره آزمایش به منظور بررسی اثر تیمارهای آزمایشی بر فرا سنجهای خونی به صورت کاملاً تصادفی از هر واحد آزمایشی دو قطعه پرنده انتخاب، و از ورید بالی آنها خونگیری انجام شد و نمونهی خون اخذ شده، در دو لوله آزمایش مجزا که یکی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA<sup>۱۷</sup> بود که جهت تعیین درصد سلولهای خونی و دیگر فاقد ماده ضد انعقاد EDTA برای اخذ سرم به منظور اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون ریخته شد. آنالیزهای آزمایشگاهی بر پایه روشهای رفرانس آزمایشگاهی انجام گردید (۱۵)، جداسازی سرم خون با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه انجام و سرم تفکیک شده به داخل میکرو تیوپهای ۱/۵ سی سی انتقال یافت تا زمان اندازه گیری پارامترهای خونی مورد نظر در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد، کلاسترول تام در این مطالعه بروش غلظت کلاسترول سرم خون و با استفاده از کیت آزمایشگاهی پارس آزمون، توسط دستگاه اسپکتو فتو متری در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد غلظت تری گلیسرید نیز توسط کیت آزمایشگاهی زیست شیمی

<sup>16</sup> Hough unit .H.U

<sup>17</sup> -Ethylene diaminetetra – acetic acid

پارس آزمون، با روش آنزیماتیک اندازه‌گیری و توسط دستگاه اسپکتومتری در طول موج ۵۲۰ اندازه‌گیری شد. در پایان داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS<sup>18</sup> نسخه ۹ (۲۰۰۰) و رویه GLM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه تفاوت بین میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### صفات تولیدی و عملکردی

با بررسی نتایج به دست آمده (جدول ۳) مشخص گردید که هسته و روغن هسته انار، موجود در جیره، بر وزن تخم‌مرغ، وزن توده تخم‌مرغ، تولید تخم‌مرغ و ضریب تبدیل تاثیر معنی‌داری نداشت ( $P>0.05$ ). بی‌تاثیر بودن مصرف هسته و روغن هسته انار بر وزن تخم‌مرغ، وزن توده تخم‌مرغ، تولید تخم‌مرغ و ضریب تبدیل در این آزمایش با نتایج Reed 1995، صادقی و همکاران (۲۰۰۹)، ساکی و همکاران (۲۰۱۴) و رابط و همکاران (۱۳۹۱) همخوانی داشت (۱۱ و ۱۶ و ۱۷ و ۱۸). احتمالاً علت آن تأمین احتیاجات مرغ‌های تخمگذار توسط جیره‌های آزمایشی مورد استفاده می‌باشد. ولی با یافته‌های غزنوی و همکاران همخوانی نداشت (۱۹). تفاله هسته انار مورد استفاده در مطالعه غزنوی به صورت فرآوری با ۲۹/۲ درصد فیبر خام بود که احتمالاً درصد فیبر کمتر در آزمایش آنان باعث ظهور اثرات مثبت تفاله انار بر عملکرد مرغ تخم‌گذار شده است، با افزایش مقدار هسته و روغن انار، توده تخم‌مرغ کاهش و ضریب تبدیل افزایش یافت هرچند این اختلاف‌ها معنی‌دار نبود ( $P>0.05$ ). درصد تولید در تیمارهای ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۴ روغن هسته انار با افزایش مصرف روغن در جیره، کاهش یافت هرچند این افزایش معنی‌دار نبود ( $P>0.05$ ) مقدار خوراک مصرفی با افزایش درصد هسته و روغن هسته انار افزایش یافت ( $P<0.05$ ) این تغییر ممکن است بعلت اثر خوش‌خوراک‌کنندگی روغن و هسته انار که حاوی روغن هستند، باشد.

جدول ۳- تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر صفات تولیدی و عملکردی مرغ‌های تخمگذار

تیمار	درصد تولید	مقدار خوراک هر پرند	مقدار خوراک قفس	وزن توده / گرم مرغ روز	وزن توده / گرم مرغ هفته	ضریب تبدیل	گرم تخم مرغ تولیدی هر قفس	گرم تخم مرغ تولیدی	مصرفی (گرم بازای هر مرغ در هفته)	خوراک مصرفی (گرم بازای هر مرغ در هفته)
شاهد	96.163	6340 <sup>e</sup>	25360.2 <sup>ab</sup>	58.258	407.79	1.565	16311.5	60.535	6340 <sup>e</sup>	634.01 <sup>b</sup>
1	96.788	6377 <sup>d</sup>	25509 <sup>ab</sup>	55.545	388.8	1.6425	15551.8	57.383	6377 <sup>d</sup>	637.73 <sup>b</sup>
2	97.468	6266 <sup>f</sup>	25063.1 <sup>ab</sup>	57.26	400.82	1.6125	15598.9	58.76	6266 <sup>f</sup>	645.38 <sup>b</sup>
3	96.99	6202 <sup>g</sup>	24807.7 <sup>b</sup>	56.245	393.71	1.6725	15053.9	57.988	6202 <sup>g</sup>	655.55 <sup>ab</sup>
4	95.18	6452 <sup>c</sup>	25808.8 <sup>ab</sup>	55.245	368.7	1.6725	15468.1	58.035	6452 <sup>c</sup>	645.22 <sup>b</sup>
1	95.625	6455 <sup>b</sup>	25818.7 <sup>ab</sup>	59.143	414	1.565	16559.8	61.845	6455 <sup>b</sup>	645.47 <sup>b</sup>
2	96.875	6725 <sup>a</sup>	26900 <sup>a</sup>	57.85	404.95	1.665	16198	59.718	6725 <sup>a</sup>	672.5 <sup>ab</sup>
3	94.4	6725 <sup>a</sup>	25218.8 <sup>ab</sup>	56.093	392.65	1.695	14859	59.41	6725 <sup>a</sup>	664.86 <sup>ab</sup>

<sup>18</sup> SAS Institute

709.05 <sup>a</sup>	6725 <sup>a</sup>	58.503	15297.5	1.775	399.9	57.13	26900 <sup>a</sup>	6725 <sup>a</sup>	97.65	4
14.6	0	2.71	1324.64	0.14	21.4	3.06	448.3	0	1.95	SEM
0.0016	0.0001	0.41	0.63	0.52	0.67	0.67	0.004	0.0001	.31	P-Value

\* میانگین ها با حروف متفاوت در هر یک از اثرات از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی داری می باشند ( $P < 0.05$ )

### مرغ

### تخم

با بررسی نتایج به دست آمده مشخص گردید که ترکیب روغن هسته انار، موجود در جیره، صفات کیفی خارجی تخم مرغ را تحت تاثیر قرار می دهد. جدول ۴ نتایج بررسی سطوح متفاوت روغن و هسته انار بر صفات پوسته تخم مرغ در جدول ۴ ارائه شده است. استفاده از سطوح متفاوت هسته و روغن انار تأثیر معنی داری بر صفات پوسته تخم مرغ نداشت. ( $P > 0.05$ ). کیفیت پوسته تخم مرغ از مهم ترین صفات کیفی تخم مرغ در صنعت مرغ تخم گذار، تخم گذار تجاری و مرغ مادر می باشد ضخامت نامطلوب پوسته تخم مرغ برای مصرف کنندگان و کارخانجات جوجه کشی مناسب نیست. چون تخم مرغ ها دارای تخم مرغ های دارای پوسته ای نازک در زمان حمل و نقل و قبل از رسیدن به مرکز عرضه و جوجه کشی شکسته و باعث کاهش کیفیت تخم مرغ های سالم نیز می شود. نامطلوب بودن پوسته تخم مرغ راندمان جوجه درآوری تخم مرغ ها را نیز کاهش می دهد عوامل متعددی بر صفات پوسته تاثیر می گذارند که تغذیه از مهم ترین عوامل تاثیرگذار بر ضخامت پوسته می باشد (۲۰). وزن مخصوص تخم مرغ یکی از روش های غیرمستقیم، در بررسی کیفیت پوسته تخم مرغ است و عمده ترین عامل مؤثر بر آن وزن پوسته می باشد تخم مرغ هایی که وزن مخصوص بیشتر یا مساوی ۱/۰۸۸ دارند کیفیت پوسته قابل قبولی دارند (۲). وزن مخصوص تخم مرغ های گروه شاهد و تیمار های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲، و ۰/۰۰۳ هسته انار دارای بیشترین مقدار و تیمار ۰/۰۰۲ روغن هسته انار دارای کمترین مقدار بود. همان طوری که نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده ها مربوط به تاثیر سطوح متفاوت روغن هسته انار بر صفات کیفی داخلی تخم مرغ در جدول ۴ نشان میدهد که روغن و هسته انار هیچ تأثیر معنی داری بر واحد ها و تخم مرغ نداشت گرچه با افزایش مقدار روغن هسته انار به جیره واحدها و نیز ارتقا یافت ولی این افزایش معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ) و نتایج فوق با نتایج مطالعات پیشین (۱۱ و ۱۸). مبنی بر عدم تأثیر معنی دار تفاله هسته انار کیفیت سفیده تخم مرغ همخوانی داشت کیفیت سفیده تخم مرغ تا حدود زیادی به استحکام و یا ساختمان ژله سفید مربوط می شود به طوری که با افزایش استحکام سفیده، کیفیت تخم مرغ افزایش پیدا می کند و همین عامل ایجاد ساختمان ژله ای سفیده تخم مرغ است و واحدها و نشان دهنده کیفیت سفیده تخم مرغ می باشد افزایش اووسین باعث افزایش واحد ها و می گردد (۲۳). تفاله هسته انار بدلیل داشتن ترکیبات ضد اکسیدانی و رنگدانه ها احتمالاً باعث افزایش ابقاء مواد مغذی و کیفیت سفیده تخم مرغ می شود (۲۴). شاخص رنگ زرده تخم مرغ در تیمار های تغذیه شده با ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۴ هسته انار بیشترین و در تیمار های تغذیه شده با ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۴ روغن هسته انار کمترین بود.

رنگ زرده تخم مرغ مستقیماً منعکس کننده سطح گزانتوفیل موجود در جیره غذایی است (۲۵) جیره غذایی تیمارهای ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۴ هسته انار با جیره های دارای روغن به علت افزایش اسیدهای چرب غیراشباع جذب کارتونوئید ها را افزایش می دهد (۲۳) احتمالاً بهمین دلیل رنگ زرده در تیمارهای فوق بیشترین رقم نشان می دهد، امروزه از گیاهان دارویی که غنی از کارتونوئید ها هستند به جای رنگ دهند های مصنوعی برای تشدید رنگ زرده تخم مرغ در مرغ های تخمگذار استفاده می شود. مصرف آن دسته از جیره های غذایی که حاوی رنگدانه هایی نظیر کارتونوئید ها و گزانتوفیل ها باشد موجب رنگین تر شدن زرده می شود (۲۶)، بنابراین با افزایش جذب کارتونوئید، گیاهان منجر به افزایش رنگ زرده می گردد این نتایج با یافته های، ساکی و همکاران ۲۰۱۴ و رابط و همکاران ۱۳۹۶ (۱۱ و ۱۸) همخوانی نداشت.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر گرگان

جدول ۴- تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر صفات کمی و کیفی تخم مرغ

تیمار	شاخص رنگ زرده (عدد رش)	وزن پوسته (گرم)	شاخص سفیده	واحد هاو	وزن تخم مرغ (گرم)	استحکام	ضخامت (میلی متر)	وزن مخصوص	سطح پوسته (سانتی متر مربع)
شاهد	6.75 <sup>a</sup>	5.7	7.53	86.9a	58.7	3.01	0.3	1.06 <sup>b</sup>	71.25
۱۰۰۰ روغن	6.75 <sup>a</sup>	5.72	7.2	85.4	58.6	3.01	0.3	1.07 <sup>ab</sup>	70.33
۲۰۰۰ روغن	7 <sup>ab</sup>	5.73	7.25	85.9	57.2	3.05	0.31	1.075 <sup>ab</sup>	69.14
۳۰۰۰ روغن	7.25 <sup>b</sup>	5.91	7.5	86.7	59.11	3.06	0.31	1.075 <sup>ab</sup>	70.77
۴۰۰۰ روغن	7.25 <sup>b</sup>	5.7	7.5	87.5	56.79	3.06	0.31	1.078 <sup>a</sup>	68.83
SEM	0.5	0.3	0.36	2.6	2.6	0.095	0.012	0.007	
P-Value	0.13	0.47	0.37	0.83	0.83	0.72	0.61	0.28	

\* میانگین ها با حروف متفاوت در هر یک از اثرات از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی داری می باشند (P<0.05)

## و مینرال های پلاسما

در جدول شماره ۵ اثر تیمارهای آزمایشی بر کلسترول، تری گلیسرید، LDL<sup>۱۹</sup>، HDL<sup>۲۰</sup>، VLDL<sup>۲۱</sup>، گلوکز و کلسیم، فسفر، منیزیم و آهن خون آورده شده است نتایج نشان می دهد میزان تری گلیسرید، کلسترول و LDL تیمارهای جیره های آزمایشی هسته و روغن هسته انار، با افزایش میزان نمونه های مورد آزمایش در جیره مرغ ها کاهش معنی داری مشاهده شد. (P<0.05) نتیجه آزمایش حاضر با یافته های نیگرز و همکاران ۲۰۰۷، آرو ۲۰۰۴، نمر و همکاران ۲۰۰۹ که تاثیر روغن هسته انار را تغذیه موش ها بر سطح تری گلیسرید و کلسترول سرم خون گزارش کرده بودند همخوانی داشت (۲۷ و ۲۸ و ۲۹). پژوهش های متعددی در خصوص کاهش کلسترول خون انجام شده است که یکی از راهکارهای آن افزایش سطح فیبر جیره می باشد (۳۰ و ۳۱ و ۳۲). هسته انار با دارا بودن ۳۳/۷۴ درصد فیبر خام، از لحاظ فیبرغنی می باشد. وجود ترکیبات فنولی: پونیکالاجین، پونیکالین، اسید گالیک و بخصوص اسید الاجیک ممکن است بر سطح چربی سرمی و سایر پارامترهای خونی تاثیر گذار باشد [۳۰، ۳۳] روغن دانه انار سرشار از اسید چرب کنژوگه<sup>۲۲</sup> (CLNA) است. نیکولوزی و همکاران، تغذیه موش ها را با ۱/۱ درصد CLA به مدت یازده هفته انجام دادند و شاهد کاهش معنی دار در میزان کلسترول کل و تری گلیسرید شدند (۳۴).

جدول ۵- تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر متابولیت های خونی مرغ های تخمگذار

تیمار	مینرال های پلاسما خون				پروفایل لیپیدی سرم خون (گرم در دسی لیتر)			
	magnesium	phosphorous	ca	fe	LDL	HDL	tottal cholesterol	triglycerides
شاهد	3.05	6.28abc	16.1ab	610.5a	49a	41.5b	210a	645.8ab

<sup>19</sup> LOW Density Lipoprotein

<sup>20</sup>-High density lipoprotein

<sup>21</sup> -Very low density lipoprotein

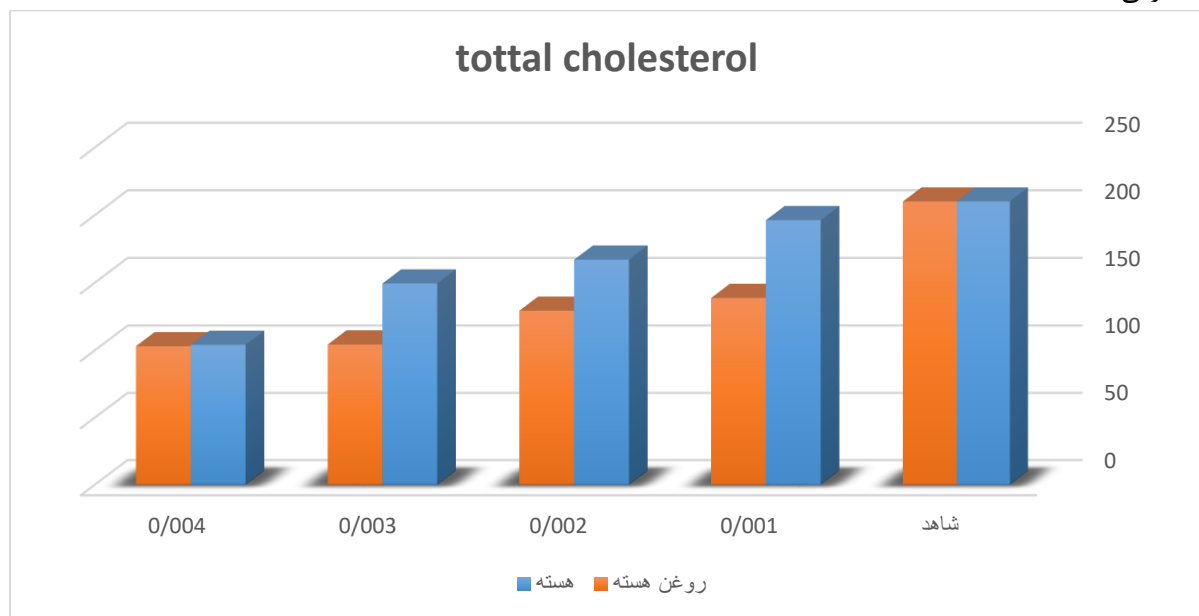
<sup>22</sup> Conjugated linolenic acid

دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

2.98	7.23a	16.62ab	615.3a	49a	46.3ab	196.23a	560ab	۱۰۰۰ هسته
3.08	6.85ab	18.1a	502ab	48.3a	49.5ab	167.02ab	552.5ab	۲۰۰۰ هسته
2.98	5.2c	15.4abc	427abc	46.7ab	49.5ab	149.4ab	517.8b	۳۰۰۰ هسته
2.9	6.13abc	17ab	529.5ab	44ab	47ab	104b	509b	۴۰۰۰ هسته
3.13	5.6bc	12.9c	119.3c	48.2c	41.3b	138.7ab	515.2b	۱۰۰۰ روغن
3.08	7.18a	16.4ab	395ab	45.2ab	55a	129.25ab	503b	۲۰۰۰ روغن
3.05	5.6bc	14.08bc	233.5c	43.4b	54.3a	104.25b	482b	۳۰۰۰ روغن
3.15	5c	15.6abc	320.8bc	42b	54a	103b	479b	۴۰۰۰ روغن
0.072	0.092	.195	16.61	17.01	.282	124.7	66.2	SEM
0.052	0.06	0.06	0.07	0.001	0.06	0.007	0.006	P-Value

\* میانگین ها با حروف متفاوت در هر یک از اثرات از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی داری می باشند ( $P < 0.05$ )

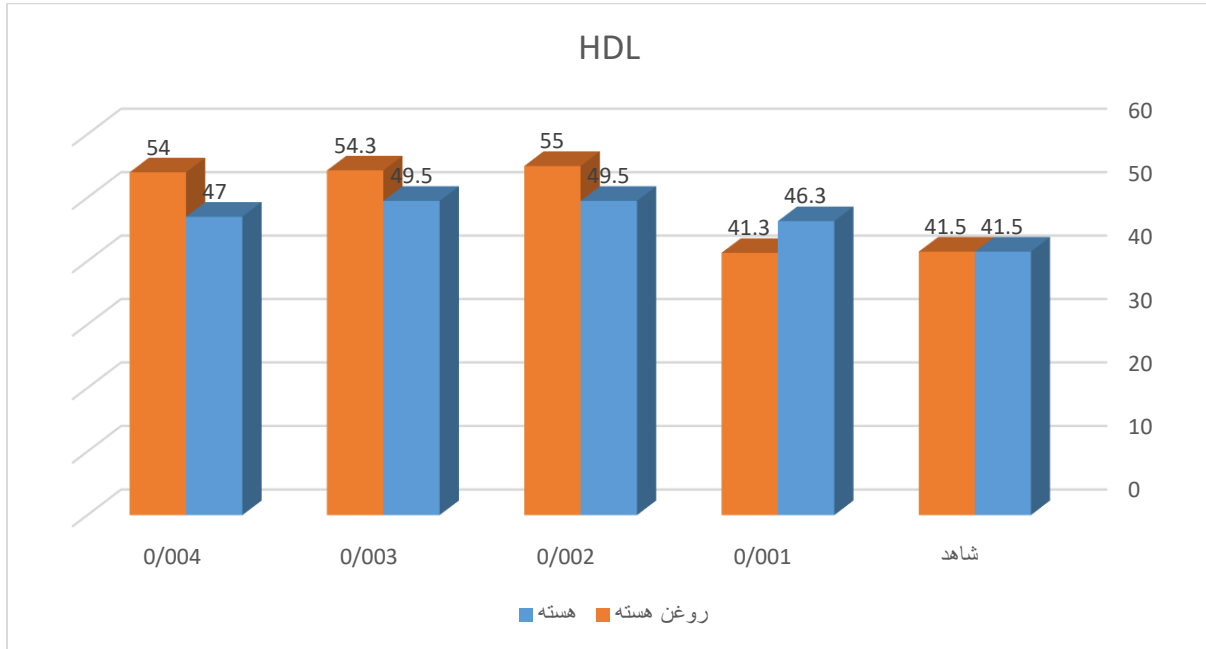
دلی و همکاران با ۰/۴ CLA، کاهش معنی داری را در میزان کلسترول کل و تری گلیسرید مشاهده کردند (۳۵) گزارش کیلی و همکاران نیز تاثیر CLA بر میزان کلسترول و تری گلیسرید سرم خون را نشان میدهد (۳۶). اسیدهای چرب غیر اشباع مقدار LDL کلسترول سرم خون را کاهش و مقدار HDL را افزایش می دهند (۳۷). یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج تحقیقات پیشین همخوانی داشت.



نمودار ۳- تاثیر سطوح مختلف هسته و روغن هسته انار بر میزان کلسترول کل<sup>۲۳</sup> خون مرغان تخمگذار

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



نمودار ۴- تاثیر سطوح مختلف هسته و روغن هسته انار بر میزان لیپوپروتئین با چگالی<sup>۲۴</sup> بالا خون مرغان تخمگذار

در طیور چربی‌های موجود در جیره غذایی پس از جذب روده‌ای از طریق سیاه‌رگ باب کبدی به صورت لیپوپروتئین با چگالی کم (VLDL) به گردش خون راه می‌یابند (۳۸). چربی‌های موجود در گردش خون طیور شامل چربی‌های خنثی (تری اسید گلیسرول ها)، فسفر لیپیدها، استرهای کلسترول، اسیدهای چرب آزاد و ترکیبات محلول در چربی از قبیل ویتامین E, K, D, A می‌باشند (۲۳) میزان کلسترول خون پرندگان تحت تأثیر سن، توارث، تغذیه و بیماری‌های مختلف است (۳۸). میزان طبیعی کلسترول خون اکثر پرندگان در حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر است (۳۹). در آزمایش حاضر بیشترین مقدار کلسترول از لحاظ عددی در تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). کاهش کلسترول و LDL هم‌زمان با افزایش مصرف درصد هسته و روغن هسته انار مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) کلسترول و LDL پلاسمای مرغان تغذیه شده با جیره حاوی سطوح بالای فیبر، پایین تر می‌باشد و تاثیر فیبر محلول در کاهش کلسترول نسبت به فیبر نامحلول بارزتر است که در مطالعه حاضر کاهش کلسترول با افزایش سطح مصرف هسته و روغن هسته انار مشاهده شد (۳۱) حسینی و همکاران گزارش کردند که افزایش فیبر و مواد خوراکی باعث کاهش کلسترول خون و کلسترول زرده تخم مرغ می‌شود. در جوجه‌های گوشتی نیز استفاده از تفاله هسته انار باعث کاهش کلسترول و LDL خون گردید (۴۰). که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. کاهش غلظت لیپوپروتئین با چگالی کم سرم خون در تیمار های حاوی هسته و روغن هسته احتمالاً به دلیل وجود اسید پنوسینیک در تفاله دانه انار است (۴۱).

با افزایش مصرف مقدار هسته و روغن انار مصرفی در جیره مقدار تری گلیسرید خون کاهش معنی داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ) این یافته بان تایید گزارش (ژلنگ و همکاران ۲۰۱۰) که از جیره حاوی چربی زیاد به همراه مکمل اسید گالیک به عنوان ترکیب‌های فنی استفاده کرده بودند (۲۷) و گزارش ها ننگ و همکاران، که از عصاره متانولی گل لنار برای رت ها استفاده کرده بودند (۴۲)، مشابهت و همخوانی دارد. مصرف جیره حاوی اسید چرب غیراشباع قادر به کاهش تری گلیسرید سرم می‌باشد (۴۳) روغن هسته انار در تغذیه موش موجب کاهش سطح تری گلیسرید سرم خون شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت (۴۴). اثرات هیپولیپیدمیک اسید های چرب غیر اشباع امگا-۳ جیره غذایی، ممکن است به وسیله چند مکانیسم اعمال گردد: کاهش سنتز تری گلیسریدها و کاهش شیلو میکرون‌ها از سلول‌های روده‌ای (۴۵). سرکوب کردن سنتز اسید های چرب کبدی و تولید تری گلیسرید

که منجر به محدود شدن ترشح لیپوپروتئین با چگالی پایین می شود (۴۶). سطوح مختلف هسته و روغن هسته انار باعث افزایش عددی میزان HDL شد که روند این تغییرات مطلوب است. افزایش معنی دار غلظت لیپوپروتئین ها با چگالی زیاد با افزایش میزان مصرف هسته و روغن هسته انار افزایش معنی داری پیدا کرد ( $P < 0/05$ ) و میزان کلسیم، فسفر و آهن خون در تیمار ها، با افزایش درصد هسته و روغن هسته انار در جیره اختلاف معنی داری را نشان داد ( $P < 0/05$ )، مقدار طبیعی کلسیم و فسفر خون در اغلب پرندگان به ترتیب ۸ تا ۱۸ و ۲ تا ۹ میلی گرم در دسی لیتر هست (۳۹) که با ما نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. دلیل نتایج متفاوت بر فراسنجه های خونی در پژوهش های انجام شده، ممکن است بخاطر وارسته های مختلف انار و مقدار هسته یا روغن انار مصرفی و میزان اسید پونیسینیک موجود در آن، گونه حیوان و مدت زمان آزمایش باشد.



نمودار ۵- تاثیر سطوح متفاوت هسته و روغن هسته انار بر مینرال های پلاسماي خون مرغ های تخمگذار

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر اسدیان رئیس مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان بخاطر مساعدت در اجرای این طرح سپاسگزاری می نمائیم.

### References:

- Hernandez, F., et al., *Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size*. 2004. **83**(2): p. 169-174.
- . چاپ دوم، ۱۳۸۴، ایران. اصفهان: دانشگاه صنعتی اصفهان. Vol. ن. ا، پرورش مرغ مادر گوشتی and رضاج، پ.
- ، اثر تفاله هسته انار فرآوری شده با هیدروکسید کلسیم بر عملکرد، صفات کیفی، کلاسترول تخم مرغ و فراسنجه های et al غزنوی، p. 103-116. بیوشیمیایی خون و وضعیت ضد اکسیدانی مرغ های تخم گذار. علوم دامی (پژوهش و سازندگی)، ۲۰۱۸، ۳۰(۱۱۷):
- Abbasi, H., K. Rezaei, and L. Rashidi, *Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO2*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008. **85**(1): p. 83-89.
- Brown, L., et al., *Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis*. The American journal of clinical nutrition, 1999. **69**(1): p. 30-42.

- ۶ Rababah, T., et al., *Effect of plant extracts on physicochemical properties of chicken breast meat cooked using conventional electric oven or microwave*. Poultry science : (۱)۸۵ .۲۰۰۶ ,p. 148-154.
- ۷ Ashoush, I.S., O. El-Batawy, and G.A.J.A.o.A.S. El-Shourbagy, *Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats*. 2013. **58**(1): p. 27-32.
- ۸ Saki, A., et al., *The effects of different levels of pomegranate seed pulp with multi-enzyme on performance, egg quality and serum antioxidant in laying hens*. Iranian Journal of Applied Animal Science, 2014. **4**(4): p. 803-808.
- ۹ Rababah, T., et al., *Effect of plant extracts on physicochemical properties of chicken breast meat cooked using conventional electric oven or microwave*. 2006. **85**(1): p. 148-154.
- ۱۰ Hosseini-Vashan, S., A. Golian, and A. Yaghoobfar, *Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace*. International Journal of Biometeorology, 2016. **60**(8): p. 1183-1192.
- ۱۱ Saki, A., et al., *The effects of different levels of pomegranate seed pulp with multi-enzyme on performance, egg quality and serum antioxidant in laying hens*. 2014. **4**(4): p. 803-808.
- ۱۲ Hosseini-Vashan, S., M. Raei-Moghadam, and S. Hosseini. *Effects of diets contained pomegranate pulp with enzyme on performance, carcass, abdominal fat and immune system of broiler chickens*. in *XXV Worlds Poultry Science congress. Beijing, China*. 2016.
- ۱۳ Schubert, S.Y., E.P. Lansky, and I. Neeman, *Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids*. Journal of ethnopharmacology, 1999. **66**(1): p. 11-17.
- ۱۴ Al-Maiman, S.A. and D. Ahmad, *Changes in physical and chemical properties during pomegranate (Punica granatum L.) fruit maturation*. Food Chemistry, 2002. **76**(4): p. 437-441.
- ۱۵ p. 169-227, انتشارات دانشگاه شیراز: شیراز. ۱۳۷۶ Editor. هماتولوژی و بیوشیمی بالینی پرندگان، ف. ا. انس، ن.
- ۱۶ Reed, J.D.J.J.o.a.s., *Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes*. 1995. **73**(5): p. 1516-1528.
- ۱۷ Sadeghi, N., et al., *Antioxidant activity of Iranian pomegranate (Punica granatum L.) seed extracts*. 2009.
- ۱۸ همایش علمی - کاربردی in. صفات عملکردی مرغ های تخمگذار در پاسخ به تغذیه تفاله دانه انار و مولتی آنزیم et al رابطه، م، استفاده از پسماند های کشاورزی، شهری و صنعتی در جیره های غذای دام ، طیور آذربایجان. ۱۳۹۱. ایران. تبریز: دانشگاه تبریز.
- ۱۹ ، اثر تفاله هسته انار فرآوری شده با هیدروکسید کلسیم بر عملکرد، صفات کیفی، کلسترول تخم مرغ و فراسنجه های et al غزنوی، p. 103-116. بیوشیمیایی خون و وضعیت ضد اکسیدانی مرغ های تخم گذار. ۲۰۱۸ .۳۰ (۱۱۷):
- ۲۰ . سوم. ۱۳۹۴، ایران . تهران: آبیژ. ed. س. ج، تغذیه طیور تجاری، land، ل.
- ۲۱ ت. دامی، تعیین انرژی قابل متابولیسم ظاهری و حقیقی و ارزش غذایی پوسته و تفاله دانه انار با J.G. and وانشان، ح. سید جواد، p. 513-534. استفاده از خروس های بالغ. ۲۰۱۶ .۱۸ (۳):
- ۲۲ تغذیه طیور. ۱۳۸۸، واحد آموزش و پژوهش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کوثر: in مظهری، م، and گلپان، ا، س. معینی، م، تهران.
- ۲۳ leasons and J.D. Summers, in *scotts nutrition of the chicken*. 2001, guelph omtariocanada.
- ۲۴ امامی، ع، تاثیر استفاده از فرآورده های فرعی انار بر عملکرد ، فراسنجه های خونی و شکمبه ای، ترکیب اسید های رب گوشت و شیر بز های پرواری و شیری. ۱۳۹۵، بیرجند.
- ۲۵ کلاسینگ، ک. تغذیه مقایسه ای پرندگان. ۱۳۸۱، ایران . تهران: انتشارات دانشگاه تربیت مدرس.



- ۲۶ Belyavin, C.J.R.a.i.a.n., *Natural products for egg yolk pigmentation*. 1987.
- ۲۷ Arao, K., et al., *Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats*. 2004. **3**(1): p. 1-7.
- ۲۸ de Nigris, F., et al., *The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats*. 2007. **17**(1): p. 50-54.
- ۲۹ Nemer, K., *The role of puniic acid (c9t11c13-CLNA) in lipid and energy metabolism of mice*. 2009, The Ohio State University.
- ۳۰ Elkin, R.G., et al., *Select 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors vary in their ability to reduce egg yolk cholesterol levels in laying hens through alteration of hepatic cholesterol biosynthesis and plasma VLDL composition*. 1999. **129**(5): p. ۱۰۱۹-۱۰۱۰ .
- ۳۱ Menge, H., et al., *Effect of cellulose and cholesterol on blood and yolk lipids and reproductive efficiency of the hen*. 1974. **104**(12): p. 1554-1566.
- ۳۲ Turk, D. and B. Barnett. *Diet and egg cholesterol content*. in *Poultry Science*. 1972. POULTRY SCIENCE ASSOC INC 1111 NORTH DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874.
- ۳۳ Radjabian, T., et al., *Effect of pomegranate fruit juice and seed oil on serum lipid levels and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits*. 2008. **7**(25): p. 93-104.
- ۳۴ Nicolosi, R., et al., *Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters*. 1997. **22**(5): p. 266-277.
- ۳۵ Denli, M., et al., *Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on carcass quality, serum lipid variables and histopathological changes of broiler chickens infected with aflatoxin B 1*. 2005. **35**(2): p. 109-116.
- ۳۶ Kelley, D., et al., *Similar effects of c9, t11-CLA and t10, c12-CLA on immune cell functions in mice*. 2002. **37**(7): p. 725-728.
- ۳۷ Celebi, S. and N.J.I.J.P.S. Utlu, *Influence of animal and vegetable oil in layer diets on performance and serum lipid profile*. 2006. **5**(4): p. 370-373.
- ۳۸ تغذیه مقایسه ای پرندگان in کلاستیک،  
۲۷۵-۲۸۰p.۱۳۸۲، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس: ایران.
- ۳۹ ع. م. بیوشیمی درمانگاهی دامپزشکی. ۱۳۷۹، ایران. تهران: انتشارات نوربخش.
- ۴۰ Hosseini-Vashan, S. *Antioxidant status, plasma lipid of broilers fed diets contained pomegranate pulp with enzyme*. in *XXV Worlds Poultry Science congress. Beijing, China*. 2016.
- ۴۱ اثر سطوح مختلف تفاله دانه انار بر صفات عملکردی و برخی فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی. et al. حسینی، ۲۰۱۴. **۳**(۲): p. 29-38.
- ۴۲ Huang, T.H.W., et al., *Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids*. 2005. **145**(6): p. 767-774.
- ۴۳ Tai, E.S., et al., *Polyunsaturated fatty acids interact with the PPARA-L162V polymorphism to affect plasma triglyceride and apolipoprotein C-III concentrations in the Framingham Heart Study*. 2005. **13**: (۳) p. 397-403.

- ۴۴ Koba, K., et al., *Genetically modified rapeseed oil containing cis-9, trans-11, cis-13-octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice*. 2007. **55**(9): p. 3741-3748.
- ۴۵ Harris, W.S.J.J.o.L.R., *Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review*. 1989. **30**(6): p. 785-807.
- ۴۶ Nobuko, I., et al., *Identification of shellfish fatty acids and their effects on lipogenic enzymes*. 1980. **618**(3): p. 378-382.

## تغییر بیان ژن‌های مربوط به اتصالات سلولی در رده سلولی PC3 در حضور ژن توکسین *tsst-1* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

مریم امیری فارسانی<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>

۱.۵. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۱.۶. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** توکسین‌های باکتری دارای پتانسیل درمانی برای درمان سرطان هستند. هدف از این مطالعه، ارزیابی تغییر بیان ژن‌های مربوط به اتصالات سلولی، در سلول‌های PC3 پس از ترانسفکت ژن توکسین *tsst-1* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، است. **روش کار:** در مطالعه پژوهشی حاضر، رده سلولی PC3 مورد استفاده قرار گرفت. پس از کشت سلول، ژن توکسین استافیلوکوکوی *tsst-1* در وکتور pcDNA3.1(+) کلون گردید و درون سلول‌های PC3 ترانسفکت شد. سپس عملکرد صحیح وکتور نوترکیب در این سلول‌ها تایید گردید. در مرحله بعد، بیان ژن‌های *Integrin* و  $\beta$ -catenin به روش real time RT-PCR ارزیابی شد. **یافته‌ها:** عملکرد صحیح وکتور در سلول توسط واکنش PCR تایید شد. بیان ژن‌های *Integrin* و  $\beta$ -catenin در سلول‌های دست‌ورزی شده با وکتور نوترکیب نسبت به سلول‌های شاهد، به صورت معناداری کاهش یافت ( $p < 0.05$ ) و این تغییر بیان تاییدی بر سست شدن اتصالات سلولی تحت تاثیر ژن *tsst-1* در رده سلولی PC3 بود. **نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که توکسین استفاده شده در این مطالعه می‌تواند چشم‌انداز جدیدی برای تحقیقات با هدف القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پروستات و کنترل سلول‌های سرطانی پروستات فراهم کند.

**واژگان کلیدی:** توکسین باکتریایی، توکسین *tsst-1*، رده سلولی PC3.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۲۳۴۵۶۵۴۳۲

پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

## Changes in the expression of genes related to cell junctions in the PC3 cell line in the presence of the *tsst-1* toxin gene of *Staphylococcus aureus*

Maryam Amiri Farsani<sup>1</sup>, Abbas Doosti<sup>2\*</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Bacterial toxins have therapeutic potential for cancer treatment. The aim of this study is to evaluate the expression changes of genes related to cell junctions in PC3 cells after the transfection of the *tsst-1* toxin gene of *Staphylococcus aureus* bacteria.

**Materials and Methods:** In this research study, PC3 cell line was used. After cell culture, staphylococcal toxin gene *tsst-1* was cloned in pcDNA3.1(+) vector and transfected into PC3 cells. Then, the correct function of the recombinant vector in these cells was confirmed. In the next step, the expression of *Integrin* and  $\beta$ -*catenin* genes was evaluated by real time RT-PCR method.

**Results:** The correct function of the vector in the cells was confirmed by PCR reaction. The expression of *Integrin* and  $\beta$ -*catenin* genes in the cells transfected with the recombinant vector decreased significantly ( $p < 0.05$ ) and this expression-change confirms the loosening of cell junctions under the influence of the *tsst-1* gene in PC3 cell line.

**Conclusion:** The obtained results show that the toxin used in this study can provide a new perspective for research aimed at inducing apoptosis in PC3 cancer cells and controlling prostate cancer cells.

**Keywords:** bacterial toxin, *tsst-1* toxin, PC3 cell line.

### مقدمه

توکسین‌های باکتری دارای پتانسیل درمانی برای درمان سرطان هستند. در چندین مطالعه (in vivo/in vitro) این سموم ظرفیت از بین بردن سلول‌های مورد مطالعه را به طور موثر نشان دادند. تعدادی از سموم باکتریایی مانند توکسین  $\alpha$  باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین باکتری کلسترییدیوم پرفرینجنس و استرپتولایزین O باکتری استرپتوکوکوس پیروجنس، برای درمان سرطان به کار گرفته شده‌اند. طی عفونت با سموم باکتریایی، سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود (۲) و (۱). استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن مهم انسانی، باعث ایجاد آپوپتوز در طول عفونت می‌شود. این باکتری، در برخی از بیماری‌ها مانند درماتیت آتوپیک و سپسیس بر شدت و نتیجه بیماری با القای آپوپتوز تاثیر می‌گذارد. بعضی از مطالعات گزارش داده‌اند که بیشتر توکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس منجر به آپوپتوز می‌شوند. به عنوان مثال، توکسین SEH باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های اپی‌تلیال پستان در گاو می‌شود (۴ و ۳). باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند پس از عفونت در بدن میزبان، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را ایجاد کند. این پروسه در سلول‌های بافت می‌تواند پاسخ ایمنی را از طریق تولید سیتوکین و تمایز سلول‌های لنفوسیت T ایجاد کند و این مطلب نشان می‌دهد که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌تواند بر پاتوژن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تاثیر بگذارد. چندین توکسین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از جمله  $\alpha$  توکسین و انتروتوکسین‌های استافیلوکوک (SEs) فعالیت پروآپوپتوتیک دارند. SE شامل حداقل ۱۰ عضو از جمله SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEI, SEH, SEG, SET و SER است (۴-۶). در میان شایع‌ترین سموم ترشح شده توسط *S. aureus*، توکسین تولید کننده سندرم شوک توکسینی نوع ۱ (TSST-1) که توسط ژن *tsst-1* کد می‌شود، قرار دارد. سندرم شوک سمی که توسط TSST-1 به وجود می‌آید با شروع کوتاه مدت تب بالا، اسهال، ورم ملتحمه و سردرد شروع می‌شود، در حالی که این ممکن است به سرعت منجر به کاهش فشار خون، شوک، اختلالات تنفسی، انعقاد داخل وریدی، ترومبوسیتوپنی شدید و اختلال عملکرد کلیه می‌شود. TSST-1 یک ماده سمی است که از سوپر آنتی‌ژن‌هایی با وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون تشکیل شده که در ۲۵-۵ درصد از گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس یافت می‌شود. این سم به نوبه خود باعث آزاد شدن سیتوکین‌های التهابی مختلف مانند اینترلوکین-۱ و ۲ و همچنین عامل نکروز تومور می‌شود و چندین هزار لنفوسیت T را فعال می‌کند. TSST-1 منطقه  $V\beta$

گیرنده‌های سلول‌های T را تحریک می‌کند بنابراین ۳۰-۵ درصد از سلول‌های کمکی T4 را فعال می‌کند (۸ و ۷). هدف از انجام این پژوهش بررسی تغییر بیان ژن‌های *Integrin* و  $\beta$ -catenin در رده سلولی سرطان پروستات پس از بیان ژن توکسین سندروم شوک سمی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود.

### مواد و روش‌ها

**تهیه پلاسمید:** پلاسمید نو ترکیب *tsstI*-pcDNA3.1(+) حامل ژن *tsst-I* طراحی و جهت سنتز به شرکت Generay Biotechnology (شانگهای، چین) سفارش داده شد. ژن *tsst-I* (با طول ۷۴۰ جفت باز) در ناحیه *EcoRV/NotI* کلون شد و برای بیان بهتر در میزبان یوکاریوتی توسط این شرکت بهینه‌سازی کدون صورت پذیرفت.

**تکثیر پلاسمید:** باکتری *E. coli* سویه TOP10 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری و در محیط کشت-Luria Bertani (LB) (سیگما، آلمان) کشت داده شد و سپس به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) انکوبه گردید. پلاسمید نو ترکیب نامبرده و پلاسمید خالی با استفاده از روش کلرید کلسیم و شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار (سیگما، آلمان)، حاوی آمپیسیلین (۳۰ میلی گرم در میلی لیتر) رشد کردند و انتخاب شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB Broth حاوی آمپیسیلین در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند. DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (فیورجین، تابوان) طبق دستورالعمل کیت، خالص سازی شد.

**کشت سلولی:** رده سلولی PC3 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری شد و در فلاسک کشت بافت T25 حاوی محیط RPMI 1640 (بیوایده، ایران) غنی شده با ۱۰ درصد سرم گاوی جنین (FBS) (بیوایده، ایران) و ۱۰۰ واحد آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین در هر ۱ میلی لیتر کشت شد. فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در شرایط ۵٪ CO<sub>2</sub> تا زمانی که سلول‌ها به تراکم ۷۰-۸۰ درصد برسند، انکوبه شد. در مجموع دو گروه سلولی مورد بررسی قرار گرفتند: سلول‌های PC3 ترنسفکت شده با پلاسمید *tsstI*-pcDNA3.1(+) و سلول‌های PC3 ترنسفکت شده با پلاسمید خالی. سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (اینویتروژن، آمریکا) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، با پلاسمیدهای نامبرده ترانسفکت شدند. به طور خلاصه،  $10^6 \times 0.3$  سلول در خانه‌های پلیت ۶ خانه کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت (هنگامی که سلول‌ها به تراکم ۵۰-۷۵ درصد رسیدند) مخلوط حجمی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (۷/۵ میلی گرم در هر چاهک) و پلاسمید (۲/۵ میلی گرم در هر چاهک) در حجم نهایی ۳۰۰  $\mu$ L از محیط کشت RPMI (بدون آنتی بیوتیک و FBS) به سلول‌ها افزوده شد. پلیت کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۴ ساعت انکوبه شد و سپس FBS به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت کشت مجدد به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط انکوبه شد. محیط کشت حاوی ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر نئومایسین برای غربالگری سلول‌های ترانسفکت شده از غیر ترانسفکت شده اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت سلول‌ها انکوبه شدند. سرانجام، سلول‌های هر گروه با استفاده از ۰/۲۵ درصد آنزیم Trypsin-EDTA (اینویتروژن، آمریکا) جدا شده و در محیط کشت با ۱۰٪ FBS کشت شدند.

**Reverse transcriptase PCR (RT-PCR):** RNA تام سلولی از سلول‌های ترنسفکت شده، توسط کیت استخراج RNA (RNX-plus، سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده به وسیله نانودراپ (ترموساینترفیک، آمریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از انجام *DNase Treatment* به منظور غیرفعال شدن آنزیم *DNase*، نمونه موجود به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سلسیوس گرما دهی شد. از EDTA (۲  $\mu$ L) EDTA (۵۰ mM) جهت محافظت از RNA در دمای بالا استفاده شد. سپس ۱ میکروگرم از RNA تام سلولی استخراج شده از هر گروه، ۱ میکرولیتر از oligoDt و random hexamer (۵۰  $\mu$ M) جهت سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. cDNA سنتز شده جهت واکنش RT-PCR و Real time PCR استفاده شد. واکنش RT-PCR جهت بررسی بیان شدن ژن *tsst-I* در سلول‌های ترنسفکت شده مورد استفاده قرار گرفت.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

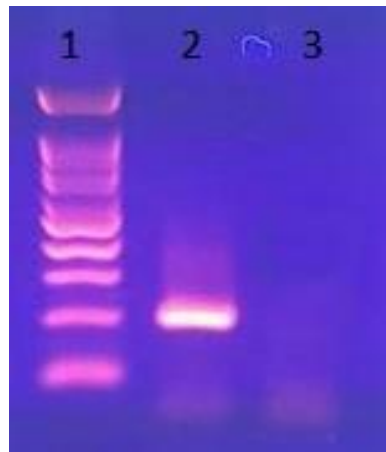
### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

**q-PCR:** از روش q-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های سلول‌های ترنسفورم شده با پلاسمید *pcDNA3.1(+)-tsstI* در مقایسه با سلول‌های ترنسفورم شده با وکتور خالی استفاده شد. ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. cDNA هر گروه در رقت سریال‌های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه گردید. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۳  $\mu\text{L}$  بود که حاوی: ۱  $\mu\text{L}$  از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر دو پرایمرهای F و R، و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر. همه واکنش‌ها به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سانتیگراد به ۹۵ درجه سانتیگراد (۱ درجه سانتیگراد در ثانیه) رسم شد. جهت محاسبه بیان ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم افزار Rotor-Gene Real-time analysis نسخه ۶ رسم شد. تغییرات نسبی بیان mRNA ها توسط روش لیواک  $2^{-DDCt}$  با مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد. با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism و آزمون‌های آماری t بیان ژن‌ها بررسی و مقایسه شد. مقدار  $P\text{-Value} \leq 0.05$ ، از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

### یافته‌ها

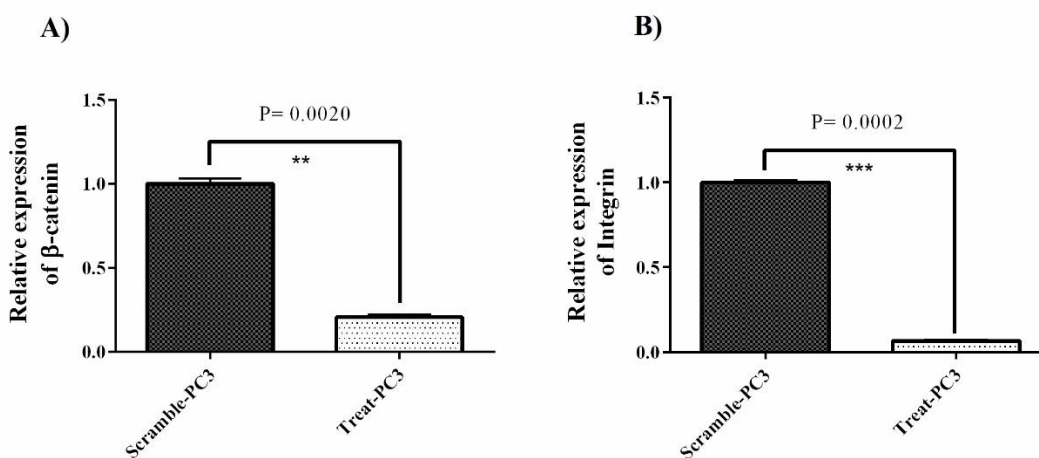
**تایید فرآیند کلونینگ و ساخت وکتور نو ترکیب:** صحت سنتز پلاسمید توسط شرکت سازنده با استفاده از توالی‌یابی DNA و هضم آنزیمی تایید شد. پس از انتقال پلاسمید نو ترکیب به *E. coli* سویه TOP10، صحت ورود پلاسمید توسط کشت کلنی‌ها بر روی آمپیسیلین تایید شد.

**تایید صحت لیپوفکشن:** در شرایط یکسان سلول‌های PC3 به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول پلاسمیدهای نو ترکیب *pcDNA3.1(+)-tsstI* را دریافت کردند (گروه تیمار) و گروه دوم پلاسمید خالی را دریافت نمود (گروه کنترل). مقاومت و زنده ماندن سلول‌های ترنسفکت شده با وکتورها در برابر آنتی‌بیوتیک نئومایسین، حضور وکتورها در سلول‌های مقاوم شده را تایید می‌کند. از سوی دیگر، انجام واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *tsstI* روی سلول‌های لیپوفکت شده سبب تشکیل باند ۲۰۷ جفت بازی گردید و صحت واکنش لیپوفکشن تایید شد (شکل ۱).



شکل ۱- محصولات RT-PCR. محصولات تکثیر یافته بر cDNA سلول‌های PC-3 ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب و خالی به منظور ارزیابی بیان ژن *tsst-I* بر روی ژل آگارز ۱ درصد. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت یکتا تجهیز آزما، ۱: باند مربوط به *tsst-I* (۲۰۷ bp) بر روی cDNA سلول *PC3- pcDNA3.1(+)-tsst-I*، ۲: پرایمر *tsst-I* بر روی سلول *PC3- pcDNA3.1(+)*

بررسی بیان ژن‌های مربوط به اتصالات سلولی: به منظور بررسی اتصالات سلولی، تغییر بیان ژن‌های *integrin* و  $\beta$ -*catenin* در سلول‌های تحت درمان با وکتور نوترکیب در مقایسه با سلول‌های تحت درمان با وکتور خالی بررسی شد. جهت بررسی اتصال سلول با فلاسک از ژن *integrin* و اتصال سلول با سلول مجاور از ژن  $\beta$ -*catenin* استفاده شد. مقایسه بیان ژن‌های *integrin* و  $\beta$ -*catenin* نشان داد که از نظر آماری در سلول‌های تحت درمان با ژن توکسین باکتریایی (*tsst-1*) کاهش بیان معنی‌داری را نشان دادند. نتایج مربوط به تغییر بیان دو ژن *integrin* و  $\beta$ -*catenin* در رده سلولی PC-3 تحت درمان با وکتور نوترکیب و خالی در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- مقایسه سطح بیان ژن‌های *Integrin* و  $\beta$ -*catenin* تغییر بیان در دو گروه ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب *tsst1*(+)-pcDNA3.1 در مقایسه با وکتور خالی در رده سلولی PC-3. A: کاهش بیان ژن  $\beta$ -*catenin* و B: کاهش بیان ژن *Integrin* پس از ترنسکشن وکتور نوترکیب.

### بحث

سرطان پروستات شایع‌ترین سرطان بدخیم در مردان است. به طور کلی از هر ۶ مرد ۱ نفر در طول زندگی خود به سرطان پروستات مبتلا خواهد شد و احتمال ابتلا با افزایش سن، افزایش می‌یابد. سالانه در دنیا بیش از ۶۷۰۰۰۰ مرد مبتلا به سرطان پروستات تشخیص داده می‌شود که حدود ۲۲۵۰۰۰ نفر آن در اروپا و ۲۴۰۰۰۰ نفر در آمریکا می‌باشد. در سراسر دنیا سرطان پروستات با ۹۱۴۰۰۰ مورد جدید (۱۴ درصد) و ۲۵۸۰۰۰ مورد مرگ (۶ درصد) در سال ۲۰۰۸، از نظر تعداد موارد تشخیصی دومین و ششمین علت منجر به مرگ را در بین سرطان‌های مردان دارد. بیش از نیمی از موارد و مرگ‌ها در کشورهای پیش‌تر توسعه‌یافته اتفاق می‌افتد. میزان بروز سرطان پروستات در سراسر دنیا نزدیک به ۵۰ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر جمعیت است که این میزان بین ۳/۹ در هند تا ۱۷۸/۸ (در ۱۰۰ هزار نفر) در سیاه‌پوستان آمریکا متغیر است. طبق گزارش سال ۲۰۰۸، میزان بروز استاندارد شده سنی (ASR) در کشورهای در حال توسعه ۱۱/۹، در کشورهای پیشرفته ۶۱/۷ و در دنیا ۲۷/۹ است. علی‌رغم کاهش میزان بروز و مرگ از سرطان پروستات در ایالات متحده و برخی از دیگر کشورهای غربی، میزان بروز و مرگ این سرطان در کشورهای کمتر توسعه‌یافته و در حال توسعه در حال افزایش می‌باشد. میزان سرطان پروستات در کشورهای آسیایی بسیار کمتر از گزارش شده از جمعیت غربی است ولی با این حال این میزان نیز در کشورهای آسیایی در حال افزایش است. میزان بروز سرطان پروستات در بین کشورها و جمعیت با نژادهای مختلف، تفاوت زیادی دارد و از ۷-۴ مورد در صد هزار نفر جمعیت کشورهای آسیایی تا ۱۰۰-۷۰ مورد در صد هزار نفر جمعیت در کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی متغیر است و برخی از مطالعات تفاوت را از یک منطقه جغرافیایی تا منطقه دیگر تا ۹۰ برابر ذکر کرده‌اند. در ایران شیوع سرطان پروستات، بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۰، ۱/۵ در هر صد هزار نفر در سال بیان شده است و این در حالی است که سیستم ثبت سرطان همه موارد را ثبت نکرده و به عبارتی مقادیر

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

گزارش شده از آمارهای واقعی کمتر بوده است. سرطان پروستات در ایران نیز همانند سایر کشورهای در حال توسعه، در حال افزایش است. سرطان پروستات هشتمین علت مرگ در اثر سرطان در ایران است (۹).

سموم باکتریایی توانایی بالایی در مهار مسیرهای سرطانی دارند. برخی مطالعات گزارش کردند که سموم باکتریایی در سرطان درمانی موثر هستند. از سموم باکتریایی برای القای آپوپتوز استفاده می‌شود و در حال حاضر در فرآیندهای بیماری‌ها مهم تلقی می‌شوند (۱۱ و ۱۰). از جمله مطالعات مربوط به توکسین‌های باکتریایی بر روی سلول‌های سرطانی می‌توان به مطالعات زیر اشاره کرد:

یو (۲۰۱۳) اثرات توکسین SEB و  $\alpha$ -toxin باکتری استافیلو کوکوس اورئوس را بر روی سلول‌های ECV304 مطالعه کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که توکسین‌های مورد استفاده سبب القای آپوپتوز، افزایش بیان TNF- $\alpha$  و همچنین فعال شدن کاسپاز ۳ و ۸ می‌شوند. یافته‌ها بیانگر آن است که توکسین‌های SEB و  $\alpha$ -toxin از طریق مسیر آپوپتوز بیرونی باعث القای آپوپتوز می‌شوند. این تحقیق نتایج مشابه مطالعه ما ارائه کرده است (۱۲).

واکسن ژنی حاصل از انتهای C توکسین tetanus همراه اپی‌توپ HLA-A2، پاسخ‌های ایمنولوژیک موثر در سرطان پروستات را ایجاد کرد (۱۳).

تحقیقات نشان داده اند که انتروتوکسین *Clostridium perfringens* می‌تواند به سلول‌های PC-3 نفوذ کرده و سمیت سلولی را در سلول‌های سرطانی پروستات انسان ایجاد کند (۱۴).

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۶ توسط Pahle و Walther به انجام رسیده به درمان سرطان با القای خودکشی سلول با روش ژن درمانی توسط توکسین‌های باکتریایی پرداخته شده است. در القای آپوپتوز سلولی با روش ژن تراپی؛ ابتدا پروتئین تبدیل شونده به آنزیم (درمان با آنزیم تولید شده توسط ژن) به کار برده می‌شود تا پرودراگ را در داخل سلول از مواد غیر سمی به سمی متابولسم کند، این فرآیند منجر به خودکشی سلول‌های تومور می‌گردد. در این تحقیق به سموم باکتری‌ها و نقش آن‌ها در عملکرد بهینه فرآیند ژن درمانی پرداخته شده است (۱۵).

در این مطالعه نیز تاثیر بیان توکسین TSST-1 را در تغییر بیان ژن‌های *Integrin* و  $\beta$ -catenin در رده سلولی PC-3 مورد بررسی قرار گرفت. دو پلاسمید pcDNA3.1(+)-*tsst-1* و پلاسمید خالی pcDNA3.1(+)(به عنوان گروه کنترل) به صورت جداگانه در سلول‌های PC-3 ترنسفکت گردیدند. سپس تغییر بیان ژن‌های نامبرده در رده سلولی ناشی از بیان توکسین بررسی گردید. نتایج آنالیز آماری نشان داد که بیان هر دو ژن *Integrin* و  $\beta$ -catenin تحت تاثیر توکسین کاهش بیان معنی‌داری پیدا کرده است و این موضوع نشان دهنده این است که بیان توکسین TSST-1 سبب کاهش اتصالات سلولی در رده PC3 گردیده است.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-*tsst-1* حامل ژن توکسین استافیلوکوکی توانایی تاثیر بر روی سلول‌های رده سرطانی PC-3 را دارا است. به این ترتیب که، نتایج بررسی بیان ژن‌های مربوط به اتصالات سلولی نشان دهنده کاهش بیان این ژن‌ها در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور نوترکیب در مقابل وکتور خالی بود. این امر موجب به سست شدن اتصالات سلولی در رده PC-3 شد. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق فوق امید است که این مطالعه راهکاری نوین در جهت مقابله با سرطان باشد.



## References:

1. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2010; 10(11): 785-94.
2. Pahle J, Menzel L, Niesler N, Kobelt D, Aumann J, et al. Rapid eradication of colon carcinoma by *Clostridium perfringens* Enterotoxin suicidal gene therapy. *BMC cancer*. 2017; 17: 1-4.
3. Liu Y, Chen W, Ali T, Alkasir R, Yin J, et al. Staphylococcal enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells in vitro. *Toxins*. 2014; 6(12): 3552-67.
4. Zhang X, Hu X, Rao X. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins. *Microbiological research*. 2017; 205: 19-24.
5. Torchinsky MB, Garaude J, Blander JM. Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger. *Current opinion in immunology*. 2010; 22(1): 55-62.
6. Ulett GC, Adderson EE. Regulation of apoptosis by gram-positive bacteria: mechanistic diversity and consequences for immunity. *Current immunology reviews*. 2006; 2(2): 119-41.
7. Badamchi A, Javadinia S, Soboti B, Tabatabaie A. Detection of *tstH* Gene in *Staphylococcus aureus* Isolates from Hospitalized Burnt Children. *Journal of Medical Bacteriology*. 2017; 6(1-2): 1-7.
8. Andrey DO, Jousselin A, Villanueva M, Renzoni A, Monod A, et al. Impact of the regulators SigB, Rot, SarA and sarS on the toxic shock Tst promoter and TSST-1 expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2015; 10(8): e0135579.
9. Rafimanesh H, Ghoncheh M, Salehinia H, Mohammadian Hafashjani A. Epidemiology of prostate cancer and its incidence trends in Iran. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2016; 23(2): 320-7.
10. Petersson K, Pettersson H, Skartved NJ, Walse B, Forsberg G. Staphylococcal enterotoxin H induces V $\alpha$ -specific expansion of T cells. *The Journal of Immunology*. 2003; 170(8): 4148-54.
11. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(2): 332-9.
12. Yu FL, Liu TT, Zhu X, Yang WX, Zhang T, et al. Staphylococcal enterotoxin B and  $\alpha$ -toxin induce the apoptosis of ECV304 cells via similar mechanisms. *Molecular medicine reports*. 2013; 8(2): 591-6.
13. Chudley L, McCann K, Mander A, Tjelle T, Campos-Perez J, et al. DNA fusion-gene vaccination in patients with prostate cancer induces high-frequency CD8+ T-cell responses and increases PSA doubling time. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012; 61: 2161-70.
14. Maeda T, Murata M, Chiba H, Takasawa A, Tanaka S, et al. Claudin-4-targeted therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin for prostate cancer. *The Prostate*. 2012; 72(4): 351-60.
15. Pahle J, Walther W. Bacterial toxins for oncoleaking suicidal cancer gene therapy. *Current Strategies in Cancer Gene Therapy*. 2016; 209: 95-110.

## اثر سایتوتوکسیسیستی سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT-29)

ایمان دهقانی<sup>۱</sup>، زهرا بم زاده<sup>۲\*</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>۳</sup>، لیلا روحی<sup>۴</sup>

۱. دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۴. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

**مقدمه و هدف:** سرطان روده یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر انسان می باشد. به همین دلیل یافتن مواد جدید با منشا طبیعی از باکتریهای بومی احساس می شود. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر سایتوتوکسی سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT-29) انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا سویه *L. paracasei* LB12 در محیط MRS براث کشت داده شد. سپس در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت (مایع رویی) جداسازی و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. در نهایت سوپرناتانت لیوفیلیزه شد. برای بررسی فعالیت سایتوتوکسیک، رده سلولی HT-29 در غلظتهای مختلف سوپرناتانت سویه *L. paracasei* در مدت زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ تیمار شد و سپس میزان توان زیستی توسط تست MTT بررسی شد.

**یافته‌ها:** تست MTT با گرمخانه گذاری ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعته سلول های HT-29 با تیمار (سوپرناتانت سویه *L. paracasei*) نشان داد که میزان توان زیستی وابسته به دوز و زمان است و با افزایش غلظت، میزان توان زیستی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار نشان دادند ( $P < 0.05$ ). بیشترین تأثیر سوپرناتانت مربوط به غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلولها بود.

**نتیجه گیری:** نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن می باشد که متابولیت‌های *L. paracasei* LB12 قادر است رشد سلولهای آدنوکارسینومای کولورکتال را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد. به طوری که با افزایش دوز تیمار و زمان این تاثیر افزایش می یابد.

**واژگان کلیدی:** *Lacticaseibacillus paracasei* LB12، تست MTT، پروبیوتیک، HT-29

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۹۰۲۲۹۳۹

پست الکترونیک: Bamzadehz@yahoo.com

## Cytotoxicity effect of *Lacticaseibacillus paracasei* supernatant on colon cancer cell line (HT-29)

Iman Deghani Champiri<sup>1</sup>, Zahra Bamzadeh<sup>\*1,2</sup>, Ebrahim Rahimi<sup>3</sup>, Leila Rouhi<sup>4</sup>

1. PhD in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Food Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Introduction and purpose:** Intestinal cancer is one of the most important causes of human mortality. For this reason, it is felt to find new materials with natural origin from native bacteria. This study was conducted with the aim of investigating the cytotoxic effect of *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 supernatant on colon cancer cell line (HT-29). **Materials and methods:** First, *L. paracasei* strain LB12 was cultured in MRS broth medium. Then it was centrifuged at 5000 rpm for 15 minutes and the supernatant was separated and passed through a 0.22 mm filter. Finally, the supernatant was lyophilized. To investigate the cytotoxic activity, HT-29 cell line was treated with different concentrations of *L. paracasei* strain supernatant for 24, 48, 72 hours, and then the biological potency was checked by MTT test.

**Findings:** MTT test with 24, 48 and 72 hours incubation of HT-29 cells with treatment (*L. paracasei* LB12 supernatant) showed that the amount of biological potency is dependent on dose and time and with increasing concentration, the amount of biological potency compared to The control group showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ). The greatest effect of the supernatant was related to the concentration of 20 mg/ml in 72 hours after the treatment of the cells.

**Conclusion:** The results obtained from this test indicate that *L. paracasei* metabolites can reduce the growth of colorectal adenocarcinoma cells in a dose- and time-dependent manner. So that this effect increases with the increase of treatment dose and time.

**Keywords:** *Lacticaseibacillus paracasei* LB12, MTT test, probiotic, HT-29

### مقدمه

سرطان کولون یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در جهان است که در ایران، در مردان رتبه سوم و در زنان رتبه چهارم را به خود اختصاص داده است. شواهد نشان دهنده این است که رژیم غذایی ممکن است از افراد در برابر ابتلا به سرطان روده بزرگ محافظت کند (۱). علاوه بر این، میکرو فلور روده بزرگ در علت سرطان روده نقش دارد، و می توان آنها را با مکمل های پروبیوتیک تعدیل کرد (۲). پروبیوتیک به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده تعریف می‌شود که در صورت مصرف به مقدار کافی، برای میزبان مفید است (۳). به طور کلی، پروبیوتیک با بهبود تعادل میکروبی روده، بهبود عملکرد ایمنی بر میزبان تأثیر مفیدی می گذارد (۴). لاکتوباسیل ها و بیفیدوباکتری ها برجسته ترین باکتری های پروبیوتیک هستند. این باکتریها گرم مثبت، کاتالاز منفی و فاقد اسپور بوده و دارای خصوصیتی چون تحمل اسیدهای صفراوی، تولید اسیدهای ارگانیک، ترکیبات ضد میکروبی و تجمع پذیری با باکتریهای بیماریزا و ممانعت از اتصال باکتریهای بیماریزا به سطوح دستگاه گوارش می باشند همچنین توجه تحقیقات فزاینده ای را در پیشگیری از سرطان به خود جلب کرده اند (۵). تعداد زیادی از داده‌های به دست آمده از مطالعات آزمایشگاهی و مطالعات مدل حیوانی تأیید می‌کنند که لاکتوباسیل‌ها ویژگی محافظت کننده دارند که می توانند با ژنوتوکسیک مقابله کنند که نقش بالقوه ای در القای سرطان روده بزرگ دارد (۶ و ۸).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که علاوه بر باکتری‌های پروبیوتیک، محصولات متابولیکی باکتری‌های پروبیوتیک، از جمله سوپرناتانت‌های بدون سلول باکتری (۹)، باکتری‌های غیرفعال (باکتری‌های کشته شده در اثر حرارت) (۱۰)، عصاره‌های اگزو پلی ساکاریدها (۱۱)، اجزای دیواره سلولی باکتریایی (۱۲)، عصاره سلولی (۱۳) و سایر اجزای سلولی دارای فعالیت های درمانی، ضد توموری و ضد سرطانی بالقوه هستند و همچنین قادر به تحریک سیستم ایمنی هستند (۱۴).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

طبق مطالعات قبلی، مزایای متابولیت های آزاد شده در مایع رویی باکتری های پروبیوتیک می تواند ضد التهاب، سیتوتوکسیک، آنتی اکسیدان و افزایش عملکرد سیستم ایمنی در برابر سلول های سرطانی و همچنین سهولت استفاده، پایداری و طول عمر بیشتر این محصولات متابولیک در مقایسه با باکتری های پروبیوتیک باشد (۱۵ و ۱۷). همچنین یک راهکار درمانی جدید و موثر برای درمان آدنوکارسینومای کولورکتال، برای کشف ترکیبات جدید، که دارای خاصیت ضدسرطانی با عوارض جانبی کمتر صورت گرفته است مانند برخی از باکتری ها که متابولیت های مختلفی تولید می کنند و تاثیر آن ها روی سلول های سرطانی با القا آپوپتوز نشان داده شده است اما همچنان در ابتدای راه بکارگیری اینگونه ترکیبات هستیم (۱۸ و ۱۹).

با هدف پاسخگویی به تقاضای روزافزون افراد و بازار، سوبه های جدید با عملکرد بالا همیشه مورد توجه بوده است در مطالعات گذشته ما، باکتری اسید لاکتیک بومی استان چهارمحال بختیاری برای استفاده احتمالی به عنوان پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت (۲۰). در تحقیق حاضر در تکمیل تحقیق قبل باکتری *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 که دارای پتانسیل بالای پروبیوتیک بود انتخاب و اثر سایتوتوکسیسیته متابولیت این سوبه بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT-29) مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش ها

#### کشت سوبه *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 و آماده سازی سوپرناتانت

در مطالعه حاضر از یک باکتری بومی ایران که طی پژوهش پیشین از لبنیات سنتی استان چهارمحال و بختیاری جداسازی شد و دارای خواص پروبیوتیک بود استفاده گردید. باکتری *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 با کد دسترسی OP286576.2 در پایگاه GenBank ثبت شده است (۲۰).

سوبه *L. paracasei* LB12 با غلظت  $10^3 \times 3/1$  در ۳۰۰ میلی لیتر محیط MRS برات (de MAN, ROGOSA and SHARPE) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت شرایط بی هوازی (جار بی هوازی) گرمخانه گذاری شد. سپس در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت (مایع رویی) جداسازی و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. در نهایت سوپرناتانت درون ویال های لیوفیلیزه ریخته شد و توسط دستگاه لیوفیلیزاتور، به مدت ۸ ساعت فریز و سپس خشک شد. نمونه های تهیه شده تا زمان استفاده برای بررسی تاثیرات سایتوتوکسیک در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۱ و ۲۲).

#### گروه های تست

برای بررسی میزان تاثیر سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 بر سلول های سرطان کولون HT-29 در معرض غلظت های مختلف سوپرناتانت قرار گرفتند.

گروه یک: سلول ها در معرض غلظت ۵ میلی گرم / میلی لیتر سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 قرار گرفتند.

گروه دو: سلول ها در معرض غلظت ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 قرار گرفتند.

گروه سه: سلول ها در معرض غلظت ۱۵ میلی گرم / میلی لیتر سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 قرار گرفتند.

گروه چهار: سلول ها در معرض غلظت ۲۰ میلی گرم / میلی لیتر سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 قرار گرفتند.

گروه کنترل: سلول ها در معرض محیط کشت DMEM قرار گرفتند

#### کشت سلولی

در این پژوهش رده سلولی سرطانی روده HT-29 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید سلول های HT-29 در محیط کشت DMEM (ایران، Bioidea) حاوی ۱۰ درصد FBS (آمریکا، Gibco) و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین (Sigma-

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

Aldrich، آمریکا) کشت داده شدند. سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت ۹۵ درصد گرمخانه گذاری شدند (۲۳).

#### بررسی سمیت سلولی

یکی از روش های ارزیابی میزان سمیت یک ترکیب روی سلول، تست MTT است. MTT که یک نمک تترازولیوم<sup>۲۵</sup> زرد رنگ است، جذب میتوکندری سلول های فعال شده و در اثر فعالیت آنزیم های دهیدروژناز، تولید بلور فورمازان<sup>۲۶</sup> بنفش رنگ می کند که در حلالی مانند دی متیل سولفوکساید حل شده و در نهایت جذب نوری محلول بدست آمده را می توان در طول موج ۵۷۰ نانومتر خواند و به کمک منحنی استاندارد داده ها را تفسیر کرد.

برای انجام تست MTT، سلول ها با تراکم ۵×۱۰<sup>۳</sup> سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه نگهداری شدند سپس محیط کشت روی سلول ها خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از (گروه های تست یک تا چهار) از غلظت های مختلف متابولیت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم / میلی لیتر و سلول ها برای زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و هر زمان سه تکرار در شرایط کشت نگهداری شدند. روز اول سلول های زمان ۷۲ ساعت، روز دوم زمان ۴۸ ساعت و روز سوم زمان ۲۴ ساعت توسط متابولیت با همان میزان ذکر شده تیمار شدند. در روز چهارم پس از اتمام زمان ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت کشت به مدت ۳ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از گذشت سه ساعت، مایع رویی پلیت ها خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید و پیتاژ انجام شد. در نهایت، میزان رنگ تولید شده که نشان دهنده سلول های زنده است، توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد (۲۴ و ۲۶).

#### تجزیه و تحلیل آماری

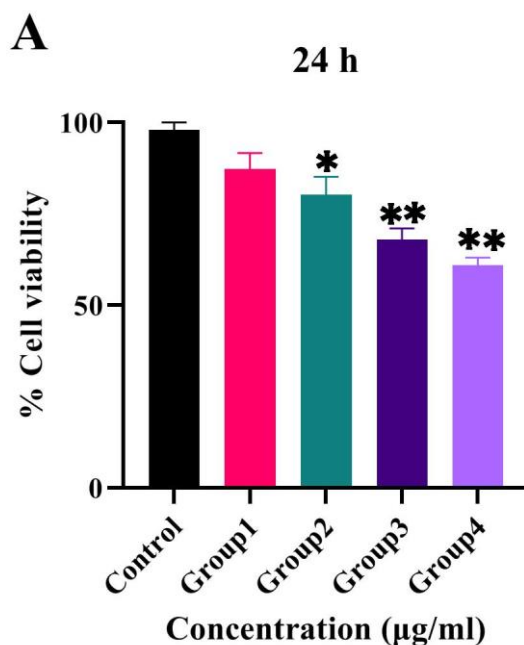
آزمایشات بررسی سمیت سلولی با سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین ذکر شده است. برای تحلیل یافته های الایزا و بقای سلولی از نرم افزار SPSS-17 به روش سوکی معنی دار بودن یافته ها از  $p < 0.05$  اسفاده شد.

#### نتایج

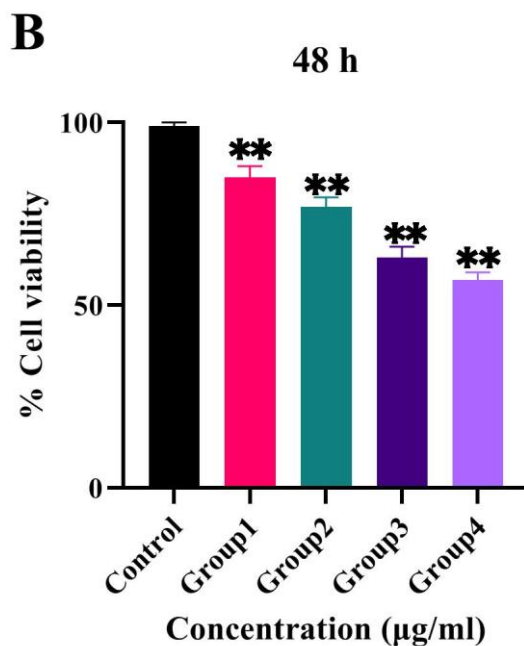
توان زیستی سلول های ردهی HT-29 تیمار شده با غلظت های مختلف سوپرناتانت LB12 *Lactocaseibacillus paracasei* (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم / میلی لیتر)، پس از گذشت زمان های سه گانه گرمخانه گذاری (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن می باشد که سوپرناتانت LB12 *Lactocaseibacillus paracasei* قادر است رشد سلول های ردهی HT-29 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد. به طوری که با افزایش زمان تیمار و افزایش دوز تیمار از درصد سلول های زنده در گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل کاهش میابد. (تمودار ۱ و ۲ و ۳).

<sup>25</sup> Tetrazole

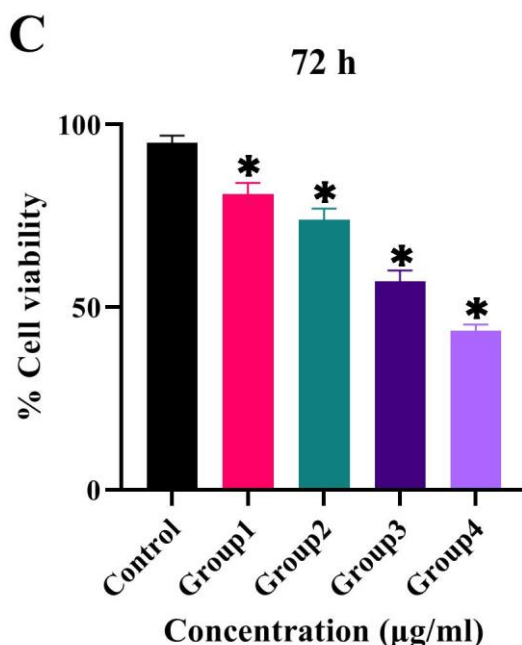
<sup>26</sup> Formazan



نمودار ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های *Lactocaseibacillus paracasei* LB12 بر توان زیستی رده سلول‌های HT-۲۹ در مدت زمان گرمخانه گذاری ۲۴ ساعته، ( $P \leq 0.05$ ،  $P \leq 0.01$ ، \*، \*\* اختلاف معنادار با گروه کنترل)



نمودار ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های *Lactocaseibacillus paracasei* LB12 بر توان زیستی رده سلول‌های HT-۲۹ در مدت زمان گرمخانه گذاری ۴۸ ساعته، ( $P \leq 0.05$ ،  $P \leq 0.01$ ، \*، \*\* اختلاف معنادار با گروه کنترل)



نمودار ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 بر توان زیستی رده سلول‌های HT-29 در مدت زمان گرمخانه گذاری ۲۴ ساعته، ( $P \leq 0.05$ ،  $P \leq 0.001$ ، \*، \* اختلاف معنادار با گروه کنترل)

نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن می باشد که متابولیت‌های *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 قادر است رشد سلولهای آدنوکارسینومای کولورکتال را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد. به طوری که با افزایش دوز تیمار و زمان این تاثیر افزایش میابد و نتایج تست بر اساس نتایج ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار می باشد که در نمودار (۱-۳) نشان داده شده است.

در زمان ۲۴ ساعت تمام غلظت‌ها میزان بقا رده سلولی HT-29 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش داد که همه تیمارها نسبت به کنترل معنادار بودند ( $P < 0.0001$ ).

در زمان ۴۸ ساعت در همه غلظت‌ها میزان بقا رده سلولی HT-29، وابسته به دوز و زمان کاهش پیدا کرد که نسبت به کنترل معنادار بود ( $P < 0.0001$ ).

در زمان ۷۲ ساعت در تمام غلظت‌ها میزان بقا رده سلولی HT-29، وابسته به دوز و زمان کاهش پیدا کرد که نسبت به کنترل معنادار بودند ( $P < 0.05$ ).

#### بحث

در این تحقیق از سویه *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 که یک سویه بومی ایران بوده و از لبنیات سنتی استان چهارمحال و بختیاری جدا شده و دارای ویژگی های منحصر به فرد پروبیوتیک بود در تحقیق گذشته ما جدا شده استفاده گردید (۲۰). میزان اثر سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 روی سلول های سرطانی HT-29 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که توانایی مهار رشد سلول های سرطانی کولون را دارد.

سرطان تولید و رشد بیش از حد و بدون برنامه سلول است. که در نتیجه اختلال در مکانیسم‌های رشد سلول و آپوپتوز ایجاد می‌شود حتی با پیشرفت علم همچنان سرطان به عنوان عامل مهم در مرگ و میر شناخته می‌شود. به طور میانگین سالانه بیش از ۴۵ میلیون

بیمار جدید سرطانی تشخیص داده می‌شود و حدوداً ۶/۶ میلیون نفر به علت سرطان جان خود را از دست می‌دهند. سرطان روده یکی از سه سرطان کشنده در دنیا به شمار می‌رود (۲۷).

بسیاری از عوامل درمانی سرطان به دلیل اثرات سمی آنها بر سلول‌ها و بافت‌های طبیعی بدن، محدود شده است بر خلاف عوامل درمانی چون شیمی درمانی، پروبیوتیک‌ها و ترکیبات مشتق از آنها سلول‌های توموری را بدون آسیب رساندن به سلول‌های طبیعی و سایر عوارض جانبی از بین می‌برند. باکتری‌های خانواده لاکتوباسیلوسه به طور رایج به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند. ویژگی‌های تنظیم‌کنندگی و تحریک‌کنندگی این باکتری‌ها بر سیستم ایمنی میزبان به خوبی در مطالعات گذشته مشخص گردیده است (۲۸ و ۲۹).

تست MTT به عنوان تستی برای بررسی میزان بقاء سلول یا بررسی اثر سمیت داروها بر روی سلول است که با اثر روی اندامک‌های سلولی می‌تواند بین سلول مرده و زنده تمایز ایجاد کند (۳۰).

در پژوهش حاضر، اثر سائیتوتوکسیک سوپرناتانت *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 بر روی رده سلولی HT-29 بررسی شد. نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن می‌باشد که متابولیت‌های *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 قادرند رشد سلول‌های آدنوکارسینوما کولورکتال را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهند. به طوری که با افزایش دوز تیمار و افزایش زمان تیمار از درصد سلول‌های زنده در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل کاسته می‌شود.

در تحقیق شهنیانی و همکاران، تاثیر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس رامنسوس بر روی رده سلولی HT-29 ارزیابی و بررسی شد. این باکتری بر روی رده سلولی HT-29 در روند وابسته به زمان و دوز مانع از تکثیر شد (۳۱).

در پژوهش صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۴ کاهش درصد بقاء در رده سلولی HT-29 در ۴۸ ساعت با غلظت‌های (۰/۲۵ و ۰/۱ و ۰/۰۵) بررسی شد نتیجه درصد زیستایی بر روی رده سلولی HT-29 در بیشترین غلظت توسط لاکتوباسیلوس پلانتروم ۵۰ درصد و لاکتوباسیلوس رامنسوس ۶۲/۷ درصد گزارش شد. اثر سمیت باکتری‌های مورد تحقیق وابسته به دوز نبود و هیچگونه تفاوت معنی داری بین غلظت‌ها در کاهش درصد بقاء مشاهده نشد (۳۲).

پارسا سرشت و همکاران در پژوهشی در سال ۲۰۱۳ به بررسی تاثیر متابولیت‌های لاکتوباسیلوس رامنسوس بر روی رده سلول سرطانی CacoII پرداختند و نشان دادند که متابولیت‌های لاکتوباسیلوس رامنسوس در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میلی گرم / میلی لیتر بترتیب ۸/۶۰، ۵/۷۲ و ۱/۸۲ درصد رشد سلول‌ها CacoII را مهار کردند است (۳۳).

پاسار و همکاران در سال ۲۰۱۶ سوپرناتانت سودوموناس *UW4. Sp* را با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلولی آدنوکارسینوما پستان بررسی کردند اثر سوپرناتانت وابسته به غلظت و زمان بود به طوری که بیشترین اثر در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر و زمان ۷۲ ساعت بود (۳۴).

سلطان دلال و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر غلظت‌های مشابه این تحقیق را روی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی سلول‌های سرطانی را بررسی کردند. اثر سمیت سلولی در بهترین شرایط ۳۸ درصد بود (۳۵). که این نیز گواهی بر میزان اثر بالای سوپرناتانت بررسی شده در این پروژه می‌باشد. اثر سمیت سلولی قابل توجه متابولیت *Lacticaseibacillus paracasei* به دست آمده در این پروژه در مقایسه با سایر بررسی‌ها، شاید بتوان گفت که متابولیت‌ها ی تولید شده، وابسته به سویه است و جداسازی سویه‌های جدید از منابع لبنی بومی امکان دستیابی به متابولیت‌های جدید و موثر را افزایش می‌دهد و در نتیجه اثر سمیت سلولی بسیار مناسب بدست آمده را می‌توان توضیح داد. لذا نتایج به دست آمده طی پروژه حاضر میتواند احتمال فعالیت بالای ضدسرطانی پروبیوتیکها تایید نماید.

### نتیجه گیری

طی قرن‌ها، LAB به طور سنتی توسط اجداد ما در غذاهای سنتی و بومی حفظ شده‌اند. و حالا با پیشرفت علم و دانش وظیفه ما است که این باکتری‌های منحصر به فرد برای مقاصد جدیدتر مورد بررسی قرار بگیرند و به عنوان یک راه درمانی مناسب برای سرطان استفاده گردند. سوپرناتانت باکتری *Lacticaseibacillus paracasei* LB12 دارای پتانسیل بالایی برای مهار رشد



سلول‌های سرطانی در رده سلولی سرطان کولون HT-29 است. با توجه به اینکه ویژگی و خواص باکتری‌های پروبیوتیک وابسته به جنس و سویه است، این باکتری‌های بومی می‌توانند به عنوان مکمل‌های غذایی کاربردی در درمان و پیشگیری از سرطان مورد استفاده قرار گیرند.

#### References:

1. Farhood B, Raei B, Malekzadeh R, Shirvani M, Najafi, M, Mortezaazadeh T. A review of incidence and mortality of colorectal, lung, liver, thyroid, and bladder cancers in Iran and compared to other countries. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 2019; 23(1), 7-15.
2. Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Zali MR. Prognostic factors in 1,138 Iranian colorectal cancer patients. *International journal of colorectal disease*, 2008; 23, 683-688.
3. Farnworth E. R. The evidence to support health claims for probiotics. *The Journal of Nutrition*, 2008; 138(6), 1250S-1254S.
4. Azcárate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer?. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011; 301(3), G401-G424.
5. Lukjancenکو O, Ussery DW, Wassenaar TM. Comparative genomics of Bifidobacterium, Lactobacillus and related probiotic genera. *Microbial ecology*, 2012; 63, 651-673.
6. Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic Lactobacillus casei and Lactobacillus rhamnosus GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutrition and cancer*, 2012; 64(6), 871-878.
7. Nozari S, Faridvand Y, Etesami A, Ahmad Khan Beiki M, Miresmaeili Mazrakhondi, S. A., & Abdolalizadeh, J. Potential anticancer effects of cell wall protein fractions from Lactobacillus paracasei on human intestinal Caco-2 cell line. *Letters in applied microbiology*, 2019; 69(3), 148-154.
8. Hosseini SS, Goudarzi H, Ghalavand Z, Hajikhani B, Rafeieiatani Z, Hakemi-Vala, M. Anti-proliferative effects of cell wall, cytoplasmic extract of Lactococcus lactis and nisin through down-regulation of cyclin D1 on SW480 colorectal cancer cell line. *Iranian Journal of Microbiology*, 2020; 12(5), 424.
9. De Marco S, Sichetti M, Muradyan D, Piccioni M, Traina G, Pagiotti R, et al. Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2018; 2018: 1756308.
10. Rasuli E, Tafvizi F, Tajabady Em. Antiproliferation Effect of Heat Killed Indigenous Probiotic Bacteria on AGS Cell Line. *J Appl Microbiol Food Ind*. 2017;3(1):42-52.
11. Mojibi P, Tafvizi F, Torbati MB. Cell-bound exopolysaccharide extract from indigenous probiotic bacteria induce apoptosis in HT-29 cell line. *Iran J Pathol*. 2019;14(1):41.
12. Fortin O, Aguilar-Uscanga B, Vu KD, Salmieri S, Lacroix M. Cancer Chemopreventive, Antiproliferative, and Superoxide Anion Scavenging Properties of Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae var. boulardii Cell Wall Components. *Nutr Cancer*. 2018;70(1):83-96.
13. S AG, A HA. Potential anticancer activities of Rhus coriaria (sumac) extract against human cancer cell lines. *Bioscie Rep*. 2021;41(5): BSR20204384

14. Ansari R, Mahdavinia M, Sadjadi A, Nouraie M, Kamangar F, Bishehsari F, Fakheri H, Semnani S, Arshi S, Zahedi MJ, Darvish-Moghadam S, Mansour-Ghanaei F, Mosavi A, Malekzadeh R. Incidence and age distribution of colorectal cancer in Iran: results of a population-based cancer registry. *Cancer Lett.* 2006;240(1):143- 7.
15. Uronis JM, Mühlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One.* 2009;4(6):e6026.
16. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One.* 2011;6(5):e20447.
17. Mahmoudi Aslzadeh H, Fazeli M, Eaidi A, Samadi N, Jamalifar H, Parsaseresht L. Study of probiotic effect of *Bifidobacterium bifidum* on CacoII cancer cell line. *Iran J Biol.* 2013; 26(3): 378-85
18. Zheng DW., Chen Y, Li ZH, Xu L, Li CX, Li B, et al. Optically-controlled bacterial metabolite for cancer therapy. *Nature communications*, 2018; 9(1), 1680.
19. Chen, C., & Li, H. The inhibitory effect of gut microbiota and its metabolites on colorectal cancer. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023; 30(11), 1607.
20. Dehghani Champiri I, Bamzadeh Z, Rahimi E, Rouhi, L. Lacticaseibacillus paracasei LB12, a Potential Probiotic Isolated from Traditional Iranian Fermented Milk (Doogh). *Current Microbiology*, 2023; 80(10), 333.
21. McConville P, Elliott WL, Kreger A, Lister R, Moody JB, Trachet E, et al. Preclinical models of tumor growth and response. In *Vivo Imaging of Cancer Therapy*: Springer; 2007: 13-32.
22. Maddox AD. Mechanisms of intracellular pH regulation in ciliated tracheal epithelial cells: University of Aberdeen (United Kingdom); 1999: U112227
23. Hwang JT, Ha J, Park IJ, Lee SK, Baik HW, et al. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer letters*, 2007; 247(1), 115-121.
24. Larki R, Rouhi L, Hossein Hejazi S. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of gallic acid on the breast adenocarcinoma cell lines SKBR3 versus normal fibroblast cells (HU-02). *Tehran University Medical Journal.* 2018;76(3).
25. Rasuli E, Tafvizi F, Tajabadi EM Antiproliferation effect of heat killed indigenous probiotic bacteria on AGS cell line." (2017): 42-52.
26. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research.* 1988;48(3):589-601.
27. Daniluk U. Probiotics, the new approach for cancer prevention and/or potentialization of anti-cancer treatment. *J Clin Exp Oncol.* 2012;1:2.
28. De Leblanc, A. D. M., Matar, C., & Perdigón, G. The application of probiotics in cancer. *British Journal of Nutrition*, 2007; 98(S1), S105-S110.
29. Şener D, Bulut HN, Bayir AG. Probiotics and relationship between probiotics and cancer types. *Bezmialem Science*, 2021; 9(4), 490.
30. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria–A review. *Acta histochemica*, 2018; 120(4), 303-311.
31. Shahniani A, Bamzadeh Z, Mahmoudnia F, Rouhi L. In vitro Apoptosis Induction in Prostate Cancer Cells (PC-3) using *Bacillus licheniformis* Supernatant. *Iranian Journal of Medical Microbiology.* 2020;14(6) 480.

32. Sadeghi-Aliabadi H, Mohammadi F, Fazeli H, Mirlohi M. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2014;17(10):815.
33. Parsaseresht L, Fazeli M, Samadi N, Jamalifar H, Eidi A, Mahmudiaslzade H. Effect of metabolites produced by *Lactobacillus Rhamnosus* GG (probiotic bacteria) on the growth of human colon cancer cell line CacoII. 2013.
34. Pasiar M, Rouhi L, Bamzadeh Z, Hossein Hejazi S. In vitro selective growth inhibition of breast adenocarcinoma cell lines by *Pseudomonas* sp. UW4 metabolites. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*. 2016;74(9):614-20.
35. Soltan Dallal MM, Mojarrad M, Baghbani M, Raoofian R, Mardaneh J, Salehipour Z. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on colorectal tumor cells activity (CaCo-2). *Arch Iran Med*. 2015; 18(3): 167-172.

## مطالعه اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس بر برخی باکتری‌های مواد غذایی

مهرداد عطایی کچویی<sup>۱</sup>، الهام فخری<sup>۲\*</sup>، فاطمه خداوردی پور<sup>۳</sup>

۱. دانشیار گروه گیاهان دارویی، دانشکده غذا و دارو، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی دکتری اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** افزایش مقاومت‌های دارویی علیه باکتری‌ها و افزایش میزان دوز مصرفی داروهای متداول و آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین عوارض ناشی از این داروها موجب شده است تا در سال‌های اخیر توجه بیشتری به عوامل طبیعی مثل گیاهان دارویی که دارای عوارض کمتری هستند جلب شود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش بعد از تهیه عصاره الکلی و اسانس از گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس این گیاهان، رقت‌های متوالی از آن‌ها جهت به دست آوردن حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) در برابر باکتری‌های شیگلا فلکسنری، سالمونلاتیفی موریوم، اشرشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس تهیه گردید. همچنین با استفاده از روش انتشار دیسک، هاله مهار رشد باکتری نیز اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. آنالیز ترکیبات هر کدام از اسانس‌ها توسط دستگاه GC-MS و آنالیز عصاره‌ها با دستگاه HPLC انجام شد.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج به دست آمده قطر هاله در اسانس‌ها بیشتر از عصاره‌ها بود و نمونه‌ها نسبت به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت بیشتری نشان دادند. میزان MIC و MBC برای هر کدام از اسانس‌ها و عصاره‌ها در برابر هر کدام از ۴ باکتری مورد آزمایش به روش میکرودايلوشن اندازه‌گیری شد و نتایج حاکی از پایین بودن میزان غلظت MIC و MBC در اسانس‌ها نسبت به عصاره‌ها بود. اسانس‌ها نسبت به عصاره‌ها دارای ترکیبات بیشتری که همین دلیل برخواص ضد آنتی‌بیوتیکی بیشتر آن‌ها می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج تحقیق حاضر، مشخص کرد که اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس اثرات ضد میکروبی دارند؛ بنابراین می‌توانند به‌عنوان فراورده‌های گیاهی طبیعی جهت کنترل عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار گیرند.

**واژگان کلیدی:** بادرنجبویه، اسطوخدوس، عصاره، اسانس، اثرات ضد میکروبی

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۳۲۸۳۹۳۱۱

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: Elham.fakhri18@gmail.com

## Studying the antimicrobial effects of essential oils and extracts of *lemongrass* and *lavender* plants on some food bacteria

Mehrdad Ataei Kachoei<sup>1</sup>, Elham Fakhri<sup>2\*</sup>, Fatemeh Khodaverdipour<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Medicinal Plants, College of Food and Drug, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

<sup>2</sup> PhD Student of Horticultural Plant Breeding and Biotechnology, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Food Industry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Ph.D Student of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** The increase in the use of drugs and the increase in the dosage of common drugs and antibiotics, as well as the side effects caused by these drugs, have led to more attention in recent years to natural factors such as medicinal plants that contain them. Fewer complications are attracted.

**Materials and methods:** In this research, after preparing the alcoholic extract and essential oil from lemongrass and lavender plants, successive dilutions were made to obtain the minimum growth inhibition concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). was prepared against *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. Also, by using the disc diffusion method, the inhibition halo of bacterial growth was also measured and compared. The composition of each essential oil was analyzed by GC-MS and the extracts were analyzed by HPLC.

**Results:** According to the obtained results, the diameter of the halo in essential oils was greater than that of extracts, and the samples showed more sensitivity to the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*. The amount of MIC and MBC for each of the essential oils and extracts against each of the 4 tested bacteria was measured by microdilution method and the results indicated that the concentration of MIC and MBC in the essential oils was lower than in the extracts. Essential oils have more compounds than extracts, which is why they have more antibiotic properties.

**Conclusion:** The results of this research determined that the essence and extract of lemongrass and lavender have antimicrobial effects; Therefore, they can be used as natural plant products to control bacterial infections

**Keywords:** Lemon balm, Lavender, Extract, Essential oil, Antibacterial effects

### مقدمه

مصرف گیاهان برای درمان سابقه‌ای به قدمت عمر انسان دارد. در سال‌های اخیر کاربرد گیاهان دارویی با توجه به عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیماران به این داروها و به لحاظ اثرات جانبی شناخته شده داروهای سنتتیک افزایش یافته است (۱). بسیار پیش از آن که بشر وجود میکروب‌ها را کشف کند، این ایده که گیاهانی خاص توانایی شفابخشی دارند پذیرفته شده بود و از زمان قدیم، انسان از گیاهان برای درمان بیماری‌های عفونی رایج استفاده می‌کرد (۲).

استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی جهت درمان بیماری‌های عفونی منجر به ظهور نمونه‌های مقاوم میکروبی شده است که هرروزه بر تعداد آن‌ها اضافه می‌شود (۲). ظهور سویه‌های مقاوم به داروهای شیمیایی، چالش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می‌کند (۳). و این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیب‌ها در مقایسه با داروهای شیمیایی کمتر است (۴). بنابراین بهره‌گیری از داروهای گیاهی به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها آزمایش شد. که از گیاهان استفاده شده می‌توان به گیاهان خانواده نعناع اشاره کرد (۵). گونه‌های نعناع تقریباً در سراسر جهان و به خصوص در مناطق مدیترانه‌ای پراکنده‌اند. جنس‌های اسطوخدوس، بادرنجویه، رزماری و آویشن از گیاهان اصلی متعلق به منطقه مدیترانه‌ای هستند و در نواحی آفریقا و هند وجود دارد (۶). گیاه بادرنجوبویه با نام علمی *Melissa officinalis* به خانواده Lamiaceae تعلق دارد، این گیاه، بومی مناطق مدیترانه‌ای و غرب آسیا بوده معطر، پایا دارای میوه فندقه با بذر تخم مرغی، سیاه رنگ و براق است و پیکر رویشی گیاه بوی خاصی تقریباً شبیه به لیمو دارد (۷). اسانس بادرنجوبویه از گل، شاخه‌ها و برگ‌های تازه یا خشک آن، تهیه می‌شود و از ویژگی‌های آن بوی تازه لیمو و رنگ زرد کم‌رنگ می‌باشد. اسانس این گیاه از لحاظ عطر و طعم‌دهی کاربردهای متنوع و زیادی در بسیاری از صنایع مانند آرایشی و عطرها، آشامیدنی، بستنی‌سازی و... دارد. بادرنجوبویه در طب سنتی ایران به عنوان تسکین‌دهنده، تب‌بر، ضد اسپاسم، ضد تشنج،

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

معرق، خوشبو کننده و بادشکن کاربرد دارد. همچنین بادرنجبویه دارای اثر ضد اضطراب و ضد باکتری است (۸). اندام‌های این گیاه دارای درصدی روغن فرار است که بیشترین ترکیبات آن شامل سیترونرول، کارواکرول، ژرانیل و آلفاپینن می‌باشد همین‌طور اسانس روغنی گیاه بادرنجبویه دارای فعالیت ضد میکروبی، ضد مخمری و ضد قارچی مناسبی است (۹). Andrade و همکاران (۲۰۱۱) با اسانس گیری گیاه بادرنجبویه، ترکیبات شیمیایی عمده اسانس را ژرانیل، بتا - سیترونلال، سیترونلال، ژرانیل و استات معرفی کردند (۱۰). با مطالعه و بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه بادرنجبویه، اسانس این گیاه بر رشد باکتری‌های بیماری‌زا، به ویژه انواع گرم مثبت، اثر مهارکنندگی قابل توجهی از خود نشان داده است، کمترین بازدارندگی اسانس مربوط به سودوموناس آئروژینوزا و بیشترین آن برای استافیلوکوکوس اورئوس بود (۱۱).

اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula officinalis* L گیاهی چند ساله و همیشه سبز از خانواده نعنائیان *Lamiaceae* است. ارتفاع گیاه اسطوخودوس بین ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متر، گل‌ها در انتهای خوشه‌ها و مجتمع در راس ساقه است. این گیاه درختچه‌ای همیشه سبز، پرپشت و چندساله است. گل‌های آن آبی‌رنگ و بنفش و بسیار معطر است (۱۲). اسانس اسطوخودوس دارای حدود ۴۰ درصد استات لینالیل بوده و همچنین در آن ترکیباتی نظیر اسیدبوتیریک، اسیدپروپیونیک و اسیدوالریک، لینالول آزاد و ژرانیل وجود دارد. اسانس این گیاه در طب سنتی دارای خواص درمانی بسیاری از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدباکتری، ضداضطراب و آرام‌بخش، فعالیت ضدپلاکتی، ضدانعقادی و ضدجهش برخوردار است و در درمان بیماران با زوال عقلی شدید کاربرد دارد. از دم‌کرده اسطوخودوس به عنوان ضدنفخ، ضدصرع، ضددردهای روماتیسمی و کمردرد، سردردهای عصبی و میگرنی استفاده می‌شود. مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آن لینالیل استات، لینالول، کامفور، ژرانیل، سینئول، تانن، کومارین، فلاونوئیدها و دانه‌های خشک آن که حاوی پروتئین و چربی است (۱۳). این گیاه دارای خواص بالینی زیادی از جمله خواص ضدقارچی، ضدالتهابی، ضد میکروبی، آرام‌بخشی و کاهش درد است (۱۴). همچنین اثرات آرام‌بخشی، ضد تشنجی، ضدصرعی، ضد اضطراب، ضد افسردگی، نوروپروتکتیو، ضد درد، ضد اعتیاد، ضد التهاب، ضد آپوپتوز، ضد جهش و ضد سرطان اسطوخودوس آن را مورد توجه قرار می‌دهد (۱۵). قدری و همکاران (۱۳۸۸) نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس اسطوخودوس بر اساس حساس‌ترین به مقاوم‌ترین به این ترتیب: سودوموناس آئروژیناز، استرپتوکوکوس فکالیس، کلبسیلا پنومونیا، اشرشیا کلاهی و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۱۶). قیامی راد و لطفی (۱۳۹۷) در مورد اثر ضدباکتریایی عصاره‌آبی اسطوخودوس روی برخی از باکتری‌های نشان دادند که عصاره‌آبی گیاه اسطوخودوس اثر بازدارندگی و مهارکنندگی قابل توجهی روی باسیلوس سوبتیلیس، استرپتوکوکوس موتاس، لیستریا منوسیتوزن، یرسینیا اینترو کولیتیکا و سالمونلا اینترتیدیس دارد و هر چقدر میزان غلظت عصاره آبی افزایش می‌یافت اثر بازدارندگی نیز بیشتر و چشمگیرتر می‌شد (۱۷). در تحقیق حاضر به منظور بررسی تعیین خواص ضدباکتریایی عصاره و اسانس بادرنجبویه و اسطوخودوس بر روی باکتری‌های شیگلا فلکسنری (*Shigella Flexneri*)، سالمونلا تیفی موریوم (*Salmonella Typhimurium*)، اشرشیا کلاهی (*Escherichia coli*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) با استفاده از روش‌های میکروداپلوشن و انتشار از دیسک مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

### مواد و روش کار

مواد مورد استفاده در این تحقیق، گیاهان دارویی بادرنجبویه و اسطوخودوس که از مزارع استان چهارمحال بختیاری جمع‌آوری شد و توسط مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مورد تأیید قرار گرفت. سپس در شرایط مناسب خشک گردیدند. باکتری‌های مورد آزمون شیگلا فلکسنری (ATCC 12022)، سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 14028)، اشرشیا کلاهی (ATCC 25922) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) بودند. که از مرکز مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شدند. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، ریفاپمپین، اریترومایسین (به صورت دیسک و پودری) بودند. که از شرکت پادتن طب و شرکت سیگما تهیه شدند.

### اسانس گیری از گیاهان

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

ابتدا گیاهان خشک شده و خلال داخل بالن ریخته و بالن روی شعله قرار داده شد. اسانس گیری با دستگاه کلونجر انجام شد پس از اسانس گیری شعله را خاموش کردیم. داخل بورت مجموعه آب و اسانس جمع شد. اسانس سنگین تر از آب شده و در انتهای بورت قرار گرفت. پس از ۱۱ ساعت شیر بورت را باز نموده و اسانس در ظرفی جداگانه جمع آوری شد (۱۸).

#### تهیه عصاره الکلی

۵۰ گرم از گیاهان خشک شده مورد مطالعه به ۱۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه اضافه شده و به مدت ۷۲ ساعت در آون (در دمای زیرنقطه جوش اتانول) قرار داده شد تا استخراج عصاره انجام شود عصاره به دست آمده از صافی توسط دستگاه تقطیر در خلأ یا روتاری<sup>۲۷</sup> تغلیظ شد. عصاره‌ها در پلیت‌های استریل شده به وسیله پارافیلیم پوشیده شدند. سپس عصاره‌ها از فیلتر میکروبیولوژی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شده و در ظرف درب‌دار در یخچال در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۹).

#### آماده‌سازی عصاره شناسایی ترکیبات توسط GC/MS

قسمتی از عصاره اتانولی حاصله را پس از تغلیظ، جهت شناسایی ترکیبات آن توسط HPLC به روش زیر مورد آماده‌سازی قرار دادیم. عصاره را ۴۸ ساعت در دمای (۱۲-) فریزر قرار دادیم تا موم و چربی آن جدا شود. سپس در همان فریزر با کاغذ صافی فاز عصاره اتانولی را جدا کردیم. فاز عصاره اتانولی را در یک ارنل با درپوش ریخته و به نسبت مساوی به آن هگزان افزودیم و ۱ ساعت آن را روی شیکر با دور ۱۸۶ قرار دادیم تا یکنواخت همزده شود. سپس آن را در یک جداکننده ریخته و ۱۵ دقیقه آن را ثابت گذاشته تا دوفاز شود. سپس فاز هگزانی را جهت تزریق به HPLC مورد جدا سازی قرار دادیم.

#### تهیه و کشت باکتری

باکتری‌ها پس از جداسازی و شناسایی در آزمایشگاه به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند و بعد از احیای باکتری ابتدا ۲۴ ساعت در محیط مولر هینتون برات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از رشد باکتری هر کدام روی محیط کشت جامد مخصوص خود کشت داده شد و مجدد ۲۴ ساعت انکوبه شد تا از باکتری‌ها کلونی‌های مورد نظر به دست آورده شد.

#### ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها به روش دیسک دیفیوژن

محیط کشت مولر هینتون آگار بر مبنای دستور العمل کارخانه سازنده آماده‌سازی شد. از سوسپانسیون نیم مک‌فارلند هر کدام از باکتری‌ها با سوآپ روی محیط به صورت چمنی کشت داده شد. سپس دیسک‌های بلانک استریل را با پنس روی محیط قرار داده و غلظت‌های تهیه شده با آب مقطر برای هر کدام از اسانس‌ها شامل: بادرنجبویه و اسطوخدوس غلظت‌های (۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱۲۵، ۰/۰۰۶۲۵) گرم بر میلی لیتر می‌باشد.

از دیسک‌های آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، ریفامپین و اریترومايسين به عنوان شاهد برای هر کدام از باکتری‌ها استفاده شد. از هر کدام از پتری‌های نمونه‌ها سه تکرار انجام شده و تمامی آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. تعیین فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها بر مبنای اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر توسط کولیس اندازه‌گیری شد.

#### تعیین MIC و MBC به روش میکرودايلوشن

برای تعیین غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و عصاره‌ها شامل بادرنجبویه و اسطوخدوس، (۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر) بود. آزمایش MBC و MIC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکرودايلوشن طبق دستورالعمل<sup>۲۸</sup> CLSI انجام شد. نحوه کار به این صورت بود که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون برات اضافه شد سپس برای هر کدام از اسانس‌ها غلظت اول در خانه اول به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید و جهت رقت‌سازی بعد از شیک ۱۰۰ میکرولیتر از خانه اول برداشته شده در خانه دوم ریخته شد و این کار

<sup>27</sup>- Rotary evaporator

<sup>28</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute

تا خانه شماره ۹ ادامه پیدا کرد و در آخر هم از خانه نهم ۱۰۰ میکرولیتر به بیرون ریخته شد، سپس از سوسپانسیون باکتری‌های مذکور به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به ۹ خانه اضافه گردید. و خانه‌های آخر جهت کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و منفی (محیط کشت بدون باکتری) در نظر گرفته شد.

در نهایت لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس نتایج قرائت شد و برای هر کدام از رقت‌های اسانس و عصاره الکلی، آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌های بدون کدورت روی محیط مولر هینتون براث آگار کشت داده شد. آخرین رقتی از عصاره‌ها که قادر به مرگ ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه بود، به عنوان MBC عصاره‌ها در نظر گرفته شد (۲۰).

### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MiniTab16 به صورت اسپلیت پلات در پلات اصلی باکتری و پلات فرعی به صورت فاکتوریل هر کدام از اسانس‌ها و عصاره‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و آزمایش‌های خصوصیات ضد میکروبی در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و آزمون همبستگی به روش پیرسون و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون LSD سطح احتمال ۱ و ۵ درصد صورت پذیرفت.

### نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه تجربی در جدول‌های زیر درج شده است. در جدول شماره ۱، قطر هاله عدم رشد اسانس و عصاره گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس و همین‌طور تاثیر ۵ آنتی‌بیوتیک نالیدیک اسید، سیپروفلوکساسین، مترونیدازول، ریفامپین، اریترومايسين بر روی چهار باکتری مورد بررسی بیان شده است. بررسی مقایسه‌ی خاصیت ضدباکتریایی (قطر هاله‌ی عدم رشد) اسانس و عصاره گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس توسط نرم‌افزار MiniTab16 با آزمون LSD سطح احتمال ۱ و ۵ درصد به عنوان نتایج معنی‌دار محسوب می‌شود.

### اثر فعالیت ضد باکتریایی اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس بر قطر هاله رشد

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس اسانس گیاه بادرنجبویه نشان می‌دهد که اسانس بادرنجبویه در سطح احتمال ۱ درصد بر قطر هاله عدم رشد هر ۴ باکتری معنی‌دار است همچنین طبق جدول ۱ مقایسات میانگین اسانس گیاه بادرنجبویه بر باکتری *سالمونلاتیفی* موریوم و *شیگلافلکسنری* نشان داده است که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر اسانس گیاه بادرنجبویه بوده است. با توجه به جدول مقایسات میانگین (جدول ۱) بیشترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *اشرشیاکلاهی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به آنتی‌بیوتیک ریفامپین و کمترین را غلظت‌های ۰/۰۰۶۲۵ و ۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی‌لیتر اسانس بادرنجبویه داشته‌اند.

بر اساس تجزیه واریانس اسانس گیاه اسطوخدوس می‌توان گفت، اسانس گیاه اسطوخدوس در سطح احتمال ۱ درصد بر قطر هاله عدم رشد هر ۴ باکتری معنی‌دار بوده است. همچنین با توجه به جدول ۱ و نتایج مقایسات میانگین اسانس گیاه اسطوخدوس بر باکتری *سالمونلاتیفی* موریوم و *شیگلافلکسنری* بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین برای باکتری *سالمونلاتیفی* موریوم کمترین قطر هاله عدم رشد را غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری *شیگلافلکسنری* کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت‌های ۰/۰۰۶۲۵ و ۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی‌لیتر اسانس گیاه اسطوخدوس داشته است. با توجه به جدول ۱ مقایسات میانگین اسانس گیاه اسطوخدوس برای باکتری *اشرشیاکلاهی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* آنتی‌بیوتیک ریفامپین بیشترین قطر هاله عدم رشد و کمترین قطر هاله عدم رشد در باکتری *اشرشیاکلاهی* مربوط به غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* آنتی‌بیوتیک نالیدیک اسید کمترین قطر هاله عدم رشد در اسانس گیاه اسطوخدوس نشان داده است.



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

جدول ۱- جدول مقایسات میانگین اسانس گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس

نام نمونه	غلظت (گرم بر میلی لیتر)	سالمونلاتیفی موریوم	شیگلافلکسنری	اشرشیاکلای	استافیلوکوکوس اورئوس
اسانس	۰/۰۰۶۲۵	۹/۳۳۳klm	۸/۳۰۰lmn	۸/۴۳۳lmn	۹/۱۰۰hij
بادرنجبویه	۰/۰۱۲۵	۱۰/۵۳۳ijk	۹/۴۰۰ijkl	۹/۱۳۳klmn	۹/۴۶۶ghi
	۰/۰۲۵	۱۱/۵۰۰ghi	۱۰/۱۳۳ijk	۱۰/۴۶۶fghij	۱۰/۴۶۶fgh
	۰/۰۵	۱۲/۳۶۶fg	۱۱/۲۶۶fghi	۱۱/۲۶۶efgh	۱۱/۴۶۶ef
اسانس	۰/۰۰۶۲۵	۹/۰۶۶lm	۷/۴۰۰n	۸/۳۶۶lmn	۷/۲۳۳klm
اسطوخدوس	۰/۰۱۲۵	۱۰/۵۳۳ijk	۸/۲۳۳lmn	۹/۶۰۰jkl	۸/۲۳۳ijk
	۰/۰۲۵	۱۲/۰۶۶fgh	۱۱/۰۶۶ghi	۱۰/۹۶۶fghi	۹/۴۶۶ghi
	۰/۰۵	۱۳/۱۳۳ef	۱۲/۴۶۶def	۱۱/۵۶۶ef	۱۰/۳۰۰fgh
عصاره	۰/۰۰۶۲۵	۸/۳۳۳f	۷/۵۰۰g	۷/۲۳۳g	۱۳/۲۳۳f
بادرنجبویه	۰/۰۱۲۵	۹/۱۶۶f	۸/۳۶۶fg	۸/۳۶۶f	۱۴/۴۰۰ef
	۰/۰۲۵	۹/۶۶۶ef	۹/۵۳۳ef	۹/۵۳۳c	۱۵/۲۳۳de
	۰/۰۵	۱۰/۶۳۳e	۱۰/۵۳۳e	۱۰/۵۳۳e	۱۶/۳۳۳d
عصاره	۰/۰۰۶۲۵	۹/۴۶۶f	۸/۹۰۰f	۸/۰۶۶g	۱۳/۰۳۳f
اسطوخدوس	۰/۰۱۲۵	۱۰/۳۰۰ef	۹/۴۰۰ef	۹/۵۳۳f	۱۳/۴۳۳ef
	۰/۰۲۵	۱۰/۵۰۰ef	۱۰/۲۶۶e	۱۰/۴۶۶ef	۱۴/۴۶۶de
	۰/۰۵	۱۱/۴۳۳e	۱۱/۴۰۰d	۱۱/۵۳۳e	۱۵/۱۶۶d
آنتی بیوتیک					
نالیدیک اسید	۱۵/۹۶۶d	۱۰/۱۶۶ijk	۱۸/۰۳۳c	۶/۵۳۳m	
سیپروفلوکساسین	۳۰/۰۶۶a	۲۹/۹۰۰a	۳۰/۱۰۰b	۲۰/۱۰۰c	
مترونیدازول	۱۱/۰۰۰hij	۱۲/۰۳۳efg	۱۲/۹۰۰d	۶/۸۰۰lm	
ریفامپین	۲۱/۲۰۰b	۲۳/۰۶۶b	۴۵/۰۶۶a	۴۱/۸۶۶a	
اریتروماپسین	۱۹/۱۳۳c	۱۶/۸۶۶c	۳۱/۰۳۳b	۳۶/۱۳۳b	

در هر ستون تیمارهایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند

بر اساس تجزیه واریانس عصاره گیاه بادرنجبویه، این عصاره در سطح احتمال ۱ درصد بر قطر هاله عدم رشد هر ۴ باکتری معنی دار بوده است. مقایسه میانگین عصاره گیاه بادرنجبویه بر عدم رشد باکتری سالمونلاتیفی موریوم و باکتری شیگلافلکسنری نشان می‌دهد که آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین قطر هاله عدم رشد را داشته است و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری سالمونلا تیفی موریوم مربوط به غلظت‌های ۰/۰۰۶۲۵ و ۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی لیتر و برای باکتری شیگلا فلکسنری غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی لیتر عصاره گیاه بادرنجبویه بوده است (جدول ۱). مقایسات میانگین عصاره گیاه بادرنجبویه (جدول ۱) نشان داده است که برای باکتری اشرشیاکلای و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس آنتی بیوتیک ریفامپین دارای بیشترین قطر هاله عدم رشد بوده و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری اشرشیاکلای مربوط به غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی لیتر عصاره بادرنجبویه و برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به آنتی بیوتیک‌های نالیدیک اسید و مترونیدازول بوده است (جدول ۱). تجزیه واریانس عصاره گیاه اسطوخدوس نشان می‌دهد که این عصاره در سطح احتمال ۱ درصد بر قطر هاله عدم رشد هر ۴ باکتری معنی دار بوده است. نتایج مقایسات میانگین عصاره گیاه اسطوخدوس روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم و باکتری شیگلا فلکسنری (جدول ۱) حاکی از آن

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

است که آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بیشترین قطر هاله عدم رشد و کمترین قطر هاله برای باکتری سالمونلا تیفی موریوم و باکتری شیگلا فلکسنری مربوط به غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه اسطوخدوس و همین طور برای شیگلا فلکسنری بوده است. با توجه به نتایج مقایسات میانگین عصاره گیاه اسطوخدوس روی باکتری /شرشیاکلای و باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس (جدول ۱)، آنتی‌بیوتیک ریفامپین بیشترین قطر هاله عدم رشد را داشته است و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری /شرشیاکلای مربوط به غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه اسطوخدوس و برای باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به آنتی‌بیوتیک-های نالیدیک اسید و مترونیدازول بوده است.

### اثر فعالیت ضد باکتریایی اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس بر میزان MIC و MBC

در جدول ۲ در مورد باکتری سالمونلا تیفی موریوم کمترین غلظت به عنوان MBC با غلظت ۰/۰۰۳۱ گرم بر میلی‌لیتر و کمترین غلظت به عنوان MIC با غلظت ۰/۰۰۱۵۶ گرم بر میلی‌لیتر مربوط به اسانس اسطوخدوس بود. نتایج به دست آمده در خصوص باکتری شیگلا فلکسنری حاکی از این بود حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC مربوط به غلظت ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی یا MBC آن نیز ۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی‌لیتر که در اسانس بادرنجبویه و اسانس و عصاره اسطوخدوس بود. در مورد باکتری /شرشیاکلای اسانس هر دو گیاه دارای حداقل غلظت MIC به میزان ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر و همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی MIC به میزان ۰/۰۰۳۱۲ گرم بر میلی‌لیتر مربوط به این دو اسانس بود. با این حال در خصوص تنها باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس اسانس بادرنجبویه دارای کمترین غلظت به عنوان MBC با غلظت ۰/۰۰۰۳۹ گرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۰/۰۰۰۱۹ گرم بر میلی‌لیتر برای MIC بوده است. در نتیجه می‌توان تفسیر کرد که باکتری سالمونلا تیفی موریوم نسبت به اسانس اسطوخدوس حساسیت بیشتری نشان داده است و باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس نیز به اسانس اسانس بادرنجبویه حساسیت بیشتری داشته است.

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس علیه باکتری‌های مورد آزمایش بر حسب گرم بر میلی‌لیتر

نمونه‌ها	سالمونلاتیفی موریوم		شیگلافلکسنری		شرشیاکلای		استافیلوکوکوس اورئوس	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
اسانس بادرنجبویه	۰/۰۰۳۱۲	۰/۰۰۰۶۲	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۰۳۱۲	۰/۰۰۰۳۹
اسانس اسطوخدوس	۰/۰۰۱۵۶	۰/۰۰۰۳۱	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۰۳۱۲	۰/۰۰۰۳۹
عصاره بادرنجبویه	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵
عصاره اسطوخدوس	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۰۶۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۱۲۵	۰/۰۱۲۵
ریفامپین	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱۲۵	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۱۵۶	۰/۰۰۰۳۱۲	۰/۰۰۰۲۵
مترونیدازول	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۰۶۲۵	۰/۰۰۱۲۵	۰/۰۰۰۲۵
سیپروفلوکساسین	۲۴× <sup>۷</sup> -۱۰	۱۲× <sup>۷</sup> -۱۰	۲۴× <sup>۷</sup> -۱۰	۲۴× <sup>۷</sup> -۱۰	۴۸× <sup>۷</sup> -۱۰	۴۸× <sup>۷</sup> -۱۰	۹۷× <sup>۷</sup> -۱۰	۹۷× <sup>۷</sup> -۱۰
نالیدیک اسید	۱۹× <sup>۶</sup> -۱۰	۹۷× <sup>۷</sup> -۱۰	۲۴× <sup>۷</sup> -۱۰	۴۸× <sup>۷</sup> -۱۰	۴۸× <sup>۷</sup> -۱۰	۹۷× <sup>۷</sup> -۱۰	۱۹× <sup>۶</sup> -۱۰	۲۴× <sup>۷</sup> -۱۰
اریترومايسين	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۷۸× <sup>۶</sup> -۱۰

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

با مقایسه غلظت‌های به دست آمده MIC و MBC در اسانس‌ها و عصاره‌ها و با توجه به این که در اسانس‌ها این غلظت‌ها بسیار کمتر از غلظت‌ها در عصاره‌ها است به طوری که کمترین غلظت برای MIC در اسانس بادرنجبویه در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۰/۰۰۰۱۹ گرم بر میلی‌لیتر به دست آمده است در حالی که در عصاره‌ها کمترین غلظت MIC ۰/۰۰۶۲۵ گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که اسانس‌ها تأثیرات بیشتری روی باکتری‌ها داشته‌اند و قدرت آن‌ها در مهار و از بین بردن باکتری‌ها بیشتر بوده است و این موضوع را با توجه به ترکیبات بیشتر و خاص‌تر موجود در اسانس‌ها می‌توان توجیه کرد. کمترین غلظت MIC و MBC در مورد باکتری *سالمونلاتیفی موریوم* و *اشرشیاکلا*ی مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود و آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نالیدیک‌اسید در باکتری *شیگلایفلسنری* دارای کمترین غلظت MIC و MBC بودند. در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* هم آنتی‌بیوتیک نالیدیک‌اسید کمترین غلظت MIC و MBC را داشت.

### شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس و گیاهان بادرنجبویه و اسطوخدوس

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی بررسی شد که در اسانس بادرنجبویه حدود ۵۵ ترکیب شناسایی گردید. مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس و فراوانی این ترکیبات در جدول ۳ مشخص شده است. بیشترین ترکیبات اسانس شامل سیترال (۳۴/۱۸ درصد)، نرول استات (۱۴/۹۹ درصد)، نرال (۱۷/۵۹ درصد) و اکسید کاریوفیلین (۹/۶۳ درصد) بود. در اسانس اسطوخدوس حدود ۴۲ ترکیب شناسایی گردید. مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس و فراوانی این ترکیبات در جدول ۴ مشخص شده است. بیشترین ترکیبات اسانس شامل: بورنئول (۲۹/۳۸ درصد)، لینالول (۲۴/۷۶ درصد) و کامفور (۱۱/۸۱ درصد)، اوکالیپتول (۹/۱۱ درصد) بود.

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه بادرنجبویه و اسطوخدوس

نمونه	نام ترکیب	درصد ترکیب	زمان بازدارندگی (دقیقه)
اسانس بادرنجبویه	وینیل هگزانول	۱/۹۴	۱۰/۳۲
	ترپین	۱/۳۷	۱۱/۵۲
	اکسیدسیس رز	۱/۱	۱۳/۳۸
	سیترنال	۱/۳۷	۱۴/۳۳
	منتول	۱/۹۱	۱۴/۷۹
	نرال	۱۷/۵۹	۱۶/۳
	اکتنوئیک اسید	۱/۵۲	۱۶/۵۷
	سیترال	۳۴/۱۸	۱۶/۹۲
	نرول استات	۱۴/۹۹	۱۸/۹۹
	بتایونون	۱/۰۲	۲۰/۹
اسانس اسطوخدوس	سودولیمون	۱/۲۳	۱۰/۱۹
	اوکالیپتول	۹/۱۱	۱۱/۶۴
	آلفاترپینئول	۳/۸	۱۲/۵۹
	وربنون	۳/۲	۱۲/۹۴
	لینالول	۲۴/۷۶	۱۳/۴۵
	کامفور	۱۱/۸۱	۱۴/۳۱
	بورنئول	۲۹/۳۸	۱۴/۸۳
	ترپین-۴-اول	۲/۶۳	۱۴/۹۹
کریپتون	۱/۳۲	۱۵/۱۶	

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

ترکیبات تشکیل دهنده عصاره نیز توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی بررسی شد که در عصاره بادرنجبویه حدود ۲۶ ترکیب شناسایی شد. مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده عصاره و فراوانی این ترکیبات در جدول ۴ مشخص شده است. بیشترین ترکیبات در عصاره گیاه بادرنجبویه شامل: پارازایلین (۴۱/۴۵ درصد)، متازایلین (۱۵/۹۹ درصد) و اتیل بنزن (۱۳/۴۱ درصد) بوده است. ترکیبات تشکیل دهنده عصاره اسطوخدوس حدود ۲۵ ترکیب شناسایی شد. که مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده عصاره و فراوانی آن در جدول ۴ آمده است. بیشترین ترکیبات در عصاره گیاه اسطوخدوس شامل: ترانس بورنئول (۲۶/۰۸ درصد) و گرانیال (۲۶/۰۴ درصد) بود.

جدول ۴- ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه بادرنجبویه و اسطوخدوس

نمونه	نام ترکیب	درصد ترکیب	زمان بازدارندگی (دقیقه)
عصاره بادرنجبویه	۲،۲-دی متوکسی بوتان	۸/۲۳	۴/۷۶
	۳،۳-دی متوکسی-۲-بوتانول	۱/۰۳	۶/۹۶
	اتیل بنزن	۱۳/۴۱	۷/۲۵
	پارازایلین	۴۱/۴۵	۷/۴۶
	متازایلین	۱۵/۹۹	۸/۰۷
	۴،۲-دی-تری-بوتیل فنل	۲/۹۳	۲۱/۳۲
	۷-فنیل ایکوزان	۱/۱۷	۲۳/۳۴
	فنیل بنزن-۲	۲/۱۴	۲۴/۴۵
	فنل، ۲،(۱،۱)-دی متیل اتیل-(۴،۱)-متیل-۱-فنیل اتیل)	۳/۲۶	۲۵/۶۶
	بنزن،(۱-متیل هگزادسیل)	۱/۱۲	۲۶/۰۳
عصاره اسطوخدوس	اتیل بنزن	۵/۴۵	۷/۲۳
	پارازایلین	۱۵/۹۸	۷/۴۴
	اورتو-زایلین	۵/۹۷	۸/۰۶
	لینالول	۲/۰۸	۱۳/۱۵
	ترانس-بورنئول	۲۶/۰۸	۱۴/۶۳
	گرانیال	۲۶/۰۴	۱۵/۱۴
	۳-متیل هگزیل-۳-متیل بوتانوات	۴/۲	۱۶/۳۷
	ترانس-۸-هیدروکسینالول	۱/۹۵	۱۶/۹
	۶-متیل-سیکلودک-۵-انول	۱/۲۶	۱۷/۸۷
	۷،۳-سیکلوندکادین-۱-اول، ۵،۵،۱،۸-تترامتیل	۱/۴۲	۱۸/۱۱
	۵،۳-دی-تری-بوتیل فنل	۳/۵۶	۲۱/۲۹

### بحث

استفاده درست و به جا از گیاهان دارویی مستلزم این است که اطلاعات دقیق و علمی از آن‌ها داشته باشیم و ترکیبات شیمیایی موجود در آن‌ها را بشناسیم زیرا اثرات درمانی هر گیاه ناشی از ترکیبات شیمیایی موجود در آن است. با توجه به این که عصاره محلولی است که حاوی تمام مواد مفید گیاه مانند تانن، موسیلاژ، اسانس، ویتامین‌ها و املاح گیاه است اما اسانس تنها شامل ترکیبات ترپنی و یا مشتقات ترپنی گیاه می‌باشد در بررسی اسانس‌ها و عصاره با GC-MS اسانس‌ها دارای ترکیبات بیشتر و خاص تری بودند مهم ترین ترکیبات اسانس‌ها از این قرار بود: اسانس گیاه بادرنجبویه (سیترال، نرول استات، نرال، اکسید کاریوفیلین)، اسانس گیاه

اسطوخدوس (بورنئول، لینالول، کامفور، اوکالیپتول). با مطالعه روی اسانس‌ها و عصاره‌ها مشخص شد که باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی (*سالمونلا تیفی موریوم*، *شیگلا فلکسنری* و *اشرشیاکلا*) بودند و از طرف دیگر میزان حساسیت تابعی از نوع و میزان اسانس یا عصاره است (۲۱). به طوری که در این تحقیق اسانس‌ها اثر ضد باکتریایی بیشتری داشتند و با افزایش غلظت قطر هاله عدم رشد و خاصیت ضد باکتریایی در اسانس‌ها و عصاره‌ها بیشتر می‌شد. علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی به اثرات ضدباکتریایی اسانس‌ها و عصاره‌ها به خاطر غشاء خارجی اطراف دیواره سلولی گرم منفی‌ها می‌باشد که باعث محدود کردن انتشار اجزاء آب‌گریز اسانس‌ها و عصاره‌ها به لایه لیپو پلی ساکاریدی می‌شود. غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی دارای کاتیون‌های دو ظرفیتی و قسمت پلی ساکاریدی لیپوپلی ساکارید در سطح سلول است. این ترکیبات آب‌دوست بوده و به عنوان یک سد در برابر ماکرومولکول‌ها و ترکیبات آب‌گریز مانند ترکیبات موجود در اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی عمل می‌کنند. البته گاهی موارد استثنایی نیز مشاهده می‌شود که حساسیت گرم مثبت‌ها کمتر بوده است. هر جزء از اجزاء اسانس‌ها و عصاره‌ها درجات متفاوتی از فعالیت را در برابر باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی نشان می‌دهند و این طور می‌توان تفسیر کرد که اسانس‌ها به خاطر داشتن ترکیباتی با درجات بالاتر فعالیت ضدباکتریایی اثر بیشتری نسبت به باکتری‌ها در این تحقیق از خود نشان داده‌اند.

همچنین ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها و عصاره‌های به دست آمده از یک گونه گیاهی خاص برحسب این که از مناطق مختلف جغرافیایی و یا مراحل مختلف برداشت به دست آمده باشد ممکن است متفاوت باشد و این دلیل هم می‌تواند علت تأثیرات مختلف اسانس‌ها و عصاره‌ها بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی باشد. با وجود این که در اسانس‌ها و عصاره ترکیبات شیمیایی متعددی وجود دارد اما نمی‌توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضدباکتریایی آن‌ها تعیین کرد به طوری که این مکانیسم‌ها جداگانه و به تنهایی عمل نمی‌کنند و برخی از آن‌ها توسط سایر مکانیسم‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرند به طور مثال هر قدر ترکیبات فنولیک مانند کارواکرول، تیمول و اوژنول در اسانس‌ها بیشتر باشد فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها در برابر باکتری‌ها بیشتر است، مکانیسم اثر این ترکیبات مانند سایر ترکیبات فنولیک شامل: اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی می‌باشد (۲۲).

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایشات دیسک دیفیوژن، میکرودایلوشن، شناسایی ترکیبات با GC-MS و ارزیابی صفات فیتوشیمیایی این گیاهان می‌توان گفت که اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارای اثرات ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های بررسی شده بودند و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای بیشترین حساسیت نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌ها بود به نحوی که در برابر این باکتری برخی از اسانس‌ها و عصاره‌ها قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به قطر هاله عدم رشد بعضی از آنتی‌بیوتیک‌های شاهد (مترونیدازول، نالیدیک اسید) داشتند. وجود برخی تفاوت‌ها در میزان اثرات ضد باکتری مشاهده شده در این مطالعه و تحقیقات مشابه می‌تواند به سبب تفاوت مکان رشدی این گیاهان و همچنین روش استخراج اسانس و عصاره باشد.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن و مقایسه نتایج می‌توان گفت که اسانس و عصاره بادرنجبویه و اسطوخدوس اثرات ضد میکروبی علیه باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق داشتند و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای بیشترین حساسیت به اسانس بادرنجبویه می‌باشد. بنابراین خالص‌سازی و ارزیابی اثرات ضدباکتریایی ترکیبات فعال در عصاره و اسانس این دو گیاه به منظور ترکیب ضدباکتریایی و نگهدارنده مواد غذایی با عنوان یک ماده طبیعی گیاهی جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی علیه میکروارگانیسم‌های مسمومیت‌زا و منتقله از مواد غذایی در جهت بهبود کیفیت و سلامت غذایی استفاده کرد. همچنین امروزه یکی از مشکلات بارز در مورد درمان عفونت‌ها و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک-هاست که توجه ویژه را برای درمان می‌طلبد و از آنجایی که اثرات ضدباکتریایی اسانس و عصاره این دو گیاه نه تنها در این تحقیق که در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است، این مواد می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای درمان عفونت‌هایی که توسط باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد می‌شوند، توصیه می‌گردد.

## References:

1. Talei G, Meshkatalasadat M and Mosavi Z. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Four Medicinal Plants of Lorestan, Iran. *Journal of Medicinal Plants*.2007; 6(21): 45-52.
2. Dupont BF, Dromer F, Improvisi L. The problem of azole resistance in Candida. *Commentary. Journal de Mycologie Médicale. Supplément*. 1996; 6(2): 12-19.
3. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy PL. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 74(3): 217-220.
4. Mashreghi M, Momtazi F. Comparison of the antibacterial effects of various concentrations of alcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Carthamus tinctorius* on the growth phases of *Escherichia coli* O157. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2012; 11(2): 103-114.
5. Abu-Lafi S, Odeh I, Dewi H, Qabajah M, Hanus LO, et al. Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. *Bioresource Technology*. 2008; 99(9): 3914-3918.
6. Ahmady-asbchin S, Mostafapour MJ. Anti-bacterial interactions Rosemary (*Officinalis rosmarinus*) and essential oils of lavender (*Lavandula stoechas*) on two Gram-positive and three Gram-negative bacteria in vitro. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2018; 31(2): 121-136.
7. Basiri S, Esmaily H, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Yasa N, et al. Improvement by *Satureja khuzestanica* essential oil of malathion-induced red blood cells acetylcholinesterase inhibition and altered hepatic mitochondrial glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2007; 89(2). 124-129.
8. Venskutonis P, Dapkevičius A and Baranauskienė M. Flavour composition of some lemon-like aroma herbs from Lithuania. In *Developments in food Science*. 1995; 37: 833-847
9. Davazdahemami S, Sefidkon F, Jahansooz M, Mazaheri D. Comparison of biological yield, essential oil content and composition and phenological stages of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) in three planting dates. *Iranian journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 2008; 24(3): 263-270.
10. Andrade EHA, Alves CN, Guimarães EF, Carreira LMM, Maia JGS. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* LC Rich. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2011; 39(4-6): 669-675.
11. Arzhang M, Dakhili M and Farahani F. Investigation of chemical compounds and anti-microbial activity of essential Oil of *Melissa officinalis* L. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2015; 9(1): 7-13.
12. Adam KL. (2006). Lavender production, products, markets, and entertainment farms. Retrieved. 2006.
13. Ez zoubi Y, Bousta D, Farah A. A Phytopharmacological review of a Mediterranean plant: *Lavandula stoechas* L. *Clinical Phytoscience*. 2020; 6: 1-9.
14. Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46(5): 1739-1745.
15. Yaghoobi K, Kaka GShD, Ashayeri H. Therapeutic effects of *Lavandula angustifolia*. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 2016; 17(4): 1-9.

16. Ghadri T, Mousavi Gargari SL, Sharafi SM, Darvish Alipour Astanceh, Rezaee MB. Antimicrobial, antioxidant, hematologic and cytotoxic properties of *Lavandula angustifolia* essential oil. *Pathobiology Research*. 2010; 12(4): 45-58.
17. Ghiami Rad M, Lotfi A. Evaluation of Anti-Bacterial Activity of *Lavandula angustifolia* Alcoholic and Aquatic Extracts on some Pathogenic Bacteria. 2021; 39-45.
18. Myint S, Daud WRW, Mohamad AB, Kadhum AAH. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1996; 679(1-2): 193-195.
19. Akbary P. In vitro inhibitory activity of the leaf methanol extract of green tea (*Camellia sinensis*) against *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila* isolated of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Advances in Microbiology*. 2014; 4(12): 829.
20. Hall GS. Bailey & Scott's Diagnostic microbiology, 13th edn. In: American Society for Clinical Pathology. 2013; 138-139.
21. Akgül A and Chialva F. (1989). Constituents of the essential oil of *Echinophora tenuifolia* L. subsp. *sibthorpiana* (Guss.) Tutin from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 4(2), 67-68.
22. Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber S, Duke JA, et al. *Natural Products from Plants*. 2016.

پوستر

## بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی *Lagenaria siceraria* (opo squash) بر هایپرلیپیدمی ایجاد شده در اثر تریتون X-100 در موش های صحرایی نژاد ویستار

محمد گودرزی<sup>۱</sup>، شادی سلیمانی مطلق<sup>۲\*</sup>، محبوبه عباسلو<sup>۳</sup>، هستی مختاری<sup>۴</sup>، امیر قریب<sup>۵</sup>

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
۳. گروه ژنتیک مولکولی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۴. گروه میکروبیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
۵. گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** افزایش چربی خون یکی از مهم ترین عوامل زمینه ساز بیماری های قلبی عروقی به شمار می آید و علاوه بر آن در دراز مدت سبب آسیب به سایر ارگان های بدن از جمله: کلیه، چشم و اعصاب می گردد. در این تحقیق اثرات کاهنده چربی های خون عصاره الکی میوه *L.Siceraria* (opo squash) در موش های صحرایی هایپرلیپیدمی مورد بررسی قرار گرفته است. **روش تحقیق:** در این تحقیق ۳۶ سر موش صحرایی نژاد ویستار به شش گروه کنترل سالم، شاهد، آتورواستاتین (دریافت روزانه 10mg/kg) و دریافت کننده عصاره الکی میوه *L.siceraria* در دوزهای 200mg/kg و 400mg/kg و 600mg/kg تقسیم و به مدت ۱۴ روز تیمار شدند. در روز پانزدهم بعد از ۱۸ ساعت ناشتایی تمامی گروه ها (به جز کنترل سالم) مورد تزریق تریتون X-100 قرار گرفتند. بعد از ۲۴ از تزریق تریتون X-100 نمونه های خون جمع آوری و جهت سنجش چربی های خون به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۵ مورد تحلیل قرار گرفتند. **یافته ها:** هر سه دوز مذکور عصاره الکی میوه *L.Siceraria* سبب مهار چربی های خون به صورت معناداری ( $P < 0/05$ ) شدند و دوز 400mg/kg بهترین نتیجه را در مهار چربی های خون داشت. **نتیجه گیری:** نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می دهند که عصاره الکی میوه *L.Siceraria* تاثیرات بسیار مطلوبی بر روی چربی های خون داشته است و در نتیجه می تواند ریسک بیماری های قلبی عروقی را کاهش دهد.

**واژگان کلیدی:** چربی های خون، عصاره الکی، *L.Siceraria*، موش صحرایی.

نشانی نویسنده مسئول: لرستان، بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی. کدپستی ۶۹۱۵۱۳۶۱۱۱.

همراه: ۰۹۱۶۶۲۹۵۷۵۹

ایمیل: shadimotlagh@yahoo.com



## Investigating the effect of hydroalcoholic extract of *Lagenaria siceraria* (opo squash) on hyperlipidemia induced by Triton X-100 in Wistar rats

Mohammad Goudarzi<sup>1</sup>, Shadi Soleimani Motlaq<sup>2\*</sup>, Mahboob Abbasloo<sup>3</sup>, Hasti Mokhtari<sup>4</sup>, Amir Gharib<sup>5</sup>

1. Students Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Department of Biology, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran.
3. Department of Molecular Genetics, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
4. Department of Microbiology, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran.
5. Department of Laboratory Sciences, Borujard Branch, Islamic Azad University, Borujard, Iran.

### Abstract

**Background and purpose:** An increase in blood lipids is one of the most important underlying factors of cardiovascular diseases, and in addition, in over time, it causes damage to other organs of the body, such as kidneys, eyes, and nerves. In this research, the blood lipid lowering effects of the alcoholic extract of *L. Siceraria* fruit (opo squash) have been investigated in hyperlipidemic rats.

**Research method:** In this research, 36 male Wistar rats were divided into six groups: healthy control, control, atorvastatin recipient (daily intake of 10mg/kg) and recipients of alcoholic extract of *L.siceraria* fruit in doses of 200mg/kg and 400mg/kg. and 600mg/kg were divided and treated for 14 days. On the 15th day after 18 hours of fasting, all groups (except the healthy control) were injected with Triton X-100. After 24 days of Triton X-100 injection, blood samples were collected and transferred to the laboratory to measure blood lipids. Then they were analyzed using SPSS version 19 software.

**Findings:** All three doses of alcoholic extract of *L.Siceraria* fruit inhibited blood lipids significantly ( $P<0.05$ ) and the dose of 400mg/kg had the best result in inhibiting blood lipids.

**Conclusion:** The results obtained from this research show that the alcoholic extract of *L.Siceraria* fruit has very favorable effects on blood lipids and as a result can reduce the risk of cardiovascular diseases

**Keywords:** Blood lipids, Alcoholic extract, *L.Siceraria*, Rat.

### مقدمه

چربی خون بیماری است که در افراد مبتلا به این بیماری باعث ایجاد یک شیوه جدید زندگی شده و تمامی روابط فرد را متأثر می کند (۱). تحقیقات نشان داده است که LDL بالا مهم ترین نقش را در ایجاد آترواسکلروز و بیماری های عروق کرونر ایفا می کند (۲-۴). تری گلیسیریدها و استرهای کلسترول توسط انواعی از ذرات لیپوپروتئینی منتقل می شوند، در هاپیر لیپیدمی مقادیر کلسترول و تری گلیسیرید و به دنبال آن ها مقادیر LDL به طور چشمگیری افزایش می یابد که مستقیماً با خطر بیماری های قلبی عروقی در ارتباط است (۵). از طرفی افزایش کلسترول عامل تشکیل پلاک های آترواسکلروتیک و سنگ های صفراوی می شود (۶). LDL با رسوب کلسترول در دیواره ی شریان ها سبب آتروژنیک می شود در حالی که HDL با خاصیت آنتی آتروژنیک کلسترول را بعد از پردازش مجدد، برای تشکیل اسیدهای صفراوی به کبد حمل می کند (۳ و ۶). بیماری های قلبی عروقی یکی از علل عمده مرگ و میر در سطح جهان بوده و یک سوم کل مرگ و میرها در جهان را به خود اختصاص می دهند. این بیماری ها علاوه بر مرگ و میر بالا، عوارض قابل توجهی را نیز به جا می گذارند و از علل ایجاد ناتوانی به خصوص در سنین بالا هستند. تخمین زده می شود که در دنیا کلسترول بالا عامل ایجاد ۱۸٪ از بیماری های عروقی مغز و ۵۶٪ از بیماری های ایسکمیک قلبی است که این میزان حدود ۷/۹٪ موارد مرگ را در بر می گیرد (۳ و ۷-۹) درمان مؤثر این موارد در نتیجه کاستن از خطر بیماری های ایسکمیک قلب و جلوگیری از آسیب های کبدی امکان پذیر است (۲ و ۴ و ۶ و ۸ و ۱۰-۱۲).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

دو گروه از داروهایی که جهت درمان هایپرلیپیدمی بکار می‌روند استاتین‌ها و فیبرات‌ها هستند (۱۳ و ۱۴) که با مکانیسم کاهش ساخت کلسترول، حرف ذرات آتروژنیک از پلاسما و افزایش آنزیم لیپولیز سبب کاهش چربی‌های خون می‌شود (۱۵). اما عواملی از قبیل هزینه‌های تحمیلی بر بیماران سبب شده است که توجه پژوهشگران به داروهای گیاهی بیشتر از پیش شود. از دیرباز تاکنون در تمام دنیا، استفاده از گیاهان دارویی جهت کنترل چربی خون مد نظر قرار داشته و اکثر این گیاهان با عملکردهای مختلف از جمله کاهش تری‌گلیسرید، افزایش HDL، کاهش LDL و غیره سبب کنترل این بیماری می‌گردند (۱۰ و ۱۶). کدوی (*Lagenaria Siceraria* Bottle gourd) از نظر گیاه‌شناسی عضو خانواده Cucurbitaceae است (۱۷) که برای رشد نیاز به نور و آب زیاد دارد و حدود ۷۵ روز زمان نیاز دارد تا بتوان اولین میوه‌ی خوراکی آن را برداشت کرد. گل‌های این کدو به رنگ سفید دیده می‌شوند که در طول شب باز می‌شوند. تصور می‌شود که این گیاه در مناطق استوایی آفریقا برای اولین بار روییده شده است و با مهاجرت بشر در طول زمان به سایر مناطق انتقال یافته است (۱۸ و ۱۹). امروزه این گیاه علاوه بر آفریقا در قسمت‌های گرمسیری از اروپا، آمریکا و آسیای شرقی کشت می‌شود (۱۲، ۱۸، ۱۹). در طی سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ ما موفق به کشت این گیاه در مناطق سرد سیر زاگرس شده‌ایم. مردم بخش‌هایی از کشور هند از میوه‌ی این گیاه جهت درمان یبوست، سرفه و درمان دیابت استفاده می‌کنند (۲۰ و ۲۱). کدوی *Bottle gourd* حاوی ۱۴ کالری در ۱۰۰ گرم است و این باعث می‌شود که این کدو به یکی از سبزیجات با کمترین کالری تبدیل شود، در نتیجه متخصصان رژیم غذایی، اغلب آن را برای رژیم‌های کاهش وزن توصیه می‌کنند (۲۲). این کدو در عین حال منبعی از ویتامین A و C، فولات، کلسیم، پتاسیم، منیزیم، اسید پانتوتونیک، نیاسین، پیریدوکسین، تیامین، سطوح بالای کولین به عنوان فاکتور لیپوتروپیک، ساپونین، کوکوروبیتاسین، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ترکیبات پلی فنولیک، پکتین و مقادیر قابل توجهی از: آهن، مس، روی و منگنز را شامل می‌شود و چربی و کلسترول آن بسیار کم است (۱۱-۱۳). وجود چنین ترکیبات مفیدی و شواهد محلی ما را بر آن داشت تا به طور عملی اثر عصاره میوه‌های برداشت شده از منطقه بروجرد را بر چربی‌های خون بررسی کنیم.

### روش کار:

میوه‌ی کدوی *L. Siceraria* از مزارع کشت شده در شهرستان بروجرد جمع آوری شد و بعد از شست و شو و خرد کردن در سایه و دمای اتاق خشک شد. میوه خشک شده توسط آسیاب پودر شد و جهت استخراج عصاره پودر عصاره با نسبت وزنی حجمی یک به ده در الکل اتانول ۷۰ درصد حل شد (۱۲) و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد در طول این مدت روزانه چندین بار ظروف حاوی عصاره تکان داده می‌شد. محلول توسط فیلترهایی با درصد تخلخل نزولی و سرانجام با کاغذ صافی واتمن فیلتر شد و بعد از فیلتراسیون در ظرف‌هایی، درون آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از ۷۲ ساعت عصاره‌ها جمع آوری شد.



شکل ۱- مزارع کشت شده در شهرستان بروجرد



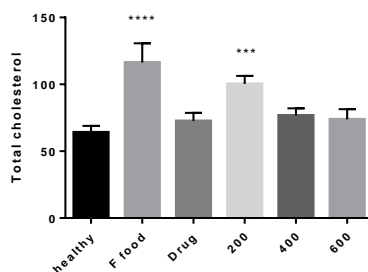
شکل ۲- میوه *Lagenaria siceraria*

در این تحقیق ۳۶ سر موش صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۶۰-۲۱۰ گرم از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بوعلی همدان تهیه و در شرایط کنترل شده ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در دمای اتاق (۲۷-۲۴ سانتی گراد) درون قفس‌هایی از جنس پلی اتیلن نگهداری شدند و با غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی (شرکت زیست فناوری رویان اصفهان) و آب شهری سالم تیمار شدند. روش کار با حیوانات به تصویب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد بروجرد رسید.

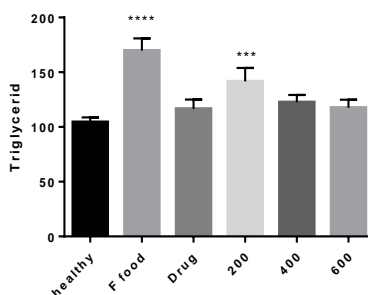
حیوانات در ۶ گروه مساوی به طور تصادفی دسته بندی شدند: گروه ۱ کنترل سالم و دریافت کننده نرمال سالین است. گروه ۲ کنترل هایپرلیپیدمی و دریافت کننده نرمال سالین‌اند. گروه ۳ کنترل دارویی آتورواستاتین‌اند (۸). گروه ۴ دریافت کننده عصاره هیدروالکلی میوه *L.Siceraria* با دوز ۲۰۰mg/kg است. گروه ۵ دریافت کننده عصاره هیدروالکلی میوه *L.Siceraria* با دوز ۴۰۰mg/kg است. گروه ۶ دریافت کننده عصاره هیدروالکلی میوه *L.Siceraria* با دوز ۶۰۰mg/kg است. همه‌ی گروه‌ها، تیمارهای یاد شده را به مدت ۱۴ روز راس ساعت ۱۰ صبح به صورت خوراکی دریافت کردند. در روز پانزدهم بعد از ۱۸ ساعت ناشتایی تمامی گروه‌ها به جز گروه اول (کنترل سالم) مورد تزریق درون صفاقی تریتون X-100 با دوز ۱۰۰mg/kg (۲۳) قرار گرفتند. موش‌ها همچنان ۲۴ ساعت دیگر در شرایط ناشتا و فقط با دسترسی به آب قرار داده شدند و سپس بعد از بیهوشی با کتامین و زایلازین با نسبت ۱ به ۳ خونگیری از قلب موش‌ها (۲۴) انجام گرفت. نمونه‌های خون جمع آوری شده جهت سنجش LDL ، TC ، TG و HDL به آزمایشگاه منتقل شدند و سنجش‌های مربوطه توسط دستگاه اتوانالایزر و کیت‌های تشخیصی استاندارد (شرکت پارس آزمون) انجام گرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۵ با در نظر گرفتن  $P < 0/05$  مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

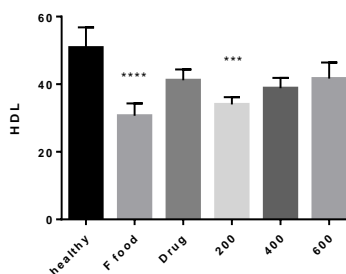
مقایسه‌ی نتایج آزمون‌های آماری بر طبق نمودارهای زیر نشان می‌دهد که تریتون سبب افزایش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) در سطوح کلسترول کل، تری گلیسرید و LDL و همچنین کاهش معنی‌دار HDL در مقایسه با گروه کنترل سالم می‌شود. همانطور که در نمودار نمایان است دوز ۲۰۰mg/kg توانسته فاکتورهای کلسترول کل تری گلیسرید، LDL و HDL را تنظیم کند اما نتوانسته است آن‌ها را در محدوده‌ی نرمال حفظ کند. دوز ۴۰۰mg/kg توانسته است فاکتورهای مذکور را به خوبی در محدوده‌ی طبیعی حفظ کند. دوز ۶۰۰mg/kg توانسته بهتر از دوز ۴۰۰mg/kg فاکتورها را در محدوده‌ی طبیعی حفظ کند اما اختلاف چشمگیری با آن ندارد. داروی آتورواستاتین نیز توانسته است فاکتورهای مذکور را در محدوده‌ی نرمال نگه دارد.



نمودار ۱- تغییرات کلسترول کل در اثر تزریق تریتون X-100 در گروه های کنترل سالم، دریافت کننده رژیم غذایی چرب، دریافت کننده آتروواستاتین و دریافت کننده عصاره گیاهی در دوز های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم

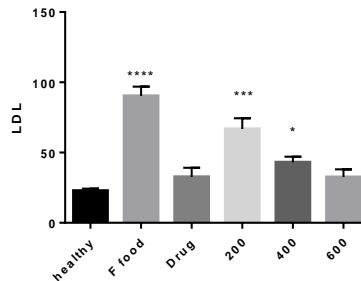


نمودار ۳- تغییرات تری گلیسیرید در اثر تزریق تریتون X-100 در گروه های کنترل سالم، دریافت کننده رژیم غذایی چرب، دریافت کننده آتروواستاتین و دریافت کننده عصاره گیاهی در دوز های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم



نمودار ۲- تغییرات HDL در اثر تزریق تریتون X-100 در گروه های کنترل سالم، دریافت کننده رژیم غذایی چرب، دریافت کننده آتروواستاتین و دریافت کننده عصاره گیاهی در دوز های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



نمودار ۴- تغییرات LDL در اثر تزریق تریتون X-100 در گروه های کنترل سالم، دریافت کننده رژیم غذایی چرب، دریافت کننده آترواستاتین و دریافت کننده عصاره گیاهی در دوز های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم

### بحث

تریتون X-100 و تریتون WR1339 جهت ایجاد هایپرلیپیدمی شدید در حیوانات آزمایشگاهی به کار می-رود (۲۵-۲۷). مزیت استفاده از این روش ساده و سریع عمل کردن آن است که همین سبب شده است از آن به طور گسترده جهت ارزیابی اثرات هایپرلیپیدمیک استفاده شود (۲۷) و در این تحقیق از تریتون X-100 استفاده شده است. تریتون با مهار آنزیم-های لیپاز و مسیرهای جذب لیپوپروتئین-هایی با تری گلیسرید بالا سبب افزایش لیپیدهای پلاسما می-شود، مطالعات نشان می-دهند که این سورفاکتانت سبب افزایش فعالیت HMG-CoA ردوکتاز (هیدروکسی متیل گلوکاریل کو آنزیم آ ردوکتاز) که تعیین کننده-ی سرعت سنتز کلسترول است، می-شود و در نتیجه کلسترول پلاسما را افزایش می-دهد، همچنین این تحقیقات نشان داده-اند که بالاترین سطوح لیپیدهای پلاسما در ۲۴ ساعت بعد از تزریق تریتون است (۲۱ و ۲۵ و ۲۸-۳۰) که در تحقیق حاضر نمونه-های خون در این زمان جمع آوری شده و مورد مطالعه قرار گرفته است .

بعد از تزریق و بالا رفتن سطوح لیپیدهای پلاسما، فاکتورهای چربی گروهی که دوزهای ۴۰۰ mg/kg و ۶۰۰ mg/kg را دریافت کرده بودند نتوانستند چربی خون خود را در محدوده-ی کنترل کنند. در بعضی از فاکتورها توانسته بودند بهتر از داروی آترواستاتین این مقادیر را حفظ کنند .

در مطالعه ای که آقای Ghule و همکاران بر روی کدوی *L.Siceraria* انجام دادند مشخص شد که عصاره-ی الکلی و کلروفومی این گیاه بیشترین ترکیبات موثر را در خود دارد که در این تحقیق از عصاره-ی الکلی استفاده شده است (۲۱). همچنین در سایر مطالعات انجام شده مشخص شده است که این گیاه خاصیت آنتی-اکسیدانی و ضد سرطانی، ضد التهابی و خنثی کردن رادیکال-های آزاد را دارد (۱۱ و ۲۰ و ۳۱ و ۳۲).

### نتیجه گیری:

نتایج حاصله ثابت می-کند که عصاره هیدروالکلی میوه-ی *L.Siceraria* در موش-های مبتلا به هایپرلیپیدمی سبب کاهش سطوح کلسترول کل، تری گلیسرید، LDL و افزایش HDL می-شود و در دوز ۴۰۰ mg/kg توانسته است فاکتورهای مذکور را همانند داروی آترواستاتین بخوبی در محدوده-ی قابل انتظار حفظ کند.

### تقدیر و تشکر

از جناب آقای دکتر عبد الرزاق مرزبان و خاتم دکتر زهره فائزی زاده که تجربیات خود را در این زمینه با ما به اشتراک گذاشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می-شود .

## تاییده اخلاقی

روش کار با حیوانات با کد IR.IAU.B.REC.1400.037 به تصویب کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد رسیده است.

## References:

1. Jellinger PS, Smith DA, Mehta AE, Ganda O, Handelsman Y, et al. American Association of Clinical Endocrinologists' guidelines for management of dyslipidemia and prevention of atherosclerosis. *Endocrine practice*. 2012; 18: 1-78.
2. Mohammadreza P. Studying the antioxidant properties of flavonoids on the affinity of LDL to the corresponding receptor: a model to prevent atherosclerosis. [In persian]
3. Azadikhah. Evaluation of blood levels of total antioxidant capacity and vitamin C in patients with or without atherosclerosis plaques, and their relationship with LDL, Oxidized-LDL and malondialdehyde levels: Hormozgan University of Medical Science; 2019. [In persian]
4. Siddiqa A, Gholam Ali N, Hossein M, Parveen M, Narges Jed. Investigation of the effect of *Artemisia sieberi* Besser extract on the level of lipoproteins and the development of atherosclerosis in the aorta of hypercholesterolemic rabbits. [In persian]
5. Shafie A, Rahimi AM, Naboizadeh F, Ranjbaran M, Ashabi G. Comparison of the effects of three types of high-fat, high-protein and low-calorie diets on the expression of Klotho and TGF- $\beta$  genes in the liver and blood serum of aged male Wistar rats. *Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran*. 2020;15(3):1-8.
6. Ghafouri Ali The composition of gallstones and their relationship with the amount of cholesterol, triglycerides, calcium and phosphorus in the blood. [In persian]
7. Farzaneh Rozhin, Hosseini Kianoush, Vahedi Siamak, Hamzeh Niko. Obesity and cardiovascular diseases. [In persian]
8. Vafajnejad, Sarki, Hasanpour Fard, Mohammad, Hosseini, Mehran. Blood lipid lowering activity of turnip root aqueous extract in hyperlipidemic rats. *Scientific Research Journal of Internal Medicine of the Day*. 2015 Apr 10;21(1):45-51 [In persian]
9. Azizi Fereydoun, Emami Habib, Salehi Payam, Arash Ghanbarian, Mirmiran Parveen, Mirbuloki Mohammadreza. Risk factors of cardiovascular diseases in the elderly, Tehran study of sugar and lipids. [In persian]
10. Fallah Hosseini, Hassan, Fakhrzadeh, Dastpak, Arzoo, Azarabadi, Mohtashmi Tutkabani. A review of medicinal plants effective on high blood fat. *Quarterly scientific journal of medicinal plants*. 2005 Sep 10;4(15):9-20 [In persian]
11. Maqsood M, Ahmed D, Atique I, Malik W. Lipase inhibitory activity of *Lagenaria siceraria* fruit as a strategy to treat obesity. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017; 10(3): 305-10.
12. Aslam M, Nijam R. Hypolipidemic and anti-atherogenic activity of aqueous extract of leaves of *Lagenaria Siceraria* in Wistar rats. *Journal of natural remedies*. 2014: 52-7.
13. Senior A, Kumar S, Kumar M. Comparison between hypolipidemic effect of *Lagenaria siceraria* and lovastatin in hypercholesterolemic rats. *Paripex Indian Journal of Research*. 2019; 8: 13-4.

14. Talai, Mahmoudpour, Shahdoost. Investigating the effect of atorvastatin on inflammatory indices in patients with type 2 diabetes. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2018; 21(4): 40-7. [In persian]
15. Shek A, Ferrill MJ. Statin—fibrate combination therapy. *Annals of Pharmacotherapy*. 2001; 35(7-8): 908-17.
16. Naghibi H, Salari R, Yousefi M, Khadem-Rezaiyan M, Ghanbarzadeh MR, Fayyazi Bordbar MR. Herbal Therapies for Weight Gain and Metabolic Abnormalities Induced by Atypical Antipsychotics: A Review Article. *Current Drug Discovery Technologies*. 2023; 20(5): 19-35.
17. Bonthala B, Abdin MZ, Arya L, Pandey CD, Sharma V, et al. Genome-wide SSR markers in bottle gourd: development, characterization, utilization in assessment of genetic diversity of National Genebank of India and synteny with other related cucurbits. *Journal of Applied Genetics*. 2022; 63(2): 237-63.
18. Decker-Walters DS, Wilkins-Ellert M, Chung SM, Staub JE. Discovery and genetic assessment of wild bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standley; Cucurbitaceae] from Zimbabwe. *Economic Botany*. 2004; 58(4): 501-8.
19. Schlumbaum A, Vandorpe P. A short history of *Lagenaria siceraria* (bottle gourd) in the Roman provinces: morphotypes and archaeogenetics. *Vegetation history and Archaeobotany*. 2012; 21: 499-509.
20. Katare C, Saxena S, Agrawal S, Joseph AZ, Subramani SK, Yadav D, Singh N, Bisen PS, Prasad GB. Lipid-lowering and antioxidant functions of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) extract in human dyslipidemia. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*. 2014; 19(2): 112-8.
21. Ghule BV, Ghante MH, Saoji AN, Yeole PG. Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects of *Lagenaria siceraria* (Mol.) fruit extracts.
22. Modgil M, Modgil R, Kumar R. Carbohydrate and mineral content of chryote (*Sechium edule*) and bottle gourd (*Lagenaria Siceraria*). *Journal of Human Ecology*. 2004; 15(2): 157-9.
23. Hashem MA, Abd-Allah NA, Mahmoud EA, Amer SA, Alkafafy M. A preliminary study on the effect of psyllium husk ethanolic extract on hyperlipidemia, hyperglycemia, and oxidative stress induced by triton X-100 injection in rats. *Biology*. 2021; 10(4): 335.
24. Struck MB, Andrutis KA, Ramirez HE, Battles AH. Effect of a short-term fast on ketamine–xylazine anesthesia in rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011; 50(3): 344-8.
25. Sudha SS, Karthic R, Naveen JR, Rengaramanujam J. Anti hyperlipidemic activity of *Spirulina platensis* in Triton x-100 induced hyperlipidemic rats. *Hygeia JD Med*. 2011; 3(2): 32-7.
26. Kourounakis AP, Victoratos P, Peroulis N, Stefanou N, Yiangou M, et al. Experimental hyperlipidemia and the effect of NSAIDs. *Experimental and Molecular Pathology*. 2002; 73(2): 135-8.
27. Parwin A, Najmi AK, Ismail MV, Kaundal M, Akhtar M. Protective effects of alendronate in Triton X-100-induced hyperlipidemia in rats. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2019; 30(6): 557.
28. Jeyabalan S, Palayan M. Antihyperlipidemic activity of *Sapindus emarginatus* in Triton WR-1339 induced albino rats. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2009; 2(2): 319-23.
29. Saleem U, Riaz S, Ahmad B, Saleem M. Pharmacological screening of *Trachyspermum ammi* for antihyperlipidemic activity in Triton X-100 induced hyperlipidemia rat model. *Pharmacognosy research*. 2017; 9(1): S34.

30. Jash R, Bagchi C, Mitra A, Tripathi SK. Evaluation of antihyperlipidemic activity of gugulipid alone and in combination with different dosage of atorvastatin in triton-induced hyperlipidemic rodent model: Exploring a possible synergistic activity. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*. 2022; 12(3): 289.
31. Ahmad MD, Ahmad I, El-Chaghaby G, Rashad S. Nutritional and medicinal potential of bottle gourd (*Lageneria siceraria*): A mini review. *Egyptian Journal of Botany*. 2022; 62(1): 1-0.
32. Hadi N, Tiwari P, Singh RB, Rupee K, Rupee S, et al. Beneficial effects of gourds in health and diseases. *Functional Foods and Nutraceuticals in Metabolic and Non-Communicable Diseases*. 2022; 61-77.



## بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* در سلول های *AGS* ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب حامل ژن کد کننده سم *TSST-1* استافیلوکوکوس اورئوس تغییر می کند

رویبا بختیاری<sup>۱</sup>، حدیثه اعرابی<sup>۲</sup>، مهدی شفیعی<sup>۲</sup>، فرانک عالی<sup>۳\*</sup>

۱۷. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۱۸. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۱۹. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** سرطان معده سومین عامل مرگ و میر به وسیله‌ی بیماری سرطان در سراسر جهان می‌باشد. اکثر افرادی که به سرطان معده مبتلا می‌شوند تا مرحله‌ی پیچیده شدن بیماری پیش می‌روند و در این مرحله سرطان تشخیص داده می‌شود. lncRNA ها جز RNA های تنظیمی سلول هستند. طیف وسیعی از شواهد نشان می‌دهد که نقش اصلی lncRNA، هدایت کمپلکس‌های اصلاح کننده کروماتین در برابر تغییرات اپی ژنتیکی می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثرات ژن سم *TSST-1* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر بیان lncRNA های *GHET1* و *CCAT1* در سلول های *AGS* ترانسفرم شده با وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-TSST-1* به روش *real time RT-PCR* می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *TSST-1* به روش شوک حرارتی وارد باکتری *E. coli* سویه TOP10 شد و سپس تخلیص شد. وکتور نوترکیب به روش لیپوفکشن وارد سلول های *AGS* شد و غربالگری توسط آنتی بیوتیک نئومایسین انجام گرفت. استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول های ترانسفکت شده انجام شد. در نهایت *real time RT-PCR* به منظور بررسی تغییر بیان lncRNA های نامبرده انجام شد.

**نتایج:** نتایج حاصل از این تست حاکی از آن می‌باشد که پس از واکنش لیپوفکشن، سلول های *AGS* در محیط حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین رشد کردند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، واکنش *real time RT-PCR* انجام شد. نتایج گویای این مطلب بود که پس از بیان سم *TSST-1* درون سلول های سرطانی، بیان lncRNA های *CCAT* و *GHET1* کاهش معنی داری یافتند. **نتیجه گیری:** با توجه به کاهش بیان lncRNA های مورد مطالعه می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که ژن سم *TSST-1* موجب اثرات ضد سرطانی می‌گردد و سلول را به سمت آپوپتوز هدایت می‌کند.

**واژگان کلیدی:** سرطان معده، سم *TSST-1*، lncRNA های *GHET1* و *CCAT1*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۴۸۰۹۲۶۱

پست الکترونیک: faranakaali1361@gmail.com

## The expression of *GHET1* and *CCAT1* lncRNAs changes in AGS cells transfected with the recombinant vector carrying the *Staphylococcus aureus* TSST-1 gene

Roya Bakhtiyari<sup>1</sup>, Hadiseh Arabi<sup>2</sup>, Mahdi Shafie<sup>2</sup>, Faranak Aali<sup>3\*</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. B.Sc. Student Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3. Ph.D. Student in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** Gastric cancer is the third leading cause of death worldwide due to cancer. Most people who develop gastric cancer are progressing to the complex stage of the disease, and cancer is detected at this stage. The purpose of this study was to investigate the effects of *TSST-1* gene expression on *GHET1* and *CCAT1* lncRNA expressions in AGS cells transfected with a new vector of pcDNA3.1 (+) - *TSST-1* in real time RT-PCR.

**Materials and Methods:** The recombinant plasmid containing *TSST-1* gene was introduced into the *E. coli* strain of TOP10 by thermal shock method and then purified. The recombinant vector was introduced into the AGS cells by lipofection technique and screening was done by neomycin antibiotics. Extracting RNA and synthesizing cDNA from transfected cells. Finally, real time RT-PCR was performed to investigate the change of expression of these lncRNAs.

**Results:** The results of this test indicate that after expression of *TSST-1* toxin within cancer cells, the expression of *CCAT1* and *GHET1* lncRNA expression decreased significantly.

**Conclusion:** The results indicate that the *TSST-1* toxin gene leads to anticancer effects and directs the cell to apoptosis.

**Keywords:** Stomach Cancer, *TSST-1* toxin, *GHET1*, *CCAT1*

### مقدمه

آدنوکارسینوم شایع ترین سرطان معده بوده و محل تومور در ۷۵ درصد از بیماران مبتلا به کارسینوم معده ثلث دیستال آن می باشد. کارسینوم معده علاوه بر تهاجم به غدد لنفاوی، به ساختمان های مجاور یعنی به انتهای تحتانی مری (توسط انتشار زیر مخاطی) پانکراس، کولون عرضی، پریتونئ و بندرت دئودنوم نیز گسترش می یابد. انتشارخونی تومور، منجر به متاستازهای ریوی، جنبی، کبدی، مغزی و استخوانی می گردد. تظاهرات بالینی در موارد زیادی کارسینوم معده در مراحل اول بدون علامت می باشد. آنور کسی (بی اشتهایی عصبی) و کاهش وزن علائم غیر اختصاصی می باشند و ارتباط چندانی با رشد تومور ندارند. ضعف و خستگی (نسبتا شایع)، کم خونی، بی اشتهایی، تهوع، استفراغ، سوءهضم، احساس ناراحتی در ناحیه اپی گاستر یا درد شدید و طاققت فرسای ناحیه اپی گاستر، بلع دردناک (دیسفاژی)، توده قابل لمس، ثابت و بی حرکت در شکم، علائم بعدی که ممکن است زودرس باشد شامل نفخ می باشد. استفراغ به طور شایع یک علامت دیررس بوده و می تواند ناشی از انسداد پیلور باشد. اما در صورت انسداد نواحی دیگر نیز دیده می شود. از علائم شایع سرطان معده می توان به کاهش اشتها و کاهش وزن، درد معده، علائم مبهم سوء هاضمه مانند آروغ زدن، احساس پری معده حتی پس از خوردن مقادیر اندک غذا، تهوع و استفراغ، سوزش سردل و علائم شبیه به زخم معده اشاره کرد (۱). در سرطان معده از بین رفتن هتروزایگوسیتی در نواحی کروموزومی تکراری متعدد اتفاق می افتد. اما در بیشتر مواقع این نواحی از دست رفتگی به طور قاطع با یک ژن مهار کننده تومور شناخته شده پیوستگی ندارد. جهش های *P53* که در حدود ۳۰ درصد کارسینوماهای گاستریک دیده شده اند گاهی با آسیب های ابتدایی اما غالباً با سرطان های پیشرفته تر همراه هستند. تعداد کمی جهش در *APC* نیز به خصوص در بیماران ژاپنی گزارش شده است. غالباً اختلال در گیر کننده فاکتور رشد ترا ریخت کننده  $\beta$  نوع II به خصوص در زیرگروه بزرگی از سرطان های معده که در سیستم ترمیم ناجور جفتی نقص دارند، اتفاق می افتد. حدود ۱۰ درصد سرطان های معده در گروه های خانوادگی اتفاق می افتند و ۱-۳ درصد ماهیت وراثتی واضحی دارند. مثال برجسته آن خانواده ناپلئون بناپارت است که مبتلا به شکل وراثتی غالب سرطان معده بوده اند. شناخته شده ترین نشانگه خانوادگی سرطان

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

معدده، سرطان معدی منتشر وراثتی است. در حدود ۳۰ درصد خانواده‌های مبتلا به HDGC در ژن *CDH1* که E-cadherin که واسطه مهم اتصال سلول به سلول است را رمز می‌کند، دارای جهش هستند. جهش‌هایی که در سراسر قالب باز خواندنی *CDH1* اتفاق می‌افتند استعداد ابتلا به آدنوکارسینومای وراثتی منتشر را ایجاد می‌کنند. نوع غالب جهش‌های *CDH1*، رمزهای خاتمه زود هنگام ایجاد می‌کنند. نفوذپذیری آلل جهش یافته *CDH1* بالاست. شایع‌ترین جهش‌هایی که خطر ابتلا به سرطان معدی را افزایش می‌دهند. ژن‌های ترمیم ناجور جفتی هستند. بسیاری از سرطان‌های معدی شواهدی مبنی بر ناپایداری میکروستلائیتی بروز می‌دهند و سرطان معدی بخشی از طیف بیماری سرطان کلورکتال غیر پولیپی وراثتی است (۲).  
*استافیلوکوکوس اورئوس* یک عامل مهم بیماری‌زا در بیمارستان شناخته می‌شود. این باکتری یک بیماری‌زای فرصت طلب است که زیستگاه طبیعی آن اپی‌تلیوم سنگفرشی مجرای قدامی بینی است. تقریباً به طور ثابت در ۲۰ درصد جمعیت کلونیزه شده و به طور متناوب ۲۰ در ۵۰ درصد جمعیت نیز شناسایی شده است (۳). *استافیلوکوکوس اورئوس* فاکتورهای ویروانس بسیاری دارد که طیف گسترده‌ای از عفونت‌ها را سبب می‌شود. برخی از این عوامل باعث اتصال باکتری به سطوح شده و برخی مانع از عملکرد سیستم ایمنی می‌شوند، همه این عوامل می‌توانند باعث ایجاد آسیب در میزبان شوند (۵ و ۴). *استافیلوکوکوس اورئوس* طیف گسترده‌ای از آگزوپروتئین‌ها و توکسین‌های پروتئینی را تولید می‌نماید که در روند بیماری‌زایی باکتری موثر می‌باشند. از سویی دیگر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از عوامل مهم عفونت‌های پوست و بافت‌های نرم و همچنین باکتری می‌باشد که از طریق بیمارستان یا جامعه کسب می‌شوند (۷ و ۶). آگزوتوکسین‌هایی از قبیل توکسین سندروم شوک توکسیک-۱ (TSST-1) متعلق به گروهی از توکسین‌ها است که به عنوان سوپر آنتی ژن‌های پیروژنیک شناخته شده اند (۹ و ۸). TSST-1 توسط ژن *tsst* رمز می‌شود. روی کروموزوم باکتری‌ها درون عناصر ژنتیکی متحرک kb ۱۵/۲ تحت عنوان جزایر پاتوژنیسیته-۱ *استافیلوکوکوس اورئوس* قرار دارد. TSST-1 نقش سوپر آنتی ژنی دارد. سوپر آنتی ژن‌ها با فعال سازی ناحیه متغیر VB روی گیرنده سلول‌های T و MHC کلاس ۲ باعث تحریک سلول‌های T می‌شوند. سلول‌های T فعال شده سایتوکاین‌هایی از قبیل اینترلوکین-۱ و  $TNF-\alpha$  آزاد کرده که این عوامل باعث ایجاد شوک و آسیب بافتی می‌شوند (۱۰). هدف از این تحقیق بررسی بررسی میزان بیان *lncRNA*های *GHET1* و *CCAT1* در سلول‌های AGS ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب حامل ژن TSST1 *استافیلوکوکوس اورئوس* است.

### مواد و روش‌ها

**سلول مورد استفاده:** سلول‌های رده سلولی AGS از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه گردید. ابتدا محیط کشت RPMI 1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد و انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شد.

**پلاسمیدها:** پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+) حامل ژن *tsst-1* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین پلاسمید pcDNA3.1(+) بدون ژن خارجی از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، تهیه شد.

**تکثیر پلاسمید:** برای تکثیر و تأیید پلاسمیدها باید آن‌ها را درون میزبان باکتریایی که رشد سریع دارند وارد کرد که به این فرآیند ترانسفورماسیون گفته می‌شود. این پلاسمیدها دارای نقطه‌ی شروع همانندسازی هم در میزبان پروکاریوتی و هم در میزبان یوکاریوتی می‌باشد. جهت انجام ترانسفورماسیون در ابتدا لازم است که سلول مستعد ساخته شود. تهیه سلول مستعد به روش شوک حرارتی و  $cacl_2$  انجام شد.

**استخراج پلاسمید:** به منظور استخراج پلاسمید نوترکیب از سلول‌های *E. coli* ابتدا از ماتریکس‌ها، درون ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB-Broth حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کشت داده شد و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکردار قرار داده شدند. محیط کشت حاوی باکتری را در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری وارد و میکروتیوب در شرایط rpm

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

۱۲۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و این کار برای تمام محیط کشت انجام داده شد. سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید FAVORGEN، پلاسمیدها استخراج گردید.

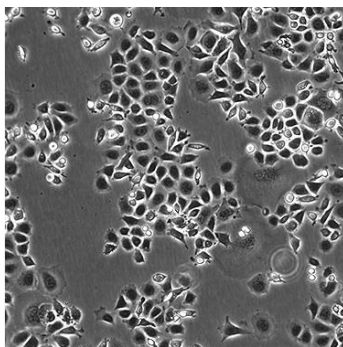
**تایید صحت استخراج پلاسمید:** پلاسمیدهای استخراج شده روی ژل آگارز برده شد و صحت استخراج پلاسمید بررسی شد. روش انتقال پلاسمید به سلول (لیپوفکشن): سلول های AGS رشد یافته با وکتور نوترکیب، تراریزش (ترانسفکت) شد. برای تراریزش این سلول ها از روش لیپوفکشن بهره گرفته شد. در کنار آن ها، دو دسته سلول دیگر به عنوان گروه های شاهد و کنترل در نظر گرفته شد. گروه کنترل بدون انتقال پلاسمید و گروه شاهد با انتقال پلاسمید pcDNA3.1(+) فاقد ژن هدف مورد آزمایش قرار گرفت. **برداشت سلول ها:** هر سه دسته سلول (تیمار، کنترل و شاهد)، در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین رشد داده شد. انتظار می رود سلول های گروه کنترل (فاقد پلاسمید)، در اثر آنتی بیوتیک نئومایسین از بین بروند. به این منظور، روز بعد، میزان ۳۰ میلی گرم از آنتی بیوتیک نئومایسین در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS و Pen-strep حل شد و محلول نئومایسین با غلظت ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه گردید. پس از تخلیه محیط کشت پلیت ۶ خانه، محیط حاوی نئومایسین جایگزین آن شد. پس از رشد سلول ها، توسط ۰/۵ میلی لیتر PBS شست و شو داده شد و سپس ۰/۵ میلی لیتر تریپسین اضافه شد و پلیت به مدت ۱-۲ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا سلول ها از ته پلیت جدا شدند. تریپسین توسط ۱ میلی لیتر محیط کشت خنثی شد و تمامی محتویات هر خانه پلیت توسط سمپلر به درون یک فالكون استریل مستقل منتقل شد. محتویات فالكون به مدت ۵ دقیقه در شرایط rpm ۱۲۰۰ سانتریفوژ شد و محیط رویی تخلیه گردید و رسوب در ۱ میلی لیتر محیط کشت حل شد. سوسپانسیون سلولی در ۲ فلاسک T25 تقسیم شد و به هر فلاسک، ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین اضافه شد و در انکوباتور قرار گرفت تا سلول ها رشد کردند.

**RNA:Reverse transcriptase PCR (RT-PCR):** تام سلولی از سلول های ترانسفکت شده، توسط کیت استخراج RNA (RNX-plus، سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده به وسیله نانودراپ (ترموساینتیفیک، امریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. پس از انجام DNase Treatment به منظور غیرفعال شدن آنزیم DNase، نمونه موجود به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه ی سلسیوس گرما دهی شد. از EDTA (۲ μl) EDTA (۵۰ mM) جهت محافظت از RNA در دمای بالا استفاده شد. سپس، ۱ میکروگرم از RNA تام سلولی استخراج شده از هر گروه، ۱ میکرولیتر از oligoDt و random hexamer (۵۰ μM) جهت سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. cDNA سنتز شده جهت واکنش RT-PCR و Real time PCR استفاده شد. برای اثبات درستی cDNA سنتز شده ابتدا PCR با پرایمرهای ژن GAPDH انجام شد.

**q-PCR:** از روش q-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان ژن های سلول های ترانسفورم شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-*tsstI* در مقایسه با سلول های ترانسفورم شده با وکتور خالی استفاده شد. ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. cDNA هر گروه در رقت سریال های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه گردید. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۳ μL بود که حاوی: ۱ μL از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر دو پرایمرهای F/R، و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر. همه واکنش ها به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سانتیگراد به ۹۵ درجه سانتیگراد (۱ درجه سانتیگراد در ثانیه) رسم شد. جهت محاسبه بیان ژن، چرخه های آستانه (CT) توسط نرم افزار Rotor-Gene Real-time analysis نسخه ۶ رسم شد. تغییرات نسبی بیان mRNA ها توسط روش لیواک  $2^{-DDCt}$  با مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد. با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری t بیان ژن ها بررسی و مقایسه شد. مقدار  $P\text{-Value} \leq 0.05$ ، از لحاظ آماری معنی دار محسوب شد.

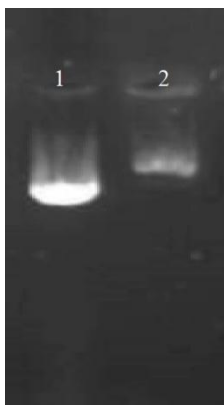
### یافته‌ها

نتایج کشت و شمارش سلول‌ها: سلول‌های رده AGS کشت داده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت بررسی شد (شکل ۱). طبق مشاهدات میکروسکوپی فلاسک، سلول‌ها حدود ۸۰ درصد رشد کرده بودند. بعد از تریپسینه کردن فلاسک و سانتریفیوژ، سوسپانسیون سلولی در محیط کشت تهیه و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام نئوبار برده شد و شمارش صورت گرفت. میزان ۳۰۰۰۰۰ سلول، درون چاهک‌های پلیت ۶ خانه seed شد.



شکل ۱- سلول AGS (بزرگنمایی ۱۰۰)

نتایج استخراج پلاسمیدها: بعد از تکثیر پلاسمید در باکتری *E. coli*، استخراج توسط کیت استخراج پلاسمید انجام شد و ۳ میکرولیتر از آن روی ژل آگارز الکتروفورز شد (شکل ۲). تفاوت سایز باندهای روی ژل آگارز نشان دهنده حضور و عدم حضور ژن *TSS1* با اندازه ۷۴۰ جفت باز بود.

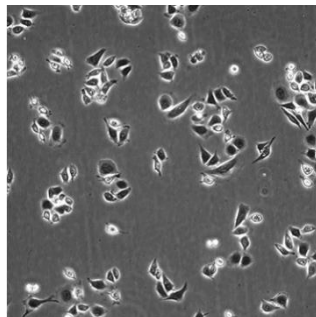


شکل ۲- نتایج استخراج پلاسمید بر روی ژل آگارز. چاهک شماره ۱ حاوی پلاسمید pCDNA3 فاقد ژن سم (۵۴۲۸ جفت باز) و چاهک شماره ۲ پلاسمید دارای ژن (۶۱۶۸ جفت باز).

نتایج انتقال پلاسمید به سلول‌ها: پس از انجام واکنش لیپوفکشن، سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده‌اند به آنتی‌بیوتیک نئومایسین مقاوم شدند و پس از افزودن محیط کشت حاوی نئومایسین زنده ماندند. پس از تکثیر سلول‌ها درون پلیت ۶ خانه، به فلاسک T25 منتقل شدند (شکل ۳). پس از رسیدن تراکم فلاسک به حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد، رسوب سلولی جهت استخراج RNA تهیه گردید.

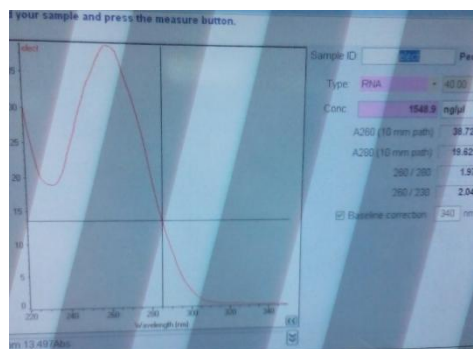
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



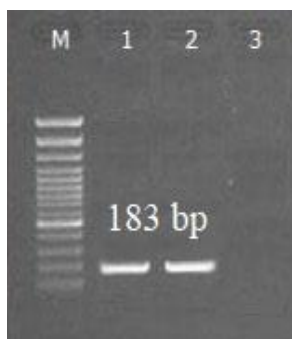
شکل ۳- سلول‌های AGS پس از واکنش لیپوفکشن با محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک نتومایسین (بزرگنمایی ۱۰۰).

نتایج استخراج RNA: پس از تریپسینه کردن سلول‌های لیپوفکت شده، استخراج RNA انجام شد. پس از استخراج RNA، غلظت RNA حاصل توسط دستگاه نانودراپ مشخص گردید. غلظت RNA بر حسب ng/μL و نیز نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۴- تعیین غلظت RNAهای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ.

بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *GAPDH* انجام شد و محصولات آن روی ژل الکتروفورز مشاهده شد. باند حاصل نشان دهنده صحت سنتز cDNA بود (شکل ۵).



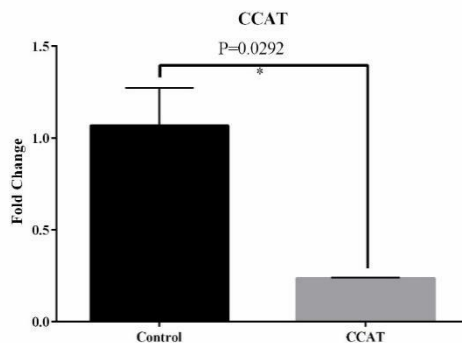
شکل ۵- چاهک شماره ۱ و ۲ نتیجه PCR ژن *GAPDH* بر روی cDNA سنتز شده، چاهک شماره ۳ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

نتایج انجام **real time RT-PCR**: نتایج آنالیز آماری مربوط به lncRNAهای *GHET1* و *CCAT1* به وسیله نرم افزار SPSS انجام شد. برای انجام این آنالیز، Ct هر نمونه (هم نمونه ژن مورد نظر و هم نمونه ژن کنترل داخلی) به صورت جداگانه

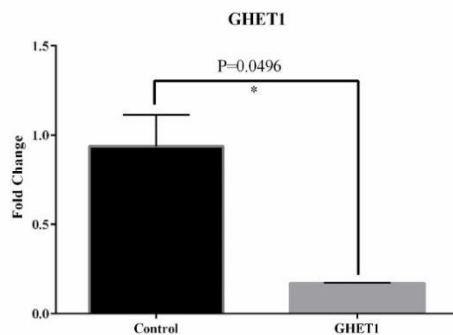
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

برای انجام آنالیز و بدست آوردن تغییر بیان ژن‌ها، یادداشت گردید. پس از نرمالایز کردن داده‌ها با ژن خانه‌دار و بدست آوردن میزان بیان، برای نرم افزار تعریف می‌شود و در نهایت نتایج به صورت نمودار قابل مشاهده می‌باشد. در این آنالیز تغییر بیان هر دو lncRNA معنی‌دار بود و میزان P Value قابل قبول بود. در واقع در اثر بیان ژن سم *TSSST1* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس سلول به سمت آپوپتوز پیش رفته است. میزان تغییر بیان در نمودارهای زیر نشان داده شده است (شکل ۶ و ۷).



شکل ۶- نتایج آنالیز آماری *CCAT*. بیان *CCAT* lncRNA در گروه سلول‌های تیمار شده با وکتور حاوی ژن سم *TSSST1* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است ( $p=0.0292$ ).



شکل ۷- نتایج آنالیز آماری *GHET1*. بیان *GHET1* lncRNA در گروه سلول‌های تیمار شده با وکتور حاوی ژن سم *TSSST1* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است ( $p=0.0496$ ).

### بحث

علی‌رغم کاهش چشمگیر بروز سرطان معده در مدت چندین دهه گذشته در کشورهای صنعتی، سرطان معده همچنان به عنوان علت شایع مرگ ناشی از بدخیمی محسوب می‌شود و بعد از سرطان ریه در این زمینه دومین مقام را داراست. با این حال حدود ۶۰٪ مورد‌های جدید سرطان معده در کشورهای کمتر توسعه یافته رخ می‌دهد و مکان‌هایی همچون ژاپن، کره، کاستاریکا، اکوادور، بلاروس و روسیه بروز بالایی از سرطان معده را نشان می‌دهند. در میان سرطان‌های اولیه معده آدنوکارسینوماها، شایع‌ترین آنهاست و بقیه تومورهای بدخیم شامل: لنفوم، تومور کارسینوئید و سایر سارکوماها می‌باشند. بروز سالانه این بیماری در آمریکا حدود ۲۲۰۰۰ و مرگ ناشی از این بیماری حدود ۱۲۰۰۰ نفر می‌باشد بقای ۵ ساله از ۱۵٪ در سال ۱۹۷۵ به ۲۲٪ رسیده است. با این وجود هنوز در ایران سرطان معده در شمار شایع‌ترین سرطان‌ها قرار داد و یکی از مشکلات بهداشتی جامعه ما می‌باشد. با توجه به این مسئله مطالعه سرطان معده از لحاظ رفتارهای بالینی و جمعیت‌شناسی آن در جهت کمک به طرح‌های اجتماعی در زمینه تشخیص زودرس، روش‌های درمانی مناسب‌تر و کاهش بروز این بیماری با دخالت بر عوامل پیشگیرانه منطقه‌ای همچون تغییر رژیم غذایی مسئله‌ای در خور توجه است (۱۱).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

استافیلوکوکوس اورئوس فاکتورهای پنهانی بیماری‌زای بسیاری را بیان می‌کند که پروتئین‌های سطحی کلون شدن در بافت میزبان را ترویج می‌دهند. فاکتورهایی که شاید فاگوسیتوز را مهار می‌کنند و سم‌هایی که به بافت میزبان آسیب زده و باعث ایجاد علائم بیماری می‌شوند از تأثیرات دیگر این فاکتورها هستند. انتروتوکسین‌ها انواع مختلفی از جمله A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E, G و F را دارند. انتروتوکسین B نوعی اگزوتوکسین است که توسط استافیلوکوکوس اورئوس تولید می‌شود. این توکسین یکی از سموم مسموم کننده‌ی غذای انسان‌هاست و به عنوان سلاح بیولوژیکی در برخی از کشورها ساخته می‌شود. SEB محرک آزادسازی سیتوکاین و التهاب است. این سم با استنشاق و بلعیده شدن همراه آب و غذا وارد بدن می‌شود. توالی نوکلئوتیدی ژن انتروتوکسین B استافیلوکوکوس اورئوس از کدون آغازی ATG به این صورت است که یک قالب خوانش باز انتروتوکسین B اولیه که ۲۶۶ آمینواسید خواهد داشت را کد می‌کند. در سمت انتهایی ۵' ژن یک توالی سیگنال به طول ۲۷ آمینواسید کد می‌شود. ژن این پروتئین تک رشته‌ای در انتهایی ۵' دارای توالی پروموتری و در انتهایی ۳' دارای ساختار پالیندرومیک غنی از تیمین است که سیگنال پایانی ترجمه می‌باشد (۱۲).

Gu و همکارانش در سال ۲۰۱۵ روی بررسی تغییرات بیان و نوع فعالیت برخی از lncRNAها در سلول‌های توموری افراد مبتلا به سرطان معده و یافتن بیومارکرهای مناسب برای پیش‌بینی و درمان این بیماری مطالعاتی انجام دادند. از جمله این lncRNAها می‌توان از *GHET1* و *CCAT1* نام برد. طبق اطلاعات به دست آمده از این تحقیق آن‌ها نتیجه گرفتند که این lncRNAها در سلول‌های سرطان معده نسبت به سلول‌های نرمال معده از خود بیان نشان می‌دهند و از آن‌ها می‌توان به عنوان بیومارکرهای مناسبی جهت پیش‌بینی و بهبود در درمان سرطان معده بهره جست (۱۳).

تحقیقی در سال ۲۰۱۵ توسط Miao و همکاران جهت بررسی انتروتوکسین SEB بر روی سلول‌های Sqc انجام شد. نتایج گویای این مطلب بود که SEB می‌تواند به عنوان یک ماده‌ی بالقوه برای آسان‌سازی برخی ایمنی‌تراپی‌ها عمل کند. SEB قادر است که رشد سلول‌های Sqc را در مدل‌های موشی مهار کند (۱۴).

در سال ۲۰۱۷ Huang و همکاران به منظور بررسی مهار بیان ژن *GHET1* در رده‌ی سلولی *AGS* تحقیقاتی انجام دادند. روش پیشنهادی آن‌ها برای بررسی بیان این lncRNA تکنیک RT-PCR بود. در این تحقیقات آن‌ها دریافتند که در محیط *In vitro* فعالیت بیولوژیکی سلول‌هایی که در آن‌ها بیان *GHET1* کاهش پیدا کرده بود، کم شده و چرخه سلولی در آن‌ها متوقف شده بود. در نتیجه آن‌ها پیشنهاد کردند که از این lncRNA به عنوان یک بیومارکر جهت بهبود در روند پیش‌بینی، تشخیص و درمان بیماری سرطان معده می‌توان استفاده کرد (۱۵).

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ژن کد کننده سم *TSST-1* بر بیان lncRNAهای *GHET1* و *CCAT1* در سلول‌های *AGS* ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب حامل ژن تولید کننده سم به روش *real time RT-PCR* است. به همین منظور، ژن *TSST-1* درون پلاسمید pCDNA3 کلون گردید. سپس جهت تکثیر پلاسمید حاضر از باکتری *E. coli* سویه TOP10F استفاده گردید. همزمان با تکثیر پلاسمید مذکور، سلول‌های سرطانی معده (لاین *AGS*) نیز کشت شدند. سپس پلاسمید به روش لیپوفکشن به درون سلول‌های سرطانی منتقل گردید و در محیط حاوی آنتی بیوتیک مناسب، کشت شدند. پس از کشت سلول‌های حاوی ژن سم مورد نظر، استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. واکنش *real time RT-PCR* برای lncRNAهای *GHET1* و *CCAT1* صورت گرفت. نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های مذکور نشان دهنده کاهش بیان این lncRNAها بود. در واقع پس از بیان شدن ژن سم درون سلول‌های *AGS*، سلول‌ها تحت تاثیر این سم به سمت آپوپتوز پیش رفته‌اند. نتایج حاصل از این تست حاکی از آن می‌باشد که پس از انتقال وکتور حاوی ژن سم و بیان سم *TSST-1* درون سلول، بیان lncRNAهای *CCAT* و *GHET1* نسبت به گروه کنترل با فرض ۹۵ درصد کاهش معنی داری یافته بودند. این مطلب بیانگر موثر واقع شدن سم *TSST-1* بر سلول‌های سرطان معده رده *AGS* و القای آپوپتوز در آن‌ها می‌باشد.

نتیجه گیری



طبق نتایج بدست آمده در این مطالعه، با توجه به کاهش بیان lncRNAهای مورد مطالعه می توان نتیجه گرفت که انتقال ژن مربوط به سم *TSST-1* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می تواند سلول های لاین سرطانی AGS را به سمت آپوپتوز پیش ببرد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری، کاهش بیان معنی دار lncRNAهای *GHET1* و *CCAT1* نمونه های تیمار نسبت به نمونه های کنترل پس از بیان ژن سم مشاهده شد.

#### References:

1. Doosti A, Zamani M, Ghasemi Dehkordi P, Taheri S, Banitalebi M, et al. Association of the p53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in South West of Iran. Scientific Research and Essays. 2011; 6 (15): 3148-3152.
2. Malakoutian M, Mirzadeh-Azad F, Naeli P, Foaani Y, Mowla SJ. A long non-coding RNA, PSORS1C3, located upstream of the human Oct4 gene is expressed in pluripotent and tumor cell lines. Pathobiology Research. 2014; 17(3): 105-17.
3. Hu DL, Maina EK, Omoe K, Inoue F, Yasujima M, et al. Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome mec genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. The Tohoku journal of experimental medicine. 2011; 225(3): 161-9.
4. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. New England journal of medicine. 1998; 339(8): 520-32.
5. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, et al. Staphylococcus aureus isolates carrying Pantone-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. Journal of clinical microbiology. 2005; 43(5): 2384-90.
6. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. International journal of food microbiology. 2000; 61(1): 1-0.
7. Souod N, Kargar M, Doosti A, Ranjbar R, Sarshar M. Genetic Analysis of *cagA* and *vacA* Genes in Helicobacter Pylori Isolates and Their Relationship with Gastrointestinal Diseases in the West of Iran. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2013; 15(5): 371-6.
8. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, et al. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. The Journal of infectious diseases. 2004; 189(12): 2334-6.
9. Holtfreter S, Broker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005; 53(1): 13-27.
10. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in Staphylococcus aureus. Molecular microbiology. 1998; 29(2): 527-43.
11. Forman D, Goodman KJ. The epidemiology of stomach cancer: correlating the past with the present: Socioeconomic influences in early life can influence mortality in adult life. Bmj. 2000; 320(7251): 1682-3.
12. Jones CL, Khan SA. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology. 1986; 166(1): 29-33.
13. Gu Y, Chen T, Li G, Yu X, Lu Y, et al. LncRNAs: emerging biomarkers in gastric cancer. Future oncology. 2015; 11(17): 2427-41.
14. Miao BP, Zhang RS, Sun HJ, Yu YP, Chen T, et al. Inhibition of squamous cancer growth in a mouse model by Staphylococcal enterotoxin B-triggered Th9 cell expansion. Cellular & molecular immunology. 2017; 14(4): 371-9.
15. Huang H, Liao W, Zhu X, Liu H, Cai L. Knockdown of long noncoding RNA GHET1 inhibits cell activation of gastric cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017; 92: 562-8.

## بررسی اثرات ژن کد کننده پپتید *Tachyplesin I* خرچنگ نعل اسبی بر بیان ژن های *Bax* و *Bcl-2* در سلول های ACHN

معصومه عباسیان<sup>۱</sup>، آرش ابراهیمی ناغانی<sup>۲</sup>، فرانک عالی<sup>۳\*</sup>، امیرحسین قوامی<sup>۲</sup>

۲۰. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.  
۲۱. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.  
۲۲. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان در نتیجه تقسیم غیر قابل کنترل سلول ها و در اثر عوامل محیطی و اختلال های ژنتیکی به وجود می آید. تومور مجموعه ای از سلول هاست که به دلیل رشد و تقسیم خارج از کنترل آن ها ایجاد می شود. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات ژن کد کننده پپتید *Tachyplesin I* بر بیان ژن های *Bax* و *Bcl-2* در سلول های سرطان کلیه رده ACHN می باشد. **مواد و روش ها:** پلاسمید نوترکیب (+)pcDNA3.1 حاوی ژن *Tachyplesin I* به روش شوک حرارتی وارد باکتری *E. coli* سویه TOP10 شد و سپس تخلیص شد. سپس وکتور نوترکیب حاوی ژن *Tachyplesin I* به روش لیپوفکشن وارد سلول های ACHN شد و غربالگری توسط آنتی بیوتیک نئومایسین انجام گرفت. استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول های ترانسفکت شده انجام شد. در نهایت واکنش real time RT-PCR به منظور بررسی تغییر بیان ژن های *Bax* و *Bcl-2* انجام شد. **نتایج:** پس از لیپوفکشن سلول ها در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین رشد کردند. سپس استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. واکنش real time RT-PCR نشان داد که بیان ژن *Tachyplesin I* در سلول های سرطان سینه رده ACHN سبب کاهش بیان ژن *Bcl-2* ( $P=0.0198$ ) و افزایش بیان ژن *Bax* ( $P=0.069$ ) شد. **نتیجه گیری:** با توجه به این که حضور ژن *Tachyplesin I* باعث افزایش معنی دار بیان در ژن *Bax* و کاهش معنی دار بیان در ژن های *Bcl-2* می شود، احتمال می رود که بتواند سلول را به سمت آپوپتوز هدایت کند.

**واژگان کلیدی:** سرطان کلیه، *Tachyplesin I*، *Bcl-2*، *Bax*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۳۴۸۰۹۲۶۱

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۶۲

پست الکترونیک: faranakaali1361@gmail.com

## Effects of Tachyplesin I Peptide Coding Gene on *Bcl-2* and *Bax* Gene Expression in ACHN Cells

Masomeh Abbasian<sup>1</sup>, Arash Ebrahimi-Naghani<sup>2</sup>, Faranak Aali<sup>3,\*</sup>, Amir-Hossein Ghavami<sup>2</sup>

1. M.Sc. in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. B.Sc. Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Ph.D. Student in Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background and Aim:** Cancer occurs as a result of uncontrolled cell division and environmental factors and genetic disorders. A tumor is a collection of cells that develops due to their out-of-control growth and division. The aim of this study was to investigate the effects of the gene encoding bee venom melatonin on the expression of *Bcl-2* and *Bax* genes in ACHN kidney cancer cells.

**Materials and Methods:** Recombinant plasmid pcDNA3.1 (+) containing *Tachyplesin I* gene was entered into TOP10 strain *E. coli* by heat shock and then purified. The recombinant vector containing the *Tachyplesin I* gene was then inserted into ACHN cells by lipofection and screened with the antibiotic neomycin. RNA extraction and cDNA synthesis were performed from transfected cells. Finally, the real-time RT-PCR reaction was performed to investigate the altered expression of *Bcl-2* and *Bax* genes.

**Results:** After lipofection, the cells were grown in culture medium containing the antibiotic neomycin. Then RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Real-time RT-PCR showed that the expression of *Tachyplesin I* gene in ACHN breast cancer cells decreased the expression of *Bcl-2* gene ( $P = 0.0198$ ) and increased the expression of *Bax* gene ( $P = 0.069$ ). Conclusion: Considering that the presence of *Tachyplesin I* gene causes a significant increase in expression in *Bax* gene and a significant decrease in expression in *Bcl-2* genes, it is likely that it can lead the cell to apoptosis.

**Keywords:** Kidney Cancer, *Tachyplesin I*, *Bcl-2*, *Bax*

### مقدمه

سرطان سلول کلیه یا همان تومورهای بدخیم سلول‌های پوششی کلیه، ۸۵ درصد از کل نئوپلاسم‌های کلیه را تشکیل می‌دهند. تومورهای بدخیم سلول‌های پوششی کلیه، در هر دو کلیه شیوع یکسانی دارند و به طور اتفاقی در قطب‌های فوقانی و تحتانی توزیع می‌شوند. سرطان سلول‌های کلیوی، شایع‌ترین نوع سرطان کلیه بوده و تقریباً ۳ درصد از کل بدخیمی‌های بزرگسالان در ارتباط با این بیماری است. پیش‌آگهی آن همچنان ضعیف باقی مانده است. بقای ۵ ساله در این افراد بین ۳۰ تا ۶۰ درصد بسته به مرحله تومور متغیر است (۱ و ۲). بر اساس مطالعه‌های بالینی و ژنتیک، عوامل خطرزای متعددی برای پیدایش سرطان کلیه وجود دارد. اکثر مطالعه‌ها نشان می‌دهد که یک ارتباط مثبت بین سرطان کلیه و مصرف سیگار وجود دارد و به میزان ۳۵ درصد ابتلا به این بیماری را افزایش می‌دهد. چاقی نیز ارتباط مثبتی با سرطان کلیه نشان می‌دهد (۱).

آپوپتوز یا مرگ سازمان یافته و برنامه‌ریزی شده سلول اصلی‌ترین مکانیسم در تکامل و هموستاز بافت‌های بالغ در جهت حذف سلول‌های غیر ضروری، آلوده، موتاسیون و یا آسیب دیده به واسطه مسیرهای خودکشی داخلی است و عوامل مختلف فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی باعث القای آن می‌گردند. آپوپتوزیس به طور کلی از دو مسیر خارجی و داخلی سلول را تحت تاثیر قرار داده و از بین می‌برد. در مسیر خارجی پیام‌های مرگ نظیر اینترلوکین ۱ بتا و فاکتور تومر نکروز آلفا به گیرنده‌های مرگ غشای سلولی متصل می‌شوند و موجب فعال‌سازی کاسپازها و در نهایت آپوپتوز سلولی می‌گردند (۳). در مسیر داخلی میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی محوری فرآیند را دارند که در این مسیر محوری میتوکندری در ایجاد آپوپتوز بیشترین اهمیت را دارد. فرآیند آپوپتوز سلولی

توسط برخی پروتئین‌های میتوکندریایی شامل پروتئین‌های خانواده Bcl-2 که به دو بخش پروتئین‌های ضد آپوپتوتیک و پروتئین‌های پیش آپوپتوتیک تقسیم می‌شوند، تنظیم می‌گردد. نسبت تعادل بین پروتئین‌های پیش آپوپتوتیک و پروتئین‌های ضد آپوپتوتیک یکی از فاکتورهای اصلی مشخص کننده این است که سلول زنده می‌ماند یا دچار آپوپتوز می‌گردد. Bcl-2 با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون یکی از معروف‌ترین پروتئین‌های مهار کننده آپوپتوز است که علاوه بر جلوگیری از آزاد سازی سیتوکروم C از میتوکندری، از طریق حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری با خارج ساختن یون‌های H<sup>+</sup>، به Apaf-1 متصل و فعال‌سازی کاسپاز ۹ را مهار می‌کند. با این وجود پروتئین Bax با وزن مولکولی ۲۴ کیلودالتون می‌تواند عمل Bcl-2 را خنثی کند. به این دلیل در بیشتر مطالعات، جهت سنجش آپوپتوز هر دوی این دو فاکتور را ارزیابی می‌کنند (۴). Bax از شناخته شده‌ترین ژن‌های درگیر در مرگ سلولی است و در پروموتور این ژن توالی شناسایی p53 وجود دارد که باعث می‌شود این ژن در پی آسیب‌های DNA و در پی فعال شدن P53 بیان شود. به دنبال تجمع Bax در میتوکندری با تضعیف غشا آن و ایجاد یک کانال در غشا باعث آزاد شدن سیتوکروم C می‌شود که در نهایت آبشار کاسپازی (کاسپاز ۹ و در نهایت کاسپاز ۳) را فعال می‌کند و موجب آپوپتوز می‌گردد (۵).

خرچنگ‌های نعل اسبی معمولا فسیل‌های زنده به حساب می‌آیند و دارای تنوع مورفولوژیکی و اکولوژیکی کمی در طول زمان زمین شناسی هستند و به اوایل اردوویان بر می‌گردند (۶). این بی‌مهرگان سخت پوست در نواحی گرم و آب‌های کم عمق ساحلی کف دریا زندگی می‌کنند و از یک سیستم دفاعی بی‌نظیر و بسیار کارآمد استفاده می‌کنند. همولف خرچنگ نعل اسب حاوی مولکول‌های دفاعی محلول و تعداد زیادی هموسیت یا آمبوسیت است که در تماس با پاتوژن‌ها دژنراسیون می‌شوند (۷). هموسیت‌های گرانول ۹۹ درصد از هموسیت‌ها را تشکیل می‌دهند و شامل گرانول‌های بزرگ و کوچک می‌شوند (۸ و ۹). در این میان Tachyplesin‌های I، II و III پپتیدهای دفاعی هستند که دارای فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد سرطانی هستند. Tachyplesin‌ها دارای ۱۷ اسید آمینه و دارای دو پیوند دی سولفیدی هستند. همچنین دارای توالی C-ترمینال α-amidation هستند و دارای یک ساختار ثانویه آمفی‌پاتیک هستند که اسیدآمینه‌های دارای بار مثبت و آبگریز در خوشه‌های مجزا از هم قرار دارند که برای فعالیت ضد میکروبی آن‌ها بسیار ضروری می‌باشد. مطالعات متعددی در مورد فعالیت ساختار و عملکرد Tachyplesin نوع یک انجام شده است. مطالعات حاکی از آن است که Tachyplesin نوع یک سلول‌های باکتریایی را با مکانیسم مربوط به نفوذپذیری غشای داخلی و جریان سریع K<sup>+</sup> از بین می‌برد. همچنین در سلول‌های سرطانی Tachyplesin نوع اول باعث اختلال سلولی و آپوپتوز و نکروز دیر رس شده است. مکانیسم مرگ سلولی سرطان بستگی به دوز پپتید دارد که در غلظت‌های بالا اختلال در غشای سلولی و در غلظت‌های پایین مکانیسم مرگ سلولی داخل سلول را فعال می‌کند (۱۰). هدف از این تحقیق بررسی اثرات ژن کد کننده پپتید Tachyplesin I خرچنگ نعل اسبی بر بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax در سلول‌های ACHN ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب حامل ژن کد کننده Tachyplesin I به روش real time RT-PCR می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه، پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)-Tachyplesin و پلاسمید دست نخورده (خالی) pcDNA3.1(+) از شرکت Generay Biotech Co. Ltd چین سفارش داده شد و تهیه گردیدند. توالی ژن هدف Tachyplesin (با طول ۶۹ جفت باز) در ناحیه BamHI/EcoRV کلون شد و برای بیان بهتر در میزبان یوکاریوتی توسط این شرکت بهینه سازی کدون صورت پذیرفت. صحت سنتز ژن‌های هدف با هضم آنزیمی توسط شرکت سازنده تایید گردید. همچنین از باکتری E. coli سویه TOP10 برای تکثیر پلاسمیدهای نامبرده بهره گرفته شد. شایان ذکر است که کیت استخراج پلاسمید (یکتا تجهیز آزما، ایران) برای تخلیص پلاسمیدها از باکتری E. coli به کار برده شد. سلول رده سرطان کلیه به نام ACHN (بانک سلولی ایران) برای انجام مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام واکنش PCR و real time RT-PCR از مواد و واکنشگرهای شرکت یکتا تجهیز آزما بهره گرفته شد. باکتری E. coli سویه TOP10 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری و در محیط کشت Luria-Bertani (LB) (مرک، آلمان) کشت داده شد و سپس به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) انکوبه گردید. پلاسمیدهای نوترکیب نامبرده و پلاسمید خالی با استفاده از روش کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) و شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شدند. کلنی‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار، حاوی آمپیسیلین (۳۰ میلی گرم در میلی لیتر) رشد کردند و انتخاب شدند. صحت انجام ترانسفورماسیون با استفاده از روش PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی تأیید شد. کلنی‌های ترانسفورم شده در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB Broth حاوی آمپیسیلین در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند (۱۲). DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید یکتا تجهیز آزما طبق دستورالعمل کیت، خالص سازی شد. کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده توسط نانودراپ (ترموساینتیفیک ۲۰۰۰، آمریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد.

رده سلولی ACHN با کد سلولی C206 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری شد و در فلاسک کشت بافت، حاوی محیط RPMI 1640 (بیوایده، ایران) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS، بیوایده، ایران) و ۱۰۰ واحد آنتی بیوتیک پنی سیلین / استرپتومایسین در هر ۱ میلی لیتر، کشت شد. فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در فشار ۵ درصد CO<sub>2</sub> تا زمانی که سلول‌ها به تراکم ۷۰-۸۰ درصد برسند، انکوبه شد. به منظور انجام ترانسفکشن (انتقال وکتورها به سلول) سلول‌های ACHN در ۳ خانه از پلیت ۶ خانه‌ای مخصوص، کشت شدند. در مجموع دو گروه سلولی مورد ترانسفکشن قرار گرفتند: ACHN ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-Tachyplesin (گروه تیمار)، سلول ACHN ترانسفکت شده با پلاسمید خالی (گروه کنترل) و خانه سوم شامل سلول‌هایی بودند که هیچ گونه سلولی دریافت نکرده بودند (گروه شاهد). سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (شرکت ترموفیشر، آمریکا) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، با پلاسمیدهای نامبرده ترانسفکت شدند. به طور خلاصه، ۱۰<sup>۶</sup> × ۰/۳ سلول در خانه‌های پلیت ۶ خانه کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت (هنگامی که سلول‌ها به تراکم ۵۰-۷۵ درصد رسیدند) مخلوط حجمی حجمی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (۷/۵ میلی گرم در هر چاهک) و پلاسمید (۲/۵ میلی گرم در هر چاهک) در حجم نهایی ۳۰۰ μL از محیط کشت RPMI (بدون آنتی بیوتیک و FBS) به سلول‌ها افزوده شد. پلیت کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با فشار ۵ درصد CO<sub>2</sub> به مدت ۴ ساعت انکوبه شد و سپس FBS به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت کشت مجدد به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط انکوبه شد. محیط کشت حاوی ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (۱۴) نئومایسین برای غربالگری سلول‌های ترانسفکت شده از غیر ترانسفکت شده اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت سلول‌ها انکوبه شدند. نشانگر انتخابی وکتور pcDNA3.1(+), مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین است. در واقع سلول‌های دریافت کننده وکتور زنده می‌مانند و سلول‌هایی که ترانسفکت نشده باشند، در حضور نئومایسین از بین می‌روند. سرانجام، سلول‌های هر گروه با استفاده از ۰/۲۵ درصد آنزیم Trypsin-EDTA (ترموفیشر، آمریکا) جدا شده و در محیط کشت با ۱۰٪ FBS کشت شدند.

RNA تام سلولی در هر دو گروه ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب (گروه تیمار) و وکتور خالی (گروه کنترل)، با استفاده از محلول RNX-Plus (سینا کلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و پرایمرهای رندوم هگزامر سنتز شد. به منظور تایید صحت واکنش ترانسفکشن، واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن Tachyplesin روی cDNA سنتز شده، انجام شد. محصول PCR حاصل از فعالیت دو پرایمر F و R، یک قطعه ۵۳ جفت بازی خواهد بود.

از روش real time RT-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های گروه تیمار (سلول‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-Tachyplesin) در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور خالی) استفاده شد. ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. cDNA هر گروه در رقت سریال‌های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه گردید. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۳ μL بود که حاوی: ۱ μL از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران)، ۰/۵ μL از هر دو پرایمرهای F/R، و ۴/۵ μL آب مقطر. همه واکنش‌ها به صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی زیر انجام شد: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد،

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

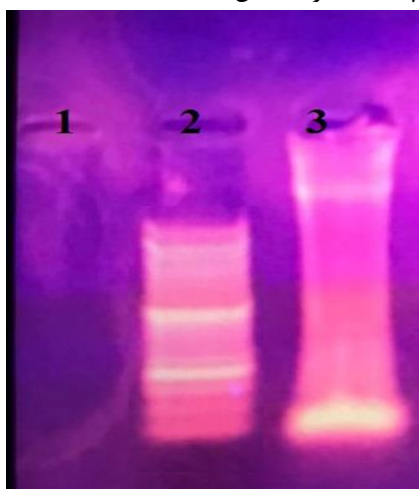
### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سانتیگراد به ۹۵ درجه سانتیگراد (۱ درجه سانتیگراد در ثانیه) رسم شد. جهت محاسبه بیان ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم افزار Rotor-Gene Real-time analysis نسخه ۶ رسم شد. تغییرات نسبی بیان ژن‌ها توسط روش لیواک  $2^{DDCt}$  با مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد.

تمامی آزمون‌های انجام شده به صورت دو بار تکرار بودند و نتایج آزمون آماری توصیفی به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند. جهت بررسی وجود یا عدم وجود ارتباط معنادار از آزمون t-test استفاده گردید. نمودارها به کمک نرم افزار GraphPad Prism رسم شد و تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

صحت سنتز پلاسمیدها توسط شرکت سازنده با استفاده از توالی‌یابی DNA و هضم آنزیمی تایید شد. پس از انتقال پلاسمید نوترکیب به *E. coli* سویه TOP10، صحت ورود پلاسمید توسط کشت کلنی‌ها بر روی آمپیسیلین در مرحله نخست و سپس انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *Tachypleisin* تایید شد. حضور باند ۵۳ جفت بازی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *Tachypleisin* مؤید صحت انتقال پلاسمید بود (شکل ۱).

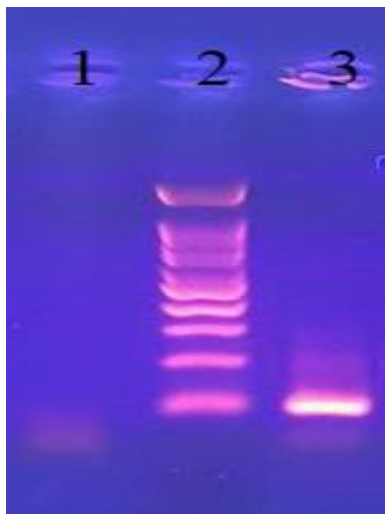


شکل ۱- بررسی صحت استخراج پلاسمید به روش PCR. چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک شماره ۲ مارکر ۵۰ جفت بازی و چاهک شماره ۳ باند ۵۳ جفت بازی ژن *Tachypleisin I* مربوط به پلاسمید استخراج شده.

در شرایط یکسان سلول‌های ACHN به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول پلاسمیدهای نوترکیب *pcDNA3.1(+)-Tachypleisin* را دریافت کردند (گروه تیمار) و گروه دوم پلاسمید خالی را دریافت نمود (گروه کنترل). گروه سوم نیز به عنوان گروه شاهد هیچ پلاسمیدی دریافت نمود. مقاومت و زنده ماندن سلول‌های ترنسفکت شده با وکتورها در برابر آنتی‌بیوتیک نئومایسین، حضور وکتورها در سلول‌های مقاوم شده را تایید می‌کند. این در صورتی است که گروه شاهد که هیچ گونه پلاسمیدی را دریافت نکرده بودند، پس از افزودن آنتی‌بیوتیک نئومایسین به محیط کشت آن‌ها از بین رفتند. از سوی دیگر، انجام واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *Tachypleisin* روی سلول‌های لیپوفکت شده سبب تشکیل باند ۵۳ جفت بازی گردید و صحت واکنش لیپوفکشن تایید شد (شکل ۲).

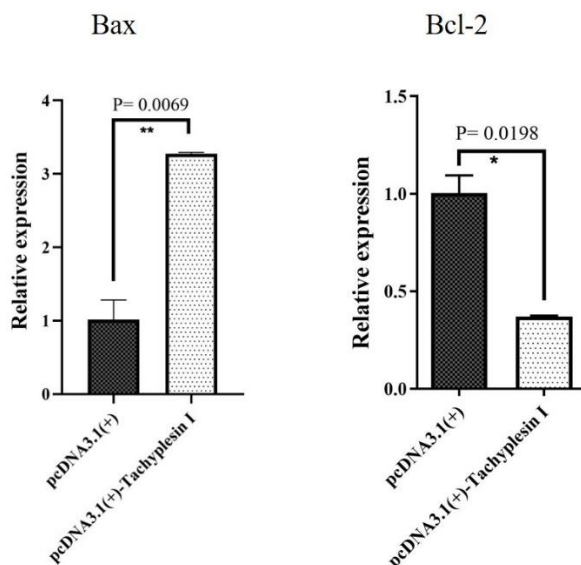
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۲- بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR. چاهک شماره ۱ نتیجه PCR سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور خالی، چاهک شماره ۲ مارکر ۵۰ جفت بازی و چاهک شماره ۳ باند ۵۳ جفت بازی ژن *Tachyplesin I* مربوط به سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب.

