



Development of Liposomal Formulations Carrying Antibiotics

Rabea Khoshneviszadeh

Assistant Professor, Department of Biochemistry and Biophysics, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Article Info

Abstract

Article History:

Received 12.28.2023
Revised 01.08.2024
Accepted 01.29.2024
Online 02.06.2024

KeyWords:

Liposome
Antibiotics
Microbial resistance
Drug delivery

*Corresponding author:

E-mail address

*Ra.Khoshnevis@iau.ac.ir

Since the advent of antibiotics, selective pressure on microorganisms has caused the formation of resistant types. Different generations of antibiotics have been designed and used to fight pathogens, but at the same time, more resistant types of pathogens have been spread, so it is necessary to use new strategies to deal with infectious agents. The development of nanoscience in the field of medicine was a suitable solution for this purpose, and pharmaceutical nanocarriers were developed. Liposomes are nanocarriers with a lipid body whose features such as biocompatibility, bioavailability, targeted transfer, amphiphilic properties, integration with membranes, slow and controlled drug release have attracted the attention of researchers. In this review article, an attempt has been made to provide information about the benefits of this drug system by studying scientific documents in the field of antibiotic-carrying liposomes.

Cite this article: Khoshneviszadeh R.*Development of liposomal formulations carrying antibiotics. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):1-12

doi 10.30495/zisti.2023.1989897.1166

DOR 20.1001.1.17354226.1402.18.1.4.1

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



توسعه داروهای لیپوزومی حامل آنتی بیوتیک

رابعه خوشنویس زاده

استادیار، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۰/۰۷

بازنگری ۱۴۰۲/۱۰/۱۸

پذیرش ۱۴۰۲/۱۱/۰۹

نهایی ۱۴۰۲/۱۱/۱۷

کلمات کلیدی

لیپوزوم
آنتی بیوتیک
مقاومت میکروبی
حامل دارویی

* نویسنده مسؤول

Ra.Khoshnevis@iauv.ac.ir

از زمان ظهور آنتی بیوتیک ها، فشار انتخابی بر میکروارگانیسم ها، باعث شکل گیری انواع مقاوم آنها شده است. برای مبارزه با عوامل بیماری زا نسل های مختلف آنتی بیوتیکی طراحی و استفاده شده اند اما به موازات آن انواع مقاوم تری از عوامل بیماری زا گسترش یافته است از این رو بکارگیری استراتژی های جدید برای مقابله با عوامل عفونی ضروری به نظر رسید. رشد علم نانو در زمینه پزشکی، راهکار مناسبی برای این منظور بود و نانوحامل های دارویی توسعه یافتند. لیپوزوم ها، نانوحامل هایی با بدنه لیپیدی هستند که ویژگی هایی همچون زیست سازگاری، دسترسی زیستی، انتقال هدفمند، خاصیت دوگانه دوستی، تلفیق با غشا، رهش آهسته و کنترل شده دارو توجه محققان را به خود معطوف کرده است. در این مقاله مروری سعی شده است که با مطالعه سندهای علمی در زمینه لیپوزوم های حامل آنتی بیوتیک اطلاعاتی درباره فواید این سامانه دارویی ارائه شود.

شیوه آدرس دهی این مقاله : خوشنویس زاده ر. * توسعه داروهای لیپوزومی حامل آنتی بیوتیک. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲: ۱۸: (۳): ۱۲-۱

doi 10.30495/zisti.2023.1989897.1166

DOR 20.1001.1.17354226.1402.18.1.4.1

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا | شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ | شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹۶ | نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

بهره گیری از سامانه های دارورسان برای افزایش راندمان درمان می توانست راه حلی برای بحران میکروارگانسیم های مقاوم به آنتی بیوتیک ها باشد. این سامانه ها با حمل دارو بر روی سطح و یا درون ساختار خود، قادر به آزادسازی آهسته، رسانش هدفمند، دارورسانی ترکیبی، ایجاد اثرات سینرژیک، کاهش غلظت داروی مورد نیاز و متعاقباً کاهش اثرات جانبی هستند (۴).

نانوبیوتیک ها که از ترکیب آنتی بیوتیک با انواع نانوساختارها (۵) شامل لیپوزوم، ذرات لیپیدی، میسل، کوانتوم دات، نانوذرات فلزی (طلا، نقره، روی، زینک ...) شکل میگیرند (۶) در جهت افزایش اثرگذاری بیشتر آنتی بیوتیک ها پایه گذاری شده اند.

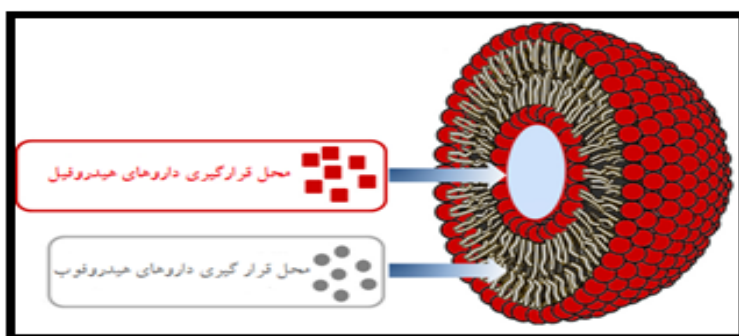
در میان طیف گسترده از نانوپلتفرم ها، یکی از رویکردهای تحویلی در حال بررسی برای آنتی بیوتیک ها، لیپوزوم ها هستند (۷-۸). این سیستم های نانو مبتنی بر لیپید به عنوان حامل های دارو در دهه ۱۹۷۰ معرفی شدند و از آن زمان، پیشرفت های عظیم در فناوری لیپوزوم باعث جلب توجه به استفاده آنها به عنوان سیستم های تحویل کارآمد برای داروهای ضدباکتری شده است (۹-۱۰).

هدف این مقاله مروری بررسی فواید لیپوزوم ها برای انتقال آنتی بیوتیک ها بوده و به موارد مختلف اشاره شده است.

الکساندر فیلیپینگ با مشاهده توقف رشد استافیلوکوک ها در حضور کپک پنی سیلیم نوتاتوم پادزیست ها یا آنتی بیوتیک ها را به دنیا معرفی کرد (۱). همه گیری بیماری های واگیردار در طی جنگ جهانی اول و دوم باعث توجه بیشتر به آنتی بیوتیک ها شد بطوری که انواع طبیعی، نیمه سنتزی و سنتزی (۲) آن گسترش پیدا کرد. گرچه آنتی بیوتیک ها باعث نجات تعداد زیادی از بیماران درگیر به عفونت شدند اما پس از چندی به دو دلیل استفاده از آنتی بیوتیک ها با وسواس دنبال شد. آنتی بیوتیک ها مولکول های سمی ترشح شده از میکروارگانسیم ها جهت مقابله با دیگر میکروارگانسیم ها است (۳) از این رو استفاده مکرر آنها می تواند اثرات جانبی بر روی سلول های انسانی داشته باشد همچنین در میکروارگانسیم ها نیز سازوکارهای مختلف برای مقابله با آنتی بیوتیک ها وجود دارد که پس از ورود به جامعه و مصرف، گونه های میکروبی مقاوم باقی می ماند بنابراین با ظهور هر آنتی بیوتیک گونه مقاوم تری از میکروارگانسیم ها بوجود آمده است و بیم آن وجود دارد که یک عمل ساده جراحی منجر به عفونت غیرقابل درمان و مرگ بیمار شود. از این رو ضرورت توسعه روش های درمانی جایگزین جهت مبارزه با میکروارگانسیم های بیماری زا احساس شد.

ساختار لیپوزوم

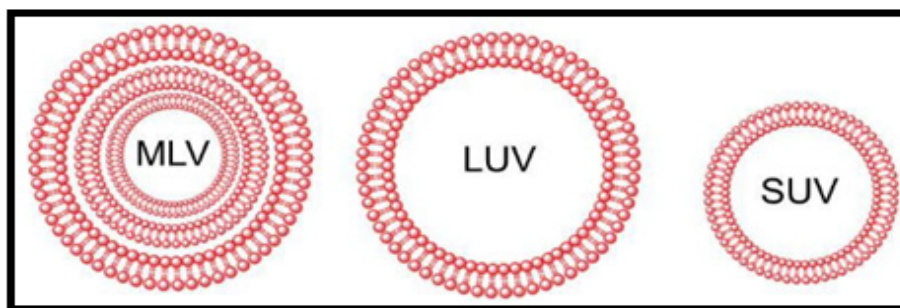
لیپوزوم ها ساختارهای کروی متشکل از لیپید است که الهام گرفته از غشا سلولی است. دیواره لیپوزوم ها از دو لایه لیپید تشکیل شده که دم های ابگریز لیپیدها به سمت یکدیگر و سرهای آبدوست در مجاورت با فضای بیرونی و حفره داخلی است (شکل ۱). لیپوزوم ها را می توان بر اساس روش ساخت، تعداد لایه، اندازه، بار و نوع اصلاح سطح طبقه بندی کرد.



شکل ۱: ساختار لیپوزوم و محل ذخیره شدن داروهای هیدروفیل و هیدروفوب

هیدراتاسیون فیلم خشک فسفولیپیدی است که برای اولین بار بنگهام از همین روش به ساخت لیپوزوم دست یافت. روش تبخیر فاز معکوس که به تهیه امولسیون روغن در آب می پردازد از دیگر روش های ساده است که می تواند جایگزین هیدراتاسیون فیلم خشک فسفولیپیدی شود. از روش های ساخت لیپوزوم می توان به روش مایع فوق بحرانی، روش کانال میکروفلوئیدی، روش حرارتی، روش پرش pH، روش آبدی و آبیگری مجدد، روش حذف دترجنت و روش تزریق حلال اشاره کرد (۱۱). استفاده از هر روش وابسته به مواد بکار گرفته شده و همچنین دستیابی به فرمولاسیون لیپوزومی با ویژگی های دلخواه است؛ مثلا روش تبخیر فاز معکوس مناسب برای محصور سازی مولکول های سنگین است اما برای پیپتدها که در حلال آلی دناتوره می شوند مناسب نیست (۱۱) و یا برای بدست آوردن فرمولاسیونی همگن نیاز است از روش آبدی و آبیگری مجدد استفاده شود.

از نظر تعداد لایه لیپوزوم ها به گروه های تک لایه (کوچک و بزرگ) و چند لایه تقسیم می شوند. لیپوزوم تک لایه (LUV و SUV) دارای فضای داخلی بزرگ بوده و امکان بارگیری داروی هیدروفیل بیشتری دارد. لیپوزوم چند لایه (MLV) که ساختاری همانند پیاز دارد از لایه های چندگانه درون هم تشکیل شده است (شکل ۲) و امکان بارگیری بیشتر داروهای هیدروفوب را دارد (۱۱). با توجه به مواد بکار گرفته شده در فرمولاسیون لیپوزوم ها، انواع آنیونی، کاتیونی و خنثی قابل تهیه است. برای القا بار در لیپوزوم ها می توان از مولکول های لیپیدی باردار (فسفاتیدیل گلیسرول) و یا غیرلیپیدی باردار (دی ستیل فسفات) با مقادیر مولی متنوع استفاده کرد تا بار مورد نظر در ذرات لیپوزومی القا شده و جهت بکارگیری برای هدف معینی استفاده شود (۱۲). لیپوزوم ها را می توان با کمک روش های ساده تا پیچیده، تهیه کرد. یکی از متداول ترین روش ها



شکل ۲: انواع لیپوزوم از نظر تعداد لایه

و در لیپوزوم است (۱۴). بهره گیری از مولکول های طبیعی که در بدن وجود دارد مثل انواع لیپیدها، آلبومین، اسیدهای نوکلئیک و غیره برای غلبه بر این محدودیت مناسب است زیرا مسیر تجزیه آنها در بدن مشخص است از این رو لیپوزوم ها که از لیپیدها تشکیل شده اند از سامانه های دارویی زیست سازگار است (۱۵) که پس از مصرف سمیت ایجاد نمی کند.

انتقال داروهای آبیگریز

فواید لیپوزوم ها

زیست سازگاری

یکی از محدودیت های سامانه های دارورسان ویژگی زیست سازگاری است. لازم است این مواد پس از ورود به بدن باعث برانگیختن واکنش های التهابی و الرژیک نشوند (۱۳)؛ همچنین مواد و مسیر تجزیه آنها معلوم بوده و سمیت ایجاد نکنند. از دیگر ویژگی های مواد زیست سازگار عدم تجمع آن در داخل سلول

بیشترین مولکول های تشکیل دهنده بدن، مولکول های آب هستند. ورود و انتقال دارو به هر بافتی نیاز به حلالیت در شرایط آبدوست درون بدن دارد از این رو استفاده از داروهای کم محلول و یا نامحلول در آب با محدودیت مواجه است. در ساختار لیپوزوم فضاهای هیدروفوب وجود دارد که می تواند باعث گیر انداختن مولکول های هیدروفوب شود. از آنتی بیوتیک های نامحلول و یا کم محلول در آب می توان به سیپروفلوکساسین (۱۶)، آزیترومایسین (۱۷) و اوفلوکساسین (۱۸) اشاره کرد که فرمولاسیون های لیپوزومی آن تهیه شده اند.

انتقال دو دارو

وجود فضاهای آبدوست و آبگریز در لیپوزوم امکان بارگیری همزمان دو نوع داروی آبدوست و آبگریز را فراهم می کند. بنابراین طراحی فرمولاسیون های دارویی که از دو نوع دارو ساخته شده باشد می تواند علاوه بر بی نیاز کردن بیمار برای مصرف جداگانه داروها، اثر سینرژیک نیز به همراه داشته باشد. اثر سینرژیک فرمولاسیون لیپوزومی کلاستین-سیپروفلوکساسین در برابر سودوموناس اثرزینوزا مقاوم (۱۹)، داپتومایسین- کلاریترومایسین در برابر استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین (۲۰) و کلاستین-آزیترومایسین (۲۱) به اثبات رسیده است.

افزایش دسترسی زیستی دارو

داروهای خوراکی پس از ورود به معده و روده بدلیل تجزیه و یا عدم شیب غلظت مناسب، کاملا جذب و وارد گردش خون نمی شوند. داروهایی که حلالیت و یا جذب (بر اساس طبقه بندی بیوداروسازی کلاس های ۲ و ۴ داروها) نفوذپذیری پایینی دارند با مشکل عدم جذب مناسب روبرو هستند بطوریکه دوزهای مصرفی بالا می توانند غلظت مناسب از دارو را در خون فراهم کند. لیپوزوم ها در ابعاد نانو می توانند داروها را از عوامل تجزیه کننده ترشحات دستگاه گوارش محافظت کنند و شیب غلظت بالاتری از دارو در روده ایجاد نمایند تا داروی بیشتری وارد گردش خون شود (۲۲).

رهش آهسته

یکی از مزایای اصلی انتقال آنتی بیوتیک ها به درون لیپوزوم، امکان کنترل آزادسازی آنتی بیوتیک محبوس شده است. بسته به ترکیب مولکولی لیپوزوم و حضور عوامل تحریک کننده خاص مانند اسیدیته یا گرما، می توان آنها را به گونه ای طراحی کرد که به طور کنترل شده از هم پاشیده و سپس داروها را در جریان خون آزاد کنند (۲۳-۲۴). این امکان وجود دارد که فرآیند آزادسازی دارو در محل عفونت اتفاق بیفتد، و یا مدت زمان طولانی تری در گردش خون باقی بماند تا از تعداد دفعات مصرف دارو ممانعت کرده و سمیت سیستمی ناشی از آن کاهش یابد (۱۳، ۲۵-۲۶). آزادسازی پایدار آنتی بیوتیک ممکن است به تنهایی بسیار مفید باشد در برابر سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک زیرا این امکان را فراهم می کند که غلظت بالاتر از حداقل مهار کننده باکتری (MIC) را بدون سمیت ثانویه حفظ کند. آزادسازی کنترل شده آنتی بیوتیک امکان درمان عفونت های سویه های مقاوم را با فراهم کردن غلظت بالاتر از حداقل مهار کننده باکتری (MIC) بدون ایجاد سمیت ثانویه ایجاد می کند.

پایداری بیشتر در گردش خون

فراهم کردن راهکارهایی که امکان حضور طولانی مدت دارو در گردش خون را میسر سازد برای آنتی بیوتیک هایی که فعالیت ضد باکتری کنده دارند بسیار کارآمد می باشد. فعالیت ضد میکروبی بتالاکتام ها و ونکومایسین وابسته به زمان بوده و برای حفظ غلظت پلاسمایی در محدوده سطح درمان، نیاز به مصرف مکرر آنهاست (۲۷) که این موضوع می تواند اثرات سمی دارو را افزایش دهد. لیپوزوم های کوچک و پگیده شده (روی سطح لیپوزوم پلی اتیلن گلیکول متصل شود) قادر به فرار از سیستم رتیکلواندوتلیال و تجزیه انزیمی ناخواسته بوده و به مدت طولانی تری در گردش خون باقی می مانند (۲۸). محصورسازی ونکومایسین و یا سیپروفلوکساسین در لیپوزوم های

پگیله منجر به افزایش زمان حضورشان در گردش خون شده است و نیاز به مصرف مکرر آنها را مرتفع کرده است (۲۹-۳۰).

انتقال هدفمند

سطح ساختار لیپوزوم ها امکان بارگیری و اتصال مولکول هایی مثل پروتئین، آنتی بادی و یا مولکولی که قادر به اتصال به گیرنده سلول معینی باشد را داراست این ویژگی باعث می شود که لیپوزوم بتواند خود را به بافت و یا سلول معینی برساند و دارو را در مجاورت بافت هدف آزاد نماید (۳۱-۳۳). انتقال هدفمند دارو میتواند باعث کاهش غلظت داروی مورد نیاز شده و به تبع آن تجمع دارو در بافت های سالم را کاهش دهد. چنین رویکردی برای استفاده از داروهایی که بدلیل اثر سمیت با محدودیت مواجه هستند بسیار مفید است مثلاً ونکومايسين باعث سمیت کلیوی و شنوایی (۳۴) می شود و طراحی فرمولاسیونی با انتقال هدفمند می تواند اثر سمیت آن را کاهش دهد (۳۵).

افزایش اثر ضد میکروبی

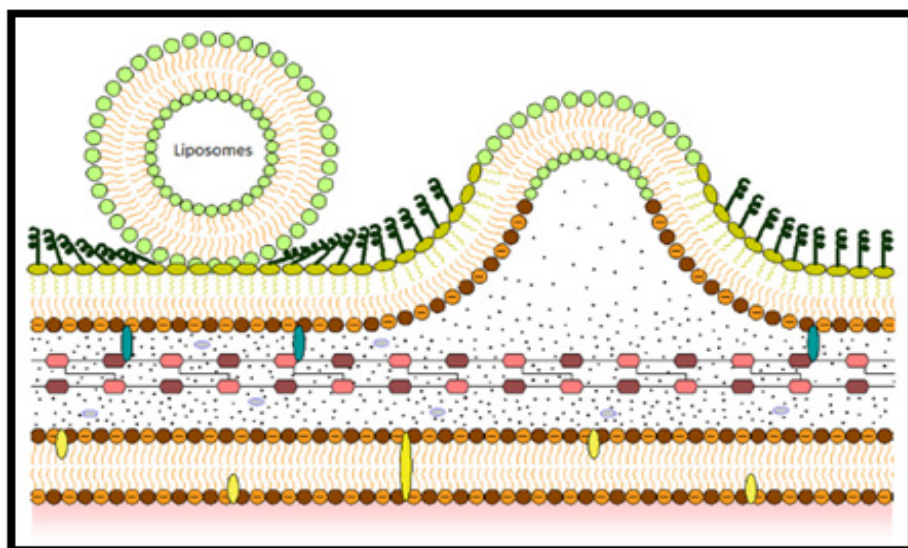
یکی از ویژگی های برجسته لیپوزوم های حاوی آنتی بیوتیک، افزایش فعالیت ضدباکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک مربوطه در فرم آزاد است. به واقع، چندین تحقیق فرمولاسیون های لیپوزومی آنتی بیوتیک با تقویت پتانسیل حتی نسبت به سویه های مقاوم توصیف کرده اند. به عنوان مثال، کاهش MIC پیراکتام در برابر سودوموناس اثرژینوزا مقاوم (۱۲)، کلیندامایسین در برابر گاردنرلا واژینالیس (۳۶) سیپروفلوکساسین و جنتامایسین در مقابل بیشتر باکتری های مقاوم معمولی نظیر سودوموناس اثرژینوزا، کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی در شکل لیپوزومی نسبت به فرم آزاد هر یک از آنتی بیوتیک های نامبرده می باشد (۳۷-۳۹). همسانی لیپوزوم و غشا باکتری از نظر مولکول های تشکیل دهنده، باعث تعامل بین آنها می شود. وجود برخی فسفولیپیدها که دارای اتانول آمین هستند

باعث شکل گیری لیپوزوم هایی با نام فیوژنیک می شود. این لیپوزوم ها در مجاورت باکتری های گرم منفی ابتدا با لیپوپلی ساکاریدهای سطح باکتری برهمکنش داده و باعث افقی شدن ساختارهای پلی ساکاریدی می شود از این رو لیپوزوم به غشا خارجی باکتری دست می یابد سپس با غشا خارجی باکتری ادغام شده و محتویات دارویی خود را به فضای پری پلاسمی باکتری تخلیه می کند و از آنجا داروها با کمک پروتئین های انتقال دهنده وارد باکتری می شود (شکل ۳). این لیپوزوم ها در مواجهه با باکتری های گرم مثبت ابتدا با لایه تیکوویک اسید برهمکنش داده سپس به لایه پپتیدوگلیکان رسیده که نوع برهمکنش با آن مشخص نبوده و با غشا سیتوپلاسمی ادغام می شود (شکل ۴) و پس از آن دارو به باکتری منتقل می شود (۴۰)

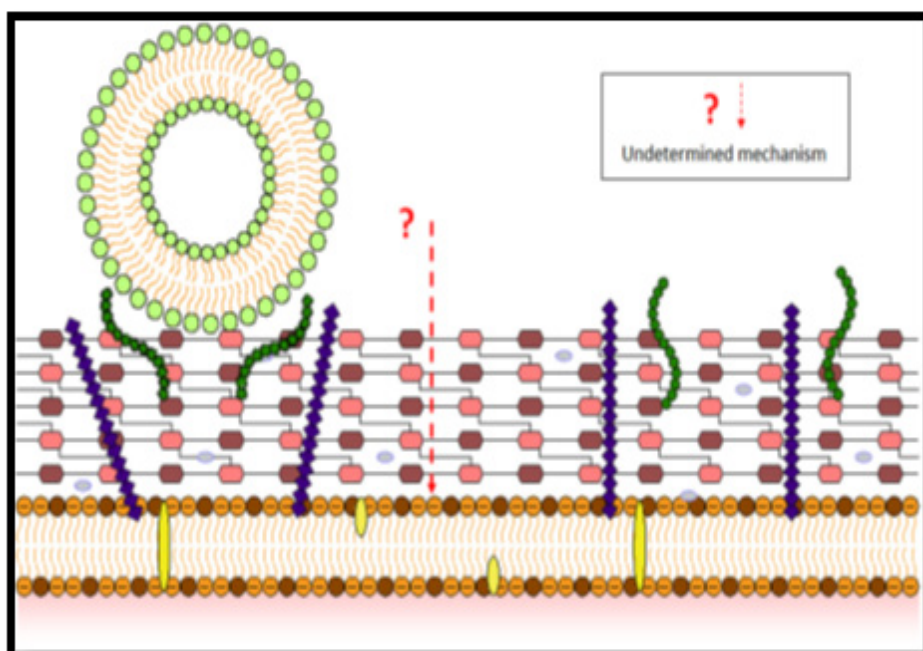
حضور فسفولیپیدهای فسفاتیدیل کولین/ فسفاتیدیل گلیسرول لیپوزوم های فلویدوزم را بوجود می آورد (۴۲) که تعامل لیپوزوم و غشا باکتری را افزایش می دهد. نتیجه افزایش تعامل لیپوزوم با باکتری تحویل هر چه بیشتر محتوای آنتی بیوتیکی لیپوزوم به باکتری بوده که منجر به کاهش MIC می شود. علاوه بر نوع فسفولیپیدهای شرکت کننده در لیپوزوم، بار سطحی لیپوزوم نیز می تواند از عوامل موثر در افزایش اثر لیپوزوم های حاوی آنتی بیوتیک باشد. بطور کلی لیپوزوم های کاتیونی اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به انواع خنثی و آنیونی از خود نشان میدهد (۳۸) زیرا می توانند با غشا باکتری ها که بار منفی دارند واکنش قوی تری ایجاد نمایند.

غلبه بر مقاومت میکروبی

کاهش نفوذپذیری غشا و یا افزایش تعداد پمپ های افلاکس از مکانیسم های مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک هاست. لیپوزوم ها قادر به تعامل با غشا باکتری ها بوده و نفوذپذیری آنها را نسبت به دارو افزایش می دهند. لیپوزوم های حاوی آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید می توانند با موفقیت عفونت هایی که توسط سویه های مقاوم سویه های



شکل ۳: وضعیت افقی لیپولی ساکاریدها و رخداد پدیده ادغام غشا خارجی باکتری گرم منفی با غشا لیپوزوم (۴۱)



شکل ۴: برهمکنش لیپوزوم با لایه تیکوییک اسید باکتری های گرم مثبت (۴۱)

های کادر درمان در بیمارستان ها، عفونت های حاصل از بیوفیلیم هاست که نسبت به عوامل ضد میکروبی مقاوم هستند. لیپوزوم ها قادر به نفوذ به درون ماتریکس بیوفیلیم بوده و می توانند آنتی بیوتیک را در مجاورت باکتری مستقر در بیوفیلیم آزاد سازند (۴۷). در همین رابطه معلوم شده است که فرمولاسیون لیپوزومی بر بیوفیلیم استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین در شرایط IN VIVO و IN VITRO اثر ضد میکروبی داشته باشد در حالیکه آنتی بیوتیک آزاد بر روی آن اثرگذار نبوده است. در مطالعه دیگری نیز لیپوزوم های حاوی ونکومایسین و سیپروفلوکساسین امکان درمان استئومیلیت حاصل از استافیلوکوکوس ارئوس را به اثبات رساند (۴۸). از این رو لیپوزوم ها می توانند راهکاری برای مبارزه با بیوفیلیم های میکروبی باشند.

معایب فرمولاسیون های لیپوزومی

تهیه فرمولاسیون های لیپوزومی نیاز به دست ورزی زیادی دارد بطوری که ویژگی های نهایی آنها، مثل درصد داروی انکپسوله، پایداری فیزیکی و یا شیمیایی، اندازه، بار و ... وابسته به کوچکترین جزئیات روش آماده سازی فرمولاسیون لیپوزومی است به همین دلیل بدست آوردن پروتکلی که امکان تهیه فرمولاسیون هایی با ویژگی های تکرارپذیر را فراهم سازد دشوار است (۴۹).

یکی دیگر از معایب لیپوزوم ها قیمت بالایی است که بدلیل استفاده از فسفولیپید به مصرف کننده ارائه می شود. فسفولیپید مهمترین ماده در تهیه لیپوزوم بوده و کیفیت آن بر فرمولاسیون بسیار موثر است. کیفیت فسفولیپید وابسته به درصد خالص سازی و منبعی است که از آن استخراج شده است و با توجه به درجه خلوص قیمت آن بیشتر می شود به همین دلیل داروهای مبتنی بر لیپوزوم گران قیمت هستند.

داروهای تجاری

فواید لیپوزوم برای حمل آنتی بیوتیک ها باعث شده که این نوع از فرمولاسیون ها از مقیاس آزمایشگاهی به صنعت راه یابند و انواع مختلفی از داروهای لیپوزومی که

بالینی سودوموناس اثرژینوزا ایجاد شده اند را درمان کنند (۴۳). فلویدوزم پلی میکسین B قادر به کاهش MIC در برابر سویه های مقاوم سودوموناس اثرژینوزا نسبت به شکل آزاد پلی میکسین B بوده و غلظت بالاتری از آنتی بیوتیک در باکتری ایجاد کرد (۴۴). بنابراین، فرمولاسیون های لیپوزومی قادر به غلبه بر یکی از موثرترین مکانیسم های مقاومت باکتری های گرم منفی است.

علاوه بر این، لیپوزوم ها امکان ممانعت از هیدرولیز آنزیمی آنتی بیوتیک ها را که یکی دیگر از مکانیسم های مقاومت باکتری ها است، فراهم می کند. در فضای پری پلاسمی باکتری های گرم منفی انزیم های بتالاکتاماز باعث شکست ساختار این دسته از آنتی بیوتیک ها شده و آنها را غیرفعال می سازد. لیپوزومه کردن پیپراسیلین نشان داد که از هیدرولیز شدن آن در استافیلوکوک جلوگیری کرده و فعالیت ضد باکتری آن حفظ شده است (۵۴).

برخی از عوامل میکروبی مثل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و یا انگل لیشمانیا در اندامک های سلولی پنهان می شوند. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با قرارگیری در لیپوزوم ماکروفاژها، عفونت طولانی مدتی را بوجود می آورد که از بین بردن آن با پیچیدگی همراه است. ذرات لیپوزومی با ابعاد بزرگ که توسط سیستم ایمنی قابل شناسایی هستند میتوانند راه حل مناسبی برای بلعیده شدن توسط ماکروفاژها و انتقال آنتی بیوتیک درون آنها به لیپوزوم ها باشد که عامل عفونت در آن قرار دارد. در همین راستا مطالعات نشان داد لیپوزوم ریفاپوتین اثر درمانی بیشتری نسبت به داروی آزاد برای عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس داشته و حتی پاسخ های التهابی مخرب را در اعضا آلوده کاهش داده است (۴۶).

برخی از باکتری ها می توانند فاز زندگی خود را از پلانکتونی به بیوفیلیمی تغییر دهند. بیوفیلیم حاصل اجتماع باکتری هایی است که توسط ماتریکس پلی ساکاریدی از استرس های خارجی حفظ می شود. این ماتریکس مانع از نفوذ عوامل ضد باکتری شده و منجر به مقاومت آنتی بیوتیکی می شود. یکی از دغدغه

جدول ۱: لیستی از داروهای تجاری لیپوزومی برای درمان انواع عفونت ها

نام تجاری دارو	ماده فعال کپسول شده	نوع عفونت
Ambisome®	آمفوتیریسین B	عفونت های قارچی
Amphotec®/Amphocil®	آمفوتیریسین B	عفونت های قارچی
Abelcet®	آمفوتیریسین B	عفونت های قارچی
Epaxal®	ویروس غیرفعال هپاتیت A	هپاتیت A
Arikayce®	آمیکاسین	بیماری ریوی حاصل از مایکوباکتریوم
Arikace™	آمیکاسین	سودوموناس ائروژینوزا در سیستم فیبروزیس
ALIS	آمیکاسین	بیماری ریوی بدون منشا مایکوباکتریوم
Vaxisome	ویروس غیرفعال آنفولانزا	آنفولانزا
JVRS-100	ویروس غیرفعال آنفولانزا	آنفولانزا
Nyotran	نیاستین	عفونت های قارچی
Vaxfectin	پلاسمید DNA ایی آنفولانزا	آنفولانزا

نتیجه گیری:

ساخته شده اند زیست سازگار بوده و دوگانه دوستی آنها امکان حمل داروهای هیدروفیل و هیدروفوب را فراهم کرده است. این نوع فرمولاسیون دارویی قابلیت انتقال هدفمند دارو را داشته و حتی می تواند به صورت کنترل شده دارو را آزاد نماید. مقابله با مکانیسم های مقاومت میکروبی و افزایش قدرت ضد میکروبی آنتی بیوتیک باعث شده است علی رغم قیمت بالا، داروهای لیپوزومی حامل آنتی بیوتیک در قفسه داروخانه ها

مورد تایید FDA قرار گرفته اند گسترش یابد. در جدول ۱ بخشی از این داروهای تجاری ارائه شده است (۵۰). طراحی و گسترش آنتی بیوتیک های جدید باعث توسعه عوامل میکروبی قوی تری شده و نیاز به شکل های دارویی جدید برای مقابله با خطر عفونت کاملا درک شده است. بهره گیری از حامل های دارویی مثل لیپوزوم نشان میدهد که یکی از راهکارهای مناسب در این زمینه است. لیپوزوم ها که از مولکول های طبیعی

تقدیر و تشکر:

نویسنده از داوران گرامی مجله دانش زیستی تشکر می کند.

تعارض منافع:

نویسنده این مقاله عنوان می کند که هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

- 1- Gaynes R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(5):849.
- 2- Leisner JJ. The diverse search for synthetic, semisynthetic and natural product antibiotics from the 1940s and up to 1960 exemplified by a small pharmaceutical player. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:976.
- 3- Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of molecular evolution*. 2020;88:26-40.
- 4- Marchianò V, Matos M, Serrano-Pertierra E, Gutiérrez G, Blanco-López MD. Vesicles as antibiotic carrier: State of art. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;585:119478.
https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119478
- 5- Elfadil D, Elkhatib WF, El-Sayyad GS. Promising advances in nanobiotic-based formulations for drug specific targeting against multidrug resistant microbes and biofilm-associated infections. *Microbial Pathogenesis*. 2022:105721.
DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105721
- 6- Tammam SN, Lamprecht A. Nanostructures in drug delivery. *Pharmaceutical Nanotechnology: Innovation and Production*, Wiley-VCH, Weinheim. 2017. **https://doi.org/10.1002/9783527800681.ch6**
- 7- Aslam B., Wang W., Arshad M.I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H., Nisar M.A., Alvi R.F., Aslam M.A., Qamar M.U., et al. Antibiotic Resistance: A Rundown of a Global Crisis. *Infect. Drug Resist.* 2018;11:1645–1658.
doi: 10.2147/IDR.S173867.
- 8- Zhang L., Pornpattananangku D., Hu C.M.J., Huang C.M. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Curr. Med. Chem.* 2010;17:585–594.
doi: 10.2174/092986710790416290
- 9- Drulis-Kawa Z., Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as Delivery Systems for Antibiotics. *Int. J. Pharm.* 2010;387:187–198.
doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.033.
- 10- Gomez A.G., Hosseinidoust Z. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. *ACS Infect. Dis.* 2020;6:896–908.
doi: 10.1021/acscinfecdis.9b00357.
- 11- Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: Structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*. 2022; 8(5): e09394.
- 12- Mirzakhlanlou H, Khoshnevis Zadeh R, Zare Karizi S. Preparation of Pipractam Liposomal Formulations and Evaluation of Antimicrobial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2022 ; 35(4):527-41.
- 13- Chandy T. Biocompatibility of materials and its relevance to drug delivery and tissue engineering. *InBiointegration of medical implant materials 2020* (pp. 297-331). Woodhead Publishing.
https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102680-9.00012-3
- 14- Raja MM, Lim PQ, Wong YS, Xiong GM, Zhang Y, Venkatraman S, Huang Y. Polymeric nanomaterials: methods of preparation and characterization. *InNanocarriers for drug delivery 2019* (pp. 557-653). Elsevier.
- 15- Dymek M, Sikora E. Liposomes as biocompatible and smart delivery systems—The current state. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2022:102757.
https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102757
- 16- Cipolla D, Blanchard J, Gonda I. Development of liposomal ciprofloxacin to treat lung infections. *Pharmaceutics*. 2016 ;8(1):6.
https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8010006
- 17- Vanić Ž, Rukavina Z, Manner S, Fallarero A, Uzelac L, Kralj M, Amidžić Klarić D, Bogdanov A, Raffai T, Virok DP, Filipović-Grčić J. Azithromycin-liposomes as a novel approach for localized therapy of cervicovaginal bacterial infections. *International Journal of Nanomedicine*. 2019 ;30:5957-76.
- 18- Furneri PM, Fresta M, Puglisi G, Tempera G. Ofloxacin-loaded liposomes: in vitro activity and drug accumulation in bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(9):2458-64.
DOI: https://doi.org/10.1128/aac.44.9.2458-2464.2000
- 19- Wang S, Yu S, Lin Y, Zou P, Chai G, Yu HH, Wickremasinghe H, Shetty N, Ling J, Li J, Zhou Q. Co-delivery of ciprofloxacin and colistin in liposomal formulations with enhanced in vitro antimicrobial activities against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceutical research*. 2018;35:1-3.
- 20- Li Y, Su T, Zhang Y, Huang X, Li J, Li C. Liposomal

co-delivery of daptomycin and clarithromycin at an optimized ratio for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Drug Delivery*. 2015 22(5):627-37.

21- Wallace SJ, Nation RL, Li J, Boyd BJ. Physicochemical aspects of the coformulation of colistin and azithromycin using liposomes for combination antibiotic therapies. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2013 May 1;102(5):1578-87.

<https://doi.org/10.1002/jps.23508>

22- Özyazıcı M, Gökçe EH, Yurdasiper A. Nanosized Drug Delivery for Enhancement of Oral Bioavailability. *Patenting Nanomedicines: Legal Aspects, Intellectual Property and Grant Opportunities*. 2012:305-43.

23- Abu Lila A.S., Ishida T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. *Biol. Pharm. Bull.* 2017;40:1-10.

doi: 10.1248/bpb.b16-00624.

24- Lian T, Ho R.J. Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Sci.* 2001;90:667-680.

doi: 10.1002/jps.1023.

25- Zazo H., Colino C.L., Lanao J.M. Current Applications of Nanoparticles in Infectious Diseases. *J. Control. Release*. 2016;224:86-102.

doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.008

26- Lim S.B., Banerjee A., Önyüksel H. Improvement of Drug Safety by the Use of Lipid-Based Nanocarriers. *J. Control. Release*. 2012;163:34-45.

doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.002

27- eekha S., Terrell C.L., Edson R.S. General Principles of Antimicrobial Therapy. *Mayo Clin. Proc.* 2011;86:156-167

doi: 10.4065/mcp.2010.0639.

28- Crommelin D.J.A., van Hoogevest P., Storm G. The Role of Liposomes in Clinical Nanomedicine Development. What Now? Now What? *J. Control. Release*. 2019;318:256-263.

doi: 10.1016/j.jconrel.2019.12.023

29- Ellbogen M.H., Olsen K.M., Gentry-Nielsen M.J., Preheim L.C. Efficacy of Liposome-Encapsulated Ciprofloxacin Compared with Ciprofloxacin and Ceftriaxone in a Rat Model of Pneumococcal Pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003;51:83-91.

doi: 10.1093/jac/dkg024

30- Muppidi K., Wang J., Betageri G., Pumerantz A.S.

PEGylated Liposome Encapsulation Increases the Lung Tissue Concentration of Vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55:4537-4542.

doi: 10.1128/AAC.00713-11.

31- Gaspar M.M., Radomska A., Gobbo O.L., Bakowsky U., Radomski M.W., Ehrhardt C. Targeted Delivery of Transferrin-Conjugated Liposomes to an Orthotopic Model of Lung Cancer in Nude Rats. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2012;25:310-318.

doi: 10.1089/jamp.2011.0928.

32- Nogueira E., Gomes A.C., Preto A., Cavaco-Paulo A. Design of Liposomal Formulations for Cell Targeting. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2015;136:514-526.

doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.09.034.

33- Alhariri M., Azghani A., Omri A. Liposomal Antibiotics for the Treatment of Infectious Diseases. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013;10:1515-1532.

doi: 10.1517/17425247.2013.822860.

34- Uda K, Suwa J, Ito K, Hataya H, Horikoshi Y. Ototoxicity and nephrotoxicity with elevated serum concentrations following vancomycin overdose: a retrospective case series. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. 2019;24(5):450-5.

35- Sande L., Sanchez M., Montes J., Wolf A.J., Morgan M.A., Omri A., Liu G.Y. Liposomal Encapsulation of Vancomycin Improves Killing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in a Murine Infection Model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67:2191-2194.

doi: 10.1093/jac/dks212

36- Moghadasipour M., khoshneviszadeh R., Noorbakhsh F. Preparation and evaluation of biophysical and microbial properties of clindamycin liposome. The first national event and conference of convergent sciences and technologies and quantum technologies. 2023

37- Mugabe C., Halwani M., Azghani A.O., Lafrenie R.M., Omri A. Mechanism of Enhanced Activity of Liposome-Entrapped Aminoglycosides against Resistant Strains of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50:2016-2022.

doi: 10.1128/AAC.01547-05.

38- Gubernator J., Drulis-Kawa Z., Dorotkiewicz-Jach A., Doroszkiewicz W., Kozubek A. In Vitro Antimicrobial Activity of Liposomes Containing Ciprofloxacin, Meropenem and Gentamicin Against Gram-Negative Clinical Bacterial Strains. *Int. J. Pharm.* 2007;315:59-66.

doi: 10.2174/157018007784620040.

39- Bakker-Woudenberg I.A.J.M., ten Kate M.T., Guo L., Working P., Mouton J.W. Improved Efficacy of Ciprofloxacin Administered in Polyethylene Glycol-Coated Liposomes for Treatment of Klebsiella Pneumoniae Pneumonia in Rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45:1487-1492.

doi: 10.1128/AAC.45.5.1487-1492.2001

40- Furneri P.M., Fresta M., Puglisi G., Tempera G. Ofloxacin-Loaded Liposomes: In Vitro Activity and Drug Accumulation in Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44:2458-2464.

doi: 10.1128/AAC.44.9.2458-2464.2000

41- Santos RS, Figueiredo C, Azevedo NF, Braeckmans K, De Smedt SC. Nanomaterials and molecular transporters to overcome the bacterial envelope barrier: Towards advanced delivery of antibiotics. *Advanced drug delivery reviews.* 2018;136:28-48.

42- Wang Z., Ma Y., Khalil H., Wang R., Lu T., Zhao W., Zhang Y., Chen J., Chen T. Fusion between Fluid Liposomes and Intact Bacteria: Study of Driving Parameters and in Vitro Bactericidal Efficacy. *Int. J. Nanomedicine.* 2016;11:4025-4036.

doi: 10.2147/IJN.S55807

43- Mugabe C., Halwani M., Azghani A.O., Lafrenie R.M., Omri A. Mechanism of Enhanced Activity of Liposome-Entrapped Aminoglycosides against Resistant Strains of Pseudomonas Aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50:2016-2022.

doi: 10.1128/AAC.01547-05.

44- Alipour M., Halwani M., Omri A., Suntres Z.E. Antimicrobial Effectiveness of Liposomal Polymyxin

B against Resistant Gram-Negative Bacterial Strains. *Int. J. Pharm.* 2008;355:293-298. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.11.035

45- Nacucchio M.C., Bellora M.J., Sordelli D.O., D'Aquino M. Enhanced Liposome-Mediated Activity of Piperacillin against Staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985;27:137-139.

doi: 10.1128/AAC.27.1.137

46- Gaspar MM, Neves S, Portaels F, Pedrosa J, Silva MT, Cruz ME. Therapeutic efficacy of liposomal rifabutin in a Mycobacterium avium model of infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2000;44(9):2424-30.

47- Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The open microbiology journal.* 2017;11:53.

48- Kadry A.A., Al-Suwayeh S.A., Abd-Allah A.R.A., Bayomi M.A. Treatment of Experimental Osteomyelitis by Liposomal Antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004;54:1103-1108.

doi: 10.1093/jac/dkh465.

49- Andra VV, Pammi SV, Bhatraju LV, Ruddaraju LK. A comprehensive review on novel liposomal methodologies, commercial formulations, clinical trials and patents. *BioNanoScience.* 2022;12(1):274-91

50- Ferreira M, Ogren M, Dias JN, Silva M, Gil S, Tavares L, Aires-da-Silva F, Gaspar MM, Aguiar SI. Liposomes as antibiotic delivery systems: A promising nanotechnological strategy against antimicrobial resistance. *Molecules.* 2021;26(7):2047.

DOI: 10.3390/molecules26072047



In silico study to Identify New Inhibitors of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Sortase A

Hasan SahebJamei^{1*}, MehrAli Mohmoud Janlou²

1. Assistant Professor, Department Biophysics, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Assistant Professor, Department Biology, School of Biological Science, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Golestan, Iran.