ارتباط افزایش یا کاهش بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* با آپوپتوز RCC در دو گروه سلول تیمار و کنترل به روش real time RT-PCR بررسی گردید و نتایج زیر بدست آمد. در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور *pcDNA3.1(+)-Tachyplesin I* (گروه تیمار)، میزان بیان ژن *Bcl-2* کاهش معنی‌داری را نسبت به سلول‌های گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.05$ ). از سوی دیگر، بیان ژن *Bax* در سلول‌های دست‌ورزی شده نسبت به سلول‌های کنترل، به شکل معنی‌داری نشان از افزایش بیان داشت ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳).



شکل ۴- آنالیز آماری ژن *Bcl-2* و *Bax*. بیان *Bcl-2* در سلول‌های ترانسفکت شده با ژن *Tachyplesin I* به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است ( $P = 0.0198$ ) در حالیکه، بیان ژن *Bax* در سلول‌های ترانسفکت شده با ژن *Tachyplesin I* به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است ( $P = 0.0069$ ).

### بحث

سرطان کلیه نوعی سرطان است که در سلول‌های کلیه ایجاد می‌شود. این سرطان یا سلول‌های کلیه را مبتلا می‌سازد و یا سلول‌های اوروتلیال درون لگن‌چه‌های کلیه را مورد هدف قرار می‌دهد (لگنچه کلیه، فضایی خالی در میان کلیه است که ادرار در آن جمع می‌گردد). سرطان کلیه می‌تواند یک تومور ثانویه ناشی از متاستاز سرطانی دیگر در هر کجای بدن باشد. وقتی که سرطان کلیه به بیرون از کلیه گسترش می‌یابد، سلول‌های سرطانی اغلب در غدد لنفاوی اطراف یافت می‌شوند. سرطان کلیه همچنین گاهی به ریه‌ها، استخوان‌ها و یا کبد نفوذ می‌کند و ممکن است از یک کلیه به کلیه‌ی دیگر منتقل شود. انواع مختلفی از سرطان وجود دارد که احتمال دارد در کلیه‌ها آغاز شود. سرطان سلول کلیوی رایج‌ترین نوع سرطان کلیه در بزرگسالان است. این نوع سرطان آدنوکارسینوم کلیوی و یا هایپرنفروم نیز نامیده می‌شود. نوع دیگری از سرطان به نام کارسینوم سلول ترانزیشنال هم وجود دارد که بر کلیه‌ها اثر می‌گذارد. این نوع سرطان شبیه به سرطان مثانه بوده و اغلب مانند سرطان مثانه درمان می‌شود. تومور ویلم رایج‌ترین نوع سرطان کلیه در میان کودکان است (۱۱).

طی این مطالعه تجربی پلاسمید pcDNA3.1(+) که حاوی ژن پپتید *Tachypleisin I* بود طراحی شد و به صورت تجاری خریداری گردید. همچنین پلاسمید بدون ژن خارجی pcDNA3.1(+) نیز تهیه گردید. پس از تکثیر این پلاسمیدها در باکتری *E. coli* سویه TOP10F، این پلاسمیدها توسط کیت‌های اختصاصی استخراج پلاسمید، استخراج و خالص‌سازی شد و توسط تکنیک لیپوفکشن وارد سلول‌های ACHN شدند. این سازواره پس از بیان در سلول‌های یوکاریوتی، این سلول‌ها را به نئومایسین مقاوم کرد. مقاومت به نئومایسین به عنوان مارکری برای جداسازی سلول‌های دارای پلاسمید از سایر سلول‌ها بود. پس از تیمار سلول‌ها با نئومایسین و رشد و تکثیر آن‌ها، RNA سلول‌ها برای آنالیزهای بیان ژن‌های آپوپتوزی استخراج شد و با کیت مخصوص از روی آن cDNA تهیه شد. *real time RT-PCR* برای ژن‌های *Bcl-2* و *Bax* انجام شد. برای مقایسه از ژن رفرنس *GAPDH* نیز استفاده شد و بیان سایر ژن‌ها با آن‌ها مقایسه گردید. در نهایت مقایسه با سلولی که پلاسمید فاقد ژن *Tachypleisin I* را دریافت کرده بود، انجام شد و این مقایسات توسط نرم‌افزارهای آماری آنالیز شدند. در واقع این تغییر بیان پس از استخراج RNA و سنتز cDNA و انجام واکنش *real time RT-PCR* با آنالیز آماری مشخص شد. نتایج حاصل از این تحقیق گویای این مطلب بود که با بیان ژن *Tachypleisin I* در سلول‌های رده سرطانی ACHN، سلول به سمت آپوپتوز پیش رفت. به طوریکه سطح بیان ژن *Bcl-2* (به عنوان یک انکوژن) بعد از لیپوفکشن و کتور حامل ژن *Tachypleisin I* و در اثر بیان آن، کاهش معنی‌داری یافتند. از سوی دیگر ژن *Bax* (به عنوان ژن سرکوبگر تومور) افزایش بیان معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داده است. تغییر بیان ژن‌های نامبرده توسط آنالیز آماری تایید شد. نتایج حاصل از این تست حاکی از آن می‌باشد که تغییر بیان ژن‌های *Bcl-2* و *Bax* تحت تاثیر بیان ژن *Tachypleisin I* تغییر معنی‌داری یافتند.

در همین راستا، رامامورتی و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند که  $\beta$ -Tachypleisin -مویی نوعی از پپتید ضد میکروبی کاتیونی است که در خرچنگ نعل اسب کشف شده است و تقریباً ۳۰ سال پیش  $\beta$ -مویی فعالیت‌های مقاوم در برابر چند دارو و همچنین سمیت سمی آن به سلول‌های پستانداران مشهور است و ضد میکروبی بالقوه در برابر باکتری در غلظت نهایی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر، تاکیپسین باعث لیز تقریباً ۲ درصد هموسیت‌ها و همچنین کاهش زنده ماندن سلول‌های کلیوی جنینی FT293 انسان گردید (۱۲). همچنین، ساراوانان و همکاران (۲۰۱۲) بررسی کردند که آنالوگ خطی حذف شده با سیستمین-1 (*tachypleisin-1*) یا CDT (KWFRVYRGIYRRR-NH2) شامل طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد باکتری‌ها با کاهش خاصیت همولیتیک است. فعالیت ضد باکتریایی CDT ناشی از تعامل انتخابی با لیپیدهای دارای بار منفی از جمله لیپوپلی ساکارید (LPS) است (۱۳). هانگ و همکاران (۲۰۱۵) در *S.aureus* و *E.coli* نتایج میکروسکوپی همچنین نشان دادند که تاکیپسین یک از روش‌های مختلفی از فعالیت، در برابر فلوسیتومتری جریانیه نکه تاکیپسین باعث مرگ سلولی *E. coli* عمدتاً با به خطر انداختن یکپارچگی غشای سلولی و ایجاد غیرفعال شدن استرهای داخل سلولی می‌شود. فلوسیتومتری جریان همچنین تغییرات پویا در زیر گروه‌های مختلف سلول با افزایش غلظت تاکیپسین را نشان داد. باکتری‌هایی که در معرض ۵ میکروگرم بر میلی لیتر تاکیپسین قرار گرفتند فوراً از بین



نرفتند. در عوض، آنها به تدریج در اثر جراحات جان خود را از دست دادند. با این حال، با قرار گرفتن در معرض ۱۰-۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر *tachyplesin I*، باکتری تقریباً بلافاصله از بین رفت (۱۴). همسو با مطالعات پیشین، نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی پس از ترانسفکشن است که نشان می‌دهد ژن تاجیپلیسین توانایی تغییر بیان آن‌ها را داشته است.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز آماری و همچنین مشاهدات میکروسکوپی کشت سلولی، می‌توان چنین اعلام کرد که ژن *Tachyplesin I* پس از انجام فرآیند لیپوفکشن، درون سلول‌های سرطانی بیان شده و بر روی القای آپوپتوز سلولی موثر است. بر طبق نتایج آماری این پژوهش، بیان ژن *Tachyplesin I* در سلول‌های سرطان کلیه سبب تغییر بیان معنی‌داری در *Bcl-2* و *Bax* می‌شود که بر طبق تغییر بیان ژن‌های ذکر شده، می‌توان این مطلب را عنوان کرد که منجر به القای آپوپتوز می‌شود.

### سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، اعلام نمایند.

### References:

1. Bajelan B, Hashemi M, Parvin M, Zaki Dizaji M, Alimoghaddam K, et al. Detection of micro-metastasis of renal cell carcinoma by CA9 marker using Real-time PCR. *Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ*. 2012;9(3):323-30.
2. Klatte T, Pantuck AJ, Kleid MD, Beldegrun AS. Understanding the natural biology of kidney cancer: implications for targeted cancer therapy. *Reviews in urology*. 2007;9(2):47.
3. Sadowski-Debbing K, Coy JF, Mier W, Hug H, Los MJ. Caspases-their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2002;50(1):19-34.
4. Park K-S, Sedlock DA, Navalta JW. Exercise-induced muscle damage and apoptotic protein expression in immune cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*; 2007;A1345.
5. Sari-Sarraf V, Amirsasan R, Sheikholeslami-Vatani D, Faraji H. Effect of creatine supplementation on the factors involved in apoptosis-related process (*Bax*, *Bcl-2*) and their ratio (*Bcl-2/Bax*) during acute resistance exercise in middle-aged men. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2016;21(4):17-28.
6. Lamsdell JC. Horseshoe crab phylogeny and independent colonizations of fresh water: ecological invasion as a driver for morphological innovation. *Palaeontology*. 2016;59(2):181-94.
7. Kawabata S-i, Osaki T, Iwanaga S. Innate immunity in the horseshoe crab. *Innate Immunity*: Springer; 2003. p. 109-25.
8. Iwanaga S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Current opinion in immunology*. 2002;14(1):87-95.
9. Iwanaga S, Kawabata S-i, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *The journal of biochemistry*. 1998;123(1):1-15.

10. Vernen F, Harvey PJ, Dias SA, Veiga AS, Huang Y-H, et al. Characterization of tachyplesin peptides and their cyclized analogues to improve antimicrobial and anticancer properties. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(17):4184.
11. Scélo G, Brennan P. The epidemiology of bladder and kidney cancer. *Nature clinical practice urology*. 2007 Apr;4(4):205-17.
12. Ramamoorthy A, Thennarasu S, Tan A, Gottipati K, Sreekumar S, et al. Deletion of All Cysteines in Tachyplesin I Abolishes Hemolytic Activity and Retains Antimicrobial Activity and Lipopolysaccharide Selective Binding. *Biochemistry*. 2006;45(20):6529-40.
13. Saravanan R, Mohanram H, Joshi M, Domadia PN, Torres J, et al. Structure, activity and interactions of the cysteine deleted analog of tachyplesin-1 with lipopolysaccharide micelle: Mechanistic insights into outer-membrane permeabilization and endotoxin neutralization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2012;1818(7):1613-24.
14. Hong J, Guan W, Jin G, Zhao H, Jiang X, Dai J. Mechanism of tachyplesin I injury to bacterial membranes and intracellular enzymes, determined by laser confocal scanning microscopy and flow cytometry. *Microbiol Res*. 2015;170:69-77

## بررسی تولید آنتی بیوتیک نئومایسین و جایگزینی منبع کربنی بومی در تولید توسط سویه تولید کننده *Streptomyces fradiae*

سارا زابلی<sup>۱</sup>، نگین فرجی<sup>۲\*</sup>، سعید اکبرزاده<sup>۳</sup>، فهیمه نعمتی<sup>۴</sup>، حسین سازگار<sup>۵</sup>

- ۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پیشرفته علوم و فنون، علوم پزشکی تهران، اسلامی دانشگاه آزاد، تهران، ایران.
- ۲ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
- ۳ گروه سم شناسی، علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۴ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پیشرفته علوم و فنون، علوم پزشکی تهران، اسلامی دانشگاه آزاد، تهران، ایران.
- ۵ استادیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه:** صنعت بیوتکنولوژی دارویی به معنی بکارگیری میکروارگانیسم‌های مولد با هدف تولید یک محصول بیوسنتزیک مورد مصرف در درمان و دارو می‌باشد. تولید آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از زمینه‌های مهم در بیوتکنولوژی (فناوری حیاتی) است و تلاش‌های زیادی برای بهینه‌سازی فرایند تولید آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت صورت گرفته است. نئومایسین یکی از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مهم است که در صنایع دارویی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش، تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین استریپتومایس - فرادیا مورد بررسی قرار گرفته است. به دست آوردن حداکثر میزان تولید نئومایسین مستلزم وجود یک محیط کشت کاملاً متوازن است که یکی از راه‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تغییر ترکیبات موجود در محیط کشت با منابع ارزان‌تر که اکثر منابع جانبی کارخانجات است. تاکنون در مورد اثر استفاده از منبع کربنی سبوس برنج به عنوان منبع بومی و ارزان قیمت بر روی رشد سویه *Streptomyces fradiae* و تولید نئومایسین گزارشی نشده است.

**هدف:** در این پژوهش، از باکتری *Streptomyces fradiae* استفاده شده و منبع کربنی بومی سبوس برنج به جای منبع مورد استفاده در صنعت (نشاسته) قرار گرفته است تا رشد و میزان تولید در مقایسه با منبع کربنی مورد استفاده بررسی شود.

**روش کار:** نمونه‌های حاوی سوسپانسیون اسپوری در محیط بذردهی به مدت ۲ روز در شیکر انکوباتور با دور ۲۰۰ rpm و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از انتخاب بهترین نمونه و تلقیح به محیط تخمیر، به مدت تقریبی ۲۰۰ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۲۲۰ rpm و دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در روزهای مشخص میزان نئومایسین تولید شده به روش میکروبیولوژیک سنجیده شد. عملیات تولید شامل بیج شاهد، بیج‌هایی با منابع کربنی جایگزین به صورت هم ارز است.

**نتایج:** از نتایج به دست آمده از آنالیزهای میکروبیولوژیک با جایگزین کردن منبع کربنی بومی به جای نشاسته میزان تولید در ساعت ۱۶۵ تخمیر از ۲۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۲۳۱ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافته است.

**بحث و نتیجه‌گیری:** بر طبق نتایج به دست آمده استفاده از منبع کربنی سبوس برنج به صورت هم ارز دارای بالاترین میزان تولید نئومایسین نسبت به بیج شاهد و در نتیجه کاهش هزینه‌های تولید را به همراه داشته است.

**واژگان کلیدی:** منبع کربنی بومی، نئومایسین، *Streptomyces fradiae*، تخمیر، سبوس برنج.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۲۲۹۷۳۴۶۸

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: neginfaraji13@gmail.com

## Investigating the production of neomycin antibiotic and replacement of native carbon source in production by the producer strain *Streptomyces fradiae*

Sara Zaboli<sup>1</sup>, Negin Faraji<sup>2\*</sup>, Saeid Akbarzadeh<sup>3</sup>, Fahimeh Nemati<sup>4</sup>, Hossein Sazegar<sup>5</sup>

1. Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islami Azad University, Tehran, Iran.
2. PhD student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Toxicology department, Tehran medical Sciences IslamicAzad University.
4. Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islami Azad University, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor of physiology, department of biology, faculty of science, shahrekord branch.

### Abstract

**Introduction:** The pharmaceutical biotechnology industry means the use of productive microorganisms with the aim of producing a biosynthetic product used in treatment and medicine. Production of antibiotics is one of the important fields in biotechnology (life technology) and many efforts have been made to optimize the production process of different antibiotics. Neomycin is one of the important aminoglycoside antibiotics that is widely used in the pharmaceutical industry. In this research, the production of the antibiotic neomycin from *Streptomyces Faradia* has been studied. Obtaining the maximum amount of neomycin production requires a completely balanced culture medium, which is one of the ways to increase the production of secondary metabolites by changing the compounds in the culture medium with cheaper sources. Most of them are secondary sources of factories. So far, there has been no report on the effect of using carbon source of rice bran as a local and cheap source on the growth of *Streptomyces fradiae* strain and neomycin production.

**Purpose:** In this research, the bacterium *Streptomyces fradiae* was used and the native carbon source of rice bran was replaced by the source used in the industry (starch) to investigate the growth and production rate compared to the carbon source used.

**Procedure:** Samples containing spore suspension were placed in the seeding medium for 2 days in an incubator shaker with 200 rpm and 30°C temperature, and after selecting the best sample and inoculating the fermentation medium, for approximately 200 hours in an incubator shaker with 220 rpm and 33°C temperature. Celsius were heated. On specific days, the amount of neomycin produced was measured by microbiological method. The production operation includes control batch, batches with alternative carbon sources in equivalent form.

**Results:** From the results obtained from the microbiological analysis, by substituting native carbon source instead of starch, the production rate increased from 220 mg/liter to 231 mg/liter at 165 hours of fermentation.

**Discussion and conclusion:** According to the obtained results, the use of rice bran carbon source has the highest neomycin production rate compared to the control batch, and as a result, it has reduced the production costs.

**Key words:** native carbon source, neomycin, *Streptomyces fradiae*, fermentation, rice bran.

### مقدمه

آنتی بیوتیک‌ها مانند نئومایسین، موادی هستند که می‌توانند سایر میکروارگانیسم‌ها را از بین ببرند یا از رشد آن‌ها جلوگیری کنند (۱ و ۲). آن‌ها می‌توانند به طور طبیعی توسط میکروب‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید شوند یا به صورت شیمیایی سنتز شوند (۳ و ۴). نئومایسین، نوعی آمینوگلیکوزید، برای درمان عفونت‌های موضعی استفاده می‌شود و به صورت صنعتی توسط باکتری *Streptomyces fradiae* تولید می‌شود. تولید آنتی بیوتیک‌هایی مانند نئومایسین می‌تواند تحت تأثیر منبع کربن در محیط کشت قرار گیرد. سبوس برنج که دارای کربن دیر هضم و فاكتورهای رشد بالایی است، در برخی موارد باعث افزایش تولید آنتی بیوتیک می‌شود (۵ و ۶). آنتی بیوتیک‌ها محصولات یا موادی هستند که میکروارگانیسم‌ها را از بین می‌برند یا از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کنند. آن‌ها از طریق روش‌های بیولوژیکی (طبیعی، مصنوعی و نیمه مصنوعی) به دست می‌آیند (۷). آنتی بیوتیک‌های طبیعی توسط میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شوند آنتی بیوتیک‌ها بر اساس مکانیسم اثر، ساختار شیمیایی یا طیف فعالیتشان طبقه‌بندی می‌شوند. آنتی بیوتیک‌های باکتری‌کش یا باکتری‌کش سلول‌های بیماری‌زا را از بین می‌برند (۸ و ۹ و ۱۰ و ۱۱). آنتی-

بیوتیک‌های باکتریوآستاتیک یا باکتریوآستاتیک رشد باکتری‌های بیماری‌زا را متوقف می‌کنند (۱۲). نمونه‌هایی از آنتی‌بیوتیک‌ها: آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (پنی‌سیلین، سفالوسپورین، کارباپنم)، آمینوگلیکوزیدها (نئومایسین، آمیکاسین، استرپتومایسین، توبرامایسین و جنتامایسین). نئومایسین دسته‌ای از داروهای آمینوگلیکوزید است که به صورت قطره و پماد استفاده می‌شود. برای درمان عفونت موضعی، اسهال عفونی، سرکوب باکتری‌های روده قبل از جراحی، درمان کمکی در کمای کبدی و کاهش چربی خون استفاده می‌شود. نئومایسین یک باکتری کش است و سنتز پروتئین را در باکتری‌ها مهار می‌کند و باعث مرگ باکتری‌های در حال رشد و تقسیم می‌شود (۱۳ و ۱۴ و ۱۵ و ۱۶). نئومایسین به صورت صنعتی توسط *Streptomyces fradiae*، یک باکتری گرم مثبت و هوازی میسلیوم تولید می‌شود (۱۷ و ۱۸). محیط کشت برای تولید آنتی‌بیوتیک کربن و نیتروژن مواد اصلی مورد نیاز در فرمولاسیون محیط کشت هستند. منابع کربن برای فعالیت‌های بیوسنتزی، بیوسنتز اسکلت سلولی و انرژی برای متابولیسم استفاده می‌شود. میکروارگانیسم‌های هتروتروف از ترکیبات آلی در محیط کشت به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. سبوس برنج یک منبع کربن دیر هضم است که ژن‌های دخیل در تولید آنزیم‌های تولید کننده آنتی‌بیوتیک را تحریک می‌کند (۱۹). سبوس برنج منبع کربن ارزان‌تری با فاکتورهای رشد قابل توجهی مانند ویتامین B و مواد معدنی است انتخاب مواد اولیه برای محیط کشت مواد خام باید حداکثر بازده محصول در هر گرم را فراهم کنند. سبوس برنج منبع کربن مناسبی برای افزایش تولید آنتی‌بیوتیک است. نیاز به بستر برای تولید نئومایسین؛ بستر باید حداکثر غلظت محصول را فراهم کند و حداکثر سرعت تولید را فراهم کند باید ارزان باشد و در طول سال با همان کیفیت به راحتی در دسترس باشد بستر باید حداقل مشکلات را در سایر جنبه‌های فرآیند، به ویژه هوادهدی و هم زدن، تصفیه و استخراج و غیره ایجاد کند. هدف این تحقیق بررسی تولید نئومایسین با استفاده از منابع کربن محلی و ارزان از سویه مولد *Streptomyces fradiae* است. این تحقیق جنبه کاربردی دارد زیرا نئومایسین یک داروی مهم با مصرف زیاد در ایران است این تحقیقات می‌تواند با کاهش هزینه تولید آنتی‌بیوتیک به اقتصاد، صنعت و پزشکی کشور کمک کند. هزینه تولید آنتی‌بیوتیک؛ حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد هزینه تولید آنتی‌بیوتیک صرف محیط کشت می‌شود. تولید ارزان نئومایسین می‌تواند سهم موثری در کاهش هزینه تولید آنتی‌بیوتیک داشته باشد (۲۰).

### مواد و روش کار

این پژوهش جهت بررسی تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین و جایگزین منبع کربنی بومی سبوس برنج توسط سویه مولد *Streptomyces fradiae* در آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی انجام گرفت. باکتری مورد استفاده برای تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین، *Streptomyces fradiae* با PTCC 1195 می‌باشد، برای باز کردن و احیا سویه لیوفیلیزه در ابتدا طبق پروتکل ارسالی همراه با سویه عمل کردیم تا سویه احیا و فعال شود؛ حال سوسپانسیون میکروبی ما آماده جهت کشت شد. نکته بسیار مهم و حائز اهمیت این است که تمام مراحل در زیر هود لامینار کلاس دو و در کنار دو شعله جهت رعایت کردن شرایط استریل و جلوگیری از ایجاد آلودگی انجام شدند.

**محیط کشت اسپورزایی:** هدف از این مرحله یکسان سازی فاز رشد سویه‌ها که برای تولید آنتی‌بیوتیک در فاز سکون الزامی است. (مقدارها بر حسب گرم بر لیتر): گلوکز ۱۰ گرم، عصاره گوشت ۱ گرم، پپتون ۳ گرم، سدیم کلرید ۳ گرم، شیرابه ذرت ۳ گرم، آگار ۴۵ گرم و pH را روی  $7.0 \pm 0.1$  تنظیم می‌کنیم و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱ اتمسفر داخل اتوکلاو گذاشته و پس از استریل شدن محیط کشت سوسپانسیون میکروبی احیا شده را روی محیط اسپورزایی کشت قرار دادیم و به مدت ۷ الی ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم تا اسپورها رشد کنند و سپس بهترین محیط کشت که رشد مناسب داشته از نظر مورفولوژی و رشد سویه برای تهیه سوسپانسیون اسپوری و انتقال به محیط کشت بذردهدی انتقال داده می‌شود (۲۱).

**محیط کشت بذردهدی:** برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از مرحله اسپورزایی برای مرحله بذردهدی مایع تلقیح سوسپانسیون اسپوری است؛ محلول توئین ۸۰ به غلظت ۰/۰۱ درصد تهیه کرده و به بهترین محیط‌های کشت اسپورزایی اضافه کرده تا مایع تلقیح آماده

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

گردد. هدف از این مرحله تهیه سوسپانسیون میکروبی مناسب و تلقیح به محیط کشت باز فرمانتاسیون با رشد حداکثری<sup>۲۹</sup> است. در این مراحل رشد باکتری به صورت میسلیمی است. (مقدارها بر حسب گرم بر لیتر): نشاسته ۲۰ گرم، کنجاله بادام زمینی ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۲۰ گرم، شیرابه ذرت ۱۰ گرم، گلوکز ۳۰ گرم، پیتون ۵ گرم، روغن سویا ۲ گرم،  $(NH_4)_2SO_4$  ۱ گرم،  $(NH_2)HPO_4$  ۱ گرم،  $CaCO_3$  ۱۰ گرم و pH را روی  $6/2 \pm 0/1$  تنظیم کرده، بعد از تهیه محیط کشت مرحله بذردهی، تعدادی ارلن ۵۰۰ میلی لیتری آماده کرده و در هر کدام ۷۰-۵۰ میلی لیتر از محیط کشت بذردهی تهیه شده ریخته و برای استریل کردن آن‌ها را داخل اتوکلاو قرار دادیم.

در مرحله بذردهی، به هر کدام از ارلن‌ها در کنار شعله و زیر هود، به اندازه ۱٪ حجم محیط داخل ارلن، از سوسپانسیون اسپوری اضافه کرده و در آن‌ها را بالشتک پنبه‌ای قرار داده و برای مدت ۳۰-۴۸ ساعت در دمای  $30^\circ C - 33^\circ C$  با دور ۲۰۰ rpm برای تکثیر باکتری و رشد میسلیمی در شیکرانکوباتور قرار می‌دهیم. نمونه گیری هر ۱۲ ساعت یکبار برای کنترل رشد میسلیم‌های رشد کرده سوبه مولد، کنترل هر گونه آلودگی احتمالی، تعیین pH محیط کشت، تعیین PMV میسلیم‌های رشد در طی فرایند بذردهی انجام می‌شود. در انتهای این مرحله باید از بین ارلن‌ها بهترین ارلن را با توجه به معیارهای زیر انتخاب کرده و از آن برای مرحله بعد یعنی مرحله پیش تخمیر به عنوان مایه تلقیح استفاده کنیم. معیارهای انتخاب بهترین ارلن در مرحله بذردهی عبارتند از: ۱- وزن تر و حجم بایومس تشکیل شده که در سوبه‌های میسلیمی با پارامترهای PMW و PMV مورد بررسی قرار می‌گیرد. ۲- مورفولوژی رشد ۳- PH مایسلیمی ۴- سوبه‌ها رشد مناسب داشته و کاملاً بدون آلودگی<sup>۳۰</sup> باشند. برای بررسی این موارد باید از هر کدام از ارلن‌ها هر ۱۲ ساعت یک بار در شرایط استریل و اسپتیک زیر هود و در کنار شعله نمونه گیری انجام و پارامترهای مندرج در بالا از نمونه گرفته شده سنجیده شوند.

$100 \times (\text{وزن ۱ میلی لیتر نمونه/وزن رسوب}) = \text{درصد وزن تریبومس}$

درصد بیومس ایده آل در این مرحله در صنعت باید ۱۸ تا ۲۲ درصد باشد و در شرایط آزمایشگاهی بین ۶/۵ تا ۸/۵ درصد است. همچنین باید pH هر لوله که از ارلن‌های محیط کشت بذردهی نمونه گرفتیم را نیز بررسی کنیم. مقدار pH را با استفاده از pH متر رومیزی می‌سنجیم. pH مناسب و ایده آل در این مرحله در رشد مناسب میسلیمی طبق تجربیات و موارد ذکر شده در منابع علمی ۶/۱-۵/۹ می‌باشد.

محیط کشت تخمیر یا تولید: ترکیبات محیط کشت این مرحله به گونه‌ای باید طراحی شود که کل نیازهای سوبه برای تولید این محصول را برای سوبه امکان پذیر سازد. در این پژوهش، اثر استفاده از سبوس برنج و جایگزینی آن با منبع کربنی نشاسته در میزان تولید نئومایسین بررسی شده است. بچ‌های مختلف شامل:

۱. بچ شاهد حاوی محیط کشت تعریف شده در مقالات (بر حسب گرم بر لیتر): نشاسته ۱۰ گرم، کنجاله بادام زمینی ۱۰ گرم، سدیم کلرید ۴/۵ گرم، عصاره مخمر ۶ گرم، شیرابه ذرت ۲/۵ گرم، کنجاله سویا ۵ گرم، روغن سویا ۳ گرم، پیتون ۶ گرم.
۲. بچ آزمایش حاوی اجزای محیط کشت تعریف شده که فقط منبع کربنی آن با منبع بومی سبوس برنج به صورت هم ارز جایگزین شده است. تمام فرمولاسیون محیط کشت مانند بچ شاهد است با این تفاوت که به جای ۱۰ گرم نشاسته با توجه به DE نشاسته که ۱۰۰ درصد است، DE سبوس برنج معادل حدوداً ۴۸ درصد است، از ۲۲ گرم سبوس برنج استفاده می‌کنیم.

به این صورت است که پس از مرحله بذردهی و تهیه سوسپانسیون میکروبی مناسب برای تلقیح به محیط کشت تولید نئومایسین و حفظ شرایط آسپتیک و انجام مرحله تخمیر در فرمانتورهایی که توسط استاد آقای دکتر اکبرزاده طراحی شده است؛ به این صورت که پس از فرمولاسیون محیط کشت در حجم مناسب و مشخص و تنظیم pH محیط در بازه ۶/۲-۶/۳ فلاسک‌ها اتوکلاو می‌شوند.

<sup>29</sup> Optimom

<sup>30</sup> Contamination

سپس پس از اتوکلاو و تست هر گونه نشتی از لوله‌های فیلتر هوا، نمونه گیری و... فلاسک مناسب جهت تلقیح انتخاب می‌شود. که از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده در فاز بذردهی با انجام تست‌های تهیه لام و اندازه‌گیری pH و تایید عدم آلودگی بهترین ارلن برای تلقیح به مرحله فرمانتاسیون (مرحله تولید) انتخاب و طبق تجربیات و مطالعات و مقالات به مقدار ۱۰٪ حجم محیط کشت از سوسپانسیون کشت میکروبی که اکثرا با پارامتر  $PMV=7-8.5$  به داخل فلاسک استریل شده محیط کشت تلقیح می‌گردد. که تمام مراحل در زیر هود و با حفظ شرایط استریل تلقیح انجام میشود.

سپس فلاسک‌ها در انکوباتور شیکردار با دور همزن rpm ۲۰۰ تا ۲۵۰ در دمای ۲۹-۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود که عملیات تولید توسط کارخانه‌های تک سلولی در شرایط اپتیموم انجام شود و نمونه گیری و کمترل شیکر و دما هر روز انجام می‌گردد که اولاً رشد میکروبی مناسب، کنترل عدم آلودگی، pH محیط اندازه‌گیری و ثبت گردد و از ساعت ۷۰ به بعد نمونه گیری‌ها علاوه بر پارامترهای فوق، مقدار محصول تولید شده نیز با حلال مناسب استخراج و با روش HPLC که از کتاب فارماکوپه USP31 با انتخاب ستون مناسب، سرعت تزریق و دمای مناسب HPLC و تهیه حلال‌های مناسب پس از فیلتراسیون نمونه گرفته شده در هر ۲۴ ساعت با فیلتر ۰/۴ میکرون به HPLC تزریق و محصول تولید شده در مقایسه با پیک به دست آمده از تزریق مقدار مناسب استاندارد نتوهایسین از کارخانه رازک تهیه شده و مقدار ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، مقایسه و محاسبه شده و با نتایج HPLC در هر ۲۴ ساعت در بچ ریکورد<sup>۳۱</sup> تولید شده صورت می‌گیرد؛ که در این تحقیق هم نتایج HPLC ارائه شده است (۲۳ و ۲۴).

سنجش میکروبیولوژیک نتوهایسین تولید شده در تخمیر: برای هر آنتی‌بیوتیک سنجش فعالیت بیولوژیک یعنی اکتیویته لازم است انجام گیرد. سنجش بیواسی در فارماکوپه برای هر آنتی‌بیوتیک میکروارگانیزم استاندارد دارد که آنتی‌بیوتیک مورد نظر می‌تواند رشد این میکروارگانیزم را مهار کند، قید شده است. با تهیه سوشه این میکروارگانیزم استاندارد از مرکز سوبه‌های میکروبی صنعتی ایران یا PTCC تهیه می‌شود. میکروارگانیزم استاندارد برای آنتی‌بیوتیک نتوهایسین سوبه/ستافیلوکوکوس/پیدرمیدیس است که با تهیه سوسپانسیون میکروبی در حد رشد ۰/۵ مک فارلند و کشت در پلیت مولر هینتون آگار با ایجاد چاهک که ۷۰ میکرولیتر از محلول استاندارد آنتی‌بیوتیک، نمونه و حلال به چاهک انتقال داده می‌شود و پس از انکوبه کردن در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد هاله عدم رشد در مدت زمان ۱۸ الی ۲۴ ساعت ایجاد شده اندازه‌گیری می‌شود و قطر هاله‌های استاندارد و نمونه مقایسه می‌شود.

#### یافته‌ها

میزان تولید نتوهایسین در روزهای نخست تخمیر (۴۸ ساعت بعد از تلقیح) ناچیز است بنابراین نمونه گیری را از روز سوم یا ساعت ۷۲ تخمیر شروع کرده و همچنین برای بررسی میزان تولید نتوهایسین نمونه‌های ساعت ۷۲، ساعت ۱۲۰، ساعت ۱۶۸ ساعت ۱۹۲ مورد آنالیز قرار گرفت.

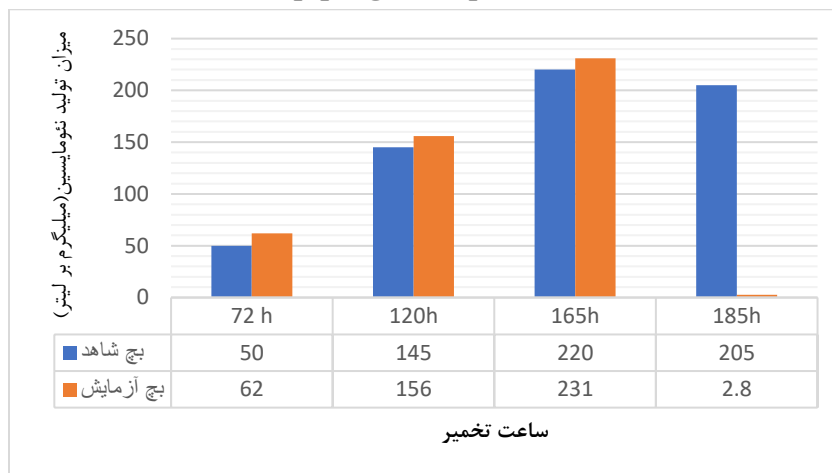
در حال حاضر در صنعت برای تولید نتوهایسین از منبع کربنی نشاسته محلول استفاده می‌شود. بنابراین، از محیط تخمیر حاوی نشاسته به عنوان تنها منبع کربنی، به عنوان نمونه شاهد یا کنترل استفاده شد تا در نهایت بتوان اثر سبوس برنج در تولید نتوهایسین را با آن مقایسه کرد. مقدار نشاسته مورد نیاز برای ساختن محیط تخمیر به حجم ml ۱۰۰۰، ۱۰ گرم است که در این پژوهش به صورت هم ارز با سبوس برنج جایگزین شد.

در نمودار ۱ مقدار تولید آنتی‌بیوتیک نتوهایسین تولید شده در بچ شاهد و بچ حاوی منبع کربنی بومی جایگزین (سبوس برنج) در ساعت‌های ۷۲، ۱۲۰، ۱۶۵ و ۱۸۵ بررسی شده‌است. همانطور که در نمودار زیر مشاهده می‌شود بیشترین میزان تولید در این بچ شاهد در ساعت ۱۶۵ بوده که مقدار تولید نتوهایسین برابر با  $220 \text{ mg/L}$  است و بچ آزمایش نیز با این بچ مقایسه می‌شود. با توجه به نتایج و پیک‌های حاصل از HPLC بیشترین میزان تولید نتوهایسین با توجه به بچ شاهد در ساعت ۱۶۵ تخمیر بچ سبوس برنج با مقدار هم ارز با میزان تولید ۲۳۱ میلی‌گرم بر لیتر نتوهایسین شاهد بودیم.

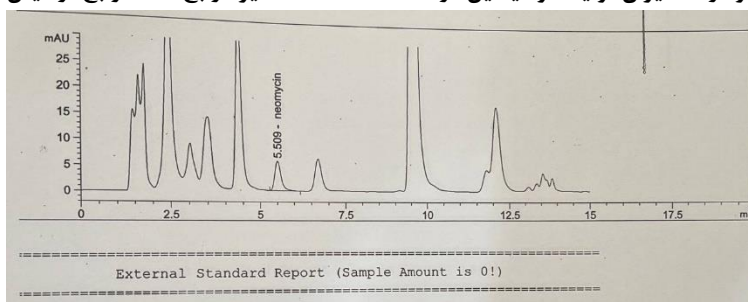
<sup>31</sup> Bach Record

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



نمودار ۱- میزان تولید نئومایسین در ساعات مختلف تخمیر در بج شاهد و بج آزمایش



شکل ۱- پیک HPLC برای بج آزمایش حاوی سبوس برنج جایگزین شده با نشاسته در ساعت ۱۶۵ تخمیر که بیشترین میزان تولید نئومایسین را شاهد هستیم.

### بحث

افزایش تولید محصول یکی از جنبه‌های مهم تحقیقات در بیوتکنولوژی است و با توجه به اینکه آنتی‌بیوتیک از نظر حجم مصرف رتبه دوم را در بین این فراورده‌ها دارند، پژوهش‌های گسترده‌ای در جهت افزایش تولید این فراورده‌ها انجام شده که در آن‌ها، سویه میکروارگانیسم و یا بهینه سازی شرایط محیطی تولید محور این پژوهش است. یکی از نکات مهم در بهینه سازی محیط، انتخاب یک محیط مناسب برای کشت و رشد میکروارگانیسم می‌باشد تا آن‌ها بتوانند توانایشان را در تولید محصول به نمایش گذارند. برای به دست آوردن حداکثر تولید محصول، مطالعه کامل شرایط محیط کشت، مقدار و ترکیبات منابع مورد نیاز سویه به ویژه منابع کربنی و نیتروژنی، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی از جمله مهم‌ترین نکات هستند که با تغییر در نوع و مقدار سوپسترا می‌توان شرایط برای بیوسنتز محصول سودمندتر با بازده حداکثر ایجاد نمود. در این پژوهش اثر سبوس برنج در تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین توسط سویه *Streptomyces fradiae* با هدف بهینه سازی ترکیب محیط کشت تخمیر از منابع کربنی بومی بررسی شده است. برای تولید آنتی‌بیوتیک و در کل متابولیت‌های ثانویه محیط کشت باید به گونه‌ای باشد که رشد اولیه سلولی را تامین کند و سپس شرایط بهینه جهت تولید متابولیت ثانویه را فراهم کند، به گونه‌ای که منابع دیر هضم باشد تا شرایط بحران غذایی را به سویه القا تا رشد سلولی متوقف و تولید برای متابولیت ثانویه که در جهت تنازع بقا سویه است فراهم گردد. به همین دلیل ارتباط بسیار زیادی بین ترکیبات محیط کشت با تولید متابولیت ثانویه که در این جا هدف ما تولید آنتی‌بیوتیک است، وجود دارد. به دلیل اینکه کربن یکی از مهم‌ترین عناصر در تولید و ساختار مولکولی سویه است و در این پژوهش سنجش بر روی منبع کربنی بومی جایگزین انجام شده است به بحث در این باره می‌پردازیم. مرحله نهایی تخمیر، کانون عمده هزینه عملیات تولید کردن آنتی‌بیوتیک است. امروزه در تخمیر صنعتی، کاهش قیمت انرژی عامل مهم و اساسی می‌باشد. طراحی محیط کشت با هدف رشد اولیه سریع، آسان‌تر از طراحی محیط کشت برای مرحله بعدی، یعنی بیشترین تولید محصول است. این مسأله به خصوص در مورد متابولیت‌های ثانویه وجود دارد.



میکروارگانسیم‌ها در وضعیتی قادر به تولید چنین محصولاتی هستند که شدت رشد ویژه از مقدار معینی کمتر باشد. بنابراین، نکته کلیدی در تولید متابولیت‌های ثانویه، طراحی نوعی محیط کشت برای مرحله نهایی است که پس از مرحله رشد اولیه سریع، کمبود یک یا چند ماده مغذی در آن به وجود آید. پس بین مواد تشکیل دهنده محیط کشت و تولید نئومایسین ارتباط زیادی وجود دارد که در بین این مواد، منبع کربنی یکی از منابع حائز اهمیت است. استفاده از منابع اولیه که از نظر قیمت، ارزان و از نظر کیفیت مناسب بوده و در طول تمام فصول سال به آسانی در دسترس باشد برای تهیه محیط کشت حائز اهمیت است که باعث کاهش هزینه‌های تولید و در نتیجه صرفه جویی اقتصادی خواهد شد. همانطور که گفته شد چندین فاکتور برای رشد بهینه میکروارگانسیم‌ها مطرح است که عبارتند از: منبع انرژی، مواد غذایی مورد نیاز، شرایط فیزیکی و شیمیایی و مایه تلقیح مناسب که در این میان ۳ عامل اول تا حد زیادی به طراحی و تهیه محیط کشت وابسته است. یکی از ترکیبات مهم محیط کشت، منبع کربنی است و نشاسته محلول یکی از منابع کربنی شناخته شده برای تولید نئومایسین و رشد سویه *Streptomyces fradiae* در منابع معتبر است. سبوس برنج، جایگزین منبع کربنی نشاسته در منابع علمی معتبر، شده است. همچنین سبوس برنج به عنوان منابع کربنی دارای ویژگی‌هایی هستند که باعث می‌شود استفاده از آن‌ها در صنعت مقرون به صرفه و تا حدی موجب خود کفایی کشور در زمینه تولید آنتی‌بیوتیک شوند که برخی از آن‌ها عبارتند از:

- ترکیب شیمیایی مناسب برای فراهم کردن منبع کربنی در فرایند تخمیر
- دارای املاح، مواد معدنی و ویتامین‌های مورد نیاز برای فرمولاسیون محیط کشت تخمیر
- تولید فراوان سبوس برنج و گندم در داخل کشور
- ارزان و در دسترس بودن (۷)

قیمت هر کیلوگرم نشاسته ۳۰۰۰۰۰۰ ریال و قیمت هر کیلوگرم سبوس برنج ۹۰۰۰۰۰۰ ریال می‌باشد. در صنعت، فرمانتور مورد استفاده برای مرحله تخمیر به طور متوسط ۷۵۰ لیتر می‌باشد که برای حجم ۵۰۰ لیتر محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجا که ۱۰ گرم نشاسته در یک لیتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، در یک فرمانتور ۷۵۰ لیتری، ۵۰۰۰ گرم یا به عبارتی ۵ کیلوگرم از این ماده در یک بیج صنعتی استفاده می‌شود که قیمت تمام شده آن برابر با ۱۵۰۰۰۰۰۰ ریال است. اگر میزان تولید نئومایسین در این حجم را با نتایج به دست آمده از این پژوهش تخمین بزنیم برابر است با ۱۱۰۰۰۰ میلی گرم در ۵۰۰ لیتر (یک بیج صنعتی). چنانچه قبلاً ذکر شد، سبوس برنج با مقدار هم ارز منبع کربنی نشاسته با غلظت ۲۲ گرم بر لیتر است. در نتیجه میزان مورد نیاز برای ۵۰۰ لیتر برابر است با ۱۱ کیلوگرم و با توجه به مقادیر محاسبه شده، قیمت تمام شده آن برابر است با ۹۰۹۰۰۰۰۰ ریال و اگر میزان تولید نئومایسین را با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش برای این حجم تخمین بزنیم خواهیم داشت ۱۱۵۵۰۰ میلی‌گرم در ۵۰۰ لیتر نئومایسین خالص در یک بیج صنعتی، با مقایسه مقدار تولید میزان نئومایسین تولید شده در بیج شاهد (حاوی منبع نشاسته) با میزان تولید در بیج آزمایشی بهینه افزایش ۵۵۰۰ میلی‌گرم نئومایسین مشاهده شد. اگر قیمت منبع کربنی بومی جایگزین و میزان نئومایسین تولید شده را با نمونه شاهد و میزان تولید نئومایسین تولید شده توسط آن، شاهد کاهش هزینه‌های تولید به صورت چشم گیر خواهیم شد.

از مقادیر بالا می‌توان نتیجه گرفت که با کاهش هزینه تولید ما شاهد افزایش قابل توجه میزان تولید نئومایسین و همچنین کاهش پسماندهای کشاورزی در حضور منبع ترکیبی کربن بومی نسبت به منبع نشاسته افزایش داشته است

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده منبع کربنی بومی جایگزین شده با نشاسته در محیط کشت تخمیر برای دستیابی به بیشترین مقدار تولید آنتی‌بیوتیک نئومایسین در تمام بیج آزمایشی سبوس برنج به مقدار هم ارز یعنی مقدار ۲۲ گرم بر لیتر است. که در نمونه شاهد مقدار نشاسته مصرفی ۱۰ گرم بر لیتر است و میزان تولید در این دو بیج در ساعت ۱۶۵ به ترتیب برابر ۲۳ و ۲۲۰ میلی‌گرم بر لیتر است که افزایش تولید نئومایسین را دارا هستیم و شاهد کاهش هزینه در تولید نسبت به بیج شاهد هستیم.

### سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند.

### References:

1. Bosch F, Rosich L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*. 2008; 82(3): 171-9.
2. Lindblad WJ. Considerations for determining if a natural product is an effective wound-healing agent. *The international journal of lower extremity wounds*. 2008; 7(2): 75-81.
3. Metsvaht T, Nellis G, Varendi H, Nunn AJ, Graham S, et al. High variability in the dosing of commonly used antibiotics revealed by a Europe-wide point prevalence study: implications for research and dissemination. *BMC pediatrics*. 2015; 15(1): 1-0.
4. Sudhakar MK, Nakhate ST, Hingane ML. Anti Biotic Resistanne. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2021; 10(3): 677-695.
5. Votruba J, Vaněk Z. Physicochemical factors affecting actinomycete growth and secondary metabolism. In *Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*. 2020; 263-281.
6. Weber JM, Wierman CK, Hutchinson CR. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *Journal of bacteriology*. 1985; 164(1): 425-33.
7. Waksman SA. What is an antibiotic or an antibiotic substance?. *Mycologia*. 1947; 39(5): 565-9.
8. Schlessinger DA. Failure of aminoglycoside antibiotics to kill anaerobic, low-pH, and resistant cultures. *Clinical Microbiology Reviews*. 1988; 1(1): 54-9.
9. Green R, Noller HF. Ribosomes and translation. *Annual review of biochemistry*. 1997; 66(1): 679-716.
10. Pimentel M, Chatterjee S, Chow EJ, Park S, Kong Y. Neomycin improves constipation-predominant irritable bowel syndrome in a fashion that is dependent on the presence of methane gas: subanalysis of a double-blind randomized controlled study. *Digestive diseases and sciences*. 2006; 51: 1297-301.
11. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999; 43(4): 727-37.
12. Fedorenko V, Genilloud O, Horbal L, Marcone GL, Marinelli F, et al. Antibacterial discovery and development: from gene to product and back. *BioMed research international*. 2015; 2015
13. Assadi S, Esmaili A, Akram Khan H. The impact of intellectual capital on the Pharmaceutical and Food Industry company's financial performance: By using Data Envelopment Analysis in the Tehran Stock Exchange. 2020.
14. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied microbiology and biotechnology*. 2006; 70: 140-50.
15. Bartlett JG, Auwaerter PG, Pham PA, editors. *Johns Hopkins ABX Guide 2012*. Jones & Bartlett Publishers. 2011.
16. Rollins KE, Varadhan KK, Neal KR, Lobo DN. Antibiotics versus appendectomy for the treatment of uncomplicated acute appendicitis: an updated meta-analysis of randomised controlled trials. *World journal of surgery*. 2016; 40: 2305-18.
17. Chater KF. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbial development*. 1984: 89-116.

18. Dietz A, Mathews J. Classification of Streptomyces spore surfaces into five groups. Applied microbiology. 1971; 21(3): 527-33.
19. Zulfiquari S. 1383, Master's thesis under the title of economic evaluation of the production of several items of essential drugs in Iran, University of Research Sciences p.32
20. Calderón CB, Sabundayo BP. Antimicrobial classifications. Antimicrobial susceptibility testing protocols. 2007; 7: 60-88.
21. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. Nature biotechnology. 2018; 36(12): 1136-45.
22. Eyer CL. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. American Journal of Pharmaceutical Education. 2002; 66(1): 95.
23. Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons. 2002.
24. Whitaker A. Actinomycetes in submerged culture. Applied biochemistry and biotechnology. 1992; 32: 23-35.

## اثرات ضد سرطانی تریپتولید بر بیان ژن *CEA* در رده سلول های سرطان ریه A549

مآنده اختری<sup>۱</sup>، سید علیرضا موسویان<sup>۲</sup>، الهام دوستی<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. کارشناسی ارشد صنایع غذایی، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان ریه کشنده ترین سرطان برای مردم سراسر جهان است. موتاسیون های *EGFR*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*، از معمورترین تغییرات ژنتیکی یافت شده در سرطان ریه است. تریپتولید و نقش بالقوه آن در مهار رشد توده انباشته (که بر کارکردهای طبیعی سلول های ریه تاثیر دارد) را نشان می دهد.

هدف مطالعه حاضر بررسی اثر ضد سرطانی تریپتولید بر بیان ژن *CEA* در رده سلول های سرطان ریه A549 است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه سلول های سرطان ریه A549 در محیط کشت با ۱۰٪ جنین گاوی کشت داده شدند. سلول ها در ۳ بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت های ۰، ۱/۲۵، ۱/۵، ۱۰، ۲۰ نانومولار تریپتولید قرار گرفتند و رشد سلولی با روش رنگ سنجی MTT مورد بررسی قرار گرفت. سپس بیان ژن *CEA* بر روی سلول های تیمار شده با روش *real time PCR* مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** با افزایش فلظت تریپتولید به صورت وابسته به دوز و زمان، توان زیستی سلولها و میزان بیان ژن *CEA* افزایش و القا آپوپتوز نیز افزایش می یابد. به طوری که بیشترین تاثیر تریپتولید مربوط به غلظت های ۱۰ تا ۲۰ نانومولار و در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول ها بود.

**نتیجه گیری:** تریپتولید یک داروی طبیعی با اثرات ضد سرطانی نوین است. مطالعات نشان داده اند که تریپتولید افزایش طول عمر سلول را مهار میکند، آپوپتوز رادر سلولها تحریک میکند، متاساز تومور رامهار میکند و سایر شیوه های درمانی رادر انواع سلولهای تقویت میکند. این ماده همچنین اندازه تومور را کاهش و یا رشد تومور در درون بدن موجود زنده محدود میکند. مطابق شواهد تریپتولید میتواند به عنوان یک ماده ضد سرطان ریه عمل کند.

**واژگان کلیدی:** تریپتولید، رده سلولی A549، سرطان ریه، *CEA*

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد.

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴ همراه: ۰۹۹۶۱۹۲۶۶۱۲

پست الکترونیک: doosti-e@yahoo.com

## The antitumor effects of triptolide on *CEA* gene expression in lung cancer cell line A549

Maedeh Akhzari<sup>1</sup>, Seyed Alireza Mossavian<sup>2</sup>, Elham Doosti<sup>3\*</sup>

1. M.Sc in Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. B.Sc Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. M.Sc in Food Industry, Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background and objective:** Lung cancer is the most lethal cancer in men and women. TP53, EGFR, KRAS and PIK3CA mutations are the most common genetic changes found in lung cancer. Triptolide and its potential role in inhibiting the growth of cumulative mass influencing natural functions of lung cells are also presented.

The objective of the present research was to study the effect of anti-cancer triptolide on *CEA* gene expression in cell line A549 of lung cancer.

**Materials and methods:** In this study, cell line A549 of lung cancer was cultured in a culture media with 10% bovine serum. The cells were exposed to 0, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 nanomolar concentrations of triptolide and the growth of cells studied using MTT colorimetric method. Then, *CEA* gene expression on the treated cells was studied by using RT-Real time PCR.

**Results:** By increasing the concentration of triptolide in relevant to the dose and time, the viability of cells and the level of expressing *CEA* gene would be increased and the induction of apoptosis in cells also increased, so that it was revealed that the highest effect of triptolide was related to 10-20 nanomolar concentrations of triptolide and within 72 hours after the cells treatment.

**Conclusion:** Triptolide is a natural agent with novel anti-cancer effects. The studies have shown that triptolide inhibits the increased lifetime of cells, induces the apoptosis in cells, inhibits tumor metastasis and reinforces the other therapeutic methods in various cancer cells. Moreover, this agent would decrease the size of tumor or constraint the growth of tumor in vivo. According to the evidence, triptolide could act as an anti-lung cancer agent.

**Key words:** triptolide, cell line A549, lung cancer, *CEA*.

### مقدمه

سرطان بیماری است که معمولاً با تغییر و جهش در ماده ژنتیکی سلول بوجود می‌آید. بررسی و تحلیل جهش‌ها و الگوبندی ژنومی در سال‌های اخیر تا حد زیادی ژنتیک سرطان ریه را روشن کرده است (۱). دو نوع سرطان ریه شامل سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) و سرطان ریه سلول غیر کوچک (NSCLC) وجود دارد. تقسیم بندی این نوع سرطان‌ها براساس بررسی میکروسکوپی سلول‌ها و ساختاری است که زیر میکروسکوپ دیده می‌شود. سرطان ریه غیر کوچک خیلی معمول‌تر از سرطان ریه کوچک است (۲). سرطان ریه در بیشتر موارد با سیگار کشیدن ارتباط مستقیم دارد (۳). سرطان ریه یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان و مردان در سرتاسر جهان است. به طوری که تعداد مرگ ناشی از سرطان ریه از تعداد کل مرگ‌های ناشی از سرطان کولون، راست روده، سینه و پروستات هم فراتر رفته است (۴).

انواع خاص سرطان‌های ریه اولیه عبارتند از: آدنوکارسینوما (یک NSCLC) معمول‌ترین نوع سرطان ریه است که ۳۰ تا ۴۰ درصد از همه موارد را تشکیل می‌دهد. یک زیر نوع از آدنوکارسینوما، کارسینومای سلول برونکر آلوئولا نامیده می‌شود که یک ظاهر شبیه به پنومونی را بر روی پرتوهای ایکس قفسه سینه ایجاد می‌کند. کارسینومای سلول سنگفرشی (یک NSCLC) دومین نوع معمول از سرطان ریه است که حدود ۳۰٪ از کل موارد را شامل می‌شود. سرطان سلول بزرگ (یک NSCLC دیگر) که ۱۰٪ همه ی موارد را تشکیل می‌دهد. SCLC نیز ۲۰٪ همه موارد را شامل می‌شود. تومورهای کارسینوئیدی بالغ بر ۱٪ همه موارد را شامل می‌شود. وقتی که سرطان ریه به سایر اندام‌ها متاساز داد، نرخ زنده ماندن بیش از ۵ سال، کمتر از ۵٪ خواهد بود (۵-۸).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

رده سلولی A549 در سال ۱۹۷۳ از یک آدنوکارسینومای ریوی (۹) در یک بررسی که تلاش کرد تا رده های سلولی پیوسته را از ۲۰۰ تومور مختلف ایجاد کند، جدا شد. علیرغم ایجاد شدن بعنوان ابزاری برای تحقیقات سرطان، رده سلولی سپس بعنوان نماینده پنوموسیت های نوع ۲ قطره ای (حبابی، حفره ای) ریه انسان، مشخص شد (۱۰) که این رده سلولی یک تحقیق تقریباً ۴۵ ساله بوده است. جداسازی رده سلولی شواهدی از توانایی A549 برای نمایش ویژگیهای فنوتیپ سلول اپیتلیال ATII همراه با گزارشاتی که کشت A549 منجر به شواهد تمایز سلولی بوسیله بیان تعداد زیادی اجسام چند لایه ای می شد حاکی از آن است که سلول قادر به تولید سورفکتانت است که یک ویژگی کلیدی سلول های ATII است. بررسی های جدیدتر منجر به یک نگرش محافظه کارانه تری از مناسب بودن تکرار فنوتیپ ATII شد. آثار اخیر نشان داده که کشت توسعه یافته در محیط یاکشت سلول مرتبط از نظر فیزیولوژیکی میتواند خواص شبیه ATII رده سلولی را افزایش دهد (۱۱ و ۱۲).

تریپتولید یک داروی طبیعی با اثرات ضد سرطانی نوین است. مطالعات نشان داده است که تریپتولید افزایش طول عمر سلول را مهار می کند، آپوپتوز را در سلول ها تحریک می کند، متاستاز تومور را مهار می کند و سایر شیوه های درمانی را در انواع سلول های سرطانی تقویت می کند. تریپتولید اثرات پروآپوپتوتیک و ضد افزایش عمر بر لاین های سلول های توموری در محیط کشت را از خود نشان داده است. همچنین اندازه تومور را کاهش و یا رشد تومور را در درون بدن موجود زنده محدود می کند. این ماده همچنین حساسیت سلول های تومور را در برابر سایر شیوه های درمانی مثل شیمی درمانی و رادیوتراپی افزایش می دهد (۱۳).

ژن CEA روی کروموزوم ۱۹ انسان قرار دارد و تغییرات بیان آن در تشخیص انواع مختلفی از سرطانها مانند سرطان سینه، کولون، پروستات، پانکراس، معده، تخمدان و ریه کاربرد دارد. از مهم ترین کاربردهای این ژن، استفاده از آن به عنوان بیومارکر در تشخیص سرطان کولورکتال و متاستاز کبد است. خانواده ژنی CEA به دو زیر گروه آنتی ژن های کارسینوم جنینی CEACAM شامل ۱۲ ژن کد کننده پروتئین و گلیکوپروتئین های مختص بارداری PSG تقسیم می شوند. بررسی فعالیت های پاتوفیزیولوژیک ژن های CEA نشان می دهد که این ژن ها می توانند نقش مهمی در تشخیص سرطان، پیشرفت و متاستاز آن ایفا نمایند. از میان انواع مختلف ژن های CEA، تغییرات بیان دو ژن CEACAM-5 و CEACAM-6 می تواند نقش مهمی در شناسایی سلول های مهاجم در سرطان سینه داشته باشد (۱۴ و ۱۵).

مرتبط ترین ژن ها با سرطان ریه شامل EGFR, KRAS, BRAF, LKB1, MET, PIK3CA, ALK, PET, POS می باشد (۱). ارتباط بیان و پیش بینی CEA در مرحله IB سرطان ریه غیرکوچک ابراز سرمی CEA یک نشانگر تومور با ارزش برای تشخیص، پیش بینی و نظارت و کنترل درمان سرطان ریه است (۱۷ و ۱۸). چند بررسی نشان داده است که سطوح بالای CEA یک نشانگر احتمالی از پیش بینی ضعیف در NSCLC صرف نظر از درمان است (۱۷). در ضمن، تعیین اینکه چه مقدار از بیان CEA بافت در تومورهای ریه وابستگی بالینی یا بیولوژیکی دارند، هنوز نامعلوم است (۱۹). هیچ تفاوتی بین بیان بافت CEA و زنده ماندن بیماران بدست نیامد. همچنین، بیماران مبتلا به بیان بالای CEA نرخ زنده ماندن پایین تری را نسبت به افراد منفی نشان دادند. اضافه بیان CEA در ۳۰ تا ۷۰ درصد بیماران مبتلا به NSCLC گزارش شده است و مکرراً در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوما و کارسینومای مرحله پیشرفته مشاهده می شود (۲۰). در واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون Real time PCR از مولکول های گزارشگر فلورسنت استفاده می شود که این روش ترکیبی از مراحل تشخیص DNA می باشد و همچنین به الکتروفورز ژل نیاز ندارد. به علاوه در این روش هر چه تعداد نمونه بیشتر باشد شدت نور منتشر شده بیشتر می شود. آزمایشات Real time PCR را می توان چندین مرتبه انجام داد و به راحتی تفاوت موجود در بین دو نمونه قابل تشخیص می باشد. در Real time PCR هزینه مواد مورد استفاده بسیار کم می باشد و این باعث می شود که برای بسیار از آزمایشات از قبیل پلی مورفیسم و همچنین شناسایی ژن های مربوط به بیماری های پیچیده مانند سرطان و دیابت مورد استفاده قرار گیرد (۲۱).

هدف از این تحقیق بررسی بیان ژن CEA در سلول های رده سرطان ریه تحت تیمار با تریپتولید می باشد. همچنین در این مطالعه اثر غلظت های مختلف تریپتولید بر توان زیستی سلول ها و تغییر میزان آپوپتوز و بیان ژن CEA در رده سلولی و A549 و بررسی

اثر مدت زمان انکوباسیون رده ی سلولی A549 با داروی تریپتولید بر توان زیستی سلول ها و تغییر میزان آپوپتوز و بیان ژن CEA بررسی می گردد.

### مواد و روش ها

**سلول مورد استفاده در این تحقیق:** رده ی سلولی A549 برای انجام این تحقیق از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. فلاسک T-25 حاوی رده ی سلولی A549 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و محیط کشت رویی سلول ها با استفاده از پیپت پاستور برداشته شد و محیط تازه (DMEM+ FBS10% + Pen/Strep1%) به آرامی به درون فلاسک اضافه شد سپس به درون انکوباتور CO<sub>2</sub> دار (۳۷C، ۵٪ CO<sub>2</sub>) منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت سلول ها زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند و در زمانی که ۸۰-۹۰ درصد کف فلاسک توسط سلول ها پوشیده شد، فرآیند پاساژ برای سلول ها انجام می شد.

**ماده مورد استفاده:** ماده مورد نظر یعنی تریپتولید به صورت جامد و به مقدار ۵ میلی گرم از شرکت Sigma-Aldrich با نام تجاری Triptolide و شماره محصول T3652 تهیه گردید.

**مراحل تیمار سلول های سرطان ریه رده A549:** ۱ میلی گرم تریپتولید از این هورمون در ۲۸۰ میکرو لیتر DMSO حل شد، سپس بنا به پروتکل ماده محلول استوک به حجم ۱۰۰ نانو رسید. برای تیمار ۲۴ ساعته تست MTT، سلول های مربوط به رده A549 درون چاهک های پلیت های ۹۶ خانه مخصوص تست MTT کشت داده شدند، به هر چاهک یکی از غلظت های مورد بررسی ماده تریپتولید اضافه گردید. برای هر غلظت ۴ تکرار در تست MTT در نظر گرفته شد و همچنین ۴ چاهک به عنوان گروه کنترل برای تست MTT در نظر گرفته شد و به چاهک های گروه کنترل محیط کشت RPMI+ FBS10% + Pen/Strep1% اضافه شد. در نهایت پلیت ها به درون انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند.

**گروه بندی برای تست MTT:** جهت بررسی تاثیر ماده تریپتولید بر میزان توانایی زیستی در رده سلولی A549 ریه انسان، سلول ها در سه بازه زمانی مختلف ۲۴ ساعت در معرض ماده تریپتولید قرار گرفتند. هر گروه مطابق اطلاعات زیر با غلظت های مختلف ماده تریپتولید در تماس بود (گروه کنترل شامل رده سرطانی A549 است):

گروه اول: سلول ها در معرض غلظت ۱/۲۵ نانومولار ماده تریپتولید قرار گرفتند.

گروه دوم: سلول ها در معرض غلظت ۲/۵ نانومولار ماده تریپتولید قرار گرفتند.

گروه سوم: سلول ها در معرض غلظت ۵ نانومولار ماده تریپتولید قرار گرفتند.

گروه چهارم: سلول ها در معرض غلظت ۱۰ نانومولار ماده تریپتولید قرار گرفتند.

گروه پنجم: سلول ها در معرض غلظت ۲۰ نانومولار ماده تریپتولید قرار گرفتند.

گروه کنترل: سلول ها در معرض محیط کشت DMEM + FBS10% + Pen/Strep1% قرار گرفتند.

**آزمون MTT:** برای اندازه گیری اثر سمیت سلولی ماده تریپتولید از آزمون MTT استفاده شد. برای انجام تست مورد نظر از ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. ابتدا سلول ها به تعداد  $5 \times 10^3$  سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. سپس انکوباسیون سلول ها به مدت ۲۴ ساعت جهت اتصال سلول ها به کف چاهک انجام شد و محیط کشت رویی سلول ها برداشته شد. و پس از آن انکوباسیون سلول ها در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت های مختلف ماده تریپتولید انجام شد. برداشت محیط رویی هر چاهک و شستشوی آن با ۱۰۰ میکرو لیتر PBS انجام گرفت. ۸۰ میکرو لیتر محیط کشت و ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه شد. سپس انکوباسیون به مدت ۳ تا ۵ ساعت انجام پذیرفت و محیط کشت همراه با MTT از چاهک ها خارج شد و ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. خواندن مقدار جذب نمونه ها توسط دستگاه ELISA reader با طول موج ۴۹۲-۶۳۰ نانومتر انجام شد (لازم به ذکر است که تمام مراحل باید در اتاق تاریک انجام شد).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

**استخراج RNA:** جهت استخراج RNA از کیت RNXplus استفاده شد. استخراج RNA طبق دستورالعمل این کیت صورت گرفت.

**سنتز cDNA:** مواد لازم جهت سنتز cDNA بافر 5x، مهار کننده آنزیم RNase، مخلوط dNTP و پرایمرهای مورد نظر می‌باشند. جهت سنتز cDNA مقدار ۵-۱ میکرولیتر از RNA مورد نظر را به همراه ۱ میکرولیتر از پرایمر هگزامر تصادفی و ۱ میکرولیتر از پرایمر الیگو (dT) به درون یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتر منتقل شدند و با آب دی اتیل پیرو کربنات (DEPC) به حجم ۱۳/۴ میکرولیتر رسانده شد، سپس به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر تحت دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذراندن مرحله قبل، میکروتیوب بالا فاصله بر روی یخ قرار گرفت، سپس به میکروتیوب مورد نظر مقدارهای ۴ میکرولیتر بافر 5x، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP، ۰/۵ میکرولیتر مهار کننده آنزیم RNase و ۱ میکرولیتر M-MLV اضافه شدند، پس از مخلوط کردن محتویات داخل میکروتیوب، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. پس از اتمام این مراحل cDNA مورد نظر ساخته شده است و می‌توان از آن استفاده کرد. جهت نگهداری کوتاه مدت و به مدت یک هفته می‌توان میکروتیوب حاوی cDNA ساخته شده را در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد و برای نگهداری در مدت زمان طولانی‌تر می‌توان آن را در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داد.

**Real time PCR:** برای انجام این واکنش از کیت مخصوص واکنش RT-Real Time PCR حاوی بافر 5x، مخلوط dNTP و آنزیم پلی‌مراز استفاده گردید. همچنین از یک رنگ اختصاصی متصل شونده به DNA دو رشته به عنوان گزارشگر، مورد نیاز برای ساخت MasterMix تحت عنوان سایبرگرین استفاده شد. سایبرگرین به شیار کوچک DNA دو رشته متصل می‌شود و در اثر تهیج از خود نور ساطع می‌کند، بنابراین با افزایش محصول PCR میزان فلورسانس نیز افزایش می‌یابد. به منظور انجام واکنش مقدار ۱/۵ میکرولیتر cDNA، ۰/۲ میکرولیتر پرایمر F (غلظت ۱۰ پیکومتر)، ۰/۲ میکرولیتر پرایمر R (غلظت ۱۰ پیکومتر) و ۷/۵ میکرولیتر SYBR 2x با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر ترکیب شدند. مخلوط پس از آماده سازی مطابق برنامه دمایی زیر دما دهی شد.

برنامه دمایی: یک سیکل (۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه)، ۴۰ سیکل (۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۱۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ ثانیه، ۵۵/۲ درجه ثانی‌گراد در ۲۰ ثانیه، ۶۰/۲ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ ثانیه) و یک سیکل ۷۲ درجه در ۵ دقیقه می‌باشد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

Gene	Primer sequence	Anneling Temperatur	Size bp
<i>CEA</i>	F: 5'-TGTCGGCATCATGATTGG-3' R: 5'-GCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC-3'	59	167
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3' R: 5'-GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC-3'	60	۱۸۳

**آنالیز آماری:** بررسی آماری با استفاده از آزمون ANOVA از طریق نرم افزار SPSS و همچنین برنامه‌ی Excel انجام شد. حدود اطمینان برای همه‌ی آزمایشات ۹۹٪ در نظر گرفته شد و  $P < 0/05$  معنی‌دار محسوب گردید.

#### یافته‌ها

**کشت سلول‌ها:** سلول‌های رده‌ی A549 پس از کشت با غلظت‌های مختلف تریپتولید (غلظت‌های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ نانومولار) برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند. انکوباسیون سلول‌های تیمار با غلظت ۱۰ تریپتولید را به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت

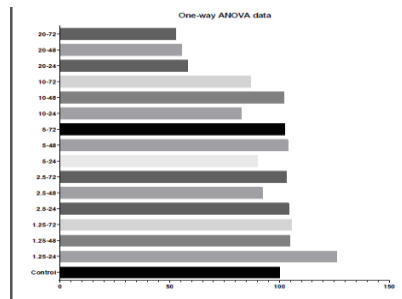
**نتایج اثر تست MTT بر توان زیستی رده سلولی A549**



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

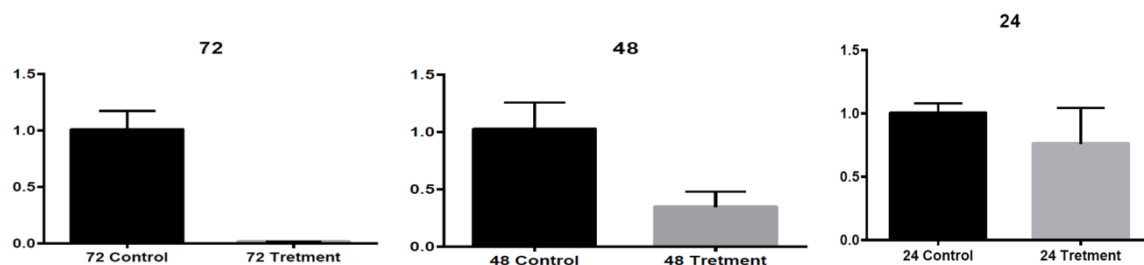
### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

بررسی نتایج تست MTT نشان می‌دهد که توان زیستی سلول‌های رده A549 سرطان ریه انسان تحت تیمار با غلظت‌های مختلف تریپتولید در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدن، نسبت به گروه کنترل تغییراتی داشته است که این کاهش توان زیستی در گروه آزمایشی که سلول‌ها در معرض غلظت ۲۰ نانومولار تریپتولید به مدت ۷۲ ساعت بوده‌اند کاهش قابل توجهی داشته‌اند اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد.



شکل ۱- اثر تریپتولید بر توان زیستی رده سلولی A549 در مدت زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت، اختلاف معنی‌دار در گروه‌های آزمایش تحت تیمار غلظت‌های ۱/۲۵ نانومولار تا ۲۰ نانومولار تریپتولید نسبت به گروه کنترل در هر سه زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعته دیده نمی‌شود.  $p > 0.05$

**نتایج RT-Real Time PCR:** پس از انجام real time PCR و آنالیز آماری نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تیمار سلول‌های رده سلولی A549 با تریپتولید و انکوباسیون آن‌ها برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان بیان ژن CEA کاهش می‌یابد. نمودارهای زیر این تغییر بیان را در ژن‌های مذکور براساس  $\Delta\Delta Ct$  نمایش می‌دهند.



شکل ۲- نمودار میزان بیان ژن CEA براساس  $\Delta\Delta Ct$  در غلظت ۱۰ نانومولار و زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت در رده سلولی A549. P  
شکل ۳- نمودار میزان بیان ژن CEA براساس  $\Delta\Delta Ct$  در غلظت ۱۰ نانومولار و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت در رده سلولی A549.  
شکل ۴- نمودار میزان بیان ژن CEA براساس  $\Delta\Delta Ct$  در غلظت ۱۰ نانومولار و زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت در رده سلولی A549.

### بحث

سرطان ریه یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان و مردان در سرتاسر جهان است. به طوری که تعداد مرگ ناشی از سرطان ریه از تعداد کل مرگ‌های ناشی از سرطان کولون، راست روده، سینه و پروستات هم فراتر رفته است (۴). در این مطالعه تجربی که با هدف بررسی اثر ماده تریپتولید بر سلول‌های سرطانی رده A549 انجام شد، سلول رده A549 در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شد. سلول‌ها در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در معرض غلظت‌های مختلف تریپتولید قرار گرفتند و رشد سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد. در نهایت بیان ژن CEA با استفاده از روش real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد که با افزایش غلظت تریپتولید به صورت وابسته به دوز و زمان توان زیستی سلول‌های A549 و

همچنین میزان بیان ژن *CEA* افزایش می‌یابد. در نتیجه القای آپوپتوز نیز افزایش می‌یابد. بیشترین تاثیر تریپتولید مربوط به غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰ نانومولار و در مدت زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها می‌باشد.

طبق نتایج به دست آمده می‌توان گفت ماده تریپتولید توانایی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ریه رده A549 را دارد. یافته‌های تحقیقات پژوهشگران پیشین نتایج مطالعه ما را تایید می‌کند:

ساواباتا و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند *CEA* فرآیندهای سلولی را تنظیم و هماهنگ می‌کند. این بیومارکر از نظر نقش بالقوه‌اش به عنوان یک فاکتور پیش‌بینی بیماری سرطان ریه بررسی شده است که نتایج حاصلی آن‌ها با تحقیق ما در یک سو قرار دارد (۲۲). لی و همکاران در سال ۲۰۰۹ دریافتند که آنتی ژن کارسینوآمبریونیک (*CEA*) یک گلیکوپروتئین بیان شده در طی تکامل جنینی و نوزادی است و مکرراً در سطح اپیکال اپیتلیوم گوارشی بیان می‌شود. گرچه آن می‌واند در اپیتلیوم انسان شامل بافت‌های ریه یافت شود (۲۳). وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تحقیق خود بر روی ارتباط بیان *CEA* با سرطان نشان دادند که افزایش بیان این ژن می‌تواند به عنوان یک شاخص پیش‌آگهی برای سرطان ریه مطرح باشد (۲۴).

آریتا و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که کاهش سطح سرمی *CEA* نشانه‌ای بر موفقیت شیمی درمانی در بیماران مبتلا به سرطان ریه از نوع NSCLC است (۲۵).

#### نتیجه گیری

طبق نتایج حاصل از تست MTT در تحقیق حاضر مشخص شد که توان زیستی سلول‌های سرطان پروستات رده سلولی A549 با افزایش غلظت تریپتولید به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه تکثیر سلولی و آپوپتوز نامنظم یکی از مشخصه‌های سرطان است بنابراین می‌توان از تریپتولید برای کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز در پیشگیری و درمان سرطان ریه استفاده کرد.

#### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به انجام رسیدن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند.

#### References:

1. Doosti A, Zamani M, Ghasemi Dehkordi P, Taheri S, Banitalebi M, Mahmoudzadeh M. Association of the p53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in South West of Iran. *Scientific Research and Essays*. 2011; 6 (15): 3148-3152.
2. Piperdi B, Merla A, Perez-Soler R. Targeting angiogenesis in squamous non-small cell lung cancer. *Drugs*. 2014; 74(4): 403-13.
3. Peter B, Bernard L. Lung cancer; WHO world cancer report. 2008, Chapter 5-10, No.12
4. Globocan L. Facts about lung cancer mortality rate at <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> (Accessed May 15, 2008).
5. Hashemzahi R, Doosti A, Kargar M, Jaafarinia M. Cloning and expression of nlpA gene as DNA vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii*. *Molecular biology reports*. 2018; 45, 395-401.
6. Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol*. 2012; 25(1): 18-30.

7. Sholl L. Molecular diagnostics of lung cancer in the clinic. *Transl Lung Cancer Res.* 2017; 6(5): 560-569.
8. Ferrini K, Ghelfi F, Mannucci R, Titta L. Lifestyle, nutrition and breast cancer: facts and presumptions for consideration. *Ecancermedalscience.* 2015; 9: 557-64.
9. Hostetter RB, Augustus LB, Mankarious R, Chi K, Fan D, et al. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 380-5.
10. Giard, D. J. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973; 51: 1417-1423.
11. Balis J U, Bumgarner, S D, Paciga, J E, Paterson, J F, Shelley S A. Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction. *Exp. Lung Res.* 1984; 6: 197-213 .
12. Swain R J, Kemp S J, Goldstraw P, Tetley T D, Stevens M M. Assessment of Cell Line Models of Primary Human Cells by Raman Spectral Phenotyping. *Biophys. J.* 2010; 98: 1703-1711.
13. Meng C, Zhu H, Song H, Wang Z, Huang G, et al. Targets and molecular mechanisms of triptolide in cancer therapy. *Chin J Cancer Res.* 2014; 26(5): 622-6.
14. Iqbal W, Alkarim S, Mohammed Ali HSH, Saini KS. CEACAM Gene Family: A Circuitous Journey towards Metastasis in Breast Cancer. *MOJ Immunol.* 2017; 5(4): 164-82.
15. Rothschild BM, Tanke DH, Helbling M. II. Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. *Naturwissenschaften.* 2003; 90: 495-500.
16. An ancient Medical Treasure at your fingertips .US National Library of Medicine. The Edwin Smith Surgical Papyrus. Available at: <http://archive.nlm.nih.gov/proj/ttp/flash/smith/smith.html> (Accessed September 29, 2012).
17. Hatate K, Yamashita K, Hirai K, Kumamoto H, Sato T, et al. Liver metastasis of colorectal cancer by protein-tyrosine phosphatase type 4A, 3 (PRL-3) is mediated through lymph node metastasis and elevated serum tumor markers such as CEA and CA19-9. *Oncol Rep.* 2008; 20(4): 737-43.
18. Tamura N, Iinuma H, Takada T. Prospective study of the quantitative carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 mRNA detection in peritoneal washes to predict peritoneal recurrence in gastric carcinoma patients. *Oncol Rep.* 2007; 17(3): 667-72.
19. Kelly KJ, Wong J, Gladdy R, Moore-Dalal K, Woo Y, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based detection of peritoneal micrometastases in patients with pancreatic cancer undergoing curative resection. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16(12): 3333-9.
20. Matsuoka K, Sumitomo S, Nakashima N, Nakajima D, Misaki N. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007; 32(3): 435-9.
21. Doosti A, Ghasemi Dehkordi P. Application of real-time PCR for identification and differentiation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.* 2011; 14 (2): 109-115.
22. Sawabata N, Maeda H, Yokota S, Takeda S, Koma M, et al. Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA nonsmall cell lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. *Cancer.* 2004; 101(4): 803-9.
23. Li M, Li JY, Zhao AL, He JS, Zhou LX, et al. Comparison of carcinoembryonic antigen prognostic value in serum and tumour tissue of patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2009; 11(3): 276-81.

24. Wang J, Ma Y, Zhu ZH, Situ DR, Hu Y, et al. Expression and prognostic relevance of tumor carcinoembryonic antigen in stage IB non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2012; 4(5): 490-6.
25. Arrieta O, Villarreal-Garza C, Martínez-Barrera L, Morales M, Dorantes-Gallareta Y, et al. Usefulness of serum carcinoembryonic antigen (CEA) in evaluating response to chemotherapy in patients with advanced non small-cell lung cancer: a prospective cohort study. *BMC Cancer.* 2013; 13: 254-62.

## کاهش میزان اکریل امید و نیترات در پروسه حرارت دهی به غلات ( جو- گندم و ذرت) با استفاده از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و عصاره گیاهان ( تخم گشنیز - سیاهدانه - آویشن)

مهرناز رومی<sup>۱</sup>، ماندانا بهبهانی<sup>۲</sup>، حسین سازگار<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشیار، گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان.
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

وجود مواد سمی، خطرناک و سرطان زا در مواد غذایی همواره مورد توجه بوده است. نیترات و آکریل امید مواد مضر هستند که به طور طبیعی در بسیاری از غذاها یافت می شوند و در طی فرآیند پخت مقدار آنها افزایش می یابد. غلات نقش مهمی در سبب غذایی خانواده ها در سراسر جهان دارند. روش های متعددی برای کاهش این دو ماده بکار گرفته شده است. استفاده از باکتری های پروبیوتیک در غذا نه تنها فواید درمانی زیادی دارد بلکه باعث بهبود کیفیت غذا نیز می شود. این مطالعه با هدف کاهش میزان آکریل امید و نیترات در سه نوع غلات گندم، جو و ذرت با فرآیند تخمیر و افزودن انواع عصاره های گیاهی (آویشن، سیاهدانه، گشنیز) انجام شد. عصاره ها از برگ و ساقه آویشن، سیاهدانه و گشنیز تهیه شد. در طی تخمیر از لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه Rhamnosus 6013 (LCR6013) استفاده شد. مقدار آکریل امید و نیترات با کروماتوگرافی مایع و اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که افزودن عصاره های گیاهی و باکتری های تخمیر شده می تواند سطح نیترات و آکریل امید را در نمونه های غلات کاهش دهد. بیشترین کاهش میزان نیترات (تا ۹۰ درصد) توسط عصاره سیاهدانه به دست آمد. تخمیر می تواند سطح نیترات را بین ۷۰ تا ۱۰۰ درصد کاهش دهد. در حالی که عصاره سیاهدانه بیشترین تأثیر (۸۰ تا ۱۰۰ درصد) را در کاهش میزان آکریل امید در تمام نمونه ها دارد؛ تخمیر تأثیر متغیری بر کاهش آکریل امید دارد.

**واژگان کلیدی:** آکریل امید، نیترات، کروماتوگرافی مایع، اسپکتروفتومتری، آویشن، گشنیز، سیاهدانه.

نشانی نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های نوین

تلفن: ۰۹۱۷۷۱۲۱۹۹۳

ایمیل: Ma-behbahani@yahoo.com

## Using *Lactobacillus casei* Fermentation and plant extracts (coriander seeds, black seeds, thyme) for reducing Nitrate and Acrylamide production in the heat processing of the Cereals (barley, wheat and corn)

Mehrnaz Roumi<sup>1</sup>, Mandana Behbahani<sup>2</sup>, Hossein Sazegar<sup>3</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3. Assistant Professor of Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

The presence of toxic, dangerous, and carcinogenic substances in food has always been a concern. Nitrate and Acrylamide are harmful substances that are naturally found in many foods and increase in amount during the baking process. Cereals play an important role in the food basket of families around the world. Numerous methods have been used to reduce these two substances. The use of probiotic bacteria in food not only has many therapeutic benefits but also improves the quality of food. This study aimed to reduce the amount of acrylamide and nitrate in three types of cereals including wheat, barley, and maize by the fermentation process and adding a variety of plant extracts (Thymus, Nigella, Coriander). The extracts were prepared from Thymus, Nigella, and Coriander leaves and stems. *Lactobacillus casei* subspecies *Rhamnosus* 6013 (abbreviation LCR6013) was used during the fermentation. Acrylamide and nitrate were measured by liquid chromatography and spectrophotometry. The results showed that adding the plant extracts and fermented bacteria could reduce the level of nitrate and acrylamide in the cereal samples. The greatest reduction (up to 90 %) in the amount of nitrate was obtained by Nigella sativa extract. Fermentation could reduce the level of nitrate between 70 and 100 %, as well. While Nigella sativa extract has the most significant effect (80% to 100%) on reducing the amount of acrylamide content in all samples, fermentation has a variable impact on decreasing acrylamide.

**Keywords:** Acrylamide, Nitrate, liquid chromatographic, spectrophotometry, Thymes, coriander, *Nigella sativa*.

### مقدمه

آکریل آمید و نیترات قوی ترین ترکیبات سرطان زا<sup>۳۲</sup> در غذا هستند. واکنش میلارد به عنوان واکنش فراگیر در غذاهای غنی از کربوهیدرات که به صورت حرارتی آماده می شوند، منبع اصلی آلودگی آکریل آمید<sup>۳۳</sup> (AA) است. واکنش بین اسید آمینه اسپاراژین و قندهای کاهنده منجر به تشکیل AA می شود (۱-۴). بر اساس گزارش های آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC)<sup>۳۴</sup> (۵)، AA در گروه سرطان زاهای A۲ (احتمالا سرطان زا برای انسان) طبقه بندی می شود (۶). چندین گزارش نشان می دهد که AA می تواند خطر ابتلا به برخی از سرطان ها مانند سرطان کلیه و پستان را در زنان یائسه افزایش دهد. در سطح مولکولی، مشخص شده است که AA به ویژه در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم، می تواند به DNA آسیب برساند (۷). از جمله منابع اصلی AA در رژیم غذایی، فرآورده های سیب زمینی، فرآورده های غلات مانند غلات صبحانه، نان و بیسکویت و همچنین جایگزین های قهوه را می توان نام برد (۴ و ۸-۱۱). وجود نیترات ها و نیتريت ها در غذاهای پخته شده همیشه یک نگرانی

<sup>32</sup> .carcinogens

<sup>33</sup> .Acrylamide

<sup>34</sup> .International Agency for Research on Cancer

در تجزیه و تحلیل سیستم‌های چندعاملی<sup>۳۵</sup> سلامت و تندرستی بوده است. مصرف غذاهای سرشار از نیترات و نیتريت با افزایش خطر ابتلا به سرطان دستگاه گوارش و مت هموگلوبینمی در نوزادان مرتبط است. منابع غذایی این دو جزء در یک رژیم غذایی سالم باید به اندازه کافی در نظر گرفته شود. بیشترین مقدار نیترات رژیم غذایی (۸۰٪) از سبزیجات و پس از آن از میوه‌ها و گوشت‌های فرآوری شده به دست می‌آید. از آنجایی که AA و نیترات به عنوان تهدیدی جدی برای سلامت انسان شناخته می‌شوند، مقدار این دو ماده در غذاهای پخته شده باید کاهش یابد. داده‌های علمی متعدد فواید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را برای سلامت انسان تایید می‌کنند. عصاره‌های گیاهی سرشار از آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که از طریق مکانیسم‌های واکنش‌های مختلف، عمل می‌کنند. پیشگیری و درمان اختلالات مربوط به استرس اکسیداتیو از طریق ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی انجام می‌شود. در پژوهش حاضر از سه نمونه عصاره گیاهی (تیموس، سیاهدانه، گشنیز) استفاده شد. *Thymus vulgaris* (آویشن) به عنوان یک گیاه معطر از خانواده *Lamiaceae* به دلیل اثرات دارویی و درمانی مورد توجه زیادی در سراسر جهان قرار گرفته است. با توجه به مقالات چاپ شده، آویشن حاوی دو ترکیب فعال زیستی اصلی، تیمول و کارواکرول است که اثرات دارویی آویشن را به آنها نسبت می‌دهند (۱۲). بررسی‌های آزمایشگاهی خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات زیست‌فعال را در آویشن مشخص کرده است (۱۳). سیاهدانه یکی از دانه‌های گیاهان دارویی مورد تحسین در طب سنتی است (۱۴). بسیاری از مطالعات محتوای کینون سیاهدانه از جمله تیموکینون (TQ) و تیمول را مسئول فعالیت دارویی و ضد سرطانی آن در نظر گرفته‌اند (۱۵). گشنیز (*Coriandrum sativum* L) یکی از اعضای خانواده *Apiaceae*، منبع بالقوه ترکیبات زیستی فعال در نظر گرفته می‌شود. اسانس و عصاره‌های مختلف گشنیز دارای خواص تغذیه‌ای و دارویی مانند اثرات ضد باکتریایی، ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی هستند (۱۶، ۱۷).

این مطالعه به منظور بررسی تاثیر عصاره‌های گیاهی (سینگ سیاه، تیموس و گشنیز) و تخمیر بر کاهش تشکیل محتوای آکريل آميد و نیترات در نمونه‌های غلات (گندم، ذرت، جو) انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی و محلول‌ها

آکريل آميد (< ۹۹٪) و نیترات سدیم از شرکت سیگما شیمی (دیزنهوفن، آلمان) به دست آمد. متانول، استیک اسید و استونیتریل (گرید آزمایشگاهی<sup>۳۶</sup>)، هگزاسیانوفرات پتاسیم (Carrez I) و سولفات روی (Carrez II) از Merck (دارمشتات، آلمان) تهیه شدند. محلول Carrez I با حل کردن ۱۵ گرم هگزاسیانوفرات پتاسیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب و محلول Carrez II با حل ۳۰ گرم سولفات روی در ۱۰۰ میلی لیتر آب تهیه شد. در طول آزمایش از آب مقطر دیونیزه و فیلتر شده ۰.۲۰ میکرومتر استفاده شد (۱۸).

### تهیه استانداردهای کالیبراسیون

محلول استوک آکريل آميد با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر آب مقطر تهیه شد. پس از آن، سه غلظت محلول استاندارد آکريل آميد (۰.۱، ۰.۰۱ و ۰.۰۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر) برای رسم منحنی کالیبراسیون ساخته شد (۱۴). برای رسم منحنی استاندارد نیترات، محلول‌های استاندارد استوک نیترات با رقیق کردن استاندارد ۱ گرم در میلی لیتر با آب دیونیزه شده در غلظت‌های نهایی ۱، ۰.۱، ۰.۰۱ و ۰.۰۰۱ گرم بر میلی لیتر تهیه شد. این محلول‌ها در طول موج ۲۲۰-۲۷۵ نانومتر با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شدند.

### آنالیز HPLC کمی آکريل آميد

<sup>35</sup> .multi-factorial systems

<sup>36</sup> .analytical grade

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

آنالیز HPLC توسط Agilent 1100 Quaternary DAD HPLC System (Waldbronn, آلمان) شامل یک پمپ چهارتایی با گاز زدای خلاء<sup>۳۷</sup>، یک اجاق ستونی با دمای کنترل شده، یک سمپلر اتوماتیک و یک آشکارساز<sup>۳۸</sup> آرایه دیودی انجام شد. جداسازی های کروماتوگرافی بر روی یک ستون ODS-3 C18 (۲۵۰ میلی متر × ۴.۶ میلی متر، Intersil, ژاپن) با حجم تزریق ۴۰ میکرولیتر (۱۴) انجام شد. جذب محلول ها و آنالیت های استاندارد در طول موج ۲۱۰ نانومتر اندازه گیری شد. پیک های AA و اندازه آنها با مقایسه با الگوهای طیفی و زمان ماند نمونه ها با استاندارد محاسبه شد.

#### تهیه نمونه های غلات

بذرهای بالغ گندم، ذرت و جو در دی ماه ۱۴۰۰ اصفهان جمع آوری گردید و از هر نمونه یک کیلوگرم به دقت خشک و پودر شد. در نهایت ۵ گرم از هر نمونه با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر کاملاً مخلوط شده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در همان شرایط پخته شد.

#### استخراج آکریل آمید از نمونه های غلات

محلول های پخته شده با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲ میلی لیتر از مایع رویی هر نمونه به یک فلاسک جدید منتقل شد و با ۱ میلی لیتر محلول کارز I و ۱ میلی لیتر محلول کارز II مخلوط شد. در مرحله بعد ۶ میلی لیتر اسید استیک ۲ درصد به آن اضافه شد و محلول ها به مدت ۲ دقیقه با ورتکس به خوبی مخلوط شدند. سپس نمونه ها با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. دو میلی لیتر از مایع رویی جدا شد و ۳ میلی لیتر هگزان به همراه ۵ میلی لیتر آب به آن اضافه شد. محلول ها با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس لایه آلی بالایی دور ریخته شد و محلول های باقیمانده قبل از آنالیز با HPLC از طریق فیلتر سرنگ ۰.۲۲ میکرومتری فیلتر شدند (۱۹ و ۲۰).

#### استخراج نیترات از نمونه های غلات

هر نوع نمونه غلات در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در آن خشک شد. نمونه های خشک شده آسیاب شدند. مش شماره ۲۰ برای الک کردن پودرها استفاده شد. نمونه های الک شده (۰.۴ گرم)، کربن فعال (۰.۰۵ گرم)، و سولفات آلومینیوم (۴۰ میلی لیتر، ۰.۰۲۵ مولار) در یک فلاسک ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شدند. سپس نمونه ها با کاغذ واتمن (شماره ۱۰۰) فیلتر شدند. سپس مجدداً ۰.۰۵ گرم کربن فعال به فیلترات (محلولی که از صافی گذشته) اضافه شد. روش فیلتراسیون پس از تکان دادن نمونه تکرار شد (۲۱). در نهایت نیترات استخراج شده با استفاده از روش کاتالدو (۱۸). اندازه گیری شد. بر اساس پروتکل، ۰/۲ میلی لیتر از نمونه های استخراج شده به طور جداگانه به لوله های آزمایش منتقل شد و به هر لوله ۰/۸ میلی لیتر اسید سالیسیلیک اضافه شد. لوله های آزمایش بلافاصله هم زده شد و ۳۰ دقیقه به نمونه ها زمان داده شد. سپس ۱۹ میلی لیتر محلول هیدروکسید سدیم به هر نمونه اضافه شد و کاملاً مخلوط شد. در نهایت، جذب نمونه ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد (۲۲).

#### تیمار نمونه های غلات با عصاره های گیاهی

۴۰ گرم از مواد گیاهی (سیاه، تیموس، گشنیز) و ۸۰۰ میلی لیتر متانول برای استخراج استفاده شد. عصاره های متانولی از طریق کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شدند و سپس حلال در شرایط خلاء و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در اواپراتور (تبخیرکننده) چرخشی تقطیر شد (۲۳). بقایای عصاره در آن خلاء با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت خشک شد. پودرهای عصاره تا زمان استفاده در یک بطری تیره در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۲۴). هر پودر عصاره در ۲ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس محلول ها به طور جداگانه به هر نمونه غلات اضافه شد. در نهایت تمامی نمونه ها در دمای 121 °C به مدت ۱۵ دقیقه پخته شدند.

<sup>37</sup> .vacuum degasser

<sup>38</sup> .diode-array detector



### تیمار نمونه های غلات با باکتری ها

لاکتوباسیلوس کازئی زیر گونه *rhamnosus* با LCR 6013<sup>39</sup> در این تحقیق از استفاده شده است که از مرکز منابع زیستی ایران (تهران، ایران) خریداری شده است (۲۵). *L. casei* روی MRS آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. سپس، کلنی های جدا شده در محیط MRS<sup>40</sup> کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تا رسیدن به استاندارد کدورت ۱ مک فارلند ( $3 \times 10^8$  CFU/ml) انکوبه شدند (۲۶). پنج گرم از سه نمونه غلات ذرت، جو و گندم اندازه گیری شد و با *L. casei* در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت تخمیر شد. سپس تمامی نمونه ها در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند.

### یافته ها

#### تأثیر عصاره های گیاهی بر کاهش آکریل آمید

در این تحقیق، تأثیر عصاره متانولی سه گیاه آویشن، سیاهدانه و گشنیز بر میزان آکریل آمید تولیدی حین پخت غلات مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره های گیاهی می توانند تولید آکریل آمید را کاهش دهند. میزان کاهش بسته به نوع عصاره ی اضافه شده متفاوت بود (جدول ۱). در بین این عصاره ها، سیاهدانه در کاهش آکریل آمید مؤثرتر بود و توانست مقدار آکریل آمید را بین ۷۰ تا ۱۰۰ درصد کاهش دهد. در بین سه نمونه غلات آزمایش شده، جو بیشترین افزایش محتوای AA را پس از پردازش حرارتی نشان داد. هر دو عصاره آویشن و سیاهدانه در کاهش چشمگیر AA تولید شده در جو مؤثرتر بودند. با این حال، عصاره گشنیز با تأثیر کلی خفیف برای گندم مؤثرتر بود. نکته مهم دیگر این است که عصاره آویشن بر جو و سیاهدانه بر ذرت اثر محو کننده (حذف کننده) بر مقادیر AA داشتند.

جدول ۱: مقدار میانگین آکریل آمید اندازه گیری شده در غلات در شرایط مختلف؛ خام، پخته، تیمار شده با عصاره گیاهی و تخمیر باکتریایی ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

غلات	خام	پخته	عصاره آویشن	عصاره سیاهدانه	عصاره گشنیز	تخمیر
جو	9±0.4	16±0.8	0	2±0.1	12±0.9	10±0.9
گندم	7±0.3	10±0.9	6±0.4	4±0.3	5±0.3	8±0.6
ذرت	8±0.4	10±0.8	8±0.5	0	7±0.4	10±0.9

#### اثر تخمیر باکتریایی بر کاهش آکریل آمید

علاوه بر اثر عصاره گیاهی، تأثیر تخمیر باکتریایی غلات بر کاهش آکریل آمید نیز بررسی شد. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، تخمیر توسط *Lactobacillus casei rhamnosus* LCR 6013 می تواند میزان آکریل آمید را در تمام نمونه های غلات کاهش دهد. تخمیر می تواند به طور کامل مقدار آکریل آمید را در ذرت حذف کند. همچنین میزان آکریل آمید در گندم و جو به ترتیب ۲۰ درصد و ۳۷.۵ درصد نسبت به نوع پخته کاهش یافت.

#### تأثیر عصاره های گیاهی بر کاهش نیترات

<sup>39</sup> .Lactobacillus casei subsp. rhamnosus LCR 6013

<sup>40</sup> .MRS broth

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

در مطالعه ما، تیمار غلات با عصاره‌های گیاهی، به‌ویژه سیاهدانه، اثر حذفی معنی‌داری بر میزان نیترات هر سه نوع غلات در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده نشان داد.

میانگین مقدار نیترات در نمونه‌های غلات تیمار نشده و تیمار شده با عصاره‌های گیاهی در جدول ۲ مقایسه شده است. در بین سه نمونه غله مورد آزمایش، گندم پس از پختن، بیشترین افزایش نیترات را پس از پخت نشان داد. هر سه عصاره گیاهی کارایی بالایی برای کاهش نیترات در گندم و ذرت نشان دادند.

جدول ۲. مقدار میانگین نیترات اندازه‌گیری شده در غلات در شرایط مختلف: خام، پخته، تیمار شده با عصاره گیاهی و تخمیر باکتریایی ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

تخمیر	عصاره گشنیز	عصاره سیاهدانه	عصاره آویشن	پخته	خام	غلات
0	$46 \pm 3.9$	0	$20 \pm 1.8$	$28 \pm 1.8$	0	جو
$20 \pm 1.7$	$22 \pm 1.9$	0	$26 \pm 1.9$	$100 \pm 8$	$4.6 \pm 3.4$	گندم
$10 \pm 0.7$	0	0	$26 \pm 1.8$	$40 \pm 2.9$	$38 \pm 2.8$	ذرت

#### تأثیر تخمیر بر کاهش نیترات

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که کاهش قابل توجهی در محتوای نیترات در نمونه‌های غلات طی تخمیر توسط باکتری لاکتوباسیلوس وجود دارد. مطالعه حاضر حاکی از حذف ۱۰۰ درصدی نیترات در جو و پس از آن به ترتیب حدود ۸۰ و ۷۵ درصد کاهش در گندم و ذرت بود.

#### بحث

طبق مطالعه Shiyiou و همکاران، مسیر اصلی منتهی به تشکیل آکریل آمید در غذاها، واکنش میلارد با اسید آمینه آزاد (آسپاراژین) و قندهای احیاکننده (عمدتاً گلوکز و فروکتوز) است. اکثر مطالعات نشان دادند که افزودن عصاره‌های گیاهی می‌تواند مقدار آکریل آمید را در غذای گرم شده کاهش دهد (۲۷). علاوه بر واکنش آسپاراژین و قندهای کاهنده برای تولید آکریل آمید، چندین مسیر تشکیل دیگر از طریق آکرولئین و آمونیاک پیشنهاد شده است (۲۷). هانس لینگرت و همکاران (۲۸) گزارش کردند که آکرولئین می‌تواند طی یک سری واکنش‌های اساسی به آکریل آمید تبدیل شود. گرانبی و همکاران دریافتند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌های گیاهی می‌توانند با آلدئیدهای فعال برهمکنش داشته و اکسیداسیون آکرولئین را به طور متوسط مسدود کنند. علاوه بر این، برخی از مطالعات نشان داده‌اند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها (مانند آنتی‌اکسیدان‌های فنولیک، زغال اخته، اسید فرولیک و پونه کوهی) (۲۹). در تشکیل آمیدهای آکرلیک و همچنین جلوگیری از واکنش‌های میلارد موثر هستند. مارکوا و همکاران (۳۱) گزارش کردند که افزودن برخی ادویه‌ها به کیک‌های زنجبیل گندم سیاه می‌تواند سطح AA را تا ۲۳ درصد کاهش دهد. به همین ترتیب، محلول‌های عصاره برگ‌های بامبو که قبل از فرآوری محصول سیب‌زمینی اضافه شده‌اند، کاهش ۷۶ درصدی محتوای AA را در مطالعه Zhang و همکاران (۳۲) نشان دادند. همچنین پژوهش موسوی نژاد و همکاران (۳۳) کاهش ۸۳ درصدی مقدار AA در نان‌های سرخ شده از طریق افزودن عصاره چای سبز را نشان داد.

طبق مطالعه موترام و همکاران (۳۴) و نیز استدلر و همکاران (۳۵)، پیش‌سازهای مهم برای تولید آکریل آمید در غذاها، قندهای احیاکننده و اسیدهای آمینه آزاد، عمدتاً آسپاراژین هستند. گزارش‌های دیگر از کاهش آکریل آمید از طریق تخمیر نشان می‌دهد

که مصرف فندهای کاهنده توسط سویه های لاکتوباسیلوس می تواند منجر به یک عامل محدود کننده برای تشکیل آکریل آمید شود (۳۳، ۳۶). در پژوهشی دیگر، موسوی نژاد و همکاران (۳۳) کاهش قابل توجهی در تشکیل AA در طول تولید پنکیک سیب زمینی از طریق تخمیر خمیر سیب زمینی با گونه های مختلف لاکتوباسیلوس گزارش کردند. بر اساس اظهارات محققان، تمرکز بر حذف یا رقیق کردن پیش سازهای تشکیل دهنده AA از طریق افزودن یک آنزیم یا استفاده از مخمر یا میکروارگانیسم دیگر رایج ترین و موثرترین استراتژی برای کاهش AA است (۳).

محققان گزارش کرده اند که آنتی اکسیدان ها می توانند میزان نیترات را در غذا کاهش دهند. مطالعه ای در سال ۲۰۱۵ (۳۷) نشان داد که محتوای نیترات در محصولات مشتق شده از گوجه فرنگی پس از تیمار با آب لیموی تازه به میزان قابل توجهی کاهش یافت. در مطالعه ما، تیمار غلات با عصاره های گیاهی، به ویژه سیاه دانه، اثر حذفی معنی داری بر میزان نیترات هر سه نوع غلات در مقایسه با نمونه های تیمار نشده نشان داد. در مطالعه ای در سال ۲۰۱۸ توسط کوختین و همکاران (۳۸) انجام شد، تاثیر میکروارگانیسم های اسید لاکتیک بر محتوای نیترات در گوجه فرنگی طی فرآیند تهیه ترشی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج آن مطالعه نشان داد که میکروارگانیسم های اسید لاکتیک می توانند منجر به کاهش ۵.۷ تا ۸.۰ برابری میزان نیترات در ترشی گوجه فرنگی، نسبت به محتوای اولیه شوند.

### نتیجه گیری

از آنجایی که افزایش جمعیت انسانی منجر به افزایش تقاضا برای غلات می شود، ارزیابی کیفیت غلات مانند غلظت نیترات و نیتريت در آنها ضروری است. با توجه به پیامدهای سمی این ترکیبات بر انسان و حیوانات، ارزیابی سطح آنها در غذا از اهمیت بسیار برخوردار است. هدف از مطالعه حاضر بررسی وجود آکریل آمید و نیترات در نمونه های غلات بود. روشن است که آکریل آمید و نیترات در غلات به دلیل واکنش شیمیایی آغاز شده توسط پخت و پز در دمای بالا تولید می شوند. مقدار آکریل آمید و نیترات در نمونه های مختلف متغیر است اما همگی دارای مقدار قابل توجهی از این دو ماده هستند. در این تحقیق از دو روش تخمیر و افزودن عصاره های گیاهی برای کاهش نیترات و AA در نمونه های پخته شده غلات استفاده شد. این مطالعه نشان داد که کاهش محتوای آکریل آمید و نیترات تولید شده در غلات پخته شده با استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی امکان پذیر است. از بین عصاره های گیاهی سیاه دانه قادر به حذف کامل نیترات در تمام نمونه ها بود، همچنین سیاه دانه در کاهش ۸۷ درصدی میزان AA نمونه ها در جو و کاهش ۶۰ درصدی AA در گندم و کاهش ۱۰۰ درصدی مقدار AA در ذرت مؤثر بود. نتایج نشان داد که استفاده از باکتری های تخمیر شده می تواند محتوای نیترات در غلات را تا ۷۵ درصد کاهش دهد در حالی که تأثیر کمتری بر کاهش میزان AA دارد.

### سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه ارشد می باشد. از تمامی کسانی که من را در تهیه این مقاله یاری کردند کمال سپاس و تشکر را دارم.

### References:

1. Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. Journal of agricultural and food chemistry. 2003; 51(16): 4504-26.
2. Keramat J, LeBail A, Prost C, Soltanizadeh N. Acrylamide in foods: chemistry and analysis. A review. Food and bioprocess technology. 2011; 4: 340-63.
3. Keramat J, LeBail A, Prost C, Jafari M. Acrylamide in baking products: a review article. Food and Bioprocess Technology. 2011 May;4:530-43.
4. Mesías M, Morales FJ. Acrylamide in coffee: Estimation of exposure from vending machines. Journal of Food Composition and Analysis. 2016; 48: 8-12.

5. Acrylamide IA. In some industrial chemicals. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: IARC. 1994.
6. Çelik FS, Cora T, Yigin AK. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of acrylamide in HEK293 cell line. *Journal of Cancer Prevention and Current Research*. 2018; 9: 260-4.
7. Zamani E, Shokrzadeh M, Fallah M, Shaki F. A review of acrylamide toxicity and its mechanism. *Pharm Biomed Res* 3 (1): 1–7.
8. Dimitrieska-Stojkovikj E, Angeleska A, Stojanovska-Dimzoska B, Hajrilai-Musliu Z, Koceva D, Uzunov R, Ilievska G, Stojković G, Jankuloski D. Acrylamide content in food commodities consumed in North Macedonia and its risk assessment in the population. *Journal of food quality and hazards control*. 2019.
9. Maan AA, Anjum MA, Khan MK, Nazir A, Saeed F, Afzaal M, Aadil RM. Acrylamide formation and different mitigation strategies during food processing—a review. *Food Reviews International*. 2022; 38(1): 70-87.
10. Abdulrazak S, Otie D, Oniwapele YA. Concentration of nitrate and nitrite in some selected cereals sourced within Kaduna state, Nigeria. *Online J. Anim. Feed Res*. 2014; 4(3): 37-41.
11. Yu LL, Wang S, Sun BG, editors. *Food safety chemistry: toxicant occurrence, analysis and mitigation*. CRC press; 2014.
12. Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and chemical toxicology*. 1994; 32(1): 31-6.
13. Gumus R, Ercan NA, Imik HI. The effect of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) added to quail diets on performance, some blood parameters, and the antioxidative metabolism of the serum and liver tissues. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2017 Apr;19:297-304.
14. Karimi Z, Alizadeh AM, Dolatabadi JE, Dehghan P. *Nigella sativa* and its derivatives as food toxicity protectant agents. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2019; 9(1): 22.
15. Agbaria R, Gabarin A, Dahan A, Ben-Shabat S. Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) and its relationship with the thermal processing and quinone composition of the seed. *Drug design, development and therapy*. 2015: 3119-24.
16. Darughe F, Barzegar M, Sahari MA. Antioxidant and antifungal activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil in cake. *International Food Research Journal*. 2012; 19(3): 1253-60.
17. Zoubiri S, Baaliouamer A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2014 Dec 1;18(6):925-38.
18. Ghalebi M, Hamidi S, Nemati M. High-performance liquid chromatography determination of acrylamide after its extraction from potato chips. *Pharmaceutical Sciences*. 2019; 25(4): 338-44.
19. Muthaiah P, Govindaswamy A, Semwal A, Sharma GK. HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in snack foods of India. *Defence Life Science Journal*. 2018;4(1):45-54.
20. Geng Z, Wang P, Liu A. Determination of acrylamide in starch-based foods by HPLC with pre-column ultraviolet derivatization. *Journal of chromatographic science*. 2011; 49(10): 818-24.
21. Zeng S, Chen W, Ye J, Yang C. Investigation on the Contents of Acrylamide in Baked and Fried foods. *INOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2020; 512(1): 012058.
22. Taghipour H, Hemmati S, Faramarzi E, Somi MH, Dastgiri S, Nowrouze P. Determination of nitrate concentration in consumed vegetables and estimation of that's dietary intake in

- Shabestar and Khameneh City, northwest of Iran: Azar Cohort study. *Progr. Nutr.* 2019; 21: 336-40.
23. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food chemistry.* 2008; 110(1): 76-82.
  24. El-Shawaf AM, El-Zamzamy FM, Mekky TM. Reduction of acrylamide formation in potato chips using natural antioxidants sources from plant extracts. *Middle East Journal of Agriculture Research.* 2014; 3(1): 89-99.
  25. Nasiri Esfahani B, Kadivar M, Shahedi M, Soleimanian-Zad S. Reduction of acrylamide in whole-wheat bread by combining lactobacilli and yeast fermentation. *Food Additives & Contaminants: Part A.* 2017; 34(11): 1904-14.
  26. Colombo M, de Oliveira AE, de Carvalho AF, Nero LA. Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. *Food microbiology.* 2014; 39: 89-95.
  27. Krishnakumar T, Visvanathan R. Acrylamide in food products: a review. *Journal of Food Processing & Technology.* 2014; 5(7): 1.
  28. Lignert H, Grivas S, Jägerstad M, Skog K, Törnqvist M, Åman P. Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Food & Nutrition Research.* 2002: 159-72.
  29. Zahra N, Kalim I, Khurshid Z, Ahmad I, Saeed MK. Determination of acrylamide in branded and non-branded potato chips by using high performance liquid chromatography. *Pakistan journal of analytical & environmental chemistry.* 2018; 19(1): 91-5.
  30. Khezerlou A, Alizadeh-Sani M, Firouzsalar NZ, Ehsani A. Formation, properties, and reduction methods of acrylamide in foods: A review study. *J. Nutr. Fasting Health.* 2018; 6: 52-9.
  31. Marková L, Ciesarová Z, Kukurová K, Zieliński H, Przygodzka M, Bednáriková A, Šimko P. Influence of various spices on acrylamide content in buckwheat ginger cakes. *Chemical Papers.* 2012; 66(10): 949-54.
  32. Zhang Y, Zhang Y. Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2007; 47(5): 521-42.
  33. Mousavinejad G, Rezaei K, Khodaiyan F. Reducing acrylamide in fried potato pancake using baker's yeast, lactobacilli and microalgae. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods.* 2015; 7(5): 779-87.
  34. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature.* 2002; 419(6906): 448-9.
  35. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature.* 2002; 419(6906): 449-50.
  36. Davies HV, Bradshaw JE, Dale MF, Mottram DS, Pont SD, McNICOL JW, Shepherd LV. Acrylamide producing potential of potato: exploring the basis for natural variation. *Acrylamide: Influence of plant genetics, agronomy and food processing.* 2009:41.
  37. Ziarati P, Mohammad-Makki FM. Removal of nitrate and nitrite from tomato derived products by lemon juice. *BBRA.* 2015; 12(2): 767-2.
  38. Kukhtyn M, Horiuk Y, Yaroshenko T, Laiter-Moskaliuk S, Levytska V, Reshetnyk A. Effect of lactic acid microorganisms on the content of nitrates in tomato in the process of pickling. *Восточно-Европейский журнал передовых технологий.* 2018; 1(11): 69-75.

## رنگدانه های کروموزنیک: ویولاسئین و پرودیجیوسین

نیما بهادر<sup>۱\*</sup>، مائده نوشادی<sup>۲</sup> رضا کشاورز<sup>۳</sup>، یاسمین محمد پور<sup>۳</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲. گروه بیولوژی، موسسه آموزش عالی زند، شیراز، ایران
۳. گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد زرقان، دانشگاه آزاد اسلامی، زرقان، ایران

### چکیده

انواع گسترده‌ای از بیماری‌ها و مشکلات پزشکی وجود دارند که خطری جدی برای سلامتی انسان‌ها محسوب می‌شوند. امروزه بسیاری از داروهای موجود جهت درمان بیماری‌ها، از محصولات طبیعی می‌باشند که بیشتر آنها از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. در میان ترکیبات فعال زیستی با منشاء میکروبی، رنگدانه‌های طبیعی به دلیل علاقه روزافزون به تولید محصولات جدید، ایمن، تجزیه پذیر، سازگار با محیط زیست و بدون عوارض جانبی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. بر همین اساس در مقاله حاضر سعی بر این شده است که نگاهی به ساختار دو رنگدانه کروموزنیک باکتریایی شامل: ویولاسئین و پرودیجیوسین داشته، سپس به اثرات مختلفی که این دو پیگمان می‌توانند داشته باشند، پرداخته شده است. ویولاسئین و پرودیجیوسین هر دو متابولیت ثانویه رنگی باکتریایی هستند که به ترتیب با رنگ بنفش و قرمز مشخص می‌شوند. ارگانیسم‌های تولید کننده این دو رنگدانه به ترتیب شامل: سراسیا، کروموباکتریوم و جنتینوباکتریوم می‌باشند که هر دو پیگمان تولیدی غیر قابل حل در آب می‌باشند و عموماً توسط باکتری‌های گرم منفی که در محیط‌های مختلف مانند: دریاها، عمیق، رودخانه‌ها، خاک‌های محیط کشاورزی و جنگل، در مناطق یخبندان قطبی و آلپ زندگی می‌کنند، مشاهده می‌شوند. رنگدانه‌های مذکور اثرات مختلفی از جمله: اثر ضد میکروبی، ضد قارچ، ضد تک‌یاخته، ضد سرطان و تعدیل کننده سیستم ایمنی را از خود نشان می‌دهند. از آنجایی که دسترسی به سلول‌های باکتریایی تولید کننده پیگمان به راحتی امکان پذیر می‌باشد و استخراج پیگمان با روش‌های مختلف می‌تواند امکان پذیر باشد. بنابراین می‌توان به دلیل ایمن بودن این ترکیبات از آنها استفاده‌های فراوان نمود و در تحقیقات بعدی نیز استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** باکتری‌های کروموزنیک، پیگمان، ویولاسئین، پرودیجیوسین .

نشانی نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

کد پستی: ۷۱۹۹۳-۱

تلفن: ۰۷۱۳۶۴۱۰۰ همراه: ۰۹۱۷۰۹۱۳۵۸۰

پست الکترونیک: ni.bahador@iau.acir

## Chromogenic pigments: violacein and Prodigiosin

Nima Bahador\*<sup>1</sup>, Maedeh Noshadi<sup>2</sup>, Reza Keshavarz<sup>3</sup>, Yasamin Mohamadpour<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
2. Department of Biology, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran.
3. Department of Cellular Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran.

### Abstract

There are different kinds of disease and medical problems which is threatening human healths. Nowadays, there are diverse types of drugs for treatment of disease which is preparing by microorganisms. Among these biological active compounds with microbial origin application of this material are so interesting due to their new, immune, biodegradability, environmental friendly and without any side effects. Therefore, in this paper we tried to explain the structure of two chromogenic pigments including: violacein and prodigiosin, then explain their effects. Violacein and prodigiosin are secondary metabolite of bacteria which is presenting with purple and red color. Producing organisms are including: *Serratia*, *Chromobacterium* and *Jentnobacterium*. Both pigments are water soluble and generally producing by gram negative bacteria which is occupying different habitat including: deep seas, rivers, agricultural soils and forests, polar ice regions and Alp mountain. These pigments have different effects including: antimicrobial, antifungal, antiprotozoal, anticancer and immune properties. Although assess to bacteria with capability to produce pigments are so easy and there are different kinds of extraction of pigments, hence based on immune property of these pigments we could use them in many aspects and future research.

**Keywords:** Chromogenic bacteria, Pigment, Violacein, Prodigiosin.

### مقدمه

انواع گسترده‌ای از بیماری‌ها و مشکلات پزشکی وجود دارند که خطری جدی برای سلامتی انسان‌ها محسوب می‌شوند. از دیرباز دانشمندان به دنبال ترکیبات طبیعی حاصل از جانوران، گیاهان و دیگر منابع بوده‌اند تا به درمان این آسیب‌ها بپردازند. بسیاری از داروهای موجود جهت درمان بیماری‌های مربوط به انسان‌ها از محصولات طبیعی که بیشتر آنها از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند، بدست می‌آیند. میکروارگانیسم‌ها منبع فراوانی از ترکیبات فعال زیستی جدید هستند، زیرا برخلاف ارگانیسم‌های دیگر، از منابع تجدیدپذیر بدست می‌آیند و باعث تولید با بازده بالقوه بیشتر می‌شوند. در میان ترکیبات فعال زیستی با منشأ میکروبی، رنگدانه‌های طبیعی به دلیل علاقه روزافزون به تولید محصولات جدید ایمن، تجزیه پذیر، سازگار با محیط زیست و بدون عوارض جانبی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. باکتری‌ها پر تعدادترین میکروارگانیسم‌های قابل کشت خاک می‌باشند. برخی می‌توانند سال‌ها ساکن خاک بوده و منتظر شرایط مناسب باشند. برخی دیگر می‌توانند مستقیماً نیتروژن را از محیط یا از تجزیه مواد سمی دریافت نمایند. معمولاً تصور می‌شود که باکتری‌ها، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند که در برخی موارد نیز درست است، اما بسیاری از آنها بی‌ضرر بوده و حتی برای بشر مفید نیز هستند. محققان بر روی جنبه مثبت این ارگانیسم‌ها تمرکز کرده و توانایی‌های شگفت‌انگیزی را در آنها کشف نموده‌اند که در نوع خود بسیار جالب هستند. تولید رنگدانه توسط باکتری‌ها از همان آغاز باکتری‌شناسی مورد توجه زیادی قرار گرفته است که این می‌تواند به این دلیل باشد که این ویژگی جزو آسان‌ترین ویژگی‌های میکروبی مشاهده شده در آنها می‌باشد. اهمیت حفاظت از محیط زیست و همچنین ایمنی انسان علاقه زیادی را برای به دست آوردن رنگ‌ها از منابع طبیعی به دلیل ماهیت غیر سرطان‌زا بودن، زیست تخریب پذیر بودن و غیر سمی بودن آنها ایجاد کرده است (۱).

رنگدانه‌های طبیعی گروه خاصی از پیگمان‌ها هستند که به عنوان متابولیت ثانویه توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌گردند. ترکیب رنگدانه‌ها به طور قابل توجهی متفاوت بوده و این تفاوت به عواملی همچون نوع مواد غذایی در دسترس میکروارگانیسم و همچنین شرایط و عوامل محیطی وابسته است. رنگدانه‌ها از نقش مهمی در فرآیندهای مولکولی و فیزیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها از جمله فتوسنتز، بقا در مقابل آسیب اکسیداتیو و مقاومت به اشعه UV برخوردار هستند (۲). باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و جلبک‌ها

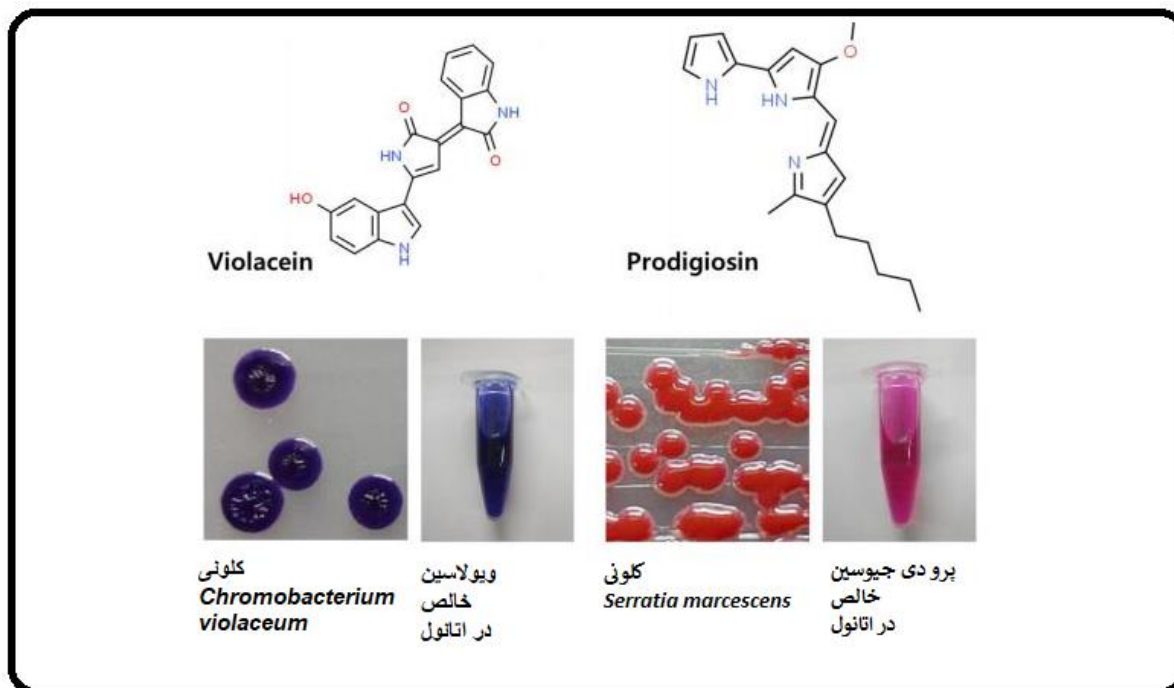
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

تعدادی از میکروبها هستند که معمولا رنگهای طبیعی تولید می کنند. در میان باکتریها، تولید رنگدانه بسیار متغیر بوده و معمولا در اکتینوباکترها وجود دارد. جنسهای مختلفی مانند استرپتومایسس، نوکاردیا، ترمومونوسپورا، میکروبیوسپورا، استرپتوسپورانژیوم، رودوکوکوس و کیتاساتوسپورا طیف وسیعی از رنگدانهها را تولید می کنند. این رنگدانههای طبیعی، اکنون در صنایع مختلفی مانند نساجی، آرایشی و بهداشتی، دارویی و غذایی استفاده می شوند. گروههایی که توسط این میکروارگانیسمها سنتز می شوند شامل: کاروتنوئیدها، فلاوینها، فنازینها، ویولاسئینها، ملانینها، ایندیگوئیدینها و غیره هستند. این رنگدانهها برای به وجود آوردن توانایی ذاتی میکروارگانیسمها جهت سازگاری با شرایط محیطی سخت و انجام عملکردهای سلولی خاص (به عنوان مثال، فتوسنتز در میکروارگانیسمهای فتوسنتزی) ضروری هستند. به طور کلی می توان بیان نمود که رنگدانههای تولید شده از میکروارگانیسمها دارای خواص درمانی از جمله ضد تومور، ضد میکروبی، ضد ویروس، ضد قارچ، فعالیت هلی ضدانگلی، آنتی اکسیدانی و آنتی بیوتیکی و غیره هستند (۳). بنابراین تحقیق حاضر به ویژگی دو پیگمان مهم باکتریایی و خصوصیات آنها می پردازد.

### ویولاسئین و پرودیجوسین

ویولاسئین و پرودیجوسین هر دو متابولیت ثانویه رنگی (شکل ۱) باکتریایی هستند که این ویژگی جداسازی و شناسایی سوبه های باکتریایی که قادر به تولید آنها می باشند را ساده تر می نماید. این پیگمان توسط برخی از سوبه های باکتریایی (۴)، از جمله سراشیا، کروموباکتریوم (۵) و جنتینوباکتریوم (۶) و در مناطق وسیعی از محیط زیست شامل: دریاها، عمیق (۷)، رودخانه ها (۵)، خاک های محیط کشاورزی و جنگل (۹، ۸، ۴)، در مناطق یخبندان قطبی و آلپ (۱۱، ۱۰، ۳) و حتی روی برگ های شیدر سفید (۱۲) تولید می شود.



شکل ۱- ویولاسئین و پرودیجوسین، ساختار شیمیایی و فوتوپیک های رنگی سوبه های باکتریایی (۱۳).

رنگ پرودیجوسین قرمز براق است و توسط تعدادی از سوبه های باکتریایی متفاوت گرم مثبت و گرم منفی، از جمله سراشیا مارسسنس (۱۴) و استرپتوکوکوس تولید می شود.



### ویولاسئین و پرودیجوسین به عنوان ضد میکروب ها

فعالیت های ضد میکروبی این دو ترکیب، به ویژه ویولاسئین به صورت گسترده و همه جانبه مورد مطالعه قرار گرفته است (جدول ۱ و ۲). برخی از تحقیقات بیانگر آن است که تعداد بسیار کمی از باکتری های گرم منفی نسبت به ویولاسئین حساس هستند (۱۸، ۱۷، ۱۵). در مقابل، فعالیت ویولاسئین در برابر بسیاری از سویه های مختلف باکتریایی گرم مثبت (جدول ۱)، از جمله استرپتوکوکوس ها، باسیلوس ها و استافیلوکوکوس ها (۱۶)، به خوبی ثابت شده است. با این وجود، طیف آن تمام سویه های گرم مثبت را در بر نمی گیرد. در واقع بسیاری از مطالعات اخیر استفاده از ویولاسئین در برابر سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک استافیلوکوکوس آرنوس را نشان داده اند (۴، ۱۷-۱۹). برای مثال، حداقل غلظت بازدارنده برای چندین سویه استافیلوکوکوس آرنوس جدا شده از التهاب پستان در گاو بین ۶/۲۵ و ۲۵/۰۰  $\mu\text{M}$  بوده است. هرچند که این سویه ها مقاومت به پنی سیلین، آمپی سیلین و یا اریترومایسین را به صورت حد واسطه نشان داده اند، اما ویولاسئین می تواند به صورت هم افزایی با پنی سیلین عمل می نماید (۱۸).

جدول ۱- فعالیت های آنتی بیوتیکی پرودیجوسین علیه میکروارگانیسم ها

منبع	شرح	میکروب
باکتری		
(۲۰)	-	<i>Bacillus cereus</i>
(۲۱)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
(۲۲-۲۰)	-	<i>Escherichia coli</i>
(۲۱)	پاتوژن انسانی	<i>Klebsiella aerogenes</i>
(۲۱)	پاتوژن انسانی	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
(۲۳-۲۰)	پاتوژن انسانی	<i>Staphylococcus aureus</i>
(۲۳)	پاتوژن انسانی	<i>Streptococcus pyogenes</i>
فارچ		
(۲۴)	پاتوژن دوزیستان	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
(۲۴)	پاتوژن دوزیستان	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>
(۲۵)	پاتوژن گیاهی	<i>Botrytis cinerea</i>
(۲۶)	پاتوژن گیاهی	<i>Fusarium oxysporum</i>
(۲۷)	پاتوژن انسانی	<i>Mucor irregularis</i>
(۲۸)	پاتوژن گیاهی	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
(۲۶)	پاتوژن گیاهی	<i>Phytophthora infestans</i>
(۲۶)	پاتوژن گیاهی	<i>Pythium myriotylum</i>
(۲۶، ۱۶)	پاتوژن گیاهی	<i>Rhizoctonia solani</i>
(۲۶)	پاتوژن گیاهی	<i>Sclerotium rolfsii</i>
ویروس		
(۲۹)	هرپس	<i>HSV-1</i>
پروتوزوا		
(۳۱، ۳۰)	مالاریا	<i>Plasmodium falciparum</i>
(۳۲)	اوگلنای انگلی	<i>Trypanosoma cruzi</i>
حشره		
(۳۳)	پشه تب زرد	<i>Aedes aegypti</i>
(۳۳)	عامل مالاریا	<i>Anopheles stephensi</i>

برای هر دو ترکیب، فعالیت های ضد میکروبی آنها ریشه در ماهیت چربی دوستی آنها دارد. پرودیجوسین و ویولاسئین وقتی که به یک محیط کشت باکتریایی عرضه شدند به سرعت در غشاهای میکروبی نفوذ نموده و اختلال یکپارچگی آنها، منجر به نشت پروتئین و ATP می گردد (۳۴-۳۶). در مقابل ویولاسئین، پرودیجوسین در غشا دولابه لیپیدی به مراتب عمیق تر نفوذ کرده و دلیلی است

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

که توضیح می دهد چرا این ترکیب در برابر بعضی سویه های گرم منفی تاثیر گذار است. این امر شانس نفوذ پرودیجیوسین را به غشا خارجی و ورود به سیتوپلاسم غشاء افزایش می دهد.

جدول ۲- فعالیت آنتی بیوتیکی ویولاستین علیه میکروارگانیسم ها

منابع	شرح	میکروب	منابع	شرح	میکروب
باکتری			ادامه قارچ		
(۴۷)	پاتوژن گیاهی تحت تاثیر دنوکسی ویولاستین	<i>Gibberella zeae</i>	(۳۷)	-	<i>Bacillus cereus</i>
(۴۷)	پاتوژن گیاهی تحت تاثیر دنوکسی ویولاستین	<i>Magnaporthe grisea</i>	(۳۸)	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
(۴۰)	پاتوژن گیاهی	<i>Penicillium expansum</i>	(۳۸)	پاتوژن گیاهی	<i>Bacillus megaterium</i>
(۴۷)	پاتوژن گیاهی	<i>Phytophthora capsici</i>	(۳۸)	باکتری های خاک معمولی	<i>Bacillus subtilis</i>
(۴۷،۴۰)	پاتوژن گیاهی تحت تاثیر دنوکسی ویولاستین	<i>Rhizoctonia solani</i>	(۳۹،۳۸)	پاتوژن انسانی	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
(۴۵)	پاتوژن گیاهی	<i>Rosellinia necatrix</i>	(۳۹،۳۷)	پاتوژن انسانی	<i>Staphylococcus aureus</i>
(۴۷)	پاتوژن گیاهی	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	(۳۷)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
(۴۰)	قارچ پای ورزشکاران	<i>Trichophyton rubrum</i>	قارچ		
(۴۷)	-	<i>Ustilaginoidea oryzae</i>	(۴۰)	-	<i>Aspergillus flavus</i>
(۴۷)	پاتوژن گیاهی	<i>Verticillium dahlia</i>	(۴۴-۴۱)	قارچ کیتريد دوزیستان	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
ویروس			(۴۴،۴۲)	قارچ کیتريد دوزیستان	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>
(۴۸)	هریس	<i>HSV-1</i>	(۴۵)	-	<i>Bipolaris leersia</i>
(۴۸)	پولیومیلیت	<i>Poliovirus type 2</i>	(۴۰)	مخمر	<i>Candida albicans</i>
(۴۸)	رتروویروس	<i>Simian rotavirus SA11</i>	(۴۰)	مخمر	<i>Candida tropicalis</i>
نماتد			(۴۶)	پاتوژن گیاهی	<i>Colletotrichum acutatum</i>
(۴۹)	نماتد پژمردگی کاج	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	(۴۵)	پاتوژن گیاهی	<i>Colletotrichum dematium</i>
(۵۱،۵۰)	-	<i>Caenorhabditis elegans</i>	(۴۷)	پاتوژن گیاهی	<i>Colletotrichum glycines</i>
پروتوزوا			(۴۷)	پاتوژن گیاهی تحت تاثیر دنوکسی ویولاستین	<i>Colletotrichum orbiculare</i>
(۸)	آمیب	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	(۴۰)	-	<i>Cryptococcus gastricus</i>
(۵۲)	انگل لیشمانیا	<i>Leishmania amazonensis</i>	(۴۵)	-	<i>Diaporthe nomurai</i>
(۵۳)	مالاریا	<i>Plasmodium chabaudi</i>	(۴۵)	پاتوژن گیاهی	<i>Fusarium lateritium</i>
(۵۳-۵۴)	مالاریا	<i>Plasmodium falciparum</i>	(۴۷،۴۰)	پاتوژن گیاهی	<i>Fusarium oxysporum</i>
(۸)	-	<i>Rhynchomonas nasuta</i>	(۴۵)	پاتوژن گیاهی	<i>Fusarium solani</i>
(۸)	-	<i>Tetrahymena sp</i>			
(۵۵)	انگل انسانی	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>			
(۵۴)	انگل انسانی	<i>Trypanosoma cruzi</i>			
حشره					
(۵۶)	مگس میوه	<i>Drosophila melanogaster</i>			
(۵۷)	حشرات آفات گیاهی	<i>Spodoptera litura</i>			

بر همین اساس معظمیان و همکاران در سال (۲۰۱۸) در پژوهشی به جداسازی رنگدانه های باکتریایی پرداخته و پس از شناسایی رنگدانه ها، فعالیت ضدباکتریایی آنها را علیه ایزوله های بالینی اسپینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو در مراکز سوختگی بررسی کردند.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

نتایج نشان داد که عصاره رنگدانه قرمز سراشیا مارسنس (پرودیجیوسین) مناسب‌ترین اثر بازدارندگی را بر روی سوبه‌های مورد مطالعه اسینتوباکتر بومانی داشت و حداقل غلظت باکتری کشی<sup>۴۱</sup> (MBC) و حداقل غلظت بازدارنده<sup>۴۲</sup> (MIC) مقدار رنگدانه استخراج شده از باکتری فوق به ترتیب بین ۵۰۰۰-۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۲۵۰۰-۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید (۵۸).

پس از آن در سال ۲۰۲۰ گوهیل و همکارانش<sup>۴۳</sup> از پرودیجیوسین به عنوان یک رنگدانه باکتریایی با خواص بیولوژیکی فوق‌العاده، در ترکیب با شش آنتی‌بیوتیک برای بررسی اثر آن بر سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و کروموباکتریوم ویولاسئوم استفاده نموده و MIC و MBC پرودیجیوسین در برابر ارگانیس‌های مورد آزمایش را تعیین کردند. همچنین در تحقیق فوق پرودیجیوسین با ترکیبات مختلف آنتی‌بیوتیک با هدف کاهش مقاومت ضد میکروبی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و MIC و MBC حاصل از پرودیجیوسین در محدوده ۱۶-۴ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید که کمتر از اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بود (۵۹).

بدنبال آن آناموریم و همکاران<sup>۴۴</sup> در سال ۲۰۲۲ یک بیوفیلیم سلولز باکتریایی را به عنوان یک ماده فعال زیستی تهیه کردند. این بیوفیلیم، با استفاده از کنسرسیون میکروبی باکتری‌ها و گونه‌های مخمر بدست آمده و با رنگدانه باکتریایی پرودیجیوسین، تولید شده از سراشیا پلیموتیکا و رنگدانه نوع فلکسیروبین از سوبه‌های کریزوباکتریوم شیگنسی عاملدار شدند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که نمونه‌های بیوفیلیم باکتریایی که با پرودیجیوسین عامل‌دار شده بودند، فعالیت ضدباکتریایی داشته و توانستند رشد باکتری‌های بیماری‌زا استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا را مهار کنند (۶۰).

### پرودیجیوسین و ویولاسئین به عنوان ضد قارچ

ویولاسئین و پرودیجیوسین علاوه بر کاربرد آنها برای پاتوژن‌های باکتریایی، به طور گسترده و مؤثری علیه بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زا نیز موثر می‌باشند (جدول ۱ و ۲). ویولاسئین بر قارچ‌هایی که پاتوژن گیاهی می‌باشند مانند *Rhizoctonia solani* (۴۳، ۳۷) و *Batrachochytrium dendrobatidis* (۳۹، ۳۸) موثر است. همچنین گزارش‌های متعددی بر فعالیت پرودیجیوسین علیه گونه‌های مختلف قارچی ثبت شده است (۲۳، ۶۱-۶۴)، بطوریکه رنگدانه مذکور با مکانیسم آسیب‌رسانی به غشای سلول هدف توانایی از بین بردن ارگانیس‌م را داراست (۶۵).

### نماتدکش و ضد تک یاخته

یکی از مزایای ویولاسئین و پرودیجیوسین برای باکتری‌های این است که مزیت بقا در برابر رقبا و شکارچیان را ایجاد می‌نماید. نماتدها باعث ایجاد بیماری‌های مضر برای انسان و کشاورزی در سراسر جهان شده‌اند. بیماری پژمردگی کاج، یک اپیدمی جدی است که جنگل‌های کاج را در سطح جهان، به ویژه در شرق آسیا ویران کرده است. این بیماری توسط نماتی به نام *Bursaphelenchus xylophilus* ایجاد می‌شود که معروف به نماتد پژمردگی کاج می‌باشد. در این پروسه به سیستم انتقال آب درختان کاج، ارگانیس‌م حمله نموده و باعث پژمردگی و مرگ آنها می‌شود (۶۵). برای کنترل این روند، معمولاً از نماتدکش‌های گران‌قیمت استفاده می‌شود که برای مبارزه با نماتد پژمردگی کاج با موفقیت کمی روبرو بوده است. اخیراً مشتقی از *violacein5'*-O-glucoside ساخته شده است که با بیان گلیکوزیل ترانسفراز (YjiC) در سوبه‌های *Bacillus* و *E. coli* (۴۷)، می‌تواند حلالیت ویولاسئین را در آب افزایش داده و به عنوان یک درمان موثر در برابر نماتد چوب کاج باشد (۴۷). ویولاسئین همچنین بر

<sup>41</sup> Minimum bactericidal concentration

<sup>42</sup> Minimum inhibitory concentration

<sup>43</sup> Gohil et al.

<sup>44</sup> Amorim et al.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

مدل ژنتیکی ارگانسیم نمادی به نام *C. elegans* تأثیر منفی داشته چنانکه این پیگمان رشد *C. elegans* را در مراحل اولیه لارو متوقف می نماید (۴۶).

### خواص ضد سرطان

یکی دیگر از ویژگی های شناخته شده این دو ترکیب، فعالیت ضد توموری آنها است. سرطان دومین عامل اصلی مرگ و میر در سطح جهان است (۶۶) و اگرچه درمان های اخیر برای برخی از سرطان ها توسعه یافته است، اما همچنان و مانند همیشه ویرانگر است. تحقیقات انجام شده در آزمایشگاه ها، بیانگر آن است که پرودییوسین رده های سلولی سرطانی انسان را با فرآیندی به نام مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپوپتوز از بین می برد. در واقع پرودییوسین می تواند آپوپتوز را در سلول های سرطانی خونساز (۶۷)، سلول های سرطان ریه انسان (۶۸)، B-cell و T-cell در لوسمی لنفوسیتی مزمن (۶۹)، سلول های سرطان معده (۷۰)، سلول های سرطان سینه مقاوم به چند دارو (۷۱)، سلول های سرطانی روده بزرگ (۷۲) و سلول های سرطانی مولتی فرم گلیوبلاستوما (۷۳) القا کند (جدول ۳).

جدول ۳- تأثیر پرودییوسین بر رده های سلولی سرطانی

منابع	شرح	رده سلولی
(۷۴)	سرطان ریه انسان با متاستاتیک بالا	95-D
(۶۹)	لوسمی لنفوسیتی مزمن	B-CLL
(۷۲)	سرطان روده بزرگ	DLD-1
(۶۸)	سلول کوچک سرطان ریه	GLC4
(۷۵)	سرطان ریه	A549
(۷۶،۷۲)	سرطان روده بزرگ	HCT116
(۷۶،۷۲)	سرطان روده بزرگ	SW480
(۷۲)	سرطان روده بزرگ	SW620
(۷۰)	سرطان معده	HGT-1
(۷۷،۶۷)	سرطان خون ساز	HL-60
(۷۸،۶۷)	سرطان خون ساز	Jurkat
(۷۳)	سرطان گلیوبلاستوم	U87MG
(۷۳)	سرطان گلیوبلاستوم	GBM8401
(۷۸،۷۱)	سرطان پستان	MCF-7
(۷۹،۷۱)	سرطان پستان	MDA-MB-231
(۶۷)	سرطان خون ساز	NSO
(۶۷)	سرطان خون ساز	Ramos

علی رغم شواهد قوی مبنی بر اینکه پرودییوسین می تواند علیه انواع مختلف سلول های سرطانی کار کند، چگونگی هدف قرار دادن مرگ سلول های سرطانی این ترکیب بوسیله آپوپتوز هنوز مشخص نیست. پرودییوسین می تواند با DNA تعامل داشته و باعث تخریب آن شود (۷۸،۷۷) و از یک مکانیسم احتمالی مرگ سلولی پشتیبانی کند. پرودییوسین همچنین انتقال همزمان پروتون و یون کلرید را تسهیل می کند و می تواند بر اسیدی شدن بخش های سلولی تأثیر گذاشته (۸۰، ۸۱) و از مکانیسم جایگزین آپوپتوز سلول سرطانی پشتیبانی کند (۷۵). در نهایت، پرودییوسین ها همچنین فعالیت پروتئین فسفاتاز را در شرایط آزمایشگاهی مهار می کنند (۸۳، ۸۲)، که مکانیسم احتمالی دیگری را نشان می دهد مبنی بر آنکه چگونه این ترکیب ممکن است رشد سلول های سرطانی را مهار کند. مطالعات جدیدتر نشان داده اند که پرودییوسین با تأثیر بر فرآیند سلولی به نام اتوفاژی باعث مرگ سلولی می شود. فرآیند اتوفاژی باعث تجمع وزیکول های خاصی در سلول به نام اتوفاگوزوم می شود که می توانند اندامک ها یا پروتئین های آسیب دیده را تجزیه کنند (۸۴). اتوفاژی همچنین هدفی برای درمان سرطان بوده (۸۵)، به ویژه به دلیل این واقعیت که این فرآیند سلولی، آپوپتوز را در سرطان ها نیز تنظیم می کند (۸۶). در یک مطالعه آزمایشگاهی اخیر، درمان پرودییوسین باعث مرگ

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما و کاهش رشد نوروسفر شد، که نشانگری مرتبط با افزایش مرگ و میر در بیماران گلیوبلاستوما می باشد (۷۳). محققین همچنین نشان دادند که مرگ آپوپتوز سلول‌های گلیوبلاستوما با درمان پروجیوسین به دلیل افزایش اتوفازی در سلول‌های سرطانی است. از طرف دیگر، تحقیقات بیانگر آن است که سلول‌های سرطانی روده بزرگ زمانیکه با ماده شیمیایی 5-fluorouracil (یک شیمی درمانی رایج برای سرطان روده بزرگ) تحت درمان قرار گرفتند، در حضور پرودیجیوسین آپوپتوز را افزایش می دهند (۷۶). جالب توجه این است که پرودیجیوسین جریان اتوفازیک را مختل و مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی در پاسخ به 5-fluorouracil افزایش می دهد. بر همین اساس، درمان ترکیبی که از دو یا چند عامل درمانی به عنوان درمان سرطان استفاده می کند، در سال‌های اخیر به یک استراتژی اصلی در درمان سرطان تبدیل شده است (۸۷). بنابراین استفاده از پرودیجیوسین در ترکیب با سایر درمان‌های سرطان یک استراتژی امیدوارکننده است که در حال حاضر در حال بررسی است. مشابه پرودیجیوسین، ویولاسئین نیز یک متابولیت باکتریایی ضد تومور امیدوارکننده است (جدول ۴).

جدول ۴- لیست رده های سلولی ارزیابی شده با ویولاسئین

منابع	شرح	رده سلولی
(۹۲)	ملانوم اوونال	۹۲.۱
(۹۴،۹۳)	سرطان ریه	A549
(۹۳)	سرطان پوست	A431
(۹۶،۹۵)	آدنوکارسینوم ناهمگن پوششی روده بزرگ	Caco-2
(۹۸)	سلول‌های سرطانی سر و گردن	CAL-27
(۸۸)	سلول‌های تخمدان همستر چینی	CHO-K1
(۹۶)	آدنوکارسینوم روده بزرگ	DLD1
(۹۸)	موش ارلیش تومور آسیت	EAT
(۹۷)	سلول‌های سرطانی سر و گردن	FaDu
(۳۹)	کلیه جنین	FRhK-4
(۹۶،۵۳)	آدنوکارسینوم روده بزرگ	HCT116
(۸۸،۵۳)	سلول هلا، سرطان دهانه رحم	HeLa
(۹۹)	مشتق از هلا	Hep2
(۹۰)	لوسمی پرومیلوسیتیک	HL60
(۹۳)	سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن	HN5
(۹۵،۹۳)	آدنوکارسینوم روده بزرگ	HT29
(۹۰)	لنفوم	K562
(۱۰۰)	سرطان روده بزرگ	KM12
(۹۹)	سلول‌های پوششی کلیه میمون	MA104
(۹۴،۹۳)	سرطان پستان	MCF7
(۱۰۰)	لوسمی لنفوبلاستی حاد	MOLT-4
(۸۸)	فیبروبلاست ریه جنین	MRC-5
(۱۰۰)	سرطان ریه سلولی غیر کوچک	NCI-H460
(۹۲)	ملانوم مشیمیه	OCM-1
(۹۳)	سرطان پروستات	PC3
(۹۷)	سلول‌های سرطانی سر و گردن	SALTO
(۹۷)	سلول‌های سرطانی سر و گردن	SCC-15
(۸۹)	ملانوم متاستاتیک جهش یافته RAS	SKMEL-103
(۸۹)	ملانوم متاستاتیک جهش یافته RAS	SKMEL-28
(۹۶)	آدنوکارسینوم روده بزرگ	SW480
(۱۰۱)	اریترولوسمی	TF1
(۹۴)	گلیوبلاستوما	U87
(۹۰)	لوسمی میلوژن مزمن	U937
(۱۰۰)	رده سلولی فیبروبلاست مانند همستر چینی از بافت ریه	V79
(۹۹)	کلیه میمون	Vero

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

همانند پرودیجیوسین، ویولاسئین منجر به اختلال عملکرد در میتوکندری می‌شود که در اثر هیپرپلازیزاسیون غشای میتوکندری در سلول‌های MRC-5 و HeLa ایجاد می‌شود (۸۸). همچنین در رده‌های سلولی ملانوم متاستاتیک جهش یافته با RAS تأیید شد که فرآیند اتوفاژی که برای رفع آسیب میتوکندری به کار می‌رود به دلیل مهار AKT و AXL مختل می‌شود (۸۹). بدنال آن فرآیندهای بعدی مسیر آپوپتوز عمومی را بدنال کرده که منجر به فسفوریلاسیون MAP کیناز p38، فعال شدن مسیر NFκB و فعال شدن کاسپازها در هنگام درمان با ۱ میکرومولار ویولاسئین در HL60 شد (۹۰). جالب توجه این است که یک مطالعه آزمایشگاهی نشان داد ویولاسئین فعالیت PKA و PKC را مهار می‌نماید (۹۱). در حالی که نتایج سایر اهداف احتمالی را رد نمی‌کند و اینکه آیا این امر منجر به مرگ سلول‌های سرطانی در داخل بدن می‌شود یا خیر، در حال بررسی است. این امر نشان می‌دهد که PKA و PKC می‌توانند هدف مستقیم ویولاسئین باشند. این توالی مکانیسم‌های مرگ سلولی ناشی از آسیب میتوکندریایی بدلیل استفاده از ویولاسئین و شرایط متابولیسم انرژی سلول‌ها است.

سایر مطالعات بیانگر آن است که تجویز خوراکی ویولاسئین به بهبود آسیب معده ناشی از NSAID کمک می‌نماید و منجر به کاهش سیتوکین‌های التهابی، به ویژه TNF-α و افزایش فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد کبدی (HGF) می‌شود (۱۰۲). به عبارت دیگر، ویولاسئین به صورت خوراکی در مهار التهاب، حفظ تعادل سیتوکین‌ها نقش دارد و در عین حال مانع آپوپتوز، رگزایی گردیده و باعث بهبودی می‌شود.

### فعالیت‌های تعدیل‌کننده ایمنی پرودیجیوسین و ویولاسئین

پرودیجیوسین همچنین به داشتن اثرات سرکوب‌کننده سیستم ایمنی شناخته شده است. به طور خاص، این ترکیب اثرات سرکوب‌کننده‌ای بر تکثیر T-cell نشان می‌دهد، در حالی که تأثیری در B-cell ندارد (۱۰۳). مکانیسم اثر آن مهار بیان زنجیره گیرنده اینترلوکین ۲ (IL-2Rα) است که یکی از عوامل مهم فعال‌سازی T-cell است (۱۰۴). در مطالعه دیگری، نویسندگان یک مولکول آنالوگ پرودیجیوسین به نام PNU156804 را توسعه دادند که هم فعال‌سازی T-cell و هم B-cell را سرکوب می‌نماید (۱۰۵). این ترکیب همچنین از طریق مهار سیگنال‌دهی وابسته به IL-2 عمل می‌کند، یعنی نه با جلوگیری از القای IL-2Rα بلکه با جلوگیری از فعال شدن AP-1 و NF-κB. پرودیجیوسین همچنین هنگامی که با سیکلوسپورین A تجویز می‌شود، از طریق مسیرهای مختلف برای سرکوب فعال‌سازی T-cell فعالیت می‌نماید (۱۰۶)، در حالی که مطالعه دیگری نشان داد که فعالیت ماکروفاژ و NK-cell و تکثیر سلول‌های طحال را مهار می‌کند (۱۰۷). همچنین نشان داده شد که ویولاسئین عملکرد تعدیل‌کننده ایمنی دارد و التهاب را مهار می‌کند. به عنوان مثال، این ترکیب واکنش‌های ضد تب، ضددرد و تعدیل‌کننده ایمنی در هنگام تجویز خوراکی به موش‌ها داشت (۱۰۸).

### پیگمان تولید شده توسط سویه‌های باکتریایی

همانگونه که در بالا گفته شد، طیف گسترده‌ای از سویه‌های باکتریایی طبیعی قادر به سنتز ویولاسئین و پرودیجیوسین هستند. بنابراین جای تعجب نیست که محققان به دنبال سویه‌های مختلفی برای تولید و کاربرد این دو ترکیب در مقیاس آزمایشگاهی بوده‌اند. به عنوان مثال گونه سراسیا *S. marcescens FZSF02*، از خاک منطقه فوزو چین جدا شده و قادر به تولید پرودیجیوسین در مقادیر کافی است (۱۰۹) و یا سویه طبیعی دیگر که از ملخ جدا شده و *S. marcescens MO-1* نام دارد (۱۱۰) و این در حالی است که *S. marcescens ucp 1459* و *S. marcescens utm* به ترتیب از خاک نیمه خشک در برزیل و یک حوضچه اکسیداسیون در مالزی جداسازی شده‌اند (۱۱۱، ۱۱۲). همچنین باکتری دیگری به نام *S. rubidaea* نیز قادر به تولید پرودیجیوسین می‌باشد که در ابتدا از یک نارگیل فاسد جداسازی شد و این کشف در هنگامی بود که رنگ داخل نارگیل از سفید به صورتی تغییر شکل داده بود (۱۱۳). به همین ترتیب، تولید ویولاسئین نیز در گونه‌های طبیعی مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. به طور مثال، تولید این ترکیب در *C. violaceum 3496* با اضافه شدن تریپتون و عصاره مخمر حدود ۲.۵ برابر افزایش یافت، اما

عملکرد آن با گلوکز کاهش یافت (۱۱۴) و یا در مطالعه دیگری بهینه‌سازی در *Duganella sp. B2* نشان داد که تریپتوفان، عصاره گوشت گاو و نیترات پتاسیم همه عوامل عمده‌ای هستند که بر عملکرد ویولاسئین تاثیر می‌گذارند (۱۱۵). با توجه به گزارش ناکمورا و همکارانش<sup>۴۵</sup> در سال ۲۰۰۳ برخی از باکتری‌های تولید کننده ویولاسئین نیز روانگردان هستند مانند سویه *rt102*، که مربوط به *Janthinobacterium lividum* است (۱۶). نویسندگان دریافتند که شرایطی که منجر به سطح تولید مطلوب می‌شود شامل: pH کمی اسیدی ۶، دمای رشد ۲۰ درجه سانتیگراد و میزان ۱ میلی گرم در لیتر اکسیژن محلول است. ایده استفاده از آمپی سیلین و گلیسرول برای افزایش عملکرد ویولاسئین، در واقع بیش از یک دهه قبل در مطالعه ایی توسط پانتازالا و همکارانش<sup>۴۶</sup> در سال ۲۰۰۷ مطرح گردید. جایی که گلیسرول سطح تولید ویولاسئین را تقریباً ۱۲ برابر افزایش داده، در حالی که آمپی سیلین منجر به افزایش ۳ برابری آن می‌شد (۱۱۶).

#### References:

1. Nahid N, Bahadur N, Razmi N. The role of pigments extracted from bacteria isolated from the environment on antibiotic resistant microorganisms isolated from diabetic patients, Medical Sciences Quarterly 2017;28(2):104-116. [In Persian].
2. Moazzamian A, Emami A. Antimicrobial effect of the pigment of *Cerasia marcens* bacteria on multi-antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates collected from burn wounds. Armaghane Danesh magazine. 2017; 23(2) 515-499. [In Persian].
3. Agarwal H, Bajpai S, Mishra A, Kohli I, Varma A, Fouillaud M, Dufossé L, Joshi NC. Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechnology and Pharmacological Applications. Microorganisms. 2023;11(3):614.
4. Choi SY, Kim S, Lyuck S, Kim SB, Mitchell RJ. High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. Sci Rep. 2015;5:15598.
5. Moss MO, Ryall C, Logan NA. Classification and Characterization of Chromobacteria from a Lowland River. J Gen Microbiol. 1978;105(Mar):11-21.
6. Osullivan J, Mccullough J, Johnson JH, Bonner DP, Clark JC, Dean L, Trejo WH. Janthinocin-a, Janthinocin-B and Janthinocin-C, Novel Peptide Lactone Antibiotics Produced by *Janthinobacterium-Lividum* .1. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physicochemical and Biological Characterization. J Antibiot. 1990;43(8):913-9.
7. Yada S, Wang Y, Zou Y, Nagasaki K, Hosokawa K, Osaka I, Arakawa R, Enomoto K. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. Mar Biotechnol. 2008;10(2):128-32.
8. Aranda S, Montes-Borrego M, Landa BB. Purple-Pigmented Violacein-Producing *Duganella* spp. Inhabit the Rhizosphere of Wild and Cultivated Olives in Southern Spain. Microb Ecol. 2011;62(2):446-59.

<sup>45</sup> Nakamura et al.

<sup>46</sup> Pantanella et al.

9. Li WJ, Zhang YQ, Park DJ, Li CT, Xu LH, Kim CJ, Jiang CL. *Duganella violaceinigra* sp nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Micr.* 2004;54:1811-4.
10. Baricz A, Teban A, Chiriac CM, Szekeres E, Farkas A, Nica M, Dascălu A, Oprișan C, Lavin P, Coman C. Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 15272.
11. Kim SJ, Shin SC, Hong SG, Lee YM, Lee H, Lee J, Choi IG, Park H. Genome Sequence of *Janthinobacterium* sp Strain PAMC 25724, Isolated from Alpine Glacier Cryoconite. *J Bacteriol.* 2012;194(8):2096.
12. Kampf P, Wellner S, Lohse K, Martin K, Lodders N. *Duganella phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Trifolium repens* and proposal to reclassify *Duganella violaceinigra* into a novel genus as *Pseudoduganella violceinigra* gen. nov., comb. nov. (vol 35, pg 19, 2012). *Syst Appl Microbiol.* 2012;35(4):278.
13. Choi SY, Lim S, Yoon KH, Lee JI, Mitchell RJ. Biotechnological activities and applications of bacterial pigments violacein and prodigiosin. *Journal of Biological Engineering.* 2021; 15(1):1-6.
14. Williams RP. Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol.* 1973; 25(3):396-402.
15. Im H, Choi SY, Son S, Mitchell RJ. Combined Application of Bacterial Predation and Violacein to Kill Polymicrobial Pathogenic Communities. *Sci Rep.* 2017;7(1):14415.
16. Nakamura Y, Asada C, Sawada T. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. *Biotechnol Bioproc E.* 2003;8(1):37-40.
17. Aruldass CA, Rubiyatno VCK, Ahmad WA. Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. *Rsc Adv.* 2015; 5(64):51524-36.
18. Cazoto LL, Martins D, Ribeiro MG, Duran N, Nakazato G. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis. *J Antibiot.* 2011; 64(5):395-7.
19. Martins D, Costa FTM, Brocchi M, Duran N. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. *J Nanopart Res.* 2011; 13(1):355-63.
20. John Jimtha C, Jishma P, Sreelekha S, Chithra S, Radhakrishnan EK. Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia* sp. *Rhizosphere.* 2017;3:105-8.
21. Gutiérrez-Román MI, Holguín-Meléndez F, Dunn MF, Guillén-Navarro K, Huerta-Palacios G. Antifungal activity of *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 purified chitinolytic enzymes and prodigiosin against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka in banana (*Musa* spp.). *BioControl.* 2015;60(4):565-72.
22. Someya N, Kataoka N, Komagata T, Hirayae K, Hibi T, Akutsu K. Biological Control of Cyclamen Soilborne Diseases by *Serratia marcescens* Strain B2. *Plant Disease.* 2000; 84(3):334-40.
23. Suryawanshi RK, Koujah L, Patil CD, Ames JM, Agelidis A, Yadavalli T, Patil SV, Shukla D. Bacterial Pigment Prodigiosin Demonstrates a Unique Antiherpesvirus Activity That Is



- Mediated through Inhibition of Prosurvival Signal Transducers. *J Virol.* 2020; 94(13):e00251-20.
24. Isaka M, Jaturapat A, Kramyu J, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Potent In Vitro Antimalarial Activity of Metacycloprodigiosin Isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2002;46(4):1112-3.
  25. Papireddy K, Smilkstein M, Kelly JX, Shweta SSM, Alhamadsheh M, Haynes SW, Challis GL, Reynolds KA. Antimalarial Activity of Natural and Synthetic Prodiginines. *J Med Chem.* 2011;54(15):5296-306.
  26. Genes C, Baquero E, Echeverri F, Maya JD, Triana O. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Parasit Vectors.* 2011;4:66.
  27. Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res.* 2011;109(4):1179-87.
  28. Im H, Choi SY, Son S, Mitchell RJ. Combined Application of Bacterial Predation and Violacein to Kill Polymicrobial Pathogenic Communities. *Sci Rep.* 2017;7(1):14415.
  29. Aruldass CA, Rubiyatno VCK, Ahmad WA. Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. *Rsc Adv.* 2015;5(64):51524-36.
  30. Sasidharan A, Sasidharan NK, Amma DBNS, Vasu RK, Nataraja AV, Bhaskaran K. Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp NIIST (MTCC 5522). *J Microbiol.* 2015;53(10):694-701.
  31. Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, Lam BA, Woodhams DC, Briggs CJ, Vredenburg VT, et al. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *ISME J.* 2009;3(7):818-24.
  32. Becker MH, Brucker RM, Schwantes CR, Harris RN, Minbiole KPC. The Bacterially Produced Metabolite Violacein Is Associated with Survival of Amphibians Infected with a Lethal Fungus. *Appl Environ Microb.* 2009;75(21):6635-8.
  33. Shirata A, Tsukamoto T, Yasui H, Hata T, Hayasaka S, Kojima A, Kato H. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *Jarq-Jpn Agr Res Q.* 2000;34(2):131-40.
  34. Suryawanshi RK, Patil CD, Koli SH, Hallsworth JE, Patil SV. Antimicrobial activity of prodigiosin is attributable to plasma-membrane damage. *Nat Product Res.* 2016;31(5):572-7.
  35. Aruldass CA, Masalamany SRL, Venil CK, Ahmad WA. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Environ Sci Pollut Res.* 2017;25(6):5164-80.
  36. Cauz ACG, Carretero GPB, Saraiva GKV, Park P, Mortara L, Cuccovia IM, Brocchi M, Gueiros-Filho FJ. Violacein Targets the Cytoplasmic Membrane of Bacteria. *ACS Infect Dis.* 2019;5(4):539-49.
  37. Wang H, Wang F, Zhu X, Yan Y, Yu X, Jiang P, Xing X-H. Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. *Biochem Eng J.* 2012;67:148-55.

38. Lee Y-R, Mitchell RJ, Whang K-S. Isolation and characterization of antifungal violacein producing bacterium *Collimonas* sp. DEC-B5. *Korean J Microbiol.* 2016;52(2):212–9.
39. Andrighetti-Frohner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simoes CMO. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem I Oswaldo Cruz.* 2003;98(6):843–8.
40. Lee YJ, Bashyal P, Pandey RP, Sohng JK. Enzymatic and Microbial Biosynthesis of Novel Violacein Glycosides with Enhanced Water Solubility and Improved Anti-nematode Activity. *Biotechnol Bioproc E.* 2019;24(2):366–74.
41. Li D, Liu J, Wang X, Kong D, Du W, Li H, Hse CY, Shupe T, Zhou D, Zhao K. Biological Potential and Mechanism of Prodigiosin from *Serratia marcescens* Subsp. *lawsoniana* in Human Choriocarcinoma and Prostate Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3465.
42. Isaka M, Jaturapat A, Kramyu J, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Potent In Vitro Antimalarial Activity of Metacycloprodigiosin Isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2002;46(4):1112–3.
43. Hornung C, Poehlein A, Haack FS, Schmidt M, Dierking K, Pohlen A, Schulenburg H, Blokesch M, Plener L, Jung K, Bonge A, Krohn-Molt I, Utpatel C, Timmermann G, Spieck E, Pommerening-Röser A, Bode E, Bode HB, Daniel R, Schmeisser C, Streit WR. The *Janthinobacterium* sp. HH01 genome encodes a homologue of the *V. cholerae* CqsA and *L. pneumophila* LqsA autoinducer synthases. *PLoS One.* 2013;8(2):e55045.
44. Leon LL, Miranda CC, De Souza AO, Durán N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(3):449–50.
45. Leon LL, Miranda CC, De Souza AO, Duran N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(3):449–50.
46. Bilslund E, Tavella TA, Krogh R, Stokes JE, Roberts A, Ajioka J, Spring DR, Andricopulo AD, Costa FTM, Oliver SG. Antiplasmodial and trypanocidal activity of violacein and deoxyviolacein produced from synthetic operons. *BMC Biotechnol.* 2018;18(1):22.
47. Lopes SCP, Blanco YC, Justo GZ, Nogueira PA, Rodrigues FLS, Goelnitz U, Wunderlich G, Facchini G, Brocchi M, Duran N, et al. Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* Inhibits Plasmodium Growth In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2009;53(5):2149–52.
48. Rahul S, Chandrashekar P, Hemant B, Bipinchandra S, Mouray E, Grellier P, Satish P. In vitro antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles. *Parasitol Int.* 2015;64(5):353–6.
49. Lozano GL, Guan C, Cao Y, Borlee BR, Broderick NA, Stabb EV, Handelsman J. A Chemical Counterpunch: *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 Produces Violacein in Response to Translation-Inhibiting Antibiotics. *mBio.* 2020;11(3):e00948–20.
50. Baskar K, Ignacimuthu S. Bioefficacy of violacein against Asian armyworm *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). *J Saudi Soc Agric Sci.* 2012;11(1):73–7.
51. Cazoto LL, Martins D, Ribeiro MG, Duran N, Nakazato G. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis. *J Antibiot.* 2011;64(5):395–7.

52. Jones JA, Vernacchio VR, Lachance DM, Lebovich M, Fu L, Shirke AN, Schultz VL, Cress B, Linhardt RJ, Koffas MA. ePathOptimize: A Combinatorial Approach for Transcriptional Balancing of Metabolic Pathways. *Sci Rep.* 2015;5:11301.
53. Hashimi SM, Xu TF, Wei MQ. Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1731–6.
54. Yang C, Jiang PX, Xiao S, Zhang C, Lou K, Xing XH. Fed-batch fermentation of recombinant *Citrobacter freundii* with expression of a violacein-synthesizing gene cluster for efficient violacein production from glycerol. *Biochem Eng J.* 2011;57:55–62.
55. Jiang PX, Wang HS, Zhang C, Lou K, Xing XH. Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp B2 in different heterologous hosts. *Appl Microbiol Biot.* 2010;86(4):1077–88.
56. Asencio G, Paris Lavin, Karen Alegrã a, et al. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria *Electronic Journal of Biotechnology.* 2014;17:1-5.
57. Subramaniam S, Ravi V, Sivasubramanian A. Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms. *Pharm Biol.* 2014;52(1):86–90.
58. Moazamian, E. Emami, A. Mehdizadeh, H and Pirbonyeh, N. bactericidal activity of pigments isolated from Fars province (Iran) environmental bacteria on MDR clinical isolates of *Acinetobacter*. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology.* 2018: 8(1):922-930.
59. Gohil, N, Bhattacharjee, G and Sing, V. Synergistic bactericidal profiling of prodigiosin extracted from *Serratia marcescens* in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. *Journal of Microbial Pathology.* 2020;149:104508.
60. Amorim, L.F.A.; Fangueiro, R.; Gouveia, I.C. Characterization of Bioactive Colored Materials Produced from Bacterial Cellulose and Bacterial Pigments. *Materials* 2022;15:2069.
61. Hazarika DJ, Gautom T, Parveen A, Goswami G, Barooah M, Modi MK, Boro RC. Mechanism of interaction of an endofungal bacterium *Serratia marcescens* D1 with its host and non-host fungi. *Plos One.* 2020;15(4):e0224051.
62. Clements T, Ndlovu T, Khan W. Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. *Microbiol Res.* 2019;229:126329.
63. Dhar Purkayastha G, Mangar P, Saha A, Saha D. Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *Plos One.* 2018;13(2):e0191761.
64. Madison JD, Ouellette SP, Schmidt EL, Kerby JL. *Serratia marcescens* shapes cutaneous bacterial communities and influences survival of an amphibian host. *Proc Biol Sci.* 2019;286(1914):20191833.
65. Mamiya Y. Pathology of the Pine Wilt Disease Caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Ann Rev Phytopathol.* 1983;21(1):201–20.
66. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Anderson HR, Bhutta ZA, Biryukov S, Brauer M, Burnett R, Cercy K, Charlson FJ, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters

- of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1659–724.
67. Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Pérez-Tomás R. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol*. 2000;131(3):585–93.
68. Llagostera E, Soto-Cerrato V, Montaner B, PÉRez-TomÁS R: Prodigiosin Induces Apoptosis by Acting on Mitochondria in Human Lung Cancer Cells. *Ann New York Acad Sci* 2003, 1010(1):178-181.
69. Campàs C, Dalmau M, Montaner B, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Pérez-Tomás R, Gil J. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003;17(4):746–50.
70. Diaz-Ruiz C, Montaner B, Perez-Tomas R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol Histopathol*. 2001;16(2):415–21.
71. Soto-Cerrato V, Llagostera E, Montaner B, Scheffer GL, Perez-Tomas R. Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(7):1345–52.
72. Prabhu VV, Hong B, Allen JE, Zhang S, Lulla AR, Dicker DT, El-Deiry WS. Small-Molecule Prodigiosin Restores p53 Tumor Suppressor Activity in Chemoresistant Colorectal Cancer Stem Cells via c-Jun-Mediated  $\Delta$ Np73 Inhibition and p73 Activation. *Cancer Res*. 2016;76(7):1989–99.
73. Cheng S-Y, Chen N-F, Kuo H-M, Yang S-N, Sung C-S, Sung P-J, Wen Z-H, Chen W-F. Prodigiosin stimulates endoplasmic reticulum stress and induces autophagic cell death in glioblastoma cells. *Apoptosis*. 2018;23(5-6):314–28.
74. Zhang J, Shen Y, Liu J, Wei D. Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition of tumor invasion. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(3):407–14.
75. Sessler JL, Eller LR, Cho W-S, Nicolaou S, Aguilar A, Lee JT, Lynch VM, Magda DJ. Synthesis, Anion-Binding Properties, and In Vitro Anticancer Activity of Prodigiosin Analogues. *Angewandte Chemie Int Edition*. 2005;44(37):5989–92.
76. Zhao C, Qiu SZ, He J, Peng Y, Xu HM, Feng ZQ, Huang HL, Du YL, Zhou YJ, Nie YQ. Prodigiosin impairs autophagosome-lysosome fusion that sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil-induced cell death. *Cancer Lett*. 2020;481:15–23.
77. Melvin MS, Tomlinson JT, Saluta GR, Kucera GL, Lindquist N, Manderville RA. Double-Strand DNA Cleavage by Copper-Prodigiosin. *J Am Chem Soc*. 2000;122(26):6333–4.
78. Montaner B, Castillo-Ávila W, Martinell M, Öllinger R, Aymami J, Giralt E, Pérez-Tomás R. DNA Interaction and Dual Topoisomerase I and II Inhibition Properties of the Anti-Tumor Drug Prodigiosin. *Toxicol Sci*. 2005;85(2):870–9.
79. Anwar MM, Shalaby M, Embaby AM, Saeed H, Agwa MM, Hussein A. Prodigiosin/PU-H71 as a novel potential combined therapy for triple negative breast cancer (TNBC): preclinical insights. *Sci Rep*. 2020;10(1):14706.

80. Ohkuma S, Sato T, Okamoto M, Matsuya H, Arai K, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH. Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symport. *Biochem J.* 1998;334(3):731-41.
81. Sato T, Konno H, Tanaka Y, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH, Ohkuma S. Prodigiosins as a New Group of H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> Symporters That Uncouple Proton Translocators. *J Biol Chem.* 1998;273(34):21455-62.
82. Fürstner A, Reinecke K, Prinz H, Waldmann H. The Core Structures of Roseophilin and the Prodigiosin Alkaloids Define a New Class of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors. *ChemBioChem.* 2004;5(11):1575-9.
83. Soliev AB, Hosokawa K, Enomoto K. Effects of prodigiosin family compounds from *Pseudoalteromonas* sp. 1020R on the activities of protein phosphatases and protein kinases. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2014;30(4):533-8.
84. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1102-9.
85. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(9):528-42.
86. Razaghi A, Heimann K, Schaeffer PM, Gibson SB. Negative regulators of cell death pathways in cancer: perspective on biomarkers and targeted therapies. *Apoptosis.* 2018;23(2):93-112.
87. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget.* 2017;8(23):38022-43.
88. Leal AM, de Queiroz JD, de Medeiros SR, Lima TK, Agnez-Lima LF. Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro. *BMC Microbiol.* 2015;15:115.
89. Goncalves PR, Rocha-Brito KJP, Fernandes MRN, Abrantes JL, Duran N, Ferreira-Halder CV. Violacein induces death of RAS-mutated metastatic melanoma by impairing autophagy process. *Tumor Biol.* 2016;37(10):14049-58.
90. Ferreira CV, Bos CL, Versteeg HH, Justo GZ, Duran N, Peppelenbosch MP. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood.* 2004;104(5):1459-64.
91. Balibar CJ, Walsh CT. In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry.* 2006;45(51):15444-57.
92. Saraiva VS, Marshall JC, Cools-Lartigue J, Burnier MN. Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2004;14(5):421-4.
93. Hashimi SM, Xu TF, Wei MQ. Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1731-6.
94. Mehta T, Vercruysse K, Johnson T, Ejiofor AO, Myles E, Quick QA. Violacein induces p44/42 mitogen-activated protein kinase-mediated solid tumor cell death and inhibits tumor cell migration. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):1443-8.
95. de Carvalho DD, Costa FTM, Duran N, Haun M. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicol in Vitro.* 2006;20(8):1514-21.
96. Kodach LL, Bos CL, Duran N, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Hardwick JCH. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-

- mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*. 2006;27(3):508–16.
97. Masuelli L, Pantanella F, La Regina G, Benvenuto M, Fantini M, Mattera R, Di Stefano E, Mattei M, Silvestri R, Schippa S, et al. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. *Tumor Biol*. 2016;37(3):3705–17.
  98. Bromberg N, Dreyfuss JL, Regatieri CV, Palladino MV, Duran N, Nader HB, Haun M, Justo GZ. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chem-Biol Interact*. 2010;186(1):43–52.
  99. Andrighetti-Frohner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simoes CMO. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem I Oswaldo Cruz*. 2003;98(6):843–8.
  100. Melo PD, Maria SS, Vidal BD, Haun M, Duran N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev-An*. 2000;36(8):539–43.
  101. Queiroz KC, Milani R, Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Justo GZ, Zambuzzi WF, Duran N, Diks SH, Spek CA, Ferreira CV, Peppelenbosch MP. Violacein induces death of resistant leukaemia cells via kinome reprogramming, endoplasmic reticulum stress and Golgi apparatus collapse. *PLoS One*. 2012;7(10):e45362.
  102. Antonisamy P, Kannan P, Aravinthan A, Duraipandiyan V, Arasu MV, Ignacimuthu S, Al-Dhabi NA, Kim JH. Gastroprotective activity of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum* on indomethacin-induced gastric lesions in rats: investigation of potential mechanisms of action. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:616432.
  103. Han SB, Kim HM, Kim YH, Lee CW, Jang E-S, Son KH, Kim SU, Kim YK. T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *Int J Immunopharmacol*. 1998;20(1-3):1–13.
  104. Han SB, Park SH, Jeon YJ, Kim YK, Kim HM, Yang KH. Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin-2 $\alpha$  expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen-induced arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(2):415–25.
  105. Mortellaro A, Songia S, Gnocchi P, Ferrari M, Fornasiero C, D'Alessio R, Isetta A, Colotta F, Golay J. New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa B and AP-1 activation. *J Immunol*. 1999;162(12):7102–9.
  106. Han S-B, Lee CW, Yoon YD, Kang JS, Lee KH, Yoon WK, Kim YK, Lee K, Park S-K, Kim HM. Effective prevention of lethal acute graft-versus-host disease by combined immunosuppressive therapy with prodigiosin and cyclosporine A. *Biochem Pharmacol*. 2005;70(10):1518–26.
  107. Huh J-E, Koo H-J, Kim K-H, Yim J-H, Lee H-K, Sohn E-W, Pyo S-N. Immunosuppressive Effect of Prodigiosin on Murine Splenocyte and Macrophages. *Biomol Ther*. 2008;16(4):351–5.
  108. Antonisamy P, Ignacimuthu S. Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*. *Phytomed*. 2010;17(3-4):300–4.

109. Lin C, Jia X, Fang Y, Chen L, Zhang H, Lin R, Chen J. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* FZSF02 in the form of pigment pellets. *Electron J Biotechnol.* 2019;40:58–64.
110. Kurbanoglu EB, Ozdal M, Ozdal OG, OF A. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Brazilian J Microbiol.* 2015;46(2):631–7.
111. Casullo de Araújo HW, Fukushima K, GMC T. Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* UCP 1549 Using Renewable-Resources as a Low Cost Substrate. *Molecules.* 2010;15(10):6931–40.
112. Aruldass CA, Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. Brown sugar as a low-cost medium for the production of prodigiosin by locally isolated *Serratia marcescens* UTM1. *Int Biodeterioration Biodegradation.* 2014;95:19–24.
113. Siva R, Subha K, Bhakta D, Ghosh AR, Babu S. Characterization and Enhanced Production of Prodigiosin from the Spoiled Coconut. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011;166(1):187–96.
114. Mendes AS, de Carvalho JE, Duarte MCT, Duran N, Bruns RE. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnol Lett.* 2001;23(23):1963–9.
115. Wang HS, Jiang PX, Lu Y, Ruan ZY, Jiang RB, Xing XH, Lou K, Wei D. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp B2. *Biochem Eng J.* 2009;44(2-3):119–24.
116. Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J Appl Microbiol.* 2007;102(4):992–9.

## ایمونوتراپی با سلول‌های T گیرنده آنتی‌ژن کایمیریک (CAR-T cells) فراتر از درمان سرطان

فرشاد یداللهی<sup>۱\*</sup>، آرش ابراهیمی ناغانی<sup>۲</sup>، زهرا خلیلی<sup>۳</sup>

۱. دکترای تخصصی ایمنولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
۳. کارشناس میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** سلول‌های CAR-T مبتنی بر گیرنده‌های آنتی‌ژنی کایمیریک هستند که این گیرنده‌ها از طریق وکتورهای ویروسی و غیر ویروسی بر روی لنفوسیت‌ها، بخصوص لنفوسیت‌های T بیان می‌شوند. این سلول‌ها به طور کاملاً دقیق، هدف‌های خاص آنتی‌ژنی را بدون نیاز به عرضه آنتی‌ژن‌ها بر روی مولکول‌های MHC، شناسایی کرده و سلول هدف را از بین می‌برند. ساختار خارج سلولی گیرنده این سلول‌ها همانند آنتی‌بادی‌ها قادر به شناسایی انواع آنتی‌ژن‌ها می‌باشد. سلول‌های CAR-T فقط به درمان سرطان محدود نمی‌شوند و می‌توان از آن‌ها برای درمان بیماری‌های خود ایمنی و همچنین عفونت‌های ویروسی نیز بهره برد. اگرچه این سلول‌ها آینده روشنی را برای درمان بیماری‌های لاعلاج یا صعب‌العلاج به ارمغان می‌آورند، اما دارای معایبی از جمله سمیت روی هدف/خارج از تومور، سمیت عصبی، سندرم آزادسازی سیتوکاین، فرار آنتی‌ژن تومور، سطوح پایین نفوذ به بافت تومور و... نیز می‌باشند ولی اکنون، ساخت نسل‌های جدیدی از سلول‌های CAR-T و طراحی‌های نوآورانه این سازه‌های ژنتیکی، باعث کاهش سمیت و افزایش کارایی این سلول‌ها گردیده است.

**نتیجه‌گیری:** شناسایی هدف‌های آنتی‌ژنی خاص و همچنین پیشرفت در طراحی سازه‌های CAR می‌تواند نوید بخش درمان‌های موفق بیماری‌های لاعلاج توسط سلول‌های CAR-T باشد.

**واژگان کلیدی:** CAR-T cells، گیرنده‌های آنتی‌ژنی کایمیریک، سرطان، بیماری‌های خود ایمنی، بیماری‌های ویروسی.

نشانی نویسنده مسئول: استان آذربایجان غربی، ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه. کد پستی: ۵۷۵۶۱۵۱۸۱۸

همراه: ۰۹۱۳۲۸۲۸۴۷۳

تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۵۲۷۴۱

ایمیل: yadollahi.farshad@gmail.com



## Immunotherapy with chimeric antigen receptor T cells (CAR-T cells) beyond cancer treatment

Farshad Yadollahi<sup>1\*</sup>, Arash Ebrahimi Naghani<sup>2</sup>, Zahra Khalili<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** CAR-T cells are based on chimeric antigen receptors, which are expressed on lymphocytes, especially T lymphocytes, through viral and non-viral vectors. These cells accurately identify specific antigenic targets without the need to present antigens on MHC molecules and destroy the target cell. The extracellular structure of the receptor of these cells, like antibodies, is capable of identifying all types of antigens. CAR-T cells are not limited to cancer treatment and can be used to treat autoimmune diseases as well as viral infections.

Although these cells offer a bright future for the treatment of incurable or irremediable diseases, they have disadvantages including on-target/off-tumor toxicity, neurotoxicity, cytokine release syndrome, low levels of tumor tissue penetration, tumors antigen escape and etc. but now with the creation of new generations of CAR-T cells and the innovative designs of these genetic structures, it has reduced the toxicity and increased the efficiency of these cells.

**Conclusion:** Identification of specific antigenic targets as well as progress in the design of CAR structures can promise the successful treatment of irremediable diseases by CAR-T cells.

**Keywords:** CAR-T cells, chimeric antigen receptors, cancer, autoimmune diseases, viral diseases.

### مقدمه

گیرنده آنتی ژنی کایمیریک (CAR)<sup>۴۷</sup>، گیرنده های مصنوعی مهندسی شده ای هستند که برای هدایت لنفوسیت ها، معمولاً لنفوسیت های T و برای شناسایی و حذف سلول هایی که یک آنتی ژن هدف خاص را بیان کرده، عمل می کنند. اتصال CAR به آنتی ژن های هدف بیان شده در سطح سلول، مستقل از گیرنده MHC بوده (برخلاف لنفوسیت T) و این امر منجر به فعال شدن شدید سلول های CAR-T و پاسخ های قدرتمند ضد تومور می شود (۱).

ساخت سلول های CAR-T برای کاربرد درمانی، فرآیندی چند مرحله ای می باشد که با جداسازی سلول های T از خون محیطی بیمار آغاز شده و به دنبال آن، ژن های CAR به واسطه وکتور ویروسی یا روش های غیر ویروسی وارد ژنوم سلول T می شوند. سپس سلول های CAR-T تکثیر شده و محصول سلولی دوباره به بیمار تزریق می شود (۲). نکته مهم در طراحی سلول های CAR-T انتخاب آنتی ژنی هدف مناسب می باشد. تعداد اهداف موجود برای سلول درمانی CAR-T به سرعت در حال گسترش است (۳). موفقیت های بی سابقه ایمونوتراپی توسط سلول های CAR-T ضد CD19 برای درمان بدخیمی های سلول B هماتولوژیک توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده تأیید شده است و آزمایش های بالینی نتایج دلگرم کننده ای به دست آورده اند (۴-۸). درمان با سلول های T اصلاح شده، به ویژه استفاده از سلول های گیرنده آنتی ژن کایمیریک (CAR)-T، در سال های اخیر توجه فزاینده ای را به تومورهای جامد مختلف جلب کرده است (۹ و ۱۰).

امروزه علاوه بر درمان سرطان ها، بیماری های خود ایمنی و ویروسی نیز توسط سلول های CAR-T قابل درمان می باشند (۱۱). پاتوژن بسیاری از بیماری های خود ایمنی<sup>۴۸</sup> (AIDS) هنوز به طور دقیق مشخص نشده است، اما شکی نیست که شکست تحمل سلول های T نقش اصلی را در این فرآیند ایفا می کند (۱۲).

<sup>47</sup> Chimeric antigen receptor

<sup>48</sup> autoimmune diseases

مکانیسم‌های زیربنایی از دست دادن تحمل ایمنی به اجزای خودی در AIDS شامل فعال‌سازی کلون‌هایی از لنفوسیت‌های B خود واکنشی می‌باشد که اتوآنتی‌بادی‌هایی تولید می‌کنند تا باعث آسیب بافتی شده و همچنین مکانیسم دیگر، سرکوب سلول‌های T تنظیم‌کننده<sup>۴۹</sup> (Treg) می‌باشد. این جنبه‌های پاتوژنز بیماری در مفهوم کاربرد درمانی سلول‌های CAR-T ضد خود ایمنی با هدف از بین بردن کلون‌های خود واکنشی سلول‌های ایمنی منعکس می‌شود. گیرنده اتوآنتی‌بادی کایمیریک<sup>۵۰</sup> (CAAR)، که همچنین با نام گیرنده هدف گیری کننده آنتی‌بادی سلول B<sup>۵۱</sup> (BAR) نیز شناخته می‌شود، نشان دهنده گونه ای از CAR های اصلاح شده است. این نوع از سلول‌های CAR-T بجای دامنه خارج سلولی scFv (قطعه متغیر تک زنجیره ای<sup>۵۲</sup>) از دامنه های اصلاح شده است. این نوع از سلول‌های CAR-T بجای دامنه خارج سلولی scFv (قطعه متغیر تک زنجیره ای<sup>۵۲</sup>) از دامنه های اصلاح شده است. این نوع از سلول‌های CAR-T بجای دامنه خارج سلولی scFv (قطعه متغیر تک زنجیره ای<sup>۵۲</sup>) از دامنه های اصلاح شده است. این نوع از سلول‌های CAR-T بجای دامنه خارج سلولی scFv (قطعه متغیر تک زنجیره ای<sup>۵۲</sup>) از دامنه های اصلاح شده است.

CAAR استفاده می‌کنند که سلول‌های B خودواکنشگر را هدف می‌گیرد. سمیت سلولی سلول‌های CAAR-T انتخابی بوده و تنها سلول‌های ایمنی که گیرنده‌های ضد اتوآنتی ژن خاص را حمل می‌کنند، هدف گرفته و سیستم ایمنی را سرکوب نمی‌کنند (۱۳ و ۱۴). این استراتژی قرار است منجر به حذف مستقیم ایمونوگلوبولین‌های سطحی سلول‌های B حافظه و حذف غیرمستقیم پلاسماسل‌های با عمر کوتاهی شود که اتوآنتی‌بادی‌های عامل بیماری خود ایمنی را تولید می‌کنند. یک استراتژی ریشه‌کنی سلول‌های ایمنی مشابه را می‌توان با قرار دادن موتیف CAAR ضد قسمت MHC:پپتید بر روی سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن<sup>۵۳</sup> (APCs) خود واکنش گر یا گیرنده‌های سلول T<sup>۵۴</sup> (TCR) برای سلول‌های CD8+ اعمال کرد (۱۵ و ۱۶). روش دیگر برای بازگرداندن تحمل ایمنی، تغییر فنوتیپ سلول T از نوع سیتوتوکسیک به تنظیمی است، زیرا Tregs معمولاً در AIDS سرکوب می‌شوند. CAR-Treg ها سلول‌های CAR-T هستند که همزمان همراه با انتقال CAR ژن FOXP3 که عضوی از خانواده پروتئین FOX بوده و مسیرهای مسئول توسعه و عملکرد سلول‌های T تنظیمی را کنترل می‌کند، به Tregs تبدیل می‌شوند. CAR-Treg ها لنفوسیت‌های T خودایمنی را از طریق القای انرژی<sup>۵۵</sup>، نادیده گرفتن ایمونولوژیک<sup>۵۶</sup> و حذف کلونال شناسایی و تنظیم می‌کند (۱۷).

همچنین از سلول‌های CAR-T برای درمان عفونت‌های ویروسی می‌توان استفاده کرد. در این استراتژی، آنتی ژن‌های ویروسی عرضه شده بر روی سلول به عنوان هدفی برای CAR-T ها در نظر گرفته خواهد شد (۱۸). مطالعات فراوانی جهت بررسی کارایی سلول‌های CAR-T بر علیه عفونت‌های ویروسی از جمله بیماری ایدز (۱۹-۲۷)، آنفولانزا (۲۸)، هیپاتیت B (۳۱-۲۹)، هیپاتیت C (۳۲)، COVID-19 (۳۳-۳۶) و... انجام شده است. با این حال، محدودیت‌های عمده‌ای برای درمان با این سلول‌ها وجود دارد که باید به آن‌ها توجه شود. در ادامه به بررسی این محدودیت‌ها خواهیم پرداخت.

### ساختار سلول‌های CAR-T

سلول‌های CAR-T سلول‌های T مهندسی شده ژنتیکی هستند که ناقل‌های CAR سنتز شده را برای شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن‌های خاص (مانند CD19) روی سلول‌های تومور بیان می‌کنند (۴ و ۳۷).

<sup>49</sup> regulatory T cells

<sup>50</sup> chimeric autoantibody receptor

<sup>51</sup> B cell antibody targeting receptor

<sup>52</sup> single-chain variable fragment

<sup>53</sup> antigen presenting cells

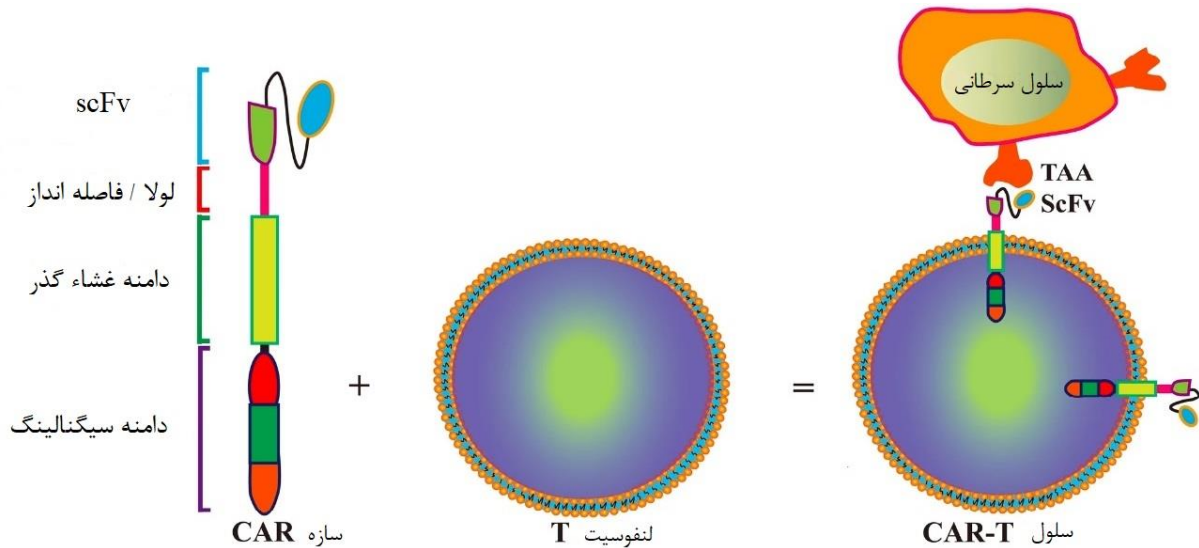
<sup>54</sup> T cell receptors

<sup>55</sup> anergy

<sup>56</sup> immunological ignorance

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

CAR یک پروتئین همجوشی مصنوعی است که شامل یک دامنه اتصال به آنتی ژن خارج سلولی<sup>۵۷</sup>، یک موتیف توالی فاصله دهنده/لولای خارج سلولی<sup>۵۸</sup>، یک دامنه غشاء گذر<sup>۵۹</sup> (TM) و یک دامنه سیگنال دهی درون سلولی<sup>۶۰</sup> است (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار و تولید سلول های T گیرنده آنتی ژن کایمیریک (CAR-T cells)

قطعه متغیر تک زنجیره‌ای (scFv)، که عنصر اصلی دامنه اتصال به آنتی ژن است، می‌تواند آنتی ژن‌های مرتبط با تومور<sup>۶۱</sup> (TAAs) را تشخیص دهد. با توجه به وجود scFv، CAR می‌تواند به طور خاص با هدف درگیر شده و سیگنال دهی پایین دست را آغاز کند. قطعه scFv از زنجیره‌های متغیر سنگین (VH) و سبک (VL) آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مشتق شده است که از طریق یک پیوند دهنده انعطاف‌پذیر به هم متصل می‌شوند تا یک قطعه متغیر تک زنجیره‌ای را تشکیل دهند (۳۸ و ۳۹).

طول ناحیه فاصله دهنده یا لولا<sup>۶۲</sup> را می‌توان برای بهینه‌سازی فاصله بین سلول‌های CAR-T و اپی‌توپ خاص سلول‌های هدف برای انتقال سیگنال CAR تنظیم کرد. نکته مهم این است که به نظر می‌رسد، لولا انتخاب شده بر عملکرد CAR تأثیر می‌گذارد، زیرا تفاوت در طول و ترکیب ناحیه لولا می‌تواند بر انعطاف‌پذیری، بیان CAR، سیگنال دهی، قدرت خروجی‌های فعال‌سازی و تشخیص اپی‌توپ تأثیر بگذارد (۴۰ و ۴۱). علاوه بر این تأثیرات، پیشنهاد شده است که طول فاصله دهنده یا لولا، برای ایجاد فاصله بین سلولی کافی، برای تشکیل سیناپس ایمنولوژیک حیاتی است (۳۷).

در اصل، طول فاصله‌دهنده بهینه، به موقعیت اپی‌توپ هدف و مانع فضایی روی سطح سلول هدف بستگی دارد که در آن فاصله دهنده‌های طولانی انعطاف‌پذیری بیشتری را فراهم می‌کنند و امکان دسترسی مؤثرتر به اپی‌توپ‌های پروگزیمال غشایی یا

<sup>57</sup> extracellular antigen- binding domain

<sup>58</sup> extracellular spacer/hinge sequence motif

<sup>59</sup> transmembrane (TM) domain

<sup>60</sup> intracellular signaling domain

<sup>61</sup> tumor-associated antigens

آنتی‌ژن‌های گلیکوزیله پیچیده را فراهم می‌کنند. در حالی که لولا‌های کوتاه در اتصال اپی‌توب‌های غشایی-دیستال موفق‌تر هستند. با این حال، در عمل طول مناسب فاصله‌دهنده اغلب به صورت تجربی تعیین می‌شود و باید برای هر دامنه اتصال به آنتی‌ژن خاص، تنظیم شود (۴۰ و ۴۲-۴۴). متداول‌ترین نواحی لولای مورد استفاده از توالی‌های اسید آمینه CD8، CD28، IgG1 یا IgG4 مشتق شده‌اند. با این حال، فاصله‌دهنده‌های مشتق شده از IgG می‌توانند باعث کاهش سلول‌های CAR-T و در نتیجه کاهش ماندگاری در داخل بدن شوند، زیرا می‌توانند با گیرنده‌های Fc $\gamma$  تعامل داشته باشند (۴۵ و ۴۶).

دامنه غشاء‌گذر TM، همراه با ناحیه فاصله‌دهنده/لولا، CAR را به غشای سلولی متصل می‌کند (۳۹). در میان تمام اجزای CAR، دامنه غشاء‌گذر احتمالاً کمترین مشخصه را دارد و عملکرد اصلی آن لنگر انداختن CAR به غشای سلول T است، اگرچه شواهد نشان می‌دهد که دامنه غشاء‌گذر می‌تواند برای عملکرد سلول CAR-T نیز موثر باشد. مطالعات نشان می‌دهند که حوزه‌های غشاء‌گذر CAR بر سطح بیان CAR و پایداری آن تأثیر می‌گذارند و می‌توانند در سیگنال‌دهی یا تشکیل سیناپس فعال باشند و با مولکول‌های سیگنال‌دهنده درون‌زا دایمر شوند (۴۷-۴۹).

بیشتر دامنه‌های غشاء‌گذر از پروتئین‌های طبیعی شامل CD3 $\zeta$ ، CD4، CD8 $\alpha$  یا CD28 مشتق شده‌اند. اثر یک گذرنده در مقایسه با دیگری بر عملکرد CAR به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است زیرا دامنه غشاء‌گذر به طور مکرر بر اساس الزامات ناحیه فضایی خارج سلولی یا حوزه‌های سیگنال‌دهی داخل سلولی تغییر می‌کند. قابل ذکر است، غشاء‌گذر CD3 $\zeta$  ممکن است فعال‌سازی سلول‌های T با واسطه CAR را تسهیل کند، زیرا حوزه غشاء‌گذر CD3 $\zeta$  واسطه دایمرسازی CAR و ادغام آن در TCRهای درون‌زا است (۴۷). در مقابل اثرات مفید حوزه غشاء‌گذر CD3 $\zeta$ ، عیب آن پایداری کمتر CAR متصل به آن در مقایسه با CAR با دامنه غشاء‌گذر CD28 است (۵۰).

به نظر می‌رسد تأثیر دامنه غشاء‌گذر و ناحیه لولا با همدیگر بر تولید سیتوکین سلولی CAR-T و مرگ سلولی ناشی از فعال‌سازی<sup>۶۳</sup> (AICD) تأثیر می‌گذارد، زیرا سلول‌های CAR-T با دامنه غشاء‌گذر و دامنه‌های لولا CD8 $\alpha$  در مقایسه با CARهایی با دامنه‌های مشتق شده از CD28، مقادیر کمتری از سایتوکاین‌های TNF و IFN $\gamma$  را آزاد کرده و حساسیت کمتری به AICD دارند (۵۱). در کل به نظر می‌رسد بیان و پایداری CAR با استفاده از دامنه‌های غشاء‌گذر CD8 $\alpha$  یا CD28 که اغلب استفاده می‌شوند، افزایش می‌یابد.

دامنه سیگنالینگ یک مجتمع درون سلولی جهت فعال‌سازی سلول T است که از یک ماژول سیگنال CD3 $\zeta$  (همچنین CD247 نامیده می‌شود) و بسیاری از مولکول‌های تحریک‌کننده تشکیل شده است. اینها اتصال آنتی‌ژن را با تعدیل یک آبشار سیگنال دهی پایین دستی جهت فعال‌سازی سلول T آغاز می‌کنند (۳۸ و ۳۹).

مولکول‌های تحریک‌کننده شامل CD27، CD28، OX40 (CD134)، 4-1BB (CD137)، تحریک‌کننده القایی<sup>۶۴</sup> (ICOS)، CD278، و پروتئین مرتبط با گیرنده فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) ناشی از گلوکوکورتیکوئید<sup>۶۵</sup> (GITR) می‌باشند (شکل ۲) که از این میان CD28، OX40 و 4-1BB متداول‌ترین مولکول‌های مورد استفاده هستند (۹).

### انواع سلول‌های CAR-T

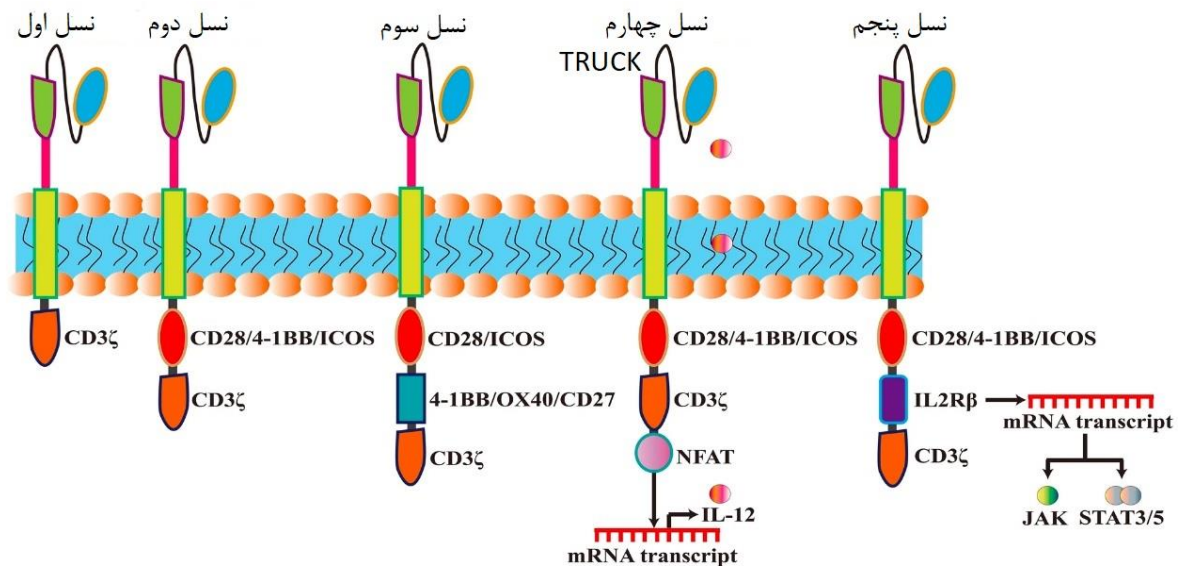
ایمنی و کارایی درمان با سلول‌های CAR-T را می‌توان از طریق بهینه‌سازی وکتورهای CAR بهبود بخشید (۵۲). تفاوت اصلی بین نسل‌های CARها در مولکول‌های تحریک‌کننده خاص یا همان دامنه سیگنالینگ آنها می‌باشد (شکل ۲).

<sup>63</sup> activation induced cell death

<sup>64</sup> inducible costimulator

<sup>65</sup> glucocorticoid induced tumor necrosis factor (TNF) receptor-related protein

نسل اول CARها فقط شامل دامنه داخل سلولی سیگنالینگ  $CD3\zeta$  است که با scFv خارج سلولی ترکیب شده است تا منجر به تغییر و فعال سازی سلول های T شود (۵۳). با این حال، این نسل از سلول های CAR-T عمر کوتاهی داشت و به طور موثری باعث فعال شدن سلول T نمی شد. برای غلبه بر این عیب، CAR های نسل دوم معمولاً دارای یک مولکول تحریک کننده اضافی (مانند  $CD28$ ،  $4-1BB$  و  $ICOS$ ) برای افزایش ماندگاری و طول عمر سلولها هستند (۱).  
 CAR های نسل سوم حاوی  $CD3\zeta$  و دو عنصر تحریک کننده (مانند  $CD27$ ،  $CD28$ ،  $4-1BB$ ،  $ICOS$  و  $OX-40$ ) هستند که ظرفیت آنها را برای کشتن سلولهای تومور خیلی بیشتر از قبل می باشد (۹، ۵۴).



شکل ۲- پنج نسل سلولهای CAR-T و تفاوت آنها در دامنه سیگنالینگ

نسل چهارم CARها که نام دیگر آنها سلولهای T هدایت شده برای کشتن جهانی با واسطه سیتوکین<sup>۶۶</sup> (TRUCKS) می باشد، به جای  $OX-40/CD27$ ، حاوی یک دامنه از فاکتور هسته ای سلولهای T فعال<sup>۶۷</sup> (NFAT) هستند (۵۵). دامنه NFAT باعث ایجاد مقدار زیادی سیتوکین، به ویژه اینترلوکین<sup>۶۸</sup> (IL) های  $IL-12$ ،  $IL-15$  و فاکتور تحریک کننده کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ<sup>۶۹</sup> (GM-CSF) می شود که ریزمحیط ضد تومور را تعدیل می کند. نسل پنجم CAR های کنونی شامل قطعه ای از گیرنده  $IL-2$  ( $IL-2R\beta$ ) به جای  $OX-40/CD27$  است. قطعه  $IL-2R\beta$  می تواند تولید جانوس کیناز<sup>۷۰</sup> (JAKs) و مبدل سیگنال و فعال کننده رونویسی<sup>۷۱</sup> (STAT)-3/5 را القا کند (۱۰ و ۵۶). نسل پنجم CAR ها جهت بررسی ایمنی و کارایی در دست بررسی است (۱۰ و ۵۷).

درمان با سلول های CAR-T یک استراتژی کلی با استفاده از فناوری انتقال ژن برای برنامه ریزی مجدد سلولهای T بیماران و برای بیان یک CAR است که می تواند به آنتی ژنهای رایج متصل شود (۵۸). پس از ترانسفکشن لنفوسیت های T خون محیطی

<sup>66</sup> T cells redirected for universal cytokine-mediated killing

<sup>67</sup> nuclear factor of activated T cells

<sup>68</sup> interleukin

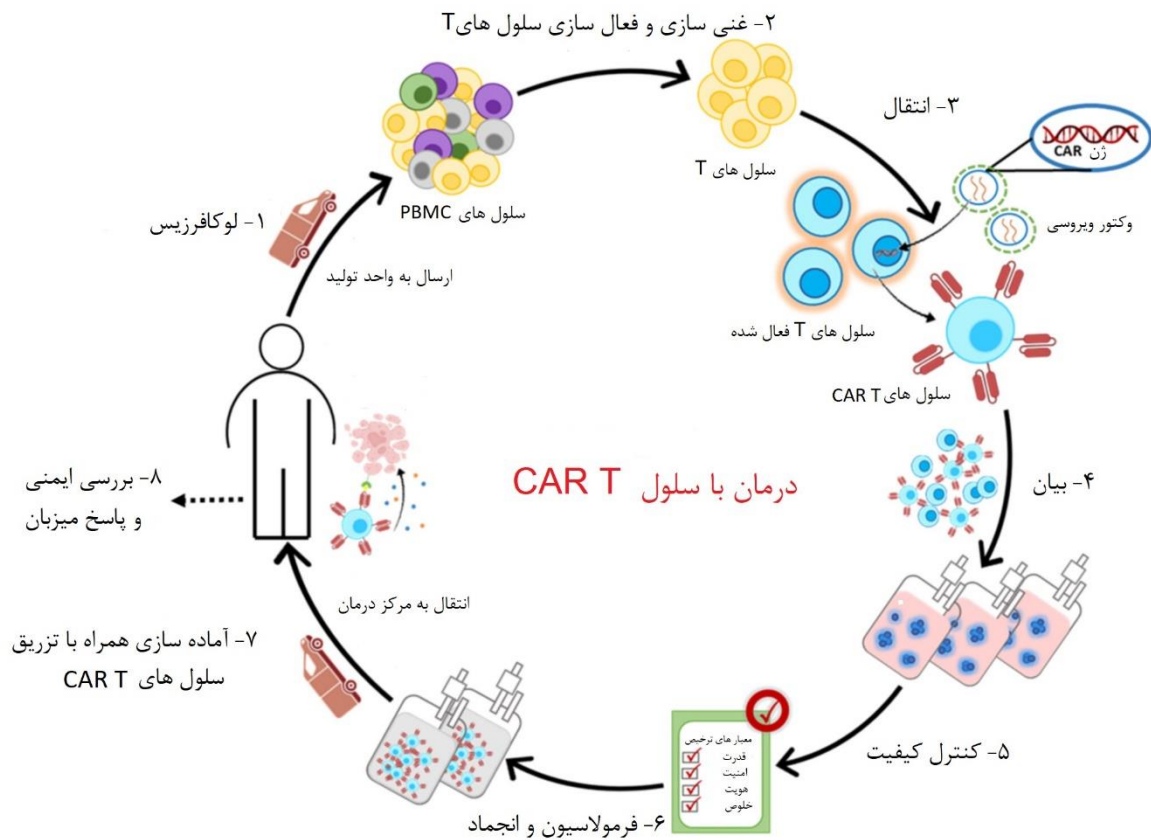
<sup>69</sup> granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

<sup>70</sup> Janus kinases

<sup>71</sup> signal transducer and activator of transcription

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

اتولوگ یا آلوژنیک با کمپلکس CAR، سلول‌های ترانسفکت شده به عنوان عوامل سیتوتوکسیک به بیمار تزریق می‌شوند و به سلول‌های سرطانی و یا سلول‌های هدف حمله می‌کنند (۵۹). فرآیند تزریق بالینی در (شکل ۳) نشان داده شده است. برخلاف درمان بدخیمی‌های خونی، درمان تومورهای جامد با سلول‌های CAR-T تاکنون موفقیت محدودی داشته است (۶۰). موانع موفقیت عبارتند از: ۱- سمیت روی هدف/خارج از تومور. ۲- سمیت عصبی. ۳- سندرم آزادسازی سیتوکین<sup>۷۲</sup> (CRS) ۴- کمبود آنتی ژن‌های خاص تومور ۵- ریزمحیط تومور<sup>۷۳</sup> (TME) سرکوب کننده سیستم ایمنی ۶- سطوح پایین نفوذ به بافت تومور و ۷- فرار آنتی ژن تومور (۳۹).



شکل

۳- مراحل درمان بیماران با سلول های CAR-T

### محدودیت‌های درمان با سلول‌های CAR-T

#### ۱- سمیت روی هدف/خارج از تومور

اگرچه سلول‌های CAR-T یک رویکرد امیدوارکننده برای درمان سرطان‌ها ارائه می‌کنند، اما سمیت آنها در عمل بالینی همچنان یک نگرانی است. سمیت روی هدف/خارج از تومور زمانی ایجاد می‌شود که سلول‌های CAR-T به یک آنتی ژن هدفمند روی سلول‌های طبیعی (خارج از تومور) متصل شوند. این به این دلیل اتفاق می‌افتد که بسیاری از TAAها مختص تومور نیستند. میزان اثر روی هدف/خارج از تومور بین بیماران و آنتی ژن‌ها، متفاوت است و ممکن است منجر به اختلالاتی شود که بر سیستم‌های

<sup>72</sup> cytokine-release syndrome

<sup>73</sup> tumor microenvironment

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

مختلف اندام (از جمله سیستم های ریوی، خونی و گوارشی) تاثیر گذاشته و حتی تهدید کننده زندگی باشد (۶۰). برای به حداقل رساندن این خطرات، CARها باید تا حد امکان انتخابی باشند. این را می توان با انتخاب آنتی ژن های ایمن تر (مانند EGFR نوع III و آنتی ژن های گلیکوزیله نابجا) به دست آورد (۶۱ و ۶۲).

#### ۲- سمیت عصبی

مسمومیت سیستم عصبی یک واکنش نامطلوب رایج به درمان سلول های CAR-T است و شامل گیجی و تشنج است (۶۳). NCI کورتیکواستروئیدهای با دوز بالا را برای درمان چنین سمیت های عصبی درجه ۳ که برای  $\leq 24$  ساعت ادامه دارند و برای همه سمیت های عصبی درجه ۴ توصیه می کند (۶۴).

#### ۳- سندرم آزادسازی سیتوکین (CRS)

CRS یک اثر نامطلوب عمده درمان با سلول های CAR-T است که باعث سمیت خطرناک و حتی تهدید کننده زندگی می شود (۹ و ۶۴). CRS با انتشار انواع سیتوکین های التهابی توسط سلول های T تزریق شده پس از شناسایی آنتی ژن مشخص می شود که منجر به افزایش قابل توجهی در سطح بیان  $TNF-\alpha$ ، پروتئین واکنشی C<sup>۴</sup>(CRP)، IL-2، IL-6، IL-8 و  $IFN-\gamma$  می گردد (۶۵). تب، خستگی، بی اشتها، افت فشار خون، اختلال عملکرد چند اندام و حتی مرگ ناگهانی به دلیل طوفان سیتوکین از عوارض دیگر CRS می باشند (۵۹ و ۶۴). تشخیص و مدیریت CRS برای سلامت بیمار بسیار مهم است و شواهد زیادی از استفاده از مهارکننده های مسیر IL-6، مانند توسیلیزوماب<sup>۷۵</sup> یا سیتوکسیماب<sup>۷۶</sup>، برای درمان CRS حمایت می کند (۶۶). اینفلکسیماب<sup>۷۷</sup> یکی دیگر از مهارکننده های سیتوکین است که باید به عنوان مهارکننده  $TNF-\alpha$  در نظر گرفته شود (۶۷).

#### ۴- کمبود آنتی ژن های اختصاصی تومور

در حال حاضر، موثرین راه برای درمان تومورهای جامد با سلول های CAR-T، شناسایی آنتی ژن های سطح سلولی خاص تومور است (۶۸). با این حال، ناهمگونی در ساختار بیولوژیکی تومورهای جامد یک عامل محدود کننده مهم است (۶۹). بنابراین، نیاز فوری به کشف TAAهای جدید برای بهبود کاربرد و ایمنی بالینی و همچنین حفظ فعالیت ضد توموری سلول های CAR-T وجود دارد. یک رویکرد درمان بیماران بهره گیری از عواملی است که بیان آنتی ژن هدف را افزایش می دهد. در یک مطالعه ی پیش بالینی، این رویکرد با استفاده از تمامی اسید های ترانس رتینوئیک برای افزایش بیان گیرنده فولات بتا در لوسمی میلوئید حاد دنبال شد (۷۰). در روش دیگر، از CAR مهندسی شده می توان برای افزایش فعالیت سلول های T در برابر آنتی ژن های موجود در تراکم پایین تر استفاده کرد. تغییری که معمولاً تا به امروز انجام شده است، کاهش میل ترکیبی scFv برای شناسایی ترجیحی هدف آن بوده است. یک گروه نشان داده اند که کاهش میل ترکیبی سلول های CAR-T ضد EGFR برای آنتی ژن هایشان باعث می شود سلول های T ترجیحاً سلول های بدخیم را تشخیص دهند، زیرا حاوی سطوح بالاتری از آنتی ژن نسبت به سلول های عادی هستند (۷۱).

#### ۵- ریز محیط تومور (TME) سرکوب کننده سیستم ایمنی

عوامل مرتبط با TME مانند هیپوکسی، کمبود آرژنین یا تریپتوفان، سرکوب سیتوکین های مشتق از تومور، اثربخشی بالینی سلول های CAR-T در درمان سرطان ها را توسط مهار سلول های T مختل می کنند. مطالعات نشان داده اند که از دست دادن

<sup>74</sup> C-reactive protein

<sup>75</sup> Tocilizumab

<sup>76</sup> Siltuximab

<sup>77</sup> Infliximab

سریع عملکرد سلول های CAR-T نقش درمانی آن را در TME سرکوب کننده سیستم ایمنی محدود می کند (۷۲، ۵۹). یک راه مفید، بهینه سازی سلول درمانی CAR-T در ترکیب با سایر درمان های سرطان است. اثر درمانی با سلول های CAR-T را می توان با ترکیب آن با مهارکننده های ایست بازرسی ایمنی افزایش داد که با ایجاد یک TME مطلوب تر، سرکوب سیستم ایمنی سلول های CAR-T را کاهش می دهد. بسیاری از آزمایش های بالینی در حال انجام، اتصال سلول های CAR-T به مهارکننده های ایست بازرسی را برای کاهش سرکوب سیستم ایمنی بررسی می کنند (۷۳ و ۷۴). سلول درمانی CAR-T را نیز می توان با بیان عوامل مرتبط با ایمنی افزایش داد. IL-12 یک سیتوکین تعدیل کننده سیستم ایمنی است که پاسخ ایمنی را از طریق سلول های کشنده طبیعی و سلول های T تحریک می کند. در مطالعه ای نشان داده شد که سلول های CAR-T مجهز به IL-12 می توانند از طریق غلبه بر TME سرکوب کننده سیستم ایمنی، عملکرد ضد تومور خود را اعمال کنند (۷۵).

#### ۶- سطوح پایین نفوذ به بافت تومور

برخی از مطالعات نشان داده اند که نفوذ سلول های CD3+ T، سلول های CD8+ T و لنفوسیت های B ارتباط نزدیکی با حضور زیاد ونول های اندوتلیال دارد. بیان بیش از حد گیرنده اندوتلین B و تنظیم پایین مولکول چسبندگی بین سلولی ICAM1<sup>۸</sup> نیز می تواند مانع از نفوذ سلول های T شود که به طور مستقیم کارایی ایمونوتراپی تومور را کاهش می دهد (۷۶). بنابراین، جذب بیشتر سلول های CAR-T به بافت های تومور، کارایی را افزایش می دهد. کموکارین ها به یک کلاس بزرگ از زیرخانواده سیتوکین ها تعلق دارند. اکثر کموکارین ها عملکرد کموتاکتیکی دارند و با اتصال به گیرنده های همولوگ خود مهاجرت سلولی را هدایت می کنند (۷۷). سلول های تومور، استرومایی و ایمنی، کموکارین ها را بیان می کنند. در حال حاضر، سیستم کموکارین (شامل کموکارین ها و گیرنده های مربوط به آنها) به یک هدف بالقوه جدید برای ایمونوتراپی سرطان تبدیل شده است (۷۸ و ۷۹). بنابراین، مسدود کردن کموکارین های مشتق از تومور و گیرنده های کموکارین که بیش از حد بیان می شوند، می تواند یک استراتژی ایده آل برای ایمونوتراپی سلول های CAR-T در میانجی گری مهاجرت سلولی برای بهبود نفوذ سلولی CAR-T به داخل تومور باشد (۳۹).

#### ۷- فرار آنتی ژن تومور

فرار آنتی ژن یک مکانیسم اصلی عود سرطان بوده و یک مانع کلیدی برای گسترش استفاده از سلول های CAR-T بر علیه سرطان های جامد با مجموعه های آنتی ژن سطحی متنوع آنها می باشد (۶۹). به طور معمول، سلول های T که دو یا چند مولکول CAR مستقل را بیان می کنند، عملکردهای ضد توموری موثرتری نسبت به سلول های T که یک مولکول CAR را بیان می کنند، دارند. با این حال، تفاوت این نوع سلول های CAR-T با انواع قبلی در این است که سلول های T را می توان به دو یا چند CAR مجهز کرد که TAA های مختلف را تشخیص دهند (۸۰).

#### چشم اندازهای آینده در مورد پیشگیری و درمان مسمومیت با سلول های CAR-T

امروزه بیشتر سمیت های مرتبط با سلول درمانی CAR-T بر روی کنترل علامتی رویدادهای پاتوفیزیولوژیکی، متمرکز هستند. اما استراتژی های امیدوارکننده متعددی برای مداخله درمانی در مراحل اولیه، با اعمال کنترل دقیق بر سلول های CAR-T، در حال بررسی می باشند که برخی از این موارد در زیر بیان شده است (شکل ۴).