.Place of Research: Department of Biology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Article Info	Abstract
<p>Article History:</p> <p>Recived 01.06.2024 Revised 01.27.2024 Accepted 02.08.2024 Online 02.08.2024</p> <p>KeyWords:</p> <p>Srt A inhibitors <i>Staphylococcus aureus</i> Molecular docking Molecular dynamics simulation</p> <p>*Corresponding author: E-mail address</p> <p>sahebjam.has@gmail.com mfs21@gmail.com</p>	<p>Introduction: Inhibition of key enzymes in bacteria that exert low evolutionary pressure can be a drug development strategy for bacterial antibiotic resistance. Sortase A (Srt A) is a transpeptidase that is widely used in site-specific protein modification. This enzyme has a key function in the interactions between <i>Staphylococcus aureus</i> and the host and has been considered a promising target for the drug development of resistant bacteria. To date, some Srt A inhibitors have been discovered most of them are derived from flavonoid compounds, like myricetin.</p> <p>Aim: Since computational methods for monitoring the behavior of biomolecules at the microscopic level are more accurate and cost-effective, therefore, in this research, our goal is to use computational methods to find similar molecules but with higher binding and inhibitory effect than myricetin.</p> <p>Materials and Methods: In this study, we used computational methods such as structure-based virtual screening, molecular docking, MM-PBSA approach, and MD simulation. A molecular docking approach was used to understand protein-ligand interactions and inhibition constants in terms of affinity. MD simulation technique was used to monitor the conformational changes of Srt A enzyme. After the MD simulation studies, the MM-PBSA approach was used to interpret the binding free energy.</p> <p>Results: First, Chempider's chemical library was screened by the «Similarity search» method, in which myricetin was placed as a reference molecule. The second stage of screening was done using PyRx software, so that the top 10 compounds were carefully selected based on their inhibitory potential from the set of ligands obtained from the previous stage. These compounds were subjected to Autodock4.2 for molecular docking. As a result, it was observed that compound73945561- has a higher inhibitory effect than myrsteine. To investigate the stability and efficiency of ligand binding mode, free Srt A, its complexes with myrsteine and the best selected compound were subjected to 50s molecular dynamics simulation. MD simulation results showed that compound73945561- had better binding profiles and interactions than myrsteine as a reference inhibitor, and steadily unstable behavior was observed in the docking complex.</p> <p>Conclusion: Overall, compound73945561- may serve as a new inhibitor or provide a scaffold for further optimization toward the design of more potent SortA inhibitors. The development of such inhibitors would be an essential strategy against resistant bacteria.</p>

Cite this article: SahebJamei.H*, Mahmoud Janlou M.A. In silico study to Identify New Inhibitors of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Sortase A. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):13-25

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



مطالعه مجازی تعیین مهارکننده های جدید آنزیم سورتازآ در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

حسن صاحب جمعی^{۱*} و مهرعلی محمودجانلو^۲

۱- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گلستان، ایران

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

مقدمه: مهار آنزیم‌های کلیدی در باکتری‌هایی که فشار تکاملی پایینی اعمال می‌کنند می‌تواند یک استراتژی توسعه دارویی برای مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریایی باشد. سورتازآ (Srt A) یک ترانس پپتیداز است که به طور گسترده در مطالعات مهار عفونت باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم یک عملکرد کلیدی در تعاملات بین استافیلوکوکوس اورئوس و میزبان دارد و به عنوان یک هدف امیدوارکننده برای توسعه دارویی باکتری‌های مقاوم در نظر گرفته شده است. تا به امروز، برخی از مهارکننده‌های Srt A کشف شده‌اند که بیشتر آنها از ترکیبات فلاونوئیدی مانند مایرستتین (Myricetin) مشتق شده‌اند.

هدف: از آنجاییکه روش‌های محاسباتی برای نظارت بر رفتار مولکول‌های زیستی در سطح میکروسکوپی دقیق‌تر و مقرون به صرفه‌تر هستند، لذا در این تحقیق هدف ما اینست که با استفاده از روش‌های محاسباتی مولکول‌هایی مشابه اما با قدرت اتصال و مهار بالاتر نسبت به مایرستتین یافته شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ما از روش‌های محاسباتی مانند غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار، اتصال مولکولی و شبیه‌سازی Molecular Dynamic (MD) بهره جستیم. رویکرد اتصال مولکولی برای درک برهم‌کنش‌های پروتئین-لیگاند و ثابت مهار از نظر میل ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. برای نظارت بر تغییرات ساختاری آنزیم Srt A، از تکنیک شبیه‌سازی MD استفاده شد. پس از مطالعات شبیه‌سازی MD، رویکرد MM-PBSA برای تفسیر انرژی اتصال آزاد استفاده شد.

نتایج: ابتدا کتابخانه شیمیایی Chemspider را به روش «جستجوی مشابه» (Similarity search) که در آن مایرستتین به عنوان مولکول مرجع قرار داده شد، غربال گردید. مرحله دوم غربالگری با استفاده از نرم افزار PyRx صورت گرفت بطوریکه 10 ترکیب برتر بر اساس پتانسیل بازدارندگی آنها از مجموعه لیگاند‌های حاصل از مرحله قبل به دقت انتخاب شدند. این ترکیبات در معرض Autodock4.2 برای داکینگ مولکولی قرار گرفتند. که در نتیجه آن مشاهده گردید که ترکیب Chemspider ID=73945561 از قدرت مهار بالاتری نسبت به مایرستتین برخوردار است. برای بررسی پایداری و کارایی حالت اتصال لیگاند، Srt A آزاد، کمپلکس‌های آن با مایرستتین و بهترین ترکیب منتخب، تحت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی 50 ns قرار گرفتند. نتایج شبیه‌سازی MD نشان داد که ترکیب Chemspider ID=73945561 پروفایل‌ها و برهمکنش اتصال بهتری نسبت به مایرستتین به عنوان یک بازدارنده مرجع دارد، و رفتار ناپایدار پیوسته در کمپلکس داکینگ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، ترکیب Chemspider ID=73945561 ممکن است به عنوان یک بازدارنده جدید عمل کند یا دارای داربستی برای بهینه‌سازی بیشتر به سمت طراحی مهارکننده‌های SortA قوی‌تر باشد. پیشنهاد می‌گردد که توسعه این مهارکننده می‌تواند یک استراتژی اساسی برای مهار باکتری‌های مقاوم باشد.

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۰/۱۶

بازنگری ۱۴۰۲/۱۱/۰۷

پذیرش ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

نهایی ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

کلمات کلیدی

مهارکننده های سورتازآ
استافیلوکوکوس اورئوس
داکینگ مولکولی
شبیه سازی دینامیک مولکولی

* نویسنده مسؤل

sahebjam.has@gmail.com
mfs21@gmail.com

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: صاحب جمعی ح. محمودجانلو م.ع. مطالعه مجازی تعیین مهارکننده های جدید آنزیم سورتازآ در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. مجله

دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲: ۱۸(۳): ۲۵-۱۳

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا | شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ | شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X | نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

منجر به ظهور سریع سویه های مقاوم به دارو به دلیل فشار تکاملی بالا می شود. در واقع، مقاومت آنتی بیوتیکی آنها یکی از مشکلات عمده بهداشتی در سراسر جهان است (۱۱). افزایش مقاومت ضد میکروبی، همراه با کمبود قابل توجه سرمایه گذاری دارویی در توسعه آنتی بیوتیک های جدید، تحقیقات در مورد استراتژی های جایگزین برای آنتی بیوتیک های معمولی برای مبارزه با پاتوژن های باکتریایی را سبب شده است. در دهه گذشته، استراتژی هایی برای نسل بعدی داروهای ضد میکروبی توسعه یافته است. یکی از آنها به طور خاص مسیر متابولیسمی را مورد هدف قرار می دهد بطوریکه در این مسیر به دلیل فشار تکاملی پایین اعمال شده مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد نخواهد شد (۱۲). مطالعات بیولوژیکی نشان داده است که جهش ژن *Sortase A (Srt A)* در استافیلوکوکوس اورئوس از چسبیدن ارگانیسیم به IgG، فیرونکتین و فیبرینوژن جلوگیری می کند و ظرفیت پاتوژن را برای ایجاد عفونت حاد در موش تا حد زیادی کاهش می دهد (۱۳). *Srt A* تقریباً در تمام سویه های متعلق به گونه های گرم مثبت از جمله استافیلوکوک ها، استرپتوکوک ها، انتروکوک ها و لیستریا مونوسیتوژنز وجود دارد و نقش مهمی در مراحل مختلف فرآیند بیماری زایی مانند چسبندگی به بافت میزبان، فرار از دفاع میزبان و تشکیل بیوفیلم ایفا می کند (۱۴،۱۵). بنا به گزارش برخی از محققین، غیرفعال سازی ژن *Srt A* در برخی از پاتوژن های گرم مثبت باعث ایجاد نقص های متعدد در پاتوژن آنها شده است (۱۶). با این حال، برای رشد یا بقای باکتری ها حیاتی نیست. اینها، دلایل بیشتری را تقویت می کنند که چرا *Srt A* یک هدف ایده آل برای توسعه داروهای ضد باکتریایی است. بنابراین یک هدف امیدوارکننده برای توسعه داروهای ضد عفونی جدید در نظر گرفته می شود که هدف آنها تداخل با مکانیسم های بیماری زایی مهم باکتری های گرم مثبت است (۱۷). *Srt A* یک ترانس پپتیداز است که واکنش اتصال پروتئین سطحی باکتری های گرم مثبت به پپتیدوگلیکان پیشساز دیواره سلولی را کاتالیز می کند. پروتئین های سطحی نقش مهمی

توسعه آنتی بیوتیک هایی که مولکول های زیستی خاصی در سلول های باکتریایی را مورد هدف قرار می دهند، و نیز اثرات جانبی برای سلول های انسانی نداشته باشند، نقش به سزایی در رشد جمعیت انسانی و بهبود کیفیت زندگی در ۷۵ سال اخیر داشته اند. با این وجود، ظهور گونه های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی مقاوم چند دارویی، باعث محدودیت تاثیر کلینیکی اغلب آنتی بیوتیک های تجاری شده است. بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۱۱، مقاومت دارویی باکتری ها باعث ایجاد مرگ ۵۰۰۰ نفر در سال در بریتانیا و ۲۵۰۰۰ نفر در اروپا گردید. تخمین زده می شود که در هر سال حداقل دو میلیون نفر در آمریکا به باکتری آلوده می شوند و ۲۳۰۰۰ نفر آنها می میرند، زیرا مبتلایان به گونه های باکتریایی موجود با استفاده از هیچ آنتی بیوتیک رایج مورد درمان قرار نمی گیرند (۱،۲). این آمار نیاز مبرم به تولید داروهای ضد عفونی جدید و موثرتر علیه باکتری های بیماری زا را نشان می دهد.

استافیلوکوک ها (*Staphylococcus*) جنس مهمی از باکتری های گرم مثبت هستند. آنها مانند استرپتوکوک ها به شکل کوکسی می باشند اما تقسیم آنها در دو محور انجام می گیرد و به شکل خوشه ای دیده می شوند. استافیلوکوک دارای حداقل ۴۰ گونه می باشد که مهمترین گونه در جنس (سرده) از نظر پزشکی استافیلوکوک اورئوس می باشد. بیشتر استرپتوکوک ها از نظر تولید آنزیم های کاتالاز و اکسیداز، منفی بوده و بی هوازی اختیاری هستند (۳). استافیلوکوکوس اورئوس باعث طیف وسیعی از بیماری ها مانند عفونت های پوستی، اندوکاردیت، پنومونی، استئومیلیت و عفونت های خونی با عوارض و مرگ و میر بالا می شود (۴،۵). اگرچه آنتی بیوتیک های مختلفی مانند *Oritavancin* (۶)، *Delbavancin* (۷)، *Tedizolid Delafloxazine* (۸)، *Lefamulin* (۹)، (۱۰) برای درمان عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس ساخته شده اند، با این حال، به دلیل مکانیسم اثر این داروها، سویه های مقاوم به دارو در سراسر جهان پدید آمده اند. جلوگیری از عفونت باکتریایی با مهار رشد، و یا کشتن باکتری ها

که یافتن مولکول‌های جدید مشابه مایرستین اما با اثرات بازدارندگی بالاتر و فارماکوکینتیک بهتر می‌تواند اهداف دارویی و درمانی باشد. از سوی دیگر، تولید داروی جدید پرهزینه و زمان بر است. آخرین ارزیابی که توسط Joe D. Massi، اقتصاددان مرکز تافتز در سال ۲۰۱۴ انجام شد، برآورد کرد که کل هزینه توسعه و کسب تأییدیه بازاریابی برای یک داروی جدید حدود ۲/۶ میلیارد دلار است (۲۸). علاوه بر این، روند توسعه و ورود به بازار یک داروی جدید می‌تواند ۱۰-۱۲ سال طول بکشد. هنگامی که یک دارو در بازار عرضه می‌شود، اغلب تحقیقات پس از تأیید برای ارزیابی اثربخشی کامل داروی کشف شده انجام می‌شود. بدیهی است که بررسی رفتار ساختاری پروتئین‌ها می‌تواند به اطمینان از اتصال صحیح دارو و کارایی آن کمک کند. برخلاف مطالعات آزمایشگاهی، روش‌های محاسباتی برای نظارت بر رفتار مولکول‌های زیستی در سطح میکروسکوپی دقیق‌تر و مقرون به صرفه‌تر هستند. از این رو، در این مطالعه، ما از روش‌های محاسباتی مانند غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار، اتصال مولکولی و شبیه‌سازی MD بهره جستیم. رویکرد اتصال مولکولی برای درک برهم‌کنش‌های پروتئین-لیگاند و ثابت مهار از نظر میل ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MDS) یک روش محاسباتی است که برای مشاهده و تجزیه و تحلیل حرکات اتم‌ها و مولکول‌ها استفاده می‌شود (۲۹). این قوانین حرکت نیوتن و قوانین برخورد اتمی را برای پیش‌بینی تحرک مولکول‌ها در یک سیستم ترکیب می‌کند (۳۰). برای نظارت بر تغییرات ساختاری آنزیم Srt A، از تکنیک شبیه‌سازی MD استفاده شد. پس از مطالعات شبیه‌سازی MD، رویکرد MM-PBSA برای تفسیر انرژی اتصال آزاد استفاده شد. ما امیدواریم که دانش ارائه شده در این تحقیق منجر به پیشرفت در مطالعات بالینی مهارکننده‌های قوی‌تر Srt A و همچنین تلاش برای تحقیق در مورد توسعه داروهای ضد باکتریایی برای درمان جایگزین یا مکمل بیماری‌های عفونی در آینده نزدیک شود.

در چسبندگی و تهاجم به بافت‌های انسانی دارند. Srt A بواسطه موتیف شناخته شده LPXTG در پروتئین‌های سطحی، طی یک واکنش ترانس پپتیدازی باعث اتصال پروتئین سطحی به پپتیدوگلیکان پیش‌ساز دیواره سلولی می‌شود (۱۸). مطالعه ساختاری Srt A نشان داد که اسیدهای آمینه غیرقطبی شامل Ala118 (۶۰)، Trp194 (۱۳۶)، Val168 (۱۱۰)، Val193 (۱۳۵)، Ala92 (۳۴)، Ala104 (۴۶)، Leu169 (۱۱۱)، و Ile182 (۱۲۴) یک جایگاه آبگریز در مجاورت محل فعال آنزیم ایجاد می‌کند. جهش نقطه ای این اسیدهای آمینه منجر به از دست دادن فعالیت ترانس پپتیداز Srt A می‌شود. جایگاه فعال Srt A شامل سه رزیدوی آمینواسیدی حفاظت شده متشکل از آمینواسیدهای His120 (۶۲)، Cys184 (۱۲۶)، و Arg197 (۱۳۹) در انتهای یک شیار بلند در امتداد یک طرف ساختار دوم بتا است که تقریباً در معرض حلال قرار می‌گیرد. نشان داده شده است که جهش در هر یک از اینها به شدت فعالیت کاتالیزوری Srt A را کاهش می‌دهد (۱۹). همچنین، نشان داده شده است که Arg197 بر اساس حالت باردار پروتئین، برهم‌کنش متمایزی را ایجاد می‌کند، که به تثبیت فرم فعال کاتالیزوری جایگاه فعال آنزیم Srt A کمک می‌کند (۲۰).

نشان داده شده است که برخی از ترکیبات طبیعی در برابر آنزیم Srt A فعال بوده و باعث مهار آنزیم می‌گردد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که عصاره مایرستین (Myricetin) به عنوان یک گیاه دارویی بهترین اثر بازدارندگی را بر روی Srt A دارد و سمیت کمی بر روی سلول‌های انسانی نشان می‌دهد (۲۱).

مایرستین عضوی از طبقه فلاونوئیدها به نام فلاونول است که در سبزیجات (از جمله گوجه فرنگی)، میوه‌ها (از جمله پرتقال)، آجیل، انواع توت‌ها و شراب قرمز موجود است (۲۲). در واقع، ساختار هیدروکسیله مایرستین در مقایسه با سایر فلاونول‌ها مسئول خواص بیولوژیکی آن می‌باشد (۲۳). گزارش شده است که مایرستین دارای تعدادی از اثرات دارویی است، از جمله، آنتی‌اکسیدان (۲۴)، ضد سرطان (۲۵)، ضد التهاب و ضد ویروس (۲۶) و ضد باکتری (۲۷). بدیهی است

مواد و روش ها

آماده سازی پروتئین

ساختار کریستالی (PDB ID: 1T2P) با قدرت تفکیک ۲Å از بانک داده پروتئین (<http://www.rcsb.org>) به دست آمد قبل از اتصال مولکولی، ساختار پروتئین توسط نرم افزار UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) برای آماده سازی اتصال مولکولی بارگذاری شد. زنجیره A در ساختار PDB، که شامل ۱۴۶ باقیمانده آمینواسیدی بوده است انتخاب شد. سپس لیگاندها حذف و بارهای گاستیگر و اتم های هیدروژن اضافه شدند. در نهایت، آنزیم آماده شده با فرمت pdb برای مطالعات داکینگ ذخیره شد.

غربال گری مجازی و انجام داکینگ مولکولی

چندین پایگاه داده قابل دسترس از ترکیبات شیمیایی ایجاد شده است که ده ها میلیون مولکول شیمیایی را در خود ذخیره نموده اند. در این پژوهش از کتابخانه شیمیایی (<http://www.chemspider.com>)، برای شناسایی و غربالگری مجازی مولکول های شیمیایی استفاده شد. با توجه به حجم بالای کتابخانه، از ضریب تانیموتوی بالای ۰٫۹، برای پردازش جستجوی شباهت به عنوان معیار غربالگری استفاده شد. همچنین، مولکول مایرستین به عنوان ساختار مرجع برای غربالگری مبتنی بر شکل انتخاب شد. پس از غربال گری، تعداد مولکول های شیمیایی مشابه مایرستین به ۳۲۴ عدد کاهش یافت. نکته مهم این است که پایگاه داده ChemSpider منبع خوبی از ترکیبات امیدوارکننده با فعالیت بالقوه علیه اهداف بیولوژیکی می باشد. پس از به حداقل رساندن انرژی ساختاری مولکول ها با اعمال مجموعه پایه HyperChem ۶/۳۱G-۶/۳LYP با استفاده از نرم افزار ۷٫۵، مرحله دوم غربال گری مجازی با استفاده از Autodock vina (PyRx) انجام شد. PyRx یک ابزار غربالگری مجازی با یک پروتکل برای اتصال مولکولی پیشرفته است و برای طراحی دارو به کمک رایانه استفاده می شود (۳۱). لیگاندهایی که دارای بهترین انرژی اتصال در این مرحله بودند انتخاب شده و برای مرحله سوم غربالگری قرار گرفتند که این مرحله

مهم از طریق اتصال هر یک از لیگاندهای منتخب از مرحله قبل با استفاده از نرم افزار Autodock4.2 بوده است. مشخص شده است که Autodock4.2 دارای عملکرد بهتری نسبت به Autodock vina برای بررسی اتصال لیگاندها می باشد (۳۲). همانگونه که قبلاً اشاره شد، همه انواع سورتازها حاوی یک سه آمینواسید حفاظت شده His۱۲۰، Cys۱۸۴ و Arg۱۹۷ در محل فعال هستند و برای فعالیت مورد نیاز هستند. همچنین بررسی دقیق محیط باقیمانده Cys۱۸۴ در محل فعال ساختار کریستالی Srt A چندین باقیمانده قابل یونیزاسیون Thr۱۸۳، Asp۱۸۵، Lys۱۹۶، Arg۱۹۷، Glu۱۰۵، Ser۱۱۶، Thr۱۸۰ و Try۱۸۷ را نشان داد (۲۲). بر اساس این اطلاعات، مختصات جعبه شبکه مرکزی بصورت: مرکز: x: ۳۰۶/۳۰۵، مرکز: y: ۲۲۹/۱۶- و مرکز: z: ۰۰۰/۲، فاصله بین نقاط شبکه در ۳۷۵Å/۰ و تعداد نقاط در x، y و بعد z به ترتیب ۴۸، ۴۰ و ۴۴ بود. این پارامترها با توجه به اندازه جایگاه اتصال لیگاندها انتخاب شدند. به طوری که کل محل اتصال و باقی مانده های مجاور آن را پوشش دهند. برای همه لیگاندها و مولکول مرجع (مایرستین)، از اندازه جعبه شبکه و سایر پارامترهای یکسان استفاده شد. برای هر اجرا مستقل، عدد الگوریتم ژنتیک (GA) روی ۱۰۰ تنظیم شد. سایر پارامترها به طور پیش فرض در نرم افزار Autodock تنظیم شدند. متعاقباً، برهم کنش های دو بعدی و سه بعدی بین لیگاند-آنزیم به ترتیب توسط نرم افزار Discovery Studio Client 2017 و PyMol مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

شبیه سازی دینامیک مولکولی و آنالیز MM/PBSA دینامیک برهمکنش های بین پروتئین و لیگاندهای مذکور با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفت: شبیه سازی ها با استفاده از GROMACS نسخه 5.1.1 انجام شد (۳۳). پارامترهای پروتئین با استفاده از میدان نیروی gromos۵۳a۶ تولید شد. پارامترهای لیگاند برای همان میدان نیرو با استفاده از سرور PRODRG تولید شد (۳۴). ابزار Gmx editconf برای تولید جعبه شبیه

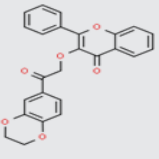
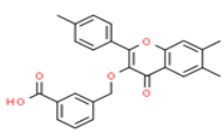
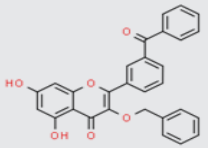
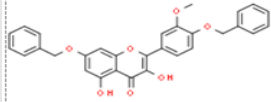
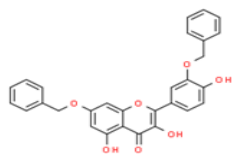
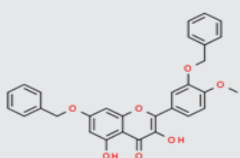
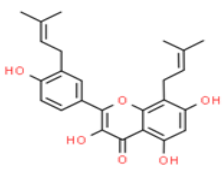
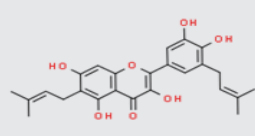
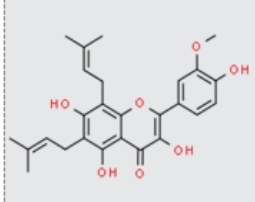
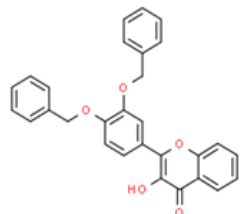
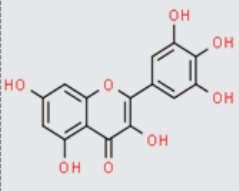
ریشه (RMSF) پروتئین به ترتیب با استفاده از ابزار $gmx\ rmsf$ و $gmx\ rms$ محاسبه شد و مساحت سطح قابل دسترسی حلال (SASA) و شعاع چرخش (Rg) نیز با $gmx\ sasa$ و gmx اندازه‌گیری شد. مقدار قدرت انرژی‌های برهمکنش پروتئین-لیگاند در حالت پویا با استفاده از اسکریپت «GROMACS» g_mmpbsa با مکانیک مولکولی سطح پواسون-بولتزمن (MM/PBSA) و محاسبه‌های انرژی آزاد اتصال تخمین زده شد (۳۶،۳۷). در نهایت قدرت انرژی‌های برهمکنش پروتئین-لیگاند در یک حالت دینامیکی با محاسبات انرژی آزاد اتصال سطح پواسون-بولتزمن مکانیک مولکولی (MM/PBSA) همراه با برهمکنش‌های کوتاه برد کولمبی (SR) ندارد- جونز بین پروتئین هدف و لیگاند محاسبه شد برآورد شد (۳۸).

سازی شش وجهی استفاده شد. حلال سازی با مدل آب SPC با استفاده از ابزار $gmx\ solvate$ انجام شد. بار خالص پروتئین +۱ بود، بنابراین خنثی سازی سیستم نیاز به افزودن یک یون کلر (Cl) داشت. کل سیستم با استفاده از روش $steepest\ descent$ ۱۰۰۰۰ پله و سپس روش $conjugate\ gradients$ تا ۵۰۰۰۰ به حداقل رسید. پس از به حداقل رساندن انرژی، سیستم در دو مرحله متعادل شد: در مرحله اول ۵۰۰ پیکوثانیه تعادل NVT، سیستم تا ۳۰۰K گرم شد تا دمای سیستم تثبیت شود. در مرحله دوم ۵۰۰ پیکوثانیه از مجموعه NPT، طول پیوندها با استفاده از الگوریتم حل محدودیت خطی (LINCS) در مقادیر تعادلی خود قرار گرفت (۳۵). در مرحله آخر شبیه‌سازی MD، هندسه‌های تعادلی با استفاده از شبیه‌سازی MD برای ۵۰ نانوثانیه در ۳۰۰K با زمان گام ۲fs به دست آمد. میانگین مربعات انحراف ریشه (RMSD) و نوسانات میانگین مربعات

نتایج

امتیاز انرژی اتصال برای ارزیابی قدرت برهمکنش‌های پروتئین-لیگاند و رتبه بندی آنها استفاده شد. امتیاز انرژی اتصال منفی تر، اتصال مطلوب تری بین لیگاند و پروتئین را نشان می‌دهد. انرژی اتصال و ثابت بازدارنده در بهترین خوشه برای مولکول‌های متصل شده توسط Autodock4.2 در جدول ۱ نشان داده شده است. یکی از اهداف اصلی دانش شیمی دارویی، کشف داروی کاندید با بیشترین میل پیوندی در کمترین غلظت است (۳۹). با توجه به این واقعیت که مقادیر انرژی اتصال ترکیبات پاسخ احتمالاً در نرم افزار Autodock بهبود می‌یابد، بر این اساس برای اطمینان بیشتر از مولکول منتخب و محدود کردن فضای جستجو، آستانه انرژی برای تعیین بهترین پاسخ را به ۸- کیلوکالری در مول کاهش دادیم. فرآیند اتصال نشان می‌دهد که فقط لیگاند شماره ۳ (جدول ۱) دارای انرژی اتصال کمتر از ۸- کیلوکالری در مول است که بسیار بهتر از میریستین است

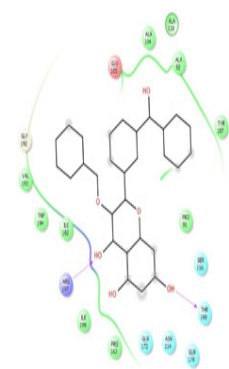
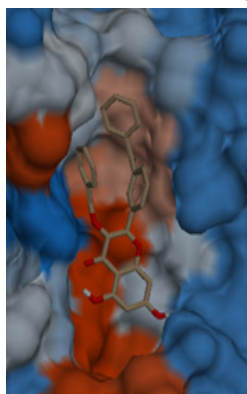
نتایج حاصل از غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار و اتصال مولکولی در مجموع ۳۲۴ ترکیب از پایگاه داده Chemspider بر اساس یک جستجوی مشابه تانیموتو ۹۰٪ در برابر مایرستیین به عنوان یک مولکول مرجع برای توسعه مولکول‌های دارو به دست آمد. برای غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار لیگاندهای حاصله از نرم افزار PyRx استفاده شد. همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود، ۱۰ لیگاند از بهترین لیگاندها با توجه به انرژی اتصال به عنوان مولکول‌های پاسخ در این مرحله انتخاب شدند. اتصال مولکولی یک روش خوبی است که به طور گسترده در کشف دارو بر اساس غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار استفاده می‌شود. بر این اساس در مرحله بعد، ۱۰ لیگاند آماده شده همراه مولکول مرجع یک به یک و جداگانه با استفاده از Autodock4.2 به محل اتصال مولکول هدف (Srt A) اتصال داده شدند. از مقدار عددی

			
۱: ۶۰۴۲۲۱۵۱	۲: ۶۰۴۳۷۴۳	۳: ۷۳۹۴۵۵۶۱	۴: ۷۴۸۴۷۳۱۶
			
۵: ۷۴۸۴۷۳۱۸	۶: ۷۴۸۴۷۳۱۹	۷: ۸۰۴۳۵۹۹	۸: ۸۵۱۸۵۲۹
			
۹: ۸۷۷۵۰۹۹	۱۰: ۸۷۹۸۷۹۲	۱۱: ۴۴۴۴۹۹۱ (Myricetin)	

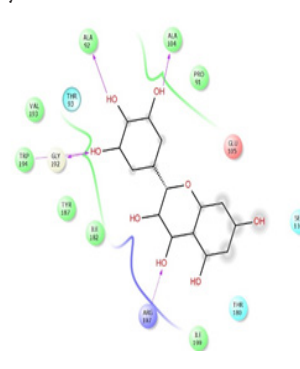
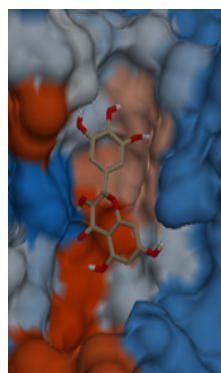
شکل ۱: ساختار دو بعدی مولکول مرجع همراه با ۱۰ ترکیب برتر شناسایی شده از طریق غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار توسط نرم افزار PyRx.

Chemspider ID

Ligand No. 3



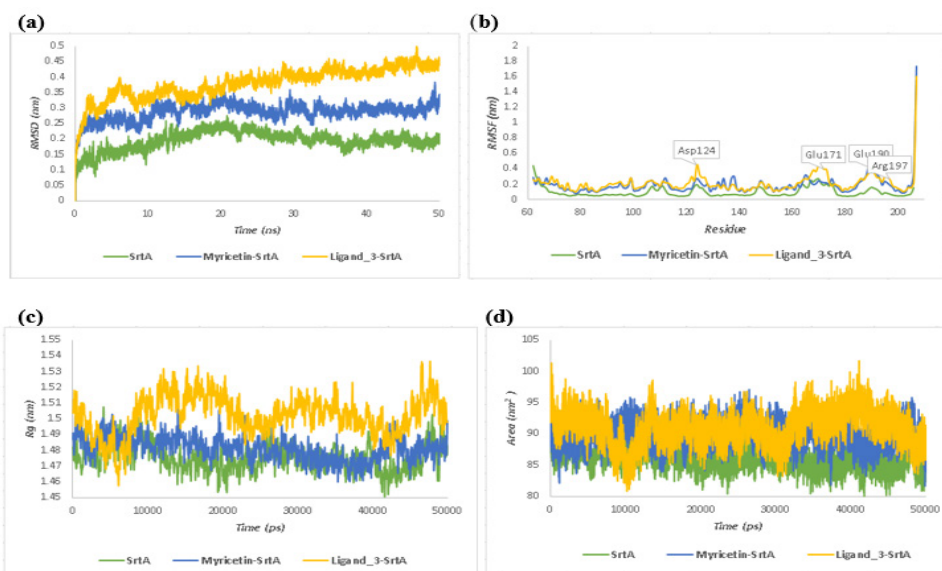
Myricetin



شکل ۲: تصاویر دو و سه بعدی برهمکنش بین مولکول مرجع و منتخب شماره ۳ در جایگاه اتصال آنزیم S. aureus Srt A.

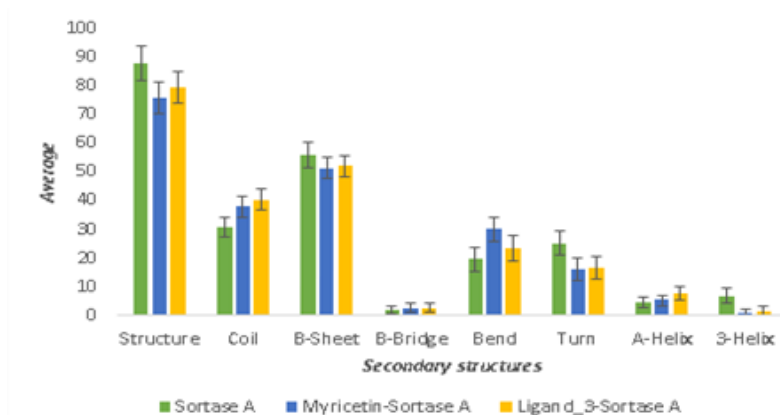
جدول ۱. انرژی های اتصال و ثابت های بازدارندگی ترکیبات در برابر Srt A.

No	Chemspider ID	Binding energy(kcal/mol)	Inhibition Constant(μ M)
۱	۶۰۴۲۲۱۵	-۴۵/۶	۴۷/۳
۲	۶۰۴۳۷۴۳	-۵۴/۶	۰۲/۱۶
۳	۷۳۹۴۵۵۶۱	-۰۷/۸	۲۱/۱
۴	۷۴۸۴۷۳۱۶	-۱۷/۵	۶۹/۱۶۲
۵	۷۴۸۴۷۳۱۸	-۹۱/۵	۸۴/۴۶
۶	۷۴۸۴۷۳۱۹	-۸۸/۵	۵۸/۴۸
۷	۸۰۴۲۵۹۹	-۱۴/۶	۷۳/۳۱
۸	۸۵۱۸۵۲۹	-۵۶/۵	۵۱/۸۴
۹	۸۷۷۵۰۹۹	-۵۴/۵	۲۹/۸۷
۱۰	۸۷۹۸۷۹۲	-۰۲/۷	۱/۳
۱۱	Myricetin	-۱۳/۵	۱۲/۱۷۳



شکل ۳: (a) RMSD، (b) RMSF، (c) Rag، و (d) SASA در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی برای Apo- Sort A و کمپلکس های

. Ligand 3-Srt A و Myricetin-Sort A



شکل ۴: میانگین ساختارهای ثانویه در طول شبیه‌سازی MD برای اشکال Sort A اتصال یافته و آزاد.

جدول ۲: مقدار انرژی اتصال بر حسب kJ/mol برای کمپلکس‌های Sort A با دو مولکول میریستین و Ligand No. 3.

Complex	E_{vdW}	E_{ele}	E_{Total}	Number of H-bonds
Ligand No. 3	-133.92	-55/21	-187/14	۰/۸
Myricetin	-88/91	-37/99	-126/90	۱/۱۰

شعاع چرخش (Rag)، و سطح قابل دسترسی (SASA) انجام شد.

RMSD، خواص کلی از تغییرات ساختار پروتئین را نشان می‌دهد. پس از تعادل سیستم به مدت ۱۰ ns، RMSD اشکال کمپلکس نسبت به فرم آزاد (Apo-Sort) افزایش بیشتری نشان می‌دهد. در این بین، کمپلکس Ligand 3-Srt A تغییرات RMSD بالاتری را بین ۰ تا ۴۲/۰ نانومتر نشان داد. درحالی‌که کمپلکس Myricetin-Sort A تغییرات RMSD را کمی بالاتر از Apo-Sort A نشان داد (۰ تا ۲۷/۰ نانومتر) (شکل ۳(a)). مشابه توزیع RMSD، کمپلکس Ligand 3-Srt A بالاترین نمایه RMSF را نشان می‌دهد. علاوه بر این، تعداد کمی از باقیمانده‌های

(به ترتیب برای لیگاند شماره ۳ و میریستین -۰/۱۳ و ۰۷/۸- کیلو کالری در مول). همچنین از نقطه نظر ثابت بازداری (Ki)، لیگاند شماره ۳ نسبت به لیگاندهای دیگر از جمله میریستین برتری دارد. جزئیات برهمکنش‌های واندروالس و پیوند هیدروژنی بین زنجیره جانبی آمینواسیدها در پاکت اتصال Srt A با لیگاند مرجع و ترکیب شماره ۳ در شکل ۲ نشان داده شده‌اند.

تجزیه و تحلیل شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

۵۰ ns شبیه‌سازی MD برای ارزیابی پایداری ساختاری کمپلکس‌ها با تجزیه و تحلیل ریشه میانگین انحراف مربع (RMSD)، نوسانات ریشه میانگین مربع (RMSF)،

زمان (Time-dependent secondary structures) مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز نتایج حاصل از DSSP جالب توجه می باشد. در این نتایج دیده می شود که اگر چه اتصال مایرستین به جایگاه فعال Srt A همچون لیگاند شماره ۳ باعث کاهش ساختارهای دوم B-Sheet، Turn، و ۳-helix و تبدیل آنها به Bend، Coil، و A-helix می شود، اما لیگاند شماره ۳ میزان بیشتری از Coil را ایجاد می کند که معیاری از عدم تاخوردگی پروتئین می باشد (شکل ۴). به طور کلی، تجزیه و تحلیل شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان می دهد که اتصال لیگاند شماره ۳ در مقایسه با مایرستین به پاکت اتصال Srt A باعث باز شدن و ناپایداری بیشتر می شود.

جدول ۲ مقدار میانگین انرژی کل اتصال و همچنین سهم انرژی حاصل از برهمکنش های واندروالسی و الکترواستاتیکی از انرژی اتصال کل و میانگین تعداد پیوندهای H در حالت دینامیکی را نشان می دهد که برای اتصال دو مولکول مایرستین و لیگاند شماره ۳ با استفاده از روش مساحت سطح پواسون-بولتزمن مکانیک مولکولی (MM/PBSA) انجام شد. همانند مطالعات docking، لیگاند شماره ۳ دارای بالاترین انرژی اتصال با جایگاه اتصال Srt A است. همچنین، برخلاف Myricetin-Srt A که دارای میانگین پیوندهای هیدروژنی بالاتری است، سهم واندروالس در اتصال لیگاند شماره ۳ به جایگاه فعال بیشتر از الکترواستاتیکی است. این به وضوح اثر برجسته لیگاند شماره ۳ را در حفره Srt A نشان می دهد.

واقع در ابتدا و انتهای زنجیره پروتئینی، نوسانات بالاتر از ۴ نانومتر را نشان دادند (شکل ۳(b)). افزایش دو پارامتر فیزیکی RMSF و RMSD بیانگر آنست که اتصال لیگاند شماره ۳ به آنزیم Sort A نسبت به لیگاند مرجع، باعث تغییرات ساختاری همراه با ناپایداری بیشتر در آنزیم Sort A می شود. Rag که معیاری برای فشردگی پروتئین است و به نوبه خود پایداری ساختار پروتئین را نشان می دهد، نیز با توزیع های RMSF و RMSD در سراسر شبیه سازی همخوانی دارد (شکل ۳(c)). واضح است که یک تغییر قابل توجه (باز شدن بیشتر) در کمپلکس Ligand 3-Srt A در مقایسه با ساختار Apo-Sort A مشاهده شد. مقادیر Rag برای کمپلکس Myricetin-Sort A کمی بالاتر از ساختار Apo-Sort A به نظر می رسد، که نشان دهنده کاهش جزئی در فشردگی در مقایسه با Apo-Sort A است. همچنین شکل ۳(d) تغییر SASA را نسبت به زمان برای سه ساختار نشان می دهد. SASA سطح قابل دسترس بیومولکول ها به حلال است. میانگین مقدار SASA برای Myricetin-Sort A، Apo-Sort A و Ligand 3-Srt A به ترتیب ۱۰/۸۶ نانومتر مربع، ۹۲/۸۹ نانومتر مربع و ۹۲/۹۰ نانومتر مربع است. در اینجا نیز، افزایش مقدار SASA در Ligand 3-Srt A نشان دهنده متورم شدن آن در مقایسه با ساختار Apo-Sort A است. باز هم، به نظر می رسد که مقادیر SASA برای کمپلکس Myricetin-Sort A افزایش جزئی نسبت به ساختار Apo-Sort A نشان می دهد، که نشان دهنده تورم جزئی در مقایسه با پروتئین Sort A است. با استفاده از برنامه DSSP، ساختارهای دوم وابسته به

نتایج

های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس می تواند یک استراتژی توسعه دارویی برای مهار باکتری ها و یک زمینه تحقیقاتی فشرده برای شیمیدانان دارویی باشد. مولکول مایرستین به عنوان یک مولکول طبیعی موجود در برخی از سبزیجات مانند گوجه فرنگی، میوه ها مانند پرتغال، انواع توت، و چای که خاصیت آنتی

امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس ناشی از جهش های ژنی یکی از دغدغه های اصلی سازمان بهداشت جهانی است. بنابراین، توسعه نسل بعدی داروهای ضد میکروبی برای اهداف خاصی در باکتری هایی که فشار تکاملی پایینی اعمال می کنند، ضروری است. آنزیم Sort A در باکتری

جدید کاندیدای عالی برای تحقیقات بیشتر توسط Molecular Docking در نظر گرفته شدند. لیگاند شماره ۳ از جدول شماره ۱، بر اساس انرژی اتصال پیش بینی شده و ثابت بازدارندگی انتخاب به عنوان بهترین پاسخ انتخاب شد. جالب توجه است، نتایج شبیه سازی MD نشان می دهد که لیگاند شماره ۳ دارای پروفایلها و برهمکنش اتصالی بهتری نسبت به مایرستین به عنوان یک مهارکننده مرجع بوده، و باعث رفتار ناپایدار پیوسته در کمپلکس docking می شود.

اکسیدانی نیز دارد، توسط برخی از محققان به عنوان یک مهارکننده Sort A مورد مطالعه قرار گرفته است. اما تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از آن به عنوان یک داروی بالینی گزارش نشده است. در این مطالعه، ابتدا پس از غربالگری کتابخانه ای از ترکیبات شیمیایی مبتنی بر جستجوی شباهت و سپس غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار، ۱۰ نامزد برتر از لیگاندها براساس میزان میل اتصال به جایگاه فعال آنزیم Sort A و ثابت بازدارندگی، به عنوان کلاس های جدید بازدارنده های مولکولی کوچک برای Sort A شناسایی شد. این بازدارنده های

نتیجه گیری:

کاربرد درمانی به آزمایش هایی مانند تعیین مهار آنزیم برای تأیید بیشتر ویژگی انتخاب پذیری و فعالیت ترکیبات در برابر Sort A، هم در شرایط *in vitro* و هم *in vivo* بستگی دارد.