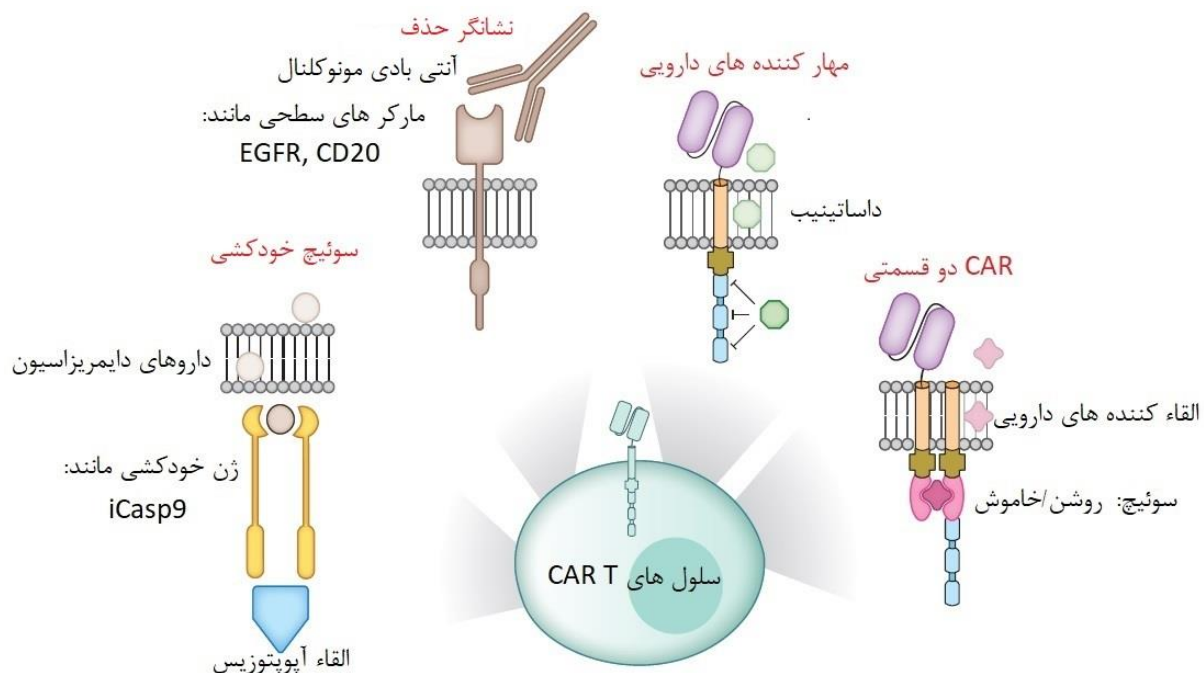


## ۱- کلید خودکشی

ادغام ژن های خودکشی در ساختار CAR امکان از بین بردن انتخابی سلول های CAR-T را در صورت نیاز فراهم می کند. از جمله کلیدهای خودکشی مرتبط بالینی، کاسپاز ۹ القایی<sup>۷۹</sup> (iCasp9) (۸۱-۸۳) و تیمیدیلات کیناز انسانی<sup>۸۰</sup> (۸۴) هستند در صورت واکنش شدید سیستم ایمنی میزبان به سلول های CAR-T و به خطر افتادن جان بیمار، با تجویز یک مولکول کوچک، مسیر آپوپتوز کاسپاز ۳ فعال شده و منجر به آپنوز سلول های CAR-T و تخلیه آنها از بدن بیمار می شود. شایان ذکر است، ژن خودکشی iCasp9 با موفقیت برای از بین بردن سلول های T بیان کننده iCasp9 در بیماران مبتلا به شروع بیماری پیوند در مقابل میزبان<sup>۸۱</sup> (GvHD) پس از دریافت پیوند سلول های بنیادی هاپلودیکال استفاده شده است (۸۱).

## ۲- نشانگر حذف

یک استراتژی جایگزین برای تامین سلول های CAR-T با سوئیچ ایمنی، ادغام یک اضافه کردن یک نشانگر حذف در ساختار CAR است. مولکول های سطحی که معمولاً روی سلول های T یافت نمی شوند، مانند CD20 (۸۵، ۸۶) یا گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) (۸۷، ۸۸)، می توانند به عنوان نشانگر حذف عمل کنند. سپس می توان از آنتی بادی های مونوکلونال تأیید شده بالینی مانند ریتوکسیماب<sup>۸۲</sup> یا ستوکسیماب<sup>۸۳</sup> برای القای کاهش تعداد سلول های CAR-T به واسطه آنتی بادی استفاده کرد. علاوه بر نقش آنها به عنوان نشانگرهای حذف، این مولکول های سطحی همچنین می توانند برای تسهیل شناسایی سلول های CAR T مثبت، در نمونه های بیمار استفاده شوند (۸۹).



<sup>79</sup> inducible caspase 9

<sup>80</sup> human thymidylate kinase

<sup>81</sup> graft-versus-host disease

<sup>82</sup> Rituximab

<sup>83</sup> Cetuximab

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

شکل ۴- استراتژی‌های آینده برای اعمال کنترل دقیق بر سلول‌های CAR-T

### ۳- مهارکننده‌های دارویی

نشان داده شده است که داساتینیب<sup>۸۴</sup>، مهارکننده تیروزین کیناز به طور برگشت پذیر از تکثیر و تولید سیتوکین سلول‌های CAR-T در مطالعات پیش بالینی بدون تأثیر منفی بر زنده ماندن آنها جلوگیری می‌کند. اثر داساتینیب بر سلول‌های T با مهار فسفوریلاسیون LCK (تیروزین کیناز اختصاصی لنفوسیت<sup>۸۵</sup>) و مسدود کردن انتقال سیگنال سلول T منتقل می‌شود. بنابراین، هم سلول‌های CAR-T و هم سلول‌های T طبیعی را سرکوب می‌کند. مشخص نیست که آیا استفاده از داساتینیب به عنوان یک داروی اورژانسی در بیماران با سمیت ثابت مفید است یا خیر، زیرا داساتینیب در مهار سلول‌های CAR-T که قبلاً فعال شده بودند، کارایی کمتری داشت. با این وجود، داساتینیب در مهار فعال سازی بیشتر سلول‌های T در یک مدل پیش بالینی از کور تیکوآستروئیدها بهتر عمل کرد (۸۹ و ۹۰).

### ۴- CAR دو قسمتی<sup>۸۶</sup>

سلول‌های CAR-T دو قسمتی یا به اصطلاح اسپلیت CAR ممکن است امکان تعدیل حتی دقیق‌تر فعالیت سلول‌های CAR-T را فراهم کند. در یک CAR دو قسمتی، اجزای عملکردی CAR به دو بخش جدا می‌شوند و استفاده از یک القاکننده دارویی، یکپارچگی عملکردی CAR را فعال (سوئیچ روشن) یا غیرفعال (سوئیچ خاموش) می‌کند. در طراحی CAR سوئیچ روشن، دو جزء اسپلیت CAR تنها در حضور یک مولکول کوچک کنار هم جمع شده و سلول CAR-T فعال می‌شود (۹۱ و ۹۲). برعکس، در طراحی CAR با کلید خاموش، اجزای CAR به طور خود به خود جمع می‌شوند اما می‌توانند توسط یک مولکول کوچک از هم جدا شده و سلول غیر فعال شود (۹۳).

### نتیجه گیری

سلول‌های CAR-T سلول‌های مهندسی شده ژنتیکی هستند که برای هدف‌های کاملاً خاص در درمان سرطان‌ها، بیماری‌های خود ایمنی و همچنین بیماری‌های ویروسی طراحی می‌شوند. لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک به طور کاملاً اختصاصی بر علیه آنتی ژن‌های داخل سلولی در بدن تولید شده و عملکرد آنها کاملاً وابسته به عرضه آنتی ژن‌های پروتئینی بر روی ساختار MHC می‌باشد که نهایتاً پس از شناسایی اپی توپ‌های اختصاصی بر روی آنتی ژن هدف با مکانیسم پرفورین و گرانزیم سلول هدف را از بین می‌برند. در صورتی که ساختارهای سلولی CAR-T قادر به شناسایی هر نوع هدف آنتی ژنی (پروتئینی، لیپیدی، کربوهیدراتی و...) و بدون وابستگی به MHC هستند که از این لحاظ به ساختار آنتی بادی‌ها شباهت دارند. با تمامی قابلیت‌های سلول‌های CAR-T در شناسایی و از بین بردن اهداف خاص و آینده امیدوار کننده این سلول‌ها در یافتن درمان‌های قطعی برای بیماری‌های صعب‌العلاج، این سلول‌ها دارای معایبی نیز هستند که پیشرفت علمی منجر به شناسایی این عیوب و تلاش برای رفع این نقص‌ها می‌باشد. لذا با تمامی این اوصاف، هنوز سلول‌های CAR-T نوید بخش آینده روشنی برای درمان بیماری‌های صعب‌العلاج و لاعلاج هستند.

<sup>84</sup> Dasatinib

<sup>85</sup> Lymphocyte-specific tyrosine kinase

<sup>86</sup> Split CAR

## References:

1. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer discovery*. 2013; 3(4): 388-98.
2. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015; 348(6230): 62-8.
3. Titov A, Valiullina A, Zmievskaia E, Zaikova E, Petukhov A, Miftakhova R, et al. Advancing CAR T-cell therapy for solid tumors: lessons learned from lymphoma treatment. *Cancers*. 2020; 12(1): 125.
4. Ying Z, Huang XF, Xiang X, Liu Y, Kang X, Song Y, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nature medicine*. 2019; 25(6): 947-53.
5. Patel AJ, Richter A, Drayson MT, Middleton GW. The role of B lymphocytes in the immunobiology of non-small-cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2020; 69: 325-42.
6. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2017; 377(26): 2531-44.
7. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2018; 378(5): 439-48.
8. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *New England Journal of Medicine*. 2017; 377(26): 2545-54.
9. D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L, Alimandi M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell death & disease*. 2018; 9(3): 282.
10. Kim DW, Cho J-Y. Recent advances in allogeneic CAR-T cells. *Biomolecules*. 2020; 10(2): 263.
11. Zmievskaia E, Valiullina A, Ganeeva I, Petukhov A, Rizvanov A, Bulatov E. Application of CAR-T cell therapy beyond oncology: autoimmune diseases and viral infections. *Biomedicines*. 2021; 9(1): 59.
12. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine*. 2015; 278(4): 369-95.
13. Ellebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, Choi EJ, Mao X, Cho MJ, et al. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science*. 2016; 353(6295): 179-84.
14. Parvathaneni K, Scott DW. Engineered FVIII-expressing cytotoxic T cells target and kill FVIII-specific B cells in vitro and in vivo. *Blood Advances*. 2018; 2(18): 2332-40.
15. Fishman S, Lewis MD, Siew LK, De Leenheer E, Kakabadse D, Davies J, et al. Adoptive transfer of mRNA-transfected T cells redirected against diabetogenic CD8 T cells can prevent diabetes. *Molecular Therapy*. 2017; 25(2): 456-64.
16. Zhang L, Sosinowski T, Cox AR, Cepeda JR, Sekhar NS, Hartig SM, et al. Chimeric antigen receptor (CAR) T cells targeting a pathogenic MHC class II: peptide complex modulate the progression of autoimmune diabetes. *Journal of Autoimmunity*. 2019; 96: 50-8.
17. Tenspolde M, Zimmermann K, Weber LC, Hapke M, Lieber M, Dywicki J, et al. Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes. *Journal of Autoimmunity*. 2019; 103: 102289.

18. Seif M, Einsele H, Löffler J. CAR T cells beyond cancer: hope for immunomodulatory therapy of infectious diseases. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 2711.
19. Masiero S, Del Vecchio C, Gavioli R, Mattiuzzo G, Cusi MG, Micheli L, et al. T-cell engineering by a chimeric T-cell receptor with antibody-type specificity for the HIV-1 gp120. *Gene therapy*. 2005; 12(4): 299-310.
20. Liu B, Zhang W, Zhang H. Development of CAR-T cells for long-term eradication and surveillance of HIV-1 reservoir. *Current opinion in virology*. 2019; 38: 21-30.
21. Sahu GK, Sango K, Selliah N, Ma Q, Skowron G, Junghans RP. Anti-HIV designer T cells progressively eradicate a latently infected cell line by sequentially inducing HIV reactivation then killing the newly gp120-positive cells. *Virology*. 2013; 446(1-2): 268-75.
22. Leibman RS, Richardson MW, Ellebrecht CT, Maldini CR, Glover JA, Secreto AJ, et al. Supraphysiologic control over HIV-1 replication mediated by CD8 T cells expressing a re-engineered CD4-based chimeric antigen receptor. *PLoS pathogens*. 2017; 13(10): e1006613.
23. Ali A, Kitchen SG, Chen IS, Ng HL, Zack JA, Yang OO. HIV-1-specific chimeric antigen receptors based on broadly neutralizing antibodies. *Journal of virology*. 2016; 90(15): 6999-7006.
24. Liu B, Zou F, Lu L, Chen C, He D, Zhang X, et al. Chimeric antigen receptor T cells guided by the single-chain Fv of a broadly neutralizing antibody specifically and effectively eradicate virus reactivated from latency in CD4+ T lymphocytes isolated from HIV-1-infected individuals receiving suppressive combined antiretroviral therapy. *Journal of virology*. 2016; 90(21): 9712-24.
25. Hale M, Mesojednik T, Ibarra GSR, Sahni J, Bernard A, Sommer K, et al. Engineering HIV-resistant, anti-HIV chimeric antigen receptor T cells. *Molecular therapy*. 2017; 25(3): 570-9.
26. Liu L, Patel B, Ghanem MH, Bundoc V, Zheng Z, Morgan RA, et al. Novel CD4-based bispecific chimeric antigen receptor designed for enhanced anti-HIV potency and absence of HIV entry receptor activity. *Journal of virology*. 2015; 89(13): 6685-94.
27. Ghanem MH, Bolivar-Wagers S, Dey B, Hajduczki A, Vargas-Inchaustegui DA, Danielson DT, et al. Bispecific chimeric antigen receptors targeting the CD4 binding site and high-mannose Glycans of gp120 optimized for anti-human immunodeficiency virus potency and breadth with minimal immunogenicity. *Cytherapy*. 2018; 20(3): 407-19.
28. Talbot SJ, Blair NF, McGill N, Ligertwood Y, Dutia BM, Johannessen I. An influenza virus M2 protein specific chimeric antigen receptor modulates influenza A/WSN/33 H1N1 infection in vivo. *The Open Virology Journal*. 2013; 7: 28.
29. Krebs K, Böttinger N, Huang LR, Chmielewski M, Arzberger S, Gasteiger G, et al. T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. *Gastroenterology*. 2013; 145(2): 456-65.
30. Festag MM, Festag J, Fräßle SP, Asen T, Sacherl J, Schreiber S, et al. Evaluation of a fully human, hepatitis B virus-specific chimeric antigen receptor in an immunocompetent mouse model. *Molecular Therapy*. 2019; 27(5): 947-59.
31. Kruse RL, Shum T, Tashiro H, Barzi M, Yi Z, Whitten-Bauer C, et al. HBsAg-redirected T cells exhibit antiviral activity in HBV-infected human liver chimeric mice. *Cytherapy*. 2018; 20(5): 697-705.
32. Sautto GA, Wisskirchen K, Clementi N, Castelli M, Diotti RA, Graf J, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells redirected against hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein. *Gut*. 2015; 65(3): 512-23.

33. Golchin A. Cell-based therapy for severe COVID-19 patients: clinical trials and cost-utility. *Stem cell reviews and reports*. 2021; 17: 56-62.
34. Ma M, Badeti S, Geng K, Liu D. Efficacy of targeting SARS-CoV-2 by CAR-NK cells. *BioRxiv*. 2020; 11: 247320.
35. England JT, Abdulla A, Biggs CM, Lee AY, Hay KA, Hoiland RL, et al. Weathering the COVID-19 storm: lessons from hematologic cytokine syndromes. *Blood Reviews*. 2021; 45: 100707.
36. Hoiland RL, Stukas S, Cooper J, Thiara S, Chen LY, Biggs CM, et al. Amelioration of COVID-19-related cytokine storm syndrome: parallels to chimeric antigen receptor-T cell cytokine release syndrome. *British Journal of Haematology*. 2020; 190(3): e150.
37. Srivastava S, Riddell SR. Engineering CAR-T cells: design concepts. *Trends in immunology*. 2015; 36(8): 494-502.
38. Zhang G, Wang L, Cui H, Wang X, Zhang G, Ma J, et al. Anti-melanoma activity of T cells redirected with a TCR-like chimeric antigen receptor. *Scientific reports*. 2014; 4(1): 3571.
39. Qu J, Mei Q, Chen L, Zhou J. Chimeric antigen receptor (CAR)-T-cell therapy in non-small-cell lung cancer (NSCLC): current status and future perspectives. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2021; 70: 619-31.
40. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer immunology research*. 2015; 3(2): 125-35.
41. Jensen MC, Riddell SR. Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. *Current opinion in immunology*. 2015; 33: 9-15.
42. Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies DM, Julien S, Cooper L, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *The Journal of Immunology*. 2008; 180(7): 4901-9.
43. James SE, Greenberg PD, Jensen MC, Lin Y, Wang J, Till BG, et al. Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane. *The Journal of Immunology*. 2008; 180(10): 7028-38.
44. Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O'Neill A, et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *Journal of immunotherapy*. 2005; 28(3): 203-11.
45. Hombach A, Hombach A, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene therapy*. 2010; 17(10): 1206-13.
46. Almåsbak H, Walseng E, Kristian A, Myhre M, Suso E, Munthe L, et al. Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model. *Gene therapy*. 2015; 22(5): 391-403.
47. Bridgeman JS, Hawkins RE, Bagley S, Blaylock M, Holland M, Gilham DE. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3 $\zeta$  transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *The Journal of Immunology*. 2010; 184(12): 6938-49.
48. Guedan S, Posey Jr AD, Shaw C, Wing A, Da T, Patel PR, et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI insight*. 2018; 3(1): 96976.

49. Zhang T, Wu M-R, Sentman CL. An NKp30-based chimeric antigen receptor promotes T cell effector functions and antitumor efficacy in vivo. *The Journal of Immunology*. 2012; 189(5): 2290-9.
50. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological reviews*. 2014; 257(1): 107-26.
51. Alabanza L, Pegues M, Geldres C, Shi V, Wiltzius JJ, Sievers SA, et al. Function of novel anti-CD19 chimeric antigen receptors with human variable regions is affected by hinge and transmembrane domains. *Molecular Therapy*. 2017; 25(11): 2452-65.
52. MacKay M, Afshinnekoo E, Rub J, Hassan C, Khunte M, Baskaran N, et al. The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors. *Nature biotechnology*. 2020; 38(2): 233-44.
53. Firor AE, Jares A, Ma Y. From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy. *Experimental biology and medicine*. 2015; 240(8): 1087-98.
54. Guedan S, Ruella M, June CH. Emerging cellular therapies for cancer. *Annual review of immunology*. 2019; 37: 145-71.
55. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert opinion on biological therapy*. 2015; 15(8): 1145-54.
56. Zhao L, Cao YJ. Engineered T cell therapy for cancer in the clinic. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 2250.
57. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *British journal of cancer*. 2019; 120(1): 26-37.
58. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018; 359(6382): 1361-5.
59. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nature reviews Clinical oncology*. 2020; 17(3): 147-67.
60. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy-Oncolytics*. 2016; 3: 16011.
61. Morgan RA, Johnson LA, Davis JL, Zheng Z, Woolard KD, Reap EA, et al. Recognition of glioma stem cells by genetically modified T cells targeting EGFRvIII and development of adoptive cell therapy for glioma. *Human gene therapy*. 2012; 23(10): 1043-53.
62. Posey AD, Schwab RD, Boesteanu AC, Steentoft C, Mandel U, Engels B, et al. Engineered CAR T cells targeting the cancer-associated Tn-glycoform of the membrane mucin MUC1 control adenocarcinoma. *Immunity*. 2016; 44(6): 1444-54.
63. Wang Z, Guo Y, Han W. Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment. *Protein & cell*. 2017; 8(12): 896-925.
64. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016; 127(26): 3321-30.
65. Abken H. Driving CARs on the highway to solid cancer: some considerations on the adoptive therapy with CAR T cells. *Human Gene Therapy*. 2017; 28(11): 1047-60.
66. Chen F, Teachey DT, Pequignot E, Frey N, Porter D, Maude SL, et al. Measuring IL-6 and sIL-6R in serum from patients treated with tocilizumab and/or siltuximab following CAR T cell therapy. *Journal of immunological methods*. 2016; 434: 1-8.

67. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014; 124(2): 188-95.
68. Martinez M, Moon EK. CAR T cells for solid tumors: new strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 128.
69. Kailayangiri S, Altvater B, Wiebel M, Jamitzky S, Rossig C. Overcoming heterogeneity of antigen expression for effective CAR T cell targeting of cancers. *Cancers*. 2020; 12(5): 1075.
70. Lynn RC, Poussin M, Kalota A, Feng Y, Low PS, Dimitrov DS, et al. Targeting of folate receptor  $\beta$  on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015; 125(22): 3466-76.
71. Caruso HG, Hurton LV, Najjar A, Rushworth D, Ang S, Olivares S, et al. Tuning sensitivity of CAR to EGFR density limits recognition of normal tissue while maintaining potent antitumor activity. *Cancer research*. 2015; 75(17): 3505-18.
72. Kiesgen S, Chicaybam L, Chintala NK, Adusumilli PS. Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for thoracic malignancies. *Journal of Thoracic Oncology*. 2018; 13(1): 16-26.
73. Prelaj A, Tay R, Ferrara R, Chaput N, Besse B, Califano R. Predictive biomarkers of response for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer. *European journal of cancer*. 2019; 106: 144-59.
74. Li J, Li W, Huang K, Zhang Y, Kupfer G, Zhao Q. Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward. *Journal of hematology & oncology*. 2018; 11: 1-18.
75. Yeku OO, Purdon TJ, Koneru M, Spriggs D, Brentjens RJ. Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment. *Scientific reports*. 2017; 7(1): 10541.
76. Vedvyas Y, McCloskey JE, Yang Y, Min IM, Fahey TJ, Zarnegar R, et al. Manufacturing and preclinical validation of CAR T cells targeting ICAM-1 for advanced thyroid cancer therapy. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 10634.
77. Mollica Poeta V, Massara M, Capucetti A, Bonecchi R. Chemokines and chemokine receptors: new targets for cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 379.
78. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2017; 17(9): 559-72.
79. Do HTT, Lee CH, Cho J. Chemokines and their receptors: multifaceted roles in cancer progression and potential value as cancer prognostic markers. *Cancers*. 2020; 12(2): 287.
80. Majzner RG, Mackall CL. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy. *Cancer discovery*. 2018; 8(10): 1219-26.
81. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365(18): 1673-83.
82. Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*. 2005; 105(11): 4247-54.
83. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010; 24(6): 1160-70.
84. Sato T, Neschadim A, Konrad M, Fowler DH, Lavie A, Medin JA. Engineered human tmpk/AZT as a novel enzyme/prodrug axis for suicide gene therapy. *Molecular Therapy*. 2007; 15(5): 962-70.

85. Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B, et al. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014; 124(8): 1277-87.
86. Vogler I, Newrzela S, Hartmann S, Schneider N, Von Laer D, Koehl U, et al. An improved bicistronic CD20/tCD34 vector for efficient purification and in vivo depletion of gene-modified T cells for adoptive immunotherapy. *Molecular Therapy*. 2010; 18(7): 1330-8.
87. Paszkiewicz PJ, Fräßle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, Drexler I, et al. Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *The Journal of clinical investigation*. 2016; 126(11): 4262-72.
88. Wang X, Chang W-C, Wong CW, Colcher D, Sherman M, Ostberg JR, et al. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2011; 118(5): 1255-63.
89. Weber EW, Lynn RC, Sotillo E, Lattin J, Xu P, Mackall CL. Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Advances*. 2019; 3(5): 711-7.
90. Mestermann K, Giavridis T, Weber J, Rydzek J, Frenz S, Nerretter T, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Science translational medicine*. 2019; 11(499): 5907.
91. Wu C-Y, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*. 2015; 350(6258): 4077.
92. Mata M, Gerken C, Nguyen P, Krenciute G, Spencer DM, Gottschalk S. Inducible activation of MyD88 and CD40 in CAR T cells results in controllable and potent antitumor activity in preclinical solid tumor models. *Cancer discovery*. 2017; 7(11): 1306-19.
93. Giordano-Attianese G, Gainza P, Gray-Gaillard E, Cribioli E, Shui S, Kim S, et al. A computationally designed chimeric antigen receptor provides a small-molecule safety switch for T-cell therapy. *Nature biotechnology*. 2020; 38(4): 426-32.



## piRNA از تولید تا عملکرد

مریم صفرپور دهکردی<sup>۱</sup>، فریبا شاکری<sup>۱</sup>، نوشین صمیمی دهکردی<sup>۱</sup>، مهدی روشنیان<sup>۱</sup>، امین بختیاری<sup>۱</sup>

پریسا محمدی نژاد<sup>۱\*</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

piRNA از دسته RNAهایی هستند که با پروتئین‌های Piwi ارتباط دارند. پروتئین‌های Piwi اصولاً در ژرم لاین بیان می‌شوند و مورد نیاز اسپرماتوزون هستند. پروتئین‌های Piwi قادر هستند piRNAها را تثبیت کنند. piRNA عمدتاً در بیضه‌ها یافت می‌شود. آنها می‌توانند به تعداد یک میلیون کپی در سلول‌های اسپرماتوسیت یا اسپرماتید وجود داشته باشند و در هسته و سیتوپلاسم قرار گرفته‌اند. ترکیب piRNA و پروتئین‌های Piwi منجر به خاموشی عناصر متحرک ژنتیکی (ترانسپوزون‌ها) می‌شود. این امر از طریق خاموشی ژن پس از رونویسی و رونویسی به دست می‌آید. عناصری که منجر به piRNA می‌شوند نیازمند نسخه‌برداری تخصصی هستند زیرا زیست زایی piRNA یک فرآیند سیتوپلاسمی است. چرخه پینگ پونگ، یک مکانیسم خاموشی پس از رونویسی، خاموشی وابسته به تقسیم RNA های ترانسپوزون را با تولید piRNA ترکیب می‌کند. عناصر ترانسپوزون توسط پروتئین‌های Piwi در ارتباط با piRNA برش داده می‌شوند. اگر غلظت پروتئین‌های Piwi کاهش یابد تعداد ترانسپوزون‌ها افزایش می‌یابد. جدیدترین تکنیک‌های مولکولی این امکان را فراهم نموده‌اند که نقش بیماری زایی piRNAها را مورد بررسی قرار دهیم. با وجود اینکه الگوهای بیانی بسیاری از RNAهای کوچک غیر کد کننده همچون miRNA-ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند هنوز نقش بسیاری از piRNAها در بیماریها به خصوص سرطانها مشخص نشده است. تاکنون نوع بیانی تعدادی از piRNAها در سرطانهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است اما بررسی‌های بیشتری نیاز است تا نقش این piRNAها در سرطان‌زایی یا مهار سرطان‌ها مشخص شود. در این بررسی، ما درک کنونی خود از مکانیسم‌های درگیر در تولید زیستی و عملکرد piRNA را خلاصه می‌کنیم.

واژگان کلیدی: piRNA، Piwi، ترانسپوزون

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۲۳۴۵۶۵۴۳۲

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: parisa\_mohamadynejad@yahoo.com

## piRNA from production to function

Maryam Safarpour Dehkordi<sup>1</sup>, Fariba Shakri<sup>1</sup>, Noushin Samimi Dehkordi<sup>1</sup>, Mehdi Roshnian<sup>1</sup>, Amin Bakhtiari<sup>1</sup>, Parisa Mohammadi-Nejad<sup>1\*</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

piRNAs are RNAs that are related to Piwi proteins. Piwi proteins are primarily expressed in the germline and are required for spermatogenesis. Piwi proteins are able to stabilize piRNAs. piRNA is mainly found in the testes. They can exist as many as one million copies in spermatocyte or spermatid cells and are located in the nucleus and cytoplasm. The combination of piRNA and Piwi proteins leads to silencing of mobile genetic elements (transposons). This is achieved through post-transcriptional and transcriptional gene silencing. Elements that give rise to piRNAs require specialized transcription because piRNA biogenesis is a cytoplasmic process. The ping-pong cycle, a post-transcriptional silencing mechanism, combines splicing-dependent silencing of transposon RNAs with piRNA production. Transposon elements are cut by Piwi proteins in association with piRNA. If the concentration of Piwi proteins decreases, the number of transposons increases. The latest molecular techniques have made it possible to investigate the pathogenic role of piRNAs. Even though the expression patterns of many small non-coding RNAs such as miRNAs have been investigated, the role of many piRNAs in diseases, especially cancers, has not yet been determined. So far, the expression variation of a number of piRNAs in different cancers has been studied, but more studies are needed to determine the role of these piRNAs in carcinogenesis or cancer inhibition. In this review, we summarize our current understanding of the mechanisms involved in piRNA bioproduction and function.

**Keywords:** piRNA, Piwi, transposon

### مقدمه

RNAهای غیر کدکننده<sup>۸۷</sup> (ncRNAs) نقش بسیار مهمی در جنبه‌های مختلف زیستی دارا می‌باشند از جمله در تمایز سلولها و ظرفیت چند توانی<sup>۸۸</sup> آنها (۱-۴). برخلاف RNAهای کدکننده این نوع از RNAها یا در سیتوپلاسم از طریق تنظیم mRNAها در تنظیم پروتئینها دخالت می‌کنند یا در هسته با اتصال به DNA در خاموش کردن ژنها نقش دارند. آنها را بر اساس اندازه می‌توان در گروههای زیر تقسیم کرد: RNAهای غیر کدکننده بلند<sup>۸۹</sup> (lncRNAs) با اندازه‌ای بزرگتر از ۲۰۰ bp ، RNAهای غیر کدکننده کوچک<sup>۹۰</sup> (sncRNAs) که خود شامل miRNAs, siRNAs, piRNAs, scnRNAs, PASRs, TASRs, diRNAs و tiRNAs و endo-siRNA می‌باشند و اندازه آنها کوچکتر از ۲۰۰ bp می‌باشد (۵-۱۱). در گذشته lncRNAها به عنوان تنظیم کننده‌های مهمی در فرآیندهای زیستی از DNA به RNA و از آن به پروتئین در نظر گرفته می‌شدند. تا کنون بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ lncRNA در انسانها شناسایی شده است که عملکرد بیشتر آنها ناشناخته مانده است و اطلاعات علمی در مورد عملکرد و نقش آنها در بیماریهای انسانی کم می‌باشد (۵، ۱۲).

سه دسته از ncRNAها در اسپرماتوژنز بیان می‌شوند: miRNAها، endo-siRNAها و piRNAها که miRNAها شناخته شده‌ترین آنها می‌باشند. (۱۳، ۱۴).

گروهی از ncRNAها در متیله کردن مستقیم DNA دخالت دارند.

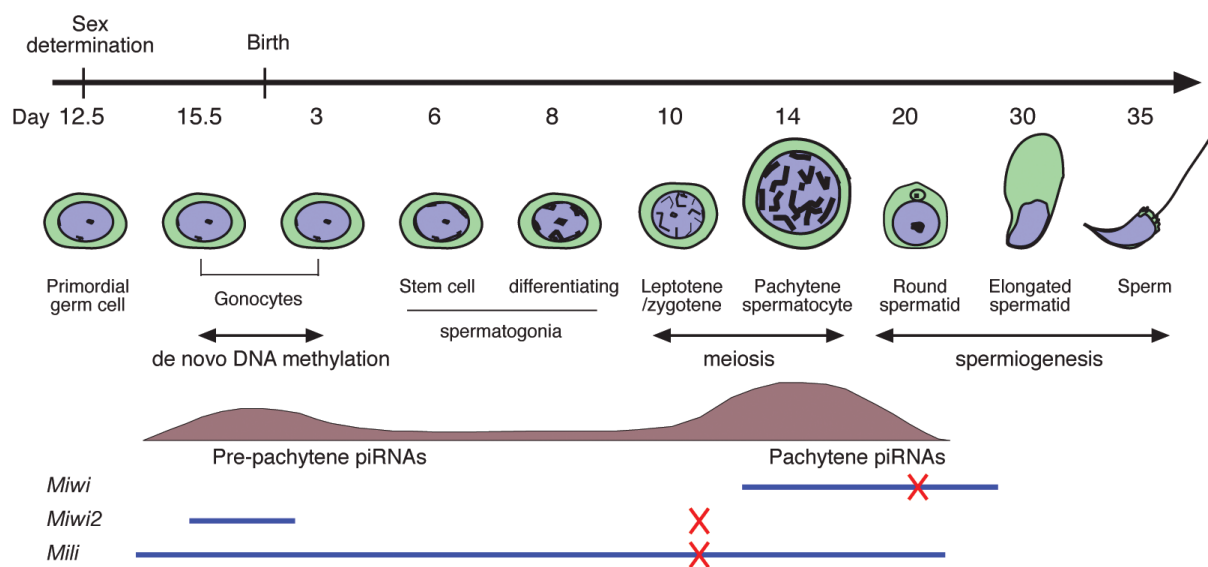
در این مسیر رونوشت‌های ترنسپوزونها و سایر توالیهای تکراری جهت تولید siRNAها به کار می‌روند. siRNAها در هدایت مجموعه پروتئینی جهت متیله کردن توالی هدف مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۵-۱۷). گروه دیگری از ncRNAها که بیشترین بیان را در اسپرماتوژنز دارند اما کمتر شناخته شده می‌باشند piRNAها هستند (۱۸، ۱۹). این گروه که به تازگی شناسایی شده‌اند، توالیهای

- 87 non-coding RNAs
- 88 pluripotency
- 89 long noncoding RNAs
- 90 small noncoding RNAs

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

تک رشته به طول ۲۳-۳۶ نوکلئوتید می‌باشند. piRNAها در مراحل اولیه جنین زایی در سلول‌های جنسی و بنیادی با پروتئینهای PIWI واکنش داده تا واحدهای متحرک<sup>۹۱</sup> در ژنوم را در سطح رونویسی خاموش کنند (۲۰، ۲۱). آنها در مراحل مختلف اسپرماتوژنز شامل متیلاسیون مجدد<sup>۹۲</sup> DNA، میوز و اسپرمیوژنز<sup>۹۳</sup> فعالیت دارند (شکل ۱). در برنامه ریزی مجدد ژنوم تمامی نشانهای متیلاسیون در سلولهای جنسی پاک می‌شوند و مجدد متیله می‌شوند. از بین رفتن متیلاسیون مجدد باعث فعالسازی ژنهایی می‌شود که در حالت معمول غیرفعال هستند مثل ترنسپوزونها و در این حالت ژنوم مستعد آسیبهای زیادی می‌شود (۲۲). piRNAها برای خاموش کردن ترنسپوزونها مورد نیاز می‌باشند. در این مقاله مروری بر داده‌های موجود در مورد piRNAها، چگونگی ساخت آنها، عملکرد و نقش آنها در سرطان فراهم شده است. در این مطالعه سعی شده است تا بیشتر مسیرها و داده‌های در ارتباط با پستانداران مورد بررسی قرار بگیرند.



شکل ۱: بیان piRNAها در اسپرماتوژنز موشها. piRNAهای پاکیتن در اسپرماتوسیت‌های موجود در مرحله پاکیتن و اسپرماتیدها مشاهده می‌شوند. MIWI در اسپرماتوسیت‌های موجود در مرحله پاکیتن و اسپرماتیدها مشاهده می‌شود. MIWI2 در pro-spermatogonia و MILI از مرحله pro-spermatogonia تا اسپرماتید دیده می‌شود (۲۳).

### piRNAها

piRNAها برای اولین بار در رده سلولهای جنسی دروزوفیلا به عنوان RNAهای کوچک رونویسی شده از واحدهای تکراری مثل رتروترنسپوزونها<sup>۹۴</sup>، DNA ترنسپوزونها و جایگاههای Su<sup>۹۵</sup> دیده شد. پس از آن piRNAها در سایر جانداران چندسلولی مثل موشها، گورخرماهی و کرم ابریشم شناسایی شد (۲۴-۳۱). در هر گونه هزاران piRNA وجود دارد و توالی آنها در میان گونه‌های مختلف حفظ شده نمی‌باشد (۳۲). piRNAها با طول ۲۵-۳۰ نوکلئوتید از نظر اندازه با miRNAها و siRNAها (۲۴-۲۱ نوکلئوتید) تفاوت دارند. انتهای ۵' آنها تمایل زیادی به حضور یوریدین دارد، در حالی که انتهای ۳' آنها در ۲-O' متیله می‌باشد (۲۴، ۲۶، ۳۳، ۳۴). با توجه به منشأ piRNAها می‌توان آنها را به سه دسته تقسیم نمود: piRNAهای مشتق شده از ترنسپوزونها

91 transposable elements

92 de novo DNA methylation

93 spermiogenesis

94 Retrotransposons

95 Su locus

که از هر دو رشته DNA رونویسی می‌شوند و piRNAهای رشته کد کننده<sup>۹۶</sup> و غیر کد کننده<sup>۹۷</sup> را تولید می‌کنند. piRNAهای مشتق شده از mRNA که همیشه نسبت به mRNA، دارای توالی رشته کد کننده می‌باشند و اغلب از 3'UTRها منشأ می‌گیرند. در نهایت piRNAهای منشأ گرفته از lncRNAها که از تمام رونوشت تولید شده منشأ می‌گیرند (۱۵-۱۷، ۲۰، ۲۱، ۳۵، ۳۶). در طول اسپرماتوژنز موش دو دسته از piRNAها تولید می‌شوند که شامل: piRNAهای پیش پاکتین<sup>۹۸</sup> و piRNAهای پاکتین<sup>۹۹</sup> می‌باشند (شکل ۱).

### piRNAهای پیش پاکتین

piRNAهای پیش پاکتین در pro-spermatogonia و در سلولهای جنسی مردانه تا لحظه تقسیم میوزی حضور دارند. آنها در حدود پنج درصد از piRNAهای شناخته شده را تشکیل می‌دهند و می‌توان آنها را در دو گروه قرار داد: fetal pre-pachytene piRNAs و postnatal pre-pachytene piRNAs (۲۵، ۳۷، ۳۸). fetal pre-pachytene piRNAها بیشترین مقدار از piRNAهای پیش پاکتینی را تشکیل می‌دهند که در pro-spermatogonia بیان می‌شوند و با پروتئینهای PIWI، PIWIL2 (MILI) و PIWIL4 (MIWI2) در ارتباط هستند. تقریباً نیمی از این piRNAها از واحدهای متحرک<sup>۱۰۰</sup> تشکیل شده‌اند. MILI به طور پیش فرض به piRNAهایی متصل می‌شود که هم توالی با واحدهای متحرک هستند در حالی که MIWI2 به piRNAهایی متصل می‌شود که توالی آنها مکمل واحدهای متحرک می‌باشد. درصد کمی از pre-pachytene piRNAها (۳٪) از ژنهای کد کننده اگزونهای پروتئینی منشأ گرفته‌اند. Postnatal pre-pachytene piRNAها فقط با MILI در ارتباط هستند و مانند fetal pre-pachytene piRNAها تقریباً نیمی از آنها از واحدهای انتقال پذیر تشکیل شده‌اند. درصد بیشتری از fetal pre-pachytene piRNAها (۲۰٪) نسبت به Postnatal pre-pachytene piRNAها از اگزونهای ژنهای کد کننده پروتئینها منشأ می‌گیرند (۲۵).

### piRNAهای پاکتین

دومین دسته از piRNAها شامل ۹۵٪ از piRNAهای شناخته شده می‌باشد (۲۴، ۲۷، ۳۴، ۳۷-۳۹). آنها در پاکتین اسپرماتوسیتها و اسپرماتیدها قرار دارند. این گروه از piRNAها با پروتئینهای PIWI، MILI و PIWIL1 در ارتباط هستند. برخلاف piRNAهای پیش پاکتین بیشتر piRNAهای پاکتین از توالیهای غیر تکراری به نام شاخه‌های piRNAهای پاکتین<sup>۱۰۱</sup> منشأ گرفته‌اند (۲۷، ۳۸). این piRNAها هیچ گونه هدف مشخصی ندارند و این طور فرض می‌شود که نتیجه تجزیه محصولات RNAهای غیر کد کننده بزرگتری هستند که برای پردازش جهت استفاده در مسیر piRNA مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳۱). درصد کمی از این piRNAها (۲۰٪) از واحدهای متحرک منشأ می‌گیرند. شاخه‌های piRNAهای پاکتین به طور میانگین بزرگتر از piRNAهای پیش پاکتین هستند و خوشه‌های آنها با یکدیگر همپوشانی بسیار کمی دارد (۲۴، ۲۷). خوشه‌های piRNAها بخش بزرگی از ژنوم را دربر می‌گیرند که بیشتر از ۱۰۰.۰۰۰ باز می‌باشد (۴۰). لازم به ذکر است که piRNAها با پروتئینهای خانواده PIWI در ارتباط می‌باشند در حالی که endo-siRNAها و miRNAها با پروتئینهای خانواده AGO در ارتباط هستند (۴۱).

### تولید piRNA

96 Sense

97 Anti-sense

98 Pre-pachytene piRNAs

99 pachytene piRNAs

100 transposable elements

101 pachytene piRNA clusters

piRNAها در طی دو مسیر تولید می‌شوند: پردازش اولیه<sup>۱۰۲</sup> و حلقه تکثیری ping-pong<sup>۱۰۳</sup>. ابتدا در مسیر پردازش اولیه piRNAهای اولیه تولید می‌شوند سپس وارد حلقه تکثیری پینگ پنگ می‌شوند تا piRNAهای ثانویه را تولید کنند (شکل ۲).

### پردازش اولیه

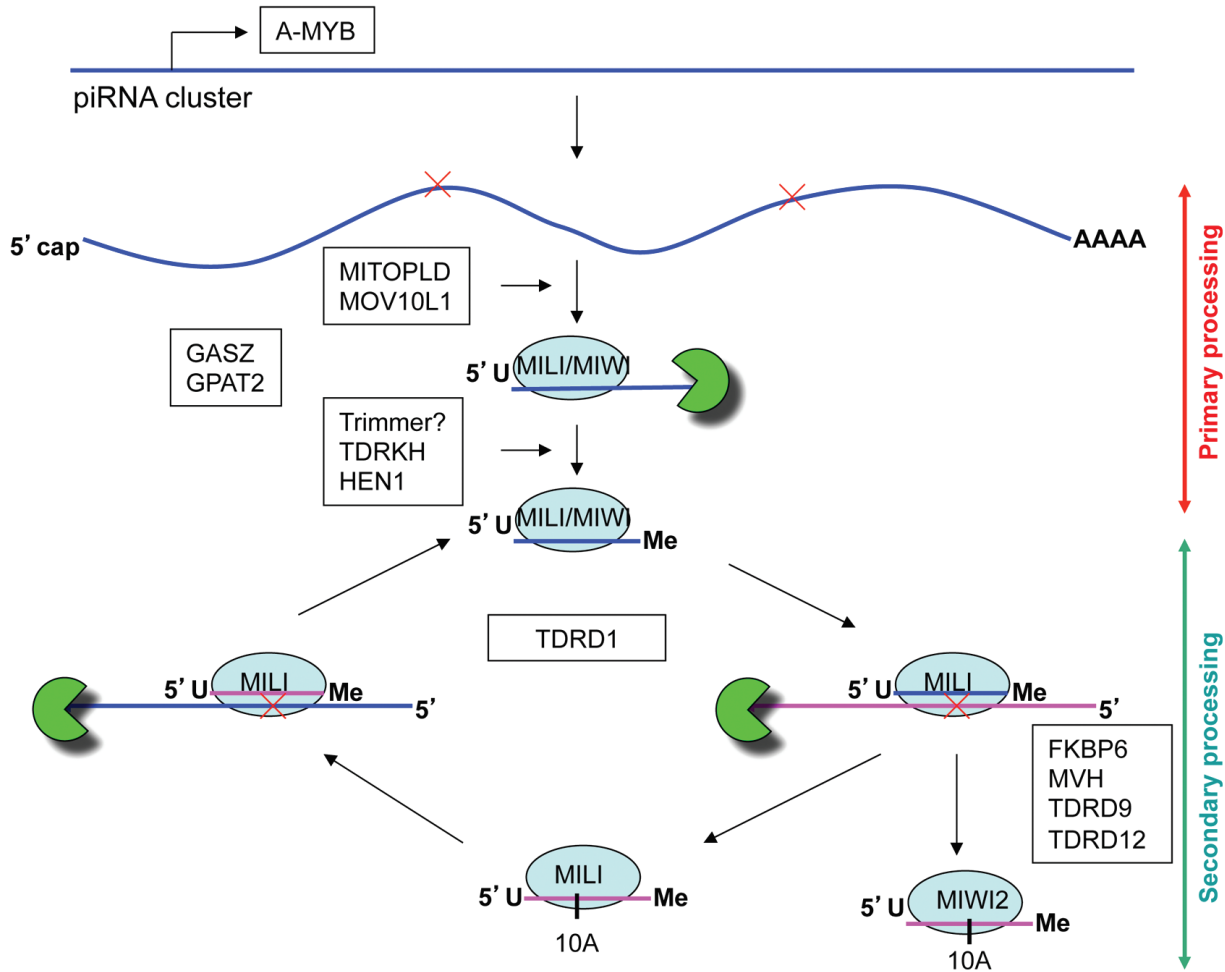
در ابتدا piRNAهای بلندی با نام piRNA پیش‌ساز توسط فاکتور رونویسی A-MYB رونویسی می‌شوند، که می‌توانند ده‌ها تا صدها کیلوباز طول داشته باشند (۴۲، ۳۲). A-MYB توسط یک حلقه کنترلی مثبت به وسیله خودش تنظیم می‌شود و رونویسی بسیاری از ژن‌های دیگر که در مسیر piRNA درگیر هستند را نیز تنظیم می‌کند مانند: *Tdrd1*، *Miwi* و *iRNA MitoPLD*. piRNAهای پیش‌ساز همانند mRNAها در انتهای 5' کلاهک‌گذاری و در انتهای 3' پلی‌آدنیل می‌شوند، سپس توسط یک اندونوکلاز به RNAهای کوچکتری به نام piRNAهای متوسط (با طول ۳۲ تا ۴۰ نوکلئوتید) تبدیل می‌شوند (شکل ۲) (۴۴، ۴۵). piRNAهای متوسط با MILI و MIWI در ارتباط هستند (۳۱، ۴۶). تاکنون مشخص نشده است که آیا piRNAهای پیش‌ساز با برش به RNAهای با انتهای ۵' یوریدین تبدیل می‌شوند و یا این که MILI و MIWI انتخاب می‌کنند که RNAهای با انتهای ۵' یوریدین پایدار باقی بمانند، به‌هرحال انتهای ۵' piRNAهای متوسط با انتهای ۵' piRNAهای بالغ مطابقت دارد. piRNAهای متوسط احتمالاً توسط فعالیت اگزونوکلازی ۳' به ۵' TDRKH کوتاه و به piRNAهای اولیه تبدیل می‌شوند که به این عمل فعالیت تریمر<sup>۱۰۴</sup> گفته می‌شود (۴۶، ۴۷). HEN1، انتهای ۳' piRNAهای اولیه را متیله (2'-O-methylated) می‌کند و سپس به پروتئین PIWI متصل می‌شوند (۳۳، ۳۴، ۵۱، ۵۲).

### پردازش ثانویه (حلقه تکثیری پینگ پنگ)

در حالی که در مسیر پردازش اولیه piRNAهای اولیه تولید می‌شود، حلقه تکثیری پینگ پنگ piRNAهای ثانویه را تولید و piRNAهای اولیه و ثانویه را تکثیر می‌کند. در طول تکثیر پینگ پنگ، piRNAهای اولیه به همراه پروتئین‌های PIWI متصل به خود به سمت RNA هدف هدایت می‌شوند (۴۱، ۵۳). پروتئین‌های PIWI، RNA هدف خود را به ترتیب بین نوکلئوتیدهای ۱۰ و ۱۱ نسبت به piRNA اولیه برش می‌دهند. یکی از نشانگرهای piRNA ثانویه، حضور یک آدنوزین در موقعیت نوکلئوتید دهم می‌باشد (۲۵، ۴۱، ۵۳). piRNAهای متوسط ثانویه به پروتئین PIWI دیگری وارد می‌شوند تا انتهای ۳' آنها توسط فعالیت تریمر پردازش شود. piRNAهای ثانویه پروتئین‌های PIWI را به سمت RNAهای هدف هدایت می‌کنند تا آنها را قطعه قطعه کرده و همزمان piRNAهای اولیه را تولید کنند. حلقه تکثیری پینگ پنگ تنها در طول تولید piRNA جنینی پیش‌پاکیتن در Mice دیده شده است. این فرآیند در زمانی که piRNAهای اولیه به MILI و piRNAهای ثانویه به MILI و MIWI2 بارگذاری می‌شوند، مشاهده شده است (۲۵، ۵۴). در حالی که MIWI2 در تولید مستقیم piRNAهای ثانویه دخالت دارد، MILI حلقه تکثیری درونی<sup>۲</sup> جهت تکثیر piRNAها تشکیل می‌دهد (۵۴).

از آنجا که MILI در بسیاری از موارد با piRNAهای جنینی پیش‌پاکیتنی که به ترانسپوزون‌ها حساس هستند وابسته می‌باشند، این باور وجود دارد که رونوشت‌های ترانسپوزون‌ها در مسیر piRNA وارد می‌شوند تا به این ترتیب piRNAهای اولیه را بوجود آورند. piRNAهای ثانویه مکمل ترانسپوزون‌ها هستند و MIWI2 را جهت خاموش کردن عناصر ترانسپوزونی در هسته به سمت آنها هدایت می‌کنند. این مکانیسم به سلول‌های جنسی اجازه می‌دهد تا یک مکانیسم دفاعی در برابر واحدهای ترانسپوزونی درونی از طریق مسیر piRNA ایجاد کنند (۵۵-۵۸).

102 primary processing  
103 ping-pong amplification loop  
104 trimmer activity  
2 intra-amplification loop



شکل ۲: مسیر تولید piRNA در پستانداران. piRNAها از روی جایگاه ژنی piRNA در ژنوم رونویسی می‌شوند. این RNAها در مسیر تولید piRNAها با نام piRNA پیش‌ساز شناخته می‌شوند و پس از پردازش اولیه بالغ می‌شوند. piRNA پیش‌ساز سپس توسط یک آنزیم اندونوکلاز برش خورده و به piRNA حد واسط تبدیل می‌شود. این piRNA پس از ترکیب شدن با مجموعه پروتئینی MILI یا MIWI و انجام شدن تغییراتی در انتهای ۳' آن به piRNA بالغ تبدیل می‌شود. این piRNA از طریق حلقه تکثیری پینگ‌پنگ تکثیر می‌شود و مجموعه پروتئین MILI را به سمت RNA مکمل خود هدایت می‌کند. این مجموعه RNA هدف را برش می‌دهد و piRNA ثانویه حد واسط را تولید می‌کند که سپس وارد مجموعه پروتئینی MILI دیگری و یا مجموعه پروتئینی MIWI2 می‌شود. تغییراتی در انتهای ۳' piRNA ثانویه حد واسط انجام می‌شود تا piRNA ثانویه تولید شود. فاکتورهای پروتئینی درگیر در این فرآیند در شکل ذکر شده‌اند (۵۹).

### مسیر تولیدی inchworming

علاوه بر مسیر اولیه و ثانویه مسیر دیگری با نام inchworming وجود دارد که تولید piRNAهای وابسته به MIWI2 را بر عهده دارد. این مسیر توسط piRNAهای القا شده توسط MILI که به طور مستقیم یک رونوشت را هدف قرار می‌دهند آغاز می‌شود. به جای تولید یک piRNA ثانویه معمولی چندین piRNA حد واسط با طول ۳۷ نوکلئوتید در مسیر ۵' به ۳' از اولین برش شکل می‌گیرد. این piRNAها می‌توانند به هر دو مجموعه MILI و MIWI متصل باشند و انتهای ۳' آنها جهت ایجاد طول استاندارد ۲۶ و ۲۸ نوکلئوتید اصلاح می‌شود. Inchworm piRNAها شاخص ۱۰ نوکلئوتیدی piRNAهای ثانویه را ندارند اما تمایل شدیدی به 1U نشان می‌دهند (۶۰). piRNAهای وابسته به MILI که مسیر inchworming را آغاز می‌کنند دارای توالی مشابه با توالی کد کننده واحدهای LINE1 می‌باشند که این امر بر خلاف مسیر تولید پینگ‌پنگ منجر به تولید تعداد زیادی از

inchworm piRNAهای غیر کدکننده می‌شود. بنابراین، مسیر inchworming یک روش تکثیری برای piRNAهایی که واحدهای LINE1 را در سطح رونویسی یا پس از رونویسی با استفاده از MIWI2 یا MILI خاموش می‌کند ارائه می‌دهد (۵۹).  
**عملکرد piRNA**

piRNAها به پروتئین‌های PIWI متصل می‌شوند تا مجموعه خاموش کننده القایی piRNA<sup>۱۰۵</sup> (piRISC) را تشکیل دهند. هر دو گروه piRNAهای پیش پاکتین و piRNAهای پاکتین برای خاموش کردن المنت متحرک لازم هستند. از جنبه ژنتیکی، piRNAهای پیش پاکتین برای میوز و piRNAهای پاکتین برای اسپرم زایی<sup>۱۰۶</sup> ضروری هستند (۲۳، ۳۷).

### خاموش سازی المنت‌های متحرک

مهمترین و شناخته شده‌ترین نقش piRNAها خاموش سازی واحدهای متحرک در طول نمو سلولهای جنسی می‌باشد. واحدهای متحرک که بخش قابل توجه‌ای از ژنوم را در گونه‌های مختلف از جمله انسان تشکیل می‌دهند، دارای قابلیت ورود به ژنوم و جابجایی در ژنوم هستند (۶۱ و ۶۲). حفظ تمامیت ژنوم در طول نمو سلولهای جنسی بسیار مهم است چرا که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد انتقال می‌دهند. بنابراین تغییر مکان واحدهای متحرک از مسیرهای گوناگون می‌تواند منجر به آسیب DNA گردد (۶۳). به همین علت در بیشتر موارد این واحدهای متحرک غیر فعال می‌شوند. دو نوع واحد متحرک وجود دارد: واحدهای متحرک DNA<sup>۱۰۷</sup> و رتروترانسپوزون‌ها<sup>۱۰۸</sup>. واحدهای متحرک DNA به دلیل جهش‌ها و نقص‌هایی است که در آنها شکل گرفته است، در ژنوم پستانداران فعال نمی‌باشند و بیشتر واحدهای متحرک فعال موجود در ژنوم را رتروترانسپوزون‌ها تشکیل می‌دهند (۶۴). رتروترانسپوزون‌ها را می‌توان به دو زیرگروه تقسیم کرد: long-terminal repeat (LTR) و non-LTR. واحدهای Long interspersed (LINE) و short interspersed (SINE) زیرمجموعه non-LTRها به حساب می‌آیند و بخش عمده‌ای از واحدهای متحرک را در ژنوم تشکیل می‌دهند (۶۳). Intracisternal A-particle (IAP) یک رتروترانسپوزون از نوع LTR می‌باشد که بخش عمده‌ای از واحدهای متحرک فعال ژنوم را تشکیل می‌دهد اما سطح بیان آن کمتر از LINEها و SINEها می‌باشد (۶۳).

در پستانداران واحدهای متحرک با مکانیسم متیله شدن خاموش می‌گردند، اما پس از برنامه‌ریزی مجدد کل ژنوم، با حذف واحدهای متیله شده فعال می‌گردند. piRNAهای پیش پاکتینی جنینی جهت خاموش کردن واحدهای متحرک از طریق متیله کردن مجدد پروموتور آنها لازم می‌باشند (۳۷، ۵۵، ۵۶). MILI با piRNAهای پیش پاکتینی که نسبت به المنت‌های متحرک حساس هستند، در مرحله پرواسپرماتوگونی در ارتباط هستند. این مطلب نشان می‌دهد که رونوشت المنت‌های متحرک فعال در مسیر piRNA پردازش می‌شوند و در نهایت به MILI متصل می‌شوند. از دست رفتن piRNAها منجر به کاهش متیله شدن المنت‌های متحرک می‌شود. فرض بر این است که MIWI2 دستگاه متیلاسیون DNA را در اختیار می‌گیرد تا DNA را در پروموتور واحدهای متحرک فعال از نو متیله کند. (۲۵، ۶۵، ۶۶).

piRNAهای پاکتین نیز در خاموش کردن واحدهای متحرک دخالت دارند. موش‌های جهش یافته Miwi افزایش بیان رونوشت‌های LINE1 را با افزایش تکمیلی piRNAهای پاکتین جبران می‌کنند (۶۷). تنظیم افزایشی piRNAهای پاکتین ۱۰۸۲B منجر به کاهش بیان واحدهای متحرک LINE1 و IAP می‌شود (۶۸). به نظر می‌رسد در خاموش کردن فعالیت المنت‌های متحرک نقش piRNAهای پیش پاکتینی بارزتر از نقش piRNAهای پاکتینی است (۵۷، ۶۵).

### خاموش کردن سایر ژن‌ها

در جدیدترین مطالعات نشان داده شده است که piRNAها برای خاموش کردن ژنهای ایمپرینت شده پدري<sup>۱۰۹</sup> مثل Rasgfr1 در هنگام متیله کردن مجدد کل ژنوم مورد نیاز می‌باشند. piRNAها توالی یک رتروترانسپوزون را در ناحیه غیر کد کننده‌ای از DNA که Rasgfr1 را در بر می‌گیرد هدف قرار می‌دهند و کاهش در بیان piRNAها می‌تواند منجر به کاهش در میزان متیله شدن ژن Rasgfr1 شود (۶۹).

#### میوز

نشان داده شده است که نقص در مسیر تولید و عملکرد piRNAهای موش‌ها محدودیت‌هایی را در مرحله زایگوتن میوز ایجاد می‌کند که می‌توان به نقص در Mili، Miwi2، Ddx4، Mov10l1، GasZ، Mael و Tdrd9 اشاره کرد. فرض بر این است که، عدم مهار واحدهای متحرک در این نمونه‌های جهش یافته، موجب آسیب‌های بسیار جدی به DNA و در نتیجه محدودیت در فرآیند میوز شده است (۵۷، ۵۸، ۷۰).

#### اسپرمازی

اعتقاد بر این است که، piRNAهای پاکیتی توالی‌های مکملی که برای بلوغ اسپرماتیدها مورد نیاز هستند را هدف قرار می‌دهند. جهش در Mov10l1 (MOV10L1) تنظیم کننده اصلی مسیر piRNA است و برای بیوژنز هر دو piRNAsهای پاکیتن و پری پاکیتن مورد نیاز است) منجر به کاهش ساخت piRNA پاکیتن و محدودیت در اسپرمازی در سطح اسپرماتید می‌شود (۲۳). مطالعات جدید نشان داده‌اند که بارگیری piRNAهای پاکیتن در MIWI برای تخریب با واسطه یوبی کوئیتین توسط MIWI از طریق مسیر APC پروتازوم در اسپرماتیدها مورد نیاز است. تخریب MIWI منجر به حذف مسیر PIWI/piRNA در آخرین مراحل اسپرمازی می‌شود و به این ترتیب برای شکل گیری اسپرم مورد نیاز می‌باشد (۷۱).

#### فعالیت اپی ژنتیکی

مطالعات جدید نشان داده‌اند که piRNAها در فعالیتهای اپی ژنتیکی نیز نقش دارند. مجموعه پروتئینی PIWI در القای تغییرات هیستونی یوکروماتینها و رونویسی piRNAها تاثیر گذار می‌باشد (۷۴). علاوه بر این، در سینورابدیتیس الگانس<sup>۱۱۰</sup>، piRNA و مجموعه پروتئینی آرگونوت CSR-1<sup>۱۱۱</sup> باعث به کارگیری بیشتر آنزیمهای تغییر دهنده هیستونها می‌شوند که در نهایت باعث فعالسازی اپی ژنتیکی می‌شوند (۷۵).

#### piRNAها در خارج از سلولهای جنسی

تعداد piRNAهای شناخته شده در بافتهای پیکری بسیار کمتر از موارد یافت شده در سلولهای جنسی می‌باشد اما تلاش برای کشف بیشتر آنها روزافزون می‌باشد (۸۲)

RNAهای کوچک مشابه piRNA<sup>۱۱۲</sup> (piRNA) در بافتهای پیکری<sup>۱۱۳</sup> مثل مغز، هیپوکمپ، کلیه، کبد، ریه و طحال یافت شده‌اند. جایگاه piRNAها در مناطق بین ژنی و 3'UTRهای رشته‌های الگو تعیین شده است (۷۶، ۷۷). piRNAها در هیپوکمپ موش به MIWI متصل می‌شوند (۷۶). پروتئین‌های PIWI انسانی (HIWI و HILI) در بسیاری از سلولهای سرطانی مانند سرطان پانکراس، پستان و روده فعالیت دارند (۷۸). مطالعات انجام شده بر روی دروزوفیلا و پستانداران نشان داده‌اند که piRNAها در تنظیم بیان ژنها نیز نقش دارند (۷۹). بررسی piRNAهای کد شده توسط میتوکندری و پروتئینهای PIWI در سلولهای رده پیکری پستانداران با استفاده از فلورسنت – کولوکالیزیشن<sup>۱۱۴</sup> – نشان داد که شاید آنها به عنوان بخشی از سیستم پاسخ

- 
- 109 Paternally imprinted genes
  - 110 Caenorhabditis elegans
  - 111 Argonaute protein CSR-1 complex
  - 112 piRNA-like small RNAs
  - 113 Somatic tissues
  - 114 Colocalization



به استرس عمل می‌کنند (۸۰). piR-L-163 نوعی piRNA می‌باشد که در سیتوپلاسم و هسته سلولهای اپی‌تلیال ریه دیده می‌شود (۸۱). این piRNA به  $^{15}E$ ERM های فعال فسفریله متصل می‌گردد و به نظر می‌رسد که برای عملکرد آنها ضروری می‌باشد (۸۱).

### نتیجه گیری

در این مقاله مروری جدیدترین مطالعات انجام شده بر روی piRNAها از ساختار تا سنتز و عملکرد مورد بررسی قرار گرفت. piRNAها رایجترین RNAهای کوچک در رده سلولهای جنسی می‌باشند و بررسیهای زیادی بر روی سنتز و عملکرد آن در یک دهه گذشته انجام شده است. مشخص‌ترین نقش piRNAها در غیرفعال کردن واحدهای متحرک می‌باشد. با این وجود بسیاری از piRNAها این عمل را انجام نمی‌دهند و فعالیتهای دیگری در زمینه میوز، اسپرمزایی و اپی‌ژنتیک دارند که از آنها می‌توان به piRNAهای مشتق شده از مناطق بین ژنی و مناطق کد کننده mRNAها اشاره کرد (۸۳). اعتقاد بر این است که، عدم مهار واحدهای متحرک در سلولهای جنسی منجر به آسیب جدی DNA می‌شود اما این باور هنوز به اثبات کامل نرسیده است و بر درستی آن شک وجود دارد. مهمترین سوالی که در اینجا پیش می‌آید این است که آیا مهار نشدن این واحدها ضرورتاً منجر به وارد شدن آنها به درون ژنوم می‌شود؟

پرسش‌های زیادی در زمینه piRNAها هنوز بی پاسخ مانده‌اند اما از مهمترین آنها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: چرا piRNAها فقط از تعداد خاصی از رونوشت‌های mRNA تولید می‌شود؟ چگونه piRNAهای پیشرو انتخاب می‌شوند و در مسیر پردازش piRNAها قرار می‌گیرند؟ آنچه مشخص است نیاز به بررسیهای گسترده‌تر با استفاده از تکنیکهای نوین می‌باشد تا بتوان نقش piRNAها را در زمینه‌های مختلف و به خصوص بیماریها تعیین کرد و به این ترتیب از آنها در پیشبرد درمان و یا تشخیص بیماریها استفاده کرد.

### References:

1. Malone CD, Hannon GJ. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*. 2009;136(4):656-68.
2. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(8):475.
3. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*. 2009;136(2):215-33.
4. Olovnikov I, Aravin AA, Toth KF. Small RNA in the nucleus: the RNA-chromatin ping-pong. *Current opinion in genetics & development*. 2012;22(2):164-71.
5. Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochimica et iophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2014;1839(11):1097-109.
6. Pauli A, Rinn JL, Schier AF. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(2):136.
7. Iyengar BR, Choudhary A, Sarangdhar MA, Venkatesh K, Gadgil CJ, Pillai B. Non-coding RNA interact to regulate neuronal development and function. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:47.
8. Place RF, Noonan EJ. Non-coding RNAs turn up the heat: an emerging layer of novel regulators in the mammalian heat shock response. *Cell Stress and Chaperones*. 2014;19(2):159-72.

9. Volders P-J, Verheggen K, Menschaert G, Vandepoele K, Martens L, Vandesompele J, et al. An update on LNCipedia: a database for annotated human lncRNA sequences. *Nucleic acids research*. 2014;43(D1):D174-D80.
10. Felekakis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010;14(4):236.
11. Wei W, Ba Z, Gao M, Wu Y, Ma Y, Amiard S, et al. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell*. 2012;149(1):101-12.
12. Phuah NH, Nagoor NH. Regulation of microRNAs by natural agents: new strategies in cancer therapies. *BioMed research international*. 2014;2014.
13. Ha T-Y. MicroRNAs in human diseases: from cancer to cardiovascular disease. *Immune network*. 2011;11(3):135-54.
14. Paulmurugan R. MicroRNAs-a new generation molecular targets for treating cellular diseases. *Theranostics*. 2013;3(12):927.
15. Zheng X, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK. Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO journal*. 2007;26(6):1691-701.
16. Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current opinion in cell biology*. 2009;21(3):367-76.
17. Matzke MA, Mosher RA. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(6):394-408.
18. Cook MS, Blelloch R. Small RNAs in germline development. *Current topics in developmental biology*. 102: Elsevier; 2013. p. 159-205.
19. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(2):94.
20. Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, et al. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Molecular cell*. 2010;38(3):465-75.
21. Ross RJ, Weiner MM, Lin H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*. 2014;505(7483):353.
22. Hirotsugu Ishizu, Haruhiko Siomi, Mikiko C. Siomi I. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *GENES & DEVELOPMENT*. 2018; 26:2361-2373.
23. Zheng K, Wang PJ. Blockade of pachytene piRNA biogenesis reveals a novel requirement for maintaining post-meiotic germline genome integrity. *PLoS genetics*. 2012;8(11):e1003038.
24. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*. 2006;442(7099):203.
25. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Molecular cell*. 2008;31(6):785-99.
26. Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, et al. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & development*. 2006;20(13):1732-43.

27. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 2006;442(7099):199.
28. Kawaoka S, Hayashi N, Katsuma S, Kishino H, Kohara Y, Mita K, et al. Bombyx small RNAs: genomic defense system against transposons in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2008;38(12):1058-65.
29. Armisen J, Gilchrist MJ, Wilczynska A, Standart N, Miska EA. Abundant and dynamically expressed miRNAs, piRNAs, and other small RNAs in the vertebrate *Xenopus tropicalis*. *Genome research*. 2009;19(10):1766-75.
30. Houwing S, Berezikov E, Ketting RF. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *The EMBO journal*. 2008;27(20):2702-11.
31. Vourekas A, Zheng Q, Alexiou P, Maragkakis M, Kirino Y, Gregory BD, et al. Mili and Miwi target RNA repertoire reveals piRNA biogenesis and function of Miwi in spermiogenesis. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2012;19(8):773.
32. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(4):246.
33. Kirino Y, Mourelatos Z, editors. 2'-O-methyl modification in mouse piRNAs and its methylase. *Nucleic acids symposium series*; 2007: Oxford University Press.
34. Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes & development*. 2007;21(13):1603-8.
35. Weick E-M, Miska EA. piRNAs: from biogenesis to function. *Development*. 2014; 141(18):3458-71.
36. Thomson T, Lin H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annual Review of Cell and Developmental*. 2009;25:355-76.
37. Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*. 2007;316(5825):744-7.
38. Gan H, Lin X, Zhang Z, Zhang W, Liao S, Wang L, et al. piRNA profiling during specific stages of mouse spermatogenesis. *Rna*. 2011;17(7):1191-203.
39. Grivna ST, Pyhtila B, Lin H. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(36):13415-20.
40. Saito K, Siomi MC. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Developmental cell*. 2010;19(5):687-97.
41. Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. 2007; 128(6):1089-103.
42. Li XZ, Roy CK, Dong X, Bolcun-Filas E, Wang J, Han BW, et al. An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. *Molecular cell*. 2013;50(1):67-81.
43. Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*. 2006;313(5785):320-4.

44. Ipsaro JJ, Haase AD, Knott SR, Joshua-Tor L, Hannon GJ. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature*. 2012;491(7423):279.
45. Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, et al. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*. 2012;491(7423):284.
46. Saxe JP, Chen M, Zhao H, Lin H. Tdrkh is essential for spermatogenesis and participates in primary piRNA biogenesis in the germline. *The EMBO journal*. 2013;32(13):1869-85.
47. Christina Ernst, Duncan T. Odom, Claudia Kutter. The emergence of piRNAs against transposon invasion to preserve mammalian genome integrity. *NATURE COMMUNICATIONS*. 2017; 8: 1411.
48. Frank F, Sonenberg N, Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*. 2010;465(7299):818.
49. Seitz H, Tushir JS, Zamore PD. A 5'-uridine amplifies miRNA/miRNA\* asymmetry in Drosophila by promoting RNA-induced silencing complex formation. *Silence*. 2011;2(1):4.
50. Kawaoka S, Izumi N, Katsuma S, Tomari Y. 3' end formation of PIWI-interacting RNAs in vitro. *Molecular cell*. 2011;43(6):1015-22
51. Simon B, Kirkpatrick JP, Eckhardt S, Reuter M, Rocha EA, Andrade-Navarro MA, et al. Recognition of 2'-O-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. *Structure*. 2011;19(2):172-80.
52. Tian Y, Simanshu DK, Ma J-B, Patel DJ. Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(3):903-10.
53. Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5'end formation in Drosophila. *science*. 2007;315(5818):1587-90.
54. De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, et al. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*. 2011;480(7376):259.
55. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental cell*. 2007;12(4):503-14.
56. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes & development* 2008; 22(7):908-17.
57. Zheng K, Xiol J, Reuter M, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, et al. Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(26):11841-6.
58. Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, et al. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Developmental cell*. 2009;17(6):775-87.
59. Fu Q, Wang PJ. Mammalian piRNAs: Biogenesis, function, and mysteries. *Spermatogenesis*. 2014;4(1):e27889.

60. Yang Z, Chen K-M, Pandey RR, Homolka D, Reuter M, Janeiro BKR, et al. PIWI slicing and EXD1 drive biogenesis of nuclear piRNAs from cytosolic targets of the mouse piRNA pathway. *Molecular cell*. 2016;61(1):138-52.
61. McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1950;36(6):344-55.
62. Lander E, Linton L, Birren B, Nusbaum C, Zody M, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome, International Human Genome Sequencing Consortium.[Erratum to document cited in CA134: 217890]. *Nature (London, UK)*. 2001;412:565-6.
63. Kazazian HH. Mobile elements: drivers of genome evolution. *science*. 2004;303(5664):1626-32.
64. Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2007;8:241-59.
65. Bourc'his D, Xu G-L, Lin C-S, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*. 2001;294(5551):2536-9.
66. Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*. 2002; 129(8):1983-93.
67. Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, et al. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature*. 2011;480(7376):264.
68. Nordstrand LM, Furu K, Paulsen J, Rognes T, Klungland A. Alkbh1 and Tzfp repress a non-repeat piRNA cluster in pachytene spermatocytes. *Nucleic acids research*. 2012;40(21):10950-63.
69. Watanabe T, Tomizawa S-i, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, et al. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus. *Science*. 2011;332(6031):848-52.
70. Ma L, Buchold GM, Greenbaum MP, Roy A, Burns KH, Zhu H, et al. GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline. *PLoS genetics*. 2009;5(9):e1000635.
71. Zhao S, Gou L-T, Zhang M, Zu L-D, Hua M-M, Hua Y, et al. piRNA-triggered MIWI ubiquitination and removal by APC/C in late spermatogenesis. *Developmental cell*. 2013;24(1):13-25.
72. Klenov MS, Sokolova OA, Yakushev EY, Stolyarenko AD, Mikhaleva EA, Lavrov SA, et al. Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(46):18760-5.
73. Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, et al. MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(10):6507-19.
74. Yin H, Lin H. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 2007;450(7167):304.

75. Guo D, Barry L, Lin SSH, Huang V, Li L-C. RNAa in action: from the exception to the norm. *RNA biology*. 2014;11(10):1221-5.
76. Lee EJ, Banerjee S, Zhou H, Jammalamadaka A, Arcila M, Manjunath B, et al. Identification of piRNAs in the central nervous system. *Rna*. 2011;17(6):1090-9.
77. Yan Z, Hu HY, Jiang X, Maierhofer V, Neb E, He L, et al. Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. *Nucleic acids research*. 2011;39(15):6596-607.
78. Suzuki R, Honda S, Kirino Y. PIWI expression and function in cancer. *Frontiers in genetics*. 2012;3:204.
79. Gebert D, Ketting RF, Zischler H, Rosenkranz D. piRNAs from pig testis provide evidence for a conserved role of the Piwi pathway in post-transcriptional gene regulation in mammals. *PloS one*. 2015;10(5):e0124860.
80. Kwon C, Tak H, Rho M, Chang HR, Kim YH, Kim KT, et al. Detection of PIWI and piRNAs in the mitochondria of mammalian cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;446(1):218-23.
81. Mei Y, Wang Y, Kumari P, Shetty AC, Clark D, Gable T, et al. A piRNA-like small RNA interacts with and modulates p-ERM proteins in human somatic cells. *Nature communications*. 2015;6:7316.
82. Martinez VD, Vucic EA, Thu KL, Hubaux R, Enfield KS, Pikor LA, et al. Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Scientific reports*. 2015;5:10423.
83. Robine N, Lau NC, Balla S, Jin Z, Okamura K, Kuramochi-Miyagawa S, et al. A broadly conserved pathway generates 3' UTR-directed primary piRNAs. *Current Biology*. 2009;19(24):2066-76.

## برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین

### پویا مولائی دزکی<sup>۱</sup>، ندا جگرگوشه شیرین<sup>۲</sup>، رویا چعبی<sup>۳\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. دانشجوی دکتری تخصصی زیست فناوری و مدیر عامل شرکت بازرگانی ندا شیرین ایرانیان (ندا شیمی)، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

پروتئین‌ها بلوک‌های ساختمانی ضروری و اجزای عملکردی سلول هستند علاوه بر این، فرآیندهای حیاتی بیولوژیکی در سلول‌ها که مستقیماً با سلامت ما مرتبط هستند، مانند رونویسی، ترجمه، و انتقال سیگنال از طریق غشاء، همگی به پروتئین‌های خاص عملکردی متکی هستند. پروتئین‌ها با یکدیگر برهمکنش دارند و شبکه‌های تعامل پروتئینی را تشکیل می‌دهند. ارتباط پروتئین‌ها با یکدیگر میتواند موقتی یا دائمی باشد، همچنین رابط‌های این پروتئین‌ها در حال تعامل دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند. پیشرفت‌های اخیر منجر به ساخت شبکه‌های برهمکنش پروتئینی شده که می‌توانند اساس مولکولی بیماری را روشن کنند، و به نوبه خود می‌تواند روش‌های پیشگیری، تشخیص و درمان را ارائه دهد. در این مقاله‌ی مروری ابتدا بحث را با بررسی ساختار کلی پروتئین‌ها آغاز میکنیم، سپس برهمکنش‌های میان پروتئین‌ها از نظر ساختاری، انواع طبقه بندی و ویژگی‌های مختلف بررسی میشوند. سپس شبکه‌های برهمکنش پروتئینی و ارتباط آن با تشخیص و پیش بینی بیماری‌ها بررسی شده و در آخر بحث را با معرفی و مقایسه‌ی انواع روش‌های تشخیص برهمکنش‌ها به پایان میرسانیم

**واژگان کلیدی:** پروتئین، برهمکنش، اسید آمینه، شبکه

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۶۵۰۱۰۱۱۲

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

## Protein-protein interactions

Pooya Molai Dezaki<sup>1</sup>, Neda Jegargoshe Shirin<sup>2</sup>, Roya Chaabi<sup>3\*</sup>

1. Master's student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Ph.D. Student in Microbial Biotechnology and Head of Neda Chemistry Co., Tehran, Iran
3. Ph.D. Student in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

Proteins are essential building blocks and functional components of the cell. Moreover, vital biological processes in cells that are directly related to our health, such as transcription, translation, and signal transduction through the membrane, all rely on specific functional proteins. Proteins interact with each other and form protein interaction networks. The connection of proteins with each other can be temporary or permanent, also the interfaces of these interacting proteins have different characteristics. Recent advances have led to the construction of protein interaction networks that can elucidate the molecular basis of disease, which in turn can provide methods of prevention, diagnosis, and treatment. In this review article, we first start the discussion by examining the general structure of proteins, then the interactions between proteins are examined in terms of structure, types of classification, and different characteristics. Then, the protein interaction networks and its relationship with the diagnosis and prediction of diseases are examined, and finally, we conclude the discussion with the introduction and comparison of various interaction detection methods.

**Keywords:** protein, interaction, amino acid, network

### مقدمه

پروتئین‌ها اجزای سازنده‌ی همه موجودات زنده هستند. ساختار اولیه یک پروتئین، توالی خطی واحدهای اسید آمینه (AA) آن است که از باقی مانده‌ی آمینو ترمینال (N-terminal) شروع می‌شود تا باقی مانده‌ی انتهایی کربوکسیل ترمینال (C-ترمینال). اسیدهای آمینه از کربن هیدروژن اکسیژن و اتم‌های نیتروژن تشکیل شده‌اند که در گروه‌های عاملی دسته‌بندی می‌شوند. همه‌ی آمینو اسیدها ساختار کلی یکسانی دارند، اما هر کدام دارای گروه R یا زنجیره جانبی متفاوتی هستند. اتم کربنی که گروه R به آن متصل است کربن آلفا نامیده می‌شود. بیست اسید آمینه در پروتئین‌ها وجود دارد و توسط یک واکنش شیمیایی به هم متصل می‌شوند که در آن یک مولکول آب حذف می‌شود و دو باقی مانده اسید آمینه با یک پیوند پپتیدی به هم متصل می‌شوند. این بیست اسید آمینه عبارتند از: آلانین، آرژنین، آسپاراژین، آسپارتیک اسید، سیستئین، گلوتامیک اسید، گلوتامین، گلیسین، هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، پرولین، سرین، ترئونین، تریپتوزین، والین. این اسیدهای آمینه با علامت اختصاری یک حرفی به صورت A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V نشان داده میشوند (۱). ساختار کلی سه بعدی

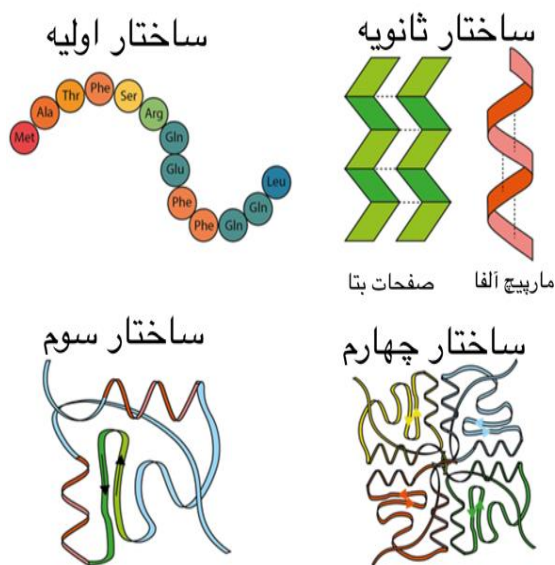


یک پروتئین، یعنی ساختار سوم آن، با آرایش عناصر ساختاری اولیه و ثانویه تعیین می شود. ساختار اولیه شامل توالی اسید آمینه ای است که زنجیره پلی پپتیدی یک پروتئین را تشکیل می دهد، ساختار ثانویه

شکل ۱- ساختار پروتئین: اولیه، ثانویه، سوم و چهارم (۲)

شکل ۱- ساختار پروتئین: اولیه، ثانویه، سوم و چهارم (۲)

شامل تشکیل عناصر ساختاری منظم و تکرار شونده ( $\alpha$ -helices و  $\beta$ -sheets) توسط فعل و انفعالات بین اتم های ستون فقرات پپتیدی میباشد، هر دو مارپیچ آلفا و صفحات بتا از طریق پیوند هیدروژنی بین اتم های اکسیژن کربونیل و اتم های هیدروژن آمینی ستون فقرات حفظ میشوند. ساختار کلی پروتئین نیز ساختار سوم نامیده میشود و در درجه اول توسط فعل و انفعالات بین زنجیره



های جانبی اسید آمینه ایجاد می شود. این فعل و انفعالات شامل پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش های یونی، برهمکنش های واندروالس، پیوندهای دی سولفیدی و برهم کنش های آبگریز است که باعث ایجاد چین خوردگی پروتئین می شود. در نهایت ساختار چهارم پروتئین ایجاد میشود که یک آرایش ساختاری است که از طریق پیوند بیش از یک زنجیره پلی پپتیدی برای تشکیل یک واحد عملکردی صورت میگیرد (شکل ۱)(۲).

دومین (domain) های پروتئینی واحدهای عملکردی اساسی ساختارهای سوم پروتئین هستند. یک دومین پروتئینی بخشی حفظ شده از یک توالی پروتئین است که می تواند عملکرد خود را تکامل دهد و به طور مستقل وجود داشته باشد. هر دومین یک ساختار سه بعدی را تشکیل می دهد و می تواند به طور مستقل پایدار و تا شود. چندین دومین در ترکیب های مختلف به هم میپیوندند و توالی های پروتئینی چند دومینی را تشکیل می دهند (۳،۴). هر پروتئین برای انجام وظایف خاص خود با سایر پروتئین ها ارتباط برقرار می کند. برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI) تقریباً در هر سطحی از عملکردهای سلولی رخ می دهد. بنابراین شناسایی فعل و انفعالات بین پروتئین ها میتواند تصویر دقیقی از عملکردهای سلولی و فرآیندهای بیولوژیکی ارائه دهد. از آنجا که اکثر فرآیندهای بیولوژیکی توسط یک یا چند برهمکنش پروتئین-پروتئین صورت میگیرد، شناسایی دقیق مجموعه ی پروتئین های تعاملی در یک موجود زنده برای رمزگشایی مکانیسم های مولکولی که زیر بنای عملکرد های بیولوژیکی قرار دارند بسیار حائز اهمیت است (۵-۷). این فرایند های بیولوژیکی شامل انتقال سیگنال، رونویسی ژن، مرگ سلولی، عملکرد سیستم ایمنی، پشتیبانی ساختاری و کاتالیز تمام واکنش های شیمیایی است که به موجودات قدرت زنده ماندن میدهد (۲).

## معرفی

مفهوم برهمکنش پروتئین-پروتئین یا protein-protein interaction (PPI)، به طور کلی برای توصیف تماس فیزیکی یا عملکردی بین پروتئین ها و گروه های متقابل آنها به کار برده می شود. در واقع میتوان گفت پروتئین ها برای ایجاد ساختار های ماکرومولکولی با پیچیدگی های مختلف، ارتباط فیزیکی ایجاد میکنند. این ساختار ها و پیچیدگی ها شامل ایجاد دایمر ها (مانند ترانس کریپتاز معکوس)، کمپلکس های چند پروتئینی (مانند پروتئازوم) و یا زنجیره های بلند (مانند رشته های اکتین در فیبرهای عضلانی) میباشد. همچنین زیر واحد هایی که کمپلکس های مختلف را ایجاد میکنند میتوانند به صورت یکسان یا غیریکسان باشند. مدت زمان برهمکنش هم میتواند به دو صورت موقتی (مانند پروتئین های دخیل در ایجاد سیگنال)، یا دائمی (مانند بعضی از پروتئین های ریبوزومی) باشد (۸).

برهمکنش های پروتئینی اغلب توسط پروتئین هایی که ساختار چهارم دارند ایجاد میشود، زیرا این نوع پروتئین ها در همه ی مکان های سلولی یافت میشوند. به طور مثال در غشاء به عنوان ناقل یا گیرنده حضور دارند. همچنین انتقال و دریافت انرژی، مشارکت آنزیمی، یکپارچگی ساختاری، حرکت سلولی و عملکرد موتور های مولکولی تحت تاثیر پروتئین هایی که ساختار مولتی مری دارند صورت میگیرد (۹).

## طبقه بندی PPI

طبق گفته های Ofran و Rost در سال ۲۰۰۳، PPI ها را میتوتن بر اساس ویژگی های توالی شان به شش گروه طبقه بندی کرد (۱۰):

- ۱- اینترادومین: در این گروه، رابط ها درون یک دومین ساختاری نشان داده میشوند.
- ۲- دومین-دومین: در این گروه ارتباط بین دومین های مختلف در یک زنجیره از پروتئین نشان داده میشود
- ۳- هوموالیگومر: این گروه به عنوان رابط بین زنجیره های پروتئینی یکسان با تعامل دائمی تعریف میشود.
- ۴- هتروالیگومر: این گروه رابط بین زنجیره های مختلف (دارای اسید آمینه متفاوت) پروتئینی است که به طور دائم در حال تعامل با یکدیگر هستند.
- ۵- هومو کمپلکس: این گروه به عنوان رابط بین زنجیره های پروتئینی یکسان با تعامل موقت و گذرا تعریف میشود.
- ۶- هترو کمپلکس: این گروه رابط بین زنجیره های مختلف پروتئینی است که به طور موقت و گذرا تعامل دارند.

## ویژگی های PPI

PPI های مختلف دارای ویژگی های متفاوتی میباشند که توسط گروه های تحقیقاتی مختلفی تعیین شده اند در این قسمت به بررسی ویژگی هایی که برای اکثر PPI ها مفید محسوب میشوند می پردازیم:

- ۱- حفظ توالی: PPI ها در مقایسه با مناطق پروتئینی که برهمکنش ندارند، توالی های اسید آمینه ی کم و بیش حفظ شده ای دارند که میتواند ناشی از ساختار یا عملکرد آنها باشد.
- ۲- ماهیت سطح: PPI ها نسبت به سایر مناطق سطحی روی پروتئین ها مسطح و صاف تر هستند. آنزیم ها نیز دارای بزرگترین حفره ها درون سطح هستند که یک بستر خاص با سطح مکل به آن متصل میشود.
- ۳- توزیع اسید های آمینه: به طور کلی PPI ها از بقایای اسید آمینه آبگریز تشکیل شده اند. همچنین تعداد اسید آمینه های حفظ شده در این PPI ها، به اندازه ی آن بستگی دارد. به طور رابط های بزرگتر دارای اسیدهای آمینه قطبی هستند که توسط حلقه های آبگریز احاطه شده اند. PPI ها همچنین غنی از باقیمانده های اسید آمینه آروماتیک (تریپتوفان، تیروزین، فنیلالانین) و همچنین آرژنین و متیونین میباشند.

۴- ساختار های ثانویه: صفحات  $\beta$  به علت اینکه یک تکه هستند بیشتر در این رابط ها یافت میشوند در حالیکه مارپیچ  $\alpha$  کمتر مشاهده میشود. همچنین حلقه های طولانی که ساختار های ثانویه را به هم متصل میکنند در این رابط ها یافت میشوند.

۵- قابلیت دسترسی به حلال: دسترسی به حلال رابط ها به نوع رابط بستگی دارد. به طور کلی PPI های لیگومر نسب به کمپلکس های گذرا قابلیت دسترسی به حلال کمتری دارند.

۶- آنتروپی ساختاری زنجیره های جانبی: برای به حداقل رساندن هزینه آنتروپیک پس از تشکیل کمپلکس، بقایای رابط دارای روتامرهای زنجیره جانبی کمتری هستند (۱۱).

### شبکه های برهمکنش پروتئین-پروتئین

داده های ارتباط و تعامل پروتئین-پروتئین می توانند در مقیاس های بزرگتر جهت نقشه برداری شبکه های ارتباطی استفاده شوند (۱۲،۱۳). در نمودارهای شبکه PPI، گره ها نشان دهنده پروتئین ها هستند و خطوطی که آنها را به یکدیگر متصل میکنند تعامل بین آنها را نشان میدهند. به همین ترتیب، نقشه های برهمکنش به دست آمده از یک گونه را می توان با برخی محدودیت ها برای پیش بینی شبکه های برهمکنش در گونه های دیگر استفاده کرد. شبکه های برهمکنش پروتئین همچنین می توانند عملکردهایی را برای پروتئین هایی که قبلاً مشخص نشده بودند، با کشف نقش آنها در مسیرها یا کمپلکس های پروتئینی پیشنهاد کنند (۱۴). به علت نقش اصلی PPI ها در فرایند های بیولوژیکی، میتوان از این برهمکنش ها در کنترل مکانیسم هایی که منجر به حالت های سالم و بیمار در موجودات میشود استفاده کرد، زیرا بیماری ها اغلب زمانی ایجاد میشوند که جهش هایی بر این رابط های اتصال تاثیر بگذارد یا منجر به تغییر آلوستریک ناکارآمد در پروتئین ها شود. بنابراین، شبکه های برهمکنش پروتئین-پروتئین می توانند اساس مولکولی بیماری را مشخص کنند، که به نوبه خود می تواند روش های پیشگیری، تشخیص و درمان را ارائه دهد (۱۵،۱۶). از جمله مطالعات بیماری های انسانی که توسط شبکه برهمکنش های پروتئینی صورت گرفته میتوان به بیماری هانتینگتون (HD) اشاره کرد. HD یک بیماری نورودژنراتیو اتوزومال غالب است که توسط Huntington در سال ۱۸۷۲ شناسایی شد (۱۷). الگو های وراثتی این بیماری در سال ۱۹۰۸ ثبت شد (۱۸). پس از حدود یک قرن مطالعات ژنتیکی در نهایت در سال ۱۹۹۳ مشخص شد که بیماری HD به علت تکرار گسترش سه نوکلئوتید CAG در ژن هانتینگتین (Htt) ایجاد میشود (۱۹). این امر باعث تجمع Htt جهش یافته در اجسام انکلوزن عصبی نامحلول می شود و در نهایت منجر به تخریب عصبی میگردد. با این وجود حتی زمانی که پروتئین بعنوان عامل اصلی بیماری HD شناسایی شد، همچنان مکانیسم تجمع Htt ناشناخته باقی مانده بود. در نهایت در سال ۲۰۰۴، Goehler و همکارانش تمام PPI های را که به صورت HD انجام می شوند نقشه برداری کردند و این مسئله را کشف کردند که در تعامل بین Htt و GIT1، یک پروتئین فعال کننده GTPase، واسطه تجمع Htt است (۲۰).

### طبقه بندی روشهای تشخیص PPI

به طور کلی سه نوع روش تشخیص برای برهمکنش های پروتئین-پروتئین وجود دارد. این روش ها شامل روش های *in vitro*، *in vivo* و روش های *in silico* میباشد (۹).

۱- روش های *in vitro*: این تکنیک ها طی یک روش معین، در یک محیط کنترل شده خارج از بدن موجود زنده انجام میشوند و شامل روش های برچسب گذاری طیف سنجی جرمی متوالی (TAP-MS)، کروماتوگرافی میل ترکیبی، رسوب همزمان، ریز آرایه پروتئینی، مکمل قطعه پروتئین، نمایش فاژی (phage display)، کروماتوگرافی اشعه X و طیف سنجی NMR میباشد (۹).

TAP-MS: روش برچسب گذاری TAP برای مطالعه PPI ها در شرایط ذاتی سلول توسعه داده شده (۲۱). برای اولین بار Gavin و همکارانش از این روش جهت تجزیه و تحلیل برهمکنش های مخمر استفاده کردند (۲۲). این روش مبتنی بر برچسب زدن دوگانه پروتئین مورد نظر بر روی جایگاه کروموزومی آن و به دنبال آن یک فرآیند خالص

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

سازی دو مرحله ای است (۲۳). سپس پروتئین هایی که با پروتئین هدف مرتبط باقی می ماند را می توان به روش الکتروفورز ژل SDS-PAGE و سپس آنالیز طیف سنجی جرمی بررسی و شناسایی کرد. به این ترتیب پروتئین های مرتبط با پروتئین اصلی شناسایی میشوند (۲۴). یک مزیت مهم برجسته گذاری TAP توانایی آن در شناسایی طیف گسترده ای از کمپلکس های پروتئینی و آزمایش فعالیت کمپلکس های پروتئینی مونومر یا مولتی مری است که در داخل بدن وجود دارند (۲۳).

**کروماتوگرافی میل ترکیبی:** مزیت این روش این است که میتواند حتی ضعیف ترین برهمکنش ها را تشخیص دهد و دقت بالایی دارد، همچنین تمام پروتئین های نمونه را به طور مساوی برای برهمکنش با پروتئین جفت شده در ستون آزمایش می کند. با این حال این روش نیز ضعیف هایی دارد از جمله اینکه گاهی نتایج مثبت کاذب گزارش میکند بنابراین مطالعه ی برهمکنش های پروتئینی نمیتواند به طور کامل بر کروماتوگرافی میل ترکیبی تکیه کنن و به روش های دیگری برای بررسی و تأیید نتایج به دست آمده نیاز دارد. کروماتوگرافی میل ترکیبی همچنین می تواند با تکنیک SDS-PAGE و طیف سنجی جرمی به منظور تولید داده های با توان بالا انجام شود (۲۵).

**رسوب همزمان:** این روش برهمکنش ها را با استفاده از یک عصاره سلول کامل بررسی و تایید می کند که در آن پروتئین ها به شکل طبیعی خود در مخلوط پیچیده ای از اجزای سلولی وجود دارند (۲۵).

**ریز آرایه پروتئینی:** ریز آرایه یا تراشه ی پروتئینی یکی از قدرتمند ترین تکنیک ها جهت شناسایی پروتئین ها، نظارت بر سطوح بیان آن ها و بررسی برهمکنش ها و عملکردهای پروتئینی میباشد. تراشه ی پروتئینی قطعه ای شیشه ای است که مولکول های مختلف پروتئین در مکان های جداگانه به صورت منظم روی آن چسبانده شده اند. هدف از توسعه ی این ریز آرایه ها تجزیه و تحلیل پروتئین ها با توان و حساسیت بالا میباشد که تعداد زیادی مشخصه را به صورت همزمان بررسی کند (۲۶).

**مکمل قطعه پروتئین:** این روش که PCA نیز نام دارد یکی از روش های تشخیص برهمکنش های پروتئینی در سیستم های بیولوژیکی است و جهت تشخیص PPI ها بین پروتئین ها با هر وزن مولکولی و سطح بیان استفاده میشود (۲۷).

**نمایش فاژی یا phage display:** روش نمایش فازی یک تکنیک قدرتمند جهت بررسی و مطالعه ی برهمکنش های پروتئین-پروتئین و پروتئین-پپتید و همچنین پروتئین-اسید نوکلئیک است. در این تکنیک ژن کد کننده ی پروتئین مورد نظر ما در ژنوم یک فاژ درج شده و روی سطح ویروس با پروتئین پوششی ادغام میشود و در نهایت در بخش بیرونی فاژ نمایش داده میشود. فاژهای رشته ای مانند fd، M13 و fl تقریباً پنج نسخه از پروتئین پوششی ژن III روی سطح خود دارند. بنابراین، یک توالی DNA خارجی وارد شده در این ژن منجر به کپی های متعددی از پروتئین ادغامی می شود که توسط فاژ نمایش داده می شود. به این نمایشگر چند ظرفیتی نیز گفته میشود. علاوه بر پروتئین پوششی III، پروتئین VIII نیز میتواند توالی خارجی درج شده را نمایش دهد، این پروتئین اجازه میدهد تا ۲۷۰۰ کپی از یک ژن در هر فاژ درج شود. فاژ نوترکیب درون سلول های باکتری مانند E.coli ترانسفورم میشود. وقتی برای ترانسفورم از ناقل های فاژمیدی استفاده کنیم ذرات فاژی زمانی آزاد میشوند که E.coli با فاژ کمی آلوده گردد. فاژ کمی همچنین باعث بسته بندی DNA فاژمیدی با پروتئین های پوششی میشود. توالی های تصادفی مختلفی را می توان به ژن III یا ژن VIII وارد کرد تا یک کتابخانه از فاژهای ادغامی ایجاد شود. پس از آن می توان چنین کتابخانه ای را برای شناسایی فاژ خاصی که توالی مورد نظر در آن درج شده غربال کرد. این غربالگری توسط مجموعه ای از کروماتوگرافی های میل ترکیبی به نام panning انجام می شود، اساس این غربالگری غنی نمودن نمونه ای اصلی با حذف مواد نامطلوب میباشد. ابتدا پروتئین هدف روی سطح چاهک ثابت میشود، این باعث

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

میشود فاز هایی که پروتئین نمایش داده شده روی آنها با پروتئین چاهک توانایی اتصال دارند باقی بمانند و سایر فاز ها به وسیله شست و شو حذف شوند. فاز های متصل باقی مانده برای آلوده نمودن E.coli تکثیر میشوند تا در نهایت ترکیبی غنی شده از فاز های مورد نظر به دست آید (۲۸،۲۹).

**کروماتوگرافی اشعه X:** این روش اساساً شکلی از میکروسکوپ با وضوح بسیار بالا است که تجسم ساختارهای پروتئین را در سطح اتمی امکان پذیر می کند و درک عملکرد پروتئین را افزایش می دهد. همچنین نشان می دهد که چگونه پروتئین ها با مولکول های دیگر و تغییرات ساختاری در مورد آنزیم ها تعامل دارند (۲۵).

**طیف سنجی NMR:** این روش با نام های طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای نیز شناخته میشود. اساس طیف سنجی NMR این است که هسته های فعال مغناطیسی که توسط یک میدان مغناطیسی قوی جهت گیری می شوند، تابش الکترومغناطیسی را در فرکانس های مشخصه ای که توسط محیط شیمیایی آن ها کنترل می شود جذب می کنند (۲۵).

۲- **روش های in vivo:** از جمله روش های *in vivo* میتوان به Y2H و کشفندگی مصنوعی اشاره نمود.

**مخمر دو هیبریدی (Y2H):** از جمله مهمترین و متداول ترین این روش ها غربالگری مخمر دو هیبریدی یا The yeast two-hybrid screen (Y2H) میباشد. سیستم Y2H برهمکنش دو پروتئین داده شده را با ادغام هر یک از آنها به یک دامنه اتصال رونویسی آزمایش می کند. اگر پروتئین ها با یکدیگر برهمکنش داشته باشند، کمپلکس رونویسی فعال می شود که یک ژن گزارشگر را رونویسی می کند و در نهایت محصول آن قابل شناسایی است. از آنجایی که این یک تکنیک *in vivo* است، سیستم Y2H در تشخیص برهمکنش های گذرا بسیار موثر است و می تواند به آسانی برای غربالگری کتابخانه های بزرگ ژنومی (مثلاً برای نقشه برداری مجموعه کاملی از برهمکنش ها یا برهمکنش های موجودات) استفاده شود. اما، سیستم Y2H به دلیل جهت گیری های خود نسبت به تعاملات غیر اختصاصی محدود شده است. به همین ترتیب، Y2H توانایی شناسایی کمپلکس ها را ندارد (یعنی فقط برهمکنش های دوتایی را گزارش می کند) یا با تترهمکنش های پروتئین هایی که به تنهایی شروع به رونویسی می کنند. اگرچه برهمکنش های پروتئینی معمولاً به صورت جفتی شناسایی و مطالعه می شوند، اما در واقعیت اغلب در کمپلکس ها و به عنوان بخشی از شبکه های بزرگتر تعامل ایجاد میکنند. روش های تشخیص مستقیم آزمایشگاهی (مانند طیف سنجی جرمی، خالص سازی میل ترکیبی) برای تشخیص برهمکنش های ماکرومولکولی مناسب تر هستند، اما محدودیت های خاص خود را دارند: برهمکنش هایی که در شرایط آزمایشگاهی رخ می دهند لزوماً در داخل بدن رخ نمی دهند (مثلاً زمانی که پروتئین ها در سلول های مختلف تقسیم می شوند). و همچنین کمپلکس ها اغلب به سختی تصفیه می شوند، که یک مرحله ضروری در پروتکل است (۳۰).

**کشفندگی مصنوعی:** این روش از جمله تکنیک های مهم *in vivo* میباشد که تلاش می کند مکانیسم هایی را درک کند که با وجود تغییرات محیطی، تنوع ژنتیکی و رویدادهای تصادفی مانند جهش ها، پایداری فنوتیپی را ممکن می سازد. این روش جهش یا حذف در دو یا چند ژن ایجاد می کند که به تنهایی زنده هستند اما در صورت ترکیب با هم تحت شرایط خاص باعث مرگ می شوند و نتایج حاصل به عنوان راهی برای استنباط پروتئین های برهمکنش دهنده استفاده میشود.

۳- **روش های in silico:** داده های حاصل از روش های *in vivo* و *in vitro* ممکن است به دلیل در دسترس نبودن PPI های احتمالی قابل اعتماد نباشند. پس به منظور درک کلی این برهمکنش ها، بهتر است رویکردهایی ایجاد شود که طیف کاملی از برهمکنش های ممکن بین پروتئین ها را پیش بینی کند (۳۱).

انواع مختلفی از روش‌های *in silico* یا درون یارانه‌ای برای پشتیبانی از برهمکنش‌هایی که با رویکرد تجربی شناسایی شده‌اند، توسعه یافته‌اند. روش‌های محاسباتی برای پیش‌بینی‌های *in silico* شامل رویکرد‌های متفاوتی از جمله: رویکردهای مبتنی بر توالی، رویکردهای مبتنی بر ساختار، مجاورت کروموزومی، ادغام ژن، هیبرید *in silico*، نمودار درخت آینه‌ای، درخت فیلوژنتیک، هستی‌شناسی ژن، و سایر رویکرد‌های مبتنی بر بیان ژن می‌باشد (۲۵).

**نتیجه‌گیری:** برهمکنش‌های پروتئینی اجزای اصلی بسیاری از فرآیندهای بیوشیمیایی هستند و نقش مهمی در درک پیچیدگی سیستم‌های بیولوژیکی دارند. بنابراین مطالعه و بررسی این برهمکنش‌ها در تمام جنبه‌های زیست‌شناسی حائز اهمیت است. همچنین بررسی شبکه‌های PPI در سال‌های اخیر بسیار گسترش یافته و به هدفی مهم در زمینه‌های درمانی تبدیل شده است. با مطالعات بیشتر، ما شروع به درک اصول اساسی تکاملی، عملکردی و ساختاری PPI‌ها می‌کنیم و تنوع زیاد آنها را آشکار می‌کنیم. مطالعات پروتئومیکس کنونی اخیراً امکان شناسایی PPI‌ها را در مقیاس وسیع فراهم کرده است. رویکردهای متفاوتی برای پیش‌بینی و تحلیل برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین وجود دارد. در این بررسی چند رویکرد متداول موجود بررسی شد و دسته‌بندی و مقایسه‌ی آنها نیز ارائه شد. ما می‌توانیم طیف کاملی از برهمکنش‌ها، از ضعیف تا قوی، اجباری و غیر الزامی را انتظار داشته باشیم. واضح است که پیش‌بینی PPI‌ها برای دستیابی به دقت بیشتر هنوز به تلاش تحقیقاتی نیاز دارد. در نهایت کارهای بسیاری در طی سال‌های آینده به طور قابل توجهی دانش ما از مجموعه‌های پروتئینی را گسترش خواهد داد و امیدواریم توانایی مدل‌سازی و پیش‌بینی ساختارها، انرژی‌ها و عملکردهای PPI‌ها را بهبود ببخشیم.

## References:

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Protein structure and function. *Biochemistry*. 2002;262:159-73.
2. Rhiannon Morris, Katrina A. Black, Elliott J. Stollar; Uncovering protein function: from classification to complexes. *Essays Biochem* 10 August 2022; 66 (3): 255–285.
3. Chothia C. One thousand families for the molecular biologist. *Nature*. 1992;357(6379):543-4.
4. Yoo PD, Sikder AR, Taheri J, Zhou BB, Zomaya AY. DomNet: protein domain boundary prediction using enhanced general regression network and new profiles. *IEEE transactions on nanobioscience*. 2008;7(2):172-81.
5. Zaki N, Lazarova-Molnar S, El-Hajj W, Campbell P. Protein-protein interaction based on pairwise similarity. *BMC bioinformatics*. 2009;10(1):1-2.
6. Xenarios I, Eisenberg D. Protein interaction databases. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001;12(4):334-9.
7. Wan KK, Park J, Suh JK. Large scale statistical prediction of protein-protein interaction by potentially interacting domain (PID) pair. *Genome Informatics*. 2002;13:42-50.
8. De Las Rivas J, de Luis A. Interactome data and databases: different types of protein interaction. *Comparative and Functional Genomics*. 2004;5(2):173-8.
9. Ali A, Bagchi A. An overview of protein-protein interaction. *Current Chemical Biology*. 2015;9(1):53-65.
10. Y. Ofran and Burkhard Rost, Analysing six types of protein-protein interfaces, *J. Mol. Biol.* 2003, 325(2), 377–387.
11. Bagchi A. Prediction of Protein-Protein Interactions. *Computational Intelligence and Pattern Analysis in Biological Informatics*. 2010:325-47.
12. Barabasi AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews genetics*. 2004;5(2):101-13.

13. Grindrod P, Kibble M. Review of uses of network and graph theory concepts within proteomics. *Expert review of proteomics*. 2004;1(2):229-38.
14. Pazos F, Ranea JA, Juan D, Sternberg MJ. Assessing protein co-evolution in the context of the tree of life assists in the prediction of the interactome. *Journal of molecular biology*. 2005;352(4):1002-15.
15. Kann MG. Protein interactions and disease: computational approaches to uncover the etiology of diseases. *Briefings in bioinformatics*. 2007;8(5):333-46.
16. Ideker T, Sharan R. Protein networks in disease. *Genome research*. 2008;18(4):644-52.
17. Huntington G, On chorea. *Med Surg Rep* 1872 ;26: 320–321.
18. Punnett, Reginald Crundall. "Mendelism in relation to disease." 1908;135-168.
19. MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L et al, A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993;72(6):971-83.
20. Goehler H, Lalowski M, Stelzl U, Waelter S, Stroedicke M, et al, A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Molecular cell*. 2004;15(6):853-65.
21. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology*. 1999 ;17(10):1030-2.
22. Gavin AC, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 2002;415(6868):141-7.
23. Pitre S, Alamgir M, Green JR, Dumontier M, Dehne F, Golshani A. Computational methods for predicting protein–protein interactions. *Protein–Protein Interaction*. 2008:247-67.
24. Rohila JS, Chen M, Cerny R, Fromm ME. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *The Plant Journal*. 2004;38(1):172-81.
25. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GN. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics*. 2014;2014:147648.
26. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*. 2000 ;289(5485):1760-3.
27. Michnick SW, Ear PH, Landry C, Malleshaiah MK, Messier V. Protein-fragment complementation assays for large-scale analysis, functional dissection and dynamic studies of protein–protein interactions in living cells. *Signal Transduction Protocols*. 2011:395-425.
28. Marintcheva B, Phage display, In: Marintcheva B, *Harnessing the power of viruses*, 1st ed, MA, USA, Academic Press, 2017;133-160
29. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*. 1995;59(1):94-123.
30. Shoemaker BA, Panchenko AR. Deciphering protein–protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases. *PLoS computational biology*. 2007;3(3):e42.
31. A. Zhang, *Protein Interaction Networks-Computational Analysis*, Cambridge University Press, New York, NY, USA, 2009.

## نقش بالقوه پپتید ضد میکروبی تاکیپلسین در کنترل انواع سرطان‌ها

فاطمه محمودی فیل آبادی<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده:

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی در ارتباط با روش‌های درمانی سرطان مشاهده شده است. با این وجود، به دلیل افزایش و پیشرفت مقاومت دارویی، و همچنین اثرات نامطلوب شدید ناشی از عدم انتخاب درمان‌ها، چندین روش درمانی هنوز در معرض بحث می‌باشند. اخیراً پپتیدهای زیست فعال ضد سرطان (ACPs) به دلیل توانایی عالی در نفوذ به سلول‌ها، هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی خاص و ایجاد عوارض جانبی کمتر، به یک گزینه درمانی امیدوارکننده در زمینه داروسازی تبدیل شده‌اند. این مقاله مروری علاوه بر معرفی پپتیدهای ضد سرطان به نقش تاکیپلسین به عنوان یک ACPs در کنترل سرطان اشاره می‌نماید. این پپتید که خواص ضد میکروبی و ضد توموری همزمان را نشان می‌دهد، پتانسیل قابل توجهی را به عنوان یک جایگزین درمانی مناسب برای بیماری فوق‌الذکر ارائه می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** سرطان، پپتید ضد سرطان، تاکیپلسین، مکانیسم عملکرد

نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تلفن: ۰۳۸ – ۳۳۳۶۱۰۴۸

پست الکترونیک: [abbasdoosti@yahoo.com](mailto:abbasdoosti@yahoo.com)



## Tachyplesin's involvement in the regulation of several forms of cancer

Fatemeh Mahmoudi Filabadi<sup>1</sup>, Abbas Doosti<sup>2,\*</sup>

1 Master's degree, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2 Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

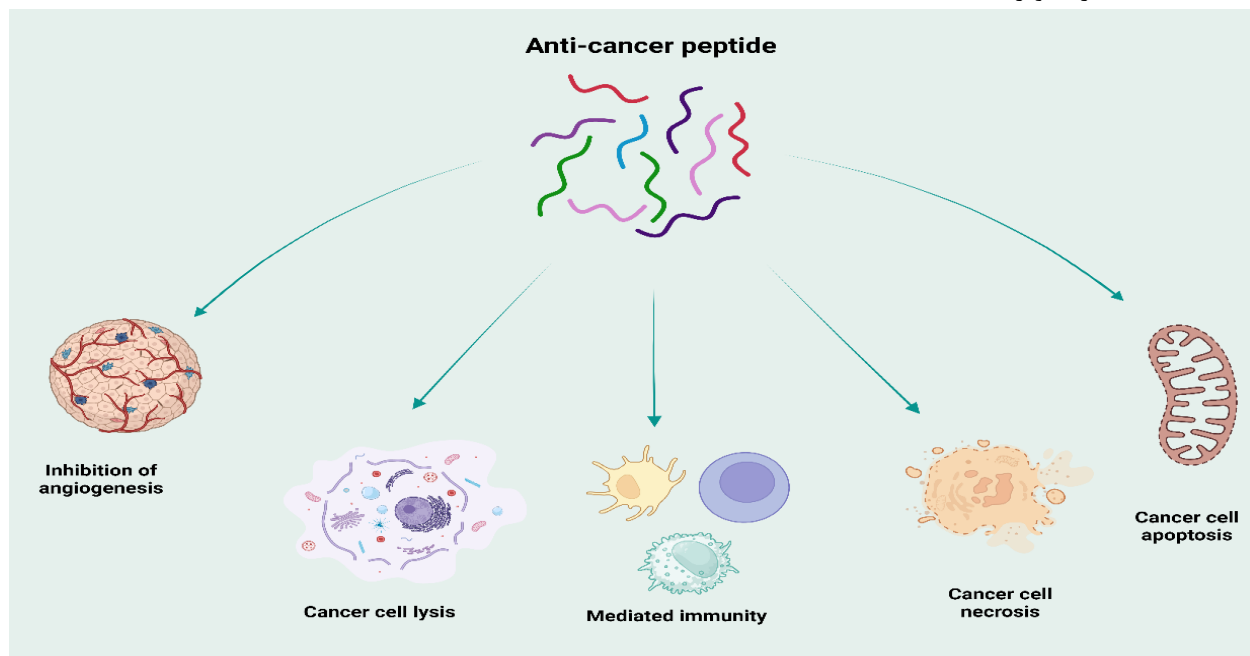
In recent times, substantial progress has been documented in the realm of cancer treatment methodologies. Despite this, numerous treatment approaches continue to be debated in light of the severe adverse effects of nonselective therapies and the escalation and development of drug resistance. Recently years, anticancer bioactive peptides (ACPs) have emerged as a highly auspicious therapeutic alternative within the pharmaceutical domain, owing to their remarkable cellular penetrability, specificity towards cancer cells, and reduced incidence of adverse effects. This review article not only discusses the introduction of anticancer peptides but also highlights the significance of Tachyplesin as an anticancer peptide in controlling cancer. This peptide, which has both antibacterial and anticancer activities simultaneously, has substantial promise as a viable treatment approach for the condition indicated above.

**Keywords:** Cancer, Anticancer peptides, Tachyplesin, Mechanism of action

### مقدمه:

سرطان وضعیتی است که با تکثیر بی رویه سلول‌ها در بدن مشخص شده و تحت تأثیر بسیاری از متغیرهای ارثی و محیطی پدیدار می‌گردد. سرطان به عنوان عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و دومین علت مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه شناخته شده است (۱). آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) تخمین می‌زند که حدود ۱۴۰۱ میلیون مورد سرطان و ۸۰۲ میلیون مرگ ناشی از سرطان در سال ۲۰۱۸ رخ داده است. سرطان سینه، ریه، کولون و پروستات از جمله شایع ترین بدخیمی‌ها می‌باشند (۲). ایران یک کشور در حال رشد در خاورمیانه است که در موقعیت ژئواستراتژیک منحصر به فردی قرار دارد و بخش‌های غربی و شرقی کره زمین را به هم پیوند می‌دهد. در سال‌های اخیر، ایران شاهد صنعتی شدن و مدرن‌سازی فوق‌العاده و همچنین تغییراتی در زندگی و محیط زیست مردم بوده است که ممکن است بر الگوهای اپیدمیولوژیک انواع بسیاری از بدخیمی‌ها تأثیر بگذارد. سرطان دومین بیماری مزمن غیرواگیر در ایران و سومین عامل مرگ و میر پس از بیماری‌های قلبی، حوادث و بلایای طبیعی است (۳). در حال حاضر، گزینه‌های اولیه درمان سرطان شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی و ایمونوتراپی است. به طور کلی، جراحی ممکن است به سرعت تومورهای جامد قابل مشاهده را حذف کند. این ممکن است یک تکنیک درمانی موفق برای تومورهای مرحله اولیه یا حتی میانی باشد. با این وجود، این نوع درمان اغلب منجر به آسیب آشکار، خونریزی، عفونت، ضعف سیستم ایمنی و سایر خطرات می‌شود که آن را به گزینه‌ای نامطلوب برای اکثر بیماران مبتلا به تومورهای پیشرفته تبدیل می‌کند (۴). پرتودرمانی اغلب در بیماران سرطانی که نتایج مطلوبی پس از مداخله جراحی مشاهده نکرده‌اند، استفاده می‌شود. با این وجود، پرتودرمانی اغلب به دنبال‌های از مشکلات منجر می‌شود و مستلزم یک دوره درمان طولانی است (۵). شیمی درمانی نوعی درمان سیستمیک است که مواد شیمیایی را وارد بدن می‌کند تا به طور خاص سلول‌های سرطانی را هدف قرار داده و با آن‌ها مبارزه کند. استفاده طولانی مدت از این درمان مقاومت دارویی را افزایش می‌دهد و احتمال عود قابل توجهی دارد. علاوه بر این، داروها به طور بی رویه سلول‌های سرطانی و سالم را از بین می‌برند که منجر به عوارض جانبی آشکار می‌شود (۶). نتیجه درمانی ایمونوتراپی نیز در افراد متفاوت است. بنابراین، نیاز فوری برآورده نشده برای تحقیق و توسعه روش‌های درمانی جدید یا داروهای ضد تومور وجود دارد (۷ و ۸). زیست‌شناسی مولکولی منجر به کشف چندین پپتید کوچک شده است که در مجموعه متنوعی از ارگانسیم‌ها وجود دارد. این پپتیدها دارای توانایی ریشه کن کردن باکتری‌ها، قارچ‌ها و سلول‌های سرطانی و همچنین تعدیل سیستم ایمنی هستند. پیشرفت‌ها در جمع‌آوری اطلاعات ساختاری و عملکردی منجر به کشف پپتیدهای کاتیونی با وزن مولکولی کم شده است که دارای خواص ضد توموری هستند. این

پپتیدها به عنوان پپتیدهای ضد سرطان (ACPs) دسته بندی می شوند (۹). ACPs پپتیدهای کاتیونی و کوچکی می باشند که از ۵-۵۰ اسید آمینه تشکیل شده اند. ACPها ویژگی های ساختاری متنوعی را نشان می دهند (۱۰). پپتیدهای کاتیونی، که قبلاً از ارگانسیم های مختلف جدا شده بودند و از نظر خواص ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفته بودند از سال ۱۹۸۵ به عنوان عوامل ضد سرطان قوی که از تکثیر سلول های تومور، مهاجرت و رگ زایی جلوگیری می کنند شناخته شده می باشند. Tachypleusin (Tpl)، یک پپتید کاتیونی طولانی با ۱۷ اسید آمینه می باشد که در ابتدا از خرچنگ نعل اسبی دریایی *Tachypleus tridentatus* جدا شده است و در این تحقیق مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. تاکپلسین به عنوان یک رویکرد درمانی در حوزه های مختلف سلامت، شامل رژیم های ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروسی و ضد سرطان، نوید قابل توجهی را نشان می دهد. مجموعه متنوعی از اثرات مشاهده شده را می توان به عوامل متعددی نسبت داد، از جمله پایداری تسهیل شده توسط حضور پل های دی سولفید، ویژگی ضد باکتریایی و ضد سرطانی، و پیکربندی صفحه آنتی بتا که به طور قابل توجهی بر تعامل غشاء تاثیر می گذارد (۱۱). ACPها ممکن است در تعاملات الکترواستاتیکی با غشای سلولی با بار منفی سلول های سرطانی درگیر شوند که منجر به نکروز و تخریب هدفمند سلول های سرطانی خواهد شد (۱۲). ACPها توانایی القای آپوپتوز (لیز غشای میتوکندری)، مهار رگ زایی و جذب و فعال کردن سلول های ایمنی برای از بین بردن سلول های سرطانی را دارند (۱۳). علاوه بر این، ACPها توانایی تسهیل تشکیل منافذ و فعال کردن پروتئین های حیاتی را دارا می باشند که هر دو در نهایت منجر به لیز سلول های سرطانی می شوند (۱۴). مکانیسم های عملکردی فعالیت ACPها در تصویر ۱ خلاصه شده است (۱۵).



شکل ۱. نمودار شماتیک مکانیسم ضد تومور ACPs: تخریب ساختار غشای سلولی آپوپتوز سلول سرطانی، نکروز سلول سرطانی، مهار رگ زایی و تنظیم ایمنی (۱۵).

افزایش پتانسیل گذر غشایی، مساحت سطح و سیالیت غشایی که در سلول های نئوپلاستیک دیده می شود، ممکن است به طور بالقوه ویژگی ACPها را نسبت به سلول های سرطانی افزایش دهد (۱۶). شیمی درمانی مرسوم سلول هایی را که به سرعت تقسیم می شوند، از جمله تعداد قابل توجهی از سلول های سالم، بدون تمایز هدف قرار می دهد. بنابراین شیمی درمانی قادر به از بین بردن سلول های سرطانی خفته یا در حال تکثیر آهسته نیست. کارایی شیمی درمانی به عنوان یک مداخله درمانی علاوه بر این به دلیل توسعه انواع سلول های توموری مقاومت به چند دارو را نشان می دهند، کاهش می یابد، که سلول سرطانی را قادر می سازد تا قبل از توانایی آن در القای مرگ سلولی از داروی سیتوتوکسیک فرار کند (۱۷). ACPها به دلیل توانایی آن ها در چسبیدن و حذف سریع طیف متنوعی

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

از سلول‌های سرطانی انسان، از جمله سلول‌هایی که در برابر چندین دارو مقاومت کرده‌اند، در حالی که از آسیب غیرضروری به اندام‌های حیاتی جلوگیری می‌کنند، پتانسیل بهتری نسبت به عوامل شیمی درمانی معمولی دارند. انتظار می‌رود که سمیت سلولی با واسطه ACP بر سلول‌های سرطانی با رشد آهسته تأثیر می‌گذارد. علاوه بر این، چندین ماده شیمیایی سطح سلولی مجزا در بار منفی غشای سلول سرطانی نقش دارند. بنابراین، بسیار غیرممکن است که سلول‌های سرطانی نسبت به ACPها مقاومت کنند. در واقع، هیچ مدرکی مبنی بر مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر ACPهای غشایی وجود ندارد. در نهایت، پپتیدهای ضد سرطانی کاتیونی توانایی افزایش اثرات سیتوتوکسیک داروهای شیمی درمانی را دارند، که نشان می‌دهد این پپتیدها ممکن است به عنوان عواملی عمل کنند که حساسیت سلول‌ها را به شیمی درمانی افزایش می‌دهند. در جدول ۱ برخی از مطالعات انجام شده در زمینه کاربردهای ACPها گزارش شده است. از این رو، هدف از این مطالعه مروری معرفی پپتید ضد سرطان تاکپلسین، اهمیت آن در القای آپوپتوز در سلول‌های توموری و ارزیابی مطالعات انجام شده می‌باشد (۱۸).

جدول ۱. مکانیسم عمل برخی از ACPها بر انواع سرطان‌ها.

نام پپتید	توالی پپتید	نوع سرطان	ویژگی ضد سرطانی	رفرنس
تاکپلسین	KWC1FRVC2YRGIC2YRRC1R-NH2	سرطان کبد	اختلال در عملکرد غشای سلول	Hussain A. Rothan et al., 2017
تاکپلسین	KWCFRVCYRGICYRRCR	سرطان پروستات	فعال شدن مسیر کمپلمان کلاسیک	Jinguo Chen et al., 2005
تاکپلسین	CRGDCGGKWCFRVCYRGICYRRCR	سرطان پروستات	القای آپوپتوز از طریق افزایش سیتوکروم C و افزایش کاسپاز ۸ و ۹	Yixin Chen et al., 2001
$\alpha$ -دفنسین	ACYCRIPACIAGERRYGTCTI	میلوئید انسانی	فعالیت سیتولیتیک	Fruitwala et al., 2019
جاسپامید	-----	سرطان ریه	اختلال در رشته اکتین	Takeuchi et al., 1998
تمپورین 1CEa	FVDLKKIANIINSIF-NH	سرطان سینه	اختلال در عملکرد غشا سلولی، آزاد سازی کسپیم و تولید ROS	Wang et al., 2012
تاکپلسین + anti-miR210	-----	گلیوبلاستوما	حامل anti-miR210، اختلال در غشای سلولی	Anirban Jana et al., 2019
آنالوگ تاکپلسین	RRWCFRVCYRGFCYRKCR	سرطان سینه	اختلال در عملکرد غشای سلول	Felicitas Vernen et al., 2019
ملیتین	GIGAVLKVLTGTPALISWIKRKRQQ-NH2	سرطان تخمدان	القای آپوپتوز و نکروز، اختلال در عملکرد غشای سلولی	Miran Jo et al., 2012

#### معرفی تاکپلسین به عنوان ACPs:

محصولات طبیعی به دلیل تنوع ساختاری بیشتر، دامنه وسیع‌تر اهداف و کاهش سمیت مزایایی نسبت به ترکیبات مصنوعی و شیمیایی دارند. تعداد زیادی از ترکیبات زیست فعال کشف شده در اکوسیستم‌های دریایی به عنوان عوامل درمانی برای بیماری‌های انسانی، از جمله سرطان، نویدبخش هستند (۱۹). مقدار قابل توجهی از ترکیبات بیولوژیکی نوآورانه موجود در محیط‌های دریایی از ریز و ماکرو جلبک‌ها، مرجان‌ها، اسفنج‌ها، تونیکات‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و سایر موجودات میکرو و ماکرو دریایی استخراج شده‌اند. در حال حاضر، بیش از ۶۰ درصد از داروهای ضد سرطانی که از نظر بالینی در دسترس هستند، از منابع طبیعی مشتق شده‌اند. پپتیدها بسته به توانایی آن‌ها در القای مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی، سمیت سلولی، آپوپتوز، مهار تکثیر سلولی، مهاجرت، و رگزایی، بی‌ثباتی میکروتوبول یا مکانیسم‌های کشف نشده در رده‌های سلولی بدخیم مختلف، مربوط به تحقیقات بالینی برای ارزیابی درمان سرطان، طبقه بندی می‌شوند (۱۹).

تاکسیپلین که از عصاره اسیدی هموسیت‌های خرچنگ نعل اسبی (*Tachypleus tridentatus*) به دست می‌آید، یک پپتید ضد میکروبی حلقوی با طیف وسیعی از فعالیت است. این پپتید حلقوی از ۱۷ باقی مانده اسید آمینه تشکیل شده است. این پپتید شامل سه تکرار متوالی از یک توالی تتراپپتیدی است که شامل یک اسید آمینه آبگریز و به دنبال آن یک سیستئین، یک اسید آمینه آبگریز دیگر و یک آرژنین است (۲۰). این آرایش نشان می‌دهد که پپتید دارای یک ویژگی آمفیپاتیک است. نتایج یک تجزیه و تحلیل NMR دو بعدی نشان داد که تاکسیپلین I یک ترکیب پایدار از صفحات بتا را اتخاذ می‌کند. این پپتید با اتصال محکم به لیپوپلی ساکارید باکتریایی (LPS) به طور قابل ملاحظه‌ای از فعال شدن فاکتور C با واسطه LPS، فاکتور شروع در آبشار انعقاد لیمولوس، جلوگیری می‌کند. حساسیت باکتری‌ها گرم مثبت و قارچ‌ها را به پپتید نمی‌توان با اتصال آن به LPS توضیح داد. با این حال، فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های گرم منفی ممکن است تا حدی تحت تاثیر قابلیت اتصال LPS قرار گیرد (۲۱). با توجه به ویژگی‌های ساختاری تاکسیپلین، فرض بر این بوده است که این پپتید دارای فعالیت‌های ضد سرطانی بالقوه‌ای می‌باشد. تاکسیپلین ممکن است به لیپیدهای خنثی موجود در غشای پلاسمایی سلول‌های یوکاریوتی متصل شود. به طور قابل توجهی، به دلیل توانایی آن در اتصال با غشای سلول‌های پروکاریوتی، این احتمال وجود دارد که تاکسیپلین ممکن است با غشای میتوکندری سلول‌های یوکاریوتی نیز تعامل داشته باشد. این غشاها از نظر فیزیکی مشابه هستند زیرا گمان می‌رود میتوکندری‌ها از سلول‌های پروکاریوتی که ارتباط همزیستی با سلول‌های یوکاریوتی اولیه داشتند منشاء گرفته باشند. تحقیقات اخیر نشان داده است که میتوکندری‌ها نقش مهمی در کنترل آپوپتوز در سلول‌های یوکاریوتی دارند. اختلال در عملکرد میتوکندری منجر به آزادسازی پروتئین‌هایی می‌شود که معمولاً در داخل این اندامک محصور می‌شوند. آزادسازی مولکول‌هایی مانند سیتوکروم c و Samc توانایی فعال نمودن کاسپازها را دارند که متعاقباً آبشار آپوپتوز را تحریک می‌نماید (۲۲).

### مکانیسم اثر تاکسیپلین بر سلول‌های سرطانی

#### اختلال در یکپارچگی غشای سلولی توسط تاکسیپلین

در سال ۱۹۷۷، Lecar & Ehrenstein مفهوم "barrel-stave" را معرفی نموده و پیشنهاد کردند که عملکرد اصلی ACP‌ها از طریق القای شکستن یا مرگ غشای سلولی توسط دپلاریزاسیون غشای سلولی می‌باشد. این دپلاریزاسیون توانایی سلول‌های تومور را برای حفظ فشار اسمزی طبیعی خود مختل می‌کند و در نتیجه باعث شکست آن‌ها می‌شود (۲۳). به دنبال آن، Pouny و همکاران. یک مدل "فرش" را معرفی کرد که فرض می‌کرد ACP‌ها از طریق اختلال در غشای سلولی سلول‌های سرطانی، مرگ سلولی را القا می‌کنند و در نتیجه محتوای سیتوپلاسمی را آزاد می‌کنند. به دلیل عملکرد مستقیم از طریق این مکانیسم، اکثر ACP‌ها دارای مزایای متمایز نسبت به شیمی درمانی معمولی هستند. برخلاف شیمی درمانی مرسوم، بسیاری از ACP‌ها توانایی از بین بردن سلول‌های توموری را دارند که از نظر متابولیک فعال، آهسته رشد کرده و به چند دارو مقاوم هستند (۲۴). هیپوکسی و شرایط تغییر یافته در ریزمحیط تومور، مانند افزایش گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، می‌تواند ناقل‌های فسفولیپید را که معمولاً مسئول حفظ عدم تقارن فسفولیپید غشای پلاسمایی هستند، مختل کند. به طور خاص، افزایش حضور فسفولیپیدهای آنیونی فسفاتیدیل سرین (PS) و فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) در غشای بیرونی ممکن است به دلیل از دست دادن افزایش غلظت این لیپیدها در غشای داخلی باشد. این اتفاق در سلول‌های مختلف ریزمحیط تومور، از جمله اندوتلیوم اپیتلیال و عروق مشاهده می‌شود (۲۵). احتمالاً با فعال کردن آبشار انعقاد خون، که می‌تواند سیگنال‌های حامی بقا را آغاز کند، با افزایش پیشرفت سرطان و بقای پایدار سلولی مرتبط است. این ایده که پپتید ممکن است سلول‌های سرطانی را با قرار گرفتن در معرض فسفولیپید آنیونی افزایش یافته مورد هدف قرار دهند، بیشتر با استفاده از لیپوزوم‌هایی با ترکیبات مختلف فسفولیپید و رده‌های سلولی تومور با قرار گرفتن در معرض PS شناخته شده مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۶).

در کنار فسفولیپیدهای آنیونی غشای سلول‌های سرطانی، بسیاری از گلیکوپروتئین‌های آنیونی اغلب در بدخیمی‌ها تنظیم می‌شوند و از این رو به بار منفی کل در سطح بیرونی سلول‌های تومور کمک می‌نمایند. نمونه‌ای از این موارد موسین‌ها می‌باشند. این گلیکوپروتئین‌ها در بیرونی ترین بخش غشای سلول‌های اپیتلیال یافت می‌شوند (۲۶). موسین‌ها از بخش‌های تکراری O-

گلیکوزیلاسیون تشکیل شده‌اند که به بار منفی کلی آن‌ها کمک می‌کند. نشان داده شده است که موسین‌های گذرنده از غشا در سرطان سینه، پروستات، ریه و پانکراس بیش از حد بیان می‌شوند. همچنین پروتئوگلیکان‌های سولفات هپاران (HSPGs) مولکول‌هایی با بار منفی هستند که در سطح سلول‌ها یافت می‌شوند. این پروتئوگلیکان‌ها با بسیاری از مواد مانند فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و آنزیم‌ها تعامل دارند. HSPG در مقادیر بیشتری در بدخیمی‌های پستان، ریه، مغز، پانکراس، پوست و کولورکتال یافت می‌شود. برهمکنش الکترواستاتیکی بین بار منفی موسین و HSPGs برای تسهیل اتصال تاقیپلسین به سطح سلول‌های تومور پیشنهاد شده است (۲۷).

تاقیپلسین مکانیسم منحصر به فردی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی دارد. یک مطالعه اخیر نشان داد که تاقیپلسین توانایی اتصال به هیالورونان بر روی سلول‌های سرطان پروستات TSU انسانی بیان کننده هیالورونان را دارد. علاوه بر این، همچنین می‌تواند به جزء C1q مکمل در سرم انسانی متصل شود. این اتصال منجر به فعال شدن مسیر کمپلمان کلاسیک و متعاقباً تخریب سلول‌های سرطانی پوشیده شده با تاقیپلسین از طریق لیز با واسطه کمپلمان می‌شود. فعالیت اتصال C1q به تاقیپلسین I به ساختار ثانویه پپتید متکی است، زیرا تاقیپلسین دناتوره شده به طور قابل توجهی کاهش اتصال به C1q را نشان داده است (۲۸). تصور می‌شود که تعامل بین تاقیپلسین و هیالورونان در تخریب هدفمند سلول‌های سرطانی توسط تاقیپلسین نقش داشته باشد. این به این دلیل است که سلول‌های تومور اغلب مقادیر بسیار بیشتری از هیالورونان را در مقایسه با بافت‌های طبیعی بیان می‌نمایند. برای این منظور، هدف قرار دادن RGD مصنوعی تاقیپلسین به اینترگرین‌های موجود در سطح سلول‌های سرطانی پروستات TSU و سلول‌های اندوتلیال، آپوپتوز وابسته به کاسپاز را القا می‌کند و از تکثیر سلولی از طریق آسیب غشای سلولی جلوگیری می‌کند (۲۹).

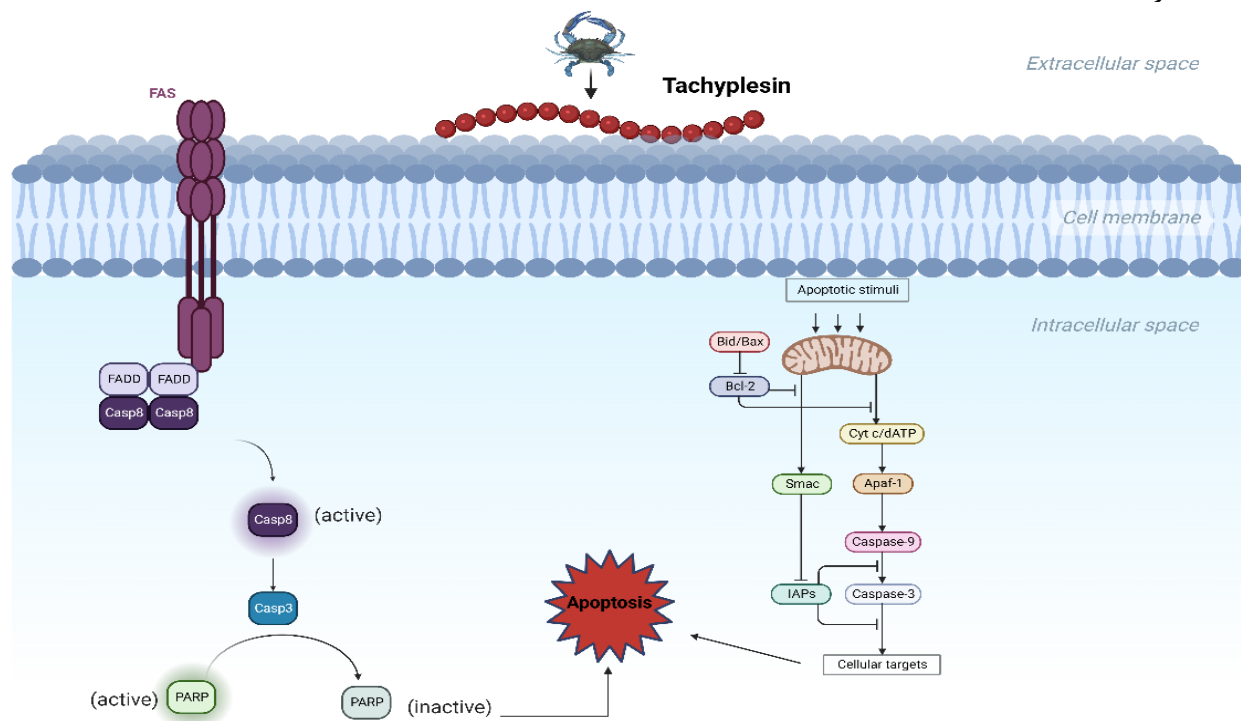
#### القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی توسط تاقیپلسین:

همه سلول‌های سرطانی، صرف‌نظر از منشأ یا نوعشان، برخی از ویژگی‌های مشخصه‌ای را نشان می‌دهند که به عنوان نشانه‌های سرطان شناخته می‌شوند. این ویژگی‌ها شامل تکثیر کنترل نشده، رگ زایی (تشکیل رگ‌های خونی جدید) و فرار از آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلولی) است (۳۰). آپوپتوز نقش مهمی در پیشگیری از سرطان دارد. در سرطان، مسیر ذاتی معمولاً سرکوب می‌شود، با این حال روش‌های دیگری برای جلوگیری از آپوپتوز وجود دارد. عدم وجود تنظیم آپوپتوز سلول‌های سرطانی را قادر می‌سازد تا برای دوره‌های طولانی باقی بمانند، و تجمع تغییرات ژنتیکی را تسهیل می‌کند که ممکن است توانایی آن‌ها را برای حمله به بافت‌های اطراف در طول پیشرفت تومور را افزایش دهد. علاوه بر این، این فقدان تنظیم می‌تواند باعث تشکیل رگ‌های خونی جدید (رگ زایی)، اختلال در کنترل طبیعی رشد سلولی و مانع از روند تمایز سلولی شود. آپوپتوز مکانیسم اولیه مرگ سلولی در سلول‌های تومور در مواجهه با عوامل شیمی درمانی است. بنابراین، افزایش آپوپتوز یک رویکرد حیاتی برای درمان تومورها است (۳۱). تحقیقات معاصر نشان می‌دهد که مکانیسم‌های اولیه آپوپتوز شامل مسیر گیرنده مرگ و مسیر میتوکندری است. انتشار سیتوکروم c منجر به فعال شدن کاسپازها و در نتیجه القای آپوپتوز می‌شود (تصویر ۲). مطالعات نشان داده‌اند که تاقیپلسین با القای آزادسازی سیتوکروم c منجر به افزایش بیان کاسپاز ۳، ۶، ۷، ۸ و ۹ در سلول‌های TSU (سلول کارسینوم پروستات) می‌گردد. حداکثر غلظت مهار (IC50) تاقیپلسین ۷۵ میکروگرم در میلی لیتر است (۳۲).

PARP یک آنزیم هسته‌ای است که با کاتالیز کردن زنجیره‌های پلی (ADP-ribose) به عنوان گیرنده آسیب DNA عمل می‌کند. فرآیند برش ممکن است تجزیه سلولی را تحریک کرده و به عنوان شاخصی از مرگ برنامه ریزی شده سلولی، معروف به آپوپتوز، عمل کند. BID پروتئینی است که منجر به مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) می‌شود و به خانواده پروتئین‌های Bcl-2 تعلق دارد. نتایج حاصل از مطالعه Jun Wu و همکاران نشان داد که تیمار سلول‌های سلول‌های سرطانی ریه سلول غیر کوچک (NSCLC) با تاقیپلسین، منجر به افزایش بیان PARP شکاف یافته و بیان کاسپاز ۸ و القاء آپوپتوز می‌گردد (۳۳). مطالعات متعددی اثر ضد توموری تاقیپلسین را تایید نموده‌اند زیرا این پپتید تکثیر سلول‌های تومور را سرکوب می‌نماید، چرخه سلولی تومور را متوقف می‌کند، فنوتیپ بدخیم سلول‌های تومور را اصلاح یا معکوس می‌کند و آپوپتوز را القاء می‌نماید. مطالعات نشان داده‌اند که تاقیپلسین از تکثیر سلول‌های سرطانی کبد انسان SMMC-7721 جلوگیری نموده و مورفولوژی بدخیم سلول را معکوس می‌کند، و با افزایش سطح

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

رونویسی p16 و p21 تمایز سلولی را القا می کند و در عین حال سطوح رونویسی جهش یافته p53, cyclin D1, CDK4 و c-myc را کاهش می دهد (۳۴). Zhang و همکاران نشان دادند که تاکیپلسین کانال های پتاسیم را تحریک کرده و منجر به آپوپتوز در سلول های HL60 لوسمی پروتومیلوژن انسانی می شود (۳۵). ParedesGamero و همکاران نیز نشان داده اند تاکیپلسین می تواند منجر به تمایز سلولی، آپوپتوز و نکروز ثانویه در سلول های لوسمی میلوژن مزمن K 562 شود (۳۶).  
 به منظور القای آپوپتوز، مسیر بیرونی از سیگنال های خارج سلولی استفاده می کند. لیگاندهای مرگ، که سیگنال های مرگ سلولی هستند، به گیرنده های مرگ خانواده فاکتور نکروز تومور (TNF) متصل می شوند. لیگاند Fas (Fas-L)، لیگاند القا کننده آپوپتوز مرتبط با TNF (TRAIL) و فاکتور نکروز تومور نمونه هایی از لیگاندهای مرگ هستند. گیرنده مرگ به یک پروتئین آداپتور مانند دامنه مرگ مرتبط با گیرنده TNF (TRADD) و دامنه مرگ مرتبط با Fas (FADD) متصل می شود. FADD کاسپاز ۸ را از طریق دامنه مؤثر مرگ مشترک خود (DED) فعال نموده و منجر به القای آبشارهای کاسپاز و در نهایت آپوپتوز می شود (۳۷). مطالعات نشان داده است که تاکیپلسین از طریق افزایش بیان Fas و Fas-L ممکن است باعث القای آپوپتوز در سلول های NSCLC A549 و H460 گردد (۳۱).



شکل ۲. تصویر شماتیک از القای آبشار آپوپتوزی توسط تاکیپلسین (۳۲).

### مهار رگ زایی تومور به کمک تاکیپلسین:

آنژیوژنز ایجاد رگ های خونی جدید از رگ های خونی از قبل موجود است که اغلب در شرایط پاتولوژیک مانند سرطان دیده می شود. این روش برای تامین اکسیژن و مواد مغذی در طول توسعه و پیشرفت سرطان ضروری است. اختلال در تعادل میان عوامل القایی رگ زایی و ضد رگ زایی به آنژیوژنز کمک می نماید که به نوبه خود منجر به پیشرفت بیماری می شود. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و آنژیوپوپتین ها که از طریق تعامل با ماتریکس خارج سلولی عمل می کنند اجزای حیاتی این فرآیند هستند (۳۸). تعامل میان ماتریکس خارج سلولی و سلول های اندوتلیال نقش مهمی در پیشرفت چندین فرآیند سلولی مانند مهاجرت، تکثیر، تمایز و مرگ در انواع مختلف سرطان ایفا می کند. داروهای ضد رگ زایی متعددی در دسترس هستند. با این حال، بخش قابل توجهی از آن ها سمیت طولانی مدت و مقاومت درمانی را نشان می دهند.

اخیراً، بسیاری از درمان‌های ضد رگ زایی توسعه یافته و نشان داده شده است که به طور موثری روند رگ زایی تومور را مختل می‌کنند. بسیاری از پروتئین‌های ضد رگ‌زایی دارای ساختارهای پیچیده‌ای هستند که نفوذپذیری آن‌ها را به بافت توموری به حداقل می‌رسانند (۳۹). به همین دلیل بر به کاری گیری پپتیدها به عنوان پروتئین‌های ضد رگ زایی تاکید شده است. چندین پپتید به عنوان داروهای کاندید در نظر گرفته شده‌اند. داروهای متعددی به دلیل ویژگی بالا و سمیت کم مورد تایید قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، اندازه کوچک آن‌ها را قادر می‌سازد تا به سرعت به بافت‌های تومور نفوذ کنند. بنابراین، توسعه قطعات پپتیدی کوچک با عملکرد مشابه با پروتئین‌های ضد رگ زایی به عنوان راه حلی برای چالش‌های فوق در نظر گرفته شده است (۴۰). پپتیدها معمولاً کمتر از پنجاه اسید آمینه داشته و اغلب با پیوندهای دی سولفیدی تقویت می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که در کل حدود ۷۰۰۰ پپتید با ویژگی‌های درمانی متنوع در جهان با منشاء طبیعی شناسایی شده است. پپتیدهای به دست آمده از زهر موجودات مختلف در سال‌های اخیر به طور گسترده برای کاربردهای دارویی در صنعت بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار گرفته است. پپتیدهای مشتق شده از زهر مارها، زنبورها و عقرب‌ها توانایی مبارزه موثر با سرطان در تومورهای بدخیم را دارند. به طور مشابه، پپتیدهای به دست آمده از میکروارگانیسیم‌ها، حیوانات، موجودات آبزی و گیاهان نیز ممکن است در مهار رشد رگ‌های خونی (فعالیت ضد رگ زایی) نقش داشته باشند (۴۱). سلول‌های سرطانی VEGF تولید می‌کنند که برای فرآیند رگ زایی ضروری است. در شرایط کم اکسیژن (هیپوکسی)، وجود موسین ۱ (MUC1) منجر به افزایش سطح HIF-1 $\alpha$  می‌شود که به نوبه خود منجر به رشد تومورها و تشکیل عروق خونی جدید (رگ زایی) می‌شود. بیان بیش از حد این ژن با افزایش سطح پروتئین Bcl-xL و غیرفعال کردن پروتئین BAD از مرگ برنامه ریزی شده سلولی جلوگیری می‌کند. کاهش سطح بیان VEGF با سرکوب MUC1 مرتبط است، که نشان می‌دهد کاهش MUC1 تأثیر منفی بر تشکیل عروق خونی دارد. به نظر می‌رسد که تاکیپلسین با سرکوب MUC1 منجر به کاهش بیان VEGF و مهار رگ‌زایی گردد (۴۲).

#### تاکیپلسین مدلی از پپتید نفوذ کننده در سلول:

یک سیستم دارورسانی موثر و قابل اعتماد طراحی شده است تا عمدتاً عوامل درمانی را در مقادیر کافی به محل مورد نظر منتقل کند، در حالی که اثرات نامطلوب را بر سلول‌های غیر هدف محدود نماید. استفاده از سیستم‌های تحویل مبتنی بر فناوری نانو، مانند نانوحامل‌ها، تحویل دقیق به اهداف خاص را تسهیل نموده است. اغلب، مولکول‌های دارو با مشکلاتی در رابطه با پایداری و اثرات خارج از هدف مواجه می‌شوند. محققان در تلاشند تا با به کارگیری راهبردهایی برای ایجاد یک رویکرد ایمن و موثر به این مسائل بپردازند (۴۳). این را می‌توان با اصلاح شیمیایی مولکول داروی فعال یا پیوند دادن آن به بخش حامل برای ایجاد یک پیش دارویی که به عنوان یک پیش ساز زیستی عمل می‌کند به دست آورد. ترکیبات پپتید-دارو (Peptide-drug conjugates, PDC) یک دسته در حال رشد از پیش داروها هستند که پتانسیل بالایی دارند. آن‌ها از یک پپتید خاص تشکیل شده‌اند و در حال حاضر به عنوان یک دسته امیدوارکننده از پیش داروها مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴۴). پپتیدها نسبت به سایر مولکول‌ها هنگامی که به عنوان بخش‌های حامل در ترکیبات دارویی استفاده می‌شوند، مزایای زیادی از جمله ایمنی، کارایی، انتخاب‌پذیری، ویژگی بالا و سادگی سنتز را از خود نشان می‌دهند. به منظور دستیابی به فراهمی زیستی بهبود یافته یا ویژگی هدف، امکان تبدیل این پپتیدهای حامل به پپتیدهای نافذ سلولی (CPPs) از طریق ترکیب اسیدهای آمینه انتخابی در طول فرآیندهای سنتز و طراحی وجود دارد (۴۵). CCPs گروه خاصی از پپتیدها هستند که طول آن‌ها بین ۶ تا ۴۰ اسید آمینه است. آن‌ها دارای قابلیت منحصر به فردی برای شکستن غشای سلولی و انتقال ماکرومولکول‌های مختلف به داخل سلول هستند. CPPها به دلیل اندازه فشرده و ظرفیت حمل بار، اغلب به عنوان نانوحامل‌های احتمالی در نظر گرفته می‌شوند. ظرفیت پپتیدهای نافذ سلولی برای انتقال ماکرومولکول‌های متنوع، از جمله الیگونوکلیئوتیدها، پروتئین‌ها، نقاط کوانتومی و مولکول‌های دارویی به سلول‌ها، توجه قابل توجهی را از سوی جامعه علمی در زمینه نانوپزشکی به خود جلب کرده است (۴۶). برخی از CCPs مانند pVEC، penetratin و MAP به دلیل دارا بودن خواص ضد میکروبی ممکن است به عنوان عوامل درمانی یا نانودارو عمل نمایند. علیرغم عملکرد ذکر شده برای CPPها به عنوان وسایل نقلیه پیشرفته

تحویل دارو، موانع متعددی باید برطرف شود تا به طور کامل از قابلیت‌های آن‌ها استفاده شود. جذب CPP در درجه اول تحت تأثیر نوع سلول خاص، ماهیت محموله متصل به آن‌ها و محیط خارج سلولی اطراف بستگی دارد (۴۷). پپتیدهای ضد سرطانی دریایی از گونه‌هایی به دست می‌آیند که در محیط‌هایی با غلظت نمک بالا زندگی می‌کنند. در نتیجه، این پپتیدها مقاومت بیشتری در برابر تغییرات سطح نمک و شرایط pH نشان می‌دهند. این پپتیدها پایداری استثنایی دارند که بیشتر به فراوانی پل‌های دی سولفیدی (۲-۳) و ترکیب اسیدهای آمینه غیر طبیعی نسبت داده می‌شود (۴۸). پیش از این، برخی از پپتیدها با خاصیت ضد میکروبی مشتق شده از منابع زیستی مختلف زمینی، از جمله بوفورین، هیستاتین، پپتید iztli و andolicidin نشان داده شده بود که فعالیت CPP را نشان می‌دهند (۴۹ و ۵۰). هم چنین در مطالعات مختلفی به نقش تاکپلسین به عنوان یک پپتید نفوذ کننده در سلول‌های گیاهی و جانوری اشاره شده است. توانایی تاکپلسین در شکستن غشاهای پپتید خاصیت ضد باکتریایی می‌دهد. یافته‌ها نشان می‌دهد که تاکپلسین به جای فرآیندهای وابسته به انرژی مانند اندوسیتوز یا ماکروپینوسیتوز، از طریق روش‌های مستقل از انرژی، یعنی نفوذ مستقیم غشاء وارد سلول‌ها می‌شود (۵۱). تحقیقات در حال انجام برای تعیین فرآیند دقیق جذب تاکپلسین توسط سلول‌های زنده در حال انجام است. CCPs عمدتاً به دلیل ظرفیتشان در حمل و نقل مولکول‌های محموله‌ای که از نظر اندازه بزرگتر از خود پلیمرها هستند، شناخته شده و به حامل‌های مؤثری برای انتقال ماکرومولکول‌ها تبدیل می‌گردند. در مطالعات انجام شده کارایی حمل و نقل محموله توسط تاکپلسین با پیوند غیر کووالانسی این پپتید با آزنیم‌هایی مانند  $\beta$ -گلوکورونیداز و  $\beta$ -گالاکتوزیداز ارزیابی شده است. نتایج نشان داده است که کارایی حمل و نقل محموله توسط این پپتید بیش از ۹۰٪ در سلول‌های گیاهی و پستانداران می‌باشد (۵۱). علاوه بر این، مانند سایر CCPs، تاکپلسین قابلیت اتصال به DNA را نشان می‌دهد. هم چنین از ویژگی تحویل محموله و محلی سازی هسته‌ای آن ممکن است برای تحویل هدفمند ژن‌ها و مولکول‌های siRNA به هسته سلول استفاده شود. به عنوان مثال تاکپلسین به راحتی یک ترکیب غیر کووالانسی با anti-miR210 تشکیل می‌دهد و آن را با موفقیت به سلول‌های گلیوبلاستوما منتقل می‌نماید. ترکیب تولید شده هنگام قرار گرفتن در معرض سرم و هپارین در مقادیر مورد استفاده پایداری قابل توجهی را از خود نشان می‌دهد. پس از ورود به سلول‌ها، این مجموعه با تأثیرگذاری بر بسیاری از ویژگی‌های کلیدی سرطان، از جمله رشد سلولی، حرکت، ایجاد ساختارهای کروی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و بیان ژن‌های هدف‌گیری شده توسط miR-210، اثرات ضد سرطانی قابل توجهی را نشان می‌دهد (۵۲).

#### نتیجه گیری:

درمان سرطان شامل چندین تکنیک از جمله جراحی، شیمی درمانی، ایمونوتراپی و پرتودرمانی است. اگرچه چندین گزینه درمانی در دسترس وجود دارد، سرطان همچنان به عنوان یکی از علل برجسته مرگ و میر در سراسر جهان شناخته شده می‌باشد. رویکردهای درمانی ذکر شده دارای کاستی‌های متعددی می‌باشند به ویژه زمانی که پس از جراحی در مراحل اولیه، خطر شروع متاستاز افزایش می‌یابد. علاوه بر این، شیمی‌درمانی‌ها فاقد انتخاب‌پذیری هستند و ممکن است باعث ایجاد مقاومت در سلول‌های سرطانی شوند. ACP‌ها به عنوان ابزار تشخیصی و درمانی از نظر اثربخشی و ویژگی عملکرد مطلوبی از خود نشان داده‌اند. ACP‌های، مشتق شده از پپتیدهای ضد میکروبی، با افزایش قابلیت هدف‌گیری مولکولی، عملکرد درمانی منحصر به فردی را از خود نشان داده‌اند. ما بر این عقیده هستیم که تاکپلسین به عنوان مدل پیشنهادی از ACP‌ها یک رویکرد جدید و تشویق‌کننده برای هدف قرار دادن و مبارزه با سلول‌های تومور به طور خاص را ارائه می‌کند. مطالعات متعددی بر نقش تاکپلسین در مهار رشد تومور در موش‌ها و جنین‌های مرغ اشاره نموده است (۲۱). تاکپلسین به دلیل ویژگی‌های ضد باکتریایی خود به خوبی شناخته شده است و به دلیل توانایی آن در نفوذ به سلول‌ها و ارسال محموله به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. علاوه بر این اعتقاد بر این است که تاکپلسین به دلیل منشاء دریایی خود، توانایی رشد در محیط‌های چالش‌برانگیزتر را دارا می‌باشد. پایداری افزایش یافته پپتید در مقایسه با CPP‌های معمولی، مانند Tat، فراهمی زیستی برتر آن را تضمین می‌کند. علاوه بر این، حمل و نقل کارآمد محموله توسط این پپتید همراه با ظرفیت آن برای هدف قرار دادن هسته سلول، ممکن است تحویل ترکیبات درمانی مانند داروها و ژن‌ها/siRNA‌ها را به سلول‌ها تسهیل نماید. این امر تاکپلسین را به یک نانوحامل مناسب برای کاربردهای بالینی تبدیل نموده است.



### سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پایان نامه با عنوان "بررسی نقش پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1(+)- tachyplestin بر رشد سلول های سرطانی MC4-L2 در موش های مبتلا به سرطان پستان تجربی" در مقطع کارشناسی ارشد رشته ژنتیک در سال ۱۴۰۲ - ۱۴۰۱ و با حمایت مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد اجرا شده است.

### References;

1. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*. 2019; 9(4): 217.
2. Mohammadi E, Aminorroaya A, Fattahi N, Azadnajafabad S, Rezaei N, et al. Epidemiologic pattern of cancers in Iran; current knowledge and future perspective. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2021; 20(1): 825-9. [In Persian].
3. Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries. *Iranian journal of public health*. 2018; 47(3): 309. [In Persian].
4. Xie M, Liu D, Yang Y. Anti-cancer peptides: Classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open biology*. 2020; 10(7): 200004.
5. Yu WD, Sun G, Li J, Xu J, Wang X. Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. *Cancer letters*. 2019; 452: 66-70.
6. Aljabery F, Shabo I, Gimm O, Jahnsen S, Olsson H. The expression profile of p14, p53 and p21 in tumour cells is associated with disease-specific survival and the outcome of postoperative chemotherapy treatment in muscle-invasive bladder cancer. *In Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2018 ; 36(12): 530-7.
7. Yang K, Xu J, Liu Q, Li J, Xi Y. Expression and significance of CD47, PD1 and PDL1 in T-cell acute lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Pathology-Research and Practice*. 2019; 215(2): 71-265.
8. Hayden PJ, Sirait T, Koster L, Snowden JA, Yakoub-Agha I. An international survey on the management of patients receiving CAR T-cell therapy for haematological malignancies on behalf of the Chronic Malignancies Working Party of EBMT. *Current Research in Translational Medicine*. 2019; 67(3): 79-88.
9. Li G, Xia X, Long Y, Li J, Wu J, Zhu Y. Research progresses and applications of antimicrobial peptides. *Chinese Journal of Animal Nutrition*. 2014; 26(1): 17-25.
10. Narula P. *Assessing versatility of Tachyplestin in cancer therapeutics and as an antiviral agent* (Doctoral dissertation, IIT Delhi).
11. Tripathi AK, Vishwanatha JK. Role of Anti-Cancer Peptides as Immunomodulatory Agents: Potential and Design Strategy. *Pharmaceutics*. 2022; 14(12): 2686.
12. Chinnadurai RK, Khan N, Meghwanshi GK, Ponne S, Althobiti M, Kumar R. Current research status of anti-cancer peptides: Mechanism of action, production, and clinical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023; 164: 114996.
13. Agrawal P, Bhagat D, Mahalwal M, Sharma N, Raghava GP. AntiCP 2.0: an updated model for predicting anticancer peptides. *Briefings in bioinformatics*. 2021; 22(3): 153.
14. Karami Fath M, Babakhaniyan K, Zokaei M, Yaghoobian A, Akbari S, et al. Anti-cancer peptide-based therapeutic strategies in solid tumors. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2022; 27(1): 33. [In Persian ].

15. Del Genio V, Falanga A, Allard-Vannier E, Hervé-Aubert K, Leone M, et al. Design and validation of nanofibers made of self-assembled peptides to become multifunctional stimuli-sensitive nanovectors of anticancer drug doxorubicin. *Pharmaceutics*. 2022; 14(8): 1544.
16. Hilchie, A.L., Power Coombs, M.R. and Hoskin, D.W. Obstacles and solutions to the use of cationic antimicrobial peptides in the treatment of cancer. In *Small Wonders: Peptides for Disease Control*. American Chemical Society. 2012 : 61-78.
17. Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*. 2002; 66(3): 184-99.
18. Gaspar D, Veiga AS, Castanho MA. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in microbiology*. 2013; 4: 294.
19. Librizzi, M., Martino C, Mauro M , Abruscato G, Arizza V, et al. Natural Anticancer Peptides from Marine Animal Species: Evidence from In Vitro Cell Model Systems. *Cancers*.2023; 16(1): 36.
20. Matsuzaki K, Fukui M, Fujii N, Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1991; 1070(1): 259-64.
21. Chen Y, Xu X, Hong S, Chen J, Liu N, Underhill CB, Creswell K, Zhang L. RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth. *Cancer research*. 2001; 61(6): 2434-8.
22. Chen J, Xu XM, Underhill CB, Yang S, Wang L, et al. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells. *Cancer research*. 2005; 65(11): 4614-22.
23. Zhang Y, Wang C, Zhang W, Li X. Bioactive peptides for anticancer therapies. *Biomaterials Translational*. 2023; 4(1): 5.
24. Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry*. 1992; 31(49): 23-12416.
25. Baxter AA, Lay FT, Poon IK, Kvangsakul M, Hulett MD. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017; 74(20): 25-3809.
26. Balasubramanian K, Schroit AJ. Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annual review of physiology*. 2003; 65(1): 34-701.
27. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2009; 9(12): 874-85.
28. Raman K, Kuberan B. Chemical tumor biology of heparan sulfate proteoglycans. *Current chemical biology*. 2010; 4(1): 20-31.
29. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008; 1778(2): 75-357.
30. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19(2): 448.
31. Liu Y, Zhu X. Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases. *Translational neurodegeneration*. 2017; 6(1): 1-8.
32. Wu ZZ, Ding GF, Huang FF, Yang ZS, Yu FM, Tang YP, Jia YL, Zheng YY, Chen R. Anticancer activity of anthopleura anjunae oligopeptides in prostate cancer DU-145 cells. *Marine drugs*. 2018; 16(4): 125.
33. Wu J, Chen X, Zhang J, Chen J, Wang Y, et al. Tachyplesin induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells and enhances the chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin by

- activating Fas and necroptosis pathway. *Chemical Biology & Drug Design*. 2021; 97(4): 20-809.
34. Ouyang GL, Li QF, Peng XX, Liu QR, Hong SG. Effects of tachyplesin on proliferation and differentiation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2002; 8(6): 1053.
  35. Zhang HT, Wu J, Zhang HF, Zhu QF. Efflux of potassium ion is an important reason of HL-60 cells apoptosis induced by tachyplesin. *Acta pharmacologica sinica*. 2006; 27(10): 74-1367.
  36. Paredes-Gamero E J, Martins M. N, Cappabianco F. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820(7): 1062-1072.
  37. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2015; 16(6): 44-2129.
  38. Shoari A, Khodabakhsh F, Cohan RA, Salimian M, Karami E. Anti-angiogenic peptides application in cancer therapy; a review. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2021; 16(6): 559.
  39. Vicari D, Foy KC, Liotta EM, Kaumaya PT. Engineered conformation-dependent VEGF peptide mimics are effective in inhibiting VEGF signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(15): 25-13612.
  40. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*. 2015; 20(1): 8-122.
  41. Taniguchi M, Nunnery JK, Engene N, Esquenazi E, Byrum T, et al. A cyclic depsipeptide from a Palmyra Atoll collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of natural products*. 2010; 73(3): 8-393.
  42. Ceci C, Atzori MG, Lacal PM, Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 signaling and its inhibition in modulating tumor invasion: Experimental evidence in different metastatic cancer models. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(4): 1388.
  43. Rohira H, Arora A, Kaur P, Chugh A. Peptide cargo administration: current state and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2023; 13: 1-29.
  44. Chavda VP, Solanki HK, Davidson M, Apostolopoulos V, Bojarska J. Peptide-drug conjugates: a new hope for cancer management. *Molecules*. 2022; 27(21): 7232.
  45. Fu C, Yu L, Miao Y, Liu X, Yu Z, Wei M. Peptide–drug conjugates (PDCs): a novel trend of research and development on targeted therapy, hype or hope?. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2023; 13(2): 516-498.
  46. Tünnemann G, Martin RM, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F, et al. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *The FASEB journal*. 2006; 20(11): 1775-84.
  47. Zorko M, Langel Ü. Cell-penetrating peptides. *Cell penetrating peptides: methods and protocols*. 2022: 2-3.
  48. Otero-González AJ, Magalhaes BS, Garcia-Villarino M, López-Abarrategui C, Sousa DA, Dias SC, Franco OL. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB journal*. 2010; 24(5): 34-1320.
  49. Plaza JG, Morales-Nava R, Diener C, Schreiber G, Gonzalez ZD, et al. Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides: two sides of the same coin. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(21): 57-14448.

50. Takeshima K, Chikushi A, Lee KK, Yonehara S, Matsuzaki K. Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(2): 5-1310.
51. Jain A, Yadav BK, Chugh A. Marine antimicrobial peptide tachyplesin as an efficient nanocarrier for macromolecule delivery in plant and mammalian cells. *The FEBS journal*. 2015; 282(4): 45-732.
52. Jana A, Narula P, Chugh A, Kulshreshtha R. Efficient delivery of anti-miR-210 using Tachyplesin, a cell penetrating peptide, for glioblastoma treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019; 572: 118789.

## اثر انجماد بر جذب زیستی مواد گوشتی

پرستو یآوری<sup>۱</sup>، سیده فاطمه احمدی<sup>۲\*</sup>، محمد حجت الاسلامی<sup>۳</sup>

۲۳. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲۴. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲۵. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲۶. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، ادویه ای و عطری، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

انجماد یکی از بهترین فرآیندهای نگهداری مواد غذایی است که منجر به تولید محصولات بسیار ارزشمند و با کیفیت در طول مدت نگهداری می‌شود. با این حال انجماد برای تمامی مواد غذایی مناسب نیست و در برخی مواد غذایی منجر به تغییرات فیزیکی و شیمیایی می‌شود که افت کیفیت ماده غذایی را در طی عمل رفع انجماد و یا در در محصول نهایی به همراه دارد. فرآیند انجماد در مواد غذایی بیشتر تحت تاثیر ماده سازنده غالب آنها یعنی آب می‌باشد. انجماد به عنوان ساده ترین روش برای نگهداری گوشت یک نقش اساسی در صنعت داشته و سلامتی محصولات گوشت را که به تمام نقاط جهان فرستاده می‌شود تضمین می‌کند. کیفیت نهایی محصول غذایی منجمد شده تا حدود زیادی به انتقال فاز و یا فرایند تبلور تغییر آب به یخ وابسته است اندازه کریستالهای یخ برای کیفیت نهایی از مواد غذایی منجمد بسیار تاثیر گذار بوده و به عنوان آسیب غیر قابل برگشت به ساختار سلولی که به نوبه خود موجب تنزل بافت و رنگ محصول می‌شود تلقی می‌گردد. کاهش دما بر اثر انجماد سبب متوقف کردن مکانیزم های فسادمانند فساد باکتریایی و شیمیایی می‌شود. انجماد سالیان متمادی برای حفاظت از غذاهای با ارزش مثل گوشت و ماهی به کار رفته است و در سالهای اخیر استفاده از آن بسیار گسترش پیدا کرده است. گوشتی که با روش انجماد نگهداری می‌شود بعد از خارج شدن از حالت انجماد بهترین کیفیت را از نظر طعم و بافت دارا است. همچنین از نظر ارزش غذایی نیز حداکثر مطلوبیت را در حین نگهداری دارد. اخیرا روشهای انجماد مواد غذایی بهبود چشمگیری پیدا کرده است زیرا غذاهای منجمد کیفیت بسیار بالاتری نسبت به غذاهایی دارد که با روش سنتی تهیه شده و تحت فرایندهای حرارتی قرار گرفته اند.

**واژگان کلیدی:** فرایند انجماد، کیفیت محصولات گوشتی، افزایش ماندگاری، ارزش غذایی بالا، اثر فرایند.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۳۸۲۲۹۶۸

پست الکترونیک: f.ahmadi208@gmail.com

## The effect of freezing on the biosorption of meat foods

Parastoo Yavari<sup>1</sup>, Seyedeh Fatemeh Ahmadi<sup>3,4\*</sup>, Mohammad Hojjatoleslami<sup>2,4</sup>

1. PhD student of Department of Food science and technology, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
4. Medicinal, spicy and aromatic plants Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

Freezing is widely recognized as a highly efficient method for preserving food, generating valuable and high-quality products over time. However, it may not be suitable for all food varieties, as it can induce physical and chemical alterations in certain cases, leading to a decline in quality during thawing or in the final product. The freezing process in food is heavily influenced by its primary component, water. In the food industry, freezing serves as a simple approach to preserving meat, playing a crucial role in ensuring the health and quality of meat products distributed globally. The overall quality of frozen food items relies significantly on the phase transition or crystallization process, wherein water changes into ice. The size of ice crystals profoundly impacts the final quality of frozen food, with larger crystals causing irreversible damage to cell structures and affecting texture and color. By reducing the temperature during freezing, spoilage mechanisms such as bacterial and chemical degradation are halted. Freezing has long been employed as a preservation method for prized foods like meat and fish, with its usage expanding considerably in recent years. Meat preserved through freezing retains optimal taste and texture upon thawing, while also preserving maximum nutritional value throughout storage. Significantly, advances in food freezing techniques have greatly improved in recent years, resulting in frozen foods of significantly higher quality compared to those processed using traditional methods or subjected to thermal processes.

**Keywords:** Freezing process, Quality of meat products, Extended shelf life, Enhanced nutritional value, Process effect.

### تاریخچه

انجماد مواد غذایی به عنوان وسیله ای برای نگهداری هزاران سال مورد استفاده قرار گرفته است، اگرچه مرز بین تبرید طبیعی و مصنوعی به هیچ وجه مشخص نیست. با این حال، سال ۱۷۵۵ بسیار مهم است زیرا پروفیسور اسکاتلندی، ویلیام کالن، اولین دستگاهی را ساخت که مقدار کمی یخ را بدون استفاده از سرمای طبیعی تولید کرد. در طول ۱۰۰ سال بعد، اولین ماشین های تبرید (سرمازا) توسط چندین مخترع توسعه یافت و انجماد به عنوان یک روش نگهداری تجاری برای اولین بار در مقیاس بزرگ در اواخر دهه ۱۸۷۰ معرفی شد. پیشرفت در انجماد تجاری شامل حمل و نقل گوشت از آمریکای جنوبی و استرالیا به اروپا در سال ۱۸۸۱ بود. محصولات معمولاً قبل از عرضه به بازار انجماد زدایی می شدند. طی ۵۰ سال بعد، گوشت، ماهی و کره اصلی ترین محصولات بودند که منجمد می شدند و همگی به عنوان کالاهای فله (حجیم) استفاده می شدند (۱).

### تعریف انجماد

با پایین آمدن دما و سرد شدن مایع، حرکت مولکول های آن کند می شود، تا جایی که در یک دمای معین، انرژی جنبشی برخی مولکول ها آنقدر کم می شود که نیرو های جاذبه بین مولکولی بتوانند آنها را در یک شبکه بلوری ثابت نگه دارند. در این حالت می توان گفت که منجمد شدن آغاز شده است و بدین ترتیب مولکول های کم انرژی آهسته و به تدریج در شبکه بلور قرار می گیرند (۲).

### دلیل استفاده از سرما

سرما باعث کند شدن یا توقف فعالیت عوامل بیولوژیک و آنزیم ها می شود. سرمای حدود ۴-۵ درجه سانتی گراد بالای صفر مثلاً در یخچال های خانگی و برای نگهداری کوتاه مدت و سرمای حدود ۱۸- درجه سانتی گراد، در فریزرهای خانگی برای نگهداری طولانی

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

تر (حدود ۶ ماه تا یک سال) به کار می رود. انجماد مواد غذایی باید با سرمای شدید و به سرعت انجام شود تا آب داخل سلولی و خارج سلولی بطور هم زمان منجمد شوند و جدار سلول ها پاره نشود (۳).

#### اهمیت انجماد

فریز کردن مواد غذایی از جمله فرآورده های گوشتی، غیرگوشتی، میوه جات و... در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد به بالا در حفظ ویتامین ها و مواد مغذی موجود در آنها تاثیرگذار می باشد. غذاهای پخته شده را نیز می توان در حالت انجماد نگهداری کرد، بدین ترتیب مصرف کنندگان می توانند غذاها را به صورت پخته شده و یا نیم پز در طولانی مدت نگهداری کنند. انجماد سریع مواد غذایی از ایجاد کریستالهای بزرگ یخ روی آنها جلوگیری می کند، چرا که برای تشکیل کریستالهای بزرگ وقت کافی وجود ندارد. این در حالی است که در انجماد کند کریستالهای بزرگی ایجاد می گردد و این به علت وجود زمان کافی برای تشکیل آنها می باشد. برای سالم نگهداشتن خوراکی های گرم در فریزر، باید پیش از انجماد کاملاً سرد شوند.

دو نوع سیستم انجماد اصلی برای محصولات غذایی وجود دارد:

مکانیکی (که از یک مبرد در گردش برای کاهش دمای هوا یا مایعی که از روی غذا عبور می کند استفاده می کند) سیستم کرایوژنیک یا برودتی (که از کاربرد مستقیم نیتروژن مایع یا دی اکسید کربن روی غذا استفاده می کند). سرعت حذف گرما از غذا در حین انجماد بستگی به این دارد که گرما با چه سرعتی می تواند در داخل غذا حرکت کند و چقدر می تواند از سطح غذا به فضای جو اطراف آزاد شود. فریزرهای صنعتی حرارت را تا حد امکان از سطح مواد غذایی خارج می کنند (۳).

#### معرفی روش های انجماد محصولات غذایی

- فریزر های تونلی وزشی ( هوای فشرده متحرک ) (Air-blast tunnel)
- فریزر های تسمه ای (Belt freezer)
- انجماد غوطه وری محصولات غذایی در محیط های سرمازا (Immersion freezers)
- فریزر های کرایوژنیک (Cryogenic freezers)
- انجماد فوق سریع (IQF) (۴)

#### نکات مهم در مورد انجماد

تمامی مواد غذایی به جز مواد غذایی کنسروی و تخم مرغ داخل پوسته قابل فریز کردن هستند. (جدول ۱) علاوه بر این کیفیت بعضی از غذاهای منجمد شده مانند مایونزها، بسیاری از سس ها و کاهو پس از ذوب شدن یخ کاهش می یابد. مواد غذایی منجمد باید در دمای ثابتی نگهداری شوند تا از ایجاد واکنش در آنها (بر اثر دماهای غیرثابت) جلوگیری گردد، بنابراین در سالم بودن غذاها و فرآورده های منجمد شده شکی نیست، چرا که در این مواد غذایی سرعت تحرک مولکول ها کاهش یافته و میکروب ها و باکتری ها غیرفعال شده اند. در نتیجه عمر مواد افزایش یافته و از رشد میکروب ها و عوامل بیماری زا و بطور کل شیوع بیماری ها پیشگیری می گردد. با توجه به اینکه انجماد تاثیر فراوانی در جلوگیری از رشد باکتری ها و میکروب ها دارد، زمانی که این غذاها از فریز خارج شده و انجماد زدایی می گردند احتمال فعال شدن مجدد میکروب ها، باکتری ها و کپک ها وجود دارد، در نتیجه باید دقت لازم را در نگهداری از آنها بعمل آورد و آنها را همانند غذای تازه نگهداری کرد. بهتر است مواد غذایی زمانی که تازه هستند فریز شوند، چرا که غذاهای تازه با کیفیت مطلوب تری نگهداری می شوند، این در حالی است که اگر غذاهایی که مدتی فریز نشده اند و رو به فساد می روند را فریز شوند کیفیت لازم را نخواهد داشت (۴).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

جدول ۱- مدت زمان نگهداری برخی از مواد پروتئینی در فریزر

مدت زمان نگه داری در فریزر	نوع محصول
۱۲-۴ ماه	گوشت خام (استیک، قطعه شده و...)
۳-۴ ماه	گوشت چرخ کرده خام
۲-۳ ماه	گوشت پخته شده
۱-۲ ماه	گوشت عمل آوری شده ( بیکن و همبرگر)
۳-۶ ماه	صدف و میگو
۲-۴ ماه	ماهی خام و پخته شده
بیشتر از ۱ ماه	شیر
۱۰-۱۲ ماه	انواع لوبیا ، قارچ، سویا، نخود، ذرت
بالاتر از ۶ ماه	تخم مرغ شکسته شده (زرده و سفیده جدا)
۱۲-۹ ماه	مرغ و بوقلمون خام و...
۴ ماه	ماکیان پخته شده
منبسط می شوند و ترک بر می دارند.	تخم مرغ با پوسته خام
بالاتر از ۴ ماه	پنیر رنده شده
لاستیکی می شوند.	تخم مرغ جوشانده شده

### ایمنی مواد غذایی حین انجماد

انجماد فعالیت میکروارگانیسم های فاسد کننده را در داخل و روی غذاها متوقف می کند و می تواند برخی از میکروارگانیسم ها را برای مدت طولانی حفظ کند. شیوع محدود بیماری های ناشی از غذا در ارتباط با غذاهای منجمد نشان می دهد که برخی از پاتوژن های انسانی، اما نه همه آنها، توسط فرآیندهای انجماد تجاری از بین می روند. پژوهش ها نشان می دهد که بسیاری از میکروارگانیسم های بیماری زا ممکن است در اثر انجماد به طور غیر کشنده آسیب ببینند. از طریق تحقیقات، به نظر می رسد که ممکن است در آینده از انجماد برای کاهش قابل اعتماد جمعیت پاتوژن های منتقله از غذا و همچنین برای حفظ مواد غذایی استفاده شود (۵).

### طبخ غذاهای منجمد

تقریباً همه مواد غذایی منجمد بخصوص انواع گوشت منجمد را می توان بلافاصله پس از خروج از فریزر درون آب یا مایکروویو پخت و مصرف کرد تنها نکته حائز اهمیت در این میان این است که معمولاً زمان پخت مواد غذایی منجمد ۱/۵ برابر حالت معمولی است اما اگر قصد کباب کردن گوشت را دارید بهتر است ابتدا به یکی از شیوه های گفته شده آن را یخ زدایی کنید چون در طی کباب کردن ممکن است قسمت های خارجی پخته شوند در حالی که قسمت های عمیق تر بعلت رسیدن کمتر گرما خام باقی بماند و میکروب های احتمالی آن از بین نروند. هنگامی که مرغ را بصورت کامل منجمد می کنید قبل از فریز کردن احشاء خوراکی داخل آن خارج شوند (۶).



### اثر انجماد بر کیفیت گوشت

انجماد گوشت برای چندین هزار سال به عنوان یک روش نگهداری انجام می شود. به طور کلی گوشت در حین انجماد و در طول مدت زمان نگهداری دچار آسیب می شود. آسیب های ناشی از انجماد مواد غذایی را می توان در سه دسته اصلی: تغلیظ مواد محلول، آسیب مکانیکی ناشی از افزایش حجم آب و از دست دادن آب به دلیل ایجاد اختلاف فشار اسمزی درون و بیرون سلول طبقه بندی نمود. در حین نگهداری نیز در اثر نوسانات دمایی، مورفولوژی (اندازه، شکل و تعداد) کریستاله دچار تغییر می شوند که این پدیده اصطلاحاً کریستالیزاسیون مجدد نامیده می شود علاوه بر این واکنشهای شیمیایی در حین نگهداری ادامه می یابد و شدت این واکنش ها بستگی به دمای نهایی نگهداری و یا مقدار آب غیر قابل انجماد گوشت دارد. از شاخصهای مهم کیفی گوشت که تحت تاثیر انجماد و رفع انجماد قرار می گیرند می توان به کاهش ظرفیت نگهداری آب WHC، تشکیل خونابه در حین رفع انجماد، دناتوراسیون پروتئین ها، اکسیداسیون چربی ها، افت رنگ محصول و کاهش میزان سفتی (نرمی) بافت اشاره کرد. وسعت هر یک از این اثرات با اندازه و توزیع کریستال های یخی که در طی انجماد در گوشت تشکیل می شوند تعیین می شود. کاهش اثرات منفی انجماد بر کیفیت گوشت یک چالش است، زیرا اندازه و توزیع کریستالی یخ توسط عوامل متعددی مانند سرعت انجماد و دما و مدت نگهداری کنترل می شود. یکی از روشهای شناخته شده برای کاهش آسیبهای ناشی از انجماد افزایش سرعت انجماد می باشد. سرعت انجماد ماده غذایی از نسبت اختلاف بین دمای اولیه و دمای نهایی ماده غذایی به مدت زمان انجماد به دست می آید. این نسبت بستگی به اندازه و شکل محصول (بویژه ضخامت) مکانیسم انتقال حرارت و دمای محیط سرد کننده دارد. سرعت انجماد: بر روی پارامترهای اصلی تعداد، اندازه، شکل و توزیع کریستال تاثیر گذار می باشد. طبق قاعده کلی، هر چه قدر تعداد کریستال های یخ بیشتر باشد اندازه کریستال ها کوچک تر شده و به همان نسبت شدت آسیب کمتر می شود. شکل کریستال های یخ نیز مهم می باشد. زیرا کریستال های گرد به راحتی بر روی هم لغزیده و بافتی نرم را ایجاد می کنند در حالی که کریستال هایی که لبه های دندانه دار و سطح ناهموار دارند بافتی نامطلوب از لحاظ حسی ایجاد کرده و احتمال پارگی بافت سلولی را نیز افزایش می دهند (۳).

### اثر انجماد و انجماد زدایی بر روی کیفیت گوشت

**پروتئین:** از دست دادن رطوبت در اثر پخت و پز بین نمونه های گوشت تازه و منجمد و همچنین برای نمونه های انجماد و انجماد زدایی با سرعت های مختلف تفاوت معنی داری ندارد. دناتوراسیون پروتئین نمونه های گوشت با استفاده از ترموگرام DSC نشان داد که، میوزین بیشترین تاثیر را از طریق انجماد پروتئین می گیرد. انجماد آهسته باعث دناتوراسیون شدن پروتئین بیشتر از انجماد سریع شد. گروهی از دانشمندان دریافتند که انجماد و انبارمانی در شرایط انجماد باعث کاهش قابل توجه فعالیت  $Ca^{2+}ATPase$  و افزایش فعالیت  $Mg^{2+}-EGTA-ATPase$  می شود که منجر به دناتوراسیون شدن میوزین و کمپلکس تروپونین-تروپومیوزین می شود. آنها همچنین ارتباط قوی بین را اکسیداسیون پروتئین و دناتوراسیون شدن پروتئین را گزارش کردند (۴). انبارمانی در شرایط انجماد همچنین باعث افزایش غلظت املاح در داخل و خارج سلول می شود که منجر به افزایش واکنش شیمیایی انبارمانی در شرایط انجماد می شود. کریستال های یخ می توانند سلول های عضلانی را تخریب کنند و آنزیم های میتوکندری و لیزوزومی را در سارکوپلاسم آزاد کنند. بخش آب منجمد نشده از نظر اکسیداسیون مهم است، زیرا واکنش های شیمیایی می تواند باعث اکسیداسیون اولیه چربی در گوشت شود که منجر به تغییرات نامطلوب در رنگ، بو، طعم و سلامتی پس از انجماد زدایی می شود. دمای نهایی که گوشت در آن منجمد و نگهداری می شود، میزان آب یخ زده موجود برای انجام واکنش های شیمیایی را تعیین می کند. همچنین نشان داده شد که واکنش های بیوشیمیایی هنوز می تواند در گوشت منجمد و نگه داری شده در دمای بالاتر از  $-20^{\circ}C$  درجه سانتی گراد انجام شود، زیرا آب یخ زده کافی برای وقوع چنین واکنش هایی در دسترس باقی می ماند. دمای مطلوب برای نگهداری گوشت منجمد  $-40^{\circ}C$  درجه سانتی گراد است، زیرا تنها درصد کمی از آب در این نقطه منجمد نشده است (۶).

میوگلوبین، یکی از اجزای مهم گوشت، تحت تاثیر پایداری رنگ گوشت پس از انجماد و انجماد زدایی قرار می گیرد. دناتوراسیون قسمت میوگلوبین در حین انجماد، نگهداری در شرایط انجماد و انجماد زدایی حساسیت آن را به اتوکسیداسیون افزایش می دهد و

منجر به از دست دادن نمایش رنگ بهینه (اکسی میوگلوبین (قرمز)) می شود. وجود یک سیستم آنزیمی که قادر به کاهش مت میوگلوبین به میوگلوبین است، معروف به فعالیت کاهنده مت میوگلوبین (MRA) پیشنهاد شده است. با این حال، همانطور که گوشت رسیده می شود یا منجمد می شود، فعالیت MRA کاهش می یابد و مت میوگلوبین در سطح تجمع می یابد. MRA و عوامل کمکی، مانند NADH، می توانند از محیط سارکوپلاسمی پس از مرگ از بین بروند و به تسریع اکسیداسیون و از بین رفتن شکوفه (bloom) کمک کنند (۷). رسیدی چربی ها: اگر اکسیداسیون لیپید با ننگه داری در طی انجماد تسریع شود، مقدار رادیکال های آزاد افزایش می یابد و منجر به افزایش سرعت اکسیداسیون میوگلوبین می شود. pH گوشت منجمد و رفع انجماد شده به دلیل عواملی مانند دنا توره شدن پروتئین های بافر، آزادسازی یون های هیدروژن، از دست دادن مایعات، و پروتئین توسط عملکرد میکروبی یا آنزیمی کمتر از قبل از انجماد است که منجر به کاهش pH می شود (۸).

نرمی گوشت: با انجماد و انجماد زدایی افزایش می یابد، همانطور که با حداکثر نیرو اندازه گیری می شود. این افزایش با طول ننگه داری در شرایط انجماد و درجه رسیدگی قبل از انجماد مرتبط است. اثر نرم کننده انجماد زمانی که گوشت به اندازه کافی مانده شود از بین می رود. مکانیسم نرم شدن شامل تجزیه فیبرهای عضلانی، پیری و از دست دادن یکپارچگی ساختاری ناشی از تشکیل کریستال یخ است. بلورهای یخ بزرگ و خارج سلولی ساختار فیزیکی را مختل می کنند، در حالی که بلورهای یخ درون سلولی کوچک سرعت رسیدن را افزایش می دهند. نتایج متناقضی از ارزیابی حسی حساسیت به دست آمده است، با افزایش نیروی کمتری که در نمونه های انجماد/انجماد زدایی شده در مقایسه با گوشت سرد گزارش شده است. این امر به از دست دادن مایع در حین ذوب شدن نسبت داده می شود که منجر به آب کمتری برای هیدراته کردن فیبرهای عضلانی می شود. کاهش نیروی برشی به از دست دادن استحکام غشاء به دلیل تشکیل کریستال یخ نسبت داده می شود (۷).

### اثر انجماد بر کیفیت گوشت قرمز

اثر دو روش انجماد سریع و روش کند بر روی گوشت قرمز را مورد مطالعه قرار داده شد. نتایج آنها نشان داد که انجماد سریع اثر معنا داری بر روی نیروی برشی ندارد ولی به دلیل کاهش میزان خونابه می تواند باعث افزایش ظرفیت نگهداری آب شود. یو و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند سرعت انجماد و رفع انجماد اثر معنا داری روی مقدار خونابه گوشت خوک دارد. مطالعات لاگرا شدت و همکاران (۲۰۰۸) بر روی گوشت شتر مرغ نیز نشان داد که انجماد و رفع انجماد اثر منفی بر کیفیت گوشت شتر مرغ داشته و افزایش سفتی، کاهش رنگ محصول، افزایش اکسیداسیون پروتئین ها و کاهش رطوبت در حین انجماد و رفع انجماد می تواند باعث کاهش بازارپسندی گردد (۹). توتیرگ و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند، ننگه داری در دمای انجماد باعث تخریب پروتئین و اختلال در توانایی هضم در پروتئین های گوشت خوک شد. این پدیده بیشتر مشهود بود زیرا نمونه ها در دماهای بالا در طی یک دوره نگهداری طولانی منجمد شدند (۱۰). تأثیر دمای انجماد مختلف بر کیفیت گوشت در صنعت گوشت بر پایداری ساختارهای ثانویه پروتئین گوشت گاو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پروتئین میوفیبریلار گوشت گاو در فرآیندهای انجماد و انجماد زدایی تغییر کرده است. انجماد می تواند منجر به تخریب ساختارهای ثانویه پروتئین میوفیبریلار گوشت گاو و ساختارهای پیشرفته پروتئینی شود. پس از رفع انجماد پروتئین باز شده مجدداً تجمع می یابد و پروتئین دوباره به حالت طبیعی باز می گردد. انجماد می تواند بر پایداری پروتئین میوفیبریلار گاو تأثیر بگذارد، میزان نسبی مارپیچ آلفا و صفحه  $\beta$  و چرخش بتا و تغییر از مارپیچ آلفا و ساختارهای منظم به سیم پیچ تصادفی و ساختارهای بی نظم تغییر یافت. پس از رفع انجماد، افزایش میزان نسبی صفحه  $\beta$  پروتئین میوفیبریلار گوشت گاو در دمای انجماد کم تر، بیشتر بود. پایداری پروتئین میوفیبریلار گوشت گاو در کم ترین دما بهترین بود و پس از رفع انجماد مجدد پروتئین نیز بهترین بود. یعنی هر چه دمای انجماد کمتر باشد، میزان دنا توره شدن انجماد پروتئین میوفیبریلار گاو کمتر است و پایداری ساختارهای ثانویه پروتئین میوفیبریلار گوشت گاو بهتر است (۱۱). امان و همکاران (۲۰۱۶) انجماد بر پروتئین های گوشت به دلیل حساسیت آنها به تغییرات پروتئولیتیک تأثیر می گذارد. فعالیت آنزیمی در طول نگهداری در دمای انجماد به طور کامل غیرفعال نمی شود و باعث ایجاد ارتباط بین اسیدهای آمینه آزاد و پروتئولیز پروتئین می شود. گوشت گاو ننگه داری شده

در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد به مدت ۷ ماه افزایش مداوم غلظت آلانین را نشان داد، در حالی که گوشت گاومیش ننگه داری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد اسیدهای آمینه آزاد آن را افزایش داد که نشان دهنده پروتئولیز پروتئین است. ننگه داری در شرایط انجماد کاهش مداوم در کل اسیدهای آمینه، عمدتاً اسیدهای آمینه ضروری، در هر دو عضله انتخاب شده (ماهچه دراز سیرنوس پشتی، عضله دوسر فمورس) را نشان داد. علاوه بر این، زمان انجماد برای چنین مدت کوتاهی، یعنی ۳ ماه، برای حفظ کیفیت مطلوب نیست (۱۲).

### اثر انجماد بر کیفیت گوشت سفید

**ماهی:** یکی از راه های افزایش زمان ماندگاری آبزیان نگهداری آن ها در دمای زیر صفر درجه سانتی گراد (انجماد) می باشد. توجه این امر در وجود منابع سرشار از پروتئین های قابل هضم با تمامی آمینواسیدهای ضروری و اسیدهای چرب غیر اشباع با خواص درمانی مهم همچون ایکوزاپنتانویک اسید و منابع سرشار از کلسیم، ید و ویتامین ها و سایر ریز مغذی ها در غذاهای دریایی است. این روش باعث می شود ترکیبات مغذی موجود در مواد غذایی با کمترین تغییر برای مدت نسبتاً طولانی حفظ شوند و از طرف دیگر از رشد و نمو موجودات ذره بینی جلوگیری کرده و فعالیت های آن ها را متوقف می کند. با توجه محدودیت فصل صید و پراکندگی محل مصرف ماهی تکنیک های متفاوتی جهت حفظ کیفیت این ماهی بکار می رود که یکی از معمولترین راه های آن استفاده از فریزرهای خانگی می باشد. انجماد ماهی یکی از بهترین راه های نگهداری است هرچند نگهداری ماهی به حالت منجمد می تواند مانع ضایعات میکروبی شود. ولی در حین نگهداری ماهی، کیفیت آن در نتیجه فاکتورهای متعدد کاهش میابد که یکی از این فاکتورها اکسیداسیون اسیدهای چرب چند غیراشباع می باشد که بو و مزه غیر متعارف تولید میکند. این تغییرات در حین هیدرولیز و اکسیداسیون چربیها اتفاق می افتد که عامل مهم برای پیشرفت تندشدگی و دناتوره شدن پروتئین و تغییرات بافتی است. ترکیبات فرار حاصل از شکسته شدن واکنش اکسیداسیون و واکنش هیدرولیتیک چربی ها (هیدرو پراکسیدها، آلدئیدها، کتون ها، اسیدهای چرب و...) بو، طعم، رنگ و بافت ارزش غذایی و به طور کلی کیفیت را دستخوش تغییر کرده و باعث عدم مطلوبیت مصرف کنندگان این منبع مهم غذایی می شود. انجماد با جلوگیری از دهدراسیون داخلی یا بی حرکتی آب، کاهش درجه حرارت و جلوگیری از رشد میکروبی باعث افزایش زمان ماندگاری محصول می گردد. به هر حال ممکن است گوشت ماهی طی فرآیندهای انجماد و انجماد زدایی با افت شاخصه های کیفی نظیر تغییر ماهیت پروتئین، اکسیداسیون چربی عضله ماهی، تخریب رنگ و طعم، تغییرات بافتی و کاهش وزن همراه باشد. این تغییرات بر روی خصوصیات حسی تاثیر گذاشته و باعث آسیب رساندن به کیفیت فیزیکی و شیمیایی و بافتی می شود. میزان افت کیفیت به فاکتورهای زیادی مانند آماده سازی محصول قبل از انجماد، نوسانات دما و شیوه انجماد زدایی بستگی دارد (۱۳). در زمینه بررسی تاثیر روند انجماد کند و انجماد سریع روی ریز ساختار و چکابه ترکیبات تقریبی و خصوصیات حسی فیله ماهی تیلابیلانیل مطالعه شد و نتیجه مطالعات نشان داد که در طول دوره انجماد میزان رطوبت، چربی و پروتئین فیله ماهی تیلابیلانیل کاهش و درصد خاکستر فیله به طور معنی داری نسبت به ماهی تازه افزایش یافت. در مطالعه مذکور هم چنین بیان شد که درصد اسیدهای چرب در زمان نگهداری در سردخانه در تمامی نمونه ها دستخوش تغییراتی گردید به گونه ای که درصد SFA به MUFA افزایش و درصد PUFA کاهش یافت. هم چنین تغییر ترکیبات تقریبی در نمونه های منجمد شده به انجماد تند بطور معنی داری کمتر از نمونه های انجماد کند بود. محاسبه مقدار چکابه نشان داد که نمونه های منجمد شده به روش کند چکابه بیشتری از نمونه های منجمد شده به روش تند داشتند. نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری تخریب ریز ساختمان فیله ها افزایش می یابد. این تخریب در نمونه های منجمد شده به روش انجماد تند کمتر از نمونه های انجماد کند بود. از نظر ارزیابی حسی نیز نمونه های انجماد تند از امتیاز بیشتری نسبت به انجماد کند برخوردار بودند (۱۴). آبرومند (۲۰۱۴) مطالعه ای بر روی ترکیبات مغذی چند گونه ماهی کم تر شناخته شده در ایران انجام داد نتایج نشان داد که در فرایند انجماد، میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در همه ی گونه های ماهی کاهش یافت. که این کاهش درصد پروتئین به دلیل دناتوره شدن پروتئین و کاهش درصد چربی با اکسیداسیون چربی ها در طول ننگه داری در شرایط انجماد همراه است. ننگه داری در شرایط انجماد منجر به از دست دادن ترکیبات

مغذی به ویژه در ماهیان چرب مانند platycephalidae می‌شود (۱۵). کیوان و همکاران (۲۰۰۸) میزان پروتئین را در گوشت ماهی سفید دریای خزر ۸/۲۱ درصد برآورد کردند که پس از شش ماه نگهداری در سردخانه به ۹/۱۹ درصد کاهش پیدا کرد. تخریب پروتئین‌های گوشت ماهی در مدت نگهداری در سردخانه می‌تواند بدلیل افزایش و آرایش کریستال‌های یخ متاثر از آب شدن باشد همچنین میزان پروتئین در ماهی منجمد شده بستگی به دمای نگهداری، نوسان دما، تغییرات رطوبت، زمان نگهداری و تخریب آنزیم دارد (۱۶). نتایج مطالعات نشان داد، چرخه های متعدد F-T باعث دناتوره شدن اکسیداتیو پروتئین و لیپید و همچنین آسیب مکانیکی به بافت عضلانی می‌شود که ثبات رنگ را از بین می‌برد، سختی، فنی بودن و جویدن گوشت را کاهش می‌دهد و به طور همزمان WHC و مواد مغذی را کاهش می‌دهد. نتایج نشان داد که هیچ تفاوت آشکاری در گوشت قزل آلی رنگین کمان پس از اولین چرخه F-T وجود ندارد. بافت و ساختار بافت گوشت ماهی پس از سومین چرخه F-T، همراه با کاهش WHC و اکسیداسیون پروتئین‌ها و لیپیدها به طور قابل توجهی تغییر کرد. پس از پنجمین چرخه F-T، گوشت برش خرده نرم شد، پروتئین‌ها و لیپیدها به طور جدی اکسید شدند، رنگ به طور قابل توجهی تغییر کرد و کیفیت گوشت به طور جدی بدتر شد. پس از هفتمین چرخه F-T، عضله به دلیل بالاترین میزان تخلیه چکابه، آسیب جدی ریزساختاری و از دست دادن تغذیه پذیرفته نشد. این نتایج این پیشنهاد را تقویت می‌کند که کاهش نوسانات دما به میزان کمتر از سه برابر برای محافظت از کیفیت ماهی و محصولات گوشتی منجمد قابل توجه است (۱۷).

**میگو:** انجماد مهمترین روش نگهداری محصولات دریایی می‌باشد. تجزیه مواد آلی و تغییرات ترکیب شیمیایی میگو ممکن است بوسیله عوامل متعددی از جمله فعالیت‌های بیولوژیکی و آنزیمی صورت گیرد. محصولات شیلاتی طی فرآیند انجماد با افت ترکیبات شیمیایی مانند تغییر ماهیت پروتئین، اکسیداسیون چربی، تخریب رنگ و طعم، تغییرات بافتی و کاهش وزن همراه می‌باشند. هم‌اکنون در بازارهای جهانی میگو به اشکال منجمد، بلوک شده، سالاد میگوی پخته شده، انجماد سریع انفرادی، میگوی پرورشی و میگوی AFD عرضه می‌شود. میگوی منجمد به دلیل قیمت مناسب و مدت زمان نگهداری طولانی در سردخانه از ارزش تجاری بالا و تقاضای زیاد مصرف‌کنندگان برخوردار است. از مهمترین تغییرات کیفی که طی نگهداری طولانی میگوی منجمد در سردخانه اتفاق می‌افتد می‌توان به از بین رفتن رنگ، اکسیداسیون چربی، دناتوره شدن پروتئین و تشکیل بلورهای یخ اشاره کرد. هدف از ذخیره محصولات دریایی در سردخانه، افزایش طول دوره نگهداری و کاهش فعالیت‌های باکتریایی و آنزیمی است (۱۸). در تحقیق با نکه داری میگوی روزنبرگی طی ۱۸ روز نکه داری، در دمای -۱۰ درجه سانتی‌گراد مشخص شد که میزان اسید آمینه‌های آرژنین، لیزین، هیستیدین، تیروزین و متیونین در طول نکه داری کاهش معنی‌داری یافت (۱۹).

**گوشت مرغ:** تأثیر چرخه‌های انجماد-ذوب (F-T) بر خواص ساختاری، گوارشی و پروتئینی سینه مرغ در طول هضم آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده شد. با افزایش چرخه‌های F-T، سختی، جویدن، و نیروی برشی سینه مرغ افزایش یافت، در حالی که قابلیت هضم کاهش یافت و اندازه ذرات نمونه‌های گوارشی افزایش یافت. قابلیت هضم نمونه‌های پنجمین چرخه F-T در پپسین و پپسین/تریپسین نسبت به نمونه‌های تازه کاهش یافت. در طول چرخه‌های F-T، اختلال در ساختار پروتئین با کاهش  $\alpha$ -Helix، افزایش صفحه  $\beta$ ، شدت تریپتوفان طبیعی کاهش یافت. بنابراین، چرخه‌های F-T ساختار پروتئین را از بین برد و منجر به تجمع پروتئین‌ها شد و در نتیجه هضم مرغ در شبیه‌سازی هضم شده دشوار بود. این پدیده با افزایش تعداد چرخه‌های F-T حادث شد (۲۰) در مطالعه‌ای که توسط سویر و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت، تأثیر انجماد در سه دمای متفاوت و نگهداری منجمد در دمای -۱۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ماه بر اکسیداسیون لیپید و پروتئین در گوشت ران و سینه مرغ ارزیابی شد. نتایج تأیید می‌کند که اکسیداسیون پروتئین، که به عنوان میزان کربونیل و میزان سولفیدریل اندازه‌گیری می‌شود، با اکسیداسیون لیپید مرتبط است. می‌توان نتیجه گرفت که نگهداری منجمد اثرات قوی بر حساسیت لیپید و پروتئین ماهیچه مرغ به واکنش‌های اکسیداتیو دارد. گوشت مرغ به دلیل میزان بالای اسیدهای چرب اشباع نشده، به ویژه در معرض اکسیداسیون لیپیدها در طی نگهداری یخ‌زده است. هم‌چنین این مطالعه نشان داد که مکانیسم‌ها و مسیرهای واکنش برای اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها به طور مستقیم با عوامل پرواکسیداتیو و آنتی‌اکسیداتیو در گوشت ران و سینه مرغ مرتبط است. علاوه بر این، گوشت ران مرغ منجمد در دمای -۷

درجه سانتی گراد نسبت به گوشت سینه منجمد در همان دما آسیب اکسیداتیو بیشتری به پروتئین ها وارد کرد. بنابراین، کاهش دمای انجماد باعث کاهش اکسیداسیون پروتئین های موجود در گوشت ران پا در طول نگهداری منجمد می شود. از سوی دیگر، دمای نگه داری در شرایط انجماد آزمایش شده، اکسیداسیون لیپید و پروتئین را به حداقل نمی رساند، که به نظر می رسد همزمان اتفاق می افتد همچنین نشان داد، که افزایش دوره نگه داری در دمای انجماد منجر به کاهش پروتئین، اسید آمینه ضروری و غیر ضروری و اسیدهای آمینه در گوشت گاو، ماهی و گوشت مرغ شد (۲۱).

### نتیجه گیری

یکی از مناسب ترین روش های نگهداری مواد غذایی مازاد بر مصرف، روش منجمد کردن یا فریز کردن آنها است. در این روش مواد غذایی تازه پس از شستشو و آماده سازی در ظروف یا کیسه های پلاستیکی مقاوم و بدون منفذ قرار داده شده و سپس به درون فریزر برای طی فرآیند انجماد سریع منتقل می شوند. دمای انجماد تاثیر زیادی بر حفظ یا از دست دادن ارزش تغذیه ای غذاها دارد. مناسب ترین دما برای انجماد کم ضرر ماده غذایی از ۱۸- تا ۲۱- درجه سانتیگراد می باشد. در این دما ماده غذایی به سرعت منجمد شده و کیفیت آن حفظ می شود. در صورتی که دمای انجماد مناسب نباشد و زمان طولانی شود، در نتیجه پاره شدن دیواره سلولی، فرصت برای خروج آب و مواد مغذی درون سلولی فراهم شده و کریستال های بزرگ یخ در ماده غذایی ایجاد می شود که در صورت صحیح نبودن عمل رفع انجماد، ارزش تغذیه ای ماده غذایی به شدت بطور اجتناب پذیری کاهش پیدا می کند.

### References

1. Li B, Sun DW. Novel methods for rapid freezing and thawing of foods - A review. *J. Food Eng.* 2002; 54: 175–182.
2. Dalvi-Isfahan M, Jha PK, Tavakoli J, Daraei-Garmakhany A, Xanthakis E, Le-Bail A. Review on identification, underlying mechanisms and evaluation of freezing damage. *J Food Eng* .2019; 255:50–60.
3. Leygonie C, Britz TJ, Hoffman LC. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Sci.* 2012; 91(2):93–98.
4. Xie X, Zhai X, Chen M, Li Q, Huang Y, Zhao L, et al. Effects of frozen storage on texture, chemical quality indices and sensory properties of crisp Nile tilapia filets. *Aquac Fish.* 2023; 8(6): 626–633.
5. James C, Purnell G, James SJ. A Review of Novel and Innovative Food Freezing Technologies. *Food Bioprocess Technol.* 2015; 8(8): 1616–1634.
6. Tian Y, Zhu Z, Sun D-W. Naturally sourced biosubstances for regulating freezing points in food researches: Fundamentals, current applications and future trends. *Trends Food Sci Technol.* 2020; 95: 131–40.
7. Cheng H, Jung E-Y, Song S, Kim G-D. Effect of freezing raw meat on the physicochemical characteristics of beef jerky. *Meat Sci.* 2023; 197: 109082.
8. Werenńska M, Okruszek A, Haraf G, Wołoszyn J, Goluch Z. Impact of frozen storage on oxidation changes of some components in goose meat. *Poult Sci.* 2022; 101(1):101517.
9. Seon Mi Y, Jun Bo S, Kwang Il K, Sang Gi M, Sang Yoon L, Yeon Ji J, et al. Effects of various freezing and thawing techniques on pork quality in ready-to-eat meals. *African J Food Sci.* 2015; 9(11): 525–533.
10. Teuteberg V, Kluth I-K, Ploetz M, Kricshek C. Effects of duration and temperature of frozen storage on the quality and food safety characteristics of pork after thawing and after storage under modified atmosphere. *Meat Sci.* 2021; 174: 108419.

11. Lu N, Ma J, Sun D-W. Enhancing physical and chemical quality attributes of frozen meat and meat products: Mechanisms, techniques and applications. *Trends Food Sci Technol.* 2022; 124: 63–85.
12. Joo ST, Kauffman RG, Kim BC, Park GB. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Sci.* 1999; 52(3).
13. Walayat N, Tang W, Wang X, Yi M, Guo L, Ding Y, et al. Quality evaluation of frozen and chilled fish: A review. *eFood.* 2023; 4(1).
14. Karami B, Moradi Y, Ali Motale A, Eghbal Kha A. Effect of Different Freezing Processes on the Quality and Histological Changes of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Tilapia mosambicus*). *J Fish Aquat Sci.* 2018; 13(2): 82–88.
15. Aberoumand A. Preliminary studies on nutritive and organoleptic properties in processed fish fillets obtained from Iran. *Food Sci Technol.* 2014; 34(2): 287–291.
16. Keyvan A, Moini S, Ghaemi N, Haghdoost AA, Jalili S, Pourkabir M. Effect of Frozen Storage Time on the Lipid Deterioration and Protein Denaturation During Caspian Sea White Fish (*Rutilus frisi kutum*). *J Fish Aquat Sci.* 2008; 3(6): 404–409.
17. Bao Y, Zhang Y, Xu W. Effects of Different Freezing Rate and Frozen Storage Temperature on the Quality of Large-Mouth Bass (*Micropterus salmoides*). *Molecules.* 2023; 28(14): 5432.
18. Liu Z, Liu Q, Zhang D, Wei S, Sun Q, Xia Q, et al. Comparison of the Proximate Composition and Nutritional Profile of Byproducts and Edible Parts of Five Species of Shrimp. *Foods.* 2021; 10(11): 2603.
19. Kundacha N, Rungsardthong V, Kiatpongarp W, Vatanyoopaisarn S, Puttanlek C, Uttapap D, et al. Effect of freshness and salt on quality of white shrimp. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2019; 346(1): 012046.
20. Soyer A, Özalp B, Dalmış Ü, Bilgin V. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. *Food Chem [Internet].* 2010; 120(4): 1025–1030.
21. ME, Yassin S, Ali G, Alsokary E. Effect of Freezing on Amino Acids and Fatty Acids Content in Fresh and Frozen Chicken Panie. *Alexandria J Vet Sci.* 2019; 62(2): 53.

## اسید نوکلئیک‌های پپتیدی (PNAs)

نازنین حیدری<sup>۱</sup>، فاطمه شایسته\*<sup>۲</sup>، رویا چعبی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

از زمانی که بررسی اسیدهای نوکلئیک و کاربردهای آنها آغاز شد، توسعه‌ی آنالوگ‌های اسید نوکلئیک با خواص بهبود یافته مانند میل پیوند و پایداری بالا به سرعت در حال پیشرفت است. اسید نوکلئیک پپتیدی (PNA) یک مولکول شبه DNA غیر باردار است که از نظر هندسه و فاصله‌ی بین مولکولی به طور قابل توجهی شبیه به DNA و RNA است. بر خلاف سایر اسید نوکلئیک‌های طبیعی که دارای یک ستون فقرات متشکل از قندهای ریبوز یا دئوکسی ریبوز هستند که توسط فسفودی‌استرها به هم متصل شده اند، در PNA ستون فقرات قند-فسفات به طور کامل با N-2-آمینواتیل گلیسین جایگزین میشود. PNA ها با DNA و RNA با میل ترکیبی بالا هیبرید میشوند و خواص منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی آنها منجر به توسعه‌ی PNA ها در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی مانند ژن درمانی، PCR، و تشخیص و شناسایی شده است. در این مقاله به طور خلاصه به بررسی PNA از زمان معرفی توسط Nielsen و همکاران، نامگذاری، سنتز، خواص فیزیکی و شیمیایی، اصلاحات و کاربردهای بالقوه‌ی این آنالوگ در زمینه‌های درمانی و تشخیصی می‌پردازیم. علاوه بر این، نقش PNA ها در شیمی اولیه یعنی منشأ حیات و تلاش برای درک این رمز و ایده‌های جدید در مورد مدل سیستم زندگی مورد بررسی قرار گرفته و بحث را با چشم انداز آینده‌ی فناوری PNA و کاربردها و منشأ زندگی به پایان رساندیم.

**واژگان کلیدی:** اسید نوکلئیک پپتیدی، PNA، DNA، آنتی ژن، آنتی سنس، تشخیص مولکولی

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۳۳۸۵۸۰۶۳

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: fshayesteh67@yahoo.com

## Peptide Nucleic Acids (PNAs)

Nazanin Heydari<sup>1</sup>, Fatemeh Shayesteh<sup>2\*</sup>, Roya Chaabi<sup>2</sup>

1. Master's student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Ph.D Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

Since the introduction of nucleic acids and their applications, the development of nucleic acid analogs with improved binding affinity and high stability properties has been progressing rapidly. Peptide nucleic acid (PNA) is a non-charged DNA-like molecule that is remarkably similar to DNA and RNA in geometry and intermolecular spacing. Unlike other naturally occurring nucleic acids that have a backbone composed of ribose sugars (or deoxyribose) linked by phosphodiester, in PNA the sugar-phosphate backbone is completely replaced by N-2-aminoethylglycine. PNAs are hybridized with DNA and RNA with a combination of the above, and their unique chemical and chemical properties have led to the development of PNAs in various research fields such as gene therapy, PCR, and detection and identification. In this article, we briefly review PNA since its introduction by Nielsen et al., nomenclature, synthesis, physical and chemical properties, modifications, and potential applications of this analog in the field of therapy and diagnosis. In addition, the role of PNA in early chemistry, i.e., the origin of life, and the search for understanding these mysteries and new ideas about the life system model are examined, and the discussion concludes with the future perspective of PNA technology, applications, and the origin of life.

**Keywords:** peptide nucleic acid, PNA, DNA, antigen, antisense, molecular detection

### مقدمه

اسیدهای نوکلئیک (DNA/RNA) بیوماکرومولکول هایی هستند پایه و اساس عملکردهای سلولی حیات را تشکیل میدهند و با استفاده از فرایندهایی مانند همانند سازی، رونویسی و ترجمه، انتقال اطلاعات را انجام میدهند. دانشمندان در درک ساختار مولکولی و عملکردهای بیولوژیکی اسیدهای نوکلئیک گام های شگرفی برداشته اند. در نتیجه، اسیدهای نوکلئیک دارای کاربردهای بالقوه ای در زمینه های زیست پزشکی، از جمله تنظیم ژن، سنجش و تشخیص، نانوفناوری، دارورسانی و درمان بیماری ها هستند (۱). بنابراین توسعه ای آنالوگ های اسید نوکلئیک در تشخیص و تحقیقات ژنتیکی به یک ویژگی مهم تبدیل شده است. در طول دهه های گذشته اسیدهای نوکلئیک به طور گسترده ای با جایگزینی پیوند دهنده های فسفودی استر یا ستون فقرات قند-فسفودی استر توسط ساختار های مختلف خنثی یا باردار اصلاح شده اند. تعدادی از این آنالوگ اصلاح شده از نظر میل ترکیبی و اتصال به DNA و RNA خواص بهبود یافته ای دارند. در میان تمام این آنالوگ های اصلاحی طراحی شده، PNA ها جایگاه ویژه ای به خود اختصاص داده و رفتار و ویژگی های اسید نوکلئیک های طبیعی را تقلید میکنند، همچنین دارای خواص فیزیکی و شیمیایی مهمی هستند که برای توسعه طیف گسترده ای از ابزارهای بیومولکولی قدرتمند، از جمله پروب های مولکولی، حسگرهای زیستی و عوامل آنتی ژنی مورد بهره برداری قرار گرفته اند (۲).

### تاریخچه PNA

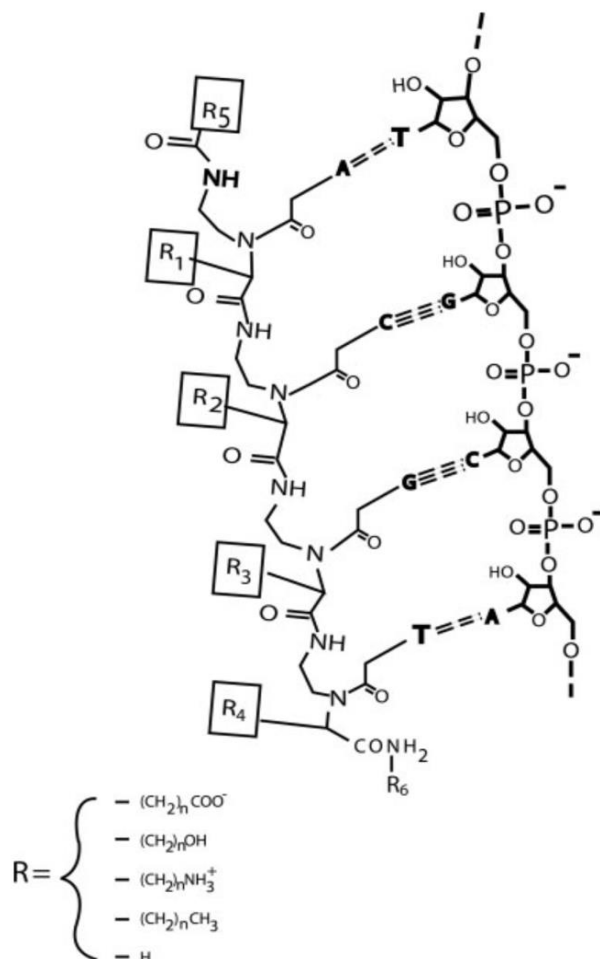
اسید نوکلئیک پپتیدی از تلاش های بیوشیمی دان Peter Nielsen که در دهه ۱۹۸۰ در آزمایشگاه شیمیدان آلی پروفیسور Ole Buchardt در کپنهاگ برای توسعه معرف های جدید اسید نوکلئیک انجام شد، منشأ گرفت و در نهایت PNA در سال ۱۹۹۱ (توسط Nielsen, buchardt, Eggolm و Berg) معرفی شد (۳).

### ساختار PNA

اسید نوکلئیک پپتیدی (PNA) یک مولکول شبه DNA غیرباردار است که از نظر هندسه و فاصله بین مولکولی به طور قابل توجهی شبیه به DNA و RNA است. بر خلاف سایر اسید نوکلئیک های طبیعی که دارای یک ستون فقرات متشکل از قندهای ریبوز یا دئوکسی ریبوز هستند که توسط فسفودی استرها به هم متصل شده اند، در PNA ستون فقرات قند-فسفات به طور کامل



با 2-N-آمینواتیل گلیسین جایگزین میشود و هر یک از باز های پورین/پیریمیدین توسط پیوندهای متیل کربونیل به ستون فقرات متصل شده‌اند و از آنجایی که تمام فواصل بین مولکولی و پیکربندی نوکلئوبازها شبیه به مولکول های DNA طبیعی است، هیبریداسیون بین PNA و DNA/RNA از طریق پیوند های هیدروژنی صورت میگیرد (شکل ۱) (۳،۴). در پی یافتن ارتباط PNA با منشأ حیات مشخص شد که 2-N-آمینواتیل گلیسین در سیانوباکترها نیز وجود دارد (۵).



شکل ۱- مقایسه‌ی ساختار PNA و DNA و پیوند هیدروژنی بین آن‌ها (۴)

### نامگذاری PNA

Nielsen و گروهش اصطلاح "PNA" را برای اسیدنوکلئیک‌های پپتیدی ابداع کردند، علت این نام گذاری تاکید بر سنتز ساده‌ی مونومرها و الیگومرهای PNA با استفاده از SPPS و همچنین ارتباط آن با اسیدهای نوکلئیک بود (۶). در واقع PNA نه پپتید است نه اسیدنوکلئیک، بلکه ترکیبی از هر دو میباشد. PNA ها مانند پپتیدها نشان داده میشوند، یعنی یک انتهای آمینی (N) و یک انتهای کربوکسیلیک (C) دارند و به ترتیب پایانه‌ی N در سمت چپ و C در سمت راست نوشته میشوند. اتم ها و زوایای پیچش ستون فقرات هم مشابه اسیدهای نوکلئیک ایزومورف نامگذاری میشوند (۳).

## سنتز و تصفیه PNA

اگرچه مونومرها و الیگومرهای PNA به صورت تجاری در دسترس هستند، ولی PNA را میتوان از طریق روش استاندارد سنتز فاز جامد نیز تولید کرد. این روش به صورت اختصاری (Solid phase peptide synthesis) SPPS نامیده میشود و شامل چرخه های مکرر (جفت شدن-شست و شو-حفاظت زدایی-شست و شو) میباشد (۷). همچنین سنتزهای کمتری هم مبتنی بر فاز محلول (LPPS) گزارش شده است. از آنجایی که ستون فقرات PNA بر پایه ی پلی آمیدها است بنابراین میتوان آن را جهت اضافه کردن عملکردها به پیپتیدها متصل کرد. همچنین میتوانند توسط رنگ ها یا سایر مواد شیمیایی برچسب گذاری شوند. PNA های خام را میتوان با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی بالا (RP-HPLC) تصفیه کرد و توسط بمباران اتمی (FAB) یا طیفسنجی جرمی مشخص نمود (۸).

## تغییرات و اصلاحات PNA

ساختار شیمیایی ستون فقرات PNA انعطاف پذیری بالایی دارد و مسئول هیبریداسیون و تقلید اسید نوکلئیک آن است، اما با این وجود ضعف هایی دارد از جمله نفوذپذیری ضعیف غشاء، حلالیت آبی پایین و ابهام در جهت اتصال DNA و همین مشکلات شیمییدانان را برانگیخت تا PNA های اصلاح شده با خواص برتر نسبت به PNA معمولی تولید کنند. این اصلاحات شامل موارد زیر میباشد:

۱. معرفی کایرالیته به ستون فقرات PNA نامتقارن که بر انتخاب گری دقیق تاثیر میگذارد.
۲. سفت کردن ستون فقرات PNA از طریق محدودیت ساختاری که بر سازماندهی ساختار PNA تاثیر میگذارد.
۳. معرفی گروه های عاملی کاتیونی جهت بهبود حلالیت در آب.
۴. تعدیل جفت نوکلئوبازها از طریق اصلاح لینکر(پیوند دهنده) یا خود نوکلئوباز که موجب اتصال موثر تر در شرایط فیزیولوژیک میگردد.

در نهایت مجموعه ای از آنالوگ ها و مشتقات PNA جهت دست یابی به PNA با خواص بهبود یافته طراحی و سنتز شدند. به عنوان مثال PNA های کایرال اصلاح شده، بر اساس موقعیت جایگزین ستون فقرات به سه گروه ( $\alpha$ -PNA،  $\beta$ -PNA و  $\gamma$ -PNA) تقسیم بندی میشوند (۹-۱۲).

## خواص مهم PNA

در طول دهه های گذشته، PNA به عنوان یک آنالوگ DNA خواص فیزیکی و شیمیایی قابل توجهی از جمله پایداری حرارتی و شیمیایی، اتصال قوی، انحلال پذیری و... دارد. در این بخش به بررسی این ویژگی های منحصر به فرد میپردازیم که سبب برتری PNA نسبت به سایر آنالوگ های DNA شده اند.