در مجموع، ما پیشنهاد می کنیم که لیگاند شماره 3 (Chemspider ID=73945561) می تواند یک ترکیب امیدوارکننده در برابر هدف Sort A به عنوان یک استراتژی درمانی باشد. با این حال، چنین استراتژی و

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمام کسانی که آنان را در انجام این تحقیق یاری رسانده اند تشکر و قدردانی می کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

References

- Noorbakhsh F. Antibiotic resistance to beta-lactams in bacteria: Beta-Lactamases. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2022;17(2):67-80.
- Nourizadeh S, Khakvar R. Efflux Systems in plant-associated Bacteria and their Role in Multiple Drug Resistance. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2021;16(3):55-67.
- Patterson MJ. *Streptococcus*. Medical Microbiology. 4th edition. 1996.
- Kwiecinski JM, Horswill AR. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr Opin Microbiol*. 2020;53:51-60.
- Tam K, Torres VJ. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes . *Microbiol Spectr*. 2019;7(2):3-39.
- Cada D, Baker D. Oritavancin diphosphate. *Hosp Pharm*. 2014;49(11):1049-60.
- Leuthner KD, Yuen A, Mao Y, Rahbar A. Dalbavancin (BI-387) for the treatment of complicated skin and skin structure infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(2):149-59.
- Shorr AF, Lodise TP, Corey GR, De Anda C, Fang E, Das AF, et al. Analysis of the phase 3 ESTABLISH trials of tedizolid versus linezolid in acute bacterial skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):864-71.
- Candel FJ, Peñuelas M. Delafloxacin: Design, development and potential place in therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:881-91.
- Veve MP, Wagner JL. Lefamulin: Review of a Promising Novel Pleuromutilin Antibiotic. *Pharmacotherapy*. 2018;38(9):935-46.
- Shakour N, Hadizadeh F, Kesharwani P, Sahebkar A. 3D-QSAR Studies of 1,2,4-Oxadiazole Derivatives as Sortase A Inhibitors. *Biomed Res Int*. 2021;2021.
- Sapra R, Rajora AK, Kumar P, Maurya GP, Pant N, Haridas V. Chemical Biology of Sortase A Inhibition: A Gateway to Anti-infective Therapeutic Agents. *J Med Chem*. 2021;64(18):13097-130.
- Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, Lenoy E, Schneewind O. Staphylococcus aureus sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(10):5510-5.
- Paterson GK, Mitchell TJ. The biology of Gram-positive sortase enzymes. *Trends Microbiol*. 2004;12(2):89-95.
- Parrino B, Diana P, Cirrincione G, Cascioferro S. Bacterial Biofilm Inhibition in the Development of Effective Anti-Virulence Strategy. *Open Med Chem J*. 2018;12(1):84-7.
- Marraffini LA, DeDent AC, Schneewind O. Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(1):192-221.
- Si L, Li P, Liu X, Luo L. Chinese herb medicine against Sortase A catalyzed transformations, a key role in gram-positive bacterial infection progress. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31:184-96.
- Theile C. Site-specific C-terminal. *Nat Protoc*. 2014;8(9):20-40.
- Kappel K, Wereszczynski J, Clubb RT, McCammon JA. The binding mechanism, multiple binding modes, and allosteric regulation of Staphylococcus aureus Sortase A probed by molecular dynamics simulations. *Protein Sci*. 2012;21(12):1858-71.
- Jacobitz AW, Kattke MD, Wereszczynski J, Clubb RT. Sortase Transpeptidases: Structural Biology and Catalytic Mechanism. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2017;109:223-64.
- Cascioferro S, Totsika M, Schillaci D. Sortase A: An ideal target for anti-virulence drug development. *Microb Pathog* [Internet]. 2014;77:105-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.007>
- Nitulescu G, Nicorescu IM, Olaru OT, Ungurianu A, Mihai DP, Zangfirescu A, et al. Molecular docking and screening studies of new natural sortase A inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
- Sato M, Murakami K, Uno M, Nakagawa Y, Katayama S, Akagi KI, et al. Site-specific inhibitory mechanism for amyloid β 42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the lys residues. *J Biol Chem*. 2013;288(32):23212-24.
- Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol*. 1997;29(2):121-6.
- Phillips PA, Sangwan V, Borja-Cacho D, Dudeja V, Vickers SM, Saluja AK. Myricetin induces pancreatic cancer cell death via the induction of apoptosis

and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. *Cancer Lett* [Internet]. 2011;308(2):181-8. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.05.002>

26. Pasetto S, Pardi V, Murata RM. Anti-HIV-1 activity of flavonoid myricetin on HIV-1 infection in a dual-chamber in vitro model. *PLoS One*. 2014;9(12):1-18.

27. Xu H, Ziegelin G, Schröder W, Frank J, Ayora S, Alonso JC, et al. Flavones inhibit the hexameric replicative helicase RepA. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(24):5058-66.

28. Rennane S, Baker L, Mulcahy A. Estimating the Cost of Industry Investment in Drug Research and Development: A Review of Methods and Results. Inq (United States). 2021;58:1-11.

29. Bhardwaj VK, Purohit R. Targeting the protein-protein interface pocket of Aurora-A-TPX2 complex: rational drug design and validation. *J Biomol Struct Dyn* 2021;39(11):3882-91.

<http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1772109>

30. Adcock SA, McCammon JA. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem Rev*. 2006;106(5):1589-615.

31. Dallakyan S, Olson A. Participation in global governance: Coordinating "the voices of those most affected by food insecurity." *Glob Food Secur Gov*. 2015;1263:1-11.

32. Uba AI, Yelekçi K. Carboxylic acid derivatives display potential selectivity for human histone deacetylase 6: Structure-based virtual screening, molecular docking and dynamics simulation studies. *Comput Biol Chem*. 2018;75:131-42.

33. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19-25.

34. Schüttelkopf AW, Van Aalten DMF. PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2004;60(8):1355-63.

35. Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput*. 2008;4(3):435-47.

36. Singh R, Bhardwaj V, Purohit R. Identification of a novel binding mechanism of Quinoline based molecules with lactate dehydrogenase of Plasmodium falciparum. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2021;39(1):348-56. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1711809>

37. Kumari R, Kumar R, Lynn A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J Chem Inf Model*. 2014;54(7):1951-62.

38. Homeyer N, Gohlke H. Free energy calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area method. *Mol Inform*. 2012;31(2):114-22.

39. Weako J, Uba AI, Keskin Ö, Gürsoy A, Yelekçi K. Identification of potential inhibitors of human methionine aminopeptidase (type II) for cancer therapy: Structure-based virtual screening, ADMET prediction and molecular dynamics studies. *Comput Biol Chem* 2020;86(March):107244.

<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107244>



Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles by Chemical Method and Investigation of Their Antimicrobial Properties

Asma Shamsaei¹, Mina Ramezani^{2,*}, Ramin Mohammadi-Alocheh³

1. M.Sc., Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Associated Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Place of Research: Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

Received 12.22.2024
Revised 01.22.2024
Accepted 02.08.2024
Online 02.08.2024

KeyWords:

Copper oxide nanoparticles
Staphylococcus aureus
Escherichia coli
Fusarium solani

*Corresponding author:

E-mail address

asma.shamsaei@yahoo.com
mina.ramezani@gmail.com
ramin.p1363@gmail.com

Introduction: Copper oxide is one of the most important metal oxides that has unique properties in various technological applications, such as superconductors, and has been used as an antimicrobial agent against numerous bacterial species.

Aim: In the present study, CuO Nps was synthesized using chemical methods and its antimicrobial activity was investigated.

Materials and Methods: Copper oxide nanoparticles were synthesized using the microwave method, and XRD, EDX, SEM, FTIR, and UV-vis analyses were performed to investigate the physical and chemical properties. The antimicrobial and antifungal effects of copper oxide nanoparticles on pathogenic bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Fusarium solani* were evaluated using MIC and MBC tests and well diffusion assay.

Results: The results showed that at a concentration of 20 mg/mL, copper oxide nanoparticles inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*. Similarly, growth inhibition of *Escherichia coli* was observed at a concentration of 4 mg/mL of nanoparticles. Furthermore, *Fusarium solani* exhibited increased sensitivity to copper oxide nanoparticles at concentrations higher than 50 mg/mL, with a growth inhibition zone diameter of 18 mm at a concentration of 100 mg/mL.

Conclusion: Copper oxide nanoparticles can be introduced as a strong antimicrobial agent.

Cite this article: Shamsaei A, Ramezani M*, Mohammadi-Alocheh R. Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles by Chemical Method and Investigation of Their Antimicrobial Properties. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):27-41

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



سنز نانوذرات اکسید مس به روش شیمیایی و بررسی خواص ضد میکروبی آنها

اسما شمسایی^۱، مینا رضانی^۲، رامین محمدی آلوچه^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

مقدمه: اکسید مس، یکی از مهمترین اکسیدهای فلزی واسطه است که دارای خصوصیات منحصر به فردی در مصارف فناورانه مختلفی نظیر ابر رساناها، به عنوان یک عامل ضد میکروبی بر علیه گونه های باکتریایی متعددی استفاده شده است.

هدف: در تحقیق حاضر نانوذرات اکسید مس، با استفاده از روش های شیمیایی تولید و فعالیت ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: نانوذرات اکسید مس به روش میکروویو سنتز شد و آنالیزهای FTIR، SEM، EDX، XRD، UV-vis، جهت بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی انجام شد. ارزیابی تأثیرات ضد میکروبی و ضد قارچی غلظت های مختلف نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری های پاتوژن گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی و گرم منفی اشرشیا کلی و قارچ فوزاریوم سولانی با کمک آزمون های MIC و MBC و چاهک گذاری بررسی گردید.

نتایج: نتایج نشان داد در غلظت های ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر از نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی ممانعت از رشد ثبت شد. همچنین این ممانعت از رشد برای اشرشیا کلی در غلظت ۴ میلی گرم در میلی لیتر از نانوذرات مشاهده شد. همچنین قارچ فوزاریوم، در غلظت های بالاتر از ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانو اکسید مس، حساسیت به نسبت بیشتری نشان می دهد به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر، قطر هاله عدم رشد ۱۸ میلی متر بود.

نتیجه گیری: می توان نانوذرات اکسید مس را به عنوان یک عامل قوی ضد میکروبی معرفی نمود.

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

بازنگری ۱۴۰۲/۱۱/۰۲

پذیرش ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

نهایی ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

کلمات کلیدی

نانوذرات اکسید مس
استرپتوکوکوس اینیایی
اشرشیا کلی
فوزاریوم سولانی

* نویسنده مسؤل

asma.shamsaei@yahoo.com
mina.ramezani@gmail.com
ramin.p1363@gmail.com

شیوه آدرس دهی این مقاله: شمسایی الف، رضانی م، محمدی آلوچه ر. سنز نانوذرات اکسید مس به روش شیمیایی و بررسی خواص ضد میکروبی آنها. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲؛ ۱۸ (۳): ۲۷-۴۱

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا | شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ | شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹۶ | نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

به عنوان یکی از عوامل مهم بروز استرپتوکوکوزیس در گونه های متعددی از ماهیان آب شیرین و دریایی، گونه های پرورشی و جمعیت های وحشی به حساب می آید (۹). تلفات حاصله از این باکتری با علائم متنوع بالینی تا ۸۰ درصد نیز می رسد. بیماری به هر دو صورت انفرادی و همه گیری در ماهیان اتفاق می افتد (۱۰).

اشرشیاکلی (*Escherichia coli* یا *E. coli*) زیر گونه O157HV یک عامل بیماریزای مهم غذایی است که باعث اسهال خونی و گاهی سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) می شود (۱۱). این پاتوژن انسانی مشترک انسان و دام می تواند در غذا و محیط های مربوط به غذا باقی بماند و متعاقباً بیوفیلیم تولید کند. O157HV از طریق مصرف غذاهای آلوده مانند گوشت گاو و لبنیات، سبزیجات و میوه ها منتقل می شود (۱۱).

بیماری های عفونی در آبزیان، می تواند توسط برخی عوامل قارچی نیز ایجاد گردد. قارچ ها در بهداشت آبزیان از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و به عنوان عاملی اساسی در تعیین وضعیت بهداشتی مزارع پرورش ماهی مدنظر می باشند (۱۲).

برخی از گونه های قارچی مانند فوزاریوم سولانی (*Fusarium solani*) نیز به عنوان عوامل موثر در فوزاریوزیس، مطرح می باشند (۱۲). این قارچ ها عمدتاً از دسته قارچ های ناقص هستند و گونه های مختلفی از آنها در ماهی و میگو ایجاد بیماری می کنند. عفونت ناشی از فوزاریوم از کوسه، لاک پشت های دریایی، ماهی آزاد اطلس و برخی انواع خرچنگ ها گزارش شده است (۱۱، ۱۲). به علت مقاومت گونه های فوزاریوم در برابر داروهای ضدقارچی، شناسایی سریع و دقیق آنها برای کنترل تبعات عفونت امری مهم و ضروری است. با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات اکسید مس و بررسی خواص ضد میکروبی آنها می باشد.

نانوذرات اکسید مس (CuO Nps)، در میان سایر نانومواد اکسید، توسط آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده به عنوان یک عامل ضد میکروبی ایمن، ساده و مؤثر برای استفاده انسانی مورد تایید، و از قرن نوزدهم به شدت مورد استفاده قرار گرفته است (۱، ۲، ۳). با توجه به چالش مقاومت دارویی، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس آنها را به عنوان کاندیدای قوی برای استفاده به عنوان عوامل درمانی تبدیل کرده است (۴). مکانیسم های زیستی متفاوتی برای نانوذرات بر علیه میکروارگانیسم ها پیشنهاد شده است که سه مکانیسم پذیرفته تر می باشد. ۱: تجمع و انحلال نانوذرات در غشای باکتری باعث تغییر نفوذپذیری آن می شود و متعاقباً آزادسازی لیپوپلی ساکاریدها، پروتئین های غشایی و بیومولکول های داخل سلولی و اتلاف نیروی محرکه پروتون در غشای پلاسمایی. ۲: تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و آسیب به ساختار سلولی. ۳: جذب یون های فلزی مشتق شده از نوکلئو پروتئین ها و به دنبال آن کاهش تولید ATP درون سلولی و اختلال در همانندسازی DNA. در این راستا، روز به روز چندین استراتژی سنتز نانوذرات بهبود یافته در حال توسعه است که شامل فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی است (۵، ۶، ۷، ۸).

بیماری های باکتریایی ماهی یکی از جدی ترین مشکلاتی است که صنعت ماهی با آن مواجه است، زیرا شیوع آنها منجر به خسارات اقتصادی بالایی می شود، بنابراین کنترل آنها از اولویت جهانی برخوردار است. سوء استفاده از آنتی بیوتیک ها در کنترل بیماری های باکتریایی ماهی منجر به ایجاد مقاومت در باکتری ها می شود که در برابر اکثر آنتی بیوتیک های رایج مقاومت می کنند و یک خطر برای سلامت عمومی محسوب می شوند (۱۰). استرپتوکوکوس ها از جمله مهمترین پاتوژن های ماهی محسوب می شوند و در این میان استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*)

مواد و روش ها

سنتر نانوذرات اکسید مس (CuO Nps)

سنتر نانوذرات اکسید مس به روش شیمیایی انجام گردید. مقدار ۶ گرم نیترات مس به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از مخلوط شدن، با استفاده از سدیم هیدروکسید، pH محلول تا مقدار ۹ یا ۱۰ رسانده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه ماکروویو گردید. نمونه مورد نظر سانتریفیوژ شد. محلول رویی را خارج کرده و رسوب حاصل از سانتریفیوژ با استفاده از آب مقطر و الکل ۷۰ درصد شستشو داده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا نانوذرات اکسید مس تشکیل شوند. به منظور ارزیابی نانوذرات اکسید مس تولید شده از طیف سنجی مرئی فرابنفش (UV)، تفرق یا پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپی الکترونی روبشی (FE-SEM)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS یا EDAX) و آنالیز مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) استفاده گردید.

ارزیابی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس

در این مطالعه از سویه‌های استاندارد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیا کلی و قارچ فوزاریوم سلوانی به ترتیب با کد ثبتی، PTCC 1887، IBRC-M 11106 و IBRC-M 30506 تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران، به منظور ارزیابی های ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس استفاده گردید. در ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری و قارچ مورد آزمایش، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند (CFU/ml $10^8 \times 1/5$) تهیه گردید.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوژن های باکتریایی

ابتدا از کشت تازه هر یک از سویه های مورد مطالعه، با استفاده از سواب استریل، بر روی محیط مولر هینتون آگار پاساژ داده شد. سپس با استفاده از پنس استریل، دیسک های آنتی بیوتیک ریفامپین (RA)، پنی سیلین (P)، مروپنم (Men) و تتراسایکلین

(Te) برای گونه گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی و از دیسک های آنتی بیوتیک جنتامایسین (GM)، سیپروفلوکساسین (CP)، آموکسی کلاو (AMO) و پنی سیلین برای گونه گرم منفی اشرشیا کلی با فاصله مناسب از یکدیگر بر روی سطح محیط قرار داده شدند. انکوباسیون ۴۸ ساعته در ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها با خط کش استاندارد (برحسب میلی متر) اندازه گیری گردید.

فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس سنتر شده، بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از سوسپانسیون نیم مک فارلند (CFU/ml $10^8 \times 1/5$) باکتری های پاتوژن مورد آزمون با سواب استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواخت تهیه شد. سپس چاهک هایی به قطر ۸ میلی متر در محیط حفر شد و پس از تهیه غلظت های مختلف نانوذره در غلظت های ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری اشرشیاکلی و غلظت های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره اکسید مس در داخل چاهک ها ریخته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها حساسیت یا مقاومت باکتری های مورد آزمون نسبت به نانوذرات اکسید مس تعیین گردید.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC)

کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذره اکسید مس سنتر شده نیز بر اساس کدورت سنجی و با استفاده از روش میکرودايلوشن در محیط مایع در پلیت های ۹۶ چاهکی انجام شد. برای این منظور رقت های مختلف نمونه های نانوذره (۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲، ۱۰۲۴، ۲۰۴۸ و ۴۰۹۶ میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط کشت مولر هینتون برآث تهیه شده و

آن کلنی مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت باکتری کشی تعیین و گزارش گردید. بررسی اثر ضد قارچی با تعیین قطر هاله بازدارنده به روش چاهک

از سویه قارچی فوزاریوم سولانی تهیه شده، سوسپانسیون میکروبی دارای کدورتی مطابق آنچه که در مراحل قبل گفته شد، تهیه گردید. سپس با استفاده از سواب پنبه ای استریل، کشت قارچی به صورت یکنواخت در محیط سابرو دکستروز آگار انجام گرفت. پس از آن با استفاده از پیپت پاستور شیشه ای استریل، چاهک هایی به قطر ۸ میلی متر در محیط های کشت حفر شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره اکسید مس با غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر به داخل چاهک ها انتقال داده شد. انکوباسیون پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انجام شد و پس از طی این مدت قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری و ثبت گردید.

در مجاورت سوسپانسیون معادل $10^8 \times 1/5$ CFU/ml از هر کدام از باکتری های پاتوژن مورد آزمون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. البته، ابتدا سوسپانسیون باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد تا تراکم 10^1 CFU/ml بدست آید و پس از مخلوط شدن با حلال، غلظت نهایی باکتری 10^0 CFU/ml شد. در این مطالعه کنترل مثبت (حاوی محیط مولر هینتون براث و سوسپانسیون باکتری معادل 10^8 CFU/ml) و کنترل منفی (حاوی محیط مولر هینتون براث و نانوذره) بود. پس از این مدت آخرین رقتی که در آن کدورت میکروبی مشاهده نشد به عنوان MIC تعیین شد. تست های حداقل غلظت مهاری برای هر باکتری با سه مرتبه تکرار انجام پذیرفت و میانگین نتایج برای آنها در این ارزیابی به ثبت رسید.

به منظور تعیین MBC، از چاهک ثبت شده به عنوان MIC و همینطور غلظت های بالاتر آن در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و آخرین رقتی که در

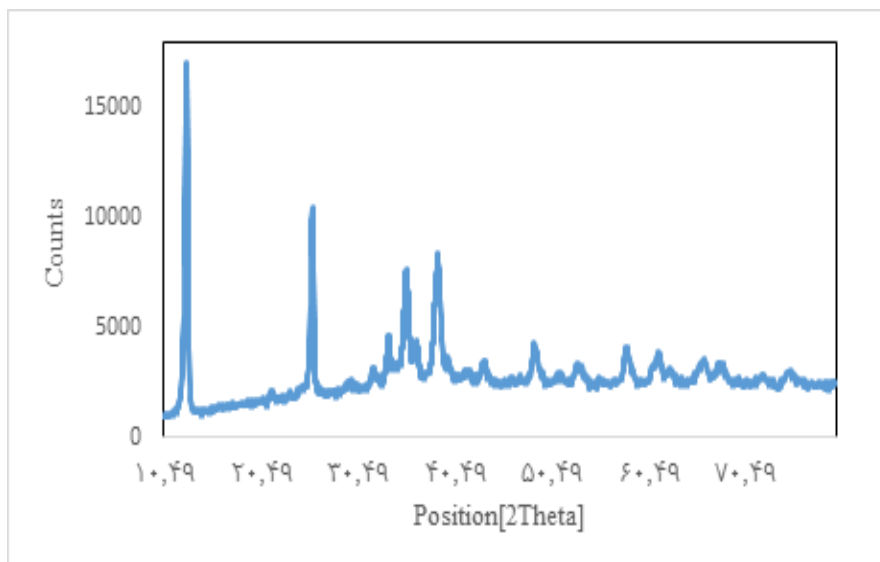
نتایج

تهیه نانوذرات اکسید مس به روش میکروویو

در طی سنتز نانوذرات اکسید مس به روش شیمیایی، نانوذرات دچار تغییر رنگ از آبی شفاف به کدر و سپس سیاه به دلیل احیاء یون های مس و تجمع آنها به صورت نانوذره در محلول شدند (شکل ۱).



شکل ۱: تغییر رنگ نانوذرات اکسید مس در طی فرایند تولید از آبی شفاف به کدر و سپس سیاه



نمودار ۱: طیف XRD نانوذرات اکسید مس سنتز شده

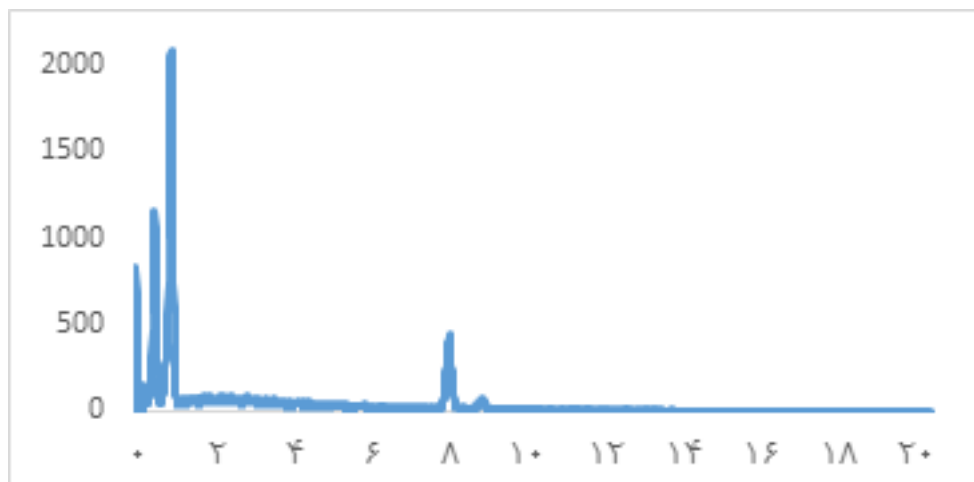
ورودی پایین تر، جذب الکترون بالاتری را از خودش نشان می دهد. البته علت این امر را می توان ناشی از ویژگی های سطحی مس بیان نمود. با توجه نمودار ۲، مشخص شد که ۶۴/۴۴ درصد مس و ۳۵/۵۶ درصد اکسیژن در نمونه وجود دارد.

همانطور که در آنالیز MAP امکان ارائه توزیع فراوانی عناصر موجود در یک تصویر امکان پذیر خواهد بود برای ذرات اکسیژن و مس به صورت مجزا و در ترکیب باهم (اکسید مس) در شکل ۲ قابل رصد و ارزیابی بود.

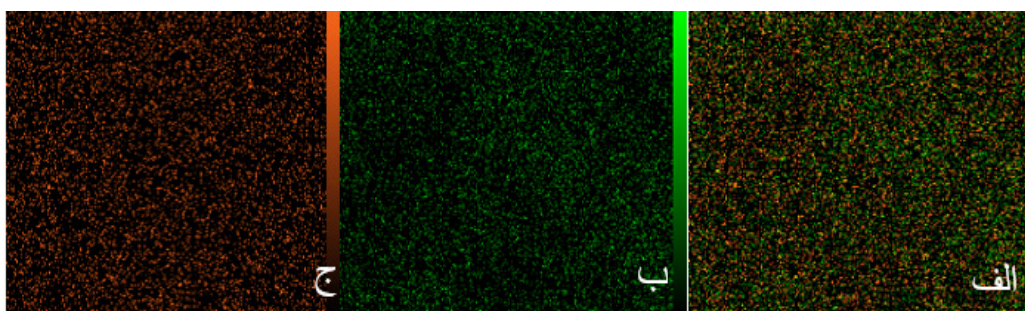
ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز FT-IR در ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز FT-IR نتایج بدست آمده از آنالیز در طول موج های بین $4003/15 \text{ cm}^{-1}$ - 397 صورت پذیرفت. در طیف FT-IR مربوط به نانوذرات مس اکسید شده، پیک O-H از cm^{-1} $3467/38$ و به خاطر اتصال گروه های عاملی مذکور به نانوذرات اکسید مس است. پیک های دیگر در cm^{-1} $1076/08$ و $1403/92$ مربوط به یون نیترات حاصل از ترکیب مس نیترات احیا شده است. جذب cm^{-1} $1639/20$ مربوط به ارتعاش کششی گروه C=C حلقه های فنولی می باشد. با توجه به گروه های عاملی حاصل از نتایج FT-IR، این آنالیزها تایید کننده نتایج حاصل از EDS می باشد (نمودار ۳).

ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز XRD در بررسی و ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز XRD مشخص گردید طبق استاندارد JCPDS به شماره ۳۶-۱۴۵۱ نتایج این آزمون از زاویه حدود ۱۰ درجه آغاز و تا زاویه حدود ۸۰ درجه به عنوان نقطه پایان ادامه داشته است که از دلایل تایید و صحت سنتز موفق این نانو ذرات می باشد. بر اساس نمودار ۱ الگوی پیک های XRD، مربوط اندیس های میلر در سطوح مختلفی بوده که مربوط به زوایای ۲ تا بوده و نشان دهنده ساختار مکعبی مراکز سطحی (Face-centered cubic) fcc در طیف نمونه نانوذرات اکسید مس می باشد. بر اساس فرمول ذکر شده میانگین نانوذرات در نتایج حاصل از XRD به طور متوسط ۶۸ نانومتر محاسبه گردید.

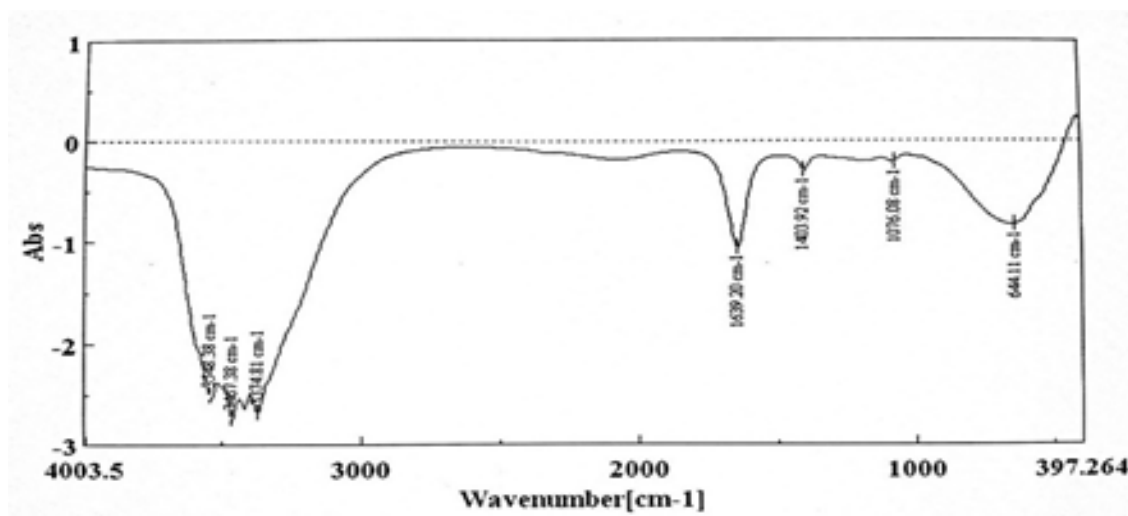
ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز EDS ارزیابی های ساختاری نانوذره سنتز شده، ترکیب عنصری آن نیز به کمک طیف سنجی پراش اشعه ایکس مورد ارزیابی قرار گرفت. در نمودار ۲ همانطور که مشخص است مس در پتانسیل ورودی ۱ keV حضوری تقریباً کامل و در ولتاژ ۸ keV نیز حضور نسبی از خود نشان داده است که با نتایج پژوهش های پیشین مطابقت خوبی دارد (۱۲). لازم بذکر است که معمولاً مس در ولتاژ های



نمودار ۲: گراف مربوط به آنالیز نانوذره اکسید مس طی آنالیز EDS



شکل ۲: تصاویر Mapping ذرات مس و اکسیژن به صورت مجزا و در ترکیب باهم طی آنالیز EDS. الف: مس، ب: اکسیژن و ج: ترکیبی از مس و اکسیژن (اکسید مس) می باشد.



نمودار ۳: نمودار مربوط به طیف FT-IR نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده

را از رشد در ناحیه حضور اکسید مس باز داشتند. این در حالی بود که در غلظت های کمتر از ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر، بر روی این باکتری و طی این روش، اثر بازدارندگی مشاهده نشد. در این ارزیابی گونه گرم منفی اشرشیا کلی حساس تر بود و در غلظت های پایین تر نانوذره، قطر هاله بازدارنده داشت. این اندازه گیری در غلظت های ۱۰، ۸، ۶ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر اکسید مس به ترتیب معادل ۱۵، ۱۱، ۹ و ۷ میلی متر بود (جدول ۲).

نتایج تعیین MIC و MBC نانوذرات اکسید مس علیه گونه های باکتری

در بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری، کمترین غلظت نانوذره اکسید مس که در حضور آن کدورت قابل جذبی در دستگاه الیزا ثبت نگردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد. همانطور که مشخص است برای باکتری استرپتوکوکوس اینیایی این مقدار ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است. همینطور برای باکتری اشرشیا کلی نیز حداقل غلظت مهارتی همین مقدار (۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. پس از تعیین میزان MIC از چاهک های فاقد کدورت بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و نتایج پس از گذشت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظتی که باعث مرگ باکتری های تلقیح شده گردد، به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) در نظر گرفته می گردد. نتایج حاکی از آن بود که برای استرپتوکوکوس اینیایی مقدار MBC نانوذرات اکسید مس با MIC آن برابر و به میزان ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است، در حالی بود که برای اشرشیا کلی مقدار MBC بیشتر و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد.

نتایج تعیین قطر هاله بازدارنده رشد قارچ فوزاریوم در روش چاهک

همچنین برای قارچ فوزاریوم سولانی مشخص گردید در غلظت های بالاتر از ۵۰ میلی گرم نانوذره، حساسیت به نسبت بیشتری در مقایسه با غلظت های کمتر از این مقدار دارد به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با قطر هاله ۱۸ میلی متری از رشد بازداشته می شود (جدول ۳).

ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز میکروسکوپی FESEM

در این پژوهش، تعیین اندازه و شکل نانوذرات اکسید مس سنتز شده از طریق میکروسکوپ الکترونی FESEM مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر به دست آمده از آنالیز FESEM نشان می دهد که شکل نانوذرات سنتز شده کروی می باشد و در برخی نقاط تجمع ذرات و آگلومریزه شدن نانو ذرات مشاهده می شود. همچنین ابعاد نانوذره سنتز شده در بازه ۵۱/۵۳۵ تا ۱۴۳/۸۷۵ نانومتر می باشند. نتایج حاصل FESEM تایید کننده نتایج بدست آمده از XRD می باشد تصاویر قابل مشاهده در شکل ۳ با بزرگنمایی های متفاوت تهیه و ثبت شده اند (شکل ۳).

ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آزمون UV-Vis

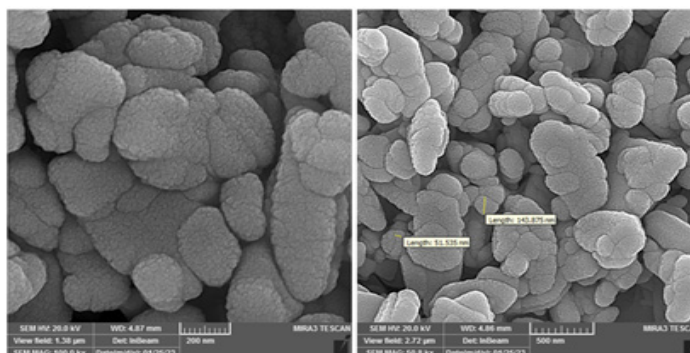
نتایج بدست آمده از آزمون UV-Vis نشان داد، در بازه طول موج ۹۰۰ - ۱۹۰ جذب انرژی صورت گرفته که نانو ذرات اکسید مس بیشترین جذب را در طول موج ۲۰۵ نانومتر نشان دادند و این نشان دهنده وجود نانوذرات سنتز شده درون محلول می باشد (همودار۴).

نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها

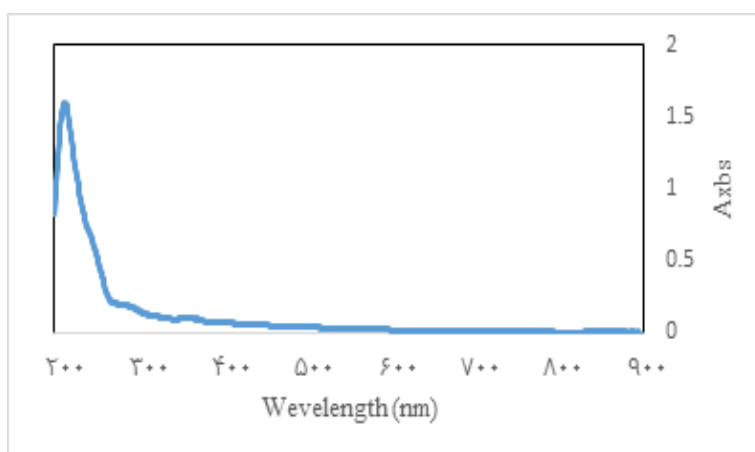
در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها مشخص گردید که استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به آنتی بیوتیک های ریفامپین و مروپنم حساس و در برابر آنتی بیوتیک های پنی سیلین و تتراسایکلین مقاوم می باشد. همچنین باکتری اشرشیا کلی نیز در حضور آنتی بیوتیک های جنتامایسین و سیپروفلوکساسین حساسیت نشان داد در حالی که در برابر دو داروی دیگر یعنی آموکسی کلاو و پنی سیلین مقاوم بود (جدول ۱).

نتایج تعیین قطر هاله بازدارنده از رشد باکتری ها در روش چاهک

در بررسی نتایج مربوط به تعیین قطر هاله بازدارنده از رشد باکتری ها در روش چاهک بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت های بالای نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مشاهده گردید که این میزان ۱۵ میلی متر ارزیابی و ثبت شد. پس از آن نیز غلظت های ۸۰، ۶۰، ۴۰ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذره با ظهور قطر های بازدارنده ای به ترتیب به میزان ۱۳، ۱۲، ۱۱ و ۱۰ میلی متر، این گونه باکتریایی



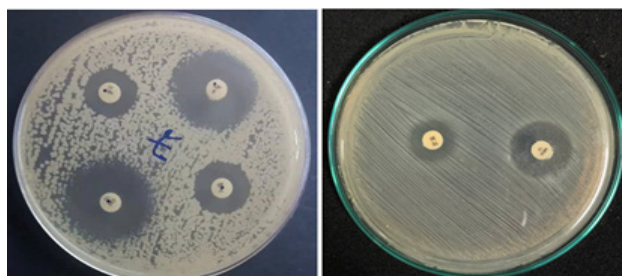
شکل ۳: مورفولوژی و اندازه نانوذرات اکسید مس در تصاویر FESEM



نمودار ۴: نمودار جذب نور مرئی - فرابنفش نانوذرات اکسید مس

جدول ۱: نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های باکتریایی به روش دیسک دیفیوژن (اعداد بر حسب میلی متر)

	ریفامپین	پنی سیلین	مروپنم	تتراسایکلین
<i>Streptococcus iniae</i>	۲۵	۰	۲۲	۱۶
	جنتامایسین	سیپروفلوکساسین	آموکسی کلاو	پنی سیلین
<i>Escherichia coli</i>	۲۸	۲۷	۱۷	۱۷



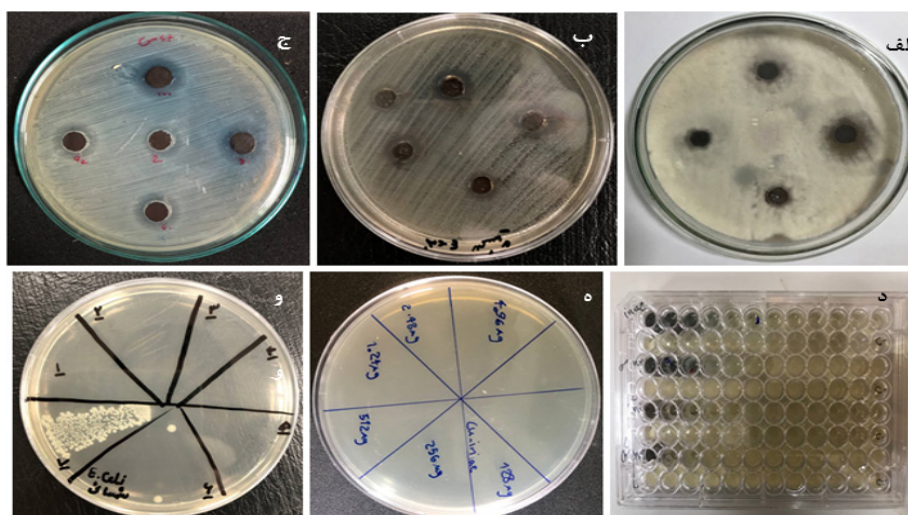
شکل ۴: هاله ممانعت از رشد در بررسی مقاومت آنٹی بیوتیکی باکتری ها در روش دیسک
الف: پلیت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی
ب: پلیت باکتری اشرشیا کلی

جدول ۲: اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در روش چاهک

	۴ mg/ml	۶	۸	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
<i>Streptococcus iniae</i>	۰	۰	۰	۰	۱۰ mm	۱۱ mm	۱۲ mm	۱۳ mm	۱۵ mm
<i>Escherichia coli</i>	۷ mm	۹ mm	۱۱ mm	۱۵ mm	—	—	—	—	—

جدول ۳: اندازه قطر هاله عدم رشد در بررسی اثر ضد قارچی نانوذرات اکسید مس علیه فوزاریوم سولانی در روش چاهک

	۱۰۰ mg/ml	۵۰ mg/ml	۲۵ mg/ml	۱۲/۵ mg/ml
<i>solani Fuzarium</i>	۱۸ mm	۱۱ mm	۱۰ mm	۱۰ mm



شکل ۵: نتایج مربوط به بررسی تأثیرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس

الف: قطر هاله بازدارنده رشد قارچ فوزاریوم سولانی در روش چاهک. ب: قطر هاله بازدارنده رشد باکتری اشرشیا کلی. ج: قطر هاله بازدارنده رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی. د: حداقل غلظت مهار کننده (MIC) باکتری های استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیا کلی. ه: حداقل غلظت کشنده (MBC) باکتری استرپتوکوکوس اینیایی. و: حداقل غلظت کشنده (MBC) باکتری اشرشیا کلی.

ROS توسط نانوذرات متصل به سلول‌های باکتریایی است که به نوبه خود باعث افزایش استرس اکسیداتیو درون سلولی می‌شود. این پارادایم توسط چندین سنجش مانند پراکسیداسیون لیپیدی و سویه های گزارشگر استرس اکسیداتیو تایید شد. علاوه بر این، میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات کوچک اکسید مس به سلول‌ها نفوذ کرده اند. در مجموع، نتایج گزارش شده در اینجا ممکن است مفاهیم مختلف موجود در گزارشات مربوط به مکانیسم ضد باکتریایی نانوذرات اکسید مس را تطبیق دهد و همچنین پتانسیل توسعه دستگاه‌های مبتنی بر نانوذرات اکسید مس را برای مهار عفونت‌های باکتریایی برجسته کند (۲۲).

در مطالعه ما جهت بررسی مورفولوژی و اندازه نانوذرات اکسید مس سنتز شده توسط فرآیند شیمیایی میکروویو، آنالیز میکروسکوپی FESEM مورد استفاده قرار گرفت. همانطور که از تصاویر FESEM قابل استنتاج است، در طی روش سنتز اکسید مس، مورفولوژی تقریباً هم محور و کروی نانوذرات با اندازه تقریبی بین ۵۲ تا ۱۴۴ نانومتر قابل تشخیص می‌باشد. با این حال، به دلیل فعالیت سطحی بالای ذرات در مقیاس نانو و تشکیل گروه های هیدروکسیل در حین شستشو، غالباً ذرات اکسید مس سنتز شده به هم می‌چسبند و آگلومر تشکیل می‌دهند که در تصاویر ما نیز این چسبندگی نانوذرات دیده شد. نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که سنتز پودر اکسید مس با روش‌های مختلف باعث مورفولوژی متفاوتی می‌شود. با بررسی اثر شکل و مورفولوژی نانو ذرات اکسید مس بر خواص ضد میکروبی، نشان داده شده است که ذرات با مورفولوژی کروی و ابعاد نانومتری به دلیل نسبت سطح به حجم بالا، توانایی بهتری در از بین بردن میکروارگانیسم ها در محیط کشت دارند (۲۳، ۲۴، ۲۵). طیف‌سنجی FTIR نیز در ادامه و برای شناسایی نانوذرات اکسید مس با استفاده از اتصالات موجود برقرار شده بین ذرات، استفاده گردید. طیف FTIR نانوذره اکسید مس نشان می‌دهد که باند جذب وسیع در $3417/381$ cm^{-1} و مربوط به گروه عاملی هیدروکسیل (OH) است. اوج جذب این نمودار نیز در همین محدوده مشاهده گردید. باند IR در حدود $1639/201$ cm^{-1} را می‌توان به خم

درسال های اخیر، بررسی های آزمایشگاهی نشان داده اند که برخی از داروها در فرم نانومتری دارای فعالیت ضد باکتریایی مؤثرتری هستند (۱۳، ۱۴). یون و همکاران اثرات ضد باکتریایی نانوذرات مس و نقره را برای اثرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس گزارش کردند، که نانو ذرات مس فعالیت ضد باکتریایی بیشتری در مقایسه با نانو ذرات نقره از خود نشان دادند (۱۵). بطور کلی اطلاعات اندکی در مورد فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید مس در دسترس است. اما در اکثر مطالعات بر روی نانو ضد میکروب های مبتنی بر فلز، اثربخشی بیولوژیکی این ماده به طور قابل توجهی بالاتر یا طولانی تر از زیست فعالی خود فلز بوده است. این عملکرد به چندین جنبه از جمله خواص وابسته به اندازه نانو فلز، نسبت سطح به حجم بالای ذرات بسیار ریز و در نهایت ویژگی‌های غیر متعارف مربوط به وجود سطح مرتبط گزارش شده است (۱۶، ۱۷). نانوذره اکسید مس نسبت به نانوذره نقره ارزانتر است و به آسانی با پلیمرها مخلوط می‌گردد و از لحاظ فیزیکی و شیمیایی نسبتاً پایدار است. نانو ذرات به شدت یونی اکسید فلزی نظیر اکسید مس، دارای پتانسیل لازم برای کاربرد به عنوان عوامل ضد میکروبی می‌باشند و می‌توانند با ناحیه سطحی بسیار وسیع و مورفولوژی های کریستالی مختلفی تهیه شوند (۱۸، ۱۹). به نظر می‌رسد که مس و ترکیبات حاوی آن، اثر ضد میکروبی خود را با تولید رادیکال های هیدروکسیل فعال اعمال می‌کنند که می‌تواند باعث آسیب های جبران ناپذیری مانند اکسیداسیون پروتئین ها، برش مولکول های DNA و RNA و آسیب غشایی به دلیل پراکسیداسیون لیپیدی شود (۲۰، ۲۱). هنوز دانش قطعی در مورد تعامل نانوذرات اکسید مس با میکروارگانیسم ها و نفوذ احتمالی نانوذرات به سلولهای میکروبی وجود ندارد اما گزارشات دیگری نیز در خصوص مکانیسم اثرات ضد میکروبی این ترکیبات به چشم می‌خورد. به عنوان مثال Applerot و همکارانش با هدف روشن کردن فعالیت ضد باکتریایی اکسید مس وابسته به اندازه (از مقیاس کوچک تا مقیاس نانو) آزمایشاتی انجام دادند. در پژوهش آنها نیز مشخص گردید که فعالیت ضد باکتریایی قوی نانوذرات اکسید مس به دلیل تولید

باکتریایی وسیعی از خود نشان دادند. در مطالعه Swain و همکاران قطر اکسید مس سنتز شده ۹۲ نانومتر بود که غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای استافیلوکوک اورئوس، گونه های ویبریو و سودوموناس آئروژینوزا اثر بازدارندگی داشت و از غلظت ۱ تا ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای سویه های باسیلوس سوبتیلیس، گونه های سیتروباکتر، فلاووباکترها و آئروموناس هیدروفیلا اثر بازدارندگی نشان داد (۲۷). در مطالعه ما نانوذرات اکسید مس با قطر بین ۵۲ تا ۱۴۴ نانومتر در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر به بالا برای استپتوکوکوس اینیایی و در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر برای اشرشیا کلی اثر بازدارندگی نشان داد.