۱. پایداری شیمیایی: PNA نسبت به سایر الیگونوکلوئوتیدهای طبیعی پایداری شیمیایی متفاوتی دارد. به طور مثال PNA ها در شرایط اسیدی کاملاً پایدار هستند در حالی که DNA در pH اسیدی (۵/۴-۵/۶) دپورینه میشود. بنابراین میتوان برای سنتز PNA از گروه های محافظ استاندارد که نیاز به برش با مواد اسیدی (مانند TFMS یا HF) ندارند استفاده کرد. PNA ها نسبت به بازهای ضعیف پایدار هستند، بنابراین میتوان آنها را طبق استراتژی Fmoc و طرح های مختلف گروه حفاظتی قابل جداسازی NH<sub>2</sub> سنتز کرد. بی ثباتی شیمیایی در طول سنتز الیگومرهای PNA تحت شرایط اولیه زمانی گزارش می شود که یک گروه عاملی NH<sub>2</sub>- آزاد در انتهای N-ترمینال وجود داشته باشد، در واقع بیشتر شبیه واکنش جانبی هستند تا بی ثباتی. بنابراین میتوان با محدود کردن N-ترمینال آزاد و اثرات برهمکنش های پایدار در کایمرهای PNA/DNA این بی ثباتی ها را متوقف نمود. PNAها همچنین پایداری زیادی در برابر مواد شیمیایی مختلف و در محدوده وسیعی از pH و دما نشان می دهند (۱۳، ۱۴).

۲. **پایداری حرارتی:** یکی دیگر از ویژگی‌های خاص و مهم PNAها پایداری حرارتی آنهاست. مطالعات ثابت کرده که پایداری حرارتی در دوبلکس‌های PNA/DNA و PNA/RNA در مقایسه با دوبلکس‌های DNA/DNA و DNA/RNA بسیار بالاتر است. این اتصال قوی به علت عدم وجود برهمکنش‌های دافعه در ستون فقرات PNA خنثی و رشته‌ی DNA/RNA باردار است (۱۵). نتایج به دست آمده از مطالعات نشان داده به طور معمول دمای ذوب (TM) یک دوبلکس PNA/DNA، 70°C است در حالیکه دمای ذوب دوبلکس DNA/DNA حدود ۵۵°C میباشد. همچنین پایداری حرارتی یک دوبلکس RNA/PNA بالاتر از دوبلکس DNA/PNA میباشد. به طور کلی بر اساس تجزیه و تحلیل دمای ذوب، پایداری دوبلکس‌ها به این صورت است: PNA- RNA > PNA- DNA > DNA- DNA > DNA- RNA (۱۶).

۳. **تهاجم رشته‌ای PNA: (Strand invasion)** قابلیت هیبرید شدن با میل ترکیبی بالا با توالی‌های DNA یا RNA را دارد که از طریق پیوند هیدروژنی Watson-Crick صورت میگیرد و در آن آدنین از طریق دو پیوند هیدروژنی با تیمین، و سیتوزین از طریق سه پیوند هیدروژنی با گوانین جفت میشوند. مولکول‌های PNA با توالی‌های مختلف، بر اساس قانون Watson-Crick، با DNA و RNA مکمل دوبلکس تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، PNA می‌تواند ساختار تریپلکس معمولی را از طریق اتصال هگستین در شیار اصلی مارپیچ DNA دو رشته‌ای تشکیل دهد. PNA هوموپیریمیدین می‌تواند ساختار تهاجم سه‌گانه با DNA را در هنگام هدف قرار دادن توالی هوموپورین در DNA دوبلکس تشکیل دهد. در این ساختار، یک رشته PNA از طریق پیوندهای هیدروژنی Watson-Crick از طریق جهت گیری ضد موازی به DNA مکمل خود هیبرید می‌شود، در حالی که رشته دوم PNA از طریق پیوندهای هیدروژنی هگستین به صورت موازی به همان دنباله متصل می‌شود. الیگومرهای PNA هنگام هدف قرار دادن رشته‌های DNA و RNA یا خود PNA در مقایسه با DNA یا RNA طبیعی، تمایل بالاتری نشان می‌دهند (شکل ۲) (۱۷، ۱۸).



شکل ۲- تصویر شماتیک از کمپلکس‌های مولکولی مختلف تشکیل شده از اتصال PNA به (A) DNA (۱۷). (B): کمپلکس triplex یا ساختار مارپیچ سه رشته‌ای توسط PNA‌های هوموپیریمیدین غنی از سیتوزین که به هدف خودشان روی DNA متصل میشوند. (C): کمپلکس Triplex invasion پایدار که توسط PNA‌های هوموپیریمیدین به یک DNA هدف هوموپورین متصل می‌شود ایجاد میگردد. (C): کمپلکس double-duplex-invasion که توسط PNA‌های حاوی نوکلئوباز غیر استاندارد تشکیل میگردد.

۴. **انحلال پذیری:** به طور کلی PNA ها حلالیت آب معمولی دارند و به علت اینکه از نظر بار خنثی هستند نسبت به DNA حلالیت کمتری دارند. میزان حلالیت PNA ها به PH و بافر مورد استفاده بستگی دارد و به طول الیگومر و نسبت پورین/پیریمیدین مرتبط است. به طور مثال PNA هایی با پورین غنی از ۶۰ درصد G به خصوص بیشتر از ۱۲ واحد ممکن است مشکلات حلالیت نشان دهند. همچنین PNA ها حلالیت آبی ضعیفی در بافرهای فسفات نشان می‌دهند (۱۹). اخیراً برخی اصلاحات صورت گرفته از جمله ادغام بقایای لیزین با بار مثبت در ناحیه C ترمینال یا اصلاح ستون فقرات که موجب بهبود حلالیت PNA ها شده‌اند (۲۰).

۵. **خواص بیولوژیکی:** مطالعات نشان داده PNA ها نسبت به تخریب آنزیمی مقاوم هستند و طول عمر آنها هم در شرایط *in vitro* و هم *in vivo* افزایش می‌یابد. همچنین ستون فقرات پپتیدی آنها توسط نوکلئازها و پروتئازها به آسانی تشخیص داده نمی‌شود، بنابراین مشخص شده در محیط‌هایی مانند سرم انسان، عصاره سلول‌های باکتریایی، آسیت هسته ای موش، عصاره سلول‌های توموری و پروتئیناز جدا شده‌ی قارچ زیست پایدار هستند (۲۱). PNA توانایی مهار تکثیر و القای توقف رونویسی و توقف ترجمه را دارد و دارای خواص آنتی سنس و آنتی ژنی است (۲۲). مطالعاتی صورت گرفته نشان می‌دهد PNA ها غیر ایمنی (non-immunogenic) هستند و وقتی به تنهایی تزریق می‌شوند قادر به ایجاد پاسخ آنتی ایمنی نیستند (۲۳). ولی میتوان آنها را از طریق یک حامل ایمونوژنیک پروتئینی ایمنی زا کرد (۲۴).

### کاربردهای PNA

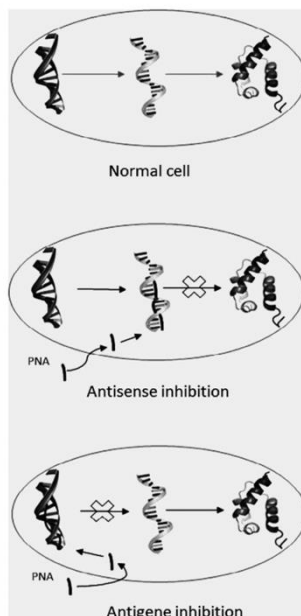
با توجه به خواص و ویژگی‌های جذاب PNA، میتوان از آن‌ها به عنوان ابزاری قدرتمند در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، تشخیص بیماری‌ها و تحقیقات ژنتیکی مولکولی استفاده کرد. از جمله این کاربردهای گسترده میتوان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. **کاربردهای ژن درمانی:** در ژن درمانی از ژن‌های خارجی یا توالی‌های الیگونوکلئوتیدی کوتاه به عنوان عوامل درمانی استفاده میشود. PNA ها به علت داشتن خواص منحصر به فرد از جمله میل ترکیبی بالا و عدم سمیت درون سلولی و پایداری شیمیایی کاندیدای مناسبی جهت طراحی داروهای ژن درمانی می‌باشند. به طور کلی ژن درمانی دو استراتژی مهم دارد: روش‌های آنتی ژنی و روش‌های آنتی سنس (۲۵).
۲. **کاربردهای آنتی ژنی:** PNA ها می‌توانند از طریق هیبرید شدن با توالی‌های مکمل در DNA، مانع رونویسی شوند. در واقع مهار رونویسی ژن به وسیله PNA عمدتاً به دلیل تشکیل کمپلکس‌های مختلف مانند ساختار تریپلکس پایدار یا تهاجم رشته‌ای اتفاق می‌افتد. PNA می‌تواند با جلوگیری از باز شدن DNA دوبلکس یا مهار اتصال فاکتور رونویسی به ناحیه‌ی پروموتور ژن‌های هدف، شروع رونویسی را مختل کند. همچنین میتوانند مانع پیشرفت پلیمرز و طولی شدن رونویسی شود و در نتیجه رونوشت‌های RNA کوتاه تولید کند (۴). از جمله کاربردهای بالینی در اختلالات فیبروپرولیفراتیو، PNA میتواند به عنوان یک معرف آنتی ژنی به کار برده شود که موجب کاهش سطح mRNA ژن و در نتیجه کاهش تولید کلاژن نوع I توسط سلول‌های فیبروبلاست میشود (۲۶).
۳. **کاربردهای آنتی سنس:** استفاده از PNA ها به عنوان معرف‌های آنتی سنس برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ نشان داده شد (۲۷). PNA ها میتوانند از طریق شناسایی و هیبریداسیون توالی مکمل در mRNA موجب مهار ترجمه شوند. الیگومرهای PNA، برخلاف سایر الیگونوکلئوتیدها نه ریبونوکلئاز (RNase H) را فعال می‌کنند و نه وارد کمپلکس‌های خاموش کننده ناشی از (RNA RISC) می‌شوند، بلکه فرآیند ترجمه را از طریق انتقال RNA به سیتوپلاسم، فرآیند طولی شدن و شروع ترجمه مانند مونتاژ ریبوزوم مختل می‌کنند (۲۸). PNA آنتی سنس زمینه‌های مختلف جهت اهداف درمانی به کار برده شده. به طور مثال اخیراً نشان داده شده PNA میتواند با هدف گیری RNA های خاص بیان ژن را در *P. falciparum* عامل مالاریا دستکاری کند. Kolevzon و همکارانش برای اولین بار درمان عفونت مالاریا را با استفاده از فناوری PNA نشان دادند. آنها با کونژوگ کردن PNA آنتی سنس با octa-d-lysine CPP بیان ژن *P. falciparum* را کاهش دادند (۲۹). همچنین توانایی PNA برای مهار باکتری‌های بیماری‌زا نیز

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

گزارش شده است. مطالعات نشان می دهد که PNA های ضد dnaK بر روی *E. coli* تاثیر کمی دارند و بر روی سویه های *S. enterica* در شرایط آزمایشگاهی بسیار موثر هستند (۳۰).



شکل ۳- خواص آنتی ژنی و آنتی سنس PNA (۹).

۴. **کاربردهای تشخیصی:** PNA ها به علت اتصال با میل ترکیبی بالا، به طور گسترده به عنوان کاوشگر تشخیصی جهت تشخیص بیماری های مختلف مورد استفاده قرار میگیرند. از خواص هیبریداسیون PNA میتوان جهت تشخیص جهش های ژنتیکی و آنالیز عدم تطابق ها استفاده کرد. به عنوان مثال در بیماری آلزایمر که با پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) مرتبط است، توسط Guo و همکاران یک رویکرد الکتروشیمیایی برای تشخیص عدم تطابق تک نوکلئوتیدی با استفاده از PNA در apoE 4 مربوط به بیماری الزایمر نشان داده شد (۳۱). همچنین Hyou-Arm Joung و همکارانش روشی موفقیت آمیز جهت تشخیص جهش در ژن BRCA1 انسانی که در بیش از نیمی از سرطان های سینه و تخمدان نقش دارد را گزارش کردند (۳۲).

۵. **تجزیه و تحلیل مواد غذایی:** PNA ها میتوانند در تجزیه و تحلیل و احراز هویت مواد غذایی به کار گرفته شوند، این تجزیه و تحلیل ها شامل تعیین اصالت مواد تشکیل دهنده با تشخیص ارگانیسم های اصلاح شده ژنتیکی و ارزیابی وجود مواد آلرژی زای پنهان و پاتوژن های میکروبی میباشند. شناسایی بیماری های منتقله از طریق مواد غذایی و همچنین نظارت بر GMO در مواد خوراکی نیازمند توجه بسیاری است که در این زمینه PNA ها می توانند در توسعه ابزارهای مناسب برای شناسایی و تشخیص مستقیم در محلول مفید باشند (۳۳).

۶. **کاربرد PNA در PCR:** PCR یک تکنیک متداول جهت تکثیر توالی هدف در آزمایشگاه های تحقیقاتی پزشکی و بیولوژی میباشد (۳۴). به علت اینکه PNA توسط DNA پلیمرز شناسایی نمیشود، نمیتوان از آن به عنوان پرایمر استفاده کرد (۳۵). اما کایمرا های PNA-DNA توسط DNA پلیمرز شناسایی شده و میتوانند به عنوان پرایمر برای واکنش های PCR مورد استفاده قرار گیرند (۳۶). همچنین میل اتصال بالای PNA ها موجب تشخیص جهش های تک نوکلئوتیدی با استفاده از PCR استفاده شده است. این تکنیک PNA-directed PCR clamping نامیده شده و از PNA ها برای مهار تقویت یک هدف خاص با رقابت مستقیم PNA که در برابر یکی از محل های پرایمر PCR و پرایمر معمولی PCR قرار گرفته است، استفاده می کند. کمپلکس pna-dna که در یکی از محل های پرایمر تشکیل می شود، به

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

طور موثری تشکیل محصول PCR را مسدود می‌کند. این روش به قدری قدرتمند است که میتوان از آن برای شناسایی واریانت های ژنی تک نوکلئوتیدی جهت غربالگری جهش و جداسازی ژن ها استفاده نمود (۳۷،۳۸). اخیراً یک *realtime PCR* خودکار جدید با استفاده از PNA توسعه یافته که *Q-PNA PCR* نام دارد. در این روش PNA به یک خاموش کننده‌ی عمومی (*generic quencher*) لیبیل شده و به یک پرایمر نشاندار شده با رنگ فلورسنت (به عنوان گزارشگر) هیبرید می‌شود تا فلورسانس پرایمر را خاموش کند. در طی PCR در دور دوم تکثیر، هیبرید Q-PNA با ادغام پرایمر در آمپلیکون ها جابه جا می‌شود و فلورانس آزاد میشود (۳۹).

۷. کاربرد PNA در تکنیک **PACR (PNA assisted rare cleavage)**: PNA ها در ترکیب با متیلازها و سایر اندونوکلازهای محدودکننده میتوانند به عنوان برش دهنده نادر ژنوم (*Rare genomic cutter*) عمل کنند. این تکنیک که (PARC) نام دارد برای اتصال به مکانهای هموپیریمیدین کوتاه روی مولکولهای DNA بزرگ از قدرت اتصال انتخابی بالای PNA ها مخصوصاً Bis-PNA استفاده میشود. توالی هدف PNA به گونه ای طراحی میشود که با توالی هدف آنزیم محدودکننده/متیله کننده همپوشانی داشته باشد. پس از حذف bis-PNA و به دنبال آن هضم های آنزیمی، می توان کل DNA را توسط آنزیم ها به تعداد محدودی قطعه تقسیم کرد. DNA به طور موثر در برابر هضم آنزیمی به دلیل متیلاسیون در اکثر سایت ها به جز آنهایی که قبلاً به PNA متصل شده بودند محافظت می‌شود. بنابراین، توالی های کوتاه PNA، به ویژه bis-PNA های دارای بار مثبت، در ترکیب با جفت های مختلف آنزیم محدود کننده/متیله کننده، می‌توانند یک کلاس جدید از برش دهنده های نادر ژنومی را تشکیل دهند (۴۰).

۸. تعیین اندازه‌ی تلومر: مرسوم ترین روش جهت اندازه گیری طول تلومر، روش ساترن بلات DNA ژنومی میباشد که این روش محدوده ای برای طول تلومر تمام کروموزوم های موجود فراهم می‌کند. در روش مدرن تر از الیگونوکلئوتیدهای نشاندار شده با فلورسئین استفاده کرده و هیبریداسیون درجا را به تکرارهای تلومری نظارت می‌کند (۱۷). اخیراً روشی جدید تر توسط Lansdorp و همکارانش نشان داده شده است که از PNA های نشاندار شده با فلورسین استفاده کرده و نتایج بهتری به همراه دارد. همچنین این روش سریعتر است و به غلظت کمتری از پروب در مقایسه با همتای DNA آن نیاز دارد. به علاوه رنگ بری نوری کم و نسبت سیگنال به نویز عالی این امکان را به وجود آورده که تکرارهای تلومری را در کروموزوم های جداگانه به این روش اندازه گیری کنند (۴۱).

۹. کاربرد PNA در سیستم آنزیمی محدود کننده‌ی مصنوعی: نوکلئاز S1 اسیدهای نوکلئیک تک رشته ای را می‌شکافد و ۵۹-فسفوریل مونو یا الیگونوکلئوتیدها آزاد می‌کند که باعث حذف انتهای آزاد تک رشته ای قطعات DNA شده و می‌تواند در نقشه برداری رونوشت RNA و ساخت حذف های یک طرفه استفاده شود. PNA در ترکیب با نوکلئاز S1 می‌تواند به عنوان یک سیستم «آنزیم محدودکننده مصنوعی» عمل کند. الیگومرهای PNA هموپیریمیدین از طریق مکانیسم تهاجم رشته‌ای با اهداف مکمل روی dsDNA هیبرید می‌شوند که منجر به تشکیل رشته‌های DNA غیر مکمل حلقه‌دار می‌شود. آنزیم نوکلئاز S1 می‌تواند این بخش DNA تک رشته ای را به قطعات کاملاً مشخص تجزیه کند. اگر از دو PNA برای این منظور استفاده شود و اجازه داده شود به دو هدف مجاور در رشته‌های DNA مشابه یا مخالف متصل شوند، اساساً کل منطقه را باز می‌کند و بستر را برای هضم نوکلئاز در دسترس قرار می‌دهد و در نتیجه کارایی برش را افزایش می‌دهد (۱۷).

۱۰. خواستگاه زندگی: PNA میتواند به کنجکاوایها و پرسش‌های ذهن انسان در مورد راز پیدایش و وجود حیات بر روی زمین کمک کند. همانگونه که میدانیم زندگی موجودات امروزی حول محور مجموعه ای از مولکول های زیستی شامل DNA، RNA، و پروتئین ها ساخته شده است که از اصول و دستورات عمل های زیست‌شناسی مولکولی پیروی می‌کنند (۴۲). با این حال هیچ مدرکی وجود ندارد که این باور را به انسان بدهد که زندگی از ابتدا به شکل کنونی خود وجود داشته است. بسیاری از محققان از مفهوم نظریه جهان RNA حمایت کردند که بر اساس آن فرض می‌شد RNA هم به عنوان

آنزیم و هم به عنوان مولکول ذخیره ژنتیکی عمل می کند. کشف مولکول RNA کاتالیزوری و خودتکثیر شونده باعث پذیرش گسترده این نظریه شد. با این حال، حساسیت و ناپایداری بالا (هیدرولیز) RNA همراه با دشواری تولید قندهای ریبوز یا ریبونوکلوئوزیدها در شرایط اولیه نشان می دهد که شبیه سازهای اصلی ممکن است نوعی مولکول مرتبط بدون ستون فقرات ریبوز فسفات یا کاملاً متفاوت بوده باشند (۴۳). Miller و Oro با ایجاد شرایط آزمایشگاهی مشابه زمین اولیه، آمینو اسیدهای ساده و نوکلئوبازهای پورین را سنتز کرده بودند و امکان تشکیل بلوک های ساختمانی اساسی حیات در شرایط پری بیوتیک را تأیید می کردند (۴۴،۴۵). علاوه بر این، نلسون و همکاران. برخی از اجزای PNA را تحت شرایط شبیه سازی شده پری بیوتیک سنتز کرد. با سنتز مولکول PNA در پیچه های جدیدی در مطالعات منشأ حیات باز شد (۴۶). همچنین وجود دی آمینوبوتیریک اسید، که یکی از بلوک های ساختمانی PNA میباشد، و مشابه های آن در شهاب سنگ مارکیسون نشان می دهد که ممکن است PNA قبل از RNA باشد (۴۷). گزارش هایی هم در مورد سیستم خودتکثیر شونده PNA مشابه با همانندسازی بیولوژیکی منتشر شده از جمله کار های Plöger و همکارانش روی توالی کوتاه PNA خود تکمیلی که قادر به ارتقای خودتکثیر خودکار است (۴۸) یا کار های Böhrer و همکارانش در مورد انتقال ژنتیکی بین PNA و RNA بدون هر گونه از دست دادن اطلاعات گمانه زنی ها در مورد نقش PNA در منشأ حیات را تقویت می کند. بنابراین، دلایل محکمی برای این باور وجود دارد که در شرایط زمین پری بیوتیک، PNA اول شد و در نهایت با معرفی کایرالیته به RNA تبدیل شد. با وجود شواهد تجربی بیشتری که برای تأیید این خط فکری مورد نیاز است، PNA بینش های جالبی را در مورد مطالعه منشأ حیات ارائه می دهد (۴۸،۴۹).

#### نتیجه گیری

اسید نوکلئیک های پتیدی دسته ی جدیدی از ترکیبات با پتانسیل بیولوژیکی گسترده و خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد هستند که در مقایسه با سایر آنالوگ های اسید نوکلئیک موقعیت ویژه ای دارد. PNA ها علیرغم حلالیت آبی ضعیف و تمایل به خودتجمعی در محیط های آبی، دارای مزایای ویژه ای از جمله میل پیوندی بالا و معرفی بارهای مثبت و منفی هستند که سبب نادیده گرفتن سایر ضعف ها و برتری نسبت به همتایان طبیعی شان میشوند. همچنین در کاربرد های تخصصی مانند PCR و تهاجم رشته ای بسیار ارزشمند هستند. در زمینه های درمانی به عنوان عوامل آنتی سنس و آنتی ژنی کاربرد دارند و اگرچه هنوز داروی ژن درمانی مبتنی بر PNA هنوز به داروخانه ها نرسیده اما در این زمینه پیشرفت های چشمگیری نسبت به دو دهه پیش داشته و به نقطه بلوغ رسیده اند، و حتی اگر توسعه ی درمانی PNA ها با شکست مواجه شود، PNA ها باز هم ابزارهای ارزشمندی برای تجزیه و تحلیل عملکرد ژن های جدید خواهند بود که از توالی یابی ژنوم انسانی پدید می آیند. به علاوه اصلاحات شیمیایی جدید ستون فقرات PNA میتواند به افزایش پتانسیل های آن کمک کند و منجر به توسعه ی برنامه های کاربردی و پروژه های وابسته به PNA در زمینه های مختلف شود. PNA همچنین یک مولکول فوق العاده جالب از نقطه نظر ساختاری است. مطالعات متعددی در مورد ساختار کمپلکس های PNA با خود و با اسیدهای نوکلئیک طبیعی قبلاً منتشر شده است. این مطالعات نه تنها درک ما از ساختار PNA را بهبود می بخشد، بلکه اطلاعات جدیدی در مورد خواص ساختاری و بیولوژیکی خود DNA و RNA نیز ارائه می دهد. در نتیجه، مطالعات روی PNA ها و کایمرهای PNA/DNA باید بینش های ارزشمندی را در مورد امکان تکامل اشکال جایگزین حیات، و در مورد انتقال های بالقوه بین سیستم های ژنتیکی مختلف ارائه دهد. این به نوبه خود ممکن است باعث ایجاد ایده های جدیدی در مورد روش های ناشناخته ی ذخیره و انتقال اطلاعات ژنتیکی شود.

## References:

1. Wang F, Li P, Chu HC, Lo PK. Nucleic Acids and Their Analogues for Biomedical Applications. Biosensors (Basel). 2022; 12(2):93.
2. Pellestor F, Paulasova P. The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. European journal of human genetics. 2004 ;12(9):694-700
3. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. Science. 1991 ;254(5037):1497-500
4. Shakeel S, Karim S, Ali A. Peptide nucleic acid (PNA)—a review. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology. 2006 ;81(6):892-9.
5. Banack SA, Metcalf JS, Jiang L, Craighead D, Ilag LL, Cox PA. Cyanobacteria produce N-(2-aminoethyl) glycine, a backbone for peptide nucleic acids which may have been the first genetic molecules for life on earth. PLoS One. 2012 ;7(11):e49043.
6. Eriksson M, Nielsen PE. PNA-nucleic acid complexes. Structure, stability and dynamics. Quarterly reviews of biophysics. 1996 ;29(4):369-94.
7. Christensen L, Fitzpatrick R, Gildea B, Petersen KH, Hansen HF, Koch T, Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE, Coull J, Berg RH. Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids. J Pept Sci. 1995;1(3):175-83.
8. Sharma C, Awasthi SK. Versatility of peptide nucleic acids (PNA s): Role in chemical biology, drug discovery, and origins of life. Chemical biology & drug design. 2017 ;89(1):16-37.
9. Sharma S, Sonavane UB, Joshi RR. Molecular dynamics simulations of cyclohexyl modified peptide nucleic acids (PNA). Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2010 ;27(5):663-76.
10. Howarth NM, Wakelin LP.  $\alpha$ -PNA: a novel peptide nucleic acid analogue of DNA. The Journal of organic chemistry. 1997 ;62(16):5441-50.
11. Sugiyama T, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M, Takano M, Kittaka A.  $\beta$ -PNA: Peptide nucleic acid (PNA) with a chiral center at the  $\beta$ -position of the PNA backbone. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2011 ;21(24):7317-20.
12. Dragulescu-Andrasi A, Rapireddy S, Frezza BM, Gayathri C, Gil RR, Ly DH. A simple  $\gamma$ -backbone modification preorganizes peptide nucleic acid into a helical structure. Journal of the American Chemical Society. 2006 ;128(31):10258-67.
13. Uhlmann E, Peyman A, Breipohl G, Will DW. PNA: synthetic polyamide nucleic acids with unusual binding properties. Angewandte Chemie International Edition. 1998 ;37(20):2796-823.
14. Govindaraju T, Kumar VA. Backbone extended pyrrolidine PNA (bepPNA): a chiral PNA for selective RNA recognition. Tetrahedron. 2006 ;62(10):2321-30.
15. Giesen U, Kleider W, Berding C, Geiger A, Ørum H, Nielsen PE. A formula for thermal stability ( $T_m$ ) prediction of PNA/DNA duplexes. Nucleic acids research. 1998 ;26(21):5004-6.
16. Singh KR, Sridevi P, Singh RP. Potential applications of peptide nucleic acid in biomedical domain. Engineering Reports. 2020 ;2(9):e12238.
17. Ray A, Nordén B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. The FASEB Journal. 2000;14(9):1041-60
18. Nielsen PE. Peptide nucleic acids (PNA) in chemical biology and drug discovery. Chemistry & biodiversity. 2010 ;7(4):786-804.



19. Nielsen PE, Egholm M. An introduction to peptide nucleic acid. *Current issues in molecular biology*. 1999 ;1(2):89-104.
20. Gildea BD, Casey S, MacNeill J, Perry-O'Keefe H, Sørensen D, Coull JM. PNA solubility enhancers. *Tetrahedron Letters*. 1998 ;39(40):7255-8.
21. Demidov VV, Potaman VN, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchard O, Sönnichsen SH, Nielsen PE. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochemical pharmacology*. 1994 ;48(6):1310-3.
22. E Nielsen P. Gene targeting and expression modulation by peptide nucleic acids (PNA). *Current pharmaceutical design*. 2010 ;16(28):3118-23.
23. Upadhyay A, Ponzio NM, Pandey VN. Immunological response to peptide nucleic acid and its peptide conjugate targeted to transactivation response (TAR) region of HIV-1 RNA genome. *Oligonucleotides*. 2008 ;18(4):329-35.
24. Cutrona G, Boffa LC, Mariani MR, Matis S, Damonte G, Millo E, Roncella S, Ferrarini M. The Peptide Nucleic Acid Targeted to a Regulatory Sequence of the Translocated c-myc Oncogene in Burkitt's Lymphoma Lacks Immunogenicity: Follow-Up Characterization of PNAE  $\mu$ -NLS. *Oligonucleotides*. 2007 ;17(1):146-50.
25. Montazersaheb S, Hejazi MS, Charoudeh HN. Potential of peptide nucleic acids in future therapeutic applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2018 ;8(4):551.
26. Imamura Y, Tsuboi S, Sugiyama T, Kittaka A, Shin Y. A peptide nucleic acid to reduce type I collagen production by fibroblast cells. *Open Journal of Medicinal Chemistry*. 2015 ;5(01):1.
27. Hanvey JC, Peffer NJ, Bisi JE, Thomson SA, Cadilla R, Josey JA, Ricca DJ, Hassman CF, Bonham MA, Au KG, Carter SG. Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science*. 1992 ;258(5087):1481-5.
28. Knudsen H, Nielsen PE. Antisense properties of duplex-and triplex-forming PNAs. *Nucleic acids research*. 1996 ;24(3):494-500.
29. Kolevzon N, Nasereddin A, Naik S, Yavin E, Dzikowski R. Use of peptide nucleic acids to manipulate gene expression in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2014;9(1):e86802.
30. Kiran D, Sriranganathan N. The antimicrobial effect of anti-dnaK peptide nucleic acids on multidrug resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Bios*. 2014 ;85(1):48-56.
31. Guo K, Li X, Kraatz HB. Exploiting the interactions of PNA-DNA films with Ni<sup>2+</sup> ions: detection of nucleobase mismatches and electrochemical genotyping of the single-nucleotide mismatch in apoE 4 related to Alzheimer's disease. *Biosens Bioelectron*. 2011;27(1):187-91.
32. Joung HA, Lee NR, Lee SK, Ahn J, Shin YB, Choi HS, Lee CS, Kim S, Kim MG. High sensitivity detection of 16s rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor. *Analytica chimica acta*. 2008;630(2):168-73.
33. Sforza S, Corradini R, Tedeschi T, Marchelli R. Food analysis and food authentication by peptide nucleic acid (PNA)-based technologies. *Chem Soc Rev*. 2011;40(1):221-32.
34. Garibyan L, Avashia N. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(3):e6.
35. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and anti-gene agents. *Anti-Cancer Drug Design*. 1993 ;8(1):53-63.
36. Misra HS, Pandey PK, Modak MJ, Vinayak R, Pandey VN. Polyamide Nucleic Acid– DNA Chimera Lacking the Phosphate Backbone Are Novel Primers for Polymerase Reaction Catalyzed by DNA Polymerases. *Biochemistry*. 1998;37(7):1917-25.

37. Ørum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic acids research*. 1993;21(23):5332-6.
38. Cochet O, Martin E, Fridman WH, Teillaud JL. Selective PCR amplification of functional immunoglobulin light chain from hybridoma containing the aberrant MOPC 21-derived V $\kappa$  by PNA-mediated PCR clamping. *Biotechniques*. 1999;26(5):818-22.
39. Fiandaca MJ, Hyldig-Nielsen JJ, Gildea BD, Coull JM. Self-reporting PNA/DNA primers for PCR analysis. *Genome Research*. 2001 ;11(4):609-13
40. Veselkov AG, Demidov VV, Nielsen PE, Frank-Kamenetskii MD. A new class of genome rare cutters. *Nucleic acids research*. 1996;24(13):2483-7.
41. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*. 1996;5(5):685-91.
42. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 1970;227(5258):561-3
43. Dworkin JP, Lazcano A, Miller SL. The roads to and from the RNA world. *J Theor Biol*. 2003;222(1):127-34.
44. Miller SL. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*. 1953;117(3046):528-9.
45. Oró J, Kamat SS. Amino-acid synthesis from hydrogen cyanide under possible primitive earth conditions. *Nature*. 1961;190(4774):442-3.
46. Nelson KE, Levy M, Miller SL. Peptide nucleic acids rather than RNA may have been the first genetic molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(8):3868-71.
47. Meierhenrich UJ, Muñoz Caro GM, Bredehöft JH, Jessberger EK, Thiemann WH. Identification of diamino acids in the Murchison meteorite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(25):9182-6.
48. Plöger TA, von Kiedrowski G. A self-replicating peptide nucleic acid. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2014;12(35):6908-14.
49. Böhler C, Nielsen PE, Orgel LE. Template switching between PNA and RNA oligonucleotides. *Nature*. 1995;376(6541):578-81.

## اپتوژنتیک

### نجمه بهادری<sup>۱\*</sup>، پیام رازقی طهرانی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. استادیار گروه تکوین، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

### چکیده

تاکنون پیشرفت‌های فراوانی در زمینه درمان صورت گرفته است. اما همچنان درمان و ترمیم بافت مغز یکی از دشوارترین عمل‌ها برای محققان می‌باشد. اپتوژنتیک یکی از تکنیک‌های نوین در زمینه مطالعه و بررسی سلول‌ها در بافت‌های زنده می‌باشد. این تکنیک ترکیبی از دو علم اپتیک و ژنتیک می‌باشد. اپتوژنتیک در واقع دستور انجام دادن یا ندادن یک عمل خاص را به سلول می‌دهد. اپتوژنتیک با استفاده از روش‌های دستکاری ژنتیکی و بیان پروتئین‌های وابسته به نور که اسپین نام دارند امکان فعال یا غیرفعال شدن عملکرد سلول را فراهم می‌کند. اسپین‌ها به دلیل ساختار ویژه خود توانایی تغییر در ساختار پروتئین را دارا می‌باشند. پس از تغییر در ساختار پروتئین امکان عبور یون‌ها از غشای پروتئین فراهم می‌گردد. محرک‌های اپتوژنتیکی انواع مختلفی دارند. channelrhodopsin، archaerhodopsin و halorhodopsin سه مورد از محرک‌های اپتوژنتیکی می‌باشند. سنسورهای اپتوژنتیکی تغییر مقدار عواملی مانند کلسیم، کلراید می‌توانند اندازه‌گیری کنند. اپتوژنتیک در سه قسمت پروتئین‌های فعال شده توسط نور، روش انتقال ژن پروتئین‌ها به سلول‌ها و روش‌های انتقال نور مورد بررسی قرار می‌گیرد. پروتئین‌های فعال شده توسط نور هنگامی که در معرض برخی طول موج‌های مشخص قرار می‌گیرند، تغییراتی در ساختارشان ایجاد می‌شود که امکان عبور یون‌ها از آن‌ها فراهم می‌گردد. پروتئین‌های فعال شده توسط نور اسپین‌ها نام دارند. اسپین‌ها به دو گروه اسپین‌های میکروبی و اسپین‌های مهره‌داران طبقه‌بندی می‌شوند. آرچیورودپسین، هالورودپسین و باکتریورودپسین از جمله شناخته شده‌ترین اسپین‌های میکروبی می‌باشند. برای ورود پروتئین به درون سلول سه روش وجود دارد که عبارتند از ترانسفکشن، انتقال از طریق وکتورهای ویروسی و تولید حیوانات ترانس ژنتیک. پس از ورود پروتئین به درون سلول باید با استفاده از تابش نور کنترل شده عملکرد سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد. به این منظور می‌توان از یک منبع نوری با تابش زمینه وسیع استفاده کرد. اپتوژنتیک علاوه بر اعصاب در سایر زمینه‌ها از جمله ماهیچه‌ها و سرطان نیز به عنوان ابزاری تاثیرگذار برای تحقیقات مورد استفاده قرار گرفته است. پیش‌بینی می‌شود با پیشرفت اپتوژنتیک بتوان برخی مشکلات مغزی مانند عقب ماندگی ذهنی را درمان نمود. اپتوژنتیک با مشکلات فراوانی نیز مواجه است دارد که امید است در آینده این مشکلات رفع گردند.

**نتیجه‌گیری:** اپتوژنتیک فناوری بسیار مفیدی در درمان بیماری‌ها می‌باشد. اگر از این فناوری به طور صحیح استفاده گردد می‌توان بسیاری از بیماری‌ها را درمان نمود. توسعه اسپین‌های جدید و همچنین یافتن روش‌های جدید انتقال نور از مواردی هستند که می‌توانند به پیشرفت اپتوژنتیک کمک شایانی بکنند.

**واژگان کلیدی:** اپتوژنتیک، اسپین، مشکلات مغزی، تابش نور.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۳۹۶۱۱ همراه: ۰۹۲۱۷۱۰۱۱۵۲

ایمیل: Najyyy@yahoo.com

## Optogenetics

Najmeh Bahadori<sup>1\*</sup>, Payam Razeghi Tehrani<sup>2</sup>

1. Master's student of genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Developmental Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

So far, many advances have been made in the field of treatment. But still treating and restoring brain tissue is one of the most difficult operations for researchers. Optogenetics is one of the new techniques in the field of studying and investigating cells in living tissues. This technique is a combination of optics and genetics. Optogenetics actually the cell to do or not do a certain action. Optogenetics provides the possibility of activating or deactivating cell function by using genetic manipulation methods and expression of light dependent proteins called opsins. Due to their special structure, opsins can change the protein structure. After changes in the protein structure, ions can pass through the protein membrane. There are different types of optogenetics stimuli. Channelrhodopsin, Archaelrhodopsin and Halorhodopsin are three optogenetics stimuli. Optogenetics sensors can measure changes in the amount of factors such as calcium and chloride. Optogenetics is examined in three parts: proteins activated by light, methods of protein gene transfer to cells, and light transfer methods. When proteins activated by light are exposed to certain wavelengths, changes are made in their structure that allow ions to pass through them. Proteins activated by light are called opsins. Opsins are classified into two groups: microbial opsins and vertebrate opsins. Archerhodopsin, Halorhodopsin, and bacteriorhodopsin are among the most well-known microbial opsins. There are three methods for entering the protein into the cell which are transfection, transmission through viral vectors, and production of transgenic animals. After the proteins enter the cell, the function of the cell should be examined using controlled light radiation. For this purpose, a light source with wide background radiation can be used. In addition to nerves, optogenetics has been used an effective tool for research in other fields, including muscles and cancer. It is expected that some brain problems such as mental retardation can be treated with the advancement of optogenetics. Optogenetics also faces many problems, which hopefully will be solved in the future.

**Conclusion:** Optogenetics is a very useful technology in the treatment of disease. If this technology is used correctly, many diseases can be cured. The development of new opsins as well as finding new methods of light transmission are among the things that can greatly help the progress of optogenetics.

**Keywords:** Optogenetics, Opsin, Brain problems, Light transmission.

### مقدمه

در دوره کنونی پیشرفت‌های بسیار زیادی در زمینه سلامت و درمان بیماری‌ها صورت گرفته است. از همین رو میزان امید به زندگی در سراسر جهان نسبت به گذشته افزایش یافته است. از طرفی با بالا رفتن میزان امید به زندگی مقدار بیماری‌هایی که به دلیل افزایش سن به وجود می‌آیند نیز افزایش چشمگیری داشته‌اند. یکی از بیماری‌هایی که عموماً به علت کهولت سن ایجاد می‌شوند، بیماری‌های قلبی و عروقی هستند. حوادث قلبی و عروقی یکی از بیشترین عوامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته می‌باشد. در بین بافت‌هایی که احتمال آسیب دیدن دارند، درمان بافت‌های آسیب دیده مغزی بسیار دشوارتر می‌باشد. مغز با وزنی حدوداً برابر ۱۳۰۰ گرم از تعداد بسیار زیادی سلول عصبی تشکیل شده است به همین علت درمان آن بسیار دشوار و به هزینه زیادی نیاز دارد. از روش‌هایی که برای بررسی عملکرد سیستم عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌توان به تحریک الکتریکی، روش‌های دارویی و مغناطیسی اشاره نمود (۱).

اپتوژنتیک ترکیبی از دو علم اپتیک و ژنتیک است که می‌توان با استفاده از این تکنیک عملکرد سلول‌های خاص در بافت‌های زنده را مورد مطالعه و بررسی قرار داد. اپتوژنتیک به وسیله روش‌های دستکاری ژنتیکی و بیان پروتئین‌های حساس به نور که اپسین نام دارند، در سلول هدف امکان تحریک یا مهار عملکرد سلول‌ها و رفتارهای آن‌ها را با دقت بسیار بالا فراهم می‌کند (۲). انتخاب صحیح

اپسین‌ها، بیان اختصاصی ژن و روش انتقال نور اصول پایه در مطالعات اپتوژنتیک می‌باشند. پروتئین‌های حساس به نور این امکان را به وجود می‌آورند که نورون‌ها به طور انتخابی توسط محققان فعال یا غیرفعال شوند. معرفی و انتقال این پروتئین‌ها به سلول‌های کشت داده شده یا سلول‌های مغز جانوران زنده امکان بررسی عملکرد سلول‌های شبکه عصبی را فراهم می‌نماید. با استفاده از این تکنیک می‌توان گام بزرگی در جهت پیشرفت درمان بیماری‌های مغزی برداشت. (۳).

در سال ۱۹۷۱ کاشف ساختار مولکول DNA، فرانسیس کریگ بیان کرد که روش‌های موجود برای مطالعه و بررسی ساختارهای شبکه مغزی موجود در آن در زمان قادر به پاسخگویی به نیازها نیستند. از این رو نیاز به روش‌های جدید برای مطالعه عملکرد سلول‌های مغزی وجود دارد (۴). در سال ۱۹۳۷ در پژوهشی خصوصیات یک پروتئین غشایی در باکتری هالوباکتریوم مورد بررسی قرار گرفت (۵). در سال‌های بعد محققان مشخص کردند که این گروه از پروتئین‌های غشای میکروبی اپسین نام دارند. اپسین‌ها به دلیل داشتن ساختار رتینا در درون خود و تاثیر پذیری در برابر نور خورشید، ساختار پروتئینی را تغییر شکل می‌دهند. در نتیجه برخی یون‌ها می‌توانند از کانال‌های ایجاد شده در پروتئین‌های غشایی عبور کنند (۶).

تا سال ۲۰۰۵ مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با اپسین‌ها صورت گرفت و اپسین‌های مختلفی در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها کشف شدند. همچنین حساسیت نوری این اپسین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در سال ۲۰۰۵ برای نخستین بار ژن بیان کننده اپسین‌های میکروبی به درون سلول‌های عصبی انتقال یافت. این ژن در درون سلول‌های عصبی بیان شد (۷). پس از این اتفاق در سراسر جهان مطالعات گسترده‌ای در زمینه شناسایی نقش و عملکرد شبکه‌های عصبی با وارد کردن ژن‌های مختلف پروتئین‌های غشای اپسین میکروبی به سلول‌ها و شبکه عصبی صورت گرفته است. به دلیل گستردگی مطالعات و همچنین کارآمد بودن تکنیک اپتوژنتیک، نشریه nature این روش را به عنوان روش منتخب در سال ۲۰۱۰ معرفی نموده است (۸).

اپتوژنتیک دستور انجام دادن یا ندادن یک فعالیت خاص را به سلول می‌دهد. سیستم عصبی با تغییر وضعیت پمپ‌های یونی فعال یا وارد حالت استراحت می‌شود. سیگنال‌های اکتیوسیون سبب جریان یافتن یون‌های بار مثبت از محیط خارج به سمت سلول می‌شوند. این عمل می‌تواند به وسیله اپتوژنتیک نیز انجام شود. دستکاری‌های فارماکوژنتیکی را می‌توان با هدف بیان پروفایل‌های مخصوص در هر نوع سلول انجام داد. اما به دلیل کم بودن دقت زمانی این روش معمولاً برای کد کردن سیگنال‌های سلول عصبی که در این مقیاس زمانی قرار می‌گیرند استفاده می‌شود. به دلیل استفاده از این تکنیک در سلول‌های عصبی این تکنولوژی را پر اهمیت‌ترین پیشرفت در حوزه علوم اعصاب می‌نامند (۲). محرک‌های اپتوژنتیکی مورد استفاده در کاربردهای کنترل عملکرد سلول‌ها انواع متفاوتی دارند. از جمله این محرک‌ها می‌توان از channelrhodopsin، archaerhodopsin و halorhodopsin یاد کرد. سنسورهای اپتوژنتیکی تغییر مقدار کلسیم، کلراید یا ولتاژ غشا را می‌توانند اندازه گیری کنند. channelrhodopsin و halorhodopsin به طور طبیعی به نور حساس هستند. اما می‌توان با دستکاری این پروتئین‌ها مقدار حساسیت آن‌ها را به نور افزایش داد و آن‌ها را به یک محرک قوی‌تر تبدیل نمود (۹ و ۱۰).

تکنولوژی اپتوژنتیک را می‌توان در سه قسمت مطالعه نمود. پروتئین‌های فعال شده توسط نور، روش انتقال ژن پروتئین‌ها به سلول‌ها و روش‌های انتقال نور این سه قسمت می‌باشند.

### پروتئین‌های فعال شده توسط نور

این گروه پروتئین‌ها هنگامی که در معرض برخی طول موج‌های مشخص قرار می‌گیرند، تغییراتی در ساختار آن‌ها ایجاد می‌شود که امکان عبور یون‌ها از آن‌ها فراهم می‌گردد. این عملکرد به دلیل وجود ساختار رتینا در درون این پروتئین‌ها می‌باشد. شناخته شده‌ترین و مهم‌ترین گروه این پروتئین‌ها اپسین‌ها می‌باشند. اپسین‌ها به عنوان گیرنده نوری عمل می‌کنند. این پروتئین‌های غشایی دارای وزن ۳۰-۵۰ کیلودالتون می‌باشند. پروتئین‌های پذیرنده نور در مهره‌داران ساختار سه بعدی مشابه با اپسین‌های میکروبی دارند، اما از نظر توالی آمینواسیدی با یکدیگر متفاوت‌اند (۱۱). پروتئین‌هایی که ساختار مشابه اپسین‌ها دارند به دو گروه طبقه بندی می‌شوند.

گروه اول شامل افسین‌های میکروبی و گروه دوم شامل افسین‌های مهره‌داران می‌باشند. آرچپورودپسین، هالورودوپسین و باکتریورودپسین از معروف‌ترین پروتئین‌های گروه اول می‌باشند. هالورودوپسین در طول موج ۵۸۹ نانومتر ایزومراسیون نوری انجام می‌دهد. پس از ایزومراسیون نوری ساختار پروتئین دچار تغییراتی می‌گردد که باعث ورود آنیون کلر و به وجود آمدن هیپریلاریزاسیون می‌شود. در نتیجه پتانسیل عمل در غشای سلولی مهار خواهد شد. شیوه کار تغییر ساختار افسین‌ها به ایزومراسیون نوری ساختار رتینا موجود در داخل این پروتئین‌ها وابسته است (۱۲).

### نحوه انتقال به سلول یوکاریوت

پس از انتخاب یک پروتئین مناسب از خانواده افسین‌ها در مرحله بعد باید با استفاده از تکنولوژی ژنتیک شرایط بیان این پروتئین در درون سلول ایجاد شود. برای ورود پروتئین سه روش که عبارتند از ترانسفکشن، انتقال از طریق وکتورهای ویروسی و تولید حیوانات ترانس ژنتیک وجود دارد. برای ورود ژن به سلول‌های هدف دو نوع پروموتور اختصاصی و غیر اختصاصی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در رابطه با پروموتورهای اختصاصی می‌توان سیستم‌های مبتنی بر Cre را نام برد که از ریکامبینازهای اختصاصی استفاده می‌کنند. روش دیگر استفاده از پروموتورهای غیر اختصاصی می‌باشد. در استفاده از پروموتورهای غیر اختصاصی با وارد کردن وکتور در یک قسمت خاص از بافت باعث می‌شود تا در سلول‌های آن قسمت از بافت ژن‌ها بیان شوند. سپس عملکرد آن قسمت از بافت در خصوص فعال یا مهار شدن سلول‌ها بررسی می‌شود (۸).

### تابش نور کنترل شده

کنترل دقیق فعالیت سلولی در اپتوژنتیک به کنترل فضایی و زمانی دقیق تابش نور وابسته است. برای کنترل زمانی دقیق در سرعت‌های بالا با یک منبع نور ثابت می‌توان از یک منبع نوری با تابش زمینه وسیع استفاده کرد. در این شرایط تمامی سلول‌هایی که پروتئین در آن‌ها بیان شده است تحریک می‌شوند. در کاربردهای *in-vivo* منبع نور به یک فیبر نوری متصل می‌گردد. همچنین می‌توان از سیستم‌های LED مینیاتوری استفاده کرد (۲).

### کاربردهای بالینی

اپتوژنتیک پیشرفت قابل توجهی در زمینه درمان یا کاهش علائم بیماری‌ها داشته است. اپتوژنتیک نه تنها در زمینه اعصاب بلکه در سایر زمینه‌ها از جمله ماهیچه‌ها، رشد سلول‌های جنینی، رگ‌های شریانی و سرطان نیز به عنوان ابزاری تاثیرگذار برای تحقیقات مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳). همچنان مطالعات اپتوژنتیک بر روی مدل‌های حیوانی نیز در حال انجام می‌باشد. اپتوژنتیک به مدل سازی بیماری‌هایی مانند پارکینسون، تنفس، آسیب شبکه‌ای، اضطراب و افسردگی نیز کمک شایانی کرده است. مهم‌ترین ویژگی این روش دقت زمانی است که به وسیله اسنفاده از نور در روش افسین میکروبی تک مؤلفه‌ای فراهم می‌شود. در این روش وقوع یک عملکرد خاص در یک سلول از میان سلول‌های زیادی در یک زمان معین بسیار اهمیت دارد. یکی محققان دانشگاه MIT اعتقاد دارد اگر بتوانیم سلول‌های مغزی را کنترل کنیم، می‌توانیم اطلاعات بسیار مفیدی از آن‌ها کسب کنیم. یکی از این اطلاعات نحوه تاثیرگذاری سلول‌ها بر روی عصب‌ها می‌باشد که از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. همچنین با استفاده از این تکنیک اگر بتوانیم کنترل مغز را به دست بگیریم ممکن است به درمان‌های جدیدی دست یابیم. سپس می‌توان برخی مشکلات مغزی مانند عقب ماندگی ذهنی یا مشکلات روانی و عصبی را درمان نمود (۱۴).

در چند وقت اخیر مطالعات و پژوهش‌ها در زمینه اعصاب با بهره گرفتن از کلون سازی کانال‌های یونی حساس به نور که در میکروارگانسیم‌ها وجود دارند پیشرفت فراوانی داشته است. این عوامل نورون‌های بخش‌های مختلف مغز را به طور دقیق با مزایایی مانند کاهش انرژی مصرفی، کنترل مقطعی و همینطور بدون سیم بودن ابزارهای اپتوژنتیک برای استفاده در بافت قلبی کنترل

می‌کنند. محققین اعتقاد دارند که اپتوژنتیک نه تنها به عنوان یک ابزار کاربردی در تحقیقات آریتمی مورد استفاده قرار گیرد، بلکه می‌تواند به عنوان پایه‌ای در ساختن نسل جدیدی از Pacemakerهای قلبی مبتنی بر نور نیز مورد استفاده قرار گیرد (۱۵).

### چالش‌ها

یکی از چالش‌هایی که در روش استفاده از حیوانات ترانس ژنتیک وجود دارد دشوار، پرهزینه و همچنین زمان‌بر بودن این روش می‌باشد. از دیگر چالش‌های پژوهشگران طراحی نوعی ویروس می‌باشد که فقط به سلول‌های هدف حمله کنند. یکی دیگر از محدودیت‌های بسیار مهم در اپتوژنتیک عدم امکان آزمایش بر روی انسان است. استخوان جمجمه مانع بسیار قوی در برابر نفوذ مناسب نور به درون بافت‌ها می‌باشد. به همین علت برای آزمایشات نیاز است کابل‌های فیبر نوری را به مغز وارد کنند. به همین علت محققان به دنبال راه‌های غیرتهاجمی هستند که با استفاده از آنان این کابل‌ها را به مغز وارد کنند (۲).

### نتیجه‌گیری

اپتوژنتیک این امکان را به ما می‌دهد که بتوانیم دستور انجام دادن یا ندادن یک فعالیت خاص را به سلول بدهیم. اپتوژنتیک یکی از فناوری‌های نوین در حوزه درمان بیماری‌ها می‌باشد. در صورت انجام مطالعات و پژوهش‌های بیشتر در ارتباط با اپتوژنتیک می‌توان به پیشرفت‌های بزرگی در حوزه درمان بیماری‌ها دست یافت. توسعه اسپین‌های جدید و همچنین یافتن روش‌های جدید تابش و انتقال نور از عواملی هستند که می‌توانند باعث افزایش دقت در هدف‌گیری سلول‌ها بشوند. با پیشرفت این موارد، فناوری اپتوژنتیک نیز پیشرفت قابل ملاحظه‌ای خواهد داشت. از طرفی اپتوژنتیک با چالش‌های فراوانی نیز روبه‌رو می‌باشد. از جمله این چالش‌ها هزینه زیاد، نیاز به پروموتورهای ویروسی و همچنین عدم امکان آزمایش بر روی انسان می‌باشد. اما دانشمندان به دنبال کشف راه‌هایی هستند تا بتوانند با استفاده از آنان این محدودیت‌ها را به حداقل ممکن برسانند. امید است دانشمندان در سال‌های آینده روش‌های نوینی ابداع کنند و با چالش‌ها مقابله کنند. در این صورت امکان درمان بسیاری از بیماری‌ها با استفاده از اپتوژنتیک فراهم می‌گردد.

### References:

1. Mirmohammadi SM, Esmaili Djavid G. Optogenetics: Concepts and Applications. *Lasers in Medicine*. 2018; 13(4): 29-35.
2. Shirkavand A, Farivar S. Optogenetics: importance and applied limitations. *Lasers in Medicine*. 2019; 16(1): 36-43.
3. Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, et al. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery*. 1998; 42: 518-25.
4. Crick FH. Thinking about the brain. *Sci Am*. 1979; 241(3); 219-32.
5. Oesterhelt D, Stoeckenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(10); 2853-7.
6. Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods*. 2011; 8(1); 26-9.
7. Gradinaru V. Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2007; 27(52); 14231-8.
8. Pastrana E. Optogenetics: controlling cell function with light. *Nature Methods*. 2011; 8: 24-25.

9. Schaafsma BE, Mieog JS, Hutteman M, van der Vorst JR, Kuppen PJ, et al. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *JSurg Oncol*. 2011; 104: 323-32.
10. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer*. 2009; 115: 2491-504.
11. Terakita A. The opsins. *Genome Biol*. 2005; 6(3): 213.
12. Zhang F. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell*. 2011; 147(7): 1446-57.
13. Liu DZ, Mathes DW, Zenn MR, Neligan PC. The application of indocyanine green fluorescence angiography in plastic surgery. *J Reconstr Microsurg*. 2011; 27: 355-64.
14. Holm C, Mayr M, Hoftner E, Becker A, Pfeiffer UJ, et al. Intraoperative evaluation of skin-flap viability using laser-induced fluorescence of indocyanine green. *Br J Plast Surg*. 2002; 55: 635-44.
15. Jia Z, Valiunas V, Lu Z, Bien H, Liu H, et al. Stimulating cardiac muscle by light: cardiac optogenetics by cell delivery. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011; 4(5): 753-60.



## lncRNAها در بیماری مولتیپل اسکروزیس

نسرین نصیری<sup>۱\*</sup>، زهرا زمانزاده<sup>۲</sup>، زهره حجتی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکترای تخصصی ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. استادیار، دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران.
۳. استاد، دکتری ژنتیک مولکولی انسانی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

### چکیده

بیماری مالتیپل اسکروزیس (ام اس) یک بیماری التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) از نوع خود ایمن می باشد که با دمیلیناسیون اکسون و اختلال در پیام رسانی عصب همراه می باشد. ام اس یک بیماری چند عاملی است که ناشی از تعامل محیط، ژنتیک و عوامل اپی ژنتیکی می باشد. از جمله عوامل اپی ژنتیکی موثر در این زمینه انواع RNAهای غیر کد کننده می باشند که در تنظیم بیان ژن ها موثرند. با شناسایی دسته ای از RNAهای غیر کد کننده بنام lncRNAها راه مطالعاتی جدیدی در حوزه ژنتیک باز شد. lncRNAها، RNAهای غیر کد کننده ی بلندی هستند که بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید طول دارند و نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارند. بیش از نیمی از lncRNAها در سلول های سیستم عصبی مرکزی بیان می شوند و بیان آنها در تکامل و عملکرد سیستم عصبی حائز اهمیت می باشد. آنها در تکامل قسمت های مختلف مغز و تمایز الیگودندروسیت ها و میلیناسیون دخالت دارند. همچنین مشخص شده است که بیان غیر عادی lncRNAها با تنظیم بیان ژن ها و نیز همکاری در فرایندهای بیولوژیکی، تاثیر بسزایی در پاتونوز و پیشرفت بیماری های سیستم ایمنی همچون ام اس داشته و نقش مهمی را در تنظیم عملکرد ایمنولوژی ایفاء می کنند.

طی مطالعه ی مروری حاضر بررسی مقاله های متعدد در زمینه ی تاثیر lncRNAها بر بیماری ام اس نشان می دهد که lncRNA - های HOTAIR, NEAT1, TUG6, ENST00000491934.2, HSP90AA4P, XR-132575.3, lnc DC, ENSG00000231898.3, THRIL, PANDA, RN7SK, UC.341, GAS5, lncRNAهای FAS-, PVT1, lncRNAهای AS1 و ENSG00000233392.1, ENSG00000259906.1 و XLOC-010931 با کاهش بیان در افراد بیمار نسبت به افراد سالم و UCA1 و CCAT2 با تفاوت بیان میان زنان بیمار و سالم بالای ۴۰ سال همراه است. نتیجه گیری: بیان غیر عادی lncRNAها در پاتونوز و پیشرفت بیماری ام اس موثر بوده و امید است با مطالعه بر روی آنها راه درمانی جدید و نیز بیومارکری جهت تشخیص زود هنگام و ارزیابی درمان ها و سیر بیماری ارائه شود.

واژگان کلیدی: lncRNA، بیماری خود ایمن، مولتیپل اسکروزیس، بیومارکر.

آدرس نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵  
تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۵۵۷۸۸۴۰  
پست الکترونیک: nasrinnasiri96@yahoo.com

## lncRNAs in multiple sclerosis

Nasrin Nasiri<sup>\*1</sup>, Zahra Zamanzadeh<sup>2</sup>, Zohre Hojati<sup>3</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Isfahani University, Esfahan, Iran.
3. Department of Biology, Faculty of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran.

### Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) of its own type, which is associated with axon demyelination and disruption of nerve signaling. MS is a multifactorial disease caused by the interaction of environment, genetics and epigenetic factors. Among the effective epigenetic factors in this field are types of non-coding RNAs that are effective in regulating gene expression. By identifying a group of non-coding RNAs called lncRNAs, a new study path was opened in the field of genetics. lncRNAs are long non-coding RNAs that are more than 200 nucleotides long and play an important role in regulating gene expression. More than half of lncRNAs are expressed in the cells of the central nervous system, and their expression is important in the development and function of the nervous system. They are involved in the development of different parts of the brain and the differentiation of oligodendrocytes and myelination. It has also been found that the abnormal expression of lncRNAs by regulating gene expression and cooperation in biological processes has a significant impact on the pathogenesis and progression of immune system diseases such as MS and plays an important role in regulating the function of immunology. During the current review, the review of numerous articles on the effect of lncRNAs on MS disease shows that lncRNAs HOTAIR, NEAT1, TUG6, ENST00000491934.2, HSP90AA4P, XR-132575.3, lnc DC in the disease. MS is effective and lncRNAs GAS5, UC.341, RN7SK, PANDA, THRIL, ENSG00000231898.3, XLOC-009626, XLOC-010881, TOB1-AS1 and linc\_MAF-4 with increased expression and lncRNAs PVT1, FAS- AS1, ENSG00000233392.1, ENSG00000259906.1, and XLOC-010931 are associated with decreased expression in diseased individuals compared to healthy individuals, and UCA1 and CCAT2 are associated with expression differences between diseased and healthy women over 40 years of age. As a result, the abnormal expression of lncRNAs is effective in the pathogenesis and progression of MS disease, and it is hoped that by studying them, a new treatment method and also a biomarker for early diagnosis and evaluation of treatments and the course of the disease will be provided.

**Keywords:** lncRNA, autoimmune disease, multiple sclerosis, biomarker

### مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis) یک بیماری التهابی خودایمن (Auto immune) مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS: Central Nervous System) می باشد که توسط Tcell های CD4+ واسطه گری می شود. این بیماری با دامیلینه شدن اکسون (Demyelination of axon) و آسیب عصبی شناسایی می شود (۱ و ۲). بررسی های اپیدمیولوژیک نشان می دهد که بیشترین میزان شیوع ام اس در اروپای شمالی دیده می شود و به گزارشی از مرکز ام اس ایران، کشور ایران در ابتلا به بیماری ام اس جزء ده کشور اول دنیا است. پاتوژنز این بیماری پیچیده بنظر می رسد و عوامل محیطی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی به عنوان فاکتورهای خطر در این بیماری موثر می باشند. تغییرات اپی ژنتیک مانند متیلاسیون DNA و تغییرات هیستون و RNA های غیر کد کننده پس از نسخه برداری ممکن است بر شروع و پیشرفت بیماری ام اس تاثیر داشته باشد (۳).

lncRNA ها، RNA های غیر کد کننده بلند تنظیمی می باشند که ترجمه نشده و پروتئین رمز نمی کنند و تنها تعداد بسیار اندکی از آن ها پپتیدهای کوچکی تولید می کنند. آن ها طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید داشته و در ژنوم یوکاریوت ها وجود دارند (۴ و ۵). lncRNA ها در انواع فرایندهای بیولوژیکی دخالت می کنند و گزارش شده است که در بیماری های از بین برنده عصب، دیابت، سرطان و بیماری های قلبی - عروقی نقش دارند (۶ و ۷). بعلاوه آن ها در تنظیم عملکردهای حیاتی مانند حفظ سلول های بنیادی عصبی، نورون زایی، گلیوژنز، هموستاز و اتصالات سیناپتیک دخالت دارند. شواهد نشان می دهد که lncRNA ها نقش کلیدی در

تنظیم عملکردهای سیستم ایمنی دارند. بنابراین lncRNAها ممکن است در بیماری ام اس نیز که یک بیماری خود ایمن است، موثر باشند ولی نقش دقیق آنها در پاتوژنز بیماری ام اس هنوز بطور کامل مشخص نیست (۵ و ۸). شناسایی نحوه ساخت و عملکرد lncRNAها در بیماری‌های خود ایمن هنوز نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در مجموع مطالعات کاربردی عملکرد بیولوژی lncRNAها و بیماری‌های خود ایمن مانند ام اس می‌تواند در آینده باعث افزایش درک بیماری‌ها و پاتوژنز آنها شود و همچنین تشخیص کلینیکال و مهار بیماری‌های خود ایمن مبهمی چون ام اس بواسطه‌ی lncRNAها عملی گردد.

### روش مطالعه

در مطالعه‌ی مروری حاضر با بررسی در پایگاه NCBI و مقاله‌های متعدد در زمینه‌ی تاثیر lncRNAها بر بیماری ام اس، کلید واژه‌ها مشخص شده و در این زمینه اطلاعات جمع آوری و مورد استفاده قرار گرفت.

### یافته‌ها

lncRNAها نقش کلیدی را در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی ایفا می‌کنند که در ابتلا به بیماری ام اس موثر می‌باشند (۹). lncRNA GAS5 (Growth Arrest Specifics) با نقش تله مانند خود گیرنده‌ی گلوکوکورتیکوئید (Glucocorticoid Receptor) را به دام انداخته و از نسخه برداری ژن‌های هدف ممانعت به عمل می‌آورد در نتیجه از رشد سلول جلوگیری کرده و موجب مرگ سلولی می‌گردد (۱۰). این lncRNA به دلیل ممانعت از تقسیم سلولی می‌تواند در پاتوژنز ام اس و در تنظیم بیان ژن NR3C1 (Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 1) نقش داشته باشد. بیان GAS5 و ژن NR3C1 در بیماران مبتلا به ام اس بررسی گردیده است و نتایج حاکی از افزایش بیان GAS5 در خون بیماران مبتلا به ام اس در مقایسه با افراد سالم می‌باشد. این یافته‌ها بر اینکه GAS5 ممکن است نقش مهمی را در اتیولوژی مولکولی و درمانی ام اس ایفا کند، اشاره دارد (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط فانگ ژانگ (Fang Zhang) و همکارانش در سال ۲۰۱۶ انجام شد، عملکردهای lncRNAها بر مبنای هم بیانی ژن‌ها و فرایندهای آنالیز بیولوژیکی تحت مطالعه قرار گرفت و مقدار lncRNAها مانند mRNAها در خون محیطی بیماران ام اس و افراد سالم بعنوان گروه کنترل بررسی شدند و رابطه‌ای میان lncRNA و mRNA مشخص گردید. در نتایج این مطالعه آمده است که در بیماران مبتلا به ام اس نسبت به گروه کنترل سالم بیان lncRNA ۲۳۵۳ عدد و mRNA ۱۰۳۷ عدد افزایش و lncRNA ۳۸۹ عدد و mRNA ۲۷۹ کاهش می‌یابد. در مقایسه‌ای که ما بین افراد مبتلا به ام اس و افراد سالم کنترل انجام گرفت، lncRNAها با اتصال به ژن‌های هدف در تنظیم هدایت اکسون، فعالیت گیرنده‌های هدایت اکسون و تنظیم کموتاکسی سلول‌های اندوتلیال (Regulation of endothelial cell chemotaxis) ارتباط داشتند. بسیاری از آنها در پاتوژنز ایمنی بیماری ام اس نقش داشتند، بنابراین این نتایج اطلاعات جدیدی را برای مطالعات بیشتر بر روی ام اس فراهم می‌کند. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که lncRNAی بیان شده‌ی متفاوت ممکن است در فرایند ام اس مهم باشد. با این حال مکانیسم‌های مولکولی خاص و عملکردهای بیولوژی این lncRNAها در پاتوژنز ام اس نیازمند مطالعه بیشتر است (۹). با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک می‌توان پیش بینی کرد که lncRNAهای متمایز بیان شده احتمالاً قادر به تنظیم بیان ژن بصورت سیس و ترانس می‌باشند (۱۲). در تنظیمات سیس زمانی که یک lncRNA رونویسی می‌شود، بر بیان ژن‌های مجاور تاثیر می‌گذارد. با غربالگری ژن‌های هم بیان در نزدیکی lncRNAهای بیان شده‌ی مختلف، بسیاری از ژن‌های هدف تنظیم کننده سیس کشف شدند. بعنوان مثال ژن HOXC9 ممکن است هدف lncRNAی UC.341 باشد که در خون محیطی بیماران مبتلا به ام اس ۲/۹ برابر افزایش بیان نشان داده است. گزارش شده که HOXC9 موجب تنظیمات مجموعه‌ای از ژن‌ها برای هماهنگی فرایندهای سلول‌های مختلف در تمایز عصب می‌شود (۹).

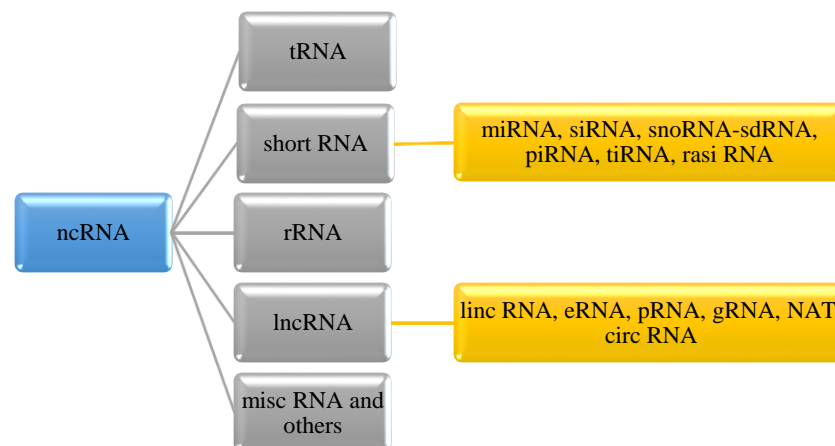
مثال دیگر از تنظیم سیس ژن DDIT4 است که بالا دست ENS00000491934.2 می‌باشد و ۲/۸۷ برابر افزایش بیان را در بیماران ام اس نسبت به افراد سالم نشان می‌دهد. پروتئین DDIT به میتوکندری متصل شده و نقش مهمی را در کاهش تولید و انتشار ROS (Reactive Oxygen Sensitive) ایفا می‌کند که یکی از عوامل مهم پاتوژنز در ام اس می‌باشد (۱۳ و ۱۴). داده‌ها

نشان می‌دهد که بیان DDIT4 برای بقاء سلول‌های بنیادی ضروری می‌باشد زیرا تنها سلول‌هایی که بیان بالایی از این ژن دارند قادر به مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو (ROS) هستند. سلول‌هایی که این ژن‌ها را به اندازه‌ی کافی بیان نمی‌کنند احتمالاً قبل از رسیدن به حالت بالغ می‌میرند، بنابراین تصور می‌شود که lncRNA های ENST00000491934.2 و HSP90AA4P ممکن است در پاتوفیزیولوژی ام اس با تنظیم بیان ژن‌های HOXC9 و DDIT4 دخیل باشند. در مدل ترانس lncRNA می‌تواند بر روی ژن‌های هدف خود از طریق اتصال به فاکتورهای رونویسی عمل کند. برای مثال lncRNA XR-132575.3 می‌تواند نسخه برداری NKX2-5 را تحت تاثیر قرار دهد (۹). اولین گزارش در مورد بیان lncRNA های HOTAIR (HOTAIR transcript) و ANRIL (antisense intergenic RNA of the NK4 locus) در بیماران مبتلا به ام اس در زمینه‌ی عملکرد ویتامین D توسط پهلوان و همکارانش در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت. در این مطالعه نشان داده شد که lncRNA های HOTAIR با پاتوژنز بیماری ام اس در ارتباط می‌باشد ولی در مورد lncRNA های ANRIL این ارتباط دیده نشد (۱۵). حساسیت سلول به HOTAIR و مهار فاکتور نکروز تومور  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )، آپوپتوز را القاء می‌کند و به طور خاص در پاتوژنز سرطان دخیل می‌باشد. اطلاعات کمی در مورد بیان HOTAIR و اثرات آن در بیماری‌های وابسته به سیستم ایمنی مانند ام اس وجود دارد. عملکرد ویتامین D بعنوان یک عامل اپی‌ژنتیک به واسطه‌ی lncRNA ها تنظیم می‌گردد (۴). بنظر می‌رسد که ویتامین D تاثیر بسزایی در بیان HOTAIR و مکانیسم‌های مربوط به التهاب دارد که در پاتوژنز بیماری ام اس و انسفالومیلیت (Encephalomyelitis) دخیل می‌باشد (۱۵). جایگاه این lncRNA داخل خوشه ژنی HOX C بر روی کروموزوم ۱۲ می‌باشد. رین و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان داده‌اند که HOTAIR بر کروماتین خاموش کننده HOX D بر روی کروموزوم ۲ می‌باشد. HOTAIR عملکرد زیستی خود را با فراخواندن و اتصال مجموعه‌های بازآرایی کروماتین به HOX D اعمال می‌کند. در واقع این lncRNA موجب تنظیم بیان ژن‌های HOX انسانی می‌شود و نقش مهمی در تنظیم اپی‌ژنتیک دارد (۱۴ و ۱۶). ANRIL، lncRNA در بیماری‌های چند شکلی بعنوان یک نقطه‌ی داغ به شمار می‌رود. این lncRNA باعث کنترل تقسیم سلولی شده و نسبت به پاسخ‌های التهابی نقش تنظیمی دارد. این lncRNA از طریق عملکرد اپی‌ژنتیکی بر بیان ژن مجاور خود که CDKN2 A/B است تاثیر می‌گذارد (۱۷). سانتورو و همکارانش طی تحقیقاتی نشان دادند که سه lncRNA های NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant transcript 1) و TUG1 (Nuclear Enriched Abundant transcript 1) و RN7SK (7SK small nuclear RNA) نقش مهمی را در فرایندهای از بین برنده‌ی عصب بازی می‌کنند که این نتایج حاکی از آن است که این lncRNA ها ممکن است در پاتوژنز بیماری ام اس دخیل باشند (۱۸). به نظر می‌رسد مشارکت NEAT1 در ساخت Para speckle در سیگنالی‌نگ TLR3 (Tool like receptor) اهمیت داشته باشد (۱۸). Para speckle ها برای رونوشت برداری توسط RNA pol II در هسته لازم بوده و در باز کردن DNA و فرایندهای رونویسی و نیز پردازش نقش ایفا می‌کنند (۱۹). آن‌ها پس از رونویسی با نگهداری از mRNA پردازش شده می‌توانند بیان ژن را تنظیم کنند (۲۰). NEAT1 بیان IL8 را با دور نگه داشتن یک پروتئین Para speckle سرکوب کننده از پروموتور، افزایش می‌دهد بنابراین IL-8 در سرم افراد مبتلا به RRMS (Relapsing Remitting Multiple Sclerosis) و همچنین در مغز افراد بیمار افزایش می‌یابد (۱۸). lncRNA های دیگر TUG1 می‌باشد که هدف پائین دست ژن P53 است، که در فرایند آپوپتوز و از بین رفتن عصب دخیل می‌باشد. lncRNA RN7SK قسمتی از کمپلکس کیناز سلولی PTEFb را سرکوب می‌کند که در تمایز سلول‌های CD4<sup>+</sup> T دخیل می‌باشد. این lncRNA می‌تواند به عنوان یک عنصر التهاب در بیماری ام اس و بیماری IIM (Idiopathic Inflammatory Myopathy) موثر باشد. مشخص شده است که lncRNA RN7SK در هر دو این بیماری‌ها افزایش بیان نشان می‌دهد (۱۸). lncRNA های PANDA (P21 associated ncRNA DNA damage activated) بطور معناداری در خون محیطی افراد بیمار نسبت به افراد سالم افزایش بیان دارد. این lncRNA با اتصال به فاکتور رونویسی NF-YA در مهار آپوپتوز نقش دارد (۲۱). همچنین سه lncRNA های ENSG00000231898.3 و XLOC-009626 و نیز XLOC-010881 در بیماران مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم افزایش و سه lncRNA های ENSG00000233392.1، ENSG00000259906.1 و XLOC-

010931 در افراد بیمار کاهش بیان نشان می‌دهند (۹). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که lincRNA (TNF- $\alpha$ ) THRIL and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L) در افراد بیمار نسبت به افراد سالم افزایش بیان داشت و lincRNA-FAS-AS1 (Fas cell surface death receptor) و PVT-1 (Plasmacytoma variant translocation 1) های 1) antisense دارای کاهش بیان بود که عملکرد آن‌ها در پاتوژنز بیماری ام اس هنوز به خوبی شناخته نشده است (۲۲). در سال‌های اخیر ژانگ و همکارانش نشان دادند که linc\_MAF-4 (Long intervening non coding RNA-MAF-4) افزایش بیان معناداری در PBMCS افراد مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم دارد. خاصیت بازدارندگی MAF که یک فاکتور رونویسی سلول Th2 است، باعث تسهیل در تمایز Th1 و محدودیت در تمایز Th2 می‌گردد. بنابراین linc\_MAF-4 با هدف قرار دادن MAF در تنظیم تمایز Th1 و Th2 نسبت Th1 را بر Th2 افزایش داده و باعث ایجاد بیماری می‌گردد (۲۳). در مطالعه‌ای میزان بیان ژن lincRNA TOB1-AS1 در سلول‌های سفید خون محیطی بیماران ام اس از نوع عود کننده-بهبود یابنده در مقایسه با افراد سالم بررسی شد. نتایج افزایش معنی‌دار بیان TOB1 را در بیماران نسبت به افراد کنترل نشان داد که در مردان و زنان این بیان متفاوت بود که نشان دهنده‌ی تاثیر احتمالی هورمون‌های جنسی بر روی این ژن است. نتایج این مطالعه نقش احتمالی ژن TOB1-AS1 را در پاتوژنز بیماری مولتیپل اسکلروزیس نشان می‌دهد (۲۴). در رابطه با بیان دو lincRNA UCA1 (Urothelial Carcinoma Associated 1) و CCAT2 (Cancer Associated transcript 2) میان افراد بیمار و سالم تفاوتی دیده نشده است ولی تفاوت معناداری در بیان این دو lincRNA میان زنان بیمار و سالم بالای ۴۰ سال مشاهده شده است. نتایج نشان می‌دهد که اثرات این دو lincRNA با هم بر روی پاتوژنز بیماری ام اس موثر بوده که بر مسیر سیگنالینگ سلولی چون WNT و NF-Kb تاثیر می‌گذارند (۲۱). به طور کلی مطالعات اخیر نشان می‌دهد که lincRNAها نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارند و بیان غیر عادی آن‌ها اغلب در پاتوژنز و پیشرفت بسیاری از بیماری‌ها دخیل می‌باشند و به طور نزدیک با سیستم ایمنی در ارتباط هستند (۲۵ و ۲۶). به هر جهت تشخیص تغییرات lincRNAها در بیماری ام اس هنوز در ابتدای مسیر بوده و مستلزم تحقیقات بیشتری می‌باشد.

#### بحث

بیماری ام اس یک بیماری التهابی با منشأ خود ایمنی است که سیستم اعصاب مرکزی را درگیر می‌کند (۲۷). نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که بیان غیر عادی lincRNAها و تنظیمات آن‌ها بر روی بیان ژن‌ها می‌تواند بر ایجاد و سیر پیشرفت بیماری موثر باشد و تفاوت‌های معنی داری در سطح بیان lincRNAها در افراد بیمار مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم وجود دارد. همچنین RNAهای غیر کد کننده در حفظ و نگهداری هموستاز بافت و سایر فرایندهای فیزیولوژیک هسته می‌توانند موثر باشند (۲۵ و ۲۶). آن‌ها محافظت شدگی کمتری در یک گونه دارند و بیان آن‌ها در بافت و سلول دارای الگوی ویژه‌ای بوده و در سطح پائین و بیشتر در مغز و بیضه بیان می‌شوند (۲۸).



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

شکل ۱- تقسیم بندی RNAهای غیر کد کننده: lncRNAها را بر اساس مشخصاتشان به گروه‌های (۱) enhancer lncRNA (eRNAs) که از تقویت کننده‌های ژنی رونوشت برداری می‌شود. (۲) CircRNA که رده‌ی جدیدی از lncRNAها هستند که بصورت حلقوی می‌باشند. (۳) lncRNA-a (activated lncRNA gene) (۴) ultra conserved elements gene (pseudogene) (۵) telomere associated noncoding RNA (TERRAs) (۶) (TUCRs) transcription طبقه بندی می‌کنند.

همانگونه که قبلا اشاره شد lncRNAها نقش مهمی در بیماری‌های خودایمن مانند ام اس بازی می‌کنند (۲۹). در بیماری ام اس سلول‌های ایمنی موجود در خون محیطی در پاسخ به فرایندهای التهابی ناشی از عوامل پاتوژن، فعال شده، از سد خونی مغزی عبور کرده و می‌توانند آنتی بادی‌هایی را آزاد کنند که غلاف میلین و سلول‌های گلیا (glia cells) را هدف قرار دهد و منجر به مرگ سلولی الیگودندروسیت‌ها شده که در نهایت موجب فاگوسیت شدن میلین مرده و تخریب شده، توسط ماکروفاژها می‌شود. از بین رفتن میلین منجر به کاهش تحریک پذیری و مختل شدن انتقال عصبی می‌گردد (۳۰ و ۳۱). مشخص شده است که lncRNAها در پاتوژن بیماری‌های التهابی خودایمن مانند اریتماتوزیس لوپوس سیستمیک، آرتریت روماتوئید، پسوریازیس، سندروم شوگر اولیه و مالتیپل اسکلروزیس از طریق تاثیر بر فاکتورهای تنظیمی تعدادی از ژن‌ها و مسیرهای آن‌ها همچون سیگنالینگ حائز اهمیت می‌باشند (۴ و ۳۲). فعالیت متفاوت سلول‌های ایمنی و توسعه نامتعادل سلول‌های T، B و NK در بیماری‌های خود ایمنی می‌تواند به طور مستقیم با lncRNAها ارتباط داشته باشند (۲۹). lncRNAها با اثر تنظیم کنندگی بر تعامل پروتئین-پروتئین قسمت‌های مهم فرایندهای ایمنی (واسطه‌های التهابی، تمایز و مهاجرت سلول) را تحت کنترل قرار می‌دهد (۳۳). در شرایط مختلف پاتولوژیکی مانند سرطان و بیماری‌های سیستم عصبی، خطای رونویسی از lncRNAهای متفاوت در پاسخ به فعال سازی سلول‌های ایمنی دیده می‌شود (۳۴). در مجموع اگر چه هزاران lncRNA در ژنوم پستانداران توسط آنالیز بیوانفورماتیک از داده‌های نسخه برداری شده شناسایی شده‌اند، ولی دانش ما از خصوصیات کاربردی آن‌ها به عنوان یک سطح نظارتی تاثیرگذار بر سیستم ایمنی و عملکرد آن، تا حد زیادی ناقص است (۳۵).

### نتیجه‌گیری

با توجه به تحقیقات اخیر که انجام شده است، نتایج نشان دهنده‌ی این است که بیان غیر عادی lncRNAها و تنظیمات آن‌ها بر روی بیان ژن‌ها می‌تواند بر ایجاد و سیر پیشرفت بیماری موثر باشد و تفاوت‌های معنی داری در سطح بیان lncRNAها در افراد بیمار مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم وجود دارد. در آینده‌ی نزدیک با برنامه‌های کاربردی در شرایط آزمایشگاه و بدن انسان، شاهد پیشرفت تکنیک‌های بیولوژی مولکولی همانند برش‌های ژنی و تولید توالی‌های ژنی خواهیم بود که شاید دستکاری lncRNA-ها بتواند در درمان بیماری‌های خودایمن سودمند باشد. مطالعات گسترده بر روی lncRNAها و مکانیسم ویژه‌ی آن‌ها می‌تواند امید زیادی را در محققین حوزه ژنتیک برای درمان بیماری‌های پیچیده‌ای مانند سرطان و بیماری‌های خود ایمنی از جمله ام اس ایجاد کند. امید است تحقیقات بر روی lncRNAها راه درمانی برای بیماران و نیز بیومارکری برای ارزیابی تلاش‌های درمانی و سیر پیشرفت بیماری ارائه دهد.

**تشکر و قدردانی:** بدین وسیله از اساتید گرانقدر حوزه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی (ره)، دانشگاه اصفهان و دانشگاه آزاد شهرکرد کمال امتنان و سپاس دارم.

### References

1. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology*. 2007; 8(9): 913.
2. Zamanzadeh Z, Ahangari G, Ataei M, Pouragahi S, Nabavi SM, et al. Association of new putative epitopes of myelin proteolipid protein (58-74) with pathogenesis of multiple sclerosis. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2016; 15(5): 394-402.

3. Calabrese R, Valentini E, Ciccarone F, Guastafierro T, Bacalini MG, et al. TET2 gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014; 1842(7): 1130-6.
4. Singh RP, Massachi I, Manickavel S, Singh S, Rao NP, et al. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2013; 12(12): 1160-5.
5. Song X, Cao G, Jing L, Lin S, Wang X, et al. Analysing the relationship between lnc RNA and protein-coding gene and the role of lnc RNA as ce RNA in pulmonary fibrosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014; 18(6): 991-1003.
6. Carrieri C, Forrest AR, Santoro C, Persichetti F, Carninci P, et al. Expression analysis of the long non-coding RNA antisense to Uchl1 (AS Uchl1) during dopaminergic cells' differentiation in vitro and in neurochemical models of Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015; 9: 114.
7. Chang YN, Zhang K, Hu ZM, Qi HX, Shi ZM, et al. Hypoxia-regulated lncRNAs in cancer. *Gene*. 2016; 575(1): 1-8.
8. Wan G, Hu X, Liu Y, Han C, Sood AK, et al. A novel non-coding RNA lncRNA-JADE connects DNA damage signalling to histone H4 acetylation. *The EMBO journal*. 2013; 32(21): 2833-47.
9. Zhang F, Gao C, Ma XF, Peng XL, Zhang RX, et al. Expression Profile of Long Noncoding RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Multiple Sclerosis Patients. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2016; 22(4): 298-305.
10. Kugel JF, Goodrich JA. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends in biochemical sciences*. 2012; 37(4): 144-51.
11. Gharesouran J, Taheri M, Sayad A, Ghafouri Fard S, Mazdeh M, et al. The growth arrest-specific transcript 5 (GAS5) and nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 (NR3C1): novel markers involved in multiple sclerosis. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2018; 7(2): 102.
12. Bassett AR, Akhtar A, Barlow DP, Bird AP, Brockdorff N, et al. Science forum: considerations when investigating lncRNA function in vivo. *elife*. 2014; 3: e03058.
13. Horak P, Crawford AR, Vadysirisack DD, Nash ZM, DeYoung MP, et al. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(10): 4675-80.
14. Mao L, Ding J, Zha Y, Yang L, McCarthy BA, et al. HOXC9 links cell-cycle exit and neuronal differentiation and is a prognostic marker in neuroblastoma. *Cancer research*. 2011; 71(12): 4314-24.
15. Pahlevan Kakhki M, Nikraves A, Shirvani Farsani Z, Sahraian MA, Behmanesh M. HOTAIR but not ANRIL long non-coding RNA contributes to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunology*. 2018; 153(4): 479-87.
16. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *cell*. 2007; 129(7): 1311-23.
17. Yap KL, Li S, Muñoz Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell*. 2010; 38(5): 662-74.
18. Santoro M, Nociti V, Lucchini M, De Fino C, Losavio FA, et al. Expression profile of long non-coding RNAs in serum of patients with multiple sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2016; 59(1): 18-23.

19. Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, et al. MEN  $\epsilon/\beta$  nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome research*. 2009; 9(3): 347-59.
20. Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Molecular cell*. 2009; 33(6): 717-26.
21. Dastmalchi R, Omrani MD, Mazdeh M, Arsang-Jang S, Movafagh A, et al. Expression of Long Non-Coding RNAs (UCA1 and CCAT2) in the Blood of Multiple Sclerosis Patients. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2018; 20: (8)
22. Eftekharian MM, Ghafouri Fard S, Soudyab M, Omrani MD, Rahimi M, et al. Expression analysis of long non-coding RNAs in the blood of multiple sclerosis patients. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2017; 63(3-4): 333-41.
23. Zhang F, Liu G, Wei C, Gao C, Hao J. Linc-MAF-4 regulates Th1/Th2 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis by targeting MAF. *The FASEB Journal*. 2016; 31(2): 519-25.
24. Dehghanzad R, Kakhki MP, Alikhah A, Sahraian MA, Behmanesh M. The Putative Association of TOB1-AS1 Long Non-coding RNA with Immune Tolerance: A Study on Multiple Sclerosis Patients. *Neuromolecular medicine*. 2019: 1-11.
25. Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic acids research*. 2012; 40(14): 6391-6400.
26. Sun L, Goff LA, Trapnell C, Alexander R, Lo KA, et al. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110(9): 3387-92.
27. Zamanzadeh Z, Ataei M, Nabavi SM, Ahangari G, Sadeghi M, et al. In Silico Perspectives on the Prediction of the PLP's Epitopes involved in Multiple Sclerosis. *Iranian journal of biotechnology*. 2017; 15(1): 10.
28. Pauli A, Valen E, Lin MF, Garber M, Vastenhouw NL, et al. Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. *Genome research*. 2012; 22(3): 577-91.
29. Sigdel KR, Cheng A, Wang Y, Duan L, Zhang Y. The emerging functions of long noncoding RNA in immune cells: autoimmune diseases. *Journal of immunology research*. 2015; 2015.
30. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006; 52(1): 61-76.
31. Pouragahi S, Nassiri Asl M, Sahraian MA, Sadeghi M, Zamanzadeh Z, et al. Utility of Myelin Basic Protein as an Early Prognostic Biomarker in Multiple Sclerosis. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2017; 19(3)
32. Jimenez SA, Piera-Velazquez S. Potential role of human-specific genes, human-specific microRNAs and human-specific non-coding regulatory RNAs in the pathogenesis of Systemic Sclerosis and Sjögren's Syndrome. *Autoimmunity reviews*. 2013; 12(11): 1046-51.
33. Wang P, Xue Y, Han Y, Lin L, Wu C, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA Inc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science*. 2014; 344(6181): 310-3.
34. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews genetics*. 2011; 12(12): 861.
35. Spurlock III CF, Tossberg JT, Guo Y, Collier SP, Crooke III PS, et al. Expression and functions of long noncoding RNAs during human T helper cell differentiation. *Nature communications*. 2015; 6: 6932.



## تأثیر فرایند حرارتی بر فرآورده های پروتئینی

طاهره میرشکاریان<sup>۱</sup>، سیده فاطمه احمدی<sup>۲\*</sup>، محمد حجت الاسلامی<sup>۳</sup>

۲۷. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲۸. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲۹. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳۰. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، ادویه ای و عطری، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

مواد غذایی برای جلب نظر مصرف کنندگان بایستی مولفه های تنوع، ارزش غذایی بالا و هزینه تولید کم را در کنار مولفه های دیگر دارا باشند. فرآیند تولید، نباید تاثیر منفی بر ارزش مواد غذایی ایجاد کند و به لحاظ مصرف انرژی نیز بایستی کارآمد باشد. انرژی حرارتی یکی از روش های مهم کنترل عوامل فساد و افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی در صنعت غذا است. فرآیند حرارتی به اشکال مختلف انجام می پذیرد و شاخص کفایت فرآیند حرارتی، عمدتاً میزان نابودی میکروارگانیسم های هدف در محصولات غذایی متنوع است. فرآیند حرارتی ممکن است در برخی موارد سبب واکنش های ناخواسته در مواد غذایی شده و منجر به کاهش ارزش غذایی و ایجاد تغییرات نامطلوب در ماهیت ترکیبات نظیر آروما، رنگ، طعم، بافت، مواد مغذی و به طور خلاصه کاهش تازگی و کیفیت محصول نهایی گردد. هدف عمده استفاده از حرارت، غیر فعال سازی میکروارگانیسم ها و کاهش فعالیت آنزیمی بوده و از دیرباز به عنوان یک روش مقرون به صرفه و ایمن جهت کنترل فساد مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. مطابق مطالعات گوناگون صورت گرفته، فرآیند حرارتی اثر چندانی بر تغییر درصد اسیدهای چرب نمونه های روغن ها ندارد و نیز باعث کاهش حساسیت زایی پروتئین های بادام زمینی می گردد. همچنین استفاده از فرآیند حرارتی یکی از روش های موثر در کاهش فعالیت های میکروبی و آنزیم های فاسد کننده در سبوس برنج و گندم می باشد. از طرفی پروتئینهای آب پنیر طی فرایند حرارت دهی دستخوش تغییراتی نظیر دناتوره شدن قرار می گیرند و ویژگیهای عملکردی آنها نظیر حلالیت، کف کنندگی، ژلاتینه شدن و امولسیفایری نیز تغییر می کند. به گونه ای که در اثر حرارت دهی، پروتئینهای آب پنیر دناتوره می شوند و حلالیت و خاصیت کف کنندگی آنها کاهش و خاصیت امولسیون کنندگی آنها افزایش می یابد. ایمنوگلوبولین اولین پروتئینی است که دناتوره می شود و به دنبال آن سرم آلبومین و بتالاکتاگلوبولین تحت شرایط مشابه دمایی کمتر تحت تاثیر قرار می گیرند و آلفا لاکتالبومین در مقابل حرارت دهی پایدارتر است. علاوه بر آن پروتئوز پیتونها نسبت به حرارت، حساس نمی باشد. حرارتی که منجر به دناتوره شدن پروتئینها می گردد ناشی از فرایندهای انجام گرفته نظیر پاستوریزه کردن شیر، دوره حرارت دهی قبل از تبخیر و تغلیظ، حرارت دهی طی تبخیر و تغلیظ، حرارت دهی حین خشک کردن و... می باشد.

**واژگان کلیدی:** فرایند حرارت دهی، دناتوره شدن، حلالیت، ارزش مواد غذایی.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۳۳۸۲۲۹۶۸

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: f.ahmadi208@gmail.com

## The effect of thermal processing on protein products

Tahereh Mirshekariyan<sup>1</sup>, Seyedeh Fatemeh Ahmadi<sup>3,4\*</sup>, Mohammad Hojjatoleslami<sup>2,4</sup>

1. PhD student of Department of Food science and technology, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
4. Medicinal, spicy and aromatic plants Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

To catch the eye of consumers, food products should offer variety, high nutritional value, and cost-effectiveness, alongside other attributes. The production process must maintain the food's value and be energy-efficient. Thermal energy plays a crucial role in controlling spoilage and prolonging shelf life in the food industry. Thermal processing is carried out in various manners, with the effectiveness gauged by the rise in the destruction rate of target microorganisms in different food items. Nevertheless, thermal processing can occasionally trigger undesirable reactions in food, resulting in diminished nutritional value and unfavorable changes in characteristics like aroma, color, taste, and texture, ultimately diminishing the overall quality of the end product. The primary objective of applying heat is to deactivate microorganisms and reduce enzyme activity, making it a longstanding, economical, and safe method for managing food spoilage. Several studies suggest that thermal processing has minimal impact on the percentage of fatty acids in oil samples and can decrease the sensitivity of peanut proteins. Moreover, thermal processing proves effective in diminishing microbial activity and spoilage enzymes in rice and wheat bran. Conversely, whey proteins undergo denaturation during heating, altering functional attributes such as solubility, foaming, gelatinization, and emulsification. Denaturation during heating reduces solubility and foaming properties but enhances emulsifying properties. Immunoglobulin is the first protein to denature, followed by serum albumin and beta-lactoglobulin, which are less affected under similar temperature conditions. Alpha-lactalbumin exhibits greater stability against heating, while proteose peptones are unaffected by heat. Protein denaturation is triggered by processes like milk pasteurization, pre-evaporation and concentration heating, evaporation and concentration heating, drying heating, and others.

**Keywords:** Heat processing, denaturation, solubility, food quality.

### مقدمه

روش‌های مبتنی بر حرارت متعددی مانند پاستوریزاسیون، اتوکلاوگذاری، استفاده از بخار و غیره معمولاً برای فرآوری مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند اما این روش‌ها باعث کاهش کیفیت محصولات غذایی و تغییر بسیاری از ویژگی‌های ارگانولپتیکی مواد غذایی می‌شوند. معمولاً استفاده از فرآیندهای حرارتی برای مواد غذایی تازه مانند میوه‌ها و سبزیجات بدون از دست دادن ویژگی‌های تغذیه‌ای و حسی بسیار دشوار است. یکی از مواردی که به میزان بالایی تحت تاثیر فرآیندهای حرارتی قرار می‌گیرند پروتئین‌ها هستند. تغییرات ایجاد شده بر روی پروتئین‌ها در طی فرآوری غذایی تاثیر بسیار بالایی بر روی ویژگی‌های آنها دارد. حرارت دادن و پختن، فرایندی است که روی ترکیب‌های موجود در مواد غذایی مانند پروتئین یا نشاسته تغییراتی ایجاد میکند تا آنها را برای بدن قابل استفاده‌تر کند. ضمن اینکه برخی میکروارگانیسم‌های داخل غذا از جمله میکروب‌ها و انگل‌ها هم در طول پخت از بین می‌روند. در علم تغذیه و بیوشیمی اصطلاحی به نام دی‌نیچیر شدن یا تغییر ماهیت وجود دارد که معمولاً بیشتر پروتئین‌ها این ویژگی را دارند، یعنی زمانی که در معرض حرارت قرار می‌گیرند، ساختار آنها تغییر می‌کند. هدف از فرایند حرارت دهی مواد غذایی، کشتن میکروب‌ها می‌باشد اما مشکل حرارت از آن جهت است که می‌تواند موجب تخریب ترکیبات مغذی و کیفیت مواد غذایی شود. روش‌های فرایند برای یک غذای خاص، با شناسایی میکروب‌های موجود در آن و خصوصیات آن غذا طراحی می‌شوند. مزایای روش‌های حرارتی عبارتند از کنترل نسبتاً آسان فرایند، تولید محصولات پایدار، اثرات مفید تغذیه‌ای، تخریب ترکیبات آلرژن و افزایش قابلیت دسترسی به مواد مغذی می‌باشد (۱).

**پروتئین‌ها و اثرپذیری آنها از فرایندهای حرارتی**

پروتئین‌ها در قرن هجدهم توسط «آنتوان فورکروی (Antoine Fourcroy)» و گروهی دیگر از دانشمندان، به عنوان گروهی از مولکول‌های زیستی که توانایی متراکم شدن یا لخته شدن تحت تیمارهای حرارتی یا اسیدی را داشتند، از سایر بیومولکول‌ها متمایز شدند. پروتئین‌های که در آن زمان مورد توجه قرار گرفتند شامل آلبومین از سفیده تخم مرغ و سرم خون، فیبرین و گلوتن گندم بودند. پروتئین‌ها ماکرومولکول‌های زیستی هستند که عملکردهای اساسی مانند نقش هورمونی، آنزیمی و ساختاری را در بدن بر عهده دارند. اکثر پروتئین‌ها پلیمرهای خطی ساخته شده از مجموعه‌ای تا ۲۰ اسیدآمینه مختلف می‌باشند. همه اسیدهای آمینه دخیل در ساختمان پروتئین‌ها، دارای ویژگی‌های ساختاری مشترکی از جمله یک کربن آلفا، یک گروه آمین، یک گروه کربوکسیل و یک زنجیره جانبی با ساختار متغیر هستند. ساختار پروتئین شامل ساختار اولیه که به توالی خطی اسیدهای آمینه اشاره دارد. این اسیدهای آمینه، با پیوندهای پپتیدی به یکدیگر متصل می‌شوند. ساختار دوم (ثانویه) به آرایش منظم و مکرر فضایی اسیدآمینه‌های مجاور، در یک زنجیره پلی‌پپتیدی اشاره دارد. ساختار سوم (سه‌بعدی) شکلی است که در نتیجه تاخوردن ساختارهای ثانویه ایجاد می‌شود. ساختار چهارم آرایش زنجیره‌های پلی‌پپتیدی در یک ترکیب چند زیرواحدی را توصیف می‌کند (۲).

ساختار و تأثیر روش‌های فرآوری بر عملکرد و اهمیت پروتئین‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین‌ها مواد بسیار پیچیده‌ای هستند که در همه موجودات زنده وجود دارند. پروتئین‌ها ارزش غذایی زیادی دارند و به طور مستقیم در فرآیندهای شیمیایی ضروری برای زندگی نقش دارند. مولکول پروتئین در مقایسه با مولکول‌های شکر یا نمک بسیار بزرگ است و از هر اسید آمینه‌ای تشکیل شده است که به هم متصل شده و زنجیره‌های بلندی را تشکیل می‌دهد، درست مانند دانه‌هایی که روی یک رشته چیده شده‌اند. حدود بیست اسید آمینه مختلف وجود دارد که به طور طبیعی در پروتئین‌ها وجود دارد. پروتئین‌هایی با عملکرد مشابه ترکیب و توالی اسید آمینه مشابهی دارند. اگرچه هنوز نمی‌توان تمام عملکرد یک پروتئین را از توالی اسید آمینه‌اش توضیح داد، اما ارتباط بین ساختار و عملکرد را می‌توان به ویژگی‌های اسیدهای آمینه تشکیل دهنده پروتئین نسبت داد. گیاهان می‌توانند در محیطی رشد کنند که حاوی مواد مغذی معدنی باشد که نیتروژن، پتاسیم و سایر مواد ضروری برای رشد را فراهم می‌کند. آنها از دی‌اکسید کربن موجود در هوا در طول فرآیند فتوسنتز برای تشکیل ترکیبات آلی مانند کربوهیدرات‌ها استفاده می‌کنند که آنها را منابع منحصراً به فرد پروتئین می‌کند. منبع پروتئین گیاهی شامل حبوبات، سویا، یونجه، گندم، غلات، آجیل و دانه‌ها است که می‌توان آنها را با کنسانتره، ایزوله و هیدرولیز پروتئین فرآوری کرد. دانه‌های حبوبات به طور فزاینده‌ای منابع ارزان قیمت غنی از پروتئین استفاده می‌شوند. اگرچه بیش از ۱۰۰ اسید آمینه در طبیعت، به ویژه در گیاهان وجود دارد ولی تنها بیست نوع آن معمولاً در بیشتر پروتئین‌ها یافت می‌شود. داناتوره سازی ممکن است در طول فرآیند دمای بالا نیز رخ دهد. این امر در طی فرآیند حرارت خشک حبوبات، غلات اتفاق می‌افتد. این تغییر ساختاری، زنجیره پیوند را که منجر به شکستن پیوند هیدروژنی پیوندهای S-S می‌شود، آشکار می‌کند. فرآیند حرارتی مستقیم مانند کباب کردن، سرخ کردن، غذا را خوش طعم و هضم می‌کند، اما از نظر تغذیه‌ای از پروتئین پشتیبانی نمی‌کند اما ویتامین‌ها و پیش‌سازها را از دسترس خارج می‌کند و باعث اتصال سایر مواد مغذی غذا در طی واکنش میلارد و غیره می‌شود. ارزش غذایی پروتئین در طول پخت افزایش می‌یابد (۱).

**فرآیند اکستروژن**

روش اکستروژن که مستلزم پختن، پاستوریزه کردن و خشک کردن است ممکن است بافت و کیفیت مواد مغذی پروتئین را مختل کند. واکنش میلارد کاهش قند در واکنش با اسید آمینه آلفا در غلات، گندم و بر خوش طعم بودن پوسته قهوه‌ای و جذابیت‌های رنگی روی محصولات نان تأثیر می‌گذارد. حبوبات مانند لوبیا خشک و سویا خشک دارای خاصیت ژل‌کنندگی زیر نقطه ایزوالکتریک هستند که به ژل اجازه می‌دهد آب را با آن نگه دارد. پروتئین‌های ذخیره سازی دانه غلات سرشار از اسیدهای آمینه مانند پرولین یا گلوتامین هستند. دامیناسیون پروتئین‌های حاوی گلوتامین به اسید گلوتامیک باعث افزایش ظرفیت اتصال به آب می‌شود. با این حال، پخت و پز، به ویژه تیمار رطوبت حرارتی، می‌تواند هضم پروتئین بسیاری از غلات، مانند سورگوم گندم برنج و ارزن را به دلیل ساختار ثانویه، آب‌گریزی پروتئین آب‌گریزی و پیوندهای متقاطع پروتئین (دی‌سولفید متقاطع) کاهش دهد. کوبوتا و همکاران

دریافتند که پرولامین پروتئین برنج نمی تواند در برنج پخته شده بدن را دچار سوء هاضمه کند. با این حال، ژانگ و همکاران، پیشنهاد کردند که تغییر در قابلیت هضم پروتئین برنج در طول پخت و پز با گونه های پروتئاز مرتبط است. تاثیر پخت و پز تحت فشار. Allo و Berghofer دریافتند که برخی از اسیدهای آمینه ناپایداری حرارتی شامل آرژنین، سیستئین، متیونین و تریپتوفان در طی اکستروژن پودر جو از بین می روند. در مقابل، هیچ تغییر قابل توجهی در این اسیدهای آمینه به جز سیستئین مشاهده نشد. ممکن است به این دلیل باشد که شدت پخت برنج ملایم تر از اکستروژن بوده است. با این حال، کاهش جزئی در سیستئین مشاهده شد که ممکن است به دلیل اکسیداسیون ناشی از پخت و پز در سیستئین و یا از دست دادن اضافی سیستئین در طی هیدرولیز اسیدی باشد. علاوه بر این، کاهش سرین و پرولین پس از پخت و پز، به ویژه در پخت و پز با فشار بالا و پخت در مایکروویو رخ می دهد. فرآوری برنج با استفاده از پخت مایکروویو خانگی بر قابلیت هضم پروتئین، تأثیر معنی داری بر محتوای پروتئین نشان نداد. پیوندهای دی سولفیدی و فعل و انفعالات آبریزی در طی پخت و پز در مایکروویو تشکیل شد. اما فعل و انفعالات آبریزی ناشی از پخت و پز ممکن است بر قابلیت هضم پروتئین تأثیر نگذارد. در مقابل، پیوند متقابل باند دی سولفید در طول پخت و پز قابلیت هضم پروتئین را به طور قابل توجهی کاهش داد. تشکیل پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولی ناشی از گرما در طول پخت، ممکن است برنج را تثبیت و تقویت کند. به طور کلی، پختن اثرات محدودی بر ساختار آمینو اسیدهای برنج داشت. اما دنگ و همکاران معتقدند که پختن حبوبات به مدت سه ساعت، محتوای متیونین، تیروزین و ترونین را کاهش می دهد. برشته کردن حبوبات آجیلی با شکستن پیوندهای هیدروژنی، پیوندهای یونی یا آبریز منجر به تخریب ساختارهای سوم پروتئین می شود. این گروه تیول یا گروه قطبی را تولید می کند که ممکن است در معرض ایجاد پیوند متقابل، اثرات پیوندی و در نهایت ایجاد محصولات مایلارد و آکریل امید باشد. کاهش تدریجی سطح پروتئین از خام به پخته و از خام به بو داده وجود داشت. واکنش های مایلارد که منجر به نوعی قهوه ای شدن می شود، برهمکنش بین گروه کربونیل یک قند احیا کننده و گروه آمینه آزاد از یک اسید آمینه یا پروتئین است. نتایج پروتئین خام نشان داد که واکنش های مایلارد در دانه های بادام زمینی پخته شده ملایم بود (در دمای ۹۰-۸۵ درجه سانتی گراد به مدت حدود ۲۰ دقیقه پخته شد) اما واکنش ها در نمونه های برشته شده بالا بود (برشتن در دمای ۱۲۰-۱۳۰ درجه سانتی گراد برای حدود ۲۵ دقیقه). از این رو پروتئین در هر دو نوع پخته و بو داده کاهش می یابد و رنگ بادام زمینی بو داده معمولاً قهوه ای است. بخار همچنین می تواند یک واحد فراروی در اکستروژن، استریلیزاسیون، پاستوریزاسیون باشد. پروتئین حبوبات گندم را می توان بخار پز کرد و در طی این فرآیند، ساختارهای سوم و چهارم پروتئین به دلیل پخش شدن ویسکوزیته مواد و در نتیجه قرار گرفتن زنجیره های جانبی بیشتری تخریب می شود (۲)

### فرآیند حرارتی در مواد گوشتی

پخت فرآورده های گوشتی برای دستیابی به محصولی خوش طعم و ایمن ضروری است. پروتئین های گوشت، تقریباً ۲۰ درصد از وزن عضله، نشان دهنده اجزای اصلی تشکیل دهنده ساختار محصول گوشتی هستند. آنها در هنگام گرم شدن دچار تغییرات ساختاری قابل توجهی می شوند و بنابراین کیفیت فرآورده های گوشتی که عمدتاً توسط ساختار گوشت کنترل می شود نیز پس از پختن به شدت تغییر می کند. یک پروتئین از یک زنجیره پلیمری طولانی از اسیدهای آمینه، یک زنجیره پلی پپتیدی ساخته می شود. پروتئین های گوشت را می توان به سه گروه تقسیم کرد. پروتئین های میوفیبریلار، میکروفون سارکوپلاس و بافت همبند. پروتئین های میوفیبریلار بین ۵۰ تا ۵۵ درصد از کل محتوای پروتئین را تشکیل می دهند، در حالی که پروتئین های سارکوپلاسمی تقریباً ۳۴-۳۰ درصد را تشکیل می دهند، ۱۰-۱۵ درصد باقی مانده پروتئین ها پروتئین های بافت همبند هستند. تغییرات ساختاری پروتئین ها که در هنگام گرم شدن رخ می دهد معمولاً دنا تورا سیون نامیده می شود. در تغییرات ساختاری که هنگام گرم شدن رخ می دهد، برهمکنش های پروتئین-پروتئین است که منجر به تجمع پروتئین ها میشود. بسیاری از محققان دریافته اند که بیشتر پروتئین های سارکوپلاسمی (یعنی آن پروتئین های ماهیچه ای محلول در آب یا با قدرت یونی کم) بین ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتیگراد جمع می شوند (۳). برای عضله گردن گاو نر یافته شد که تجمع حرارتی پروتئین های سارکوپلاسمی می تواند تا دمای ۹۰ درجه سانتی گراد افزایش یابد. آنها همچنین اولین کسانی بودند که پیشنهاد کردند که پروتئین های سارکوپلاسمی ممکن است نقشی در

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

قوام گوشت پخته داشته باشند، به گونه‌ای که پروتئین‌های سوکوپلاسمی تجمع یافته ناشی از گرما می‌توانند ژل بین عناصر ساختاری گوشت تشکیل دهند و در نتیجه به یکدیگر متصل شوند. یکی دیگر از جنبه‌های جالب پروتئین‌های سارکوپلاسمی، اثر نرم‌کننده‌ای است که برخی از این آنزیم‌ها می‌توانند داشته باشند، همانطور که اشاره شد دنا توره شدن پروتئین‌های میوفیبریلار معمولاً منجر به تشکیل ژل می‌شود، زیرا میوزین منحصر به فرد است به این معنا که ژل‌هایی را در غلظت بسیار کم ۰/۵ درصد وزنی تشکیل می‌دهد. در طول پخت پروتئین‌های مختلف دنا توره می‌شوند و باعث تغییرات ساختاری گوشت می‌شوند، مانند تخریب غشای سلولی، انقباض عرضی و طولی الیاف گوشت، تجمع و تشکیل ژل پروتئین‌های سارکوپلاسمی و انقباض و حل شدن بافت همبند (۳). اثرات فرایند حرارتی بر ضد مغذی‌ها، پروتئین و قابلیت هضم نشاسته، نخود، عدس، لوبیا قرمز و سفید مورد بررسی قرار گرفت. کاهش سطح مواد ضد مغذی همراه با بهبود قابلیت هضم پروتئین و نشاسته پس از پختن این حبوبات مشاهده شد. مواد ضد مغذی، از جمله تانن با تیمارهای حرارتی مختلف کاهش یافت. حداکثر بهبود قابلیت هضم پروتئین (۹۵.۷-۱۰۵٪) و نشاسته (۱۱۷-۱۳۸٪) در پخت این حبوبات غذایی در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه مشاهده شد. با این حال، پخت و پز معمولی منجر به بهبود قابلیت هضم پروتئین و نشاسته ی غذا به ترتیب ۸۶.۰-۹۳.۳٪ و ۸۴.۰-۹۰.۴٪ شد (۴).

### فرایند حرارتی در حبوبات

ارزش غذایی ضعیف حبوبات غذایی به دلیل وجود برخی از مواد ضد تغذیه ای گزارش شده است. تانن‌ها قابلیت هضم پروتئین را مهار می‌کنند، در حالی که اسید فیتیک برخی از مواد معدنی ضروری را کاهش می‌دهد. گزارش شده که پخت تحت فشار نسبت به پخت معمولی در کاهش مواد ضد مغذی ماش موثرتر است. یافته‌ها نشان داد که جوشاندن و اتوکلاو در آب کیفیت پروتئین لوبیا را به دلیل کاهش سطح مواد ضد مغذی بهبود می‌بخشد (۴). گزارش شده که قابلیت هضم نشاسته لوبیا چشم بلبلی به طور مشخص در نتیجه یک روش پخت با بخار بهبود یافته است، گزارشات مبنی بر اینکه جوشاندن ساده به دلیل کاهش مواد ضد مغذی، کیفیت غذایی حبوبات را بهبود می‌بخشد در واقع، پختن حبوبات غذایی به دما و زمان گرم شدن، شروع و مقدار آب اضافه شده در طول فرآیند پخت بستگی دارد. کاهش محتویات تانن و اسید فیتیک، بسته به شرایط پخت این غذاها، به میزان‌های مختلف مشاهده شد. حدود ۲۰/۸-۲۶/۸ درصد تانن و ۲۴/۰-۳۵/۱ درصد اسید فیتیک پس از پخت به روش جوشاندن معمولی کاهش یافت. با این حال، کاهش این مواد ضد مغذی در زمان پختن حبوبات غذایی در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ و ۱۲۸ درجه سانتیگراد به طور قابل توجهی بیشتر بود. کاهش محتوای تانن و اسید فیتیک به ترتیب ۳۳.۱-۴۵.۷٪ و ۲۸/۰-۵۱/۶٪، در نتیجه پختن حبوبات غذا در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد برای دوره‌های زمانی مختلف بود. محتوای پروتئین و نشاسته نیز با پختن حبوبات غذایی کاهش یافت اما به میزان کمتری نسبت به مواد ضد مغذی (تانن‌ها و اسید فیتیک) حدود ۰/۸۶-۲/۶۳ درصد پروتئین و ۰/۸۶-۳/۳۸ درصد نشاسته در پخت این حبوبات غذایی به روش معمولی از بین می‌رود، در حالی که ۱/۳۳-۴/۵۸ درصد پروتئین و ۱/۰۹-۶/۶۶ درصد نشاسته در هنگام پخت غذا از بین می‌رود. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که قابلیت هضم پروتئین پس از پخت حبوبات به روش جوشاندن معمولی بین ۸۶/۰ تا ۹۳/۳ درصد بهبود یافته است، در حالی که عملیات حرارتی بالا باعث حداکثر بهبود قابلیت هضم پروتئین به میزان ۹۵.۷-۱۰۵ شده است. پختن حبوبات غذایی در دمای ۱۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه نیز قابلیت هضم پروتئین را کاهش داد (۴). وو و همکاران (۱۹۹۴)، گزارش داد که در دسترس بودن اسیدهای آمینه خاص، به ویژه لیزین، با افزایش دما و زمان کاهش می‌یابد، که ممکن است دلیل کاهش قابلیت هضم پروتئین در داخل بدن باشد. قابلیت هضم پروتئین بالاتر پس از عملیات حرارتی ممکن است به دلیل افزایش دسترسی پروتئین به حمله آنزیمی باشد. با این حال، این اثر همچنین می‌تواند به دلیل غیرفعال شدن عوامل ضد تغذیه ای پروتئینی باشد. بهبود قابلیت هضم نشاسته را می‌توان به دلیل هیدرولیز نشاسته در نتیجه عملیات حرارتی نسبت داد. با این حال، محققان گزارش کردند که پخت و پز قابلیت هضم نشاسته را از طریق ژلاتینه شدن و از بین بردن مواد ضد مغذی ثابت می‌کند. با توجه به نتایج حداکثر بهبود توانایی هضم پروتئین و نشاسته در پختن، نخود، عدس، لوبیا قرمز و سفید در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه مشاهده شد. با این حال، کاهش تدریجی قابلیت هضم پروتئین مشاهده شد، در حالی که قابلیت هضم نشاسته بدون تغییر باقی ماند که زمان پخت (از ۱۰ تا ۹ دقیقه) و دما (از ۱۲۱ تا ۱۲۸ درجه

سانتی گراد) در طول فرآیندهای حرارتی مختلف افزایش یافت. کاهش در سطوح ضد مغذی از حبوبات غذایی مختلف نیز در نتیجه عملیات حرارتی مختلف مشاهده شد. با توجه به این نتایج، پیشنهاد می شود که حبوبات غذایی باید در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای حداکثر بهبود قابلیت هضم پروتئین و نشاسته پخته شوند (۴).

### تاثیر حرارت دهی بر روی پروتئین های موجد در آب پنیر

مطالعات انجام شده در مورد تاثیر حرارت دهی بر روی آب پنیر: وی پروتئین ها به دلیل ارزش غذایی بالا و کاربردهای مختلف در محصولات غذایی فواید زیادی دارند. یکی از اشکالات پروتئین های آب پنیر ناپایداری آنها در برابر فرآوری حرارتی است که منجر به دناتوره شدن، تجمع و در برخی شرایط ژل شدن آنها می شود. پروتئین های آب پنیر ۲۰ درصد از پروتئین های شیر را تشکیل می دهند و شامل B-لاکتوگلوبولین (B-Lg؛ تقریباً ۳/۲ گرم در لیتر)، یک لاکتالومین (a-La؛ تقریباً ۱/۲ گرم در لیتر)، آلبومین سرم گاوی (BSA؛ تقریباً ۰/۴ گرم) است. و ایمونوگلوبولین ها (تقریباً ۰/۷ گرم در لیتر) که به صورت تجاری به دست می آیند. در سال های اخیر، تحقیقات روی پروتئین های آب پنیر به دلیل ارزش بیولوژیکی آنها که بالاترین میزان در بین تمام پروتئین های شناخته شده است، مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است (۵). پروتئین های آب پنیر می توانند به طور موثر توسط انسان مورد استفاده قرار گیرند و مقدار قابل توجهی از اسیدهای آمینه ضروری را برای رشد فراهم کنند (۶). با این حال، آنها به راحتی در طول فرآوری حرارتی دناتوره می شوند، یعنی به دلیل باز شدن مولکول چین خورده اولیه خود، دچار تغییرات ساختاری می شوند. دناتوره شدن پروتئین های آب پنیر توسط گرما یکی از مسائل مهم فرآوری در صنعت لبنیات است. به عنوان مثال، دناتوره شدن پروتئین های آب پنیر با آزاد شدن ترکیباتی باعث ایجاد طعم های پخته شده در شیر گرم شده می شوند (۷). همچنین در طی فرآوری حرارتی شیر، تشکیل توده ها یا کمپلکس های پروتئین آب پنیر منجر به رسوب گیری مبدل های حرارتی می شود که به نوبه خود زمان کار کارخانه های صنعتی را محدود می کند، انتقال حرارت را کاهش می دهد و افت فشار را افزایش می دهد. افزودن کربوهیدرات ها افزودن قندها به محلول های پروتئین برای تثبیت پروتئین ها در ترکیب اصلی آنها شناخته شده است اثر بالقوه تثبیت حرارتی قندها بر پروتئین های آب پنیر مورد توجه است زیرا محصولات غذایی مختلفی که حاوی پروتئین آب پنیر هستند نیز حاوی قند هستند. مطالعات نشان دادند که ساکارز و لاکتوز در ۲٪ تا ۲۰٪ باعث کاهش میزان رسوب تشکیل شده در هنگام گرم شدن محلول های پروتئین آب پنیر (۳/۵٪) در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه می شود. آنها به این نتیجه رسیدند که ساکارز مرحله دناتوراسیون را تسریع میکند اما فاز تجمع را مهار می کند (۸). محققین دریافتند که لاکتوز WPI را تا دناتوره شدن تثبیت می کند و ژل شدن را به تاخیر می اندازد، اما از آن جلوگیری نمی کند. افزودن ساکارز با غلظت کم (۰ تا ۱۰ درصد وزنی) به محلول های WPI سرعت تجمع پروتئین آب پنیر را کاهش داد. ژل شدن در مقابل، افزودن ساکارز در غلظت بالا (۱۰ تا ۳۰ درصد وزنی بر وزن) برهمکنش پروتئین-پروتئین را افزایش داد و تجمع پروتئین را افزایش داد. اگرچه افزودن قندها در طول ژل شدن WPI می تواند پایداری حرارتی WPI را ثابت کند، اما ممکن است به واکنش میلارد و اتصال متقابل کووالانسی پروتئین ها کمک کند. ترکیب با کربوهیدرات ها افزودن پلی ساکاریدها به محلول های پروتئین آب پنیر، توانایی امولسیون سازی پروتئین ها را بهبود می بخشد. با این حال، پروتئین های آب پنیر وقتی در pH پایین و در حضور نمک حرارت داده می شوند، توانایی امولسیون کنندگی خود را از دست می دهند (۹).

### فرآیند اولتراسونیک

فرآیند اولتراسوند برای بهبود پایداری حرارتی محلول ها و کنسانتره های پروتئین آب پنیر توسط چندین نویسنده گزارش شده است. استفاده از اولتراسوند برای مدت زمان کوتاه (۲۰ کیلوهرتز) پس از یک تیمار پیش گرم (۸۰ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه) پروتئین آب پنیر (۴٪ تا ۱۵٪ WPC (w/w)) ویسکوزیته و اندازه را کاهش داد. بنابراین تجمع پروتئین ها حتی پس از عملیات حرارتی پس از صوت کاهش می یابد. کاربرد بالقوه فراصوت برای بهبود پایداری حرارتی پروتئین های آب پنیر در مقیاس آزمایشی صنعتی با استفاده از محصولات مختلف پروتئین آب پنیر مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبی از عملیات حرارتی و فراصوت باعث بهبود پایداری حرارتی WPC بازسازی شده (۵٪ وزنی بر وزنی)، احتباس پروتئین آب پنیر و حفظ پروتئین شیر شد (۱۰). ریزپوشانی، روشی برای تولید پروتئین های

آب پنیر پایدار در برابر حرارت است. میکرومولسیون آب ذرات نانومتری با قطر ۵ تا ۱۰۰ نانومتر تولید می‌کند، زیرا فضای موجود برای تشکیل ذرات پروتئین تجمع یافته در امولسیون محدود بود. ترکیب اتصال متقابل آنزیمی و کپسوله سازی به نانوذرات، یک استراتژی جدید برای تولید محصولات پروتئین آب پنیر پایدار در برابر حرارت برای استفاده در غذاهایی مانند نوشیدنی‌های غنی شده با پروتئین است. با توجه به نتایج برخلاف کازئین‌ها، پروتئین‌های آب پنیر در برابر گرما ناپایدار هستند و این امر بر فرآیند پذیری آنها و خواص فیزیکی محصولات شیر تأثیر می‌گذارد. از آنجایی که تولید بسیاری از محصولات لبنی شامل عملیات حرارتی است، مطالعات متعددی در مورد مکانیسم دناتوره شدن و تجمع پروتئین‌های آب پنیر در حین حرارت دادن و راههای جلوگیری از چنین تغییراتی انجام شده است (۱۱).

عملیات حرارتی بر ساختار مولکولی پروتئین‌های شیر در سطح مشترک امولسیون‌های روغن در آب و در محیط‌های آبی تأثیر می‌گذارد. شیر یک ماده غذایی پیچیده از دیدگاه ترکیبات مولکولی است که بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهد، عمدتاً به دلیل ارزش غذایی بالا. به صورت مایع مصرف می‌شود یا برای تولید لبنیات دیگر مانند کره، پنیر، بستنی و غیره استفاده می‌شود. شیر امولسیونی از گلبول‌های چربی در فاز آبی است. فاز آبی از اجزای محلول و معلق مانند میسل‌های کازئین، پروتئین‌های سرم، مواد معدنی لاکتوز و ویتامین‌ها تشکیل شده است. عملیات حرارتی بر ساختار مولکولی پروتئین‌های شیر در سطح مشترک امولسیون‌های روغن در آب و در محیط‌های آبی تأثیر می‌گذارد. پروتئین‌های شیر در دو دسته عمده طبقه بندی می‌شوند. اولین و فراوان‌ترین خانواده، کازئین است که از چندین بخش تشکیل شده است (عمدتاً آلفا S1، آلفا S2، بتا، کاپا) و بیشتر آنها در یک ذره کلئیدی به نام میسل کازئین وجود دارند. دومین گروه پروتئین در شیر، پروتئین‌های آب پنیر است که شامل پروتئین‌ها و آنزیم‌های حساس به حرارت، کروی، محلول در آب است (۵).

### فرآوری حرارتی شیر

فرآوری حرارتی شیر یکی از مراحل ضروری تولید شیر است که توسط صنایع لبنی اتخاذ شده است. هدف از عملیات حرارتی شیر افزایش ماندگاری و بهبود کیفیت این مایع بیولوژیکی پیچیده با کاهش بار میکروبی و در نتیجه به حداقل رساندن خطر مسمومیت غذایی است جایی که شیر به عنوان ماده غذایی در محصولات مبتنی بر شیر استفاده می‌شود، از عملیات حرارتی برای بهبود خواص ارگانولپتیکی چنین فرمولاسیون‌های لبنی با دستکاری عملکرد پروتئین‌های شیر استفاده می‌شود. پروتئین‌های شیر و به ویژه پروتئین‌های آب پنیر تنها به عنوان عوامل امولسیون کننده و کف کننده در محصولات غذایی متنوع به دلیل ویژگی‌های سطحی منحصر به فردشان استفاده می‌شود. عملیات حرارتی، بسته به شرایط فرآوری، می‌تواند منجر به تغییرات غیرقابل برگشت در ساختار پروتئین شیر شود. پروتئین شیر و عملیات حرارتی هنگامی که شیر در دمای بالاتر از ۶۵ درجه سانتیگراد گرم می‌شود، پروتئین‌های آب پنیر باز می‌شوند و گروه‌های آبگریز را در معرض دید قرار می‌دهند. هنگامی که پروتئین‌های شیر تحت فرآیند حرارتی قرار می‌گیرند، بسته به شرایط جذب، پروتئین‌های آب پنیر ممکن است دچار یک تغییر ساختاری شوند که معمولاً به عنوان دناتوره شدن شناخته می‌شود، که با باز شدن پروتئین و قرار گرفتن در معرض گروه‌های آبگریز همراه است. در طی عملیات حرارتی، توده‌های کوچکی از B-لاکتوگلوبولین تشکیل می‌شوند که با افزایش دما یا زمان گرم شدن بزرگ می‌شوند و دانه‌های B-لاکتوگلوبولین دناتوره شده بزرگ‌تری تشکیل می‌شوند (۱۲). هنگامی که دما یا زمان حرارت بیشتر افزایش می‌یابد، دناتوره شدن a-lactalbumin شروع می‌شود، که کمپلکس‌هایی را با توده‌های B-lactoglobulin دناتوره شده تشکیل می‌دهد، و هر دو پروتئین به سطح میسل‌های کازئین متصل می‌شوند. سینتیک دناتوره شدن و تجمع پروتئین توسط شرایط گرمایش و محیط شیمیایی کنترل می‌شود و دمای حرارت و pH احتمالاً مهمترین عامل در تعیین سرعت و میزان دناتوره شدن پروتئین و درجه برهمکنش بعدی پروتئین‌های آب پنیر با میسل‌های کازئین می‌باشد. در طول دوره امولسیون سازی، پروتئین‌های شیر می‌توانند به سرعت در سطح قطرات مسیل تازه تشکیل شده جذب شوند، کشش سطحی را کاهش دهند و لایه‌های ضخمی را تشکیل دهند که از ادغام یا لخته شدن قطرات از طریق مکانیسم‌های تثبیت فضایی و الکترواستاتیک جلوگیری می‌کند. در طول همگن سازی امولسیون‌های پروتئین شیر، جذب رقابتی بین کازئین‌ها و پروتئین‌های آب پنیر رخ می‌دهد که منجر به تشکیل یک لایه نازک

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

(۱۰<sup>۳</sup> نانومتر) متشکل از هر دو نوع پروتئین می شود چندین تلاش برای بررسی اثر عملیات حرارتی بر عملکرد پروتئین شیر انجام شده است. محلول های کازئینات سدیم و پروتئین های آب پنیر تحت عملیات حرارتی قرار گرفتند و پس از اتمام این پیش تیمار برای تشکیل امولسیون و تثبیت آن استفاده شد. عملیات حرارتی کازئینات سدیم در دمای ۵۰ تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه منجر به افزایش توانایی امولسیون سازی و ظرفیت آن شد. از سوی دیگر، مطالعات دیگر نشان داد که وقتی محلول های پروتئین آب پنیر در دمای بین ۶۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد تا ۱۰۰۰ ثانیه تحت فرایند حرارتی قرار می گیرند و توانایی امولسیون کنندگی قابل توجهی را از دست می دهند. به دنبال دنا توره شدن پروتئین به دلیل عملیات حرارتی، توده های پروتئینی بزرگی تشکیل می شوند که به طور موثر قطرات چربی را می پوشانند و منجر به بی ثباتی امولسیون می شود. ، اندازه قطرات امولسیون های تثبیت شده با پروتئین شیر با افزایش عملیات حرارتی افزایش می یابد. بنابراین، عملیات پیش حرارتی پروتئین ها در شرایط مشخص شده منجر به کاهش راندمان امولسیون سازی می شود که به احتمال زیاد با درجه باز شدن پروتئین مرتبط است. عملیات حرارتی، مرحله ای اساسی در فرآیند فرآوری لبنیات، بر رئولوژی و ساختار امولسیون های پروتئین شیر تأثیر می گذارد و تا حد زیادی مقبولیت مصرف کننده از این محصولات را تعیین می کند. مستند شده است که حرارت بر اندازه ذرات امولسیون های مدل تثبیت شده با پروتئین های شیر تأثیر دارد در این مورد، پلیمریزاسیون با واسطه دی سولفید بین پروتئین های شیر پس از حرارت دادن منجر به افزایش اندازه ذرات به دلیل لخته شدن قطرات شد. یافته های مشابهی در مطالعات دیگر نشان داده شد که در آن امولسیون های روغن در آب تثبیت شده با پروتئین آب پنیر تحت عملیات حرارتی در دمای بین ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. با توجه به نتایج تأثیر فرایند حرارتی بر ساختار پروتئین شیر عمدتاً مربوط به پروتئین های آب پنیر است، در حالی که به نظر می رسد کازئین ها یک اثر محافظتی در برابر دنا توره شدن پروتئین های سرم دارند. همچنین ثابت شد که عملیات حرارتی پروتئین های شیر قبل از تشکیل امولسیون، توانایی پروتئین برای تشکیل ذرات درشت پایدار را کاهش می دهد، زمانی که پروتئین های آب پنیر در فرآیند دخیل بودند. از سوی دیگر، عملیات حرارتی محلول های کازئینات سدیم در محیط شیمیایی کنترل شده منجر به بهبود قابل توجهی خواص امولسیون کننده شد. در سیستم های پروتئین آب پنیر، گرمایش اثر نامطلوبی بر پایداری امولسیون داشت که احتمالاً از لخته شدن قطرات ناشی از فعل و انفعالات پروتئین-پروتئین ناشی می شود (۱۳).

### اثر فرایند حرارتی بر آجیل ها و بادام زمینی

بادام زمینی یکی از شایع ترین و شدیدترین آلرژن های غذایی است. با این وجود، بروز آلرژی به بادام زمینی در کشورهای مختلف متفاوت است و به میزان قرار گرفتن در معرض و نحوه مصرف بادام زمینی بستگی دارد. شناخته شده است که فرآوری بر حساسیت زایی پروتئین های بادام زمینی تأثیر می گذارد. در بادام زمینی آب پز کمتر از بادام زمینی خام و بو داده مشخص شده است. فرایند حرارتی ممکن است آلرژی زایی یک پروتئین را تغییر دهد، یعنی افزایش یا کاهش دهد، اما اثر کلی روی یک آلرژن غذایی پیچیده قابل پیش بینی نیست. این مکانیسم به ساختار و خواص شیمیایی آلرژن، فرآوری حرارتی مورد استفاده، به عنوان مثال، خشک در مقابل مرطوب، دما و مدت زمان گرمایش بستگی دارد. علاوه بر این، برهمکنش با سایر اجزای تشکیل دهنده ماتریس غذایی ممکن است رخ دهد و تأثیر عمده ای بر آلرژی زایی کلی غذا داشته باشد. ویگوتزکی و همکاران همچنین نشان داد که فرآوری خشک در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد تا ۹۰ دقیقه تأثیری بر حساسیت زایی برخی از پروتئین های فندق ندارد و وقوع پروتئین های آلرژیک بسیار پایدار در برابر حرارت با وزن مولکولی کمتر از ۱۴ کیلو دالتون را پیشنهاد می کند. عملکرد استخراج در هر دو بادام زمینی خام و بو داده نزدیک به ۶۰ درصد بود. در مقابل، تنها ۳۷۷ میلی گرم پروتئین از ۵ گرم مغز بادام زمینی پخته شده به دست آمد، علاوه بر این، پروتئین در آب مورد استفاده برای پختن نیز یافت شد. تغییرات قابل توجهی در ساختار پروتئین ممکن است در طی عملیات حرارتی رخ دهد که ماهیت و میزان آن به دما و مدت زمان فرایند حرارتی بستگی دارد. آلرژی زایی برخی از پروتئین های کوچک، تحت تأثیر عملیات حرارتی در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد تا ۹۰ دقیقه در ذرت و در فندق قرار نمی گیرد. (۱۴).

به دلیل تمایل مصرف کنندگان به خوردن محصولات گیاهی خام و کم فرآوری شده به عنوان بخشی از عادات غذایی سالم تر، در سال های گذشته به طور قابل توجهی افزایش یافته است. قبل از انجماد، غذاهای با منشاء گیاهی برای کاهش بار میکروبی و غیرفعال



کردن آنزیم‌های مضر، تحت بلانچینگ حرارتی قرار می‌گیرند. بلانچینگ حرارتی در دمای ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد، بر روی فلفل دلمه‌ای سبز و قرمز متورم مقایسه شد. فلفل‌های تیمار شده تحت فشار کاهش کمتری در محتوای پروتئین محلول و اسید اسکوربیک نشان دادند. فلفل قرمز حتی محتوای اسید اسکوربیک (۱۵-۲۰٪) را در مقایسه با فلفل تیمار نشده افزایش داد. زیرا بسیاری از تغییرات کیفی که در هنگام توزیع و نگهداری این غذاها رخ می‌دهد، به دلیل واکنش‌های مضر است که کاتالیز می‌شود. توسط آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز (POD)، پلی فنل اکسیداز (PPO) و پکتین متیل استراز (PME). با این حال، گرما باعث از بین رفتن ویژگی‌های حسی (بافت، طعم و رنگ) و ویژگی‌های کیفیت تغذیه‌ای مانند کاهش محتوای اسید اسکوربیک می‌شود. درمان بلانچینگ باید در حدی باشد که باعث غیرفعال شدن آنزیم‌های مضر شود تا افت کیفیت به حداقل برسد. این امر به ویژه در مورد فلفل دلمه‌ای شیرین منجمد که قرار است به صورت منجمد نگهداری شود و پس از ذوب به صورت خام مصرف شود، مربوط می‌شود، بلانچ حرارتی می‌تواند اثرات مضر قابل توجهی بر بافت داشته باشد، که به دلیل ویژگی‌های بافتی مشخص، یعنی سفتی و استحکام، برای این محصول بسیار مهم است. تیمارهای بلانچینگ محتوای کل پروتئین محلول را حدود ۱۵ تا ۶۰ درصد از فلفل سبز و ۱۵ تا ۳۵ درصد در فلفل قرمز کاهش داد، این اثر به تدریج با افزایش میزان پروتئین افزایش یافت. آلرژی‌زایی برخی از پروتئین‌های کوچک، تحت تأثیر عملیات حرارتی در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد تا ۹۰ دقیقه در ذرت و در فندق قرار نمی‌گیرد. آلرژی‌زایی یک غذای کامل به سهم چندین ماده حساسیت‌زا بستگی دارد که ممکن است واکنش متفاوتی به فرآوری و عملیات حرارتی نشان دهند. ماهیت، شدت، طول و شرایط عملیات حرارتی نیز ممکن است بر ساختار پروتئین‌های آلرژی‌زا، برهمکنش‌های آن‌ها با سایر اجزای ماتریکس غذا و در نهایت حساسیت‌زایی آنها تأثیر بگذارد. برخی از ساختارهای آلرژی‌زا ممکن است از بین بروند، در حالی که برخی دیگر، به ویژه قطعات پپتید با وزن مولکولی کم، ممکن است به تازگی تشکیل شوند. با توجه به نتایج کاهش جهانی آلرژی‌زایی مشاهده شده در بادام زمینی پخته شده با تغییرات ساختاری پروتئین‌ها مرتبط نبود، بلکه عمدتاً با از دست دادن آلرژن‌ها، اساساً پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم و انتقال آن‌ها از طریق حل شدن به آب پخت همراه بود (۱۵).

### نتیجه گیری

پروتئین‌ها مواد بسیار پیچیده‌ای هستند که در همه موجودات زنده وجود دارند. پروتئین‌ها ارزش غذایی زیادی دارند و به طور مستقیم در فرآیندهای شیمیایی ضروری برای زندگی نقش دارند. هدف از عملیات حرارتی افزایش ماندگاری و بهبود کیفیت مواد غذایی با کاهش بار میکروبی و در نتیجه به حداقل رساندن خطر مسمومیت غذایی است. معمولاً استفاده از فرآیندهای حرارتی برای مواد غذایی تازه مانند میوه‌ها و سبزیجات بدون از دست دادن ویژگی‌های تغذیه‌ای و حسی بسیار دشوار است. فرآیند حرارتی ممکن است در برخی موارد سبب واکنش‌های ناخواسته در مواد غذایی شده و منجر به کاهش ارزش غذایی و ایجاد تغییرات نامطلوب در ماهیت ترکیبات نظیر آروما، رنگ، طعم، بافت، مواد مغذی و به طور خلاصه کاهش تازگی و کیفیت محصول نهایی گردد.

### References:

1. Siltberg-Liberles J, Grahn JA, Liberles DA. The Evolution of Protein Structures and Structural Ensembles Under Functional Constraint. *Genes (Basel)*. 2011; 2(4): 748–62.
2. Papadopoulos MC. Effect of processing on high-protein feedstuffs: A review. *Biol Wastes*. 1989 ; 29(2): 123–38.
3. Bax M-L, Buffière C, Hafnaoui N, Gaudichon C, Savary-Auzeloux I, Dardevet D, et al. Effects of Meat Cooking, and of Ingested Amount, on Protein Digestion Speed and Entry of Residual Proteins into the Colon: A Study in Minipigs. *Blachier F, editor. PLoS One*. 2013; 8(4): e61252.
4. Gallego M, Arnal M, Barat JM, Talens P. Effect of Cooking on Protein Digestion and Antioxidant Activity of Different Legume Pastes. *Foods*. 2020; 10(1):47.

5. Raikos V. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocoll.* 2010; 24(4): 259–65.
6. Wijayanti HB, Bansal N, Deeth HC. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014; 13(6): 1235–51.
7. Sreekumar R, Al-Attabi Z, Deeth HC, Turner MS. Volatile sulfur compounds produced by probiotic bacteria in the presence of cysteine or methionine. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 48(6): 777-782.
8. Al-Attabi Z, D’Arcy BR, Deeth HC. Volatile Sulphur Compounds in UHT Milk. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008; 49(1): 28–47.
9. Dissanayake M, Liyanaarachchi S, Vasiljevic T. Functional properties of whey proteins microparticulated at low pH. *J Dairy Sci.* 2012; 95(4): 1667–79.
10. Vargas SA, Delgado-Macuil RJ, Ruiz-Espinosa H, Rojas-López M, Amador-Espejo GG. High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with kappa carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrason Sonochem.* 2021; 70: 105340.
11. Jambrak AR, Mason TJ, Lelas V, Paniwnyk L, Herceg Z. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *J Food Eng.* 2014; 121: 15-23.
12. Nicorescu I, Vial C, Loisel C, Riaublanc A, Djelveh G, Cuvelier G, et al. Influence of protein heat treatment on the continuous production of food foams. *Food Res Int.* 2010; 43(6): 1585-1593.
13. Warncke M, Kieferle I, Nguyen TM, Kulozik U. Impact of heat treatment, casein/whey protein ratio and protein concentration on rheological properties of milk protein concentrates used for cheese production. *J Food Eng.* 2022; 312: 110745.
14. de Jongh HHJ, de Jong GAH, Apostolovic D, Taylor SL, Baumert JL, Koppelman SJ. Effect of heat treatment on the conformational stability of intact and cleaved forms of the peanut allergen Ara h 6 in relation to its IgE-binding potency. *Food Chem.* 2020 ; 326:127027.
15. Barry-Ryan C. The Use of Mild Heat Treatment for Fruit and Vegetable Processing. In: *Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce.* Wiley; 2012; 347-363.

## مبارزه با بیماری‌ها به وسیله واکسن‌های مبتنی بر تکنولوژی RNA

علی آقاچوچکیان<sup>۱</sup>، مریم پیمانی<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. دانشیار ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

واکسن‌های RNA از جمله واکسن‌های RNA پیام‌رسان (mRNA)، RNA دایره‌ای (circRNA) و واکسن‌های RNA خودتقویت‌شونده (saRNA) یک آینده‌ی امیدوارکننده را ایجاد کرده‌اند. ویژگی‌های برجسته این واکسن‌ها شامل کارایی بالا، سازگاری و سادگی تولید می‌باشند که تولید سریع و مقرون به صرفه را هم در بر می‌گیرند. واکسن‌های mRNA در مبارزه با COVID-19، همه‌گیری ناشی از SARS-COV-2 که در سال ۲۰۱۹ ظاهر شد، پتانسیل بالایی از نظر RNA را نمایان کرده‌اند. به عبارت دیگر، با شیوع SARS-COV-2، واکسیناسیون مورد تحسین قرار گرفته است. مفهوم واکسن‌های مبتنی بر RNA در انسان ثابت شده و در نهایت تجاری‌سازی شده‌اند. با ظهور mRNA-1273 (COVID-19)، یک واکسن mRNA توسعه یافته توسط شرکت Moderna، اولین شرکتی بود که با اولین داوطلب وارد آزمایشات بالینی شد. ارائه این واکسن‌ها به شکل تحویل مبتنی بر لیپید، تحویل مبتنی بر پلیمر، تحویل مبتنی بر پپتید، و ذرات شبیه‌سازی ویروس، و همچنین واکسن‌های mRNA برهنه (تحویل مبتنی بر نانوذرات لیپیدی) از بهترین و محبوب‌ترین راه‌ها برای تحریک ایمنی هومورال و سلولی محسوب می‌شوند. این واکسن‌ها در کشورهای در حال توسعه پیشرفت چشم‌گیری داشته‌اند و mRNA برهنه و RNA خودتکثیرشونده کاندیدای برتر برای تولید واکسن‌های جدید محسوب می‌شوند. این مقاله، یک مطالعه مروری است که با بررسی مقالات منتشر شده در سایت‌های pubmed و Google Scholar با کلیدواژه‌ی "mRNA vaccine" گردآوری شده و به بررسی جزئیات آن‌ها پرداخته است.

واژگان کلیدی: واکسن mRNA، واکسن‌های RNA دایره‌ای، حامل‌های mRNA.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۱۰

پست الکترونیک: peymani.iaushk@gmail.com

## Fighting diseases by vaccines based on RNA technology

Ali Aghakuchakian<sup>1</sup>, Maryam Peymani<sup>2\*</sup>

1. Master's student in genetics, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Associate professor of genetics, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

RNA vaccines, including messenger RNA (mRNA), circular RNA (circRNA), and self-amplifying RNA (saRNA) vaccines, have created a promising future. These RNA-based vaccines offer several advantages, such as high efficiency, compatibility, and simplicity, along with rapid and cost-effective production. mRNA vaccines, notably in the fight against COVID-19, stemming from the emergence of SARS-CoV-2 in 2019, have highlighted the potential of RNA. With the prevalence of SARS-CoV-2, vaccination has garnered significant acclaim. The concept of RNA-based vaccines has been solidified in humans and eventually commercialized. With the advent of mRNA-1273 (COVID-19), an mRNA vaccine developed by Moderna, it became the first company to enter clinical trials with the initial volunteers. The presentation of these vaccines in lipid-based delivery, polymer-based delivery, peptide-based delivery, virus-mimicking particles, and naked mRNA vaccines (delivered through lipid nanoparticles) stands out as the most effective and popular methods, stimulating both humoral and cellular immunity. These vaccines have made remarkable progress in developing countries, and naked mRNA and self-amplifying RNA represent excellent candidates for new vaccine development. This article is a review study that has gathered information from articles on pubmed and Google Scholar using the keyword "mRNA vaccine," delving into their details.

**Keywords:** mRNA Vaccine, circular RNA vaccine, vector of mRNA

### مقدمه

واکسن RNA یا واکسن mRNA، نمونه‌ای از واکسن است که از نسخه یک ماده شیمیایی طبیعی به نام RNA پیام‌رسان (mRNA) برای ایجاد پاسخ ایمنی استفاده می‌کند (۱). واکسن مولکول‌های سنتز شده (RNA) یعنی RNA های مصنوعی را به سلول‌های ایمنی ترافست می‌کند، هنگامی که واکسن RNA درون سلول‌های ایمنی جای گیرد به عنوان mRNA عمل کرده و باعث می‌شود تا سلول، پروتئین بیرونی که به‌طور معمول توسط پاتوژن مانند ویروس یا سلول سرطانی ساخته می‌شود را بسازد. این مولکول‌های پروتئینی یک واکنش ایمنی سازگار را تحریک می‌کنند که به بدن می‌آموزد چگونه پاتوژن یا سلول‌های سرطانی مربوط را شناسایی کرده و از میان ببرد (۱). از مزایای واکسن‌های RNA نسبت به واکسن‌های پروتئینی سنتی، می‌توان به طراحی آسان‌تر، سرعت تولید بیشتر، هزینه اندک تولید (۲ و ۳) و القای ایمنی هومورال و همچنین سلولی اشاره کرد (۴). از نقاط ضعف واکسن‌های mRNA مانند واکسن فایزر، این است که پیش از توزیع نیازمند نگهداری در دمای بسیار پایین می‌باشد (۵). به‌کارگیری RNA برای تولید واکسن، موجب به جریان افتادن اطلاعات نادرستی در مورد آن درون شبکه‌های اجتماعی شده که به غلط ادعا می‌کنند که به‌کارگیری RNA موجب تغییر در DNA افراد شده، یا بر روی پیشینه‌های ایمنی نامعلوم آن در گذشته تأکید می‌کنند، در حالی که مجموع شواهد ناشی از آزمایش‌های مربوط به ده‌ها هزار نفر را نادیده می‌انگارند (۵).

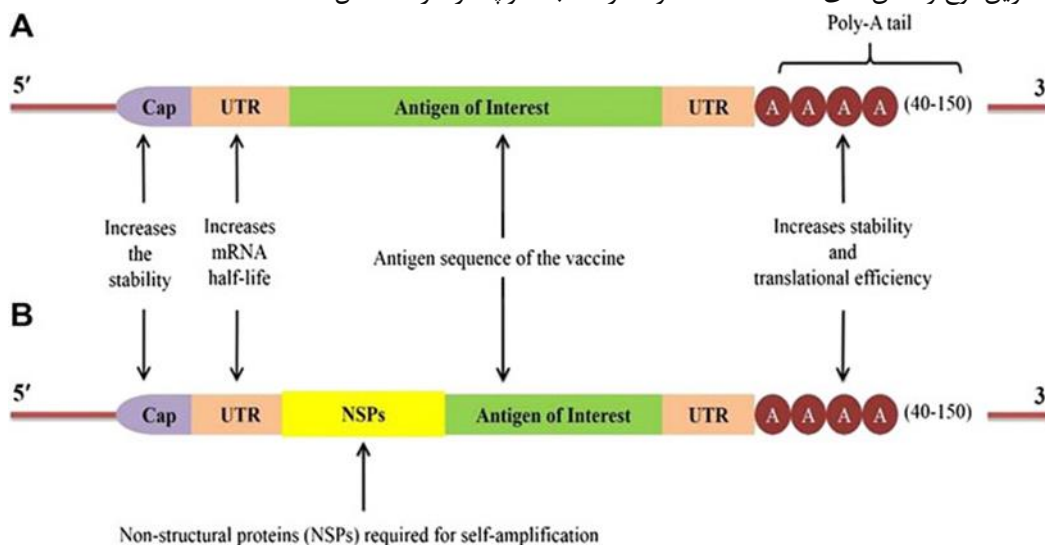
### بیان مسئله

برای تحریک پاسخ ایمنی در بسیاری از واکسن‌ها میکروپ ضعیف شده یا غیر فعال را وارد بدن می‌کنند ولی mRNA که نوع جدیدی از واکسن‌ها برای محافظت در برابر بیماری‌های عفونی هستند. به سلول‌ها می‌آموزند که چگونه پروتئینی بسازند که باعث ایجاد پاسخ ایمنی در داخل بدن شود. حال سوال این است که آیا این واکسن‌ها به ژن دریافت کنندگان واکسن آسیب می‌رسانند؟ در ابتدا باور این بود که این واکسن‌ها موجب تغییر در DNA افراد میشوند در صورتی که هرگز وارد هسته سلولی نمی‌شوند همچنین دارای ویروس زنده نیستند و به هیچ وجه بر ماده ژنی و ژن‌های ما اثر نمی‌گذارند، همچنین این مقاله به اثر این واکسن‌ها بر

بیماری‌های عفونی و همچنین اثر آن بر بیماری کووید می‌پردازد. همچنین تحویل کارآمد واکسن به سلول‌ها چالش برانگیز است چون RNA آزاد در بدن سریعاً تخریب می‌شود که در این مقاله در مورد رفع این مشکل بر اساس بسته‌بندی کردن آن‌ها توسط نانوذرات لیپیدی توضیح داده است.

### اشکال مختلف mRNA واکسن‌ها

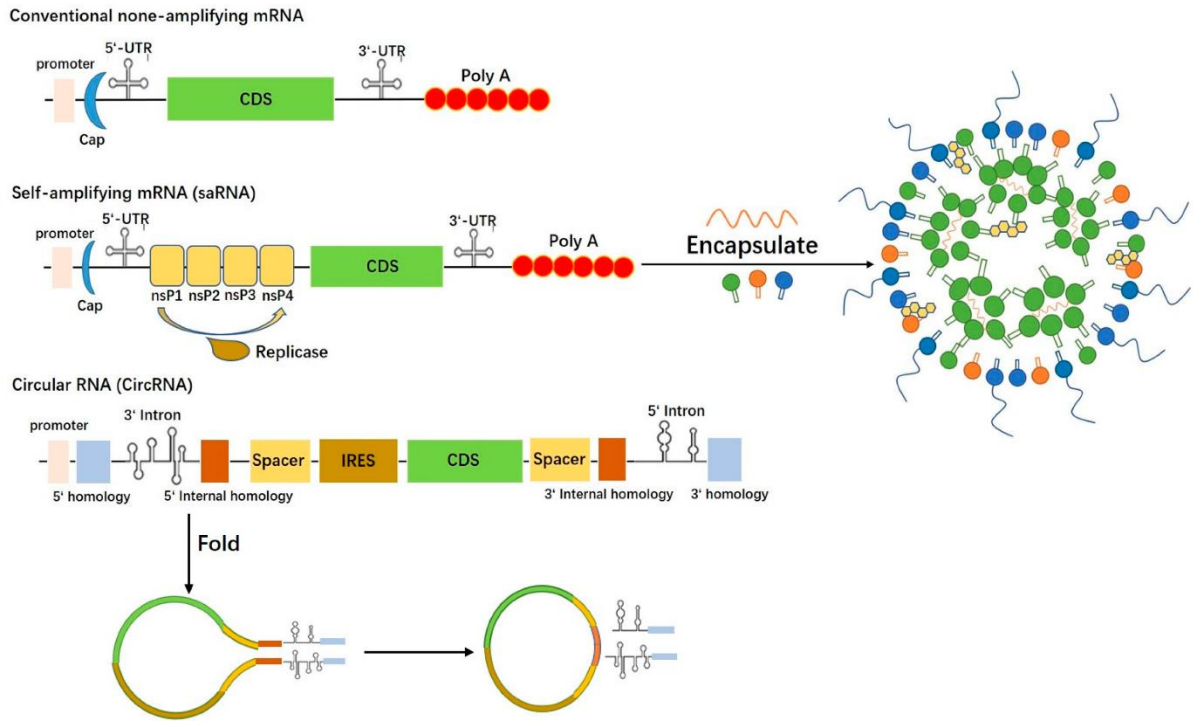
بطور کلی دو نوع عمده واکسن RNA موجود است: mRNA نوع غیر تکثیر شونده یا معمولی و mRNA تکثیر شونده یا mRNA replicon یا saRNA که از آلفاویروس‌ها منشا می‌گیرند (شکل ۱). با توجه به مزایا و معایب متمایز آن‌ها mRNA واکسن‌های معمولی ساده‌ترین نوع واکسن‌های RNA هستند و اندازه نسبتاً کوچکتر دارند (شکل ۱ الف).



شکل ۱- دو نوع واکسن RNA: (الف) ساختار واکسن mRNA معمولی با کلاهک و مناطق ترجمه نشده (UTRS) آنتی ژن و دم پلی A. (ب) ساختار واکسن mRNA خود تکثیر شونده (saRNA) مشتق شده از آلفا ویروس‌ها (۶).

این واکسن‌ها شامل شناسایی آنتی‌ژن و سپس ژن توالی یابی، شبیه سازی در پلاسמיד الگوی DNA و آنتی‌ژن‌های تومور است. در دهه‌های گذشته متوجه شدند که مولکول‌های RNA نه تنها می‌توانند به عنوان حامل ژنتیکی عمل کنند و ترجمه پروتئین را انجام دهند بلکه می‌توانند آنزیمی را نیز کنترل کنند. یکی از مزایای مولکول‌های RNA نسبت به DNA یعنی مزایای واکسن RNA نسبت به DNA این است که نیازی به ورود به هسته و عبور از غشای هسته‌ای ندارند و پس از ورود به سلول در دسترس قرار می‌گیرند و عملکرد خود را اجرا می‌کنند (۷). مولکول‌های RNA باعث تحریک سیستم ایمنی ذاتی می‌شوند یعنی می‌تواند باعث فعال شدن dsRNA اگر روزها شوند و آن‌ها هم به عنوان مولکول‌های سیگنالی، سیستم ایمنی را فعال می‌کنند و باعث پاسخ در میزبان می‌شوند (۸). واکسن‌های خود تکثیر شونده saRNA که replicon هم نامیده می‌شوند روی مولکول‌های RNA مهندسی شده برای عوامل همانند سازی مورد نیاز برای تقویت RNA در میزبان سلولی است (شکل ۲ ب) (۹). واکسن‌های خود تکثیر شونده، واکسن‌های ژنتیکی هستند که از RNA اصلاح شده استفاده می‌کند برای القای پاسخ ایمنی در برابر پاتوژن‌های خاص (۱۰). این واکسن‌ها پتانسل بالایی برای جلوگیری سریع و موثر در برابر بیماری‌های عفونی مثل عفونت‌های ویروسی مانند آنفولانزا و SARS-COV-2 هستند. تفاوت مهم بین saRNAها و واکسن‌های mRNA معمولی توانایی آن‌ها در تقویت RNA در داخل سلول‌ها است و باعث افزایش تولید پروتئین و از طرفی دیگر پاسخ ایمنی قوی ایجاد می‌کنند زیرا این ویژگی را از آلفا ویروس‌ها الهام گرفته‌اند. آلفا ویروس‌ها مثل ویروس جنگلی (۱۱ و ۱۲) و semliki(SFV) یا ویروس انفالیتیس اسبی ونزوئلا (۱۱ و ۱۳).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۲- شکل شماتیک از mRNA معمولی و saRNA و CircRNA و کپسوله شدنشان (۱۴).

CircRNAs نوع دیگری از انواع RNA هستند؛ که ساختار کوالانسی منحصر به فرد آن در مقایسه با mRNA خطی پایداری دارویی و بیولوژیکی بالاتری را ایجاد می کند و آن را در برابر تجزیه اگزونوکلازها محافظت می کند و اینها هم مانند mRNA خطی دارای اجزاء غیر کد کننده و کد کننده پروتئین است (شکل ۲) (۱۵). چندین ویژگی عملکردی دارد از جمله به عنوان یک اسفنج مولکولی عمل می کند، در تنظیم فعالیت سلول و اثر بر ترجمه پروتئین و در ارتباط با بیماری های خاص این پتانسیل را دارد که به عنوان یک نشانگر زیستی بیماری و درمانی جدید عمل کند (۱۶ و ۱۷). در سال 1995، Chen و Sarnow نشان دادند که CircRNA حاوی ساختارهای EMCV IRES می تواند پروتئین ها رو در رتیکولوسیت خرگوش بیان کند (۱۸). CircRNA ها بر خلاف RNA معمولی انتهای ۵' و ۳' ندارند و به همین خاطر در مقابل اگزونوکلازها مقاوم هستند و احتمالاً مقاوم تر از RNA خطی در سلول ها هستند (۱۹).

### SARS-CoV-2

SARS-COV-2 یک تک رشته ای پوشش دار است که جهش بالایی دارد که منجر به ایجاد چند گونه متفاوت شد شامل دودمان های آلفا، بتا، گاما و نوع اخیر که omicron نامیده شد. چند دلیل وجود دارد که نشان می دهد واکسن های سنتی برای مقابله با کرونا مناسب نیست، اول اینکه مطالعه پیش بالینی وقت گیر است. دوم اینکه واکسن های سنتی نمی توانستند مصونیت قوی در مقابل ویروس کرونایی ایجاد کنند که دائماً در حال تغییر بود، برعکس واکسن های mRNA سریعاً و به طور موثر به بیماری های عفونی نوظهور مثلاً در SARS-COV-2 با انعطاف پذیری بالا پاسخ دادند و به سادگی با تغییر طراحی توالی mRNA تطبیق داده می شوند. واکسن های COVID-19 باعث تولید آنتی بادی های خنثی کننده می شوند که گلیکوپروتئین اسپایک ویروس را هدف قرار می دهد و مسیر آلودگی آن را تغییر می دهد و از مرگ و میر جلوگیری می کند اما حتی ممکن است که آنتی بادی های تولید شده در پاسخ به یک گونه خاص در اثر استفاده از واکسن RNA در برابر انواع دیگری از گونه های SARS-COV-2 موثر نباشد (۲۰).

### سیستم تحویل mRNA

واکسن‌های mRNA به عنوان یک فناوری واکسن بسیار پیچیده و موثر ظهور کرده‌اند ولی با دو چالش مهم روبرو هستند. اولاً بار منفی RNA که برای عبور آن از ساختار غشا سلولی مشکل دارد، دوم اینکه RNAها به خصوص mRNA ذاتاً ناپایدار هستند و توسط ریبونوکلازها دچار تخریب می‌شوند بنابراین برای محافظت از mRNA از یک سیستم تحویل RNA به نام نانوذرات لیپیدی استفاده می‌شود تا واکسن در غالب ذرات لیپیدی (LNP) منتقل شوند (۱۴). در واکسن‌های پیشگیری کننده ویروس کرونا مثل mRNA1273 و BNT162b2 که هر دو از فرمول تحویل مبتنی بر نانوذرات لیپیدی (LNP) استفاده می‌کنند (۲۱).

### نتیجه گیری

یکی از مزیت‌های واکسن‌های RNA نسبت به DNA همین بود که برای اثر بخشی و بیان آنتی ژن نیازی به ورود به هسته ندارد و از زمان اولین تحویل mRNA در داخل بدن، RNA به عنوان یک پلتفرم قوی و امیدبخش برای واکسن‌ها معرفی شد و در طول همه گیری COVID-19 دانشمندان، کار بر روی RNA و واکسن‌های مبتنی بر RNA را آغاز کردند و پیشرفت آن سریع تر شد. در واقع واکسن مبتنی بر mRNA یک جایگزین برای واکسن‌های سنتی بود و تحویل واکسن‌های mRNA مبتنی بر نانوذرات لیپیدی بهترین مسیر تحویل این واکسن‌ها اعلام شد.

### References:

1. Park KS, Sun X, Aikins ME, Moon JJ. "Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems". *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020; 169: 137-151.
2. PHG Foundation (2019). "RNA vaccines: an introduction". University of Cambridge. 2020.
3. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman. "mRNA vaccines – a new era in vaccinology". *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2018; 17 (4): 261-279.
4. Kramps T, Elders K. "Introduction to RNA Vaccines". *RNA Vaccines: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2017; 1499: 1-11.
5. Carmichael F, Goodman J. "Vaccine rumours debunked: Microchips, 'altered DNA' and more" (Reality Check). *BBC news*. 2020.
6. Borah P, Deb PK, Al-Shar'i NA, Dahabiyeh LA, Venugopala KN, et al. Perspectives on RNA vaccine candidates for COVID-19. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021; 8: 635245.
7. Liu MA. A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines*. 2019; 7(2): 37.
8. Kaldis A, Berbati M, Melita O, Reppa C, Holeva M, et al. Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV. *Molecular plant pathology*. 2018; 19(4): 883-95.
9. Borah P, Deb PK, Deka S, Venugopala KN, Singh V, et al. Current scenario and future prospect in the management of COVID-19. *Current medicinal chemistry*. 2021; 28(2): 284-307.
10. Ballesteros-Briones, M.C.; Silva-Pilipich, N.; Herrador-Cañete, G.; Vanrell, L.; Smerdou, C. A New Generation of Vaccines Based on Alphavirus Self-Amplifying RNA. *Curr. Opin. Virol*. 2020; 44: 145-153
11. Aldon Y, McKay PF, Herrero JM, Vogel AB, Lévai R, et al. Immunogenicity of Stabilized HIV-1 Env Trimers Delivered by Self-Amplifying mRNA. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2021; 25: 483-493
12. Erkovic M, Vogel A, Erbar S, Walzer KC, Hempel T, et al. A TransAmplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. *Molecular Therapy*. 2020; 28: 119-128.

13. Pollock KM, Cheeseman HM, Szubert AJ, Libri V, Boffito M, et al. Safety and Immunogenicity of a Self-Amplifying RNA Vaccine against COVID-19: COVAC1, a Phase I, Dose-Ranging Trial. *EClinicalMedicine*. 2022; 44: 101262.
14. Zhou W, Jiang L, Liao S, Wu F, Yang G, et al. Vaccines' New era-RNA vaccine. *Viruses*. 2023; 15(8): 1760.
15. Pang Y, Mao C, Liu S. Encoding Activities of Non-Coding RNAs. *Theranostics*. 2018; 8: 2496-2507.
16. Cui J, Chen M, Zhang L, Huang S, Xiao F, et al. Circular RNAs: Biomarkers of Cancer. *Cancer Innov*. 2022; 1: 197-206.
17. Zhao W, Dong M, Pan J, Wang Y, Zhou J, et al. Circular RNAs: A novel target among non-coding RNAs with potential roles in malignant tumors. *Mol. Med. Rep*. 2019; 20: 3463-3474.
18. Chen C, Sarnow P. Initiation of Protein Synthesis by the Eukaryotic Translational Apparatus on Circular RNAs. *Science*. 1995; 268: 415-417.
19. Eck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, et al. "Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats". *RNA*. 2013; 19 (2): 141-157.
20. Markov PV, Ghafari M, Beer M, Lythgoe K, Simmonds P, et al. A polyvalent RNA vaccine reduces the immune imprinting phenotype in mice and induces neutralizing antibodies against omicron SARS-CoV-2. *Heliyon*. 2024; 10(4): e25539.
21. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G., mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability. *Int. J. Pharm*. 2021, 601, 120586.



## کاربردهای ریزآرایه‌ها

نجمه بهادری<sup>۱\*</sup>، حمیدرضا خدایی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. استادیار، گروه دامپزشکی، واحد شاهین شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهین شهر، ایران.

### چکیده

تکنولوژی ریزآرایه‌ی جدید برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ معرفی شد. این تکنولوژی حاصل تلاش دانشمندان برای مطالعه‌ی موازی و هم‌زمان فعالیت چندین ژن است. این فناوری علاوه بر پتانسیل علمی در مطالعات پایه‌ای بیان ژن، یعنی تنظیم و برهمکنش ژن‌ها، کاربردهای مهمی در تحقیقات دارویی و بالینی دارد. این فناوری نه تنها درک اطلاعات مختلف ژنوم را تسهیل می‌کند، بلکه به تشخیص زودهنگام بیماری‌ها و پیش‌بینی واکنش افراد به داروهای خاص نیز کمک شایانی می‌کند. به بیان ساده، ریزآرایه، یک اسلاید میکروسکوپی به ابعاد چند سانتی متر مربع است که فعالیت هزاران ژن یا پروتئین را در یک نمونه آزمایشی، با یک نمونه کنترل بررسی می‌کند. فناوری ریزآرایه DNA در چندین زمینه مانند سم شناسی، زیست شناسی تکاملی، زیست شناسی سلولی، پزشکی، بیوتکنولوژی و آسیب شناسی جانوری و گیاهی استفاده می‌شود.

از آنجایی که این فناوری یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین فناوری‌های روز دنیا است، در این تحقیق سعی شده است تا به اختصار فناوری ریزآرایه، انواع آن و سطوح مورد استفاده در ریز آرایه‌های DNA - پروتئینی و همچنین کاربردهای آن‌ها اشاره شود. همچنین فناوری ریزآرایه‌های DNA جنبه‌های جدیدی از برهمکنش‌های گیاه و عامل بیماری‌زا را آشکار کرده است و این پتانسیل را دارد که به ابزاری مهم برای طیف وسیعی از آزمایش‌ها در آسیب‌شناسی گیاهان تبدیل شود، اگرچه ریزآرایه‌های DNA به عنوان ابزاری برای استفاده معمول در آزمایشگاه‌ها پرهزینه هستند، اما مشخص شده است که هزینه تجهیزات مولکولی با افزایش حجم فروش آنها به مرور زمان کاهش می‌یابد، بنابراین امیدواریم شاهد کاهش سریع هزینه‌ها در این فناوری باشیم و با تبدیل این فناوری به ابزاری روزمره در آزمایشگاه، رویای داشتن یک آزمایشگاه در یک تراشه DNA به حقیقت بپیوندد.

**نتیجه گیری:** با پیشرفت و گسترش علم ژنتیک شاهد ظهور روش‌ها و شاخه‌های نوینی در این علم هستیم. تکنولوژی ریزآرایه روشی مقرون به صرفه، کارآمد و پربازده است و می‌توانیم از آن در یافتن راه‌حل‌های درمان، تحقیقات سرطان، پرتئومیکس و فارماکوژنومیکس استفاده کنیم.

**واژگان کلیدی:** ریزآرایه، ریزتراشه، ژن، زیست فناوری، پروتئومیکس، فارماکوژنومیکس.

آدرس نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸۱۳۳۳۳۹۶۱۱ همراه: ۰۹۲۱۷۱۰۱۱۵۲

پست الکترونیک: Najyyy@yahoo.com

## Microarray and its Applications

Najmeh Bahadori<sup>1\*</sup>, Hamidreza Khodaei<sup>2</sup>

1. Master's student, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Veterinary Science, Shahinshahr Branch, Islamic Azad University, Shahinshahr, Iran

### Abstract

The new microarray technology was introduced for the first time in 1996. This technology is the result of scientists' efforts to study the parallel and simultaneous activity of several genes. In addition to the scientific potential in the basic study of gene expression, that is, the regulation and interaction of genes, this technology has important applications in pharmaceutical and clinical research. This technology not only facilitates the understanding of various genome information, but also helps in early diagnosis of diseases and predicting people's response to certain drugs. Simply put, a microarray is a microscopic slide measuring a few square centimeters that examines the activity of thousands of genes or proteins in a sample with a control sample. DNA microarray technology is used in several fields such as toxicology, evolutionary biology, cell biology, medicine, biotechnology, and animal and plant pathology.

Since this technology is one of the most important and practical technologies today, in this research, an attempt has been made to briefly mention the microarray technology and the types of surfaces used in protein DNA microarrays, as well as their applications. Also, DNA microarray technology has revealed new aspects of plant-pathogen interactions and has the potential to become an important tool for a wide range of experiments in plant pathology, although DNA microarrays are expensive as a tool for routine use in laboratories, the cost of molecular equipment has been found to decrease over time as their sales volume increases. Therefore, we hope to see the rapid reduction of costs in this technology and by turning this technology into a daily tool in the laboratory, the dream of having a laboratory in a DNA chip will come true.

**Conclusion:** With the progress and expansion of genetic science, we are witnessing the emergence of new methods and branches in this science. Microarray technology is a cost-effective, efficient and productive method and we can use it in finding treatment solutions, cancer research, proteomics and pharmacogenomics.

**Keywords:** Microarray, Microchip, Gene, Biotechnology, Proteomics, Pharmacogenomics.

### مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از فناوری ریزآرایه (Microarray) امکان تجزیه و تحلیل هزاران ژن را به طور هم‌زمان فراهم کرده است. به زبان ساده، ریز آرایه فناوری بررسی ده‌ها، صدها و هزاران ژن می‌باشد (۱). فناوری زیرآرایه دو زیرمجموعه اصلی دارد: ریزآرایه DNA و ریز آرایه پروتئین. با ریزآرایه DNA می‌شود بیان هزاران ژن به صورت هم‌زمان را بررسی کرد. هدف از این بررسی و تجزیه تحلیل ژنی تاثیرات یک ژن منفرد بر بیان دیگر ژن‌ها و مقایسه‌ی میزان و نحوه‌ی بیان ژن در سلول‌های سالم و بیمار است. برای مثال انواع سرطان علائم مورفولوژیکی شبیه بهم دارند. بنابراین، روش‌های تشخیصی مستقیمی با استفاده از داده‌های بیان ژن می‌تواند ارائه شود. از سوی دیگر، آرایه پروتئینی یک نوع دیگر از روش‌هایی است که می‌تواند به متخصصان پزشکی کمک‌کند تا حضور پروتئین‌ها را در یک نمونه بیولوژیکی مانند خون اندازه‌گیری کنند. این روش به دلیل قابلیت‌های زیادی که دارد می‌توان یکی از مهم‌ترین روش‌های پروتئومیکس دانست. امروزه شواهد زیادی نشان داده است که میزان پیچیدگی پروتئوم انسان بسیار فراتر از ژنوم آن است. بنابراین سرمایه‌گذاری تجاری در این حوزه از بیوتکنولوژی بسیار حائز اهمیت است (۲).

این فناوری علاوه بر پتانسیل علمی در مطالعات پایه بیان ژن، یعنی تنظیم و برهمکنش ژن‌ها، کاربردهای مهمی در تحقیقات دارویی و بالینی نیز دارد. به عنوان مثال، با مقایسه بیان ژن در سلول‌های سالم و ناسالم با کمک ریزآرایه می‌توان ژن‌های ناسالم را شناسایی و میزان اثربخشی داروهای درمانی را بر روی آنها ارزیابی کرد (۳).

شناسایی ژن‌های دخیل در بیماری‌ها از روی داده‌های ریزآرایه، یک چالش مهم در بهبود آگاهی از مکانیسم‌های بیماری و استراتژی‌های کنترل بیماری است. تحقیقات در این زمینه و روش‌های مرسوم، ژن‌های بسیاری را به عنوان ژن‌های مؤثر در بیماری شناسایی کرده است (۴). از آنجایی که روش‌های تجربی برای شناسایی ژن‌های عامل بیماری در میان تعداد زیادی از ژن‌های کاندید بسیار هزینه‌بر است، به کارگیری روش‌های انتخاب ویژگی ژن توصیه می‌شود. علاوه بر این، وجود نویز و تعداد بسیار بالای اطلاعات ژنی، تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه را به یک حوزه جالب توجه تبدیل کرده است (۵). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که بسیاری از داده‌های بیان ژن ریزآرایه، فاقد بار اطلاعاتی از نظر معیارهای طبقه‌بندی هستند (داده‌ی غیر مرتبط) (۶). بنابراین انتخاب ویژگی ژن و فرآیند شناسایی و حذف ویژگی‌های نامرتب‌نقش مهمی در تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه‌ای مشتق شده از DNA دارند (۷).

فناوری ریزآرایه بر اساس پروتکل qPCR و فناوری هیبریداسیون ساترن بلاتینگ است که در مقیاس بزرگ برای اندازه‌گیری سطوح بیان تعداد زیادی از ژن‌ها استفاده می‌شود. همچنین این روش مبتنی بر فناوری نانو و هیبریداسیون با استفاده از رنگ‌های فلئورسنت نشاندار است. این فناوری قادر است الگوهای بیان تفاضلی چندین هزار توالی خاص یا ناحیه کدگذاری را به طور هم‌زمان تشخیص دهد (۸).

به بیان ساده، ریزآرایه، یک اسلاید میکروسکوپی است که فعالیت هزاران ژن یا پروتئین را در یک نمونه، با یک نمونه کنترل بررسی می‌کند (۹). این بررسی شامل مقایسه، مشابهت، بررسی تغییرات (تغییر، کاهش و افزایش) و یا عدم تغییر در ساختار و فعالیت ژن‌ها و یا پروتئین‌ها می‌باشد (۱۰).

### آشنایی با ریز آرایه ها

جفت شدن بازها (A-T و C-G در DNA و A-U و C-G در RNA) اساس فناوری ریزآرایه است. یک ریزآرایه، ماتریکسی از ردیف‌های حاوی توالی DNA نمونه‌ها است (۱۱). بر اساس قوانین جفت سازی اولیه، این روش محیطی را برای تطبیق نمونه‌های DNA شناخته شده و ناشناخته فراهم می‌کند. هر آزمایش ریزآرایه دو بخش اصلی دارد. پروب‌ها که اسیدهای نوکلئیک با توالی شناخته شده هستند که به سطح ریزآرایه متصل شده‌اند و الگوها که نمونه‌های نشاندار نوکلئیک اسید هستند و باید ویژگی‌ها و فراوانی آنها شناسایی شود. در این آزمون الگوها با توالی‌های پروب هیبرید می‌شوند (۱۲).

در فناوری ریزآرایه معماری چپ و فلسفه تولید و پیدایش آن بسیار جذاب است. به گونه‌ای که در صفحه فلوسل نانوئی، برای یک ژن در موقعیت‌های مکانی مختلف کاوشگر خاص آن ژن به طور مکرر ریخته شده است، بنابراین موضوع تکرار تکنیکی باید مورد توجه قرار گیرد. اگر به دلایلی بافر هیبریداسیون به طور یکنواخت روی صفحه پخش نشود، حباب‌هایی تشکیل شود و یا صفحه شیب نسبی پیدا کند و مواد بیشتری به چند پیکسل برسد، نتایج بیان ژن به دلیل هیبریداسیون، کاذب نشان داده خواهد شد. بنابراین به طور خلاصه، هنگام مطالعه در مورد ریزآرایه، پردازش و تصحیح پیش زمینه داده‌های ریزآرایه و بحث در مورد تکرار بیولوژیکی مورد توجه قرار می‌گیرد (۱۳).

فناوری ریز آرایه (Microarray) یا ریزتراشه (Microchip) نه تنها درک اطلاعات مختلف ژنوم را تسهیل می‌کند، بلکه به تشخیص زودهنگام بیماری‌ها و پیش‌بینی واکنش افراد به داروهای خاص کمک می‌کند. علیرغم برخی مشکلات مانند استاندارد سازی و ادغام با سوابق الکترونیکی، فناوری ریزآرایه روشی مؤثر، مقرون به صرفه و انسان محور در خدمات سلامت انسان است (۱۴).

### انواع آرایه

#### آرایه DNA

آرایه DNA شامل آرایه‌ای از پروب‌های مولکولی است که مکمل توالی‌های cDNA خاص هستند و روی یک فاز جامد مانند یک لام شیشه‌ای ثابت شده‌اند. این تثبیت معمولاً توسط روبات‌هایی به نام Arrayer انجام می‌شود. شناسایی با این روش عمدتاً بر اساس خواندن نشانگرهای فلئورسنت است. ریزآرایه DNA بر اساس هیبریداسیون بین رشته‌های DNA است. هر چه جفت بازهای

مکمل بیشتر باشد، پیوند هیدروژنی قوی تر است. چنین اتصال با شستشو از بین نمی‌رود، در حالی که اتصال‌های ضعیف، که جفت بازهای کمتری را به اشتراک می‌گذارند، با شستشو از سیستم حذف می‌شوند. شدت و قدرت سیگنال نهایی به مقدار نمونه‌هایی که تماس قوی با توالی‌های روی سطح دارند بستگی دارد (۱۵).

### آرایه پروتئین

آرایه پروتئینی یک روش قدرتمند برای شناسایی پروتئین‌ها می‌باشد. آرایه‌های پروتئینی امکان بررسی هزاران فعل و انفعالات را در آن واحد فراهم می‌کند. پروتئین‌های مورد استفاده در این روش را می‌توان به صورت نوترکیب تهیه کرد که در این صورت همبستگی مستقیم و نزدیکی بین نتایج آرایه پروتئینی و توالی DNA وجود خواهد داشت. روش‌های متداول آنالیز پروتئوم الکتروفورز ژل دو بعدی و طیف سنجی جرمی است، اما علیرغم اثربخشی این روش‌ها، محدودیت‌هایی نیز وجود دارد. در این روش‌ها ممکن است پروتئین‌های مورد نظر که دارای فراوانی کمتر می‌باشند T ثابت نگردند. در نتیجه برای کارهای تشخیصی چندان مناسب نبوده چرا که اغلب، پروتئین‌هایی با فراوانی اندک برای تشخیص مهم و مورد توجه هستند. در نتیجه به یک روش جامع‌تر مانند آرایه پروتئینی نیاز است. در حال حاضر این فناوری به عنوان فناوری محوری پروتئومیکس مدنظر می‌باشد (۱۶).

### زمینه‌های کاربرد فناوری ریز آرایه DNA

فناوری ریز آرایه DNA در چندین زمینه مانند سم‌شناسی، زیست‌شناسی تکاملی، زیست‌شناسی سلولی، پزشکی، بیوتکنولوژی و آسیب شناسی جانوری و گیاهی استفاده می‌شود (۱۶).

ابزار تجزیه و تحلیل ریز آرایه به محققان زیست‌شناسی مولکولی اجازه می‌دهد تا آزمایشات بیولوژیکی را در زمان بسیار کوتاه و با حجم بالا انجام دهند. در واقع، با حجم زیادی از اطلاعات در مورد بسیاری از ژن‌ها، می‌توان روابط پیچیده هماهنگی در سطح DNA، RNA و پروتئین را در یک ارگانیزم تعیین کرد و با سایر ارگانیزم‌ها و یا در طول مراحل تکامل مقایسه کرد. به عبارت دیگر در بیولوژی مولکولی، جهت بررسی هر یک از گونه‌های انسان، موش، رت، آرابیدوپسیس، *Zebrafish*، *E. coli*، باسیلوس سوبتیلیس و... کیت‌هایی موجود است. همچنین کیت‌هایی جهت بررسی متابولیسم اسید آمینه، اسید چرب، گلوکز، انسولین و بررسی مسیرهای آپوپتوزی، مسیرهای سیگنالینگ cAMP، چرخه سلولی، ترمیم DNA و غیره به پژوهشگران کمک می‌کند تا بتوانند به بررسی این موارد بپردازند (۱۷).

**پزشکی:** در این شاخه از علم، ریز آرایه در تشخیص سرطان، تشخیص پاتوژن‌های میکروبی و ویروسی عامل بیماری، شناسایی ژن‌های خاص عامل بیماری، جهش‌های دخیل در بیماری‌های شایع و نادر و کشف استعداد ابتلا به یک بیماری خانوادگی یا سرطان بسیار مهم و اثر گذار بوده است. همچنین کیت‌های جداگانه‌ای برای تشخیص بیماری‌هایی مانند آنژیوژنز، تصلب شرایین، ام اس، پارکینسون و... وجود دارد. علاوه بر موارد فوق، کیت‌هایی برای تشخیص برخی بیماری‌های ژنتیکی مانند سندرم داون (تریزومی ۲۱)، سندرم پاتو (تریزومی ۱۳)، سندرم ادوارد (تریزومی ۱۸)، سندرم‌های پرادرولی و آنجلمن و همچنین سندروم‌های ویلیام و دی جرج ساخته شده است. بنابراین می‌توان گفت یکی از مهم‌ترین کاربردهای ریز آرایه‌ها در پزشکی کاربوتایپ مولکولی به جای روش‌های زمان بر و دشوار سیتوژنتیکی است (۱۷).

**صنعت داروسازی:** کشف داروهای جدید، بررسی مکانیسم اثر دارو در سطح مولکولی، بررسی ناقلین دارو، تعیین تغییرات بیان ژن در پاسخ به داروها (تنظیم پایین یا تنظیم بالا)، تجزیه و تحلیل SNP بیماران و مقایسه پاسخ‌های دارویی از جمله یافتن همبستگی بین پاسخ درمانی به داروها و مشخصات ژنتیکی بیمار توسط SNP‌ها برای تعیین بهترین درمان برای آن فرد یکی از کاربردهای تکنیک‌های ریز آرایه در این زمینه است (۱۷).

**صنایع غذایی:** تشخیص عوامل بیماری‌زای غذایی، به‌ویژه کنترل کیفیت در آزمایشگاه‌ها و کارخانجات، یکی از مهم‌ترین کاربردها و فناوری‌های ریز آرایه‌ها در صنایع غذایی است، از این رو روش‌ها و فرآیندهای زیادی برای کمک به جلوگیری از فساد و ارتقای ایمنی

مواد غذایی ایجاد شده است. از جمله پرتودهی که با آسیب به DNA و یا RNA باکتری‌ها، کپک‌ها و حشرات باعث از بین رفتن آنها می‌شوند (۱۸).

**علوم کشاورزی:** تشخیص بیماری‌های گیاهی به منظور از بین بردن آن‌ها، تشخیص آفات و میکروارگانیسم‌های مضر را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های ذکر شده به راحتی انجام داد. ریزآرایه‌ها آنالیز هم‌زمان با توان بالای صدها و هزاران ژن را فراهم می‌کنند. این نوع آنالیز جامع، فرصتی را برای کشف مکانیسم‌های مولکولی که اساس بسیاری از فرآیندهای ژنتیکی گیاهان هستند، فراهم می‌کند. ریزآرایه‌ها برای شناسایی ژن‌های دخیل در تنظیم ریتم شبانه‌روزی، مکانیسم‌های دفاعی گیاه، پاسخ‌های استرس اکسیداتیو، رسیدگی میوه، سیگنال فیتوکروم، توسعه بذر و جذب نیترات به کار رفته‌اند و همچنان در حال توسعه می‌باشند. آرایه‌های بیان ژن به آسانی برای سنجش تفاوت‌های کیفی بین گیاهان در معرض خشکی و سمیت آلومینیوم به کار می‌روند. همچنین برای شناسایی ژن‌هایی که مسئول رسیدگی گوجه فرنگی بودند، استفاده شده است (۱۹).

### کاربرد فناوری ریزآرایه DNA در آسیب شناسی گیاهی

گونه‌های مختلف فوزاریوم، غلات را آلوده می‌کنند. برخی از این گونه‌ها قادر به تولید ترکیبات بسیار سمی مانند تریکوتسین (Trichothecene) می‌باشند. تشخیص دقیق گونه‌های فوزاریوم برای تعیین خطر استفاده از غلات آلوده به عنوان غذا برای انسان و حیوانات ضروری است. فناوری ریزآرایه DNA برای شناسایی گونه‌های مختلف فوزاریوم که قادر به تولید تریکوتسین هستند استفاده شده است (۲۰). از این تکنیک برای شناسایی گندم آلوده به گونه‌های فوزاریوم نیز استفاده شده است (۲۱). همچنین فناوری ریز آرایه DNA برای تشخیص دو قارچ بیماری‌زای *Botrytis cinerea* و *Didymella bryoniae* که در گلخانه‌ها شایع می‌باشند، استفاده شده است (۲۲).

نماتد شناسان ارزش و استفاده از فناوری ریزآرایه را برای بررسی اثرات جهش‌های ژن میزبان یا پاتوژن، نماتدهای سل و نماتدهای سیست بررسی کرده‌اند (۲۳). برای آنالیز ریزآرایه نیز، نمونه از بافت غده‌ای و محل‌های تغذیه نماتد به دست آمده است (۲۴). استفاده از فناوری ریزآرایه DNA در پایش ویروس‌های گیاهی، ویروئیدها و فیتوپلاسماها نیز مفید است. تشخیص آزمایشگاهی ویروس‌های گیاهی اغلب با روش‌هایی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۱۱۶</sup> (PCR) و سنجش ایمنوسوربنت متصل به آنزیم<sup>۱۱۷</sup> (ELISA) انجام می‌شود، اما این روش‌ها می‌توانند تنها یک یا تعداد کمی از عوامل بیماری‌زا را در هر واکنش شناسایی کنند. فناوری ریزآرایه DNA یک روش قابل اعتماد برای تشخیص هم‌زمان چند پاتوژن در بافت‌ها است. این فناوری برای نظارت بر ویروس‌های سیب زمینی (PVA، PVS، PVM) در آلودگی‌های مخلوط یا تکی استفاده شده است (۲۵).

### نتیجه گیری

همانطور که مشخص است، علم ژنتیک روز به روز در حال گسترش است و شاهد ظهور شاخه‌های جدیدی از این علم هستیم. فناوری ریزآرایه روشی کم‌هزینه، کارآمد و موثر بوده و می‌تواند در کشف راه‌حل‌های درمانی و همچنین در کاربرد تحقیقات بیماری‌ها و سایر علوم پیشرو باشد. از آنجایی که این فناوری یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین فناوری‌های امروزی است، در این تحقیق سعی شده است تا به اختصار، فناوری ریز آرایه، انواع و کاربردهای آن در سطوح مختلف مورد بررسی قرار بگیرد.

فناوری ریزآرایه DNA و پروتئین با آنالیز هم‌زمان هزاران ژن امکان شناسایی ژن‌ها و پروتئین‌های مفید را فراهم می‌کند و با انتقال آن‌ها به گیاهان و حیوانات مستعد، به بهبود وضعیت کمی و کیفی آنها کمک می‌کند و از سوی دیگر، سودجویانی که در حال حاضر از شرایط فعلی با تولید محصولات مختلف از مواد فاسد استفاده می‌کنند، این فناوری می‌تواند پروتئین و DNA میکروارگانیسم‌ها را در محصولات غذایی شناسایی کرده و مواد غذایی سالم و ناسالم را تشخیص داده و به سلامت و ایمنی جامعه کمک کند.

<sup>116</sup> Polymerase chain reaction

<sup>117</sup> Enzyme-linked immunosorbent assay

فناوری ریزآرایه‌های DNA جنبه‌های جدیدی از برهمکنش‌های گیاهان سالم و بیماری را آشکار کرده است و این پتانسیل را دارد که به ابزاری مهم برای طیف وسیعی از آزمایش‌ها در آسیب‌شناسی گیاهان تبدیل شود، اگرچه ریزآرایه‌های DNA به عنوان ابزاری برای استفاده معمول در آزمایشگاه‌ها پرهزینه هستند، اما از نظر تاریخی مشخص شده است که هزینه تجهیزات مولکولی با افزایش حجم فروش آنها به مرور زمان کاهش می‌یابد، بنابراین امیدواریم شاهد کاهش سریع هزینه‌ها در این فناوری باشیم و با تبدیل این فناوری به ابزاری روزمره در آزمایشگاه، رؤیای داشتن یک آزمایشگاه در یک تراشه DNA به حقیقت بپیوندد. بدون شک استفاده از فناوری ریزآرایه DNA در سال‌های آتی عصر جدیدی از دانش آسیب‌شناسی گیاهی را آغاز خواهد کرد.

## References:

1. Bariamis D, Maroulis D, Iakovidis DK. Automatic DNA microarray gridding based on Support Vector Machines. In 2008 8th IEEE International Conference on BioInformatics and BioEngineering 2008; 1-5.
2. Fakhri E, Motamed N, Habibi Rezaei M. Microarray Technology, Genetics in the Third Millennium. 2012; 9(3): 24-81.
3. Liew AW, Yan H, Yang M. Pattern recognition techniques for the emerging field of bioinformatics: A review. Pattern Recognition. 2005; 38(11): 2055-2073.
4. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. Science. 2002; 298(5602): 2345-2349.
5. Saeys Y, Inza I, Larranaga P. A review of feature selection techniques in bioinformatics. Bioinformatics. 2007; 23(19): 2507-2517.
6. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science. 1999; 286(5439): 531-537.
7. Clarke R, Renshaw HW, Wang A, Xuan J, Liu MC, et al. The properties of high-dimensional data spaces: implications for exploring gene and protein expression data. Nature reviews cancer. 2008; 8(1): 37-49.
8. Javanmard A, Hasanpoor K, Ekhtiyari MS, Sadr AS, Roudbari Z, et al. A novel overview of microarray technology; theoretical foundations, raw data structure, statistical analysis and interpretation of outputs, Breeding and Improvement of Livestock. 2022; 2(3): 5-30.
9. Park TJ, Lee MY, Dordick JS, Linhardt RJ. Signal amplification of target protein on heparin glycan microarray. Analytical biochemistry. 2008; 383(1): 116-121.
10. Yin BC, Li H, Ye BC. A dual-probe hybridization method for reducing variability in single nucleotide polymorphism analysis with oligonucleotide microarrays. Analytical biochemistry. 2008; 383(2): 270-278.
11. Cook SA, Rosenzweig A. DNA microarrays: implications for cardiovascular medicine. Circulation research. 2002; 91(7): 559-564.
12. Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. Clinical chemistry. 2002; 48(8): 1170-1177.
13. Botchkarev VA, Gdula MR, Mardaryev AN, Sharov AA, Fessing MY. Epigenetic regulation of gene expression in keratinocytes. Investigative Dermatology. 2012; 132(11): 2505-2521.
14. Yu X, Schneiderhan-Marra N, Joos TO. Protein microarrays for personalized medicine. Clinical chemistry. 2010; 56(3): 376-387.
15. Maskos U, Southern EM. Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised in situ. Nucleic acids research. 1992; 20(7): 1679-1684.

16. Angenendt P, Glökler J, Murphy D, Lehrach H, Cahill DJ. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Analytical biochemistry*. 2002; 309(2): 253-260.
17. Fazelinasab B, Amiri M. 2014. An overview of the use of modern gene array technology and protein systems in the food industry. 1<sup>st</sup> National e-Conference on novel Food Sciences. 1 July, Zahedan, Iran. 1-10.
18. Tauxe RV. Food safety and irradiation: protecting the public from foodborne infections. *Emerging infectious diseases*. 2001; 7(3): 516.
19. Wullschlegler SD, Difazio SP. Emerging use of gene expression microarrays in plant physiology. *Comparative and Functional Genomics*. 2003; 4(2): 216-24.
20. Nicolaisen M, Justesen AF, Thrane U, Skouboe P, Holmstrøm K. An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *Journal of Microbiological Methods*. 2005; 62(1): 57-69.
21. Pavlatova L, Novotny D, Hodek J, Chrpova J, Ovesna J. Utilization of DNA microarrays for detection and identification of selected *Fusarium* species from the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science*. 2011; 29: 93-101.
22. Koch CA, Li PC, Utkhede RS. Evaluation of thin films of agarose on glass for hybridization of DNA to identify plant pathogens with microarray technology. *Analytical biochemistry*. 2005; 342(1): 93-102.
23. Klink VP, Hosseini P, Matsye PD, Alkharouf NW, Matthews BF. Syncytium gene expression in *Glycine max* [PI 88788] roots undergoing a resistant reaction to the parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010; 48(2-3): 176-93.
24. Schaff JE, Nielsen DM, Smith CP, Scholl EH, Bird DM. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. *Plant physiology*. 2007; 144(2): 1079-1092.
25. Bystricka D, Lenz O, Mraz I, Piherova L, Kmoch S, et al. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. *Virological Methods*. 2005; 128(1-2): 176-182.

## تأثیر اشعه ایکس بر دسترسی زیستی مواد غذایی

طاهره میرشکاریان<sup>۱</sup>، محمد حجت الاسلامی<sup>۲\*</sup>، سیده فاطمه احمدی<sup>۳</sup>

۳۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳۲. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳۴. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، ادویه ای و عطری، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

تأمین احتیاجات غذایی برای جمعیت رو به فزاینده جهان از مهمترین مسائلی است که ذهن دانشمندان بخشهای مختلف، خصوصاً صنعت، کشاورزی و بهداشت را به خود مشغول کرده است. از طرف دیگر تأمین سلامت مواد غذایی شرط لازم برای تأمین سلامت جامعه و از شاخص های مهم توسعه می باشد. از این رو روش های نگهداری مواد غذایی مسئله مهم به شمار می آید. اشعه دهی مواد غذایی نوعی روش فیزیکی برای فرآوری محسوب می شود که شامل قراردادن ماده غذایی بسته بندی شده در برابر اشعه های گاما، اشعه X و الکترون می باشد. پرتو دهی اشعه ایکس به عنوان یک فرآیند سرد شناخته شده است و در اکثر مواد غذایی تغییرات فیزیکی یا مشخصات حسی به جا نمی گذارد. توجه به تنوع مواد غذایی و تنوع در روشهای نگهداری آنها، اشعه ایکس یکی از بهترین روشها در حال حاضر است. با فرآوری مواد غذایی به روش پرتو دهی و نگهداری محصولات با اشعه دهی ایکس در حد مطلوب، کیفیت مواد غذایی تا مدت زمانهای مختلف ثابت مانده و با کنترل میکروارگانیسمها عوامل فساد نیز کنترل میگردد. مواد غذایی عاری از وجود باکتریهای بیماریزا، مخمرها، کپکها و حشرات شده و رسیدگی، پیری و جوانه زنی میوه ها و سبزیها را کنترل میکند. ترکیبات شیمیایی مواد غذایی در جهت بهبود کیفیت مواد غذایی تغییر پیدا کرده و در نهایت بعد از اعمال پرتو هیچگونه سمی در مواد غذایی باقی نمی ماند. با توجه به مطالعات صورت گرفته استفاده از اشعه ایکس برای مواد غذایی باعث افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت و خواص زیستی مواد غذایی و محصولات کشاورزی می گردد.

**واژگان کلیدی:** پرتو دهی، دسترسی زیستی، ممانعت میکروبی، نگهداری مواد غذایی

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۸۸۳۱۹۱۸۶

پست الکترونیک: mohojjat@gmail.com



## The effect of X-rays on the bioavailability of food

Tahereh Mirshekariyan<sup>1</sup>, Mohammad Hojjatoleslami<sup>2,4\*</sup>, Seyedeh Fatemeh Ahmadi<sup>3,4</sup>

1. PhD student of Department of Food science and technology, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
4. Medicinal, spicy and aromatic plants Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

Providing food needs for the growing population of the world is one of the most important issues that have occupied the minds of scientists from different sectors, especially industry, agriculture and health. On the other hand, ensuring the health of food is a necessary condition for ensuring the health of society and one of the important indicators of development. Therefore, food storage methods are considered an important issue. Irradiation of food is a physical method for processing, which includes exposing packaged food to gamma rays, X-rays, and electrons. X-ray irradiation is known as a cold process and leaves no physical changes or sensory characteristics in most foods. Considering the variety of foods and the variety of their preservation methods, X-ray is one of the best methods at present. By processing food by irradiation method and keeping the products with X-ray radiation at optimum level, the quality of food remains stable for different periods of time and by controlling the microorganisms, spoilage factors are also controlled. Food is free from pathogenic bacteria, yeasts, molds and insects and controls the ripening, aging and germination of fruits and vegetables. The chemical composition of food has been changed in order to improve the quality of food, and finally, after the application of radiation, no poison remains in food. According to the studies, the use of X-rays for food increases the shelf life and preserves the quality and biological properties of food and agricultural products.

**Keywords:** irradiation, bioavailability, microbial inhibition, food preservation.

### مقدمه

پرتو دهی به عنوان یک روش نگهداری مواد غذایی نخستین بار در سال ۱۹۰۵ مطرح گردید. در این روش ماده غذایی با هدف از بین بردن با غیر فعال کردن میکروارگانیسم ها و حشرات تاخیر در رسیدن میوه جات و سبزیجات، ممانعت از جوانه زدن محصولات غده ای و ریشه ای و در مجموع افزایش زمان ماندگاری تحت شرایط محیطی خاص در معرض دوز معین اشعه یونیزه کننده (ذرات بتا، اشعه ایکس و اشعه گاما) قرار داده میشود. از آنجایی که روش های معمول سنتی و فراوری و نگهداری مواد غذایی مانند استفاده از نگهدارنده و افزودنی ها در صنایع غذایی یا فرایند های گرمایی مانند پاستوریزاسیون موجب از دست رفتن ارزش غذایی، تغییر ویژگی های حسی و اثرات منفی بر سلامت مصرف کننده می شود امروزه روش های فرایند و نگهداری غیرسنتی به سرعت در حال گسترش می باشد یکی از این روش ها پرتو دهی مواد غذایی می باشد (۱).

پرتو ایکس برای اولین بار در سال ۱۸۹۵ توسط فیزیکدان آلمانی بهنام ویلهلم رونتگن مورد مطالعه قرار گرفت. دلیل نامگذاری آن به ایکس به این امر بود که در آن موقع این پرتو بسیار ناشناخته و غیرمعمول به نظر می رسید و رونتگن با قرار دادن این پرتو در میدان مغناطیسی و الکتریکی شاهد عدم انحراف آن بود. اولین پرتو دهنده اشعه ایکس تجاری در پرتو دهی مواد غذایی در جولای ۲۰۰۰ در هاوایی آغاز به کار کرد و نخستین استفاده تجاری از پرتو دهی مواد غذایی در سال ۱۹۵۷ در آلمان روی داد که یک تولید کننده ادویه جات با پرتو دهی الکترون ها با استفاده از مواد الکترواستاتیکی، کیفیت بهداشتی محصول خود را بهبود بخشید. اشعه ایکس نوعی از تابش الکترومغناطیسی با طول موج حدود ۰/۰۱ تا ۱۰ نانومتر معادل با ۳۰ پیکومتر تا ۳۰۰ میکرومتر (انرژی بین ۱۰۰ الکترون ولت تا ۱۰۰ کیلو الکترون ولت است) و واحد آن Gray یا rad می باشد. اشعه یونیزه کننده طول موج کوتاه و انرژی بالاتری دارند به اندازه ای که منجر به تغییر اتم و جدا شدن یک الکترون از آن میشود و اتم را به یون تبدیل میکند ولی انرژی آن به اندازه ای نیست که اتم را

بشکافد و ایجاد رادیواکتیو کند. سطوح اشعه دهی مواد غذایی شامل ۱- Radurization (معادل بلانچینگ کردن) انرژی کم، کمتر از ۱ کیلوگری، جلوگیری از غده ها، استریلیزاسیون حشرات می باشد ۲- Radicidation (معادل پاستوریزاسیون) انرژی متوسط ۱ تا ۱۰ کیلوگری جهت از بین بردن پاتوژن های غذایی و از بین بردن حشرات و پارازیت ها ۳- Radappertization (معادل استریلیزاسیون) انرژی بالا، بیشتر از ۱۰ کیلوگری جهت از بین بردن تمام باکتری ها و کشتن ویروس ها می باشد (۲). از زمان ظهور اشعه ایکس دانشمندان مواد غذایی چشم انداز استفاده از پرتوهای یونیزه را برای حذف آفات، مهار جوانه زدن و افزایش ماندگاری محصولات غذایی ارزیابی کرده اند. چندین نهاد بین المللی مانند WHO و FAO تایید کردن که پرتو دهی مواد غذایی یک روش فراوری ایمن است و به این نتیجه رسیدند که قرار گرفتن غذا در معرض تابش یونیزان با قدرت کمتر از ۱۰ کیلوگری هیچ گونه سمیت تغذیه ای یا میکروبی ایجاد نمی کند (۱ و ۲).

پرتو دهی در واقع یک روش فیزیکی فراوری مواد غذایی است. ماده غذایی در یک محدوده زمانی مشخص در معرض اشعه یونیزه قرار می گیرد هدف از آن افزایش مدت زمان ماندگاری، بهبود ایمنی و میکروبی محصول است. پرتوهایی که برای حذف میکروارگانیسم ها استفاده می شود طول موج پایینی دارند زیرا چنین پرتوهایی با طول موج کمتر اثر تخریبی بیشتری بر میکروارگانیسم ها دارند. ترکیبات شیمیایی مواد غذایی در جهت بهبود کیفیت مواد غذایی تغییر پیدا کرده در نهایت بعد از اعمال پرتو هیچگونه سمی در مواد غذایی باقی نمی ماند. افزایش در پرتو دهی برای مواد غذایی ممکن است تاثیرات منفی روی آن داشته باشد و بهترین دوز برای مواد غذایی ۴ کیلوگری معرفی شده است. مزایای استفاده از پرتو دهی در صنایع غذایی شامل حفظ بهتر ارزش غذایی و کیفیت حسی مواد غذایی نسبت به سایر روش ها، عدم ایجاد آلودگی ثانویه به دلیل امکان استفاده از اشعه بعد از بسته بندی، باقی نماندن هیچ سمی در ماده غذایی، ثابت نگه داشتن کیفیت مواد غذایی به مدت طولانی، موثر در کنترل میکروارگانیسم های عامل فساد، عاری کردن مواد غذایی از وجود باکتری های بیماری زا، مخمرها، کپک ها و حشرات، کنترل رسیدگی، پیری و جوانه زنی میوه ها و سبزی های تازه می باشد. معایب استفاده از پرتو دهی در صنایع غذایی: بعضی از میوه ها و سبزی ها در معرض اشعه نرم شده و خصوصیات بافتی خود را از دست می دهند، چربی ها در اثر اشعه رادیکال های آزاد ایجاد می کنند که سبب اکسید و تند شدن چربی می شود، دوز بالای اشعه طعم های نامطلوب شدید تولید می کند، بعضی از مواد غذایی نسبت به پرتو حساسند، رنگ گوشت ممکن است در اثر پرتو دهی تغییر کند، دوز پایین اشعه تمام اسپورهای باکتریایی را تخریب نمی کند، یکی از معایب آشکار فرایند اشعه دهی در مقایسه با حرارت دهی عدم قابلیت آن در جلوگیری از فعالیت آنزیمی است. اثر پرتو دهی در صنایع غذایی شامل نابودی عوامل بیماری زا و حشرات، تغییرات خصوصیات کیفی مواد غذایی پرتو دهی شده، کنترل جوانه زنی، افزایش زمان نگهداری مواد فاسد شدنی و کنترل آفات است (۱).

پرتو های ایکس با انرژی ۷.۵ مگا الکترون ولت به دلیل قدرت آنها در مقایسه با سایر تابش های رادیوایزوتوپ و همچنین افزایش قدرت نفوذ نسبت به اشعه ایکس ۵ مگا ولت برای کاربرد های تجاری مناسب هستند. ساختار شیمیایی مواد غذایی پرتو دهی شده در برابر مواد غذایی بدون تابش تغییر چندانی نکرده و از استفاده از مواد شیمیایی مضر جلوگیری می کند. با توجه به تحقیقات انجام شده حداکثر دوز تابش مورد نیاز برای تابش ایمن گوشت مرغ خام ۳ کیلوگری است و چندین مطالعه نشان داد که جوجه های پرتو دهی شده با دوز ۷.۵ مگا الکترون ولت با اشعه ایکس هیچ سمیتی برای انسان نداشته است. بنابراین اثرات بیولوژیکی تابش ها رابطه مستقیمی با دوز آن دارد. در مطالعه انجام شده نشان داد که مصرف تقریباً ۲۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم پودر گوشت مرغ (۳۰ کیلوگری) به مدت ۹۰ روز روی موش های نر و ماده هیچ گونه سمیتی نداشت. علاوه بر این گوشت مرغ در نمونه های تابش شده با اشعه ایکس در ۳۰ کیلوگری با ۷.۵ مگا ولت مورد بررسی قرار گرفت نتایج هیچ گونه سمیتی را برای این نمونه ها نشان نداد. بنابراین محققان به این نتیجه رسیدند که افرادی که غذا های پرتو دهی شده با ۷.۵ مگا ولت پرتو ایکس حتی با گستره های از انرژی مصرف می کنند ناچیز خواهند بود. اشعه ایکس جایگزین خوبی برای پرتو های گاما در مواد غذایی در صنعت گرد و غبار است و هیچ منبع رادیواکتیو دیگری به جز تابش ندارد و علاوه بر این استفاده از اشعه ایکس ایمنی غذا را برای مصرف کننده نسبت به اشعه گاما تضمین می کند. اثر بخشی اشعه ایکس در کاهش تعداد مزوفیل کل نمونه های میگو در مقایسه با الکترون بیشتر است. تاثیر اشعه

ایکس و پرتو الکترونی بر کیفیت میکروبیولوژی گوشت چرخ کرده مرغ گزارش شده است بنابراین ضخامت، چگالی و سرعت فرایند مورد نیاز از عوامل موثر در انتخاب بین تابش الکترون و پرتو ایکس است. در سال های اخیر به دلیل هزینه بالای منابع کبالت ۶۰ و نگرانی های جدی مصرف کنندگان در مورد مواد رادیواکتیو اشعه ایکس گسترش زیادی یافته است. یکی دیگر از ویژگی های مهم اشعه ایکس کمک به بهبود انرژی است انرژی بالاتر دارای مزایای فنی مانند استفاده رضایت بخش از توان، کاهش مدت زمان تیمار و افزایش یکنواختی دوز و همچنین نتایج عملی مانند افزایش بازده تولید، هزینه کمتر و بهبود کیفیت محصول هستند (۳).

کرستینا روجاس آرگودو و همکاران (۲۰۱۲) تاثیر تابش اشعه ایکس بر ترکیبات مرکبات را مورد مطالعه قرار دادند و نتایج نشان داد که اثرات تابش بر ویتامین C به دوز تابش، تنوع و مرحله بلوغ بستگی دارد. کویونگ و همکاران به بررسی فیزیکی و خواص شیمیایی پودر فلفل قرمز در معرض اشعه ایکس نشان داد که تشعشع کمتر از ۱۰ کیلوگری هیچ تاثیر قابل توجهی بر روی محتوای دی هیدروکپسایسین در پودر فلفل قرمز نداشت. محمود و همکاران تاثیر اشعه ایکس را برای غیر فعال کردن باکتری های بیماری زا موجود در برگ های اسفناج مطالعه کردند و نشان دادند که دوزهای مختلف اشعه ایکس حتی در بالاترین میزان تاثیر قابل توجهی بر رنگ برگ های اسفناج نشان نمی دهد (۴). پارک و ها (۲۰۱۹) تابش اشعه ایکس ۰.۸ کیلوگری را در پنیر برش داده شده بر روی چندین باکتری از جمله اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم و لیستریا مونوسیتوزنز بررسی کردند بر اساس یافته های آنها کیفیت حسی نمونه ها هیچ تغییر قابل توجهی در محصولات پنیر برش خورده نداشت (۵). تحقیق انجام شده بر روی پرتقال نشان داد که تابش بر روی رنگ میوه ها اثر گذاشت ولی هیچ گونه تغییری در سطح اسید آسکوربیک، محتوای کاروتنوئید، اسیدیته و کل مواد جامد نشان نداد پس این مطالعه نشان داد که اشعه ایکس به طور قابل توجهی کیفیت مواد مغذی و شیمیایی را تغییر نداد تنها تغییرات جزئی در کیفیت حسی میوه های نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (۶). عملکرد اشعه ایکس را بر روی غیر فعال شدن باکتری های بیماری زا در ژامبون برش خورده آماده برای مصرف مطالعه شد، نتایج نشان داد که اشعه ایکس به طور بالقوه می تواند به عنوان فرایند غیرحرارتی جدید و موثر برای غیر فعال کردن پاتوژن های غذایی در غذا بدون تاثیر بر عوامل کیفیت مورد استفاده قرار گیرد. کانگ و همکاران تاثیر اشعه ایکس با دوز های مختلف بر کیفیت انگور قرمز امریکایی را ارزیابی کردند تابش تاثیر قابل توجهی بر سایر کیفیت فیزیکی و شیمیایی انگور (کاهش وزن، کل مواد جامد محلول، اسیدیته، پروتئین) نداشت. اثر دوزهای مختلف از اشعه ایکس را بر روی نورویروس ماهی قزل آلا و سالاد تن بررسی شد. نتایج کاهش لگاریتم را نشان داد بر این اساس اشعه ایکس می تواند به عنوان یک عامل ضد ویروس موثر در صنعت غذا های دریایی استفاده شود (۷).

اثر اشعه ایکس بر پروتئین گلوتن : اشعه ایکس به عنوان انتخاب بهینه برای پرتو درمانی در نظر گرفته می شود زیرا باعث ایجاد رادیواکتیویته القایی در محصولات غذایی نمی شود و قدرت نفوذ اشعه ایکس راهی عالی برای اصلاح درشت مولکول های غذا ایجاد می کند انرژی یونیزاسیون اشعه ایکس هنگام عبور از غذا کاهش می یابد این انرژی جذب شده توسط تشعشعات تأثیری بر درشت مولکول هایی مانند پروتئین ایجاد میکند که میتواند به حالت مطلوبی در غذا برسد و ممکن است رادیکال هایی مانند  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{H}\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$  در طول واکنش ها تشکیل شده باشد. رادیکال ها با امینو اسیدها پروتئین واکنش می دهند و باعث دکربوکسیلاسیون می شوند که باعث تولید امین و آلدئید می شود اسید امینه حاوی گوگرد و مواد معطر بیشتر در برابر تابش حساس هستند. تغییرات در خواص نوری و به دلیل اکسیداسیون اسید های امینه و تشکیل دimer ها با تغییرات غیر قابل برگشت در پروتئین ها مشاهده شد. انباشته شدن تعداد زیادی انرژی منجر به دناتوره شدن پروتئین میشود و در نتیجه تغییرات در ساختار های ثانویه و ثالث پروتئین ها ایجاد میکند اما بدون تغییر ارزش غذایی آنها. پروتئین گندم از گلیادین ها و گلوٹنین ها تشکیل می شوند این زیر واحد ها پروتئینی زیر واحد های عملکردی برای ویسکوزیته، الاستسیسته هستند خواص عملکردی مسیر های وابسته به پروتئین به ساختار پروتئین بستگی دارد تناوب در ساختار پروتئین ممکن است منجر به تغییر در عملکرد پروتئین مانند خواص امولسیون سازی، حلالیت پروتئین و خواص کف کنندگی شود. ظرفیت نگهداری آب میتواند با افزایش زمان قرار گرفتن در معرض اشعه ایکس با دوز های مختلف افزایش داد. افزایش تدریجی ممکن است به دلیل تابش باشد که منجر به دناتوره شدن پروتئین میشود. پروتئین منجر به باز شدن و قرار گرفتن در معرض گروه های آبدوست اسید امینه میشود. ظرفیت نگهداری آب خمیر یک

عامل اساسی در فراوری مواد غذایی، انواع محصولات نانوائی محسوب میشود. با افزایش زمان قرارگرفتن در معرض تابش، افزایش قابل توجهی در ظرفیت نگهداری روغن مشاهده شد این افزایش به دلیل قرار گرفتن در معرض نواحی آبرگیز بیشتر مرتبط با واکنش های اتصال عرضی مشاهده شد. ظرفیت جذب روغن یک پارامتر حیاتی در هنگام سرخ کردن و پختن رشته فرنگی و پاستا است. تابش منجر به دناتوره شدن و تجمع پروتئین میشود بنابراین میتوان اشاره کرد خواص امولسیون کنندگی پس از تابش به طور قابل توجهی تغییر کرده است. اثرات تابش اشعه ایکس بر کاهش خواص کف کنندگی را میتوان با تشعشعات یونیزه مرتبط دانست که حلالیت و ماهیت پروتئین را تغییر می دهد. تابش باعث تغییر در پروتئین ها میشود و ممکن است منجر به تغییر در خواص آن شود. کاهش معنی داری در درصد پروتئین در نمونه های تیمار شده با اشعه ایکس مشاهده شد تابش منجر به دناتوره شدن میشود که در آن پروتئین ها می توانند باز شوند و ساختار ممکن است بی ثبات شده باشد. افزایش حلالیت در آب بین نمونه های شاهد و تیمار شده مشاهده شد این افزایش ممکن است مربوط به تابش باشد زیرا پیوند های کووالانسی را از بین میبرد و ممکن است با پلیمریزاسیون و قرارگرفتن در معرض گروه های آبرگیز همراه باشد. پیوند های هیدروژنی ساختار ثانویه و سوم مولکول های پروتئین را تعیین میکند. پیوند های هیدروژنی اغلب نیروی محرکه اصلی تعیین کننده ترکیب و تجمع پروتئین های کروی نیستند اما نقش مهمی در تثبیت ساختارهای تشکیل شده ایفا می کنند. تابش نشان داد که گروه OH با افزایش دوز تابش حذف شده است و ممکن است ساختار ثانویه و سوم را تحت تاثیر قرار دهد و در نتیجه دناتوره شدن پروتئین رخ داده باشد. دناتوره شدن منجر به باز شدن و قرارگرفتن در معرض گروه های آبدوست و آبرگیز رخ می دهد و ممکن است ظرفیت نگهداری آب و روغن افزایش یافته باشد. واکنش بین پیوند های سیستین و سیستین دی سولفید تاثیر زیادی بر خواص عملکردی پروتئین دارد. با افزایش دوز تابش گروه های تیول حذف شدند و پیوند های دی سولفید در گلوئین بین مولکولی بر خاصیت ویسکوالاستیک پروتئین گلوئن گندم تاثیر می گذارد. بنابراین ناپدید شدن گروه تیول ممکن است بر خاصیت ویسکوالاستیک تاثیر بگذارد (۸).

تابش اشعه ایکس بر روی پنیر ریکوتا: محصولات لبنی تازه با ماندگاری کوتاه مشخص میشوند و محیط رشد عالی برای طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها هستند. ریکوتا تازه دارای رطوبت بالا، قند های باقیمانده و pH بالای ۶ است و در تولید نیازی به کشت اولیه ندارد در نتیجه ریکوتای تازه ماندگاری محدودی دارد و یک بستر عالی برای رشد میکروارگانیسم های فساد زا است که عمدتاً توسط سودوموناس، مخمرها، کپک ها، نشان داده میشوند. افزایش ماندگاری بیشتر پنیر های صنعتی عامل کلیدی برای بازار وسیع تر ریکوتا در سطح بین المللی است. فناوری های حرارتی مرسوم ممکن است باعث تغییرات منفی در ارزش غذایی، طعم و رنگ و بافت محصول نهایی شوند یا باعث ایجاد محصولات جانبی نامطلوب شوند که در نهایت ممکن است بر کیفیت و ایمنی غذا تاثیر بگذارند. امروزه مصرف کنندگان بیشتر غذا های سالم رو ترجیح می دهند بنابراین محققان را به سمت تکنیک های ضد عفونی غیر حرارتی مانند میدان الکتریکی پالسی، تابش، فشار هیدرواستاتیک بالا و غیره سوق می دهد. پرتو های گاما، الکترونی و اشعه ایکس نیز مکانسیم غیر حرارتی است که به طور خاص اشعه ایکس با پرتو های یونیزه کننده با منشا مکانیکی بدون هیچ گونه ماده رادیواکتیو در سیستم تولید میشود. این ویژگی این فناوری را برای تیمار غذا های بسته بندی شده از قبل مناسب می کند و از آلودگی مجدد محصول جلوگیری میکند و استفاده از اشعه ایکس هرگز نباید از دوز توصیه شده تجاوز کند. تحقیقات انجام شده توسط چانگ و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که تابش مواد غذایی نه تنها میکروارگانیسم های فاسد کننده را غیر فعال می کند بلکه عوامل بیماری زا در بخش لبنیات، ماهی و سبزیجات غیر فعال میکند برای نمونه های پرتو دهی شده تیمار اعمال شده اثرات میکروبی متفاوتی رو نشان داد. در گونه های سودوموناس با دوز ۲ و ۳ کیلوگری رشد به طور کامل توسط اشعه ایکس مهار شد. تکامل میکروبی نمونه های پرتو دهی شده در مقایسه با پنیر شاهد بدون تابش تفاوت معنی داری داشت. در نمونه های شاهد تعداد سلول های میکروبی می تواند ۱۰ Cfu تجاوز کند در حالی که در محصولات تیمار شده دوزهای بالاتر توانستند تعداد میکروبی را در طی ۲۴ روز بسیار پایین نگه دارند. این نتایج به خوبی توسط یک مطالعه قبلی Lacivita و همکاران (۲۰۱۹) که در آن اثرات اشعه ایکس بر روی پنیر ارزیابی شد پشتیبانی شد. تیمار پرتو دهی حتی در دوزهای پایین تاثیر زیادی بر تعداد کل مزوفیل داشت و پیشنهاد کردند که با تیمار ۲ کیلوگری میتوان به کنترل فساد کامل ریکوتا دست یافت. هیچ گونه تغییرات pH در نمونه های ریکوتای تیمار شده یافت نشد و

کاهش قابل توجهی pH شاهد پس از سه روز ثبت شد. نمونه های بدون تابش پس از ۶ روز نگهداری غیر قابل قبول شدند و پنیر تابش شده با ۰.۵ کیلوگری پس از ۱۴ روز و تیمار با دوز های بالاتر به مدت ۲۴ روز قابل قبول باقی ماند (۹). تکامل حسی میتواند به شدت با تکثیر میکروبی مرتبط باشد بنابراین تایید میکند که در نمونه های پنیر که رشد میکروبی در آن ها مهار شده بود ویژگی های حسی بیشتر مورد توجه قرار گرفت. ماندگاری محصولات غذایی به دلیل تکثیر میکروارگانیسم ناخواسته فساد و در نتیجه بدتر شدن کیفیت حسی به خطر می افتد. اشعه ایکس به طور قابل توجهی از فساد پنیر جلوگیری میکند اما از نظر حسی پس از ۱۴ روز برخی تغییرات رنگ نامطلوب بر روی محصول ظاهر شد و در نتیجه پایان عمر ماندگاری را تعیین کرد. ریکوتا تیمار شده با ۲ و ۳ کیلوگری ماندگاری ۸ برابر بیشتر از پنیر شاهد را ثبت کرد بنابراین تاثیر بزرگ دوز های بالای تابش اشعه ایکس بر کیفیت میکروبیولوژی و حسی را برای یک دوره نگهداری طولانی مدت نشان داد. اشعه ایکس با موفقیت بر روی ریکوتای صنعتی آزمایش شد و شدت ۲ کیلوگری برای بدست آوردن نتایج عالی کافی است (۱۰).

مهار جوانه زنی پیاز و سیب زمینی توسط اشعه ایکس: فناوری تابش برای مهار جوانه زنی از اوایل قرن بیستم استفاده شد و محدوده دوز تعیین شده برای مهار جوانه زنی پیاز و سیب زمینی به ترتیب ۲۰ تا ۱۵۰ گری و ۶۰ تا ۱۵۰ گری بود. اثر پرتو های الکترونی کم انرژی را بر مهار جوانه سیب زمینی بررسی شد و دریافتند که نفوذ الکترون های ۲۷۰ کیلو ولت یا بالاتر برای مهار جوانه در برخی از گونه های سیب زمینی کافی است پرتو های کم انرژی اشعه ایکس قدرت نفوذ بالاتری نسبت به پرتو های الکترونی کم انرژی دارند. در سال های اخیر تولید سیستم های پرتو ایکس فشرده، قابل اعتماد و مقرون به صرفه و قابل حمل و کم انرژی در حال انجام است و استفاده از آنها می تواند موثر باشد. قسمت پایین پیاز حاوی ساقه ای است که از آن ریشه ها در اطراف لبه بیرون می آیند و برای رشد پیاز ضروری است اگر این قسمت آسیب دیده باشد پیاز نمی تواند رشد کند در این آزمایش پیاز ها از جهت ریشه تابش شدند. جوانه زنی تقریباً به طور کامل در ۲۰ گری مهار شد و تابش دوز بالاتر در بیش از ۲۰ گری به طور کامل از جوانه زدن در طول ۵ ماه نگهداری جلوگیری کرد و برای پیاز های بزرگ نیز کافی است. هر غده سیب زمینی چندین جوانه در اطراف سطح خود دارد بنابراین کل سیب زمینی باید تحت تابش قرار بگیرد. تابش دوطرفه با محدوده دوز ۲۰ تا ۶۰ گری در عمق ۸ میلی متری انجام شد از انجایی که زمان تابش بیش از حد طولانی برای استفاده عملی مناسب نیست این آزمایش دوطرفه انجام شد. در نتیجه جوانه زدن در طول نگهداری ۵ ماهه به طور کامل سرکوب شد (۱۱).

اثر تابش بر روی گوشت: ترکیبات کربونیلی در بخش لیپیدی و کربونیل در اسید در بخش پروتئینی گوشت می باشد. افزایش دوز تابش این ترکیبات را افزایش می دهد اما پختن آنها را کاهش می دهد در بین اجزای فرار ۱ هپتون و ۱ نئون بیشتر تحت تاثیر دوز تابش قرار میگیرند. کاهش دما در طی فرایند تابش اثرات بو و طعم را کاهش می دهد زیرا باعث تولید رادیکال های آزاد و پراکندگی آن میشود. حداکثر دوز مجاز برای گوشت بستگی به نوع (مرغ در مقابل گوشت قرمز) سرد یا منجمد بودن آن دارد. حداکثر ۴.۵ کیلوگری برای گوشت قرمز نپخته و سرد مجاز است و ۳ کیلوگری برای مرغ تازه یا منجمد مجاز است. با این حال اثرات مضر پرتو دهی بر روی بو، طعم و رنگ موانع اصلی استفاده موثر از این فناوری برای افزایش عمر مفید و کاهش بارهای پاتوژن گوشت تازه است. به این صورت که تابش میتواند اکسیداسیون لیپید ها را آغاز کند اجزای پروتئین را تجزیه کند و به ویتامین ها، رنگ بو و طعم آسیب برساند. این احتمال وجود دارد که ترکیب اسید های چرب منحصر به فرد گونه های مختلف گوشت آنها را کم و بیش در برابر اکسیداسیون ناشی از تابش حساس کند. گوشت بوقلمون و مرغ حاوی مقادیر مشابهی اسید لینولئیک هستند که مقدار آن در گوشت خوک و ماهی آزاد و مرغ و گوشت گاو متفاوت است و این اسید های چرب غیر اشباع مواد اولیه اکسیداسیون لیپید هستند. اتوکسیداسیون اسید لینولئیک باعث تولید پنتان، پنتانال، هگزانال و هپتانال می کند که بوهای چمنی، ترشیدگی و چربی ایجاد کرده و همچنین مقدار کمتری آلدئید کربن تولید میکند که سهم نسبی این ترکیبات در بوی بد کاملاً متفاوت است. تا زمانی که سیستم های آنزیمی تغییر شکل ندهند گوشت خام دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی است. گوشت پخته شده به شدت در برابر اکسیداسیون حساس است زیرا گرما سیستم ها و اجزای تشکیل دهنده آنتی اکسیدان را تغییر می دهد و لیپید های غشا را در معرض آسیب قرار می دهد. آنتی اکسیدان ها می توانند پراکسیداسیون ناشی از تابش پرتو به گوشت خوک را به حداقل برساند و

افزودن اسید اسکوربیک به گوشت چرخ کرده قبل از تابش میتواند تولید ترکیبات حاوی گوگرد را کاهش دهد در برخی از مطالعات نشان داد که گنجاندن ویتامین در رژیم غذایی حیوانات در برابر اکسیداسیون لیپید هنگامی که گوشت در یک محیط حاوی اکسیژن نگهداری می شوند محافظت می کند. نام و همکاران گزارش کردند ویتامین E در رژیم غذایی گوشت تابیده شده و هوازی در برابر زوال اکسیداتیو محافظت میکند و این اثر حفاظتی وابسته به دوز بودند. ویتامین E در رژیم غذایی بوقلمون میتواند اکسیداسیون لیپید را در بوقلمون خام تحت تابش کنترل کند ولی برای کنترل اکسیداسیون در گوشت پخته شده تحت تابش در طول نگهداری کافی نیست. طبق تحقیق انجام شده تابش می تواند اکسیداسیون لیپید در مرغ پخته شده با بسته بندی هوازی را تسریع کند اما اثر آن را به اندازه بسته بندی معنی دار نبود. بسته بندی خلاء به طور کامل از لیپید ها در برابر اکسیداسیون محافظت می کند و تولید مواد فرار را به طور چشمگیری در نمونه های مرغ خام تابش شده و بدون تابش کاهش می دهد (۱۲).

ادویه جات و چاشنی ها به طور طبیعی با میکروارگانیسم ها به دلیل شرایط نامناسب برداشت و نگهداری آلوده میشوند و میتوانند با میکروارگانیسم های بیماری زا مانند کلرستیدیوم پرفرنس، باسیلوس سرئوس، سالمونا و کپک های سمی آلوده شوند. در گذشته از عملیات حرارتی برای از بین بردن حشرات و باکتری ها استفاده میشده که عملیات حرارتی برای محصولات خشک مناسب نیست. در نتیجه پرتو دهی با دوز ۵ تا ۱۰ کیلوگری میتواند بار میکروبی را بدون هیچ گونه تغییر شیمیایی یا ارگانولپتیکی نامطلوب در ادویه ها را کاهش دهد. پرتو دهی جهت ضد عفونی کردن در غلات، آرد ها و فراورده های تهیه شده از آن برای حشرات مورد استفاده قرار میگیرد. تابش در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ گری برای غیرفعال کردن حشرات در غلات موثر است. کپک غلات را میتوان با تابش اشعه با دوز کم از بین برد. دوز های بیشتر از ۱ کیلوگری بر کیفیت دانه غلات تاثیر میگذارد و ویسکوزیته آرد را کاهش می دهد (۱۳).

کاربرد پرتو دهی برای میوه ها و سبزیجات: فناوری پرتو دهی به مصرف کنندگان امکان دسترسی به طعم اصلی، مواد مغذی، ظاهر، بافت میوه ها و سبزیجات تازه را برای مدت طولانی می دهد. دوز های کمتر از ۱ کیلوگری برای ضد عفونی حشرات میوه ها و سبزیجات، به تاخیر انداختن رسیدن و پیری آنها و جلوگیری از جوانه زدن توصیه میشود و دوز های پاینتر (۰.۲-۰.۴) کیلوگری را میتوان جهت ماندگاری میوه ها استفاده کرد. دوز بهینه برای افزایش ماندگاری موز و چنار بین ۱۵۰ تا ۳۰۰ گری است. در تابش ۵۰۰ گری به دلیل افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز در پوست، پوست قهوه ای یا جوش خاکستری ایجاد میکند. تابش به انبه سبز با دوز ۱۵۰ تا ۷۵۰ گری میتواند رسیدن آن را به تاخیر بیندازد و دوز های بالاتر میتواند منجر به نرم شدن میوه، سوختن پوست و ایجاد حفره در گوشت کند (۱۴).

شیر و فراورده های آن جز مهمی در زنجیره غذایی هستند. میکروارگانیسم های بیماری زا در فراورده های لبنی را میتوان با پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون به طور موثر کاهش داد. پرتو دهی را میتوان یک فناوری جایگزین مورد بررسی قرار داد. ولی کاربرد عملی تابش در محصولات لبنی کم است. زیرا اکثر عوامل بیماری زا با روش پاستوریزاسیون از بین می روند برخی مطالعات طعم های نامطلوب را در محصولات لبنی تحت تابش گزارش میکنند. چندین مطالعه دیگر مناسب بودن استفاده از تابش برای حفظ کیفیت محصول لبنی مانند پنیر و بستنی را ارزیابی کردند. مطالعه انجام شده توسط اودوک نشان داد که انتروباکتریاسه که عامل اصلی فساد پنیر است. پرتو های ایکس ۲ و ۳ گری این گونه ها را غیر فعال کرده و عمر ماندگاری پنیر را برای بیش از ۴۰ روز افزایش میدهد در حالیکه پنیر تابش نشده حدود ۱۰ روز غیر قابل استفاده باقی می ماند (۱۵).

### نتیجه گیری

اگرچه پرتو دهی فرایندی پرهزینه است که نیاز به مدیریت مواد معدنی رادیواکتیو دارد اما مشخص شده است که شکل عملی فناوری برای تضمین ایمنی مواد غذایی است و همه غذا ها برای پرتو دهی مناسب نیستند برخی از مواد مغذی به عنوان مثال ویتامین ها تا حدی تحت تاثیر تابش مواد غذایی قرار می گیرند با این حال تابش گوشت در مقیاس وسیع مورد مطالعه قرار گرفته و کمبودهای تغذیه ای کمی گزارش شده است. اشعه ایکس یک فناوری غیر حرارتی است که کارایی خوبی در کاهش باکتری ها، ویروس ها و

انگل های بیماری زا و عامل فساد نشان داده است افزایش ماندگاری با تابش مواد غذایی نسبت به روش حرارتی برتری دارد و از نیاز به نگهدارنده های مصنوعی جلوگیری می کند. بنابراین ارزش غذایی آن حفظ می شود.

### پیشنهادات

اگرچه بسیاری از مطالعات نشان داده اند که مصرف غذاهای تحت تیمار با اشعه ایکس هیچ اثر مضر بر سلامت حیوانات یا کیفیت و ایمنی مواد غذایی ندارد ولی ما پیشنهاد میکنیم که مطالعات بیشتری در آینده انجام شود تا نگرانی های مصرف کننده در این مورد برطرف شود. همچنین پیشنهاد میشود تاثیر اشعه ایکس بر اکسیداسیون مواد غذایی و اثرات آن بر مواد معدنی و ویتامین های محلول در چربی نیز مورد توجه قرار گیرد.

### References:

1. Zhang H, Zhou W. Low-energy X-ray irradiation: A novel non-thermal microbial inactivation technology. *Adv. Food Nutr. Res.* 2022; 287–328.
2. Ehlermann DAE. The early history of food irradiation. *Radiat Phys Chem.* 2016; 129:10–12.
3. Grégoire O, Cleland MR, Mittendorfer J, Dababneh S, Ehlermann DAE, Fan X, et al. Radiological safety of food irradiation with high energy X-rays: theoretical expectations and experimental evidence. *Radiat Phys Chem.* 2003; 67(2): 169–183.
4. Rojas-Argudo C, Palou L, Bermejo A, Cano A, del Río MA, Carmen González-Mas M. Effect of X-ray irradiation on nutritional and antifungal bioactive compounds of ‘Clemenules’ clementine mandarins. *Postharvest Biol Technol.* 2012; 68: 47–53.
5. Park J-S, Ha J-W. X-ray irradiation inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on sliced cheese and its bactericidal mechanisms. *Int J Food Microbiol.* 2019; 289: 127–133.
6. Alanazi SF. Evaluating the effect of X ray irradiation in the control of food bacterial pathogens. *J King Saud Univ - Sci.* 2023; 35(1): 102367.
7. Zehi ZB, Afshari A, Noori SMA, Jannat B, Hashemi M. The Effects of X-Ray Irradiation on Safety and Nutritional Value of Food: A Systematic Review Article. *Curr Pharm Biotechnol.* 2020; 7: 21(10): 919–926.
8. Chandra D, Dabade A, Damgude G, Malhotra C. Effect of X-rays on structural, physicochemical and functional properties of gluten protein. *Brazilian J Food Technol.* 2021; 24. e2020074.
9. Lacivita V, Mentana A, Centonze D, Chiaravalle E, Zambrini VA, Conte A, et al. Study of X-Ray irradiation applied to fresh dairy cheese. *LWT.* 2019; 103: 186–191.
10. Ricciardi EF, Lacivita V, Conte A, Chiaravalle E, Zambrini AV, Del Nobile MA. X-ray irradiation as a valid technique to prolong food shelf life: The case of ricotta cheese. *Int Dairy J.* 2019; 99: 104547.
11. Avdyukhina VM, Bliznyuk UA, Borschegovskaya PY, Buslenko A V., Ilyushin AS, Kondratieva EG, et al. An Investigation of the Effects of X-Ray Treatment on the Concentration of Reducing Sugars in Potatos and Their Sprouting. *Moscow Univ Phys Bull.* 2018; 25: 73(3): 334–338.
12. Indiarito R, Irawan AN, Subroto E. Meat Irradiation: A Comprehensive Review of Its Impact on Food Quality and Safety. *Foods.* 2023; 12(9):1845.
13. Ameer K, Jo Y, Amir RM, Shahbaz HM, Kwon J-H. Screening and identification of electron-beam irradiated dried spice-mixture products by electronic sensing and standard analytical methods through dose estimation. *LWT.* 2020; 125: 108957.

14. Farkas J. Irradiation for better foods. Trends Food Sci Technol . 2006; 17(4): 148–152.
15. Odueke OB, Chadd SA, Baines RN, Farag KW, Jansson J. Effects of gamma irradiation on the shelf-life of a dairy-like product. Radiat Phys Chem. 2018; 143: 63–71.



## کاربرد های هوش مصنوعی در پژوهش های زیست فناوری و پزشکی

علی پورمقدم<sup>\*</sup>، شیرین کریمی<sup>۱</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده:

فن آوری هوش مصنوعی در زیست شناسی به ما این امکان را می دهند که داده ها را در مقیاس های بی سابقه جمع آوری کرده و داده ها را متصل و آنالیز کنیم. همچنین مدل های پیش بینی جامعی را نیز ایجاد کنیم که زیرشاخه های مختلفی را دربر می گیرد.

هوش مصنوعی در زیست شناسی یک فناوری مهم تلقی می شود که توانایی و قابلیت های ما را برای به انجام رساندن تحقیقات بیولوژیکی در هر مقیاسی افزایش می دهد. باید منتظر بود تا هوش مصنوعی در قرن حاضر زیست شناسی را متحول کند، درست مانند علم آمار که زیست شناسی را در قرن بیستم متحول کرد. با این حال، مشکلات بسیار زیادی در به کارگیری از هوش مصنوعی در زیست شناسی وجود دارد از جمله جمع آوری داده ها، توسعه علوم جدید در قالب نظریه هایی که زیرشاخه ها را به هم متصل می کنند و مدل های جدید هوش مصنوعی مانند مدل های پیش بینی و تفسیری که بیشتر از تکنیک های یادگیری ماشین و هوش مصنوعی موجود برای زیست شناسی و تحقیقات بیولوژیکی مناسب هستند. تلاش ها برای توسعه استفاده از هوش مصنوعی در زیست شناسی مستلزم همکاری های گسترده بین دانشمندان حوزه بیولوژیکی و محاسباتی است.

در حال حاضر استفاده گسترده از برنامه های کاربردی فناوری هوش مصنوعی، پیشرفت ها در این زمینه و تأثیرات بنیادین آن بر روی ابزارهای مبتنی بر فناوری از جمله دستگاه های یادگیری ماشین، رباتیک و غیره مورد توجه قرار گرفته است. هوش مصنوعی یکی از شناخته شده ترین فناوری های پیشرفته در دنیا است که به دلیل اهمیت آن در نشان دادن نوع رفتار هوش انسانی، مورد استقبال زیادی واقع شده است. بر این اساس تقریباً همه زمینه ها برای پیاده سازی و استفاده از سیستم های مبتنی بر هوش مصنوعی آماده و مهیا شده اند. این فناوری باعث می شود که هر دستگاه عملیاتی به اندازه کافی مجهز باشد تا رفتار انسان را با توانایی و درک خود در تصمیم گیری نشان دهد و بر این اساس مسائل را در مقابل ما قرار دهد. به دنبال تطبیق پذیری گسترده این فناوری پیشرفته بخش های مبتنی بر مراقبت های بهداشتی مرتبط با رشته های پزشکی و زیست شناسی نیز سعی در پیاده سازی و استفاده از هوش مصنوعی در توسعه فرآیندهای حوزه خود داشته اند. زیست شناسی موضوع گسترده ای است و بنابراین امکانات بی شماری برای کاربرد هوش مصنوعی دارد.

**واژگان کلیدی:** هوش مصنوعی، بیوتکنولوژی، زیست فناوری، دستگاه عملیاتی

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

پست الکترونیکی: [apm.ka17@gmail.com](mailto:apm.ka17@gmail.com)

## Applications of artificial intelligence in biotechnology and medical research

Alipour Moghadam<sup>1\*</sup>, Shirin Karimi<sup>1</sup>

1. Master student in genetics, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

The advancements in artificial intelligence technologies in biology empower us to collect unprecedented amounts of data and analyze and connect the data at unprecedented scales. It also enables the creation of comprehensive predictive models that encompass various subfields. Artificial intelligence in biology is considered a crucial technology that enhances our capabilities for conducting biological research at any scale. Expectations are high for artificial intelligence to transform biology in the current century, similar to how statistics transformed biology in the twentieth century. However, there are numerous challenges in deploying artificial intelligence in biology, including data collection, the development of new theories connecting subfields, and the creation of new artificial intelligence models such as predictive and interpretive models that are more suitable for biology and biological research than existing machine learning and artificial intelligence techniques. Efforts to incorporate artificial intelligence in to biology require extensive collaboration between researchers in the biological and computational domains. Currently, the widespread use of artificial intelligence applications, progress in this field, and its fundamental impacts on technology based tools such as machine learning devices, robotics, etc., have gained attention. Artificial intelligence is one of the most recognized advanced technologies globally, highly acclaimed for demonstrating human-like intelligence behavior. As a result, almost all domains are prepared to implement and utilize artificial intelligence systems. This technology enables operational devices to exhibit human-like behavior with their decision-making capabilities and understanding, presenting challenges and solutions in front of us. Following the broad adaptability of this advanced technology, healthcare-related sectors in the fields of medicine and biology have also attempted to implement and use artificial intelligence in the development of their processes. The expansive scope of biology offers numerous possibilities for the application of artificial intelligence.

**Keywords:** artificial intelligence, biotechnology, biotechnology, operating device, 1

### مقدمه

به طور کلی توسعه دیجیتال در امر بهبود عملکرد شرکت های دانش بنیان برای تحول در حوزه هوش مصنوعی مهم است. در ادامه با تفسیر و توضیح موارد و ارتباط های مشترک این دو حوزه در توسعه امر بیوتکنولوژی دستاورد های نو و در حال توسعه را نیز تشریح میکنیم (۱). پیشرفت های آینده در این حوزه به شدت به توانایی محققان بیوتکنولوژی برای استفاده از راه حل های پیشرفته هوش مصنوعی به طور موثر بستگی دارد. صنعت بیوتکنولوژی در حال حاضر به شدت به ذخیره سازی داده ها، فیلتر کردن، تجزیه و تحلیل و به اشتراک گذاری متکی است (۲). شرکت های بیوتکنولوژی و سازمان های مختلف مراقبت های بهداشتی در سراسر جهان در حال حاضر پایگاه داده های عظیمی را حفظ میکنند و مواردی مثل تولید دارو، تجزیه و تحلیل داده ها، توالی یابی ژنومی و ساختار و ترکیبات شیمیایی آن ها، حوزه بیوانفورماتیک از جمله این موارد است (۳). مثلاً هوش مصنوعی در کشاورزی می تواند یک راه حل برای امنیت غذایی با تطبیق مدیریت کشاورزی با تغییر آب و هوا ارائه دهد. و یا تشخیص فنوتیپ های جدید جهت ایجاد مقاومت های گیاهی در برابر آفت و شرایط آب و هوایی، این شامل شناسایی محصولات مقاوم است که در برابر تغییرات زیست محیطی و

افراطی مانند دوره های خشکسالی مقاوم تر هستند (۴). شناسایی و تجزیه و تحلیل دارویی جهت کاربردهای مختلف انسانی از جمله موارد مرتبط با این صنعت می باشد (۵). موارد دیگر مثل تصویر برداری های پزشکی و توسعه آنها از جمله موارد موثر بودن هوش مصنوعی و ربات در حوزه های پزشکی است به طور کلی در این مقاله چندین تکنولوژی و چالش های موجود در آن در حوزه زیست فناوری بررسی می شود.

#### هوش مصنوعی در بیوانفورماتیک

در حوزه فناوری رشد گیاه و شناسایی ریزترکیبات شیمیایی جهت هرچه بهره وری بهتر و جذب کم تر آفات و ترکیبات شیمیایی ناموثر مواردی هست که میتواند در حوزه هوش مصنوعی در کشاورزی مفید باشد و ارتباط با حوزه بیوانفورماتیک در این امر بسیار موثر است (۶). مثلا پرورش برای محصولات بهبود یافته از طریق انتخاب ریزومیکروبیوم خاک است که در آن یک رویکرد ترکیبی با هوش مصنوعی در بیوانفورماتیک می تواند تشخیص ژنوتیپ ها را با بهبود مقاومت زیستی و یا غیرزیستی انجام دهد (۷). در نهایت تشخیص رویکرد عملگر زیستی و مطابقت با سیستم های تشخیصی در افزایش بهره وری و تولیدات موثر و انبوه بسیار مهم و تاثیر گزار است.

#### هوش مصنوعی در کشاورزی

شناسایی پارامترهای سلامت خاک معمولا یک تلاش زمان بر و هزینه بر است. بنابراین، شناسایی متغیرهای کلیدی خاک در توابع سلامت خاک برای نظارت در مقیاس بزرگتر برای تعریف طرح های نظارت موثر اهمیت بالایی دارد. داده های آزمایشگاهی و همچنین دستگاه های دستی کم هزینه می توانند برای آموزش الگوریتم ها برای شناسایی سلامت خاک یا پتانسیل های بهبود استفاده شوند (۸). جفت کردن مدل های موجود برای چرخه مواد مغذی و بهره وری محصول با رویکردهای نانوانفورماتیک برای بهینه سازی هدف گیری، جذب، تحویل، جذب مواد مغذی و اثرات طولانی مدت بر جوامع میکروبی خاک، طراحی مواد شیمیایی کشاورزی در مقیاس نانو را امکان پذیر می کند که ترکیبی از پروفایل های ایمنی و عملکرد مطلوب است (۹).

#### هوش مصنوعی در تکنولوژی پزشکی

- تصویر برداری پزشکی:

با تجزیه و تحلیل داده های خروجی از تصویر های گرفته شده توسط مراکز تصویربرداری جهت شناسایی ناهنجاری ها و مشکلات ناشی از آن میتوان الگوریتمی را دریافت و توسط آن به مرحله تشخیص برسیم، الگوریتم دی ال در این مورد و در جهت طبقه بندی و تقسیم داده ها کمک دهنده است .

- غربالگری دارویی:

همچنین با تجزیه داده های خروجی از اثر داروهای با اثرات جانبی مخدر و استفاده از الگوریتم های موثر بر آن و استفاده از آن مثل الگوریتم ام ال میتوان احتمالات موثر در فرایند مصرف دارو را بر بدن فرد مورد نظر پیش بینی و در راستای آن از اثرات مخرب آن پیشگیری نمود و یا در مواردی با شناسایی ژنومی و تعامل پروتئین با پروتئین داده ها در جهت شناسایی ویژگی های ساختاری و در ادامه شناسایی نوع عملکرد آن در تشخیص جامعه هدف آن دارو اقدام نمود (۱۰).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

### بهبود عملکرد پزشکی با هوش مصنوعی

وانگ و همکاران آن طی پروسه ای که راجب عملکرد هوش مصنوعی در کاهش خطاها انجام دادند به نتایجی رسیدند که از جمله آن میتوان به کاهش خطاها در کولونوسکوپی اشاره نمود که متوجه شدند با عملکرد هوش مصنوعی در انجام این آزمایش قابلیت تشخیص پولیپ های بیشتری است و به میزان ۲۰ درصد افزایش داشتند. حتی با کشف پولیپ هایی که در معاینه های اولیه قابل پیش بینی نیستند، پیگیر و پیدا خواهند شد و در عملکرد بهتر و پیش گیری های ناشی از آن موثر است و یا در بخش تصویربرداری پزشکی با افزایش راندمان اشعاع و ایجاد تصویر های بیشتر و با کیفیت در بهبود عملکرد تصویربرداری موثر هستند (۱۱).

مثال خوب دیگری از افزایش بهره وری، سیستم تشخیص بیماری چشمی مجهز به هوش مصنوعی برای دژنراسیون ماکولا و ادم ماکولا دیابتی از طریق یادگیری انتقالی است که با همکاری دانشگاه ایالتی سن دیگو و دانشکده پزشکی دانشگاه گوانگژو چین توسعه یافته است این سیستم هوش مصنوعی می تواند فرآیند تشخیص بیماری و مرحله توسعه آن را تنها در ۳۰ ثانیه تکمیل کند. همچنین میزان دقت تشخیص در مقایسه با تشخیص جمعی پنج چشم پزشک متخصص بالای ۹۵ درصد بود. این مثالها به وضوح نشان می دهند که سیستم های مبتنی بر هوش مصنوعی می توانند بهره وری را با کاهش نسبت خطا، صرفه جویی در زمان تشخیص و درمان، و بررسی فرصت هایی برای گسترش خدمات مراقبتی که در گذشته امکان پذیر نبود، بهبود بخشند (۱۲).

### فرصت ها و چالش های هوش مصنوعی در مراقبت های بهداشتی

داوز و همکاران با گزارشی که چگونه میتوان بیماران مبتلا به فشار خون بالا و بیماری ریوی را با داده های دقیق تری حرکت قلب مبتنی بر تصویربرداری رزونانس مغناطیسی با پشتیبانی از هوش مصنوعی درمان کرد. در همین راستا، ۳ بلیون الگوریتمی برای تشخیص بیماری های نادر مبتنی بر DNA در سال ۲۰۱۹ توسعه داد. گوو و لی گزارش کردند که فناوری های بر هوش مصنوعی می توانند خدمات مراقبت از بیمار را در جوامع کشاورزی روستایی در اقتصادهای در حال توسعه تا حد زیادی بهبود بخشند (۱۳).

از دیگر چالش های مرتبط با این ارتباط هوش مصنوعی و صنعت در زیست و فناوری و در پزشکی حذف برخی از شغل ها و تخصص هاست، مثلا بسیاری بر این باورند که رادیولوژی یک تخصص پزشکی است که ممکن است در آینده ناپدید شود زیرا هوش مصنوعی قادر خواهد بود تصاویر پزشکی تشخیصی را با دقت بیشتری نسبت به انسان تجزیه و تحلیل کند. با این حال، استدلال می شود که معرفی هوش مصنوعی به رادیولوژیست ها اجازه می دهد تا خدمات تشخیصی تخصصی تری را به بیماران ارائه دهند با این حال، مسلم است که فناوری های مرتبط با هوش مصنوعی بسیاری از مشاغل تکراری را منسوخ خواهند کرد. در حالی که برخی از مشاغل از بین خواهند رفت، بسیاری از مشاغل جدید برای پشتیبانی از پیاده سازی سیستم ها و دستگاه های مبتنی بر هوش مصنوعی ایجاد خواهند شد (۱۴).

از نظر تاریخی، مهم ترین نتایج به دست آمده در حوزه بیوتکنولوژی توسط آزمایش های آزمایشگاهی به دست آمده است که در بسیاری از موارد، از مقادیر نسبتاً محدودی از داده ها استفاده می کنند. نتایج تاریخی و شناخته شده در این زمینه، از اکتشافات پاستور در مورد فرآیند تخمیر گرفته تا کشف پنی سیلین توسط فلمینگ، با انجام و تجزیه و تحلیل آزمایش های آزمایشگاهی به دست آمد که در مقایسه با آزمایش های بزرگ امروزی، داده های رقت باری را تولید کرد. این توانایی برای کار با مقادیر کمی از داده های خصوصی عمدتاً در دهه های آخر قرن بیستم صادق بود. تا آن زمان، کاملاً منطقی بود که فرض کنیم تحقیقات بیوتکنولوژی قابل توجهی را

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

می‌توان بدون استفاده از داده‌های شخص ثالث تولید شده از آزمایش‌های در مقیاس بزرگ انجام داد (۱۵). با این حال، با توالی‌یابی ژنوم انسان و خروجی حاصل از داده‌های تولید شده توسط توالی‌یابی، پروتئومیکس و سایر فناوری‌های ابزار دقیق، دستیابی به پیشرفت‌های قابل توجه در این زمینه بدون استفاده از رویکردهای مبتنی بر داده‌های بزرگ به سرعت غیرممکن شد استخراج داده‌های موجود و در برخی موارد، داده‌های در دسترس عموم، به یکی از پایه‌های اصلی تحقیقات بیوتکنولوژی تبدیل شده است. با این حال، هر محقق در این زمینه با ابزارهای زیادی که اکنون برای کشف مقادیر گسترده دانش پراکنده در هزاران پایگاه داده موجود در دسترس است، آشنا نیست. بینش‌های جدید مهم را می‌توان با یکپارچه‌سازی، کاوش و بهره‌برداری از اطلاعات جمع‌آوری کرد (۱۶).

### مباحثی کاربردی و آینده‌دار در حوزه هوش مصنوعی و فناوری زیستی

چندین موضوع داغ در زمینه هوش مصنوعی و بیوتکنولوژی وجود دارد که در حال حاضر به طور فعال در حال تحقیق هستند و احتمالاً در آینده نیز حوزه‌های مورد توجه قرار خواهند گرفت:

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

این موارد در بیوتکنولوژی اهمیت فزاینده‌ای پیدا می‌کنند، زیرا می‌توان از آنها برای تجزیه و تحلیل مجموعه داده‌های بزرگ و پیش‌بینی سیستم‌های پیچیده بیولوژیکی استفاده کرد. این شامل استفاده از تکنیک‌های هوش برای تجزیه و تحلیل داده‌های ژنومی، داده‌های پروتئومی مصنوعی و بسیاری دیگر از انواع داده‌های بیولوژیکی برای درک بهتر و مکانیسم‌های زمینه‌ای بیماری‌ها و شناسایی اهداف بالقوه درمانی است

#### کشف و توسعه دارو

- هوش مصنوعی می‌تواند برای تجزیه و تحلیل مقادیر زیادی از داده‌ها برای شناسایی الگوها و روابطی که ممکن است برای انسان آشکار نباشد استفاده شود. این می‌تواند برای کمک به شناسایی داروهای جدید و اهداف دارویی و همچنین بهینه‌سازی درمان‌های موجود استفاده شود

#### پزشکی شخصی

هوش مصنوعی می‌تواند برای تجزیه و تحلیل داده‌های ژنومی یک فرد و سایر انواع داده‌های سلامتی برای توسعه برنامه‌های درمانی شخصی‌شده که متناسب با نیازهای خاص آن‌ها است، استفاده شود. این شامل استفاده از الگوریتم‌های یادگیری ماشین برای پیش‌بینی پاسخ فرد به یک درمان خاص و شناسایی واکنش‌های نامطلوب بالقوه است

#### تشخیص و پیش‌بینی بیماری:

هوش مصنوعی می‌تواند برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از منابع مختلف، مانند سوابق الکترونیکی سلامت و دستگاه‌های پوشیدنی، برای شناسایی الگوها و همبستگی‌هایی که ممکن است وجود یک بیماری خاص را نشان دهد، استفاده شود. این می‌تواند به بهبود دقت تشخیص‌ها و امکان مداخلات اولیه برای جلوگیری از پیشرفت بیماری‌ها کمک کند

تجزیه و تحلیل تصویر زیست پزشکی:

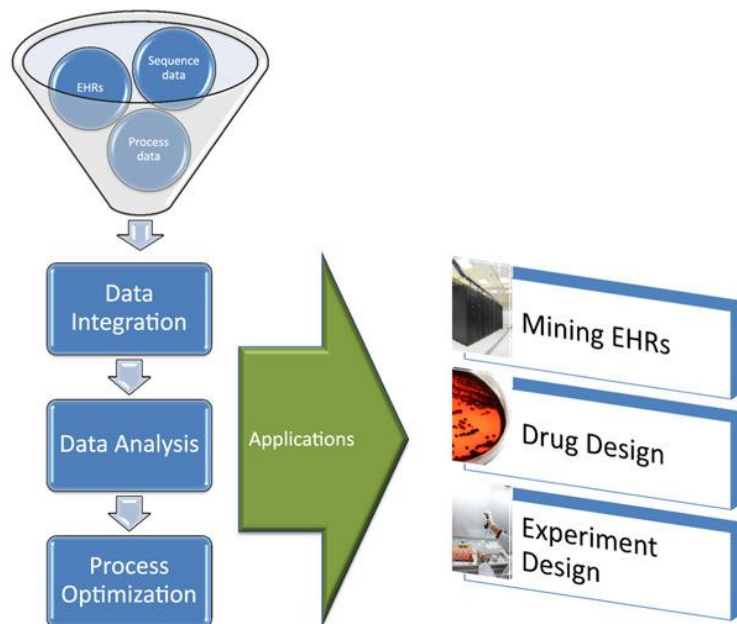
هوش مصنوعی می تواند برای تجزیه و تحلیل تصاویر پزشکی، مانند سی تی اسکن و تصاویر MRI برای شناسایی ناهنجاری ها و تشخیص بیماری ها استفاده شود. این شامل استفاده از الگوریتم های یادگیری عمیق برای تقسیم و طبقه بندی خودکار ساختارها در تصاویر پزشکی است (۱۷).

### نتیجه گیری:

هوش مصنوعی یک اصطلاح بسیار گسترده است که امروزه به طور کلی و عملی برای هر چیزی که در آن هر سیستم پردازش اطلاعات دیجیتال هر داده ای را پردازش می کند استفاده می شود. بنابراین، دیجیتالی شدن و تحول دیجیتال در آغاز هر کاربرد هوش مصنوعی نقش اساسی دارند. این دقیقاً در دسترس بودن حجم داده های بزرگ و با کیفیت بالا و افزایش سریع قدرت محاسباتی است که از عوامل تعیین کننده بوده و خواهد بود. اینها در آینده نیز نیروهای محرکه هوش مصنوعی خواهند بود. ما هنوز در میانه این روند توسعه هستیم و در حال حاضر هیچ پایانی در چشم نیست.

هوش مصنوعی و یادگیری ماشینی در تمام تحقیقات بیوتکنولوژی آتی نقش اساسی خواهند داشت. تعداد بیشتری از محققان در بیوتکنولوژی باید از روش های مورد نیاز برای مقابله با حجم زیادی از داده ها آگاه شوند و افرادی را که توانایی ادغام، سازمان دهی و کاوش این داده ها را دارند، در تیم های تحقیقاتی خود بگنجانند. محققان متخصص در بیوانفورماتیک به یک عنصر کلیدی در هر تیم تحقیقاتی بیوتکنولوژی تبدیل خواهند شد، اما در بسیاری از موارد، شناسایی فرصت ها به آگاهی خود محققان بیوتکنولوژی در مورد این موضوع بستگی دارد. هدف این مقاله مروری بالا بردن این آگاهی و از این طریق کمک به توسعه این حوزه از علم است.

و در آخر کاربردی کلی و راهبردی در شکل ۱، در زمینه ارتباط هوش مصنوعی و زیست فناوری نمایش داده شده است



شکل ۱- ارتباط هوش مصنوعی و زیست فناوری

## References:

1. L. David, A. Thakkar, R. Mercado, et al. Molecular representations in AI-driven drug discovery. a review and practical guide *J Chemin* 2020 ; 1(12) :1-22.
2. A. Holzinger, M. Kickmeier-Rust, H. Müller. Kandinsky patterns as IQ-test for machine learning *Lecture Notes in Computer Science LNCS 11713*. Springer/Nature, Cham 2019: 1-14.
3. T.M. Fenning, J. Gershenson .Where will the wood come from? Plantation forests and the role of biotechnology *TRENDS Biotechnol* 2002; 20(7) : 291-296.
4. M.T. Scholten, I. De Boer, B. Gremmen, C. Lokhorst Livestock farming with care: towards sustainable production of animal-source food *NJAS: Wagening J Life Sci* (2013);66(1): 3-5.
5. P.S. Reel, S. Reel, E. Pearson, E. Trucco, E. Jefferson .Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: a review *Biotechnol Adv*2021; Article 107739, 10.1016/j.biotechadv.2021.107739.
6. J. Jung, M. Maeda, A. Chang, M. Bhandari, A. Ashapure, J. Landivar-Bowles. The potential of remote sensing and artificial intelligence as tools to improve the resilience of agriculture production systems. *Curr Opin Biotechnol*, 2021;70: 15-22.
7. M. Hesami, A.M.P. Jones. Application of artificial intelligence models and optimization algorithms in plant cell and tissue culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020;104: 9449-9485.
8. M. Tester, P. Langridge. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 2010; 327 (5967) : 818-822.
9. R.C. Wilhelm, H.M. van Es, D.H. Buckley. Predicting measures of soil health using the microbiome and supervised machine learning. *Soil Biol Biochem* 2022;16: Article 108472.
10. M. Janisch, G. Adelsmayr, H. Müller, et al. Non-contrast-enhanced CT texture analysis of primary and metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas: value in assessment of histopathological grade and differences between primary and metastatic lesions. *Abdom Radiol* 2022;1-9
- 11: Wang, P.; Berzin, T.; Brown, J.; Bharadwaj, S.; Becq, A.; Xiao, X.; Liu, P.; Li, L.; Song, Y.; Zhang, D.; et al. Real-time Automatic Detection System Increases Colonoscopic Polyp and Adenoma
- 12: Tobiano, G.; Bucknall, T.; Marshall, A.; Guinane, J.; Chaboyer, W. Patients' Perceptions of Participation in Nursing Care on Medical Wards. *Scand. J. Caring Sci.* 2016;30: 260–270
- 13: Kermany, D.; Goldbaum, M.; Cai, W.; Lewis, M.; Xia, H.; Zhang, K. Identifying Medical Diagnoses and Treatable Diseases by Mage-based Deep Learning 2018;172:1122–1131.

14: Wang, P.; Berzin, T.; Brown, J.; Bharadwaj, et al. Real-time Automatic Detection System Increases Colonoscopic Polyp and Adenoma Detection Rates: A Prospective Randomised Controlled Study. *BMJ J.* 2019;68:1813–1819.

15: alanica, A.; Flaschner, P.; Thommandram, A.; Li, M.; Fossat, Y. Physicians' Perceptions of Chatbots in Health Care: Cross-sectional Web-based Survey. *J. Med Internet Res.* 2019; 21.

16. B. Shahriari, K. Swersky, Z. Wang, R.P. Adams, N. de Freitas. Taking the human out of the loop: a review of bayesian optimization. *Proc IEEE*, 2016; 104 (1) : 148-175.

17. J. McCarthy, M.L. Minsky, N. Rochester, C.E. Shannon. A proposal for the dartmouth summer research project on artificial intelligence, August 31, 1955. *AI Mag* 2006; , 27 (4) : 12-14.



## کاربرد سلول‌های بنیادی در درمان آلزایمر

### افروز یزدانی<sup>۱</sup>، سمیه تیربخش گوران<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. دانش آموخته دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشکده پرستاری، واحد خوراسگان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

### چکیده

بیماری آلزایمر (AD) یک بیماری تخریب کننده عصبی است که با مرگ سلول‌های عصبی، کوچک شدن بافت مغز و اختلالات پیشرونده شناختی، حرکتی و رفتاری همراه است و اغلب منجر به مرگ می‌شود. درمان فعلی کیفیت زندگی بیمار را بهبود می‌بخشد، اما نتوانسته آسیب شناسی بیماری زمینه‌ای AD را تغییر دهد. ویژگی‌های بافت شناسی کلاسیک AD شامل تشکیل خارج سلولی پلاک‌های  $\beta$ -آمیلوئید ( $A\beta$ )، گره‌های نوروفیبریلاری داخل سلولی (NFT) و از دست دادن سیناپسی است. سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که توانایی تولید انواع مختلف سلول‌ها را در بدن دارند. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های عصبی و گلیال با موفقیت از سلول‌های بنیادی مختلف تمایز می‌یابند. سلول‌های بنیادی پیوندی ممکن است علائم AD را با تنظیم عملکرد میکروگلیال، بهبود بخشند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) گروهی از سلول‌های بنیادی چندتوان، توانایی تحریک بازسازی عصبی و پتانسیلی برای درمان بیماران AD دارند. در مطالعات اخیر وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده با سیتوکین نیز نشان داده که اثرات تعدیل کننده ایمنی و محافظت عصبی را در مدل‌های AD القاء می‌کنند. این بیماری با کاهش رشد نورون و اتصالات سیناپسی پس از رسوب پروتئین بتا آمیلوئید مشخص می‌شود.

### واژگان کلیدی: آلزایمر، سلول‌های بنیادی، پروتئین تاو، بتا آمیلوئید

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۱۸۸۴۵۹۷۰۴

تلفن: ۰۳۱۳۳۳۴۵۶۷۴

پست الکترونیک: somayetirbakhsh@gmail.com

## Use of stem cells in Alzheimer's treatment

Afroz Yazdani<sup>1</sup>, Somaye Tirbakhsh Gouran<sup>2\*</sup>

1. Master's student, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. PhD in Molecular Genetics, Faculty of Nursing, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

### Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that is associated with neuronal cell death, shrinkage of brain tissue, and progressive cognitive, motor, and behavioral disorders, which often leads to death. Current treatment improves the patient's quality of life, but it has not been able to alter the underlying disease pathology of AD. The classic histological features of AD include extracellular formation of  $\beta$ -amyloid plaques ( $A\beta$ ), intracellular neurofibrillary tangles (NFT), and synaptic loss. Stem cells are undifferentiated cells that have the ability to produce many different types of cells in the body. Studies have shown that neural and glial cells are successfully differentiated from various stem cells. Transplanted stem cells might ameliorate AD symptoms by regulating microglial functions. That mesenchymal stem cells (MSCs)-a group of multipotent stem cells-have the ability to stimulate neuroregeneration and, hold potential for treating AD patients. in recently studies, extracellular vesicle (EVs) from cytokine-preconditioned MSCs have also shown to induce immunomodulatory and neuroprotective effects in AD models This disease is characterized by the reduction of neuron development and synaptic connections after the deposition of amyloid beta protein.

**Keywords:** Alzheimer's, stem cells, tau protein, beta amyloid.

### مقدمه

بیماری آلزایمر (AD) رایج ترین بیماری نورودژنراتیو وخیم (ND) است (۱). AD یکی از شایع ترین بیماری های تخریب کننده عصبی است (۲). بیماری آلزایمر یک نوع بیماری پیش رونده است که علائم آن به طور تدریجی شروع شده و به مرور زمان افزایش می یابد. در بیماری آلزایمر ساختارهای پروتئینی به شکل کروی (اجسام آمیلوئیدی) در خارج نورون های برخی مناطق مغز و ساختارهای پروتئینی رشته ای در جسم سلولی نورون ها، تشکیل می شود (۳). آمیلوئید بتا ( $A\beta$ ) جزء اصلی پلاک های آمیلوئیدی در مغز بیماران آلزایمری می باشند. آمیلوئید بتا تکه ای از پروتئینی بزرگ تر به نام پروتئین پیش ساز آمیلوئید بتا (APP) است. این پروتئین در سلول های دستگاه عصبی بیان می شود و در اتصال سلول ها به هم، تماس سلول ها و اتصال به ماتریکس خارج سلولی و اسکلت سلولی نقش دارد (۴). AD با مرگ سلول های عصبی، کوچک شدن بافت مغز و اختلالات شناختی، حرکتی و رفتاری پیش رونده همراه است که اغلب منجر به مرگ می شود (۵). طبق مطالعات انجام شده تشکیل پلاک پیری یک عامل اصلی در ایجاد آلزایمر است. این پلاک ها باعث می شود که ارتباط بین سلول های عصبی قطع شده و در نهایت سلول های عصبی مرده و بافت مغز از بین می رود (۶). سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) گروهی از سلول های بنیادی چند توانی هستند (۷). سلول های بنیادی مزانشیمی به دلیل خواص تعدیل کننده ایمنی و ایمنی زیستی بالا و نیز به دلیل توانایی آنها در سنتز فاکتورهای نوروتروفیک و پیش رگ زایی، کارایی بسیاری برای تحریک بازسازی عصبی دارا می باشند (۸). در AD، درمان توسط سلول های بنیادی باعث شده تا سلول های عصبی را که آسیب دیده یا از دست رفته اند جایگزین کنند همچنین درمان های مبتنی بر MSC باعث پیشرفت آهسته بیماری می شود (۷).

## پاتوزنز AD و درمان فعلی

بسیاری از آزمایشات بالینی ناموفق این مسیر را به طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق درمان‌های مولکولی کوچک یا آنتی بادی برای کاهش تولید  $A\beta$  یا ارتقاء پاکسازی  $A\beta$  مورد هدف قرار دادند. دومین پروتئین اشتباه تا شده در AD، تاو است، پروتئینی که در سلول‌ها به شکل گره‌های عصبی فیبریلاری تجمع می‌یابد. نزدیک‌ترین ویژگی پاتولوژیک مربوط به زوال شناختی AD است (۹). نتایج حاکی از مطالعات نشان داده که AD زمانی اتفاق می‌افتد که پلاک‌های پیری خارج سلولی و NFT‌های درون سلولی پروتئین تاو هیپرفسفریله شده در مغز تجمع یابند. این فرآیندهای پاتولوژیک باعث تخریب عصبی با از دست دادن نورونی و سیناپسی می‌شود (۱۰). سلول‌های بنیادی سلول‌های اولیه‌ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز به انواع سلول‌های انسانی را دارند و می‌توانند سلول‌ها و بافت‌های مختلف در بدن انسان تولید کنند که برای درمان AD مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱). پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP) یک پروتئین غشایی است که نقش مهمی در رشد عصبی، سیگنال دهی و انتقال درون سلولی ایفا می‌کند (۱۲). در سیستم عصبی مرکزی (CNS)، APP می‌تواند از طریق مسیر غیر آمیلوئیدوژنیک یا آمیلوئیدوژنیک دچار شکاف شود. در مسیر غیر آمیلوئیدوژنیک، APP ابتدا توسط  $\alpha$ -سکرتاز که پپتید آلفا محلول خارج سلولی ( $sAPP\alpha$ ) و یک قطعه اسید آمینه شناخته شده C83 را ترشح می‌کند، جدا می‌شود که بعداً توسط  $\gamma$ -سکرتاز شکسته می‌شود و قطعه‌ای به نام  $p3$  تولید می‌کند. از سوی دیگر، در مسیر آمیلوئیدوژنیک، APP ابتدا توسط  $\beta$ -سکرتاز جدا می‌شود و پپتید بتا محلول خارج سلولی ( $sAPP\beta$ ) و یک قطعه اسید آمینه به نام C99 ترشح می‌کند.  $\gamma$ -سکرتاز نیز با جدا کردن C99 در این مسیر شرکت می‌کند و یک پپتید به نام  $A\beta$  تولید می‌کند (۱۳). دو ایزوفرم اصلی  $A\beta$ ،  $A\beta40$  و  $A\beta42$  است، تنها تفاوت بین آن‌ها این است که  $A\beta42$  دارای دو باقیمانده اضافی در انتهای C است. بیشتر پلاک‌های آمیلوئید در AD از  $A\beta42$  تشکیل شده است (۱۳). تجمع مونومرهای  $A\beta$  باعث می‌شود پلاک‌هایی را ایجاد کند که منجر به سمیت عصبی و زوال عقل می‌شود (۱۴).

## سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به عنوان یک درمان جایگزین

MSCها را می‌توان از بافت‌هایی مانند مغز استخوان (BM)، خون بند ناف (UCB)، بافت چربی، جفت و ... به دست آورد (۱۰). خون بند ناف باقیمانده خون جفت و بند ناف پس از زایمان است و سرشار از سلول‌های بنیادی خون ساز و سایر سلول‌های بنیادی مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی است (۹). اثرات پاراکرین MSCها، از جمله تولید فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های ضد التهابی و تنظیمات ضد آپوپتوزی، باعث بازسازی عصبی و میلین‌سازی می‌شود. MSCها اثرات فاگوسیتی را بر روی پلاک‌های  $A\beta$  غیرطبیعی، جلوگیری از مرگ عصبی و افزایش تمایز نورونی را اعمال می‌کنند (۱۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاسخ‌های ایمنی را از طریق فعال‌سازی میکروگلیا ایجاد می‌کنند، که در نتیجه باعث ایجاد پاسخ ضد التهابی می‌شود (۱۶). در مقایسه با سایر سلول‌های بنیادی، پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بهتر است، زیرا در اثر تحریک با فاکتورهای رشد خاص، می‌توانند به سلول‌های عصبی، استئوسیت‌ها، کندروسیت‌ها یا سلول‌های چربی تمایز یابند. علاوه بر این، سلول‌های بنیادی مزانشیمی کمتر به سلول‌های سرطانی تمایز پیدا می‌کنند و ایمنی‌زایی کمی دارند (۱۷). مورد دیگر به دلیل عدم بیان MHC کلاس II و مولکول‌های تحریک کننده است (۱۸).

### سلول‌های بنیادی عصبی (NSC)

سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) از بافت مغز جنین انسان یا جوندگان بدست می‌آیند که تحت روش‌های مختلف کشت سلولی قرار می‌گیرند (۱۹). NSC سلول‌های تمایز نیافته هستند و می‌توانند باعث تجدید خود شوند علاوه بر آن مسئول تولید سلول‌های عصبی و گلیال هستند (۱۰). اثر پاراکرین NSCها پتانسیل درمانی قابل توجهی دارد (۹). NSCها تولید  $A\beta$  و مرگ سلولی را محدود می‌کنند (۱۰). علاوه بر این، اکثر سلول‌های پیوندی فاکتورهای نوروتروفیک از جمله BDNF، FGF-2، فاکتور رشد شبه انسولین-۱، و فاکتور نوروتروفیک مشتق از خط سلول گلیال (GDNF) ترشح می‌کنند (۲۰). با این حال، یکی از موانع مهم برای کاربرد بالینی NSCهای مشتق از مغز (BD-NSCs)، تکثیر، تمایز و مهاجرت کم آنهاست که می‌تواند با روش‌های مختلف دستکاری، از جمله ویرایش ژن و تجویز همزمان عوامل مختلف، تقویت شود (۱۹).

### سلول‌های بنیادی پرتوان (iPSCs)

سلول‌های بنیادی پرتوان شامل ESCها و iPSCها می‌شوند، که به انواع سلول‌ها تمایز می‌یابند و سیستم عصبی مرکزی (CNS) و سیستم عصبی محیطی (PNS) را از پیش سازهای عصبی تا نورون‌های بالغ تخصصی، الیگودندروسیت‌ها و آستروسیت‌ها تشکیل می‌دهند (۲۱). برای اولین بار iPSCها از فیبروبلاست‌های موش به دست آمدند (۹). سلول‌های تمایز یافته می‌توانند با برنامه‌ریزی دوباره به سلول‌های بنیادی تبدیل شوند. iPSCs می‌توانند از انواع متفاوت سلول‌های جنینی و بالغ ایجاد شوند (۱۰). iPSCها اتولوگ هستند و در برابر رد ایمنی مقاوم‌تر هستند (۲۱). یک مزیت استفاده از iPSCها این است که می‌توان آنها را از بیماران سالمند بدست آورد که برای پژوهش روی بیماری‌های تهاجمی عصبی مانند آلزایمر (AD) و بیماری پارکینسون (PD) مورد استفاده قرار می‌گیرند. محدودیت‌های اخلاقی استفاده از iPSC شبیه به استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی است (۱۰).

(پیوست: در جدول ۱ درمان بیماری آلزایمر به وسیله‌ی انواع گوناگون سلول‌های بنیادی آورده شده است)

### نتیجه گیری

در درمان بیماری آلزایمر (AD) می‌توان از انواع سلول‌های بنیادی استفاده کرد و سلول‌های بنیادی می‌توانند با نورون‌زایی باعث بهبود بیماری یا کاهش روند بیماری شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده گسترده و موثری در درمان این بیماری دارند. تاثیرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی عبارتند از افزایش فعالیت تلومراز (۱) و کاهش فسفوریلاسیون تاو. استفاده از سلول‌های بنیادی نه تنها AD، بلکه بیماری‌های دیگر مانند سرطان را نیز درمان می‌کند (۲).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

شماره	محقق و منبع	نوع سلول بنیادی	نمونه مورد مطالعه	نتایج
۱.	لی و همکارانش (۲۸)	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف	موش‌های ترانسژنیک APP و PS1	بهبود یادگیری و شناخت فضایی و حافظه توسط فعال‌سازی میکروگلیاها. کاهش بیان A $\beta$ مشاهده شد.
۲.	بلورتون جونز و همکارانش (۲۹)	سلول‌های بنیادی عصبی	موش‌های ترانسژنیک PS-1، APP و tau را بیان می‌کنند	فقدان حافظه فضایی و یادگیری توسط BDNF بهبود یافته است. افزایش تراکم سیناپسی رخ داد.
۳.	لینلین‌هان و همکارانش (۳۰)	سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	موش‌های ترانسژنیک APP و PS1	تنظیمات میکرو RNAهای let-7f-5p در MSCها باعث کاهش آپوپتوز ناشی از A $\beta$ 25-35 به‌وسیله کاهش سطح caspase-3 شد. اثر محافظتی let-7f-5p بر بقا MSCهای پیوند شده با هدف قرار دادن کاسپاز ۳ در مدل‌های AD نشان داده شد.
۴.	ژنگ و همکارانش (۳۱)	سلول‌های بنیادی عصبی	موش‌های ترانسژنیک APP و PS1	افزایش بیان پروتئین‌های سیناپسی از جمله سیناپتوفیزین synaptophysin و GAP-43 بهبود اختلالات شناختی.
۵.	دانگ‌هیون‌کیم و همکارانش (۳۲)	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف	موش‌های ترانسژنیک APP و PS1 و موش‌های C57BL/6	تجویز HUBC-MSCها به‌طور قابل‌توجهی بیان مارکرهای وزیکولی سیناپسی، از جمله سیناپتوفیزین را افزایش دادند که در بیماران مبتلا به AD کاهش یافته است. علاوه بر این، فعالیت سیناپسی in vitro از طریق GDF-15 ارتقا پیدا کرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تزریق مکرر hUCB-MSC به cisterna magna باعث افزایش نوره‌زایی در هیپوکامپ بالقین و افزایش فعالیت سیناپسی از طریق فاکتور پاراکرین GDF-15 می‌شود.
۶.	ون و همکارانش (۳۳)	سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	موش‌های ترانسژنیک APP و PS1	پلاک‌های سال‌خورده کاهش یافته بود. بیان پروتئینی DeltaNp73 به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته بود. عملکرد بهتر در بیج و خم آب مورب مشاهده شد.
۷.	مارتی و همکارانش (۳۴)	سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از یولب یوایی انسان	موش مدل AD القا شده توسط Ibotenic acid	سلول‌ها برای بیان فاکتورهای رشد عصبی مهندسی شدند. توانایی‌های شناختی پیشرفت پیدا کرد. نتایج نشان داد که OBNSC olfactory bulb neural stem cells انسانی NGF را بیان می‌کنند، و این عمل نقص‌های شناختی مرتبط با ضایعات ناشی از Ibotenic acid IBO را در موش‌های صحرایی AD بهبود می‌بخشد.
۸.	ایسراییل و همکارانش (۳۵)	سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده	دو بیمار انسان مبتلا به آلزایمر اِرتی	به‌طور قابل‌توجهی مارکرهای آسیب‌شناختی آمیلوئید $\beta$ (۱-۴۰)، فسفو-تائو (T $\tau$ 231) و $\beta$ -GSK-3 $\alpha$ پس از پیوند افزایش یافت. ثابت شد که فناوری iPSC می‌تواند برای ردیابی فنوتیپ‌های مرتبط با بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار گیرد، حتی اگر دهه‌ها بعد، بیماری در فرد آشکار شود.

جدول ۱- درمان بیماری آلزایمر به وسیله انواع گوناگون سلول‌های بنیادی (۱۰).

## References:

1. Baig MH, Ahmad K, Rabbani G, Choi I. Use of Peptides for the Management of Alzheimer's Disease: Diagnosis and Inhibition. *Front Aging Neurosci* 2018; 10: 21.
2. Cha MY, Kwon YW, Ahn HS, Jeong H, Lee YY, et al. Protein-induced pluripotent stem cells ameliorate cognitive dysfunction and reduce A $\beta$  deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Stem Cells Translational Medicine*. 2017; 6 (1): 293-305
3. Engel M, Do-Ha D, Munoz SS, Ooi L. Common Pitfalls of Stem Cell Differentiation: A Guide to Improving Protocols for Neurodegenerative Disease Models and Research. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73 (19): 3693-70
4. Jones SV, Kounatidis I. Nuclear Factor-Kappa B and Alzheimer Disease, Unifying Genetic and Environmental Risk Factors from Cell to Humans. *Front Immunol* 2017; 8: 1805.
5. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*. 2019;167: 231-255.
6. Shen Z, Li X, Bao X, Wang R. Microglia-Targeted Stem Cell Therapies for Alzheimer Disease: A Preclinical Data Review. *J Neurosci Res* 2017; 95 (12): 2420-9.
7. Chakari-Khiavi F, Dolati S, Chakari-Khiavi A, Abbaszadeh H, Aghebati-Maleki L, et al. Prospects for the application of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease treatment. *Life sciences*. 2019; 231: 116564.
8. Mukhamedshina YO, Gracheva OA, Mukhutdinova DM, Chelyshev YA, Rizvanov AA. Mesenchymal stem cells and the neuronal microenvironment in the area of spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2019; 14(2): 227-37.
9. X.Y.Liu, L.P.Yang, L.Zhao. Stem cell therapy for Alzheimer's disease. *World J Stem Cells* . 2020; 12 (8): 787–802.
10. Ebrahimikia Y, Darabi S, Rajaei F. Roles of Stem Cells in the Treatment of Alzheimer's Disease. *JSSU* 2020; 28 (3) :2431-2441. [In persian]
11. C. Lane, J. Hardy, Schott J. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*.2018: 25(1): 59-70.
12. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2017; 38(9): 1205-35.
13. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*. 2019;167:231-255.
14. Hernández AE, García E. Mesenchymal stem cell therapy for Alzheimer's disease. *Stem Cells International*. 2021;2021: 7834421
15. Naaldijk Y, Jager C, Fabian C, Leovsky C, Bluher A, et al. Effect of Systemic Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Neuropathology Markers in APP/PS1 Alzheimer Mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2017; 43(4): 299-314.
16. Salem H, Colpo GD, Teixeira AL. Stem cells in Alzheimer's disease: current standing and future challenges. *Cell Biology and Translational Medicine*. *Stem Cells in Regenerative Medicine: Advances and Challenges*. 2018: 1: 93-102.
17. Kim J, Lee Y, Lee S, Kim K, Song M, et al. Mesenchymal stem cell therapy and Alzheimer's disease: current status and future perspectives. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2020; 77(1): 1-4.
18. Liew LC, Katsuda T, Gailhouste L, Nakagama H, Ochiya T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease. *International Immunology*. 2017; 29(1): 11-9.

19. Dever D.P, Scharenberg S.G, Camarena J, Kildebeck E.J, Clark J.T, et all. CRISPR/Cas9 genome engineering in engraftable human brain-derived neural stem cells. *iScience*. 2019; 15: 524–535.
20. Hattiangady B, Kuruba R, Shuai B, Grier R, Shetty A.K. Hippocampal neural stem cell grafting after status epilepticus alleviates chronic epilepsy and abnormal plasticity, and maintains better memory and mood function. *Aging Dis*. 2020; 11(6): 1374–1394.
21. Caprnda M, Kubatka P, Gazdikova K, Gasparova I, Valentova V, et all. Immunomodulatory effects of stem cells: Therapeutic option for neurodegenerative disorders. *Biomed. Pharmacother*. 2017;91:60–69 .

## کاربرد های مایکروویو در فراوری و دسترسی زیستی مواد غذایی

پرستو یآوری<sup>۱</sup>، محمد حجت الاسلامی<sup>۲\*</sup>، سیده فاطمه احمدی<sup>۳</sup>

۳۵. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳۶. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳۷. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳۸. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، ادویه ای و عطری، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

لزوم استفاده از تکنیک‌ها و سیستم‌های مجهز و مدرن و روش‌هایی جدید فن آوری برای افزایش کمی و کیفی محصولات غذایی هر روز بیش از گذشته احساس می‌گردد. حرارت دهی مایکروویو یکی از مهم‌ترین روش‌های مرسوم و متداول در فرآیند غذایی بوده و بررسی تاثیر امواج بر روی مواد مغذی امروزه بسیار حائز اهمیت دارد. از کاربردهای مایکروویو در صنایع غذایی می‌توان به آنزیم‌بری، خشک‌کردن، پختن، برشته‌کردن، پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون و انجماد زدایی اشاره کرد. حرارت دهی سریع‌تر با بازده انرژی بیشتر، مزیت اصلی فرآیند مایکروویو در مواد غذایی محسوب می‌شود. امواج تولید شده توسط مگنترون یک میدان مغناطیسی ایجاد می‌کند و مولکول‌های غذا مخصوصاً مولکول‌های قطبی مثل آب و پروتئین‌ها خودشان را با تغییرات سریع میدان الکتریکی همسو می‌کنند، آنها حول یک محور نوسان می‌کنند. این نوسانات باعث ایجاد اصطکاک قابل توجهی بین مولکول‌ها شده که نتیجه آن تولید انرژی است. سهولت استفاده و زمان فرایند کوتاه، کاربرد مایکروویو را در منازل و رستورانها افزایش داده است. از جمله مزایای مایکروویو زمان گرم شدن اولیه کمتر؛ حرارت سریع‌تر، کارایی انرژی بالاتر، فضای کمتر، کنترل دقیق‌تر فرآیند، حرارت دهی انتخابی و مواد غذایی با کیفیت تغذیه‌ای بالاتر اشاره کرد. کاهش توسعه رنگ و طعم و کاهش رطوبت از معدود مشکلات غذاهای فرآوری شده با مایکروویو می‌باشد. در روش‌های پخت متداول، حرارت از منبع حرارتی خارجی به ماده غذایی اعمال می‌شود ولی در پخت با مایکروویو حرارت داخل ماده غذایی تولید می‌گردد. کاهش شدید زمان پخت جاذبه اصلی این روش را موجب می‌شود.

**واژگان کلیدی:** مایکروویو، حرارت دهی، افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۸۸۳۱۹۱۸۶

پست الکترونیک: mohojjat@gmail.com



## Applications of microwaves in processing and bioavailability of food

Parastoo Yavari<sup>1</sup>, Mohammad Hojjatoleslami<sup>2,4\*</sup>, Seyedeh Fatemeh Ahmadi<sup>3,4</sup>

1. PhD student of Department of Food science and technology, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
4. Medicinal, spicy and aromatic plants Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

The necessity for employing modern, well-equipped techniques, and innovative technological methods to enhance both the quantity and quality of food products is increasingly evident in today's society. Microwave heating is recognized as a prominent conventional method in food processing, and investigating its impact on nutrients holds significant importance in the present day. Microwaves have various applications in the food industry, including enzyme removal, drying, cooking, roasting, pasteurization, sterilization, and defrosting. The primary advantage of microwave processing in food lies in its ability to achieve faster heating with higher energy efficiency. Waves generated by the magnetron create a magnetic field, causing food molecules—especially polar molecules like water and proteins—to align themselves with the rapid changes of the electric field, thus oscillating around an axis. These oscillations lead to significant friction between molecules, resulting in energy production. The convenience and shorter processing time associated with microwave usage have increased its adoption in both households and restaurants. Notable benefits of microwave cooking include reduced initial heating time, faster heating, higher energy efficiency, reduced space requirement, improved process control, selective heating, and food with enhanced nutritional quality. However, microwave processing also presents challenges such as diminished color and flavor development, and decreased moisture content in foods. Unlike conventional cooking methods where heat is applied externally to food, microwave cooking generates heat internally within the food itself. The primary appeal of this method lies in its significant reduction in cooking time.

**Keywords:** microwave, heating, extending food shelf life.

### مقدمه

گرمايش مايکروويو به دليل برهمکنش تابش الکترومغناطیسی با خواص دی الکتريک غذاها صورت می گیرد. امواج مايکروويو بخشی از طيف الکترومغناطیسی در محدوده فرکانسی است که بين ناحیه رادیو و مادون قرمز قرار دارد. دو فرکانس برای استفاده انحصاری از برنامه گرمايش مايکروويو در نظر گرفته شده است که عبارتند از: ۹۱۵ مگاهرتز و ۲۴۵۰ مگاهرتز.

### اساس روش مايکروويو

مايکروويو گرما را در داخل غذا توليد می کند و به سرعت دما را تا حد مطلوب افزایش می دهد. از انرژی مايکروويو برخلاف پرتوهای يونيزه برای حرارت دادن مواد غذایی استفاده می شود. حرارت دهی با مايکروويو یک پدیده چند فازی است که شامل امواج الکترومغناطیسی و انتقال حرارت است. هر ماده ای که در معرض تابش الکترومغناطیسی باشد گرم می شود. طول موج مايکروويو حدوده طيف الکترومغناطیسی از ۳۰۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگاهرتز را پوشش می دهد. فقط فرکانس های ۲۴۵۰ مگاهرتز و ۹۱۵ مگاهرتز برای استفاده مجاز هستند. مايکروويو خانگی با فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز کار می کنند و سیستم های صنعتی از فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز یا ۹۱۵ مگاهرتز استفاده می کنند (۱).

### کاربرد های مايکروويو در صنايع غذایی

۱. پخت مواد غذایی

۲. تغليظ کردن

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

۳. پخت و پز
۴. کیورینگ
۵. خشک کردن
۶. غیرفعال کردن آنزیم (بلانچینگ)
۷. خشک کردن انجمادی
۸. حرارت دهی
۹. پاستوریزه کردن
۱۰. پیش پخت
۱۱. پف کردن و کف کردن
۱۲. حذف حلال
۱۳. استریل کردن
۱۴. رفع انجماد (۲و۱).

### مزایای استفاده از مایکروویو در پاستوریزاسیون

- سرعت پاستوریزاسیون ۳-۵ دقیقه به جای ۳۰-۴۵ دقیقه
- کیفیت بهتر (رنگ و طعم تغییری نمی کند)
- افزایش طول عمر نگهداری بدون استفاده از نگهدارنده (طبق گزارش Olsen در سال ۱۹۶۵ جهت جلوگیری از رشد کپک در نان، گرم کردن با مایکروویو مؤثرتر از کاربرد ۰/۱ درصد پروپیانات سدیم می باشد).
- حفظ ظاهر طبیعی
- حفظ خواص ارگانولپتیکی
- صرفه جوئی در انرژی
- کاهش هزینه توزیع (به علت افزایش عمر نگهداری محصول)
- پرسنل کمتر (تنها یک اپراتور نیاز دارد).

### فرآیند استریلیزاسیون بوسیله مایکروویو

-با فرآیند استریلیزاسیون مایکروویو (۱۲۸ درجه سانتی گراد و زمان ۳ دقیقه) محصولاتی برتر از فرآیندهای معمولی کنسرو کردن (دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد و زمان ۴۵ دقیقه) تولید کرد. هنگامی که از حرارت دهی مایکروویو با فرکانس ۹۱۵ مگاهرتز برای استریل کردن کیسه های حاوی ماکارونی و پنیر پخته شده استفاده شد، تغییر قابل توجهی در بافت محصول یا از دست دادن طعم مشاهده نشد.

### تاوینگ (thawing) رفع انجماد

نرم کردن مواد غذایی منجمد (تاوینگ) مایکروویوها به سرعت گرما را به صورت حجمی تولید می کنند و یخ زدایی در چند دقیقه به جای ساعت/روز انجام می شود، حتی برای بلوک های بزرگ محصول (۳).

### تمپرینگ

تمپرینگ فرآیند حرارتی کنترل شده ای است که به منظور ایجاد خواص فیزیکی مناسب در ماده غذایی منجمد برای فراهم آوردن امکان فرآیندهای بعدی بکار می رود. در تمپرینگ، ماده غذایی گرم شده و دمای آن به دمای بالاتر، ولی کمتر از نقطه انجماد آب رسانده می شود. هدف، تنظیم درصد رطوبت نسبی قسمت های منجمد و غیرمنجمد است تا ویژگی های مکانیکی قطعه گوشت برای عملیات مکانیکی بعدی بهینه شود. بنابراین در این مرحله هنوز غذا سفت است اما می توان عملیاتی مانند تکه کردن، شکل دهی یا چرخ کردن را بر روی آن انجام داد.

مزایای استفاده از مایکروویو در تمپرینگ:

- ۱- افزایش سرعت فرآیند بطوریکه در روش سنتی چند روز و در روش مایکروویو در عرض چند دقیقه انجام پذیر است.
- ۲- کنترل بیشتر و انعطاف پذیر بودن فرآیند.
- ۳- به حداقل رسیدن کاهش مواد محلول از طریق چکه کردن و در نتیجه بهبود راندمان.
- ۴- در روش جدید زمان لازم برای رشد باکتریها یا دیگر عوامل فساد به حداقل می رسد یا بطور کامل از رشد میکروارگانیسمها جلوگیری می شود.
- ۵- نیاز به فضای کمتر.
- ۶- تمیز کردن راحت سیستمهای تمپرینگ.
- ۷- توانایی انجام فرآیند بدون خارج کردن ماده غذایی از بسته بندی که با آسان کردن عملیات
- ۸- حمل و نقل و کاهش نیازمندیهای بهداشتی به ارزش فرآیند افزوده می شود.
- ۹- آمارگیری از محصولات آسان شده و به حداقل زمان می رسد.
- ۱۰- کاهش یا حذف اشتباهات احتمالی در سیستم انبارداری. در سیستمهای انبارداری به روش مرسوم می بایستی برای تولید چند روز آینده، گوشت تهیه و چند روزی هم نگهداری شده ولی در تمپرینگ با مایکروویو این مشکل وجود ندارد.
- ۱۱- میزان اسیدیته گوشت نرم شده همانند گوشت تازه است.

### خشک کردن

گرمای حاصل از انرژی مایکروویو رطوبت موجود در داخل ماده غذایی را تبخیر کرده و بر موانع موجود در مقابل انتقال حرارت ( که بوسیله هدایت حرارتی کم ایجاد شده) غلبه می کند. بدین ترتیب از وارد شدن آسیب به سطح ماده غذایی جلوگیری نموده و انتقال رطوبت را در طول مراحل بعدی بهبود داده و از سختی غذا جلوگیری می کند. در خشک کردن مایکروویو، گرما مستقیماً در داخل مواد تولید می شود و انتقال حرارت بالاتر و در نتیجه افزایش دما بسیار سریعتر از حرارت دهی معمولی امکان پذیر می شود. تفاوت های قابل توجهی در مکانیسم های مایکروویو و فرآیندهای خشک کردن معمولی وجود دارد. شیب دما و رطوبت در مورد گرمایش مایکروویو بر خلاف گرمایش معمولی در یک جهت است، که در آن از دست دادن رطوبت قابل توجهی از مواد در برابر گرایان دما مشخص می شود. نخستین کاربرد وسیع مایکروویو در صنعت، خشک کردن کامل چپیس سیب زمینی بود. مایکروویو عمدتاً به منظور خشک کردن نهایی مواد غذایی که بخشی از رطوبت آنها گرفته شده بکار می رود (۳).

### استخراج چربی از بافت سلولهای چربی (rendering)

در مقایسه با روشهای پخت متداول، ذوب کردن چربی حیوانی با انرژی مایکروویو، باعث بهبود رنگ و کاهش هزینه تا ۳۰ درصد می شود. همچنین بوهای نامطبوع ایجاد نمی کند و به فرآیندهای بیشتری مانند فیلتر کردن، شفاف کردن چربی استخراج شده نیازمند نیست.

### بلانچینگ

هدف بلانچینگ از بین بردن آنزیمهای موجود، بیرون راندن هوای بین سلولی، تثبیت رنگ، از بین رفتن بوی خام سبزیها، از بین رفتن تعداد زیادی از میکروبهای موجود در سطح محصول، شستن و جدا شدن گل و مواد خارجی، نرم شدن بافت، کم شدن حجم، تسهیل بسته بندی و جدا شدن پوست بعضی از میوه جات مثل بادام و پسته. از مزایای غیرفعال کردن آنزیمها بوسیله حرارت دهی مایکروویو، حفظ مواد مغذی حساس به حرارت و ترکیبات مواد معطر و طعم می باشد. تحقیقات زیادی در زمینه کاربرد مایکروویو در بلانچینگ میوه جات و سبزیجات و اثر این فرآیند بر مواد مغذی شده است، لیکن به دلیل بالا بودن هزینه سرمایه گذاری و محدود بودن فصل زراعت، این فرآیند صنعتی نشده است. گزارش شده است که وقتی مایکروویو به صورت ترکیبی با بخار بکار می رود از نظر کاهش هزینه و زمان بلانچینگ مناسب خواهد بود و میزان رطوبت سطح محصول نیز قابل کنترل می باشد. این تکنیک هنوز صنعتی و تجاری نشده است. برای حفظ کیفیت غذایی محصولات غذایی، چندین محقق استفاده از گرمایش مایکروویو را به عنوان جایگزینی

برای روش معمولی بلانچینگ برای محصولات غذایی پیشنهاد کردند از آنجایی که بلانچ با مایکروویو برای انتقال حرارت کارآمد در مواد غذایی نیاز به آب کم یا بدون نیاز دارد، می‌تواند مقدار مواد مغذی از دست رفته در اثر شستشو در مقایسه با غوطه‌وری در آب گرم را کاهش دهد (۲ و ۳).

#### اثر مایکروویو بر روی کیفیت گوشت

**رطوبت:** پخت در مایکروویو در مقایسه با روش‌های معمولی منجر به کاهش ۳-۶ درصدی رطوبت اضافی می‌شود. کباب گوشت بالای ران گاو در مایکروویو به دلیل تراوش (چکه کردن خونابه) و تبخیر نسبت به کباب‌های معمولی وزن و رطوبت بیشتری از دست می‌دهند. کباب‌ها و پیراشکی گوشت خوک نیز خونابه بیشتری را از دست می‌دهند، اما تلفات تبخیر کمی دارند. کاهش وزن و رطوبت به طور کلی در مرغ پخته شده در مایکروویو در مقایسه با روش‌های معمولی بیشتر است.

**ویتامین‌ها:** پخت و پز در مایکروویو اطلاعات محدودی در مورد اثرات ویتامین‌های محلول در چربی بر غذاهای گوشتی دارد، اما لیپیدهای موجود در گوشت گاو، مرغ و تخم مرغ تفاوت‌های جزئی را نشان می‌دهند. ویتامین‌های محلول در آب مانند: تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، ویتامین B<sub>۱۲</sub> و پیریدوکسین کمتر تحت تأثیر پخت و پز در مایکروویو قرار گرفته‌اند. تیامین در اثر اکسیداسیون از بین می‌رود، اما نشان داده نشده است که امواج مایکروویو برای آن مخرب هستند. کباب‌های گوشت گاو در مایکروویو حداکثر دمای داخلی بالاتری دارند و در نتیجه حفظ تیامین کمتری دارند. با این حال، حفظ تیامین در خونابه‌ها برای محصولات پخته شده در مایکروویو بیشتر است. ریبوفلاوین و نیاسین در برابر حرارت نسبتاً پایدار هستند، بنابراین کار کمی در مورد تأثیر آنها بر پخت در مایکروویو انجام شده است. ویتامین B<sub>۱۲</sub> تحت تأثیر حرارت مایکروویو قرار نمی‌گیرد، اما مقادیر کمی در خونابه از بین می‌رود. گرما می‌تواند بر کیفیت تغذیه‌ای پروتئین رژیم غذایی تأثیر بگذارد. به نظر می‌رسد از دست دادن نیتروژن به خونابه و میزان اسید آمینه آزاد، برای گوشت پخته شده در امواج مایکروویو کمتر از محصولات پخته شده به روش متداول باشد. گزارش شده است که غلظت سدیم در نمونه‌های پخته شده مرسوم تا ۱۰ درصد بیشتر است، در حالی که حفظ پتاسیم در گوشت پخته شده توسط مایکروویو به طور قابل توجهی بالاتر است (۲).

#### اثر مایکروویو بر محصولات نانوائی

غذا در طی فرآیند پیچیده پخت دستخوش تغییرات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی می‌شود. برهمکنش مایکروویوها با مولکول‌های قطبی و ذرات باردار در اجاق‌های مایکروویو باعث تولید گرما می‌شود که می‌تواند منجر به محصولات با کیفیت پایین‌تر و زمان گرم شدن سریع‌تر شود. چهار مرحله پخت معمولی عبارتند از: ۱- قهوه‌ای شدن، ۲- ژلاتینه شدن یا پختن، ۳- انتقال حرارت از پوسته به داخل و ۴- ایجاد یک پوسته سفید. به طور معمول، برنامه‌های پخت از یک آون مایکروویو با فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز استفاده می‌کنند، بنابراین مرحله اول حذف می‌شود. از آنجایی که خمیر نان مورد استفاده در پخت‌های معمولی حاوی هوای زیادی است، انتقال حرارت با مشکل مواجه می‌شود. پخت در مایکروویو می‌تواند باعث از دست رفتن اجزای طعم به دلیل تقطیر، اتصال نشاسته و تخریب شیمیایی شود. راه حل‌های این مشکلات شامل جایگزینی نشاسته‌های اصلاح شده با نشاسته‌های کم‌آمیلوز برای حذف محل‌های اتصال بالقوه است. طعم‌های ویژه‌ای که برای محصولات پخته شده در مایکروویو ایجاد می‌شوند، می‌توانند طعم نهایی را بهبود بخشند و نه تنها ویژگی‌های مشخصه‌ای مانند لیمو، کره یا وانیل را ارائه می‌کنند، بلکه طعم معمولی پخته شده توسط واکنش‌های میلارد و کاراملی شدن قندها را نیز ارائه می‌دهند. با این حال، پخت مایکروویو مزایایی دارد، مانند ارزش غذایی بالاتر، کاهش زمان پخت، هزینه انرژی کمتر و فضای کمتر مورد نیاز برای تجهیزات مایکروویو. تولید محصولات با کیفیت بالا که در مایکروویو پخته می‌شوند، چالشی را برای فناوریان مواد غذایی ایجاد می‌کند، زیرا نشاسته جزء اصلی اکثر محصولات نانوائی است. درک اثرات مایکروویو بر نشاسته برای بهبود کیفیت محصولات پخته شده در مایکروویو بسیار مهم است (۳).

## فرآیند قهوه ای شدن

پخت در مایکروویو می تواند باعث خیسوی خمیر مانند و خشک شدن فرآورده های خمیری در صورت گرم شدن برای مدت طولانی شود. برای دستیابی به واکنش های قهوه ای شدن و ترد شدن، سطح غذا باید حداقل به ۱۵۰ درجه سانتیگراد برسد. درب های گیره دار که از فیلم پلاستیکی متیزه شده ساخته شده اند، انرژی مایکروویو را جذب کرده و به گرما تبدیل کرده، به دمای بالایی دست می یابند که آب را تبخیر کرده و محصول را ترد می کند. همچنین می توان از نمک و ترکیبات رنگی برای افزایش دمای سطح برای قهوه ای شدن استفاده کرد. ترکیب مایکروویو و گرمایش همرفت اجباری می تواند به قهوه ای شدن سطح و ایجاد طعم در محصولات پخته شده در مایکروویو منجر شود (۴).

## کیک

کیک های مایکروویوی اغلب به دلیل حجم کم و بافت سخت مورد انتقاد قرار می گیرند. محققان از سیستم های مدل برای درک اثرات مواد بر مکانیسم های پخت مایکروویو استفاده کرده اند. ساختار کیک در کیک های معمولی نسبت به کیک های پخته شده در مایکروویو متغیرتر به نظر می رسد. سیستم های خمیری دارای گرادیان های دمایی کمتری در طول پخت مایکروویو هستند. کیک های پخته شده در تابه های شیشه ای در مقایسه با کیک هایی که در تابه های فلزی پخته می شوند دارای سطح مقطع و کاهش وزن مشابهی هستند. نرخ از دست دادن رطوبت در کیک های مایکروویو بیشتر از اجاق های همرفت است. متیل سلولز یک هیدروکلئید موثر برای بهبود حفظ رطوبت و بافت است. نشاسته های فوری با میزان هیدراتاسیون متفاوت و ظرفیت های نگهداری آب می توانند برای افزایش حفظ رطوبت در طی پخت مایکروویو استفاده شوند. نان

مطالعه توسط لورنز و همکاران (۱۹۷۳) اهمیت خمیرهای تیره را در فرمولاسیون نان برای از بین بردن مشکلات رنگ پوسته برجسته کرد. نان گندم کامل و چاودار پخته شده در آن مایکروویو نسبت به نان های معمولی که در فر پخته می شوند پس از نگه داری سفت تر بودند. بافت نان های چاودار و گندم کامل پخته شده در آن مایکروویو کمی سفت و لاستیکی توصیف شد. کوره های ترکیبی یا چند کاره ترکیبی از امواج مایکروویو برای غلبه بر مشکل بدون پوسته یا رنگ غیر قابل قبول معرفی شده اند. فرمول های معمولی نان بافت های غیر قابل قبولی را هنگام پخت در اجاق مایکروویو، با قسمت های بیرونی لاستیکی و سخت و قسمت های داخلی سفت ایجاد می کنند. سفتی و چقرمگی دو خاصیت مجزا هستند که سفتی مربوط به گلوتن و چقرمگی مربوط به دانه های نشاسته است. راه حل های مشکل سخت شدن در قسمت بیرونی شامل پلیمریزاسیون پروتئین گلوتن، افزودن عوامل حاوی سولفیدریل و طراحی خمیر با رطوبت کم است. این نشان می دهد که فرمول های معمولی را می توان بهبود بخشید یا می توان یک فرمول جدید برای حل مشکل سختی یا سفتی نان های پخته شده در مایکروویو طراحی کرد.

## اثر مایکروویو بر شیر

شیری که با مایکروویو حرارت دهی شده به میزان بسیار کمی پروتئین و لاکتوز از بین می رود. در مورد میزان اسید آمینه ی پروتئین و اسید آمینه آزاد در شیرهایی که به روش مرسوم و با استفاده از مایکروویو پاستور شده بودند انجام شد، مشخص شد، که میزان اسید آمینه های پروتئین هر دو روش نسبت به شیر خام تقریباً ثابت مانده است. مقدار اسید آمینه ها در هر دو مورد بالا نسبت به شیر خام افزایش یا کاهش یافته است. مقدار لیزین قابل جذب در هر دو روش به مقدار کمی نسبت به شیر خام کاهش یافته بود. هیدروکسی متیل فورفورال در هیچ کدام از روش ها ایجاد نشد. ویتامین C با پاستوریزاسیون به روش مرسوم به مقدار کمی از بین می رود در صورتی که با مایکروویو به کم تر از یک سوم مقدار اولیه کاهش می یابد. در مورد ویتامین های گروه B تفاوتی بین دو روش مشاهده نشد و در هر دو روش ویتامین B<sub>1</sub> حدود ۳۵٪ و B<sub>2</sub> ۱۲٪ و B<sub>6</sub> ۲٪ به میزان ۱۰٪ کاهش می یابد. در پژوهشی دیگر (kaddouri et al ۲۰۰۶) اعلام کردند که پرتو دهی با امواج مایکروویو میزان آنتی ژن بتا-لاکتوگلوبین حدوداً به نصف مقدار در شیر خام کاهش می یابد که این آنتی ژن در اطفال کم تر از ۳ سال به عنوان آلرژن عمل می کند. در بررسی دیگر (Clare et al ۲۰۰۵) به مطالعه میزان کاراملیزاسیون و مقادیر تیول و آنزیم پلاسمین در شیر حرارت دیده به روش UHT و مایکروویو پرداختند. آنها در UHT از تزریق غیرمستقیم بخار و در هر دو روش شیر را به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۸/۱۳۷ درجه

سانتیگراد حرارت دادند. آنزیم پلاسمین در شیرهای کهنه اغلب با شکستن کازئین باعث انعقاد و ایجاد لخته می شود که در هر دو روش غیرفعال شده بود. مقدار تیول ایجاد شده بر اثر شکستن گروه های سولفیدریل در هر دو روش برابر و نسبت به روش های مرسوم به طور چشمگیری کمتر شده بود که به نظر می رسد ناشی از مدت زمان کوتاه فرآیند باشد. میزان کاراملیزاسیون در روش UHT نسبت به مایکروویو بیشتر بود که باعث روشن تر بودن رنگ شیر حرارت دیده با مایکروویو نسبت به روش UHT بود. در سال (Lubec و همکاران، ۱۹۸۹) که در مورد تأثیر مایکروویو بر اسیدآمینها شیرتحقیق می کردند دو نمونه شیر را که یکی در آن مایکروویو به مدت ده دقیقه و دیگری در حمام آب ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ده دقیقه حرارت دیده بودند هیدرولیز نموده، ۳ و ۴ ترانس هیدروکسی پرولین و ۳ و ۴-سیس-هیدروکسی پرولین نمونه را به کمک TLC اندازه گیری نمودند. فقط نمونه گرم شده توسط مایکروویو شامل ایزومر سیس-هیدروکسی پرولین بوده و به کمک HPLC وجود D-پرولین در آن تأیید شد. انتقال فرم ترانس به سیس خطرناک است زیرا وقتی در پپتیدها و پروتئین ها ایزومر سیس آمینواسیدها بجای ایزومر ترانس با هم ترکیب شوند می تواند باعث تغییرات ساختمانی، عملکردی و ایمونولوژی شود. همچنین D-پرولین سم عصبی و تبدیل L-پرولین به D-پرولین باعث مسمومیت کلیه و کبد می شود (۲ و ۴ و ۵).

### اثر مایکروویو بر محصولات کشاورزی

**ویتامین ها:** انرژی کوانتومی امواج مایکروویو در مقایسه با سایر انواع پرتوهای الکترومغناطیسی (پرتوهای X و Y) بسیار کم است، با چندین مرتبه بزرگی، که نمی تواند با برهمکنش مستقیم با مولکول ها و پیوندهای شیمیایی، تغییرات شیمیایی ایجاد کند. لین و همکاران (۱۹۹۸) اثرات خشک کردن مایکروویو تحت خلاء را بر خواص فیزیکی، ارزش های غذایی و کیفیت حسی برش های هویج در مقایسه با خشک کردن معمولی با هوای گرم مورد مطالعه قرار داد. خشک کردن با هوا باعث کاهش میزان آلفا و بتا کاروتن شد، در حالی که کاهش آلفا کاروتن با خشک کردن خلاء مایکروویو کم تر رخ داده است. مجموع از دست دادن آلفا و بتا کاروتن در طول خشک کردن برای نمونه های خشک شده در هوا بیشتر از نمونه های خشک شده در خلاء مایکروویو بود. خشک کردن خلاء مایکروویو ۷۹ درصد ویتامین C حفظ شد. در حالی که در خشک کردن با هوا این مقدار بسیار کم تر بود (۵).

### ویتامین C

لین و همکاران (۱۹۸۵) میزان اسید اسکوربیک چهار سبزی را که با مایکروویو و روشهای معمولی (آب جوشاندن و بخارپز کردن) بلانچ شده بودند مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که به استثنای نخود فرنگی پوسته بنفش با بخار، حفظ اسید اسکوربیک تحت تأثیر روش بلانچینگ قرار نگرفت. دریک و همکاران (۱۹۸۱) تأثیر روش بلانچینگ را بر کیفیت سبزیجات انتخابی مورد مطالعه قرار داد. مارچوبه و لوبیا سبز با آب و بخار بلانچ شده غلظت اسید اسکوربیک مشابهی داشتند و هر دو در اسید اسکوربیک نسبت به محصول بلانچ شده با مایکروویو برتری داشتند. نخود سبز بلانچ شده با امواج مایکروویو و بخار حاوی اسید اسکوربیک کمتری نسبت به نخود سبز بلانچ شده با آب بود. رامش و همکاران (۲۰۰۲) حفظ ویتامین C در بلانچینگ مایکروویو را در مقایسه با آب بلانچینگ برای سه سبزی اسفناج، فلفل دلمه ای و هویج ارزیابی کردند. از دست دادن ویتامین C در بلانچینگ مایکروویو برای اسفناج ۱۸ درصد، فلفل دلمه ای ۸.۵ درصد و برای هویج ۳۳.۵ درصد کاهش یافت. حفظ ویتامین C در سبزیجات بلانچ شده با امواج مایکروویو به طور قابل توجهی بیشتر بود. حفظ بهتر کیفیت مواد مغذی را می توان با اجتناب از تلفات شستشو که در طی فرآیند معمولی بخار یا آب بلانچ رخ می دهد توضیح داد. از نتایج می توان بیان کرد که سبزیجات بلانچ شده با انرژی مایکروویو مغذی تر از سبزیجاتی هستند که با آب بلانچ معمولی در همان دما گرم می شوند. مقادیر حفظ ویتامین C برای سبزیجات بلانچ شده در مایکروویو که در مقالات موجود است. خرایشه و همکاران (۲۰۰۴) ویژگی های کیفی سیب زمینی را بر اساس حفظ اسید اسکوربیک (ویتامین C) در طول خشک کردن مایکروویو و همرفتی ارزیابی کردند، نمونه های خشک شده در شرایط مایکروویو غلظت بسیار بیشتری از اسید اسکوربیک را در مقایسه با نمونه های خشک شده در هوا حفظ کردند. نمونه های خشک شده در مایکروویو تقریباً ۷۵ درصد از میزان اولیه ویتامین C را حفظ کردند، در حالی که نمونه های خشک شده در هوا (۳۰ درجه سانتی گراد) کمتر از ۳۰ درصد از میزان اولیه ویتامین C را حفظ کردند. حتی در شرایط با قدرت مایکروویو بالاتر حفظ ویتامین C از ۴۵ درصد فراتر رفت. نمونه های خشک شده

در مایکروویو حداقل دو برابر ویتامین C نمونه‌های خشک شده همرفتی را حفظ کردند. کاراتاس و کامیسی (۲۰۰۷) مطالعه ای را برای تعیین تغییرات ویتامین ها A، C و E و (مالون دی آلدئید در زردآلو) با استفاده از خشک کن های مادون قرمز و مایکروویو انجام دادند. ویتامین A، C و E نمونه های زردآلو خشک شده در خشک کن مایکروویو بیشتر از خشک کن مادون قرمز است. همچنین مقادیر مالون دی آلدئید در نمونه‌های زردآلو خشک شده با مایکروویو بیشتر از نمونه‌های زردآلو خشک مادون قرمز است. از این رو، آنها به این نتیجه رسیدند که استفاده از خشک کن مایکروویو برای زردآلو از نظر حفظ ویتامین A و E و مقادیر مالون دی آلدئید بسیار مؤثرتر از خشک کن مادون قرمز است.

#### پروتئین

Kaasova و همکاران (۲۰۰۲) تغییرات شیمیایی و بیوشیمیایی را در طی عملیات مایکروویو گندم مورد مطالعه قرار داد و تأثیر حرارت دادن مایکروویو بر میزان گلوتن مرطوب را تعیین کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که حرارت دادن گندم با مایکروویو تا دمای ۴۸ درجه سانتیگراد هیچ تغییری ایجاد نمی کند، در حالی که حرارت دادن به دمای بالای ۷۹ درجه سانتی گراد باعث کاهش قابل توجهی در زجاجیت دانه، مقادیر رسوب SDS، میزان گلوتن مرطوب، حجم و کیفیت نان می شود.

#### دیگر ترکیبات:

عامل محدود کننده کاهش مصرف حبوبات وجود  $\alpha$ -galactooligosaccharides و سایر عوامل ضد تغذیه ای است. کادلک و همکاران (۲۰۰۱) مطالعاتی را برای تعیین تغییرات کربوهیدرات های محلول در طول جوانه زنی و حرارت دادن و خشک کردن دانه های نخود در مایکروویو انجام داد. نخودهای نمونه اجازه داده شد تا جوانه بزنند و سپس با مایکروویو تیمار شدند و در آن هوای خشک با فن تا رطوبت نهایی ۱۲-۱۴ درصد خشک شدند. نتایج آنها نشان داد که در طی ۳ روز اول جوانه زنی میزان گالاکتوالیگوساکاریدها کاهش یافت و زمان خشک شدن به طور قابل توجهی با تیمار مایکروویو کاهش یافت.

سیب خام حاوی غلظت بالایی از فنولیک ها و فلاونوئیدها است، که خطر ابتلا به سرطان و بیماری قلبی عروقی را کاهش می دهد و به سلامت کمک می کند. (کنکت و همکاران، ۱۹۹۶؛ پیرسون و همکاران، ۱۹۹۹؛ ابرهارد و همکاران، ۲۰۰۰ به نقل از جرارد و رابرتز، ۲۰۰۴)، اما غلظت فنول ها و فلاونوئیدها در آب میوه و سیب پس از فرآوری آب میوه به شدت کاهش می یابد. عملیات حرارتی پوره میوه برای افزایش غلظت ترکیبات فنلی در آب میوه و همچنین عملکرد موثر ثابت شده است. اما اکثر عملیات حرارتی آب میوه ای با خواص تحلیلی و حسی غیر قابل قبول تولید می کنند. انرژی مایکروویو این مزیت را دارد که سریعتر گرم می شود، در نتیجه آنزیم ها را سریعتر غیرفعال می کند و قهوه ای شدن را به حداقل می رساند. جرارد و رابرتز (۲۰۰۴) اثر عملیات حرارتی مایکروویو ارقام سیب: پوره فوجی و مالتنوش را بر عملکرد آب میوه، کیفیت و میزان کل فنول ها و فلاونوئیدها در آب ارزیابی کردند. عملیات حرارتی مایکروویو باعث افزایش تولید آب میوه و غلظت کل فنول ها و فلاونوئیدها شد. لین و بروور (۲۰۰۵) تأثیر تیمارهای مختلف بلانچینگ مانند روش های بخار، آب و مایکروویو را بر ویژگی های کیفی نخود فرنگی منجمد مطالعه کردند. نخودهای بلانچ شده در مایکروویو برابر یا سبتر از نخودهای بلانچ شده با روش های دیگر بود. طعم و عطر و میزان اسید اسکوربیک نخودهای بلانچ شده در مایکروویو با نخودهای بلانچ شده مرسوم قابل مقایسه بود. Devecce و همکاران (۱۹۹۹) مایکروویو، عملیات حرارتی مرسوم و ترکیبی را برای آنالیز غیرفعال سازی آنزیمی از بلانچ کردن قارچ مقایسه کرد. در قارچ، پلی فنول اکسیداز آنزیم اصلی مسئول قهوه ای شدن است. روش مرسوم برای غیرفعال کردن پلی فنل کسیداز شامل روش های اتوکلاو و بلانچینگ است که منجر به کاهش کیفیت غذایی در محصول می شود. مایکروویو اخیرا به عنوان جایگزینی برای بلانچ کردن قارچ معرفی شده است. تیمار ترکیبی مایکروویو و حمام آب گرم باعث غیرفعال شدن کامل پلی فنل اکسیداز در مدت زمان کوتاهی شده است و از دست دادن محتوای آنتی اکسیدانی و افزایش قهوه ای شدن در نمونه های تیمار شده با این روش ترکیبی در مقایسه با شاهد جزئی بود. Coper و همکارانش (۱۹۷۹) اثر طبخ سنتی و مایکروویو را بر روی حفظ فولاسین اسفناج منجمد و لوبیای سبز مطالعه نمودند. در حفظ فولاسین سبزیجات، اختلاف معنی داری وجود نداشت. مطالعه جدید آنها (۱۹۸۱) روی اسفناج نشان داد که حفظ این ویتامین طبخ سنتی با طبخ در مایکروویو تقریبا یکسان است. در مطالعه Chen و همکارانش (۱۹۸۳) بر روی اسفناج، بلانچینگ در آب جوش منجر به اتلاف دوبرابر فولاسین نسبت به

بلانچینگ با مایکروویو (بدون افزودن آب) شد. بدریگم و بروور (۲۰۰۱) کیفیت فیزیکی، شیمیایی و حسی نخودهای یخ زده را که با آب جوش، بخار و مایکروویو بلانچ شده در کیسه‌های قابل درزبندی حرارتی بلانچ شده بودند، مورد مطالعه قرار دادند. تفاوتی در مقادیر L وجود ندارد. نخودهای جوشانده شده با آب کمترین رنگ سبز را داشتند، در حالی که نخودهایی که در کیسه با بخار و مایکروویو بلانچ شده سبزه‌ترین بودند. جوشاندن نخودهای بلانچ شده با آب کمترین مقدار b را داشت در حالی که تفاوت معنی داری در مقادیر b برای سایر تیمارهای بلانچ وجود نداشت (۵).

#### اثر مایکروویو بر لیپیدها

غذاهای پرچرب، از جمله بادام زمینی، گوشت چرب و کره، به دلیل گرمای ویژه کم و توانایی آن در به حداقل رساندن اکسیداسیون لیپیدها، به ویژه در برابر حرارت مایکروویو آسیب پذیر هستند. گرمایش مایکروویو اکسیداسیون لیپید، پلیمریزاسیون و تجزیه حرارتی را تسریع می‌کند، اما درجه اکسیداسیون کمتری نسبت به حرارت معمولی دارد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد و متابولیت‌های ثانویه لیپید را کاهش می‌دهد. مایکروویو باعث کاهش میزان کل لیپیدها و چربی‌ها می‌شود و در عین حال باعث افزایش مقدار اسیدهای چرب و تغییر ترکیب آنها می‌شود. عواملی مانند دما، اکسیژن، نسبت اسیدهای چرب غیراشباع و تبخیر آب بر کاهش چربی تأثیر می‌گذارد. مایکروویو همچنین میزان اسیدهای چرب آزاد را افزایش می‌دهد، به طوری که اسیدهای چرب تک غیراشباع و چند غیراشباع کاهش می‌یابد و اسیدهای چرب اشباع و ترانس افزایش می‌یابد. گرمایش مایکروویو با تولید مولکول‌های فعال آنتی‌اکسیدانی، بهبود ظرفیت کیلیت فلز و کاهش عملکرد اکسیداز، قابلیت آنتی‌اکسیدانی لیپیدی را افزایش داده و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد. تشکیل اجزای فعال آنتی‌اکسیدانی در روغن را تقویت می‌کند، مکان‌های اتصال فنلی پروتئین را مختل می‌کند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد. امواج مایکروویو همچنین به طور غیرمستقیم اکسیداسیون لیپید را با تغییر ویژگی‌های پروتئین، کاهش فعالیت لیپوکسیژناز و حفظ روغن از اکسیداسیون افزایش می‌دهند (۶).

#### اثر مایکروویو بر پروتئین‌ها:

گرمایش مایکروویو با برهم زدن برهم کنش‌های درون مولکولی، ساختارهای پروتئین را تغییر می‌دهد، بر ویژگی‌های آنها تأثیر می‌گذارد و آن را به یک ماده مغذی حیاتی برای بدن انسان تبدیل می‌کند. گرمایش مایکروویو می‌تواند ساختار پروتئین‌ها را تغییر داده و باعث تغییرات ساختاری و تسریع در باز شدن آن شود. همچنین می‌تواند اثرات ساختار ثانویه را کاهش دهد و بر خواصی مانند آب‌گریزی، قابلیت هضم، امولسیون شدن، کف کردن، مقاومت ژل، اکسیداسیون و حساسیت زایی تأثیر بگذارد. امواج مایکروویو پر قدرت به دلیل تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و گروه‌های سولفیدریل، آب‌گریزی پروتئین را افزایش می‌دهند. این با افزایش محتوای کل گروه سولفیدریل افزایش می‌یابد. با این حال، پس از حرارت دادن مایکروویو، آب‌گریزی پروتئین به دلیل تبدیل سولفیدریل‌های خاص به پیوندهای دی‌سولفیدی کاهش می‌یابد. این باعث می‌شود پروتئین برای مواد کیک، چاشنی‌های سالاد و مواد مبتنی بر روغن مناسب باشد. برای جلوگیری از دناتوره شدن و تجمع بیش از حد پروتئین باید توجه دقیق شود. تیمار با مایکروویو می‌تواند هضم پروتئین را با تغییر عملکرد آنزیم، افزایش برهم کنش پروتئین-پروتئاز، و قرار دادن مکان‌های برش بیشتر برای فعالیت پروتئاز، بهبود بخشد (۷). گرمایش معمولی می‌تواند باعث باز شدن پروتئین و قرار گرفتن در معرض واکنش‌های آنزیمی شود، اما گرمایش مایکروویو با اثرات حرارتی و غیر حرارتی بهتر است. با این حال، افزایش عملیات حرارتی منجر به دناتوره‌سازی کامل پروتئین‌ها می‌شود و در نتیجه توده‌های با وزن مولکولی بزرگ‌تر و در نتیجه دسترسی به پروتئین اندونوکلئاز مشکل می‌شوند. تیمار با مایکروویو می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین را با ترویج هیدرولیز پروتئین، تولید پپتیدهای فعال و افزایش توانایی کلاته‌کنندگی فلزی بهبود بخشد. و منجر به محصولات پایدارتر و افزایش پتانسیل REDOX می‌شود. الکترون‌های توالی پپتیدی، ویژگی‌های پیوند هیدروژنی و موقعیت اسید آمینه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد. (فعالیت کیلیت یون فلزی (MIC) به پپتیدهایی با اسیدهای آمینه سولفیدریل نسبت داده می‌شود که می‌توانند فلزات سنگین را متصل کرده و عملکرد پرواکسیدانی آنها را کاهش دهند). خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین مایکروویو می‌تواند از دست دادن مواد مغذی را کاهش دهد و از آسیب پراکسیداسیون جلوگیری کند (۵ و ۷).



تیمار با مایکروویو می تواند واکنش میلارد غذا را افزایش دهد، طعم، ظرفیت آنتی اکسیدانی و آسیب پراکسید را افزایش دهد. با این حال، دارای خواص غیرقابل کنترل و پیچیده است. برای بهبود ویژگی های غذا، تحقیق در مورد فرآیند واکنش و محصولات بسیار مهم است. محدود کردن فناوری گرمایش مایکروویو، تنظیم پارامترهای داخلی مواد غذایی و افزودن ترکیبات می تواند به کاهش بروز واکنش میلارد کمک کند. تیمار با مایکروویو می تواند با ایجاد تجمع پروتئین و تغییرات ساختاری، آلرژی زایی را کاهش دهد و از هدف قرار گرفتن اپی توپ ها جلوگیری کند. همچنین می تواند پاسخ های ایمنی پروتئین طبیعی را با از بین بردن اپیتوپ ها (بخشی آنتی ژن) از طریق هیدرولیز آنزیمی کاهش دهد. با این حال، امواج مایکروویو می توانند با دنا توره کردن آلرژن های طبیعی، حساسیت زایی را افزایش دهند، که منجر به ایجاد اپیتوپ های جدید یا در دسترس قرار دادن اپیتوپ های پنهان قبلی می شود. برای جلوگیری از آلرژی کاربر، نظارت بر تغییرات آلرژی زایی غذایی مهم است. حرارت دادن مایکروویو توانایی پروتئین برای جذب آب و روغن را تغییر می دهد و مزه، طعم و سایر ویژگی های غذا تأثیر می گذارد. پلیمریزاسیون پروتئین، اسیدهای آمینه قطبی بیشتری را در معرض دید قرار می دهد و جذب آب و روغن را افزایش می دهد. باز شدن نواحی آبدوست و قرار گرفتن در معرض اسیدهای آمینه قطبی بیشتر ظرفیت جذب آب را افزایش می دهد. قابلیت جذب روغن (OBC) احساس دهانی و حفظ طعم را بهبود می بخشد. با افزایش دوره مایکروویو، OBC در ابتدا افزایش می یابد، سپس کاهش می یابد. ظرفیت امولسیون کنندگی به برهمکنش پروتئین ها با آب و روغن اشاره دارد، که بر سیستم غذایی تأثیر می گذارد. گرمایش با مایکروویو می تواند پروتئین ها را باز کند و پایداری و طعم را بهبود بخشد. عملیات خلاء مایکروویو باعث افزایش لخته شدن امولسیون می شود. حرارت دادن مایکروویو باعث افزایش ژل شدن پروتئین شده و باعث سفت شدن و غلیظ شدن ژل های از پیش ساخته شده از طریق واکنش های تبادل تیول-دی سولفید می شود. این فرآیند قرار گرفتن در معرض گروه های فنل و مرکاپتان را افزایش می دهد و دو نوع ژل پروتئینی تولید می کند: ژل های مات از نوع انعقادی و ژل های شفاف منظم، که شفافیت و ظاهر غذا را اصلاح می کند. پروتئین ها و پپتیدها با ساختارهای آمفی فیلیک به دلیل قابلیت پخش شدن در سطح مشترک آب و هوا و ایجاد یک لایه نازک با ویسکوزیته و انعطاف پذیری، عوامل کف ساز ایده آل هستند. افزایش اسیدهای آمینه آبریز ناشی از مایکروویو باعث افزایش ویسکوزیته پروتئین می شود که منجر به خواص کف سازی بهتر می شود. با این حال، فرآیند مایکروویو می تواند باعث نقص در ماتریس ژل شود.

پخت و پز در مایکروویو میزان اسید آمینه را کاهش می دهد، اما میزان اسید آمینه ضروری افزایش می یابد. عدم تحمل گرما بر اسیدهای آمینه آبریز و حاوی گوگرد تأثیر می گذارد، در حالی که میزان سیستمین بدون تغییر باقی می ماند. باید به دما، قدرت و مدت زمان توجه شود (۸ و ۱۱).

#### اثر حرارت دهی مایکروویو بر روی سایر ترکیبات

طعم غذا تحت تأثیر اجزای مختلفی مانند الکل ها، کتون ها، هیدروکربن ها، لیپیدها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه آزاد است. پخت و پز در مایکروویو با سنتز و جذب ترکیبات عطر و طعمی مانند الکل ها و اسیدهای آلی، با تغییر ساختار پروتئین و افزایش مکان های اتصال، طعم را بهبود می بخشد. با این حال، گرمایش طولانی مدت یا با قدرت زیاد مایکروویو می تواند جذب طعم را کاهش دهد. پخت و پز در مایکروویو به طور قابل توجهی بهتر از روش های سنتی در حفظ مواد مغذی است، جلوگیری از دست دادن آب و تخریب حرارتی ویتامین های A، B<sub>1</sub>، B<sub>6</sub> و B<sub>12</sub> و بهبود قابلیت استخراج آلفا-توکوفرول عمل می کند. عملیات حرارتی مایکروویو می تواند اکسیدازهای طبیعی را غیرفعال کند و حفظ ویتامین E را افزایش دهد. به دلیل پایداری حرارتی ویتامین K، حرارت دادن مایکروویو هیچ تأثیری بر آن ندارد. مایکروویو همچنین می تواند میزان مواد معدنی غذا را حفظ کند. به عنوان مثال، مقادیر سدیم، پتاسیم و فسفر در ماهی قزل آلی خام به دنبال گرمایش با مایکروویو به میزان قابل توجهی افزایش یافت. گرمایش مایکروویو از تشکیل مواد سرطان زا جلوگیری می کند، حساسیت زایی پروتئین را تنظیم می کند و تجمع اسیدهای چرب اشباع و ترانس را کاهش می دهد و واکنش های آلرژیک و بیماری های قلبی عروقی را کاهش می دهد. تولید آمین هتروسیکلیک را مهار می کند، ظرفیت آنتی اکسیدانی را بهبود می بخشد و تولید دیوکسین را کاهش می دهد. استریلیزاسیون با مایکروویو از آلودگی قارچی و باکتریایی در مواد غذایی جلوگیری می کند (۱۲ و ۶).

### مزایای مایکروویو

- ۱- مؤثر بودن انرژی، متوسط راندمان مایکروویو ۳۰-۴۰ درصد است. در حالیکه حرارت دهی به روش مرسوم راندمانی برابر ۷-۱۴ درصد دارد.
- ۲- سرعت عمل و کاهش زمان فرایند انجماد (تمپرینگ) زمان از چند روز به چند دقیقه کاهش می یابد.
- ۳- تمیز کردن آسان
- ۴- سهولت کاربرد (سهولت در استفاده از آن)
- ۵- چند منظوره بودن سیستم مایکروویو به علت وسعت دامنه تنظیم درجه حرارت، بالا بردن دمای مواد غذایی منجمد به دمای چند درجه زیر صفر، پختن، آب پز کردن و گرم کردن غذا را می توان در یک آون مایکروویو انجام داد.
- ۶- صرفه جویی در فضا مایکروویو فضای کمی اشغال می کند. طرح توسعه کارخانه به راحتی امکان پذیر است.
- ۷- صرفه جویی در امور خدماتی و پرسنلی در رستورانها و سلف سرویسهای بزرگ.
- ۸- امکان پخت بدون افزودن آب به مواد غذایی، که در سبزیجات باعث حفظ ویتامینهای محلول در آب، املاح، رنگ و طعم و بالا رفتن کیفیت ارگانولپتیکی (طعم، مزه، رنگ، بافت،...) می شود.
- ۹- حفظ اجزای ناپایدار در حرارت مانند ویتامینها و لیپیدها (به دلیل توانایی در گرم کردن سریع و یکنواخت) عدم تشکیل واکنش میلارد نیز نکته مطلوبی در اکثر فرایندها مثل پاستوریزاسیون شیر است.
- ۱۰- مکان حرارت دهی مواد بسته بندی شده می توان جهت پرهیز از آلودگی ثانویه مواد غذایی را قبل از حرارت بسته بندی کرد.
- ۱۱- امکان استفاده همزمان سیستم ماکروویو با سیستم های حرارتی دیگر نظیر بخار آب. هوای گرم و مادون قرمز.
- ۱۲- امکان از بین بردن انزیمها (بلانچینگ) بدون تراوش مواد مغذی از سبزیها و میوه جات به علت سرعت حرارت دهی.
- ۱۳- حذف سوختگی سطحی به دلیل نفوذ سریع امواج در عمق ماده غذایی. امکان فرایند مواد غذایی با ضخامت زیاد که فرایند آنها بوسیله روشهای حرارتی موجود مشکل و وقت گیر است (۹ و ۱۳).

### محدودیتها

- ۱- نامشخص بودن نقطه پایان پخت به علت عدم امکان نمونه گیری در حین فرآیند (در ماکروویو صنعتی).
  - ۲- ضعیف بودن تکنولوژی اندازه گیری درجه حرارت.
  - ۳- عدم امکان سرخ کردن غذاها به علت نفوذ امواج در عمق ماده غذایی.
  - ۴- محدود بودن تنوع تجهیزات.
  - ۵- کم بودن راندمان توان که در فرایندهای مداوم بیش از ۷۵ درصد نیست.
  - ۶- بالا بودن سرمایه گذاری ثابت ولی در صورتی که همه هزینه ها در نظر گرفته شود از فرایندهای دیگر گران تر نیست بویژه وقتی با روش های دیگر فرایند همراه باشد.
  - ۷- کوتاه بودن عمر ژنراتور.
- محدودیت در مواد اولیه بسته بندی (مواد اولیه بسته بندی می بایست امواج ماکروویو را از خود عبور داده و از طرف دیگر در مقابل عبور رطوبت و نور مقاوم باشند)
- ۹- عدم امکان استفاده از ظروف و ورقه های فلزی جهت بسته بندی مواد غذایی.
  - ۱۰- تشکیل نقاط سرد و گرم در ماده غذایی، که یکی از علتهای آن جذب متفاوت امواج توسط ترکیبات مختلف مواد غذایی است. این حالت در آونهای خانگی بیشتر از مایکروویو مداوم صنعتی روی می دهد.
  - ۱۱- امکان غیرفعال نشدن برخی از میکروبهای بیماریزا در بعضی از مواد غذایی (به عنوان مثال میکروبهای بیماریزای موجود در شیر غیرفعال می شوند اما امکان غیرفعال نشدن همان میکروبها در گوشت وجود دارد).

۱۲- عدم انجام واکنشهای شیمیایی کند و مطلوب، در کاربرد مایکروویو زمان پخت کوتاه است که تغییرات کندشیمیایی که در برخی غذاها اهمیت دارند مجال رخ دادن ندارند، لذا غذاهای پخته شده توسط مایکروویو قهوه ای رنگ نشده و تردی در آن ظاهر نمی شود، ولی بیشتر مواد فرار حفظ می شوند. در نتیجه غذا دارای طعم غیرعادی است و این امر ممکن است از مطلوبیت آن بکاهد (۴ و ۶ و ۸).

### نتیجه گیری

گرمایش با مایکروویو می تواند به طور قابل توجهی به مصرف انرژی کمتری برای آبیگری (تغلیظ) مواد غذایی نسبت به روش معمول نیاز داشته باشد. انرژی مایکروویو منابع انرژی منحصر به فردی است که ممکن است باعث کوتاه شدن زمان فرآیند، صرفه جویی در انرژی، کار و فضا و اغلب محصولات با کیفیت بهتر شود. توجه بر پیشرفت در فناوری (تکنولوژی)، تمرکز و کنترل انرژی مایکروویو امکان توسعه فرآیند مایکروویو برای صنایع غذایی و لبنیات را افزایش داده است. انتظار می رود که فرایند مایکروویو فراتر از انتظار ما رشد کند، زیرا در سالهای اخیر به دلیل افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای انواع جدیدتر غذاهای راحت تر، ارزش غذایی بیشتر و کیفیت حسی بهتری دارند.

### References;

1. Goldblith SA. Applications of microwaves in food processing. *Microwave J.* 1966; 1966:118.
2. Ramaswamy H, Van de Voort FR. Microwave applications in food processing. *Canadian Int. J. Food Sci. Technol.* 1990; Feb 23(1): 17-21.
3. Chandrasekaran S, Ramanathan S, Basak T. Microwave food processing—A review. *Food research international.* 2013 Jun 1; 52(1):243-61.
4. Guo Q, Sun DW, Cheng JH, Han Z. Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry. *J. Food Eng.* 2017; 67: 236-47.
5. Tang J, Feng H, Lau M. Microwave heating in food processing. *Advances in bioprocessing engineering.* 2002; 1: 1-43.
6. Guzik P, Kulawik P, Zając M, Migdał W. Microwave applications in the food industry: An overview of recent developments. *CRFSN.* 2022; 62(29): 7989-8008.
7. Bhatt K, Vaidya D, Kaushal M, Gupta A, Soni P, Arya P, Gautam A, Sharma C. Microwaves and radiowaves: In food processing and preservation. *IJCMAS.* 2020; 9(9): 118-31.
8. Jiang H, Liu Z, Wang S. Microwave processing: Effects and impacts on food components. *CRFSN.* 2018; 58(14): 2476-89.
9. Raghavan GV, Orsat V, Meda V. Microwave processing of foods. *Stewart Postharvest Review.* 2005; 3(2): 1-7.
10. Regier M, Knoerzer K, Schubert H. Introducing microwave-assisted processing of food: Fundamentals of the technology. In *The Microwave Processing of Foods 2017*; 1-22. Woodhead Publishing.
11. Roy I, Gupta MN. Applications of microwaves in biological sciences. *Current Science.* 200; 1685-1693.
12. Dronachari M, Yadav BK. Application of microwave heat treatment in processing of pulses. *J. Acad. Ind. Res.* 2015; 3: 401-407.
13. Abo Bakr TM. Microwave applications in food processing: An overview. *AJVS.* 2020; 17(2): 11-22.

## سخنرانی

مروری بر خواص گیاهان به‌لیمو (*Lippia citriodora* L.)، روناس صخره‌زی (*Rubia florida*)، آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)، بره موم (Propolis)، بارهنگ (*Plantago major*) و پونه (*Mentha aquatica*) بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا

فاطمه طالبی ورنوسفادرائی<sup>۱</sup>، پریسا بهشود<sup>۱</sup>

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

**مقدمه و هدف:** در دهه‌های اخیر، مصرف بی‌رویه و بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها، سبب ایجاد مقاومت‌های دارویی و پیدایش سویه‌های مقاوم گردیده است. باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند. به همین علت، محققان در تلاش هستند که با تولید داروهایی بر پایه گیاهان، جایگزینی مناسب برای داروهای شیمیایی ایجاد نمایند لذا هدف از تحقیق مروری حاضر، مطالعه و بررسی نتایج تعدادی از پژوهش‌هایی است که قبلاً در رابطه با اثر گیاهان دارویی مختلف بر روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا انجام شده بودند.

**مواد و روش‌ها:** اطلاعات مربوط به این تحقیق از طریق جست و جو کردن در پایگاه‌های اطلاعاتی نظیر Google Scholar، سایت Sid از سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۲ و با کلیدواژه‌هایی چون عصاره گیاهان دارویی، باکتری‌های بیماری‌زا، مهار رشد تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، ضد التهاب و ضد میکروب این جست و جو صورت گرفت.

**یافته‌ها:** در مجموع ۱۰ مقاله فارسی انتخاب شد که ۵ مورد از آن‌ها مورد بررسی نهایی قرار گرفت. علت عدم انتخاب سایر مقاله‌ها، دور بودن از موضوع و هدف تحقیق بود. نتایج به دست آمده از مطالعات این مقالات نشان داد که عصاره‌های گیاهان به‌لیمو (*Lippia citriodora* L.)، روناس صخره‌زی (*Rubia florida*) دارای بیشترین تأثیر بر روی باکتری‌های گرم مثبت بودند. عصاره گیاهان آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)، بره موم (Propolis)، بارهنگ (*Plantago major*) و پونه (*Mentha aquatica*)، بر روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت تأثیر قابل توجهی داشتند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به تحقیقات بررسی شده، به نظر می‌رسد که گیاهان دارویی بررسی شده این توانایی را دارند که به عنوان درمان و کنترل علائم بیماری‌های باکتریایی مورد استفاده قرار بگیرند. هم‌چنین لازم به ذکر است توصیه می‌شود بعد از شناسایی تأثیر ضدباکتریایی گیاهان دارویی، ارزیابی بر روی حیوانات آزمایشگاهی و کارآزمایی بالینی جهت تأیید نهایی انجام شود. کلمات کلیدی: گیاهان دارویی، خواص ضدباکتریایی، به‌لیمو، روناس صخره‌زی، آویشن باغی، بره موم، بارهنگ، پونه

نشانی نویسنده مسئول: پریسا بهشود، شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۱۸۶۰۴۵۸

پست الکترونیک: Parisa\_behshood@yahoo.com

## A review of medicinal plants *Lippia citriodora* L., *Rubia florida*, *Thymus vulgaris*, Propolis, *Plantago major*, and *Mentha aquatica* on some pathogenic bacteria

Fatemeh Talebi Varnosfaderani<sup>1</sup>, Parisa Behshood<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

**Background:** In recent decades, the indiscriminate and excessive using of antibiotics has led to the emergence of drug resistance and resistant strains of pathogenic bacteria. Consequently, there is a pressing need among researchers to explore suitable alternatives to chemical drugs. One potential avenue of investigation involves the development of plant-based drugs. As such, the purpose of this review research is to examine and evaluate the findings of numerous previous studies that have investigated the effects of various medicinal plants on multiple pathogenic bacteria.

**Materials and Methods:** To conduct this research, relevant information was systematically sourced from databases such as Google Scholar and the Sid site, over the period from 1399 to 1402. Keyword searches were employed, focusing on topics such as medicinal plant extracts, pathogenic bacteria, growth inhibition, immune system modulation, anti-inflammatory properties, and antimicrobial activity.

**Findings:** A total of 10 Persian articles were identified, out of which 5 underwent thorough scrutiny for the final review. The rationale for excluding the remaining articles stemmed from their divergence from the research topic and objectives. Analysis of the selected articles revealed that extracts derived from lemongrass (*Lippia citriodora* L.) and *rubia florida* plants exhibited the most pronounced impact on Gram-positive bacteria. Furthermore, extracts derived from *Thymus vulgaris*, Propolis, *Plantago major*, and *Mentha aquatica* plants displayed substantial effects against both Gram-negative and Gram-positive bacteria.

**Conclusion:** Based on the findings obtained through this comprehensive review, it can be inferred that the investigated medicinal plants possess the potential to be employed for the treatment and management of bacterial diseases. It should be highlighted that further studies are required to evaluate the antibacterial properties of these medicinal plants in laboratory animals and to conduct clinical trials for ultimate confirmation.

**Keywords:** Herbal Plants, Antibacterial effects, *Lippia citriodora* L., *rubia florida*, *Thymus vulgaris*, Propolis, *Plantago major*, *Mentha aquatica*.

### مقدمه

در سال‌های اخیر نگرش مردم اکثر کشورهای دنیا به مصرف داروهای گیاهی افزایش یافته است. به نظر می‌رسد داروهای گیاهی عوارض جانبی کمتر نسبت به استفاده از داروهای شیمیایی دارند. داروهایی که امروزه در دنیا به طور وسیعی برای درمان انواع بیماری‌هایی چون عفونت‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی تا انواع بیماری‌های متابولیک به کار می‌روند، منشأ طبیعی دارند (۱ و ۲). این ترکیبات نه فقط در درمان بیماری‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نقش دارند، بلکه به طور همزمان می‌توانند اثراتی که اغلب با مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی همراه هستند را هم کاهش دهند (۱ و ۲). این موارد به همراه عارضه جانبی بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها سبب شده است که محققین و دانشمندان همواره به دنبال آنتی‌بیوتیک‌هایی با اثرات جانبی کمتر باشند. به همین دلیل منابع طبیعی، به خصوص استفاده از گیاهان دارویی گامی در جهت درمان و ریشه‌کن کردن بیماری‌هاست (۳). در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای بررسی و ارزیابی اثرات ضد میکروبی ترکیباتی با منشأ گیاهی از جمله عصاره‌ها و اسانس‌ها صورت گرفته و نتایج بیانگر توانایی این ترکیبات برای جلوگیری از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است (۴).

/شرشیا کلی یکی از شایعترین علل عفونت باکتریایی رایج در انسان و حیوانات است. این باکتری باعث انتریت، عفونت مجاری ادراری، سپتی‌سمی و سایر عفونت‌های بالینی مانند مننژیت نوزادان می‌شود. درمان عفونت‌های /شرشیا کلی با ظهور سویه‌های مقاوم به درمان در سراسر جهان عمدتاً به دلیل گسترش عناصر ژنتیکی متحرک مانند پلاسمیدها مشکل است و امروزه سویه‌های مقاوم به درمان /شرشیا کلی مشکلات زیادی را در انسان‌ها ایجاد میکنند (۵).

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

انتروباکتر آئروژنز و انتروباکتر کلواکه دو پاتوژن اغلب جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در میان جنس انتروباکتر هستند. این ارگانسیم‌ها به عنوان فلور گوارشی طبیعی انسان‌ها عمل می‌کنند و پاتوژنهای فرصت‌طلب هستند (۶). از سال ۲۰۱۰، انتروباکتر آئروژنز در فرانسه پنجمین باکتری انتروباکتریاسه و هفتمین باسیل گرم منفی است که عامل عفونت‌های بدخیم بیمارستانی است و امروزه سویه‌های مقاوم به درمان آنها هزینه‌ها و آسیب‌های زیادی را در انسان‌ها ایجاد می‌کنند (۷).

استرپتوکوکوس پیوژنز گروه A، پاتوژن باکتریایی گرم مثبت مهم است که باعث طیف وسیعی از شرایط بالینی از فارنژیت تا عفونت‌های تهاجمی شدید می‌شود. میزان مرگ و میر گزارش شده و عفونت‌های آن بین ۱۰ تا ۳۰ درصد متغیر است (۸). استافیلوکوک‌ها گروه متنوعی از باکتری‌ها هستند که سبب ایجاد بیماری‌هایی از عفونت‌های پوستی خفیف تا کشنده می‌شوند. علیرغم تلاش‌های گسترده برای کنترل شیوع آن‌ها، این گروه از باکتری‌ها به عنوان عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اجتماعی در سراسر جهان هستند. تنها در محیط بیمارستان، این گروه مسئول بیش از یک میلیون عفونت جدی در سال بوده و دو پاتوژن فرصت‌طلب اصلی این جنس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بخش قابل توجهی از جمعیت انسانی را تهدید می‌کنند که امروزه به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی مقاوم شده‌اند (۹).

### معرفی گیاهان بررسی شده در این مطالعه

#### ۱- به لیمو (*Lippia citriodora* L.)

به لیمو یک گیاه معطر از خانواده شاه‌پسند بومی آمریکا جنوبی بوده که دارای خواص دارویی ارزشمندی است. به لیمو درختچه‌ای پایا است که در مناطق گرمسیر همیشه‌سبز است ولی در مناطق سرد در زمستان برگ‌های خود را از دست می‌دهد بیضی شکل و نوک تیز بوده و ۳ تا ۴ برگ از یک نقطه ساقه منشعب می‌شود. رنگ داخل جام آن آبی مایل به بنفش و خارج آن سفید است و به صورت سنبله‌های متعدد در قسمت انتهایی ساقه ظاهر می‌شود. در طب سنتی از این گیاه، برای درمان سرماخوردگی، تب، اسپاسم، درد معده، تشنج، سرگیجه و تپش قلب استفاده می‌شود. عصاره این گیاه حاوی ترکیبات فنولی و دارای خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضد درد و آنتی‌اکسیدانی است (۹ و ۱۰ و ۱۱).

#### ۲- گیاه روناس صخره‌زی (*Rubia florida*)

گیاه روناس صخره‌زی در زمان گذشته در صنعت رنگ‌رزی استفاده می‌شده است. روناس در زمره گیاهان رنگ دار صنعتی و دارویی بشمار می‌آید. ریشه روناس حاوی گلیکوزیدهایی به نام اسید روبرتیک، آلیزارین، پورپورین، روبیارین، مواد پکتیکی، رزین و کلسیم است. ریشه روناس دارای خاصیت مدر، صفرابر، ملین و تا حدودی اوره خون را کاهش می‌دهد. یکی از ویژگی‌های آن حلال سنگ‌های مثانه و کلیه است. روناس گیاهی فوق‌العاده مقاوم به شوری و شوری خاک تا ۳۰٪ درصد را به خوبی تحمل می‌کند. در آفریقا و منطقه آسیا می‌روید. ریشه‌های این گیاه پس از خشک شدن و در مجاورت با آب چسبناک می‌شود. برداشت روناس معمولاً در آخر پاییز انجام می‌شود. این گیاه دارای اثرات دارویی مختلفی از جمله ضد سرطان و نقرس می‌باشد. این گیاه برای درمان ناراحتی‌های کلیوی و مثانه استفاده می‌شود و آرامش‌بخش، ضد عفونی‌کننده، ضد سرطان و آنتی‌اکسیدان است. علاوه بر این، گیاه روناس دارای اثر ضد میکروبی بوده و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به این گیاه حساس تر می‌باشند (۱۲ و ۱۳).

#### ۳- آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)

آویشن باغی یکی از شناخته شده ترین گیاهان گلدار از خانواده نعنائیان (*Lamiaceae*) است که برای طعم دادن انواع محصولات غذایی، سس‌ها، گوشت‌ها، غذاهای کنسروی و تهیه برخی نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود. از جمله خواص دارویی این گیاه می‌توان به اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری و ضد التهابی، مسکن درد معده و دردهای قاعدگی، ضد تشنج، تقویت کننده دستگاه عصبی اشاره نمود همچنین این گیاه دارای اثرات درمانی و اثرات ضد قارچی علیه برفک دهانی انسان است (۱۴ و ۱۵).

#### ۴- بره موم (Propolis)

بره موم ماده‌ای رزینی شبیه موم و از تولیدات زنبور عسل است، حالت آن خمیری شکل و چسبناک با بوی مطبوع که رنگ آن از سبز تا قهوه‌ای تیره متغیر است. رنگ و عطر بره موم در مناطق مختلف متفاوت بوده و خصوصیات آن بستگی به نوع گیاهان موجود در هر منطقه دارد. بره موم، در هوای سرد، ترد و شکننده و در هوای گرم، نرم و چسبناک می‌شود. بره موم به واسطه خواص میکروب کشی آن در کشورهای مختلف نیز کاربرد وسیعی در بهداشت و درمان برخی از بیماری‌ها داشته و امروزه به اشکال مختلف از جمله صابون، کپسول، پماد، خمیردندان در بسیاری از کشورها استفاده می‌شود (۱۶).

### ۵- بارهنگ (*Plantago major*)

گیاه بارهنگ با نام علمی *Plantago major* یک گیاه چند ساله دارای ریزوم، بدون ساقه واضح و کرک است که برگ‌های طوقه‌ای و دم‌برگ نیز دارد. از این گیاه برای درمان ناراحتی‌های تنفسی، تصفیه خون، تب بر، ضد اسهال، کاهنده دردهای رماتیسمی، ضد التهاب کلیه و مثانه استفاده می‌شود و همچنین دارای خاصیت است. به علاوه از این گیاه می‌توان در درمان خون‌ریزی‌های ریوی، التهابات روده‌ای، بیماری‌های کبدی، استفراغ، عفونت‌های مجاری تنفسی، التهابات چشمی، کولیت و مالاریا استفاده کرد. کرم بارهنگ نیز قادر است جوش‌های صورت، جوش‌های جوانی، زخم‌های پوستی را به طور چشم‌گیر بهبود ببخشد (۱۷).

### ۶- پونه آبی (*Mentha aquatica*)

پونه آبی با نام علمی *Mentha aquatica* نوعی گیاه معطر است که در ایران ۶ گونه از فلور را به خود اختصاص داده است. گونه‌های این جنس به طور کلی تحت عنوان نعناع و پونه معروف می‌باشند، که پونه آبی در جاشیه جریان آب‌های ملایم و کم عمق یافته می‌شود. برگ‌های این گیاه به عنوان طعم دهنده مواد غذایی استفاده می‌شود. این گیاه هم‌چنین دارای اثراتی چون خواص ضدباکتریایی، کمک به بهبود اختلالات گوارشی، استفراغ، کولیت اولسراتیو، و اختلالات کبدی می‌باشد (۱۸).

## مواد و روش‌ها

اطلاعات مربوط به این تحقیق از طریق جست و جو کردن در پایگاه‌های اطلاعاتی نظیر Google Scholar، سایت Sid از سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۲ و با کلیدواژه‌هایی چون عصاره گیاهان دارویی، باکتری‌های بیماری‌زا، مهار رشد تعدیل کننده سیستم ایمنی، ضد التهاب، ضد میکروب این جست و جو صورت گرفت. بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه ایزدی و همکاران در سال ۲۰۲۳ اثر ضد میکروبی عصاره به لیمو بر باکتری‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفیموریوم* به روش دیسک دیفیوژن، چاهک در آگار بررسی شد و حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین شد. در هر ۲ روش بررسی شده عصاره به لیمو بیشترین تأثیر را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان داد. عصاره اتانولی گیاه به لیمو دارای اثر ضد میکروبی قوی‌تری بر باکتری‌های گرم مثبت بود. آنها اظهار کردند می‌توان از عصاره به لیمو در صنایع غذایی و دارویی به عنوان یک ماده طبیعی ضد میکروبی استفاده کرد (۱۱).

در مطالعه نوشاد و همکاران در سال ۱۴۰۰، اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی گیاه روناس علیه باکتری‌های *انتروباکتر آئروژنز اشرشیا کلی*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به روش دیسک دیفیوژن و چاهک آگار بررسی شد. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حساس‌ترین باکتری نسبت به این عصاره بود و به صورت کلی باکتری‌های گرم مثبت در مقابل گرم منفی نسبت به عصاره حساسیت بیشتری داشتند (۱۳).

نتایج مطالعه علمیرادی و همکاران، ۱۴۰۰ نشان داد عصاره اتانولی آویشن باغی در غلظت ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر، اثرات ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسایتوژنز دارد. اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی آویشن باغی از تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا، و لیستریا مونوسایتوژنز بیشتر بود. میزان MIC و MBC پایین عصاره اتانولی آویشن باغی می‌تواند نشان دهنده اثرات ضد میکروبی مشخص گیاه در غلظت‌های پایین باشد که استفاده از آن را به صرفه و اقتصادی می‌کند. با توجه به نتایج بدست آمده، پیشنهاد می‌شود از عصاره اتانولی آویشن باغی به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی خوراکی در مواد غذایی (به صورت خوراکی یا به عنوان چاشنی) استفاده شود (۱۵).

در مطالعه اسکندری نیا و همکاران تاثیر تداخلی عصاره الکی بره موم، اسانس آویشن و نانو ذرات نقره روی باکتری ها و مخمر کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی بره موم زنبور عسل ایران (استان آذربایجان غربی)، اسانس آویشن و نانوذرات نقره هم بصورت انفرادی و هم بصورت تداخلی بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر مهارکنندگی داشته است. تداخل تیمارهای ترکیبات طبیعی مانند بره موم و اسانس آویشن می‌تواند همان اثرات انفرادی هر کدام از تیمارها را داشته باشد و این نویدی بر اینکه ما بتوانیم ترکیبات طبیعی را جایگزین ترکیبات شیمیایی و سنتزی نماییم (۱۹).

در مطالعه عزیزی و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و الکی گیاهان بابونه، بارهنگ، پونه آبی و گزنه بر باکتری کلبسیلا پنومونیه و مقایسه اثر آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق مشخص گردید که عصاره‌های آبی و الکی گزنه در غلظت‌های ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب هاله‌های به اندازه ۱۰ و ۱۱ میلی متر علیه کلبسیلا پنومونیه ایجاد کردند. در این تحقیق اثر بهینه عصاره آبی و اتانولی گیاهان مورد مطالعه علیه کلبسیلا پنومونیه بود که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به گیاه بابونه و کمترین اثر مربوط به گیاه بارهنگ ارزیابی شد. با توجه به این نکته که گیاهان دارویی به دلیل ماهیت طبیعی با بدن سازگاری بهتری داشته و دارای عوارض جانبی کمتری هستند. لذا با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیک، نتایج این مطالعه حائز اهمیت می‌باشد (۲۰). عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های بیماری‌زا نسبتاً شایع است و با توجه به این که این باکتری‌ها مقاومت نسبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از خودش نشان می‌دهند و حتی می‌توانند منجر به مرگ افراد شوند باید مورد توجه بیشتری قرار بگیرند. از همین روی، ما در این مطالعه بر آن شدیم که مطالب مقالات قبلی را جمع آوری و به صورت یک مقاله ارائه کنیم تا در راه کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دنیای امروز گامی برداشته باشیم. با توجه به مقالات بررسی شده نیاز هست در تحقیقات بر روی گیاهان دارویی چند مورد در نظر گرفته شود:

- I. مطالعات علاوه بر سطح آزمایشگاهی در سطح بالینی هم انجام شود و با توجه به اینکه این دو مرحله مکمل یکدیگر هستند، بدون چنین مطالعاتی نمی‌توان تایید کرد که این گیاهان موثر هستند.
- II. در بعضی از مطالعات ماده موثره ترکیبات گیاهی مشخص نشده و با توجه به این نکته نمی‌توان فهمید کدام ماده گیاه خاصیت ضدباکتریایی دارد.
- III. با توجه به مناطق مختلف آب و هوایی کشور، گیاهان مناطق مختلف اثرات متفاوتی می‌توانند از خودشان نشان دهند، به همین علت نیاز است تحقیق گسترده‌تری در این زمینه انجام شود و از یک نوع گیاه چند نمونه از سراسر کشور جمع‌آوری گردیده و مورد مطالعه قرار بگیرد.
- IV. در مطالعات نیاز هست علاوه بر سویه‌های بالینی، از سویه‌های استاندارد هم استفاده شود تا مطالعات با داده‌های گسترده‌تر و دقیق‌تر فراهم شود.



## References:

1. Fathi A, Sahari M, Zangiabadi M, Barzegar M. [Application of *Satureja hortensis* L and *Zataria multiflora* Boiss essential oils as two natural antioxidants in soybean oil during microwave heating (Persian)]. *Journal Med Plants*. 2011;10(39):12-21.
2. Shojaee-Aliabadi S, Hosseini H, Mohammadifar MA, Mohammadi A, Ghasemlou M, Ojagh SM, et al. Characterization of antioxidant-antimicrobial K-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *Int J ournal Biol Macromol*. 2013; 52:116-24.
3. Taleb H, Maddocks SE, Morris RK, Kanekanian AD. The antibacterial activity of date syrup polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*. *Front Microbiol*. 2016; 7:198. [DOI:10.3389/fmicb.2016.00198]
4. Kozłowska M, Laudy AE, Przybył J, Ziarno M, Majewska E. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. *Acta Pol Pharm*. 2015; 72(4):757-67.
5. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013;10(12):6235-54.
6. Ronveaux O, De Gheldre Y, Glupczynski Y, Struelens M, De Mol P. Emergence of *Enterobacter aerogenes* as a major antibiotic-resistant nosocomial pathogen in Belgian hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*. 1999;5(10):622-7.
7. Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6.
8. Terao Y. The virulence factors and pathogenic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Oral Biosciences*. 2012;54(2):96-100.
9. 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. *J Bacteriol*. 2005;187(7):2426-38.
10. Ombito JO, Salano EN, Yegon PK, Ngetich WK, Mwangi EM. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (verbenaceae family). *J Sci Innov Res*. 2014; 3(4):460-66. [DOI:10.31254/jsir.2014.3411]
11. Z, Mirazi N. [Antioxidant and Antimicrobial Properties of Ethanolic Extract of Lemon Verbena (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J*. 2023; 16(10):816-829.
12. Alesheikh P, Feyzi P, Moghaddam PZ, Mohammadi A, Kasaian J, Nezhad AA, et al. Antibacterial Activity of Methanolic Extract of Some Native Medicinal Herbs of North Khorasan Province on *Staphylococcus aureus*. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*. 2019;11(2):59-65.
- ۱۳
13. Noshad M, Alizadeh Behbahani B, Rahmati Joneid abad M. Antimicrobial effect of *Rubia florida* on pathogenic bacteria in vitro. *Iranian journal of infectious disease and tropical medicine*. 2022. 27(96):39-48.
14. Fani M, Kohanteb J. In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*. 2017;22(4):660-6.
15. Alimoradi M, Ataie Kachoie M, Moattar F. Study the antimicrobial effects of ethanolic extract of *Thymus vulgaris* on foodborne bacteria in vitro. *Journal of Food Microbiology*. 2022;9(2):23-32

16. FATTOLLAHI, Mehrdad. The Comparison of Therapeutic Effect of Propolis Extract and Phenytoin on the Wound of Koi Fish *Cyprinus carpio haematopterus*. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 2017, 30(1): 22-32
17. Shiri P, Arasteh A, Tajaddod G. Evaluation of phytochemical, antioxidant, and inhibitory properties of *Plantago major L.* seeds hydroalcoholic extract on amyloid nanofibrils production. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 2023, 39(2):203-212.
18. Alizadeh Amoli Z, Mehdizadeh T, Tajik H. Comparative study of antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha aquatica* L. Ethanol extract and essential oil. 2021. 31(11):863-873.
19. Eskandarnia M, Ahmady-asbchin S, Ounag A. Interfering Effects of ethanolic extract of Propolis, *Thymus vulgaris* essential oil and Silver Nanoparticles on bacteria and *Candida albicans* in vitro observation. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2023 22;36(2):176-85.
20. Azizi Alidoust F, Anvari M, Ataei Jaliseh S. Antimicrobial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of Chamomile, Fleawort, Aquatic Pennyroyal and Nettle Plants on *Klebsiella pneumoniae* and Comparing Their Effects with Common Antibiotics. *Iran J Med Microbiol*. 2020; 14 (4):361-373

## بررسی آلودگی های زیست محیطی سیگار

عباس جعفری<sup>۱,۲\*</sup>، سکینه قادری<sup>۳</sup>

۱. گروه عمران، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. مرکز تحقیقات انرژی و محیط زیست، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. گروه مطالعات اجتماعی، آموزش پرورش استان چهارمحال و بختیاری، شهرکرد، ایران.

## چکیده

آلودگی زیست محیطی ناشی از استفاده و دفع سیگارها و سیگارهای الکترونیکی در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است. این مقاله به تحلیل آلاینده‌ها، منابع تولید آنها، و تأثیرات زیست محیطی که این دو نوع سیگار ممکن است داشته باشند، می‌پردازد. به رغم اطلاعات گسترده‌ای که در مورد تأثیرات سیگار بر سلامت انسان وجود دارد، یک تأثیر کمتر شناخته‌شده از استفاده و دفع محصولات تنباکو، آلودگی زیست محیطی است. این بررسی به بررسی راه‌های آلودگی سیگار و سیگارهای الکترونیکی در زمینه منابع و تأثیرات زیست محیطی آنها می‌پردازد، با تمرکز بر تأثیرات ثبت‌شده بر بیوتا، از جمله باکتری‌ها تا پستانداران. سیگارهای استفاده‌شده و اجزای سیگارهای الکترونیکی ممکن است آلاینده‌ها را به خاک، آب و هوا منتقل کنند. فیلترهای سلولز استات که از جنس دهانه‌ها ساخته شده‌اند، دارای حد اقل قابل تجزیه هستند و منبع آلاینده‌های پلاستیکی و میکروپلاستیکی هستند، به خصوص در اکوسیستم‌های آبی که در آنها تمایل به تجمع دارند. سوختن سیگار و تولید ائروسول در حین استفاده از سیگارهای الکترونیکی باعث آلودگی هوا از راه‌های *exhaled, sidestream* و *thirdhand* می‌شود. فرآیند استفاده از محصولات تنباکو باعث آلودگی آبهای پساب، نشت مواد آلاینده از زباله‌ها و زهاب‌های شهری می‌شود. یافته‌های گسترده از نیکوتین و کوتینین در محیط نشان‌دهنده پتانسیل برای تأثیرات زیست محیطی گسترده از زباله محصولات تنباکو هستند. مطالعات نشان می‌دهند که شیرابه مکان دفن زباله حاوی ته سیگار و نیکوتین برای میکروب‌ها، گیاهان، ارگانسیم‌های بنتوس، دوکفه‌ای‌ها، زوپلانکتون، ماهیان و پستانداران سمی می‌باشد؛ با این حال، هنوز گذرگاه‌های اطلاعات بحرانی مربوط به تأثیرات زیست محیطی زباله محصولات تنباکو بر سلامت زیست محیطی و عملکرد اکوسیستم راه‌اندازی نشده است.

**واژگان کلیدی:** زباله‌های سیگار، کوتینین، آلودگی محیطی، میکروپلاستیک، نیکوتین، زباله محصولات تنباکو.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۸۵ همراه: ۰۹۱۳۲۸۲۵۴۹۵

پست الکترونیک: jafari.iaushk@gmail.com

## Examination of Environmental Pollution from Cigarettes

Abbas Jafari<sup>1,2\*</sup> Sakineh Ghaderi<sup>3</sup>

1. Department of Civil Engineering, ShahreKord Branch, Islamic Azad University Shahrekord, Iran.
2. Center for Energy and Environmental Research, ShahreKord Branch, Islamic Azad University, ShahreKord, Iran.
3. Department of Social Studies, Education and Training Organization of Chaharmahal and Bakhtiari Province, ShahreKord, Iran.

### Abstract

Environmental pollution resulting from the use and disposal of cigarettes and electronic cigarettes is investigated in this article. The study delves into the analysis of pollutants, their sources, and the potential environmental impacts associated with these two types of cigarettes. Despite extensive information on the health effects of smoking, a less recognized impact of tobacco product use and disposal is environmental pollution. This review explores the avenues of pollution from cigarettes and electronic cigarettes in terms of sources and their environmental effects, with a focus on documented impacts on biota, ranging from bacteria to mammals. Used cigarettes and components of electronic cigarettes may transport pollutants to soil, water, and air. Cellulose acetate filters, constructed from mouthpieces, are minimally biodegradable and serve as a source of plastic and microplastic pollutants, particularly accumulating in aquatic ecosystems. The combustion of cigarettes and aerosol production during the use of electronic cigarettes contribute to air pollution through sidestream, exhaled, and thirdhand pathways. The process of using tobacco products leads to wastewater pollution, leakage of pollutants from waste, and urban runoff contamination. Extensive findings of nicotine and cotinine in the environment indicate the potential for wide-ranging environmental impacts from tobacco product waste. Studies demonstrate that leachates from landfill sites containing cigarette butts and nicotine are toxic to microbes, plants, benthic organisms, copepods, zooplankton, fish, and mammals. However, critical information pathways related to the environmental impacts of tobacco product waste on ecological health and ecosystem performance have yet to be fully explored.

**Keywords:** Cigarette butts; Cotinine; Environmental pollution; Microplastics; Nicotine; Tobacco product waste

### مقدمه

استفاده از محصولات تنباکو گسترده است و به طور جهانی ادامه دارد. بیش از شش تریلیون سیگار سوزان به صورت سالانه در سراسر جهان تولید و مصرف می‌شوند [۱،۲]. علاوه بر این، استفاده از سیگارهای الکترونیک (سیگارهای الکترونیک) به شدت افزایش یافته است و فروش آنها به سرعت در حال رشد است [۳]. در ایالات متحده (USA)، حدود ۶۰ میلیون عدد سیگار الکترونیک سال به فروش می‌رسد [۴]. سیگارهای الکترونیک به ویژه میان جوانان و جوانان بسیار محبوب هستند [۵،۶،۷]. رفتارهای دیگری که در حال رشد در میان مردم است شامل استفاده از نیلوفر آبی [۸] و استفاده از محصولات تنباکوی گرم شده که به تازگی توسط اداره غذا و داروی ایالات متحده (FDA) تأیید شده‌اند [۹]. تأثیرات سیگار بر سلامت انسان به طور گسترده شناخته شده است، مرگ و میر مرتبط با تنباکو که سالانه به حدود هشت میلیون نفر در سراسر جهان می‌رسد [۱۰]. یک اثر کمتر شناخته شده از استفاده و دفع محصولات تنباکو، تأثیر غیرمستقیم بر کرامت انسان از طریق آلودگی محیطی است که ممکن است به ارائه خدمات بحرانی اکوسیستمی مانند آب تمیز، هوای پاک و تولید مواد غذایی مختلف آسیب بزند [۱۱]. دود، قطره‌های مایع (قسمت ذراتی از دود تنباکو) و پسماندهای سیگارها و سیگارهای الکترونیک، شامل تعداد زیادی ترکیب سمی از جمله نیکوتین، هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌حلقوی (PAH) و فلزات هستند. تریلیون‌ها سیگار سوزان آلاینده (CB) سالانه در محیط زیست دفع می‌شوند که CBها به عنوان آیت‌های پسماندی جهانی، به ویژه در مناطق ساحلی، رواج دارند [۱]. با گذر زمان و تجزیه و تحلیل CBها، این‌ها می‌توانند مواد آلاینده را به خاک، آب سطحی و آب زیرزمینی منتقل کنند و انواع مختلفی از مواد آلاینده را که برخی از آنها ممکن است در شبکه‌های غذایی تجمع یابند، بر حیات در معرض قرار دهند [۱۲ و ۱۳]. CBها اصلاً از فیلترهایی از استات سلولز تشکیل شده‌اند که بیشتر به تجزیه زیستی مقاوم هستند و CBها منبع قابل توجهی برای آلودگی پلاستیکی فیبری به محیط زیست هستند [۱۴]. پسماندهای مرتبط با سیگارهای الکترونیک شامل کپسول‌های قابل تعویض با باقیمانده‌های غلیظ نیکوتین، باتری‌ها و مدارهای

الکترونیکی هستند که نیز ممکن است مواد آلاینده را در آب و خاک آزاد کنند [۱۵]. مناطقی که توسط نوجوانان و جوانان پرچمدار می‌شوند، از جمله مدارس، مکان‌های مهمی برای زباله‌های سیگارهای الکترونیکی هستند که بسیاری از آنها از استفاده از محصولات تنباکوی مزه‌دار ناشی می‌شود [۱۶]. هدف این مرور گذشته از تمرکز اخیر بر CBها است و قصد دارد به مطالعات فعلی در زمینه آلودگی از سیگار و سیگارهای الکترونیکی بپردازد، با تأکید بر منابع محیطی و تأثیرات بر انواع مختلف از جلبک‌ها تا پستانداران. این مقاله تکمیلی بر اساس مطالعات و بررسی‌های اخیر است که بر اهمیت دفع CBها تأکید دارند [۱۸، ۱۷، ۱۱، ۱].

### آلاینده‌ها

#### نیکوتین

الکلوئید نیکوتین (۳- (۱-متیل-۲-پیرولیدینیل)پیریدین) یکی از فراوان‌ترین ترکیبات در محصولات تنباکو است. هر سیگار حاوی حدود ۷ تا ۱۵ میلی‌گرم نیکوتین است که بستگی به نوع برند دارد [۱۹]. حداکثر تنها حدود ۲۰ درصد از آن نیکوتین به صورت سیستمیک توسط مصرف‌کنندگان جذب می‌شود [۲۰] و مابقی نیکوتین و ترکیبات تبدیلی آن با محصولات سوخت‌سوز یا در فیلتر سیگار باقی می‌مانند یا با ترکیبات مختلف موجود در دودها و یا در فیلترهای سیگار جا می‌مانند. مسیرهای آلودگی نیکوتین به محیط‌ها در طول دوره حیات تنباکو از کشت تنباکو و تولید سیگار [۲] تا سوخت‌سوزی سیگار [۲۱]، دفع سیگارها [۱۳، ۲، ۱] و گذر نیکوتین و متابولیت‌های آن، به ویژه کتینین و ترانس-۳-هیدروکسیکتینین، به جریان فاضلاب‌های انسانی [۲۲] ادامه دارد. با توجه به استفاده تاریخی آن به عنوان مه دود و حشره‌کش، فشار بخار نیکوتین به خوبی مشخص شده است. در دمای محیط، دمای اشتعال آن نسبتاً پایین است (حدود ۵۶ پاسکال در ۲۵ درجه سانتی‌گراد). این مقدار حدود ۳۵ برابر کمتر از فشار بخار ۱۰۴-دی‌کلروبنزن (۱،۴-DCB) است که یک ترکیب شاخص اکوتوکسیسی است؛ با این حال، مانند بیشتر ترکیبات، فشار بخار نیکوتین با افزایش دماهای مرتبط با سوخت‌سوزی تنباکو به شدت افزایش می‌یابد [۲۳]. اینکه آیا نیکوتین به مقدار قابل توجهی به عنوان بخار پخش می‌شود یا خیر، به شرایط محیطی وابسته است. مولکول نیکوتین دارای دو گروه نیتروژن اساسی است ( $pK_{a1} = 3.12$ ،  $pK_{a2} = 8.02$  در ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و می‌تواند به عنوان یک باز نیتروکس یا به صورت نمک‌های مونوپروتونه و دی‌پروتونه وجود داشته باشد. فرم آزاد نیکوتین بیشترین تمایل را دارد که از فاز آب یا جامد به فاز هوا منتقل شود. به عنوان مثال، افزودن آمونیاک به تنباکوی سیگار می‌تواند pH را در طول سوخت‌سوزی تنباکو افزایش دهد، که منجر به کاهش تقسیم‌بندی نیکوتین به ذرات دود می‌شود و تغییر اشکال به فرم آزاد، قابل بخار، بیشتر می‌شود [۲۴].

#### نیتروزامین‌های خاص تنباکو

نیکوتین و سایر الکلوئیدهای تنباکو محصولات جانبی سمی و پتانسیل‌دار با کارایی کارسینوژنیک افزایشی تولید می‌کنند، که به نام نیتروزامین‌های خاص تنباکو یا TSNAs شناخته می‌شوند و در فرآیند خشک کردن پس از برداشت و هنگام سوزاندن ایجاد می‌شوند [۲۵]. در فرآیند خشک کردن تنباکو، TSNAs ناشی از واکنش‌های نیکوتین با اسید نیتریک هستند. اصلی‌ترین TSNAs مورد نگرانی در تنباکو شامل نیتروسواناباسین (NAB)، نیتروسواناتابین (NAT)، N'-نیتروسونورنیکوتین (NNN) و ۴-(متیل‌نیتروزامینو)-۱-(۳-پیریدیل)-۱-بوتانول (NNK) هستند. این ترکیبات به میزان قابل ملاحظه‌ای در دود تنباکو و به میزان کمتری در اثر و سل سیگارهای الکترونیکی یافت شده‌اند [۲۶]. NNN و NNK به شدت کارسینوژنیک هستند [۲۵]. تنباکو دارای دیگر TSNAs نیز است که شامل نیتروزامین‌های ۴-(متیل‌نیتروزامینو)-۱-(۳-پیریدیل)-۱-بوتانول (NNAL)، ۴-(متیل‌نیتروزامینو)-۳-(پیریدیل)-۱-بوتانول (NNAL) و ۴-(متیل‌نیتروزامینو)-۳-(پیریدیل)-۱-بوتانول (NNAL) و ۴-(متیل‌نیتروزامینو)-۳-(پیریدیل)-۱-بوتانول (NNAL) هستند. استفاده از تر تنباکو نیز حاوی نیتروزامین‌های غیر قابل بخار است [۲۷].

#### هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای PAHs

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای ترکیبات آلی هستند که از حلقه‌های آروماتیک متعدد تشکیل شده‌اند و نتیجه سوخت ناقص مواد آلی هستند. دود اصلی و دود دست دوم (SHS) شامل تعداد زیادی از PAHs هستند که عمدتاً در قسمت قطران ذرات جامد موجود هستند [۲۸، ۲۹، ۳۰]. قطران دود تنباکو حاوی حدود ۰/۰۲ درصد وزنی PAHs است [۲۹]. در حالی که بسیاری از PAHs

در قطران به عنوان مواد کارسینوژن شناخته شده‌اند، اما تنها آنها به توکسیسیته قطران دود تنباکو دلیل نمی‌شوند، که به ماهیت پیچیده این ماده اشاره دارد [۲۹]. بیشترین PAHS در قطران دود تنباکو شامل نفتالین با وزن ملکولی پایین دو حلقه، فلورن و فنانترن با وزن ملکولی سه حلقه هستند. همچنین ترکیباتی با وزن ملکولی بالا، بنزو[a]پایرن، یک ترکیب آروماتیک پنج حلقه است که به عنوان یک ماده سرطانزای گروه یک برای انسان‌ها دسته‌بندی شده است PAHS غیر قطبی و آب‌گریز هستند، و بسیاری از PAHS، به ویژه آنهایی با وزن ملکولی پایین‌تر، به میزان قابل قبولی در آب حل می‌شوند، بخارپذیر و توسط میکروارگانیسم‌های خاکی و آبزیان قابلیت تجزیه پذیری دارند [۳۱-۳۰] و تمایل دارند در محیط‌ها مانند دود، گرد و غبار، خاک و رسوبات که انتقال PAHS را در هواهای آزاد [۳۳،۳۲] و در خاک و آبهای زیرزمینی [۳۴] تسهیل می‌کنند، بر روی ذرات جمع شوند. یکبار وارد محیط شده، سرنوشت PAHS به ویژگی‌های فیزیکی هر PAH، شرایط دما و رطوبت وابسته است PAHS ممکن است در محیط‌ها تا دهه‌ها باقی بمانند زمانی که به قوی به خاک جذب شده و کمتر قابل دسترس یا در محیط‌های آلاینده صنعتی با غلظت‌ها یا وضعیت‌های گلومره‌ای(نوعی بیماری که دو کلیه را درگیر می‌کند) حاضر باشند [۳۵،۳۶].

#### فلزات و متالوئیدها

گیاه تنباکو یعنی *Nicotiana tabacum* می‌تواند فلزات را از خاک به راحتی جذب کند [۳۷-۳۹]. به همین دلیل، محصولات تنباکویی مانند سیگارها ممکن است در فلزات غنی شده باشند و مصرف و دفع بعدی آنها می‌تواند یک منبع اضافی برای آلودگی فلزات به محیط زیست باشد [۴۰-۴۲]. در حالی که عناصر اساسی تقریباً همه در خاک ممکن است در بافت گیاه تنباکو یافت شوند و بسیاری از این عناصر نگرانی‌هایی در مورد انسان و ایجاد تماس با دود سیگار دارند، زیرمجموعه‌ای نیز برای محیط زیست ذخیره می‌شوند. این عناصر شامل فلزات کادمیوم، کروم، سرب، جیوه، نیکل و روی، و همچنین فلز نقره می‌شوند. همه این عناصر به صورت طبیعی در خاک وجود دارند، اما غلظت‌های بالاتر به حضور رسوبات زیرین دریا، کاربردهای کشاورزی از پسماندهای شهری یا صنعتی، حضور مواد آسیب‌پذیر یا زغال‌سنگ، استفاده بیش از حد از کودهای فسفر آلوده به طبیعت و تراکم بارش‌های جوی نسبت داده می‌شوند [۴۳-۴۲].

#### منابع آلودگی

#### پوسته‌های سیگار

پوسته‌های سیگار یا CBS که به علاوه فیلتر ممکن است شامل باقیمانده‌های تنباکو، خاکستر و مواد شیمیایی و قطره‌های دود سیگار باشد، یکی از پراکنده‌ترین اشکال زباله محصولات تنباکو در سراسر جهان هستند. هر ساله تخمین زده می‌شود که حدود ۴.۵ تریلیون پوسته سیگار به محیط زیست پراکنده می‌شود [۱۳]، معمولاً در مناطق شهری نزدیک به مکان‌های خدماتی، هاب‌های حمل و نقل عمومی و ورودی‌های اماکن آموزشی و زمین بازی‌ها [۴۵]. بسیاری از پوسته‌های سیگاری که به طور پراکنده واقع می‌شوند، وارد رودخانه‌ها [۴۶] و محیط‌های ساحلی [۱] می‌شوند. سازمان حفاظت از اقیانوس گزارش داد که در رویداد سالانه تمیزکاری ساحلی بین‌المللی آنها در سال ۲۰۱۹، ۴.۲ میلیون پوسته سیگار جمع‌آوری شد، که دومین مورد بیشترین تعداد جمع‌آوری شده در این رویداد بود [۴۷]. با توجه به حضور گسترده و پایدار آنها در محیط زیست، علاقه به ارزیابی تأثیرات زیست‌محیطی پوسته‌های سیگاری که دور انداخته شده‌اند [۴۸-۵۲] در حال افزایش است.

سلولز استات پوسته‌های سیگار یک پلاستیک ترکیبی است که از واکنش سلولز از پنبه و چوب با آنیدرید استاتیک و اسید استاتیک به دست می‌آید [۵۳]. پوسته‌های سلولز استات سیگار در محیط زیست پایدار هستند. این پوسته‌ها نسبت به فتوتخریب حساس هستند، اما نسبت به تجزیه و تحلیل زیستی نسبتاً مقاوم هستند و ممکن است ماه‌ها تا سال‌ها طول بکشد تا تجزیه شوند وابسته به شرایط محیطی [۵۴-۵۵]. پسماند پوسته سیگار منبع قابل ملاحظه‌ای از آلودگی پلاستیک به محیط زیست است [۵۶،۱۴]. آزمایشات تازه در تخریب نشان می‌دهند که پوسته‌های سیگار همچنین یک منبع مزمن از میکروفیبرهای سمی پلاستیکی به محیط زیست هستند [۵۷].

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

زمانی که سیگارهای قابل سوزان تداخل شوند، ترکیبات هوایی متغیر، قیر شیمیایی، جرم ذراتی از دود تنباکو و پسماندهای جامد باقی مانده از خاکستر و سیگارهای دودی تولید می‌شوند. دود سیگار، انتشار هوایی از سیگارهای قابل سوزان، شامل هزاران ترکیب شیمیایی می‌شود که بسیاری از آنها سمی هستند، از جمله منواکسیدکربن، نیکوتین، فرمالدهید، هیدروکربن‌های حلقوی پلی‌هسته‌ای (PAH)، نیتروزامین‌های تخصصی تنباکو (TSNA)، فلزات و دیوکسین‌ها [۲۷]. دود شراره‌زا (SHS) اصلی‌ترین منبع آلودگی هوا از مصرف سیگار است و شامل دود اصلی از دهان دودوروا و دود جانبی از یک سیگار یا محصول تنباکوی سوخته شده است [۲۸]. بیشتر تحقیقات در مورد SHS بر روی محیط داخلی تمرکز دارد [۵۸]؛ با این حال، چندین مطالعه نشان می‌دهد که دود تنباکو می‌تواند یک منبع آلودگی هوایی خارجی، شامل نیکوتین، ذرات ریز، و تیپ‌های خاص تنباکو تخصصی نیتروزامین‌ها، باشد [۲۷، ۵۹-۶۰]. در برخی موارد، آلاینده‌های دود تنباکو در محیط‌های داخلی بدون منبع دودی داخلی نیز یافت شده‌اند [۲۱، ۶۱، ۶۲].

#### سیستم‌های مدیریت پسماند

چندین مطالعه متابولیت‌های نیکوتین را در جریان و جریان خروجی ایستگاه‌های تصفیه فاضلاب اندازه‌گیری کرده‌اند [۶۳-۶۱، ۶۲]. منشاء اصلی این ترکیبات از انتشار مستقیم از سموم استفاده‌کنندگان است. نیکوتینی که از محصولات تنباکو به بدن جذب می‌شود، در کبد انسان به ترکیبات مختلفی تبدیل می‌شود، به ویژه کوتینین و ترانس-۳-هیدروکسیکوتینین، و اصلاً از طریق ادرار آزاد می‌شوند [۶۴]. به نسبت جذب‌شده نیکوتین، ادرار به طور معمول حاوی حدود ۵-۱۰٪ نیکوتین، حدود ۱۰-۳۰٪ کوتینین، حدود ۳۵-۴۵٪ ترانس-۳-هیدروکسیکوتینین و مجموعه‌ای از متابولیت‌های کوتینین کمتر دیگر است [۶۲، ۶۳-۶۶]. نرخ معمولی افزایش معادل نیکوتین برای یک کدام کننده فرضی، با فرض ۱.۲۵ میلی‌گرم نیکوتین‌میزان نیکوتین متابولیتی که به ازای هر سیگار و با نرخ مصرف روزانه ۱۲ سیگار در روز، حدود ۱۵ میلی‌گرم در روز است [۶۲].

ارزیابی جامعی از ایستگاه‌های تصفیه فاضلاب در زوریخ، سوئیس، مقدار کوتینین را در حدود ۱.۵-۲.۹ میکروگرم بر لیتر و ۳۰-۹۵ میکروگرم بر لیتر در جریان ورودی فاضلاب اندازه‌گیری کرد [۶۷]. نیکوتین در یک ایستگاه تصفیه فاضلاب نزدیک به بارسلونا، اسپانیا، در غلظت‌هایی از ۱۰۰ تا ۳۲۵۰ میکروگرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. در بسیاری از مطالعات، مشاهده شده است که در طول فرآیند تصفیه، مقدار قابل توجهی از نیکوتین، کوتینین و ۳۰-هیدروکسی کوتینین حذف می‌شود. چرا که نیکوتین در فاضلاب ممکن است از منابع دیگر (مانند سیگارهای دورانداخته شده، پتچ‌های نیکوتین و ذرت‌خالی‌های نیکوتین) نشأت بگیرد و احتمالاً در محیط قابل تجزیه بیشتری داشته باشد، کوتینین به عنوان نشانگر بهتری از مصرف سیگار در نظر گرفته می‌شود [۲۲]. برخی از متابولیت‌های جزئی، مانند N-formylornicotine، به نظر می‌رسد در طی فرآیند تصفیه فاضلاب مقاوم به تجزیه باشند و به همین دلیل می‌توانند به عنوان نشانگرهای آلودگی سیگار استفاده شوند [۶۷]. مطالعات همچنین پیگیری آب‌های دریافتی نزدیک را انجام داده و نیکوتین و متابولیت‌های آن را در آب‌های سطحی کشف کرده‌اند [۶۷، ۲۲-۶۸]. در یک ارزیابی جامع از آب‌های سطحی در ایالات متحده، کوتینین یکی از پنج مواد شناخته‌شده‌ترین مواد بوده‌است، که بر جلوه گسترده ماهیت آلودگی به دلیل استفاده از تنباکو در محیط زیست اشاره می‌کند [۶۹].

#### نکات مرتبط با مدیریت پسماند

استفاده‌های گسترده از سیگارها و دیگر محصولات تنباکو با آلاینده‌هایی نظیر نیکوتین و کوتینین به منابع آب زیرزمینی به عنوان آلاینده‌ها مرتبط شده‌اند که ممکن است با استفاده و دفع سیگارها مرتبط باشند. در مقایسه با آب‌های سطحی، آلودگی آب زیرزمینی کمتر وسیع به نظر می‌رسد [۶۹، ۷۰]؛ با این حال، نیکوتین و کوتینین در آب زیرزمینی نزدیک به تخلیه‌های تانک‌های فاضلاب مشاهده شده‌اند [۷۴-۷۱]. تخلیه فاضلاب سومین درمانی بازیافت‌شده برای آبیاری و شارژ آب زیرزمینی همچنین می‌تواند یک منبع برای کوتینین در محیط باشد [۷۶، ۷۵]. یکی دیگر از منابع آلاینده‌های انسانی در آب زیرزمینی، مخصوصاً در سیستم‌هایی که از سامانه‌های مدرن حاوی نشتی محیط زیست برخوردار نیستند، سردخانه‌ها هستند [۷۷]. دو مطالعه درباره آلودگی ارثی از سردخانه‌های بدون لایه در ایالات متحده، کوتینین را در آب زیرزمینی شناختند، اما نتوانستند به طور قطع منابع آن را به دفع پسماند محصولات تنباکو مرتبط کنند.

## تأثیرات زیست محیطی

### میکروسیستم‌ها

میکروسیستم‌ها شامل پروکاریوت‌ها (باکتری‌ها از جمله باکتری‌ها و سیانوباکتری‌ها)، یوکاریوت‌ها (اوکاریا مانند قارچ‌ها و پروتوزوا)، همزیستی‌ها (برای مثال، ارتباطات گیاه-قارچ) می‌شوند. تأثیرات زیست محیطی اجزای مختلف سیگار و آلاینده‌های مرتبط با آن بر محیط زیست را بررسی می‌کند. این تأثیرات شامل اثرات مخرب بر میکروسیستم‌ها، اکوسیستم‌های آبی، جانوران و سایر عوامل زیست محیطی است.

میکروارگانیسم‌ها شامل پروکاریوت‌ها (باکتری‌ها از جمله باکتری‌ها و سیانوباکتری‌ها، و آرکتا)، یوکاریوت‌ها (از جمله قارچ‌ها و پروتوزوا) و روابط همزیستی (به عنوان مثال گره‌های ریشه گیاه یا لیکن‌ها) و ویروس‌ها هستند. این ارگانیسم‌ها به ترکیبات محیطی در آب‌های شور و شیرین، خاک و لایه‌های رسوبی، و سیستم‌های پردازش پسماند (به عبارت دیگر، تمام بخش‌های محیطی که زباله‌های سیگار ممکن است در آنها جمع شوند [۷۸]) واکنش نشان می‌دهند. همانند سایر گیاهان کشاورزی، توتون دارای یک میکروبیوم متنوع و پویا است [۷۹،۸۰] که شامل انواع زیادی از ارگانیسم‌های میکروبی مرتبط با سیگار و باکتری‌های پاتوژن انسان شناخته شده می‌شود [۸۱]. وارد کردن میکروب‌های مرتبط با توتون به داخل دهان انسان ممکن است میکروبیوم را تغییر دهد، همانند اتفاقاتی که در استفاده از تنباکو بدون دود، سیگار کشیدن، و ویپینگ رخ داده است [۸۵-۸۲]. مطالعات اخیر همچنین به تفاوت‌های مشاهده شده در میکروبیوم روده افراد بزرگتر دودی نسبت به غیر دودی، و همچنین نوزادان و کودکان مواجه با دود سوم [۸۶،۸۷] اشاره دارند.

تجزیه و تحلیل میکروبی از مواد زائدات تنباکو ممکن است بر تقدیر و ریسک زیست محیطی این مواد تأثیر بگذارد؛ با این حال، تجزیه و تحلیل میکروبی به عوامل زیادی وابسته است، از جمله اینکه آیا مواد مورد تجزیه و تحلیل برای میکروارگانیسم‌ها سمی هستند یا خیر. نیکوتین به عنوان یک ماده سمی برای ارگانیسم‌های بالاتر شناخته شده و همچنین می‌تواند ضد میکروبی باشد [۸۸]. اوروپسا و همکاران به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر نیکوتین برای باکتری دریایی و بیبریو فیشری سمی حاد نیستند، با مقدار اثر غیرمشاهده (NOEC) کمتر از ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر نیکوتین [۸۹]؛ با این حال، بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها [۹۰] و قارچ‌ها [۹۱] قادر به متابولیسم نیکوتین هستند. به عنوان مثال، در خاک آلوده به زائدات تنباکو، افزودن یک سلسله باکتریایی تجزیه کننده نیکوتین از جنس *پسودوموناس* منجر به افزایش جمعیت این باکتری‌ها در زمان تجزیه شد [۹۲].

### گیاهان

علاقه مندی به درک جذب گیاهان نیکوتین از محیط، جزئیات زیادی از شناسایی نیکوتین در بافت‌های گیاهان در محصولات مختلف غذایی و سایر محصولات گیاهی مانند ادویه‌جات و چایها برمی‌گردد. این گیاهان برای سنتز داخلی نیکوتین شناخته نمی‌شوند و غلظت‌های بالای نیکوتین در بافت‌های آنها در شرایطی که از حشره‌کش‌های حاوی نیکوتین استفاده نشده باشد، یافت می‌شود. غلظت‌های بالای نیکوتین در گیاهان مشاغل محصولی نگران کننده هستند که ممکن است منجر به خروج محصول از بازار شده و زیان اقتصادی برای کشاورزان و توزیع کنندگان شود. به عنوان پاسخ به سطوح غیرمنتظره بالای آلودگی نیکوتین، اتحادیه اروپا سطح موقت بیشینه باقی مانده نیکوتین در محصولات محموله را افزایش داد تا بازار این محصولات را به ندرت ببیند و زنجیره تأمین را مسخره نکند [۹۳].

نیکوتین همچنین ممکن است از طریق انتقال افقی از گیاهان اهداکننده به گیاهان پذیرنده در سیستم گیاه و خاک حرکت کند. این می‌تواند به صورت مستقیم بین دو گیاه زنده رخ دهد، یا به صورت غیرمستقیم از طریق تجزیه باقیمانده‌های بافت گیاه پذیرنده که در زمان پیری بافت گیاه یا از محصولات دخالت‌ناپذیر حاوی نیکوتین مانند سایبان‌های سیگار، در خاک ریخته می‌شوند اتفاق بیفتد. انتقال نیکوتین بین گیاهان زنده احتمالاً اساساً از انتزاع ریشه‌ای توسط گیاه اهداکننده [۹۴] و سپس جذب نیکوتین توسط گیاه



پذیرنده در نزدیکی رشد کنار گذاشته می‌شود؛ با این حال، اهمیت انتقال نیکوتین از طریق شبکه‌های میکوریزایی مشترک بین گیاهان [۹۵].

### حیوانات غیر پستاندار

بسیاری از تحقیقات محدود در زمینه اثرات زباله‌های محصولات تنباکو بر حیوانات مرتبط با سیگارها در محیط است [۵۷]. یک مطالعه اخیر توسط Venugopal و همکاران مجموعه‌ای از ترکیبات شامل نیکوتین، هیدروکربن‌های پلی‌هسته‌ای ((PAHs، فلزات، فتالات و ترکیبات آلی هوازای که برای ایجاد سمیت زیادی برای ارگانسیم‌های آبی شناخته شده‌اند، در لیچیت از سیگارهای دودی جمع‌آوری شده از محیط زیست را اندازه‌گیری کرد. یک مطالعه دیگر نشان داد که لیچیت از سیگارهای دودی جمع‌آوری شده از محیط زیست در محیط دریایی تولید مثل کوپود ((Notokra sp) را در غلظت‌های پایین زیان زنده می‌کند [۹۶]. Dobaradaran و همکاران [۹۷] اخیراً سمیت سیگارهای دودی برای ارگانسیم‌های آبی را مرور کردند و نشان دادند که لیچیت سیگارهای دودی برای طیف وسیعی از حیوانات آبی از جمله زوپلانکتون آب شیرین، صدف‌های دریایی، قورباغه‌ها، جنین‌های قورباغه، ماهیان دریایی و آب شیرین سمی است. در یک مطالعه دیگر، Slaughter و همکاران [۹۸] سمیت لیچیت از سیگارهای دودی را بر روی ماهیان ارزیابی کردند. آن‌ها گزارش دادند که لیچیت از سیگارهای دودی، که شامل فیلتر دودی به همراه با باقیمانده تنباکو هستند، برای هر دو گونه تاپ‌اسملت در آب شور ((Atherinops affinis و مینوی فات‌هد ((Pimephales promelas سمی است. غلظت کشنده که در آن ۵۰ درصد افراد آزمایشی مرد (یعنی LC50) حدود یک سیگار در هر لیتر آب بود برای هر دو گونه مشاهده شد. توجه شود که اثرات منفی غیر کشنده اما مشاهده‌پذیر، به ویژه ناتوانی حرکت اصلی، در غلظت‌های کمتر لیچیت سیگار مشاهده شد. در ادامه، در ادبیات مدرکی اثرات غیر کشنده بر حیوانات از آلاینده‌های مرتبط با تنباکو، مانند تغییرات توسعه‌ای، فیزیولوژیکی یا مزمن در رفتار، که ممکن است منجر به از دست دادن سلامتی با تأثیرات بعدی بر جمعیت‌ها شود، گزارش شده است [۹۷]. Belzogui و همکاران اخیراً نشان دادند که میکروفیبرمیگویان آبی دریایی ((Mytilus edulis به نیکوتین که از CB های سلولزی استخراج می‌شود وارد می‌شوند، در حالی که CB های سلولزی اسیتات این اثر را ندارند [۹۹].

### تأثیرات اقتصادی آلودگی

هرچند هزینه‌های مرتبط با مصرف تنباکو در حوزه بهداشت ارزیابی شده‌اند [۱۰۰]، اما در تحقیقات تا کنون شاهد یک شکاف مهم در مورد هزینه‌های مرتبط با تأثیرات زیست‌محیطی مرتبط با استفاده و دفع سیگارهای سوختنی و سیگارهای الکترونیکی هستیم. یک نگرانی خاص مربوط به فیلتر سیگار استات سلولزی در سیگارهای سوختنی است، یک نوع پلاستیک که همانطور که پیش‌تر ذکر شد، از تخریب محدودیت‌هایی برخوردار است [۵۴] و میکروپلاستیک را به محیط زیست انتقال می‌دهد [۵۷]. این بار اقتصادی ممکن است به دلیل محدوده مشکلات پسماند CB، به خصوص اینکه مردم عموماً نمی‌دانند که CBها پلاستیک هستند و دفع غیررسمی آن‌ها جزء عادت‌های مربوط به سیگار است [۱۰۲، ۱۰۱]، معنی‌دار باشد. بسیاری از CBهای مصرفی در مکان‌های عمومی به محیط شهری پرتاب می‌شوند به جای دفن در ظروف مناسب [۹۲]. افزوده شدن به بار CBها زباله مرتبط با افزایش استفاده از سیگارهای الکترونیکی است [۱۶].

پاکسازی و دفع پسماندهای محصولات تنباکو، بسیاری از آن به مصرف سیگارها مرتبط است، یک جدایی اقتصادی منفی است، که می‌توان آن را به عنوان یک اثر زیان‌بار برای یک شخص ثالث که به‌طور مستقیم در معامله شرکت نداشته و از طریق آن کمپانی‌ها تعویض نمی‌شوند، تعریف کرد. این اثر خارجی بر عهده غیرسیگاری‌ها، مالکان مکمل، جوامع و گروه‌های اختیاری که پاکسازی انجام می‌دهند، قرار دارد. صنعت تنباکو با ارائه "روی کار بیاورید قربانی را" بیشتر به حمایت از مسئولیت سیگاریان و اجرای مقررات زباله‌ها پرداخته است، به جای سیاست‌های پیشگیرانه مانند حذف فیلترهای پلاستیکی از سیگار [۱۰۳، ۱۱۳]. شهر علاوه بر اثرات مستقیم مرتبط با پاکسازی زباله، تأثیرات غیرمستقیمی وجود دارد که نیازمند ارزیابی دقیق‌تر می‌باشند. پسماندهای سیگار کیفیت محیط زیست را با آلودگی مناطق ساحلی، خراب کردن مناطق عمومی مانند پارک‌ها و تخریب محله‌ها و فضاهای عمومی کاهش می‌دهند [۱۰۴]. چنین تأثیرات غیرمستقیمی بر محیط زیست ممکن است به عواقب اقتصادی قابل توجهی منتهی شود به دلیل کاهش ارائه

خدمات اکوسیستمی نظیر تأمین غذا، خدمات تنظیمی نظیر تصفیه آب و پسماند، و خدمات فرهنگی و زیبایی از جمله گردشگری و تفریح [۱۰۵]. آلودگی پلاستیک مرتبط با زباله‌های سلولز استات سیگار، سیگارهای الکترونیکی یا کشیش‌های پلاستیکی نیز احتمالاً تأثیر زیست‌محیطی قابل توجهی دارد. آلودگی پلاستیک به طور قابل توجهی بر ارائه خدمات اکوسیستمی تأثیر می‌گذارد، به ویژه در محیط‌های دریایی [۱۰۶]. افزایش خطر حریق ساختمانی و جنگلی ناشی از دفع نادرست CBها باعث بروز حدود ۱۳۰,۰۰۰ حریق در سال در ایالات متحده شده و منجر به هزینه‌های بیش از ۲ میلیارد دلار مربوط به آتش‌نشانی و ۶ میلیارد دلار خسارت مالی می‌شود [۱۰۷, ۱۰۸].

### نتیجه‌گیری

آلودگی مرتبط با زباله‌های سیگار بسیار گوناگون است و شامل: نیکوتین؛ متابولیت‌های اصلی آن مانند کوتینین و ترانس-۳-هیدروکسی کوتینین؛ نیتروزامین‌های ویژه تنباکو؛ فلزات؛ و هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌هسته (PAHs) می‌شود. برخی از این ترکیبات ممکن است در محیط زیست نسبت به زمان کوتاه (برای مثال نیکوتین) فرا برونند، در حالی که دیگران ممکن است پایدار باقی بمانند (برای مثال فلزات و PAHهای بزرگتر) یا در زیست محیطی (مانند نیکوتین، کوتینین و فلزات) تجمع یابند. برخی از آلاینده‌ها (برای مثال فلزات و آلاینده‌های آلی) ممکن است به علت ارتباط آن‌ها با نانوذرات تولید شده در حین سوخت‌وساز در محیط زیست، حمل و نقل تسهیل شده داشته باشند. در حالی که آلاینده‌های شیمیایی مرتبط با آلودگی سیگار به خوبی مشخص شده‌اند، سرنوشت آن‌ها در محیط زیست، از جمله در سیستم‌های آبی که معمولاً پایانه برای آلاینده‌های مرتبط با محصولات تنباکو هستند، مشخص نیست. نیکوتین، کوتینین و ترانس-۳-هیدروکسی کوتینین نشانگرهای مهمی از آلودگی سیگار در محیط زیست هستند. برخلاف PAHها و فلزات، این ترکیبات منابع طبیعی کمتری دارند که ممکن است به مشکلات مربوط به منبع نشان‌دهی منجر شوند. به نظر می‌رسد که کوتینین به‌طور متداولتر از نیکوتین در مطالعات محیطی نظارت شود، احتمالاً به دلیل اینکه می‌تواند به همراه یک مجموعه از آلاینده‌ها توسط استخراج فاز جامد و کروماتوگرافی مایع/طیف‌سنج جرمی اندازه‌گیری شود. برعکس، نیکوتین نیاز به روش‌ها و درمان‌های تحلیلی متفاوتی دارد به دلیل مقدار بالای PK آن. مطالعات محیطی باید تلاش کنند نیکوتین را به همراه کوتینین اندازه‌گیری کنند، به ویژه که نیکوتین سم قوی‌ای در محیط زیست است. همچنین، با توجه به اینکه نیکوتین و کوتینین ممکن است از منابع غیرتنباکویی نیز مشتق شوند، نرخ آزاد شدن شیمیایی‌های سیگار به خصوص در آب و هوا به خوبی مشخص نشده و نیازمند تمرکز بیشتری در تحقیقات است.

### References:

1. Araújo, M.C.B.; Costa, M.F. A critical review of the issue of cigarette butt pollution in coastal environments. *Environ. Res.* 2019, 172, 137–149. [CrossRef]
2. Novotny, T.E.; Bialous, S.A.; Burt, L.; Curtis, C.; Costa, V.L.D.; Iqtidar, S.U.; Liu, Y.; Pujari, S.; Tursan d'Espaignet, E. The environmental and health impacts of tobacco agriculture, cigarette manufacture and consumption. *Bull. World Health Organ.* 2015, 93, 877–880. [CrossRef]
3. Pisinger, C.; Døssing, M. A systematic review of health effects of electronic cigarettes. *Prev. Med.* 2014, 69, 248–260. [CrossRef]
4. Marynak, K.L.; Gammon, D.; Rogers, T.; Coats, E.M.; Singh, T.; King, B.A. Sales of Nicotine-Containing Electronic Cigarette Products: United States, 2015. *Am. J. Public Health* 2017, 107, 702–705. [CrossRef] *Sustainability* 2021, 13, 12994 16 of 25
5. Cullen, K.A.; Gentzke, A.S.; Sawdey, M.D.; Chang, J.T.; Anic, G.M.; Wang, T.W.; Creamer, M.R.; Jamal, A.; Ambrose, B.K.; King, B.A. e-Cigarette Use Among Youth in the United States, 2019. *JAMA* 2019, 322, 2095. [CrossRef]

6. European Commission. Special Eurobarometer 458 Attitudes of Europeans towards Tobacco and Electronic Cigarettes; Report; European Union: Brussels, Belgium, 2017; ISBN 978-92-79-69104-1.
7. Gentzke, A.S.; Creamer, M.; Cullen, K.A.; Ambrose, B.K.; Willis, G.; Jamal, A.; King, B.A. Vital Signs: Tobacco Product Use Among Middle and High School Students—United States, 2011–2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2019, 68, 157–164. [CrossRef]
8. Maziak, W.; Ben Taleb, Z.; Bahelah, R.; Islam, F.; Jaber, R.; Auf, R.; Salloum, R.G. The global epidemiology of waterpipe smoking. *Tob. Control* 2015, 24, i3–i12. [CrossRef]
9. Simonavicius, E.; McNeill, A.; Shahab, L.; Brose, L.S. Heat-not-burn tobacco products: A systematic literature review. *Tob. Control* 2019, 28, 582–594. [CrossRef]
10. World Health Organization. Tobacco Fact Sheet. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco> (accessed on 1 June 2021).
11. Zafeiridou, M.; Hopkinson, N.S.; Voulvoulis, N. Cigarette Smoking: An Assessment of Tobacco's Global Environmental Footprint Across Its Entire Supply Chain. *Environ. Sci. Technol.* 2018, 52, 8087–8094. [CrossRef]
12. Hoh, E.; Wei, H.-H.; Richardson, W.; Dodder, N.; Watanabe, K.; Cibor, A.; Novotny, T.E.; Gersberg, R. Determination of Leachable Organic Compounds in Smoked Cigarettes and Their Bioaccumulation Potentials in the Marine Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. In Proceedings of the 2019 Annual Meeting Society for Research on Nicotine and Tobacco, San Francisco, CA, USA, 20–23 February 2019.
13. Novotny, T.E.; Slaughter, E. Tobacco Product Waste: An Environmental Approach to Reduce Tobacco Consumption. *Curr. Environ. Health Rep.* 2014, 1, 208–216. [CrossRef]
14. Van Schalkwyk, M.C.I.; Novotny, T.E.; McKee, M. No more butts. *BMJ* 2019, 367, 15890. [CrossRef]
15. Hendlin, Y.H. Alert: Public Health Implications of Electronic Cigarette Waste. *Am. J. Public Health* 2018, 108, 1489–1490. [CrossRef]
16. Mock, J.; Hendlin, Y.H. Notes from the Field: Environmental Contamination from E-cigarette, Cigarette, Cigar, and Cannabis Products at 12 High Schools—San Francisco Bay Area, 2018–2019. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2019, 68, 897–899. [CrossRef]
17. Araújo, M.C.B.; Costa, M.F. From Plant to Waste: The Long and Diverse Impact Chain Caused by Tobacco Smoking. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2019, 16, 2690. [CrossRef]
18. Poppendieck, D.G.; Khurshid, S.S.; Emmerich, S.J. Measuring Airborne Emissions from Cigarette Butts: Literature Review and Experimental Plan; National Institute of Standards and Technology US Department of Commerce: Gaithersburg, MA, USA, 2016. [CrossRef]
19. Kozlowski, L.T.; Mehta, N.Y.; Sweeney, C.T.; Schwartz, S.S.; Vogler, G.P.; Jarvis, M.J.; West, R.J. Filter ventilation and nicotine content of tobacco in cigarettes from Canada, the United Kingdom, and the United States. *Tob. Control* 1998, 7, 369–375. [CrossRef]
20. Benowitz, N.L.; Hukkanen, J.; Jacob, P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; Volume 2009, pp. 29–60. [CrossRef]
21. Ramirez, N.; Özel, M.Z.; Lewis, A.; Marcé-Recasens, R.M.; Borrull, F.; Hamilton, J.F. Exposure to nitrosamines in thirdhand tobacco smoke increases cancer risk in non-smokers. *Environ. Int.* 2014, 71, 139–147. [CrossRef]
22. Benotti, M.J.; Brownawell, B.J. Distributions of Pharmaceuticals in an Urban Estuary during both Dry- and Wet-Weather Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41, 5795–5802. [CrossRef]

23. Banyasz, J.L. The Physical Chemistry of Nicotine. In Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites; Gorrod, J.W., Jacob, P., III, Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1999; pp. 149–190.
24. Pankow, J.F.; Mader, B.T.; Isabelle, L.M.; Luo, W.; Pavlick, A.; Liang, C. Conversion of Nicotine in Tobacco Smoke to Its Volatile and Available Free-Base Form through the Action of Gaseous Ammonia. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31, 2428–2433. [CrossRef]
25. Konstantinou, E.; Fotopoulou, F.; Drosos, A.; Dimakopoulou, N.; Zagoriti, Z.; Niarchos, A.; Makrynioti, D.; Kouretas, D.; Farsalinos, K.; Lagoumintzis, G.; et al. Tobacco-specific nitrosamines: A literature review. *Food Chem. Toxicol.* 2018, 118, 198–203. [CrossRef]
26. Leigh, N.J.; Palumbo, M.N.; Marino, A.M.; O'Connor, R.J.; Goniewicz, M.L. Tobacco-specific nitrosamines (TSNA) in heated tobacco product IQOS. *Tob. Control* 2018, 27, s37–s38. [CrossRef] *Sustainability* 2021, 13, 12994 17 of 25
27. Fowles, J.; Bates, M. The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke: Priorities for Harm Reduction; A Report to the New Zealand Ministry of Health; Epidemiology and Toxicology Group, ESR, Kenepuru Science Centre: Porirua, New Zealand, 2000; p. 65.
28. Protano, C.; Vitali, M. The New Danger of Thirdhand Smoke: Why Passive Smoking Does Not Stop at Secondhand Smoke. *Environ. Health Perspect.* 2011, 119, a422. [CrossRef]
29. Lee, H.-L.; Hsieh, D.P.; Li, L.-A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette sidestream smoke particulates from a Taiwanese brand and their carcinogenic relevance. *Chemosphere* 2011, 82, 477–482. [CrossRef]
30. Lodovici, M.; Akpan, V.; Evangelisti, C.; Dolara, P. Sidestream tobacco smoke as the main predictor of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Toxicol.* 2004, 24, 277–281. [CrossRef]
31. Gong, M.; Daniels, N.; Poppendieck, D. Measurement of chemical emission rates from cigarette butts into air. *Indoor Air* 2020, 30, 711–724. [CrossRef]
32. Poppendieck, D.; Gong, M.; Pham, V. Influence of temperature, relative humidity, and water saturation on airborne emissions from cigarette butts. *Sci. Total Environ.* 2020, 712, 136422. [CrossRef]
33. Hildemann, L.M.; Markowski, G.R.; Cass, G.R. Chemical composition of emissions from urban sources of fine organic aerosol. *Environ. Sci. Technol.* 1991, 25, 744–759. [CrossRef]
34. Schwarz, K.; Gocht, T.; Grathwohl, P. Transport of polycyclic aromatic hydrocarbons in highly vulnerable karst systems. *Environ. Pollut.* 2011, 159, 133–139. [CrossRef]
35. Manzetti, S. Ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines, and nitroarenes through molecular properties. *Environ. Chem. Lett.* 2012, 10, 349–361. [CrossRef]
36. Harmon, T.C.; Burks, G.A.; Aycaguer, A.-C.; Jackson, K. Thermally Enhanced Vapor Extraction for Removing PAHs from Lampblack-Contaminated Soil. *J. Environ. Eng.* 2001, 127, 986–993. [CrossRef]
37. Golia, E.E.; Dimirkou, A.; Mitsios, I.K. Accumulation of Metals on Tobacco Leaves (Primings) Grown in an Agricultural Area in Relation to Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2007, 79, 158–162. [CrossRef]
38. Golia, E.E.; Dimirkou, A.; Mitsios, I.K. Heavy-Metal Concentration in Tobacco Leaves in Relation to Their Available Soil Fractions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 2009, 40, 106–120. [CrossRef]
39. Liu, H.; Wang, H.; Ma, Y.; Wang, H.; Shi, Y. Role of transpiration and metabolism in translocation and accumulation of cadmium in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Chemosphere* 2016, 144, 1960–1965. [CrossRef]

40. Fresquez, M.R.; Pappas, R.S.; Watson, C.H. Establishment of Toxic Metal Reference Range in Tobacco from US Cigarettes. *J. Anal. Toxicol.* 2013, 37, 298–304. [CrossRef]
41. Armendáriz, C.R.; Garcia, T.; Soler, A.; Ángel, J.G.F.; Glez-Weller, D.; González, G.L.; de la Torre, A.H.; Gironés, C.R. Heavy metals in cigarettes for sale in Spain. *Environ. Res.* 2015, 143, 162–169. [CrossRef]
42. Stephens, W.E.; Calder, A.; Newton, J. Source and Health Implications of High Toxic Metal Concentrations in Illicit Tobacco Products. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 479–488. [CrossRef]
43. Adriano, D.C.; Chlopecka, A.; Kaplan, D.I. Role of Soil Chemistry in Soil Remediation and Ecosystem Conservation. *Soil Chem. Ecosys. Health* 1998, 52, 361–386.
44. Traina, S.J. The Environmental Chemistry of Cadmium. In *Cadmium in Soils and Plants*; McLaughlin, M.J., Singh, B.R., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1999; pp. 11–37. ISBN 978-94-010-5916-9.
45. Valiente, R.; Escobar, F.; Pearce, J.; Bilal, U.; Franco, M.; Sureda, X. Estimating and mapping cigarette butt littering in urban environments: A GIS approach. *Environ. Res.* 2020, 183, 109142. [CrossRef]
46. Hoellein, T.; Rojas, M.; Pink, A.; Gasior, J.; Kelly, J. Anthropogenic Litter in Urban Freshwater Ecosystems: Distribution and Microbial Interactions. *PLoS ONE* 2014, 9, e98485. [CrossRef]
47. Ocean Conservancy. *International Coastal Cleanup: 2020 Report*; Ocean Conservancy: Washington, DC, USA, 2020; p. 32.
48. Healton, C.G.; Cummings, K.M.; O'Connor, R.J.; Novotny, T.E. Butt really? The environmental impact of cigarettes. *Tob. Control* 2011, 20, i1. [CrossRef]
49. Kungskulniti, N.; Charoenca, N.; Hamann, S.L.; Pitayarangsarit, S.; Mock, J. Cigarette Waste in Popular Beaches in Thailand: High Densities that Demand Environmental Action. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018, 15, 630. [CrossRef]
50. Novotny, T.E.; Lum, K.; Smith, E.; Wang, V.; Barnes, R. Cigarettes Butts and the Case for an Environmental Policy on Hazardous Cigarette Waste. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009, 6, 1691–1705. [CrossRef]
51. Wallbank, L.A.; MacKenzie, R.; Beggs, P.J. Environmental impacts of tobacco product waste: International and Australian policy responses. *Ambio* 2016, 46, 361–370. [CrossRef]
52. World Health Organization. *Tobacco and Its Environmental Impact: An Overview*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017; ISBN 978-92-4-151249-7.
53. Fischer, S.; Thümmel, K.; Volkert, B.; Hettrich, K.; Schmidt, I.; Fischer, K. Properties and Applications of Cellulose Acetate. *Macromol. Symp.* 2008, 262, 89–96. [CrossRef]
54. Bonanomi, G.; Incerti, G.; Cesarano, G.; Gaglione, S.A.; Lanzotti, V. Cigarette Butt Decomposition and Associated Chemical Changes Assessed by <sup>13</sup>C CPMAS NMR. *PLoS ONE* 2015, 10, e0117393. [CrossRef]
55. Kadir, A.A.; Sarani, N.A. Cigarette Butts Pollution and Environmental Impact—A Review. *Appl. Mech. Mater.* 2015, 773–774, 1106–1110. [CrossRef]
56. Harris, B. The intractable cigarette ‘filter problem’. *Tob. Control* 2011, 20, i10–i16. [CrossRef]
57. Belzagui, F.; Buscio, V.; Gutiérrez-Bouzán, C.; Vilaseca, M. Cigarette butts as a microfiber source with a microplastic level of concern. *Sci. Total Environ.* 2021, 762, 144165. [CrossRef]
58. Jacob, I.P.; Benowitz, N.L.; Destailats, H.; Gundel, L.; Hang, B.; Martins-Green, M.; Matt, G.E.; Quintana, P.J.E.; Samet, J.M.; Schick, S.F.; et al. Thirdhand Smoke: New Evidence, Challenges, and Future Directions. *Chem. Res. Toxicol.* 2017, 30, 270–294. [CrossRef]

59. Cecinato, A.; Balducci, C.; Romagnoli, P.; Perilli, M. Airborne psychotropic substances in eight Italian big cities: Burdens and behaviours. *Environ. Pollut.* 2012, 171, 140–147. [CrossRef]
60. Schauer, J.J.; Rogge, W.F.; Hildemann, L.M.; Mazurek, M.A.; Cass, G.R.; Simoneit, B.R. Source apportionment of airborne particulate matter using organic compounds as tracers. *Atmos. Environ.* 1996, 30, 3837–3855. [CrossRef]
61. Brennan, E.; Cameron, M.; Warne, C.; Durkin, S.; Borland, R.; Travers, M.J.; Hyland, A.; Wakefield, M.A. Secondhand smoke drift: Examining the influence of indoor smoking bans on indoor and outdoor air quality at pubs and bars. *Nicotine Tob. Res.* 2010, 12, 271–277. [CrossRef]
62. Sureda, X.; Martínez-Sánchez, J.M.; López, M.J.; Fu, M.; Agüero, F.; Saltó, E.; Nebot, M.; Fernández, E. Secondhand smoke levels in public building main entrances: Outdoor and indoor PM<sub>2.5</sub> assessment. *Tob. Control* 2012, 21, 543–548. [CrossRef]
63. Senta, I.; Lor, E.G.; Borsotti, A.; Zuccato, E.; Castiglioni, S. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Res.* 2015, 74, 23–33. [CrossRef] [PubMed]
64. Hukkanen, J.; Jacob, P., III; Benowitz, N.L. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacol. Rev.* 2005, 57, 79–115. [CrossRef]
65. Heinrich, J.; Hölscher, B.; Seiwert, M.; Carty, C.L.; Merkel, G.; Schulz, C. Nicotine and cotinine in adults' urine: The German Environmental Survey 1998. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 2004, 15, 74–80. [CrossRef]
66. Zarrelli, A.; DellaGreca, M.; Parolisi, A.; Iesce, M.R.; Cermola, F.; Temussi, F.; Isidori, M.; Lavorgna, M.; Passananti, M.; Previtiera, L. Chemical fate and genotoxic risk associated with hypochlorite treatment of nicotine. *Sci. Total Environ.* 2012, 426, 132–138. [CrossRef]
67. Buerge, I.J.; Kahle, M.; Buser, H.-R.; Müller, M.D.; Poiger, T. Nicotine Derivatives in Wastewater and Surface Waters: Application as Chemical Markers for Domestic Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 6354–6360. [CrossRef]
68. Bueno, M.M.; Uclés, S.; Hernando, M.; Davoli, E.; Fernández-Alba, A. Evaluation of selected ubiquitous contaminants in the aquatic environment and their transformation products. A pilot study of their removal from a sewage treatment plant. *Water Res.* 2011, 45, 2331–2341. [CrossRef]
69. Focazio, M.J.; Kolpin, D.W.; Barnes, K.K.; Furlong, E.; Meyer, M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Thurman, E.M. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—II) Untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* 2008, 402, 201–216. [CrossRef]
70. Barnes, K.K.; Kolpin, D.W.; Furlong, E.; Zaugg, S.D.; Meyer, M.; Barber, L.B. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) Groundwater. *Sci. Total Environ.* 2008, 402, 192–200. [CrossRef]
71. Godfrey, E.; Woessner, W.W.; Benotti, M.J. Pharmaceuticals in On-Site Sewage Effluent and Ground Water, Western Montana. *Ground Water* 2007, 45, 263–271. [CrossRef] [PubMed]
72. Schaidler, L.A.; Ackerman, J.M.; Rudel, R.A. Septic systems as sources of organic wastewater compounds in domestic drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. *Sci. Total Environ.* 2016, 547, 470–481. [CrossRef] [PubMed]
73. Stuart, M.; Lapworth, D.; Crane, E.; Hart, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci. Total Environ.* 2012, 416, 1–21. [CrossRef]

74. Verstraeten, I.; Fetterman, G.; Meyer, M.; Bullen, T.; Sebree, S. Use of tracers and isotopes to evaluate vulnerability of water in domestic wells to septic waste. *Ground Water Monit. Remediat.* 2005, 25, 107–117. [CrossRef]
75. Kinney, C.A.; Furlong, E.T.; Werner, S.L.; Cahill, J.D. Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environ. Toxicol. Chem.* 2006, 25, 317–326. [CrossRef] [PubMed]
76. Teijon, G.; Candela, L.; Tamoh, K.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci. Total Environ.* 2010, 408, 3584–3595. [CrossRef]
77. Lapworth, D.J.; Baran, N.; Stuart, M.E.; Ward, R.S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* 2012, 163, 287–303. [CrossRef]
78. Schmidt, R.; Ulanova, D.; Wick, L.Y.; Bode, H.B.; Garbeva, P. Microbe-driven chemical ecology: Past, present and future. *ISME J.* 2019, 13, 2656–2663. [CrossRef]
79. Chopyk, J.; Chattopadhyay, S.; Kulkarni, P.; Smyth, E.M.; Hittle, L.E.; Paulson, J.N.; Pop, M.; Buehler, S.S.; Clark, P.I.; Mongodin, E.F.; et al. Temporal Variations in Cigarette Tobacco Bacterial Community Composition and Tobacco-Specific Nitrosamine Content Are Influenced by Brand and Storage Conditions. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 358. [CrossRef]
80. Zhou, J.; Yu, L.; Zhang, J.; Zhang, X.; Xue, Y.; Liu, J.; Zou, X. Characterization of the core microbiome in tobacco leaves during aging. *Microbiologyopen* 2020, 9, e984. [CrossRef]
81. Sapkota, A.R.; Berger, S.; Vogel, T.M. Human Pathogens Abundant in the Bacterial Metagenome of Cigarettes. *Environ. Health Perspect.* 2010, 118, 351–356. [CrossRef] [PubMed]
82. Sun, J.; Jin, J.; Beger, R.D.; Cerniglia, C.E.; Yang, M.; Chen, H. Metabolomics evaluation of the impact of smokeless tobacco exposure on the oral bacterium *Capnocytophaga sputigena*. *Toxicol. In Vitro* 2016, 36, 133–141. [CrossRef]
83. Jiang, Y.; Zhou, X.; Cheng, L.; Li, M. The Impact of Smoking on Subgingival Microflora: From Periodontal Health to Disease. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 66. [CrossRef]
84. Shah, S.A.; Ganesan, S.M.; Varadharaj, S.; Dabdoub, S.M.; Walters, J.D.; Kumar, P.S. The making of a miscreant: Tobacco smoke and the creation of pathogen-rich biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017, 3, 1–9. [CrossRef]
85. Yang, I.; Sandeep, S.; Rodriguez, J. The oral health impact of electronic cigarette use: A systematic review. *Crit. Rev. Toxicol.* 2020, 50, 97–127. [CrossRef]
86. Northrup, T.F.; Stotts, A.L.; Suchting, R.; Matt, G.E.; Quintana, P.J.; Khan, A.M.; Green, C.; Klawans, M.R.; Johnson, M.; Benowitz, N.; et al. Thirdhand smoke associations with the gut microbiomes of infants admitted to a neonatal intensive care unit: An observational study. *Environ. Res.* 2021, 197, 111180. [CrossRef]
87. Kelley, S.T.; Liu, W.; Quintana, P.J.E.; Hoh, E.; Dodder, N.G.; Mahabee-Gittens, E.M.; Padilla, S.; Ogden, S.; Frenzel, S.; Sisk-Hackworth, L.; et al. Altered microbiomes in thirdhand smoke-exposed children and their home environments. *Pediatr. Res.* 2021, 1–8. [CrossRef]
88. Biller, O.M.; Adler, L.S.; Irwin, R.E.; McAllister, C.; Palmer-Young, E.C. Possible Synergistic Effects of Thymol and Nicotine against *Crithidia bombi* Parasitism in Bumble Bees. *PLoS ONE* 2015, 10, e0144668. [CrossRef]
89. Oropesa, A.L.; Floro, A.M.; Palma, P. Toxic potential of the emerging contaminant nicotine to the aquatic ecosystem. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, 24, 16605–16616. [CrossRef]

90. Mu, Y.; Chen, Q.; Parales, R.E.; Lu, Z.; Hong, Q.; He, J.; Qiu, J.; Jiang, J. Bacterial catabolism of nicotine: Catabolic strains, pathways and modules. *Environ. Res.* 2020, 183, 109258. [CrossRef]
91. He, C.; Huang, Y.; Liu, P.; Wei, J.; Yang, Y.; Xu, L.; Xiao, M. Transcriptome analysis of genes and metabolic pathways associated with nicotine degradation in *Aspergillus oryzae* 112822. *BMC Genom.* 2019, 20, 86. [CrossRef] [PubMed]
92. Wang, X.; Tang, L.; Yao, Y.; Wang, H.; Min, H.; Lu, Z. Bioremediation of the tobacco waste-contaminated soil by *Pseudomonas* sp. HF-1: Nicotine degradation and microbial community analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97, 6077–6088. [CrossRef] [PubMed]
93. Selmar, D.; Radwan, A.; Abdalla, N.; Taha, H.; Wittke, C.; El-Henawy, A.; Alshaal, T.; Amer, M.; Kleinwächter, M.; Nowak, M.; et al. Uptake of nicotine from discarded cigarette butts—A so far unconsidered path of contamination of plant-derived commodities. *Environ. Pollut.* 2018, 238, 972–976. [CrossRef]
94. Zhao, B.; Agblevor, F.A.; Ritesh K., C.; Jelesko, J.G. Enhanced production of the alkaloid nicotine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult. (PCTOC)* 2012, 113, 121–129. [CrossRef]
95. Simard, S.W.; Beiler, K.J.; Bingham, M.A.; Deslippe, J.R.; Philip, L.J.; Teste, F.P. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biol. Rev.* 2012, 26, 39–60. [CrossRef]
96. Lima, C.F.; dos Pinto, M.A.S.; Choueri, R.B.; Moreira, L.B.; Ítalo, B.C. Occurrence, characterization, partition, and toxicity of cigarette butts in a highly urbanized coastal area. *Waste Manag.* 2021, 131, 10–19. [CrossRef]
97. Dobaradaran, S.; Soleimani, F.; Akhbarizadeh, R.; Schmidt, T.C.; Marzban, M.; BasirianJahromi, R. Environmental fate of cigarette butts and their toxicity in aquatic organisms: A comprehensive systematic review. *Environ. Res.* 2021, 195, 110881. [CrossRef]
98. Slaughter, E.; Gersberg, R.M.; Watanabe, K.; Rudolph, J.; Stransky, C.; E Novotny, T. Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tob. Control* 2011, 20, i25–i29. [CrossRef]
99. Green, D.S.; Kregting, L.; Boots, B. Effects of cigarette butts on marine keystone species (*Ulva lactuca* L. and *Mytilus edulis* L.) and sediment microphytobenthos. *Mar. Pollut. Bull.* 2021, 165, 112152. [CrossRef] *Sustainability* 2021, 13, 12994 24 of 25
100. Max, W.; Sung, H.-Y.; Shi, Y.; Stark, B. The Cost of Smoking in California. *Nicotine Tob. Res.* 2015, 18, 1222–1229. [CrossRef]
101. Kotz, D.; Kastaun, S. Do people know that cigarette filters are mainly composed of synthetic material? A representative survey of the German population (the DEBRA study). *Tob. Control* 2021, 30, 345–347. [CrossRef]
102. Patel, M.; Cuccia, A.F.; Folger, S.; Benson, A.F.; Vallone, D.; Novotny, T.E. Support for cigarette filter waste policies among US adults. *Tob. Control* 2021. [CrossRef] *Sustainability* 2021, 13, 12994 25 of 25
103. Smith, E.A.; Novotny, T.E. Whose butt is it? tobacco industry research about smokers and cigarette butt waste. *Tob. Control* 2011, 20, i2–i9. [CrossRef]
104. Witkowski, J. Holding Cigarette Manufacturers and Smokers Liable for Toxic Butts: Potential Litigation-Related Causes of Action for Environmental Injuries/Harm and Waste Cleanup. *Tulane Environ. Law J.* 2014, 28, 1–36.
105. Newman, S.; Watkins, E.; Farmer, A.; ten Brink, P.; Schweitzer, J.-P. The Economics of Marine Litter. In *Marine Anthropogenic Litter*; Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M., Eds.;



Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 367–394. ISBN 978-3-319-16509-7.

106. Beaumont, N.J.; Aanesen, M.; Austen, M.C.; Börger, T.; Clark, J.R.; Cole, M.; Hooper, T.; Lindeque, P.K.; Pascoe, C.; Wyles, K.J. Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. *Mar. Pollut. Bull.* 2019, 142, 189–195. [CrossRef]
107. Komatz, K. Fire Prevention 52: Cigarette Butts. Available online: <https://www.nps.gov/articles/p52-cigarette-butts.htm> (accessed on 12 February 2021).
108. Leistikow, B.N.; Martin, D.C.; Milano, C.E. Fire Injuries, Disasters, and Costs from Cigarettes and Cigarette Lights: A Global Overview. *Prev. Med.* 2000, 31, 91–99. [CrossRef]

## مروری بر اثر عصاره مالت جو بر عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و جمعیت میکروبی روده طیور

فاطمه ختوان هفشجانی<sup>۱\*</sup>، محمد رستمی<sup>۱</sup>

۱. کارشناسی ارشد، واحد تحقیق و توسعه شرکت شهرداگرس جهان بین، هفشجان، شهرکرد، ایران

### چکیده

استفاده پیشگیرانه از آنتی بیوتیک‌ها در تغذیه طیور به منظور بهبود رشد مستند است. از طرفی با شناسایی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ایجاد نقص درمانی در جمعیت انسانی محققان به دنبال جایگزین کردن محرک‌های رشد بدون عوارض جانبی هستند. استفاده از ترکیبات فیتوژنیک و فیتوبیوتیک مانند برخی ترکیبات گیاهی و مشتقات آن‌ها در خوراک طیور گوشتی و تخم‌گذار تاثیر مثبتی بر افزایش وزن، مصرف خوراک، ضریب تبدیل غذایی، سلامتی پرنده و همچنین بهبود عملکرد دستگاه گوارش، تنظیم سیستم ایمنی و خواص آنتی‌اکسیدانی دارند. یکی از افزودنی‌های گیاهی که اخیراً جهت استفاده در خوراک دام و طیور معرفی شده، عصاره مالت جو است. عصاره مالت جو از دانه جو جوانه زده طی فرآیند مالتینگ تولید می‌شود. طی روند مالتینگ ساختار دانه جو اصلاح می‌شود و ترکیبات مغذی دانه افزایش می‌یابد. عصاره مالت دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدان، ویتامین‌های گروه B، آهن، سلنیوم، روی، پتاسیم، منگنز، منیزیم، قندهای الیگوساکاریدی شامل مالتوز و مالتوتریوز است. در زمینه تاثیر عصاره مالت جو بر طیور تحقیقات زیادی انجام شده است. لذا هدف از این مطالعه مروری، جمع آوری تحقیقات و پژوهش‌هایی است که در سال‌های اخیر، در رابطه با تاثیر عصاره مالت جو بر روی طیور است. طبق مطالعات انجام شده استفاده عصاره مالت جو در جیره طیور باعث بهبود سیستم ایمنی و حفاظت از پرزهای روده می‌شوند. در نتیجه، جذب مواد مغذی بهبود می‌یابد از طرف دیگر کربوهیدرات‌ها و ترکیبات الیگوساکاریدی عصاره مالت سبب رشد باکتری‌های مفید دستگاه گوارش شده و از رشد باکتری‌های مضر جلوگیری می‌کند.

**واژگان کلیدی:** عصاره مالت جو، محرک رشد گیاهی، جایگزین آنتی‌بیوتیک.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، هفشجان، شهرک صنعتی هفشجان، شرکت شهرداگرس جهان بین. کد پستی ۸۸۴۱۸۸۴۱۴۴

همراه: ۰۹۱۳۹۷۷۷۸۲۳

تلفن ثابت: ۰۳۸۳۲۵۸۰۴۵۵

پست الکترونیک: fatemakhetvan@gmail.com

## A review of the effect of barley malt extract on growth performance, immune response and intestinal microbial population of poultry

Fateme Khatovan Hefeshjani<sup>1\*</sup>, Mohammad Rostami<sup>1</sup>

1. M.Sc, the Research and Development Unit of Shahdzagros Jahanbin Company, Hafshejan, Shahrekord, Iran

### Abstract

The preventive use of antibiotics in poultry nutrition to improve growth is documented. On the other hand, by identifying antibiotic resistance and creating therapeutic deficiencies in Human population, researchers are looking to replace growth stimulants without side effects. The use of phytogetic and phytobiotic compounds such as some plant compounds and their derivatives in broiler and laying poultry feed have a positive effect on weight gain, feed consumption, feed conversion ratio, bird health, as well as improving digestive system function, immune system regulation, and antioxidant properties. One of the plant additives that has recently been introduced for use in animal and poultry feed is barley malt extract. Barley malt extract is produced from sprouted barley grains during the malting process. During the malting process, the structure of the barley grain is modified and the nutritional composition of the grain increases much research has been done on the effect of barley malt extract on poultry. Much research has been done on the effect of barley malt extract on poultry. According to the studies, the use of barley malt extract in the poultry diet improves the immune system and protects the intestinal villi. As a result, the absorption of nutrients is improved. On the other hand, carbohydrates and oligosaccharide compounds of malt extract cause the growth of beneficial bacteria in the digestive tract and prevent the growth of harmful bacteria.

**Keywords:** Barley malt extract, Plant growth stimulant, Antibiotic substitute.

### مقدمه

استفاده پیشگیرانه از آنتی بیوتیک‌ها در تغذیه طیور به منظور بهبود رشد، مصرف غذا و کاهش مرگ و میر در اثر بیماری‌های کلینیکی به خوبی مستند شده است. پدیده مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها برای اولین بار در اوایل دهه ۱۹۶۰ شناسایی شد. به دنبال آن، رابطه‌ی بین تجویز آنتی بیوتیک‌ها به دام و طیور و نقص درمانی داروهای آنتی بیوتیکی در جمعیت‌های انسان مشخص گردید. امروزه محققین با در نظر گرفتن این مهم به دنبال جایگزین کردن محرک‌های رشد بدون عوارض مانند پری بیوتیک‌ها، پرو بیوتیک‌ها، فیتوبیوتیک‌ها و آنتی اکسیدان‌های طبیعی هستند (۱). بررسی‌های متعدد نشان داده‌اند که استفاده از ترکیبات فیتوژنیک و فیتوبیوتیک گیاهی و مشتقات آن‌ها در خوراک طیور گوشتی، تاثیر مثبتی بر افزایش وزن، مصرف خوراک، ضریب تبدیل غذایی، سلامتی حیوان و همچنین بهبود عملکرد دستگاه گوارش، تنظیم سیستم ایمنی و خواص آنتی اکسیدانی دارند (۲ و ۳). خواص مثبت ترکیبات گیاهی به طیف وسیعی از مواد فعال شیمیایی موجود در آنها مربوط است. عمده ترکیباتی که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند شامل: روغن‌های ضروری، کارنوئوئیدها، ساپونین، استروئیدهای گیاهی، ترکیبات فنلی، سولفیدها، لکتین‌ها پلی پیپتیدها، پلی ساکاریدهای غیرنشسته‌ای می‌باشد.

مکانیسم عمل ترکیبات گیاهی در بهبود عملکرد پرندگان دقیقاً مشخص نشده است. اما چندین نظریه، چگونگی بهبود عملکرد پرنده را توصیف می‌کنند. ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در عصاره‌های گیاهی باعث حفاظت از پرزهای روده می‌شوند. در نتیجه اثر آنتی اکسیدانی در سلول‌های پرز روده، جذب مواد مغذی بهبود می‌یابد (۴). یکی از افزودنی‌های گیاهی که اخیراً جهت استفاده در خوراک دام و طیور معرفی شده، عصاره مالت جو است. این محصول از دانه‌های جو، طی فرآیندی به نام مالتینگ تولید می‌شود. فرآیند مالتینگ شامل مجموعه تغییراتی در دانه جو و مالت است که منجر به اصلاح ساختاری و سنتز ترکیبات جدید می‌شود و ارزش غذایی و پایداری دانه‌ها بهبود می‌یابد (۵). عصاره مالت به عنوان یک منبع طبیعی از آنتی اکسیدان‌ها، ترکیبات پری بیوتیک، ویتامین‌های گروه B مواد معدنی مثل آهن، سلنیوم، روی، کلسیم، منیزیم و فسفر شناخته می‌شود (۶). عصاره مالت به دو فرم پودر و مایع موجود می‌باشد که فرم مایع آن به صورت شربت غلیظ است که در صنایع نوشیدنی، مخمرسازی، پخت نان، شیرینی یا

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

به‌عنوان یک طعم دهنده مواد خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد با توجه به اینکه این محصول اخیراً به عنوان افزودنی جهت خوراک دام و طیور معرفی شده است. تحقیقات محدودی بر روی این محصول صورت گرفته است. این مقاله مروری بر اثر عصاره مالت بر عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و جمعیت میکروبی روده طیور است.

#### ارزش تغذیه‌ای عصاره مالت جو

غلات و مشتقات حاصل از آن دارای مواد مغذی بسیار غنی شامل پروتئین و ترکیبات زیست فعال می‌باشند (۷). برای تولید مالت، جو یک غله انتخابی با توجه به فعالیت آنزیمی، قابلیت فرآوری، محتوای مواد مغذی و مشخصات حسی است (۸). به طور کلی به جو جوانه زده و برشته شده مالت گفته می‌شود. به عبارت دیگر برای تهیه مالت جو، آن را سبز کرده و سپس با حرارت غیر مستقیم رطوبت آن گرفته شده و پس از جدا کردن جوانه و ریشه ذخیره می‌شود. برای گرفتن عصاره مالت، مالت را آسیاب کرده و با مخلوط مقدار معینی آب در درجه حرارت مختلف پخته می‌شود تا شربت شیرین مالت بدست آید. شربت حاصله، بعد از جدا کردن تفاله جو و صاف کردن تحت خلا به جوش می‌آید تا غلیظ شود همچنین برای بعضی مصارف، عصاره مالت به شکل پودر در آورده می‌شود. این ماده بسیار مغذی بوده و برای مصارف گوناگون به کار می‌رود (۹). عصاره مالت حاوی ویتامین‌های B1, B3, B6, B12، آهن، روی، کلسیم، منیزیم، فسفر و اسید آمینه است (۱). عصاره مالت همچنین به واسطه داشتن ترکیبات الیگو ساکاریدی و ملانوئیدین دارای خاصیت پری بیوتیکی بوده و باعث افزایش باکتری‌های مفید دستگاه گوارش می‌شود (۱۰ و ۱۱). Sandres و همکاران اظهار داشتند که افزودن تک قندی‌ها و دو قندی‌ها به محیط پایه فرآورده‌های تخمیری پروبیوتیک سبب افزایش رشد برخی از پروبیوتیک‌ها می‌شود. افزایش قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها به احیا بودن قندها وابسته است. از این رو عصاره مالت به دلیل تجزیه نشاسته طی مالت سازی از مالتوز بالا برخوردار است و رشد پروبیوتیک‌ها را به خوبی تجدید می‌کند (۱۲). از دیگر ترکیبات موثر عصاره مالت آنتی‌اکسیدان‌ها هستند. آنتی‌اکسیدان عصاره مالت عمدتاً شامل پلی فنول‌هایی از جمله کاتچین و اسید فولیک است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی از خود نشان می‌دهد و توان مهار رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید را دارد (۱۳).