در پژوهش ما اثرات ضدقارچی قابل توجهی نیز علیه سویه استاندارد آبی فوزاریوم سولانی مشاهده گردید که در غلظت های بیشتر از ۵۰ میلی گرم نانوذره، میزان این بازدارندگی تشدید می شد. در پژوهش های مشابه، گونه های متعددی از جمله آسپرژیلوس به عنوان یک قارچ فرصت طلب، با نانوذرات حاوی مس در اندازه حدوداً ۲۵ نانومتری به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد محیط آنکوبه شدند. در نتایج به دست آمده، جوانه زنی هاگ یا رشد رشته های رویشی مشخص نگردید اما الکتروفورز DNA ژنومی جدا شده پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات، نشان دهنده تکه تکه شدن ژنوم قارچ و نفوذ نانوذره در دیواره سلولی بوده است (۲۸). همچنین بررسی فعالیت نانوذرات مس علیه گونه کاندیدا آلبیکنس طی مطالعه دیگری حاکی از آن بود که مخمر قرار گرفته در معرض یک سطح مسی، در مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد غیرفعال می گردد. در آن مطالعه، رنگ فلورسنت دی هیدروآتیدیوم، برای شناسایی ROS سیتوپلاسمی در کنار یک رنگ حساس به مس که جذب نانوذره را نشان می داد، جهت نشان دادن اهمیت یون های مس در فعالیت قارچ کشی، استفاده شد. رنگ آمیزی بافت های زنده/مردم مخمری نشان داد که غشاها در مواجهه با سطح مس فوراً آسیب می بینند، که این خود نشان می دهد تعامل فیزیکی نانوذرات Cu با سلول مخمری در مکانیسم مرگ سلولی آن، حیاتی می باشد (۲۹).

آروماتیک گروه آلکن (C=C) اختصاص داد. قله های دیگر قابل مشاهده در نمودار، به ارتعاش تغییر شکل باند گروه های آلکانی، الکل های اولیه و ثانویه و نیز ارتعاش خمشی گروه های آروماتیک مربوط بود.

طی پژوهش ما، اثرات هم افزایی یا پوشش دهی نانوذرات اکسید مس با مواد دیگر انجام نشد اما خواص ضدباکتریایی آن بر علیه دو گونه باکتریایی استپتوکوکوس اینیایی و اشرشیا کلی در مقایسه با آنتی بیوتیک ها و همینطور اثرات ضدقارچی نانوذرات علیه گونه فوزاریوم سولانی، که هر سه ساکن محیط های آبی نیز می باشند، بررسی گردید. نتایج نشان داد که اشرشیا کلی طی سنجش بازدارندگی در روش چاهک در غلظت های پایین تری از رشد بازداشته می شود در حالی که در تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC)، حتی در غلظت بالای نانوذره مس اثر خوبی نسبت به آنتی بیوتیک ها نشان نداد که این رفتار، ناشی از تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتریایی آنها نسبت به استپتوکوکوس اینیایی است. بنابراین، باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به طور کلی مقاومت متفاوتی در برابر نانوذرات اکسید فلزی از خود نشان می دهند.

در مطالعه Slosarczyk و همکاران در سال ۲۰۲۳ از نانوذرات اکسید مس برای توقف رشد باکتری های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (باکتری پسدوموناس آئروژینوزا) استفاده شد. در این مطالعه نشان داده شد که نانوذرات اکسید مس، در تمام غلظت های آزمایش شده، خواص ضد باکتریایی دارند. با این وجود، بهترین خواص مکانیکی، نانوذرات اکسید مس در ۰/۲۵ درصد وزنی به دست آمد (۲۶). در مطالعه Swain و همکاران در سال ۲۰۱۴ که به مطالعه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مبتنی بر فلز در برابر میکروب های مرتبط با بیماری های موجود در آبی پروری پرداختند، نانوذرات فلزی و اکسید فلزی سنتز شده تجاری و آزمایشگاهی مختلف برای فعالیت های ضد میکروبی خود در برابر طیف وسیعی از عوامل باکتریایی و قارچی از جمله سیانوباکتری های خاص آب شیرین غربالگری شدند. در میان نانوذرات مختلف، اکسید مس سنتز شده (CuO)، اکسید روی (ZnO)، فعالیت ضد

فوری برای توسعه جایگزین های جدید در مقابله با میکروارگانیسم های مقاوم به چند دارو و همچنین نقش محافظتی نانوذرات مس و دوره بازیابی مورد نیاز برای ایمن بودن نانوذرات مس برای استفاده به عنوان یک آنتی باکتریال برای هر گونه ماهی در صنعت آبی پروری ضروری خواهد بود.

بطور کلی می توان گفت با وجود پیشرفت عظیم چند دهه اخیر در درک تأثیر مس و نانوذرات حاوی آن بر میکروارگانیسم ها، بسیاری از سؤالات بی پاسخ در مورد اثر ضد میکروبی آنها همچنان باقی مانده است. لذا شناخت کامل این فرآیند و مکانیسم های مرتبط با آن، به ویژه با توجه به استفاده گسترده از مس به عنوان یک عامل ضد میکروبی در کاربردهای مختلف و ضرورت

نتیجه گیری

بیماری زای برجسته مانند استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیا کلی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین نتایج بدست آمده از این مطالعه اثرات قابل توجه ضد قارچی را در تمامی غلظت های به کار رفته از ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی گرم، نشان داد که این بازدارندگی مطلوب می باشد. به طور کلی، این مطالعه ساده، کم هزینه، سازگار با محیط زیست و بهره‌وری بالا از ساخت نانوذرات اکسید مس را ارائه نمود.

نانوذرات اکسید مس سنتز شده در این پژوهش کروی شکل و به اندازه حدوداً ۵۱ تا ۱۴۴ نانومتر بودند که در محدوده مناسبی جهت کاربرد به عنوان داروهای ضد میکروبی و اهداف پزشکی است. نتایج فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس تولید شده در این مطالعه، نشان داد که در صورتی که پروسه بالینی آن تأیید شود قابل رقابت با برخی آنتی بیوتیک های باکتریایی تجاری مثل پنی سیلین، تتراسایکلین و آموکسی کلاو، خواهد بود، که می توانند از نظر دارویی برای مبارزه با باکتری های

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همه کسانی که آنان را در انجام این پروژه همیاری کردند کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که تعارض منافع وجود ندارد.

مصوبات پژوهشی

شناسه اخلاق: IR.IAU.CTB.REC.1401.087

References

1. Anuj SA, Gajera HP, Hirpara DG, Golakiya BA. Interruption in membrane permeability of drug-resistant *Staphylococcus aureus* with cationic particles of nano silver. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;127:208-16.
2. Anuj SA, Gajera HP, Hirpara DG, Golakiya BA. Bactericidal assessment of nano-silver on emerging and re-emerging human pathogens. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019;51:219-25.
doi: 10.1016/j.jtemb.2018.04.028
3. Baptista PV, McCusker MP, Carvalho A, Ferreira DA, Mohan NM, Martins M, Fernandes AR. Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria—“A Battle of the Titans”. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1441.
doi: 10.3389/fmicb.2018.01441
4. Karunakaran C, SakthiRaadha S, Gomathisankar P. Photocatalytic and bactericidal activities of hydrothermally and sonochemically prepared Fe₂O₃-SnO₂ nanoparticles. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 2013;16(3):818-24.
https://doi.org/10.1016/j.mssp.2012.12.030
5. Elemike EE, Onwudiwe DC, Nundkumar N, Singh M. CuO and Au-CuO nanoparticles mediated by *Stigmaphyllon ovatum* leaf extract and their anticancer potential. *Inorganic Chemistry Communications*. 2019;104:93-7.
https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.03.03
6. Saravanakumar K, Sathiyaseelan A, Mariados AV, Xiaowen H, Wang MH. Physical and bioactivities of biopolymeric films incorporated with cellulose, sodium alginate and copper oxide nanoparticles for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;153:207-14.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.250
7. 7- Khoshhal Z, Vaziri A, Rahbarian R. Green production of silver nanoparticles from *Eryngium planum* and its antibacterial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2023; 17(4): 77-92
10.30495/ZISTI.2023.1983554.1158
8. Farazandeh AR, Noorbakhsh F, Honarmand jahromi S. Effect of silver nanoparticles on surface hydrophobicity and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2021;16(1),19-31
9. Dagher S, Haik Y, Ayesh AI, Tit N. Synthesis and optical properties of colloidal CuO nanoparticles. *Journal of Luminescence*. 2014;151:149-54.
https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.02.015
10. Grigore ME, Biscu ER, Holban AM, Gestal MC, Grumezescu AM. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of CuO nanoparticles. *Pharmaceuticals*. 2016;9(4):75.
https://doi.org/10.3390/ph9040075
11. Nations S, Long M, Wages M, Maul JD, Theodorakis CW, Cobb GP. Subchronic and chronic developmental effects of copper oxide (CuO) nanoparticles on *Xenopus laevis*. *Chemosphere*. 2015;135:166-74.
12. Ali Soomro R, Tufail Hussain Sherazi S, Memon N, Raza Shah M, Hussain Kalwar N, Richard Hallam K, Shah A. Synthesis of air stable copper nanoparticles and their use in catalysis. *Advanced Materials Letters*. 2014;5(4):191-8.
13. Qamar H, Rehman S, Chauhan DK, Tiwari AK, Upmanyu V. Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanomaterial derived from *Momordica charantia*. *International journal of nanomedicine*. 2020;2541-53.
14. Talebian S, Shahnavaaz B, Nejabat M, Abolhassani Y, Rassouli FB. Bacterial-mediated synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles with antibacterial, antioxidant, and anticancer potentials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1140010.
15. Atri A, Echabaane M, Bouzidi A, Harabi I, Soucase BM, Chaâbane RB. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Ephedra Alata* plant extract and a study of their antifungal, antibacterial activity and photocatalytic performance under sunlight. *Heliyon*. 2023;9(2), e13484.
https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13484
16. Yoon KY, Byeon JH, Park JH, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 2007;373(2-3):572-5.
doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.11.007.
17. Applerot, G., Lellouche, J., Lipovsky, A., Nitzan, Y., Lubart, R., Gedanken, A. and Banin, E. (2012),

Understanding the Antibacterial Mechanism of CuO Nanoparticles: Revealing the Route of Induced Oxidative Stress. *Small*, 2012;8(21): 3326-3337.

<https://doi.org/10.1002/sml.201200772>

18. Vorobyova V, Vasyliiev G, Uschapovskiy D, Lyudmyla K, Skiba M. Green synthesis, characterization of silver nanoparticles for biomedical application and environmental remediation. *Journal of Microbiological Methods*. 2022;193:106384.

19. Saha T, Mobarak MB, Uddin MN, Quddus MS, Naim MR, Pinky NS. Biogenic synthesis of copper oxide (CuO) NPs exploiting *Averrhoa carambola* leaf extract and its potential antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*. 2023;305:127979.

20. Alavi M, Dehestaniathar S, Mohammadi S, Maleki A, Karimi N. Antibacterial activities of phytofabricated ZnO and CuO NPs by *Mentha pulegium* leaf/flower mixture extract against antibiotic resistant bacteria. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2021;11(3):497.

21. Bandeira M, Giovanela M, Roesch-Ely M, Devine DM, da Silva Crespo J. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2020;15:100223.

<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>

22. Franco D, Calabrese G, Guglielmino SP, Conoci S. Metal-based nanoparticles: Antibacterial mechanisms and biomedical application. *Microorganisms*. 2022;10(9):1778.

23. Applerot G, Lellouche J, Lipovsky A, Nitzan Y, Lubart R, Gedanken A, Banin E. Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress. *Small*. 2012;8(21):3326-37.

24. Zhang Q, Zhang K, Xu D, Yang G, Huang H,

Nie F, Liu C, Yang S. CuO nanostructures: synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications. *Progress in Materials Science*. 2014;60:208-337.

25. Sathiyavimal S, Vasantharaj S, Kaliannan T, Garalleh HA, Garaleh M, Brindhadevi K, Chi NT, Sharma A, Pugazhendhi A. Bio-functionalized copper oxide/chitosan nanocomposite using *Sida cordifolia* and their efficient properties of antibacterial, anticancer activity against on breast and lung cancer cell lines. *Environmental Research*. 2023;218:114986.

26. Hong MZ, Li JM, Chen ZJ, Lin XY, Pan JS, Gong LL. Global burden of major gastrointestinal cancers and its association with socioeconomic, 1990–2019. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:942035.

27. Ślosarczyk A, Klapiszewska I, Parus A, Balicki S, Kornaus K, Gapiński B, Wiczorowski M, Wilk KA, Jesionowski T, Klapiszewski Ł. Antimicrobial action and chemical and physical properties of CuO-doped engineered cementitious composites. *Scientific Reports*. 2023;13(1):10404.

28. Swain P, Nayak SK, Sasmal A, Behera T, Barik SK, Swain SK, Mishra SS, Sen AK, Das JK, Jayasankar P. Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30:2491-502.

29. Goma EZ, Housseiny MM, Omran AA. Fungicidal efficiency of silver and copper nanoparticles produced by *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17397 against four *Aspergillus* Species: A molecular study. *Journal of Cluster Science*. 2019;30:181-96.

30. Quaranta D, Krans T, Espírito Santo C, et al. Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(2):416-426



Investigating the effect of boron levels on the quantitative and qualitative yield of medicinal-oil plant varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.)

Mohammad Reza Zargaran Khouzani^{1*}, Mohammad Hossein Gharineh², Malihe Jahani^{3,4*}, Sedighe Jahani⁴

1. Ph.D. Student of Agrotechnology, Department of Plant Genetics and Production Engineering, Faculty of Agriculture, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Khuzestan, Iran
2. Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Khuzestan, Iran
3. Department of Biology, Shandiz Institute of Higher Education, Mashhad, Iran
4. Ph.D. Graduated, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Place of research: Research Farm, Shahid Bahonar Agricultural School of Shoshtar, Khuzestan, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

received 10.04.2023
revised 11.14.2023
accepted 12.18.2023
online 01.04.2024

KeyWords:

safflower (*Carthamus tinctorius*L.),
boron,
oil yield,
seed yield,

*Corresponding author:

E-mail address

mr.zargarankh@gmail.com
hossain_gharineh@yahoo.com
malihe.jahani2009@gmail.com
sedighe.jahani2010@gmail.com

Introduction: Safflower plant (*Carthamus tinctorius* L.) is a medicinal and industrial plant that has many uses in the field of medicinal uses, and its main use is for the oil seeds of plant.

Aim: With the aim of determining the effect of different levels of boron fertilizer on the yield and quality of safflower varieties, an experiment was conducted during the crop year 2017-2018 in a research farm in Shoushtar city.

Materials and methods: This research was carried out as factorial in the form of randomized complete block design with three replications. The first factor was the safflower variety in three levels (Isfahan, Goldasht, Sofeh) and the second factor was the boron fertilizer content in five levels (zero, two, four, six and eight kilograms per hectare).

Results: The results showed that the variety factor had a significant effect on the leaf area index, the number of pods per square meter, the number of seeds per pod, the weight of 1000 seeds, seed yield, harvest index, oil yield and boron concentration in the whole plant. The amounts of boron fertilizer also showed a significant effect on leaf area index, number of pods per square meter, weight of 1000 seeds, seed yield, harvest index, oil yield and boron concentration in the whole plant. Isfahan variety had the highest seed yield with an average of 1110.4 kg per hectare and the highest oil yield with an average of 267.59 kg per hectare. Also, among the levels of boron fertilizer, the level of four kilograms of boron per hectare had the highest seed yield and oil yield, respectively, with averages of 1148.67 and 280.73 kg per hectare. Grain yield increased with boron application, and levels of two, four and six kilograms did not have a significant difference with each other. But the higher consumption of this element up to the level of eight kilograms per hectare caused a decrease in grain yield.

Conclusion: The use of micronutrient element boron increased the yield of safflower seeds and oil by increasing the yield components, especially the number of seeds per square meter and thousand seed weight. The significant effect of application of boron element on the quantitative and qualitative characteristics of safflower shows that in order to reduce the environmental effects caused by excessive use of chemical fertilizers, the use of micronutrient elements as an efficient management solution in the production of crops is suitable.

Cite this article: Zargaran Khouzani MR*, Gharineh MH, Jahani M*, Jahani S. Investigating the effect of boron levels on the quantitative and qualitative yield of medicinal-oil plant varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3): 43-57

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



بررسی تاثیر سطوح بور بر عملکرد کمی و کیفی وارپته های گیاه دارویی- روغنی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

محمد رضا زرگران خوزانی^{۱*}، محمد حسین قرینه^۲، ملیحه جهانی^{۳*}، صدیقه جهانی^۴

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، ایران

۲. دانشیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران

۳. گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی شانددیز، مشهد، ایران

۴. دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: مزرعه پژوهشی، هنرستان کشاورزی شهید باهنر شوشتر، خوزستان، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۰۷/۱۲

بازنگری ۱۴۰۲/۰۸/۲۳

پذیرش ۱۴۰۲/۰۹/۲۷

نمایه ۱۴۰۲/۱۰/۱۴

کلمات کلیدی

گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

بور

عملکرد روغن

عملکرد دانه

شاخص سطح برگ

* نویسنده مسؤل

mr.zargarankh@gmail.com

hossain_gharineh@yahoo.com

malihe.jahani2009@gmail.com

sedighe.jahani2010@gmail.com

مقدمه: گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L) گیاهی دارویی و صنعتی می باشد که در زمینه مصارف دارویی کاربردهای زیادی دارد و عمده استفاده آن به جهت دانه های روغنی گیاه است.

هدف: با هدف تعیین اثر سطوح مختلف کود بور بر عملکرد و کیفیت وارپته های گلرنگ، آزمایشی طی سال زراعی ۱۳۹۷-۹۸ در مزرعه پژوهشی در شهر شوشتر انجام شد.

مواد و روش ها: این تحقیق بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. عامل اول وارپته گلرنگ در سه سطح (اصفهان، گلدشت و صفه) و عامل دوم مقادیر کود بور در پنج سطح (صفر، دو، چهار، شش و هشت کیلوگرم در هکتار) بود.

نتایج: عامل وارپته بر شاخص سطح برگ، تعداد طبق در متر مربع، تعداد دانه در طبق، وزن هزار دانه، عملکرد دانه، شاخص برداشت، عملکرد روغن و غلظت بور در کل بوته تاثیر معنی داری را نشان داد. مقادیر کود بور نیز تاثیر معنی داری را بر شاخص سطح برگ، تعداد طبق در متر مربع، وزن هزار دانه، عملکرد دانه، شاخص برداشت، عملکرد و غلظت بور در کل بوته نشان دادند. وارپته اصفهان با میانگین ۱۱۱۰/۴ کیلوگرم در هکتار بیشترین عملکرد دانه و میانگین ۲۶۷/۵۹ کیلوگرم در هکتار بیشترین عملکرد روغن را داشت. همچنین از بین سطوح کود بور، سطح چهار کیلوگرم بور در هکتار بیشترین عملکرد دانه روغن و عملکرد روغن را به ترتیب با میانگین های ۱۱۴۸/۶۷ و ۲۸۰/۷۳ کیلوگرم در هکتار به خود اختصاص داد. عملکرد دانه با مصرف بور افزایش یافت که سطوح دو، چهار و شش کیلوگرم اختلاف معنی داری از این نظر با همدیگر نداشتند. اما مصرف بیشتر این عنصر تا سطح هشت کیلوگرم در هکتار سبب کاهش عملکرد دانه گردید.

نتیجه گیری: کاربرد عنصر ریزمغذی بور از طریق افزایش اجزای عملکرد به ویژه تعداد طبق در مترمربع و وزن هزار دانه سبب افزایش عملکرد دانه و روغن گلرنگ گردید. تاثیر معنی دار کاربرد عنصر بور بر ویژگی های کمی و کیفی گلرنگ نشان می دهد به منظور کاهش اثرات زیست محیطی ناشی از مصرف بی رویه کودهای شیمیایی، کاربرد عناصر ریزمغذی بعنوان یک راهکار مدیریتی کارآمد در تولید محصولات زراعی مناسب باشد.