#### تأثیر عصاره مالت بر طیور

عصاره مالت جو به علت داشتن ترکیبات مغذی می‌تواند به عنوان یک محرک رشد و بهبود سیستم ایمنی طیور استفاده شود. مطالعات متفاوتی در این زمینه انجام شده که در اینجا به چند مورد آن اشاره می‌شود.

صدقی و همکاران در سال ۱۴۰۰ اثر عصاره مالت جو بر عملکرد، پاسخ ایمنی و تغییرات هیستولوژیک ژنوم مرغ‌های تخم‌گذار را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که درصد تولید، وزن توده تخم‌مرغ، ضریب تبدیل غذایی و مصرف خوراک تحت تأثیر تیمار آزمایشی قرار نگرفت. ضخامت، استحکام پوسته و صفات داخلی تخم مرغ (واحد‌ها و ارتفاع زرده) در تیمارهای دریافت کننده عصاره مالت نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت. همچنین تولید آنتی‌بادی کل و IgG علیه SRBC در تیمارهای دریافت کننده عصاره مالت افزایش یافت و تولید آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل و آنفلوآنزا تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. مطالعه هیستولوژیک ژنوم نشان داد افزودن عصاره مالت در جیره سبب افزایش طول پرز و نسبت طول پرز به عمق کریپت می‌شود. به طور کلی در این مطالعه نشان داده شد افزودن ۰/۲ درصد عصاره به جیره می‌تواند سبب تداوم بهتر درصد تولید بعد از پیک و بهبود شاخص کیفی تخم مرغ، افزایش تیتراژ آنتی‌بادی علیه SRBC و افزایش طول پرز و نسبت طول پرز به عمق کریپت در روده کوچک مرغ‌های تخم‌گذار شود (۱۴). در مطالعه Kebede و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند استفاده از مالت جو به جای ذرت در جیره مرغ تخم‌گذار سبب افزایش مصرف خوراک، افزایش رنگ زرده وزن تخم مرغ و ضخامت پوسته می‌شود (۱۵). در سال ۱۴۰۲ کاظمی و همکاران در مطالعه تأثیر مصرف عصاره مالت جو بر عملکرد رشد و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی نشان دادند مصرف خوراک، افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک در دوره‌های آغازین، رشد و پایداری تحت تأثیر تیمارهای دریافت کننده عصاره مالت قرار نگرفتند. ولی تیمار حاوی ۰/۲ درصد عصاره مالت باعث افزایش IgG و Anti-SRBC کل شد (۱۶). طلازاده و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند عصاره مالت در غلظت ۰/۵ درصد، در تمام دوره‌های پس از واکسیناسیون، پاسخ آنتی‌بادی سیستمیک به واکسن نیوکاسل را در جوجه‌های گوشتی افزایش داد، اما این عصاره تأثیر معنی‌داری بر پاسخ آنتی‌بادی علیه واکسن آنفلوآنزا نداشت (۱۷). دره بیدی و

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

همکاران در سال ۱۳۹۶ با مطالعه اثر عصاره مالت بر عملکرد رشد، گوارش پذیری مواد مغذی و جمعیت میکروبی روده کور جوجه‌های گوشتی نشان دادند افزودن ۰/۳ درصد عصاره مالت به جیره جوجه‌های گوشتی بدون تاثیر بر مصرف خوراک، بیشترین افزایش وزن روزانه و کمترین ضریب تبدیل خوراک را داشتند همچنین افزودن ۰/۳ درصد عصاره مالت سبب بهبود گوارش پذیری ماده خشک، پروتئین، چربی و کاهش جمعیت باکتری اشرشیاکلای می شود (۱۸). تیموری پارچین و همکاران در سال ۱۳۹۹ در مطالعه اثر سطوح مختلف عصاره مالت و سرکه مالت بر عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی نشان دادند افزودن ۰/۸ درصد عصاره مالت و ۰/۳ درصد سرکه مالت در دوره آغازین موجب افزایش وزن جوجه‌ها شد ولی در طی دوره رشد، پایانی و کل دوره هیچ یک از صفات مربوط به عملکرد رشد جوجه‌ها تحت تاثیر معنی‌دار تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (۱۹). رضوی و همکاران در سال ۱۴۰۱ نشان دادند استفاده از ۱ درصد عصاره مالت جو در جیره غذایی جوجه شترمرغ‌ها سبب بهبود عملکرد، تقویت سیستم ایمنی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش جمعیت باکتری‌های مضر مدفوع گردید (۲۰). Smirnov و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده است، کاهش جمعیت باکتری‌های اشریشیاکلای در سطح ۱۰ گرم عصاره مالت جو، می‌تواند نشانه‌ی بهبود سلامت دستگاه گوارشی و قسمت‌های مختلف بافت روده باشد و سبب کاهش هدر رفت مواد مغذی و بهبود رشد و تغذیه در جوجه شترمرغ‌ها گردد. بتاگلوکان و الیگوساکارید مانان موجود در عصاره مالت جو، با اثرات خود توانسته است از تکثیر این باکتری مضر جلوگیری کند (۲۱). صدقی و اکبری مقدم در سال ۲۰۱۸ نشان دادند افزودن ۰/۲ درصد عصاره مالت جو به همراه ۰/۴ درصد سرکه مالت در تغذیه جوجه‌های گوشتی در کل دوره آزمایشی، به طور معنی‌داری سبب بهبود افزایش وزن روزانه، شاخص تولید اروپایی و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی شد. همچنین عرض پرز و مساحت جذب پرزهای روده، افزایش و تولید مالون‌دی‌آلدهید در بافت ران و سینه کاهش یافت (۲۲). در مطالعه محمدپور و همکاران جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی عصاره مالت و پروبیوتیک به تنهایی و توأم غلظت سرمی تری گلیسرید، کلسترول، C-LDL را به طور معنی‌داری کاهش و سطح C-HDL سرم را افزایش معنی‌داری دادند. نسبت C-HDL به C-LDL فقط در جیره‌های حاوی عصاره مالت به طور معنی‌داری افزایش یافت. تاثیر عصاره مالت در کاهش کلسترول و C-LDL بیشتر از پروبیوتیک مصرفی بود. همچنین مصرف عصاره مالت و پروبیوتیک موجب کاهش مصرف خوراک و بهبود ضریب تبدیل غذایی جوجه‌ها شد (۲۳). در مطالعه صالح بهزادی در سال ۱۴۰۱ نشان داد افزودن عصاره مالت جو و سین‌بیوتیک به تنهایی بر خوراک مصرفی، افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های گوشتی و صفات لاشه نسبت به شاهد تاثیر معنی‌داری ندارد. افزودن ۰/۳ درصد عصاره مالت جو در آب آشامیدنی، سبب افزایش معنی‌دار سطح تری‌گلیسرید و کلسترول لیپو پروتئین با چگالی بسیار کم سرم خون جوجه‌های گوشتی نسبت به گروه شاهد شد و تاثیری بر فراسنجه‌های خونی و راندمان لاشه نداشت (۲۴).

### نتیجه گیری

عصاره مالت یک ماده طبیعی مغذی می‌باشد که از دانه‌ی جو جوانه زده به دست می‌آید. دانه جو یک غله با ارزش غذایی بالا است که طی روند جوانه زنی، دانه اصلاح می‌شود. در نهایت عصاره حاصل از این دانه دارای ارزش غذایی بسیار بالایی می‌باشد که باعث شده است تاثیرات مناسبی بر روی سلامت طیور داشته باشد. طبق مطالعات انجام شده عصاره مالت جو یک ترکیب فیتوبیوتیک و فیتوژنیک است که با داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدان، ویتامین‌های گروه B و الیگوساکاریدها باعث تقویت سیستم ایمنی، افزایش تولید آنتی‌بادی در زمان واکسیناسیون و بهبود عملکرد دستگاه گوارش (افزایش رشد باکتری‌های مفید و کاهش باکتری‌های مضر) می‌شود.

## References:

1. Liu Q, Yao H . Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry. 2007; 102: 732-737.
2. Hashemi SR, Davoodi H. Phytogetic as new class of feed additive in poultry industry. Journal of Animal and veterinary Advances. 2010; 9: 2295-2304.
3. Wang J, Su S, Pender C, Murugesan R, Syed B, et al. Effect of a phytogetic feed additive on growth performance, nutrient digestion, and immune response in broiler-fed diets with two different levels of crude protein. Animals. 2021; 11(3): 775.
4. Manzanillo EG, Baucelis F, Kamel C, Morales J, Perez JF, et al . effects of plant extracts on the performance and lower gut microflora of early weaned piglets. Journal of Animal Science. 2001; 1: 473-476.
5. Haks J, Mannam V, Kwon YI, Posyolidis E. Stimulation of phenolics, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities during barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. Plant Foods Hum Nutr. 2016; 71: 211-217.
6. Reinhard T. Superfoods: The healthiest foods on the planet. 2nd ed. Firefly Books, North American. Landete, J. M. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2013; 53(7): 706-21.
7. Hassani A, Zarnkow M, Becker T. Influence of malting conditions on sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) as a raw material for fermented beverages. Food Science and Technology International. 2014; 20(6): 453-463.
8. Charalampopoulos D, Pandiella SS, Webb C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. International Journal of Food Microbiology. 2003; 82(2): 133-141.
9. Gibson B, Aumala V, Heiniö RL, Mikkelsen A, Honkapää K. Differential evolution of Strecker and non-Strecker aldehydes during aging of pale and dark beers. Journal of Cereal Science. 2018; 83: 130-138.
10. Amrit P, Sonali B. Plant Prebiotics and Their Role in the Amelioration of Diseases. Nutrients. 2020; 12(1): 241.
11. Camilla E, Margareta E, Nyman ME. Malt in Combination with *Lactobacillus rhamnosus* Increases Concentrations of Butyric Acid in the Distal Colon and Serum in Rats Compared with Other Barley Products but Decreases Viable Counts of Cecal Bifidobacteria Pubmad J Nutr. 2011; 141(1): 101-107.
12. Sandr JW, Venema G, Kok J. of Effect fermentation on lactose, glucose, maltose in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. Journal of dairy Science. 1999; 23: 483.
13. Qingming YP, Xianhui K, Weibao Hong S, Yidan ZLi, Yanan Y, et al. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. Food Chemistry. 2010; 118: 84-89.
14. Sedghi M, Delavi Esfahani M, Mahdavi S, Ghasemi R. Investigating the effect of barley malt extract on performance, immune responses and histological changes of the jejunum of laying hens, Journal of Animal Science Research. 2022; 13(4): 601-614.
15. Kebede H, Urge M, Kebede K. Effect of replacing maize with malted barley grain on egg quality and laying hen's performance of white leghorn. Global Journal of Science Frontier Research. 2015; 15: 74-86.

16. Kazemi M, Mohammadi M, Terani Kohi H. Effect of barley malt extract supplementation on growth performance and immune response of broiler chickens. *Second International Congress of Animal Sciences*. 2023: 31-31.
17. Talazadeh F, Mayahi M, Fathi M. Evaluation of immunostimulatory effects of a commercial herbal extract on avian influenza subtype H9N2 and Newcastle disease vaccination in chickens *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2022; 73(2): 4023-4030.
18. Rezvani M, Abbasi M, Thabit S. the effect of malt extract on growth performance, digestibility of nutrients and microbial population of the caecum of broiler chickens. *Livestock Production Journal of Tehran University*. 2021; 23(3): 471-479.
19. Timuri Parchin R, Shakuri M, Mohebuddini H, Hedayat Ivoriq N. Effects of different levels of malt extract and malt vinegar on growth performance of broiler chickens. *The second international conference and the sixth national conference on organic and conventional agriculture*. 2020; 120-122.
20. Razavi Babaheidari A, Ahmadipour B, Khajali F, Karimi S. Investigating the effect of different levels of barley malt extract in the diet on growth traits, blood parameters and microbial population of the gastrointestinal tract of growing ostrich chicks; *Iranian veterinary medicine journal*; 2022; 16(1): 15-24.
21. Smirnov A, Tako E, Ferket P, Uni Z. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in ovo feeding of carbohydrates. *Poultry science*. 2006; 85(4): 669-673.
22. Sedghi M, Akbari Moghaddam Kakhki R. Effects of dietary supplementation of barley malt extract and malt vinegar on growth performance, jejunal morphology and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science Journal*. 2018; 6(2): 129-731
23. Mohammadpura M, Shakuri M, Bahram R, The effect of malt extract and probiotics on the growth performance of broiler chickens, the first national conference of new ideas in agriculture and natural resources. 2017; 1232-1234.
24. Saleh Behzadi M, Dastar B, Salmanian M. effect of different levels of malt extract and synbiotic on performance, blood parameters and carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Animal Environment*. 2023; 15(3): 145-150.

## چاپرون ها، مولکول های حیاتی میکروبها در حفظ ساختار پروتئین ها

### کیمیا گلستان فر\*

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

چاپرون های مولکولی پروتئین های بسیار حفاظت شده ای هستند که تاخوردگی مناسب سایر پروتئین ها را در داخل بدن ترویج می کنند. سیستم های چاپرون متنوع به فولد کردن و انتقالات پروتئین، جمع آوری کمپلکس های الیگومری، و بازیابی از باز شدن ناشی از استرس کمک می کنند. یک عملکرد اساسی چاپرون های مولکولی مهار فعل و انفعالات پروتئین غیرمولد با شناسایی و محافظت از سطوح آبریز است که در هنگام تا شدن یا به دنبال استرس پروتئوتوکسیک در معرض قرار می گیرند. بنابراین چاپرون ها در سیستم های سلولی از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند که در این مقاله مروری در مورد این مولکول ها و مکانیسم های عمل آنها، بحث شده است. هم چنین در مورد تغییرات بیان ژن در شرایط اکسیداتیو در باکتری در راستای تحمل شرایط محیطی بحث خواهد شد برای این بررسی ۴۵ مقاله مورد مطالعه قرار گرفته که ۳۸ مقاله در اینجا استفاده شده است.

**واژگان کلیدی:** چاپرون، فولدینگ، استرس دمایی

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۴۱۰۸۲۴۵

پست الکترونیک: Golestanfark@gmail.com



## Chaperones, vital molecules of microbes in maintaining the structure of proteins

Kimia Golestanfar<sup>1\*</sup>

1. Ph.D Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

Molecular chaperones are highly conserved proteins that promote proper folding of other proteins inside the body. Diverse chaperone systems contribute to protein folding and translocation, assembly of oligomeric complexes, and recovery from stress-induced unfolding. A fundamental function of molecular chaperones is to inhibit nonproductive protein interactions by recognizing and protecting hydrophobic surfaces that are exposed during folding or following proteotoxic stress. Therefore, chaperones are of special importance in cellular systems, which are discussed in this review article about these molecules and their mechanisms of action. Also, changes in gene expression in oxidative conditions in bacteria will be discussed in order to tolerate environmental conditions.

**Keywords:** Chaperone, folding, temperature stress

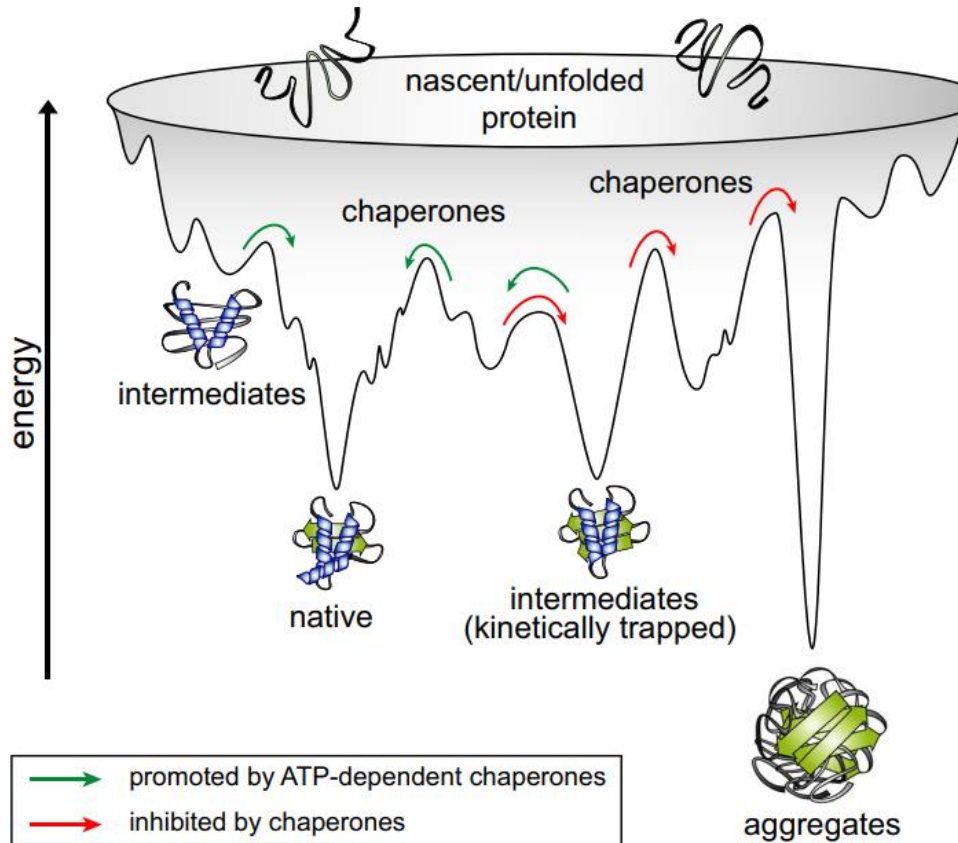
### مقدمه

باکتری‌ها و موجودات مختلف در شرایط حاد محیطی مختلفی قرار می‌گیرند. موجودات برای مقابله با این شرایط محیطی مکانیسم‌های مختلفی دارند تا به زنده ماندن آن‌ها کمک کنند. در این مقاله ابتدا به چاپرون‌ها که از پروتئین‌های ضروری برای مقابله با شرایط حاد محیطی در موجودات مختلف هستند اشاره خواهد شد. در قسمت دوم تغییرات بیان ژن در شرایط اکسیداتیو در باکتری بررسی خواهد شد.

### چاپرون‌ها

#### فولدینگ پروتئین‌ها

چندین عامل منجر به پیچیده شدن فرآیند فولدینگ پروتئین‌ها می‌شوند. مسیر انرژی آزاد فولدینگ ناهموار است: زنجیره‌های پروتئینی باید از موانع انرژی قابل توجهی در مسیر رسیدن به حالت اصلی عبور کنند و در نتیجه حداواسط‌های فولدینگ در این مسیر به وجود می‌آید (شکل ۱). واسطه‌های فولد ناصحیح خارج از مسیر اصلی فولدینگ منجر به آهسته شدن فرایند می‌شوند. از طرفی در این مسیر برهمکنش‌های غیر طبیعی می‌توانند منجر به حالت‌های فولدینگ نادرست و پایدار شود (۱). علاوه بر این، واسطه‌های فولدینگ سطوح آبگریز را در معرض محیط قرار می‌دهند که می‌توانند در تعاملات غیر عملکردی بین مولکولی موثر بوده و منجر به تجمع پروتئین‌های فولد نشده گردد (شکل ۱). مطالعات بیوفیزیکی فولدینگ پروتئین معمولاً بر روی پروتئین‌های مدل کوچک (اغلب کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه) تمرکز می‌کنند که به صورت نوترکیب بیان می‌شوند و فولدینگ برگشت‌پذیر قوی را در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهند (۲).



شکل ۱- فرایند فولدینگ طبیعی پروتئین‌ها (۳)

مشکل فولدینگ پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی پیچیده تر می‌شود. غلظت بالای ماکرومولکول‌ها در سلول، تمایل پروتئین‌های غیربومی به تجمع را افزایش می‌دهد، در حالی که استرس پروتئوتوکسیک حالت طبیعی را بی‌ثبات می‌کند. علاوه بر این، تاخوردگی پروتئین در هنگام ترجمه اتفاق می‌افتد، که در نتیجه آن پلی‌پپتیدهای تازه سنتز شده در یک حالت ناقص از نظر فولد صحیح در معرض محیط سلولی قرار می‌گیرند که فاقد اطلاعات ساختاری مورد نیاز برای فولدینگ طبیعی پروتئین است. چاپرون‌های مولکولی در پاسخ به این چالش‌ها تکامل یافته‌اند (۴).

### چاپرون‌ها

از سال ۱۹۶۲، زمانی که فروچیو ریتوسا الگوهای پف‌کردن جدیدی را در کروموزوم‌های پلی‌تن مگس سرکه در دمای بالا انکوبه شده بود، کشف کرد که استرس در سطح سلولی با تولید محصولات ژنی خاص پاسخ داده می‌شود. این محصولات پروتئین‌های شوک حرارتی (Hsps) یا پروتئین‌های استرس سلولی نامیده شدند و در ابتدا به عنوان مولکول‌هایی شناسایی شدند که در پاسخ به حضور پروتئین‌هایی که ساختار فضایی خود را از دست داده‌اند، در سلول تولید می‌شوند (۵). با این حال، تا زمانی که کار پیشگامانه گروه‌های لاسکی، الیس و جورجوپولوس رابطه بین تولید درشت مولکول‌هایی که به درستی مونتاژ شده‌اند و پروتئین‌هایی که برای اطمینان از مونتاژ صحیح عمل می‌کنند، برقرار نشد. محققان پروتئین هسته‌ای نوکلئوپلاسمین را مورد مطالعه قرار دادند که مونتاژ صحیح هیستون‌ها و DNA را در نوکلئوزوم‌ها تضمین می‌کند. لاسکی نوکلئوپلاسمین را یک همراه مولکولی می‌نامد، زیرا عملکرد یک همراه انسان را تقلید می‌کند که تعامل صحیح بین افراد را تضمین می‌کند. الیس و جورجوپولوس پروتئینی را مورد مطالعه قرار

دادند که در نهایت به عنوان چپرونین ۶۰ (chaperonin 60) شناخته شد و مسئول شروع سیل عظیمی از مقالات در مورد چاپرون‌های مولکولی در دو دهه گذشته بود. در حال حاضر، ایس یک چاپرون مولکولی را اینگونه تعریف می‌کند: «یکی از گروه بزرگ و متنوعی از پروتئین‌ها که دارای خاصیت کمک به مونتاژ/جداسازی غیرکووالانسی سایر ساختارهای ماکرومولکولی هستند، اما در صورت وجود، اجزای دائمی این ساختارها نیستند. عملکردهای بیولوژیکی طبیعی خود را انجام می‌دهند. تغییر و اصلاح بیشتر اصطلاحات قدیمی در مورد چاپرون‌ها ضروری است، زیرا چاپرون‌های مولکولی به طور دائمی در سلول تولید می‌شوند و غلظت‌های درون سلولی آن‌ها لزوماً در پاسخ به استرس افزایش نمی‌یابد. این پروتئین‌ها به عنوان چپرون‌های مولکولی تعریف می‌شوند اما Hsps یا پروتئین‌های استرس نیستند. چاپرون‌های مولکولی، که غلظت آنها در پاسخ به استرس افزایش می‌یابد، هم چپرون هستند و هم پروتئین‌های استرس / پروتئین‌های شوک حرارتی (۶).

### انواع چاپرون‌های مولکولی

اولین چاپرون مولکولی فولدینگ-پروتئینی که کشف شد Cpn60 بود. از زمان شناسایی این پروتئین به عنوان یک چپرون مولکولی در سال ۱۹۸۸، پروتئین‌های بسیار بیشتری با عملکرد مولکولی واقعی یا فرضی کشف شده‌اند و این اصطلاح در حال حاضر برای ۲۵ خانواده از پروتئین‌ها به کار می‌رود (جدول ۱). در همه موجودات زنده، چاپرون‌های مولکولی به عنوان پروتئین‌های ضروری طبقه‌بندی می‌شوند و توالی‌های بین پروتئین‌های مورد استفاده توسط پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها (مانند اعضای خانواده تیوردوکسین (Trx)، سیکلوفیلین‌ها، چپرونین‌ها، Hsp70 و Hsp90) حفظ می‌شود (۷).

جدول ۱- انواع چاپرون‌ها و عملکرد آن‌ها

خانواده پروتئینی	پروکاریوت‌ها	یوکاریوت‌ها	عملکرد
<b>Chaperonins</b>	GroEL, GroES	Hsp60, TriC, CCT	تا شدن پروتئین‌ها در ساختار قفس (cage)
<b>Thioredoxin</b>	Trx, DsbA to DsbE, glutaredoxin	Trx, glutaredoxin, protein disulfide isomerase	تبادل پروتئین تیول-دی سولفید
<b>Small Hsps</b>	IbpA, IbpB	Hsp25/27, a-crystallins	جذب زنجیره‌های باز شده برای جلوگیری از تجمع استرس
<b>Peptidyl-prolyl isomerases</b>	Cyclophilins, FKBP, parvulins	Cyclophilins, FKBP, parvulins	ایزومریزاسیون پیوند پپتیدی قبل از پرولین
<b>GrpE</b>	GrpE	GrpE	عامل تبادل ADP/ATP در تعامل با DnaK/DnaJ
<b>Hsp40/DnaJ</b>	DnaJ, CbpA, Rcs	Hsp40, Hdj2, Mtj1	کوچاپرون‌های Hsp70 که فعالیت Hsp70 را تنظیم می‌کنند
<b>Hsp70</b>	DnaK, Hsc66, BiP, mitochondrial Hsp70, etc	Many (e.g., Hsp70, Hsc70)	جلوگیری از تجمع زنجیره‌های پروتئینی باز شده
<b>Hsp90</b>	HtpG	Hsp90, Gp96	تنظیم مونتاژ پروتئین‌های انتقال سیگنال
<b>Hsp100</b>	ClpA, ClpB, ClpC, ClpX, ClpY	Hsp100	جداسازی الیگومرها و اگریگیت‌ها
<b>Prefoldin nascent chain associated complex</b>	Prefoldin	Nascent chain-associated complex	اتصال به زنجیره‌های تازه سنتز شده پروتئین‌ها هنگام بیرون آمدن از ریبوزوم‌ها

سلول‌های یوکاریوتی دارای بخش‌های متعددی هستند (سیتوزول، شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری، هسته)، و در این محفظه‌ها تاخوردگی پروتئین ناشی از استرس به عنوان پاسخ پروتئین باز شده شناخته می‌شود. پاسخ‌های پروتئینی باز شده عنصر مهمی در زیست‌شناسی یک پارچه سلول هستند، با مسیرهای سیگنال‌دهی کلیدی درون سلولی مرتبط هستند و اکنون با بیماری‌های انسانی مرتبط هستند. ضمناً در تعریف چپرون‌های مولکولی این بود که آن‌ها پروتئین‌های درون سلولی هستند که در تاخوردگی پروتئین

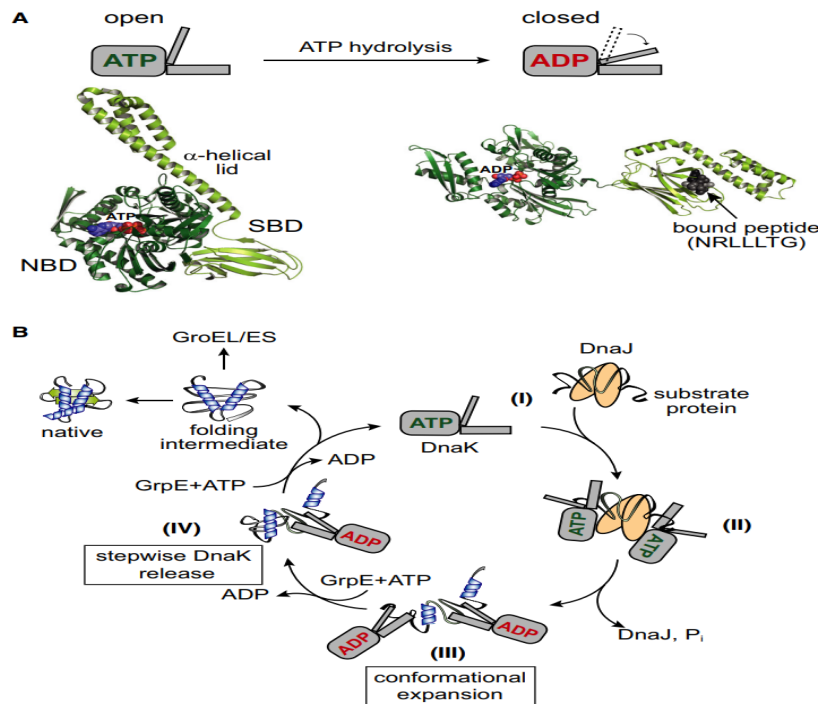
ها در داخل محفظه های سلولی نقش دارند، که به دلیل غلظت بالای پروتئین (در حد ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر)، پروتئین-پروتئین نامناسب را ترجیح می دهند. فعل و انفعالات، که منجر به دناتور شدن پروتئین قابل توجهی می شود. با این حال، مشخص شده است که بسیاری از چاپرون های مولکولی می توانند در خارج از سلول وجود داشته باشند و در اعمال غیر فولدینگ شرکت کنند (۸).

### مکانیسم عمل چاپرون ها

در ادامه برخی از مکانیسم های مهم چاپرون ها در فولدینگ پروتئین ها توضیح داده شده است.

### تاخوردگی پروتئین ها به کمک سیستم چاپرون Hsp70

چاپرون های کلاس Hsp70 (در باکتری ها) ماشین های مولکولی آلوستریکی هستند که در طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی از جمله تاخوردگی مجدد پروتئین، ری فولدینگ، جابه جایی، جداسازی و تخریب شرکت می کنند. این فعالیت های متنوع به دلیل تمایل مولکول Hsp70 برای عناصر توالی کوتاه (۵-۷ اسید آمینه) در اسید آمینه های آگریز (اغلب توسط اسیدهای آمینه با بار مثبت در کنار آن ها) می باشد (۹). اتصال برگشت پذیر پپتیدهای آگریز به C ترمینال دومین اتصال سوبسترا (SBD) به Hsp70 توسط اتصال ATP و هیدرولیز در دومین اتصال به نوکلئوتید (NBD) تنظیم می شود (شکل ۲ قسمت A). چرخه ساختاری مبتنی بر ATP Hsp70 توسط پروتئین های دامنه J کلاس Hsp40 (در باکتری ها) و عوامل تبادل نوکلئوتیدی (NEFs؛ GrpE در باکتری ها) هماهنگ می شود. Hsp40 سوبستراها را به حالت باز و متصل به ATP Hsp70 تحویل می دهد (شکل ۲ قسمت B). اتصال Hsp40 و پروتئین سوبسترا به طور هم افزایی باعث هیدرولیز ATP متصل می شود، در نتیجه یک کمپلکس پایدار بین پروتئین سوبسترا و Hsp70 در ترکیب بسته و متصل به ADP ایجاد می کند (شکل ۲). اتصال بعدی به NEF تبادل ADP/ATP را کاتالیز می کند و آزادسازی بستر را تسهیل می کند، با پیشروی میانی تاشو حاصل یا مستقیماً به حالت اصلی یا انتقال به سایر سیستم های چاپرون، مانند چاپرونین یا Hsp90 (شکل ۲ قسمت B، حالت III) (۱۰).

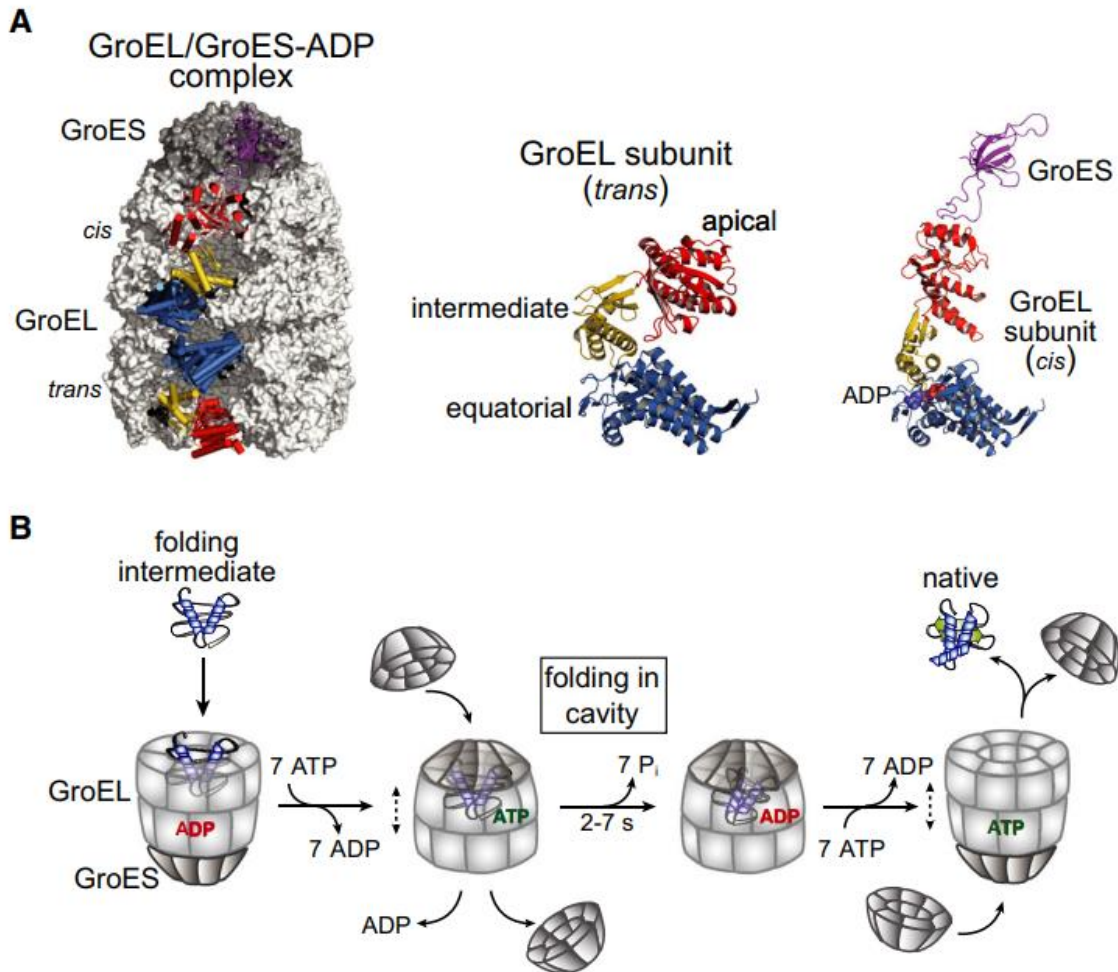


شکل ۲- مکانیسم مولکولی سیستم چاپرون Hsp70 (۱۱).

### کاتالیز فولدینگ توسط چپرونین GroEL/ES

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

چاپرونین‌ها (هم‌چنین به عنوان Hsp60s نیز شناخته می‌شوند) کمپلکس‌های الیگومری بزرگی هستند که به عنوان نانو قفس برای مولکول‌های پروتئین منفرد عمل می‌کنند تا جدا شوند. آن‌ها در فولدینگ ~ ۱۰٪ از پروتئوم سیتوزولی شرکت می‌کنند، از جمله پروتئین‌های ضروری که نمی‌توانند خود به خود به حالت اصلی خود برسند و نمی‌توانند از سایر سیستم‌های چاپرون استفاده کنند. چاپرونین باکتریایی GroEL از دو حلقه از هفت زیرواحد یکسان ~ ۶۰ کیلو دالتون تشکیل شده است. هر زیر واحد شامل یک دامنه ATPase استوایی، یک دامنه لولای میانی، و یک دامنه آپیکال است که باقی‌مانده‌های آگریز را برای اتصال بسترهای غیربومی در معرض نمایش می‌گذارد (شکل ۳ قسمت A). محفظه فولدینگ با تعامل با GroES ایجاد می‌شود، یک هپتامر از زیر واحدهای ~ ۱۰ کیلو دالتون که به حوزه‌های آپیکال GroEL متصل می‌شود (شکل ۳ قسمت A). (۱۲).



شکل ۳- مکانیسم مولکولی چاپرونین GroEL/ES

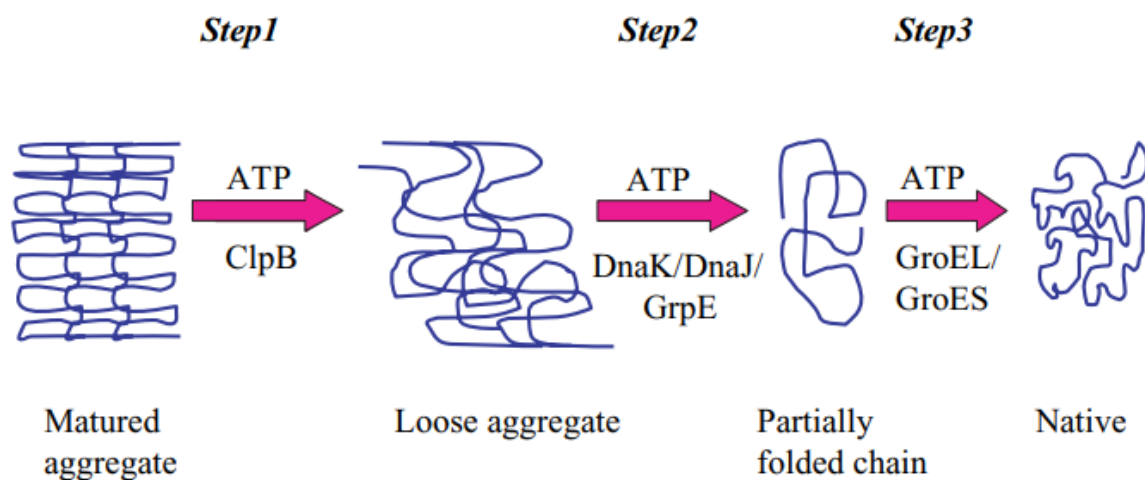
### بیماری‌های مرتبط با فولدینگ پروتئین‌ها

تعداد زیادی از بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی در انسان ناشی از تاخوردگی و تجمع اشتباه پروتئین است. اعتقاد بر این است که تا کردن اشتباه پروتئین علت اصلی بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون، بیماری هانتینگتون، بیماری کروتسفلد-جاکوب، فیروز کیستیک، بیماری گوچر و بسیاری از اختلالات دژنراتیو و عصبی است. چاپرون‌های مولکولی سلولی، که همه‌جا پروتئین‌های ناشی

از استرس هستند، و چاپرون‌های شیمیایی و دارویی تازه یافته‌شده، در جلوگیری از تا زدن نادرست پروتئین‌های مختلف بیماری‌زا مؤثر بوده و اساساً شدت چندین اختلال عصبی و بسیاری دیگر از تا زدن اشتباه پروتئین‌ها را کاهش می‌دهند (۱۳).

### نقش چاپرون‌ها در بیماری

چاپرون‌های مولکولی عملکردهای مهمی برای کنترل آسیب در حین و پس از استرس دارند. در شرایط آزمایشگاهی، بسیاری از چاپرون‌ها مانند *E. coli* IbpB, DnaJ, DnaK, GroEL, HtpG, SecB و پروتئین‌هایی مانند HspU, DegP و Ion می‌توانند پلی‌پپتیدهای باز شده را متصل کرده و از تجمع آنها جلوگیری کنند. آن‌ها همچنین در حل شدن آگریگیت‌ها نقش دارند. آگریگیت‌های پایدار در هنگام عملکرد جداگانه در برابر اکثر سیستم‌های چاپرون ATPase مقاوم هستند، به عنوان مثال GroEL, Hsp90, ClpB و غلظت‌های پایین DnaK. Skowyra و همکاران مشاهده کردند که سیستم چاپرون DnaK ممکن است برخی از اشکال تجمع پروتئین را دوباره فعال کند. مشاهده شده است که Hsp100، که شامل ClpA, Ipb, Hsp100، ClpX و HspU در *شریشیا کلی* است، دارای فعالیت جداسازی است. مشخص شده که ClpA و ClpX برخی از ساختارهای پروتئینی طبیعی را بی‌ثبات می‌کنند (۱۴). شریمر و همکاران نشان داده‌اند که Hsp70 و Hsp100 در ترکیب برای فعال کردن مجدد بسیاری از توده‌های پروتئینی عمل می‌کنند. آنها همچنین نشان دادند که Hsp104 با Hsp70 و Hsp40 در یک تجزیه آهسته و ناکارآمد همکاری می‌کند، که به طور کلی محدود به دانه‌های کوچک لوسیفراز و  $\alpha$ -گالاکتوزیداز است. یافته‌های آن‌ها با شواهدی تأیید شده است که نشان می‌دهد هر دو همراه در کسب سلولی تحمل حرارتی با یکدیگر همکاری می‌کنند. گزارش شده است که فاکتور غیر مندلی مخمری [+psi]، که مشابه پروتئین‌های پستانداران است، زمانی که مقادیر متوسطی از پروتئین چاپرون Hsp104 وجود دارد و تولید بیش از حد یا غیرفعال شدن Hsp104 باعث از دست دادن [+psi] می‌شود، تکثیر می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که چاپرون‌ها در پیشرفت بیماری پروتئین بسیار مهم هستند و سطح مشخصی از بیان چاپرون می‌تواند سلول‌ها را از شر پروتئین‌ها خلاص کند، بدون اینکه بر قابلیت حیات آن‌ها تأثیر بگذارد. کنترل سطح بیان Hsp104 ممکن است درمانی در برابر بیماری پروتئین ارائه دهد. علاوه بر این، Hsp104، همراه با Hsp70، مسئول حل شدن دانه‌های پروتئین مانند در ساکارومایسس سرویزیه است. بسیاری از پاسخ‌های مثبت دیگر در مورد جداسازی همراه با واسطه سلولی در داخل بدن گزارش شده‌اند. یک آزمایش کلاسیک توسط Goloubinoff و همکاران انجام شد، که پدیده‌های فعال‌سازی مجدد در شرایط آزمایشگاهی و تجزیه توده‌های پایدار مالات دهیدروژناز توسط ClpB همراه با DnaK، GrpE (KJE) و اثبات کردند و مکانیسم کل فرآیند تجزیه را بیشتر توضیح دادند. (شکل ۴).



شکل ۴- فرآیند ضدتجمع پروتئین در *شریشیا کلی* توسط چاپرون

### نقش چاپرون‌های شیمیایی و دارویی در حفظ ساختاری پروتئینی

چاپرون‌های شیمیایی راهبرد دیگر برای جلوگیری از تا خوردگی نادرست یا اصلاح ساختار کشنده پروتئین جهش یافته، تأثیرگذاری بر محیط فولدینگ پروتئین در داخل سلول است. به منظور آزمایش این ایده، پروتئین  $\Delta F508$  CFTR برای توانایی فولدینگ آن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و  $> 30$  درجه سانتی گراد آزمایش شد. مشاهده شد که در دمای بالاتر، بخشی از پروتئین تازه سنتز شده به اشتباه تا خورده و تخریب می‌شود، در حالی که در دمای پایین‌تر بخشی از آن ساختار طبیعی را تشکیل می‌دهد. این به کشف برخی از ترکیبات شیمیایی کمک کرد که پروتئین‌ها را در برابر دناتوره شدن حرارتی تثبیت می‌کنند و ممکن است به اصلاح عیوب تا خوردگی پروتئین‌ها کمک کنند. این ترکیبات در مجموع چاپرون‌های شیمیایی نامیده می‌شوند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که چاپرون‌های شیمیایی در جلوگیری از تشکیل ساختار نادرست چین خورده و متعاقب آن تشکیل آمیلوئید موثر هستند. آن‌ها ترکیباتی با جرم مولکولی کم هستند که برای تثبیت ساختار پروتئین در برابر دناتوره شدن حرارتی و شیمیایی شناخته شده‌اند. نشان داده شده است که چاپرون‌های شیمیایی اگرگیست و تاخوردگی نا صحیح درون سلولی چندین پروتئین مختلف مانند CFTR،  $\alpha$ -آنتی تریپسین، آکواپورین-۲، گیرنده وازوپرسین-۲،  $\alpha$ -گالاکتوزیداز-A، p53 و P-گلیکوپروتئین را معکوس می‌کنند (۱۵، ۱۶).

### تنظیم بیان ژنهای شوک حرارتی

#### مکانیسم های تنظیم کننده ژن های شوک حرارتی

در باکتری‌ها، تنظیم ژن‌های شوک حرارتی می‌تواند مثبت یا منفی باشد. تنظیم مثبت از عوامل سیگما جایگزین استفاده می‌کند تا به طور خاص ماشین رونویسی را به زیر مجموعه ای از پروموتورهای انتخاب شده هدایت کند، در حالی که تنظیم منفی توسط سرکوبگرهای رونویسی تنظیم می‌شود. جالب توجه است، در حالی که چندین باکتری مکانیسم‌های منحصراً مثبت یا منفی را اتخاذ می‌کنند، در برخی میکروارگانیسم‌ها این استراتژی‌های متضاد با هم وجود دارند و یک شبکه تنظیمی پیچیده از ژن‌های شوک حرارتی ایجاد می‌کنند (۱۷).

#### فاکتورهای تنظیم کننده رونویسی شوک حرارتی

تنظیم رونویسی ژن‌های شوک حرارتی درجات مختلفی از پیچیدگی را در میان میکروارگانیسم‌های مختلف نشان می‌دهد که منعکس کننده تنوع شدید مکانیسم‌های تنظیم کننده ژنتیکی در باکتری‌ها است. در چندین باکتری، تنظیم رونویسی شوک حرارتی منحصراً توسط یک عامل  $\sigma$  اختصاصی مدیریت می‌شود که آنزیم RNA پلیمراز را قادر می‌سازد تا ژن‌های خاصی را که برای پاسخ به استرس دما مهم هستند رونویسی کند (جدول ۲). در چنین موارد ساده‌ای، تمام ژن‌های پاسخ‌دهنده به حرارت تحت کنترل یک تنظیم کننده هستند. برای مثال، در *Sodوموناس آئروژینوزا* و در *ویبریوکلرا*، تنظیم رونویسی ژن‌های شوک حرارتی توسط یک فاکتور سیگما جایگزین خاص برای تنش گرمایی کنترل می‌شود که از نظر توالی و عملکرد مشابه  $\sigma 32$ /شیریشیا کلی است. در اینجا، دو فاکتور  $\sigma$  جایگزین ( $\sigma 32$  و  $\sigma E$ ) در تنظیم شوک حرارتی نقش دارند، با  $\sigma 32$  نقش عمده‌ای در سنجش محرک‌های سیتوپلاسمی و غشای داخلی دارد، در حالی که  $\sigma E$  متعهد به پاسخ استرس برون سیتوپلاسمی است (۱۸).

در سایر گونه‌های باکتریایی، همزیستی مکانیسم‌های کنترل مثبت و منفی، همراه با تنظیم بیان مجموعه‌های متمایز ژن‌های شوک حرارتی، مشاهده شده است. به عنوان مثال، در پاتوژن گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز*، سه گروه از ژن‌های شوک حرارتی وجود دارد که هر کدام با استراتژی متفاوتی کنترل می‌شوند. به طور مفصل، ژن‌های متعلق به کلاس I (اعضای رمزکننده سیستم‌های چاپرون اصلی DnaK و GroE) و کلاس III (شاپرون‌های کدکننده و پروتئازهای Clp وابسته به ATP) به ترتیب توسط HrcA و توسط مهارکننده شوک حرارتی CtsR تنظیم منفی می‌شوند. در مقابل، ژن‌های متعلق به کلاس II (کد کننده پروتئین‌های استرس

دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

عمومی) به طور مثبت توسط فاکتور سیگما جایگزین  $\sigma^B$  کنترل می شوند. جالب است که در سیانوباکتری ها، هر دو استراتژی مثبت و منفی تنظیم رونویسی برای کنترل بیان برخی از ژن های شوک حرارتی ترکیب می شوند. به عنوان مثال، در *Synechocystis* PCC6803، اپرون *groESL* به طور منفی توسط سیستم *HrcA/CIRCE* تنظیم می شود و به طور مثبت توسط فاکتورهای سیگما جایگزین *SigB* و *SigE* تنظیم می شود. علاوه بر این، هیستیدین کیناز *Hik34* در تنظیم منفی ژن چارونین نقش دارد. علاوه بر مکانیسم های رونویسی، تنظیم ژن های شوک حرارتی مبتنی بر RNA در سیانوباکتری ها نیز گزارش شده است. بیان ژن *hsp17* که برای پروتئین شوک حرارتی کوچکی که *HspA* نیز نامیده می شود، کد می کند، از نظر رونویسی به فاکتورهای سیگمای جایگزین *SigB* و *SigE* وابسته است و پس از رونویسی توسط ساختار RNA حساس به دما در بخش  $5'$ -UTR از ژن کنترل می شود (۱۹).  
جدول ۲- فاکتورها و ژن های تحت تاثیر (۱۷).

ژن های تنظیم شده	فاکتور تنظیم رونویسی	باکتری
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE, clpP</i> and others	RpoH	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>groESL</i>	HrcA	
Class I: <i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE</i> , and others	HrcA	<i>Bacillus subtilis</i>
Class II: genes coding for general stress proteins	$\sigma^B$	
Class III: <i>clpP, clpE, ctsR-mcsA-mcsB-clpC</i> and others	CtsR	
	Unknown	
Class IV: <i>htpG</i>	CssS/CssR	
Class V: <i>htrA, htrB</i> and others	Unknown	
Class VI: <i>ftsH, clpX</i> and others		
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE, ibpA</i> and others	$\sigma^{32}$ ( $\sigma^H$ , RpoH)	<i>Escherichia coli</i>
<i>degP, clpX, lon</i> and others	$\sigma^E$ ( $\sigma^{24}$ )	
<i>cbpA-hspR-helicase, groESL, hrcA-grpE-dnaK</i>	HspR	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>groESL, hrcA-grpE-dnaK</i>	HrcA	
Class I: <i>groESL, dnaK</i> , and others	HrcA	<i>Listeria monocytogenes</i>
Class II: genes coding for general stress proteins	$\sigma^B$	
Class III: <i>clpP, clpB, hslU</i> and others	CtsR	
<i>dnaK, lon, clpB</i>	HrcA	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>groESL, dnaK, clpP, hsp18</i> and others	HrcA	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>groESL, dnaK</i> , and others	$\sigma^H$ (RpoH)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>hrcA-dnaK, groESL</i>	HrcA	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>clpP, clpC, clpB, hrcA-dnaK, groESL</i>	CtsR	
genes coding for general stress proteins	$\sigma^B$	
<i>groESL, dnaK-dnaJ, grpE</i>	HrcA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>groESL, clpP, clpC, clpE</i>	CtsR	
<i>clpP, groESL, dnaK</i>	HrcA	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>clpP, groESL</i> , other <i>clp</i> genes	CtsR	
<i>groESL1, groEL2, dnaJ2</i>	HrcA	<i>Streptomyces albus</i>
<i>dnaK, clpB</i>	HspR	
<i>hsp18</i>	RheA	
<i>groESL, groEL-2, dnaK2</i> and others	HrcA	<i>Synechocystis PCC6803</i>
<i>groESL, groEL-2, dnaK2, hspA, htpG</i> and others	SigB	
<i>groESL, groEL-2, dnaK2, hspA, htpG</i> and others	SigE	
<i>groESL, dnaK2, htpG</i>	Hik34	
<i>groESL, dnaK-dnaJ, lon, clpB</i> , and others	$\sigma^{32}$ (RpoH)	<i>Vibrio cholerae</i>

مکانیسم های سنجش گرما در باکتری ها در پاسخ به محیط

توانایی باکتری ها برای واکنش سریع به افزایش ناگهانی دما به مکانیسم های حسگر حرارت بستگی دارد که نشانه های محیطی را برای فعال کردن مسیرهای پاسخ مناسب ادغام می کنند. تا به امروز، مکانیسم های مختلفی از تنظیم حرارت در باکتری ها توصیف شده



است و تقریباً تمام کلاس‌های بیومولکول‌ها از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک (یعنی هم DNA و هم RNA) را شامل می‌شود. همه این کلاس‌ها می‌توانند به عنوان حسگرهای حرارتی عمل کنند که تغییرات دمای محیط را تشخیص داده و پاسخ‌های سلولی مربوطه را آغاز می‌کنند. مکانیسم‌های حسگر گرما می‌توانند مستقیم باشند، که توسط آن دما به طور مستقیم بر فعالیت مولکول زیستی حسگر تأثیر می‌گذارد، یا می‌تواند غیرمستقیم باشد که به وسیله آن پیامدهای افزایش ناگهانی دما (به عنوان مثال، تجمع پروتئین‌های تا شده اشتباه در سیتوپلاسم) شناسایی می‌شود. اگرچه دما یک سیگنال فراگیر است که چندین مسیر سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، این فصل عمدتاً بر مکانیسم‌های حسی متمرکز است که بیان ژن شوک حرارتی را تحریک می‌کند و تنها چند نمونه از حسگرهای حرارتی که در تنظیم عوامل بیماری‌زا است توضیح داده می‌شوند (۲۰).

#### سنجش دما از طریق RNA

سریع‌ترین روش تغییر بیان ژن در پاسخ به تغییرات دما بر اساس یک عنصر تنظیم‌کننده سیس است که بخشی از mRNA است که پروتئین شوک حرارتی را کد می‌کند. این مکانیسم تنظیم حرارت، پاسخ بسیار سریعی را پس از درک سیگنال تضمین می‌کند، زیرا دما بر کارایی ترجمه هر دو مخزن درون سلولی مولکول‌های mRNA و هم‌چنین رونویسی در حال انجام تأثیر می‌گذارد. اصل کلی مبتنی بر تشکیل ساختارهای ثانویه زیپ‌مانند و حساس به دما است که mRNA های تحت این نوع تنظیم را مشخص می‌کند (شکل ۵ قسمت A). به طور خاص، در دمای فیزیولوژیکی، ناحیه ۵' این دسته از mRNA ساختاری را تشکیل می‌دهد که مانع از عناصر توالی حیاتی برای شروع ترجمه می‌شود، مانند محل اتصال به ریبوزوم (همچنین به عنوان دنباله شاین-دالگرنو شناخته می‌شود) و شروع ترجمه. کدون هنگامی که چنین عناصر توالی در یک ساختار ثانویه دخالت دارند، تشخیص و اتصال رونوشت توسط ریبوزوم با مشکل مواجه می‌شود و در نتیجه بر ترجمه mRNA تأثیر منفی می‌گذارد. با افزایش دما، ساختار ثانویه از طریق یک بازآرایی یا ذوب جزئی از بین می‌رود. در نتیجه، ریبوزوم‌ها می‌توانند به راحتی به ناحیه 5' mRNA دسترسی پیدا کنند و ترجمه افزایش می‌یابد. چندین توالی RNA حساس به دما که به عنوان دماسنج RNA نیز شناخته می‌شوند، در دو دهه اخیر کشف و با جزئیات مشخص شده‌اند (۲۱).

اولین دماسنج RNA در *شریشیا کلی* کشف شد و بیان فاکتور سیگما جایگزین شوک حرارتی  $\sigma^{32}$  را تنظیم می‌کند. این یکی از پیچیده‌ترین دماسنج‌های RNA را نشان می‌دهد که تاکنون شناخته شده‌اند، با ساختار ثانویه گسترده‌ای که فقط به ناحیه mRNA RpoH 5' محدود نمی‌شود. به طور خاص، اگرچه در ساختار ثانویه مشخص شده، توالی Shine-Dalgarno تا حدی در معرض دید قرار می‌گیرد، ترجمه mRNA ژن *rpoH* در دمای پایین توسط جفت شدن درون مولکولی بین ناحیه ترجمه نشده ۵' و بخشی از توالی کدکننده بلافاصله در پایین دست کدون شروع AUG مانع می‌شود. با این حال، دماسنج‌های RNA بسیار ساده‌تری وجود دارند که نمونه‌ای از آن با کنترل بیان ژن *hspA* *Bradyrhizobium japonicum* است. این توالی تنظیم‌کننده سیس، عضو موسس فراوان‌ترین دسته دماسنج‌های RNA به نام ROSE برای سرکوب بیان ژن‌های شوک حرارتی است. عناصر ROSE به طور معمول در تنظیم پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک نقش دارند و طول آنها از ۶۰ تا حدود ۱۲۰ نوکلئوتید متغیر است. عناصر ROSE به عنوان یک عنصر DNA حفاظت شده قبل از چندین ژن شوک حرارتی در ریزوبیاهای مختلف مورد توجه قرار گرفتند. در ابتدا، حدس زده شد که آن‌ها در سطح DNA عمل می‌کنند و مکانیسم تنظیمی آنها به اتصال یک پروتئین سرکوبگر وابسته است. با توجه به اینکه امکان پیش‌بینی ساختار ثانویه مشابه برای همه ۱۵ عنصر ROSE شناخته شده وجود داشت، یک مکانیسم پس از رونویسی پیشنهاد شد و با تجزیه و تحلیل جهش دقیق یک همجوشی ترجمه‌ای ROSE-hspA-lacZ تأیید شد. مشخصات مولکولی و ساختاری گسترده بعدی برخی از ویژگی‌های کلیدی این نوع دماسنج‌های RNA را نشان داد. جالب توجه است، نشان داده شد که دماسنج‌های RNA مبتنی بر ROSE شامل دو تا چهار حلقه ساقه هستند و می‌توانند به تدریج به تغییرات دما پاسخ دهند و سطوح مختلف تنظیم بیان را با توجه به شدت تنش گرمایی ارائه دهند (۲۲).

#### سنجش دما از طریق DNA

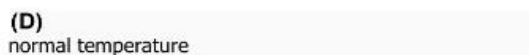
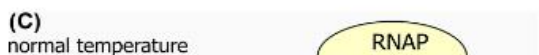
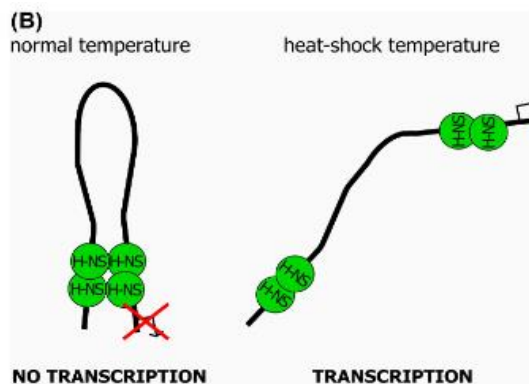
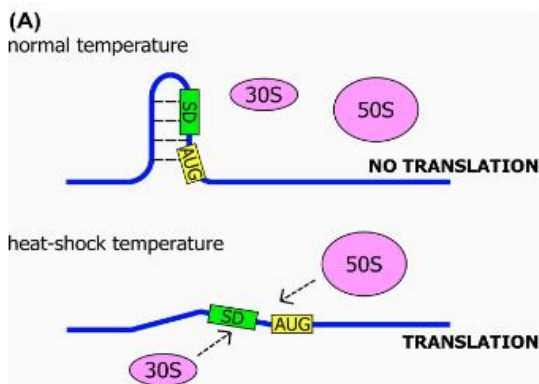
در برخی موارد، تغییرات دما را می توان مستقیماً توسط DNA سلول باکتری تشخیص داد. چندین مسیر متابولیک فیزیولوژیکی یک میکروارگانیسم تحت تأثیر شرایط خارجی تجربه شده است. به نوبه خود، وضعیت متابولیک سلول از جمله نسبت ADP به ATP تحت تأثیر قرار می گیرد. در نتیجه، آنزیم هایی که به ATP به عنوان کوفاکتور نیاز دارند، مانند DNA gyrase، تحت تأثیر قرار خواهند گرفت. این آنزیم که فعالیت آن کاملاً با وضعیت توپولوژیکی DNA مرتبط است، به ATP وابسته است و توسط ADP مهار می شود (بنابراین تغییر در نسبت ATP:ADP بر فعالیت DNA گیزاز تأثیر می گذارد). به همین دلیل، شرایط نوسان خارجی که بر فرآیندهای متابولیک، از جمله شوک اسمزی و حرارتی تأثیر می گذارند، می توانند در نهایت بر سطح جهانی ابرپیچ زنی DNA تأثیر بگذارند. با توجه به اینکه ابرپیچ DNA می تواند بر رونویسی ژن تأثیر بگذارد، DNA را می توان به عنوان یک حسگر حرارتی تغییر دمای محیط در نظر گرفت که از طریق تغییرات وضعیت توپولوژیکی جهانی کروموزوم در پاسخ به محرک های خارجی عمل می کند. یکی از پارامترهای اولیه توپولوژی DNA که به تغییرات دما پاسخ می دهد، ابرپیچ پلاسمیدی است. به طور خاص، هم در باکتری های مزوفیل و هم در باکتری های هایپرترموفیل نشان داده شد که تغییرات ناگهانی دما منجر به تغییرات گذرا در توپولوژی DNA پلاسمید می شود و این اثر، به نوبه خود، تأثیر قابل توجهی بر کارایی رونویسی دارد (۲۳). با این حال، در برخی موارد دیگر، ساختارهای DNA محلی، حس دما را واسطه می کنند و رونویسی ژن های همسایه را تحت تأثیر قرار می دهند. برخی از توالی های DNA شناسایی شده در اشرشیاکلی و در چندین باکتری دیگر با ترکیب توپولوژیکی خاص توالی مشخص می شوند که می تواند ترکیب های مختلفی را در پاسخ به تغییرات دما در نظر بگیرد. هنگامی که این نواحی DNA نزدیک به پروموترها هستند، تغییرات ساختاری محلی ناشی از شوک حرارتی به مدولاسیونی از کارایی اتصال RNA پلیمراز تبدیل می شود و در نتیجه رونویسی ژن های پایین دست را تحت تأثیر قرار می دهد. یک مثال با ناحیه بالادست ژن *plc* نشان داده شده است که فسفولیپاز C (PLC) را در کستریدیوم پرفریژنز کد می کند. در این مورد، سه بخش A-tracts که قبل از ژن کد کننده PLC هستند، یک ترکیب خمیده قوی به این توالی DNA می دهند. با استفاده از روش های رونویسی آزمایشگاهی، نشان داده شد که اثر تحریکی بر فعالیت پروموتور توالی A-tract وابسته به دما است، احتمالاً به دلیل تغییر در زاویه خم شدگی بر نوسانات دما. علاوه بر فعال سازی مستقیم رونویسی با واسطه DNA خم شده از طریق تسهیل اتصال RNA پلیمراز، انحنای DNA محلی وابسته به دما می تواند به طور غیرمستقیم کارایی رونویسی را با تأثیر بر تعامل پروتئین ها با نقش تنظیمی بر بیان ژن تنظیم کنند. از این نظر، پروتئین های مرتبط با نوکلئید مانند HU، Fis، IHF و H-NS نشان داده شده است که در این نوع فرآیند نقش دارند. یکی از بهترین نمونه های مطالعه شده مربوط به تنظیم وابسته به دما رونویسی *virF* در شیگلا فلکسنسری، یک باکتری بیماری زا است که می تواند به اپیتلیوم روده انسان حمله کند (شکل ۵ قسمت B). تنظیم کننده VirF شبه AraC، پروتئینی که باعث فعال شدن چندین ژن با عملکردهای تهاجمی می شود، باید تنها پس از انتقال از محیط بیرون به میزبان بیان شود. نشان داده شده است که رونویسی پروموتور *virF* در دماهای غیرمجاز (زیر ۳۲ درجه سانتیگراد) توسط پروتئین H-NS مرتبط با نوکلئید سرکوب می شود (۲۴).

علاوه بر این، نشان داده شد که پروموتور *virF* دارای دو محل اتصال H-NS است که توسط یک منطقه خمیده ذاتی جدا شده اند که وجود آن در انالیز های بیوانفورماتیکی پیش بینی شده بود و با نتایج تجربی آزمایشگاهی نشان داده شد. به طرز جالبی، با افزایش دما، این ناحیه DNA تحت یک انتقال ساختاری ناگهانی (در حدود ۳۲ درجه سانتیگراد) قرار می گیرد که بر دسترسی H-NS به سایت های DNA هدف تأثیر می گذارد و پروموتور *virF* را سرکوب می کند. یک فعل و انفعال مشابه بین خم شدن DNA وابسته به دما و اتصال H-NS برای تعدیل بیان ژن همولیزین در ارگانیسم مدل /اشرشیا کلی و افزایش بیان یک سیستم ترشح نوع III در بالای ۳۰ درجه سانتیگراد در *S. enterica* نشان داده شد (۲۵).

به طور خلاصه، حتی اگر چندین مثال از تنظیم بیان ژن وابسته به دما به نقش DNA به عنوان یک مولکول زیستی حسگر اشاره می کند، به نظر می رسد که این مکانیسم سنجش گرما به جای گرما، برای تنظیم بیان ژن های حدت پاسخ شوک بسیار مناسب تر است.

پروتئین های حسگر

باکتری‌ها همچنین می‌توانند با استفاده از پروتئین‌ها به‌عنوان حسگرهای حرارتی، نوسانات دما را در جایگاه‌های اکولوژیکی خود حس کرده و به آن پاسخ دهند. طبقات مختلف پروتئین‌ها، از جمله کینازها، سرکوبگرهای رونویسی شوک حرارتی و چاپرون‌ها، به‌عنوان اند. با این حال، دو دسته اخیر پروتئین‌ها در درجه اول برای انتقال سیگنال‌های استرس حسگرهای تغییرات دما مشخص شده گرمایی استفاده می‌شوند که پاسخ شوک حرارتی رونویسی را تحریک می‌کنند. سرکوبگرهای رونویسی حسگر حرارت ذاتی قادر به تعدیل مستقیم رونویسی ژن‌های هدف در پاسخ به نوسانات دما هستند. به‌طور خاص، آن‌ها فقط در دمای فیزیولوژیکی برای اتصال پروموتور و سرکوب رونویسی ژن‌ها صلاحیت دارند. پس از شوک حرارتی، این سرکوبگرهای حرارتی تحت یک تغییر ساختاری قرار می‌گرفته و باید (شکل ۵ قسمت گیرند که میل اتصال نسبی را برای اپراتورهایشان کاهش می‌دهد. در نتیجه، رونویسی ژن هدف پایین، GC، سرکوبگر ژن‌های شوک حرارتی *باسیلوس سوبتیلیس* و سایر باکتری‌های گرم مثبت با CtsR). با توجه به نکته قبلی، آزمایشگاهی که در دماهای مختلف انجام شد DNA یکی از بهترین نمونه‌های مشخص شده است (۲۶). سنجش‌های اتصال در شرایط شوک حرارتی (۵۰ درجه سانتی‌گراد)، در مقایسه با دمای طبیعی clpC به پروموتور CtsR نشان داد که فعالیت اتصال DNA CtsR رشد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به شدت کاهش می‌یابد. جالب توجه است، از دست دادن فعالیت اتصال وابسته به دما به ابتدا در دمای غیرمجاز و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، CtsR برگشت پذیر نشان داده شد. در واقع، زمانی که تغییر ساختاری وابسته به دما که مسئول از دست دادن CtsR را به دست آورد. در مورد DNA تنظیم کننده فعالیت اتصال به محدود می‌شود، که مکان عملکردی دقیقی را DBD است، به یک ناحیه حلقه غنی از گلیسین کوتاه در DNA فعالیت اتصال به قادر به تشخیص *Streptomyces albus RheA* برای سنجش گرما تشکیل می‌دهد. نشان داده شد که سرکوبگر شوک حرارتی را از DNA فعالیت اتصال به RheA دارد. پس از چالش گرما، CtsR تغییرات دما در غیاب سایر عوامل است و رفتاری مشابه با دست می‌دهد و انتقال از شکل فعال به غیرفعال به یک تغییر ساختاری برگشت پذیر ناشی از دما مربوط می‌شود (۲۷). یک الگوی مرتبط با حدت یرسینیا پستیس و برای Rova وابسته به دما نیز به وضوح برای تنظیم کننده DNA مشابه از ظرفیت اتصال به باکتری *سالمونلا انتریکا* نشان داده شد. در مثال دوم، به‌طور خاص، دما به‌طور برگشت پذیر بر دومین‌های TlpA تنظیم کننده تأثیر می‌گذارد. DNA در حالت الیگومریزه شده پروتئین تأثیر می‌گذارد و در نتیجه بر توانایی اتصال به DNA مناسب اتصال به می‌تواند در برخی موارد به‌عنوان یک دماسنج پروتئینی ذاتی عمل HrcA یکی دیگر از مهارکننده‌های شوک حرارتی گسترده، HrcA-*B. thermoglucosidasius* کند. مشاهده این که پروفایل‌های دناتوراسیون حرارتی *باسیلوس سوبتیلیس* و کمپلکس‌های ممکن است HrcA بسیار با دماهای رشد متفاوت دو میکروارگانیزم سازگار است، به این پیشنهاد منجر شد که رپرسور CIRCE هلیکوباکتر پیلوری HrcA نقشی به‌عنوان حسگر حرارتی داشته باشد. نقش مستقیمی به‌عنوان حسگر حرارتی اخیراً برای سرکوبگر با واسطه DNA در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که اتصال DNaseI نشان داده شده است. به‌طور خاص، نتایج سنجش ردپای در معرض دمای بالاتر از ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار HrcA به شدت وابسته به دما است. هنگامی که هلیکوباکتر پیلوری HrcA را کاهش داد و اساساً غیرفعال شد. به‌طور جالب توجهی، از دست CIRCE گرفت، به‌طور چشمگیری میل اتصال به اپراتورهای دادن فعالیت اتصال پس از درمان شوک حرارتی به نظر می‌رسد در شرایط آزمایشگاهی غیرقابل برگشت باشد، که احتمالاً به‌عنوان یک نتیجه از تغییرات ساختاری عمده در دمای بیش از ۴۰ درجه سانتی‌گراد است. با این حال، وضعیت در داخل بدن متفاوت است، قادر است عملکرد سرکوب کننده خود را پس از چالش دما بازیابی کند (۲۷). HrcA جایی که



شکل ۵- مکانیسم های حسگر دما (۱۷).

### تغییرات بیان ژن‌ها در شرایط استرسی در باکتری‌ها

یکی از مهم‌ترین رویدادها در موجودات مختلف در مواجهه با شرایط حاد محیطی، تغییرات بیان ژن‌ها برای مقابله و زنده ماندن در آن شرایط حاد می‌باشد که در ادامه به یکی از مهمترین تغییرات بیان ژن در شرایط استرس اکسیداتیو پرداخته می‌شود. مشخصات رونویسی ژنومی سلول‌های *اشریشیا کلی* تیمار شده با پراکسید هیدروژن با یک ریزآرایه DNA متشکل از ۴۱۶۹ فریم خواندن باز اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. با اندازه‌گیری بیان ژن در سویه‌های حذفی نوع وحشی و *oxyR*، تأیید شد که تنظیم‌کننده پاسخ پراکسید *OxyR* اکثر ژن‌های بسیار القایی با پراکسید هیدروژن را فعال می‌کند. اندازه‌گیری‌های میکروآرای DNA امکان شناسایی چندین ژن جدید فعال شده با *OxyR*، از جمله ژن بیوسنتزی *hemH* هم را فراهم کرد. اپرون *suf* شش ژنی که ممکن است در مونتاژ یا تعمیر خوشه Fe-S و چهار ژن با عملکرد ناشناخته شرکت کند. ما هم‌چنین چندین ژن از جمله *uxxA* را شناسایی کردیم که هیدرولاز مانونات را کد می‌کند، که بیان آن‌ها ممکن است توسط *OxyR* سرکوب شود، زیرا بیان آنها در سویه جهش یافته  $\Delta oxyR$  افزایش یافته است. علاوه بر این، القای برخی از ژن‌ها مستقل از *OxyR* بود که نشان‌دهنده وجود سایر حسگرها و تنظیم‌کننده‌های پراکسید در *اشریشیا کلی* است. به عنوان مثال، اپرون *isc*، که فعالیت‌های تشکیل و ترمیم خوشه Fe-S را مشخص می‌کند، توسط پراکسید هیدروژن در سویه‌های فاقد *OxyR* یا تنظیم‌کننده‌های پاسخ سوپراکسید *SoxRS* القا شد. این نتایج درک ما را از پاسخ استرس اکسیداتیو گسترش می‌دهد (۲۸).

### پاسخ وابسته به *OxyR*

مشخصه پاسخ *اشریشیا کلی* به پراکسید هیدروژن، القای سریع و قوی مجموعه‌ای از ژن‌های تنظیم شده با *OxyR* از جمله *dps*، *katG*، *grxA*، *ahpCF* و *trxC* است. القای بیش از ۲۰ برابر مشاهده شده همه این ژن‌ها در سویه نوع وحشی در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- ۳۰ ژن القا شده با پراکسید هیدروژن

Gene	b no.	Induction ratio <sup>a</sup>	Function <sup>b</sup>
<i>dps</i>	b0812	180	Stress response DNA binding protein
<i>yaiA</i>	b0389	56	Function unknown
<i>katG</i>	b3942	44	Catalase hydrogen peroxidase I
<i>grxA</i>	b0849	37	Glutaredoxin I
<i>yfiA</i>	b2597	36	Function unknown
<i>ibpA</i>	b3687	29	Chaperone, heat-inducible protein of HSP20 family
<i>yjiD</i>	b4326	29	Function unknown

<i>ycfR</i>	b1112	26	Function unknown
<i>ahpF</i>	b0606	22	Alkyl hydroperoxide reductase large subunit
<i>trxC</i>	b2582	21	Thioredoxin 2
<i>sufA</i>	b1684	21	Homology with IscA
<i>ymgB</i>	b1166	20	Function unknown
<i>ahpC</i>	b0605	20	Alkyl hydroperoxide reductase small subunit
<i>ibpB</i>	b3686	18	Chaperone, heat-inducible protein of HSP20 family
<i>yaaA</i>	b0006	18	Function unknown
<i>tnaA</i>	b3708	18	Tryptophanase
<i>fpr</i>	b3924	17	Ferredoxin NADP <sup>+</sup> reductase
<i>cysK</i>	b2414	16	Cysteine synthase
<i>sufB</i>	b1683	16	Function unknown
<i>dsdX</i>	b2365	15	Homology with gluconate permease
<i>ybjM</i>	b0848	15	Function unknown
<i>yeeD</i>	b2012	14	Function unknown
<i>dsdA</i>	b2366	13	d-Serine deaminase
<i>soxS</i>	b4062	13	Regulatory protein of <i>soxRS</i> regulon
<i>sbp</i>	b3917	12	Periplasmic sulfate binding protein
<i>sufC</i>	b1682	12	Putative ABC transporter
<i>phoH</i>	b1020	12	Member of <i>pho</i> regulon
<i>hemH</i>	b0475	11	Ferrochelatase
<i>yljA</i>	b0881	11	Function unknown
<i>ycgZ</i>	b1164	11	Function unknown

### *hemH*

یک ژن، *hemH* (b0475) که بیان آن ۱۱ برابر توسط پراکسید هیدروژن در سویه نوع وحشی القا شد، یک فروکلاتاز را کد می‌کند که ادغام یون آهن را در پروتوپورفیرین IX در نهایی کاتالیز می‌کند. مرحله در بیوسنتز پروتوهم جایگاه *hemH* نیز *visA* نامیده شد زیرا برخی از جهش‌های فروکلاتاز/شریشیا کلی به دلیل داشتن یک فنوتیپ حساس به نور شناسایی شدند. قبلاً مشخص شده بود که حساسیت به نور ناشی از افزایش سطوح پروتوپورفیرین IX است که در جهش‌های فاقد فروکلاتاز تجمع می‌یابد (۲۹).

### اپرون *suf*

سه ژن *sufA/ydiC* (b1684)، *sufB/ynhE* (b1683) و *sufC/ynhD* (b1682) که بیان آن‌ها به شدت در سویه نوع وحشی القا شد. این ژن‌ها در یک جهت رونویسی می‌شوند و پتانسیل جفت شدن انتقالی را نشان می‌دهند. Patzer و Hantke پیشنهاد کردند که خوشه ژنی یک اپرون را تشکیل می‌دهد و به دلیل دخالت احتمالی در تجمع گوگرد، ژن‌ها را *sufA*، *sufB*، *sufC*، *sufD*، *sufS* و *sufE* نامیدند. از شش ORF، ژن *sufS* و محصول آن بهترین مشخصه‌ها هستند. این ژن یکی از سه همولوگ *NifS* در *شریشیا کلی* را کد می‌کند و هم‌چنین *csdB* نامیده شده است. هر سه همولوگ ژن *NifS* در *شریشیا کلی*، *CSD*، *IscS* و *SufS/CsdB* حذف گوگرد از ال-سیستئین و سلنیوم از ال-سلنوسیستئین را کاتالیز می‌کنند. با این حال، پروتئین *SufS/CsdB 290* برابر بر ال-سلنوسیستئین فعال تر از ال-سیستئین است و بنابراین به عنوان هم‌تای اشریشیا کلی سلنوسیستئین لیاز پستانداران در نظر گرفته شد. محصولات ژنی پنج ژن باقیمانده *suf* کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما برخی مشابهت‌های جالبی را با سایر پروتئین‌های مشخص شده نشان می‌دهند. *sufA* یک همولوگ از *IscA* را کد می‌کند که همراه با محصولات ژن‌های *iscS* و *iscU* در تشکیل و ترمیم خوشه Fe-S نقش دارد. ژن‌های *sufB*، *sufC* و *sufD* اجزای یک انتقال دهنده کاست اتصال (ABC) ATP را رمزگذاری می‌کنند. هیچ داده بیوشیمیایی در رابطه با این سه ژن یافت نمی‌شود. با این حال، مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که جهش‌یافته‌های اشریشیا کلی *sufC* القای وابسته به *soxR* یک همجوشی ژن *soxS-lacZ* را به تاخیر انداخته‌اند، و پایداری پروتئین یون ردوکتاز [Fe-2S<sub>2</sub>] که توسط *fhuF* کدگذاری می‌شود در *sufD* جهش یافته‌ها کاهش می‌یابد. ژن نهایی در اپرون، *sufE*، یک اکسیدوردوکتاز حفاظت‌شده را کد می‌کند، که همولوگ آن در پایین دست ژن *csd* وجود دارد (۳۰).

اگرچه فقط *sufA*, *sufB* و *sufC* جزو ژن‌های بسیار القا شده هستند، *sufD* (b1681)، *sufS* (b1680) و *sufE* (b1679) نیز با نسبت‌های بالاتری در سویه نوع وحشی القا می‌شوند. برای تأیید تنظیم *OxyR* این اپرون و برای ترسیم شروع رونوشت *suf*، سنجش‌های گسترش پرایمر را انجام دادیم. مطابق با داده‌های ریزآرایه، القای *sufA* وابسته به *OxyR* را شناسایی کردیم. هنگامی که RNA جدا شده از سویه نوع وحشی به عنوان الگو استفاده شد، یک محصول گسترش پرایمر قوی که به یک باقیمانده T در موقعیت ۱۷۶۲۴۴۲، ۳۲ جفت باز در بالادست کدون شروع *sufA* در موقعیت ۱۷۶۲۴۱۰ ختم می‌شد، مشاهده شد. رد پای DNase I که با استفاده از یک قطعه ۳۷۸ جفت باز از ناحیه درون ژنی *sufA-ydiH* انجام شد، نشان داد که *OxyR* اکسید شده منحصراً به سایت پیش‌بینی شده متصل است. با این حال، این تک محل اتصال *OxyR* از انتهای محصول گسترش پرایمر در بالادست فاصله داشت، و در تمام پروموترهای شناخته شده فعال شده با *OxyR*، فاکتور رونویسی در موقعیتی با هم همپوشانی یا مستقیماً در بالادست دنباله -۳۵ پروموتر متصل می‌شود. احتمالاً رونوشت اولیه *sufA* طولانی‌تر است و یا پردازش می‌شود یا به یک ساختار ثانویه پیچیده غیرقابل نفوذ نسبت به رونوشت معکوس تبدیل می‌شود. با توجه به حفاظت غیرمعمول بالای ناحیه درون ژنی *sufA-ydiH*، این احتمال وجود دارد که تنظیم بیان *sufA* پیچیده باشد. ما تنظیم قوی *Fur* بیان *sufA* را در شرایط مورد استفاده در آزمایش‌های خود مشاهده نکرد. با این حال، دو محل اتصال *Fur* فرضی، در موقعیت‌های ۱۷۶۲۴۶۰ و ۱۷۶۲۴۶۶، در پروموتر *suf* پیش‌بینی شده‌اند، و بیان وابسته به *Fur* ترکیبات *sufD-lacZ* و *sufS-lacZ* قبلاً مشاهده شده است. برای درک کامل تنظیم اپرون *suf* به آزمایشات بیشتری نیاز است (۳۱).

#### ژن‌های با عملکرد ناشناخته

چهار ORF با عملکرد ناشناخته، *yaiA*، *yaaA*، *yljA* و *ybjM*، القای پراکسید بسیار قوی‌تری را در سویه نوع وحشی نسبت به سویه حذف *oxyR* نشان دادند. *yaaA* و *yljA* ORF‌های حفاظت شده هستند، اما داده‌های تجربی در مورد عملکرد پروتئین‌های مربوطه را نمی‌توان در مقالات یافت. سنجش گسترش پرایمر تأیید کرد که رونوشت‌هایی که مستقیماً در بالادست اولین کدون پیش‌بینی شده ORF‌های *yaiA*، *yaaA* و *yljA* شروع می‌شوند، توسط پراکسید هیدروژن به روشی وابسته به *OxyR* القا می‌شوند. جستجوی محاسباتی برای مکان‌های اتصال *OxyR* یک سایت اتصال *OxyR* فرضی را در موقعیت ۹۲۲۰۲۶ در پروموتر *yljA* پیش‌بینی کرد. جالب اینجاست که ما قادر به شناسایی رونوشتی نبودیم که ۱۲۵ آمینو اسید ORF *YbjM* (aa) پیش‌بینی شده را رمزگذاری کند. در عوض، نورترن بلات و تجزیه و تحلیل گسترش آغازگر نشان داد که رونوشت *grxA* تنظیم شده با *OxyR* تقریباً ۶۰۰ نوکلئوتید طول دارد و به سمت رشته مقابل *ybjM* گسترش می‌یابد. بررسی توالی آنتی سنس *ybjM* نشان داد که این رشته مخالف نیز یک ORF 81-aa را کد می‌کند (۳۲).

#### (IV) ژن‌های احتمالی سرکوب شده با *OxyR*

در مقایسه ژن‌های القا شده توسط پراکسید هیدروژن در نوع وحشی و جهش  $\Delta oxyR$ ، تعدادی از ژن‌ها، *ytfK*، *ygaQ*، *uxuA*، *ydcH*، *ydeN* و *yaeH* را که با شدت بیشتری در پس‌زمینه  $\Delta oxyR$  القا می‌شوند، اشاره کردیم. *OxyR* هم یک فعال‌کننده و هم یک سرکوب‌کننده است. بنابراین، ممکن است *OxyR* این ژن‌ها را در پاسخ به استرس اکسیداتیو سرکوب کند. جستجوی محاسباتی ما یک محل اتصال *OxyR* را در موقعیت ۴۵۴۹۰۴۴ بین *uxuAB* (رمزکننده هیدرولاز مانونات و اکسیدوردوکتاز مانونات) و ژن *gntP* واگرا (که یک گلوکونات پرمز ممکن را کد می‌کند) پیش‌بینی کرد. از آنجایی که *uxuB* و *gntP* در غیاب *OxyR* نیز نسبت‌های القایی بالاتری را نشان دادند، جالب است که حدس بزنیم که دو پروموتر واگرا توسط *OxyR* اکسید شده سرکوب می‌شوند. به طور مشابه، دو محل اتصال *OxyR* پیش‌بینی شده در موقعیت‌های ۲۷۸۴۰۵۳ و ۲۷۸۴۲۷۶ بین *ygaQ* و یک ژن واگرای احتمالی به نام *b2653* وجود دارد، و هر دو *ygaQ* و *b2653* نسبت القای بالاتری را در سویه جهش یافته  $\Delta oxyR$  نشان دادند.

#### پاسخ‌های مستقل از *OxyR*

تعدادی از ژن‌های شوک حرارتی (*groEL*, *groES*, *grpE*, *dnaK* و *hspG*) از جمله ژن‌هایی که فعالیت‌های پروتئولیتیک را کد می‌کنند (*clpA*, *clpB*, *clpX*) بودند. و *clpP*. ژن‌های SOS (*recA*, *recN*, *lexA* و *dinD*)؛ ژن‌های متابولیسم سولفات و سیستئین (*yspA* و *sbp*)؛ ژن‌هایی که آنزیم‌های چرخه اسید تری کربوکسیلیک (*acnA* و *fumA*) را مشخص می‌کنند. اپرون *nrdHIEF* که سنتز دومین سیستم ردوکتاز ریونوکلئوتیدی را هدایت می‌کند. و ژن استرس جهانی *uspA* نیز تا حدی در هر دو سویه نوع وحشی و سویه جهش یافته القا شد. در مقابل، بیان بسیاری از ژن‌های پروتئین ریپوزومی، ژن‌های شوک سرد، ژن‌های سنتاز ATP و ژن‌های ناقل سرکوب شد.

### رگولون SoxRS

رگولون SoxRS قبلاً گزارش شده بود که عمدتاً توسط ترکیبات مولد سوپراکسید القا می‌شود و نه توسط پراکسید هیدروژن. بنابراین، چندین عضو این رگولون مانند *fpr* (رمزکننده فردوکسین - فلاوودوکسین ردوکتاز) و *sodA* (با نسبت القایی ۸ و کدکننده سوپراکسید دیسموتاز منگنز)، و همچنین خود *soxS*، از جمله ژن‌های هستند که به شدت توسط پراکسید هیدروژن ۱ میلی‌مولار القا می‌شود (۳۳).

### اپرون isc

خوشه ژن *isc* (*b2531*)، *yfhP* (*b2530*)، *iscS/yfhO* (*b2529*)، *iscU/yfhN* (*b2528*)، *iscA/yfhF* (*b2527*)، *hscB* (*b2526*)، *hscA* (*b2525*) و *fd25* (*b25*) به دلیل نقش آن در تشکیل خوشه Fe-S و متابولیسم مرتبط با سیستئین مورد توجه قرار گرفته است. پروفایل بیان نشان داد که چهار ژن اول (*yfhP*، *iscS*، *iscU* و *iscA*) در خوشه به طور متوسط در هر دو سویه نوع وحشی و سویه حذف *oxyR* القا می‌شوند. نسبت القایی برای چهار ژن آخر (*hscB*، *hscA*، *fdx* و *yfhJ*) در خطای آزمایش بود، که نشان می‌دهد این چهار ژن القا نشده‌اند و به‌طور متفاوتی تنظیم می‌شوند. این نتیجه با گزارشی مطابقت دارد که ژن‌های *hscBA* مستقل از ژن‌های *isc* رونویسی می‌شوند. سنجش گسترش پرایمر نشان داد که القای اپرون *isc* توسط پراکسید هیدروژن و پاراکوات مستقل از هر دو *OxyR* و *SoxRS* بود. این سنجش‌ها همچنین اجازه می‌دهند که شروع رونویسی به یک باقیمانده G در موقعیت ۲۶۶۰۲۱۹، ۶۸ جفت باز در بالادست کدون شروع *yfhP* نگاهت شود (۳۴).

## References:

1. AlQuraishi MJC.. End-to-end differentiable learning of protein structure. 2019; 8(4):292-301. e3.
2. Bartlett AI, Radford SEJNs, biology m. An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. (1009) 16(6):582-8.
3. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FUJS. In vivo aspects of protein folding and quality control. (2016).353(6294):aac4354.
4. Liutkute M, Samatova E, Rodnina MVJB. Cotranslational folding of proteins on the ribosome. (2020).10(1):97.
5. Chaudhary R, Atamian HS, Shen Z, Briggs SP, (2014) Kaloshian IJPotNAoS. GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. 111(24):8919-24.
6. Henderson B, Allan E, Coates ARJI. Immunity. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. 2006; 74(7):3693-706.
7. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT. Georgopoulos CP, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. (1988). 333(6171):330-4.
8. Kaufman RJTiCB. A trip to the ER: coping with stress. 2004;14:20-8.
9. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau BJNrmcb. The Hsp70 chaperone network. 2019;20(11):665-80.
10. Luengo TM, Kityk R, Mayer MP, Rüdiger SGJMc. Hsp90 breaks the deadlock of the Hsp70 chaperone system. 2018;70(3):545-52. e9.
11. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FUJFI. Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones. ;2020; 594(17):2770-81.
12. Hayer-Hartl M, Bracher A. Hartl FUJTibs. The GroEL–GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding. 2016; 41(1):62-76.
13. Cohen FE, Kelly JWJN. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. 2003; 426(6968):905-9.
14. Schirmer EC, Glover JR, Singer MA. Lindquist SJTibs. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. 1996; 21(8):289-96.
15. Burrows JA, Willis LK. Perlmutter DHJPotNAoS. Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT) Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in  $\alpha$ 1-AT deficiency. 2000; 97(4):1796-801.
16. Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F. Kanazawa IJNod. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado–Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. 2002; 10(2):88-99.
17. Roncarati D, Scarlato VJFmr Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output. 2017; 41(4):549-74.
18. Slamti L, Livny J, Waldor MKJJob. Global gene expression and phenotypic analysis of a *Vibrio cholerae* rpoH deletion mutant. 2007; 189(2):351-62.
19. Kojima K, Nakamoto HJFI. A novel light-and heat-responsive regulation of the groE transcription in the absence of HrcA or CIRCE in cyanobacteria. 2007; 581(9):1871-80.
20. Shapiro RS, Cowen LEJM. Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing. 2012; 3(5):10.1128/mbio. 00238-12.
21. Kortmann J, Narberhaus FJNrm. Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. 2012; 10(4): 255-65.



22. Waldminghaus T, Gaubig LC, Klinkert B, Narberhaus FJRb. The *Escherichia coli* *ibpA* thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. 2009; 6(4):455-63.
23. Dorman CJ, Corcoran CPJNAR. Bacterial DNA topology and infectious disease. 2009; 37(3):672-8.
24. Colonna B, Casalino M, Fradiani PA, Zagaglia C, Naitza S, Leoni L, et al H-NS regulation of virulence gene expression in enteroinvasive *Escherichia coli* harboring the virulence plasmid integrated into the host chromosome. 1995; 177(16):4703-12.
25. Duong N, Osborne S, Bustamante VH, Tomljenovic AM, Puente JL, Coombes BKJJoBC. Thermosensing coordinates a cis-regulatory module for transcriptional activation of the intracellular virulence system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. 2007; 282(47):34077-84.
26. Elsholz AK, Michalik S, Zühlke D, Hecker M. Gerth UJTEJ. CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. 2010; 29(21):3621-9.
27. Servant P, Grandvalet C, Mazodier PJPotNAoS. The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*. 2000;97(7):3538-43.
28. Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA, Storz GJJob. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. 2001;183(15):4562-70.
29. Bachmann BJJec, cellular St, biology m. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. 1996:2460.
30. Nachin L, El Hassouni M, Loiseau L, Expert D, Barras FJMm. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. 2001;39(4):960-72.
31. Patzer SI, Hantke KJJob. SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. 1999;181(10):3307-9.
32. Zheng M, Wang X, Doan B, Lewis KA, Schneider TD, Storz GJJob. Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. 2001;183(15):4571-9.
33. Nunoshiba T, Hidalgo E, Amabile Cuevas C, Demple BJJJob. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. 1992;174(19):6054-60.
34. Kambampati R, Lauhon CTJB. IscS is a sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. 1999;38(50):16561-8.

## نقش بیوتکنولوژی در توسعه و تولید داروهای جدید

### الهام مقتدایی خوراسگانی<sup>۱\*</sup>، شیما فقیه<sup>۲</sup>، شیوا فقیه<sup>۲</sup>

۱. دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده:

نانوبیوتکنولوژی ترکیبی از بیوتکنولوژی و نانو تکنولوژی است. نانو تکنولوژی به عنوان یک حوزه، در سال های اخیر در جستجوی جایگزین هایی برای غلبه بر چالش های مرتبط با تحویل دارو مورد استفاده قرار گرفته است. تکنیک های مختلفی به منظور ساخت نانوذرات با اثربخشی درمانی بهبود یافته، پایداری دارو، هدف گذاری خاص سلول ها و رهاسازی کنترل شده در داخل سلول، کنار هم قرار گرفته اند. این بررسی تمایل دارد به مفاهیم درگیر در نانوبیوتکنولوژی، کاربرد نانوبیوتکنولوژی در نانوپزشکی، تشخیص، درمان سرطان و رویکردهای تحویل دارو بپردازد.

**کلمات کلیدی:** نانوبیوتکنولوژی، دارورسانی، هدف گذاری، نانوپزشکی

آدرس دانشگاه: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن همراه: ۰۹۱۳۲۸۷۷۹۱۱      تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک نویسنده مسئول: moghtadaiee@gmail.com

## The Role of Biotechnology in the Development and Production of Novel Drugs

Elham moghtadaei-khorasani<sup>1</sup>, Shima Faghieh<sup>2</sup>, Shiva Faghieh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pathobiology department, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

<sup>2</sup>Vet student, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

Nanobiotechnology is a blend of biotechnology and nanotechnology. Nanotechnology, as a field, has been tapped into in recent years, in search of alternatives to overcome challenges associated with drug delivery. Various techniques have been put together in order to fabricate nanoparticles with improved therapeutic efficacy enhanced drug stability, specific targeting of the cells and controlled release inside the cell. This review tends to address the concepts involved in nanobiotechnology, the application of nanobiotechnology in nanomedicine, diagnosis, cancer treatment and drug delivery approaches.

**Key words:** Nanobiotechnology, drug delivery, targeting, nanomedicine.

### مقدمه

بیوتکنولوژی استفاده از فرآیندها، ارگانیسم ها یا سیستم های بیولوژیکی برای تولید محصولاتی است که برای بهبود کیفیت زندگی انسان طراحی شده اند. از سوی دیگر، نانوتکنولوژی شاخه‌ای از مهندسی است که به طراحی و ساخت مدارهای الکترونیکی بسیار کوچک و دستگاه‌های مکانیکی ساخته شده در سطح مولکولی ماده می‌پردازد. نانومواد به سادگی به عنوان موادی که دارای ذرات یا اجزایی با ابعاد خارجی در مقیاس نانو بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند، تعریف شده است (۱).

تعداد بیشتری از سیستم‌های بیولوژیکی موجود در زمین در سطح نانومقیاس هستند. با ترکیب تمام اصول بیولوژیکی، یک دانشمند می‌تواند نتایج آزمایشگاهی را با استفاده از شیمی، فیزیک، نانوتکنولوژی و اصول مهندسی برای تولید و شناسایی مولکول ها و دستگاه های زیستی در مقیاس نانو با استفاده از سیستم های بیولوژیکی به دست آورد. با استفاده از این حقایق، فناوری جدیدی به وجود آمد که به نام «نانوبیوتکنولوژی» شناخته می‌شود (۲). بنابراین نانوبیوتکنولوژی ادغام بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی است. این دارای ترکیبی از رویکردهای زیست شناسی مولکولی با میکروتکنولوژی کلاسیک است. بیوتکنولوژی از دانش و تکنیک های زیست شناسی برای دستکاری فرآیندهای ژنتیکی، مولکولی و سلولی برای ساخت محصولات و خدمات استفاده می‌کند و در زمینه های مختلف از کشاورزی گرفته تا پزشکی و سایر زمینه ها استفاده می‌شود (۳، ۴). اخیراً افزایشی در مواجهه موجودات زنده در اکوسیستم با نانومواد وجود دارد و یک پیش‌بینی برای ادامه افزایش وجود دارد (۱). در نتیجه، منجر به ادغام بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی برای بهبود کیفیت زندگی انسان از طریق تحویل دارو شده است.

### نانوبیوتکنولوژی

پیش بینی می‌شود که در مدت زمان کوتاهی، مهمترین کاربرد نانوتکنولوژی بالینی در توسعه دارویی می‌باشد (۵). تحقیقات مربوط به دارورسانی در حال حاضر از مقیاس میکرو به اندازه نانو در حال پیشرفت است. کاربردهای مرتبط با فناوری نانوذرات (NPs) به عنوان دارو یا ترکیبات دارویی، رویکردهای جدیدی برای رهاسازی کنترل شده، تحویل هدفمند و افزایش فراهمی زیستی هستند (۶، ۷). کپسول های پلیمری فرموله شده در مقیاس نانو، مزایایی از تخریب، رهاسازی دارو با الگوی کنترل و جذب بالا در محل مورد نظر را به همراه دارند (۸). اکنون دانشمندان در سراسر جهان به سمت فرموله کردن پلیمرهای جدید، پالایش پلیمرهای موجود و ارزیابی ترکیبات دارویی پلیمری خاص برانگیخته شده اند. به عنوان مثال، نانوکپسول ها از مونومرها یا با استفاده از رسوب نانو ساده

یک پلیمر ساخته شده اند (۹). در حال حاضر نانوکپسول‌ها از لیپوزوم‌ها و آلبومین تولید می‌شوند. نانومواد به روشی بسیار منحصر به فرد برای برقراری تماس با مولکول‌ها، تعامل و تشخیص هرگونه تغییر در سطح مولکولی از طریق انتقال عوامل تشخیصی و درمانی فرموله می‌شوند (۵، ۱۰). مواد و دستگاه‌های نانومقیاس را می‌توان با استفاده از روش‌های ساخت «پایین به بالا» یا «از بالا به پایین» ساخت. در روش‌های پایین به بالا، نانومواد یا ساختارها از تجمع اتم‌ها یا مولکول‌ها به شیوه‌ای کنترل شده ساخته می‌شوند که توسط وسایل ترمودینامیکی مانند خودآرایی تنظیم می‌شود (۱۱). از سوی دیگر، از پیشرفت‌های میکرو فناوری می‌توان برای ساخت ساختارها و دستگاه‌های نانومقیاس استفاده کرد. این تکنیک‌ها که مجموعاً فن‌آوری‌های نانو ساخت از بالا به پایین نامیده می‌شوند، شامل فوتولیتوگرافی، نانوقالب‌سازی، لیتوگرافی با قلم غوطه‌وری و نانوسیالات است (۱۲، ۱۳).

### نانو پزشکی

مفهوم نانوپزشکی از این ایده متولد شد که نانوروبات‌های کوچک و ماشین‌های مرتبط می‌توانند طراحی، تولید و وارد بدن انسان شوند تا تعمیرات سلولی را در سطح مولکولی انجام دهند. تحقیقات اخیر به عنوان نشانگر نانوپزشکی است که فواید زیادی برای عمل پزشکی به همراه دارد. نانوپزشکی به عنوان کاربردهای مرتبط با نانو تکنولوژی برای تشخیص، نظارت، کنترل و درمان شرایط فیزیولوژیکی یا پاتولوژیک توسط موسسه ملی بهداشت در سال ۲۰۰۲ توصیف شده است (۱۴). نانوپزشکی به حوزه‌های دیگری مانند نانوماشین‌ها، تقلیدهای بیولوژیکی، نانوالیاف، نانوبیومواد پلیمری، آزمایشگاه‌های تشخیصی و حسگرها گسترش می‌یابد (۱۵). کاربردهای عمده در نانوپزشکی، تحویل منطقی دارو، هدف‌گذاری دارویی، عوامل تشخیصی و روش‌های درمانی است.

### کاربرد نانوپزشکی در تشخیص

طب مدرن با هدف قرار دادن سلول بیولوژیکی و شناسایی محل بیماری انسان عمل می‌کند. در ابتدا، تشخیص بر اساس مفهوم تئوری سلولی انجام شد، اما پیشرفت‌هایی در مطالعات سطح اتمی و مولکولی حاصل شد. با ظهور حوزه نانومتری سلول، تکنیک‌های مختلفی که قبلاً برای مطالعه مولکول‌ها و اتم‌ها استفاده می‌شد، مانند تشدید مغناطیسی هسته‌ای، پراش پرتو ایکس و طیف‌سنجی به ساختارهای نانومتری و سایر ماکرومولکول‌ها گسترش یافتند (۵). به عنوان مثال، نانولوله‌ها در تشخیص سرطان ریه با تجزیه و تحلیل ترکیبات موجود در تنفس به دست آمده از بیماران با استفاده از نانولوله‌ها استفاده شده‌اند، نانوسیم‌هایی که عمدتاً از ترکیبات سیلیکونی به دست می‌آیند در تشخیص سرطان نیز استفاده می‌شوند. نانومواد منحصر به فرد دیگری مانند نانوروبات‌ها و حسگرهای زیستی و غیره برای تشخیص دقیق‌تر استفاده می‌شوند (۱۶).

### کاربرد نانوپزشکی در درمان

هدف نانوپزشکی ارائه و هدف قرار دادن داروها، عوامل تشخیصی و درمانی است. این شامل شناسایی اهداف معتبر (سلول‌ها و گیرنده‌ها) مرتبط با شرایط بالینی دقیق است. در مرحله بعدی انتخاب مناسب‌ترین نانوحامل مکان‌های مورد نظر برای به دست آوردن پاسخ‌های مورد نیاز و در عین حال کاهش عوارض جانبی نانوذرات است. به طور معمول، ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک، سلول‌های سرطانی و سلول‌های اندوتلیال اهداف کلیدی هستند (۱۴).

### کاربرد نانوپزشکی در درمان سرطان

در یک مطالعه چهار ساله که بر روی مدل موش در متاستاز سرطان سینه پیشرفته در محفظه قدامی چشم انجام شد، مشخص گردید که نانوذره جدید نه تنها سلول‌های تومور را در چشم می‌کشد، بلکه بقای موش‌های آزمایشی حامل تومورهای 4T1 را افزایش می‌دهد، خط سلولی که کشتن آن بسیار دشوار است (۱۵). نانوذرات به عنوان ابزاری برای از بین بردن تومورها با استفاده از گرما کشف شده‌اند. طلا یک ماده محبوب برای نانوذرات است که به صورت درمانی استفاده می‌شود، زیرا تحمل خوبی دارد و معمولاً

هیچ واکنش نامطلوبی ایجاد نمی کند. به ویژه ذرات پلاسمونیک (نوعی نانوذرات)، هنگامی که نور مادون قرمز نزدیک را جذب می کنند، گرم می شوند، که آنها را قادر می سازد تا بافت های تومور را بکشند (۱۷).

### نانوبیوتکنولوژی برای تحویل دارو

مواد نانومقیاس را می توان به عنوان وسایل حمل دارو برای توسعه روش های درمانی و تشخیصی بسیار انتخابی و موثر مورد استفاده قرار داد. نانوذرات نسبتاً مفیدتر از میکروذرات هستند. به عنوان مثال، ذرات نانومقیاس می توانند از طریق جریان خون، بدون رسوب یا انسداد عروق کوچک حرکت کنند. نانوذرات کوچک می توانند در بدن گردش کنند و به بافت هایی مانند تومورها نفوذ کنند. نانوذرات همچنین می توانند از طریق اندوسیتوز توسط سلول ها جذب شوند. نانوذرات برای رساندن دارو به مکان های هدف برای درمان سرطان (۱۸) یا تحویل عوامل تصویربرداری برای تشخیص سرطان استفاده شده اند (۱۹). نانوذرات هدفمند معمولاً از دارو، مواد محصورکننده و پوشش سطح تشکیل شده اند. مواد محصور کننده می تواند از پلیمرهای زیست تخریب پذیر، دندیریمرها یا لیپوزوم ها ساخته شود. انتشار کنترل شده داروها (مانند مولکول های کوچک، DNA یا RNA یا پروتئین ها) از مواد محصورکننده با آزادسازی داروهای کپسوله شده از طریق فرسایش سطحی یا حجمی، انتشار یا تحریک شده توسط عوامل محیطی مانند تغییرات PH، نور، دما یا با حضور آنالیت هایی مانند گلوکز تعیین می شود (۲۰).

### نانوذرات فلزی

تحقیقات مختلف در توسعه فناوری نانو در چند سال گذشته بر روی مطالعه نانوذرات فلزی برای اثرات ضد میکروبی آنها متمرکز شده است (۲۱). کاهش اندازه نانوذرات فلزی، تعامل بین نانوذرات فلزی و غشای سلولی میکروارگانیسم را تسهیل می کند (۲۲، ۲۳). تثبیت نانوذرات فلزی با عوامل ضد میکروبی، کاربردهای زیادی در تجهیزات پزشکی، صنایع غذایی و تصفیه آب دارد. همچنین نانوذرات فلزی می توانند با پلیمر ترکیباتی بسازند و برای فعالیتهای ضد سرطانی، ضد توموری و ضد میکروبی استفاده شوند (۲۴). نانوذرات به دست آمده از فلزات و ترکیبات آنها بیشتر در درمان بیماری های عفونی استفاده می شود. نمونه هایی از این فلزات مورد استفاده عبارتند از: طلا، نقره و مس که رایج ترین آنها هستند. آنها کاربردهای گسترده ای از جمله عفونت های قارچی، ویروسی، باکتریایی و تک یاخته ای علاوه بر دارورسانی و عملکردهای تشخیصی آنها دارند (۲۵).

### نانوذرات پلیمری

نانوذرات زیست تخریب پذیر با رهش کنترل شده را می توان از طیف گسترده ای از پلیمرها از جمله پلی (اسید لاکتیک)، PLA، پلی (اسید لاکتیک کوگلیکولیک) ساخت PLGA، پلی (اسید گلیکولیک)، PGA و پلی انیدرید PLA، PGA و هم پلیمر آنها. PLGA پلیمرهای زیست سازگار رایجی هستند که برای ساخت نانوذرات استفاده می شوند. نانوذرات ساخته شده از پلیمرهایی با اندازه متوسط کمتر از ۱۰۰ نانومتر از هر دو پلیمر مصنوعی و طبیعی فرموله شده اند. سائز کاهش یافته نانوذرات مورد استفاده برای دارورسانی برای گردش خون سیستمیک بسیار ضروری است. پلیمرهای طبیعی مانند کربوهیدرات ها و پروتئین ها به دلیل تفاوت های خلوص و عمدتاً به پیوند متقابل نیاز دارند که ممکن است داروهای کپسوله شده را دناتورده کند، به طور گسترده برای دارورسانی مورد ارزیابی قرار نگرفته اند. از این رو، نانوذرات پلیمری مصنوعی به طور قابل ملاحظه ای توجه بیشتری را به خود جلب کردند (۵).

### نانوذرات پلیمری به عنوان سیستم تحویل دارو

#### نانوالیاف

این لیاف با قطر کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر هستند. کاربردهای پزشکی شامل مواد ویژه برای پانسمان زخم و منسوجات جراحی، مواد مورد استفاده در ایمپلنت، مهندسی بافت و اجزای اندام مصنوعی است. نانوالیاف ساخته شده از کربن نیز نویدبخش تصویربرداری

پزشکی و ابزار اندازه گیری دقیق علمی است. در حال حاضر، مش های جراحی مورد استفاده برای ترمیم غشای محافظتی که مغز و نخاع را می پوشاند، از مواد ضخیم و سفت ساخته شده اند که کار با آن دشوار است. اما شبکه نانوالیاف سرب نازک تر، انعطاف پذیرتر است و احتمال ادغام آن با بافت بدن بیشتر است (۲۶).

#### پلیمرزوم ها

در زمان های اخیر، محققان بر روی استفاده از وزیکول های پلیمری برای سیستم دارورسانی متمرکز شده اند. اینها از کopolymerهای دوبلوک آبدوست-آبگریز ساخته شده اند (۲۷). تحقیقی که در سال ۲۰۰۳ انجام شد، ثابت کرد که زمان گردش خون پلیمرزوم ها، با افزایش ضخامت دو لایه لیپیدی در داخل بدن افزایش می یابد (۲۸). تحقیق دیگری ثابت کرد که خواص دولایه لیپیدی پلیمری نسبت به دولایه لیپیدی کاملاً متفاوت است و می توان از آن برای اصلاح خواص حامل استفاده کرد (۲۹).

#### لیپوزوم ها

سلول های زنده از دو لایه لیپیدی برای کنترل و تنظیم مولکول های درون و بیرون سلول استفاده می کنند. ارزیابی لیپوزوم هایی که توانایی تقلید عملکرد سلولی طبیعی را دارند، به ویژه لیپیدهایی که در حمل و نقل مواد شیمیایی مختلف درگیر هستند، در نهایت منجر به استفاده از آنها به عنوان یک سیستم دارورسانی شد (۲۲، ۲۳). مزیت اصلی لیپوزوم ها زیست سازگاری آنهاست. از این رو، لیپوزوم ها یک نقطه کانونی اصلی برای تحویل دارو هستند. لیپوزوم ها همچنین قادر به انتقال طیف گسترده ای از داروهای فعال مانند چربی دوست، آمفیپاتیک یا آبگریز هستند. این بدان معناست که ماهیت آمفی فیلیک فسفولیپیدها در آب جمع می شوند تا یک فاز دولایه تشکیل دهند و یک مرکز آبی را محصور کنند. این مرکز برای به دام افتادن داروهای آب دوست است در حالی که داروهای آبگریز در دو لایه فسفولیپیدها به دام افتاده اند (۳۰). با این حال، نقطه ضعف استفاده از سیستم دارورسانی لیپوزوم، پاکسازی سریع دارو از گردش خون از طریق سیستم رتیکولاندوتلیال است، اما این را می توان کاهش داد. معرفی لیپوزوم های PEGylated stealth®، که جذب پروتئین را قطع می کند و منجر به انتقال فعال از طریق سطح PEG می شود (۳۱، ۳۲).

#### میسل کرم مانند

میسل های کرمی گروه جدیدی از حامل های رنگ/دارو استوانه ای هستند (۳۳). نانوذرات تولید شده از میسل های کرمی بسیار پایدار هستند و مشابه فازهای (رشته ای) که در داخل بدن مورد استفاده قرار گرفته اند، به نظر می رسند و نرخ موفقیت بالایی برای فاز دارند، لیگاند های هدف گیری را برای تومورها نشان می دهد (۳۴). درست مانند فازهایی که اسیدهای نوکلئیک را حمل می کنند، میسل ها نیز می توانند داروهای با خاصیت چربی دوستی را انتقال دهند.

#### میسل های پلیمری

میسل های پلیمری از کopolymerهای متشکل از بخش های آب دوست و آبگریز به دست می آیند. ناحیه آبگریز میسل ها هسته داخلی را تشکیل می دهد در حالی که ناحیه آب دوست پوسته بیرونی را تشکیل می دهد (۳۵). میسل های پلیمری می توانند به عنوان ابزاری برای دارورسانی با دو مکانیسم مختلف عمل کنند: با دارو از نظر فیزیکی در هسته مرکزی، یعنی داروهای آبگریز یا با اتصال شیمیایی به بلوک آبگریز قبل از تشکیل میسل محصور می شوند (۳۶).

#### دارورسانی غیر فناوری نانو

علاوه بر نانوذرات پلیمری، انواع دیگری از نانومواد نیز برای اهداف پزشکی مورد استفاده قرار گرفته اند. اینها شامل نقاط کوانتومی پلیمری، نانوذرات با خواص الکترومگناطیس جدید و عوامل کنتراست تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MIR) هستند که برای

تصویربرداری از سلول‌های سرطانی استفاده می‌شوند. بقیه نانولوله‌های کربنی، نانوسیم‌ها و نانوپوسته‌هایی هستند که برای کاربردهای درمانی و تشخیصی استفاده می‌شوند (۳۷). مواد مختلف خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی منحصر به فردی دارند که بر اساس اندازه نانومقیاس و ساختار مواد است.

### نانوساخت از بالا به پایین و میکروساخت در دارورسانی

روش‌های نانوساخت از بالا به پایین و میکروساخت مبتنی بر پردازش مدار مجتمع ممکن است برای ساخت دستگاه‌های تحویل دارو با رهش کنترل شده استفاده شود. با استفاده از روش‌های پردازش فتولیتوگرافی و مدار مجتمع، ریزتراشه‌هایی مبتنی بر سیلیکون ساخته شده‌اند که می‌توانند مواد شیمیایی منفرد یا چندگانه را با استفاده از محرک‌های الکتریکی آزاد کنند (۳۸). تکنیک‌های میکروساخت همچنین برای توسعه روش‌های دارورسانی از طریق پوست بر اساس میکروسوزن‌ها استفاده شده است (۳۹). سوزن‌های میکروساخت بسیار کوچکتر از سوزن‌های زیرپوستی هستند و ممکن است برای تحویل داروها به روشی بدون درد و کارآمد استفاده شوند.

روش‌های پایین به بالا و از بالا به پایین برای بهینه‌سازی وسایل حامل دارورسانی ادغام شده‌اند. به عنوان مثال، رویکردهای میکروساختی برای توسعه دستگاه‌های میکروسیالی که عروق بدن را تقلید می‌کنند و می‌توانند برای آزمایش و بهینه‌سازی تعامل نانوذرات هدف با سلول‌هایی که رگ‌های خونی سرطانی را پوشانده‌اند، مورد استفاده قرار گیرند (۴۰).

### روش از پایین به بالا

شامل استفاده از ذرات مایع برای ساختن نانوذرات است. این فرآیند شامل وسایل فیزیکی می‌باشد که ممکن است یکی از روش‌های اسپری کردن، استفاده از لیزر، کندانس و غیره باشد (۴۱).

### نتیجه‌گیری

نانوبیوتکنولوژی زمینه‌ای است که نویدهای زیادی در تحقیقات پزشکی و داروسازی به ویژه در دارورسانی دارد. این پلت فرمی را برای نانودستگاه‌ها و نانوسیستم‌های نوآورانه فراهم می‌کند که در نهایت فرصت طراحی و تولید سیستم تحویل هدفمند کارآمدترین داروها را به ما می‌دهد. با این حال، برای سوق دادن این زمینه به سمت درمان‌های بالینی قابل دوام، باید بر موانع خاصی غلبه کرد.

### References

1. Jackson T. C , Patani B. O , and Israel M. B, “Nanomaterials and Cell Interactions: A Review.” *Journal of Biomaterials and Nanotechnology* 2017; 8(4): 220-228.
2. Roco M. C, “Nanotechnology: Convergence with Modern Biology and Medicine.” *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14(3): 337-46.
3. Ernest H, Shetty R, “Impact of Nanotechnology on Biomedical Sciences: Review of Current Concepts on Convergence of Nanotechnology with Biology.” *J Nanotechnology Online* 2005; 1: 1-14.
4. Sahoo S, Parveen S, Panda J, “The Present and the Future of Nanotechnology in Human Health Care.” 2007; 3(1): 20-31.
5. Khan I, Khan M, Umar M. N, Oh D. H, “Nanobiotechnology and Its applications in Drug Delivery System: A Review.” *Journal of the Institution of Engineering and Technology* 2015; 9(6): 396-400.

6. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P, “Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis.” *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(5): 631-51.
7. Crommelin D. J, Storm G, Jiskoot W, Stenekes R, Mastrobattista E, Hennink W. E, “Nanotechnological Approaches for the Delivery of Macromolecules.” *J Control Release* 2003; 87(1-3): 81-88.
8. Na K , Bae Y, “Self-assembled Hydrogel Nanoparticles Response to Tumor Extracellular pH from Pullulan Derivative/Sulfonamide Conjugate: Characterization, Aggregation and Adriamycin Release in Vitro.” *Pharm Res* 2002; 19(5): 681-8.
9. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C, “Nanocapsule Technology: A Review.” *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2002 ;19(2): 99-134.
10. Xia Y, Xiong Y, Lim B, Skrabalak S. E, “Shape-controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?” *Angew Chem Int Ed Engl* 2009; 48(1): 60-103.
11. Ferrari M, “Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges.” *Nat Rev Cancer* 2005; 5(3): 161-171.
12. Peppas N. A, “Intelligent Therapeutics: Biomimetic Systems and Nanotechnology in Drug Delivery.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56(11): 1529-1531.
13. Sahoo S. K, and Labhasetwar V, “Nanotech Approaches to Drug Delivery and Imaging.” *Drug Discov Today* 2003 ; 8(24): 1112-20.
14. Moghimi S. M, Hunter A. C, Murray J. C, “Nanomedicine: Current Status and Future Prospects.” *FASEB J* 2005; 19(3): 311-30.
15. Rolland J. P, Maynor B. W, Euliss L. E, Exner A. E, Denison G. M, Desimone J. M, “Direct Fabrication and Harvesting of Monodisperse, Shape-Specific Nanobiomaterials.” *J Am Chem Soc* 2005;127(28): 10096-100.
16. Jackson T. C, Patani B. O, Ekpa D. E, “Nanotechnology in Diagnosis: A Review.” *Advances in Nanoparticles* 2017; 6(3): 93-102.
17. Zurich E. T. H, “Hot Nanoparticles for Cancer Treatment.” *Science Daily*. available at : <http://www.Sciencedaily.com/releases/2014/03/140324111331.htm> ( 2014)
18. Gerf R, et al. “Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres.” *Science* 1994; 263(5153): 1600-3.
19. Lemarchand C, et al. “Polysaccharide-Decorated Nanoparticles.” *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58(2): 327-341.
20. Langer R, and Tirrell D. A, “Designing Materials for Biology and Medicine.” *Nature* 2004; 428(6982): 487-92.
21. Morones J. R, Elechiguerra J.L, Camacho A, et al. “The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles.” *Nanotechnology* 2005; 16(10): 2346-53.
22. Raveh A, Zukerman I, Shneck R, Avni R, Fried I, “Thermal Stability of Nanostructural Superhard Coatings: A Review.” *Surf Coat Technol* 2007; 201(13): 6136-6142.
23. Parveen S, Misra R, Sahoo S. K, “Nanoparticles: A Boon to Drug Delivery, Therapeutics, Diagnostics, and Imaging.” *Nanomedicine* 2012; 8(2): 147-66.
24. Govender T, Stolnik S, Garnett M. C, Illum L, Davis S. S, “PLGA Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation: Drug Loading and Release Studies of a Water Soluble Drug.” *J Control Release* 1999; 57(2): 171-85.
25. Mordorski B, Friedman A. Metal nanoparticles for microbial infection. In *Functionalized nanomaterials for the management of microbial infection*. Elsevier. 2017; 77-109.
26. Paddock Catherine, *Medical News Today* published Friday 4, May, 2012.



27. Discher B. M , Won Y-Y, Ege D. S, et al. “Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers.” *Science* 1999; 284(5417): 1143-6.
28. Pata V, Dan N, “The Effect of Chain Length on Protein Solubilization in Polymer \_ Based Vesicle (polymersomes).” *Biophys J* 2003 ; 85(4): 2111-8.
29. Vinogradov S. V, Bronich T. K, Kabanov A.V, “Nanosized Cationic Hydrogels for Drug Delivery: Preparation, Properties and Interactions with Cells.” *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(1): 135-47.
30. Gabizon A, Papahadjopoulos D, “Liposome Formulations with Prolonged Circulation Time in the Blood and Enhanced Uptake by Tumors.” *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(18): 6949-53.
31. Papahadjopoulos D, Gabizon A, “Liposomes Designed to Avoid the Reticuloendothelial System.” *Prog Clin Biol Res* 1989;343: 85-93.
32. Lin H-Y, Thomas J. L, “PEG-lipids and Oligo (ethylene glycol) Surfactants Enhance the Ultrasonic Permeabilizability of Liposomes.” *Langmuir* 2003; 19(4): 1098-1105.
33. Dalhaimer P, Engler A. J, Parthasarathy R, Discher D. E, “Targeted Worm” 2004
34. Gao Z, Oh K, Kim C-K, “Preparation and Characterization of Sustained Release Microspheres of Chlorpromazine.” *J Microencapsule* 15 (1): 75-83. Micelles.” *Biomacromolecules* 1998 ;5(5): 1714-9.
35. Cammas–Marion S, Okano T, Kataoka K, “Functional and Site-Specific Macromolecular Micelles as High Potential Drug Carriers.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1999; 16(1-4) : 207-215.
36. Lavasanifer A, Samuel, J., Kwon, G. S. “Poly(ethylene oxide)-block-poly(1-amino acid) Micelles For Drug Delivery.” *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(2): 169-90.
37. Loo C, et al. “Immuno Targeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy.” *Nano Lett* 2005; 5(4): 709-11.
38. John T, Santini Jr, et al. “A Controlled-Release Microchip.” *Nature* 1999; 397(6717): 335- 338.
39. McAllister D. V, et al. “Microfabricated Micro Needles for Gene and Drug Delivery.” *Annu Rev Biomed Eng* 2000 ; 2: 289-313.
40. Farokhzad O. C, et al. “Microfluidic System for Studying the Interaction of Nanoparticles and Microparticles with Cells.” *Anal Chem* 2005. 77(17): 5453-9.
41. Khan I, Saeed K , Khan I. “Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities.” *Arabian Journal of Chemistry* 2017; 12(7): 908-931.

## کاربرد ملیتین در درمان سرطان

فاطمه مشهدی<sup>۱\*</sup>، سیده بیتا موسوی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی دکتری تخصصی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** از بین رفتن سلول‌های سرطانی تحت تاثیر زهر زنبور عسل ناشی از ماده‌ای به نام ملیتین (MLT) می‌باشد. این ماده اثر فوق العاده‌ای بر علیه سلول‌های سرطانی دارد و قادر است در عرض چند دقیقه باعث از بین رفتن غشاء سلول‌های سرطانی شده و حیات سلول‌های سرطانی را به خطر بیندازد. این اثرات منجر به کاهش تعداد سلول‌های سرطانی شده و از تکثیر آن‌ها جلوگیری می‌کند. سالانه افراد بسیار زیادی جان خود را بر اثر سرطان از دست می‌دهند. درمان‌های مرسوم برای این بیماری مهلک، جراحی، شیمی درمانی، اشعه تراپی و ایمونوتراپی می‌باشد و هر روزه دانشمندان به دنبال کشف راه‌های جدید و کم خطرتری برای درمان سرطان هستند. تاکنون از زهر زنبور عسل برای درمان درد، آرتریت روماتوئید و بیماری‌های التهابی مزمن استفاده می‌شد و با کشف اثر ضد سرطانی MLT، زهر زنبور عسل نیز به عنوان کاندیدی برای درمان سرطان معرفی شده است. با این حال MLT به طور غیر اختصاصی، غشاء کلیه سلول‌ها را از بین برده و فعل و انفعالات ناخواسته MLT باعث ایجاد اثرات همولیتیک و سیتوتوکسیک شده که این اثرات مانع از کاربردهای درمانی آن می‌شود. با این حال پژوهشگران به دنبال راه‌هایی برای تحویل این ماده ضد سرطانی به سلول‌های سرطانی به طور کاملاً اختصاصی هستند که از جمله این تلاش‌ها استفاده از نانوذرات می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** با توجه به دستاوردهای اخیر مبنی بر خاصیت ضد سرطانی MLT، در این مقاله مروری سعی بر آن شده است تا مکانیسم اثر MLT و معایب و مزایای استفاده از آن در درمان سرطان بررسی شود.

**واژگان کلیدی:** سرطان، ملیتین، زهر زنبور عسل.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۹۶۳۷۳۰۰۷۵

پست الکترونیک: mshhdyfatemeh.com

## The use of Melittin in the treatment of cancer

Fatemeh Mashhadi\*<sup>1</sup>, Seyedeh Bita Mousavi<sup>2</sup>

1. Master's student, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

**Background:** The destruction of cancer cells under the influence of bee venom is caused by a substance called melittin (MLT). This substance has an extraordinary effect against cancer cells and is capable of destroying the membrane of cancer cells within a few minutes and endangering the life of cancer cells. These effects reduce the number of cancer cells and prevent their proliferation. Many people die from cancer every year. Conventional treatments for this deadly disease are surgery, chemotherapy, radiation therapy and immunotherapy, and every day scientists are looking for new and less dangerous ways to treat cancer. So far, bee venom has been used to treat pain, rheumatoid arthritis and chronic inflammatory diseases and with the discovery of the anti-cancer effect of MLT. bee venom has also been introduced as a candidate for cancer treatment. However, MLT non-specifically destroys the membrane of all cells and the unwanted interactions of MLT cause hemolytic and cytotoxic effects, which prevent its therapeutic applications. However, scientists are looking for ways to deliver this anti-cancer substance to cancer cells in a completely specific way, which includes the use of nanoparticles.

**Conclusion:** According to the recent achievements regarding the anti-cancer properties of MLT, in this review article, an attempt has been made to investigate the mechanism of MLT's effect and the disadvantages and advantages of its use in cancer treatment.

**Keywords:** cancer, melittin, bee venom

### مقدمه

ملیتین (MLT) یک پپتید کاتیونی محلول در آب است که از زهر زنبور عسل به دست می‌آید و برای درمان سرطان‌های مختلف به طور کامل مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال، فعل و انفعالات ناخواسته MLT باعث ایجاد اثرات همولیتیک و سیتوتوکسیک گردیده که مانع از کاربردهای درمانی آن می‌شود. برای غلبه بر کاستی‌ها، گروه‌های تحقیقاتی متعددی رویکردهای متفاوتی از جمله ترکیب با پروتئین‌های هدف‌گیری تومور، ژن‌درمانی و کپسوله‌سازی در نانوذرات را برای کاهش اثرات غیراختصاصی سیتوتوکسیک و تقویت فعالیت ضد سرطانی خود اتخاذ کرده‌اند (۱).

در جامعه امروزی، تعداد افرادی که در اثر سرطان سینه جان خود را از دست می‌دهند، بیش از هر زمان دیگری است. در واقع، پیش‌بینی شده است که از هر ۳۹ زن، ۱ نفر بر اثر سرطان سینه می‌میرد. در طول سال‌ها، دانشمندان انواع مختلفی از درمان را برای کمک به کاهش برخی از علائم و جلوگیری از سرطان ایجاد کرده‌اند، مانند شیمی‌درمانی و ایمونوتراپی. اما اخیراً کشفی صورت گرفته است که می‌تواند بیشترین کارایی و اثربخشی را در برابر سرطان سینه داشته باشد. ملیتین، یک پپتید کاتیونی حاوی ۲۶ اسید آمینه‌ای موجود در زهر زنبور عسل بوده که در بسیاری از زمینه‌های پزشکی در حال مطالعه است تا به عنوان شکل جدیدی از درمان در ارتباط با اشکال فعلی درمان مورد استفاده قرار گیرد. MLT در تحقیقات ضد سرطان به دلیل عملکردهای ویژه‌ای از جمله توانایی شروع آپوپتوز با سوراخ کردن خود سلول، مورد آزمایش قرار گرفته است (۲). در این مقاله مروری بر تاریخچه و تاثیر MLT بر سرطان خواهیم پرداخت و مطالعه‌های موردی را تجزیه و تحلیل می‌کنیم تا ببینیم چگونه می‌توان از MLT برای هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی استفاده کرد.

### ملیتین:

ملیتین، جزء پپتیدی اولیه زهر زنبور عسل بوده و یک پپتید ضد سرطانی سیتولیتیک قوی با فعالیت ضد تومور ثابت است. با این حال، به دلیل فعالیت همولیتیک قوی و غیر اختصاصی و همچنین بی‌ثباتی ذاتی آن، کاربرد عملی آن در انکولوژی با مشکل مواجه شده است. بنابراین از سیستم‌های تحویل برای غلبه بر معایب MLT و تسهیل تحویل ایمن آن استفاده می‌شود. با این حال، یک مطالعه اخیر نشان داد که MLT کپسوله شده، ایمنی‌زا باقی می‌ماند و می‌تواند به عنوان یک ادجوانت برای ایجاد یک پاسخ ایمنی عمل کند. طبق مطالعات انجام شده مشخص گردید که جایگزینی اسیدهای آمینه L با اسیدهای آمینه D این مشکل را کاهش می‌دهد. نانوفرمولاسیون‌های D-ملیتین باعث کاهش قابل توجه پاسخ ایمنی گردیده و منجر به ایمنی زایی عالی، بدون به خطر انداختن پتانسیل سیتولیتیک می‌شود. این روش اولین کاربرد D-melittin و فرمول‌های میسلی آن برای درمان سرطان می‌باشد. D-melittin توسط یک حامل پلیمری حساس به pH تحویل داده می‌شود که نانوذرات میسلی، MLT را کپسوله می‌کنند و این میسل در pH آندوزوم تجزیه شده و فعالیت MLT را بازیابی می‌کند. میسل‌های D-ملیتین<sup>118</sup> (DMM) سمیت سلولی قابل توجهی را نشان می‌دهند و همولیز را به روشی وابسته به pH القا می‌کنند. علاوه بر این، DMM مرگ سلولی ایمنی را القا کرده و پتانسیل آن را برای ایمونوتراپی سرطان نشان می‌دهد. در واقع، مطالعات *in vivo*، پروفایل ایمنی برتر DMM را نسبت به پپتید آزاد و کارایی بهبود یافته آن را در جلوگیری از رشد تومور، نشان دادند. این یافته‌ها یک استراتژی جدید برای تحویل ایمن و سیستمیک MLT ایجاد می‌کنند و یک مسیر بالقوه به سمت ترجمه بالینی برای پپتیدهای سیتوتوکسیک به عنوان عوامل ضد سرطان را باز کرده که می‌تواند انتقال *in vivo* پپتیدهای درمانی و آنتی‌ژن‌های پپتیدی را متحول کند (۳).

زهر زنبور عسل برای درمان درد، آرتریت روماتوئید و بیماری‌های التهابی مزمن استفاده می‌شود و با خواص ضد سرطانی، ضد میکروبی، ضد ویروسی و سایر خواص دارویی شناخته شده است. MLT یک پپتید دارای پتانسیل در درمان بیماری‌های مختلف است. با این حال، MLT به دلیل بار مثبت خود باعث ایجاد منافذ در غشای سلولی می‌شود و باعث لیز سلولی می‌گردد. برای غلبه بر این عیب و استفاده از اثر بالقوه ملیتین، نانوذرات PMMA-b-SPMA<sup>119</sup> جدید با بار منفی با پلیمریزاسیون RAFT<sup>120</sup> سنتز شد و نانوذرات با روش نانو رسوب، تشکیل شدند. پس از کمپلکس شدن MLT با نانوذرات، اندازه نانوذرات از ۲۲۳ به ۵۵۰ نانومتر افزایش یافت، در حالی که بار نانوذرات از ۴۰- به ۲/۹۷- میلی ولت افزایش یافت. نتایج سمیت سلولی نشان می‌دهد که سمیت MLT (IC<sub>50</sub>: 2.23 μM) با موفقیت با نانوذرات MLT در سلول‌های ماکروفاژی موش رده Raw 264.7 از بین رفته است. این نانوذرات این پتانسیل را دارند که استفاده موفق و موثر از MLT را در درمان‌های مختلف تسهیل کنند و پتانسیل استفاده از آن را در درمان‌های متنوع ایجاد کنند (۴).

### ساختار ملیتین و تعاملات آن با غشاء

MEL در ابتدا از زهر زنبور عسل جدا و خالص گردید. این ماده، ماده فعال اصلی در زهر زنبور عسل بوده که تقریباً ۵۰ درصد وزن خشک آن را تشکیل می‌دهد به طور خلاصه، MEL از طریق فیلتراسیون ژل، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، یا الکتروفورز مویرگی (CE) از زهر زنبور عسل جدا شده است و با روش ماوراء بنفش، HPLC فاز معکوس و تجزیه و تحلیل اسید آمینه، تجزیه و تحلیل شده است. این پپتید ۲۶ آمینو اسیدی به صورت زیر توالی یابی می‌شود:

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH<sub>2</sub>

<sup>118</sup> D-melitin micelles

<sup>119</sup> Poly (methyl methacrylate)-b-Sulfopropyl Methacrylate

<sup>120</sup> Fragmentation chain transfer

ناحیه N ترمینال آن آگریز است و ناحیه C ترمینال آن آبدوست می‌باشد که به دلیل وجود اسیدهای آمینه با بار مثبت، بار خالص +6 را در pH فیزیولوژیکی حمل می‌کنند که منجر به خاصیت آمی دوستی آن می‌شود. تحت شرایط طبیعی، MEL در حالت تترامر است و در طول تغییر شدت یون به مونومرها تجزیه می‌شود. مارپیچ  $\alpha$ MEL یک ساختار ضروری است که اثرات لیتیک آن را ایجاد می‌کند. تحت شرایط مختلف فیزیولوژیکی، مارپیچ  $\alpha$  یک ترکیب عمودی یا موازی با سطح غشاء ایجاد می‌کند. هنگامی که موازی با سطح غشاء لنگر می‌اندازد، مولکول MEL غیرفعال است و این شکل از وارد شدن پپتیدهای دیگر به لایه‌های دوتایی لپیدی جلوگیری می‌کند. در حالت دیگر، MEL به صورت عمود بر لایه دوتایی لپیدی وارد می‌شود و باعث تشکیل منافذ و پارگی غشاء می‌شود که منجر به نشت هموگلوبین یا سایر محتویات داخل سلولی می‌شود، با این حال، مکانیسم خاص MEL و غشای سلولی بحث‌برانگیز باقی می‌ماند (۵-۷).

### کاربرد ملیتین در درمان سرطان

درمان با آپیتوکسین<sup>۱۲۱</sup> (زهر زنبور عسل) در درمان سرطان در سراسر جهان به رسمیت شناخته شده است. محصولات زنبور عسل پتانسیل قابل توجهی برای تقویت سیستم ایمنی و بهبود سلامت انسان دارند. زهر زنبور عسل (آپیتوکسین) در غده زهر شکم زنبور عسل تولید می‌شود و زنبورهای بالغ از آن به عنوان یک مکانیسم دفاعی اولیه کلنی استفاده می‌کنند. آپیتوکسین شامل ترکیبات بیولوژیکی فعال متعددی از جمله پپتیدها، آنزیم‌ها، آمین‌ها، اسیدهای آمینه، فسفولیپیدها، مواد معدنی، کربوهیدرات‌ها و اجزای فرار است. مطالعات عمدتاً بر روی کشف پتانسیل MLT زهر زنبور عسل متمرکز شده است که پتانسیل امیدوارکننده‌ای را در درمان چندین سرطان انسانی از جمله سینه، معده، ریه، پروستات، تخمدان، کلیه، روده بزرگ، معده، مری، سرطان دهانه رحم، ملانوما، استئوسارکوم و کارسینوم کبدی نشان داده است. این بررسی‌ها تمام مطالعات بالقوه مربوط به اثر ضد سرطانی ملیتین، فرمول‌بندی‌ها، ترکیبات و فرمول‌های نانو را در برابر چندین سرطان انسانی خلاصه کرده است که راه را برای محققان آینده در توسعه داروهای قوی برای مدیریت سرطان هموار می‌کند (۸).

شواهد جمع آوری شده قویاً نشان می‌دهد که MLT پتانسیل درمان سرطان را دارد. اثرات ضد سرطانی MLT باید با جزئیات بیشتر مورد بررسی قرار گیرد و به عنوان یک روش جایگزین برای درمان سرطان توسعه یابد. در بسیاری از مناطق جهان که داروهای شیمی درمانی گران قیمت از طریق سیستم مراقبت‌های بهداشتی در دسترس نیستند، این استراتژی در صورت موفقیت آمیز بودن می‌تواند ارزش زیادی داشته باشد. MLT در ایجاد آپوپتوز، نکروز، اختلال میتوکندری، پیشگیری از رگرایی، توقف چرخه سلولی و سرکوب تهاجم و متاستاز به سلول‌های سرطانی اثربخشی قابل توجهی نشان داده است. MLT یک گزینه امیدوارکننده برای درمان سرطان است، اما توانایی لیز درون تنی MLT و برخی سمیت سلولی غیراختصاصی استفاده از آن را به عنوان یک عامل درمانی در محیط‌های بالینی محدود کرده است. MLT در درمان سرطان با استفاده از تکنیک‌های نانو تکنولوژی در حال بهبود است. مجموعه تحقیقات موجود قویاً نشان می‌دهد که می‌توان از فناوری نانو، برای تحویل دادن MLT جهت هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی استفاده کرد. این عمل به طور قابل توجهی کارایی درمانی MLT را افزایش و اثرات همولیتیک آن را کاهش داده و یا از بین می‌برد و ثبات، ویژگی و کارایی آن را بهبود بیشتری بخشیده و می‌تواند ایمن‌تر و مقرون به صرفه تر عمل کند. استفاده بالینی در مدیریت سرطان توسط MLT راه درازی در پیش دارد. با این حال، ادامه تحقیقات در مورد این موضوع در نهایت این مولکول‌ها را قادر می‌سازد تا به عنوان یک درمان ضد سرطانی احتمالی در آینده مورد ارزیابی قرار گیرد (۵).

در مطالعه دیگر، یک پلتفرم جدیدی بر پایه مهندسی ژنتیک جهت تحویل دارو بر پایه آنتی‌بادی-ملیتین وزیکولی<sup>۱۲۲</sup> (VAM) برای درمان ترکیبی سرطان هدفمند، پیشنهاد و تایید شد. VAM تولید شده از غشای پلاسمایی سلولی به صورت بیوسنتتیک ساخته و

<sup>121</sup> Apitherapy

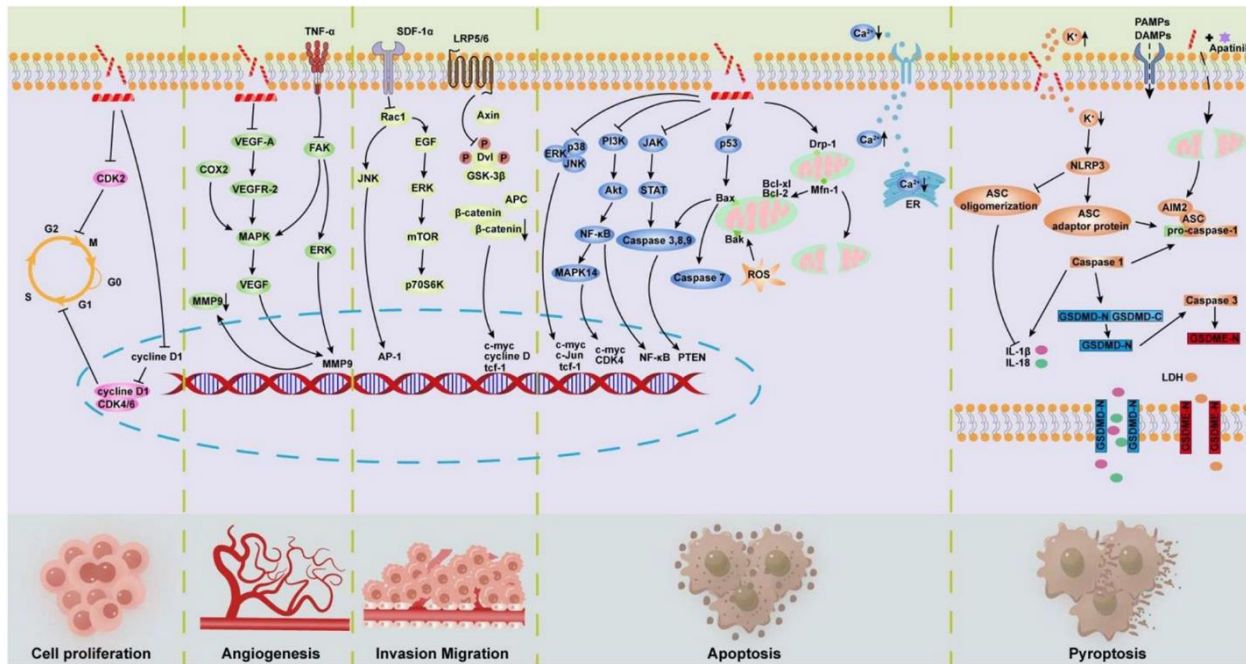
<sup>122</sup> vesicular antibody-melittin

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

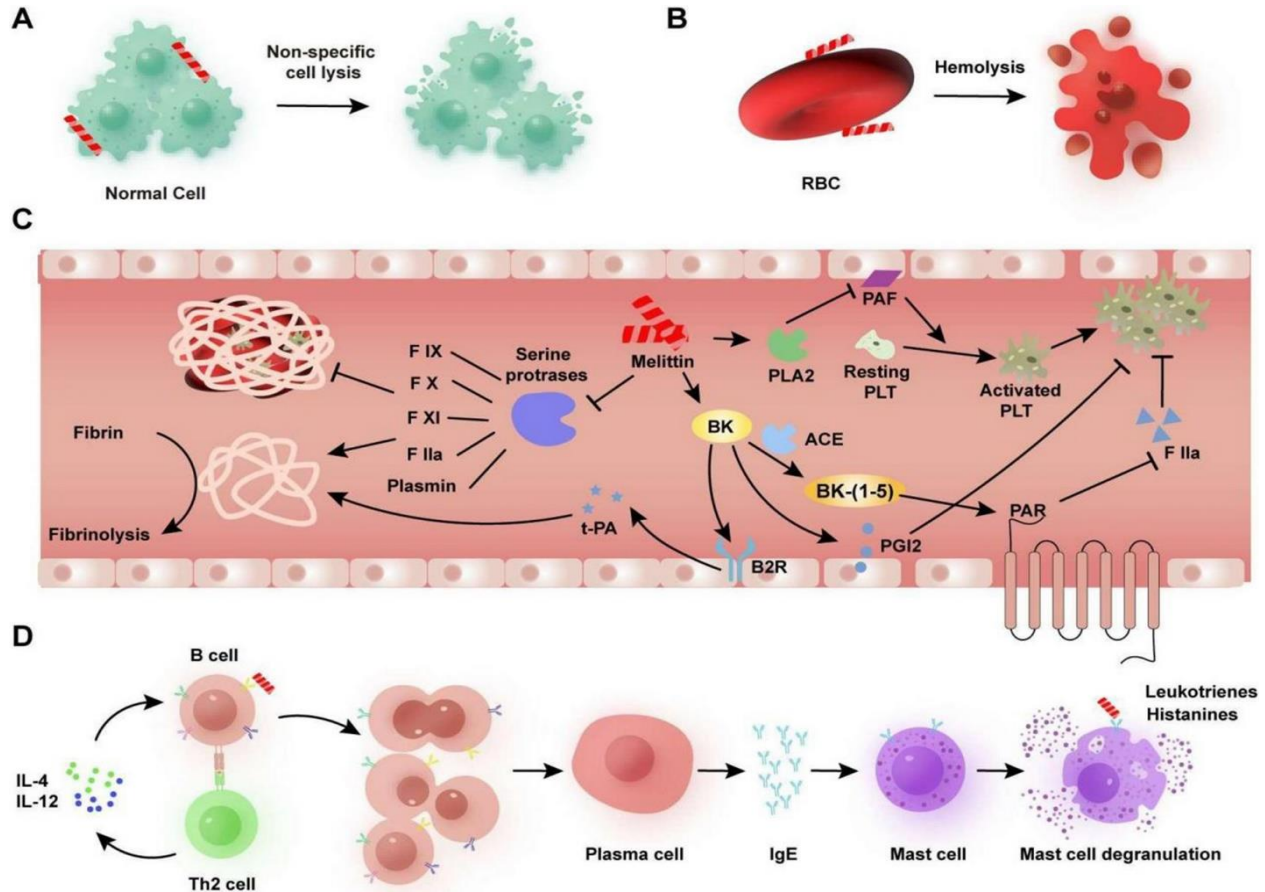
این پروتئین نو ترکیب (hGC33 scFv-melittin) در غشای سلولی قرار داده شد. نانوملیتین زیست فعال و قابل هدف کونژوگه شده توسط hGC33 scFv می تواند به روشی پاسخگو به ماتریکس متالوپروتئیناز-۱۴<sup>۱۳۳</sup> (MMP14) در محل های تومور منتشر شود که این امر باعث کاهش سمیت خارج از هدف، به ویژه فعالیت همولیتیک MLT می شود. نکته مهم این است که VAM می تواند با داروهای مولکولی کوچک یا نانوذرات برای درمان ترکیبی با رگیری شود. نانوملیتین منافذی را در غشاها ایجاد می کند که باعث اختلال در هر دو لایه ی فسفولیپیدی شده و به عوامل ضد سرطانی (داروی شیمی درمانی مانند دوکسوروبیسین و حساس کننده سونوگرافی به نام نانوذرات پورپورین ۱۸) که به وسیله VAM حمل می شوند، اجازه نفوذ به مکان های توموری عمیق تر را می دهد. در مجموع، این یافته ها نشان می دهد که استراتژی های مبتنی بر VAM به صورت بالینی، یک رویکرد جهانی و امیدوار کننده برای درمان سرطان سینرژیک چندوجهی است (۹).

پس از دهه ها تحقیق و کاوش، MLT نه تنها به طور مستقیم باعث مرگ سلول های توموری می شود، بلکه فعالیت های ضد توموری را از طریق اعمال تعدیل کننده ایمنی و به طور غیرمستقیم نیز اعمال می کند. در سال های اخیر، MLT اغلب به عنوان یک داروی ضد تومور جذاب در انواع تومورهای بدخیم از طریق ترکیبات چند مکانیزمی نشان داده شده است اگرچه MLT می تواند پیشرفت تومور و متاستاز را از طریق مکانیسم های مختلف مهار کند، محدوده باریک دوزهای ایمن MLT مانع از کاربرد آن در داخل بدن می شود. MLT اغلب باعث عوارض جانبی مضر در غلظت های موثر درمانی می شود، از جمله لیز سلولی غیراختصاصی، همولیز، اختلالات انعقادی، واکنش های آلرژیک و غیره (شکل ۱). علاوه بر این، غلظت کم MLT به دلیل اثرات آسیب رسان DNA ژنوتوکسیک است (۱۰).



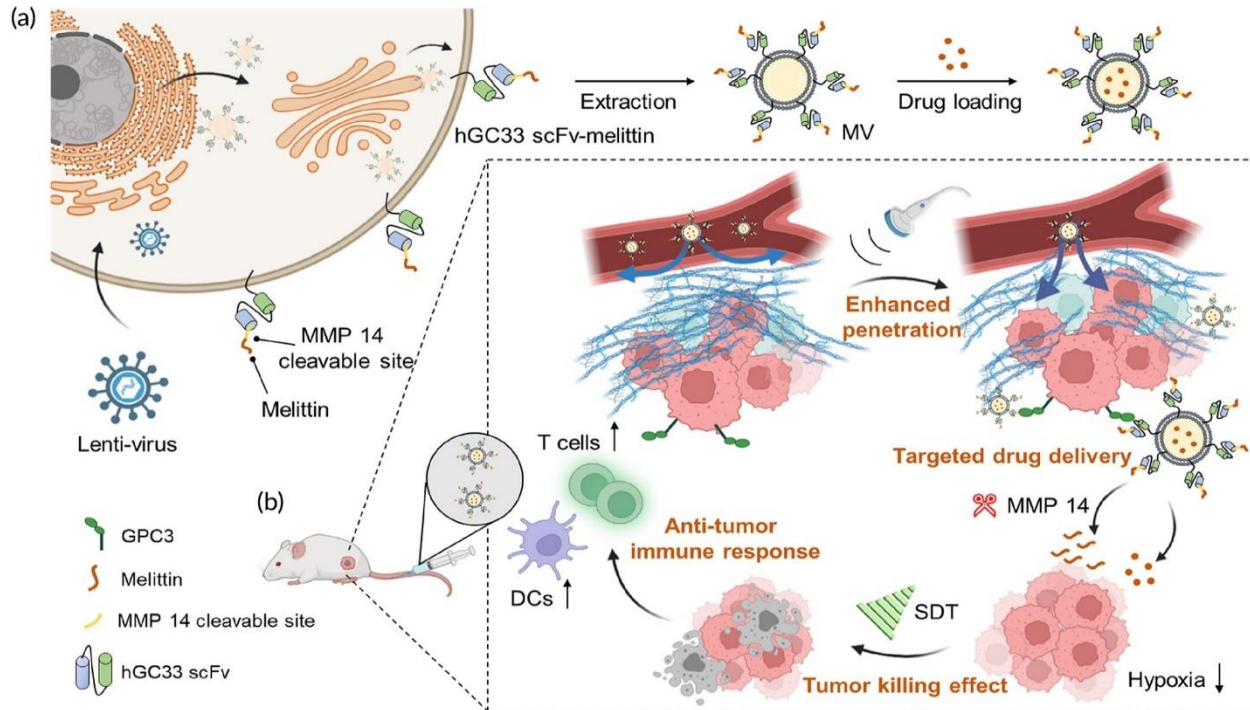
شکل ۱- از پیشرفت های اخیر در نانوذرات مبتنی بر MLT برای درمان ضد تومور: از مکانیسم ها تا استراتژی های تحویل هدفمند

قرار گرفتن مستقیم در معرض MLT در داخل بدن می تواند منجر به عوارض جانبی سمی مانند لیز سلول غیراختصاصی، همولیز، اختلالات انعقادی و واکنش های آلرژیک شود (شکل ۳) (۱۱).



شکل ۲- قرار گرفتن مستقیم در معرض MLT در داخل بدن می تواند منجر به عوارض جانبی سمی مانند لیز سلول غیراختصاصی (A)، همولیز (B)، اختلالات انعقادی (C) و واکنش های آلرژیک (D) شود.

برای بهبود بیشتر اثر ضد توموری داروهای مبتنی بر MLT، استراتژی های مختلفی برای به حداقل رساندن عوارض جانبی نامطلوب و بهبود اثر کشتن تومور ایجاد شده اند. برخی از مطالعات تلاش کرده اند توالی را تغییر دهند یا ترکیب MLT را برای رسیدگی به مسائل فوق با هدف کاهش همولیز غیراختصاصی تنظیم کنند. با این حال، اثرات قابل توجه نبود یا حتی به طور اجتناب ناپذیری منجر به کاهش فعالیت لیتیک غشایی MLT بر روی سلول های تومور شد. برای بهبود بیشتر سمیت سلولی خاص MLT بر سلول تومور، استراتژی های دارورسانی مبتنی بر نانو حامل هوشمند برای دستیابی به هدف گیری غیرفعال یا هدف گیری فعال برای درمان بدخیمی های عودکننده و مقاوم ایجاد شده اند. در سال های اخیر، کلاس های مختلف نانوذرات به دلیل مزایایی که دارند، از جمله اندازه منافذ مناسب، سطح ویژه فوق العاده، سهولت اصلاح سطح و زیست سازگاری عالی، توجه قابل توجهی را در زمینه تحقیقات زیست پزشکی به خود جلب کرده اند. علاوه بر این، بر اساس تفاوت های موجود در گیرنده های سطح سلول های تومور و سلول های طبیعی یا پاسخدهی خاص به محرک های درون زای یا برون زای در محل مورد نظر، محققان تلاش های مفصلی برای توسعه استراتژی های عامل سازی، مانند هدف گیری فعال، استراتژی های پاسخ دهنده به محرک ها و... انجام می دهند. تغییرات بیونیک<sup>۱۲۴</sup> این نه تنها کارایی تحویل را تا حد زیادی بهبود بخشید، بلکه ایمنی و فراهمی زیستی MLT را در داخل بدن بهینه کرد. این بخش به بررسی استراتژی های مختلف تحویل MLT برای بهبود اثر ضد توموری و زیست سازگاری آن می پردازد (شکل ۳) (۱۰).



شکل ۳- طراحی VAM برای درمان ترکیبی هدفمند سرطان (الف) آنتی بادی-ملیتین ویزیکولی (VAM) با یک روش مهندسی ژنتیک ساخته شد. VAM به عنوان یک پلت فرم تحویل دارو، می‌تواند به سلول‌های تومور GPC3 مثبت تحویل داده شود که این امر سمیت خارج از هدف را کاهش می‌دهد. hGC33 scFv-melittin MVs را می‌توان با حساس کننده‌های صوتی بارگذاری کرد و با SDT هم‌افزایی کرد. (ب) نانوملیتین فعال زیستی می‌تواند به شیوه‌ای پاسخگو به MMP14 در محل‌های تومور آزاد شود. افزایش تجمع و نفوذ داروها در تومورها به دلیل تشکیل منافذ غشایی و سونوگرافی به دست آمد. اثر پانچ ایجاد شده توسط سونودینامیک تراپی<sup>125</sup> (SDT) باعث بهبود بیشتر اثر تعدیل کننده ایمنی نانوملیتین برای فعال کردن پاسخ ایمنی ضد تومور شد.

در حال حاضر، ژن درمانی مبتنی بر فناوری نانو، نویدبخش درمان بیماری‌های مختلف از اختلالات ارثی گرفته تا تومور است. تحویل هدفمند DNA پلاسمید کد کننده MLT به سلول‌های تومور ممکن است به پتانسیل درمانی بهتری دست یابد. مهم‌تر از آن، نیازی به در نظر گرفتن مسائل مربوط به منابع MLT از طریق اصلاح ژنتیکی وجود ندارد (۱۲).

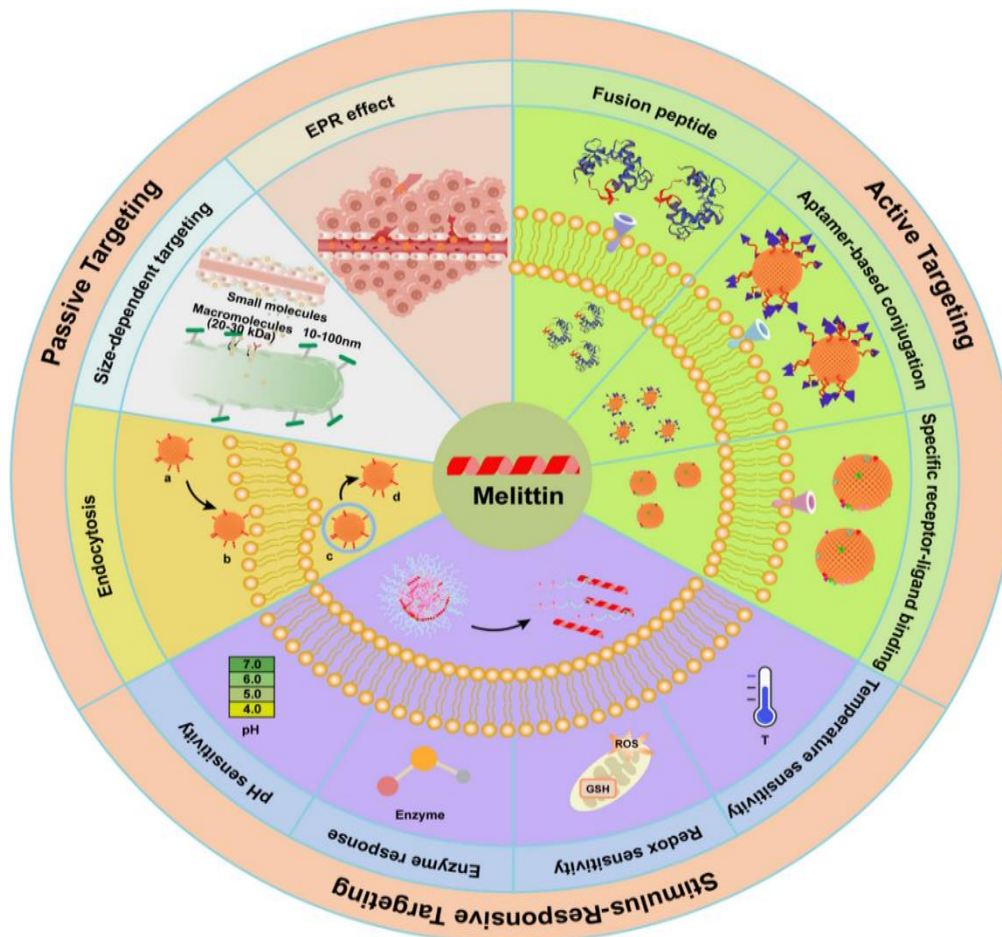
در سال ۲۰۲۴ جین و همکارانش<sup>126</sup> در پژوهشی به این نتیجه رسیدند که MLT به دلیل اثرات ضد توموری قابل توجه و اثرات مختلف تعدیل کننده ایمنی توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است. با این حال، موانع مختلف مانند نیمه عمر کوتاه پلاسما و واکنش‌های نامطلوب، کاربرد آن را محدود می‌کند. نانوذرات تشکیل شده از ویتامین E-سوکسینیک اسید- (گلوتامات) ۵ (E5)، ویتامین E-سوکسینیک اسید- (گلوتامات) ۱۰ (E10) یا ویتامین E-سوکسینیک اسید- (گلوتامات) ۱۵ (E15) به همراه سیستم مونتاژ همزمان با MLT با بار مثبت در آب برای هدف گیری سلول‌های توموری استفاده کردند. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان داد که انرژی الکترواستاتیک و نیروی واندروالس در سیستم با افزایش مقدار اسید گلوتامیک به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. سیستم MLT و E15 پایداری بهینه را برای خودآرایی نانوذرات نشان دادند. هنگامی که نانوذرات مشتق شده از سیستم‌های مختلف خودآرایی با پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان سینه به طور همزمان انکوبه شدند، تصویربرداری *in vivo* نشان داد که افزایش تعداد باقی مانده‌های اسید گلوتامیک باعث افزایش مدت زمان گردش خون و اثرات هدف‌گیری تومور می‌شود. هر دو ارزیابی ضد تومور *in vitro* و *in vivo* افزایش قابل توجهی در اثر ضد توموری با افزودن اسید گلوتامیک نشان دادند. با توجه به یافته‌های تحقیق آنها،

<sup>125</sup> Sonodynamic Therapy

<sup>126</sup> jin et al.



تعداد باقی مانده‌های اسید گلوتامیک نقش مهمی در تحویل هدفمند MLT برای تعدیل ایمنی و مهار سرطان پستان 4T1 ایفا می‌کند. با توجه به قابلیت‌های خودآرایی ویتامین E-سوکسینیک اسید-گلوتامات (n در آب، این نانوذرات دارای پتانسیل قابل توجهی برای تحویل پپتیدهای کاتیونی مانند MLT هستند (۱۳).



نمودار ۱- شماتیک استراتژی‌های تحویل هدفمند MLT برای درمان تومور

هوانگ و همکارانش<sup>۱۲۷</sup> در سال ۲۰۲۴ بیان داشتند که: MLT، یک پپتید ضد میکروبی طبیعی، دارای فعالیت ضد میکروبی گسترده است. این امر منجر به جلب توجه فزاینده به عنوان یک جایگزین بالقوه آنتی بیوتیک شده است. با این حال، استفاده عملی از آن به دلیل فعالیت ضد میکروبی ضعیف، فعالیت همولیتیک بالا و پایداری پروتئولیتیک کم محدود شده است. در این مطالعه، کونژوگاسیون اسیدهای چرب N ترمینال برای ایجاد لیپوپپتیدهای مشتق شده از ملیتین<sup>۱۲۸</sup> (MDLs) جدید برای بهبود ویژگی‌های MLT استفاده شد. نتایج نشان داد که در مقایسه با MLT بومی، فعالیت ضد میکروبی MDL ها ۲ تا ۱۶ برابر افزایش یافته و پایداری این MDL ها در برابر تخریب تریپسین و پپسین ۵۰ تا ۸۰ درصد افزایش یافته است. با این حال، فعالیت همولیتیک MDLها زمانی کاهش یافت که طول زنجیره کربنی اسیدهای چرب از ۱۰ گذشت. مکانیسم ضد میکروبی مورد مطالعه نشان داد که MDLها با برهمکنش با لیپوپلی ساکارید (LPS) یا اسید لیپوتیکوئیک (LTA) و نفوذ به غشای سلولی باکتری، اثر ضد باکتریایی سریعی از

<sup>127</sup> Huang et al.

<sup>128</sup> Melittin-derived lipopeptides

خود نشان دادند. در نتیجه، یک کلاس جدید از MDL با فعالیت ضد میکروبی قوی، پایداری پروتئولیتیک بالا و فعالیت همولیتیک کم از طریق کونژوگاسیون اسیدهای چرب N ترمینال طراحی و سنتز شد (۱۴).

یو و همکارانش<sup>۱۲۹</sup> در سال ۲۰۲۰ مطالعه‌ای را انجام دادند که هدف از آن بررسی اثر ضد سرطانی MLT بر رشد، مهاجرت، تهاجم و آپوپتوز سلول‌های سرطانی غیرکوچک ریه (NSCLC) بود. این مطالعه همچنین مکانیسم ضد سرطانی بالقوه MLT را در سلول‌های NSCLC مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که MLT رشد، مهاجرت و تهاجم را سرکوب می‌کند و آپوپتوز سلول‌های NSCLC را در شرایط آزمایشگاهی القا می‌کند. MLT بیان ژن کاسپاز ۳ و آپوپتوز پرو آپوپتوتیک را افزایش داد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که MLT رشد، مهاجرت و تهاجم را مهار می‌کند و باعث القای آپوپتوز سلول‌های NSCLC از طریق تنظیم پایین مسیر سیگنالینگ ERK با واسطه TGF- $\beta$  می‌شود، که نشان می‌دهد MLT ممکن است یک عامل ضد سرطانی امیدوارکننده باشد (۱۵).

یان و همکاران<sup>۱۳۰</sup> نشان دادند که MLT با مکانیسمی نا شناخته اثر درمانی بر سرطان پروستات مقاوم به اخته<sup>۱۳۱</sup> (CRPC) دارد. تجزیه و تحلیل توالی RNA در این مطالعه نشان داد که ژن مسیر سیگنالینگ اینترلوکین-۱۷ (IL-17) لیپوکالین-۲<sup>۱۳۲</sup> (LCN2) توسط تیمار ملیتین در CRPC کاهش یافت. تحقیقات بیشتر نشان داد که بیان بیش از حد LCN2 قادر به نجات سرکوب تومور و حساسیت سیس پلاتین<sup>۱۳۳</sup> است که ملیتین واسطه آن است. جالب توجه است که بیان LCN2 ارتباط زیادی با متاستاز در PCa<sup>۱۳۴</sup> دارد. به طور خلاصه LCN2 نقش انکوژنی در CRPC ایفا می‌کند و ملیتین ممکن است به عنوان یک کاندید جذاب برای درمان CRPC انتخاب شود (۱۶).

#### نتیجه گیری:

در این پژوهش با بررسی نتایج دیگر محققان در زمینه درمان سرطان با استفاده از پپتید MLT که یک توکسین به شمار می‌آید و از زهر زنبور عسل بدست می‌آید این نتیجه حاصل شد که MLT یک ماده ضد سرطانی می‌باشد که می‌تواند سرطان را از طریق مکانیسم‌های مختلفی که در بررسی به آن‌ها پرداختیم، مهار کند. این پپتید یکی از گزینه‌های جدید برای درمان سرطان است و در پژوهش‌های جدید نگاهی ویژه به این پپتید شده است و محققان استفاده از این توکسین را در درمان اکثر سرطان‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند که بیشتر این پژوهش‌ها نشان دهنده تاثیر درمانی این توکسین بر روی سرطان‌های مختلف می‌باشد.

#### References:

1. Haque S, Hussain A, Joshi H, Sharma U, Sharma B, et al. Melittin: a possible regulator of cancer proliferation in preclinical cell culture and animal models. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2023; 149(19): 17709-26.
2. Ramasani G, Appavu R. The usage of melittin in breast cancer microenvironment targeting. *Journal of Student Research*. 2023; 12(1).
3. Lv S, Sylvestre M, Song K, Pun SH. Development of D-melittin polymeric nanoparticles for anti-cancer treatment. *Biomaterials*. 2021; 277: 121076.
4. Memet<sup>1</sup> BC, Demirpolat E, Yildirim T, editors. Check for updates. MEDICON'23 and CMBEIH'23: Proceedings of the Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing

<sup>129</sup> Yu et al.

<sup>130</sup> Yan et al.

<sup>131</sup> castration-resistant prostate cancer

<sup>132</sup> Lipocalin-2

<sup>133</sup> cisplatin

<sup>134</sup> Prostate cancer antigen

- (MEDICON) and International Conference on Medical and Biological Engineering (CMBEBIH), September 14–16, 2023, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina—Volume 2: Bio-innovations, Sustainable Practices, and Multidisciplinary Applications in Healthcare; 2024: Springer Nature; 45.
- Habermann E. Bee and Wasp Venoms: The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science*. 1972; 177(4046): 314-22.
  - Wang A, Zheng Y, Zhu W, Yang L, Yang Y, et al. Melittin-based nano-delivery systems for cancer therapy. *Biomolecules*. 2022;12(1):118.
  - Chen J, Guan S-M, Sun W, Fu H. Melittin, the major pain-producing substance of bee venom. *Neuroscience bulletin*. 2016; 32: 265-72.
  - Pandey P, Khan F, Khan MA, Kumar R, Upadhyay TK. An updated review summarizing the anticancer efficacy of melittin from bee venom in several models of human cancers. *Nutrients*. 2023; 15(14): 3111.
  - Zhang J, Liu X, Xia Y, Xu S, Liu X, et al. Genetically engineered nano-melittin vesicles for multimodal synergetic cancer therapy. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2023: e10482.
  - Yu X, Jia S, Yu S, Chen Y, Zhang C, et al. Recent advances in melittin-based nanoparticles for antitumor treatment: from mechanisms to targeted delivery strategies. *Journal of Nanobiotechnology*. 2023; 21(1): 454.
  - Gajski G, Domijan A-M, Žegura B, Štern A, Gerić M, et al. Melittin induced cytogenetic damage, oxidative stress and changes in gene expression in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol*. 2016; 110: 56-67.
  - Perekalin DS, Novikov VV, Pavlov AA, Ivanov IA, Anisimova NY, et al. Selective ruthenium labeling of the tryptophan residue in the bee venom Peptide melittin. *Chemistry–A European Journal*. 2015; 21(13): 4923-5.
  - Jin X, Wu H, Yu J, Cao Y, Zhang L, et al. Glutamate affects self-assembly, protein corona, and anti-4 T1 tumor effects of melittin/vitamin E-succinic acid-(glutamate) n nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2024; 365: 802-17.
  - Huang S, Su G, Jiang S, Chen L, Huang J, et al. New N-Terminal Fatty-Acid-Modified Melittin Analogs with Potent Biological Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(2): 867.
  - Yu R, Wang M, Wang M, Han L. Melittin suppresses growth and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer cells via down-regulation of TGF- $\beta$ -mediated ERK signal pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2020; 54.
  - Yan R, Dai W, Mao Y, Yu G, Li W, et al. Melittin inhibits tumor cell migration and enhances cisplatin sensitivity by suppressing IL-17 signaling pathway gene LCN2 in castration-resistant prostate cancer. *The Prostate*. 2023; 83(15): 1430-45.

## Cancer stem cell و کاربرد آن در بیوتکنولوژی

شکیلا اسدپورا<sup>۱</sup>، مریم پیمانی<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. دانشیار ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

سلول‌های بنیادی سرطان، یک زمینه پژوهشی بسیار پرکاربرد و پیچیده در حوزه بیولوژی سرطان هستند. این مقاله به بررسی جوانب مختلف مربوط به این سلول‌ها و کاربردهای آن‌ها در بیوتکنولوژی می‌پردازد. در این تحقیق به بررسی ویژگی‌های مولکولی و ژنتیکی سلول‌های بنیادی سرطان پرداخته می‌شود. همچنین شرح دقیقی از مکانیسم‌های مولکولی درونی این سلول‌ها و ژنومیک آن‌ها بررسی می‌شود. در بخش مهمی دیگر از مقاله، مقاومت به درمان در سلول‌های بنیادی سرطان مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد. این مقاله شامل تشریح مکانیسم‌های مختلف مقاومت و راهکارهای ممکن برای کنترل آن، بررسی کاربردهای بیوتکنولوژی در مطالعه سلول‌های بنیادی سرطان و شرح جامعی از مزایای استفاده از بیوتکنولوژی در تحقیقات سلول‌های بنیادی سرطان و توسعه درمان‌های نوین می‌باشد. نهایتاً، خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان به طور جامع و کامل توضیح داده می‌شود. و در نهایت نتیجه می‌شود که این سلول‌ها نه تنها چالش‌های ما در تطبیق با پیچیدگی سرطان را مشخص می‌کنند، بلکه به عنوان نقطه شروع مهمی برای تحولات در زمینه درمان‌های بیولوژیک و نوآوری‌های درمانی محسوب می‌شوند. این پیشرفت‌ها نه تنها به درمان انواع سرطان کمک می‌کنند بلکه امیدوارم که در آینده بهبود زندگی بیماران و کاهش بار انتقالی سرطان در جامعه ما نیز داشته باشند. در نتیجه، این مقاله به نقد و ارزیابی پیشرفت‌ها و چالش‌های روزافزون در زمینه سلول‌های بنیادی سرطان می‌پردازد و امیدوار است که به توسعه راهکارهای جدید و بهبود کیفیت درمان‌های بیولوژیک سرطان کمک کند. با ارائه این اطلاعات، امید است که این مقاله نقش مهم سلول‌های بنیادی سرطان در بیوتکنولوژی را روشن نماید و به درک بهتری از راهبردها و راهکارهای موثر در مقابله با این جنبه پیچیده و چالش‌برانگیز سرطان کمک کند.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی سرطان، سرطان، مقاومت به درمان، ژنتیک، درمان بیولوژیک.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۱۰

پست الکترونیک: peyman.iaushk@gmail.com

Shakila Asadpour<sup>1</sup>, Maryam Peymani<sup>2\*</sup>

1. Master's student in genetics, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Associate professor of genetics, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

Cancer stem cells are a very widely used and complex research field in the field of cancer biology. This article examines various aspects related to these cells and their applications in biotechnology. In this research, the molecular and genetic characteristics of cancer stem cells are investigated. Also, a detailed description of the internal molecular mechanisms of these cells and their genomics is investigated. In another important part of the article, resistance to treatment in cancer stem cells is discussed. This article includes the description of various mechanisms of resistance and possible strategies to control it, the investigation of the applications of biotechnology in the study of cancer stem cells and a comprehensive description of the benefits of using biotechnology in the research of cancer stem cells and the development of new treatments. Finally, the properties of cancer stem cells are comprehensively explained. And finally, it turns out that these cells not only define our challenges in coping with the complexity of cancer, but also serve as an important starting point for developments in the field of biological treatments and therapeutic innovations. These advances not only help to treat all types of cancer, but I hope that in the future they will improve the lives of patients and reduce the burden of cancer transmission in our society. As a result, this article reviews and evaluates the advances and challenges in the field of cancer stem cells and hopes to help develop new strategies and improve the quality of biological cancer treatments. By presenting this information, it is hoped that this article will clarify the important role of cancer stem cells in biotechnology and help to better understand effective strategies and solutions in dealing with this complex and challenging aspect of cancer.

**Keywords:** cancer stem cells, cancer, treatment resistance, genetics, biological treatment.

### مقدمه

سلول‌های بنیادی سرطان، زیرمجموعه‌ای از سلول‌های سرطانی هستند که برخی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی را حفظ کرده‌اند. این سلول‌ها توانایی تجدید و تکثیر نسل‌های جدید از سلول‌های سرطانی با ویژگی‌های مشابه به خود را دارند. به عبارت دیگر، آن‌ها می‌توانند به عنوان "سلول‌های مادر" تومور عمل کرده و نقش کلیدی در ایجاد و حفظ تومور داشته باشند (۱). سلول‌های بنیادی سرطان معمولاً دارای خصوصیتی هستند که به آن‌ها این توانایی را می‌دهد، از جمله توانایی خودنویسی (self-renewal) و تمایز به سلول‌های مختلف تومور (differentiation). این ویژگی‌ها باعث می‌شود که حتی پس از درمان‌های مختلف، این سلول‌های بنیادی سرطان باقی بمانند و می‌توانند بازآفرینی تومور را آغاز کنند. این امر می‌تواند عامل مهمی در مقاومت به درمان و بازگشت تومور باشد. با درک بهتر از خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی سلول‌های بنیادی سرطان، امکان توسعه راهکارهای موثرتر برای شناسایی و درمان سرطان افزایش می‌یابد (۲).

سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است در تکامل تومور، مهم باشند. آن‌ها توانایی دارند تا سلول‌های تخصص یافته مختلف تومور را تولید کنند و بر این تخصص‌ها نظارت داشته باشند. این پدیده به عنوان "تمایز سلولی" شناخته می‌شود و نقش آن در پیشرفت تومور و همچنین مقاومت به درمان به عنوان یک چالش مهم مطرح می‌شود. به‌طور کلی، درک عمیق‌تر از ویژگی‌ها و عملکرد سلول‌های بنیادی سرطان برای ارتقاء راهبردها و داروهای درمانی اساسی است. شناختن مسیرهای مولکولی که این سلول‌ها را کنترل می‌کنند، ابزارهای مهمی فراهم می‌کند تا به‌طور هدفمندتر و کارا در مقابله با این سلول‌ها پیش روی تحقیقات و درمان‌های سرطان قرار گیرد. شناخت و تحقیق در زمینه سلول‌های بنیادی سرطان به ایجاد راهکارهای نوین در تشخیص و درمان سرطان منجر شده

است. این مطالعات کمک می‌کنند تا درمان‌های هدفمندتر، کاهش عوارض جانبی، و افزایش بهره‌وری در ترکیب درمانی را ممکن سازند (۳). بررسی عملکرد دقیق سلول‌های بنیادی سرطان به نتایج قابل ملاحظه در توسعه داروها و رویکردهای درمانی منجر می‌شود. درک عمیق از سلول‌های بنیادی سرطان به شناخت بهتری از فرآیندهای تومورزایی و تکامل سلولی منجر می‌شود. این دانش نظری می‌تواند به نقد و بررسی مدل‌های توموری و تحلیل جنبه‌های مختلف سلامت و بیماری در پژوهش‌های پایه کمک کند. همچنین، درک عمیق از ویژگی‌های مولکولی و ژنتیکی سلول‌های بنیادی سرطان به توسعه تکنولوژی‌های نوین تحقیقاتی و دیاگنوز پیشرفته منجر می‌شود که این امکان را فراهم می‌کند تا به سرعت در جهت درمان و پیشگیری از سرطان پیشرفت کرد (۴).

### بیان مساله

سلول‌های بنیادی سرطان، یا همان "Cancer Stem Cells"، یک جنبه مهم و پیچیده در زمینه بیوتکنولوژی و تحقیقات پزشکی به حساب می‌آیند. این سلول‌های ویژه به عنوان زیرمجموعه‌ای از سلول‌های سرطانی شناخته می‌شوند که نقش برجسته‌ای در ایجاد و حفظ تومورها دارند. از آنجا که سلول‌های بنیادی سرطان توانایی تولید سلول‌های دیگر با ویژگی‌های مشابه به خود را دارا هستند، این موضوع به نقطه تمایز واضحی در مطالعه و درمان سرطان تبدیل شده است. در این مقاله، به بررسی مفهوم و خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان، همچنین کاربردهای آنها در زمینه بیوتکنولوژی پرداخته خواهد شد. از راهکارهای نوین تشخیص و درمان سرطان با بهره‌گیری از این سلول‌های ویژه نیز به تفصیل خواهیم پرداخت. در این سیاق، بررسی عمیق‌تر نحوه عملکرد سلول‌های بنیادی سرطان و نقش آنها در فرایند تومورزایی از اهمیت بسزایی برخوردار است. این سلول‌ها معمولاً دارای توانایی خودنویسی و تکامل به سلول‌های مختلف تومور هستند، که این ویژگی‌ها باعث مقاومت به درمان‌های متداول می‌شوند. همچنین، در این مقاله به بررسی کاربردهای بیوتکنولوژی در شناسایی و استفاده از سلول‌های بنیادی سرطان خواهیم پرداخت. از روش‌های نوین تحقیقاتی گرفته تا تکنولوژی‌های پیشرفته درمانی، نقش بیوتکنولوژی در مبارزه با سلول‌های بنیادی سرطان به عنوان یک چالش مهم در حوزه پزشکی روشن خواهد شد.

### مبانی نظری تحقیق

سلول‌های بنیادی سرطان معمولاً دارای مارکرهای سطحی خاصی هستند که امکان تشخیص آنها را فراهم می‌کند. این مارکرها عبارتند از پروتئین‌هایی که بر روی سطح سلول وجود دارند و به عنوان نشانگرهای تشخیصی برای شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان استفاده می‌شوند. مسیرهای سیگنالیته در سلول‌های بنیادی سرطان نقش مهمی در تنظیم تکثیر، تمایز، و تعیین سرنوشت سلول‌ها دارند. این مسیرها از جمله Wnt، Notch، و Hedgehog می‌توانند بخشی از کنترل تصمیمات سلولی در این سلول‌ها را به دست بگیرند (۵). یکی از ویژگی‌های مهم سلول‌های بنیادی سرطان، توانایی تکثیر یا خودنویسی است. این به معنای توانایی سلول برای تولید نسل جدیدی از خودش باقی می‌ماند، که در ادامه تومور را نگه می‌دارد. معمولاً سلول‌های بنیادی سرطان توانایی تمایز به سلول‌های تخصص‌یافته مختلف را دارند. این تمایز می‌تواند باعث ایجاد تنوع در تومور شود و سلول‌ها با ویژگی‌های مختلف درون تومور تشکیل شوند (۶).

سلول‌های بنیادی سرطان معمولاً مقاوم به آپوپتوز یا مرگ سلولی زیستی هستند. این ویژگی می‌تواند به آنها امکان بدهد که پس از تعریض به درمان‌های مختلف، زنده بمانند و فرآیند تومورزایی را ادامه دهند. این ویژگی‌ها به همراه یکدیگر، سلول‌های بنیادی سرطان را به عنوان یک زیرگروه مهم و مختص از سلول‌های سرطانی تعریف می‌کنند که در درک بهتر از زمینه سلول‌های بنیادی سرطان و توسعه راهبردهای درمانی مؤثر تأثیرگذار هستند. برخی از سلول‌های بنیادی سرطان توانایی مهاجرت دارند و می‌توانند به دیگر بافت‌ها حرکت کنند. این ویژگی مهاجرت و تشکیل متاستازها (تومورهای فرعی) به آنها امکان می‌دهد تا به سرعت در سرتاسر بدن گسترش یابند (۲). استماتایزسی به توانایی سلول‌های بنیادی سرطان برای اخذ و حفظ ویژگی‌های ساختاری و وظیفه‌ای مشابه با سلول‌های نرمال می‌گویند. این ویژگی ممکن است باعث شباهت زیاد سلول‌های بنیادی سرطان به سلول‌های نرمال گردد و فرآیندهای

تشخیص و درمان را دشوارتر کند. سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است دارای تغییرات ژنتیکی متنوع باشند که نقش مهمی در پیدایش و پیشرفت تومور ایفا می‌کنند. این تغییرات می‌توانند از انحراف‌های در مسیرهای رگولاتوری گنوم گرفته تا متغیرهای در DNA تشکیل شوند. در کل، این ویژگی‌ها به همراه تفاوت‌های ژنتیکی و مولکولی، سلول‌های بنیادی سرطان را به یک زیرگروه پیچیده از سلول‌های سرطانی تبدیل کرده و در توسعه و پیشرفت تومور نقش مهمی ایفا می‌کنند (۷).

مقاومت به درمان یک ویژگی بسیار حیاتی در سلول‌های بنیادی سرطان است که توسعه و پیشرفت تومور را تسریع می‌دهد. این مقاومت می‌تواند در برابر درمان‌های شیمی‌ای، ترکیبات هدفمند، و حتی در برابر درمان‌های ترکیبی و متداول به وجود آید. سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است تغییرات ژنتیکی جدیدی تجربه کنند که به آنها توانایی مقاومت به داروها را بدهد. این تغییرات ممکن است باعث ایجاد مسیرهای سیگنالینگ جدید یا تغییر در بیان ژن‌های مهم شوند (۸). سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند مسیرهای سیگنالینگ متداول در پاسخ به درمان را تغییر دهند. این تغییرات می‌توانند به ایجاد مسیرهای جایگزین یا تقویت مسیرهایی که به مقاومت منجر می‌شوند، منجر شوند. سلول‌های بنیادی سرطان معمولاً مقاوم به فرآیند آپوپتوز یا مرگ سلولی هستند. این مقاومت به ایجاد سلول‌های باقی‌مانده پس از درمان و ادامه فعالیت تومور کمک می‌کند (۹).

سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است به صورت پویا به درمان واکنش نشان دهند و مکانیسم‌هایی برای فرار از تأثیرات درمان توسعه دهند. این شامل تغییر در مسیرهای سیگنالینگ، تنظیم مجدد برنامه زمانی سلولی، و تغییر در ترکیب پروتئین‌ها می‌شود. سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند محیط اطراف خود را به گونه‌ای تغییر دهند که از تأثیرات مخرب درمان محافظت کند. این شامل ایجاد ماتریکس خارج سلولی مقاوم، افزایش عرضه عوامل رشد و تغییرات در سطح ایمنی محیط می‌شود. توجه به این عوامل و شناخت مکانیسم‌های مقاومت می‌تواند به توسعه راهبردهای درمانی هوشمندتر و پیشگیری از بازگشت تومور کمک کند (۳).

معمولاً سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند به ترکیب و متراکم شدن مقاومت در برابر چندین نوع درمان واکنش نشان دهند. این به ایجاد چندلایه‌ای از مقاومت در برابر درمان‌های مختلف منجر می‌شود. در اثر درمان، برخی از سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است توانایی زنده ماندن را حتی در مواجهه با شرایط سخت تراکم نشان دهند. این سلول‌های باقی‌مانده می‌توانند فرآیند بازگشت تومور را آغاز کنند. در برخی موارد، سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است توانایی به شکل‌های متغیری از سلول‌ها تغییر شکل دهند. این تغییر به آنها این امکان را می‌دهد که از اثرات درمانی فرار کنند و در نتیجه مقاومت به درمان توسعه یابند (۶). سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است در فرآیند متاستازی (شکل‌گیری تومور در مناطق دور از تومور اصلی) دخیل باشند. این می‌تواند باعث مقاومت به درمان شود زیرا این تومورهای ثانویه ممکن است در محیط‌های جدید با مشخصات مختلف شکل گیرند. در کل، مقاومت به درمان در سلول‌های بنیادی سرطان یک چالش جدی در حوزه سرطان است و بررسی دقیق‌تر این مکانیسم‌ها می‌تواند به توسعه راهکارهای مؤثرتر در درمان سلول‌های بنیادی سرطان و کنترل پیشرفت تومور کمک کند (۱).

بیوتکنولوژی می‌تواند به توسعه روش‌های دقیق تشخیص سلول‌های بنیادی سرطان کمک کند. از تکنیک‌های ژنتیکی گرفته تا سنجش مارکرهای سطحی، این فناوری‌ها امکان شناسایی دقیق‌تر و سریع‌تر این سلول‌ها را فراهم می‌کنند. با استفاده از بیوتکنولوژی، می‌توان داروهای هدفمند برای سلول‌های بنیادی سرطان طراحی کرد. این داروها به طور خاص به مولکول‌ها و مسیرهای مولکولی مخصوص این سلول‌ها هدف می‌شوند و اثرات جانبی کمتری دارند (۱۰). بیوتکنولوژی امکان مهندسی ژنتیک سلول‌های بنیادی سرطان را فراهم می‌کند. این فرآیند می‌تواند برای مهار یا تغییر ویژگی‌های خاص سلول‌ها به منظور کنترل رشد و تأثیرات درمانی مؤثر باشد. بیوتکنولوژی به تحقیقات بنیادی در زمینه سلول‌های بنیادی سرطان کمک می‌کند و در توسعه زیست‌سازگان مؤثر نقش دارد. این فناوری‌ها امکان تولید مدل‌های سلولی مشابه سلول‌های بنیادی سرطان برای آزمایشات درمانی و تحقیقات را فراهم می‌کنند (۱۱).

با استفاده از بیوتکنولوژی، می‌توان تحلیل ژنوم و پروتئوم سلول‌های بنیادی سرطان را انجام داد. این تحلیل‌ها به درک بهتر از ویژگی‌ها و مسیرهای مولکولی این سلول‌ها کمک کرده و به توسعه راهبردهای درمانی هوشمندتر کمک می‌کنند. کلیتاً، بیوتکنولوژی ابزارهای قدرتمندی را برای مقابله با سلول‌های بنیادی سرطان ارائه می‌دهد و در توسعه راهکارهای مؤثر در تشخیص و درمان این

نوع سلول‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۲). تکنولوژی RNAi (تداخل RNA) این امکان را فراهم می‌کند تا با استفاده از RNAهای کوتاه، عبور از بیان ژن‌های خاص در سلول‌های بنیادی سرطان را مهار کرده و فرآیندهای بیولوژیکی آنها را تضعیف نماید. تکنولوژی CAR-T (سلول‌های ترکیبی آنتی‌ژنی تقویت شده) از سلول‌های سیتوتوکسیک T استفاده می‌کند که به طور هدفمندانه به سلول‌های بنیادی سرطان می‌آمپلیفای شده‌اند، این سلول‌ها می‌توانند به تخریب سلول‌های بنیادی سرطان بپردازند (۱۳).

سلول‌های NK از جنس سلول‌های ایمنی هستند که توانایی تشخیص و تخریب سلول‌های سرطانی را دارند. استفاده از بیوتکنولوژی می‌تواند به تقویت و بهینه‌سازی این سلول‌ها برای مبارزه با سلول‌های بنیادی سرطان کمک کند. تحقیقات بیوتکنولوژی در زمینه ایمونوتراپی می‌تواند به ارتقاء پاسخ ایمنی بدن به سلول‌های بنیادی سرطان و کنترل رشد آنها کمک کند (۱۴). بیوتکنولوژی امکان توسعه واکسن‌های جدید برای تقویت سیستم ایمنی به منظور حمایت از بدن در مقابل سلول‌های بنیادی سرطان را فراهم می‌کند. بیوتکنولوژی با تحلیل دقیق داده‌های ژنومیک و بهره‌گیری از ابزارهای بیوانفورماتیک، به شناخت بهتر از مکانیسم‌های مولکولی و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان کمک می‌کند. همه این فناوری‌ها و رویکردها نشان دهنده نقش بیوتکنولوژی در تحقیقات و درمان سلول‌های بنیادی سرطان و بهبود بهبود افراد مبتلا به این نوع سرطان است (۱۵).

سلول‌های بنیادی سرطان توانایی تکثیر و تولید نسل جدید از خود را دارند. این ویژگی باعث پایداری و افزایش تعداد سلول‌های بنیادی سرطان می‌شود. علاوه بر توانایی تکثیر، سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است به سلول‌های تخصص یافته مختلف تمایز یابند. این تمایز تحت کنترل نظام‌های مختلف مولکولی قرار دارد. سلول‌های بنیادی سرطان معمولاً مقاوم به آپوپتوز یا مرگ سلولی هستند. این مقاومت باعث می‌شود که سلول‌ها حتی در مواجهه با شرایط نامساعد، زنده بمانند و فرآیند تومورزایی را ادامه دهند (۱). سلول‌های بنیادی سرطان توانایی مهاجرت دارند و می‌توانند متاستازها یا تومورهای ثانویه در مناطق دور از تومور اصلی تشکیل دهند. سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است تنوع زیادی در ویژگی‌های فنوتیپی نشان دهند. این تنوع می‌تواند باعث ایجاد زیرگروه‌های مختلفی از سلول‌های بنیادی سرطان با ویژگی‌ها و عملکردهای متفاوت شود. سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است دارای تغییرات ژنتیکی و مولکولی متنوع باشند که نقش مهمی در پیدایش و پیشرفت تومور ایفا می‌کنند (۷).

استماتایزسی به توانایی سلول‌های بنیادی سرطان برای اخذ و حفظ ویژگی‌های ساختاری و وظیفه‌ای مشابه با سلول‌های نرمال می‌گویند. این ویژگی باعث شباهت زیاد سلول‌های بنیادی سرطان به سلول‌های نرمال می‌شود. سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است مقاومت به درمان‌های مختلف را تجربه کنند، این شامل درمان‌های شیمی‌ای، ترکیبات هدفمند، و سایر روش‌های درمانی باشد. این خصوصیات به همراه یکدیگر، سلول‌های بنیادی سرطان را به یک زیرگروه پیچیده و مهم از سلول‌های سرطانی تبدیل کرده و در درک بهتر از زمینه سلول‌های بنیادی سرطان و توسعه راهبردهای درمانی مؤثر تأثیرگذار هستند. سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است توانایی به شکل‌های متغیری از سلول‌ها تغییر شکل دهند. این ویژگی به آنها این امکان را می‌دهد که از تأثیرات درمانی فرار کنند و در نتیجه مقاومت به درمان توسعه یابند (۲).

سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است در فرآیند متاستازی (شکل‌گیری تومور در مناطق دور از تومور اصلی) دخیل باشند. این می‌تواند باعث مقاومت به درمان شود زیرا تومورهای ثانویه ممکن است در محیط‌های جدید با مشخصات مختلف شکل گیرند. سلول‌های بنیادی سرطان معمولاً می‌توانند به ترکیب و متراکم شدن مقاومت در برابر چندین نوع درمان واکنش نشان دهند. این به ایجاد چندلایه‌ای از مقاومت در برابر درمان‌های مختلف منجر می‌شود (۸). در اثر درمان، برخی از سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است توانایی زنده ماندن را حتی در مواجهه با شرایط سخت تراکم نشان دهند. این سلول‌های باقی‌مانده می‌توانند فرآیند بازگشت تومور را آغاز کنند. سلول‌های بنیادی سرطان معمولاً مقاوم به فرآیند آپوپتوز یا مرگ سلولی هستند. این مقاومت به ایجاد سلول‌های باقی‌مانده پس از درمان و ادامه فعالیت تومور کمک می‌کند. در کل، این ویژگی‌ها به همراه یکدیگر، سلول‌های بنیادی سرطان را به یک گروه پیچیده از سلول‌های سرطانی با خصوصیات متنوع و مقاومت‌های گوناگون تبدیل کرده و نقش مهمی در توسعه راهبردهای درمانی مؤثر بازی می‌کنند (۱۰).



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۱۴۰۲ اسفند

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است منجر به افزایش حجم تومور شوند که ممکن است با لمس یا تصویربرداری قابل شناسایی باشد. استفاده از تکنیک‌های تصویربرداری مانند اسکن‌های CT یا MRI می‌تواند تغییرات سلول‌های بنیادی سرطانی را نشان دهد. بررسی بیومارکرها مانند آنزیم‌ها، پروتئین‌ها یا ژن‌های خاص که در سلول‌های بنیادی سرطان بیشتر بیان می‌شوند، می‌تواند به شناسایی این سلول‌ها کمک کند. تحلیل و شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان مستقیماً از نمونه‌های بافت توموری با استفاده از تکنیک‌های مختلف آزمایشگاهی می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری ارائه دهد (۱۳). تحلیل تغییرات ژنتیکی در سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند از طریق تکنیک‌های مولکولی مانند PCR و سکوئینسینگ ژنوم کمک کند. در زمان جراحی برای حذف تومور، نمونه‌های بافت می‌توانند برای بررسی میکرومحیط تومور و شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان جمع‌آوری شوند. تحقیقات در زمینه مولکولی با استفاده از تکنیک‌های مانند western blot و RT-PCR می‌تواند به شناسایی و مطالعه برخی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان کمک کند (۱۵).

استفاده از تست‌های نوآورانه مانند تصویربرداری مولکولی و نانوتکنولوژی در شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند موثر باشد. مطالعات در سطح سلولی و بافتی به وسیله روش‌های ایمنو‌هیستوشیمی یا ایمنوفلورسانس می‌تواند علائم خاص سلول‌های بنیادی سرطان را نمایش دهد. شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان از طریق ترکیب چندین روش و تکنیک مختلف ممکن است و به کمک این اطلاعات، محققان می‌توانند بهترین راهکارهای درمان سلول‌های بنیادی سرطان را شناسایی و مطالعه کنند. همچنین، ممکن است تغییرات در تصویربرداری و آزمایش‌های تشخیصی پیشرفته، مانند تصاویر سه بعدی و مطالعات متوسطه‌ای، در این راستا توسعه یابد. به علاوه، در حال حاضر تحقیقات جاری در زمینه بیومارکرها، آنالیز ژنومیک، و بهره‌گیری از هوش مصنوعی نیز بهبود در دقت شناسایی و تحلیل سلول‌های بنیادی سرطان ایجاد می‌کنند (۳).

سلول‌های بنیادی سرطان توانایی تکثیر مداوم را دارند. این توانایی به آنها اجازه می‌دهد نسل‌های جدیدی از سلول‌های بنیادی تولید کرده و تومور را ادامه دهند. برخی از سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است تحت تأثیر عوامل محیطی یا ژنتیکی تمایز متغیر داشته باشند و به سلول‌های تخصص یافته تبدیل شوند. سلول‌های بنیادی سرطان توانایی مهاجرت به سایر ناحیه‌های بدن را دارند، که ممکن است منجر به تشکیل تومورهای ثانویه (متاستاز) شود (۹). برخی از سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند از تومور اصلی به سایر اندام‌ها و بافت‌ها حرکت کنند و در محیط‌های جدید تشکیل تومورها کنند. برخی از سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است با انتقال پوشش مهربانی از ماکروفاژها فرار کنند و از حمله سیستم ایمنی محافظت شوند. سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند تغییرات ژنتیکی متنوعی داشته باشند که تنوع بالای ژنتیکی و زیستی در تومورها ایجاد می‌کند. بسیاری از سلول‌های بنیادی سرطان مقاوم به فرآیند آپوپتوز یا مرگ سلولی هستند، که باعث می‌شود در مواجهه با شرایط نامساعد زنده بمانند (۱۲).

برخی از سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است با تغییر به شکل‌ها و خصوصیات مشابه به سلول‌های سلیقه‌ای مشابه شوند و در محیط اطراف خود مخفی شوند. برخی از سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است با استفاده از پروسه‌هایی مانند میکروویزیون، به شکل غیرمستقیم از یک منطقه به منطقه دیگر انتقال یابند. این مکانیسم‌ها به طور کلی نشان از پیچیدگی فرآیندهای توسعه و انتقال سلول‌های بنیادی سرطان دارند که تحت تأثیر مجموعه‌ای از فاکتورهای محیطی و ژنتیکی قرار می‌گیرند. سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند از عوامل میکرومحیط توموری مثل سیگنال‌های رشد، فاکتورهای رشد و متابولیت‌ها بهره ببرند تا رشد و توسعه خود را تحت کنترل داشته باشند (۵). فرایندهای متابولیکی و تغذیه سلول‌های بنیادی سرطان نقش مهمی در توسعه و انتقال آنها دارد. انرژی و مواد تغذیه مورد نیاز برای تشکیل تومور از این مسیرها فراهم می‌شود. سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است با پاسخ به سیگنال‌های خارجی مثل فاکتورهای رشد، سیتوکاین‌ها و هورمون‌ها تغییرات فیزیولوژیکی نشان دهند که بر رشد و تمایز آنها تأثیرگذار است. برخی از سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند با سلول‌های مجاور همکاری کرده و از تأثیرات همسایگان خود بهره‌مند شوند (۱۴). شرایط محیطی چون اسیدیته، اکسیژن، و فشار تأثیر بسزایی در توسعه و انتقال سلول‌های بنیادی سرطان دارد و ممکن است تغییرات محیطی باعث تطور و تغییر در رفتار آنها شود. پدیده توخالی که به تشکیل عروق خونی جدید در اطراف تومور می‌انجامد، می‌تواند در انتقال سلول‌های بنیادی سرطان به مناطق دور از تومور اصلی نقش داشته باشد. واکنش‌های سیستم ایمنی

نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد. برخی از سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است از سیستم ایمنی فرار کرده و از حملات این سیستم محافظت شوند (۱۶).

استفاده از نانوذرات برای حمل داروها به سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند اثربخشی درمان را افزایش دهد و به تصویرگیری دقیق‌تر کمک کند. تکنیک‌های تصویربرداری مولکولی با استفاده از فلورسانس و نور، ساختارهای داخلی و عملکرد سلول‌های بنیادی سرطان را به تصویر می‌کشند. استفاده از نانوذرات و نانومتریال‌ها در بیوتکنولوژی می‌تواند به دقت بالا در تصویربرداری و داروسازی در مطالعات سلول‌های بنیادی سرطان منجر شود. مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی مشتق از تومورهای واقعی می‌توانند به تحلیل و مطالعه خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان در شرایط واقعی بپردازند (۱۷). استفاده از مدل‌های حیاتی مثل مدل‌های حیوانی یا ارگانوئیدها که به دقت تراکم محیطی و شرایط بیولوژیکی را شبیه‌سازی می‌کنند، مطالعات عمیق‌تری در مورد رفتار سلول‌های بنیادی سرطان ارائه می‌دهند. جمع‌بندی و تحلیل داده‌های بزرگ حاصل از بیوانفورماتیک و داده‌کاوی می‌تواند الگوها و ارتباطات بین عناصر مولکولی در سلول‌های بنیادی سرطان را نمایان کند. ابزارهای هوشمند مطالعه سلولی که توانایی زمانبندی و کنترل شرایط محیطی را دارند، مطالعه تأثیرات دقیق‌تری را در محیط‌های مختلف بر سلول‌های بنیادی سرطان ممکن می‌سازند (۱).

مطالعه سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند به شناسایی هدف‌های داروسازی جدید برای توسعه داروهای مؤثر در درمان سرطان کمک کند. اطلاعات به دست آمده از این سلول‌ها می‌تواند به توسعه درمان‌های هدفمند و شخصی‌سازی شده در برابر انواع سرطان‌ها منجر شود. مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند به شناخت مکانیسم‌های مقاومت به درمان و توسعه راهکارهای مبارزه با آنها کمک کند. این سلول‌ها ممکن است به عنوان منبع مناسب برای تحقیقات بالینی و آزمایشات بالینی بر روی داروها و درمان‌های جدید استفاده شوند. تشخیص و شناسایی دقیق این سلول‌ها در محیط توموری ممکن است دشوار باشد که تحقیقات را مختلف می‌کند (۴). استانداردسازی و تهیه مواد مرجع مرتبط با سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند چالشی در اطلاعات یکسان و قابل اطمینان ارائه دهد. مدل‌های حیوانی ممکن است نتایج متفاوت از واقعیت بالینی نشان دهند، که این امر بر اعتبار و انتقال پذیری نتایج تأثیر می‌گذارد. برخی از محدودیت‌های فنی ممکن است به دقت و صحت نتایج در تحقیقات بر روی سلول‌های بنیادی سرطان تأثیر بگذارد. تحقیقات در این زمینه نیاز به تعامل متخصصان مختلف از جمله بیوتکنولوژیست‌ها، پزشکان، متخصصان اخلاق پزشکی و سایر حوزه‌های مرتبط دارد. با توجه به پیشرفت‌های اخیر در بیوتکنولوژی و تحقیقات بر روی سلول‌های بنیادی سرطان، امیدواریم که این چالش‌ها در آینده با ادامه تحقیقات و نوآوری‌های فناوری برطرف شوند و به بهبود درمان‌های سرطان کمک کنند (۶).

سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند به عنوان هدف‌های داروسازی مهم شناخته شوند. این سلول‌ها، با حفظ توانایی بهبود و تجدید خود، هدف‌های مناسبی برای داروهای بیولوژیک و داروهای هدفمند فراهم می‌کنند. مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است به توسعه درمان‌های هدفمند و شخصی‌سازی شده بر اساس ویژگی‌های مولکولی و بیولوژیکی این سلول‌ها منجر شود (۲). سلول‌های بنیادی سرطان اغلب در مقابل درمان‌ها مقاوم می‌شوند. درک مکانیسم‌های مقاومت این سلول‌ها به درمان‌ها، امکان توسعه داروهایی با اثربخشی بیشتر را فراهم می‌کند. سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است در محیط ایمنی تومور حضور داشته باشند و تأثیرات مخربی بر روی سیستم ایمنی داشته باشند. تحقیقات در این زمینه می‌تواند به بهبود درمان‌های ایمونوتراپی کمک کند. نانوتکنولوژی می‌تواند در تحویل داروهای بیولوژیک به سلول‌های بنیادی سرطان به صورت دقیق‌تر و با کارایی بیشتری موثر باشد (۹).

سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند برای تولید مدل‌های توموری شخصی‌سازی شده مورد استفاده قرار گیرند. این مدل‌ها می‌توانند برای آزمایش داروهای بیولوژیک در شرایط ویژه تومور فردی بکار روند. ان‌تی‌ژن‌های موجود در سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است به عنوان هدف برای توسعه واکسن‌های سرطانی و درمان‌های بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرند. مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است به ارتقاء روش‌های تشخیص مبتنی بر بیولوژی و شناخت بهتر ویژگی‌های مولکولی تومورها منجر شود (۱۸). سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند به توسعه مطالعات پیشرفته در زمینه ژنومیک و تحلیل دقیق ژنوم تومورها کمک کنند. شناخت دقیق از سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند به تولید اطلاعات قابل استفاده برای تحقیقات بالینی و آزمایشات بالینی در حوزه

درمان‌های بیولوژیک منجر شود. توسعه داروها و روش‌های درمانی بیولوژیک با تأثیر گذاری بر سلول‌های بنیادی سرطان، بهبود درمان سرطان و کاهش عوارض جانبی ممکن است به دست آید. به کمک این پژوهش‌ها و پیشرفت‌ها، درمان‌های بیولوژیک می‌توانند به شکل مستقیم و هدفمندانه‌تر به سلول‌های بنیادی سرطان عمل کنند و اثربخشی درمانی را افزایش دهند (۵). مطالعه سلول‌های بنیادی سرطان ممکن است به شناخت بهتر از اختلافات مولکولی و بیولوژیکی بین سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم منجر شود. این شناخت می‌تواند به توسعه داروهایی کمتر اثرات جانبی و بیشتر هدفمند کمک کند. استفاده از تکنیک‌های تصویربرداری پیشرفته برای مطالعه سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری از ساختار و فعالیت این سلول‌ها فراهم کند و در تشخیص و درمان بهبود ایجاد کند. نقش سلول‌های بنیادی سرطان در ایمونیتیه تومور می‌تواند در تحقیقات بر روی ایمونوتراپی کمک کند (۱). درک بهتر از نقش این سلول‌ها می‌تواند به بهبود تأثیر درمان‌های ایمونوتراپی و افزایش پاسخ بیماران کمک کند. انٹی‌ژن‌های موجود در سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند به عنوان مولکول‌های هدف برای توسعه واکسن‌های سرطانی درمانی استفاده شوند. شناخت دقیق از ژنوم سلول‌های بنیادی سرطان می‌تواند به پیشرفت در زمینه ژنومیک و درک بهتر از تغییرات ژنتیکی در سرطان‌ها منجر شود (۷). استفاده از سلول‌های بنیادی سرطان برای توسعه مدل‌های انسانی شبیه به تومور می‌تواند مطالعات بر روی این مدل‌ها به بهبود درمان‌های بیولوژیک کمک کند. در نتیجه، سلول‌های بنیادی سرطان به عنوان یک منبع اصلی برای مطالعه بیولوژی سرطان و توسعه درمان‌های بیولوژیک با اهمیت بالایی شناخته می‌شوند. این تحقیقات می‌توانند به بهبود درمان‌ها، کاهش عوارض جانبی و افزایش اثربخشی درمانی کمک کنند (۱۰).

### نتیجه گیری

در نتیجه، مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی سرطان نقش بسیار مهمی در تحولات درمان سرطان و پیشرفت‌های بیولوژیک داروسازی ایفا می‌کنند. شناخت عمیق از خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی این سلول‌ها، منجر به شناخت بهتر از مکانیسم‌های مقاومت به درمان، هدفگذاری دقیق‌تر داروها، و توسعه درمان‌های هدفمند و شخصی‌سازی شده است. این تحولات در حوزه بیوتکنولوژی، ایمونوتراپی، و توسعه واکسن‌های سرطانی را تقویت کرده و به افزایش اثربخشی و کاهش اثرات جانبی درمان‌ها منجر شده است. با ادامه پژوهش‌ها و نوآوری‌ها، امکان توسعه راهکارهای نوین و بهبود مستمر در درمان‌های بیولوژیک سرطان به دست آمده و به بهبود سطح درمانی و کیفیت زندگی بیماران کمک خواهد کرد. به طور خلاصه، درک عمیق از سلول‌های بنیادی سرطان اساسی است در تحقیقات مدرن سرطان که به وسیله آن ما قادر به ساختن راهکارهای دقیق‌تر و هدفمندتر برای تشخیص و درمان انواع مختلف سرطان شده‌ایم. این سلول‌ها نه تنها چالش‌های ما در تطبیق با پیچیدگی سرطان را مشخص می‌کنند، بلکه به عنوان نقطه شروع مهمی برای تحولات در زمینه درمان‌های بیولوژیک و نوآوری‌های درمانی محسوب می‌شوند. این پیشرفت‌ها نه تنها به درمان انواع سرطان کمک می‌کنند بلکه امیدوارم که در آینده بهبود زندگی بیماران و کاهش بار انتقالی سرطان در جامعه ما نیز داشته باشند.

### References:

1. Malta TM, Sokolov A, Gentles AJ, Burzykowski T, Poisson L. et al. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation. *Cell*. 2018; 173(2): 338–354.
2. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*. 2017; 23(10): 1124–1134.
3. Zhang D, Wu K, Rastegar M. *Stem cell research: a comprehensive handbook*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2018.

4. Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP. Cancer stem cells—old concepts, new insights. *Cell Death & Differentiation*. 2008; 15(6): 947–958.
5. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414(6859): 105–111.
6. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G. et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010; 468(7325): 824–828.
7. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(6): 717–728.
8. Batlle E, Clevers H, Cancer Genome Atlas Research Network. Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2017; 487(7407): 330–337.
9. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP. et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110(10): 4009–4014.
10. Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Research*. 2011; 71(3): 634–639.
11. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*. 2011; 17(3): 313–319.
12. Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012; 149(6): 1192–1205.
13. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio G. et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *The FASEB Journal*. 2018; 32(1): 80–94.
14. Garg M. Targeting microRNAs in epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem cells: therapeutic approaches in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2016; 20(9): 1013–1021.
15. Wang X, Huang S, Chen JL. Understanding of leukemic stem cells and their clinical implications. *Molecular Cancer*. 2018; 17(1): 1–14.
16. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells—what challenges do they pose? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014; 13(7): 497–512.
17. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*. 2006; 66(19): 9339–9344.
18. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007; 445(7123): 111–115.

## نقش microRNA ها در توسعه و پیشرفت سرطان سینه

مهشید سمیع قهفرخی<sup>\*۱</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

سرطان سینه یکی از بدخیم‌ترین سرطان‌ها در میان زنان است. مطالعات اخیر بیانگر نقش مهم و کلیدی microRNA ها در فرایند سرطان می‌باشد. miRNA ها نوعی از RNA های کوچک غیر کدکننده‌ای هستند که بیان ژن را از طریق تخریب mRNA یا سرکوب ترجمه کنترل می‌کنند. miRNA ها همچنین در فرایندهای مختلف رشد سلولی، تمایز و آپوپتوز دخیل هستند. اختلال در بیان miRNA ها در تومورزایی و پیشرفت سرطان‌ها از جمله سرطان سینه موثر است. بررسی‌ها نشان داده است که برخی از miRNA ها دارای نقش آنکوژنی هستند و در سرطان افزایش بیان دارند و تومورزایی و متاستاز را تحریک می‌کنند. همچنین مشخص شده است که برخی از miRNA ها به عنوان سرکوبگر تومور عمل می‌کنند و کاهش بیان آن‌ها باعث پیشرفت تومور می‌شود. بسیاری از miRNA ها نشانگرهای زیستی بالقوه‌ای در تشخیص سرطان سینه هستند و برخی از آن‌ها به عنوان شاخص‌های پیش‌آگهی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این miRNA های در گردش نیز به عنوان نشانگرهای کم‌تهاجمی در تشخیص و پیش‌آگهی در سرطان سینه کاربرد دارند.

miR-155، miR-10b و miR-145 دارای نقش آنکوژنی می‌باشند و در سرطان سینه افزایش بیان دارند، درحالی که خانواده let-7 و miR-145 دارای نقش سرکوبگری تومور می‌باشند و در سرطان سینه کاهش بیان دارند. متفاوت بودن بیان miRNA ها در بافت‌های سرطانی و سالم منجر به استفاده آن‌ها به عنوان بیومارکرهای تشخیصی مهم در سرطان سینه شده است.

**کلمات کلیدی:** سرطان سینه، miRNA، بیومارکر.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۱۷۹۹۳۰۲

پست الکترونیک: m.samie1994@gmail.com

## The role of microRNAs in the development and progression of breast cancer

Mahshid Samie Ghahfarokhi\*

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

Breast cancer is one of the most malignant cancers among women. Recent studies indicate the key role of microRNAs in the cancer process. MiRNAs are a type of small non-coding RNAs that control gene expression through mRNA degradation or translational repression. MiRNAs are also involved in various processes of cell growth, differentiation and apoptosis. Dysregulation of miRNAs leads to tumorigenesis and the development of cancers, including breast cancer. Studies have shown that some miRNAs have an oncogenic role and are up-regulation in cancer and stimulate tumorigenesis and metastasis. . It has also been found that some miRNAs act as tumor suppressors and their down-regulation causes tumor progression. Many miRNAs are potential biomarkers in breast cancer diagnosis and some of them are also used as prognostic indicators. In addition, circulating miRNAs are also used less aggressive markers in breast cancer diagnosis and prognosis. MiR-21, miR-155 and miR-10b have an oncogenic role up-regulated in breast cancer, while the let-7 and miR-145 family have a tumor suppressive role and down-regulated in breast cancer. Since the expression of miRNAs is different in healthy and cancerous tissues, they can be considered as important diagnostic biomarkers in breast cancer.

**Keywords:** breast cancer, miRNAs, biomarker

### مقدمه

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین تومورهای بدخیم و دومین عامل سرطان در زنان است (۱). تومورهای سینه بسیار ناهمگن هستند و می‌توانند بر اساس پروفایل‌های متفاوت بیان ژن، به چندین زیرگروه طبقه‌بندی شوند (۲). از عوامل مهم در سرطان سینه می‌توان به شناسایی زود هنگام و نظارت بر بیماران در پاسخ به درمان‌های مختلف اشاره کرد (۳). همچنین شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مشارکت کننده در فرایند‌های اصلی سرطان سینه، مانند تومورزایی و متاستاز نیز حائز اهمیت است (۴). عوامل مختلفی در ایجاد و ترویج سرطان سینه نقش دارند. بیشتر آن‌ها شامل تغییراتی در بیان ژن‌های خاص، از جمله ژن‌های RNAهای غیر کدکننده می‌باشد (۵). مطالعات اخیر بیانگر نقش کلیدی و مهم microRNAها در فرایند سرطان است. microRNAها (miRNAs) نوعی از RNAهای کوچک غیر کد کننده هستند که در بسیاری از گونه‌ها از جمله گیاهان و ویروس‌ها یافت می‌شوند و بیان ژن را کنترل می‌کنند. بیش از ۱۰۰۰ miRNA انسانی شناسایی شده است که هر کدام به طور بالقوه صدها ژن هدف را کنترل می‌کنند (۶). نقش مهم miRNAها را در چندین فعالیت فیزیولوژیکی مانند رشد سلولی، تمایز، آپوپتوز و همچنین در بروز انواع مختلف تومورها شناسایی شده است (۷). در فرایند سرطان، miRNAها می‌توانند به عنوان سرکوبگر تومور یا آنکوژن (oncomiRs) در پیشرفت و متاستاز تومور عمل کنند (۸ و ۹). اختلال در بیان miRNAها در انواع مختلف سرطان رخ می‌دهد و با ایجاد تومور، مقاومت دارویی و متاستاز مرتبط است. بنابراین، استراتژی‌های درمانی مبتنی بر تعدیل سطح بیان miRNAها و شناسایی اهداف آن‌ها، رویکردهای امیدوارکننده‌ای برای درمان سرطان هستند (۱۰).

### بیوژنز miRNA

miRNAها مولکول‌های کوچک RNA با اندازه ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که بیان ژن را تنظیم می‌کنند. از زمان کشف آن‌ها به دلیل پایداری بیشتر نسبت به mRNA و تشخیص بدون عارضه آن‌ها در بافت‌ها یا پلاسما، نشانگرهای زیستی بالقوه‌ای برای تشخیص، پیش‌آگهی، درمان و بقای سرطان بوده‌اند (۱۱ و ۱۲). در سنتز miRNA ابتدا ژن‌های miRNA توسط آنزیم RNA پلی‌مراز II در هسته به عنوان miRNAهای اولیه (pri-miRNA) که شامل کلاهک در ۵' و دم پلی‌آدینیل در ۳' است، رونویسی

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

می‌شوند. پردازش miRNAها ابتدا در هسته صورت می‌گیرد، در این مرحله pri-miRNA توسط کمپلکس DROSHA/DICER برش خورده و یک pre-miRNA با طول ۶۰-۷۰ نوکلئوتید ایجاد می‌شود که توسط Eportin 5 از هسته به سیتوپلاسم صادر شده و در آنجا توسط یک نوع آنزیم RNase III به نام DICER1 پردازش می‌شود. عمل این آنزیم منجر به ایجاد یک miRNA دو رشته‌ای بالغ با طول ۲۲ نوکلئوتید می‌شود. در نهایت، RNA دورشته‌ای باز می‌شود و miRNA تک رشته بالغ به کمپلکس خاموش کننده القا شده با RNA (RISC) می‌پیوندد و با اتصال به mRNA هدف منجر به خاموش شدن ژن مورد نظر و مهار بیان ژن می‌شود (۱۳ و ۱۴ و ۱۵).

### miRNA و سرطان

تحقیقات زیادی در زمینه ارتباط miRNAها و سرطان انجام شده است. اولین ارتباط بین miRNAها و سرطان توسط کالین و همکاران در سال ۲۰۰۲ ارائه شد که کاهش بیان miRNA-15 و miRNA-16 را در لوسمی لنفوسیتی مزمن گزارش کردند (۱۶). در سال ۲۰۰۵، لو و همکارانش بیان متفاوت miRNAها را در سرطان پستان گزارش کردند (۱۷).

### miRNA و سرطان سینه

اکثر مطالعات نمایه سازی بر روی miRNAهای دارای اختلال در بافت سرطان سینه اولیه یا رده های سلولی سرطان سینه متمرکز شده اند. با این حال، به دلیل مقاومت آن ها در برابر تخریب، به نظر می‌رسد miRNAها در خون پایدار هستند و نمایه سازی miRNAهای در حال گردش به عنوان نشانگرهای جایگزین غیرتهاجمی مورد توجه است. مشخص شده است که miRNAهای در گردش در خون بیماران سرطانی در مقایسه با افراد سالم به میزان قابل توجهی افزایش یافته است و این سطوح در تومورهای اولیه منعکس می‌شود. علاوه بر این، حذف تومور اولیه منجر به از دست دادن miRNAهای در گردش افزایش یافته می‌شود، که نشان می‌دهد بسیاری از این miRNAهای در حال گردش افزایش یافته، مشتق از تومور و مختص سرطان هستند. باور فعلی این است که این miRNAهای در حال گردش مشتق از تومور، از تومور اولیه از طریق وزیکول‌های اگزوزوم و اجسام آپوپتوتیک آزاد می‌شوند (۱۸ و ۱۹).

مطالعات متعددی برای شناسایی miRNAهایی که داری اختلال بیان هستند و در شروع و پیشرفت سرطان سینه در زیرگروه‌های مختلف سرطان پستان موثر هستند، انجام شده است. تجزیه و تحلیل بیان miRNA در ۷۶ نمونه سرطان سینه و ۱۰ نمونه طبیعی منجر به شناسایی ۲۹ miRNA که بیان آنها به طور قابل توجهی دارای اختلال است، شد و همچنین miR-145، miR-125b، miR-21 و miR-155 نیز به طور قابل توجهی دچار اختلال در بیان بودند (۲۰).

### miRNA های سرطان زا

بسیاری از miRNAهایی که ژن‌های سرکوبگر تومور را هدف قرار می‌دهند در سرطان سینه بیش از حد بیان می‌شوند. این miRNAها تومورزایی، تکثیر، تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی را تنظیم می‌کنند (۲۱). miR-21 یکی از اولین miRNAهای انکوژنی بود که شناسایی شد و اغلب در انواع تومور بیش از حد بیان می‌شود (۲۲). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که miR-21 نقش کلیدی در پیشرفت تومور و متاستاز دارد (۲۳). همچنین miR-21 از طریق سرکوب بیان پروتئین مرگ سلولی برنامه ریزی شده PDCD4 (۲۴) تغییرات و توسعه سرطان سینه را افزایش می‌دهد (۲۴).

miR-155 در سرطان‌های متعدد انسانی، از جمله سرطان سینه، بیش از حد بیان می‌شود (۲۵). miR-155 از طریق کاهش FOXO3a در تنظیم بقا در سرطان سینه نقش دارد. بیان نابجا miR-155 بقای سلولی و مقاومت شیمیایی را از طریق چندین عامل القا می‌کند، در حالی که حذف miR-155 منجر به آپوپتوز و افزایش حساسیت شیمیایی می‌شود (۲۶).

miR-10b یکی از اولین miRNAهای کشف شده موثر بر متاستاز سرطان بود. miR-10b در سلول‌های سرطان سینه متاستاتیک به شدت بیان می‌شود و تأثیر مثبتی بر مهاجرت و تهاجم سلولی در شرایط آزمایشگاهی دارد (۲۷).

خوشه پلی سیسترونی miR-17-92 نمونه دیگری از miRNAها با عملکرد سرطان‌زا را نشان می‌دهد. بیان بیش از حد هفت miRNA در این خوشه (miR-17-3p، miR-175p، miR-18a، miR-19a، miR-20a، miR-19b، و miR-92-1) با

انواع مختلفی از بدخیمی‌های روده بزرگ، لنفوم، پستان، ریه، لوزالمعده، پروستات و معده همراه بوده‌است (۲۵). مکانیسم عملکرد این خوشه احتمالاً به دلیل سرکوب PTEN (یک ژن سرکوب کننده تومور و تنظیم کننده منفی بسیار سرطانی مسیر سیگنالینگ PI3K / AKT) می‌باشد (۲۸).

#### miRNA های مهار کننده تومور

اگرچه به طور کلی، اکثر miRNA ها بیان بیش از حد را در سرطان نشان می‌دهند، اما تعداد زیادی از miRNA ها با عملکرد سرکوب کننده تومور و حتی ضد متاستاتیک نیز وجود دارد. رایج‌ترین میکروRNA های سرکوب کننده تومور در سرطان سینه از خانواده let-7 (شامل ۱۰ عضو: let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7) تشکیل شده است. عملکردهای طبیعی بیولوژیکی let-7 شامل رشد، چسبندگی سلولی، تشکیل ماهیچه و تنظیم بیان ژن می‌باشد. بیان Let-7 در مراحل اولیه پیشرفت تومور سینه سرکوب می‌شود (۲۹). miRNA های Let-7 یکی از بزرگترین خانواده‌های miRNA ها را تشکیل می‌دهد که دارای خواص ضد سرطانی بالقوه در بافت‌های مختلف هستند و بیان قابل توجهی را نیز دارند (۳۰). مطالعات مختلف نشان داده است که miR-145 در نمونه سرطان سینه در مقایسه با بافت سالم سینه، به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۳۱). miR-145 عملکرد قوی سرکوب کننده تومور خود را با خاموش کردن ژن‌های هدف مختلف در رویدادهای خاص مرحله‌ای اعمال می‌کند. miR-145 دارای اثر پیش آپوپتوتیک در رده‌های سلولی سرطان پستان است و همراه با افزایش بیان TP53 است که نشان می‌دهد miR-145 مسیر TP53 را فعال می‌کند. علاوه بر این، miR-145 به طور مستقیم بیان پروتئین گیرنده استروژن- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) را سرکوب می‌کند و باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه ER- $\alpha$  مثبت و نوع وحشی TP53 می‌شود (۳۲).

#### miRNA به عنوان بیومارکر های تشخیصی سرطان سینه

سرطان سینه نوعی بیماری ناهمگن است که ظاهر مورفولوژیک، ویژگی‌های مولکولی، فنوتیپ‌ها و پاسخ‌های درمانی متعددی را نشان می‌دهد (۲ و ۳۳). تشخیص زودهنگام سرطان سینه به منظور بهبود پیش آگهی از اهمیت بالایی برخوردار است. بنابراین، شناسایی نشانگرهای زیستی تشخیصی جدید همچنان حائز اهمیت است. نمونه‌های سرطان پستان بیان متفاوت miRNA را در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور نشان می‌دهند. به عنوان مثال، در اولین مطالعه پروفایل بیان miRNA در سرطان پستان، بیان ۱۳-miRNA می‌تواند به درستی سرطان سینه را از بافت‌های طبیعی سینه با دقت ۱۰۰ درصد متمایز کند (۳۴). miRNA ها در سیستم گردش خون ممکن است به عنوان نشانگرهای زیستی در تشخیص سرطان پستان در مراحل اولیه عمل کنند. به عنوان مثال، miRNA های در گردش مانند let-7a, miR-10b و miR-155 مشخص شد که در سرطان‌های ملانوما، پستان، پروستات و روده بزرگ افزایش بیان دارند. بیان miR-195 در گردش به طور خاص در سرطان سینه افزایش می‌یابد (۳۵).

#### نتیجه گیری

miRNA ها نقش مهم و کلیدی در توسعه و پیشرفت سرطان‌ها از جمله سرطان سینه دارند. miRNA ها دسته‌ای از RNA های کوچک غیرکدکننده‌ای هستند که نقش بسیار مهمی در تنظیم بیان ژن و فعالیت‌های سلولی دارند. بررسی‌های متعدد مشخص کرده است که اختلال در بیان miRNA می‌تواند منجر به تحریک تومورزایی، تکثیر، تهاجم و متاستاز شود و به پیشرفت سرطان کمک کند. انواع گوناگونی از miRNA هایی که در سرطان سینه دخالت دارند، شناسایی شده است. برخی از این miRNA ها مانند miR-21, miR-155 و miR-10b دارای نقش آنکوژنی هستند و در سرطان سینه افزایش بیان دارند، در حالی که برخی دیگر مانند خانواده let-7 و miR-145 دارای نقش سرکوبگری تومور هستند و در سرطان سینه کاهش بیان دارند. با توجه به اینکه بیان miRNA در بافت‌های سالم و سرطانی متفاوت است، می‌توانند به عنوان بیومارکرهای تشخیصی مهم در سرطان سینه در نظر گرفته شوند. در نتیجه استفاده از miRNA ها به عنوان هدف‌ها و بیومارکرهای درمانی و تشخیصی می‌تواند یک رویکرد موثر برای بهبود، تشخیص، پیش آگهی و درمان این بیماری باشد.



## Reference

1. DeSantis CE, Ma J, Goding Sauer A, Newman LA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017; 67(6): 439-48.
2. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *nature*. 2000; 406(6797): 747-52.
3. Barber MD, Jack W, Dixon JM. Diagnostic delay in breast cancer. *Journal of British Surgery*. 2004; 91(1): 49-53.
4. Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016; 66(2): 115-32.
5. Wang J, Ye C, Xiong H, Shen Y, Lu Y, et al. Dysregulation of long non-coding RNA in breast cancer: an overview of mechanism and clinical implication. *Oncotarget*. 2017; 8(3): 5508.
6. Kontomanolis EN, Kalagasidou S, Fasoulakis Z, Kontomanolis E. MicroRNAs as potential serum biomarkers for early detection of ectopic pregnancy. *Cureus*. 2018; 10(3): e2344.
7. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic acids research*. 2005; 33(4): 1290-7.
8. Serpico D, Molino L, Di Cosimo S. microRNAs in breast cancer development and treatment. *Cancer treatment reviews*. 2014; 40(5): 595-604.
9. Sui Y, Zhang X, Yang H, Wei W, Wang M. MicroRNA-133a acts as a tumour suppressor in breast cancer through targeting LASP1 Retraction in/10.3892/or. 2022.8330. *Oncology reports*. 2018; 39(2): 473-82.
10. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2008; 110(1): 13-21.
11. Khan MT, Irlam-Jones JJ, Pereira RR, Lane B, Valentine HR, et al. A miRNA signature predicts benefit from addition of hypoxia-modifying therapy to radiation treatment in invasive bladder cancer. *British journal of cancer*. 2021; 125(1): 85-93.
12. Zhao Y, Xu L, Wang X, Niu S, Chen H, et al. A novel prognostic mRNA/miRNA signature for esophageal cancer and its immune landscape in cancer progression. *Molecular oncology*. 2021; 15(4): 1088-109.
13. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*. 2015; 15(6): 321-33.
14. Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose?. *International journal of molecular sciences*. 2016; 17(12): 1987.
15. MacFarlane LA, R Murphy P. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Current genomics*. 2010; 11(7): 537-61.
16. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2002; 99(24): 15524-9.
17. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*. 2005; 435(7043): 834-8.
18. Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Communicative & integrative biology*. 2010; 3(5): 478-81.
19. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*. 2010; 101(10): 2087-92.

20. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*. 2005; 65(16): 7065-70.
21. Zaravinos A. The regulatory role of microRNAs in EMT and cancer. *Journal of oncology*. 2015; 2015: 232-244.
22. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer research*. 2005; 65(14): 6029-33.
23. Rask L, Balslev E, Søkilde R, Høgdall E, Flyger H, et al. Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer patients sub-classified according to lymph node status. *Cellular Oncology*. 2014; 37: 215-27.
24. Abdulhussain MM, Hasan NA, Hussain AG. Interrelation of the circulating and tissue MicroRNA-21 with tissue PDCD4 expression and the invasiveness of Iraqi female breast tumors. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2019; 34: 26-38.
25. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(7): 2257-61.
26. Kong W, He L, Coppola M, Guo J, Esposito NN, et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(23): 17869-79.
27. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007; 449(7163): 682-8.
28. Van Haaften G, Agami R. Tumorigenicity of the miR-17-92 cluster distilled. *Genes & development*. 2010; 24(1): 1-4.
29. Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, Bak M, Heath CV, et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer research*. 2007; 67(24): 11612-20.
30. Büsling I, Slack FJ, Großhans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in molecular medicine*. 2008; 14(9): 400-9.
31. Wang S, Bian C, Yang Z, Bo Y, Li J, et al. miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *International journal of oncology*. 2009; 34(5): 1461-6.
32. Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, et al. miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor- $\alpha$  in human breast cancer cells. *Cell Death & Differentiation*. 2010; 17(2): 246-54.
33. Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2001; 6: 375-92.
34. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425(6956): 415-9.
35. Khalighfard S, Alizadeh AM, Irani S, Omranipour R. Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 17981.

## نانو تکنولوژی در زیست فناوری، کاربردها و چالش‌ها

علی دوانیان<sup>۱\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

تمامی خلقت بر اساس ساختارهای نانو پایه ریزی شده‌اند. مواد سمی در این ساختارهای نانو در طول تکامل یا حذف شده‌اند یا با بدن موجودات در تطابق قرار گرفته‌اند. اکنون بشر به سمت سنتز و استفاده مستقیم از ساختارهای نانو و کاربردی نمودن آن در جوانب مختلف زندگی پیش می‌رود. به دلیل ساختارهای غیرقابل پیش‌بینی نسبت به اشکال اولیه و قابل دسترسی‌اش در طبیعت، عدم دانایی نسبت به عملکرد این ساختارها در محیط‌های بیولوژیک و رسمیت بالقوه آن‌ها و عطش فعلی جوامع دانشگاهی در بررسی این ساختارها، ضوابط اخلاقی بر نحوه ساخت و اثرات آن در محیط‌های آزمایشگاهی، صنعتی، و همچنین استفاده از این مواد در کلیه ابعاد زندگی بشر و محیط زیست پیرامونش، نیاز به تدوین راهکارهایی دارد تا از وقوع فجایعی جلوگیری به عمل آید. استفاده از این فناوری نانو در تمامی حوزه‌های علوم پزشکی، پتروشیمی، علوم مواد، صنایع دفاعی، الکترونیک، کامپیوترهای کوانتومی، و غیره، باعث شده که تحقیقات در زمینه نانو به عنوان یک چالش اصلی علمی و صنعتی در مقابل جهانیان قرار گیرد. لذا محققان، اساتید، و صنعتگران ایرانی نیز باید در یک بسیج همگانی، جایگاه، موقعیت، و وضعیت خود را در خصوص این موضوع مشخص نمایند.

واژگان کلیدی: نانو تکنولوژی، زیست فناوری

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: adavanian@gmail.com

## Nanotechnology in biotechnology, applications and challenges

Ali Davanian<sup>1\*</sup>

1. Master's student in genetics, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

All of creation is based on finely-tuned nanostructures. Toxic materials in these nanostructures have either been eliminated or adapted throughout evolution. Now, humanity is moving towards synthesizing and directly utilizing nanostructures in various aspects of life. Due to the unpredictable nature of nanostructures compared to their initial forms and their accessibility in nature, along with the lack of knowledge regarding their performance in biological environments and their potential recognition, and the current thirst in academic communities to explore these structures, ethical guidelines are needed on how to construct and the effects of these structures in laboratory, industrial, and all dimensions of human life and the surrounding environment. The use of nanotechnology in fields such as medical sciences, petrochemistry, materials science, defense industries, electronics, quantum computers, etc., has made research in the field of nano a major scientific and industrial challenge globally. Therefore, Iranian researchers, professors, and industrialists must collectively define their position, status, and role in this matter.

**Keywords:** nanotechnology, Biotechnology

### مقدمه

نانوتکنولوژی یکی از نوظهورترین زمینه‌های تحقیقاتی در دهه‌های اخیر است و بر اساس بهره‌برداری از مواد در اندازه‌های نانو (مانند نانوذرات، نانولوله‌ها، نانوغشاها، نانوسیم‌ها، نانوالیاف و غیره) در زمینه‌های عملیاتی مختلف است. نانومواد مزایای متعددی از جمله پایداری بالا، گزینش پذیری هدف و انعطاف پذیری دارند. از مواد مختلف زیستی (مانند کپسید ویروس‌ها و جلبک‌ها) و غیر زنده (مانند کربن، نقره، طلا و غیره) می‌توان در فرآیند سنتز نانومواد استفاده کرد. «نانوبیوتکنولوژی» ترکیبی از رشته‌های نانوتکنولوژی و بیوتکنولوژی است.

### تاریخچه فناوری نانو

در حدود ۱۱۱ سال پیش از میلاد مسیح، دموکریتوس فیلسوف یونانی، برای اولین بار واژه اتم را که در زبان یونانی به معنی تقسیم‌نشده است، برای توصیف ذرات سازنده مواد به کار برد. از این رو شاید بتوان او را پدر فناوری و علوم نانو دانست. ریشه یونانی "نانس" به معنی کوتوله می‌باشد، فناوری نانو موج چهارم انقلاب صنعتی، پدیده‌های عظیم می‌باشد که در تمامی گرایش‌های علمی راه یافته تا جایی که در یک دهه‌ی آینده برتری فرایندها، وابسته به این تحول خواهد بود (۱).

### نانو تکنولوژی در زیست فناوری

به بیان ساده علم نانو مطالعه اصول اولیه مولکول‌ها و ساختارهایی با ابعاد بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است. این ساختارها نانو ساختار نامیده می‌شوند.

نانو تکنولوژی: کاربرد این ساختارها در دستگاه‌هایی با اندازه نانومتری است. می‌توان گفت نانو تکنولوژی تولید کارآمد مواد و دستگاه‌ها و سیستم‌ها با کنترل ماده در مقیاس طولی نانومتر و بهره‌برداری از خواص و پدیده‌های نوظهوری است که در مقیاس نانو توسعه یافته‌اند. یکی از ویژگی‌های مهم نانو تکنولوژی جنبه چند رشته‌ای آن است. فهم چند رشته‌ای در نانو تکنولوژی بدان معنی است که نیروی کاری نانو تکنولوژی باید دارای بینش وسیعی از مفاهیم زیست‌شناسی، فیزیک، شیمی، اصول مهندسی طراحی، کنترل فرایند و محصولات باشد. تحقیقات اخیر بر روی سیستم‌های زیستی در مقیاس نانو و نانوتکنولوژی، یکی از پویاترین حوزه‌های علم و فناوری را در تلاقی علوم فیزیکی، مهندسی مولکولی، زیست‌شناسی، بیوتکنولوژی و پزشکی ایجاد کرده است. این حوزه شامل درک بهتر سیستم‌های زندگی و تفکر، فرآیندهای بیوتکنولوژی انقلابی، سنتز داروهای جدید است (۲).

دهه ۱۹۸۰ نقطه شروع فناوری نانو است: ظرفیت سنتز، دستکاری و تجسم ماده در مقیاس نانومتری. قدرت های جدید برای رسیدن به نانو مقیاس امکان بی سابقه ای را برای ما به ارمغان آورد تا مستقیماً در مقیاس زیستمول - هدف قرار دهیم. تعاملات چشمی، و انگیزه ایجاد نانو ساختارهای هوشمند که می تواند دور زدن موانعی که مانع موفقیت رویکردهای دارویی سنتی می شود. 40 سال بعد، ادغام پیشرونده فناوری های زیستی و نانو آغاز شده است ایجاد دگرگونی در روش تشخیص، درمان و پایش بیماری ها و عدم بازگشت مشکلات پزشکی را حل کرد (۳).

تشخیص سرطان ها، هدف قرار دادن بیماری های عصبی و کاربردهای متنوع دندان پزشکی و درمان سل را بررسی می کنیم. مواد نانو ساختار در زمینه هایی مانند پزشکی احیا کننده و کنترل شده، انتشار داروها و درمان ها دومی در حال حاضر آماده است تا پیشرفتی را ایجاد کند. تغییرات در ایمونوتراپی: ظهور "ایمپلنت های واکنس" که به طور مداوم کنترل می شوند و پاسخ های ایمنی را در طول زمان بهبود بخشد. با احتمال فزاینده پایان یافتن همه گیری کووید ۱۹ با کمک واکنس مبتنی بر نانو پزشکی (هر دو مدرن) و واکنس های BioNTech/Pfizer بر اساس فرمولاسیون نانوذرات لیپیدی هستند. سنتز مواد مهندسی شده جدید، به ویژه نانومواد، به سرعت در طول سال افزایش یافته است (۴).

نانو و بیوتکنولوژی کیفیت منحصر به فرد مواد در مقیاس نانومتری، توانایی فیزیک و شیمی خود را در مقیاسی که در آن فعل و انفعالات زیست مولکولی رخ می دهد دستکاری و تنظیم می کند فرصت های بی شماری را در عرصه پزشکی باز می کند، از جمله تشخیص زودهنگام نشانگرهای زیستی، هدف قرار دادن سلول ها و بافت ها، سیستم های پیچیده تحویل دارو، مرحله بندی و ارزیابی بیماری و درمان آن ها را مورد بررسی قرار می دهد (۵) نانوتکنولوژی مطالعه، طراحی و ساخت مواد یا وسایل در مقیاس نانو با طول بسیار کوچک (۱۰-۹ متر) می باشد برای برخی کاربردهای مفید است. خواص منحصر به فرد آنها که به دلیل اندازه بسیار کوچک آنها است، زیرا در مقیاس نانو خواص مواد توسط مکانیک کلاسیک کنترل نمی شود. کاربرد نانومواد در بیوتکنولوژی یعنی یافتن راه حل هایی برای مشکلات خاص با استفاده از نانومواد می باشد کاربردهای نانومواد در بیوتکنولوژی عبارتند از تعداد زیادی از جمله نانوذرات - انتقال دارو، انتقال ژن، مگنت جداسازی خالص مولکول های زیستی، زیست پذیری با نقاط کوانتومی فلورسنت، دارو کپسوله سازی، سیستم های دارورسانی هدفمند و کنترل شده، تصویربرداری زیستی و غیره. نانوذرات پلیمری زیست سازگار و زیست تخریب پذیر به عنوان بستری برای توسعه و راه اندازی سیستم های دارورسانی هدفمند و کنترل شده برای سرطان می باشد به طور مشابه، زیستی نانوذرات اکسید آهن به عنوان ماده کنترلی است و برای قدرت مغناطیسی استفاده می شود (۵).

تصویربرداری (MRI): در مقایسه با ترکیبات سمی گادولینیوم سنتی به همین ترتیب کاربردهای دیگری مانند نانوکامپوزیت های سه بعدی و داربست برای ایمپلنت های بدن و همچنین بازسازی بافت و استخوان مورد بحث قرار می گیرد.

در حال حاضر نانومواد در حال دستیابی به مقاطع بالایی است اهمیت زیادی در حوزه علم و فناوری دارد. نانومواد، به ویژه نانو ذرات فلزات، دارای منابع کنجکاو در حوزه علوم کاربردی از علم مواد گرفته تا بیوتکنولوژی می باشند (۶).

مفهوم نانومواد تقریباً ۳۰ تا ۴۰ سال قدمت دارد. این روزها مورد توجه جدی قرار گرفته است. خواص نانوذرات به دلیل وجود مواد حجیم متفاوت است اندازه بسیار کوچک و سطح بالا به خوبی شناخته شده است که فیزیکی، یا شیمیایی هستند خواص کالبدی، الکترونیکی و نوری مواد با توجه به ترکیب آنها متفاوت است.

اندازه، شکل و مساحت ذرات جامد تغییر می کند، به عنوان مثال. نقره و طلا، نانوذرات با اندازه و شکل های مختلف دارای خواص نوری منحصر به فردی هستند با توجه به تفاوت آنها در اندازه و شکل، آنها کاربرد خود را پیدا می کنند.

اقدامات در زمینه های مختلف، به عنوان مثال در دستگاه های الکترونیکی، کاتالیزور، حسگر و تصویربرداری، تحویل دارو و غیره صورت گرفته است (۷).

نانوذرات با هندسه متقارن اغلب یک نوار جذبی را نشان می دهند برای تشدید پلاسمون سطحی و ذرات با اشکال ناهمسانگرد ممکن است چندین قله در طیف مرئی خود داشته باشند. سنتز از ذرات با مورفولوژی مورد نیاز علاقه زیادی در این زمینه دارند فناوری نانو چندین تکنیک مختلف وجود دارد که برای آن استفاده می شود تهیه نانومواد از انواع پیش سازها این مواد از جمله روش های

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

خشک/فیزیکی مانند آسیاب گلوله ای، کندانس بخار یون، رسوب بخار شیمیایی، فرسایش لیزر، لیتوگرافی و غیره به طور مشابه، چندین روش شیمیایی مرطوب وجود دارد.

روش های میکرومولسیون و حلال گرمایی نکته جالب توجه است (۸).

طیف گسترده ای از نانوذرات با ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مورد نظر هستند که با کمک فناوری نانو سنتز شده اند و به چند کلاس مجزا تقسیم می شود:

(۱) نانو خوشه ها، دارای توزیع در اندازه های باریک و درونی ابعاد ۱-۱۰ نانومتر، آنها نیمه کریستالی هستند.

(۲) نانو پودرها از تجمع نانو مواد تشکیل شده اند. که غیر کریستالی هستند و بین ۱۰-۱۰۰ نانو متر است .

(۳) نانوبلورها نانو موادی با ۱۰۰-۱۰۰۰ نانومتر هستند و تک کریستالی میباشند.

بسته به مورفولوژی، انواع دیگری از نانو وجود دارد موادی که شامل نانوسیم ها، نانوکپسول ها، نانو فنجان ها، نانواستارها، نانوکره ها و نقاط کوانتومی میباشد (۹).

**لیپوزوم:** لیپوزوم ها وزیکول هایی از حداقل یک لایه لیپیدی هستند. که از دیس ساخته شده اند پاره شدن غشاهای بیولوژیکی در دهه ۱۹۶۰ لیپوزوم ها مورد مطالعه قرار گرفتند و به عنوان نانو ظروف پلیمرهای زیستی در نظر گرفته شد، در حالی که در دهه ۱۹۷۰ لیپوزوم ها برای حمل و نقل مواد مخدر توسعه یافته است. در صنعت داروسازی از لیپوزوم ها به عنوان ماشین دارویی استفاده می شود انواع مختلفی از عوامل درمانی در درمان ضد سرطان، واکسیناسیون و فعالیت ضد قارچی آنها همچنین در آماده سازی استفاده می شوند (۱۰).

**نانو ذرات سوپر پارامغناطیس:** نانوذرات سوپر پارامغناطیس از فرومغناطیسی تشکیل شده اند. مواد ری مغناطیسی مانند اکسید آهن به غیر از آهن حاوی نیکل، کبالت و منگنز است. با مواد معدنی مانند سیلیس، طلا یا برخی مواد آلی مانند به دست آوردن اسیدهای چرب، پلی ساکاریدها، پپتیدها، سورفکتانت ها و پلیمرها می توان اشاره کرد (۱۱).

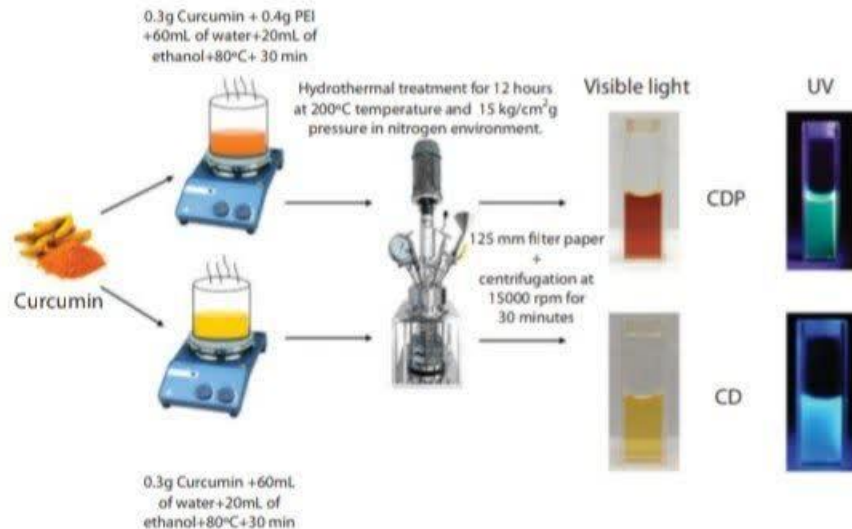
**فولرن ها: توپ های باکی و نانولوله های کربنی:** فولرن ها کره ها، لوله ها یا بیضی های توخالی هستند که از کوانتومی بالا تشکیل شده اند. مقدار کربن باکی بال ها کروی هستند در حالی که نانولوله های کربنی CNT هستند لوله های تک جداره یا چند جداره از اتم های کربن که ممکن است باز باشند یا در انتهای آنها بسته شده است. ساختار متشکل از لایه هایی از اتم های کربن که به طور منظم توسط پنتاگو به هم متصل شده اند. CNT به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته اند و مشخص شده اند که دارای خصوصیات منحصر به فرد هستند خواص مکانیکی و الکترونیکی آن ها را از فلزات و دیگر موارد برتر میکند. CNT ها باعث پیشرفت های چشمگیری در زمینه نانو شده اند. نانو ابزارها مانند حسگرها، تولید و ذخیره انرژی، کاتالیزور، کامپیوتر و الکترونیک همچنین در چندین کاربرد زیستی استفاده شده اند کاتیون ها مانند دارورسانی، حسگرهای زیستی، بیوالکترونیک و غیره استفاده شده است (۱۲-۱۴).

### سنتز سبز نانومواد با الهام از زیستی

خود طبیعت راه های متعددی را برای تولید نانو ابداع کرده است.

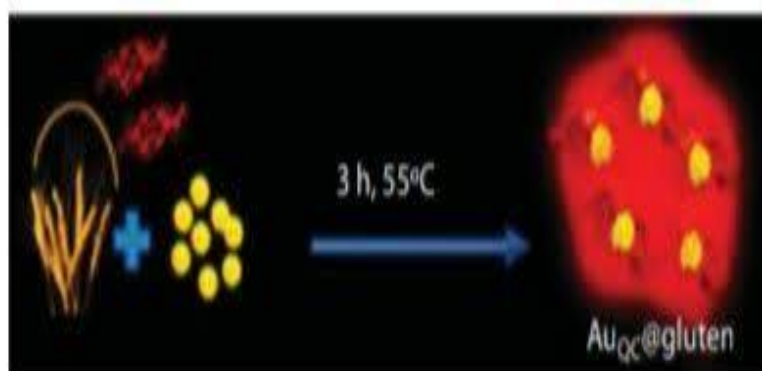
این راه های طبیعی سهم بسزایی در تولید جدید و مقادیر نسبتاً زیادی از نانومواد، که قبلاً غیرقابل آزمایش بودند مورد تجسس قرار گرفته است. این تولید طبیعی نانومواد در داخل یا توسط اندام زنده را بیوسنتز گویند (۱۵).

اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲  
 دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۱- سنتز نقاط (۱۶)

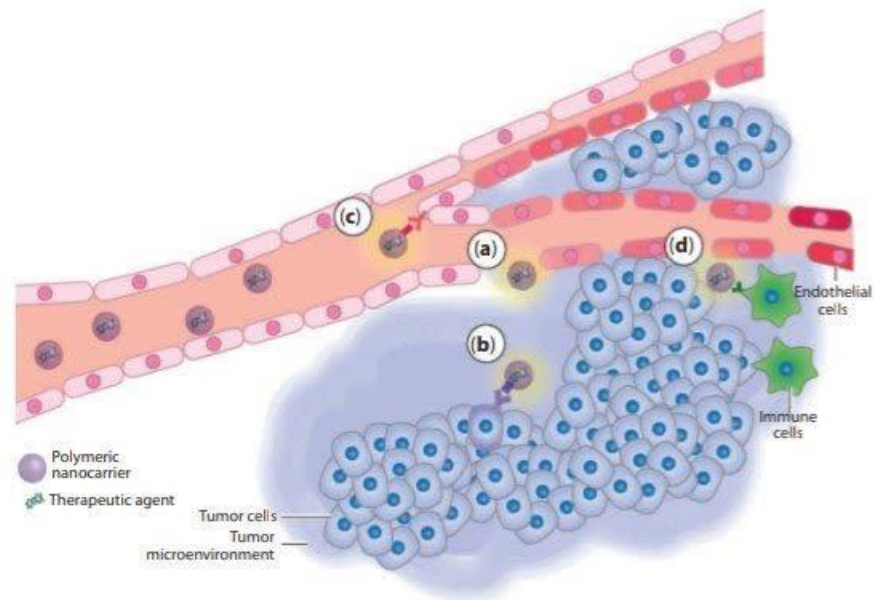
این شکل نمایش شماتیک سنتز نقاط C از طریق راکتور هیدروترمال به دنبال تجسم CDP (نقطه کربن غیرفعال شده در سطح) و (CD نقاط C غیر فعال) تحت نور مرئی و نور UV می‌باشد (۱۶).



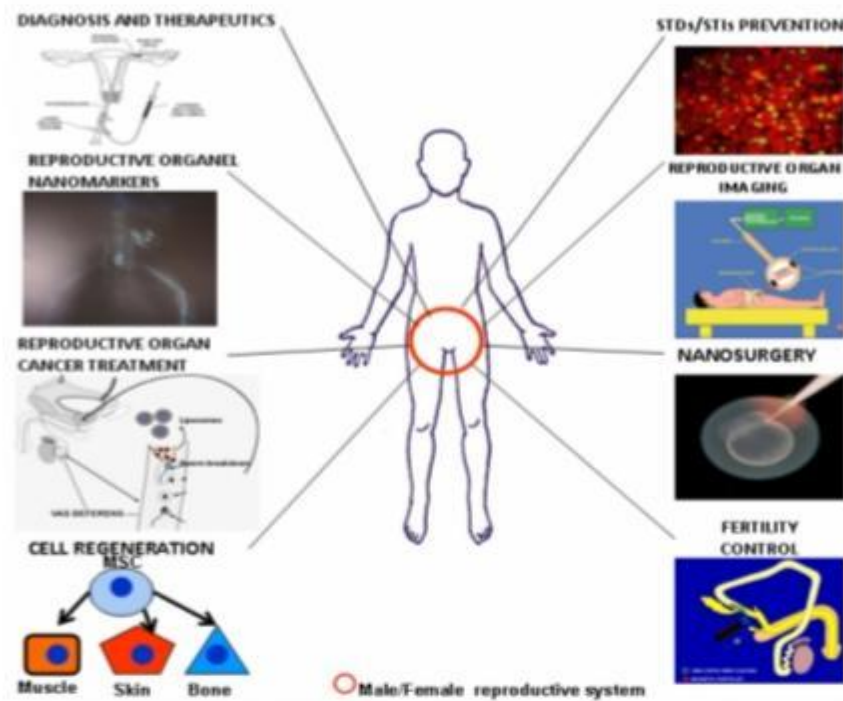
شکل ۲- نمایش تصویر Au55 (۱۷)

این شکل نمایش شماتیک ۵۵ AU درجه سانتیگراد هم زدن مداوم به مدت ۳ ساعت منجر به تشکیل AuQC شد. گلوتن که مشخص شد بسیار فلورسنت است و ممکن است کاربردهایی داشته باشد (۱۷).

اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲  
 دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد



شکل ۳- ویژگی های سرطان.. این شکل هدف گیری سرطان با نانوحامل های پلیمری را می توان با هدف گیری به دست آورد چندین ویژگی خاص سرطان، از جمله الف) عروق تومور نشتی و ناکارآمد زهکشی لنفاوی (اثر) (EPR) گیرنده های پروتئینی بیش از حد در سطح از سلول های سرطانی، ج) رگ های خونی نامنظم، و د) سلول های ایمنی در داخل سرطان (۱۸)



شکل ۴- مشکلات بهداشت باروری (۲۰)



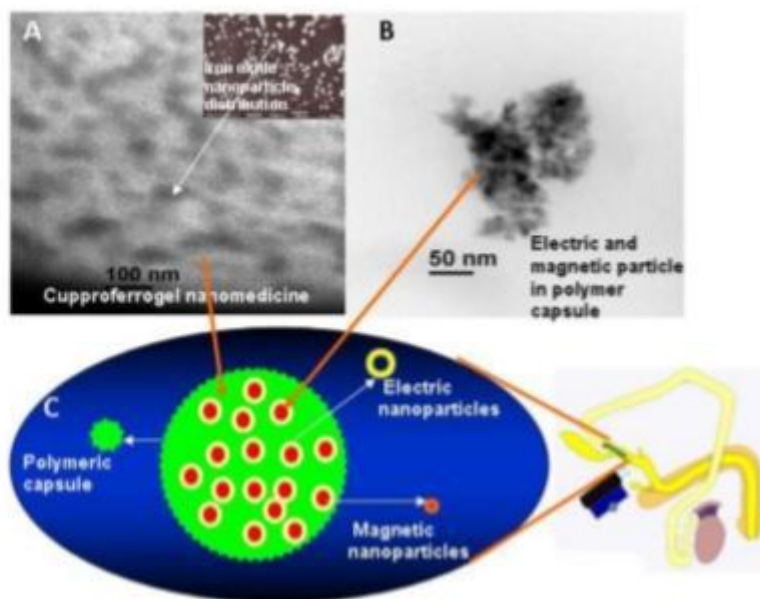
## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

این شکل به طور مشابه، نانوتکنولوژی می تواند به حل مشکلات کمک کند مانند رابطه جنسی (۱۹) و بیماری های منتقله STD و مقاربتی عفونت ها در STIs برای مراقبت های بهداشتی باروری، پیشگیری از بارداری، درمان ناباروری، و غیره. بسیاری از افراد باید تحت مداخلات جراحی مانند لوله قرار گیرند. اومی، وازکتومی یا لاپاراسکوپی در مراحل مختلف زندگی. برای اینکه در آینده از درد خود بکاهیم، فرد قادر خواهد بود بهبود سریعتر زخم ها با کمک فناوری نانو سیستم های تحویل ناشناخته ای که به صورت ممنوعه کاشته می شوند مصرف می کند و حاوی داروهایی مانند آومینوسیلیکات خواهد بود ارتقاء قابلیت های بازسازی سریع و این اجازه خواهد داد زخم ها سریع تر بهبود می یابند (۲۰).

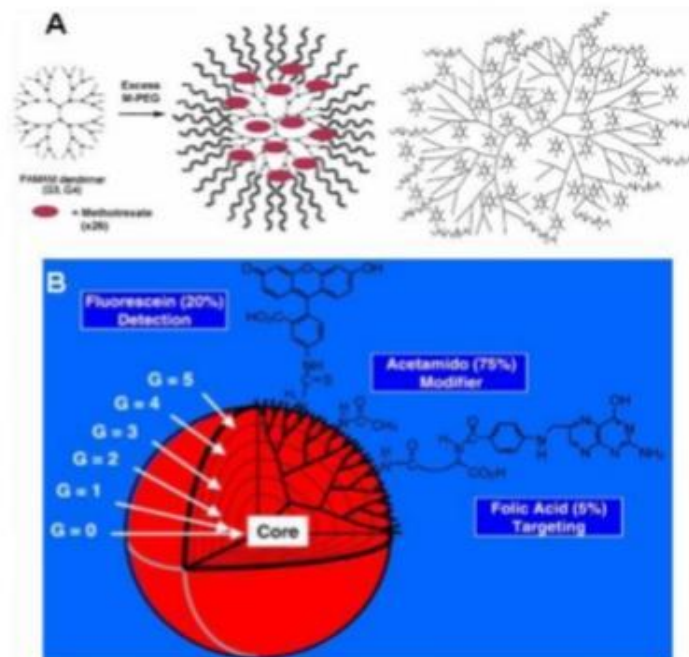
### Regen

فرسایش فرآیند بازگرداندن فرد به زندگی است. امروزه مشکلات مختلفی برای انجام این کار وجود دارد اما نانوتکنولوژی ممکن است قادر به رفع بیشتر این مشکل شود. یکی از بزرگترین مشکلات به دلیل کریستال بودن است. لیزاسیون بودن سلول های منجمد، اما فناوری نانو ممکن است بتواند آن سلول ها را گرم کند و حتی برخی از آنها را بازسازی کند تا زمانی که فرد از نظر بیولوژیکی از هم می پاشد احیا شود. فناوری نانو ممکن است بتواند آسیب سلولی به محض مرگ به سادگی درمان کند. همانطور که قبلاً گفته شد، بیشتر فناوری نانو بر اساس انتظارات مراقبت های بهداشتی آینده است نانوتکنولوژی مولکولی (MNT)، یک فناوری است بر اساس توانایی ساخت سازه های پیچیده، مشخصات اتمی با استفاده از مکانوسنتز است. (۲۱)



شکل ۵- دستگاه نانتیک در فناوری نانو (۲۲)

این شکل فناوری نانو قادر خواهد بود برای اینکه همه ی مراحل خیلی سریعتر پیش برود، و مراحل کاری سریع باشد و همچنین به دلیل کوچک بودن، از نظر تئوری می توان هزاران نانومکانیکی را بارگذاری کرد درون دستگاهی به نام نانیت یا نانوروبات با هزاران واکسن های مختلف و تزریق آنها به بدن میزبانی کنید و ببینید آیا هر کدام از آنها کار می کند یا خیر (۲۲)



شکل ۶- نقش نانوربات در لاپاروسکپی (۲۳)

این شکل نانوربات ها می توانند نقش مهمی در لاپاراسکوپي داشته باشند جراحی اندام تناسلی و اصلاح ناهنجاری ها را کمک بخشند نانوربات های جراحی می توانند وارد بدن شوند از طریق سیستم عروقی یا در انتهای کاتترها به عروق مختلف و دیگر حفره های بدن انسان وارد می شود. یک نانوربات برنامه ریزی شده توسط یک جراح می تواند نقش یک جراح نیمه مستقل را ایفا کند . این دستگاه می تواند عملکردهای مختلفی مانند جستجو را انجام دهد برای آسیب شناسی در اندام های تناسلی و سایر اندام ها، و سپس تشخیص و اصلاح ضایعات یا کیست ها با دستکاری نانو، که توسط یک کامپیوتر هماهنگ شده است انجام فناوری نانو نیز ممکن است بتواند کمک کند و حتی عمل بازسازی سلول ها/بافت ها را کامل می کند (۲۳ و ۲۴).

### نتیجه گیری

نانوتکنولوژی در زیست شناسی (ژنتیک مولکولی و سلولی) و بیوتکنولوژی با عنوان نانوبیوتکنولوژی به ما اجازه میدهد تا اجزاء و ترکیبات را داخل سلولها قرار داده و مواد جدیدی را با استفاده از روشهای خود ترمیمگر بسازیم. ایجاد ساختارهایی بر مبنای DNA در علوم پزشکی، داروسازی، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، یک تحول و انقلاب جدید در این علوم خواهد بود. قطعا تحقیقات گسترده و سرمایه گذاری برای ساخت داروهایی به منظور رهاسازی دارو در بدن، ساخت قطعات سازگار برای جایگزینی اعضای بدن و حسگرهای محیطی به منظور آزمایشهای کامل طراحی شده روی یک تراشه بسیار کوچک مفید میباشد. تشخیص همزمان چندین بیماری از روی یک قطره خون بر اساس سیستمهای لیزری در محدوده فرکانسی مادون قرمز، مرئی و حتی ماوراء بنفش، تشخیص از روی DNA (و ساخت ابزارهای نانومتری بر پایه ی DNA نشان دهندهی رویکرد جدید محققین علوم پزشکی و زیستی به نانوتکنولوژی است. نانوتکنولوژی از این جهت که در حال حاضر پیشرفته ترین و جدیدترین فناوری بشری است و تحول عظیمی در علم پزشکی، شیمی، فیزیک و غیره ایجاد میکند، در زمره علوم راهبردی میباشد و اهمیت آن از تکنولوژی هسته‌ای به مراتب بیشتر است. قطعا در مورد انتقال نانوتکنولوژی به کشورمان تحریمهایی اساسی ایجاد خواهد شد. لذا هر گونه اقدامی در راستای توسعه این علم در کشور ضمن آن که باید با احتیاط و دقت فراوان صورت گیرد، نیاز به سرعت عمل نیز دارد تا بتوان از فرصت موجود، حداکثر بهره را برد

با توجه به گسترده‌ی علوم در زمینه‌ی نانو تکنولوژی و کاربردهای آن، پیشنهاد میشود، مرکز تحقیقات نانو با هدف اطلاع رسانی، برگزاری کنفرانسهای علمی، همکاری آموزشی- پژوهشی فرارشته ای، تشویق محققین جهت انتشار مقالات داخلی و بین المللی، ارتباط با انجمن نانو فناوری ایران، شناسایی پتانسیل علمی و میزان آمادگی متخصصان امر برای حضور در این عرصه، راه اندازی آزمایشگاه ها و گروههای تحقیقاتی در دانشگاههای علوم پزشکی و حمایت مالی از پروژههای تحقیقاتی تشکیل گردد.

### References:

1. Gianfaldoni S, Lotti J, Roccia MG, Fioranelli M, Gianfaldoni R, Lotti T. Stigmata in the history: between faith, mysticism and science. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017 APR-JUN;31(2 Suppl. 2):45-52
2. Morrow SM, Bissette AJ, Fletcher SP. Transmission of chirality through space and across length scales. *Nat Nanotechnol*. 2017 May 5;12(5):410-419.
3. Contera S, Bernardino de la Serna J, Tetley TD. Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerg Top Life Sci*. 2020 Dec 17;4(6):551-554.
4. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*. 2019 Dec 27;25(1):112.
5. Ratner BD. Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future. *Annu Rev Biomed Eng*. 2019 Jun 4;21:171-191
6. Nath, D., Banerjee, P., Green nanotechnology – a new hope for medical biol-Ogy. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 2014; 36(3) : 997-1014.
7. Thimiri Govinda Raj DB, Khan NA. Designer nanoparticle: nanobiotechnology tool for cell biology. *Nano Converg*. 2016;3(1):22.
8. Parsian, M., Unsoy, G., Mutlu, P., Yalcin, S., Tezcaner, A., Gunduz, U., Loading Of Gemcitabine on chitosan magnetic nanoparticles increases the anti-cancer Efficacy of the drug. *Eur. J. Pharmacol*. 2016;784:121-128
9. Cinelli, M., Coles, S.R., Nadagouda, M.N., Błaszczyszki, J., Słowiński, R., Varma, R.S., et al., A green chemistry-based classification model for the syn-thesis of silver nanoparticles. *Green Chem*. 2015;17(5):2825-2839
10. Mikkola, S.K., Robciuc, A., Lokajová, J., Holding, A.J., Lämmerhofer, M., Kilpeläinen, I., et al., Impact of amphiphilic biomass-dissolving ionic liquids On biological cells and liposomes. *Environ. Sci. Technol*. 2015;49(3):1871-878
11. Gasser, C.A., Ammann, E.M., Schäffer, A., Shahgaldian, P., Corvini, P.F., Production of superparamagnetic nanobiocatalysts for green chemistry ap-Plications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016;100(16):7281-7296
12. Chinnappan, A., Baskar, C., Kim, H., Ramakrishna, S., Carbon nanotube hy-Brid nanostructures: future generation conducting materials. *J. Mater. Chem. A*, 2016;4(24):9347-9361
13. Sygula, A., Polynuclear aromatic hydrocarbons with curved surfaces: Buckyballs. *Mississippi State Univ., Mississippi State, MS, April 2001 Tetrahedron* ;57(17):3637-3644
14. Passos, F.I.L., da Silva Filho, J.G., Saraiva-Souza, A., Souza Filho, A.G., Meunier, V., Girão, E.C., One- and two-dimensional carbon nanostructures Based on unfolded buckyballs: An ab initio investigation of their electronic Properties. *Phys. Rev. B*, 2017;95(19):195-124.
15. Duan, H., Wang, D., Li, Y., Green chemistry for nanoparticle synthesis. *Chem. Soc. Rev*. 2015;44(16): 5778-5792

16. Pal, T., Mohiyuddin, S., Packirisamy, G., Facile and green synthesis of multi-Color fluorescence carbon dots from curcumin. Vitro and in vivo bioimaging And other application. 31 ACS Omega. Pp. 2018;831-843
17. Mathew, M.S., Joseph, K., Green synthesis of gluten-stabilized fluorescent Gold quantum clusters: Application as turn-on sensing of human blood creati- Nine. ACS Sustainable Chem. Eng. 2017; 5(6):4837-4845
18. Karlsson, J., Vaughan, H.J., Green, J.J., Biodegradable polymeric nanoparticles for Therapeutic cancer treatments. Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 2018; 9(1): 105-127
19. Betty YSK, Rutka JT, Chan WCW. Current concepts. Nano-Medicine. N Eng J Med. 2010; 363: 2434-43.
20. Chu Y, Yu D, Wang P, Xu J, Li D, Ding M. Nanotechnology Promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of Recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. Wound Rep Reg. 2010; 18: 499-505
21. Hersam MC, Guisinger NP, Lyding JW. Silicon-based mole-Cular nanotechnology. Nanotechnology 2000; 70-76.
22. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 2007; 3: 95-101
23. Cavalcanti A, Shirinzadeh B, Murphy D, Smith JA. Nano-Robots for laparoscopic cancer surgery. 6<sup>th</sup> IEEE/ACIS Inter-National Conference on Computer and Information Science; Melbourne, Australia. 2007; 11-13
24. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. Nano Today. 2009; 4: 66-80.

## جهش در ژن ATM در ارتباط با خطر ابتلا به سرطان معده

فروغ عیدی خوش<sup>۱\*</sup>، عباس مریدنیا<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

### چکیده

سرطان در نتیجه ی اختلالات ژنتیکی و اثرات محیطی به وجود می آید. سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان و دومین علت مرگ را در بین تمام سرطان ها به خود اختصاص می دهد. ژن سرکوبگر تومور (ATM) *Ataxia telangiectasia mutated* در کنترل چرخه ی سلولی و تشخیص آسیب به DNA، در سیستم ترمیمی DNA و القای آپوپتوز نقش دارد. طبق مطالعات صورت گرفته، نقص و حذف عملکرد در این ژن با خطر ابتلا به سرطان های زیادی از قبیل سرطان سینه، روده، ریه و همچنین معده مرتبط می باشد. ارتباط این ژن با ایجاد سرطان می تواند به دنبال جهش در آگزون و یا اینترون، وجود پلی مورفیسم و یا متیلاسیون پروموتور ژن ATM همراه باشد. بیان ژن ATM در سلول های معده ی آلوده به هلیکوباکتر پیلوری ارتباط مستقیم و معناداری دارد. از طرفی می توان با استفاده از مهار کننده های ژن ATM حساسیت سلول های سرطانی معده را به پرتو درمانی افزایش داد و با توسعه ی بیشتر مهار کننده های ATM می توان به تأثیر بیشتر پرتودرمانی بر روی بیماران سرطانی امیدوار بود. با توجه به اینکه بیش از ۵۰٪ سرطان هایی که در مراحل اولیه تشخیص داده می شوند از جمله سرطان معده، قابل درمان هستند، بنابراین شناسایی ژن های دخیل در ایجاد سرطان معده و مطالعه ی بیشتر بر روی چنین ژن هایی و معرفی نشانگر های زیستی آن ها می تواند نقش مؤثری در پیشگیری، تشخیص زود هنگام و حتی معالجه ی سریع بیماری داشته باشد. مطالعه ی حاضر با توجه به اطلاعات بسیار اندک در زمینه ی ارتباط ژن ATM با خطر ابتلا به سرطان معده در جمعیت ایران، به بررسی و مرور یافته ها در خصوص ژن ATM و ارتباط آن با ابتلا به سرطان معده خواهد پرداخت.

واژگان کلیدی: ژن ATM، ژن سرکوبگر تومور، سرطان معده

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۳۶۳۵۵۶۷۵۴

پست الکترونیک: [forugh.eidikhosh@gmail.com](mailto:forugh.eidikhosh@gmail.com)

## Mutations in the ATM gene in relation to the risk of stomach cancer

Forough Eidikhosh<sup>1\*</sup>, Abbas Moridnia<sup>2</sup>

1. PhD Student, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran

### Abstract

Cancer occurs as a result of genetic disorders and environmental effects. Gastric cancer (GC) is the fourth most common cancer in the world and the second leading cause of death among all cancers. The tumor suppressor gene Ataxia telangiectasia mutated (ATM) plays a role in cell cycle control and detects DNA damage, in the DNA repair system and induces apoptosis. According to studies, defects and deletions of function in this gene are associated with the risk of contracting many cancers, such as breast, colon, lung, and GC. The association of this gene with cancer can be associated with mutations in the exon or intron, polymorphism or methylation of the ATM gene promoter. The expression of ATM gene in gastric cells infected with *Helicobacter pylori* has a direct and significant relationship. On the other hand, by using ATM gene inhibitors, the sensitivity of gastric cancer cells to radiation therapy can be increased, and with the further development of ATM inhibitors, we can hope for a greater effect of radiation therapy on cancer patients. Considering that more than 50% of cancers that are diagnosed in the early stages, including GC, can be treated, therefore identifying the genes involved in causing stomach cancer and further studying such genes and introducing its biomarkers can play an effective role in prevention, early diagnosis and even rapid treatment of the disease. Considering the very little information about the relationship between the ATM gene and the risk of gastric cancer in the Iranian population, the present study will examine and review the findings the ATM gene and its relationship with gastric cancer.

**Keywords:** ATM gene, Tumor suppressor gene, Gastric cancer

### مقدمه

سرطان، رشد غیر قابل کنترل سلول ها می باشد که در نتیجه ی اختلالات ژنتیکی و اثرات عوامل محیطی به وجود می آید. سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان با ۹۵۲۰۰۰ مورد جدید و ۷۲۳۰۰۰ مرگ در سال ۲۰۱۲ و دومین علت مرگ در بین همه ی سرطان ها می باشد. سرطان معده یازدهمین علت از همه ی مرگ ها و ۱/۸ درصد مرگ را تا سال ۲۰۳۰ به خود اختصاص می دهد (۱). در این مطالعه ما به بخشی از انواع جهش در ژن ATM و ارتباط آن با سرطان معده خواهیم پرداخت. ژن ATM در موقعیت کروموزومی 11q22-23 قرار دارد و شامل حدود ۱۵۰ کیلو باز از DNA ژنومی بوده که دارای ۶۶ اگزون می باشد. این ژن یک پروتئین ۳۵۰ کیلو دالتونی را کد می کند. این پروتئین از طریق فسفاتیدیل ۳-کیناز (PI3-kinase) نزدیک به C-Terminal خود با خانواده ای از پروتئین های درگیر در کنترل چرخه سلولی و تشخیص آسیب به DNA مرتبط است. ژن ATM مسئول سندرم A-T که یک اختلال ارثی نادر است و با نقص ایمنی، حساسیت به تشعشع و افزایش استعداد ابتلا به بدخیمی های مختلف همراه می باشد (۲). مطالعه ی گو و همکاران<sup>۱۳۵</sup> فعال شدن ژن ATM به دنبال شکست های دو رشته ای DNA ناشی از تابش پرتو ها همراه با پروتئین های مرتبط با ترمیم DNA از جمله P53، در چندین نقطه بازرسی<sup>۱۳۶</sup> در چرخه ی سلولی نشان داد (۳). همچنین شواهد بیشتری نشان می دهد که ATM نقش اصلی در سیگنال های آسیب به DNA، فعال کردن نقاط بازرسی چرخه ی سلولی و القای آپوپتوز را دارد. در واقع ATM جزء اصلی از سیستم ترمیمی DNA در مسیر های پاسخ به

<sup>135</sup> Guo et al.

<sup>136</sup> check point

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

آسیب های DNA<sup>137</sup> (DDR) می باشد (۴). با توجه به نقش مهم ATM در کنترل پایداری ژنوم، نقص در عملکرد ATM می تواند سلول را به سمت سرطانی شدن سوق دهد. شیلو و همکاران<sup>138</sup> شواهدی ارائه کرده اند که نشان می دهد برخی از سرطان ها با انواع جهش در ژن ATM، از جمله سرطان سینه، لوسمی، لنفوم و معده مرتبط است (۵).

جهش های متفاوتی در ژن ATM باعث از دست رفتن عملکرد این ژن در سرطان معده می شود. یکی از مکانیسم های اصلی غیر فعال شدن ژن ATM در سرطان معده، جهش اینترونی توسط ناپایداری ریزماهواره ای<sup>139</sup> (MSI) می باشد. سونگ کیم و همکاران<sup>140</sup> به بررسی جهش های اینترونی ژن ATM توسط MSI پرداختند. در مطالعه ای آنها، جهش های اینترونی ژن ATM برای ۸۳۹ بیمار مورد بررسی قرار گرفت. مثبت بودن MSI و از دست رفتن پروتئین ژن ATM در ۶۸/۴٪ بیماران مشاهده گردید (۶).

پلی مورفیسم هایی نیز از ژن ATM گزارش شده است که با خطر ابتلا به نوعی از سرطان از جمله سرطان معده مرتبط می باشد. پلی مورفیسم rs189037 G>A ژن ATM معرفی شده است که با خطر ابتلا به انواعی از سرطان مرتبط می باشد. طبق مطالعه ای تائو و همکاران<sup>141</sup> این پلی مورفیسم با (P=۰/۰۴) با خطر ابتلا به سرطان معده در جامعه چین مرتبط می باشد (۷).

طبق مطالعات هلگاسون و همکاران<sup>142</sup> در اروپا که بر روی ۲۵۰۰ بیمار مبتلا به سرطان معده انجام گرفت، انواعی از جهش هایی که سبب از دست رفتن عملکرد ژن ATM مانند: P.Gln852، P.Ser644 و P.Tyr103 در بیماران مبتلا به سرطان معده معرفی شد. همچنین بر طبق این پژوهش سرطان در افرادی که فقدان عملکرد ژن ATM را دارند، در سنین پایین و زودتر از افراد فاقد جهش بروز می کند (۸). همچنین شن و همکاران<sup>143</sup> ارتباط بین ۲ پلی مورفیسم از ژن ATM را با سرطان ریه و پستان تأیید کردند. طبق نتایج حاصل از این مطالعه، افراد هتروزیگوت برای پلی مورفیسم rs664143 با خطر ابتلا به سرطان ریه و پستان مواجه هستند و پلی مورفیسم rs664677 با کاهش خطر ابتلا به سرطان ریه و افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان همراه بود (۹).

ارتباط پلی مورفیسم 1853N ژن ATM در دو گروه از جمعیت سوئیس با سرطان کولورکتال بررسی شد. میل و همکاران<sup>144</sup> وجود ارتباط بین پلی مورفیسم نام برده و افزایش ابتلا به سرطان کولورکتال در افراد مستعد به سندرم ارثی سرطان کولورکتال غیر پولیپوز<sup>145</sup> (HNPCC) را گزارش کردند. همچنین وجود پلی مورفیسم 1853N ژن ATM در افراد مستعد HNPCC نفوذ جهش ژن های MSH2، MLH1 را افزایش می دهد (۱۰). با توجه به نقش ژن ATM در بسیاری از سرطان های دیگر، بررسی پلی مورفیسم های دیگری از این ژن که در سرطان هایی دیگر دخیل هستند در سرطان معده نیز توصیه می گردد.

### مهارکننده های ATM به عنوان عوامل ضد سرطانی

در مطالعه ای می هیوا و همکاران<sup>146</sup> به ارزیابی اثرات ضد توموری مهارکننده های ATM از قبیل KU-55033، CP-466722، AZD0156، AZ32، AZD1390 و AZ31، KU-60019، KU-59403 پرداخته شد و مشخص گردید که مهار ATM

<sup>137</sup> DNA damage response

<sup>138</sup> Shiloh et al.

<sup>139</sup> Microsatellite instability

<sup>140</sup> Sung kim et al.

<sup>141</sup> Tao et al.

<sup>142</sup> Helgason et al.

<sup>143</sup> Shen et al.

<sup>144</sup> Mailet et al.

<sup>145</sup> non-polyposis colorectal cancer

<sup>146</sup> Mei Hua et al.

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

حساسیت سلول سرطانی را به پرتودرمانی افزایش می دهد (۱۱). مشاهدات بالینی کنت و همکاران<sup>۱۴۷</sup> بر روی ۳۵۷ بیمار مبتلا به سرطان معده مشخص کرد که غیرفعالسازی ژن ATM در ۲۷.۵٪ افراد مبتلا، با کنترل قابل توجه رشد تومور به دنبال پرتو درمانی همراه است (۱۲). روی هم رفته، با توجه به اینکه ATM جزء اصلی از سیستم ترمیمی DNA در مسیر DDR می باشد، تمرکز بر مهار کننده های ATM می تواند یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان سرطان از جمله سرطان معده باشد. از این رو توسعهی بیشتر مهار کننده های ATM در تحقیقات سرطانی ضروری می باشد.

### اثر هلیکوباکتر پیلوری (*H.pilori*) بر افزایش بیان ATM

در مطالعهی جولیانو و همکاران<sup>۱۴۸</sup> به بررسی چگونگی اثر عفونت معده با هلیکو باکترپیلوری و افزایش بیان ژن ATM پرداخته شد. نتایج حاصل از آنالیز های این مطالعه نشان داد افزایش بیان ATM با عفونت با *H.pilori* از طریق هایپراستیلایسون هیستون H3 و H4 ژن ATM همراه است (۱۳). طبق این یافته می توان مطالعهای در زمینهی حذف عملکرد ژن ATM و ارتباط آن با ایجاد سرطان معده در سلول های آلوده به هلیکوباکتر پیلوری انجام داد. چنان به نظر می رسد که در صورت آلودگی با هلیکوباکتر و نقص در ژن ATM، سلول های معده مستعد سرطانی شدن خواهند بود.

### هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن ATM به عنوان یک نشانگر زیستی در سرطان

بیگام و همکاران<sup>۱۴۹</sup> به ارزیابی متیلاسیون پروموتور و بیان ژن ATM در سرطان سینه پرداختند. طبق یافتههای آنها از ۵۰ بیمار، ۵۸٪ از نمونه های بافت سرطانی هایپرمتیلاسیون پروموتور را برای ژن ATM نشان دادند. علاوه بر این متیلاسیون پروموتور ژن ATM با سن افراد ( $P=0/01$ )، اندازه ی تومور ( $P=0/045$ ) و مرحله ی پیشرفت بیماری ( $P=0/01$ ) ارتباط مثبت داشت. همچنین ارتباط بین هایپرمتیلاسیون پروموتور و بیان کمتر mRNA ژن ATM مشاهده شد ( $P=0/035$ ). طبق یافته های به دست آمده، آنها برای اولین بار هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن ATM را به عنوان یک نشانگر زیستی جدید برای سرطان سینه معرفی کردند (۱۴). با توجه به این مطالعه و همچنین دخیل بودن ژن ATM در سرطان معده، پیشنهاد می شود هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن ATM در روند سرطان معده نیز مطالعه شود.

### نتیجه گیری

پژوهش های انجام یافته در نقاط مختلف جهان نشان داده است که جهش در ژن ATM و غیر فعال شدن آن بر روی ابتلا به سرطان های سینه، روده، ریه و معده مؤثر می باشد. مطالعات بر روی جمعیت ایرانی در این زمینه بسیار اندک بوده است. با مطالعات بیشتر بر روی این ژن و اثرات آن بر روی سرطان معده شاید بتوان این ژن و یا برخی از پلی مورفیسم های زیان بار این ژن را به عنوان نشانگر زیستی برای خطر ابتلا به سرطان معده معرفی کرد و با توجه به اینکه بیش از ۵۰٪ از سرطان ها از جمله سرطان معده در مراحل اولیه قابل درمان هستند، بنابراین شناسایی نشانگرهای زیستی سرطان معده می تواند نقش مؤثری در پیشگیری، تشخیص زود هنگام و معالجه ی سریع بیمار داشته باشد.

<sup>147</sup> Keneth et al.

<sup>148</sup> Juliana et al.

<sup>149</sup> Begam et al.



## References:

1. Moridnia, A. Comparison of CDH1 gene mutation in patients with hereditary diffuse gastric cancer with sporadic diffuse gastric cancer. *Journal of Isfahan Medical School*. 2017; 35(432): 622-628.
2. MJ C. ATM-dependent phosphorylation of human Rad9 is required for ionizing radiation-induced checkpoint activation. *J Biol Chem*. 2001; 276: 16850-6.
3. Guo CY, Wang Y, Brautigan DL, Larner JM. Histone H1 dephosphorylation is mediated through a radiation-induced signal transduction pathway dependent on ATM. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(26):18715-20.
4. Gatti RA, Tward A, Concannon P. Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Molecular genetics and metabolism*. 1999; 68(4): 419-23.
5. Shiloh Y, Kastan MB. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. 2001; 209-254.
6. Kim HS, Choi SI, Min HL, Kim MA, Kim WH. Mutation at intronic repeats of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene and ATM protein loss in primary gastric cancer with microsatellite instability. *PLoS One*. 2013; 8(12): e82769.
7. Tao Y, Mei Y, Ying R, Chen S, Wei Z. The ATM rs189037 G> A polymorphism is associated with the risk and prognosis of gastric cancer in Chinese individuals: a case-control study. *Gene*. 2020; 741: 144578.
8. Helgason H, Rafnar T, Olafsdottir HS, Jonasson JG, Sigurdsson A, Stacey SN, Jonasdottir A, Tryggvadottir L, Alexiusdottir K, Haraldsson A, Le Roux L. Loss-of-function variants in ATM confer risk of gastric cancer. *Nature genetics*. 2015; 47(8): 906-10.
9. Shen L, Yin ZH, Wan Y, Zhang Y, Li K, Zhou BS. Association between ATM polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2012; 39: 5719-25.
10. Maillet P, Chappuis PO, Vaudan G, Dobbie Z, Müller H, Hutter P, Sappino AP. A polymorphism in the ATM gene modulates the penetrance of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2000; 88(6): 928-31.
11. Jin MH, Oh DY. ATM in DNA repair in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2019; 203: 107391.
12. Pitter KL, Casey DL, Lu YC, Hannum M, Zhang Z, Song X, Pecorari I, McMillan B, Ma J, Samstein RM, Pei IX. Pathogenic ATM mutations in cancer and a genetic basis for radiotherapeutic efficacy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2021; 113(3): 266-73.
13. Santos JC, Gambeloni RZ, Roque AT, Oeck S, Ribeiro ML. Epigenetic mechanisms of ATM activation after helicobacter pylori infection. *The American journal of pathology*. 2018; 188(2): 329-35.
14. Begam N, Jamil K, Raju SG. Promoter hypermethylation of the ATM gene as a novel biomarker for breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017; 18(11): 3003.

## مکمل‌های پروبیوتیک: نگاهی به فواید درمانی و سلامتی گوارش در بدن انسان

زهرا رحیمی<sup>۱</sup>، مریم پیمانی<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. دانشیار ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

پروبیوتیک، باکتری‌ها و مخمرهای مفید زنده، به بهبود گوارش و هضم غذا در معده کمک کرده و به عنوان "باکتری خوب" شناخته می‌شوند. این موجودات مفید از باکتری‌های زنده یا مخمرهایی تشکیل شده‌اند که به طور طبیعی در بدن انسان زندگی می‌کنند. در بدن انسان همزیستی باکتری‌های خوب و بد اتفاق می‌افتد. هنگامی که بدن با عفونت روبرو می‌شود، باکتری‌های بد بیشتری سیستم بدن را از تعادل خارج می‌کنند. در این مواقع، باکتری‌های خوب به از بین بردن باکتری‌های بد اضافی کمک کرده و تعادل را به روده‌ها باز می‌گردانند. مکمل‌های پروبیوتیک راهی هستند تا باکتری‌های خوب را به بدن انسان اضافه کنند. پروبیوتیک‌ها به عنوان کاندید زیست فعال شناخته شده‌اند که در درمان بسیاری از بیماری‌ها و شرایط ناخوشایند مؤثر هستند. شواهد علمی نشان می‌دهد که مکمل‌های پروبیوتیک می‌توانند از بیماران و عوارض جانبی مرتبط با درمان حفاظت کنند. بررسی مطالعات نشان می‌دهد که اثر مفید این مکمل‌ها به عوامل مختلفی مانند فشار، دوز، مدت مداخله، فیزیولوژی میزبان و سایر مکمل‌های غذایی بستگی دارد. مداخله پروبیوتیک به بهبود میکروبیوتا کمک می‌کند، مواد ضد میکروبی و ضد سرطانی را آزاد می‌سازد، به حذف مواد سرطان‌زا کمک می‌کند و نفوذپذیری روده، عملکرد اتصال محکم و فعالیت آنزیم را در بیماران بهبود می‌بخشد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، میکروبیوم، سلامت انسان

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۱۰

پست الکترونیک: peymani.iaushk@gmail.com

## Probiotic Supplements: An Insight into Therapeutic Benefits and Gastrointestinal Health in the Human Body

Zahra Rahimi<sup>1</sup>, Maryam Peymani<sup>2\*</sup>

1. Master's student in genetics, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.  
Associate professor of genetics, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

Probiotics are live bacteria and beneficial yeasts that assist in digestion and food absorption in the stomach, commonly known as 'good bacteria.' Probiotics are derived from naturally occurring live bacteria and yeasts in the human body. The human body harbors both good and bad bacteria. When faced with an infection, the body tends to disrupt the balance with an overabundance of bad bacteria. Good bacteria aid in eliminating excess bad bacteria, restoring balance to the intestines. Probiotic supplements serve as a means to introduce good bacteria into the human body. Probiotics have emerged as a recognized bioactive candidate for treating various diseases and unfavorable conditions. Recent scientific evidence suggests that probiotic supplements protect patients from the associated side effects of treatment. Analysis of studies reveals that the beneficial effects of probiotic supplements depend on multiple factors, including strain, dosage, intervention duration, host physiology, and other dietary supplements. Probiotic intervention improves the microbiota, releases antimicrobial and anticancer agents, assists in eliminating carcinogens, and enhances intestinal permeability, tight junction function, and enzyme activity in patients.

**Keywords:** Probiotics, microbiome, human health

### مقدمه

بررسی‌های اخیر نشان داده است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند به طور قابل توجهی میزان بروز اسهال و متوسط دفعات مدفوع روزانه را کاهش دهند. با این حال، بیشتر این شواهد باید از نظر بالینی متقاعد کننده تر باشند و بیشتر مورد بحث قرار گیرند. بدون شک، برخی از پروبیوتیک‌ها، زمانی که به درستی دوز و تجویز شوند، می‌توانند یک اثر متعادل کننده قوی بر روی میکروبیوتای روده و در نتیجه یک اثر مثبت احتمالی بر تعدیل سیستم ایمنی دستگاه گوارش و التهاب مخاط روده داشته باشند. بسیاری از یافته‌های اخیر در واقع از این فرضیه حمایت می‌کنند که استفاده روزانه از برخی از پروبیوتیک‌های منتخب می‌تواند یک رویکرد عملی برای محافظت مؤثر از بیماران در برابر خطر برخی عواقب شدید ناشی از پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی باشد (۱).

شواهد علمی اخیر نشان می‌دهد که مکمل‌های پروبیوتیک از بیماران مبتلا به سرطان در برابر عوارض جانبی مرتبط با درمان محافظت می‌کند. بررسی مطالعات نشان داد که تأثیر مفید مکمل پروبیوتیک به عوامل متعددی مانند فشار، دوز، مدت مداخله، فیزیولوژی میزبان و سایر مکمل‌های غذایی بستگی دارد. مداخله پروبیوتیک میکروبیوتا را بهبود می‌بخشد، مواد ضد میکروبی و ضد سرطان‌زا آزاد می‌کند، به حذف مواد سرطان‌زا کمک می‌کند و نفوذپذیری روده، عملکرد اتصال محکم و فعالیت آنزیم را در بیماران سرطانی بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، همه سویه‌های پروبیوتیک فعالیت ضد سرطانی را نشان نمی‌دهند. غربالگری سویه قوی برای ایجاد یک عامل درمانی مبتنی بر پروبیوتیک برای کنترل یا جلوگیری از بروز سرطان ضروری است (۲).

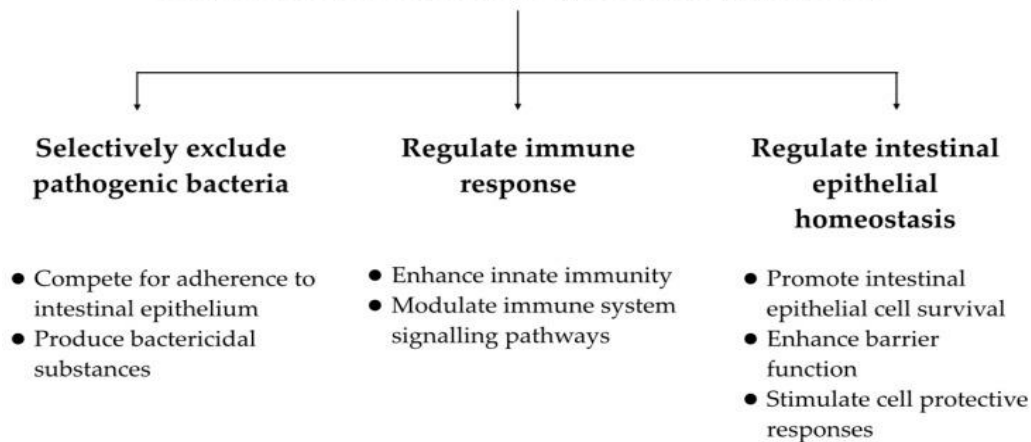
### بیان مسئله

تحقیقات روزافزون نشان می‌دهد که میکروبیوتا می‌تواند تأثیر زیادی بر پیشگیری از سرطان روده بزرگ (CC) و روند بهبودی در طول التهاب روده داشته باشد. درک مکانیسم‌هایی که جامعه باکتریایی روده بر بیماری‌های روده تأثیر می‌گذارد، می‌تواند راه را برای رویکردهای پیشگیرانه و درمانی جدید هموار کند. مکانیسم‌های متعددی در سال‌های اخیر کشف شد که مشهودترین آن‌ها تأثیر تولید گونه‌های اکسیژن فعال خاص (ROS) و فعال شدن گیرنده‌های پتیدی خاص در تنظیم هموستاز روده بود. شواهد بسیار اخیر نشان می‌دهد که میکروب‌های روده خاص، مانند گونه‌های لاکتوباسیلوس. می‌تواند به تنظیم مثبت این فرآیندها کمک کند (۳).

ما از تعدادی از مطالعات می‌دانیم که میکروبیوم نقش مهمی در سلامت و عملکرد دستگاه گوارش ایفا می‌کند و دستکاری میکروبیوم - برای مثال با استفاده از پروبیوتیک‌ها - می‌تواند اثرات مفیدی داشته باشد (شکل ۱). میکروارگانیسم‌های کامنسال مکانیسم‌هایی را نشان می‌دهند که به نظر می‌رسد التهاب را کاهش می‌دهد. آن‌ها با تولید مواد باکتری کش و رقابت با پاتوژن‌ها و سموم برای چسبیدن به اپیتلیوم روده با باکتری‌های بیماری‌زا مبارزه می‌کنند. بسیاری از آن‌ها پاسخ‌های ایمنی را با تقویت ایمنی ذاتی و تعدیل مسیرهای سیگنالینگ تنظیم می‌کنند و برخی دیگر با ارتقاء بقای سلول‌های اپیتلیال روده، افزایش عملکرد سد و تحریک پاسخ‌های محافظ سلولی، هموستاز اپیتلیال روده را تنظیم می‌کنند (۴).

از نظر بالینی، تعدادی از مطالعات و متا آنالیزها وجود دارد که مزایای پروبیوتیک‌ها را در طیف وسیعی از بیماری‌های گوارشی از جمله پوچیت، اسهال عفونی و یبوست مزمن نشان می‌دهد. اکثر این مطالعات کوچک با محدودیت‌های روش شناختی بوده‌اند. به دلیل تفاوت در ترکیب مطالعه، دوزهای پروبیوتیک، و فعالیت بیولوژیکی بین آماده‌سازی‌های مختلف پروبیوتیک تجاری، نتایج هر مطالعه مشخصی را نمی‌توان به طور جهانی برای همه مواد پروبیوتیک اعمال کرد. در حال حاضر، هیچ استراتژی پروبیوتیکی نشان دهنده استاندارد مراقبت یا درمان اولیه برای این مسائل GI نیست. با این وجود، با توجه به مزایای بالقوه و خواص ضد التهابی آن‌ها، منطقی است که پروبیوتیک‌ها همچنین ممکن است تأثیر مفیدی در پیشگیری و درمان سرطان به ویژه با توجه به پیشگیری یا کاهش اثرات نامطلوب درمان‌های سنتی سرطان داشته باشند (۵).

### Commensal bacteria in the gut microenvironment

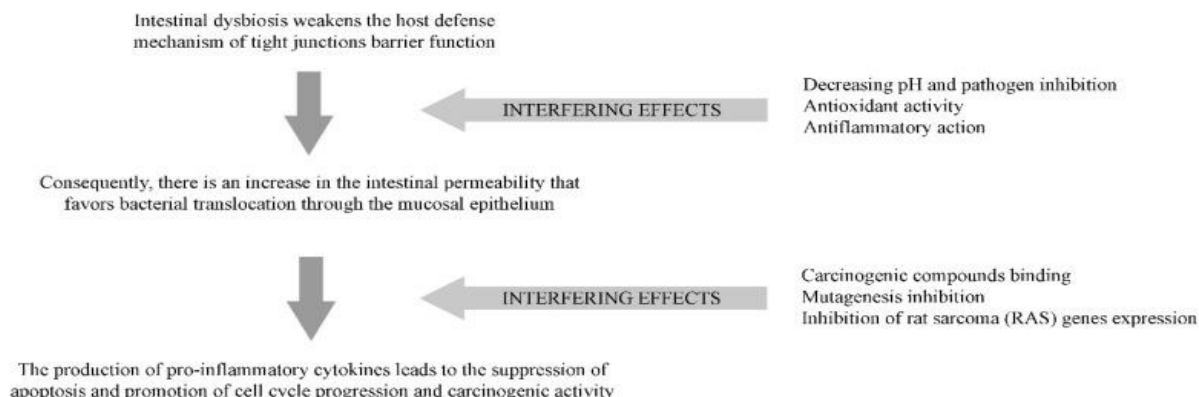


شکل ۱- عملکردهای پیشنهادی باکتری‌های روده؛ که ممکن است در پیشگیری و درمان سرطان مفید باشد (۴)

در واقع، به طور گسترده نشان داده شده است که تغییرات اپی ژنتیکی و مقررات ژنی نیز می‌تواند در طول توسعه سرطان روده بزرگ (CC) رخ دهد. اخیراً همراه با عواملی مانند رژیم غذایی، سبک زندگی، ژنتیک و عفونت انکوژنیک، میکروارگانیسم‌های خاص یا تغییرپذیری میکروبیوم با این تومور مرتبط شده‌اند. چگونگی کمک میکروبیوم روده به پاتوژن CC در میزبان به طور کامل شناخته نشده است. میکروبیوتای روده مرتبط با CC یک تعامل میکروبی پویا و پیچیده را نشان می‌دهد که توسط دانشمندی که می‌خواهند مکانیسم‌های مربوط به توسعه CC را مطالعه کنند، مورد توجه جدی قرار دارد. در طی این فرآیند سرطان را چندعاملی، تغییر تدریجی میکروبیوتا، همراه با ریزمحیط آن‌ها که باعث دیس بیوزیس و افزایش میکروبی‌های سرطان را بالقوه می‌شود، می‌تواند واسطه تعدیل سرطان باشد (شکل ۲). بدون شک تومورزایی کولون به نقش برخی از متابولیت‌های میکروبی به عنوان آغازگر یا بازدارنده فعالیت‌های سرطان‌زا یا ضد انکوژن نیز مرتبط است (۱).

VICIOUS CIRCLE OF DYSBIOSIS

LACTOBACILLI PREVENTIVE ACTIONS



شکل ۲- چرخه معیوب فعالیت دیس بیوزیس لاکتوباسیل های منتخب (۱)

نقش درمانی میکروبیومها

فوزوباکتریوم نوکلئاتوم<sup>۱۵۰</sup> و پورفیروموناس جینجیوالیس<sup>۱۵۱</sup> به عنوان باکتری های سرطان زا شناخته می شوند. فراوانی بیش از حد توالی آن ها در تومورها در مقایسه با بافت کنترل طبیعی منطبق، و ارتباط مثبت آن ها با متاستاز به غدد لنفاوی مشاهده شده است. همه این مطالعات نشان می دهند که برخی از میکروارگانیسم ها می توانند عامل خطر جدیدی برای پیشرفت بیماری از آدنوم به سرطان باشند که احتمالاً بر نتایج بقای بیمار تأثیر می گذارد. با نگاهی به این سناریو، مقابله با پیامدهای منفی ناشی از حضور این میکروارگانیسم ها با استفاده از برخی باکتری های انتخابی با اثرات بازدارنده در برابر پاتوبیون ها می تواند از نظر استراتژیک مرتبط باشد (۶).

امروزه شناسایی یک جمعیت باکتریایی خاص یا تغییر در فراوانی آن ها یا تعداد سویه های منفرد مسئول افزایش حساسیت و توسعه تومور آسان نیست. مطالعات نشان داده است که چندین باکتری، نه تنها فوزوباکتریوم نوکلئاتوم یا پورفیروموناس جینجیوالیس همانطور که قبلاً ذکر شد، بلکه /شریشیاکلی<sup>۱۵۲</sup>، باکترئوئیدس فراژیلیس<sup>۱۵۳</sup> و انتروکوکوس فکالیس<sup>۱۵۴</sup> نیز در بیماران مبتلا به CC افزایش یافته است، در حالی که کلستریدیال، فکالی باکتریوم، بلاوتیا، بیفیدوباکتریوم یا لاکتوباسیلوس، غایب بودند. البته، جمعیت های خاص یا فراوانی آن ها را نمی توان به طور قطعی با تومورزایی مرتبط دانست. به عنوان مثال، کلستریدیا اغلب به عنوان انکومیکروب شناسایی می شوند، اما پیچیدگی میکروبیوتا و رابطه بین میکروارگانیسم ها (شبکه) در روده تا کنون بر نشانه باکتریایی خاصی برای پیشرفت تومور تأکید نکرده است. بدون شک، میکروبیوتای روده می تواند سلامت یا پیشرفت تومور (مثلاً در مورد دیس بیوز) را از طریق اثرات التهابی و تکثیری که احتمالاً به زمینه و عوامل ژنتیکی میزبان نیز بستگی دارد، ارتقا دهد (۱).

یکی از روش های امیدوارکننده برای مطالعه در پیشگیری و درمان سرطان کولورکتال، میکروبیوتای انسانی است. این موضوع به ۱۰ تا ۱۰۰ تریلیون سلول میکروبی همزیست اشاره دارد که توسط هر فرد تا حد زیادی در روده قرار دارد و در آنجا با متابولیسم باقی مانده غذا، ترشحات روده و گوارشی و کلونوسیت های لایه برداری شده درگیر هستند. میکروبیوم انسان نیز به نوبه خود به ژن های موجود در این سلول ها اشاره دارد. میکروبیوتا نقش های بی شماری را در بدن با اثرات مثبت و منفی بر سلامت انسان ایفا می کند

<sup>150</sup> *Fusobacterium nucleatum*

<sup>151</sup> *Porphyromonas gingivalis*

<sup>152</sup> *Escherichia coli*

<sup>153</sup> *Bacteroides fragilis*

<sup>154</sup> *Enterococcus faecalis*

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

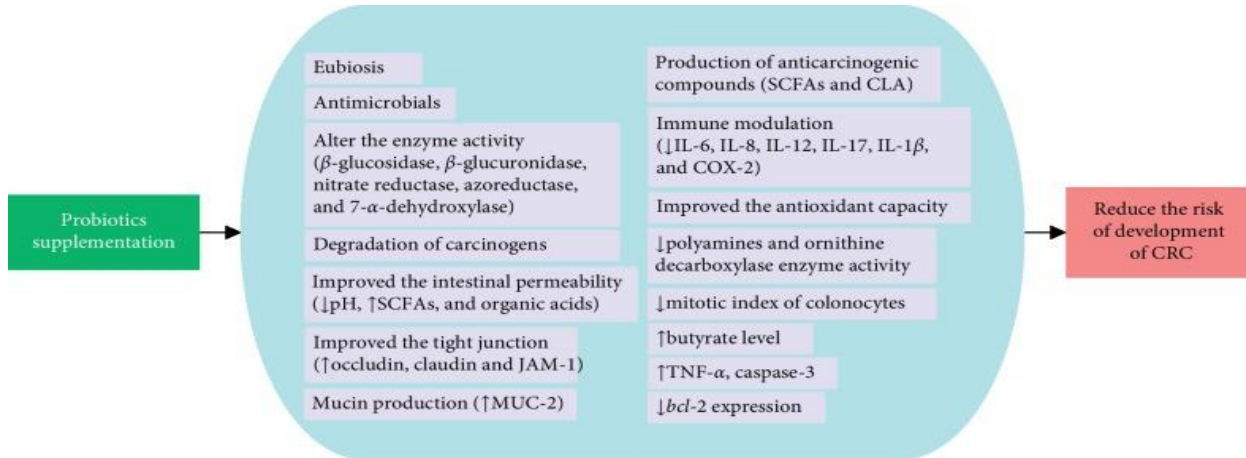
و چندین پروژه بزرگ در حال انجام برای کشف این تعامل پیچیده وجود دارد. پیچیدگی این تحقیق این واقعیت است که میکروبیوم بین افراد بسیار متنوع است. کل ژنوم انسان از حدود ۲۲۰۰۰ ژن تشکیل شده است. این با میکروبیوم روده انسان مقایسه می‌شود که حاوی ۳.۳ میلیون ژن غیر زائد است که بین افراد متفاوت است (۷).

در زمینه این تنوع، بحث بر سر این است که چه چیزی یک میکروبیوم انسانی "سالم" را تشکیل می‌دهد. هنگامی که کل محتوای DNA میکروب‌های ساکن در انسان تجزیه و تحلیل می‌شود، تنها یک سوم از ژن‌های تشکیل دهنده آن‌ها در اکثر افراد سالم یافت می‌شود. تحقیقات اولیه در مورد میکروبیوم انسان بر شناسایی یک مجموعه اصلی از گونه‌های میکروبی متمرکز بود که به طور کلی در افراد سالمی که فاقد فنوتیپ‌های بیماری آشکار بودند، با این فرض که میکروب‌های خاص برای سلامت ضروری هستند، وجود داشت. با این حال، ثابت شد که این یک ساده‌سازی بیش از حد است زیرا تنوع گونه‌های میکروبی بین افراد به این معنی است که مشخص کردن مجموعه ایده‌آلی از میکروب‌های خاص عملی نیست. یک فرضیه جایگزین این است که یک میکروبیوم سالم یک "هسته عملکردی" را نشان می‌دهد - مجموعه‌ای از عملکردهای متابولیکی و دیگر مولکولی که توسط میکروبیوم انجام می‌شود و لزوماً توسط یک ارگانیسم در هر فرد انجام نمی‌شود (۴).

همانطور که تحقیقات در مورد میکروبیوم پیشرفت می‌کند، متوجه می‌شویم که بر سلامتی به گونه‌ای تأثیر می‌گذارد که ما انتظارش را نداریم. برای مثال، اختلال در نسبت‌های نسبی جمعیت‌های میکروبی روده ممکن است بر افزایش وزن و مقاومت به انسولین تأثیر بگذارد که به دیابت نوع دوم کمک می‌کند. این اکتشافات به رابطه پیچیده بین میکرو فلور روده، توسعه سرطان و اثربخشی درمان‌های سرطان گسترش می‌یابد. ترکیب میکروبیوم با توسعه سرطان روده بزرگ در موش و مطالعات انسانی مرتبط است. شواهدی وجود دارد که اثربخشی رژیم‌های شیمی درمانی مختلف و درمان ایمنی به ترکیب میکروبیوم بستگی دارد (۸).

به طور کلاسیک، تعریف پروبیوتیک‌ها «میکروارگانیسم‌های زنده‌ای است که وقتی به مقدار کافی تجویز شوند، برای میزبان فواید سلامتی دارند». جالب اینجاست که باکتری‌های متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم به دلیل اثرات پروبیوتیکی و مفید، پرمصرف‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در صنایع غذایی هستند. فهرست اثرات ارتقاء دهنده سلامتی نسبت داده شده به باکتری‌های پروبیوتیک گسترده است و شامل کاهش علائم عدم تحمل لاکتوز، کاهش کلسترول سرم، اثرات ضد سرطانی، بهبود یبوست/اسهال و تسکین واژینیت می‌باشد. اکثریت قریب به اتفاق مطالعات در مورد اثرات ضد سرطانی با سرطان کولورکتال سروکار دارند، اگرچه سایر مطالعات مربوط به سرطان سینه و مثانه هستند (۱).

علیرغم اینکه چندین مطالعه تلاش کردند مکانیسم خاصیت ضد سرطان پروبیوتیک‌ها را توضیح دهند، مکانیسم روشنی در پشت فعالیت ضد CRC پروبیوتیک‌ها هنوز توضیح داده نشده است. چندین شواهد نشان داد که پروبیوتیک‌ها با اصلاح ترکیب میکروبیوتا و فعالیت‌های متابولیکی آن، تولید ترکیبات ضد سرطان و ضد میکروبی، بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی میزبان، تخریب مواد سرطان‌زا، تغییر بیان ژن‌های مرتبط با التهاب، تقویت سیستم ایمنی، فواید سلامتی و پیشگیری از تکثیر سرطانی و القای آپوپتوز را به همراه دارند (شکل ۴) (۲).



شکل ۳- مکانیسم احتمالی زیربنای خاصیت ضد سرطانی پروبیوتیک ها **CRC**: سرطان کولورکتال، **SCFAs**: اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، **CLA**: اسیدهای لینولئیک مزدوج،  $\uparrow$ : افزایش و  $\downarrow$ : کاهش یافته است (۲).

ثابت شده است که مکمل های پروبیوتیک می توانند به طور مثبت میکروبیوتای روده سیستم میزبان را تغییر دهند و به حفظ یوبیوز کمک کنند. پروبیوتیک ها می توانند مواد ضد میکروبی (مانند باکتریوسین ها) تولید کنند که مانع رشد میکروب های بیماری زا در مجرای روده می شود و در نتیجه از دیس بیوز و توسعه **CRC** جلوگیری می کند. برخی از آنزیم های باکتریایی (تولید شده توسط اعضای کلستریدیوم، باکتریوئیدها، یوباکتریوم) مانند نیترات ردوکتاز، آزوردوکتاز، بتا گلوکزیداز،  $\beta$ -گلوکورونیداز و  $\gamma$ - $\alpha$ -دهیدروکسیلاز با تولید ترکیبات سرطان زا مانند کرزول ها مرتبط هستند. آمونیاک، فنل ها، آگلیکون ها و ترکیبات **N-nitroso** و این ترکیبات مسیره های ضد آپوپتوز را القا می کنند و در نتیجه توسعه **CRC** را تسهیل می کنند. مطالعات ثابت کردند که مکمل پروبیوتیک ها فعالیت آنزیم های باکتریایی را به طور قابل توجهی کاهش می دهد. ترکیبات سرطان زا با پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی میکروب های پروبیوتیک متصل می شوند و از طریق مدفوع دفع می شوند. برخی از سویه های پروبیوتیک می توانند ترکیبات سرطان زا به ویژه آمین ها و ترکیبات **N-nitroso** را متابولیزه کنند و تناوب فعالیت متابولیکی (یعنی کاهش تولید درون زای ترکیبات سرطان زا) میکروبیوتای روده و اتصال و تجزیه مواد سرطان زا از جمله مواردی هستند. مکانیسم هایی که توسط آن مکمل های پروبیوتیکی خطر ایجاد **CRC** را کاهش می دهد (۱).

دستکاری میکروبیوم با استفاده از پروبیوتیک ها برای بهبود ایمنی و نمایه عوارض جانبی **GI** درمان سرطان نیز با چند مطالعه ارزیابی شده است که مزایای بالینی احتمالی پروبیوتیک ها را با جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی ارزیابی می کند. پروبیوتیک ها به عنوان یک مکمل بالقوه برای درمان جذاب هستند، زیرا ارزان هستند و با عوارض جانبی اندک، در صورت وجود، همراه هستند. شواهد موجود همچنین نشان می دهد که پروبیوتیک ها ممکن است تأثیر بالینی قابل توجهی داشته باشند (۴). با این حال، مطالعات آینده نگر برای ارزیابی اثر بالینی پروبیوتیک ها در بیماران سرطانی در حال حاضر تعداد کمی است و شواهد بیشتری برای تعیین موقعیت هایی که در آن پروبیوتیک ها مفید هستند مورد نیاز است.

علاوه بر این، ترکیب میکروبیوم روده به شدت به رژیم غذایی وابسته است. در یک مطالعه روی موش، تغییر از یک رژیم غذایی کم چرب و غنی از پلی ساکارید گیاهی به یک رژیم غذایی غربی با چربی بالا و قند بالا، با تغییرات قابل اندازه گیری در مسیره های متابولیک میکروبیوم و بیان ژن، تأثیرات عمده ای بر میکروبیوم در یک روز داشت (۹). پری بیوتیک ها، که مواد غذایی غیر قابل هضم هستند که با تحریک رشد یا فعالیت باکتری های هم زمان در روده، برای میزبان مفید هستند، از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. نشان داده شده است که اینها به طور قابل توجهی ترکیب میکروبیوم را تغییر می دهند. به عنوان مثال، تجویز فروکتو-الیگوساکاریدها به طور قابل توجهی تعداد بیفیدوباکتری های موجود در تجزیه و تحلیل مدفوع را افزایش می دهد و میزان باکتریوئیدها، فوزوباکتری ها

و کلسترییدیومها را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، پری بیوتیکها مانند الیگوساکاریدهای زنجیره بلند و کوتاه در روده بزرگ توسط باکتری‌های بی‌هوازی تخمیر می‌شوند که آن‌ها را به اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (SCFAs) مانند استات، پروپیونات و بوتیرات متابولیزه می‌کنند. به نظر می‌رسد افزایش غلظت SCFAها در روده بزرگ دارای چندین اثر مفید از جمله بهبود عملکرد سد، افزایش سنتز مخاط روده، تحریک سیتوکین‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی مانند اینترلوکین ۱۰ (IL-10) و کاهش سطح واسطه‌های پیش التهابی است. علاوه بر این، به نظر می‌رسد افزایش SCFAها منجر به رشد ترجیحی باکتری‌های محافظ نسبت به سویه‌های بیماری‌زا می‌شود. سین بیوتیک‌ها<sup>۱۵۵</sup> - ترکیبی از پری بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها - اثرات نظارتی مفید مشابهی دارند (۴).

استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان کمکی برای بهبود ایمنی و عوارض جانبی گوارشی در طول درمان سرطان نیز با ارزیابی بالینی مزایای احتمالی پروبیوتیک‌ها در طول و بعد از جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی مورد بررسی قرار گرفته است. از این نظر، پروبیوتیک‌ها به عنوان یک مکمل بالقوه در این شرایط بسیار جذاب هستند زیرا اگر هزینه‌های بهداشتی برای مدیریت سرطان را در نظر بگیریم، ارزان هستند (۲).

دلایل اصلی که پروبیوتیک‌ها ممکن است در کاهش اثرات نامطلوب گوارشی درمان سرطان مفید باشند، در بسیاری از مدل‌های حیوانی نشان داده شده است. موش‌هایی که به صورت داخل صفاقی ۵-فلوراوراسیل (FU-۵) تزریق شده بودند، دچار اسهال شدند، اما علائم آن‌ها پس از درمان با سوسپانسیون پروبیوتیک کاهش یافت. این مطالعه همچنین مکانیسم‌هایی را که برای آن رخ می‌دهد نشان داد: ترمیم آسیب‌ها در پرزهای ژژنوم، و کاهش بیان mRNA TNF- $\alpha$ ، IL-1 و IL-6 در بافت روده. مطالعه دیگری بر فعالیت مخلوطی از میکروارگانیسم‌های مختلف در کاهش شدت اسهال و بهبود بررسی بافت‌شناسی در مدل تجربی موش تاکید کرد (۲).

در سرطان انسان، برخی از داده‌های منتشر شده در مورد اینکه آیا پروبیوتیک‌ها می‌توانند به بهبود تحمل به شیمی درمانی کمک کنند، بحث می‌کنند. در یک کارآزمایی تصادفی کنترلی اخیر، بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال که درمان با ایرینوتکان را شروع کرده بودند، همزمان به صورت خوراکی با مخلوطی از باکتری‌های پروبیوتیک درمان شدند. اگرچه مطالعه متوقف شد، اما روند مشاهده شده به نفع کاهش دفعات اسهال شدید بود. کارآزمایی بالینی دیگری نشان داد که مکمل لاکتوباسیلوس رامنوسوس می‌تواند شدت اسهال، ناراحتی شکمی و سمیت روده را در بیماران تحت درمان با رژیم‌های شیمی درمانی مبتنی بر FU-۵ کاهش دهد (۲). پروبیوتیک‌ها همچنین می‌توانند در زمینه پرتودرمانی مفید باشند.

این پژوهش با هدف بررسی جدیدترین مقالات به منظور در نظر گرفتن یک رویکرد کمکی ممکن برای استفاده از پروبیوتیک‌های خاص برای کمک به سلامت انسان و درمان برخی بیماری‌ها انجام گرفته است.

### پیشینه پژوهش

متابولیت‌های میکروبی نیز می‌توانند در تومورزایی کولون نقش داشته باشند. در مطالعه اخیر سرطان کولورکتال (CRC) حیوانی، دانشمندان راه‌های جایگزینی متابولیت‌های از دست رفته را در بیماران مستعد التهاب روده و CRC نشان دادند و اینکه چگونه پروبیوتیک‌های خاص ممکن است به یک استراتژی پیشگیرانه یا درمانی جدید برای بیماران در معرض خطر التهاب روده تبدیل شوند. این مطالعه که در مجله آمریکایی پاتولوژی منتشر شد، توضیح داد که چگونه تجویز میکروب‌های روده تولید کننده هیستامین به موش‌های فاقد آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز (HDC) می‌تواند التهاب و تشکیل تومور را کاهش دهد (۱۰).

مطالعات دیگر بر نقش خاص لاکتوباسیل‌ها در پیشگیری از سرطان کولون در مدل حیوانی تاکید کردند. این مطالعات اثرات محافظتی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلیوس و لاکتوباسیلوس سالیاریوس را به ترتیب بر رشد روده‌های پیش سرطانی و سرطان کولورکتال در مدل موش نشان داد. مطالعه دیگری نشان داد که چگونه یک سویه خاص از لاکتوباسیلوس پلانتروم سرطان روده بزرگ را در مدل موش پس از القای شیمیایی سرطان مهار کرد (۲).



سرطان یکی از سناریوهایی است که در آن آپوپتوز بسیار کم رخ می دهد و در نتیجه سلول های بدخیم نمی میرند. مکانیسم آپوپتوز پیچیده است و مسیرهای زیادی را در بر می گیرد. گاملات و همکاران نشان داد که یک سویه خاص از لاکتوباسیلوس رامنوسوس به عنوان یک اقدام پیشگیرانه می تواند بروز و تعدد تومورهای روده بزرگ را با القای آپوپتوز سلولی و مهار التهاب کاهش دهد (۱۱). در حالی که Ciorba و همکاران فعالیت لاکتوباسیل های خاص را در تقویت عملکرد سد اپیتلیال روده به روشی وابسته به TLR2/cyclo-oxygenase-2 نشان داد (۱۲). Ghoneum و Felo اثر لاکتوباسیلوس کفیری<sup>۱۵۶</sup>، یک محصول جدید کفیر، را بر میزان آپوپتوز سلول های سرطانی معده، سلول های سرطان سینه و سلول های تک هسته ای خون محیطی انسان (PBMCs) گزارش کردند. نتایج نشان داد که یک عامل درمانی بالقوه برای درمان سرطان معده وجود دارد (۱۳).

در مطالعه ای توسط لیو و همکاران مصرف منظم لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم در دوزهای بالا به مدت ۱۶ روز، تنوع و غنای میکروبی را در افراد مبتلا به CRC که تحت کولورکتومی قرار می گیرند، افزایش داد. در این مطالعه، ترکیب میکروبیوتای روده بیماران مشابه افراد سالم بود. همانطور که گفته شد، برخی از آنزیم های روده مانند  $\beta$ -گلوکوزیداز، بتا-گلوکورونیداز، نیترات ردوکتاز، آزورودوتاز و  $\alpha$ -7-دهیدروکسیلاز که قادر به تبدیل هیدروکربن های معطر و آمین ها در مواد سرطان زا با سنتز آگلیکون ها، فنل ها، آمونیاکرسول ها هستند. و ترکیبات N-nitroso، می توانند فعالیت های سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک داشته باشند، در نتیجه در ایجاد سرطان روده بزرگ نقش دارند (۱۴).

اخیراً کوتزامپاسی و همکاران کاهش قابل توجهی در تمام عوارض عمده بعد از عمل در بیماران تحت عمل جراحی سرطان کولون رکتوم پس از درمان با فرمول پروبیوتیک در مقابل دارونما مشاهده کردند (۲۸.۶٪ در مقابل ۴۸.۸٪،  $p = 0.010$ , OR 0.42). همه این مطالعات برای اثبات واضح این موضوع که پروبیوتیک ها می توانند از سرطان روده بزرگ پیشگیری یا درمان کنند بسیار دور هستند، اما می توانند شروع امیدوارکننده ای برای تحقیقات بیشتر در این زمینه جذاب باشند. در این مطالعات، عوامل مخدوش کننده بالقوه مانند BMI، سیگار کشیدن، نوع رژیم غذایی و فعالیت بدنی را نیز می توان در نظر گرفت (۱۵).

اورلاندو و همکاران اثر سلول های زنده یا کشته شده با حرارت لاکتوباسیلوس کازئی IMPC2.1 و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (108 CFU/mL) را بر تکثیر و آپوپتوز معده (HGC-27) و کولون (DLD-1) ارزیابی کردند. خطوط سلولی سرطانی هر دو سلول زنده و کشته شده توسط گرما (لاکتوباسیلوس کازئی IMPC2.1 و لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG) به طور موثری تکثیر را کاهش داده و پروپوپتوز را در هر دو سلول سرطانی در شرایط آزمایشگاهی القا می کنند. از این رو، سلول های IMPC2.1 (که در اثر حرارت کشته می شوند) می توانند برای تهیه غذای کاربردی مبتنی بر پروبیوتیک برای بهبود وضعیت سلامت بیماران CRC به عنوان یک رژیم مکمل استفاده شوند (۱۶).

زو و همکاران اثر لاکتوباسیلوس سالیواریوس بر سرطان کولون ناشی از DMH در موش های صحرایی نر F344 بررسی شد. مکمل لاکتوباسیلوس سالیواریوس (۵ × ۱۰۸ یا ۱ × ۱۰۱۰ CFU/Kg وزن بدن در روز به مدت ۱۵ هفته) باعث بهبود میکرو فلور کولون (کاهش سویه های باسیلوس و رومینوکوکاسه<sup>۱۵۷</sup>) و متابولیسم مجرا در RCrats. سطح قابل توجهی از افزایش اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و کاهش قابل توجهی در فعالیت آزورودوکتاز در گروه تحت درمان با پروبیوتیک مشاهده شد، در حالی که فعالیت  $\beta$ -گلوکوزیداز و  $\beta$ -گلوکورونیداز در مقایسه با گروه کنترل تحت تاثیر قرار نگرفت. این مطالعه نشان داد که مکمل لاکتوباسیلوس سالیواریوس به طور مثبت میکروبیوتا و فعالیت های آنزیمی را در موش های القا شده با CRC با واسطه DMH تغییر می دهد (۱۷).

هو و همکاران اثر سویه های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانتاروم یا لاکتوباسیلوس سالیواریوس) را در موش های BALB/c حامل تومور CT26 مورد مطالعه قرار دادند. موش های BALB/c با لاکتوباسیلوس پلانتاروم یا لاکتوباسیلوس سالیواریوس

<sup>156</sup> *Lactobacillus kefir*

<sup>157</sup> Ruminococcaceae

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

( $1 \times 10^9$  CFU/day) به مدت ۱۴ روز از قبل تکمیل شدند و سلول‌های سرطانی CT26 برای القای سرطان در موش‌ها معرفی شدند. تغییرات در مفررات ایمنی و وضعیت رشد تومور در موش‌های حامل تومور CT26 بررسی شده است. لاکتوباسیلوس پلانتاروم قبل از قرار گرفتن در معرض به طور قابل توجهی رشد سلول CT26 را کاهش داد و طول عمر موش‌های حامل تومور را با بهبود تمایز T<sup>+</sup>CD4، نوع Th1، نفوذ سلول NK، عملکرد CD8<sup>+</sup> و بیان IFN- $\gamma$  در مقایسه با *L. rhamnosus pre* افزایش داد. گروه در معرض و کنترل نتایج ثابت کرد که لاکتوباسیلوس پلانتاروم خاصیت تقویت کننده سیستم ایمنی ضد توموری را نشان می‌دهد (۱۸).

ورثی و همکاران یک کارآزمایی متقاطع دوسوکور کنترل شده با دارونما را برای مطالعه اثر مکمل سازی آماده سازی پری بیوتیک، پروبیوتیک و سین بیوتیک بر نشانگرهای زیستی CRC در داوطلبان انسان سالم انجام داد. همه داوطلبان با پروبیوتیک ها (*B. lactis*;  $1 \times 10^9$  CFU/g؛ ۵ گرم در روز)، پری بیوتیک ها (نشاسته مقاوم؛ ۲۵ گرم در روز) و سین بیوتیک ها به صورت متوالی تکمیل شدند و هر مداخله ۴ هفته طول می‌کشد. بدون دوره شستشو تغییرات در میکروبیوتا، متیلاسیون DNA، تکثیر اپیتلیال و نشانگرهای زیستی CRC پس از ۴ هفته از هر مداخله ارزیابی شده است. نتایج نشان داد که مکمل سازی آماده سازی سین بیوتیک به طور موثری میکروبیوتا را نسبت به سایر مداخلات تغییر می‌دهد. علاوه بر این، مکمل‌های سین بیوتیک تأثیر معنی‌داری بر بیومارکهای سرم، مدفوع و اپیتلیال نداشت (۱۹).

### بحث و بررسی

ما در حال حاضر فقط درک بسیار ابتدایی از میکروبیوم و نحوه عملکرد آن در بدن انسان داریم. حتی در مورد اصول میکروبیوم نیز بحث‌های مداومی وجود دارد. ما می‌دانیم که برای سلامتی انسان حیاتی است، اما از اینکه بتوانیم یک میکروبیوم انسانی «سالم» را تعریف کنیم، فاصله زیادی داریم. ما می‌دانیم که عملکردهای خاصی مانند تنظیم سیستم ایمنی و سد مخاطی روده مفید هستند، اما منطقی است که تعداد زیادی از عملکردهای حیاتی میکروبیوم وجود دارد که هنوز کشف نشده اند (۴). خوشبختانه، قبل از تبدیل دانش میکروبیوم به مداخلات بالینی، به درک کاملی نیاز نداریم. مطالعات تاکنون نشان داده اند که بازگرداندن عملکرد به میکروبیوم می‌تواند اثرات مفیدی در پیشگیری از سرطان و در بهبود اثربخشی و ایمنی درمان سرطان داشته باشد. همانطور که دیدیم، تجویز برخی از سویه‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم با تغییرات بیوشیمیایی و بافت شناسی همراه است که ممکن است خطر ابتلا به بدخیمی را کاهش دهد. به نظر می‌رسد سویه‌های دیگر لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم و باکتریوئیدها نقش مهمی در اثربخشی برخی درمان‌های سیتوتوکسیک و ایمنی دارند. با این وجود، عمده تحقیقات در این موضوعات در مدل‌های حیوانی بوده است. داده‌های تحقیقات انسانی، به‌ویژه در آزمایش‌های بالینی که ارزیابی می‌کنند آیا پروبیوتیک‌ها یا سین بیوتیک‌ها می‌توانند اثرات نامطلوب درمان‌های مختلف سرطان را کاهش دهند، تاکنون نتایج متفاوتی را نشان داده‌اند (۲۰). با توجه به وضعیت اولیه تحقیقات بالینی در مورد پروبیوتیک‌ها و میکروبیوم، این نتایج ترکیبی لزوماً غیرمنتظره نیستند. کارآزمایی بالینی که پروبیوتیک‌ها را در بیماران سرطانی ارزیابی می‌کنند، از محدودیت‌های عمده‌ای رنج می‌برند، از فقدان کور کردن و گروه کنترل دارونما تا تعهد ناکافی بیمار. در حالی که برخی از این مطالعات نشان می‌دهند که درمان با پروبیوتیک مفید است، تحقیقات بالینی بیشتری با جمعیت‌های بزرگتر و متنوع‌تر بیماران نیاز دارد تا مشخص شود آیا سود واقعی وجود دارد یا خیر. علاوه بر این، در حالی که برخی از فرمول‌های پروبیوتیک فردی در چندین کارآزمایی بالینی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، هیچ شواهد محکمی وجود ندارد که یک فرمول را بر دیگری ترجیح دهد. به نظر می‌رسد گونه‌های باکتریایی خاص عملکردهای مفیدی را ارائه می‌دهند، اما ترجمه این دانش به درمان‌های بالینی مفید احتمالاً دشوار خواهد بود. به عنوان مثال، همانطور که قبلاً در مطالعات موش ذکر شد، به نظر می‌رسد بیفیدوباکتریوم کامنسال در اثربخشی درمان ضد PD-L1 مهم باشد. اگر این موضوع به صورت تجربی در انسان‌ها نیز ثابت می‌شد، سوالات زیادی باقی می‌ماند. آیا می‌توانیم از طریق تجویز پروبیوتیک‌های خوراکی یا سین بیوتیک‌ها بر «کمبود» بیفیدوباکتریوم غلبه کنیم؟ اگر چنین است، آیا حداقل دوز در واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) وجود دارد که برای

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

مؤثر بودن درمان باید تجویز شود؟ آیا سایر سویه‌های غیر بیفیدوباکتریوم باکتری‌های کامنسال می‌توانند عملکردهای معادلی را انجام دهند که اثربخشی درمان‌های ضد PD-L1 را تقویت کند؟

علاوه بر این، در صورت وجود، استفاده از چندین سویه از پروبیوتیک‌ها در یک فرمول چه فایده‌ای دارد؟ فعل و انفعالات بیشماری بین سویه‌های باکتریایی منفرد در میکروبیوتای روده وجود دارد و به نظر می‌رسد ترکیبات میکروبیوم خاصی افراد را کم و بیش مستعد کلونیزاسیون با باکتری‌های بیماری‌زا می‌کند. منطقی است که چندین نوع باکتری با اثرات ضد تومور ممکن است در صورت تجویز با هم همکاری کنند. در واقع، بسیاری از کارآزمایی‌های بالینی بررسی شده در این پژوهش، فرمول‌های پروبیوتیک را به جای پروبیوتیک‌هایی که از یک سویه تشکیل شده بودند، بررسی کردند. احتمالاً استفاده از سویه‌های پروبیوتیک با مکانیسم‌های اثر مفید متفاوت ممکن است نتیجه بهتری نسبت به هر یک به تنهایی ایجاد کند و ممکن است مکانیسم‌های دیگری وجود داشته باشد که توسط آن باکتری‌های هم‌زمان با یکدیگر همکاری می‌کنند. با این حال، کاملاً ممکن است که برعکس باشد و دادن برخی از پروبیوتیک‌ها به صورت ترکیبی باعث محدود شدن اثربخشی یکدیگر شود (۴).

در نهایت، به منظور تحقق وعده‌های درمانی مرتبط با میکروبیوم، تحقیقات باید بر روی توسعه رژیم‌های درمانی پروبیوتیکی تعریف‌شده با سویه‌ها و دوزهای خاص متمرکز شود که ممکن است منجر به یک مزیت بالینی قابل تکرار شود. حتی در این صورت، برای تعیین اینکه آیا اثر هم‌افزایی بین پروبیوتیک‌ها و داروهای ضد سرطان به نتایج انکولوژیک بهبود یافته مانند بقای بدون پیشرفت یا بقای کلی تبدیل می‌شود، به تحقیقات بیشتری نیاز داریم.

### نتیجه‌گیری

مطالعاتی که میکروبیوم روده را ارزیابی می‌کنند، ارتباط امیدوارکننده‌ای را بین آن و پاتوژنز و درمان سرطان کولورکتال نشان داده‌اند. تحقیقات ترجمه‌ای بیشتر و آزمایشات بالینی در افراد انسانی برای بررسی امکان دستکاری میکروبیوم برای بهبود نتایج در سرطان کولورکتال ضروری است (۴).

درک عوامل مؤثر بر میکروبیوم روده، استراتژی‌هایی برای تقویت پاسخ‌های درمانی، و همچنین مهندسی میکروبیوم برای درمان دقیق به عنوان چشم‌اندازهای آینده الزامی است. مداخلات غذایی و مکمل‌های غذایی، مانند برخی از پروبیوتیک‌های منتخب، به عنوان یک جایگزین معتبر برای مدیریت سرطان روده بزرگ ظاهر شده‌اند. همچنین مهم است که گزارش‌های بسیار کمی هرگونه اثرات نامطلوب مکمل‌های خوراکی پروبیوتیک را نشان می‌دهند. با این حال، این جنبه دیگری است که باید بیشتر توضیح داده شود، به ویژه در میزبان‌های نقص ایمنی که معمولاً پروبیوتیک‌ها را به عنوان مکمل رژیم غذایی مصرف می‌کنند. ما به وضوح می‌دانیم که برخی از پروبیوتیک‌هایی که به خوبی مشخص نشده‌اند می‌توانند سد روده را تغییر دهند. این دلیل اصلی این است که چرا در آینده باید از قوانین سختگیرانه پیروی کرد و انتخاب کارآمدی از باکتری‌ها را برای گنجاندن در "فهرست پروبیوتیک‌های ایمن و موثر" داشت. شناسایی ژنتیکی، سمیت، مقاومت گوارشی و میزان کلونیزاسیون، شرایط اصلی برای طراحی یک پروبیوتیک خوب است (۲).

اگرچه نتایج امیدوارکننده‌ای از مطالعات بر روی تعامل میکروبیوم-سرطان به دست می‌آید، اما داده‌های ارزیابی پروبیوتیک‌ها به عنوان وسیله‌ای بالقوه برای تأثیرگذاری بر سرطان هنوز برای فرمول‌بندی پاسخ قطعی بسیار کمیاب است. دیدگاه‌های آینده که امکان توصیف کامل‌تری از تنوع زیستی روده را فراهم می‌کند و تغییرات را در پاسخ به درمان ضد سرطان به دقت بررسی می‌کند، به تعیین نقش پروبیوتیک‌ها در پیشگیری از سرطان و در کاهش اثرات نامطلوب ناشی از آن کمک می‌کند. این تحقیق باید در آینده راه را برای "عصر پروبیوتیک‌های ضد سرطان" با هدف بازبازی یوبیوز روده برای نتایج بالینی بهتر در بیماران سرطانی هموار کند.

## References:

1. Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut C. The role of probiotics in colorectal cancer management. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020; 2020.
2. Drago L. Chloramphenicol resurrected: A journey from antibiotic resistance in eye infections to biofilm and ocular microbiota. Microorganisms. 2019; 7(9): 278.
3. Fernandez-Villa T, Alvarez-Alvarez L, Rubin-Garcia M, Obon-Santacana M, Moreno V. The role of dietary patterns in colorectal cancer: A 2019 update. Expert review of gastroenterology & hepatology. 2020; 14(4): 281-90.
4. Hendler R, Zhang Y. Probiotics in the treatment of colorectal cancer. Medicines. 2018;5(3):101.
5. Mitelmão FCR, de Cassia Bergamaschi C, Gerenutti M, Hächel K, Silva MT, Balcão VM, et al. The effect of probiotics on functional constipation in adults: double-blind, randomized, placebo-controlled study. Medicine. 2021;100(10).
6. Zeng J, Ji Y, Liang B, Zhang G, Chen D, Zhu M, et al. The effect of pro/synbiotics on postoperative infections in colorectal cancer patients: A systematic review and meta-analysis. Complementary Therapies in Clinical Practice. 2021;43:101370.
7. Hayes W, Sahu S. The Human Microbiome: History and Future: Microbiome. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 2020;23:406-11.
8. Rad AH, Aghebati-Maleki L, Kafil HS, Abbasi A. Molecular mechanisms of postbiotics in colorectal cancer prevention and treatment. Critical reviews in food science and nutrition. 2021;61(11):1787-803.
9. Gayathri D, Rashmi B. Anti-cancer properties of probiotics: a natural strategy for cancer prevention. EC Nutr. 2016;5(4):1191-202.
10. Gao C, Ganesh BP, Shi Z, Shah RR, Fultz R, Major A, et al. Gut microbe-mediated suppression of inflammation-associated colon carcinogenesis by luminal histamine production. The American journal of pathology. 2017;187(10):2323-36.
11. Gamallat Y, Meyiah A, Kuugbee ED, Hago AM, Chiwala G, Awadasseid A, et al. Lactobacillus rhamnosus induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016;83:536-41.
12. Ciorba MA, Riehl TE, Rao MS, Moon C, Ee X, Nava GM, et al. Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. Gut. 2012;61(6):829-38.
13. Ghoneum M, Felo N. Selective induction of apoptosis in human gastric cancer cells by Lactobacillus kefir (PFT), a novel kefir product. Oncology Reports. 2015;34(4):1659-66.
14. Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, et al. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery—a double-blind study. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2011;33(1):50-63.
15. Kotzampassi K, Stavrou G, Damoraki G, Georgitsi M, Basdanis G, Tsaousi G, et al. A four-probiotics regimen reduces postoperative complications after colorectal surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. World journal of surgery. 2015;39:2776-83.
16. Orlando A, Refolo M, Messa C, Amati L, Lavermicocca P, Guerra V, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed Lactobacillus paracasei IMPC2. 1 and Lactobacillus rhamnosus GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. Nutrition and cancer. 2012;64(7):1103-11.
17. Zhu J, Zhu C, Ge S, Zhang M, Jiang L, Cui J, et al. Lactobacillus salivarius Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. Journal of applied microbiology. 2014;117(1):208-16.

دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

18. Hu J, Wang C, Ye L, Yang W, Huang H, Meng F, et al. Anti-tumour immune effect of oral administration of *Lactobacillus plantarum* to CT26 tumour-bearing mice. *Journal of biosciences*. 2015;40:269-79.
19. Worthley DL, Le Leu RK, Whitehall VL, Conlon M, Christophersen C, Belobrajdic D, et al. A human, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;90(3):578-86.
20. Salva S, Marranzino G, Villena J, Agüero G, Alvarez S. Probiotic *Lactobacillus* strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *International immunopharmacology*. 2014;22(1):209-21.

## تولید انرژی از منابع زیستی: پیشرفت ها در بیوانرژی

شقایق رحمانی<sup>۱</sup>، مریم پیمانی<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. دانشیار ژنتیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

### چکیده

سوخت‌های زیستی، تنها تعدادی از محصولات انرژی تجدیدپذیر هستند که می‌توانند با گیاهان و میکروبی‌های تولید شوند. فتوسنتز گیاهان و جلبک‌ها موتوری است که چرخه کربن بیولوژیکی جهانی را به حرکت در می‌آورد، که تا حد زیادی از چرخه کربن سوخت فسیلی فراتر می‌رود، در حالی که همه محصولات غذایی و جنگلی ما و حتی امروزه بخش قابل توجهی از فیبر و سوخت مورد نیاز ما را تامین می‌کند. پتانسیل زیادی برای گسترش سیستم‌های زیست توده، هم برای «انرژی سبز» و هم برای سایر منابع تجدیدپذیر وجود دارد. چنین گسترشی در درجه اول باید ناشی از افزایش بهره‌وری باشد، یعنی راندمان تبدیل خورشیدی، بدون اینکه، همانطور که در "انقلاب کشاورزی" اتفاق افتاد، افزایش کودها، مواد شیمیایی و سایر نهاده‌های تجدیدناپذیر در سیستم‌های کشت. موفقیت آینده محصولات انرژی زیستی به اقتصادی بودن آنها نسبت به هزینه‌های رقابتی سایر منابع بستگی دارد. در حال حاضر منابع انرژی زیست توده به دلیل قیمت پایین سوخت‌های فسیلی، عموماً از نظر اقتصادی رقابتی نیستند. با این حال، قیمت‌های پایین سوخت‌های فسیلی نه تنها به دلیل هزینه پایین استخراج سوخت‌های فسیلی است، بلکه، و شاید مهم‌تر از همه، به این دلیل است که قیمت‌های آنها منعکس کننده هزینه‌های واقعی آنها نیست: برای محیط زیست، جامعه و آینده ما. این هزینه‌های "خارجی" منابع سوخت فسیلی توسط همه، به ویژه نسل‌های آینده، در تخریب محیط زیست، تغییرات آب و هوا و ناپایداری سیستم‌های اقتصادی ما پرداخت می‌شود. اگرچه سیستم‌های انرژی زیست توده در حال حاضر در برخی موارد خاص با سوخت‌های فسیلی رقابت می‌کنند، اما گسترش عمده انرژی زیستی تجدیدپذیر نه تنها به پیشرفت‌های فناوری، بلکه در محاسبه اقتصادی هزینه‌های زیست‌محیطی و اجتماعی کمتر آنها در مقایسه با سوخت‌های فسیلی نیاز دارد.

واژگان کلیدی: منابع زیستی، بیوانرژی، انرژی‌ها تجدیدپذیر

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: 038-33361010

پست الکترونیک: peymani.iaushk@gmail.com

## Energy Production from Biomass: Advances in Bioenergy

Shaghayegh Rahmani<sup>1</sup>, Maryam Peymani<sup>\*1</sup>

1. Master's student in genetics, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Associate professor of genetics, , Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

Biofuels are only a subset of renewable energy products that can be produced using plants and microorganisms. The photosynthesis of plants and algae is an engine that sets the global biological carbon cycle in motion, extending beyond the carbon cycle of fossil fuels, while supplying a significant portion of our food and forestry products, and even meeting a considerable part of our fiber and fuel needs today. There is great potential for expanding biomass systems, both for “green energy” and other renewable resources. Such expansion should primarily result from increased efficiency, such as solar conversion efficiency, without, as happened in the “Agricultural Revolution,” increasing non-renewable inputs into cultivation systems, such as fertilizers and other chemicals.

The future success “of bioenergy” products depends on their economic competitiveness compared to the competitive costs of other resources. Currently, biomass energy resources are generally not economically competitive due to the low prices of fossil fuels. However, the low prices of fossil fuels are not only due to the low cost of extracting fossil fuels, but perhaps more importantly, because their prices do not reflect their true costs: for the environment, society, and our future. The “external” costs of fossil fuel resources are paid by everyone, especially future generations, in the destruction of the environment, climate change, and the instability of our economic systems. While biomass energy systems currently compete with fossil fuels in some specific cases, the widespread expansion of renewable energy not only requires technological advancements but also a lessening of their environmental and social costs in economic calculations compared to fossil fuels.

**Keywords:** Biological resources – bioenergy – renewable energies

### مقدمه

نژاد بشر در حال حاضر، به طور مستقیم و غیرمستقیم، از بخش بزرگی، تقریباً نیمی از کل تولید اولیه سیاره - از طریق کشاورزی، شیلات، جنگل‌داری و سایر فعالیت‌ها بهره‌برداری می‌کند. در واقع، تعداد کمی از اکوسیستم‌های مولد در سراسر جهان در وضعیت طبیعی خود باقی می‌مانند که توسط اقدامات بشر کاهش نیافته است. از آنجایی که بهره‌برداری و تخریب اکوسیستم جهانی در نیمه اول قرن آینده به نقطه پایانی خود می‌رسد و محیط‌های طبیعی خارج از چند منطقه کم و بیش حفاظت شده دیگر وجود ندارند، اتکای ما به نعمت‌های طبیعت پایان خواهد یافت. سپس ما کاملاً به این بستگی خواهیم داشت که چگونه می‌توانیم دارایی‌های بیولوژیکی و فیزیکی باقیمانده سیاره خود را مدیریت کنیم تا بتوانیم وجود جمعیت انسانی را حفظ کنیم که نرخ رشد فعلی آن تنها با مصرف فزاینده منابع طبیعی فراتر رفته است. علاوه بر این، ما باید این منابع را در چارچوب یک محیط جهانی که به سرعت در حال تغییر است، با آب و هوای غیرقابل پیش‌بینی، مواد اولیه کمیاب‌تر، و زمین‌های مولد رو به کاهش، که توسط سکونتگاه‌ها پوشانده شده یا توسط شیوه‌های استثماری ویران شده است، مدیریت کنیم. فقط به چند مورد از چالش‌هایی که برای نسل‌های بعدی می‌گذاریم اشاره کنیم.

اگر قرار است از فاجعه - فروپاشی اقتصادی و جمعیتی - جلوگیری شود، ما نه تنها باید جمعیت و مصرف را مهار کنیم، بلکه باید فناوری‌های کارآمدتر و سازگار با محیط‌زیست را توسعه و پیاده‌سازی کنیم که در دسترس جمعیت بزرگی باشد که در حال حاضر از

مزایای اقتصاد تکنولوژیک ما برخوردار نیستند. سیستم‌های انرژی بیولوژیکی می‌توانند نقش مهمی در این دگرگونی اقتصاد و شرایط انسانی، که برای بقای ما در قرن بیست و یکم ضروری است، ایفا کنند.

#### بیان مسئله

بیوگاز یک انرژی تجدیدپذیر ارزشمند با حامل انرژی ثانویه است و تولید آن را می‌توان از مواد آلی زیست تخریب پذیر به دست آورد و اساساً از گازهای متان ( $CH_4$ )، دی اکسید کربن ( $CO_2$ )، مقدار کمتر گاز سولفید هیدروژن ( $H_2S$ ) با مقداری تشکیل شده است. رطوبت و سیلوکسان‌ها ترکیبات مختلف سوخت زیستی نیز بسته به منبع تولید گزارش شده است. ترکیب بیوگاز با درصد هر یک از گازهای تشکیل دهنده ۴۵ تا ۷۰ درصد متان ( $CH_4$ )، ۳۰ تا ۴۰ درصد گاز دی اکسید کربن ( $CO_2$ ) و ۱۵-۱ درصد گاز نیتروژن ( $N_2$ ) به عنوان اجزای اصلی است و در ترکیبات بر اساس منبع تولید بیوگاز (هضم فاضلاب، هاضم زباله آلی و منابع دفن زباله). احتراق یا اکسیداسیون متان، هیدروژن یا مونوکسید کربن ( $CO$ ) با اکسیژن گزارش شده است که با استفاده از آن برای اهداف پخت و پز یا گرم کردن، مقدار کافی انرژی آزاد می‌کند. در تولید مواد شیمیایی یا بیوشیمیایی، هیدروژن و/یا گاز سنتز، بیوگاز به عنوان ماده اولیه یا منابع سوخت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱).

انرژی ذخیره شده زیست توده برای سنتز انرژی تجدید پذیر الکتریکی یا گرمایی استفاده می‌شود. فرآیندهای احتراق یا تبدیل به گاز برای زیست توده خشک یا بیوگاز (متان) تحت هیدرولیز میکروبی بی‌هوازی کنترل شده برای تولید انرژی زیستی استفاده می‌شود. سوزاندن مستقیم (در دما و فشار بالا در حضور اکسیژن) توده کوچک و فشرده چوب، بقایای چوب پس از برش و سایر قطعات زیست توده خشک برای تولید توان حرارتی برای مقاصد گرمایشی و سرمایشی در مقیاس فردی تا صنعتی استفاده می‌شود. به حداقل رساندن تولید گازهای گلخانه‌ای می‌تواند با بهبود فرآیندهای مقرون به صرفه تشکیل انرژی زیستی و با کاهش آلاینده‌های هوا در نیروگاه‌های موجود انجام شود. استفاده از زیست توده در تولید انرژی الکتریکی تجدیدپذیر، انرژی حرارتی یا انرژی سوخت‌های حمل و نقل (سوخت‌های زیستی) رخ داده است. بقایای کشاورزی، ضایعات دامی، زباله‌های شهری و ضایعات آلی صنعتی به عنوان بهترین نمونه‌های زیست توده زباله گزارش شده است (۲). در کشورهای در حال توسعه، استفاده از زیست توده ضایعات برای تولید سوخت زیستی جامد موثر یا به طور بالقوه در سطح نیست، اما آنها منابع خوبی برای تولید بیومس زباله از تولید محصول خود از برنج یا خرما و میوه جاتروفا هستند. بر اساس مقدار آب، درصد خاکستر و اجزای فرار، عناصر شیمیایی اصلی (C, H, N و O) و ارزش حرارتی خالص (NCV) در زیست توده گیاهان پسماند، بیشترین تناسب ضایعات میوه جاتروفا (کیک) برای تشکیل انرژی زیستی گزارش شده است. در مقایسه با ضایعات میوه خرما و ضایعات برنج (با کمترین پتانسیل) (۳).

تبدیل موثر مواد زیست توده به منابع بیوانرژی، سویه‌های میکروبی مناسب با استفاده از تکنیک‌های مهندسی برای بهینه‌سازی سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی برای حداکثر تولید سوخت زیستی با انتقال بهینه انرژی نیز ساخته شده است و در شکل ۱ نشان داده شده است. گونه‌های ریزجلبکی می‌توانند از طریق افزودن بخش‌ها و عناصر غیر ارثی برای آنزیم‌های هیدرولیزکننده زیست توده، گذرگاه‌های جذب کربن یا فرآیندهای انتقال‌دهنده پروتئین، فتوسنتز و تثبیت  $CO_2$  با عملکردهای متابولیکی بهینه برای تولید انرژی زیستی، پلتفرم خوبی باشند. توسعه اخیر در رویکرد مهندسی، مسیری به کمک زیست‌شناسی مصنوعی در سویه‌های میکروبی راه خوبی برای افزایش تولید انرژی زیستی پایدار پیدا کرده است (۴). توسط مدل Hinshelwood، اثرات غلظت‌های مختلف قند کاهنده اولیه (۸۵-۱۱۵۶- $g \cdot L^{-1}$ ) بر پارامترهای رشد جنبشی (یعنی حداکثر نرخ رشد ویژه  $m^{\sim}$ ) تولید اتانول (از طریق نظارت بر تخمیر دینامیک) با ساکارومایسس سرویزیه بی حرکت بررسی شده است. سویه CICC 1308 و آب ساقه سورگوم شیرین (سوبسترا) (۵).

#### منابع انرژی زیستی و اثرات آن بر محیط زیست

تبدیل هر نوع منابع زیست توده لیگنوسلولوزی به انواع مختلف سوخت‌های زیستی با استفاده از طرح عملیاتی ساده و مقرون به صرفه صورت می‌گیرد که می‌تواند با ادغام یک فرآیند نوآورانه انجام شود. این را می‌توان با ترکیبی از فعال‌سازی مکانیکی و شیمیایی با



تکمیل موثر پیش تصفیه و به دنبال آن فرآیند زیستی میکروبی بستر پایدار برای تولید اتانول به دست آورد. لیگنوسلولزی منشا کشاورزی و محصولات جانبی آن در حال حاضر یک بستر تخمیری امیدوارکننده برای بیوسنتز بیواتانول با کاهش هزینه‌های دفع و همچنین انتشار گازهای گلخانه‌ای است. تخمیر مواد باقیمانده کشاورزی و گیاهان آبی با رشد سریع (مانند گونه‌های گربه‌سانی ~ گونه‌های تیفا از تالاب‌ها) می‌تواند کاندیدای خوبی با منابع قابل توجهی برای سوخت زیستی باشند زیرا به راحتی و بدون نیاز به مناطق کشاورزی در دسترس هستند (۶). سنتز میکروبی انواع مختلف محصولات بیوشیمیایی با استفاده از تکنیک الکتروسنتز به عنوان فرآیندی جذاب تر با مسیرهای جدید در فرآیند تصفیه زیستی فاضلاب گزارش شده است. این تکنیک به تولید سنتز توان الکتریکی نیز کمک کرده است. فرآیند الکتروسنتز منشا میکروبی از طریق ترکیب الکتروشیمی و میکروبیولوژی با تمرکز بیشتر بر اصول و چالش‌های آن به عنوان یک رشته جدید گزارش شده است (۷). علاوه بر این، فرآیند الکتروسنتز برای سنتز ترکیبات چند کربنه (بیوگاز) از استفاده از گاز دی اکسید کربن استفاده می‌شود و این روش جدید در فرآیندهای تصفیه بیوگاز است. این الکتروسنتز میکروبی (MES) با انجام فرآیند ساخت با استفاده از مواد الکترودهای مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌توان آن را با استفاده از کشت بی‌هوای مخلوط به عنوان کاتالیزور زیستی در محل کاند و مواد الکترولیت‌های مختلف به آند برای تولید پتانسیل ارزش کاند (V<sub>0.7</sub>-) به کار برد. الکترودهیدروژن استاندارد (۸). تحقیقات سوخت زیستی در حال حاضر با علاقه زیادی برای برآوردن تقاضای افزایش یافته جهانی انرژی در هر سال برای ارزش‌های اقتصادی نوظهور و افزایش قیمت جهانی نفت متمرکز شده است. استفاده از انواع مختلف میکروارگانیسم‌های مناسب برای تولید انواع سوخت‌های زیستی (به عنوان مثال الکل‌ها، هیدروژن، بیودیزل و بیوگاز) از انواع مختلف مواد اولیه (از انواع مختلف زیست توده زباله) با دخالت رویکردهای متعدد برای تحقیق در مرکز آزمایشگاهی کوچک تا مقیاس‌های صنعتی در حوزه سوخت‌های زیستی.

### رویکردهایی برای افزایش قابلیت سویه میکروبی برای سوخت زیستی

تحقیقات کنونی بر اساس تاکید ویژه بر موفقیت‌های اقتصادی تکنیک‌ها یا روش‌های مختلف برای استفاده از ماهیت ارزان و فراوان بستر برای سنتز سوخت زیستی متمرکز شده است (۹). لیگنوسلولز از ذرت به عنوان مواد اولیه سوخت زیستی چالش‌هایی را ارائه کرده است که با توسعه روش کارآمد برای فرآیندهای پیش تصفیه زیست توده با غربالگری مناسب و بهترین توانایی‌های میکروارگانیسم‌های سنتز کننده سوخت مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارگانیسم‌های تولید کننده سوخت ایده آل توانایی تبدیل موثر انواع مختلف ترکیبات قندی به سوخت‌های زیستی مختلف را در شرایط بی‌هوای یا شرایط هوای از طریق دستیابی به بازدهی خوب از ارزش نظری نشان داده‌اند. برخی از ترکیبات بازدارنده در طول فرآیندهای پیش تصفیه زیست توده سنتز می‌شوند که باعث ایجاد سمیت در مهار رشد میکروبی و تشکیل محصول با مقدار کم می‌شود. اشریشیا کلی به طور گسترده‌ای به عنوان یک سیستم مدل با اصلاح از طریق پیشرفت فعلی در تکنیک مهندسی متابولیک برای تولید زیستی سوخت زیستی در مسیرهای متابولیک مربوطه با تنظیم شارها استفاده شده است که می‌تواند در طول فرآیند پذیرش آن به عنوان یک سویه میکروبی سنتز کننده سوخت زیستی بر مسائل مختلف غلبه کند (۱۰).

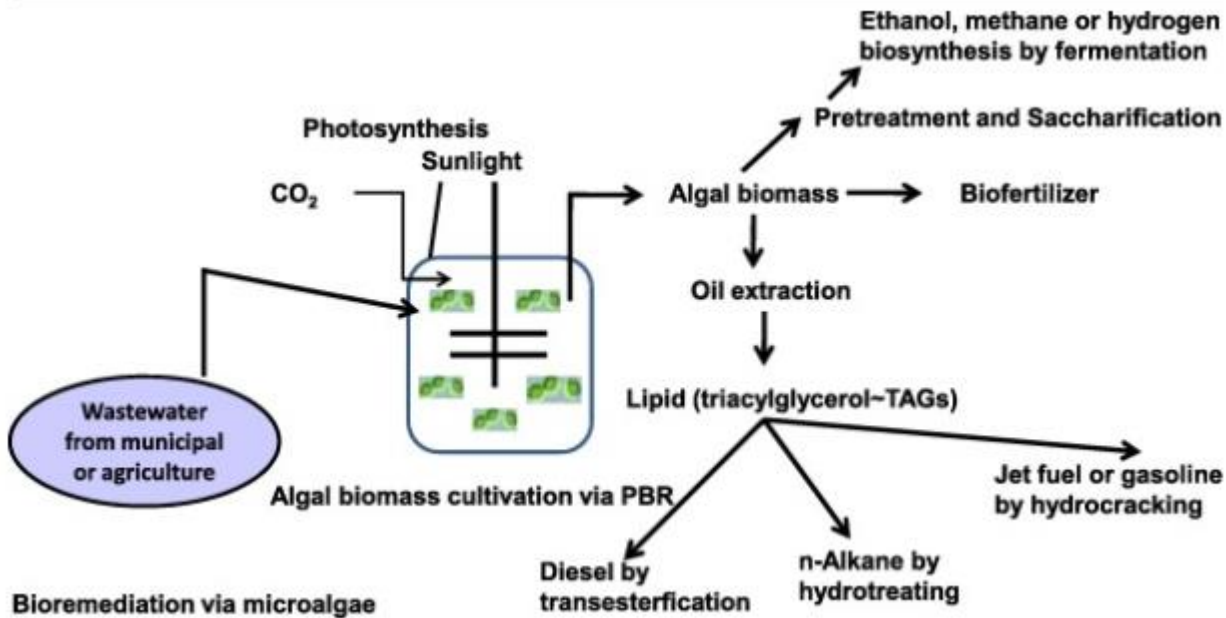
سوخت زیستی لیگنوسلولزی به عنوان نیاز پایدار، تجدید پذیر و آینده به منبع اختیاری انرژی برای سوخت‌های نفتی (حمل و نقل) گزارش شده است. ماهیت چقرمگی و سختی بیشتر ترکیبات لیگنوسلولز با مواد لیگن غنی، موانع یا مشکلات فنی را برای استفاده از آن به عنوان بستری برای سنتز اقتصادی و بادوام سوخت زیستی یا پالایشگاه زیستی ایجاد کرده است. توانایی ضعیف هیدرولیز آنزیمی برای تشکیل محصول کم، حداقل درصد عملکرد و غلظت سوخت‌های زیستی از موانع فنی اصلی هستند. در این راستا، استراتژی مهندسی پروتئین برای کارایی بهتر آنزیم‌های هیدرولیزکننده لیگنوسلولز یا بیوکاتالیست‌ها و اجزای پروتئین‌های شرکت کننده در مسیرهای متابولیکی بیوسنتز سوخت زیستی اعمال شده است. این رویکرد می‌تواند برای کاربردهای صنعتی برای دستیابی به کارایی لیگنوسلولز به سوخت زیستی موفق تر باشد (۱۱).

سنتز میکروبی ماهیت بالاتر (نسل دوم یا سوم) ترکیبات سوخت زیستی و بیوشیمیایی فله ای با مشکل ذخیره سازی متابولیت یا محصول نهایی با نمایش تأثیر منفی بر سنتز سویه میکروبی میزبان و محدودیت غلظت محصولات متابولیت مواجه شده است. بهبود ظرفیت تحمل در برابر حلال را می توان با سویه های میکروبی مهندسی شده که تولید سوخت زیستی بهبود یافته را نشان می دهند، به دست آورد. تحمل حلال به مکانیسم‌هایی بستگی دارد که از چاپرون‌ها تا عوامل رونویسی را شامل می‌شود. انتقال دهنده ها با ایفای نقش مهمی در ظهور دسته ای از پروتئین های قدرتمند با کمک به ظرفیت تحمل حلال و بهبود سنتز سوخت زیستی توسعه یافته اند. مهندسی در پروتئین ناقل سویه، تحمل بهتر حلال باکتریایی و تولید سوخت زیستی را از طریق بیان ناقل‌های موضعی غشایی فراهم کرده است (۱۲).

### زیست توده ریز جلبک

ریزجلبک‌ها زیست توده های گیاهی تک سلولی با طبیعت متنوع هستند که پتانسیل های مختلفی را برای توسعه سوخت حمل و نقل مایع نشان می دهند. گونه‌های ریزجلبکی را می‌توان در آب‌های شیرین و شور اشباع (یا هر دو) با استفاده مؤثر از CO<sub>2</sub> از جو ما با سهم بیشتر در تثبیت کربن جهانی (تا ۴۰٪) کشت کرد. این زیست توده جلبکی می تواند به سرعت تولید شود (دو برابر شدن دوره های ۶ تا ۲۴ ساعته) بسته به جنس یا گونه با ظرفیت طبیعی برای تولید روغن های غنی از انرژی در کل زیست توده سلول خشک خود. بوتریوکوکوس spp. تا ۵۰ درصد روغن هیدروکربن های زنجیره بلند از توده سلولی خشک خود انباشته شده است (۱۳). ماهیت بالقوه میلیون‌ها گونه جلبکی گزینه‌های مختلفی را برای شناسایی سویه‌های میکروجلبک بالقوه بیوسنتز با اطلاعات ژنتیکی در اختیار محققان قرار داده است. پتانسیل حذف گونه های ریزجلبکی در جریان های زباله در تصفیه فاضلاب شهری با حذف نیترات ها و فسفات ها قبل از دفع به عنوان پساب دخیل است. قابلیت بیوسنتز سوخت های زیستی جلبکی می تواند استفاده از زمین های حاصلخیز را در مقایسه با بیوسنتز سوخت های زیستی از گیاهان عالی زمینی کاهش دهد. فرآیند کشت زیست توده ریز جلبک در جریان‌های فاضلاب، برای اصلاح فاضلاب با تولید سوخت‌های زیستی مبتنی بر جلبک با رقابت در مقیاس اقتصادی با سوخت‌های فسیلی مانند فرآورده‌های نفتی پیدا شده است. این ویژگی‌های ریزجلبک‌ها به‌عنوان بستر مناسبی با پتانسیل بیشتری برای توسعه ماهیت مقرون‌به‌صرفه سنتز سوخت‌های زیستی فراهم کرده‌اند (۱۴).

تکنیک مهندسی بهبود یافته نقش بسیار مهمی در بهبود سنتز سوخت زیستی جلبکی ایفا کرده است که می‌تواند تحت تأثیر پروتکل‌های تکنیک‌های مؤثر برای جریان ترکیبات مغذی و تابش انرژی نور باشد. طراحی فتو بیوراکتورها (PBRs) توسط متخصصان (رشته‌های مهندسی و بیولوژیکی) به کار گرفته شده است تا قدرت‌های ساخت گونه‌ها را برای کشت به روش‌های مؤثر در سیستم‌های باز با حداقل هزینه‌ها با حفظ محیط‌های رشد آکسنیک و کنترل‌شده‌تر برای افزایش افزایش دهد. بهره وری و کاهش آلودگی از طریق بهبود فناوری های توسعه اخیر برای کشت سلولی، برداشت سلولی و استخراج روغن از زیست توده جلبک (۱۵). و در شکل نشان داده شده است.



شکل ۱. استفاده از نانو فناوری برای کشت‌های سلولی (۱۶).

از دوران باستان به بعد، تقاضای بالای زندگی کمکی با انرژی مصرفی بیشتر با تولید زیست توده جلبکی در طرح‌های گیاهی پرهزینه با کشت گران‌تر به دست آمده است. اما پیشرفت‌های اخیر در طراحی نیروگاه‌های بیوراکتور (یعنی برای ساخت و سازهای ارزان‌تر) می‌تواند این مشکلات را برطرف کند. طرح‌های مختلف نیروگاه‌های مقیاس پایلوت خاص، قابلیت فرآیند اختلاط مؤثر و رقیق‌سازی بیشتر تابش نور را از طریق استفاده از سطوح بزرگ بیرونی یا سطح جانبی داخلی سازه‌های هدایت نور و تحرک گاز از طریق ساختار غشایی دارند. چنین تلاش‌هایی می‌تواند سنتز سوخت زیستی ناشی از ریزجلبک‌ها را نزدیک به فرآیند اقتصادی مقرون‌به‌صرفه در برخی از کارخانه‌های آزمایشی کند. با انجام فرآیند ارزیابی اقتصادی، تنها می‌تواند در بخش‌های کوچک و یک چارچوب زمانی محدود عمل کند (۱۶).

استفاده از گونه‌های جلبک یوکاریوتی برای تولید سوخت‌های زیستی تجدید پذیر و همچنین برای حامل‌های انرژی زیستی انجام شده است. ترکیبات نشاسته برای سوخت زیستی الکلی، ترکیبات لیپیدی برای تولید کننده یا مبدع سوخت دیزل، و هیدروژن برای سلول‌های سوختی پاک گزارش شده است که از گونه‌های مختلف ریزجلبک بیوسنتز می‌شوند. گونه‌های ریزجلبکی ظرفیت بهتری برای تبدیل انرژی تشعشع به ترکیبات سوخت‌های زیستی در گیاهان با قابلیت‌های فتوسنتزی بالاتر در مقایسه با مواد اولیه سوخت زیستی با منشأ زمینی مانند گیاهان عالی (محصولات کشاورزی) از طریق رشد در سیستم‌های آب شور دارند. اخیراً، بسیاری از تحقیقات خوب با پیشرفت‌های مفید کافی در شناسایی برخی از ژن‌های کمک‌کننده انرژی زیستی و مسیرهای متابولیکی در گونه‌های مختلف گونه‌های ریزجلبکی از طریق استفاده از مؤثر ژنتیکی یا روش‌های مهندسی متابولیک برای توسعه به برخی سوبه‌های مهندسی شده برای اختلال هدف‌گرا در حال انجام است. ژن‌های درون‌زا و بیان ژن‌های گونه‌های مختلف پیشرفت سریع در توانایی تحقیقاتی می‌تواند به بهینه‌سازی اجزای ژنتیکی برای تولید سوخت‌های زیستی مبتنی بر هدف در گونه‌های ریزجلبکی کمک کند (۱۷).

میکروبی‌های کارآمد توانایی خود را در تولید نیروی الکتریکی از طریق طراحی سلول‌های سوختی میکروبی (MFCs) نشان داده‌اند. MFCهای کارآمد کاربرد عملی را به عنوان ساخت تجهیزات برداشت انرژی با منشاء میکروبی در مقیاس بزرگ نشان داده‌اند. MFCها غشای الکترولیت پلیمری (PEM) تولید شده در مقیاس تجاری حاوی سوخت یا دستگاه هستند، بدون نیاز به تصفیه

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

برای تامین سوخت. MFCها حاوی مواد بیولوژیکی سازگار هستند. در دمای محیط به عنوان کاتالیزور بیولوژیکی برای بازسازی خود الکتریسیته در طی تصفیه فاضلاب از طریق رویکرد تصفیه بی هوازی یا فن آوری های برداشت انرژی عمل می کنند. بسیاری از طرح های MFC در مقیاس بزرگ از چگالی توان کم یا فشردگی تولید شده تا حداکثر چگالی از بهترین سیستم های MFC توسعه یافته اند. تنوع بیشتر طرح ها برای تجهیزات MFC در دوره های اخیر مربوط به پیشرفت MFC برای چگالی توان به سرعت ظاهر شده است (۱۸).

زیست توده ریز جلبک *Scenedesmus abundans* توانایی خود را برای غلظت بیشتر ترکیبات لیپیدی، منبع خوب اسیدهای چرب و بهترین ویژگی های بیودیزل تحت سطوح مختلف ترکیبات فسفات، مقادیر pH و شدت نوردهی نشان داده است. غلظت فسفات ( $160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) زیست توده ( $10.77 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) با تیترا چربی ( $10.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) تولید کرده است، در حالی که شدت نور ( $600 \times$ ) زیست توده ( $10.74 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ایجاد کرده است. ( با تیترا چربی ( $10.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). در pH 6 یا ۸، زیست توده ( $10.77 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) و غلظت چربی ( $10.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) به عنوان بهترین غلظت زیست توده یا چربی گزارش شده است. تمام تیمارهای کشت تأثیر مؤثری بر مشخصات بیوسنتز اسیدهای چرب و ویژگی های بیودیزل ترکیبات روغن استخراجی نشان داده اند. ویژگی های بیودیزل مشتق از متیل استرهای اسید چرب (FAMES) برای کیفیت سوخت با استفاده از استانداردهای بیودیزل اروپایی، استانداردهای بیودیزل هند و استانداردهای بیودیزل آمریکایی برای ارزیابی ماهیت پایدار روغن های جلبکی به عنوان منابع مواد خام بیودیزل بررسی شده است و چند نمونه دیگر نشان داده شده است (۱۹).

برای تولید بیودیزل، کاربردهای مفید گونه های میکرو جلبک *Scenedesmus abundans* با منشاء آب شیرین (به عنوان مواد اولیه موثر) در محیط های کشت مختلف (BBM, H-13 اصلاح شده و B-11) برای کشت سلولی و عملکرد اجزای لیپیدی رشد داده شده اند. جزء اصلاح شده محیط H-13 بالاترین میزان زیست توده ( $11.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) و عملکرد چربی ( $10.49 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) را با  $\text{KNO}_3$  ( $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) نشان داده است. روش های مختلف استخراج لیپید و همچنین فرآیند ترانس استریفیکاسیون برای بیودیزل دارای ترکیبات اسیدهای چرب با طول زنجیره کربنی ۱۶ تا ۱۸ و ویژگی های مختلف بیودیزل (مانند عدد ستان، عدد ید یا مقدار صابونی شدن) مطابق با Brailian گزارش شده است. آژانس ملی نفت و استانداردهای بیودیزل اروپا به عنوان ماده اولیه بالقوه برای تولید بیودیزل (۲۰).

### تولید سوخت زیستی

اخیراً، نسل های سوخت زیستی از ریز جلبک ها با پتانسیل بیشتری برای جایگزینی انرژی مبتنی بر سوخت های فسیلی مورد توجه گسترده ای قرار گرفته اند. فن آوری های تولید یا تبدیل برای سوخت زیستی ریز جلبکی فرآیندهای کشت، برداشت و استخراج است. قابلیت فتوسنتز بالای گونه های ریز جلبک، با سنتز زیست توده بالا می تواند به طور موثر میزان انتشار دی اکسید کربن در محیط را از طریق کاهش تأثیر گرمایش جهانی به حداقل برساند. نرخ رشد بالای ریز جلبک ها می تواند تا ۷۰ درصد محتوای ترکیبات لیپیدی را در سلول های زیست توده خود بسته به نوع گونه ایجاد کند و همچنین توانایی بقای خود را در شرایط نامطلوب در مناطق کوچک سنتز زیست توده زمین ها نشان می دهد. توانایی تولید الکتریکی ریز جلبک ها همچنین می تواند دارای لیپید خام برای توسعه سوخت حمل و نقل (تا ۸۰٪) به عنوان محتوای انرژی متوسط باشد. بیودیزل، سوخت زیستی و گازها، نفت زیستی، متان، سوخت زیستی  $\text{H}_2$  و سوخت های الکلی مختلف نمونه های خوبی از سوخت های زیستی هستند که از زیست توده ریز جلبک ها به دست می آیند. تولید سوخت های زیستی از طریق مشارکت گونه های ریز جلبک ها می تواند فرآیندی مقرون به صرفه اقتصادی در مقیاسی برای بهبود فرآیندهای زیستی، با سود از نظر اقتصادی و همچنین در سطح محیطی باشد (۲۱).

زیست توده گونه های ریز جلبکی منبع انرژی سبز پایدار است زیرا مقدار زیادی سوخت بیودیزل، بیواتانول و بی هیدروژن تولید می کند. سایر سوخت های زیستی نیز با عرضه روغن های نخل، کلزا، سویا و گیاهان زراعی نیشکر یا مواد زائد آن ها سنتز می شوند، اما زیست توده ریز جلبک ها را می توان در مدت زمان کوتاهی با قابلیت سنتز بیشتر در آب های شور و زمین های غیر زراعی یا استریل

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

رشد داد. تلاش‌های مختلفی برای تجاری‌سازی سوخت‌های زیستی منشأ گرفته از گونه‌های ریزجلبک با مشارکت هر دو بدن (مردم دولتی و بخش خصوصی) با استفاده از تکنیک‌ها یا روش‌های معمول و خاص‌تر برای کشت و برداشت زیست توده جلبکی با پیشرفت‌های فعلی در تکنیک‌ها یا روش‌ها انجام شده است. سنتز سوخت زیستی آن (۲۲). تولید سوخت زیستی حاصل از ریز جلبک‌ها را می‌توان با محاسبه فرآیندهای اقتصادی پایدار و طبیعت پایدار زیست‌محیطی از طریق حفظ تعادل کربن و انرژی با تأثیر زیست‌محیطی بر قیمت‌های تولید نهایی آن تعیین کرد. این می‌تواند تعادل انرژی مثبت را از طریق استفاده از پیشرفت در روش‌ها یا مهارت‌های فنی با فرآیندهای تولید بسیار بهینه حفظ کند و برای اهداف پمپاژ، ساخت و ساز و خشک کردن و آبیگری استفاده می‌شود. اهمیت محیط زیستی سیستم مدیریت آب، مدیریت غلظت گاز دی اکسید کربن با مکمل‌های ترکیبات مغذی مناسب، عوامل محدودکننده مهمی برای طراحی بهینه فرآیند سوخت زیستی میکروجلبکی و همچنین وجود گزینه‌های اجرایی افزایش یافته است. کاهش قابل توجه (تا ۵۰٪) هزینه برای دی اکسید کربن، مواد مغذی و استفاده از آب با حداقل هزینه گزارش شده است. انتخاب ریزجلبک‌های غنی از لیپید به دلیل حداقل ظرفیت ذخیره‌سازی اجزای لیپیدی یا عملکرد در کشت انبوه ریزجلبک‌ها، چالش بزرگی برای تحقیق برای تولید بیودیزل میکروجلبک است. محتوای چربی بالای ۳۳.۴٪ DW (۹۰٪ TAG های ذخیره سازی) نیز برای اولین بار در کشت استخر مسابقه ای در مقیاس آزمایشی به دست می‌آید. با استفاده از یک فتوبیوراکتور ستونی حبابدار (ظرفیت ۱۰ لیتر) با ریزجلبک گونه *Graesiella WBG-1*، زیست توده (۱۱۲ g.m-2days-1) و لیپیدها (۵.۴ g.m-2day-1) (۴۵.۲٪ DW) در کمتر از ۱۵ mol.m-2days-1 تولید شده است. ۱ تابش نور مصنوعی تجمع مقدار زیادی چربی ذخیره در *Graesiella sp. WBG-1* تحت تابش طبیعی خورشید و شرایط دمایی بهینه گزارش شده است (۲۳).

### سنتز بیوگازها

متان بخش مهمی از بیوگاز (غنی از انرژی) است که عمدتاً از طریق تجزیه بیولوژیکی مواد آلی در غیاب مولکول‌های اکسیژن با کمک سوبه‌های میکروارگانیسم‌های مختلف تولید می‌شود و از باقیمانده‌های غنی از مواد مغذی تولید می‌شود و محصولات جانبی آن (کمپوست) به عنوان کوددهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. عامل. گاز متان برای سنتز گرما، الکتروسیسته یا سوخت خودرو استفاده می‌شود و بسترهای مختلف می‌توانند بر تولید آن تأثیر بگذارند که بستگی به ویژگی زیرلایه و انواع مختلف فناوری‌های راکتور دارد. تولید متان یک فرآیند زیستی پیچیده است که توسط انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها درگیر می‌شود و مقدار انرژی به مشخصات رشد ساختار جامعه میکروبی (همچنین در پیش تیمار، پاکسازی و تخمیر استفاده می‌شود) و پارامترهای عملیاتی (دمای فرآیند) بستگی دارد (۲۴).

کاه (گندم) محصولات کشاورزی ارزان و فراوان با مواد اولیه بالقوه برای تولید بیوگاز است، اما ساختار پیچیده آن باعث می‌شود دسترسی آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز با منشاء میکروبی دشوار باشد و منجر به فرآیند تخریب محدود شود. سرعت فرآیند تجزیه به عملکرد موثر آنزیم‌های تولید شده از سیستم‌های جامعه میکروبی با تأثیر بر فرآیند بیوگاز (آمونیاک) بستگی دارد. میزان تخریب سلولز و بسترهای کاه گندم یا برنج در کشت دسته ای با تلقیح اندازه سلول‌های میکروبی برای فرآیند هضم مشترک (CD) طراحی نیروگاه های بیوگاز و تصفیه خانه های فاضلاب (WWTP) آغاز می‌شود. دو T-RF از جامعه *cel5* ارتباط مثبتی با نرخ های تخریب بالای هر دو (برنج و گندم) کاه و سلولز دارند و یکی از توالی های جزئی مربوطه *cel5* هویت ۱۰۰٪ را با کلسترییدیوم سلولولیتیکوم دارد (۲۵).

تولید انرژی تجدیدپذیر می‌تواند مشکل اصلی کمبود انرژی را در سراسر جهان حل کند و بیوگاز (متان) یک حامل انرژی با طبیعت تجدیدپذیر امیدوارکننده است و تولید آن حذف ترکیبات پسماند آلی را با سنتز یک حامل انرژی همه کاره ترکیب کرده است. پیچیدگی‌های سیستم جوامع میکروبی با مسیرهای متابولیکی آن‌ها در فرآیند میکروبیولوژیکی برای تولید بیوگاز شرکت می‌کنند. رویکردهای *Mtgenomic* یک تکنیک جدید با توان عملیاتی بالا هستند که برای مزایای آن در حل پیچیدگی عملکردی و

طبقه‌بندی سیستم‌های کنسرسیوم میکروبی آزمایش شده‌اند. تنوع میکروبیولوژیکی با نقش تنظیمی آن در متابولیسم هیدروژن از طریق نیروهای محرک برای جوامع میکروبی سنتز کننده بیوگاز بهینه یافت می‌شود (۲۶). طراحی منطقی جوامع میکروبی می‌تواند فرآیند بازدهی بیشتر سنتز بیوگاز را در سیستم‌های عملی در مقیاس بزرگ القا کند. پلتفرم توالی یابی DNA کوتاه خواندن SOLiDTM قادر به رمزگشایی اطلاعات مفید برای زمینه‌های سیستماتیک و کاربردی برای حالت بهینه قابلیت سنتز بیوگاز در جامعه میکروبی است. تجزیه مواد آلی توسط *Eubacteria Clostridia* گزارش شده است. *Archaea* به عنوان اقلیت در این جامعه و نقش حیاتی آنها در سنتز بیوگاز گزارش شده است. *Methanoculleus marisnigri* فراوان‌ترین گونه است و به عنوان متانوژن هیدروژنوتروف گزارش شده است. تجزیه سوبسترای آلی توسط کمک‌های کلسترییدی انجام می‌شود همانطور که با اهمیت متابولیسم سوخت زیستی گاز هیدروژن در جوامع میکروبی سنتز کننده بیوگازها گزارش شده است (۲۷).

#### بحث

سوخت‌های انرژی تجدیدپذیر منبع خوبی از انرژی‌های زیستی (سوخت‌های زیستی یا گازهای زیستی) هستند که از زیست توده محصولات کشاورزی یا ریزجلبک‌ها یا پسماندهای بیولوژیکی به دست می‌آیند. این می‌تواند گزینه جایگزینی برای انرژی سوخت فسیلی از طریق تامین افزایش تقاضای انرژی در دوره‌های حال و آینده در سراسر جهان با انتشار گازهای گلخانه‌ای کمتر ارائه دهد. بیوگاز حامل انرژی ثانویه است و سوخت‌های زیستی را می‌توان از زیست توده جلبکی به عنوان انرژی جایگزین مناسب در انرژی فعلی در سناریوهای جهانی و اقتصادی فعلی سنتز کرد. ریزجلبک‌ها لیپیدها را در توده سلولی خود جمع کرده و برای تولید سوخت زیستی استفاده می‌کنند. این پتانسیل تولید ۱۰۰ برابر بیشتر ترکیبات نفتی در هر هکتار از هر گیاه خشکی را دارد. انرژی زیستی معمولاً از بسترهای خام پایدار با تخمیر یا هضم بی‌هوازی از طریق دخالت سیستم میکروبی تولید می‌شود. سلول‌های سوختی میکروبی از طریق استفاده از زباله‌های آلی پیچیده یا تجدیدپذیر به تولید بیوالکتریسته کمک کرده‌اند. سلول‌های سوختی میکروبی در تولید انرژی زیستی پایدار در طول تصفیه فاضلاب همراه با تولید برق استفاده شده است. کاربرد تکنیک‌های مهندسی مسیره‌های ژنتیکی یا متابولیک باعث ایجاد جوامع میکروبی موثر برای توسعه بیوانرژی شده است.

#### نتیجه‌گیری

تنها تعدادی از محصولات انرژی تجدیدپذیر هستند که می‌توانند با گیاهان و میکروب‌های بالاتر تولید شوند. فتوسنتز گیاهان و جلبک‌ها موتور است که چرخه کربن بیولوژیکی جهانی را به حرکت در می‌آورد، که تا حد زیادی از چرخه کربن سوخت فسیلی فراتر می‌رود، در حالی که همه محصولات غذایی و جنگلی ما و حتی امروزه بخش قابل توجهی از فیبر و سوخت مورد نیاز ما را تامین می‌کند. پتانسیل زیادی برای گسترش سیستم‌های زیست توده، هم برای «انرژی سبز» و هم برای سایر منابع تجدیدپذیر وجود دارد. چنین گسترشی در درجه اول باید ناشی از افزایش بهره‌وری باشد، یعنی راندمان تبدیل خورشیدی، بدون اینکه، همانطور که در "انقلاب کشاورزی" اتفاق افتاد، افزایش کودها، مواد شیمیایی و سایر نهاده‌های تجدیدناپذیر در سیستم‌های کشت. بهبود تولید سوخت زیستی را می‌توان با بهترین طراحی و توسعه سلول‌های میکروبی مصنوعی (گونه‌های باکتریایی یا مخمری با استفاده از بیوتکنولوژی سیستمی، زیست‌شناسی مصنوعی و سیستمی) به دست آورد. گزارش شده است که بیودیزل، بیواتانول، بیو بوتانول، بیوهیدروژن و بیوگاز از منابع مختلف پایدار سنتز می‌شوند. مانند مواد منشأ لیگنوسلولزی، گونه‌های ریز جلبکی و انواع مختلف مواد زائد آلی در جریان فاضلاب از طریق سودمندی برای محیط زیست، کشاورز و صنایع.

## References:

1. Awe, O. W., Zhao, Y., Nzihou, A., Minh, D. P., & Lyczko, N. A review of biogas utilisation, purification and upgrading technologies. *Waste and Biomass Valorization* 2017, 8, 267-283.
2. Liu, Z. (Ed.). *Gas biofuels from waste biomass: principles and advances*. Nova Science Publishers, Incorporated 2015.
3. Brunerová, A., Malafák, J., Müller, M., Valášek, P., & Roubík, H. Tropical waste biomass potential for solid biofuels production. *Agronomy Research* 2017, 15(2).
4. Srivastava, R. K. Bio-energy production by contribution of effective and suitable microbial system. *Materials Science for Energy Technologies* 2019, 2(2), 308-318.
5. Jin, H., Liu, R., & He, Y. Kinetics of batch fermentations for ethanol production with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* growing on sweet sorghum stalk juice. *Procedia Environmental Sciences* 2012, 12, 137-145.
6. Anker, Y., Nakonechny, F., Niazov, B., Lugovskoy, S., & Nisnevitch, M. Biofuel production by fermentation of water plants and agricultural lignocellulosic by-products. In *MATEC web of conferences* 2016, (Vol. 70, p. 12005). EDP Sciences.
7. Omidi, M., Mashkour, M., Biswas, J. K., Garlapati, V. K., Singh, L., Rahimnejad, M., & Pant, D. From electricity to products: recent updates on microbial electrosynthesis (MES). *Topics in Catalysis* 2021, 1-18.
8. Das, S., Chatterjee, P., & Ghangrekar, M. M. Increasing methane content in biogas and simultaneous value added product recovery using microbial electrosynthesis. *Water Science and Technology* 2018, 77(5), 1293-1302.
9. Shalini, P., Raman, L. A., Santhanakrishnan, S., Vijayalakshmi, S., & Ranjitha, J. A review on recent trends in the microbial production of biodiesel. In *AIP Conference Proceedings* 2021, (Vol. 2396, No. 1). AIP Publishing.
10. Singh, S., Sharma, P. K., Chaturvedi, S., Kumar, P., Nannaware, A. D., Kalra, A., & Rout, P. K. Biocatalyst for the synthesis of natural flavouring compounds as food additives: Bridging the gap for a more sustainable industrial future. *Food Chemistry* 2024, 435, 137217.
11. Madhavan, A., Arun, K. B., Binod, P., Sirohi, R., Tarafdar, A., Reshmy, R., ... & Sindhu, R. Design of novel enzyme biocatalysts for industrial bioprocess: Harnessing the power of protein engineering, high throughput screening and synthetic biology. *Bioresource Technology* 2021, 325, 124617.
12. Mukhopadhyay, A. Tolerance engineering in bacteria for the production of advanced biofuels and chemicals. *Trends in microbiology* 2015, 23(8), 498-508.
13. Oraby, T., Tyshenko, M. G., Maldonado, J. C., Vatcheva, K., Elsaadany, S., Alali, W. Q., ... & Al-Zoughool, M. Modeling the effect of lockdown timing as a COVID-19 control measure in countries with differing social contacts. *Scientific reports* 2021, 11(1), 3354.
14. Khan, A. K., Kausar, H., Jaferi, S. S., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. An insight into the algal evolution and genomics. *Biomolecules*, 2020, 10 (11): 1524.
15. de Lima Araujo, R. R., de Farias Silva, C. E., de Sa Filho, M. L. F., & Almeida, R. M. R. G. Bioethanol from microalgae 20. *3rd Generation Biofuels: Disruptive Technologies to Enable Commercial Production* 2022, 439.
16. Paladino, O., & Neviani, M. Airlift photo-bioreactors for *Chlorella vulgaris* cultivation in closed-loop zero waste biorefineries. *Biomass and Bioenergy* 2021, 144, 105926.
17. Kaloudas, D., Pavlova, N., & Penchovsky, R. Lignocellulose, algal biomass, biofuels and biohydrogen: a review. *Environmental Chemistry Letters* 2021, 19, 2809-2824.

18. Choudhury, P., Ray, R. N., Bandyopadhyay, T. K., Basak, B., Muthuraj, M., & Bhunia, B. Process engineering for stable power recovery from dairy wastewater using microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy* 2021, 46(4), 3171-3182.
19. Mandotra, S. K., Kumar, P., Suseela, M. R., Nayaka, S., & Ramteke, P. W. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology* 2016, 201, 222-229.
1. Ho, S. H., Li, P. J., Liu, C. C., & Chang, J. S. Bioprocess development on microalgae-based CO<sub>2</sub> fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource technology* 2013, 145, 142-149.
2. Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K., & Vellayan, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2016, 58, 180-197.
3. Tan, C. H., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., & Lan, J. C. W. Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: A recent review. *Biotechnology Advances* 2015, 33(6), 1219-1227.
4. Wen, X., Du, K., Wang, Z., Peng, X., Luo, L., Tao, H., ... & Li, Y. Effective cultivation of microalgae for biofuel production: a pilot-scale evaluation of a novel oleaginous microalga *Graesiella* sp. WBG-1. *Biotechnology for biofuels* 2016, 9, 1-12.
5. Schnürer, A. Biogas production: microbiology and technology. *Anaerobes in biotechnology*, 195-234.
6. Sun, L., Liu, T., Müller, B., & Schnürer, A. (2016). The microbial community structure in industrial biogas plants influences the degradation rate of straw and cellulose in batch tests. *Biotechnology for biofuels* 2016, 9(1), 1-20.
7. Hashemi, S., Hashemi, S. E., Lien, K. M., & Lamb, J. J. Molecular microbial community analysis as an analysis tool for optimal biogas production. *Microorganisms* 2021, 9(6), 1162.
8. Srivastava, R. K. Bio-energy production by contribution of effective and suitable microbial system. *Materials Science for Energy Technologies* 2019, 2(2), 308-318.



## کاربرد نانوتکنولوژی در تشخیص و درمان سرطان

شکیلا اسدپور<sup>۱\*</sup>، احمد مسیبی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی دکتری فلسفه تعلیم و تربیت، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

### چکیده

**مقدمه و هدف:** یکی از درمان های شناخته شده سرطان، شیمی درمانی می باشد اما به دلیل محدودیت دسترسی دارو ها به بافت سرطانی، سمیت بسیار و مقاومت و پایداری کم دارو ها در جریان خون، موفقیت زیادی نداشته اند. با شناسایی هر چه بهتر بیولوژی تومور و پیشرفت فناوری نانوتکنولوژی، روش های پیشرفته تری برای درمان سرطان ارائه شده است. ذرات در مقیاس نانو به دلیل تغییر در خواص و ویژگی های آن ها به صورت هدفمند برای درمان به صورت بسیار موثر عمل خواهند کرد. در داروسازی، نانوپار تیکل ها به گونه ای مهندسی می شوند که توانایی بالایی در انتقال دارو های سایتوتوکسیک به سایت سرطانی داشته باشند. برای درمان سرطان، نانوپار تیکل ها و تکنیک بیوکونژوگاسیون، راه کار های موثری در معالجهی سرطان معرفی شده اند. این مقاله ی مروری به بررسی نانوپار تیکل ها و فناوری نانوتکنولوژی در درمان و تشخیص سرطان ها اشاره می کند و همچنین مروری بر نانوذرات معدنی و آلی دارد.

**نتیجه گیری:** با توجه به اینکه استفاده از روش های متداول در تشخیص و درمان دارای معایبی می باشد از جمله محدودیت های استفاده از نانو تکنولوژی مثل نانو ذرات کوانتوم، نانو بادی ها، اپتامر ها می توانند تاثیر هدفمندی در درمان سرطان باشند.

**واژگان کلیدی:** نانوتکنولوژی، سرطان، اپتامر، ذرات کوانتوم، حمل دارو.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵  
همراه: ۰۹۰۵۰۹۲۰۴۰۹

پست الکترونیک: [Asrshakila@gmail.com](mailto:Asrshakila@gmail.com)

## application of nanotechnology in cancer diagnosis and treatment

Shakila Asadpour<sup>1\*</sup>, Ahmad Mosayebi<sup>2</sup>

1. Department of Genetics, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Ph.D. Student of Educational Philosophy, Payamenoor, Tehran, Iran.

### Abstract

**Background:** One of the well-known cancer treatments is chemotherapy, but due to the limited access of drugs to the cancerous tissue, high toxicity, and low resistance and stability of drugs in the bloodstream, they have not been very successful. With the better understanding of tumor biology and the advancement of nanotechnology, more advanced methods of cancer treatment have been provided. Nano-scale particles will act very effectively for targeted treatment due to changes in their properties and characteristics. In pharmaceuticals, nanoparticles are engineered to have a high ability to deliver cytotoxic drugs to the cancer site. For the treatment of cancer, nanoparticles and bioconjugation technique have been introduced as effective ways to treat cancer. This review article refers to the investigation of nanoparticles and nanotechnology in the treatment of diagnosis of cancers and also has an overview of inorganic and organic nanoparticles.

**Conclusion:** Considering that the use of conventional methods in diagnosis and treatment has disadvantages, including the limitations of using nanotechnology such as quantum nanoparticles, nanobodies, aptamers can have a targeted effect in cancer treatment.

**Keywords:** nanotechnology, cancer, aptamer, quantum particles, drug delivery.

### مقدمه

سرطان یکی از مهمترین بیماری‌ها و عمده ترین علل مرگ و میر در سراسر جهان محسوب می شود. از هر چهار مرگ در آمریکا یک مرگ به علت سرطان گزارش شده است (۱). در برخی از کشورهای غربی نیز یک چهارم از مرگ و میرها ناشی از سرطان‌ها می باشد. علاوه بر این، سرطان یک مسئله مهم در بهداشت عمومی می باشد. در مطالعات صورت گرفته نشان داده اند که حدود ۱/۸ میلیون مورد سرطان جدید به غیر از سرطان پوست غیر ملانوم در ۱۹۹۰ شکل گرفته، این مقدار امروزه به ده میلیون مورد جدید رسیده است (۲). علت برخی از سرطان‌ها بر شیوع یکسری از ویروس‌ها می باشد، به عنوان مثال سرطان گردن رحم که دومین سرطان شایع میان زنان است و پنجمین سرطان از لحاظ شیوع در جهان می باشد (۳). سرطان دهانه رحم شایع ترین بیماری مرتبط با HPV است. حدود ۹۹/۷ درصد از موارد سرطان دهانه رحم ناشی از عفونت مداوم پاپیلومای انسانی (HPV) پرخطر دستگاه تناسلی است (۴).

### نانوتکنولوژی، پزشکی، درمان و تشخیص

نانوتکنولوژی در برگیرنده علم مهندسی ساخت مواد با اندازه‌ی ۵۰۰ نانومتر و کمتر می باشد (۵). خاصیت تشخیصی و درمانی این حوزه از جمله ساخت مواد با اندازه‌ی کوچک و نسبت سطح به حجم بالای نانوذرات و اندازه‌ی کوچک آنها می باشد که موجب تماس بیشتر آن‌ها با فضای مورد نظر می گردد (۶).

استفاده از نانو مواد امکان بهرمندی از خواص ویژه‌ی آن‌ها مانند حلالیت، نفوذ، نیمه عمر بالای آن‌ها در گردش خون، ویژگی رها سازی دارو و ایمونوژنیسیته را به پژوهشگر و درمانگر می دهد (۷). انستیتو بین المللی سرطان یافته اند که نانوتکنولوژی عامل کمک کننده در امر تشخیص و درمان سرطان می باشد. در ابتدا از این علم در داروسازی استفاده شد. سیستم‌های داروسازی مانند: لیپوزوم‌ها، نانو ساختارهای ژلاتینی و میسل‌ها می باشند. پیشرفت در علم نانوتکنولوژی باعث ایجاد ذرات نانو با ساختارهای متعددی چون

نقاط کوانتومی، نانوذرات طلا، نانو شنل ها، نانوتیوب های کربن شده و نانوذرات پارامغناطیسی شده است. استفاده از این نانو ذرات ها در تشخیص و درمان سرطان، تشخیص آپوپتوز به وسیله تصویر برداری رزونانس مغناطیسی و نقشه برداری گره های لنفوی مستعد به سرطان، کمک شایانی در علم سرطان شناسی کرده است (۵). این عوامل نانو موجب درمان های راحت تر، موثر تر، درمان با سمیت کمتر، افزایش نیمه عمر محصولات درمانی و کاهش هزینه های درمان می شود. نانو ذرات می توانند به تشخیص ناهنجاری هایی چون وجود اجزای ویروسی و سلول های پروتوانکوژن کمک شایانی کند. عوامل کنتراست دهنده تصویر برداری باعث افزایش اختصاصیت تصویربرداری رزونانس مغناطیسی<sup>۱۵۸</sup> (MRI) شده است (۷). استفاده از نانو ذرات به عنوان حامل های دارو، مزایایی چون جذب سلولی بالاتر، افزایش فارماکوکینتیک دارو، توزیع زیستی قابل قبول به علت افزایش نفوذپذیری و نگه داری دارو<sup>۱۵۹</sup> (EPR) می باشد (۸). نانوذرات در سیستم های عروقی معیوب، مانند تومور های توپر که دارای سیستم عروقی منفذدار و آسیب دیده هستند، بیشتر تجمع پیدا می کنند که به این فرایند پدیده هدف گیری غیر فعال<sup>۱۶۰</sup> با استفاده از اثر نفوذ پذیری گفته می شود (۹). استفاده از نانوذرات در زمینه تشخیص و درمان سرطان ها، موجب ایجاد یک شاخه علمی جدید انکولوژی به نام نانوانکولوژی گردیده است (۱۰، ۱۱). نانو کریستال های فلورسنت القایی<sup>۱۶۱</sup> مانند ذرات کوانتوم کونژوگه شده با آنتی بادی می باشند که تعیین کننده دقیق مقدار آن ها در یک قطعه کوچک تومور مانند تومور سینه می شود (۱۲). از جمله نانو ذرات دیگر که در تصویر برداری تومور سرطانی و تعیین متاستاز محیطی مورد بحث قرار گرفته اند: نانوپروب ها<sup>۱۶۲</sup>، نانوکانتیلر ها<sup>۱۶۳</sup> و نانوذرات کوپل شده با لیگاندها اختصاصی می باشند (۱۳). نانوپارتنیکل ها به عنوان حامل دارویی محدودیت هایی از جمله: توزیع دارو های سایتوتوکسیک در هر دو سلول سرطانی و سالم، سمیت دارویی، امکان عود بیماری، دوز بالای دارو رسانی برای درمان به دلیل دفع سریع دارو ها و توزیع گسترده در اکثر ارگان ها و بافت ها را در درمان سرطان را از بین برده است. این ساختار باعث کاهش سمیت دارو و کاهش عوارض دارویی، افزایش بقای دارو در جریان خون و همچنین باعث افزایش کارایی دارو درمانی می گردند (۱۴، ۱۵). از جمله نانو حامل های سازگار با بدن می توان به برخی پلیمر ها، لیپوزوم ها، میسل ها، آنتی بادی های مهندسی شده و پپتید ها اشاره کرد (۱۶، ۱۷). نانو مواد طوری طراحی می شوند که خواص فیزیکی، شیمیایی مطلوب برای انتقال دارو به صورت هدفمند به محیط دینامیک توموری و ایجاد اثرات بالای درمانی با سمیت کمتر و همچنین قابلیت عبور از سد های بیولوژیکی را داشته باشند قابلیت هایی که دارو های سنتی آنها را ندارند (۱۵، ۱۸). رینگدورف<sup>۱۶۴</sup> در سال ۱۹۷۵ مدل کونژوگه دارو به پلیمر که با افزایش دارو رسانی در درمان سرطان همراه می شد را گزارش داد (۱۹). به منظور اثر دهی هر چه بهتر و گسترده تر دارو های سایتوتوکسیک، این دارو ها در ابتدا باید از جریان خون خارج گردند و پس از خروج از فضای خارج سلولی، از سطح غشای بافت سرطانی بگذرند و وارد سلول های سرطانی هدف شوند (۲۰، ۲۱). هنگام طراحی نانوپارتنیکل ها باید به یکسری خواص توجه لازم شود، از جمله: اجتماع دارو به صورت غیر فعال در بافت های سرطانی، رها کردن مستمر دارو، هدف قرار دادن رسپتور ها و آنتی ژن های سطح سلول سرطانی، رهاپیش دارو به سیتوپلاسم و جلوگیری از تجزیه آنزیمی (۱۵، ۲۲، ۲۳).

<sup>158</sup> Magnetic resonance imaging

<sup>159</sup> Enhanced permeability and retention

<sup>160</sup> Passive targeting

<sup>161</sup> Semiconductor fluorescent Nanocrystal

<sup>162</sup> Nano probs

<sup>163</sup> Nanocantiliers

<sup>164</sup> Ringdorf

### سیستم تحویل دارو بر اساس نانوتکنولوژی

بعد از تشکیل نانو پارتیکل ها دارو به آن ها افزوده شده و توسط آن ها جذب می شود که به وسیله ی انکو باسیون حامل های نانویی با یک داروی محلول غلیظ به دست می آید (۲۴، ۲۵). پلیمر مناسب برای اکثر نانو پارتیکل ها پلی اتیلن گلیکول می باشد زیرا اثر ضدی بر روی بارگیری دارو ندارد و اختلالی هم ایجاد نخواهد کرد (۲۶). بیشتری بازدهی بارگیری دارو در نقطه ی ایزوالکتریک می باشد (۲۷). پوشیده شدن نانو پارتیکل ها با پلیمر به کنترل رهایش دارو در غشای پلیمری کمک می کند. اگر دارو با اجرای کمی تداخل پیدا کند، محلول آبی کمتری شکل گرفته و موجب کاهش رها سازی می شود (۲۸). یوکونژوگه های شیمیایی باعث اتصال بیومولکول ها به سطوح جامد از جمله طلا، سیلیکون و ... می گردد. یک نوع بیوکونژوگاسیون، متد مستقیم کونژوگاسیون کربوکسیلیک اسید (COOH-) با امین نوع اول (NH<sub>2</sub>-) به وسیله ی کربودی ایمید<sup>۱۶۵</sup> می باشد (۲۹). برای اتصال آنتی بادی ها بر روی سطوح جامد از EDC/NHS<sup>۱۶۶</sup> استفاده می شود، که یک راه حل برای غلبه بر محدودیت نانوحامل ها در درمان توده های سرطانی می باشند (۳۰، ۳۱). شناسایی و هدف قرار دادن توده های سلولی متاستاز دهنده ی سرطانی کاری بسیار دشوار است تا بتوان هدف درمانی را برای توده ی سرطانی القا کرد (۳۲). از مشکلات مطرح در طراحی کونژوگاسیون نسل اول داروها به آنتی بادی ها عدم پایداری شیمیایی لینکر ها بوده که در نهایت موجب اثر بخشی ضعیف می شود (۳۳). از مشکلات دیگر در هدف گیری فعال دارو های ضد سرطانی، عدم پایداری نانو ذرات در جریان خون از نظر فیزیکی شیمیایی می باشد (۳۴). اخیرا قسمتی از این مشکلات با پیشرفت نانو تکنولوژی برای درمان سرطان حل شده است اما هنوز مشکلاتی پیش روی کادر درمان و پژوهش قرار دارد (۳۵).

### نانوذرات مورد استفاده در پزشکی

نانوذرات مورد استفاده در این حیطه دو گروه می باشند. نانوذرات آلی که حاوی مولکول های آلی در ساختمان اصلی خود بوده و نانوذرات معدنی که به عنوان هسته مرکزی کاربرد دارند. از نانو ذرات آلی می توان به اپتامر ها و نانو بادی ها اشاره کرد (۳۶، ۳۷). اپتامر ها به عنوان ابزاری برای درمان سرطان شناخته شده اند که مولکول های الیگونوکلیوتیدی با اختصاصیت بالا جهت هدف قرار دادن مولکول های هدف از جمله پروتئین ها و حتی سلول ها می باشند. RNA اپتامر دارای انعطاف پذیری بیشتر نسبت به DNA اپتامر می باشد (۳۷). از اپتامر ها می توان در سیستم های تحویل دارو استفاده کرد (۳۸). نانو بادی ها، نانوذراتی با حلالیت بوده که اختصاصیت بالایی نیز نسبت به آنتی ژن خود دارند. بنابر این برای تشخیص و درمان بسیار می توانند حایز اهمیت باشند (۳۹). به این آنتی بادی ها، زنجیره سنگین آنتی بادی<sup>۱۶۷</sup> و یا به اختصار HCabs گفته می شود به این دلیل که فاقد زنجیره ی سبک و ناحیه ثابت زنجیره سنگین CH1 می باشند و تنها واجد زنجیره ی سنگین و حوزه های CH2 و CH3 می باشند (۳۹). در مطالعه ای که ونلمپ و همکارانش<sup>۱۶۸</sup> بر روی موش ها انجام دادند، استفاده از این آنتی بادی ها موجب کاهش متاستاز در غدد پستانی موش های نمونه شد (۴۰).

### ژن درمانی در درمان سرطان

ژن درمانی به معنای انتقال ژن های سرکوب کننده و افزایش پاسخ ایمنولوژیکی با استفاده از ژن های مقاومت به دارو می باشد (۴۱). نانوذرات برای انتقال DNA و RNA برای انتقال ژن در درمان انواع سرطان ها مفید خواهند بود (۴۲).

<sup>165</sup> Carbodimide

<sup>166</sup> Nethyl N-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide / N-hydroxy succinimide

<sup>167</sup> heavy chain Antibody

<sup>168</sup> Van Impe et al.

### استفاده از نانوتکنولوژی در تشخیص و درمان سرطان

عکس برداری از طریق تشدید مغناطیسی، اشعه‌ی ایکس انجام می‌شود که به علت عدم سرعت کافی و عدم حساسیت مورد نیاز، بیماری را پس از پیشرفت، تشخیص می‌دهد (۴۳). نانوتکنولوژی ابزارهای نوآورانه‌ای ارائه می‌کند که چرخه زندگی سلول‌های طبیعی و نقطه‌ای را که در آن فرآیندها و تغییرات مولکولی درون سلول‌ها با توسعه سرطان مرتبط می‌شود، روشن می‌کند. نانوذرات می‌توانند حجم زیادی از اطلاعات را از یک منبع کوچک به دست پژوهشگران برسانند. نانوذرات به تجزیه و تحلیل پارامترهایی مانند مکانیک سلولی، مورفولوژی و اسکلت سلولی کمک می‌کنند که دستیابی به آن با استفاده از فناوری معمول دشوار است. دستگاه‌های نانو می‌توانند سلول‌های سرطانی را شناسایی کنند، علائم سرطان را شناسایی کنند و داروهای ضد سرطان و مواد کنتراست را به سلول‌های تومور تحویل دهند. فناوری نانو ابزار بالقوه‌ای است که می‌تواند به شناسایی تغییرات مولکولی و تمرکز بر تلاش‌های پیشگیرانه کمک کند برای بیماران که در وضعیت خفیف قرار دارند از حسگرهای قابل کاشت استفاده می‌شود. این حسگرها امکان کنترل شیمی خون و فشار را دارند. همچنین می‌توان با ابزاری به کمک این حسگرها وضعیت درونی بدن را گزارش کرد و تشکیل تومور را تشخیص داد (۴۴). لیزهای مادون قرمز نیز برای رشته‌های DNA و RNA با طول موج حدوداً یک میکرومتر حایز اهمیت هستند. با مطالعه بیومولکول‌ها می‌توان فهمید که این بیومولکول‌ها، جذب در این طول موج را به کمترین مقدار خود می‌رسانند و در نهایت از سرطانی شدن بر اثر گرمای ناشی از جذب تا حد امکان جلوگیری می‌کنند (۴۵). نانوتکنولوژی در ژنتیک مولکولی و سلولی و همچنین بیوتکنولوژی این امکان را می‌دهد تا اجزا و ترکیبات مورد نیاز را درون سلول قرار داد. نانوتکنولوژی از این جهت که به عنوان جدیدترین فناوری شناخته شده است، از علوم راهبردی بوده و اهمیت آن از تکنولوژی هسته‌ای بیشتر می‌باشد (۴۶)، (۴۷).

### نتیجه‌گیری

به طور خلاصه می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که با استفاده از نانوتکنولوژی امکان طراحی داروهای اختصاصی و حامل‌های دارویی برای بیماری سرطانی همراه با نتیجه‌ی بهتر و اثرات سمیت کمتر بوده و امکان شناسایی و عکسبرداری ماکروهای زیستی برای تشخیص سرطان را فراهم می‌کند. استفاده از ذرات نانو، عوارض جانبی دارو را کاهش داده و همچنین کیفیت زندگی فرد مبتلا به سرطان را افزایش خواهد داد. هدف اصلی در نانوتکنولوژی تشخیص زود هنگام و امکان درمان سلول‌های توموری با کمترین اثر سوء بر سایر ارگان‌های بدن می‌باشد که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با روش MRI و همچنین با بارگیری داروهای شیمی درمانی در حامل‌های نانوذرات به صورت هم‌زمان، بسیاری از مشکلات مربوط به بیماری سرطان را مرتفع ساخته است. در امر تشخیص و تصویربرداری، نانوذرات طلا و نقره با تجمع در محل تومور و ایجاد نور و گرما در بافت تومور، کاندیدای مناسبی خواهند بود. با توجه به پیشرفت نانوتکنولوژی در حیطه‌ی تشخیص و درمان انواع سرطان و ساخت ذرات نانو با ویژگی‌های مطلوب و هدفمند امکان تسریع تشخیص دقیق تر با افزایش بازده درمانی بیشتر به همراه کاهش هزینه‌های درمان فراهم خواهد شد.

### قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و اساتید و داوران مربوطه جهت فراهم کردن شرایط نگارش این مقاله تشکر و قدردانی می‌گردد.

### References:

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for hispanics/latinos, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2012; 62(5): 283-98.

2. Boyle P, Langman MJ. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *Bmj*. 2000; 321(7264): 805-8.
3. Foldvari M. HPV infections: can they be eradicated using nanotechnology? *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. 2011; 8(2): 131-5.
4. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2020; 40(5): 602-8.
5. Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, Delano M, Cance WG, Grobmyer SR. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*. 2006; 107(3): 459-66.
6. Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Zarrintan MH, Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 2014; 44: 278-84.
7. Zhang L, Gu F, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology & therapeutics*. 2008;83(5):761-9.
8. Zeng X, Tao W, Mei L, Huang L, Tan C, Feng S-S. Cholic acid-functionalized nanoparticles of star-shaped PLGA-vitamin E TPGS copolymer for docetaxel delivery to cervical cancer. *Biomaterials*. 2013;34(25):6058-67.
9. Bakhtiary Z, Saei AA, Hajipour MJ, Raoufi M, Vermesh O, Mahmoudi M. Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: Possibilities and challenges. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016;12(2):287-307.
10. Jain KK. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clinica chimica acta*. 2005;358(1-2):37-54.
11. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature reviews cancer*. 2005;5(3):161-71.
12. Yezhelyev M, Morris C, Gao X, Nie S, Lewis M, Cohen C, editors. Multiple profiling of human breast cancer cell lines with quantum dots–Ab conjugates. *Proc Am Assoc Cancer Res*; 2005; 510
13. Fortina P, Kricka LJ, Surrey S, Grodzinski P. Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. *TRENDS in Biotechnology*. 2005;23(4):168-73.
14. Leroux J-C, Allémann E, De Jaeghere F, Doelker E, Gurny R. Biodegradable nanoparticles—from sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1996;39(2-3):339-50.
15. Kanapathipillai M, Brock A, Ingber DE. Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;79:107-18.
16. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Nano-Enabled Medical Applications*. 2020:159-203.
17. Alexis F, Pridgen EM, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Drug delivery*. 2010:55-86.
18. Hofheinz R-D, Gnad-Vogt SU, Beyer U, Hochhaus A. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anti-cancer drugs*. 2005;16(7):691-707.
19. Ringsdorf H, editor *Structure and properties of pharmacologically active polymers*. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*; 1975: Wiley Online Library; 135-53.
20. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(10):750-63.

21. Rizzo LY, Theek B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Current opinion in biotechnology*. 2013;24(6):1159-66.
22. Bazak R, Hourri M, El Achy S, Hussein W, Refaat T. Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Molecular and clinical oncology*. 2014;2(6):904-8.
23. Vasir JK, Labhasetwar V. Targeted drug delivery in cancer therapy. *Technology in cancer research & treatment*. 2005;4(4):363-74.
24. Govender T, Riley T, Ehtezazi T, Garnett MC, Stolnik S, Illum L, et al. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2000;199(1):95-110.
25. Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2004;93(7):1804-14.
26. Peracchia MT, Gref R, Minamitake Y, Domb A, Lotan N, Langer R. PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *Journal of Controlled Release*. 1997;46(3):223-31.
27. Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical research*. 1997;14:1431-6.
28. Chen Y, McCulloch R, Gray B. Synthesis of albumin-dextran sulfate microspheres possessing favourable loading and release characteristics for the anticancer drug doxorubicin. *Journal of controlled release*. 1994;31(1):49-54.
29. Shamsi F, Coster H, Chilcott T. Characterization of the dielectric properties of covalently attached organic films on silicon surfaces. *Thin solid films*. 2011;519(19):6472-9.
30. Jazayeri MH, Amani H, Pourfathollah AA, Pazoki-Toroudi H, Sedighimoghaddam B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and bio-sensing research*. 2016;9:17-22.
31. Ansell SM, Harasym TO, Tardi PG, Buchkowsky SS, Bally MB, Cullis PR. Antibody conjugation methods for active targeting of liposomes. *Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications*. 2000:51-68.
32. Coleman R. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer treatment reviews*. 2001;27(3):165-76.
33. STAFF A, Committee S. Cancer progress report. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(19):1-128.
34. Matsumura Y, Kataoka K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer science*. 2009;100(4):572-9.
35. Bagi CM. Targeting of therapeutic agents to bone to treat metastatic cancer. *Advanced drug delivery reviews*. 2005;57(7):995-1010.
36. Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Research*. 2002;4:1-5.
37. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical microbiology and immunology*. 2009;198:157-74.

38. Hosseini-Zijoud S-M, Zarei S, Ghasemi H, Mahmoodi M, Abbasalipourkabir R. Aptamers and their biological-therapeutical applications: A review article. *Pajouhan Scientific Journal*. 2013;12(1):11-26.
39. Jain KK. Personalised medicine for cancer: from drug development into clinical practice. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2005;6(9):1463-76.
40. Van Impe K, Bethuyne J, Cool S, Impens F, Ruano-Gallego D, De Wever O, et al. A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. *Breast cancer research*. 2013;15:1-15.
41. Takahashi S, Ito Y, Hatake K, Sugimoto Y. Gene therapy for breast cancer.—Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital. *Breast Cancer*. 2006;13:8-15.
42. Hayes M, Drummond D, Kirpotin D, Zheng WW, Noble C, Park J, et al. Genospheres: self-assembling nucleic acid-lipid nanoparticles suitable for targeted gene delivery. *Gene Therapy*. 2006;13(7):646-51.
43. Frangioni JV. New technologies for human cancer imaging. *Journal of clinical oncology*. 2008;26(24):4012-21.
44. Ravindran R. Nanotechnology in cancer diagnosis and treatment: An overview. *Oral Maxillofac Pathol J*. 2011;2:101-6.
45. Rudolph AS. Biomaterial biotechnology using self-assembled lipid microstructures. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;56(2):183-7.
46. Svoboda K, Block SM. Biological applications of optical forces. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 1994;23(1):247-85.
47. Musgrave CB, Perry JK, Merkle RC, Goddard WA. Theoretical studies of a hydrogen abstraction tool for nanotechnology. *Nanotechnology*. 1991;2(4):187.



## سوخت زیستی و پتانسل نسل ۳ (جلبک‌ها)

شهریار صالحی<sup>۱\*</sup>، حدیثه اعرابی<sup>۲</sup>، فاطمه بگوردی<sup>۳</sup>

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۴. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۵. کارشناسی ارشد فیزیک، مدرسه دخترانه شاهد فاطمه زهرا، آموزش و پرورش ناحیه ۱ شهرکرد، شهرکرد، ایران. (کد پرسنلی ۵۸۶۷۳۴۰۰)

### چکیده

سوخت‌های مورد استفاده ما به دو دسته تجدید ناپذیر و تجدید پذیر تقسیم می‌شوند. سوخت‌های زیستی از منابع بیولوژیکی به دست می‌آیند. از اثرات مثبت سوخت‌های زیستی می‌توان به پایدار بودن و همچنین کاهش اثرات گازهای گلخانه‌ای و آلاینده‌ها در مقایسه با سوخت‌های فسیلی اشاره کرد. یکی از دلایل کاهش آلاینده‌ها توسط این نوع سوخت‌ها سهم ۱۰ درصد اکسیژن موجود در آن‌ها می‌باشد. می‌توانیم انتشار گازهای گلخانه‌ای را کاهش دهیم و همینطور با بازیافت آن‌ها اثرات منفی آن‌ها را به اثرات مثبت تبدیل کنیم. سوخت‌های زیستی به سه نسل تقسیم می‌شوند. سوخت‌های زیستی نسل اول از روغن گیاهی و حیوانی به دست می‌آیند، مانند بیواتانول. نسل دوم سوخت‌های زیستی از ضایعات کشاورزی مانند تفاله نیشکر به دست می‌آید. نسل سوم شامل جلبک‌های فتوسنتز کننده می‌باشد که باعث آزاد شدن اکسیژن می‌شوند. اما نسل سوم سوخت‌های زیستی معایب بسیاری دارد. به دلیل داشتن چنین معایبی تاکنون از این سوخت‌ها به صورت گسترده استفاده نشده است. یکی از معایبی که سوخت‌های این نسل دارند هزینه بسیار بالا می‌باشد. سوخت‌های نسل سوم پتانسیل بسیار بالایی در برابر سوخت‌های نسل اول و دوم دارند. نسل‌های پیشین به منابعی مانند مواد غذایی و تفاله‌های زیستی نیاز دارند اما نسل سوم سوخت‌های زیستی تنها به نور خورشید و آب برای تولید نیاز دارند.

**نتیجه گیری:** نسل سوم سوخت‌های زیستی نسبت به نسل اول و دوم امکان پیشرفت بسیار بالایی دارند. از این رو می‌توان با برنامه‌ریزی درست و استفاده از این سوخت‌ها در جهت کاهش اثرات گازهای گلخانه‌ای و همینطور آلاینده‌های موجود در اتمسفر زمین قدم بزرگی در جهت بهبود کیفیت زندگی انسان‌ها برداشت.

**واژگان کلیدی:** انرژی تجدیدپذیر، سوخت‌های زیستی، آلاینده‌ها، جلبک.

نشانی نویسنده مسئول: ایران، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

همراه: ۰۹۳۹۰۶۰۵۲۹۸

تلفن: ۰۹۳۹۰۶۰۵۲۹۸

پست الکترونیکی: shahriarsalehi333@gmail.com

### 3rd generation biofuel and potential (algae)

Shahriyar Salehi<sup>1\*</sup>, Hadiseh Aarabi<sup>2</sup>, Fatemeh Bagverdi<sup>3</sup>

1. Master's student, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. B.Sc Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Shahid Fatemeh Zahra Girls' School, Education District 1, Shahrekord, Iran. (ID: 58673400)

#### Abstract

The fuels we use are divided into two categories: non-renewable and renewable. Biofuels are obtained from biological sources. Among the positive effects of biofuels, we can point out that they are stable and also reduce the effects of greenhouse gases and pollutants compared to fossil fuels. One of the reasons for the reduction of pollutants by these types of fuels is the 10% share of oxygen in them. We can reduce the emission of greenhouse gases and also turn their negative effects into positive effects by recycling them. Biofuels are divided into three generations. First generation biofuels are obtained from vegetable and animal oil, such as bioethanol. The second generation of biofuels is obtained from agricultural waste such as sugarcane pulp. The third generation includes photosynthetic algae that release oxygen. But the third generation of biofuels has many disadvantages. Due to these disadvantages, these fuels have not been widely used. One of the disadvantages of the fuels of this generation is their high cost. Third generation fuels have a very high potential compared to first and second generation fuels. The previous generations need resources such as food and biological waste, but the third generation of biofuels only need sunlight and water for production. **Conclusion:** The third generation of biofuels have a very high possibility of improvement compared to the first and second generation. Therefore, with proper planning and use of these fuels in order to reduce the effects of greenhouse gases and pollutants in the earth's atmosphere, a big step can be taken to improve the quality of human life.

**Keywords:** renewable energy, biofuels, pollutants, algae.

#### مقدمه

سوخت‌های زیستی از دید کلی به خاطر پایداری بودن کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای و ساختار اجتماعی و کشاورزی بسیار مهم هستند (۱). در جهان امروزی چند مشکل اساسی وجود دارد. برخی از این مشکلات آلودگی هوا، تغییرات اقلیمی، هزینه سوخت، آلاینده بودن سوخت مصرفی، تجدید ناپذیر بودن سوخت‌های مصرفی کنونی هستند. منابع در دسترس ما به دو دسته تجدیدپذیر و تجدیدناپذیر تقسیم می‌شوند. سوخت‌هایی را که بتوان با استفاده از محیط به دست آورد که قابل جایگزینی باشند و همچنین آلودگی کمی داشته باشند را منابع تجدیدپذیر می‌گویند منابع تجدیدپذیر عبارتند از انرژی خورشیدی، بادی، آبی، زمین گرمایی و غیره. برخی از منابع تجدیدناپذیر عبارتند از نفت، گاز و سوخت‌های فسیلی (۲ و ۳ و ۴ و ۵). در جهان امروز جوامع به دلیل بحران انرژی، آلودگی هوا، آثار زیست محیطی، کمبود انرژی، افزایش گازهای گلخانه‌ای و توسعه صنعت و توسعه شهرها به به دنبال منابعی برای جایگزینی سوخت‌های فسیلی می‌باشند (۳ و ۴ و ۵). با انتشار گازهای گلخانه‌ای در بخش حمل و نقل که به علت وجود سوخت‌های فسیلی تولید می‌شوند، مقدار گازهای گلخانه‌ای بسیار افزایش یافته است (۶ و ۷). یکی از انواع منابع تجدیدپذیر، سوخت‌های زیستی می‌باشد که مانع از انتشار گازهای گلخانه‌ای و گازهای سمی می‌شوند. این سوخت با محیط زیست سازگار بوده است و در اکثر منابع موجود در طبیعت وجود دارند (۴ و ۸ و ۹). به همین علت برای جلوگیری از گرم شدن کره زمین و افزایش نیافتن اثرات گازهای گلخانه‌ای و آلودگی هوا لازم هست که اثرات گازهای گلخانه‌ای کاهش یابند. به این منظور لازم است که چرخه کربن در اتمسفر زمین متوقف شود. می‌توان با بازیافت گازهای گلخانه‌ای اثرات منفی را به اثرات مثبت تبدیل کرد. بهترین راه موجود برای انجام این

عمل استفاده از منابع گیاهی مانند گیاهان و جلبکها است. منابع گیاهی به دلیل فرایند فتوسنتز می‌توانند گازهای گلخانه‌ای را بازیافت کنند (۱۰).

### یک دیده کلی به انرژی زیستی

یکی از راه‌های کاهش اثرات گازهای گلخانه‌ای تولید انرژی زیستی از منابع زیستی و زیست محیطی و جایگزین کردن‌های سوخت‌های فسیلی با آنها است. سوخت‌های زیستی از سه روش به‌دست می‌آیند. این روش‌ها ترموشیمیایی، سنتز و تخمیر می‌باشند (۱۰).

### سوخت زیستی

سوخت زیستی به سوخت سبز و جایگزین منابع و سوخت‌های تجدیدناپذیر گفته می‌شود. این نوع سوخت از منابع آلی و بیولوژیکی به دست می‌آید، در واقع این سوخت از زیست توده به دست می‌آید. ماهیت سوخت زیستی به گیاهان بر می‌گردد (۴). مطالعات نشان داده است که استفاده کردن از سوخت‌های زیستی باعث کاهش آلاینده‌هایی همچون مونوکسیدکربن، دی اکسید گوگرد و ذرات معلق می‌شود (۱۰ و ۱۱). سوخت‌های زیستی به دلیل سهم ۱۰ درصد اکسیژنی که دارا می‌باشند آلاینده کمتری نسبت به دیگر سوخت‌های مورد استفاده دارند (۱۲). یکی دیگر از دلایل مقدار کم آلاینده‌های سوخت‌های زیستی عدم وجود گوگرد و ترکیبات آروماتیک می‌باشد. عدم وجود گوگرد باعث می‌شود اکسیدهای گوگردی حذف شوند. نبود اکسیدهای گوگردی باعث می‌شود خوردگی که توسط ترکیبات گوگردی در موتور اتفاق می‌افتد کاهش یابد (۱۳). از جمله معایب سوخت‌های زیستی می‌توان به ایجاد مشکلاتی برای موتور در هنگام سردی هوا به وجود می‌آورد اشاره کرد. به دلیل وجود اکسیژن که دمای احتراق را بالا می‌برد، سوخت در موتور به حالت ژلاتینی تبدیل می‌شود. با افزودن برخی مواد می‌توان این مشکل را برطرف نمود. اما با این کار ممکن است اکسیدهای نیتروژن در آلاینده‌های خروجی از اگزوز افزایش یابند. این معطل را می‌توان با تنظیم اسپری سوخت در موتور رفع کرد (۱۱ و ۱۲).

### طبقه بندی سوخت‌های زیستی

سوخت‌های زیستی به سه دسته تقسیم می‌شوند. سوخت‌های نسل دوم و سوم را سوخت‌های زیستی پیشرفته می‌نامند. زیرا مسیر تولیدی نسل دوم و سوم در دست تحقیق و توسعه آزمایشگاهی قرار دارد. اما نسل اول از طریق تقطیر، تخمیر و روش‌های شیمیایی تثبیت شده به دست می‌آید. به همین علت به آن سوخت معمولی گفته می‌شود (۱۴).

### نسل اول سوخت‌های زیستی

نسل اول سوخت‌های زیستی، سوخت‌های سنتی و تجاری می‌باشند. این سوخت‌ها از روغن‌های گیاهی و حیوانی به دست می‌آیند. از جمله این سوخت‌ها می‌توان به سوخت‌های بیوگاز، بیودیزل، بیواتانول اشاره کرد (۴ و ۱۵ و ۱۶). از مضرات این نسل می‌توان به خطر افتادن چرخه تولید محصولات غذایی اشاره کرد که می‌تواند باعث ضرر اقتصادی قابل توجهی شود (۴).

### نسل دوم سوخت‌های زیستی

نسل دوم شامل ضایعات کشاورزی و خوراکی نمی‌شود. مواد اولیه این نسل شامل تفاله نیشکر، علف نقره‌ای، تفاله‌های جنگلی، کاه غلات، ضایعات جامد شهرداری‌ها، چمن‌های گیاهی و چوب می‌باشند (۴ و ۱۵ و ۱۶ و ۱۷). اما استخراج سوخت از مواد اولیه ذکر شده بسیار مشکل است. زیرا به فناوری پیشرفته و همچنین گران قیمتی نیاز دارد (۴ و ۱۵).

### نسل سوم سوخت‌های زیستی

نسل سوم سوخت‌های زیستی شامل میکروارگانیزم‌ها فتوسنتز کننده و جلبک‌ها و میکروجلبک‌ها می‌باشد (۴). پرورش و کشت جلبک‌ها به عنوان منبع غنی از چربی در آمریکا توسط دانشمندان مورد آزمایش قرار گرفته است. به دلیل ویژگی‌هایی همچون جذب نور خورشید و بازدهی بیشتر نسبت به گیاهان کشت شده در خشکی، جلبک‌ها نیاز به منابع کمی دارند و محدودیتی برای تولید سوخت و تداخل با منابع غذایی ندارند (۱۸). اما تاکنون به صورت جدی از جلبک‌ها به دلیل هزینه بسیار بالا و تضاد منافع با منابع و چرخه غذایی در مقیاس صنعتی استفاده تجاری نشده است (۱۹).

## جلبک‌ها

جلبک‌ها با انجام فرایند فتوسنتز اکسیژن آزاد می‌کند. اکسیژن آزاد شده به باکتری‌های هوازی کمک کرده تا در تجزیه مواد خام موجود در فاضلاب‌ها فعال باشند. مثل جلبک اسپایرولینا که در جذب فلزات سنگین همچون مس در تصفیه فاضلاب استفاده می‌شود. جلبک سارگاسوم در آب‌های گرم به فراوانی یافت می‌شود یک جاذب خوب برای فلزات سنگینی مانند کادیوم و سرب در فاضلاب کارخانه می‌باشد (۲۰).

## راه‌های رشد و تکثیر جلبک‌ها

جلبک‌ها برای رشد به شرایط خاصی نیاز ندارند. زیرا هم در آب‌های شور و هم در آب‌های شیرین و همچنین در پساب فاضلاب‌ها می‌توانند رشد میکنند. جلبک‌ها به مواد آلی کمتری نسبت به نسل اول سوخت‌های زیستی برای رشد نیاز دارند. جلبک‌ها برای رشد به نیتروژن و فسفر نیاز دارند. جلبک‌ها برای رشد به امکاناتی مانند آب، دی اکسید کربن، مواد مغذی و نور خورشید نیاز دارند (۱۰). دو روش رایج برای تکثیر جلبک وجود دارد. مورد اول استفاده از فتوبیوراکتورهای بسته و مورد دوم استفاده از استخرهای رو باز است. استفاده از استخر رو باز روشی ساده می‌باشد اما دارای مشکلات زیادی است. از جمله این مشکلات می‌توان نیاز به فضای بسیار بزرگ، عدم کنترل بر محیط رشد را نام برد (۹). سوخت زیستی می‌تواند به حفظ تنوع زیستی، بهبود شرایط زیستی، کاهش فرسایش خاک، پاکسازی آب، تثبیت دی‌اکسید کربن در خاک، و بازگرداندن باروری به زمین‌های کشاورزی تخریب شده کمک کند. همچنین، می‌تواند به عنوان منبع انرژی پایدار برای تولید برق یا سوخت‌های مایع مورد استفاده قرار گیرد. با این حال نیاز به مدیریت دقیق منابع آب، جلوگیری از تخریب زیستگاه‌های طبیعی و ارزیابی تأثیرات جانبی بسیار اهمیت دارد (۲۱). یکی از ایده‌های جالب و نوظهور جذب و ذخیره کربن می‌باشد. به این منظور می‌توان دی اکسید کربن را در هنگام رشد در تاسیسات انرژی حذف نمود. دی اکسید کربن جذب شده به مدت طولانی در مخازنی مانند سازه‌های زمین شناسی در زیر زمین و در رسوبات اعماق اقیانوس یا به صورت جامد مثل کربنات ذخیره می‌شود (۲۱ و ۲۲).

## اثرات اجتماعی و اقتصادی

صنعت سوخت زیستی از نظر اجتماعی و اقتصادی تأثیر مثبت بر درآمد و اشتغال دارد. این صنعت به بهبود درآمد و اشتغال فردی، همچنین به ارتقاء اقتصاد جهانی کمک می‌کند. بسیاری از کشورهای جهان سوم دارای بقایای کشاورزی و زمین‌های حاشیه‌ای می‌باشند. در حال حاضر بقایای زمین‌های کشاورزی به دلیل ارزش اقتصادی ناچیز توجه کمی به خود جلب کرده‌اند. اما استفاده از این زمین‌ها برای تولید سوخت زیستی، تقاضا برای این بقایا به عنوان مواد اولیه سوخت زیستی داخلی یا صادرات افزایش می‌یابد (۲۳).

## نسبت انرژی

تراز انرژی نسبت انرژی دریافتی از زیست سوخت به انرژی ورودی و داده شده به آن را نشان می‌دهد. این تراز به طور مستقیم به فرآیند تولید زیست سوخت وابسته است. با بهینه‌سازی فرآیندهای تولید زیست سوخت، می‌توان بهبود بالانس انرژی را ایجاد کرد. برای نیروگاه‌های برقایی، مقدار بالانس انرژی نزدیک به ۳۰۰ است. در حالی که برای چوب این مقدار بین ۱۰ تا ۲۰ و برای اتانول تولید شده از دانه جو مقدار بالانس انرژی ۱ است. اما با بهبود فرآیندها، می‌توان نسبت تراز انرژی زیست سوخت‌ها را به مراتب افزایش داد (۹).

## نتیجه‌گیری

در جامعه امروز سعی بر این است که استفاده از سوخت‌ها و انرژی‌هایی که بر پایه منابع تجدیدناپذیر هستند کاهش یافته. جایگزین کردن منابع زیستی که از منابع تجدیدپذیر هستند باعث کاهش آلاینده‌ها می‌شوند. زیرا علاوه بر اینکه باعث آلودگی هوا و تغییرات اقلیمی نمی‌شوند ممکن است تا چند دهه آینده منابع تجدیدناپذیر به پایان برسند. همچنین دانشمندان پی برده‌اند جایگزین کردن منابع تجدیدناپذیر با منابع تجدیدپذیر باعث کاهش آلاینده‌ها و گازهای گلخانه‌ای می‌شود. همینطور فرصت‌های شغلی ایجاد می‌شود.

اما در کنار ویژگی‌های مثبتی که ذکر شد ویژگی‌های منفی هم گفته شد. البته راهکارهایی هم که تا به امروز ارائه شده امیدوار کننده هستند. امید است در یک یا دو دهه اخیر راهکارهای بیشتری برای کاهش مضرات این سوخت‌ها ارائه شود.

### References:

1. Reijnders L. Conditions for the sustainability of biomass based fuel use. *Energy policy*. 2006; 37(4): 863-76.
2. Sevim C. Rapid climate change problem and wind energy investments for Turkey. *Energy Education Science and Technology Part A-energy Science and Research*. 2010; 25(1-2): 59-67.
3. Demirbas A. The social, economic, and environmental importance of biofuels in the future. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy*. 2017; 12(1): 47-55.
4. Mathimani T, Pugazhendhi A. Utilization of algae for biofuel, bio-products and bio-remediation. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2019; 17: 326-30.
5. Subsamran K, Mahakhan P, Vichitphan K, Vichitphan S, Sawaengkaew J. Potential use of vetiver grass for cellulolytic enzyme production and bioethanol production. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2019; 17: 261-8.
6. Change IC. Mitigation of climate change. Contribution of working group III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. 2014; 1454: 147.
7. Kusch-Brandt S. Urban Renewable Energy on the Upswing: A Spotlight on Renewable Energy in Cities in REN21's "Renewables 2019 Global Status Report". 2019; 8: 139.
8. Chi NT, Duc PA, Mathimani T, Pugazhendhi A. Evaluating the potential of green alga *Chlorella* sp. for high biomass and lipid production in biodiesel viewpoint. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2019; 17: 184-8.
9. Sharma J, Kumar SS, Bishnoi NR, Pugazhendhi A. Enhancement of lipid production from algal biomass through various growth parameters. *Journal of Molecular Liquids*. 2018; 269: 712-20.
10. Oidvat A. Microalgae, future sources of bioenergy production. *Journal of Renewable and New Energy*. 2014; 1(1): 16-20.
11. Erazo J, Sequera A, Parthasarathy R, Gollahalli S. Comparison of spray characteristics of biodiesel and diesel fuels. In 5th International Energy Conversion Engineering Conference and Exhibit (IECEC) 2007; 4816.
12. Tyson KS. Biodiesel handling and use guidelines. DIANE Publishing; 2009.
13. De Almeida SC, Belchior CR, Nascimento MV, dos SR Vieira L, Fleury G. Performance of a diesel generator fuelled with palm oil. *Fuel*. 2002; 81(16): 2097-102.
14. Murillo S, Miguez JL, Porteiro J, Granada E, Moran JC. Performance and exhaust emissions in the use of biodiesel in outboard diesel engines. *Fuel*. 2007; 86(12-13): 1765-71.
15. Jeswani HK, Chilvers A, Azapagic A. Environmental sustainability of biofuels: a review. *Proceedings of the Royal Society A*. 2020; 476(2243): e20200351.
16. Alam F, Mobin S, Chowdhury H. Third generation biofuel from algae. *Procedia Engineering*. 2015; 105: 763-8.
17. Sims RE, Mabee W, Saddler JN, Taylor M. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource technology*. 2010; 101(6): 1570-80.
18. Maity JP, Bundschuh J, Chen CY, Bhattacharya P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives—A mini review. *Energy*. 2014; 78: 104-13.
19. Wen Z, Johnson MB. Microalgae as a feedstock for biofuel production. 2009; 442-886.

20. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. Look back at the US department of energy's aquatic species program: biodiesel from algae; close-out report. National Renewable Energy Lab., Golden, CO.(US); 1998.
21. Kern JD, Gorelick DE, Characklis GW, Macklin CM. Multiobjective optimal siting of algal biofuel production with municipal wastewater treatment in watersheds with nutrient trading markets. *Journal of Water Resources Planning and Management*. 2019; 145(2): e04018092.
22. Pushpa BT, Rajasekaran S, Easwaran M, Murugan C, Algeri R, et al. ISSLS PRIZE in basic science 2023: Lactate in lumbar discs—metabolic waste or energy biofuel? Insights from in vivo MRS and T2r analysis following exercise and nimodipine in healthy volunteers. *European Spine Journal*. 2023; 1-3.
23. Demirbas A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied energy*. 2009; 86: 108-17.
24. Florini A. The International Energy Agency in global energy governance. *Global Policy*. 2011; 2: 40-50.

## مروری کوتاه بر جهش‌زایی هدفمند یا سایت محور

شهریار صالحی<sup>۱\*</sup>، عباس رحیمی کاهکشی<sup>۲</sup>

۳۹. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.  
۴۰. دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

برای نوشتن این مقاله مروری ۳۵ مقاله خوانده شد که از بین آن‌ها فقط ۱۵ مورد جهت نوشتن مقاله انتخاب شد. در این مقاله با یک دید کلی به صورت خلاصه روش تکنیک‌ها، مواد لازم و ابزارهای پایه را جمع‌آوری کرده‌ایم. اصول پایه در همه آزمایشات مشابه می‌باشد اما هدف و روش محققان متفاوت می‌باشد.

جهش‌زایی هدفمند یا سایت محور مبتنی بر PCR می‌باشد که جهش‌های نوکلئوتیدی برای مشخص کردن توالی‌های پلاسمیدی هستند. این تکنیک به محقق اجازه می‌دهد یک اسید آمینه خاص را بر اساس ویژگی‌هایی همچون ساختار و عملکرد پروتئین آن‌ها مورد مطالعه قرار بدهند. در این روش به دلیل دسترسی بهتر به توالی‌های ژنومی از گونه‌های متفاوت به کمک ابزارهای ویرایش ژنومی می‌توان به مشکلاتی همچون شکستگی‌های دو رشته‌ای DNA و الگوهای اهداکننده DNA غلبه کرد. این در دسترس بودن به تحقیقات پایه مورد نظر یا هدفمند به کمک ابزار PCR کمک بسیار زیادی کرده است. روش SDM یا site-directed mutagenesis به محققان کمک کرده است که مکانیسم، فرایند و عملکرد آن‌ها را کشف کنند. در جهش‌های عادی تعاملات پروتئین بهم‌زده می‌شود. دو روش وجود دارد که هر کدام از این روش‌ها چند مرحله دارند. روش دوم بیشتر برای توالی‌های بزرگ مانند ۱۳ یا ۱۷ کیلو باز کاربرد دارد. زمانی که ما از PCR برای این جهش‌زایی هدفمند استفاده می‌کنیم پرایمر طراحی می‌شود که آن ژن کدکننده مورد نظر ما را بتوانیم اضافه، حذف یا جایگزین کنیم.

**نتیجه‌گیری:** برای جهش‌زایی هدفمند روش‌های متفاوتی مانند SMLP و SDM وجود دارد. این روش‌ها برای انواع مختلف پلاسمیدها کاربرد دارند. استفاده از روش مناسب به نوع کار محقق بستگی دارد.

**واژگان کلیدی:** ویرایش ژنوم، جهش‌زایی هدفمند، جهش‌زایی سایت محور، ژن هدف، DNA دو رشته‌ای

نشانی نویسنده مسئول: ایران، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

همراه: ۰۹۳۹۰۶۰۵۲۹۸

تلفن: ۰۹۳۹۰۶۰۵۲۹۸

پست الکترونیکی: [shahriyarsalehi333@gmail.com](mailto:shahriyarsalehi333@gmail.com)

## A brief overview of targeted mutagenesis

Shahriyar salehi<sup>1\*</sup>, Abbas Rahimi-Kahkeshi<sup>2</sup>

1. Master's student, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. B.Sc Student in Microbiology, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

### Abstract

To write this review article, 35 articles were read, out of which only 15 were selected to write the article. In this article, with a general view, we have collected the techniques, necessary materials and basic tools. The basic principles are the same in all experiments, but the goal and methods of the researchers are different.

Targeted or site-directed mutagenesis is based on PCR, which are nucleotide mutations to specify plasmid sequences. This technique allows the researcher to study a specific amino acid based on features such as their protein structure and function. In this method, problems such as DNA double-strand breaks and DNA donor patterns can be overcome due to better access to genomic sequences from different species with the help of genome editing tools. This availability has greatly aided targeted or targeted basic research using PCR tools. The method of SDM or site-directed mutagenesis has helped researchers to discover the mechanism, process and function of enzymes. In normal mutations, protein interactions are disturbed. There are two methods, each of which has several steps. The second method is more applicable for large sequences such as 13 or 17 kilobases. When we use PCR for this targeted mutagenesis, the primer is designed in such a way that we can add, remove or replace the coding gene we want.

**Conclusion:** There are different methods for targeted mutagenesis such as SMLP and SDM. These methods are used for different types of plasmids. The use of the appropriate method depends on the type of researcher's work.

**Keywords:** Genome editing, Targeted mutagenesis, Site-directed mutagenesis, Target gene, Double-stranded DNA

### مقدمه

استفاده دقیق و کارآمد از ابزارهای ویرایش ژنومی مانند: شکستگی‌های دورشته‌ای DNA، الگوهای اهداکننده DNA، با بازسازی مبتنی بر همولوژی با مشکل مواجه شده است. در مطالعات اخیر در ارتباط با ابزارهای ویرایش ژنوم می‌توان بر چالش‌های قبلی غلبه کرد. همچنین به افزایش در دسترس بودن توالی‌های ژنومی برای بسیاری از گونه‌ها و استفاده از آن‌ها برای تحقیقات پایه و کاربردی به ابزارهایی که باعث اصلاح یک ژن به صورت خاص شوند نیاز است. که به آن‌ها اصلاحات هدفمند گفته می‌شود. می‌توان گفت یک نوع جهش برای بهبود آن ژن می‌باشد. فعال کننده‌های رونویسی موثر مانند نوکلئازها باعث می‌شود DNA دورشته‌ای در یک جای خاص شکسته شود (۱ و ۲). PCR یک ابزار قدرتمند و کاربردی است که از آن در جهش‌زایی دقیق سایت محور یا هدفمند site-directed mutagenesis (SDM) استفاده شود. یا site-directed mutagenesis (SDM) برای دانشمندان و مهندسان فراهم کرده تا مکانیسم‌ها و فرآیندهایی را برای درک روابط عملکردی ساختاری آنزیم‌ها و سایر پروتئین‌ها کشف کنند (۳).

### تعریف

جهش‌زایی سایت هدایت شده یک روش مبتنی بر PCR آزمایشگاهی برای جهش نوکلئوتیدهای مشخص شده از یک توالی در یک پلاسمید است. این تکنیک به فرد اجازه می‌دهد تا اهمیت نسبی یک اسید آمینه خاص برای ساختار، عملکرد پروتئین و تاخوردگی پروتئین را مطالعه کند (۴). جهش‌های معمولی برای برهم زدن تعاملات پروتئین، تقلید یا مسدود کردن تغییرات پس از ترجمه، یا خاموش کردن فعالیت آنزیمی طراحی شده‌اند. تغییرات غیر کدکننده اغلب برای تولید سازه‌هایی هستند که در برابر شکست از طریق RNA مقاوم هستند، استفاده می‌شوند (۵). ما در اینجا به طور خلاصه به ۲ روش که توسط محققان و نویسندگان جمع آوری شده است می‌پردازیم. هر دو روش شامل دو مرحله است: مرحله اول جهش مورد نظر توسط پرایمر PCR برای تکثیر بخشی از ژن هدف است. در مرحله دوم محصول PCR به عنوان مگاپرایمر برای تقویت ژن کامل حاوی جهش استفاده می‌شود. هر دو روش در نحوه



بازگرداندن ژن جهش یافته به ناقل شبیه‌سازی آن منحرف می‌شوند. در روش اول، کل پلاسمید ناقل در یک واکنش PCR تکثیر می‌شود. روش دوم متکی بر روش آنزیم محدودکننده ژن و ناقل و به دنبال آن است. در هر دو روش، همراه با جهش، یک نشانگر آنزیم محدود کننده توسط جهش‌های خاموش به ژن هدف وارد می‌شود تا امکان غربالگری سریع و راحت برای حضور جهش فراهم شود (۶ و ۷ و ۸).

#### روش اول

نسخه اصلاح شده از پروتکل جهش‌زایی PCR است. از دو واکنش PCR تشکیل شده که جهش همراه مکان به همراه محدود کننده نشان‌گر می‌باشد که مولکول‌های DNA حاوی جهش در هر رشته DNA هستند. همچنین مخلوط محصول PCR حاوی الگوی اصلی واکنش PCR است. این آنزیم محدود کننده فقط DNA حاوی سایت‌های GATC را که باقیمانده‌های آدنین آن متیله هستند، جدا می‌کند (۹ و ۱۰).

#### روش دوم

جهش‌زایی PCR با استفاده از پروتکل مگا پرایمر اصلاح شده است. این روش از سه آغازگر PCR و سه واکنش PCR استفاده می‌کند. به رشته پایینی پایین دست ژن هدف متصل می‌شود و محل شبیه‌سازی ۳' به ژن را حذف می‌کند و در پایین دست متصل می‌شود، اما محل شبیه‌سازی ۳' را دست نخورده باقی می‌گذارد. که جهش مورد نظر توسط یک پرایمر در واکنش PCR به ژن وارد می‌شود. محصول PCR که شامل بخشی از ژن هدف است، محل شبیه‌سازی ۳' را حمل می‌کند. محصول PCR با استفاده از Pup تولید و هیبرید می‌شود. PCR دوم پس از سه مرحله پر کردن PCR، یک PCR با استفاده از Pup و انجام می‌شود، PCR سوم پس از آن که فقط محصولات جهش یافته حامل محل شبیه‌سازی ۳' باقی ماندند انجام می‌شود. پس از آن در قطعه بزرگ ناقل شبیه‌سازی که با آنزیم محدود کننده شبیه‌سازی شکسته شده است، کلون می‌شود. معمولاً ۳۰ تا ۵۰ درصد کلون‌های به دست آمده حاوی محل نشانگر و جهش مورد نظر هستند (۹).

#### نحوه سنتز کردن DNA

هنگامی که PCR برای جهش‌زایی استفاده می‌شود، پرایمرها طوری طراحی می‌شوند که تغییرات مورد نظر را شامل شوند. این تغییرات عبارت‌اند از: جایگزینی، افزودن یا حذف. این جهش در طول پروتکل PCR گنجانده می‌شود و جایگزین توالی اصلی می‌شود. جهش‌های معرفی شده توسط PCR فقط می‌توانند در نواحی توالی مکمل پرایمرها و نه مناطق بین پرایمرها گنجانده شوند (۱۱). پروتکل PCR برای جایگزینی هدفمند مورد نظر شامل استفاده از پرایمر برای تغییرات هدفمند مورد علاقه است که به عنوان یک شکست غیر مکمل در توالی پرایمر رخ می‌دهد که جایگزین توالی اصلی می‌شود. پروتکل PCR برای اضافه کردن ترمینال، شامل اضافه کردن دنباله در انتهای ۵' پرایمر B است که با پرایمر مکمل A برای تقویت محصول جدید PCR که حاوی محصول پایانی است استفاده می‌شود. محصول PCR به خاطر توالی حذف شده کوتاه‌تر می‌شود (۱۲).

#### دید کلی تئوری و آزمایشگاهی

می‌توان گفت آغازگرهای رو به جلو و معکوس بر روی تغییرهای مورد نظر که در هر دو جهت کاملاً همپوشانی دارند نظارت دارند. گسترش این پرایمرها در اطراف کل پلاسمید که یک کپی از الگو با جهش درج شده ایجاد می‌کند. این پلاسمید جهش یافته به عنوان یک الگو برای تقویت بیشتر PCR عمل می‌کند. از آنجایی که پلاسمیدهای رشد یافته در *E. coli* متیله شده‌اند، اندونوکلاز محدود Dpn I، که مخصوص DNA متیله و همی متیله است، برای هضم الگوی اصلی استفاده می‌شود. سپس پلاسمید باقی مانده برای انتخاب و جداسازی DNA به *E. coli* تبدیل می‌شود (۵).

### افزونه‌های جهش‌زایی پرایمر

جهش‌زایی سایت هدایت شده توسط گسترش پرایمر شامل ترکیب پرایمرهای جهش‌زا در PCRهای مستقل و تو در تو قبل از ترکیب آنها در محصول نهایی هست. واکنش لازم قرار گرفتن پرایمرهای جانبی است (B و C) که در دو طرف ناحیه بوده، حذف شده است تا این ناحیه بخشی از قطعات AB و CD نشود. پرایمرهای B و C شامل توالی‌های دنباله ۵' هستند که بخش مکمل DNA هدف در بالادست است که برای حذف پرایمر C یا پایین دست برای حذف پرایمر B هستند. PCR نهایی دارای نواحی همپوشانی مکمل است به طوری که قطعه AB خواهد بود. در واکنش PCR دوم قطعه CD هیبرید می‌شود (۱۲ و ۱۳).

### مواد

برای انجام PCR معمولاً از این مواد استفاده می‌شود: پرایمرهای R و F، DNA، پلاسمید، dNTPs، بافرهای DNA پلیمراز، DNA پلیمراز مبتنی بر Pfu، آب تزریق، DPN I، Lysogeny Broth (LB media) و صفحات پتری (۵).

### وسایل مورد نیاز

PCR ترموسایکلر، حمام آب، انکوباکتور شیکر، انکوباکتور، سمپلر، صفحات پتری، ۰/۲-۱/۵ ml thin-walled PCR tubes، ۱۵-۱ ml sterile snap-cap tubes، polypropylene tubes (۵)

### خلاصه

جهش‌زایی هدایت یا هدفمند که روشی بسار ارزشمند برای مطالعه رابط ساختاری برای عملکرد پروتئین، بیان ژن و تغییرات در وکتور می‌باشد. این روش به کمک واکنش زنجیره پلیمرازی PCR که یک ابزار قدرتمند برای جهش‌های ژنتیکی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد اجازه هر تغییر در پلاسمید را می‌دهد. روش PCR جهش‌زایی توسعه یافته بوده که در جهش‌زایی مکانی هدایت یافته توسط افزونه‌های همپوشانی شده PCR برای اولین بار توسعه یافته است (۱۴ و ۱۵). این روش وقت گیر است چون محصولات PCR باید قبل از استفاده خالص، فسفریله و پیوند شوند. علاوه بر این، کارایی فسفوریلاسیون DNA معمولاً آنقدر پایین است که جهش‌زایی سایت هدایت شده گاهی اوقات موفق نمی‌شود، حتی اگر واکنش‌های PCR مؤثر باشد (۱۴).

### نتیجه گیری

روش‌های زیادی برای جهش‌زایی هدفمند وجود دارد. مانند: SMLP، SDM، Quich- chang، Soe-pcr. این روش‌ها برای انواع و اندازه مختلف پلاسمیدها کاربرد دارند. این روش‌ها را نمی‌شود در این مقاله قرار داد چون از نظر تکنیک، روش انجام، محل انجام جهش، اندازه پرایمر و همین طور استفاده از سیستم باکترایی و قارچی متفاوت هستند. همه این‌ها بستگی به خود محققان دارد که چگونه و بستگی به لزوم خود از چه تکنیکی و چه ابزارهایی استفاده کنند در این مقاله فقط نمای کلی از جهش‌زایی هدفمند یا سایت محور به صورت کلی گرد آوری شد.

### References:

1. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*. 2010; 11(9): 636-46.
2. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(1): 49-55.
3. Reikofski J, Tao BY. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnology advances*. 1992; 10(4): 535-47.
4. Botstein D, Shortle D. Strategies and applications of in vitro mutagenesis. *Science*. 1985; 229(4719): 1193-201.
5. Bachman J. Site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol*. 2013; 529: 241-8.

6. Wataru I, Hiroshi I, Yoshikazu K. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1991; 102(1): 67-70.
7. Perrin S, Gilliland G. Site-specific mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction and a single mutant primer. *Nucleic acids research*. 1990; 18(24): 7433-8.
8. Roth, M., Helm-Kruse, S., Friedrich, T., and Jeltsch, A. (1998) Functional roles of conserved amino acid residues in DNA methyltransferases investigated by sitedirected mutagenesis of the EcoRV adenine-M6-methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(23): 17333-17342.
9. Jeltsch A, Lanio T. Site-directed mutagenesis by polymerase chain reaction. *In Vitro Mutagenesis Protocols*. 2002: 85-94.
10. Lacks SA. [17] Purification and properties of the complementary endonucleases DpnI and DpnII. *In Methods in enzymology*. 1980; 65: 138-146.
11. Zoller MJ. New molecular biology methods for protein engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 1991; 2(4): 526-31.
12. Reikofski J, Tao BY. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnology advances*. 1992; 10(4): 535-47.
13. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1989; 77(1): 51-9.
14. Liu H, Naismith JH. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC biotechnology*. 2008; 8(1): 1-0.
15. Costa GL, Bauer JC, McGowan B, Angert M, Weiner MP. Site-directed mutagenesis using a rapid PCR-based method. *In vitro mutagenesis protocols*. 1996: 239-48.

## کاربردهای تشخیصی DNA آزاد در پلاسمای خون مادر (Cell Free DNA)

نازنین حیدری<sup>۱\*</sup>، پویا مولائی دزکی<sup>۲</sup>، پیام رازقی طهرانی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. استادیار گروه تکوین، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

### چکیده:

استفاده از خون و پلاسما برای تشخیص های مولکولی سالهاست که مورد توجه قرار گرفته است. DNA آزاد سلولی یا cell free DNA که اصطلاحاً cfDNA نیز نامیده می شود یک مولکول دو رشته ای با وزن مولکولی پایین (حدود ۱۸۰-۲۱ kb) است که بخش مهمی از اسید نوکلئیک های آزاد در پلاسما را تشکیل می دهد. برای اولین بار وجود DNA آزاد سلولی (cfDNA) در پلاسمای خون توسط Mandel و Métais در سال ۱۹۴۸ کشف شد. پس از آن در سال ۱۹۹۷ وجود DNA آزاد سلولی در پلاسمای خون زنان باردار توسط Lo و همکاران کشف شد که پایه و اساس آزمایش های غیر تهاجمی پیش از تولد را تشکیل داد. در سال ۲۰۰۸ تست های غیر تهاجمی (NIPT) از نظر بالینی در دسترس قرار گرفت و cfDNA جهت تشخیص تریزومی های جنین مورد استفاده قرار گرفت. به نظر می رسد منشأ اصلی DNA آزاد سلولی در پلاسمای مادر از پرزهای جفت می باشد که از طریق آپوپتوز آزاد شده و وارد گردش خون مادر می شوند. امروزه cfDNA کاربردهای بسیاری در زمینه تشخیص اختلالات جنینی (مانند آنیوپلوئیدی) و پیگیری وضعیت سلامت جنین دارد و برخلاف روش های تهاجمی که نیاز به نمونه برداری و بیوپسی بافت دارند cfDNA را می توان به راحتی از مایعات بدن جدا کرد. هدف از این مطالعه بررسی جنبه های مختلف cfDNA در پلاسمای مادر و کاربردهای آن جهت تشخیص پیش از تولد می باشد.

**نتیجه گیری:** امروزه cfDNA کاربرد های بسیاری در زمینه تشخیص اختلالات جنینی (مانند آنیوپلوئیدی)، تعیین جنسیت، تعیین RHD و پیگیری وضعیت سلامت جنین دارد و برخلاف روش های تهاجمی که نیاز به نمونه برداری و بیوپسی بافت دارند cfDNA را میتوان به راحتی از مایعات بدن جدا کرد بنابراین هیچ خطری برای مادر و کودک به همراه ندارد و در سه ماهه اول بارداری قابل انجام است. در واقع کشف این سلول ها انقلابی در زمینه تشخیص غیر تهاجمی قبل از تولد ایجاد کرده و راه جدیدی را در زمینه تحقیقات مامایی باز کرده است. تشخیص CFDNA با دانش و ابزار های امروزه آسان و ارزان است و در بلند مدت با توجه به توسعه فناوری میتواند بخش مهمی از خدمات بهداشت و درمان و همچنین غربالگری های پیش از زایمان ملی برای همه ی زنان باردار را تشکیل دهد.

**واژگان کلیدی:** cfDNA، DNA آزاد جنینی، پلاسما، تشخیص غیر تهاجمی.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۱۸۷۵۰۱۱

پست الکترونیک: Nazaninheidari7798@gmail.com

## Diagnostic applications of free DNA in maternal blood plasma (Cell Free DNA)

Nazanin Heydari<sup>1\*</sup>, Pooya Molai Dezaki<sup>2</sup>, Payam Razeghi Tehrani<sup>2</sup>

1. Master's Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Developmental Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

### Abstract

The use of blood and plasma for molecular diagnostics has been considered for years. Cell free DNA or cell free DNA, also known as CFDNA, is a double-stranded molecule with a low molecular weight (about 0.18-21 kb) that forms an important part of free nucleic acids in plasma. For the first time, the presence of cell-free DNA (cfDNA) in blood plasma was discovered by Mandel and Métais in 1948. After that, in 1997, the presence of cell-free DNA in the blood plasma of pregnant women was discovered by LO et al. In 2008, non-invasive tests (NIPT) became clinically available and cfDNA was used to detect fetal trisomies. It seems that the main source of cell-free DNA in maternal plasma is from It is the placental villi that are released through apoptosis and enter the mother's blood circulation. Today, cfDNA has many applications in the field of diagnosing fetal disorders (such as aneuploidy) and monitoring the health status of the fetus, unlike invasive methods that require tissue sampling and biopsy. cfDNA can be easily separated from body fluids. The aim of this study is to investigate the different aspects of cfDNA in maternal plasma and its applications for prenatal diagnosis.

**Conclusion:** The cfDNA system has many applications in the field of diagnosing fetal disorders (such as aneuploidy), determining sex, determining RHD, and the health status of the fetus, and invasive methods that require tissue sampling and biopsy can be used to remove cfDNA from liquids. Therefore, the body does not pose any risk to the mother and the child, and it can be done in the first trimester of pregnancy. In fact, the discovery of these cells has opened up a revolution in the fields of non-invasive prenatal diagnosis in the field of midwifery research. CFDNA diagnosis is easy and cheap with knowledge and tools, and in a long time, due to the development of technology, it can be important to establish health services and national prenatal screenings for all pregnant women.

**Keywords:** cfDNA, free fetal DNA, plasma, non-invasive diagnosis

### مقدمه:

استفاده از خون و پلاسما برای تشخیص های مولکولی سالهاست که مورد توجه قرار گرفته است، همچنین یکی از حوزه‌هایی که اخیرا بسیار مورد توجه قرار گرفته، جدا سازی مواد ژنتیکی موجود در خون مادر به عنوان هدفی برای تشخیص‌های غیر تهاجمی پیش از تولد می‌باشد. در این روش از DNA آزاد جنینی موجود در خون مادر جهت تشخیص اختلالات جنینی (مانند آنیوپلوئیدی، تریزومی و...)، تعیین جنسیت جنین و پیگیری وضعیت جنین استفاده می‌گردد. تا پیش از این جهت بررسی‌های مورد نظر از روش‌های تهاجمی مانند نمونه برداری از پرزهای کوریونی و آمینوسنتز استفاده می‌شد که خطر سقط جنین را به همراه داشت (۱).

**معرفی:** اصطلاح cell free nucleic acid برای انواع مختلفی از اسیدهای نوکلئیک آزاد پلاسما به کار برده می‌شود که شامل DNA ژنومی، DNA میتوکندریایی، DNA و RNA ویروسی و انواع میکرو RNAها می‌باشد و اخیرا وجود آن‌ها در پلاسمای خون گزارش شده است. DNA آزاد سلولی یا cell free DNA اصطلاحا cfDNA نیز نامیده می‌شود، یک مولکول دو رشته‌ای با وزن مولکولی پایین، حدود (۱۸-۲۱/۰ kb) است که به بخش‌های کوتاه (۷-۲۰۰) جفت باز و بخش‌های طولانی (تا ۲۱ kb) تقسیم می‌شود و قسمت مهمی از اسید نوکلئیک‌های آزاد پلاسما را تشکیل می‌دهد (۲).

**تاریخچه cfDNA:** کشف و درک DNA آزاد سلولی طی دهه‌های اخیر تکامل یافته است. نقاط عطف کلیدی در تاریخ کشف cfDNA به ترتیب آورده شده: اولین بار وجود DNA آزاد سلولی در پلاسمای خون در سال ۱۹۴۸ توسط Mandel و Métais کشف شد (۳). در سال ۱۹۷۷، Lo و همکارانش شروع به استفاده از cfDNA در تشخیص تومور کردند، اما متأسفانه به دلیل امکانات فنی بیولوژیکی مولکولی چندان موفق نبودند. آنها در سال ۱۹۹۷ مفهوم DNA جنین در خون مادر را مطرح کردند و شروع

به تشخیص RHD و جنسیت جنین در پلاسمای مادر با استفاده از تکنیک PCR کردند. این کشف پایه و اساس آزمایش‌های غیر تهاجمی پیش از تولد (NIPT) را تشکیل داد (۴ و ۵).

**روش‌های تهاجمی تشخیص قبل از زایمان:** جهت انجام تست‌های تشخیصی قبل از زایمان از دو روش نمونه برداری از پرزهای کوریونی و آمینوسنتز استفاده می‌شود. در روش اول از پرزهای بافت جفت نمونه برداری می‌کنند و طی هفته‌های یازدهم تا چهاردهم بارداری انجام می‌شود. در روش آمینوسنتز (قبل از هفته پانزدهم بارداری) یک سوزن را از طریق دیواره شکمی وارد رحم کرده و از مایع آمنیوتیک نمونه برداری می‌کنند تا مورد بررسی قرار گیرد. هر دو روش همانگونه که گفته شد تهاجمی بوده و خطر سقط جنین را به همراه دارند (۶-۹).

**روش‌های غیر تهاجمی تشخیص قبل از زایمان:** اساس روش‌های غیر تهاجمی بر روی استراتژی‌هایی برای تشخیص ماده ژنتیکی جنین در گردش خون مادر متمرکز شده است (۱۰).

**منشأ cfDNA:** همانگونه که گفته شد DNA آزاد جنینی می‌تواند از جفت عبور کند و وارد گردش خون مادر شود (۵). چندین منشأ مختلف برای cfDNA گزارش شده از جمله: بافت جفت، سلول‌های خونی جنین و انتقال مستقیم DNA از طریق غشای آمنیوتیک. هر چند شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهند منبع اصلی DNA آزاد جنینی در پلاسمای مادر سلول‌های تروفوبلاست جنینی می‌باشند. برخی از شواهد شامل این موارد هستند: امکان تشخیص زود هنگام cfDNA در خون مادر در هفته‌های اول بارداری (قبل از ایجاد گردش خون جفت جنین)، پاکسازی سریع DNA جنینی از خون مادر بلافاصله بعد از زایمان، وجود cfDNA در پلاسمای خون مادر در حاملگی‌های بدون جنین که فقط کیسه آمنیون و تروفوبلاست‌ها وجود دارند (۱۱). بررسی‌ها نشان داده DNA آزاد جنینی شامل حدود ۳ تا ۶ درصد از کل DNA آزاد سلولی در گردش خون مادر در اوایل و اواخر بارداری است (۹۴ تا ۹۷ درصد دیگر DNA آزاد سلولی مادر هستند) (۱۲). بنابراین تمایز و جدا سازی DNA آزاد جنینی از میان انبوهی از DNAهای آزاد سلولی پلاسمای مادر امری مهم و چالش برانگیز است. در حال حاضر بهترین روش جدا سازی و بررسی DNA آزاد جنینی روش PCR می‌باشد (۱۳). DNA آزاد جنینی از هفته چهارم بارداری قابل تشخیص و از هفته هفتم جهت بررسی مورد اطمینان است و غلظت آن با افزایش سن بارداری افزایش می‌یابد (۱۴).

**کاربردهای تشخیصی DNA آزاد جنینی:** به دلیل مشکلات جداسازی DNA آزاد جنینی از گردش خون مادر، پتانسیل تشخیصی آن در حال حاضر محدود به تفاوت‌های شناخته شده بین ژنوم جنین و مادر است. همچنین این نکته قابل ذکر است که ژنوتیپ کامل جنین با استفاده از DNA آزاد جنینی قابل تشخیص نیست و اطلاعات ژنتیکی مشتق شده از آن کاملاً محدود به توالی DNA (یا کروموزوم) خاص شناسایی شده است (۱۵).

البته برخی از کاربردهای بالینی بر اساس تفاوت‌های قابل تشخیص بین ژنوم جنین و مادر وجود دارد که به بررسی آن‌ها می‌پردازیم:

۱- **تعیین جنسیت جنین:** به علت سهولت نسبی که می‌توان کروموزوم Y جنین پسر را از DNA مادر متمایز کرد، یکی از رایج‌ترین کاربردهای بالینی با استفاده از cfDNA تشخیص زود هنگام جنسیت جنین است. عمدتاً در مواردی که جنین پسر در معرض خطر جنسیت است (مانند بیماری‌های وابسته به جنس، هموفیلی و...) تعیین جنسیت جنین به صورت غیرتهاجمی می‌تواند تعداد تشخیص‌های تهاجمی مورد نیاز برای هر بیماری خاص را به نصف کاهش دهد، با این مزیت خاص که بیشتر جنین‌های دختر را از آزمایش‌های تشخیصی غیرضروری تهاجمی در امان می‌دارد. همچنین تعیین جنسیت در مواردی که رشد دستگاه تناسلی خارجی مبهم است و در برخی از اختلالات غدد درون ریز مانند هیپرپلازی مادرزادی آدرنال، که در آن مردانه شدن جنین دختر وجود دارد، اهمیت دارد که با درمان قبل از زایمان قابل پیشگیری است (۱۶-۱۸).

مطالعات متعددی وجود دارد که استفاده از cfDNA را برای تعیین جنسیت جنین توصیف می‌کند، از جمله چندین مطالعه بزرگ که به طور خاص به دقت آزمایش می‌پردازند. اگر چه در اصل تعیین جنسیت جنین با استفاده از cfDNA برای هر

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

بیماری مرتبط با جنسی قابل استفاده است و تا به امروز در زمینه هموفیلی، دیستروفی عضلانی دوشن، عقب ماندگی ذهنی مرتبط با X، آدرنولوکودیستروفی، سندرم آلپورت، نقص ایمنی شدید مرتبط با X منتشر شده است (۱۹).

۲- **اختلالات تک ژنی:** هزاران بیماری انسانی تنها در اثر جهش در یک ژن ایجاد می‌شوند و تخمین زده شده است که وقوع ترکیبی آن‌ها حدود ۳/۶ در ۱۰۰۰ تولد زنده است (۲۰). تشخیص بیماری‌های غالبی که از پدر به ارث می‌رسند (یا در اثر جهش‌های خود به خودی که در طی تشکیل تخمک یا اسپرم به وجود می‌آیند) به دلیل عدم وجود آلل عامل بیماری در ژنوم مادر امکان پذیر است. تا به امروز، استفاده از DNA آزاد جنینی برای تشخیص غیرتهاجمی این اختلالات تک ژنی غالب در حداقل یک بارداری منتشر شده است. برای مثال: بیماری هانتینگتون، یک بیماری عصبی غالب بزرگسالان، ناشی از گسترش تعداد نسخه‌ها (بیش از ۳۶) از یک توالی مکرر سه جفت بازی در ژن HD در کروموزوم ۴ است که تصور می‌شود نقش مهمی در سلول‌های عصبی دارد. گسترش ارثی پدری از ۳۷ تکرار با استفاده از cfDNA شناسایی شده است (۲۱). همچنین دیستروفی میوتونیک، شکل غالب دیستروفی عضلانی بزرگسالان (بیماری تحلیل عضلانی)، ناشی از گسترش تعداد کپی‌ها (۵۰-۵۰۰۰) از یک توالی مکرر سه جفت بازی در ژن DMPK روی کروموزوم ۱۹ درگیر در اسکلتی ماهیچه است که گسترش ۷۰ تکرار ارثی پدری با استفاده از DNA آزاد جنینی شناسایی شده است (۲۲).

۳- **تعیین RHD:** آنتی‌ژن‌های D جزو آنتی‌ژن‌های RH روی سطح گلبول‌های قرمز است که تشخیص آن در زنان باردار اهمیت ویژه‌ای دارد. در زنان باردار RH منفی که نوزادشان RH مثبت است احتمال دارد آنتی‌ژن‌های جنینی وارد خون مادر شوند و بر علیه آن‌ها آنتی‌بادی تولید گردد. این آنتی‌بادی‌های تولید شده قابلیت عبور از جفت دارند و باعث تخریب گلبول‌های قرمز جنین می‌شوند و بیماری همولیتیک جنینی-نوزادی را ایجاد می‌کنند. برای جلوگیری از این اتفاقات در مادران RHD منفی، دو دوز آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن D (anti D immunoglobulin) تزریق می‌شود (یکی در هفته ۲۸ و یکی هم ۷۲ ساعت پس از زایمان). این آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن D، سطح آنتی‌ژن‌های جنینی را پوشانده و باعث جلوگیری از حساسیت سیستم ایمنی مادر می‌شود. در نتیجه استفاده از DNA آزاد جنینی برای تشخیص وضعیت RHD جنین در خون مادران RHD منفی اهمیت زیادی دارد تا از تزریق غیر ضروری anti D immunoglobulin جلوگیری شود (۲۳-۲۷).

۴- **آنیوپلوئیدی:** آنیوپلوئیدی به تغییر در تعداد کروموزوم‌های موجود در داخل سلول اشاره دارد که اغلب به دلیل عدم تفکیک صحیح در میوز در طول تولید گامت ایجاد می‌شود. اگرچه در جنین‌های در حال رشد نسبتاً رایج است، اما بیشتر آنیوپلوئیدی‌ها منجر به سقط خود به خود در اوایل بارداری می‌شوند. در سال ۱۹۸۸، تخمین زده شد که ناهنجاری‌های کروموزومی در حدود ۱/۸ در هر ۱۰۰۰ تولد زنده وجود دارد (۲۸). معمولاً تشخیص آنیوپلوئیدی‌هایی مانند تریزومی ۲۱ از طریق نمونه برداری از پرزهای کوریونی و تهیه کاریوتایپ انجام می‌شود (۲۹). برخی شواهد نشان می‌دهند که میزان DNA آزاد جنینی در خون مادر هنگامی که جنین مبتلا به تریزومی ۱۳ و ۲۱ باشد افزایش می‌یابد ولی در تریزومی ۱۸ این افزایش مشاهده نشده (۳۰-۳۱). اخیراً یک روش کاملاً متفاوت برای تشخیص آنیوپلوئیدی جنین با استفاده از PCR دیجیتال پیشنهاد شده است، که روش جدیدی برای شناسایی اسیدهای نوکلئیک و بررسی کمیت آن‌ها است. طی این روش یک مولکول میلیون‌ها برابر افزایش می‌یابد و با استفاده از پروب رنگ آمیزی شده قابل ردیابی است. این روش جایگزین بسیار خوبی برای real time PCR می‌باشد و حساسیت و تعیین کمیت بهتری دارد. به طوری که تعیین غلظت DNA آزاد جنینی با real time PCR حدود ۳٪ و با روش digital PCR ۱۰٪ می‌باشد یک تکنولوژی دیگر تحت عنوان MPS نیز در دسترس است که توالی مولکول‌های DNA را در پلاسما مادر تعیین کرده و با توالی ژنوم مرجع مقایسه می‌کند مثلاً در بارداری تریزومی ۲۱، تعداد مولکول‌های اندازه گیری شده از کروموزوم ۲۱ در مقایسه با حالت طبیعی افزایش می‌یابد (۳۲).

۵- **تشخیص زود هنگام پره اکلامسی:** از آنجایی که مهمترین منشأ DNA آزاد جنینی از بافت جفت است مشکلات مربوط به بارداری که با رشد غیر طبیعی جفت همراه است موجب افزایش سطح DNA آزاد جنینی می‌شود. یکی از عوارض بارداری که با افزایش فشار خون و دفع پروتئین ادرار همراه است پره اکلامسی می‌باشد و در هفته بیستم بارداری شناخته می‌شود. اگر پره

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

اکلامسی به موقع تشخیص داده نشود موجب افزایش مرگ و میر مادر و جنین می‌گردد در نتیجه بررسی DNA آزاد جنینی یک روش مطمئن جهت بررسی زنان در معرض خطر در اوایل بارداری است (۱۰-۳۳). اولین بار Lo میزان غلظت DNA آزاد جنینی را اندازه‌گیری و در زنان باردار طبیعی و باردار با تشخیص بالینی مقایسه نمود (۳۴).

#### نتیجه‌گیری

DNA آزاد جنینی را می‌توان در دوران بارداری در گردش خون مادر تشخیص داد و برای تشخیص‌های غیر تهاجمی اولیه وضعیت ژنتیکی جنین روش بسیار مناسبی می‌باشد. cfDNA از هفته پنجم بارداری قابل تشخیص است و پس از زایمان به سرعت از گردش خون مادر پاک می‌شود. در حال حاضر، به علت اینکه cfDNA تنها ۶-۳ درصد از کل DNA آزاد سلولی را شامل می‌شود، تشخیص‌ها عمدتاً محدود به توالی‌های ارثی از پدر و همچنین شرایطی است که می‌توان از بیان منحصر به فرد RNA جنین توسط جفت استنباط کرد. مزیت اصلی استفاده از cfDNA نسبت به روش‌های مرسوم تشخیص قبل از تولد (آمیوسنتز و CVS) این است که روش نمونه‌گیری غیرتهاجمی است و بنابراین هیچ خطری برای مادر یا کودک ندارد و می‌تواند در اوایل سه ماهه اول بارداری انجام شود و به احتمال زیاد انجام خواهد شد. این روش ارزان‌تر است و به طور کلی، کاربردهای بالقوه بسیاری دارد. در حال حاضر تنها تعیین جنسیت و تشخیص RhD در حال تبدیل شدن به عمل بالینی برای افراد در معرض خطر هستند. در بلند مدت، بسته به توسعه فناوری مناسب همراه با ارزیابی قوی، چه توسط شرکت‌های تجاری یا خدمات بهداشتی ارائه شده دولتی، تجزیه و تحلیل cfDNA ممکن است بخشی از برنامه‌های غربالگری پیش از زایمان ملی برای همه زنان باردار باشد.

#### References:

1. Mortazavipour M, Mahdian R, Shahbazi S. The current applications of cell-free fetal DNA in prenatal diagnosis of single-gene diseases: A review. *Int J Reprod Biomed*. 2022; 20(8): 613-626.
2. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*. 2001; 61(4): 1659-65.
3. Mandel P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez 1 homme. *CR Seances Soc Biol Fil*. 1948; 142: 241-3.
4. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*. 1977; 37(3): 646-50.
5. Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The lancet*. 1997; 350(9076): 485-7.
6. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstetrics & Gynecology*. 2007; 110(3): 687-94.
7. NICH National Registry for Amniocentesis Study Group. Mid-trimester Amniocentesis for Prenatal Diagnosis; Safety and Accuracy. *Journal of American Medical Association*. 1976; 236: 1471-7.
8. Rhoads GG, Jackson LG, Schlesselman SE, de la Cruz FF, Desnick RJ, et al. The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities. *New England journal of medicine*. 1989; 320(10): 609-17.
9. Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L, Dukes K, Berkowitz RL, et al. Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstetrics & Gynecology*. 2006; 108(5): 1067-72.
10. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update*. 2009; 15(1): 139-51



11. Alberry MS, Soothill PW. Non-invasive prenatal diagnosis: implications for antenatal diagnosis and management of high-risk pregnancies. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008; 13(2): 84-90.
12. Lo YD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics.* 1998; 62(4): 768-75.
13. Traeger-Synodinos J. Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases. *Molecular aspects of medicine.* 2006; 27(2-3): 176-91.
14. Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, et al. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clinical chemistry.* 2005; 51(2): 312-20
15. Ge Q, Bai Y, Liu Z, Liu Q, Yan L, et al. Detection of fetal DNA in maternal plasma by microarray coupled with emulsions PCR. *Clinica chimica acta.* 2006; 369(1): 82-8.
16. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry R. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *American journal of human genetics.* 1988; 42(5): 677
17. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Human genetics.* 2002; 110: 75-9.
18. Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaidis K, HOLzGREVE WO, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry.* 2005; 51(9): 1598-604.
19. Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *New England Journal of Medicine.* 2002; 346(19): 1502-.
20. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry R. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *American journal of human genetics.* 1988; 42(5): 677
21. Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, et al. Huntington disease—unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis.* 2003; 23(3): 232-4.
22. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clinical chemistry.* 2000; 46(2): 301-2.
23. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol.* 2005; 14(3-4): 143-53.
24. Chinen PA, Nardoza LM, Martinhago CD, Camano L, Daher S, et al. Noninvasive determination of fetal rh blood group, D antigen status by cell-free DNA analysis in maternal plasma: experience in a Brazilian population. *American journal of perinatology.* 2010; 24(10): 759-62.
25. Kaushansky K, Reid ME, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, & Prchal, J. T. *Williams Hematology.* (8th ed.). New York. 2010.
26. Peterec SM. Management of neonatal Rh disease. *Clinics in perinatology.* 1995; 22(3): 561-92.
27. Pilgrim H, Lloyd-Jones M, Rees A. Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women: a systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment (Winchester, England).* 2009; 13(10): 1-103.

28. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry R. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *American journal of human genetics*. 1988; 42(5): 677.
29. Fan HC, Quake SR. Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. *PloS one*. 2010; 5(5): e10439.
30. Lo YD, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clinical chemistry*. 1999; 45(10): 1747-51.
31. Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, et al. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Human genetics*. 2003; 112: 204-8.
32. Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *Open biology*. 2012; 2(6): 120086.
33. Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*. 2011; 32: 17-20.
34. Lo YD, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clinical chemistry*. 1999; 45(2): 184-8.

## نقش باکتری ها در توسعه و پیشرفت نئوپلاسم دستگاه گوارش

ایمان دهقانی چم پیری<sup>۱</sup>، زهرا بم زاده<sup>۱و۲\*</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

### چکیده

فلور میکروبی دستگاه گوارش انسان نقش مهمی در وضعیت سلامت و بیماری انسان بازی می کند. در دهه ی گذشته، تعامل بین میکروارگانیسم ها و تومورها به منظور تلاش برای درک ویژگی های مختلف جوامع پیچیده ی میکروبی و همچنین مکانیسم هایی که از طریق فلور میکروبی ممکن است در پیشگیری از سرطان، سرطان زایی و درمان ضدسرطان دخیل باشند توجه های زیادی را به خود جلب کرده است. شواهد نشان می دهد که باکتری های خاص و ناتراز شدن همزیستی باکتریایی در دستگاه گوارش می تواند باعث توسعه و پیشرفت نئوپلاسم دستگاه گوارش توسط تخریب DNA، فعال سازی مسیره های آنکوژنیک، تولید متابولیت های ترویج دهنده تومور مانند اسیدهای ثانویه صفراوی و سرکوب ایمنی ضدتومور شود. گونه های باکتریایی دیگر تولید اسیدهای چرب با زنجیره ی کوتاه مانند بوتیرات می کنند که می تواند التهاب و سرطان زایی را در دستگاه گوارش سرکوب کند. مطابق با این شواهد مطالعات بالینی با استفاده از آنالیزهای متاژنومیک ارتباط باکتری های اختصاصی و ناتراز شدن همزیستی باکتریایی با سرطان های دستگاه گوارش از جمله مری، معده و روده ی بزرگ را نشان داده اند. درک بهتر مکانیسم هایی که به وسیله ی آن ها میکروفلور روده بر رشد تومور و پیشرفت آن در روده تاثیر می گذارد، فرصت هایی را برای توسعه ی استراژی های جدید پیشگیری و درمان برای بیماران مبتلا به سرطان های دستگاه گوارش توسط هدف قرار دادن میکروفلور روده فراهم می کند.

**واژگان کلیدی:** میکروارگانیسم، کارسینوما دستگاه گوارش، نئوپلاسم، ناترازی همزیستی.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵  
تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۳۹۰۲۲۹۳۹  
پست الکترونیک: imandehghanichampiri@gmail.com

## The role of bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms

Iman Dehghani Champiri<sup>1</sup>, Zahra Bamzadeh<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

### Abstract

Human gut microbiota play an essential role in both healthy and diseased states of humans. In the past decade, the interactions between microorganisms and tumors have attracted much attention in the efforts understanding various features of the complex microbial communities, as well as the possible mechanisms through which the microbiota are involved in cancer prevention, carcinogenesis, and anti-cancer therapy. Evidence demonstrates that specific bacteria and bacterial dysbiosis in the gastrointestinal tract can potentiate the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms by damaging DNA, activating oncogenic signaling pathways, producing tumor-promoting metabolites such as secondary bile acids, and suppressing antitumor immunity. Other bacterial species have been shown to produce short-chain fatty acids such as butyrate, which can suppress inflammation and carcinogenesis in the gastrointestinal tract. Consistent with these lines of evidence, clinical studies using metagenomic analyses have shown associations of specific bacteria and bacterial dysbiosis with gastrointestinal tract cancers, including esophageal, gastric, and colorectal cancers. A better understanding of the mechanisms by which the gut microbiota influence tumor development and progression in the intestine would provide opportunities to develop new prevention and treatment strategies for patients with gastrointestinal tract cancers by targeting the intestinal microflora.

**Keywords:** Microorganism, Gastrointestinal carcinoma, neoplasms, dysbiosis

### مقدمه

سرطان نامی است که به مجموعه بیماری‌هایی اطلاق می‌شود که از تکثیر مہارنشده سلول‌ها پدید می‌آیند. سلول‌های سرطانی از سازوکارهای عادی تقسیم و رشد سلول‌ها جدا می‌افتند. علت دقیق این پدیده نامشخص است ولی احتمال دارد عوامل ژنتیکی یا مواردی که موجب اختلال در فعالیت سلول‌ها می‌شوند در هسته سلول مشکل ایجاد کند. از جمله این موارد می‌توان از متابولیت‌های میکروبی، مواد رادیو اکتیو، مواد شیمیایی و سمی یا تابش بیش از حد اشعه‌هایی مانند نور آفتاب نام برد. سرطان به عنوان یک نگرانی جدی در جامعه‌ی انسانی در سراسر جهان باقی مانده است (۱). سرطان دستگاه گوارش علت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است (۲). شواهد نشان می‌دهد که سرطان‌های دستگاه گوارش از طریق تجمع تغییرات ژنتیک و اپی ژنتیک که تحت تاثیر ایمنی میزبان، رژیم غذایی، و محیط زیست و جوامع میکروبی قرار می‌گیرند، ایجاد می‌شود (۳). میکروبیوم روده‌ی انسان شامل حداقل ۱۰۰ تریلیون میکروارگانیزم است که می‌تواند بر سیستم ایمنی و وضعیت سلامت تاثیرگذار باشد (۴). شواهد رو به افزایشی وجود دارد که نشان می‌دهد رژیم غذایی، شیوه‌ی زندگی و داروها می‌توانند در ترکیب میکروفلور روده تاثیرگذار باشد و همچنین میکروفلور روده می‌تواند رشد و نئوپلاسم دستگاه گوارش را تعدیل کند (۵). از این رو در مطالعه مروری حاضر ارتباط باکتری‌های روده‌ی در ارتباط با سرطان‌های دستگاه گوارش، شامل سرطان‌های مری، معده و روده‌ی بزرگ بررسی شده است.

### ژنوتوکسین های باکتریایی

ژنوتوکسین های باکتریایی در میان توکسین های باکتریایی به دلیل این که هدف مولکولی آن ها DNA است منحصر به فرد هستند. پیامد آن مسمومیت یا عفونت، القا اختلالات و شکست DNA است که اگر به درستی اصلاح نگردد، منجر به توقف غیر قابل برگشت چرخه ی سلول یا مرگ سلول های هدف می شود (۶).

باکتری های روده ای کارسینوژن را از طریق توکسین های اختصاصی که باعث آسیب DNA می شوند، امکان پذیر می کنند. این باکتری ها (شریشیاکلی زیر گروه B2) با استفاده از التهاب موجود، شرایط فلور میکروبی روده را برای پاتوژن خود مهیا می کنند. این باکتری با تولید توکسین ترشحی کلی باکترین که بعنوان متابولیت ثانویه باکتری مطرح می باشد، با اختلال در سیکل سلولی، آسیب DNA را القا می کند و با ناپایداری ژنوم (۷)، باعث شروع، پیشرفت و توسعه سرطان کولورکتال می گردد (۸).

اتروکوکوس فکالیس تولید سوپراکسیداز خارج سلولی می کند که باعث ایجاد آسیب DNA و بی ثباتی ژنوم در سلول های اپیتلیال کولون (۹) و فعال سازی ماکروفاژها برای تولید 4-hydroxy-2-nonenal می شود، که سرطان زایی کولون را ترویج می دهد (۱۰). در سلول های سرطانی معده انسان، عفونت با اتروکوکوس فکالیس باعث تولید اکسیژن واکنشی (ROS) و آسیب DNA می شود (۱۱). توکسین های Cytotolethal توسط باکتری گرم منفی /شریشیاکلی زیر گروه B2 و گونه های هلیکوباکتری پیلوری تولید می شود، که می توانند باعث آسیب DNA در سلول های پستانداران شوند (۱۲).

### متابولیت های میکروبی

باکتری های روده ای متابولیت های متنوعی تولید می کنند که می توانند بر رشد و پیشرفت تومورهای دستگاه گوارش تاثیر بگذارند (۱۳). پلی آمین ها که توسط سلول های میزبان و باکتری های روده تولید می شوند، نقش مهمی در فرآیندهای مختلف زیستی و پاتولوژیک مانند ترجمه، تنظیم ژن، مقاومت به استرس و تکثیر و تمایز سلولی دارند (۱۴). نشان داده شده است که پلی آمین ها سرکوب ایمنی ضد تومور و افزایش تکثیر سلول های سرطانی، تهاجم و متاستاز را تقویت می کنند (۱۵). بیوفیلیم مخاط کلون مرتبط با تنظیم متابولیت های پلی آمین است که می تواند تکثیر سلول های سرطانی روده را افزایش دهد (۱۶). شواهد ارتباط بین اسیدهای صفراوی ثانویه صفراوی و رشد تومورهای دستگاه گوارش را نشان می دهد. Cholic acid و chenodeoxycholic acid. اسیدهای صفراوی اولیه هستند که در کبد از کلسترول تولید می شوند، و به گلیسین یا تائورین متصل می شوند و به دوازدهه منتقل می گردند تا هضم چربی را تسهیل کنند. در روده ی کوچک و کلون، اسیدهای صفراوی متصل شده می توانند توسط میکروفلور روده جدا شوند و تولید اسیدهای صفراوی ثانویه کنند، که lithocholic acid و deoxycholic acid نامیده می شوند. مطالعات بالینی نشان داده اند که رژیم های غذایی با چربی بالا می توانند ترشح صفراوی را افزایش دهند (۱۷) و غلظت های اسیدهای صفراوی مدفعی بالا در بیماران مبتلا به سرطان روده یافت می شود (۱۸). مطالعات تجربی نشان داده اند که lithocholic acid و deoxycholic acid می توانند مسیر سیگنالینگ NFkB را در کلون فعال کنند (۱۹) و می تواند رشد تومورهای روده ای را در موش ها افزایش دهد (۲۰). مطالعه بر اساس یک مدل موش نشان می دهد که deoxycholic acid می تواند رشد کارسینوما مری را توسط آسیب DNA افزایش دهد (۲۱). شواهد نشان می دهد که SCFAs مانند بوتیرات، توسط میکروفلور روده تولید می شوند و می توانند التهاب کولون

و سرطان زایی را توسط مهار فعال سازی مسیر سیگنالینگ NFkB و القای تمایز سلول های T تنظیمی و سلول های T تولید اینترلوکین-۱۰ مهار کنند (۲۲). مطالعات آزمایشگاهی نشان می دهند که بوتیرات می تواند به عنوان یک مهارکننده هیستون داستیلاز برای مهار تمایز و تکثیر سلولی، تحریک آپوپتوز، و سرکوب رشد تومور کلون عمل کند (۲۳). در مقابل، داده های در حال ظهور نشان می دهد که غلظت های پائین بوتیرات ممکن است رشد تومورهای کلون را افزایش دهد که کمبود ترمیم DNA را در یک مدل موش نشان می دهد (۲۴).

### مطالعات بالینی در ارتباط با باکتری های خاص و ناترازی همزیستی باکتریایی با سرطان های دستگاه گوارش

#### سرطان مری

سرطان مری در ناحیه ی مری که لوله ی غذا بین گلو و معده است ایجاد می شود و علائم آن مشکل در بلع و کاهش وزن می باشد. سایر علائم ممکن است شامل درد در هنگام بلع، صدای خیره کننده، غدد لنفاوی بزرگ در اطراف ترقوه، سرفه خشک و احتمالاً سرفه همراه با استفراغ خونی باشد. سرطان مری نهمین بدخیمی در سراسر جهان با پیش آگاهی بسیار ضعیف است (۲۵). میزان بروز این سرطان در سراسر جهان متفاوت است. بالاترین میزان در آسیا، جنوب و شرق آفریقا دیده شده است و در این مناطق با خطر بالا مرگ و میر سالانه بیش از ۱۰۰ مرگ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می باشد (۲۶). دو نوع اصلی این بیماری کارسینوم سلول سنگفرشی مری (که اغلب به اختصار ESCC نامیده می شود) که در کشورهای در حال توسعه رایج است و آدنوکارسینوما مری (EAC) که در کشورهای توسعه یافته رایج می باشد. ESCC اکثریت موارد گزارش شده از سرطان مری را در سراسر جهان به خود اختصاص می دهد و بیش از ۹۰٪ موارد در مناطق پر خطر مانند چین، ایران و ژاپن مشاهده شده است (۱). از علل نوع سلول سنگفرشی می توان به مصرف تنباکو، الکل، نوشیدنی های گرم و رژیم غذایی نامناسب اشاره کرد. شایعترین علل نوع آدنوکارسینوم شامل سیگار کشیدن، چاقی و ریفلاکس اسید است. EAC یکی از سریع رشدترین سرطان ها در ایالات متحده است (۲۷). مطالعات بالینی ارتباط باکتری های اختصاصی و ناترازی همزیستی باکتریایی (شرایط عدم تعادل در جوامع میکروبی) را با رشد ESCC و EAC نشان داده اند. مطالعات بالینی در چین نشان داده است که تنوع میکروبی پائین (تعداد ژن های باکتریایی در هر نمونه) در بافت های بزاق یا مری مرتبط با حضور ESCC و دیسپلازی سنگفرشی مری است، که پیش ساز ضایعه ESCC است (۲۸). یک مطالعه نشان داده است که ترکیب میکروفلور معده در مرحله ی اول ESCC و مرحله ی دوم ESCC و در مقایسه با افراد سالم متفاوت است (۲۹). متآنالیزها نشان دهنده ارتباط معکوس بین عفونت با هلیکوباکتر پیلوری و خطر ابتلا به EAC می باشند (۳۰). اگر چه مکانیسم های زیربنایی این ارتباط معکوس هنوز مشخص نیست، یک مطالعه نشان می دهد که عفونت هلیکوباکتر پیلوری با کاهش شیوع aneuploidy همراه است که یک اندازه گیری ناپایداری ژنوم، در EAC است (۳۱). Yamamura و همکاران گزارش کردند که تعداد بالای فوزوباکتریوم نوکلئوتوم با بقای کوتاه تر سلول های سرطانی و میانگین کلی بقای آن ها در سرطان های مری، شامل ESCC و EAC در ارتباط است، و مقدار فوزوباکتریوم نوکلئوتوم مرتبط با بیان کموکاین CCL20 تومور است. این نتایج نشان می دهد که فوزوباکتریوم نوکلئوتوم می تواند در به دست آوردن رفتار تهاجمی تومور از طریق فعال سازی کموکاین ها در کارسینوما مری کمک کند (۳۲). Zaidi و همکاران گزارش کردند که تعداد بالای /شیریشیاکلی در بافت مری مرتبط با EAC و افزایش بیان TLRs است (۳۳).

#### سرطان معده

سرطان معده، پوشش معده را درگیر می کند. علائم اولیه آن ممکن است شامل سوزش، درد شکمی، حالت تهوع و از دست دادن اشتها باشد، از علائم و نشانه های بعدی می توان به کاهش وزن، زرد شدن پوست و سفیدی چشم ها، استفراغ و خون در مدفوع اشاره کرد. این سرطان ممکن است از معده به سایر قسمت های بدن مانند کبد، ریه ها، استخوان ها، پرده ی صفاق و گره های لنفاوی گسترش یابد. سیگار کشیدن، رژیم غذایی مانند سبزیجات شور شده و چاقی عوامل خطر این بیماری هستند. در حدود ۱۰٪ از خانواده ها این بیماری مشهود است و بین ۱٪ تا ۳٪ از موارد به علت سندرم های ژنتیکی است که از والدین به ارث می رسد. در سرتاسر جهان، سرطان معده پنجمین علت سرطان و سومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان است که ۹٪ مرگ و میر را تشکیل می دهد (۳۴). در سال ۲۰۱۲، در ۹۵۰۰۰۰ نفر اتفاق افتاد و باعث مرگ ۷۲۳۰۰۰ نفر شد. پیش از دهه ی ۱۹۳۰، در بیشتر کشورهای توسعه یافته ی غرب، این بیماری شایع ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان بود. از آن به بعد مرگ و میر در بسیاری از مناطق جهان کاهش یافته است. سرطان معده بیشتر در آسیای شرقی و اروپای شرقی رخ می دهد و میزان آن در مردان دو برابر زنان است (۳۵). برخی از مطالعات نشان می دهند که افزایش قابل توجهی در فراوانی لاکتوباسیلی (۳۶) و لاجنوسپیراسه (۳۷) در نمونه های بافت بیماران مبتلا به سرطان معده وجود دارد. فراوانی لاکتوباسیلوس، لاجنوسپیراسه، /شیریشیاکلی - شیگلا، نیتروسپیرا و بورخولدریا در بیماران مبتلا به سرطان معده زمانی که با گروه کنترل مقایسه می شوند به طور قابل توجهی بالا است (۳۸)، که از یافته های قبلی در مورد افزایش حضور لاکتوباسیلی و لاجنوسپیراسه در بیماران مبتلا به سرطان معده حمایت می کند (۳۹) و

تعداد اشریشیاکلی و شیگلا در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به طور قابل توجهی بالا است (۴۰). مهم است که توجه داشته باشیم که این مطالعات فقط شواهد ژنتیکی مربوط به باکتری‌ها را شناسایی کرده اند و مطالعات عمیق برای ارزیابی حیاتی این ارگانسیم‌ها انجام نشده است. با این حال، این نتایج یک فرضیه ی جذاب را ایجاد می کنند، که کلونیزاسیون معده توسط باکتری هایی غیر از هلیکوباکتریپیلوری، که بسیاری از آن ها روده را نیز کلونیزه می کنند، می توانند خطر ابتلا به سرطان معده را تحت تاثیر قرار دهند. اکثر باکتری ها نمی توانند در محیط اسیدی معده زنده بمانند. با این حال، به خوبی در یک مجموعه از افراد ثابت شده است که عفونت با هلیکوباکتریپیلوری منجر به ترشح هیدروکلریک اسید معده می شود. بنابراین، کلونیزاسیون طولانی مدت هلیکوباکتریپیلوری و خنثی سازی محیط معده ممکن است به طور مستقیم به تغییرات میکروفلور معده کمک کند. همچنین مطالعات بالینی بسیاری وجود دارند که این مفهوم را تایید می کنند، یعنی بیماران درمان شده با داروهای سرکوب کننده ی اسید، مانند مهارکننده‌های پمپ پروتون، افزایش قابل توجهی را در میزان باکتری‌های غیر از هلیکوباکتریپیلوری درون معده نشان می دهند. از سوی دیگر، این افزایش مرتبط با افزایش پاسخ های التهابی است، که نشان می دهد باکتری‌هایی به غیر از هلیکوباکتریپیلوری که در معده کلونیزه می شوند ممکن است توانایی القای التهاب را داشته باشند که به طور بالقوه می توانند پیشرفت بیماری را تسهیل کنند (۴۱). با این حال شواهد قطعی برای این، مستلزم مطالعات مداخله‌ای دقیق است که هنوز انجام نشده است. شایع ترین علت عفونت معده هلیکوباکتریپیلوری است که بیش از ۶۰٪ موارد را تشکیل می دهد. با توجه به مطالعات اپیدمیولوژیکی، عفونت مزمن با هلیکوباکتریپیلوری، که یک میکروارگانسیم گرم منفی بیماری زا است، و به طور انتخابی در اپیتلیال معده کلونیزه می شود، نشان دهنده ارتباط آن با افزایش دو برابر خطر ابتلا به سرطان معده است (۴۲). هلیکوباکتریپیلوری توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان به عنوان کارسینوژن کلاس I در نظر گرفته شده است. علاوه بر عفونت با هلیکوباکتریپیلوری، مطالعات متاآنالیز ارتباط بالقوه ی بین میکروفلور معده و سرطان معده را مهم برشمرده اند (۴۳). در میان بیماران آلوده شده به عفونت هلیکوباکتریپیلوری، تنوع میکروبی در سرطان معده در مقایسه با گاستریت های مزمن یا متاپلازی روده بالاتر است (۴۴). پروتئین های *VacA* و *CagA* به عنوان شاخص های بیماری زایی هلیکوباکتریپیلوری به شمار می آیند (۴۵). عفونت هایی با سویه های *Cag+* دارای خطر بسیار بالایی برای سرطان معده هستند، البته این موضوع در جمعیت آسیای شرقی صدق نمی کند.

با وجود اینکه در میان آن ها سویه های *CagA+* عامل گاستریت شدیدتری هستند و احتمال زخم معده و آتروفی و سرطان معده در آن ها بیشتر است، اما در بیماران دارای زخم و سرطان معده سویه های *Cag-* نیز یافت شده است. پس نتیجه گرفته می شود که سویه های *CagA+* جزیره ی بیماری زایی *cag* را به صورت ناقص دارند. بنابراین وجود *CagA* همیشه نمی تواند به عنوان نشانگری برای وجود جزیره ی بیماری زایی *cag* باشد (۴۶). پروتئین *VacA* در سطح هلیکوباکتریپیلوری در صورت تماس با میزبان مستقیماً وارد آن شده و باعث تغییرات رفت و آمد وزیکول های داخل سلولی در میزبان می گردد، در نتیجه وزیکول های بزرگی محتوی اندوزوم ها و لیزوزوم های تاخیری شکل می گیرد (۴۷). علاوه بر این با عرضه ی آنتی ژن در سیستم ایمنی تداخل می کند و این عمل را با اشتباه جفت کردن آنتی ژن ها به سلول های عرضه کننده ی آنتی ژن انجام می دهند. سیتوتوکسین واکوئل زا یک فاکتور حدت قوی برای هلیکوباکتریپیلوری می باشد چون انواع مختلفی از سلول های میزبان نظیر سلول های بافت پوششی معده، ماکروفاژها، نوتروفیل ها، ماست سل ها و بسیاری از اجزای سلولی مثل غشای سیتوپلاسمی، اندوزوم ها، لیزوزوم ها و میتوکندری را می تواند تحت تاثیر قرار دهد. بیشترین اثر *VacA* در ایجاد کانال های انتخابی آنیونی در غشا سلولی T-Cell ها است (۴۸). *VacA* توانایی القا مرگ برنامه ریزی شده را به وسیله ی مکانیسم های وابسته به میتوکندری دارد و باعث آزاد شدن سیتوکروم C می شود. به علاوه باعث فعال شدن P38 و بازآرایی ساختار سلولی وابسته به *Rac1* می شود. این دو مکانیسم وابسته به کانال های یونی می باشند (۴۹). همچنین هلیکوباکتریپیلوری با بیان *VacA* ایمنی میزبان را از طریق مهار فعال سازی سلول T و القای سلول های T تنظیمی سرکوب می کند (۵۰).

### سرطان کولورکتال

سرطان کولورکتال (CRC)، به عنوان سرطان روده و سرطان روده بزرگ شناخته می شود، توسعه و پیشرفت سرطان از روده بزرگ یا راست روده است. سرطان رشد غیرطبیعی سلول هایی است که توانایی حمله یا گسترش به سایر قسمت های بدن را دارند. نشانه ها و علائم ممکن

است شامل خون در مدفوع، تغییر در حرکات روده، کاهش وزن و احساس خستگی همیشگی باشد. اکثر سرطان‌های کولورکتال به علت عوامل پیرامون و شیوه زندگی و تعداد کمی از موارد به علت اختلالات ژنتیکی پایه هستند. برخی از عوامل خطر برای این سرطان شامل رژیم غذایی، چاقی، سیگار کشیدن و عدم فعالیت بدنی می‌باشد. عوامل تغذیه‌ای نیز ممکن است باعث افزایش خطر این بیماری شوند که از جمله می‌توان به گوشت قرمز و فرآوری شده‌ی آن و همچنین الکل اشاره نمود. یکی دیگر از عوامل خطر، بیماری‌های التهابی روده است که شامل بیماری کرون (Crohn's) و کولیت زخمی می‌شود. برخی از شرایط موروثی که بیماری سرطان روده بزرگ را ایجاد می‌کنند، مواردی همچون پولیپ‌های آدنوماتوز خانوادگی و سرطان کولون غیرپولیپی ارثی هستند؛ اما این‌ها شامل کمتر از پنج درصد موارد می‌شوند. این بیماری معمولاً با تومور خوش‌خیم آغاز می‌گردد که به مرور زمان تبدیل به سرطانی می‌شود. شواهد بالینی نقش‌های احتمالی را برای باکتری‌های خاص و ناترازی همزیستی باکتریایی در توسعه و پیشرفت تومورهای کولورکتال نشان می‌دهد. مطالعات کنترلی موردی نشان می‌دهد تنوع میکروبی در بافت تومور یا نمونه‌های مدفوع در آدنوما کولورکتال و موارد کارسینوما بالاتر از گروه کنترل است (۵۲). این یافته‌ها یک ارتباط را بین ناترازی همزیستی باکتریایی و توسعه‌ی تومورهای کولورکتال نشان می‌دهد. مطالعات بالینی با یک حجم نمونه‌ی محدود شده نشان می‌دهد که تعداد/شریشیالکی در بافت کارسینوما کولورکتال بالاتر از بافت‌های نرمال مجاور است و مقدار بالاتر/شریشیالکی ممکن است با مرحله‌ی پیشرفته بیماری در ارتباط باشد (۵۳). باکترئوئیدس فراژلیس انتروتوکسیژنیک توکسین باکتری باکترئوئیدس فراژلیس را بیان می‌کند، که یک فاکتور ویروانس می‌باشد که مسیرهای سیگنالینگ WNT و NFkB را در سلول‌های اپیتلیال کلون فعال می‌سازد (۵۴). تعدادی از مطالعات انسانی ارتباط بالقوه‌ی بین باکترئوئیدس فراژلیس انتروتوکسیژنیک و سرطان کولورکتال را نشان می‌دهند. مطالعات نشان می‌دهد که باکترئوئیدس فراژلیس انتروتوکسیژنیک به طور قابل توجهی در بافت‌های مخاطی روده یا نمونه‌های مدفوع موارد مبتلا به سرطان کولورکتال نسبت به کنترل بالاتر است و تعداد بالاتر باکترئوئیدس فراژلیس انتروتوکسیژنیک مرتبط با مرحله‌ی پیشرفته‌ی بیماری است (۵۵). اگرچه مطالعات تجربی نشان می‌دهد، انتروکوکوس فکالیس ممکن است تومورهای معده و کولورکتال را ترویج دهد (۵۶)، یک مطالعه‌ی بالینی نشان می‌دهد که انتروکوکوس فکالیس به طور قابل توجهی در نمونه‌های مدفوعی موارد مبتلا به سرطان کولورکتال بالاتر تشخیص داده می‌شود (۵۷). مطالعات نشان داده است که میزان/استریپتوکوکوس گالولیتیکوس در کارسینوم‌های کولورکتال انسان بالاتر از بافت کنترل است و مقدار/استریپتوکوکوس گالولیتیکوس با بیان PTGS2 (cyclooxygenase-2) در بافت سرطان کولورکتال ارتباط دارد. این یافته‌ها نقش بالقوه/استریپتوکوکوس گالولیتیکوس در توسعه تومورهای کولورکتال از طریق التهاب را نشان می‌دهند. این مطالعات بالینی، باکتری‌های خاص و ناترازی همزیستی باکتریایی را به سرطان‌های دستگاه گوارش، از جمله مری، معده و سرطان کولورکتال مرتبط کرده‌اند. با این حال، تفاوت‌های قابل توجه مطالعه به مطالعه در مورد گونه‌های باکتری در ارتباط با سرطان کولورکتال وجود دارد که ممکن است به علت محدودیت‌هایی از جمله اندازه نمونه کوچک، سایت‌های نمونه برداری بافت نامشهود و اطلاعات محدود در خصوص ویژگی‌های بالینی و ویژگی‌های مولکولی تومور باشد (۵۸). مطالعات، حضور قابل توجه فوزوباکتریوم نوکلئوتوم در آدنوما و کارسینوما کولورکتال انسان در مقایسه با بافت‌های مجاور را طبیعی نشان داده‌اند (۵۹). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مقدار بالای فوزوباکتریوم نوکلئوتوم در بافت، مرتبط با مرحله‌ی پیشرفته‌ی بیماری است (۶۰)، و تراکم سلول‌های T در بافت کارسینوما کولورکتال (۶۱) پائین‌تر است، و بقای بیمار امید بخش نیست (۶۲). نسبت سرطان کولورکتال با حضور فوزوباکتریوم نوکلئوتوم به طور خطی در امتداد قسمت‌های روده‌ای از راست روده تا کور روده افزایش می‌یابد و این یک مدل پیوسته از تاثیر پاتوژنیک باکتری‌های روده در ایجاد سرطان کولورکتال را نشان می‌دهد (۶۳، ۶۴). مصرف فیبر پائین و مصرف بالای گوشت در ارتباط با پروفایل‌های باکتریایی و متابومیک تغییر یافته است (۶۵). داده‌های جدید نشان می‌دهند که مصرف فیبر پائین و مصرف بالای چربی با افزایش تعداد فوزوباکتریوم نوکلئوتوم اندازه‌گیری شده توسط PCR در نمونه‌ی مدفوع در ارتباط است (۶۶). مصرف کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم، مانند فیبر، نشان داده شده است که باعث افزایش تخمیر در روده، افزایش انتقال محتوای روده و کاهش pH لومن روده می‌شود، که ممکن است بر کلونیزاسیون کولون با فوزوباکتریوم نوکلئوتوم تاثیر بگذارد، اگرچه تحقیقات بیشتری لازم است. ادهیسین A فوزوباکتریوم (FadA)، یک فاکتور ویروانس سطح سلول بیان شده توسط فوزوباکتریوم است، که در بیماران مبتلا به پلیپ آدنوماتوز یا سرطان کولورکتال اغلب تشخیص داده می‌شود. FadA با E-cadherin در اندوتلیوم در تعامل است و مسیر E-cadherin /  $\beta$ -catenin را تعدیل می‌کند و منجر به افزایش بیان فاکتورهای رونویسی، آنکوژن‌ها و ژن‌های التهابی می‌شود. همچنین به فوزوباکتریوم برای اتصال یا



## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

تهاجم به سلول‌های بیان کننده ی E-cadherin کمک می کند و بنابراین، به طور مستقیم بر تکثیر و تمایز سلولی و رشد تاثیر می گذارد (۶۷). فوزوباکتریوم نوکلئوتوم فاکتور ویرولانس FadA را روی سطح سلول باکتری بیان می کند و به CDH1 متصل می شود، و مسیر سیگنالینگ WNT را در سلول‌های کارسینوما کولورکتال فعال می سازد، و در نهایت رشد تومور کولورکتال را افزایش می دهد (۶۸). پروتئین *Fap2* باکتری فوزوباکتریوم نوکلئوتوم با سلول T و گیرنده دومین ITIM (TIGIT) در تعامل است و فعالیت سلول‌های NK و سلول های T را مهار می کند (۶۹). شواهد جدید نشان می دهد که پروتئین *Fap2* باعث اتصال فوزوباکتریوم نوکلئوتوم به بافت سرطانی کولورکتال می شود (۷۰). گزارش اخیر نشان داده است که فراوانی کل فوزوباکتریوم نوکلئوتوم در بافت‌های سرطانی کولورکتال ۴۰۰ برابر بیشتر از بافت‌های مجاور طبیعی است (۷۱). بنابراین FadA ممکن است یک نشانگر بالقوه برای تشخیص و درمان سرطان کولورکتال باشد (۷۲).

### آفتی به آینده

شواهد نشان می دهد که باکتری‌های روده می توانند بر رشد و پیشرفت تومور در دستگاه گوارش تاثیر گذار باشند. با توجه به این که شیوه ی زندگی، رژیم غذایی، عوامل دارویی مانند آنتی بیوتیک‌ها، و پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها می توانند بر ترکیب میکروفلور روده تاثیر بگذارند، تحقیقات آینده برای بررسی تاثیرات بالقوه ی این عوامل روی میکروفلور روده و فرآیندهای تومور زایی ضروری به نظر می رسد. علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان‌های دستگاه گوارش متاستاز است و کبد توسط متاستاز تحت تاثیر قرار می گیرد. مطالعات تجربی نشان می دهد که میکروفلور روده ممکن است بر اثربخشی شیمی درمانی سرطان و ایمنوترابی تأثیر بگذارد. از آنجایی که رابطه بین میکروفلور پیچیده روده و سلول‌های تومور در انسان نمی تواند به طور کامل در مدل موش خلاصه شود، از این رو تجزیه و تحلیل با استفاده از بافت سرطانی انسان برای کاربرد بالینی ضروری است. از این رو، تحقیقات بین رشته ای در رابطه با سرطان شناسی، میکروب شناسی، ایمونولوژی، گوارش، آسیب شناسی، و جراحی آنکولوژی اطلاعات با ارزشی را برای توسعه راه های جدید پیشگیری و درمان سرطان‌های دستگاه گوارش با هدف گیری میکروفلور روده ارائه می کنند. درک بهتر نقش میکروفلور روده در روند جذب پس از بازسازی و بهبود دستگاه گوارش و بروز عوارض بعد از جراحی دستگاه گوارش ممکن است فرصت‌های جدیدی را برای استفاده از میکروفلور روده برای بهبود پس از جراحی در بیماران مبتلا به سرطان دستگاه گوارش ایجاد کند.

### پروبیوتیک

از نظر لغوی، ریشه کلمه پروبیوتیک یونانی است، اما در واقع این کلمه متشکل از پیشوند لاتین "پرو" و کلمه یونانی باستانی "بایوس" است، ترکیبی لفظی که به معنای "برای زندگی" می باشد. اداره غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAD) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) پروبیوتیک را اینگونه تعریف می کند: «پروبیوتیک‌ها میکرو ارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف کافی آنها سبب نمایان شدن اثرات سلامت بخش در بدن میزبان می شود.» بر این اساس، باکتری‌های پروبیوتیک موجود در محصولات خوراکی، نه تنها باید دارای مشخصه‌های عملکردی و سودمند برای سلامتی انسان باشند بلکه از قابلیت ماندگاری در دستگاه گوارش هم برخوردار باشند. تعدادی از مطالعات مزایای پروبیوتیک‌ها را روی سرکوب سرطان کولورکتال ذکر کرده اند، که این عمل را از طریق شرکت در سیستم ایمنی ذاتی و آپوپتوز، کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود میکروفلور روده انجام می دهند (۷۳). گونه های لاکتوباسیلوس از پروبیوتیک‌های مورد استفاده در آزمایشات بالینی به علت کاهش فراوانی *انتروباکتر* و تنظیم پاسخ ایمنی در روده بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال هستند، در حالیکه بیفیدوباکتریوم لانگوم چنین تاثیری ندارد (۷۴). تجویز لاکتوباسیلوس *سالیاریوس* می تواند به طور موثر توسعه و رشد سرطان کولورکتال القا شده توسط ۱،۲-دی متیل هیدرازین را سرکوب کند. تزریق با این کارسینوژن قوی به طور قابل توجهی جامعه ی باکتریایی را با افزایش تعداد گونه‌های *رامینوکوکوس* و *کلوستریدیا*، و کاهش تعداد گونه ی *پروتلا* تغییر می دهد. علاوه بر این مصرف لاکتوباسیلوس *سالیاریوس* موجب تقویت میکروفلور روده می شود، که نشان می دهد لاکتوباسیلوس *سالیاریوس* ممکن است به طور بالقوه برای پیشگیری از سرطان روده ی بزرگ مفید باشد (۷۵). یک پروبیوتیک، LBB (لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* و بیفیدوباکتریوم *بیفیدوم*) غنی شده با لیگوفروکتوز و مالتودکسترین، تعداد گونه های *سودوموناس*، کانگریگی باکتر، *کلستریدیوم*، *اشریشیاکلی*، *هلیکوباکتر* را کاهش می دهد، در حالیکه باعث

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید – ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

افزایش تعداد لاکتوباسیلوس در افراد مبتلا به سرطان کولور کتال می‌شود (۷۶). نشان داده شده است که جمعیت میکروفلور روده به باکتری‌های خاصی مانند پروتلا و/اوسکیلی باکتر تغییر می‌یابد که محصولات ضد التهابی مطلوب را ایجاد می‌کنند (۷۷). علاوه بر درمان‌های متداول عفونت هلیکوباکتریپیلوری با آموکسی سیلین، کلاریترومایسین، مهار کننده های پمپ پروتون که گروهی از داروها هستند که وظیفه ی اصلی آن ها در بدن کاهش پایدار اسید معده است، می‌توانند میکروفلور روده را در طولانی مدت تغییر دهند (۷۸). در یک کارآزمایی کنترل شده تصادفی با مقایسه گروه درمان متعارف با گروه درمان ترکیبی با پروبیوتیک، جامعه میکروبی روده در گروه درمان متعارف با نسبت قابل ملاحظه تری نسبت به باکتری مقاوم در برابر دارو تغییر می‌کند. اشاره شده است که تجویز پروبیوتیک به میکروفلور روده کمک می‌کند تا از اختلال ناشی از درمان عفونت هلیکوباکتریپیلوری جلوگیری کند (۷۹).

### پری بیوتیک

پری بیوتیک ها مواد غذایی هستند که باعث رشد یا فعالیت میکروارگانیسم های مفید (مانند باکتری ها و قارچ ها) می‌شوند. همچنین پری بیوتیک ها می‌توانند ترکیبات موجود در میکروفلور روده را تغییر دهند (۸۰). یک رژیم غذایی سالم با افزایش مصرف غذاهای گیاهی و مصرف محدود گوشت، برای تنظیم میکروفلور روده سالم مفید خواهد بود (۸۱). بذره‌های کتان برای کلون مفید هستند و حساسیت به بیماری های مرتبط با روده را کاهش می‌دهند (۸۲). رژیم های انولین به طور قابل توجهی باعث کاهش pH محتویات مدفوع، غلظت فنل و ایندول در روده ی بزرگ می‌شوند، فعالیت آنزیم‌های میکروبی شامل بتا-گلوکورونیداز، آزوردوکتاز و نیتروردوکتاز را مهار می‌کنند و احتمال ضایعات پیش سرطانی کولون را کاهش می‌دهند (۸۳).

Avenanthramide-C (2c) ، یک avenanthramide است که در جو وجود دارد که توسط باکتری‌های روده متابولیزه شده و این ترکیب اثر ضد التهابی نیز از خود نشان می‌دهد (۸۴). Urolithins متابولیت میکروفلور روده از ellagitannins و ellagic acid است. مصرف عصاره ی انار به طور قابل توجهی مقدار ellagic acid و urolithins را در بافت های سرطانی کولور کتال افزایش می‌دهد (۸۵). گیاه رازک، یک عامل اولیه در آبجو است که حاوی پرنیل فلاونوئیدها با اثر استروژنیک ضعیف می‌باشد. پرنیل فلاونوئیدها توسط میکروفلور روده افزوده می‌شود، و اثرات ضد سرطانی را بر روی مدل CRC اعمال می‌کند (۸۶).

آگارو-الیگوساکاریدها از جلبک دریایی اثر مثبتی را روی ناترازی همزیستی روده ناشی از رژیم غذایی با چربی بالا و توسعه و رشد سرطان کولور کتال با تغییر مقدار SCFAs، اسید صفراوی و فسفولیپیدها نشان می‌دهند (۸۷). گیاه جوز فعالیت ضد میکروبی را با کاهش سطح IL-6 نشان می‌دهد (۸۷). تخمیر دانه ها منجر به غلظت بالاتر SCFA، و تشکیل acid Vaccenic، که یک لینولئیک اسید است می‌شود، که می‌تواند یک متابولیت شیمی درمانی بالقوه باشد (۸۹).

پلی فنول ها زمانی که در معرض متابولیسم میکروبی قرار می‌گیرند، اثر ضد سرطان زایی و ضد موتانزایی را برای جلوگیری از سرطان کولون از خود نشان می‌دهند (۹۰). اسید چرب، اسید ایکوزاپنتانویک، که یک اسید چرب امگا ۳ می‌باشد، به طور موثر باعث جلوگیری از التهاب و همچنین ایجاد پولیپ و سرطان‌های مرتبط با کولیت می‌شود (۹۱). مطالعه ی کولور کتال (۹۲) و یک مطالعه ی آزمایشی کنترلی تصادفی (۹۳) اثرات سودمند پلی دکستروز را روی میکروفلور روده و پیشگیری از سرطان کولور کتال نشان می‌دهند. یکی از مطالعات اخیر دیگر نشان داده است که اگرچه مصرف خرما به طور قابل توجهی فراوانی نسبی میکروفلور روده یا SCFAs را تغییر نمی‌دهند، اما به طور قابل توجهی باعث افزایش حرکات روده و مدفوع مکرر می‌شوند، در حالیکه غلظت آمونیاک مدفوع را کاهش می‌دهند (۹۴).

### سینبیوتیک

سینبیوتیک ها ترکیبی از پروبیوتیک ها هستند. مطالعات قبلی نشان داده است که مکمل سینبیوتیک در طی مراحل قبل از شیمی درمانی اصلی برای سرطان مری، جامعه میکروبی روده را بهبود می‌بخشند و عوارض جانبی ناشی از عوامل شیمی درمانی را کاهش می‌دهند (۹۵). از آن جایی که تغییرات در میکروبیوم معده منجر به افزایش شیوع آدنوماکارسینوما مری و به خصوص در ناحیه ی اتصال مری به معده می‌شود،

میکروبیوم معده را می توان با آنتی بیوتیک ها، پروبیوتیک ها یا مهار کننده های مسیرهای اختصاصی سلول میزبان برای جلوگیری از اختلالات در این ناحیه تغییر داد (۹۶).

### نتیجه گیری

مطالعات در تلاش برای درک چگونگی تنظیم سلامتی بدن و سرطان ها توسط میکروب های دستگاه گوارش هنوز در مراحل اولیه است، یافته های اولیه نشان دهنده ی یک همبستگی هستند تا این که رابطه ی علیت داشته باشند. با این حال پزشکان درک کرده اند که میکروفلور دستگاه گوارش نقش مهم و منحصری در سلامت و بیماری های انسان ایفا می کند، آن ها تلاش های جسورانه را شروع کرده اند تا میکروب های روده را تنظیم کنند. اهداف آن ها شامل تنظیم متابولیسم انسان، پاسخ ایمنی و التهابی، پیشگیری از سرطان زایی، مهار پیشرفت سرطان ها، بهبود کارایی درمان سرطان اشخاص است. میکروفلور روده قادر است تا یک اثر هم افزایی را با عوامل شیمی درمانی و ایمونوتراپی از خود نشان دهد. بر اساس مطالعات میکروفلور روده، پزشکان همچنین در پی کشف هدف های درمانی جدید، همچنین تشخیص، پیش بینی و بیومارکرهای پیش آگهی سرطان با استفاده از میکروفلور روده انسان هستند. در این راستا چالش هایی وجود دارد، که ممکن است شامل یافتن درک عمیق مکانیسم میکروبیوم در تحقیقات اولیه، تسریع ترجمه در مطالعات پزشکی میکروفلور روده، و یافتن راه حلی برای مهندسی بیولوژیکی میکروبی روده انسان باشد. در نهایت آزمایشات بالینی با استفاده از میکروفلور در ترکیب با شیمی درمانی یا ایمونوتراپی مشتاقانه انتظار می رود.

### References:

1. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health* 2016;4:e609-16.
2. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A., *Cancer Statistics, 2017*, *CA Cancer J Clin* 67 (2017) 7-30.
3. Song M., Garrett W.S., Chan A.T., Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention, *Gastroenterology* 148 (2015) 1244-1260 e1216.
4. Rooks M.G., Garrett W.S., Gut microbiota, metabolites and host immunity, *Nat Rev Immunol* 16 (2016) 341-352.
5. Wang J., Jia H., Metagenome-wide association studies: fine-mining the microbiome, *Nat Rev Microbiol* 14 (2016) 508-522.
6. O'Keefe S.J., Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13 (2016) 691-706.
7. Cuevas-Ramos G., Petit C.R., Marcq I., et al., *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 11537-11542.
8. Arthur J.C., Gharaibeh R.Z., Muhlbauer M., et al., Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer, *Nat Commun* 5 (2014) 4724.
9. Wang X., Allen T.D., May R.J., et al., *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect, *Cancer Res* 68 (2008) 9909-9917.

10. Wang X., Allen T.D., Yang Y., et al., Cyclooxygenase-2 generates the endogenous mutagen trans-4-hydroxy-2-nonenal in *Enterococcus faecalis*-infected macrophages, *Cancer Prev Res (Phila)* 6 (2013) 206-216.
11. Strickertsson J.A., Rasmussen L.J., Friis-Hansen L., *Enterococcus faecalis* Infection and Reactive Oxygen Species Down-Regulates the miR-17-92 Cluster in Gastric Adenocarcinoma Cell Culture, *Genes (Basel)* 5 (2014) 726-738.
12. Graillot V., Dormoy I., Dupuy J., et al., Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis, *Front Cell Infect Microbiol* 6 (2016) 34.
13. Sonnenburg E.D., Smits S.A., Tikhonov M., et al., Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations, *Nature* 529 (2016) 212-215.
14. Igarashi K., Kashiwagi K., Modulation of cellular function by polyamines, *Int J Biochem Cell Biol* 42 (2010) 39-51.
15. Soda K., The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread, *J Exp Clin Cancer Res* 30 (2011) 95.
16. Johnson C.H., Dejea C.M., Edler D., et al., Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis, *Cell Metab* 21 (2015) 891-897.
17. Ou J., DeLany J.P., Zhang M., et al., Association between low colonic short-chain fatty acids and high bile acids in high colon cancer risk populations, *Nutr Cancer* 64 (2012) 34-40.
18. Barrasa J.I., Olmo N., Lizarbe M.A., et al., Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules, *Toxicol In Vitro* 27 (2013) 964-977.
19. Payne C.M., Weber C., Crowley-Skillicorn C., et al., Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells, *Carcinogenesis* 28 (2007) 215-222.
20. Muhlbauer M., Allard B., Bosserhoff A.K., et al., Differential effects of deoxycholic acid and taurodeoxycholic acid on NF-kappa B signal transduction and IL-8 gene expression in colonic epithelial cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286 (2004) G1000-1008.
21. Quante M., Bhagat G., Abrams J.A., et al., Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia, *Cancer Cell* 21 (2012) 36-51.
22. Singh N., Gurav A., Sivaprakasam S., et al., Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis, *Immunity* 40 (2014) 128-139.
23. Donohoe D.R., Holley D., Collins L.B., et al., A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner, *Cancer Discov* 4 (2014) 1387-1397.
24. Belcheva A., Irrazabal T., Robertson S.J., et al., Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells, *Cell* 158 (2014) 288-299.
25. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002;97:72-81.
26. Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2001;22:1737-1746.
27. Brown L.M., Devesa S.S., Chow W.H., Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age, *J Natl Cancer Inst* 100 (2008) 1184-1187.

28. Chen X., Winckler B., Lu M., et al., Oral Microbiota and Risk for Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a High-Risk Area of China, *PLoS One* 10 (2015) e0143603.
29. Nasrollahzadeh D., Malekzadeh R., Ploner A., et al., Variations of gastric corpus microbiota are associated with early esophageal squamous cell carcinoma and squamous dysplasia, *Sci Rep* 5 (2015) 8820.
30. Nie S., Chen T., Yang X., et al., Association of Helicobacter pylori infection with esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: a meta-analysis, *Dis Esophagus* 27 (2014) 645-653.
31. Gall A., Fero J., McCoy C., et al., Bacterial Composition of the Human Upper Gastrointestinal Tract Microbiome Is Dynamic and Associated with Genomic Instability in a Barrett's Esophagus Cohort, *PLoS One* 10 (2015) e0129055.
32. Zaidi A.H., Kelly L.A., Kreft R.E., et al., Associations of microbiota and toll-like receptor signaling pathway in esophageal adenocarcinoma, *BMC Cancer* 16 (2016) 52.
33. Yamamura K., Baba Y., Nakagawa S., et al., Human Microbiome Fusobacterium Nucleatum in Esophageal Cancer Tissue Is Associated with Prognosis, *Clin Cancer Res* 22 (2016) 5574-5581.
34. Cooke CL, Huff JL, Solnick JV. The role of genome diversity and immune evasion in persistent infection with Helicobacter pylori. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45:11-23.
35. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2007;133:659-672.
36. Wang X., Allen T.D., May R.J., et al., Enterococcus faecalis induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect, *Cancer Res* 68 (2008) 9909-9917.
37. Wang X., Allen T.D., Yang Y., et al., Cyclooxygenase-2 generates the endogenous mutagen trans-4-hydroxy-2-nonenal in Enterococcus faecalis-infected macrophages, *Cancer Prev Res (Phila)* 6 (2013) 206-216.
38. Strickertsson J.A., Desler C., Martin-Bertelsen T., et al., Enterococcus faecalis infection causes inflammation, intracellular oxphos-independent ROS production, and DNA damage in human gastric cancer cells, *PLoS One* 8 (2013) e63147.
39. Louis P., Hold G.L., Flint H.J., The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer, *Nat Rev Microbiol* 12 (2014) 661-672.
40. Nestic D., Hsu Y., Stebbins C.E., Assembly and function of a bacterial genotoxin, *Nature* 429 (2004) 429-433.
41. Guidi R., Guerra L., Levi L., et al., Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response, *Cell Microbiol* 15 (2013) 98-113.
42. Amieva M., Peek R.M., Jr., Pathobiology of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer, *Gastroenterology* 150 (2016) 64-78.
43. Aviles-Jimenez F., Vazquez-Jimenez F., Medrano-Guzman R., et al., Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer, *Sci Rep* 4 (2014) 4202.
44. Wang L., Zhou J., Xin Y., et al., Bacterial overgrowth and diversification of microbiota in gastric cancer, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 28 (2016) 261-266.
45. Cristescu R., Lee J., Nebozhyn M., et al., Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes, *Nat Med* 21 (2015) 449-456.

46. Sundrud M.S., Torres V.J., Unutmaz D., et al., Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 7727-7732.
47. Suzuki M., Mimuro H., Kiga K., et al., *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation, *Cell Host Microbe* 5 (2009) 23-34.
48. Wei J., Noto J.M., Zaika E., et al., Bacterial CagA protein induces degradation of p53 protein in a p14ARF-dependent manner, *Gut* 64 (2015) 1040-1048.
49. Bessede E., Staedel C., Acuna Amador L.A., et al., *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes, *Oncogene* 33 (2014) 4123-4131.
50. Oertli M., Noben M., Engler D.B., et al., *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and vacuolating cytotoxin promote gastric persistence and immune tolerance, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 3047-3052.
51. Boncristiano M., Paccani S.R., Barone S., et al., The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms, *J Exp Med* 198 (2003) 1887-1897.
52. Shen X.J., Rawls J.F., Randall T., et al., Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas, *Gut Microbes* 1 (2010) 138-147.
53. Bonnet M., Buc E., Sauvanet P., et al., Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk, *Clin Cancer Res* 20 (2014) 859-867.
54. Wu S., Powell J., Mathioudakis N., et al., *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor-kappaB pathway, *Infect Immun* 72 (2004) 5832-5839.
55. Wei Z., Cao S., Liu S., et al., Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism, *Oncotarget* 7 (2016) 46158-46172.
56. Huycke M.M., Abrams V., Moore D.R., *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA, *Carcinogenesis* 23 (2002) 529-536.
57. Balamurugan R., Rajendiran E., George S., et al., Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer, *J Gastroenterol Hepatol* 23 (2008) 1298-1303.
58. Gupta A., Madani R., Mukhtar H., *Streptococcus bovis* endocarditis, a silent sign for colonic tumour, *Colorectal Dis* 12 (2010) 164-171.
59. Vogtmann E., Hua X., Zeller G., et al., Colorectal Cancer and the Human Gut Microbiome: Reproducibility with Whole-Genome Shotgun Sequencing, *PLoS One* 11 (2016) e0155362.
60. Flanagan L., Schmid J., Ebert M., et al., *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33 (2014) 1381-1390.
61. Mima K., Sukawa Y., Nishihara R., et al., *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma, *JAMA Oncol* 1 (2015) 653-661.

63. Mima K., Nishihara R., Qian Z.R., et al., Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis, Gut 65 (2016) 1973-1980.
64. Yamauchi M., Morikawa T., Kuchiba A., et al., Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum, Gut 61 (2012) 847-854.
65. Mima K., Cao Y., Chan A.T., et al., Fusobacterium nucleatum in Colorectal Carcinoma Tissue According to Tumor Location, Clin Transl Gastroenterol 7 (2016) e200.
66. Cotillard A., Kennedy S.P., Kong L.C., et al., Dietary intervention impact on gut microbial gene richness, Nature 500 (2013) 585-588.
67. O'Keefe S.J., Li J.V., Lahti L., et al., Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans, Nat Commun 6 (2015) 6342.
68. Yu J., Feng Q., Wong S.H., et al., Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer, Gut 66 (2017) 70-78.
69. Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., et al., Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin, Cell Host Microbe 14 (2013) 195-206.
70. Gur C., Ibrahim Y., Isaacson B., et al., Binding of the Fap2 protein of Fusobacterium nucleatum to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack, Immunity 42 (2015) 344-355.
71. Abed J., Emgard J.E., Zamir G., et al., Fap2 Mediates Fusobacterium nucleatum Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc, Cell Host Microbe 20 (2016) 215-225.
72. Ito M., Kanno S., Noshō K., et al., Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway, Int J Cancer 137 (2015) 1258-1268.
73. Ambalam P, Raman M, Purama RK, Doble M. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2016;30:119-31.
74. Gianotti L, Morelli L, Galbiati F, Rocchetti S, Coppola S, Beneduce A, et al. A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. World J Gastroenterol 2010;16:167-75.
75. Zhang M, Fan X, Fang B, Zhu C, Zhu J, Ren F. Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. J Microbiol 2015;53:398-405.
76. Kuugbee ED, Shang X, Gamallat Y, Bamba D, Awadasseid A, Suliman MA, et al. Structural change in microbiota by a probiotic cocktail enhances the gut barrier and reduces cancer via TLR2 signaling in a rat model of colon cancer. Dig Dis Sci 2016;61:2908-20.
77. Li J, Sung CY, Lee N, Ni Y, Pihlajamäki J, Panagiotou G, et al. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113:E1306-15.
78. Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. PLoS One 2010;5:e9836.
79. Oh B, Kim BS, Kim JW, Kim JS, Koh SJ, Kim BG, et al. The effect of probiotics on gut microbiota during the *Helicobacter pylori* eradication: randomized controlled trial. Helicobacter 2016;21:165-74.
80. Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. J Food Sci Technol 2015;52:7577-87.

81. Greiner AK, Papineni RV, Umar S. Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Natural products and microbiome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:G1-15.
82. Power KA, Lepp D, Zarepoor L, Monk JM, Wu W, Tsao R, et al. Dietary flaxseed modulates the colonic microenvironment in healthy C57Bl/6 male mice which may alter susceptibility to gut-associated diseases. *J Nutr Biochem* 2016;28:61-9.
83. Pattananandecha T, Sirilun S, Duangjitcharoen Y, Sivamaruthi BS, Suwannalert P, Peerajan S, et al. Hydrolysed inulin alleviates the azoxymethane-induced preneoplastic aberrant crypt foci by altering selected intestinal microbiota in Sprague-Dawley rats. *Pharm Biol* 2016;54:1596-605.
84. Wang P, Chen H, Zhu Y, McBride J, Fu J, Sang S. Oat avenanthramide-C (2c) is biotransformed by mice and the human microbiota into bioactive metabolites. *J Nutr* 2015;145:239-45.
85. Nuñez-Sánchez MA, García-Villalba R, Monedero-Saiz T, García-Talavera NV, Gómez-Sánchez MB, Sánchez-Álvarez C, et al. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1199-211.
86. Allsopp P, Possemiers S, Campbell D, Gill C, Rowland I. A comparison of the anticancer properties of isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin using *in vitro* models of colon cancer. *Biofactors* 2013;39:441-7.
87. Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Ushiroda C, et al. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; 310: G367-75.
88. Li F, Yang XW, Krausz KW, Nichols RG, Xu W, Patterson AD, et al. Modulation of colon cancer by nutmeg. *J Proteome Res* 2015;14:1937-46.
89. Schlörmann W, Birringer M, Lochner A, Lorkowski S, Richter I, Rohrer C, et al. *In vitro* fermentation of nuts results in the formation of butyrate and c9,t11 conjugated linoleic acid as chemopreventive metabolites. *Eur J Nutr* 2016;55:2063-73.
90. Miene C, Weise A, Gleis M. Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97). *Nutr Cancer* 2011;63:653-62.
91. Piazzini G, D'Argenio G, Prossomariti A, Lembo V, Mazzone G, Candela M, et al. Eicosapentaenoic acid free fatty acid prevents and suppresses colonic neoplasia in colitis-associated colorectal cancer acting on Notch signaling and gut microbiota. *Int J Cancer* 2014;135:2004-13.
92. Winkels RM, Heine-Bröring RC, van Zutphen M, van Harten-Gerritsen S, Kok DE, van Duijnhoven FJ, et al. The COLON study: colorectal cancer: longitudinal, observational study on nutritional and lifestyle factors that may influence colorectal tumour recurrence, survival and quality of life. *BMC Cancer* 2014;14:374.
93. Costabile A, Fava F, Röytiö H, Forssten SD, Olli K, Klievink J, et al. Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. *Br J Nutr* 2012;108:471-81.
94. Eid N, Osmanova H, Natchez C, Walton G, Costabile A, Gibson G, et al. Impact of palm date consumption on microbiota growth and large intestinal health: a randomised, controlled, cross-over, human intervention study. *Br J Nutr* 2015;114:1226-36.



95. Motoori M, Yano M, Miyata H, Sugimura K, Saito T, Omori T, et al. Randomized study of the effect of synbiotics during neoadjuvant chemotherapy on adverse events in esophageal cancer patients. *Clin Nutr* 2017;36:93–99.
96. Abreu MT, Peek RM. Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology* 2014;146:1534–46.e3.
97. Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest* 2013;123:700–11.
98. Zackular JP, Baxter NT, Chen GY, Schloss PD. Manipulation of the gut microbiota reveals role in colon tumorigenesis. *mSphere* 2015;1: e00001–15.
99. DeStefano Shields CE, Van Meerbeke SW, Housseau F, Wang H, Huso DL, Casero RA, et al. Reduction of murine colon tumorigenesis driven by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* using Cefoxitin Treatment. *J Infect Dis* 2016;214:122–9.
100. Boursi B, Mamtani R, Haynes K, Yang YX. Recurrent antibiotic exposure may promote cancer formation--another step in understanding the role of the human microbiota? *Eur J Cancer* 2015;51:2655–64.
101. Yang B, Hagberg KW, Chen J, Sahasrabudde VV, Graubard BI, Jick S, et al. Associations of antibiotic use with risk of primary liver cancer in the clinical practice research datalink. *Br J Cancer* 2016;115:85–9.

## بیومارکرها

### علیرضا نیکزاد چالشتری<sup>۱\*</sup>، فاطمه شایسته<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

در دنیای کنونی تعداد زیادی بیومارکر وجود دارد. اولین بیومارکر در دنیای پزشکی برای سنجش پروتئین bence jones بوده است. بیومارکرها علاوه بر مزایا فراوانی که دارند دارای مشکل بزرگی نیز می‌باشند. این مشکل عدم وجود یک تعریف درست در ارتباط با بیومارکرها می‌باشد. اما این مشکل با ایجاد گروهی که این مفاهیم را با عنوان بیومارکرها، نقاط پایانی و سایر ابزارها در دسترس عموم قرار دادند حل شد. تعریف اولیه بیومارکرها با عنوان ویژگی تعریف شده‌ای که به عنوان شاخصی از فرآیندهای بیولوژی طبیعی، فرآیندهای بیماری‌زا اندازه‌گیری می‌شود شناخته می‌شود. این تعریف در بخش درمان بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیومارکرها باید از معیارهای احساس، عملکرد و زنده ماندن افراد متمایز باشند. دسته‌ای از معیارها با عنوان ارزیابی پیامدهای بالینی شناخته می‌شوند. بیومارکرها زمانی که برای نقطه پایان مورد استفاده قرار می‌گیرند پیچیدگی بیشتری پیدا می‌کنند. بیومارکر ممکن کارایی-های متفاوتی داشته باشد اما باید برای هر کاربرد نشانه‌های جداگانه‌ای داشته باشد. بیومارکرها انواع مختلفی دارند. از جمله بیومارکرها می‌توان به بیومارکهای تشخیصی، بیومارکهای فارماکودینامیک/پاسخ، پیش‌بینی کننده، پیش‌آگاهی و حساسیت/خطر اشاره نمود. بیومارکهای تشخیصی وجود یا عدم وجود یک بیماری یا شرایط مورد نظر را شناسایی می‌کنند. بیومارکهای فارماکودینامیک/پاسخ بیومارکهایی هستند که در مقابل یک محصول پزشکی یا عامل محیطی دچار تغییر می‌شوند. بیومارکهای پیش‌بینی کننده آن دسته از بیومارکهایی هستند که فرد یا گروهی که امکان دارد عامل منفی در آن‌ها ایجاد شوند را پیش‌بینی می‌کنند. بیومارکهای پیش‌آگاهی برای شناختن احتمال ایجاد یک رویداد بالینی یا پیشرفت بیماری در افراد مبتلا به بیماری استفاده می‌شوند. بیومارکهای حساسیت/خطر به بیومارکهایی می‌گویند که احتمال ایجاد یک بیماری یا وضعیت خاص پزشکی در فردی که علائم بیماری ندارد را بررسی می‌کنند. همچنین بیومارکهایی که بر اساس معیارهای حیاتی و ارتباط عمیق با بیماری ساخته شده‌اند را بیومارکهای پیچیده می‌گویند.

**نتیجه‌گیری:** در دنیای کنونی بیومارکرها می‌توانند بسیار مفید باشند. از بیومارکرها می‌توان در توسعه علم پزشکی و همچنین درمان بیماری‌ها به طور گسترده استفاده کرد. پژوهش‌ها و مطالعات در ارتباط با بیومارکرها برای گسترش آن‌ها بسیار مفید خواهد بود. فلذا می‌توان با تحقیقات درست در این رابطه به پیشرفت علم پزشکی کمک شایانی نمود.

**واژگان کلیدی:** بیومارکر، COA، علم پزشکی، تحقیقات بالینی.

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

همراه: ۰۹۳۵۶۳۳۱۱۴۹

تلفن: ۰۳۸ ۳۳۳۶۱۰۰۰

پست الکترونیک: alirezaniczad@gmail.com

## Biomarkers

Alireza Nickzad-Chaleshtory<sup>1\*</sup>, Fatemeh Shayesteh<sup>2</sup>

1. Master's student, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Ph.D Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

### Abstract

There are many biomarkers in today's world. The first was in the medical world to measure protein bence jones. In addition to their advantages, biomarkers also have a big problem. This problem is the lack of a correct definition in relation to biomarkers. But this problem was solved by the creation of a group that made these concepts publicly available as biomarkers, endpoints and other tools. The initial definition of biomarkers is known as defined characteristics that are measured as indicators of natural biological processes, pathogenic processes. This definition is widely used in the treatment sector. Biomarkers should be distinguished from measures of people's feelings, performance and survival. Some of the criteria are known as clinical outcomes assessment. Biomarkers become more complex when used for endpoints. Biomarkers may have different functions, but it should have different indications for each applications. There are different types of biomarkers. Among the biomarkers, we can refer to diagnostic biomarkers, pharmacodynamics/ response, predictive, prognostic and sensitivity/ risk biomarkers. Diagnostic biomarkers identify the presence or absence of a disease or condition. Pharmacodynamics/ response biomarkers are biomarkers that change in response to a medicinal product or environmental agent. Predictive biomarkers are those biomarkers that predict an individual or a group that may develop a negative factor in them. Prognostic biomarkers are used to know the probability of a clinical event or disease progression in people with disease. Susceptibility/risk biomarkers are biomarkers that assess the likelihood of developing a disease or a specific medical condition in a person who does not have symptoms of the disease. Also, the biomarkers that are made based on vital criteria and deep connection with the disease are called complex biomarkers.

**Result:** in today's world, biomarkers can be very useful. Biomarkers can be widely used in the development of medical science and the treatment of diseases. Researches and studies related to biomarkers will be very useful for their development. Therefore, proper research in this regard can help the regard can help the progress of medical science.

**Keywords:** biomarkers, COA, medical science, clinical research.

### مقدمه

امروزه تعداد بسیار زیادی بیومارکر در سطح جهان وجود دارد. نخستین بیومارکر در پزشکی جدید، سنجش سطح پروتئین bence jones بوده است. این پروتئین در اواخر قرن نوزدهم میلادی در سال ۱۸۴۷ برای تشخیص مولتیپل میلوما کشف شد و تاکنون نیز مورد استفاده قرار گرفته است. بیومارکر یا نشانگر زیستی از دهه ۱۹۷۰ میلادی مورد استفاده قرار گرفت (۱). نشانگرهای زیستی برای توسعه منطقی درمان‌های پزشکی حیاتی هستند (۲). مشکل بزرگی که در ارتباط با بیومارکرها وجود دارد سردرگمی محققان در ارتباط با تعاریف و مفاهیم بیومارکرها در استفاده از آنها در تحقیقات و عملکرد بالینی می‌باشد. علاوه بر آن مشکل بزرگ دیگری که وجود دارد پیچیدگی نشانگرهای زیستی برای درک بیماری‌های مزمن و تغذیه می‌باشد (۳). چند سال قبل در کنفرانسی که با مدیریت اداره غذا و داروی ایالات متحده و موسسه ملی بهداشت برگزار شد اثبات شد که مدیران هر سازمان برداشت متفاوتی نسبت به تعریف مناسب بیومارکرها دارند. به همین دلیل گروهی به منظور تعریف درست بیومارکرها تشکیل شد. این تعاریف تحت عنوان بیومارکرها، نقاط پایانی و سایر ابزارها یا به اختصار BEST در دسترس عموم قرار گرفت (۴).

ویژگی تعریف شده‌ای که به عنوان شاخصی از فرآیندهای بیولوژی طبیعی، فرآیندهای بیماری‌زا اندازه‌گیری می‌شود تعریف اولیه بیومارکرها می‌باشد. گردید این تعریف در قسمت درمان بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌تواند از ویژگی‌های مولکولی، بافت

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد

شناسی، رادیوگرافی و فیزیولوژیک مشتق شود. بیومارکرها باید از معیارهای احساس، عملکرد یا زنده ماندن یک فرد متمایز باشند. دسته‌ای از معیارها تحت عنوان ارزیابی پیامد بالینی یا به اختصار COA شناخته می‌شوند. تفاوت بین بیومارکرها و COAها اهمیت بسیار بالایی دارد. زیرا COAها در واقع نتایجی که مستقیماً برای بیماران اهمیت دارند را اندازه‌گیری می‌کنند. اما بیومارکرها اهداف مختلفی را دنبال می‌کنند. یک بیومارکر تنها زمانی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد که تایید شده باشد. البته در شرایطی که درمان موثر دیگری وجود نداشته باشد نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (۵).

بیومارکرها و COAها هنگامی که به عنوان نقطه پایانی در مطالعات بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند پیچیدگی بیشتری پیدا می‌کنند. نقطه پایانی یک متغیر دقیق است که با هدف به دست آوردن یک نتیجه دلخواه با استفاده از آمار برای پاسخ دادن به یک سوال مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک بیومارکر ممکن است چند معیار برای کاربردهای مختلف داشته باشد. اما ایجاد نشانه‌های مختلف برای هر کاربرد بسیار اهمیت دارد. پس در حالی که بیومارکر می‌تواند تعاریف مشابهی داشته باشد، باید ویژگی‌های متمایزی نیز داشته باشد تا کاربرد بیومارکر به طور دقیق مشخص شود (۶).

### بیومارکهای تشخیصی

بیومارکهای تشخیصی وجود یک بیماری، شرایط مورد نظر یا فردی با زیر گروه یک بیماری را شناسایی می‌کند (۴). با گذشت زمان بیومارکرها پیشرفت گسترده‌ای خواهند داشت و ممکن است نه تنها برای شناسایی افراد مبتلا به بیماری بلکه برای تعریف مجدد طبقه بندی بیماری نیز مورد استفاده قرار گیرند. به عنوان مثال تشخیص سرطان به سمت یک طبقه بندی مولکولی و مبتنی بر تصویر برداری پیش می‌رود. برخی بیومارکهای تشخیصی کاربردی فراتر از موارد عمومی دارند. برای مثال پیشرفت مفاهیم علمی و استفاده در تحقیقات آینده نگرانه. این بیومارکرها اهمیت بسیاری دارند و باید زمینه رشد و استفاده بیشتر از آنها ایجاد شود. یک بیومارکر ممکن است در یک شرایط به خوبی عمل کند اما در زمینه دیگری مرتکب اشتباه شود (۶). استفاده از منحنی عامل گیرنده روند ارزیابی بیومارکهای تشخیصی را ممکن ساخت (۷). با این شرایط مشکلی که وجود دارد عدم وجود یک یک تعریف درست برای وجود یا عدم وجود بیماری یا شرایط مورد نظر می‌باشد. علاوه بر این آستانه تصمیم گیری در حالت تبدیل شدن به معیارهای مهم برای ارزیابی ارزش بیومارکر در کاربرد بالینی ضروری است. در آینده اثبات اینکه بیومارکر اطلاعاتی در مورد تشخیص اضافه می‌کند یا خیر ممکن است ضروری باشد (۸).

### بیومارکهای فارماکودینامیک/پاسخ

هنگامی که میزان یک بیومارکر در مواجهه با یک محصول پزشکی یا یک عامل محیطی تغییر کند به آن بیومارکر فارماکودینامیک/پاسخ می‌گویند. این نوع بیومارکرها هم در درمان و هم در تحقیقات بسیار مفید هستند. در درمان دیابت یا فشار خون اگر کاهش در فشار خون یا گلوکز رخ ندهد باید روش درمان را تغییر داد و روش دیگری جایگزین آن نمود. همانند این قضیه اگر در درمانی که به واسطه بیومارکر صورت می‌گیرد اگر تغییری در سطح بیومارکر رخ نمی‌دهد، بیومارکر ارزش درمانی ندارد. یک شرایط خاص مطالعه بیومارکر در افراد عادی است. سطح بیومارکر مرتبط با بیماری در فردی که دچار بیماری نیست نباید تغییری داشته باشد. در این شرایط هدف ایجاد شواهد اولیه مبنی بر ایمن بودن دارو در افراد مبتلا به بیماری است. تفسیر و تعریف بیومارکهای فارماکودینامیک/پاسخ همیشه ساده نیست. مشکل پیچیده‌ای که وجود دارد این است که بیومارکهای قابل اندازه‌گیری پاسخ‌های فارماکودینامیک واقعی را منعکس نمی‌کنند (۶).

### بیومارکهای پیش‌بینی کننده

بیومارکهای پیش‌بینی کننده در ارتباط با فرد یا گروهی از افراد که احتمال دارد در مواجهه با یک محصول پزشکی یا محیطی، اثر مثبت یا منفی در آنها ایجاد شود را پیش‌بینی می‌کنند (۴). برای اثبات این که یک بیومارکر از نوع پیش‌بینی کننده است به انجام

مطالعات بالینی نیاز است. در حالت مطلوب بیماران با یا بدون بیومارکر درمان می‌شوند و تفاوت در نتیجه به عنوان عملکرد درمان به تفاوت در حضور یا عدم حضور بیومارکر مرتبط است. بیومارکرهای پیش بینی کننده برای استراتژی‌های غنی سازی در طرحی و اجرای آزمایشات بالینی مهم هستند. به ویژه در افرادی که سطح بالایی از بیومارکر پیش بینی کننده دارند سیگنال واضح‌تری ایجاد می‌کند که درمان در افراد کار می‌کند یا خیر. استفاده از بیومارکرهای پیش بینی کننده رویکرد هدفمندتری نسبت به بیومارکرهای پیش‌آگاهی می‌باشد (۹ و ۱۰).

### بیومارکرهای پیش‌آگاهی

بیومارکرهای پیش‌آگاهی برای شناسایی احتمال یک رویداد بالینی و پیشرفت بیماری در افراد مبتلا مورد استفاده قرار می‌گیرد. گروه کاری BEST معتقد هستند که بیومارکرهای پیش‌آگاهی باید از بیومارکرهای حساسیت/خطر که با انتقال از حالت سالم به بیمار درگیرند متمایز شوند. همچنین باید از بیومارکرهای پیش‌بینی کننده نیز متمایز شوند. در کار آزمایشی‌های بالینی بیومارکرهای پیش‌آگاهی معمولاً برای تعیین معیارهای ورود و خروج برای شناسایی جمعیت‌های پرخطر استفاده می‌شوند. مسئله مهم این می‌باشد که قدرت آماری یک آزمایش به جای حجم نمونه با تعداد رویدادها تعیین می‌شود. هنگامی که کارآزمایی‌ها به این روش غنی می‌شوند میزان رویداد افزایش می‌یابد. در این شرایط اگر درمان موثر باشد تفاوت‌ها در نتایج به عنوان تابعی از درمان از نظر کمی بزرگ‌نمایی می‌شوند. بیومارکرهای پیش‌آگاهی برای پیش‌بینی خطر یک رویداد یا پیامد ضعیف در یک فرد مهم می‌باشند (۶).

### بیومارکرهای حساسیت/خطر

بیومارکرهای حساسیت/خطر آن دسته از بیومارکرهایی هستند که نشان دهنده پتانسیل ایجاد یک بیماری یا وضعیت پزشکی در فردی که علائم بیماری یا شرایط پزشکی ندارد، می‌باشند. این تعریف مشابه با تعریف بیومارکرهای پیش‌آگاهی است. اما تفاوت این دو تعریف این است که بیومارکرهای حساسیت/خطر در ارتباط با پیشرفت یک بیماری است نه پیش‌آگاهی در مورد آن بیمار پیش از تشخیص قبلی. بیومارکرهای حساسیت/خطر برای انجام مطالعات اپیدمیولوژیک در مورد خطرهای بیماری ضروری هستند (۶).

### بیومارکرهای پیچیده

بیومارکرها بر اساس معیارهای حیاتی با ارتباط عمیق با بیماری ساخته شده‌اند که می‌توانند در یک الگوی ساده درک شوند. برای مثال کلسترل LDL با خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی مرتبط می‌باشد، هر چقدر میزان کلسترل LDL بیشتر باشد میزان ایجاد بیماری‌های قلبی و عروقی کمتر است. سیستم‌های بیولوژی پیچیده و چند بعدی هستند. اندازه‌گیری بیومارکرهای پیچیده و مرکب ممکن است پیش‌بینی‌های بهتری را امکان پذیر کند. زیرا هر بیومارکر نقش کوچکی در نتیجه نهایی خواهد داشت (۶). هنگامی که اثر متقابل چندین بیومارکر در نظر گرفته شود تلاش برای شناخت یک بیومارکر بسیار سخت و دشوار خواهد بود. خوشبختانه تغییرات در محاسبات و اندازه‌گیری‌ها چنین عملی را به خوبی امکان پذیر می‌سازد. نتایج برخی تحقیقات در حال انجام مانند طرح پایه پروژه Verily/Alphabet17 و All of Us18 از NIH مجموعه گسترده‌ای از داده‌های پیچیده بیولوژیکی و همچنین زمینه‌ای را برای چگونگی ارتباط این داده‌ها با نتایج بالینی ایجاد می‌کند (۳ و ۱۱ و ۱۲).

### بیومارکرهای دیجیتال

بیومارکرهای دیجیتال به سرعت در حال پیشرفت و گسترش می‌باشند (۱۳). دریافت مداوم اطلاعات از یک فرد مانند وضعیت روانی، سطح ورزش، توانایی‌های شناختی، الگوهای غذا خوردن و حرکت می‌تواند بسیار مفید باشد. این اطلاعات عموماً توسط ابزارهای الکترونیکی مانند تلفن همراه به دست می‌آیند. بنابراین باید استانداردی در ارتباط با این ابزارها ایجاد شود. البته ابتکار تحول

کارآزمایی‌های بالینی اخیراً توصیه‌هایی در مورد استانداردهای کیفیت در این زمینه منتشر کرده است (۱۴). برای پیوند دادن نقاط پایانی دیجیتال به معیارهای نتایج سنتی به مطالعات بیشتری نیاز است. برای مثال آزمایش پیاده روی ۶ دقیقه‌ای به یک روش استاندارد برای ارزیابی تحمل ورزش تبدیل شده است. مثال دیگر تبدیل شدن فشار خون سیستولیک در حالت استراحت به معیار استاندارد برای ارزیابی فشار خون می‌باشد. به همین منظور ارتباط بین فعالیت بیمار و اندازه‌گیری‌های حاصل از دستگاه‌های دیجیتال در حال پیشرفت می‌باشد (۱۵).

### نتیجه‌گیری

در عصر حاضر انواع زیادی از بیومارکرها موجود می‌باشند. بیومارکرها انواعی دارند. از جمله بیومارکرها می‌توان به بیومارکهای تشخیصی، فارماکودینامیک/پاسخ، پیش‌بینی کننده، پیش‌آگاهی، حساسیت/خطر اشاره کرد. بیومارکرها در توسعه علم پزشکی، دستگاه‌های پزشکی و همچنین شناخت و درمان بیماری‌ها کاربرد فراوانی دارند. در بین بیومارکهای ذکر شده بیومارکهای پیش-آگاهی و پیش‌بینی کننده اهمیت بسیاری دارند. با انجام مطالعات و تحقیقات بیشتر و همچنین گسترش بیومارکرها می‌توان درجه جدیدی در علم پزشکی و درمان بیماری‌ها گشود. بیومارکرها می‌توانند سرعت پیشرفت علم پزشکی و همچنین تحقیقات بالینی را بسیار افزایش دهند.

### References:

1. Öberg K. Molecular Genomic Blood Biomarkers for Neuroendocrine Tumors: The Long and Winding Road from Berzelius and Bence Jones to a Neuroendocrine Destination. *Neuroendocrine*. 2021; 111(4): 297-303.
2. Robb MA, McInnes PM, Califf RM. Biomarkers and surrogate endpoints: developing common terminology and definitions. *JAMA*. 2016; 315: 1107–8.
3. Institute of Medicine. Evaluation of biomarkers and surrogate endpoints in chronic disease. Washington, D.C.: National Academies Press, 2010, [www.nationalacademies.org/hmd/Reports/2010/Evaluation-ofBiomarkers-and-Surrogate-Endpoints-in-Chronic-Disease.aspx](http://www.nationalacademies.org/hmd/Reports/2010/Evaluation-ofBiomarkers-and-Surrogate-Endpoints-in-Chronic-Disease.aspx) (accessed 22 September 2017).
4. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health US), [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/) (2016, accessed 22 September 2017).
5. U.S. Food and Drug Administration. Fast track, breakthrough therapy, accelerated approval, priority review. Updated September 14, 2015, [www.fda.gov/forpatients/approvals/fast/ucm20041766.htm](http://www.fda.gov/forpatients/approvals/fast/ucm20041766.htm) (accessed 27 September 2017).
6. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*. 2018; 243: 213–221.
7. Cook NR. Use and misuse of the receiver operating characteristic curve in risk prediction. *Circulation*. 2007; 115: 928–35.

8. Pencina MJ, Demler OV. Novel metrics for evaluating improvement in discrimination: net reclassification and integrated discrimination improvement for normal variables and nested models. *Stat Med.* 2012; 31: 101–13
9. Antman EM, Loscalzo J. Precision medicine in cardiology. *Nat Rev Cardiol.* 2016; 13: 591–602.
10. US Food and Drug Administration. Draft guidance for industry: enrichment strategies for clinical trials to support approval of human drugs and biological products. December 2012, [www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm332181.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm332181.pdf) (accessed 27 September 2017).
11. Verily Life Sciences. Project baseline, [www.projectbaseline.com/](http://www.projectbaseline.com/) (accessed 27 September 2017).
12. National Institutes of Health. National Institutes of Health All of Us Research Project, <https://allofus.nih.gov/> (accessed 27 September 2017).
13. Insel T. Digital phenotyping: technology for a new science of behavior. *JAMA.* 2017; 318: 1215–6.
14. Clinical Trials Transformation Initiative. CTTI Recommendations: developing novel endpoints generated by mobile technology for use in clinical trials, [www.ctti-clinicaltrials.org/files/novelendpoints-recs.pdf](http://www.ctti-clinicaltrials.org/files/novelendpoints-recs.pdf) (accessed 27 September 2017).
15. Yap J, Lim FY, Gao F, Teo LL, Lam CS, et al. Correlation of the New York Heart Association classification and the 6-minute walk distance: a systematic review. *Clin Cardiol.* 2015; 38: 621–8.

## غربالگری با توان بالا

سمیه امیرخانی دهکردی<sup>۱</sup>، حمیدرضا خدایی<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. استادیار، گروه دامپزشکی، واحد شاهین شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهین شهر، ایران

### چکیده

غربالگری با توان بالا، یک تکنیک مهم در کشف دارو و تحقیقات زیست پزشکی است که غربالگری سریع و سیستماتیک تعداد زیادی از ترکیبات شیمیایی یا مولکول‌های زیستی را برای شناسایی داروهای بالقوه که فرآیندهای بیولوژیکی خاص یا اهداف درمانی را هدف قرار می‌دهند، تسهیل می‌کند. غربالگری با توان بالا، به سنگ بنای کشف دارو و تحقیقات زیست پزشکی تبدیل شده است و روش غربالگری ترکیبات برای فعالیت درمانی بالقوه را متحول می‌کند. در فرآیند غربالگری با توان بالا، هزاران تا میلیون‌ها ترکیب شیمیایی به سرعت در برابر یک هدف بیولوژیکی خاص با استفاده از سیستم‌های سنجش خودکار غربالگری می‌شوند. هدف این مقاله ارائه یک نمای کلی از اصول، روش‌شناسی و کاربردهای مرتبط با این غربالگری در زمینه کشف دارو است. داده‌های به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل نتایج، می‌تواند به محققان در اولویت‌بندی ترکیبات برای آزمایش‌های بیشتر، بهینه‌سازی و مطالعات پیش‌بالینی کمک کند. علاوه بر این، می‌توان این فرایند را در مراحل مختلف کشف دارو، از اعتبار سنجی هدف و شناسایی ضربه گرفته تا بهینه‌سازی و غربالگری سمیت اعمال کرد. این مقاله اهمیت غربالگری با توان بالا را در تسریع فرآیند توسعه دارو، امکان شناسایی ترکیبات فعال زیستی جدید، و پیشرفت درک ما از سیستم‌های بیولوژیکی پیچیده را مورد بحث قرار می‌دهد. این مقاله، همچنین به بررسی تاریخچه غربالگری با توان بالا می‌پردازد و ریشه آن را از روزهای اولیه غربالگری تا سیستم‌های خودکار امروزی که می‌توانند هزاران تا میلیون‌ها ترکیب را در کسری از زمان غربال کنند، بررسی می‌کند.

واژگان کلیدی: غربالگری با توان بالا، دارو، ژنتیک

آدرس نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸۱۳۳۳۳۹۶۱۱ همراه: ۰۹۲۱۷۱۰۱۱۵۲

پست الکترونیک: Najyyy@yahoo.com



## High-Throughput screening

Somayeh Amirkhani Dehkordi<sup>1</sup>, Hamidreza Khodaei<sup>2\*</sup>

1. Master's student, Department of Basic Sciences, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Department of Veterinary Science, Shahinshahr Branch, Islamic Azad University, Shahinshahr, Iran

### Abstract

High-throughput screening is an important technique in drug discovery and biomedical research that facilitates the rapid and systematic screening of large numbers of chemical compounds or biomolecules to identify potential drugs that target specific biological processes or therapeutic targets. High-throughput screening has become a cornerstone of drug discovery and biomedical research, revolutionizing the way compounds are screened for potential therapeutic activity. In high-throughput screening, thousands to millions of chemical compounds are rapidly screened against a specific biological target using automated assay systems. The aim of this article is to provide an overview of the principles, methodology and applications related to this screening in the field of drug discovery. Data obtained from results analysis can help researchers prioritize compounds for further testing, optimization, and preclinical studies. In addition, this process can be applied in various stages of drug discovery, from target validation and hit identification to optimization and toxicity screening. This paper discusses the importance of high-throughput screening in accelerating the drug development process, enabling the identification of novel bioactive compounds, and advancing our understanding of complex biological systems. This article also examines the history of high-throughput screening, tracing its origins from the early days of screening to today's automated systems that can screen thousands to millions of compounds in a fraction of the time.

**Keywords:** High-Throughput screening (HTS), drug, genetics

### مقدمه

پیشرفت های مداوم در زیست شناسی مولکولی و ژنتیک انسانی شناسایی مکانیسم های تعداد فزاینده ای از بیماری های انسانی را تسریع کرده است. این پیشرفت شانس مداخله درمانی بالقوه توسط داروها را افزایش داده است. همزمان، رویکردهای جدید در شیمی ترکیبی و مجموعه های گسترده ای از محصولات طبیعی، تعداد ترکیباتی دارویی را که می توان برای فعالیت در برابر این اهداف آزمایش کرد، به طور چشمگیری افزایش داده است (1,2). اما کشف داروهایی با ساختارهای جدید با قابلیت درمان بالقوه، یک فرآیند پیچیده است. امروزه، نوآوری ها در علم و فناوری، محیطی ایده آل برای آزمایش هزاران ترکیب برای فعالیت بیولوژیکی، شناسایی مولکول های فعال یا ذراتی که می توانند به سرعت تبدیل به داروهای بالقوه با فعالیت درمانی مطلوب شوند، فراهم کرده اند (3). فناوری های جدید در غربالگری با توان بالا (High-Throughput Screening) به طور قابل توجهی در این زمینه موثر واقع شده اند. غربالگری با توان بالا، یکی از استراتژی های استراتژی های است که برای کشف ترکیبات اولیه برای طراحی دارو با مولکول های کوچک استفاده می شود که در آن تعداد زیادی از مواد شیمیایی با کارایی بالا برای شناسایی مولکول های کوچک فعال بیولوژیکی برای اعتبارسنجی بیشتر در آزمایش های بیولوژیکی یا دارویی، آزمایش و غربالگری می شوند و امکان آزمایش خودکار تعداد زیادی از ترکیبات شیمیایی یا زیستی را در مدت زمان محدود برای یک هدف خاص زیستی فراهم می کند و شامل مجموعه های ترکیبی بزرگی از مولول های کوچک، ربات های صنعتی و اتوماسیون پیچیده است. شایان ذکر است که HTS تنها یک مرحله از مراحل اولیه کشف دارو است. مراحل دیگر شامل ساخت کتابخانه مرکب، غربالگری ثانویه، و بهینه سازی کتابخانه مرکب از طریق شیمی دارویی است (4,5). در این فرآیند، تعداد زیادی از ترکیبات، به صورت خودکار، برای فعالیت به عنوان بازدارنده یا فعال کننده یک

هدف بیولوژیکی خاص، مانند یک گیرنده سطح سلول یا یک آنزیم متابولیک، آزمایش می‌شوند (1). اساس این غربالگری بر توسعه دستگاه‌های خودکار و روش‌های سنجش سریع است (6).

در چند دهه گذشته علاقه فزاینده‌ای به توسعه فناوری‌های غربالگری با توان بالا وجود داشته است، عمدتاً به این دلیل که روش‌های غربالگری ترویج شده توسط صنعت داروسازی نقش کلیدی در کشف دارو داشته است. افزایش قدرت محاسباتی و کوچک‌سازی تجهیزات غربالگری اکنون امکان انجام آنالیزهای HTS را حتی در آزمایشگاه‌های کوچک دانشگاهی فراهم می‌کند (7,8). این داده‌ها باید با استفاده از روش‌ها و پروتکل‌های آماری و داده‌کاوی مناسب برای شناسایی اهداف دارویی امیدوارکننده پردازش شوند. یکی از چالش‌های کلیدی که باید در طول تجزیه و تحلیل داده‌های HTS پاسخ داده شود، شناسایی و حذف موفقیت‌آمیز سوگیری (به عنوان مثال خطای سیستماتیک) در اندازه‌گیری‌ها است (7).

غربالگری با توان بالا، یک تکنیک قدرتمند و فناوری کلیدی با ظهور در عرصه کشف دارو است، که به محققان اجازه می‌دهد تا به سرعت و کارآمد غربالگری سریع کتابخانه‌های ترکیبی بزرگ را برای شناسایی کاندیدهای دارویی بالقوه، امکان پذیر کنند و تعداد زیادی از ترکیبات را برای فعالیت‌های بیولوژیکی خاص آزمایش کنند. توانایی غربالگری هزاران تا میلیون‌ها ترکیب در مدت زمان نسبتاً کوتاه، روند کشف دارو را به طور قابل توجهی تسریع کرده است (6,9,10). امروزه HTS یک فناوری بالغ است که اثربخشی آن در ترکیب با فن‌آوری‌های مکمل و اهرم دانش نوظهور برای شناسایی نقاط شروع داروهای فردا به حداکثر می‌رسد (11).

#### تاریخچه

مفهوم غربالگری با توان بالا، برای اولین بار در اواسط دهه ۱۹۸۰ میلادی ظاهر شد و در طول سالیان گذشته برای پاسخگویی به نیازهای متغیر تحقیقات دارویی، تکامل یافته است (11). ظهور و بلوغ غربالگری با توان بالا در طی دهه‌های گذشته به صورت یک بستر برای کشف اولیه در صنعت داروسازی دیده شده است. در اواخر دهه ۱۹۸۰ تا اواسط دهه ۱۹۹۰، پیشرفت‌های قابل توجه در شیمی ترکیبی و ژنومیک به رشد سریع HTS کمک کرد. پتانسیل ارائه هزاران ترکیب جدید به سرعت و ارزان باعث ایجاد خوش بینی زیادی در مورد وعده کشف داروهای جدید در آینده شد و به توسعه فناوری HTS برای ارزیابی تعداد زیادی از ترکیبات جدید موجود از طریق شیمی ترکیبی کمک کرد. تقریباً در همان زمان، پیشرفت سریع در ژنومیک، بسیاری از اهداف دارویی جدید بالقوه را نشان داد. فقدان قابلیت دارویی و اطلاعات ساختاری مستند برای بسیاری از اهداف ژنومی جدید منجر به تبدیل HTS به روش انتخابی برای شناسایی تعدیل‌کننده‌های مولکولی کوچک این اهداف از درون مجموعه‌های ترکیبی رو به افزایش در صنعت داروسازی شد. در نتیجه، صنعت داروسازی مبالغ هنگفتی از سرمایه را برای ایجاد پیشرفت سریع در فناوری‌های HTS از نظر اتوماسیون، کوچک‌سازی و روش‌شناسی سنجش سرمایه‌گذاری کرد (11,12,13).

#### فرایند

غربالگری با توان بالا، یک فرآیند فشرده اما با زمان محدود است که ممکن است یک یا چند بار در طول فرآیند کشف دارو رخ دهد (۱۱). در فرآیند HTS، هزاران تا میلیون‌ها ترکیب شیمیایی به سرعت در برابر یک هدف بیولوژیکی خاص با استفاده از سیستم‌های سنجش خودکار غربالگری می‌شوند. هدف اولیه در این روش، شناسایی اهداف دارویی بالقوه است که می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای توسعه دارو یا ابزارهای تحقیقاتی جدید باشد. معمولاً شامل استفاده از سیستم‌های رباتیک و قالب‌های سنجش کوچک شده برای انجام آزمایش‌ها به شیوه‌ای با سرعت بالا و حجم بالا است. سنجش‌ها برای اندازه‌گیری اثر مولکول‌های کوچک بر روی اهداف بیولوژیکی مورد علاقه، مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، یا گیرنده‌ها طراحی شده‌اند. این سنجش‌ها برای حساس و اختصاصی بودن بهینه‌سازی شده‌اند و به محققان این امکان را می‌دهند تا به سرعت ترکیباتی را که فعالیت مورد نظر را نشان می‌دهند شناسایی کنند. با آزمایش تعداد زیادی از ترکیبات به طور همزمان، محققان را قادر می‌سازد تا روند کشف دارو را تسریع کنند و احتمال یافتن موارد موثر امیدوارکننده را برای توسعه بیشتر بهبود بخشند. داده‌های به دست آمده می‌تواند به محققان در اولویت‌بندی ترکیبات برای آزمایش‌های بیشتر، بهینه‌سازی و مطالعات پیش‌بالینی کمک کند. به طور کلی، فرآیند غربالگری با کارایی بالا نقش مهمی در پیشبرد تلاش‌های کشف دارو و تسریع توسعه درمان‌های جدید برای بیماری‌ها و شرایط مختلف ایفا می‌کند (4,5,12,14).

این فناوری ۴ بخش اصلی دارد: ۱- آماده سازی در تعداد و حجم بالا، ۲- آنالیز و بررسی چندگانه مواد، ۳- جمع آوری آنان در بانک داده و ۴- تجزیه و تحلیل (4).

### انواع غربالگری با توان بالا

غربالگری با توان عملیاتی بالا رویکردها و فناوریهای مختلفی را در بر می گیرد که غربالگری سریع هزاران تا میلیونها ترکیب را برای فعالیت بیولوژیکی یا پتانسیل درمانی ممکن می سازد (1,2). یکی از انواع رایج HTS غربالگری بیوشیمیایی است، که در آن ترکیبات برای توانایی آنها در تعامل با یک هدف خاص، مانند یک آنزیم یا گیرنده آزمایش می شوند. این نوع غربالگری اغلب شامل استفاده از سنجش های فلورسنت یا مبتنی بر آنزیم برای تشخیص فعالیت ترکیب است (7).

غربالگری مبتنی بر سلول یکی دیگر از انواع پرکاربرد HTS است که در آن ترکیبات برای تأثیراتشان بر فرایندها یا فنوتیپ های سلولی آزمایش می شوند. این رویکرد معمولاً شامل استفاده از سلول های کشت شده است که یک هدف خاص را بیان می کنند یا یک فنوتیپ مرتبط با بیماری را نشان می دهند، و ترکیبات از نظر توانایی آنها در تعدیل این پاسخ های سلولی غربالگری می شوند (12).

علاوه بر غربالگری بیوشیمیایی و مبتنی بر سلول، انواع دیگر HTS شامل غربالگری فنوتیپی، که در آن ترکیبات بر اساس توانایی آنها در القای یک فنوتیپ یا پاسخ سلولی خاص ارزیابی می شوند، و غربالگری مبتنی بر مسیر، که در آن ترکیبات بر اساس اثرات آنها بر روی آنها غربالگری می شوند. یک مسیر سیگنالینگ خاص یا فرآیند بیولوژیکی. هر نوع HTS مزایا و چالش های منحصر به فردی را ارائه می کند و انتخاب رویکرد غربالگری به اهداف تحقیقاتی خاص بستگی دارد (4,7,12).

### سنجش HTS

آزمایشی که دقیقاً تعریف شده و به طور کارآمد طراحی شده است که تأثیر یک ماده را بر روی یک فرآیند بیوشیمیایی یا سلولی مورد نظر اندازه گیری می کند (4,6,11). توسعه سنجش مناسب یا مجموعه ای از سنجش ها برای اجرای موفقیت آمیز فرایند HTS ضروری است. این آزمون ها با استفاده از ترکیب ابزار و فناوری های رباتیک، نرم افزارها و دستگاه ها و آشکارسازهای بسیار حساس با سرعت بسیار زیاد، انجام می شود (4,5,11).

### انواع سنجش HTS

HTS از انواع سنجش استاندارد شناخته شده برای اکثر دانشمندان بیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده می کند (به عنوان مثال، ELISA، سنجش تکثیر و سمیت سلولی، سنجش گزارشگر، و سنجش اتصال). غربالگرها سنجش ها را به صورت ناهمگن یا همگن تعریف می کنند. سنجش های ناهمگن نیازمند مراحل هستند که فراتر از افزودن مایعات ساده و خواندن هستند (مانند مراحل فیلتراسیون، سانتریفیوژ و شستشوی صفحه). سنجش های همگن فقط به افزودن و انکوباسیون و سپس خواندن نیاز دارند (5,6). غربالگری با توان بالا، به دلیل نیاز به پردازش هزاران سنجش در روز، حول دنیای ترکیبی میکروپلیت های چند چاهکی و پردازش رباتیک می چرخد. برای چندین سال، سنجش های HTS در میکروپلیت استاندارد ۹۶ چاهکی اجرا می شدند. با پیشرفت علم و فناوری، فرایند غربالگری با توان بالا به سمت استفاده از ابزار و تجهیزاتی با توان عملیاتی بالا و حجم کمتر، که به هزینه کمتر تبدیل می شد، رفت. اکنون، از میکروپلیت هایی که دارای ۹۶، ۶۱۴۴، ۳۴۵۶، ۱۵۳۶، ۳۸۴، ۱۹۲ چاهک یا بیشتر هستند، استفاده می شود که همگی مضرری از عدد ۹۶ هستند (4,5,11,15).

### HSE در همه گیری کووید ۱۹

HTS به عنوان یک ابزار کارآمد برای توسعه داروهای ضد ویروسی استفاده شده است که تا بحال توانسته چندین شکل دارویی بالقوه (مانند امریکاسان و نیکوزامید) را علیه عفونت ویروس ابولا در سال ۲۰۱۴ و زیکا شناسایی کند. همچنین در زمان پاندمی کووید ۱۹، این روش به عنوان یک ابزار حیاتی ظاهر شده است و روشی سریع و کارآمد برای شناسایی داروهای بالقوه برای مبارزه با کروناویروس جدید ارائه می کند. با نیاز فوری به درمان ها و واکسن های موثر برای کووید-۱۹، محققان به HTS روی آورده اند تا

کتابخانه‌های موجود ترکیبات را از نظر توانایی آنها در مهار ویروس یا کاهش علائم آن بررسی کنند. این رویکرد امکان ارزیابی تعداد زیادی از ترکیبات را در مدت زمان کوتاهی فراهم می‌کند، روند کشف دارو را تسریع می‌کند و احتمال شناسایی داروهای امیدوارکننده را افزایش می‌دهد (16,17). تا کنون، پنج نوع سنجش آزمایشگاهی HTS برای شناسایی ترکیبات ضد SARS-CoV-2 با توجه به اهداف و استراتژی‌های طراحی مختلف ایجاد شده اند: سنجش تک هدف، سنجش های چند هدف و سنجش اثربخشی ضد ویروسی فنوتیپی. در نتیجه مطالعات و بررسی‌ها، در مقایسه با سنجش‌های تک‌هدف، سنجش‌های چندهدف، مزایایی را از نظر دقت و کارایی نشان دادند (16).

سنجش‌های HTS برای هدف قرار دادن اجزای کلیدی ویروس، مانند پروتئین اسپایک یا آنزیم‌های ویروسی، که نقش مهمی در چرخه تکثیر ویروس دارند، طراحی شده‌اند. سنجش HTS همچنین می‌تواند برای شناسایی ترکیباتی استفاده شود که با ورود ویروس به سلول‌های میزبان تداخل می‌کنند، تکثیر ویروس را مسدود می‌کنند یا پاسخ التهابی مرتبط با موارد شدید COVID-19 را مهار می‌کنند (16,17,18).

### نتیجه گیری

غربالگری با توان بالا فرآیند کشف دارو را متحول کرده و به ابزاری ضروری در صنعت داروسازی و تحقیقات دانشگاهی تبدیل شده است. HTS با فعال کردن آزمایش سریع و سیستماتیک کتابخانه‌های ترکیبی بزرگ، کشف داروهای جدید را تسریع کرده و شناسایی اهداف درمانی جدید را تسهیل کرده است. پیشرفت مداوم فن‌آوری‌های غربالگری با کارایی بالا، نوید بزرگی برای افزایش کارایی و اثربخشی کشف دارو و باز کردن فرصت‌های جدید در زیست‌شناسی شیمیایی، پزشکی شخصی‌سازی شده و استفاده مجدد از دارو است. از آنجایی که محققان به نوآوری و اصلاح روش‌های HTS ادامه می‌دهند، زمینه غربالگری با توان عملیاتی بالا در سال‌های آینده مشارکت قابل توجهی در توسعه دارو و تحقیقات زیست‌پزشکی دارد. پیشرفت‌ها در فن‌آوری‌ها و روش‌های HTS به گسترش قابلیت‌های بسترهای غربالگری ادامه می‌دهد و فرصت‌های جدیدی را برای تحقیق و توسعه دارویی نوآورانه ارائه می‌دهد. پذیرش گسترده HTS در دانشگاه و صنعت بر اهمیت آن در پیشبرد پیشرفت علمی و پیشبرد پزشکی دقیق تأکید می‌کند.

### References:

1. Silverman L, Campbell R, Broach JR. New assay technologies for high-throughput screening. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1998; 2(3): 397-403.
2. Mayr LM, Bojanic D. Novel trends in high-throughput screening. *Current opinion in pharmacology*. 2009; 9(5): 580-8.
3. Sittampalam GS, Kahl SD, Janzen WP. High-throughput screening: advances in assay technologies. *Current opinion in chemical biology*. 1997; 1(3): 384-91.
4. Azadi Payam, Qarailo Daoud. What is the high power screening test method? (First part: introduction, mechanism, application). *Laboratory knowledge of Iran* 2019; 8(4): 11-16. [In Persian]
5. Armstrong JW. A review of high-throughput screening approaches for drug discovery. *Am. Biotechnol. L ab*. 1999; 17(1): 26-8.
6. Zeng W, Guo L, Xu S, Chen J, Zhou J. High-throughput screening technology in industrial biotechnology. *Trends in biotechnology*. 2020; 38(8): 888-906.
7. Caraus I, Alsuwailem AA, Nadon R, Makarenkov V. Detecting and overcoming systematic bias in high-throughput screening technologies: a comprehensive review of practical issues and methodological solutions. *Briefings in bioinformatics*. 2015; 16(6): 974-86.

8. Janzen WP, editor. High throughput screening: methods and protocols. Vol. 190. Springer Science & Business Media; 2008
9. Blay V, Tolani B, Ho SP, Arkin MR. High-throughput screening: today's biochemical and cell-based approaches. *Drug Discovery Today*. 2020; 25(10):1807-21.
10. Fernandes PB. Technological advances in high-throughput screening. *Current opinion in chemical biology*. 1998; 2(5): 597-603.
11. Wildey MJ, Haunso A, Tudor M, Webb M, Connick JH. High-throughput screening. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2017; 50: 149-95.
12. An WF, Tolliday N. Cell-based assays for high-throughput screening. *Molecular biotechnology*. 2010; 45:180-6.
13. Hertzberg RP, Pope AJ. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Current opinion in chemical biology*. 2000; 4(4): 445-51.
14. Giacomotto J, Ségalat L. High-throughput screening and small animal models, where are we? *British journal of pharmacology*. 2010; 160(2): 204-16.
15. Mayr LM, Fuerst P. The future of high-throughput screening. *SLAS Discovery*. 2008;13(6): 443-8.
16. Xu T, Zheng W, Huang R. High-throughput screening assays for SARS-CoV-2 drug development: Current status and future directions. *Drug discovery today*. 2021; 26(10): 2439-44.
17. Yang Z, Cai X, Ye Q, Zhao Y, Li X, et al. High-Throughput Screening for the Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 with Essential Dynamic Behavior. *Current Drug Targets*. 2023; 24(6): 532-45.
18. Lynch C, Sakamuru S, Ooka M, Huang R, Klumpp-Thomas C, et al. High-Throughput Screening to Advance in Vitro Toxicology: Accomplishments, Challenges, and Future Directions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2024; 64:191-209

## کاربرد آگوزوم ها برای درمان سرطان

آرام یوسفی<sup>۱\*</sup>، فرناز خیری<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. دکتری تخصصی مدیریت آموزشی، آموزش و پرورش منطقه فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران

### چکیده

بیماری سرطان دومین عامل مرگ و میر در کل جهان پس از بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشد. اخیراً روند درمان سرطان به سمت طراحی سیستم‌های تحویل بیولوژیکی پایدار و سازگار با انسان‌ها تغییر یافته است. از جمله عواملی که شاهد پیشرفت آن بوده‌ایم آگوزوم‌ها هستند. استفاده از آگوزوم‌ها به عنوان دارویی کارآمد و غیرسمی پنجره جدیدی را برای درمان سرطان گشوده است. حدود ۳۰ سال از کشف آگوزوم‌ها می‌گذرد اما در سال‌های اخیر دانشمندان توجه زیادی به استفاده از آگوزوم‌ها به منظور سلول درمانی نشان داده‌اند. محققان بر این باورند که آگوزوم‌ها می‌توانند به عنوان نانو وریکول برای انتقال ژن و دارودرمانی مورد استفاده قرار گیرند. آگوزوم‌ها با اندازه ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند و می‌توانند از سدخونی-مغزی عبور کنند و حاوی تنوعی از مولکول‌ها از جمله نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌باشند و تقریباً در تمام مراحل تومورزایی از تشکیل تومور اولیه تا فاز تهاجم و در نهایت متاستاز نقش دارند. اگر چه نانوذرات مصنوعی به عنوان حامل نیز عمل می‌کنند، اما آگوزوم‌ها نانوذرات طبیعی هستند، بنابراین در محیط سازگارتر بوده و در محیط زیست تجزیه می‌شوند و سمیت و ایمنی‌زایی کمتری دارند تاکنون آگوزوم‌ها برای مهار سلول‌های سرطانی معده، سرطان روده بزرگ، سرطان پانکراس، سرطان ریه، سرطان سلول کبدی (CC) و سرطان پستان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به طور کلی جهت‌گیری مطالعات در این آزمایش‌ها به سمت استفاده از آگوزوم‌ها به عنوان نشانگر زیستی و حامل دارو در بیماری‌های مختلف به خصوص سرطان است. بنابراین با دستکاری محموله‌های زیستی می‌توان از آن‌ها به عنوان عامل درمانی در بهبود بیماری‌های مختلف استفاده کرد. در مطالعه حاضر توجه ویژه بر روی نقش آگوزوم‌ها در درمان سرطان می‌باشد.

واژگان کلیدی: آگوزوم، دارو، درمانی، سرطان.

آدرس نویسنده مسئول: آرام یوسفی هفشجانی دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

تلفن: ۳۳۳۵۱۱۰۰ همراه: ۰۹۹۲۳۵۵۲۵۴۴

پست الکترونیک: aramyousefi204@gmail.com

## Application of exosomes for cancer treatment

Aram Yousefi<sup>1\*</sup>, Farnaz Kheiri<sup>2</sup>

1. Master s Student of Genetics, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Iran
2. Ph.D. in Educational Management, Education and Training of Flavarjan Region, Flavarjan, Isfahan, Iran

### Abstract

Cancer is the second leading cause of death worldwide after cardiovascular diseases. Recently, the trend of cancer treatment has changed towards the design of biological delivery systems that are stable and compatible with humans. Among the factors that we have witnessed the development of are exosomes. The use of exosomes as an efficient and non-toxic medicine has opened a new window for cancer treatment. About ۳۰ years have passed since the discovery of exosomes, but in recent years, scientists have paid great attention to the use of exosomes for cell therapy. Researchers believe that exosomes can be used as nanovesicles for gene transfer and drug therapy. Exosomes are nanometers in size and can pass through the blood-brain barrier and contain a variety of 100 to 30 molecules including nucleic acids, proteins and lipids and are involved in almost all stages of tumorigenesis, from the initial tumor formation to the invasion phase and in finally, metastasis plays a role. Although artificial nanoparticles also act as carriers, but exosomes are natural nanoparticles, so they are more compatible in the environment and decompose in the environment, and have less toxicity and immunogenicity. So far, exosomes have been used to inhibit stomach cancer cells, colon cancer, pancreatic cancer, lung cancer, hepatocellular carcinoma (CC) and breast cancer have been used. In general, the direction of studies in these experiments is towards the use of exosomes as biomarkers and drug carriers in various diseases, especially cancer. Therefore, by manipulating biological cargoes, they can be used as a therapeutic agent in curing various diseases. In the present study, special attention is paid to the role of exosomes in cancer treatment

**Keywords:** exosome, drug, therapy, cancer

### مقدمه

سرطان دومین عامل مرگ و میر در سراسر جهان پس از بیماری‌های قلبی عروقی است و متأسفانه، انتظار می‌رود شیوع کلی بدخیمی‌های شایع از ۱۴ میلیون نفر در سال ۲۰۱۲ تا ۱۹ میلیون نفر در سال ۲۰۲۵ متغیر باشد (۱). به طور جدی بر ثبات جامعه و پیشرفت اقتصادی تأثیر می‌گذارد. تاکنون بسیاری از روش‌های درمانی مانند جراحی، رادیوتراپی، شیمی‌درمانی، ژن‌درمانی برای جلوگیری از پیشرفت سرطان استفاده می‌شده است، اما این روش‌ها به اندازه کافی برای رفع تمام نیازهای ریشه‌کنی سرطان مؤثر نیستند و ممکن است توده سرطانی مدتی پس از درمان در همان محل اولیه یا در سایر نقاط بدن ظاهر شود و باعث ایجاد و عود سرطان شود و حتی مقاومت دارویی بعد از درمان‌های کلاسیک بروز کند. بنابراین نیاز مبرمی به مواد و روش‌های جدید برای پزشکان وجود دارد تا این درمان‌های مؤثر را با راندمان بالا و سمیت کم در زمینه سرطان که بیماری اولویت دار است انجام دهند (۲). در سال‌های اخیر، چندین نانوذرات مصنوعی به‌عنوان وزیکول برای رساندن داروهای درمانی به بخش عمده تومور و تأثیر مستقیم بر محل هدف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، نانوذرات دارای ویژگی‌های آزاد کننده دارویی هستند که باعث ایجاد یک غلظت بالایی از داروهای مرتبط در اطراف تومور و افزایش کارایی ضد سرطانی می‌شوند (۳).

از جمله عواملی که شاهد پیشرفت آن بوده‌ایم اگزوزوم‌ها هستند (۴). تقریباً ۳۰ سال از کشف اگزوزوم‌ها می‌گذرد اما در سال‌های اخیر دانشمندان بیشتر بر روی استفاده از اگزوزوم‌ها برای سلول درمانی تمرکز کرده‌اند (۵). دانشمندان بر این باورند که اگزوزوم‌ها می‌توانند به عنوان نانوزیکول‌ها برای انتقال ژن و درمان دارویی استفاده شوند (۶). اگزوزوم‌ها حامل‌های دارویی درمانی هستند که ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر اندازه دارند و می‌توانند از سد خونی مغزی عبور کنند. آن‌ها برای رساندن مولکول‌های زیستی فعال به مغز





## نقش اگزوزوم ها در درمان سرطان

اگزوزوم ها پتانسیل زیادی برای درمان سرطان در آزمایشات بالینی نشان داده اند و به عنوان نسل بعدی نانوپلتفرم ها با کاربردهای درمانی پیشرفته در نظر گرفته می شوند (۱۷). تاکنون اگزوزوم ها برای مهار سلول های سرطانی معده (۱۸)، سرطان روده بزرگ (۱۹)، سرطان پانکراس (۲۰)، سرطان ریه (۲۱) سرطان سلول کبدی (CC) (۲۲) و سرطان پستان (۲۳) مورد استفاده قرار گرفته اند. برخی از سرطان هایی که اگزوزوم ها در بهبودی نقش داشته اند در این مقاله مورد بحث قرار گرفته است و یکی از مهم ترین این سرطان ها ، سرطان پستان است. سرطان پستان یکی از شایع ترین بیماری ها در بین زنان است. براساس آمار سازمان بهداشت جهانی، از هر ۸ تا ۱۰ زن ، یک نفر دچار سرطان پستان میشود. براساس آمار ایران در کشور ما از هر ۱۰ تا ۱۵ زن احتمالاً سرطان پستان دارد. اما سن بروز این سرطان در زنان ایرانی حداقل یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه یافته است. میانگین سنی تشخیص سرطان سینه در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است. اگرچه شواهد اپیدمیولوژیک بر وجود عوامل خطر تاکید دارند، داشتن سابقه خانوادگی سرطان پستان قوی ترین عامل خطر برای این بیماری محسوب می شود (۲۴).

آدریامایسین و دوستاکسل دو عاملی هستند که معمولاً برای درمان سرطان استفاده می شوند. اگزوزوم های مشتق از آدریامایسین و سلول های سرطانی مقاوم به Docetaxel می توانند مقاومت دارویی را از طریق پروتئین با واسطه اگزوزوم و تحویل miRNA تنظیم کنند Jing و همکاران نشان دادند که تحویل p-گلیکوپروتئین توسط اگزوزوم ها می تواند باعث مقاومت دارویی در سلول های سرطان سینه MCF-7 شود. این نتیجه نشان داد که سلول های مقاوم در برابر آدریامایسین ترشح کننده ی اگزوزوم ها نه تنها می توانند ترمینال هیدرولاز L-1 کربوکسیل را به سلول های گیرنده یوبی کویترین تبدیل می کنند بلکه می توانند بیان پروتئین های گلیکوپروتئین P را از طریق مسیر سیگنالینگ MAPK/ERK نیز افزایش دهند (۲۵).

سرطان تخمدان نیز یک بدخیمی مرتبط با دستگاه تناسلی زنان است که دومین بدخیمی شایع در بین زنان و سومین سرطان شایع سولوی در بین همه سرطان ها است و بالاترین میزان مرگ و میر را در میان سرطان های زنان دارد (۲۶). با توجه به میزان بالای عود و مرگ و میر در تومور سلول گرانولوزا و تأثیر این بیماری بر باروری و همچنین مشکل گسترش سرطان در نتیجه استفاده از اگزوزوم ها، تشخیص و درمان زودهنگام تومور سلول گرانولوزا بسیار حائز اهمیت است. همانطور که در مطالعه Nikdel و همکاران (۲۰۲۱) زمانی که سلول های گرانولوزا با اگزوزوم های آزاد شده از سلول های سرطانی تخمدان تحت درمان قرار گرفتند، افزایش قابل توجهی در گرانولوژنز هورمون های Inhibin B و AMH وجود داشت، بنابراین می توان فرض کرد که چون سرطان تخمدان بر سلول های گرانولوزای اطراف خود تأثیر می گذارد، در ایجاد تومورهای سلول گرانولوزا نیز ممکن است نقش داشته باشد. بدیهی است که مطالعات تکمیلی به ویژه ارزیابی های بالینی در این راستا مورد نیاز است (۲۷).

لوسمی یکی از بدخیمی های ناشی از خون یا مغز استخوان است که پنجمین یا ششمین علت مرگ ناشی از سرطان در بین مردان و زنان است و شامل لوسمی حاد میلوئیدی (AML)، لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)، لوسمی لنفوئیدی حاد (ALL) است. لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) و... است. پیش آگهی این بیماری به نوع لوسمی و سن بیمار بستگی دارد (۲۸). یکی از عوامل مهم و اساسی در رشد و پیشرفت تومورها، ارتباط بین سلول ها است که باعث تغییر شرایط نرمال فیزیولوژیک به نفع سرطان میشود و نقش اگزوزوم ها در این ارتباطات بسیار مهم است (۲۹). مطالعات مختلف نشان میدهند که مقدار اگزوزوم در مایعات بیولوژیک بیماران لوسمی اغلب بالاست (۳۰).

علاوه بر مطالعه نقش اگزوزوم ها به عنوان یک عامل تأثیرگذار در ایجاد و پیشرفت بدخیمی، استفاده از آن ها در بحث بهبود بیماری های مختلف از جمله لوسمی نیز مورد توجه است. نکته دیگری که در مورد این نانو وزیکول ها قابل توجه است که می توان از آن ها به عنوان حامل استفاده کرد، توانایی آن ها در انتقال محتویات بین سلول ها با اگزوزوم و کاهش پاکسازی آن ها توسط سیستم فاگوسیت های تک هسته ای بدن یکی دیگر از نکات قابل توجه این نانو وزیکول ها میباشد که استفاده از آن ها را به عنوان انتقال دهنده ی عوامل درمانی بدون پاکسازی سریع و سمیت ممکن کرده است (۳۱).

### عملکرد بیولوژیکی آگزوزوم ها

آگزوزوم ها که در سلول ها و موجودات زنده زندگی می کنند، دو عملکرد بیولوژیکی را بر عهده دارند: حذف پروتئین هایی که عملکرد آن ها به پایان رسیده است، و دوم، انتقال مولکول های زیستی خاص بین سلول ها از طریق مایعات بیولوژیکی مانند خون و پلاسما (۳۲). مطالعات نشان داده اند که سلول های سرطانی مقادیر بیشتری از وزیکول های خارج سلولی را آزاد می کنند که در تبدیل سلول های غیر متاستاتیک به متاستاز نقش دارند (۳۳). مطالعات اخیر نشان داده اند که وزیکول های خارج سلولی آزاد شده توسط سلول های سرطانی محیط تومور را تغییر می دهند و در تبدیل سلول های استرومایی به سلول های رگ زا، سلول های پیش متاستاتیک یا سلول های سرکوب کننده تومور نقش دارند (۳۴). آگزوزوم های آزاد شده از سلول سرطانی، بر سطح خود انبوهی از آنتی ژن های توموری دارند که از این آنتی ژن ها میتوان در تشخیص های غیر تهاجمی و زودهنگام سرطان و همچنین نظارت بر روند درمان استفاده کرد (۳۵).

در روش های سنتی، آگزوزوم ها با اولتراسانتریفیوژ جدا می شوند، اما این روش نمی تواند آگزوزوم ها را از سایر ساختارهای وزیکولی یا پروتئین های بهم چسبیده تمایز دهد. روش های دیگر مانند وسترن بلات و سنجش های ایمونولوژی فرایندهای زمان بری هستند که به مقادیر زیادی از آگزوزوم جدا شده از خون یا محیط کشت نیاز دارند (۳۵).

### برهمکنش آگزوزوم ها با سلول هدف

به طور کلی، آگزوزوم ها می توانند از طریق سه مکانیسم با سلول گیرنده تعامل داشته باشند. مکانیزم اول، پروتئین های غشایی آگزوزوم ها می توانند مستقیماً به گیرنده های سیگنالی غشای سلول هدف متصل شوند (۳۶). دوم، آگزوزوم ها با غشای پلاسمایی سلول هدف متصل میشوند و محتویات خود را در سلول هدف آزاد می کنند (۳۷). سوم، آگزوزوم ها می توانند وارد سلول هدف شوند که خود دو سرنوشت دارد. آگزوزوم های بلعیده شده توسط سلول هدف می توانند با اندوزوم ها ادغام شوند و تحت ترانس سیتوزیس قرار بگیرند و به سلول های مجاور منتقل شوند یا اینکه آگزوزوم ها وارد اندوزوم سلول هدف شده و به لیزوزوم هدایت شوند تا در آنجا تخریب شوند (۳۸).

### مزایای استفاده از آگزوزوم در درمان سرطان

اگرچه نانوذرات مصنوعی به عنوان حامل نیز عمل می کنند، اما آگزوزوم ها نانوذرات طبیعی هستند، بنابراین در محیط سازگارتر بوده و در محیط زیست تجزیه میشوند و سمیت و ایمنی زایی کمتری دارند (۳۹). اگر چه وزیکول های خارج سلولی مانند لیپیدها، پروتئین ها، گیرنده ها و مولکول های اثر گذار نیز بیولوژیک هستند، اما نسبت به آگزوزوم ها بزرگ تر و ناهمگن تر هستند، بنابراین کاربرد آن ها برای بارگذاری و تحویل دارو محدود است. آگزوزوم ها به راحتی تولید می شوند زیرا اکثر سلول ها می توانند آن ها را تولید کنند. آگزوزوم ها در مایعات بیولوژیکی پایدار هستند و اندازه کوچک آن ها باعث میشود که آگزوزوم ها به راحتی از ریه آزاد شده و از سد خونی مغزی عبور کنند (۴۰). آگزوزوم ها برای هدف قرار دادن سرطان مزیت بالاتری دارند زیرا اتصال و نفوذ آن ها به سلول های تومور بیشتر از لیپوزوم های هم اندازه است (۴۱). علاوه بر این به دلیل افزایش نفوذپذیری و ماندگاری آگزوزوم های نانومتریک تمایل به انباشته شدن در بافت های تومور حاوی رگ های خونی غیر عادی نسبت به بافت های طبیعی را دارند. بنابراین آگزوزوم ها به راحتی میتوانند به تومورهای بدخیم برسند تا میزان تحویل و دریافت دارو را افزایش دهند. علاوه بر این، آگزوزوم ها را می توان با پروتئین ها، پپتیدها یا آنتی بادی های هدف دار تومور برای سیستم های تحویل دارو و اسید نوکلئیک بهینه ساخت. این ویژگی ها آگزوزوم ها را به یکی از بهترین گزینه ها برای درمان سرطان تبدیل می کند (۴۲).

### نتیجه گیری:

اخیراً روند درمان سرطان به سمت طراحی سیستم های تحویل بیولوژیکی پایدار و سازگار با انسان ها تغییر کرده است. استفاده از آگزوزوم ها به عنوان داروهای موثر و غیر سمی درهای جدیدی را در درمان سرطان می گشاید. مکانیسم های پیچیده و مولکول های زیستی متعددی در ساخته شدن و بارگیری آگزوزوم ها دخیل هستند. در ۳۰ سالی که از معرفی آگزوزوم ها می گذرد، پیشرفت

های زیادی در توضیح خواص و عملکردهای بیولوژیکی آن ها حاصل شده است با کشف اگزوزوم ها راهی امیدبخش برای درمان بیماری های مختلف به وجود آمده است. زمینه تحویل دارو مبتنی بر اگزوزوم به طور قابل توجهی رشد کرده است. به طور خاص، به نظر می رسد که سرطان زمینه تحقیقاتی مناسبی برای سیستم های تحویل دارو مبتنی بر اگزوزوم میباشد که در بسیاری از مطالعات مرتبط با سرطان منعکس شده است. در واقع اگزوزوم ها مولکول های زیستی را منتقل می کنند؛ بنابراین با دستکاری محموله های زیستی می توان از آن ها به عنوان عامل درمانی در بهبود بیماری های مختلف استفاده کرد. در جهت توسعه ی این نوع روش درمانی مکانیسم جذب اگزوزوم ها به تحقیقات بیشتری نیاز است. به نظر می رسد که سرطان زمینه تحقیقاتی مناسبی برای سیستم های تحویل دارو مبتنی بر اگزوزوم می باشد که در مطالعات متعدد مربوط به سرطان منعکس شده است.

## References:

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011; 144(5): 646-74.
2. McCracken M, Olsen M, Chen Jr MS, Jemal A, Thun M, Ward E. Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2007; 57(4): 190-205.
3. Ahmad J, Akhter S, Ahmed Khan M, Wahajuddin M, H Greig N, et al. Engineered nanoparticles against MDR in cancer: The state of the art and its prospective. *Current pharmaceutical design*. 2016; 22(28): 4360-73.
4. Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer letters*. 2016;371(1):48-61.
5. Zhang B, Yeo RW, Lai RC, Sim EW, Chin KC, et al. Mesenchymal stromal cell exosome-enhanced regulatory T-cell production through an antigen-presenting cell-mediated pathway. *Cytotherapy*. 2018 1;20(5):687-96.
6. Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer letters*. 2016;371(1):48-61.
7. Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *Annual review of biochemistry*. 2019 Jun 20;88:487-514.
8. Maji K, Dasgupta S, Pramanik K, Bissoyi A. Preparation and evaluation of gelatin-chitosan-nanobioglass 3D porous scaffold for bone tissue engineering. *International journal of biomaterials*. 2016;2016.
9. Mortezaee K, Majidpoor J, Fathi F. Extracellular vesicle isolation, purification and evaluation in cancer diagnosis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2022 Oct 21:1-44.
10. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-9.
11. Saleh R, Elkord E. Exosomes: Biological carriers and promising tools for cancer immunotherapy. *Vaccines*. 2020 Jul 16;8(3):390.
12. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, Fournier DR, Piech T, et al. The Simoa HD-1 analyzer: a novel fully automated digital immunoassay analyzer with single-molecule sensitivity and multiplexing. *Journal of laboratory automation*. 2016 (4):533-47.
13. Li K, Chen Y, Li A, Tan C, Liu X. Exosomes play roles in sequential processes of tumor metastasis. *International journal of cancer*. 2019 Apr 1;144(7):1486-95.
14. Keustermans GC, Hoeks SB, Meering JM, Prakken BJ, de Jager W. Cytokine assays: an assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. *Methods*. 2013 ;61(1):10-7.

15. Sansone P, Savini C, Kurelac I, Chang Q, Amato LB, Strillacci A, et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 ;114(43):E9066-75.
16. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S. Tumour exosome integrins determine organotropic metast. *Nature*. 2015;527(7578):329-35.
17. Kim H, Kim EH, Kwak G, Chi SG, Kim SH, et al. Exosomes: cell-derived nanoplatforams for the delivery of cancer therapeutics. *International journal of molecular sciences*. 2020 ;22(1):14.
18. Sinha D, Roy S, Saha P, Chatterjee N, Bishayee A. Trends in Research on Exosomes in Cancer Progression and Anticancer Therapy. *Cancers* 2021, 13, 326.
19. Zaharie F, Muresan MS, Petrushev B, Berce C, Gafencu GA, et al. Exosome-carried microRNA-375 inhibits cell progression and dissemination via Bcl-2 blocking in colon cancer. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2015 1;24(4):435-43.
20. Shi H, Li H, Zhen T, Dong Y, Pei X, et al. The potential therapeutic role of exosomal microRNA -520b derived from normal fibroblasts in pancreatic cancer. *Molecular Therapy -Nucleic Acids*. 2020;20:373 -84.
21. Jeong K, Yu YJ, You JY, Rhee WJ, Kim JA. Exosome-mediated microRNA-497 delivery for anti-cancer therapy in a microfluidic 3D lung cancer model. *Lab on a Chip*. 2020;20(3):548-57.
22. Chen W, Quan Y, Fan S, Wang H, Liang J, et al. Exosome-transmitted circular RNA hsa\_circ\_0051443 suppresses hepatocellular carcinoma progression. *Cancer letters*. 2020;475:119-28.
23. Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Mossahebi-Mohammad. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cellular oncology*. 2017;40:457-70.
24. Samira Kazemzadeh, Esmaeil Babaei , Mohammad Ali Hoseinpour Fizi, Investigating the expression of CCAT2 gene as a new molecular marker in breast tumors, *Journal of Advanced Biomedical Sciences*, 2018; 7(4): 573-581. [In Persian]
25. jing Zhao Y, Xie L. Potential role of exosomes in cancer therapy. *Precision Radiation Oncology*. 2019;3(2):59-64.
26. Zhu H, Yang SY, Wang J, Wang L, Han SY. Evidence for miR-17-92 and miR-134 gene cluster regulation of ovarian cancer drug resistance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(12):2526-31.
27. Nikdel N, Baharara J, Zakerbostanabad S, Tehranipour M. The effect of exosomes derived from human ovarian epithelial cancer cells on the secretion of AMH and Inhibin in granulosa cells. *Nova Biologica Reperta*. 2021;8(1):31-8.
28. Zhou J, Wang S, Sun K, Chng WJ. The emerging roles of exosomes in leukemogenesis. *Oncotarget*. 2016;7(31):50698.
29. Whiteside TL. Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression. *Advances in clinical chemistry*. 2016;74:103-41.
30. Mudgapalli N, Nallasamy P, Chava H, Chava S, Pathania AS, et al. The role of exosomes and MYC in therapy resistance of acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities. *Molecular Aspects of Medicine*. 2019;70:21-32.

31. Urbanelli L, Buratta S, Sagini K, Ferrara G, Lanni M, et al. Exosome-based strategies for diagnosis and therapy. *Recent Patents on CNS Drug Discovery (Discontinued)*. 2015;10(1):10-27.
32. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 2013;200(4):373-83.
33. Griffiths SG, Cormier MT, Clayton A, Doucette AA. Differential proteome analysis of extracellular vesicles from breast cancer cell lines by chaperone affinity enrichment. *Proteomes*. 2017;5(4):25.
34. Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*. 2015 ;34(3):290-302.
35. Zhao Z, Yang Y, Zeng Y, He M. A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis. *Lab on a Chip*. 2016:489-96.
36. Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser WJ, Beer-Stolz D, Vujanovic NL. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology*. 2012;1(7):1074-83.
37. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3(1):24641.
38. Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP,. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of cellular physiology*. 2013 ;228(7):1487-95.
39. Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016;6(4):287-96.
40. Li X, Tsibouklis J, Weng T, Zhang B, Yin G, et al. Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of drug targeting*. 2017;25(1):17-28.
41. Li X, Tsibouklis J, Weng T, Zhang B, Yin G, et al. Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of drug targeting*. 2017;25(1):17-28.
42. Shamseddin Yousef Amoli , Razieh Yousefian Molla, Toktam Deylami, Masoumeh Deylami, et al, Development of exosome based drug delivery system for cancer treatment: a comprehensive review, *Journal of Applied Biology*, 2018: 57-71.[In Persian]

## کاربرد نانوتکنولوژی در دارورسانی

مریم امانی<sup>۱\*</sup>، نیکتا امانی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.  
۲. دانشجوی کارشناسی، گروه زیست شناسی، رشته زیست سلولی و ملکولی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر، ایران.

### چکیده

نانوتکنولوژی گسترده وسیعی از تکنولوژی‌های جدید برای تحقیق و توسعه یافتن و پیدا کردن راه های مطلوب برای درمان بیماری های مانند سرطان و کاهش عوارض جانبی دارویی و سمیت دارویی و شیمی درمانی شناخته شده است. سیستم دارورسانی نانوذره‌ای مختلف با تغییر حامل ها به پیدایش می‌شوند و دسترسی ایجاد تغییر در خواص دارویی به وجود می‌آورد (۱). بعضی نانو مواد دارای خواص درمانی منحصر به فردی‌اند که با دارو معمولی تفات دارند و به طور مستقیم برای درمان از آن می‌توان استفاده کرد نانو ذرات مبتنی بر اسیدها فینیم و طلا امکان تقویت پرتو ایکس را تا حد زیادی ممکن می‌کنند. اندازه کوچک نانو امکان دسترسی به سلول و بخش های مختلف از جمله هسته را فراهم کرده است (۲). همچنین به عنوان یابنده داخلی رگ ها یا سلول برای اهداف تشخیص و درمان کاربرد دارد (۱). نانو دارو ها به عنوان نظارت جامع، ساخت، ترمیم، عملیات سطح مولکول با استفاده از دستگاه ها و ساختار های نانو مهندسی می‌توان بیان کرد (۳). نانوذرات به عنوان سیستم دارو رسانی کلوتیدال شناخته شده است (۱). استفاده از نانو حامل یا نانو های حمل کننده مثل نانوذرات جامد، لیپوزوم ها، نانوذرات ویروسی مورد مطالعه و بحث است. برای جلوگیری از ایراد های دارورسانی، سیستم دارویی طراحی شده که دارورسانی مبتنی بر اسید نوکلئیک، سیستم دارورسانی مبتنی بر سلول، سیستم تحویل داروی خود نانوامولسیون کننده، تحویل دارو خود میکروامولسیون کننده شامل می شوند. که این سیستم ها مبتنی بر محرک های شیمیایی و فیزیکی، نانوسوزن ها، فناوری ریزتراشه ها توضیح داده شده است (۴). در کل نانو حامل های هوشمند در توسعه برای انتقال و آزاد سازی کنترل شده مولکول دارو موثر بوده است. کلمات کلیدی: نانوذرات، دارورسانی، نانو، دارو

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، کد پستی: 8813733395

تلفن: 038-33361000 همراه: 09163012853

پست الکترونیک: maryamamani1998@gmail.com

1. Master's Student of Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Bachelor's Student. Department of Biology, Cell and Molecular Biology, Faculty of Marine and Ocean Sciences, Khorramshahr University of Marine Sciences and art, Khorramshahr, Iran.

### Abstract

Nanotechnology is a wide range of new technologies for research and development and finding optimal ways to treat diseases such as cancer and reduce drug side effects and drug toxicity and chemotherapy. Different nanoparticle drug delivery systems by changing the resulting carriers Some nanomaterials have unique therapeutic properties that are different from conventional drugs and can be directly used for treatment. It can amplify the X-ray to a great extent. The small size of the nano allows access to the cell and different parts, including the nucleus. It is also used as an internal searcher for vessels or cells for diagnosis and treatment purposes General purpose Nanomedicines can be broadly defined as comprehensive monitoring, manufacturing, repair, and molecular level operations using nano engineering devices and structures. Nanoparticles are one of the types of systems known as clottidal drug delivery systems. Applications of nano-carriers such as solid nanowires, liposomes, and viral nanoparticles have been discussed. To overcome the disadvantages of drug delivery, a drug delivery system has been designed that includes nucleic acid-based drug delivery, cell-based drug delivery system, self-nanoemulsifying drug delivery system, and self-microemulsifying drug delivery. These systems are based on chemical and physical stimuli. Nanoneedles are the technology of microchips. In general, smart nanocarriers have been effective in the development for controlled delivery and release of drug molecules.

Key words: Nanoparticles, delivery-drug, Nano, Drug

### مقدمه

نانوفناوری علم تکوین مواد در اندازه مولکولی، و اتم‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر است که با خواص شیمیایی و الکتریکی به خصوص در موارد مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نانو تکنولوژی توانمندی در تولید مواد، ابزار و سیستم‌های جدید با در دست گرفتن کنترل در سطح مولکول و استفاده از خاصیت‌هایی که در آن مقیاس مطرح می‌شود. در صنعت داروسازی با استفاده از نانوتکنولوژی می‌توان ابزارهای قدرتمند و پر کاربردی در زمینه پزشکی و تحقیقاتی به دست آورد. علاوه بر ساخت ابزار، علم نانو دارو به ساختارهای مواد و دارو ارتباط دارد. نانو دارو به صورت مستقیم در ساخت خود دارو نقش ندارد بلکه در نحوه ی پخش شدن آن در بدن تاثیر دارد و اثر دارو را افزایش می‌دهد. براساس این علم پزشکان می‌توانند دارو را به منطقه‌ای یا ناحیه یا نقطه‌ای که بدن به آن نیاز دارد رسانده. سیستم داروسازی جدید به طور قابل ملاحظه ای برای کاهش دز مصرفی دارو، سمیت و عوارض دارو از نانوذرات استفاده می‌کند (۳). نمونه‌های متفاوت و مختلفی از نانو سیستم از جمله نانو لوله‌های کربن، نانوذرات پارامغناطیسی، دندیم‌ها، نانومولسیون و... ساخته شده‌اند. نانوذرات برای درمان بیماری‌های کلیوی، سل، بیماری‌های پوستی، بیماری آلزایمر، انواع مختلف سرطان همچین تهیه واکسن (مثلا واکسن کووید ۱۹) استفاده می‌شود (۵).

### دارورسانی با استفاده از سامانه‌های نانوذره‌ای

استفاده از سامانه‌های نانوذره‌ای برای دارورسانی به دهه ۱۹۷۰ و تحقیق‌های پیترا اسپیسر بر می‌گردد. آن‌ها از نانو ذرات پلی اکریل و سیانواکریلات از روش تزریقی برای دارورسانی ضد تومور و نیز انتقال دارو به مغز و ژن درمانی استفاده می‌کردند. سامانه‌های نانوذره‌ای می‌توانند با هدف قرار دادن تومورها به افزایش نقطه‌ای دارو، افزودن لیگاند به سطوح نانوذرات برای اتصال به هدف‌های خاص و بهبود دارو رسانی می‌شود. حضور نانوذرات فلزی در این سامانه به منظور پیدا کردن خاصیت ویژه نظیر مغناطیسی، پارامغناطیسی، حرارتی و... است. از نانوذره‌ای نظیر مگنتیت پوشیده شده با نانو پوسته خارجی نظیر طلا در دارورسانی و پزشکی برای هدف گیری سلول‌های سرطانی و آشکار سازی استفاده فراوانی می‌شود. در حال حاضر، پژوهش روی ساخت ترکیب‌های متنوع مغناطیسی نانوپوسته هسته-پلی ساکارید نظیر نانوذرات طلا، مگنتیت، کیتوزان برای درمان ضایعات نخاعی، محافظت سلول‌های عصبی و غشا میتوکندری از واکنش تخریبی با اکسیژن مطالعه انجام می‌شود

به طور کلی مهمترین سامانه های نانوذره ای زیستی دارورسانی عبارتند از:

- مایسل های پلیمری (Micelles)
- نانویزیکول (Nano vesicles)
- درخت سان ها (دندریمرها) (dendrimers)
- نانوکره ها (nanospheres)
- نانوکپسول (nanocapsules)
- نانوذرات ویروسی (Viral nanoparticel)



شکل ۱- سیستم های دارورسانی (۷)

### خطرات نانوذرات

علاوه بر برتری ها و مفید بودن نانوذرات کار با این مواد معایب و خطرات احتمالی دارد و توجه به مسائل مرتبط با ایمنی و خطرات آن ها لازم به ذکر است. فناوری نانو محصولات موجود را موثرتر و قابلیت استفاده و مفید تر می نماید. نانوذرات قادرند سرعت جهش ژنتیکی باکتری را افزایش دهند، اندازه نانوذرات، فعالیت سطحی بالا نانو ذرات تهدید بالقوه برای محیط زیست و انسان می باشند. وجود نانوذرات در رنگ ها باعث می شود که رنگ ها با خاصیت مطلوب تر بهبود یافته و امکان تولید با مصرف کمتر حلال ها را فراهم می آورد. اندازه این ذرات خود خاصیت مهم دیگری است. این ذرات از گرده گل و گیاهان و مواد حساسیت زا معمولی کوچک تر هستند و می توانند باعث بروز حساسیت شوند. بعضی از این ذرات همراه با تنفس به کیسه های هوایی ریه ها آسیب وارد کنند. در موقیت های ویژه این ذرات در سامانه دفاعی و ایمنی موجودات زنده و انسان خلل ایجاد می کنند. در این بین ماکروفاژها سعی می کنند با از بین بردن آن ها مانع از عبور این ذرات و ورودشان به خون شوند. ولی ماکروفاژها در تشخیص ذرات با قطر کمتر از ۷۰ نانومتر دچار مشکل می شوند و این ذرات می توانند به راحتی در خون نفوذ کنند. گزارش هایی وجود دارد مبنی بر ایجاد التهاب و جراحت در پوست و ریه و انباشتگی نانوذرات کربن سیاه و دی اکسید تیتانیوم که در فرایند های صنعتی استفاده می شود. ذرات اکسید روی و اکسید تیتانیوم باعث ایجاد می شوند که رادیکال های آزاد در سلول پوستی تولید شود و DNA آسیب ببیند و این آسیب به DNA موجب جهش ژنتیکی می شود و تغییرات در ساختمان پروتئین به وجود می آید که ایجاد تومور یا سرطان می



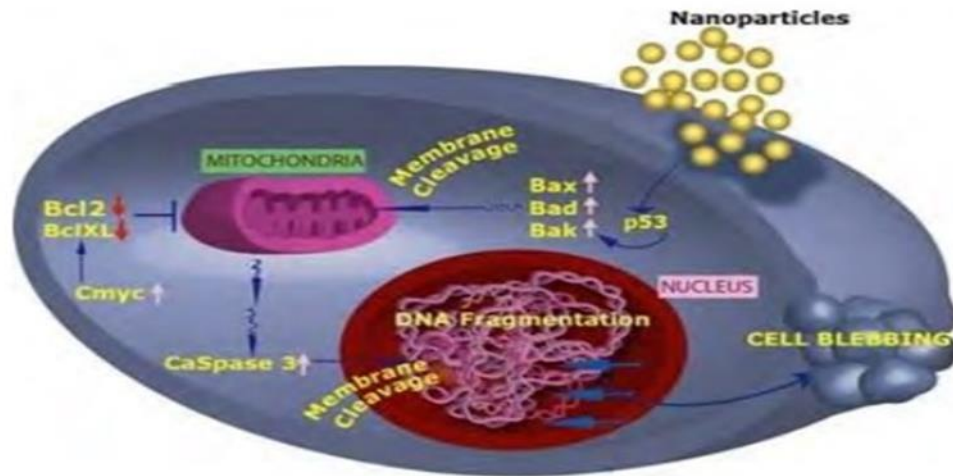
شود. به نظر می رسد که فعالیت سطح و اندازه ذره از عامل های اصلی در سمی بودن نانوذرات هستند. منابع احتراق مثل اجاق های خوراک پزی گازی، احتراق گاز صنعتی و انواع وسایل گرم کننده خانگی، موادی را تولید می کنند که حاوی صدها یا هزارها نانولوله کربنی هستند و ساختار های نانوبلوری دارند. نانولوله های فرآور نشده مس توانند آئروسول را در طی جا به جا کردن به وجود آورند. کارخانه جاتی که مواد بر پایه ی نانولوله های کربنی مانند فولرین تولید می کنند می توانند باعث از بین رفتن گلوتامین و آسیب اکسیداتیو بر مغز ماهیان شوند. همچنین فولرین در خاک حرکت می کند و به وسیله کرم های خاکی جذب شود و به این ترتیب وارد زنجیره غذایی شود. نانوذرات طبیعی ناشی از احتراق، مهم ترین منبع تولید نانوذرات طبیعی در محیط زیست هستند. انتشار نانوذرات مهندسی شده در محیط زیست خطرناک تر از ذرات طبیعی است. زیرا آن ها مواد جدیدی دارند و انسان و موجودات زنده ممکن است دارای سازکار های دفاعی مناسب در برابر آن ها نباشند. نانوفناوری مزایای بسیاری برای بشر به ارمغان می آورد و تحولی عظیم در زمینه های متفاوت ایجاد می کند. ولی در استفاده از مواد و فناوری آن الویت داشتن نکات ایمنی و سلامت انسان و محیط زیست ضروری است و باید به آن توجه نمود (۶).

### نانوذرات در سرطان

اصطلاح سطحی نانوذرات لیپوزومی و پلیمری با پلی اتیلن گلیکول به ترتیب در ۱۹۹۰ و ۱۹۹۴ موجب اثر گذاری در زمان گردش آن ها در بدن افزایش یابد. این پیشرفت ها در DOXIL که یک سیستم دارورسانی کپسوله کننده دوکسوروبیسین است به عنوان یک درمان بسیار مهم برای انواع سرطان مطرح شد (۴).

خواص شیمیایی و فیزیکی نانوذرات که باعث فعالیت ضد سرطانی آن می شود از ویژگی های ذاتی نانو ذرات مانند فعالیت آنتی اکسیدان یا فعالیت های مبتنی بر استفاده از محرک های خارجی از ناشی می شود. نانو ذرات که توسط یک منبع تابش خارجی تحریک می شوند از طریق هیپرترمی و ایجاد رادیکال سلول های سرطانی را از بین می برد. و امکان اثر گذاری روی عروق خونی یا استروما اطراف تومور از گسترش تومور جلوگیری کند. نانوذرات به راحتی از طریق سیستم عروقی نازک و آسیب دیده موجود در بافت سرطانی انتشار می شود و موجب حرکت سلول های سرطانی می شوند (۸).

نانوذرات سمیت انتخابی نسبت به سلول های سرطانی نشان می دهد. ROS پاسخ سمیت انتخابی نانو ذرات برای سلول هایی با سرعت تکثیر بالا را توضیح می دهند. تولید ROS در سلول های سرطانی بعد از درمان با نانو ذرات نسبت به سلول های طبیعی افزایش پیدا می کند. با بیشتر شدن ROS شدت اکسیداتیو در سلول بیشتر می شود که در نهایت باعث مرگ سلول می شود (۸). مکانیسم دیگری که برای مرگ سلول های سرطانی وجود دارد اتصال پیدا کردن نانو ذرات به غشا سلول های سرطانی است که باعث می شود به یکپارچگی غشاء صدمه وارد شود و باعث فعال شدن پروتئین P53 می شوند که این پروتئین برای فعال سازی ژن های پروآپوپتوزیس است. پروتئین های BAX، BAD، BAK، را فعال می کند. این پروتئین ها باعث نشت غشاء میتوکندری و آزاد سازی سیتوکروم C می شوند فعال شدن کاسپاز ۳ را در پی دارند که در نهایت این پروتئین غشاء هسته ای را دچار گسستگی می کند و موجب قطعه قطعه شدن DNA و افزایش آپوپتوزیس و مرگ سلولی می شود (۴).



شکل ۲- تصویر شماتیک از مکانیسم القاء مرگ سلولی توسط نانوذرات (۹)

### نانوذرات اکسید آهن

از نانوذرات اکسید آهن در علم زیست پزشکی بر سه عامل مورفولوژی، اندازه و ویژگی سطح آن استفاده می کنند (۱۰). سنتز مورفولوژی اکسید آهن تحت تاثیر عوامل متعددی مثل سورفکتانت، غلظت واکنش دهنده، دمای واکنش و زمان است. مورفولوژی بر زمان گردش خون، جذب سلول و توزیع زیستی اثر داشته است. مطالعاتی روی شکل نانوذرات برای تحویل داروی ضدسرطانی انجام شده است اما اثر مورفولوژی توزیع زیستی نانوذرات اکسید آهن به طور گسترده مورد توجه و مطالعه واقع نشده است. اندازه نانوذرات زمان گردش آن ها در خون را تعیین می کنند، مثلاً ذرات با کمتر از ۱۰ نانومتر از طریق کلیه ها از خون حذف می شود. اما ذرات با قطر بزرگتر از ۲۰۰ نانومتر در طحال باقی می ماند یا توسط فاگوسیت های موجود در بدن جذب می شوند. به طور کلی نانوذرات ایده آل در زیست پزشکی نانوذراتی با اندازه بین ۱۰ الی ۲۰۰ نانومتر هستند. زیرا زمان بیشتری در گردش خون هستند و اثر طولانی تر، مفید تر و کاربردی تری بر روی تومور می گذارند (۱۱ و ۱۰). نسبت سطح به حجم بالای نانوذرات باعث پایداری کلئیدی آن ها می گردد و پتانسیل بالا پراکندگی خوب و تجمع کم آن ها را در بافت نشان می دهد. یکی از ویژگی هایی که باعث می شود نانوذرات به راحتی از طریق سیستم رتیکولواندوتلیال از گردش خون حذف شوند این است که نانوذرات اکسید آهن بدون پوشش به دلیل سطح ویژه بالا و بر همکنش دو قطبی، مغناطیس ذاتی قوی دارند (۱۲). از سوی دیگر باز سطحی نانوذرات در بدن تعیین کننده توزیع آن ها است. بار های خنثی با پروتئین های پلاسما تعامل ایجاد می کنند و باعث بیشتر شدن زمان گردش خون می شوند. نانوذرات اکسید آهن آنیونی با سلول ها تعامل ایجاد می کنند و روش ورود آن ها به سلول از طریق آندوسیتوز سلولی است (۱۳). غشا سلول بار منفی اندکی دارد و جذب سلول از طریق الکترواستاتیک امکان می پذیرد. پس باعث می شود که نانوذرات اکسید آهن با بار مثبت سرعت بیشتری برای جذب داشته باشند (۱۴).

دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

معایب	مزایا	روش سنتز
به دلیل آلودگی شدن نانوذرات، کنترل اندازه آن‌ها دشوار است.	بازده بالای تولید نانوذرات شرایط سنتز آسان نانوذرات سنتز شده با این روش تأییدیه سازمان غذا و دارو آمریکا را دارند.	هم‌رسوبی
استفاده از محلول‌های آلی سمی باعث محدودیت استفاده از این نوع سنتز در کاربردهای زیستی شده است.	کنترل اندازه و شکل نانوذرات آسان است.	تخریب حرارتی
پایین بودن بازده تولید نانوذرات زمانبر بودن سنتز (ساعت‌ها یا حتی روزها)	اندازه و شکل نانوذرات به آسانی قابل کنترل است.	هیدروترمال و سالوترمال
خالص‌سازی نانوذرات به دلیل وجود سورفکتانت سخت است. پایین بودن بازده تولید نانوذرات	اندازه و شکل نانوذرات به آسانی قابل کنترل است.	میکروامولسیون
اثرات مضر ناشی از بسترهای گیاهی مورد استفاده در این نوع سنتز هنور به طور کامل شناخته نشده است.	اکثر بسترهای گیاهی مورد استفاده غیرسمی هستند.	سبز

جدول شماره ۱- مزایا و معایب روش سنتز نانوذرات اکسید آهن (۱۵)

### نتیجه گیری

در حال حاضر از نانوتکنولوژی برای دارورسانی هدفمند و درمان سرطان استفاده می شود به کمک این علم دارو را به محل مورد نظر که بافت آسیب دیده وجود دارد منتقل می کند. و از پخش بیهوده دارو جلوگیری می کند. در تشخیص بیماری ها همچنین بیماری های سرطانی در مراحل اولیه و همچنین درمان و از بین بردن آن موثر است. نانوذرات با عملکرد هدفمند یا نقطه ای میتوانند آسیب ها را ردیابی کند و بر بخش آسیب دیده اثر بگذارد که به کمک آن میتوان بخش آسیب دیده را درمان کرد یا سلول را به سمت مرگ سلولی هدایت کرد با پیشرفت علم در این زمینه میتوان جلوگیری از بسیاری از بیماری ها یا حتی شناسایی جهش ها را داشته باشیم که می تواند تحولی بزرگ در پزشکی و حتی شاخه های ژنتیک (برای درمان بیماری های ژنتیکی) به وجود آورد. اما با توجه به تمام مزایایی که نانوذرات دارند آسیب های احتمالی آن برای محیط زیست، جانوران، انسان در نظر گرفته شود.

### Refrence

1. Wanger V, Davis M, Jain K. Nano\_drug delivery and tissu engineering. Available at: [https://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%81%D9%86%D8%A7%D9%88%D8%B1%DB%8C\\_%D9%86%D8%A7%D9%86%D9%88\\_%D8%AF%D8%B1\\_%D8%AF%D8%A7%D8%B1%D9%88\\_%D8%B1%D8%B3%D8%A7%D9%86%DB%8C\\_%D9%88\\_%D9%85%D9%87%D9%86%D8%AF%D8%B3%DB%8C\\_%D8%A8%D8%A7%D9%81%D8%AA](https://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%81%D9%86%D8%A7%D9%88%D8%B1%DB%8C_%D9%86%D8%A7%D9%86%D9%88_%D8%AF%D8%B1_%D8%AF%D8%A7%D8%B1%D9%88_%D8%B1%D8%B3%D8%A7%D9%86%DB%8C_%D9%88_%D9%85%D9%87%D9%86%D8%AF%D8%B3%DB%8C_%D8%A8%D8%A7%D9%81%D8%AA) (January20, 2023)
2. Hatefi M. Nan-drug delivery system: 2006, the forth nathnal biotechnology conferenc of the islamic republic of iran (kerman), 7 [in persian]
3. Shams M, Shams F. Appraisal of smart nano drug delivery system: 2023: the first internatinal congress of artificial intelligence in medical sciences [in persain]
4. Safae M: Investigating the application of nanoparticles in cancer treatment and their mechanism of action: 2018: National technology Development conference (kermansha) [In persain]
5. Zaeed M, Rasha S: Pharmaceutical nanotechnology:from market to market: Future Journal of Pharmaceutical Sciences: 2022; 8:12

6. Shojaolsadari S, Ali asadollahi M. Industrial Biotechnology. Tehran. Tarbiat Modares University. 1395
7. Aslam H, Shazia S, Nazi M, Hareem F, Sami Ulla H. Current and future perspectives of multifunctional magnetic nanoparticles based controlled drug delivery systems. JDDST. 2022: 102946.
8. Moshref javadi M, Soleimani N. Therapeutic and anticancer effect of nanoparticles. Razi J med Sci. 2020; 27(10): 115-134.
9. Gopinath P, Gogoi S.K, Sanpui P, Paul A, Chattopadhyay A, and Ghosh S. "Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis ", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010,77(2): 240-245.
10. Xie W, Guo Z, Gao F, Gao Q, Wang D, Liaw B-s, et al. Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. Theranostics. 2018; 8(12):3284-307.
11. Gupta AK, Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. IEEE Transactions on Nanobioscience. 2004; 3(1):66-73.
12. Hu Y, Mignani S, Majoral J-P, Shen M, Shi X. Construction of iron oxide nanoparticle-based hybrid platforms for tumor imaging and therapy. Chemical Society Reviews. 2018; 47(5):1874-900.
13. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. Chemical reviews. 2012; 112(11):5818-78.
14. Veisoh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. Advanced Drug Delivery Reviews. 2010; 62(3):284-304.
15. Rezaee M. A review of the advances of nanoparticles as a magnetic agent in cancer diagnosis and treatment. Imtj. 2023; 28(3): 280-299

## متیلاسیون DNA در سرطان

مریم امانی<sup>۱\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

### چکیده

اپی ژنتیک به معنی تغییر در بیان و عملکرد ژن‌ها که به نسل بعد به ارث می‌رسند. اپیژنتیک شامل چند مکانیسم از جمله: متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و تغییر در وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم‌ها است. تغییرات اپی ژنتیکی با بروز یا پیشرفت سرطان‌ها ارتباط دارد. برخلاف جهش‌های ژنتیکی، تغییرات اپی ژنتیکی خاصیت برگشت‌پذیری دارند (۱). DNA متیل‌ترانسفراز ایجاد و حفظ الگوی متیلاسیون را به عهده دارد. غیر فعال شدن بعضی از ژن‌های سرکوبگر تومور در پی متیلاسیون در پروموتور رخ می‌دهد. مطالعات بر روی ژن‌های خاموش شده متیلاسیون DNA انواع مختلف سرطان را به نمایش گذاشته است. همچنین متیلاسیون با تنظیم RNAهای غیر کد کننده همانند microRNA امکان نقش در سرکوب تومورها را فراهم می‌کند (۲). متیلاسیون یکی از تغییرات اپی ژنتیکی برگشت پذیر است که آن را برای استفاده در کارهای درمانی مورد توجه قرار داده است. در حالت کلی دو نوع متیلاسیون داریم: ۱. هیپرمتیلاسیون ۲. هیپومتیلاسیون، هیپرمتیلاسیون DNA در پروموتورها باعث جلوگیری بیان ژن می‌شود که در ایجاد سرطان نقش مهمی دارد (۳). متیلاسیون DNA از طریق تعامل با ناحیه پر موتوری بیان lncRNAها (lncRNA در متاستاز نقش دارند) را تنظیم می‌کند (۴). هیپومتیلاسیون DNA فعال شدن نابه‌جا، مناطق غیر کد کننده به پیشرفت سرطان کمک می‌کند. این در حالی است که هیپرمتیلاسیون بی ثباتی ژنوم را زیاد می‌کند و باعث فعال شدن آنکوژن‌ها می‌شود (۳).

کلمات کلیدی: متیلاسیون، سرطان

نشانی نویسنده مسئول: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، کد پستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۰۰ همراه: ۰۹۱۶۳۰۱۲۸۵۳

پست الکترونیک: maryamamani1998@gmail.com

Maryam Amani<sup>1\*</sup>

1. Master's student, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

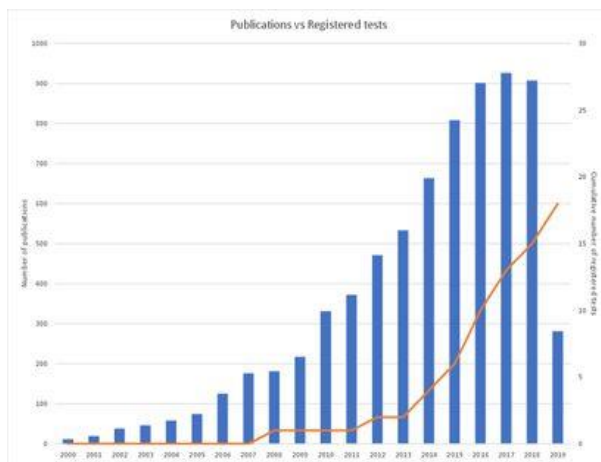
### Abstract

Epigenetics means changes in the expression and function of genes that are inherited to the next generation. Epigenetics includes several mechanisms such as: DNA methylation, histone modifications and changes in the position of nucleosomes. Epigenetic changes are related to the occurrence or progression of cancers. Unlike genetic mutations, epigenetic changes are reversible. DNA methyltransferase is responsible for creating and maintaining the methylation pattern. Inactivation of some tumor suppressor genes occurs due to methylation in the promoter. Studies on silenced genes have demonstrated DNA methylation in various types of cancer. Also, methylation by regulating non-coding RNAs such as microRNA allows for a role in suppressing tumors. Methylation is one of the reversible epigenetic changes that has attracted attention for use in therapeutic work. In general, we have two types of methylation: 1. Hypermethylation 2. Hypomethylation, DNA hypermethylation in promoters prevents gene expression, which plays an important role in causing cancer. DNA methylation regulates the expression of lncRNAs (lncRNAs play a role in metastasis) through interaction with the promoter region. DNA hypomethylation aberrant activation of non-coding regions contributes to cancer progression. This is the case where hypermethylation increases genome instability and activates oncogenes.

Key Words: Methylation, Cancer

### مقدمه

متیلاسیون جزایر غنی از سیتوزین و گوانین در ژنوم انسان یک اپیژنتیک شایع به شمار می‌آید که ژن‌های مداخله کننده در ایجاد سرطان در مرحله‌های اول بیماری رخ می‌دهد. که این موضوع می‌تواند در تشخیص و درمان زود هنگام سرطان مفید واقع شود. علاوه بر این به عنوان بیومارکر برای پیش بینی خطر DNA، تعیین الگوی متیلاسیون ابتلا، طبقه بندی انواع سرطان، پیش بینی بیماری و درمان کاربرد دارد. بررسی الگوی متیلاسیون امری ضروری است. نمونه ای تازه بیوپسی مناسب ترین نمونه ها برای بررسی هستند. به دلایلی دسترسی به نمونه تازه ساده نمی‌باشد مثلاً محل خاص تومور، دردناک بودن نمونه گیری برای بیمار، زمان بر بودن و پرهزینه بودن این روند و همچنین به دلیل محدودیت های اخلاقی از نمونه تازه استفاده نمی‌شود و جایگزین آن استفاده از نمونه های پارافینه بایگانی شده با خلوص، غلظت و DNA است (۵). هیپومتیلاسیون در نواحی تکراری رخ می‌دهد و یک فرآیند سرطان زا است. علاوه بر این باعث افزایش بی‌ثباتی ژنومی، تجمع نادرست کروموزوم‌ها در طول تقسیم سلولی، فعال شدن ناخواسته عناصر قابل انتقال در ژنوم، که منجر به آسیب‌های ژنتیکی بیشتر می‌شود. هیپرمتیلاسیون خاموش شدن سرکوبگرهای کلیدی تومور، مناطق تنظیم کننده در ژنوم را در پی دارد که منجر به اختلال در رشد سلولی یا تغییر پاسخ به درمان های سرطان می‌شود، چنین مکانیسم‌های اپیژنتیکی با جهش‌های محرک شناخته شده برای تسهیل توسعه یا تکامل سرطان کاربرد دارند (۶).



نشانهگر زیستی اپی ژنتیک سرطان، در مقابل IVD های ثبت شده بر اساس DNA متیله شده تجمعی. این شکل میزان آکادمیک نشانهگر زیستی اپی ژنتیک سرطان را در ۲۰ سال گذشته (محور چپ) در مقایسه با میزان تجمعی تست های تشخیصی اپی ژنتیک سرطان ثبت شده موجود در بازار (محور راست) نشان می‌دهد (جدول ۱) (۶).

جدول ۱- بررسی نشانهگر زیستی در مقایسه با تعداد تجمعی

### مکانیسم بروز سرطان

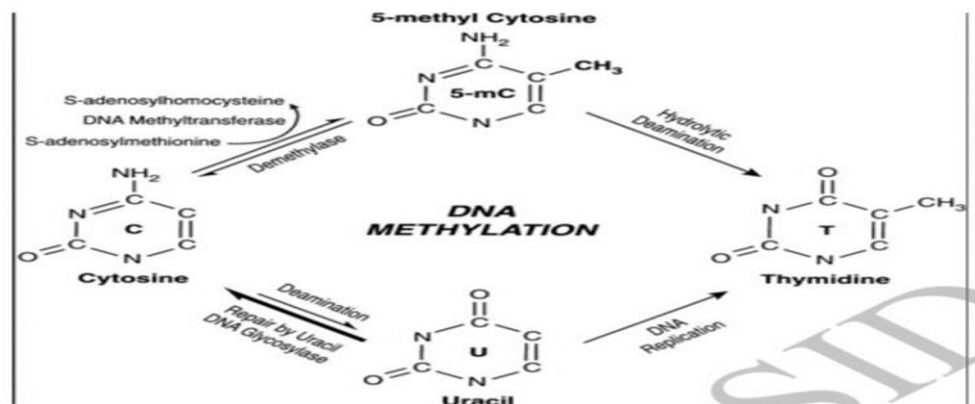
در هر سلول انسان در حدود ۳۵۰۰۰ ژن وجود دارد. خوشبختانه در اغلب موارد، آسیب‌های DNA به سرطان یا بیماری‌های دیگر منتهی نمی‌شود. جهش در یک ژن سبب ایجاد سرطان نمی‌شود، بلکه سرطان وقتی به وقوع می‌پیوندد که جهش در ژن‌های کلیدی رخ دهد. ژن‌های کلیدی به سه دسته تقسیم می‌شوند:

- پروتوآنکوژن‌ها که مسئول شروع پیشبرد رشد و تقسیم سلولی هستند.
- ژن‌های سرکوب کننده تومور که مهارکننده رشد سلولی هستند و عملکرد طبیعی این ژن‌ها، سلول را از تقسیم شدن باز می‌دارد.
- ژن‌های ترمیم کننده که مسئول ترمیم آسیب‌های DNA وارده به ساختار ژنتیکی سلول هستند (۷).

سرطان به عنوان یک بیماری مزمن ژنتیکی، پس از بیماری‌های قلبی و عروقی، دومین علت شایع مرگ در دنیا به شمار می‌رود که در اثر بروز چندین جهش در ژن‌های کنترل کننده مسیرهای حیاتی سلول شامل رشد، نمو و آپوپتوز ایجاد می‌شود که در نتیجه منجر به عدم توجه به فاکتورهای رشد داخلی و خارجی، توانایی تکثیر خود به خود سلول، فرار از آپوپتوز و متاستاز سلول سرطانی و ایجاد تومورهای خوش خیم و بدخیم در موجود زنده می‌شود (۸ و ۹).

### نقش متیلاسیون در بیان ژن

متیلاسیون DNA جز تغییرات اپی‌ژنتیک شناخته شده‌ای است. که در سلول‌های تکامل یافته به طور پایدار رخ می‌دهد و به ارث می‌رسد (۸). این فرایند شامل انتقال گروه متیل از S-آدنوزیل میتونین به کربن شماره ۵ باز آلی سیتوزین است که خانواده آنزیمی متیل ترانسفرازها (DNMTها) باعث کاتالیز آن می‌شود، به این ترتیب ۵ متیل سیتوزین شکل می‌گیرد (۱۰). (شکل ۱)



شکل ۱- تصویر شماتیک از مسیرهای بیوشیمی متیلاسیون و دمتیلاسیون باز آلی سیتوزین (۷)

در پستانداران این تغییر معمولاً در نواحی غنی از دی نوکلئوتید CpG اتفاق می‌افتد. در صورت طبیعی بودن الگوی متیلاسیون، فاکتورهای رونویسی به راحتی به نقطه شروع رونویسی اتصال پیدا می‌کنند و ژن به صورت طبیعی بیان می‌شود. با بیشتر شدن متیلاسیون در این نواحی بیان ژن مورد نظر (عمدتاً ژن‌های سرکوب کننده تومور) کاهش پیدا می‌کند یا حتی ممکن است ژن به طور خودکار خاموش شود. کاهش متیلاسیون نواحی تنظیمی آنکوژن‌ها عامل افزایش بیان آن و در نتیجه هدایت سلول‌ها به سمت توموری شدن است. مکانیسم فعال سازی آنکوژن‌ها مداخله کننده در فرایند رشد و بقای سلولی، آپاپتوز و پرخه‌ی سلولی در گسترش

## اولین همایش ملی توسعه زیست فناوری و رشد تولید - ۹ اسفند ۱۴۰۲

### دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرمان

سلول های سرطانی تاثیر دارد. پیچیدگی تنظیم الگو های متیلاسیون DNA از طریق تعدد عملکرد متنوع DNA متیل ترانسفرازها و پروتئین های برهم کنش دهنده با ۵-متیل سیتوزین نمایان می شود (۱۰).

متیلاسیون از طریق یک تغییر کووالان پایدار روی مولکول DNA و عمدتاً جزایر CG خاص در ارتباط با پروموتور ژن های سرکوبگر تومور اتفاق می افتد. این در حالی است که بیشتر جهش ها جزایر CpG درون پروموتور ژن ها در بافت های نرمال غیر متیله رخ می دهد و متیلاسیون آن هادر بعضی تومورها اتفاق می افتد که نتیجه آن سرکوب بیان ژن های بازدارنده تومور است. با توجه به دلایل هیپرمتیلاسیون DNA به عنوان یک بیومارکر امید بخش برای کاربرد های بالینی در مدیریت سرطان مطرح شده است. یک تفاوت مهم دیگر بین تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سرطان، تغییرات اپی ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA برگشت پذیر بوده و به وسیله استفاده از مداخلات درمانی می توانند برگردانده شوند از همین سو اهداف درمانی به حساب می آید، در نتیجه اپی ژنتیک با وجود تغییرات برگشت پذیر راه جدیدی راه برای درمان انواع تومور ها بازیابی کرده است (۱۱).

جزایر CpG غیرمتیله ژن ها با ناحیه فعال کروماتین که به شدت رونویسی می شوند ارتباط دارد. به طور معمول در تمام بافت های طبیعی این جزایر غیرمتیله است و غالباً انتها ۵' تعدادی از ژن ها را شامل می شود. زمانی که جزایر CpG ناحیه راه انداز متیلاسیون نداشته باشد فاکتور های نسخه برداری مناسب به آن دسترسی دارند بیان ژن میسر می شود: در مقابل متیلاسیون جزایر CpG راه انداز با ساختار بسته کروماتین در نتیجه عدم نسخه برداری ژن ها ارتباط خواهد داشت. الگوی متیلاسیون در ژنوم پستانداران به این صورت است که دی نوکلئوتیدهای CpG به بروز ژن های دخیل در سرطان ها و یا بیماری های دیگر منجر می شود. متیلاسیون DNA در فرآیندهای تمایز سلولی، نشان گذاری ژنومی، مرگ برنامه ریزی شده سلول، سرطان ها، پیری، غیر فعال شدن تصادفی کروموزوم X و... ایفا نقش می کند (۱۲).

### بررسی ژن با بیان متفاوت

نتایج حاصل متیلاسیون در ژن ها با بیان مختلف نشان می دهد که ژن های *CSNK1D*, *CD40*, *S100A9*, *DAPP1* و *CX3CL1*, *ZC3H12A*, *RDAD2*, *MX1*, *MAP3K8* CpG متیله شده می باشد (۱۲). (جدول ۱)

HMRs	GF	TJ	DGE**
۴	۶۷۱	۱۴	LTF
۲	۳۵۲۲	۲۵	APP
۱	۶۲۱	۶	CD40
-	۶	-	BCL2A1
-	-	-	CCL2
۱	۱۰۸	۵	CCL5
-	-	-	CCL20
-	۲	۳	CFB
۵	۲۳۹۷	۱۰	CSNK1D
۱	-	۲	CX3CL1
-	۳۲۱	۱	CXCL2
-	۲۶۳	۱	CXCL3
-	۳۱۹	۱	CXCL5
-	-	-	CXCL8
۴	۱۵۵	-	DAPP1
-	۲۳۸	۱	GRO1
-	۱۶	-	IL1A
-	۵۲	۲	IL1B
-	-	۲	IL1RN
-	۸۴۷	۲	NFKB1A
۱	۶۱۹	۱	NFKB1Z
-	-	-	S100A8
۱	۱۰	۱	S100A9
۱	-	۲	ISG15
۴	۷۷	۷	MAP3K8
-	۲۶۵	۱	MARCKSL1
۱	۸۰۸	۷	MX1
-	۲۹	۱	RND1
۲	۳۷۱	۴	RSAD2
-	-	-	SAA3
-	۱۱۹۷	۲	TLR2
-	-	۱	TNF
۱	۱۰۷۹	۸	ZC3H12A

جدول ۱- بررسی وضعیت متیلاسیون جزایر CpG در ژن ها با بیان متفاوت (۱۲)



### هیپومتیلاسیون DNA در سرطان

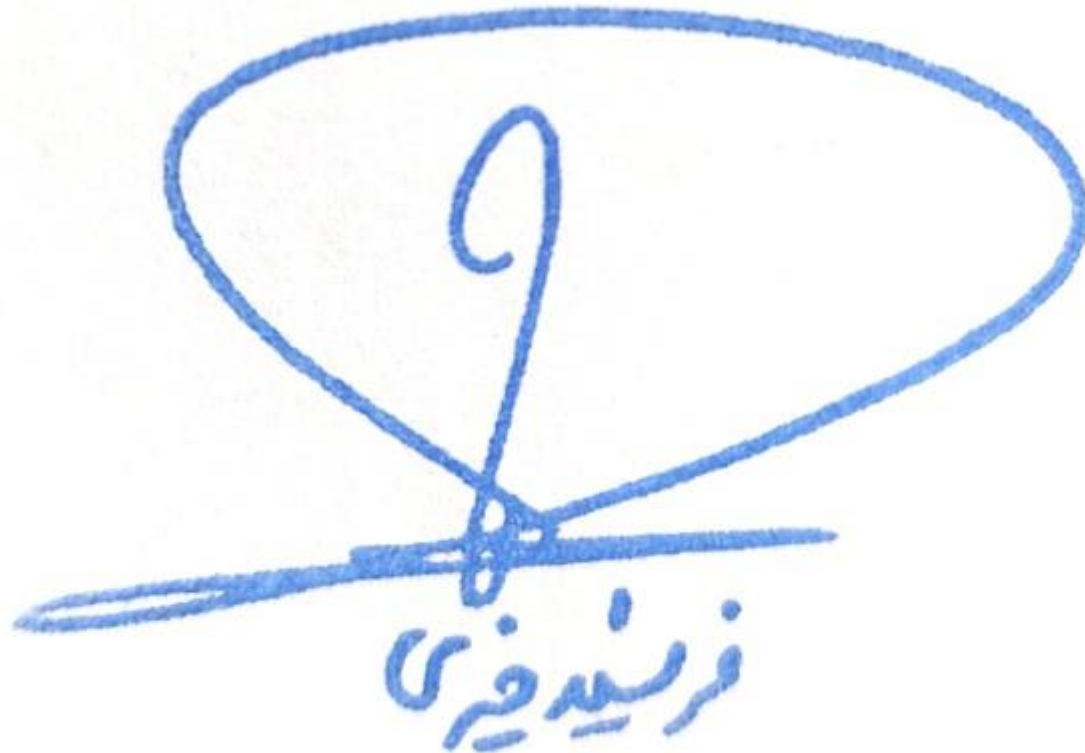
ژنوم سرطان بیشتر اوقات با کاهش کلی در سطح ۵ متیل سیتوزین، همزمان با هیپرمتیلاسیون ژن‌های خاصی نمایان می‌شود. به طور کلی می‌گویند که فقط هیپومتیلاسیون DNA با سرطان مرتبط بود و مرکز تحقیق‌های توموری است. هیپومتیلاسیون ژنوم تا حد زیادی بر نواحی بین ژنی و درونی DNA، به ویژه توالی‌های تکراری و عناصر قابل انتقال اثر می‌گذارد (۱۳).

### درمان سرطان

سرطان به عوامل درمانی مختلف می‌تواند پاسخ دهد که بع وضعیت متیلاسیون مجموعه خاصی از ژن‌ها بستگی دارد بنابراین می‌توان از آنها به عنوان نشانگرهای زیستی برای تعیین و تشخیص پاسخ بالینی به شیمی درمانی استفاده کرد. برای حداقل پنج ژن *DPYD*، *CPYP1A1*، *CPYP1B1*، *MLH1*، *MGMT* مشخص شد که میزان متیله شدن این ژن‌ها با پیشرفت تومور ارتباط دارد. آنزیم ترمیم DNA متیل ترانسفراز *O6-methylguanine-DNA (MGMT)* مقابله می‌کند (۱۳).

### نقش متیلاسیون DNA در متاستاز سرطان

تهاجم و پیشرفت تومور به فرآیند متاستاز ربط دارد. متاستاز به معنی رشد تومورهای ثانویه در مکان‌های دور از محل اولیه است. شانس زنده ماندن با وقوع متاستاز به شدت کم می‌شود؛ متاستاز سرطان چالش‌های زیادی را در فرآیند درمان سرطان به وجود آورده است و فهمیدن این که سلول‌های سرطانی چطور صفات متاستاتیک را دریافت می‌کنند، برای حل این چالش‌ها اهمیت زیادی دارد. از جمله ژن‌هایی که متاستاز را القا کرده می‌توان به *TNFRSF11A*، ژن *MACC1* و *S100A4* در سرطان کولورکتال و *SPP1* در سرطان پستان اشاره کرد. با این حال جهش‌های ژنتیکی مختص به متاستاز در اکثر توالی‌های ژنومی یا توالی‌های یابی اگزوم دیده نمی‌شود. اثر گذاری اپیتلیال مزانشیمی ب



#### ر تومورزایی

سرطان های متفاوت از جمله سرطان پروستات، ریه، کبد، پانکراس و سینه ثابت شده است. با به توجه مکانیسم های تنظیمی اپیژنتیک در بیان ژن های درگیر در ETM مشاهده شده است. تغییرات اپی ژنتیکی که با برنامه ریزی مجدد ژنتیکی اشتباهی در سرطان همکاری می کند، تغییرات در سطح متیلاسیون DNA در جزایر CpG است. متیلاسیون DNA می تواند توسط سلول های توموری در گردش شکل بگیرد. سایر مکانیسم های اپی ژنتیک شامل: تغییرات ساختارهای ماکرو مولکول های DNA و هیستون ها، تغییر وضعیت کروماتین، مدیفیکاسیون های پروتئین های هیستونی پس از ترجمه و تاثیر انواع RNA های غیر کدکننده هستند که منجر به بیان و یا عدم بیان یک سری ژن ها در سلول ها می شوند. در بعضی سرطان ها از جمله آدنوکارسینوم مجرای پانکراس، متاستاز بجای عوامل ژنتیکی، بیشتر با تغییرات اپی ژنتیکی کنترل می شود. در سرطان تخمدان، با ادغام متیلاسیون DNA و پروفایل بیان ژن، اثری از یک متیلاسیون DNA خاص مرتبط با مقاومت پلاتین دیده شد. متیلاسیون DNA می تواند مستقیماً بیان lncRNA ها را از طریق ارتباط با ناحیه ی پروموتور آن ها تنظیم کند. lncRNA ها هم در مراحل مختلف متاستاز نقش دارند و هم می توانند به شناسایی تومورهای با ریسک متاستاز بالا کمک کرده باشند (۱۲).

#### نتیجه گیری

تغییرات اپی ژنتیکی امروزه باعث بیماری های زیادی می شود اما به دلیل برگشت پذیر بودن این تغییرات می توان درمان را نیز از مسیر این تغییرات یافت. یکی از شایع ترین بیماری های که تغییرات اپی ژنتیکی باعث به وجود آمدن آن می شود سرطان است. یکی از علل شایع متیلاسیون DNA است که باعث بروز سرطان و از سوی دیگر باعث درمان سرطان می شود هیپومتیلاسیون با افزایش بی نظمی ژنومی، خاموش کردن ژن ها در پیشرفت بیماری نقش دارد در مقابل میتوان از هیپرمتیلاسیون در جهت هدایت درمان استفاده کرد. متیلاسیون یک تغییر اپی ژنتیک برگشت پذیر است که از آن برای درمان بیماری های سرطانی استفاده می شود. طبق مطالعات انجام شده متیلاسیون را یک بیومارکر خوب و یک نوید بخش در درمان بیماری های سرطانی در نظر گرفته اند.

#### References:

1. Noroozi Aghide A, Lashgari N. Epigenetic-Based Cancer Therapy. *Paramedical Sciences and Military Health*. 2015; 10(2): 56-68
2. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics*. 2010; 70 :27-56
3. Akbari F. 2015. Mechanism of DNA methylation its place and function in genetic activities. *International Conference on Applied Research in Agriculture(ICARA)*. June2015, Tehran,12
4. Ghane M, Ali Ahmadi M. Sofi rezaee Y. Hashemi M. 2023The Rol of DNA methylation in Cancer metastasis. *National congress on innovations in the convergence of basic and medical sciences*. 24-25 February 2023. Tehran
5. Jedi F. Genomic DNA extraction kit from paraffin embedded samples for gene methylation studies. Available at: <https://eprints.arums.ac.ir/12316/> (21 Jul 2019).
6. Locke WJ, Guanzon D, Ma C, Liew YJ, Duesing KR. Fung KYC and Ross JP (2019) DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Front. Genet*. 10:1150
7. Bolori P, Haji Hosseini R, Shekh-Nejad R, Hamedani M, Sajadi M, Farsad Z. Evaluation of the expression of several genes involved in cancer in several different cancer cell lines by RT-PCR. *Experimental Animal Biology*. 2015; 3(3): 1-12.
8. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991; 253(5015):49-53.
9. Purohit A, Newman S,P, Reed M,J. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2002; 4(2): 65-69.
10. Fam B, Emami F, Ghafari M, Azizi f. A review of DNA methylation and its role in thyriod cell tumorigenesis. *RJM*. 2016; 22(140) :13
11. Moghadas kho F, Ghafari H, Ghadami M, Alimoghadam k, Ghavamzade A, DNA methylation pattern study in RASSF1A tumor suppressor gene promoter two breast cancer cell lines. *IGBD*. 2016; 1: 11.
12. Beyranvand Z, Mirhosseini S,Z, Ghaderi\_zafaree M, Hosseinimoghadam S,H,F, azeli A, Zarin-kaviyani K. Prediction of CPG islands and DNA methylation in cow genome using meta-analysis of DNA microarrays and genomic scanning. *IJASR*. 2020.(29).14
13. Watanabe Y, Maekawa M. Chapter 7 - Methylation of DNA in Cancer. *Advances in Clinical Chemistry*. 2010; (52): 145-167.
14. Ghane M, Ali Ahmadi M, Sofi rezaee Y, Hashemi M. The Rol of DNA methylation in Cancer metastasis. *National congress on innovations in the convergence of basic and medical sciences*. 24-25February2023.Tehran

## معرفی آزما کالا



- بزرگ ترین سامانه واردات دستگاه و تجهیزات آزمایشگاهی از برند های مطرح
- الکتروفورز ( bio rad ) ، ریل تایم pcr ( biosystems، roch، biorad، bms ) ،  
 pcr ( thecne ، boyco ، biometra ) ، سانترفیوژ ( hettich، selecta lab ) ،  
 اسپکتروفتومتر ( unico، AND ) ، نانو دراپ ( klab، alsheng ) ،  
 اتوکلاو ( elma، labtech ) ، میکروسکوپ اینورت ( Nikon، optuka ) ، دستگاه  
 hplc ( scion، waters ) ، ترازو ( RADWAG لهستان ، AND ژاپن ، Ohaus سوئیس و  
 ... ) ، اسپکتروفتومتر ( KERN آلمان ، Unico و ... ) ، دستگاه آون ساده / فن دار /  
 یخچالدار ( Labtech کره ، Hirayama ژاپن ، Elma آلمان و ... ) ، ph متر  
 ( BRAND آلمان ، HERMLE آلمان ، adwa، ezdo و ... ) و ...
- آدرس سایت : [www.azma-kala.com](http://www.azma-kala.com)
- صفحه اینستاگرام : @azmakalaplus
- شماره تماس ثابت : ۰۲۱۴۴۹۷۲۹۶۹
- شماره همراه : ۰۹۹۱۴۲۱۴۶۹۹



**آزمایشگاه پاتوبیولوژی  
و ژنتیک پزشکی  
(عج)**

# المهدی



مجهز به امکانات فوق مدرن و پیشرفته  
 تشخیص پزشکی و پاتولوژی  
 انجام آزمایشات روتین  
 تخصصی و فوق تخصصی



آزمایشگاه پاتوبیولوژی  
**دکتر طاهری**  
**دکتر شهلا طاهری**  
 board تخصصی کلینیکال و آناتومیال پاتولوژی  
 عضو آکادمی بین المللی پاتولوژی (IAP)



آزمایشگاه پاتوبیولوژی  
**دکتر طاهری**  
**دکتر الهام طاهری**  
 board تخصصی کلینیکال و آناتومیال پاتولوژی  
 فلوشیپ فوق تخصصی مولکولار پاتولوژی و سائتوزنتیک

همکاری مؤثر با شرکت های دانش بنیان در جهت انجام پژوهش های بیولوژیک

 [www.Almahdilab.com](http://www.Almahdilab.com)

 [Almahdi\\_laboratory](https://www.instagram.com/Almahdi_laboratory)

۰۳۸ - ۳۲ ۲۶ ۴۴ ۶۸  
 ۰۳۸ - ۳۲ ۲۲ ۷۳ ۴۸

شهرکرد : چهارراه دامپزشکی، کوچه ۴۴  
 جنب بیمارستان آیت اله کاشانی



## شرکت سینا برنا آسیا (سبا)

خدمات فنی مهندسی و مهندسی معکوس تجهیزات صنعتی

صنایع فولاد، ذوب آهن، پتروشیمی و نفت

- پمپ ها
- گریبکس
- دمنده ها
- توربین ها
- بویلرها



مشاوره تخصصی مهندسی معکوس تجهیزات صنعتی



03832288507-10

09387669103

sabaco.co

sabaco.co