شبهه آدرس دهی این مقاله: زرگران خوزانی م.ر.، قرینه م.ح.، جهانی م.، جهانی ص. بررسی تاثیر سطوح بور بر عملکرد کمی و کیفی وارپته های گیاه دارویی- روغنی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲؛ ۱۸(۳): ۴۳-۵۷

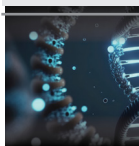
ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا **شاپا چاپی:** ۱۷۳۵-۴۲۲۶ **شاپا الکترونیکی:** ۲۷۱۷-۴۵۹۸ **نویسندگان:** © حق مؤلف

مقدمه:

افزایش ۳۶ تا ۴۳ درصد عملکرد نسبت به شاهد شد (۲۴). Moradi-Telavat و همکاران (۲۵) گزارش کردند که کاربرد ۱۰ کیلوگرم بور در هکتار، باعث افزایش عملکرد کلزا شد که بیشترین افزایش مربوط به افزایش تعداد دانه در خورجین بود. نتایج حاصل از تحقیقات Galavi و Kamaraki (۲۶) نشان داد که محلول پاشی بور باعث افزایش معنی دار عملکرد دانه، تعداد دانه در بوته و وزن هزار دانه گلرنگ نسبت به شاهد شده است. همچنین کاربرد عنصر بور عملکرد دانه آفتابگردان را به مقدار زیادی افزایش داد (۲۷). Castro و Brighenti (۲۸) در آزمایش خود نشان داد که مصرف بور موجب افزایش عملکرد دانه و درصد روغن شد. Safari و همکاران (۲۹) گزارش کردند که کاربرد بور در زراعت گلرنگ باعث افزایش معنی دار عملکرد دانه شده است. نتایج تحقیقات نشان داده است که محلول پاشی بور در زمان رشد و نمو فعال گیاه در خاک هایی که کمبود این عنصر وجود داشت سبب افزایش عملکرد دانه گردید (۳۰). نتایج تحقیقی نشان داده که مصرف بور در آفتابگردان باعث افزایش معنی دار قطر طبق، تعداد دانه در طبق و همچنین وزن هزار دانه نسبت به شاهد گردیده است (۳۱). Pazoki و همکاران (۳۲) در مطالعات خود روی کلزا گزارش کردند که مصرف بور باعث افزایش تعداد خورجین در بوته، تعداد دانه در خورجین، وزن هزار دانه و عملکرد دانه شده است. نتایج تحقیقی نشان داده که مصرف بور قبل از گلدهی از طریق تاثیر مثبت بر تمامی اجزای عملکرد باعث افزایش عملکرد می گردد (۳۲-۳۳). Alihosinpour و همکاران (۳۳) در تحقیقات خود روی گیاه سویا گزارش کردند محلول پاشی عنصر بور باعث افزایش معنی دار عملکرد و اجزای عملکرد سویا شده است. نتایج تحقیقات نشان داده است که کاربرد بور در زراعت گلرنگ باعث افزایش معنی دار درصد روغن دانه نسبت به شاهد گردیده است (۲۶). Nasef و همکاران (۳۴) گزارش کردند که کاربرد بور باعث افزایش میزان روغن در بادام زمینی شده است. نتایج تحقیقات نشان داده که کاربرد بور در کلزا باعث افزایش معنی دار عملکرد روغن دانه نسبت به شاهد شده است همچنین محتوای بور در گیاه تحت تاثیر

گلرنگ زراعی (safflower) با نام علمی *Carthamus tinctorius* L یکی از گونه های خانواده *compositae* است (۱-۲). گلرنگ بعنوان یک گیاه دانه روغنی و به منظور استحصال روغن صنعتی، گیاهی و تولید مارگارین از قرن های پیش تاکنون در مناطق مختلف جهان کشت می گردد (۳-۴). دانه گلرنگ دارای ۲۵ تا ۴۵ درصد روغن، ۱۵ تا ۲۵ درصد پروتئین، ۳۶ تا ۶۰ درصد پوسته است (۵). گلرنگ بعلت دارا بودن اسید چرب غیر اشباع و ضروری لینولئیک (۷۸ درصد) و نیز کیفیت تغذیه ای بالا در برخی از اوریته ها، بعنوان یک گیاه دانه روغنی دارای اهمیت فراوان می باشد (۶-۹).

بور یکی از عناصر مهم کم مصرف است که وظایف زیادی را در گیاه به عهده دارد از جمله می توان به رویش دانه گرده، رشد لوله گرده، جلوگیری از تخریب بافت ها، متابولیسم اسیدهای نوکلئیک، انتقال قندها، تراوایی غشای سلولی و تنظیم هورمون های گیاهی اشاره کرد (۱۰-۱۲). بور یک شبه فلز است که وجود آن برای رشد و نمو همه گیاهان آوندی ضروری است (۱۳-۱۵). در گیاهان عالی بخش عمده بور به صورت کمپلکس استرهای سیس- بورات در دیواره سلولها وجود دارد (۱۶). بور نه تنها با اجزای دیواره سلول ترکیبات پیچیده محکمی تشکیل می دهد، بلکه همراه با کلسیم به عنوان سیمان بین سلولی عمل می کند (۱۰، ۱۴، ۱۶). بور در توسعه و تقسیم سلولی، متابولیسم نوکلئیک اسیدها، کربوهیدرات، چربی و پروتئین، نفوذپذیری غشای سلول، سازوکار هورمون اکسین و ترکیبات فنلی، انتقال مواد بین سلولها و ترمیم بافت های آوندی نقش مهمی بر عهده دارد (۱۰، ۱۴، ۱۷، ۱۹، ۱۸). بررسی ها نشان داده است که عنصر بور از طریق تاثیر بر مسیر، متابولیسم هورمون اکسین و انتقال قندها (۲۰)، در تنظیم رشد و نمو گیاهان نقش محوری دارد (۲۱). Bailey و Grant (۲۲) بیان نمودند بور یکی از عناصر کم مصرف ضروری برای گیاهان می باشد. همچنین Matthes و همکاران (۲۳) در گزارشی اعلام نمودند اثرات بور به رشد گیاه در مراحل پس از لقاح شامل تقویت جنین زایی، تشکیل بذور و میوه می باشد. در دانه های روغنی نظیر خردل، کاربرد بور سبب



عکس العمل به مصرف بور و بررسی اثر سطوح مختلف بور بر بعضی از ویژگی های کمی و کیفی واریته های مختلف گلرنگ در شوشتر انجام شد.

مصرف بور افزایش معنی داری داشته است (۳۵). Nuttall و همکاران (۳۶) نیز در مطالعات خود افزایش محتوای روغن دانه را با مصرف بور در زراعت کلزا گزارش کردند. این تحقیق با هدف تعیین بهترین واریته گلرنگ از نظر

مواد و روش ها

کولتیواتور دستی مخلوط گردید. کشت بذر بصورت خطی با دست و با تراکم ۳۳ بوته در مترمربع انجام گرفت. آبیاری اول بلافاصله بعد از کشت و عملیات تنک در مرحله چهار تا پنج برگی انجام شد.

برای مبارزه با علف های هرز نیز عملیات وجین دستی در طی کل دوره رویش صورت گرفت. برداشت مزرعه در اواسط خرداد ماه سال ۱۳۹۸ از سطح زمین بوسیله داس و با مساحت یک متر مربع از هر کرت آزمایشی صورت گرفت. برای اندازه گیری تعداد طبق در متر مربع و تعداد دانه در طبق، در مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی بطور تصادفی پنج بوته از خطوط عملکرد جدا و تعداد طبق در پنج بوته شمارش و تبدیل به تعداد طبق در متر مربع شد. همچنین بطور تصادفی تعداد ۱۵ طبق از پنج بوته جدا و تعداد دانه در طبق نیز شمارش شد. وزن هزار دانه نیز پس از بوجاری بذر با استفاده از دستگاه بذر شمار هزار دانه شمارش و وزن آن بدست آمد. برای اندازه گیری عملکرد دانه نیز از هر کرت آزمایشی یک متر مربع بوته ها کف بر شد و عملکرد دانه محاسبه گردید.

برای اندازه گیری روغن دانه از روش Porim (۱۹۹۵) استفاده شد. بذر آسیاب شده به مقدار ۱ گرم توزین، در کاغذ صافی پیچیده شدند و به فالكون های ۵۰ میلی لیتری منتقل، سپس ۶ میلی لیتر پترولیوم اتر به نمونه ها اضافه شد. فالكون ها ۲۴ ساعت بر روی شیکر ۱۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، پترولیوم اتر درون فالكون تخلیه و مجدداً ۶ میلی لیتر به آن ها اضافه شد و دوباره به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفتند. بعد از گذشت مدت ذکر شده، نمونه برای تبخیر پترولیوم اتر درون آن با دمای ۴۰ درجه

این پژوهش در سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷ در مزرعه پژوهشی در شهر شوشتر به اجرا درآمد. از نظر شرایط اقلیمی شوشتر جزء مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می شود. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک تصادفی با دو فاکتور و سه تکرار اجرا شد. عامل اول واریته های مختلف گلرنگ (شهرهای اصفهان، صفا، گلدشت) و عامل دوم سطوح مختلف بور (۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ کیلوگرم در هکتار) بودند. ابعاد هر کرت ۳ × ۳ متر و فواصل بین کرت ها بوسیله مرز جدا شد.

آماده سازی زمین شامل شخم، دیسک و تسطیح در اواخر آذر ماه انجام و کاشت در تاریخ ۱۰ دی ماه ۱۳۹۷ انجام گرفت. قبل از انجام عملیات خاک ورزی، در زمین محل انجام آزمایش عملیات ماخار (آبیاری قبل از کشت) با هدف تحریک جوانه زنی علف های هرز مدفون شده در خاک و سبز شدن به منظور کنترل مطلوب تر آن ها و تامین رطوبت مناسب جهت انجام عملیات شخم صورت گرفت. بعد از آبیاری و رسیدن رطوبت به حد ظرفیت مزرعه (گاورو)، زمین توسط گاواهن برگردان دار شخم و بعد از زدن دو دیسک عمود برهم و خرد شدن کلوخه ها، آماده کرت بندی شد. سپس با استفاده از نهرکن کانال های انتقال آب احداث شد و در انتها کرت بندی زمین و تسطیح کرت ها به صورت دستی توسط بیل صورت پذیرفت. هر کرت آزمایشی دارای ۱۰ خط کشت با فواصل ۳۰ سانتی متر از یکدیگر بود. فاصله بین کرت ها نیم متر و فاصله بین تکرارها دو متر در نظر گرفته شد.

پس از پیاده کردن نقشه طرح، کود بور با منبع بوریک اسید با خلوص ۱۶ درصد بور قبل از کاشت با خاک هر کرت آزمایشی (بسته به تیمار مورد بررسی) توسط

لیتر محلول کورکامین اضافه شد. سپس نمونه ها را در حمام بن ماری با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داد تا نمونه ها به طور کامل تبخیر شدند و بعد از خارج کردن نمونه‌ها از حمام بن ماری، به هر کدام از نمونه‌ها ۲۵ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۵ درصد اضافه و از کاغذ صافی رد شدند. در ادامه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر عدد نشان داده شده ثبت گردید و با منحنی استاندارد مطابقت داده شد و غلظت بور در ماده خشک گیاه براساس میلی‌گرم بور در کیلوگرم ماده خشک محاسبه شد (۳۸).

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین داده ها به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

سانتی‌گراد قرار گرفتند تا کاملاً عمل تبخیر کامل صورت پذیرد. در انتها نمونه‌ها وزن شدند و اختلاف وزن آن‌ها با نمونه مصرفی، درصد روغن را نشان داد. عملکرد روغن از رابطه درصد روغن ضربدر عملکرد دانه محاسبه شد (۳۷).

غلظت بور در کل بوته بر اساس روش آزمونین انجام شد (۳۸). در اواخر مرحله رسیدگی، تعداد ۵ بوته انتخاب شد و پس از خشک شدن در آون به مدت ۴۸ ساعت و دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها آسیاب شد. سپس از نمونه نیم گرم برداشته شد و در کوره به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد خاکسترگیری به عمل آمد. به نمونه‌های خاکسترگیری شده، ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲ درصد نرمال اضافه شد. سپس محلول‌های بدست آمده از صافی گذرانده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. در این مرحله از هر کدام از محلول های نمونه، ۱ میلی‌لیتر برداشته و به آن ۴ میلی

نتایج

تیمارها بر تعداد طبق در متر مربع اختلاف معنی داری را نشان نداد. در بین واریته های مختلف گلرنگ بیشترین تعداد طبق در متر مربع مربوط به واریته اصفهان با میانگین ۱۷۶۶/۶ و کمترین تعداد طبق در متر مربع مربوط به واریته گلدشت با میانگین ۱۴۴۵/۴ بدست آمده است. همچنین بیشترین تعداد طبق در متر مربع مربوط به تیمار چهار کیلوگرم بور در هکتار با میانگین ۱۷۷۸/۳ و کمترین تعداد طبق در متر مربع مربوط به تیمار عدم کاربرد بور (شاهد) با میانگین ۱۳۴۲ طبق بدست آمد

تعداد دانه در طبق

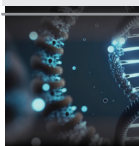
نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که تعداد دانه در طبق فقط تحت تاثیر عامل واریته در سطح احتمال خطای یک درصد معنی دار بود که در بین واریته های مختلف گلرنگ بیشترین تعداد دانه در طبق مربوط به واریته اصفهان با میانگین ۵۲/۸۸ دانه در طبق و کمترین تعداد دانه در طبق مربوط به واریته گلدشت با میانگین

شاخص سطح برگ در ۵۰ درصد گلدهی

نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که شاخص سطح برگ تحت تاثیر عامل واریته و عامل کود بور در سطح احتمال خطای یک درصد معنی دار بود. ولی اثر متقابل واریته و کود بور بر شاخص سطح برگ معنی دار نبود. بیشترین شاخص سطح برگ در بین واریته های مختلف گلرنگ مربوط به واریته اصفهان با میانگین ۵/۲۸ و کمترین شاخص سطح برگ مربوط به واریته صفه با میانگین ۴/۱۷ بدست آمده است. همچنین بیشترین شاخص سطح برگ در تیمار شش کیلوگرم بور در هکتار با میانگین ۶/۰۴ و کمترین شاخص سطح برگ در تیمار عدم کاربرد بور (شاهد) با میانگین ۳/۵۱ بدست آمده است.

تعداد طبق در متر مربع

نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که تعداد طبق در متر مربع تحت تاثیر عامل واریته و کود بور در سطح احتمال خطای پنج درصد معنی دار بود ولی اثر متقابل



بیولوژیکی تحت تاثیر کود بور در سطح احتمال خطای حدود شش درصد اختلاف معنی داری را نشان داد. بیشترین عملکرد بیولوژیکی در تیمار هشت کیلوگرم بور در هکتار با میانگین ۵۷۷۵/۶ کیلوگرم در هکتار و کمترین عملکرد بیولوژیکی در سطح عدم کاربرد بور (شاهد) با میانگین ۴۵۴۶/۷ کیلوگرم در هکتار بدست آمده است.

عملکرد بیولوژیکی

نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که عملکرد بیولوژیکی تحت تاثیر واریته معنی دار نبود ولی عملکرد بیولوژیکی تحت تاثیر کود بور در سطح احتمال خطای حدود شش درصد اختلاف معنی داری را نشان داد. بیشترین عملکرد بیولوژیکی در تیمار هشت کیلوگرم بور در هکتار با میانگین ۵۷۷۵/۶ کیلوگرم در هکتار و کمترین عملکرد بیولوژیکی در سطح عدم کاربرد بور (شاهد) با میانگین ۴۵۴۶/۷ کیلوگرم در هکتار بدست آمده است.

عملکرد روغن

تولید روغن بستگی به درصد روغن و عملکرد دانه دارد. نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که عملکرد روغن تحت تاثیر واریته‌های مختلف و سطوح مختلف کود بور در سطح احتمال خطای یک درصد معنی دار بود (جدول ۳). در بین واریته‌های مختلف بیشترین عملکرد روغن مربوط به واریته اصفهان با میانگین ۲۶۷/۵۹ کیلوگرم در هکتار و کمترین عملکرد روغن مربوط به واریته ۲۲۸/۸۷ کیلوگرم در هکتار در هکتار بدست آمده است (شکل ۳). همچنین بررسی واکنش عملکرد روغن نسبت به مصرف کود بور نشان داد که بیشترین عملکرد روغن در سطح چهار کیلوگرم بور در هکتار با میانگین ۲۸۰/۷۳ کیلوگرم در هکتار و کمترین عملکرد روغن در سطح عدم کاربرد بور (شاهد) با میانگین ۱۷۵/۳۵ کیلوگرم بدست آمده است (شکل ۴).

غلظت بور در کل بوته

نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که غلظت بور در کل بوته تحت تاثیر عامل واریته در سطح احتمال خطای پنج درصد و تحت تاثیر عامل کود بور در سطح احتمال خطای یک درصد معنی دار شد ولی اثر متقابل تاثیر معنی داری روی غلظت بور در گیاه نداشت (جدول ۳). در بین واریته‌های مورد بررسی بیشترین غلظت بور در

۳۳/۸۸ دانه در طبق بدست آمد. همچنین واریته صفا با میانگین ۵۰/۰۸ دانه در طبق اختلاف معنی داری با واریته اصفهان نداشت و از نظر آماری با واریته اصفهان در یک گروه قرار گرفت.

وزن هزار دانه

نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که وزن هزار دانه تحت تاثیر واریته در سطح احتمال خطای یک درصد و تحت تاثیر عامل کود بور در سطح احتمال خطای پنج درصد معنی دار بود ولی اثر متقابل اختلاف معنی داری را بر وزن هزار دانه نشان نداد. در بین واریته‌های مختلف، بیشترین وزن هزار دانه مربوط به واریته گلدشت با میانگین ۴۳/۳۱ گرم و کمترین وزن هزار دانه مربوط به واریته اصفهان با میانگین ۲۶/۲۳ گرم بدست آمده است. همچنین وزن هزار دانه واریته صفا ۲۶/۷۶ گرم بود که با واریته اصفهان از نظر آماری در یک گروه قرار گرفت. همچنین بیشترین وزن هزار دانه در سطح چهار کیلوگرم بور در هکتار با میانگین ۳۳/۳۶ گرم و کمترین وزن هزار دانه در سطح عدم کاربرد بور (شاهد) با میانگین ۳۰/۱ گرم بدست آمده است.

عملکرد دانه

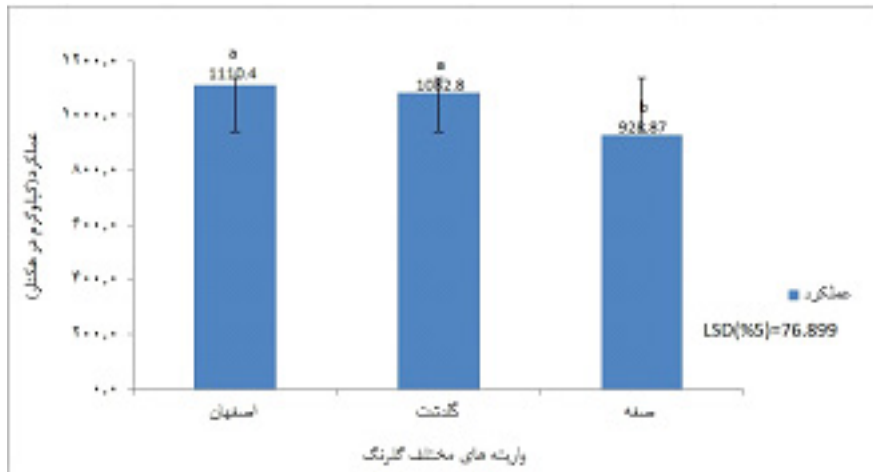
نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که وزن هزار دانه تحت تاثیر واریته در سطح احتمال خطای یک درصد و تحت تاثیر عامل کود بور در سطح احتمال خطای پنج درصد معنی دار بود ولی اثر متقابل اختلاف معنی داری را بر وزن هزار دانه نشان نداد. در بین واریته‌های مختلف، بیشترین وزن هزار دانه مربوط به واریته گلدشت با میانگین ۴۳/۳۱ گرم و کمترین وزن هزار دانه مربوط به واریته اصفهان با میانگین ۲۶/۲۳ گرم بدست آمده است. همچنین وزن هزار دانه واریته صفا ۲۶/۷۶ گرم بود که با واریته اصفهان از نظر آماری در یک گروه قرار گرفت. همچنین بیشترین وزن هزار دانه در سطح چهار کیلوگرم بور در هکتار با میانگین ۳۳/۳۶ گرم و کمترین وزن هزار دانه در سطح عدم کاربرد بور (شاهد) با میانگین ۳۰/۱ گرم بدست آمده است.

عملکرد بیولوژیکی

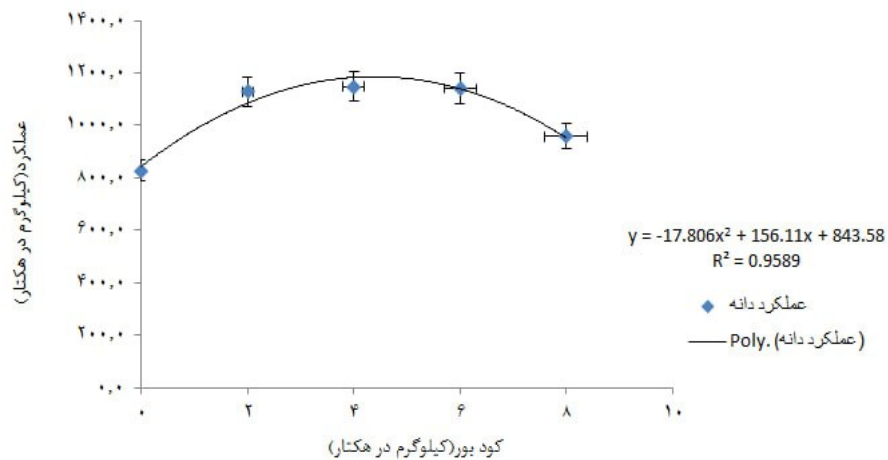
نتایج تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که عملکرد بیولوژیکی تحت تاثیر واریته معنی دار نبود ولی عملکرد

ماده خشک و کمترین غلظت بور در تیمار عدم کاربرد بور (شاهد) با میانگین ۳/۲۱ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک بدست آمده است (جدول ۴).

گیاه مربوط به واریته اصفهان با میانگین ۵/۸۷ میلی-گرم در کیلوگرم ماده خشک و کمترین غلظت بور در گیاه مربوط به واریته گلدشت با میانگین ۵/۰۲ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک بدست آمده است. همچنین واکنش غلظت بور در گیاه نسبت به کاربرد کود بور نشان داد که بیشترین غلظت بور در گیاه در تیمار شش کیلوگرم بور در هکتار با میانگین ۷/۸۷ میلی گرم در کیلوگرم



شکل ۱- اثر واریته های مختلف بر عملکرد دانه گلرنگ



شکل ۲- اثر سطوح مختلف کود بور بر عملکرد دانه گلرنگ



جدول ۱- تجزیه واریانس (مجموع مربعات) عملکرد و اجزای عملکرد

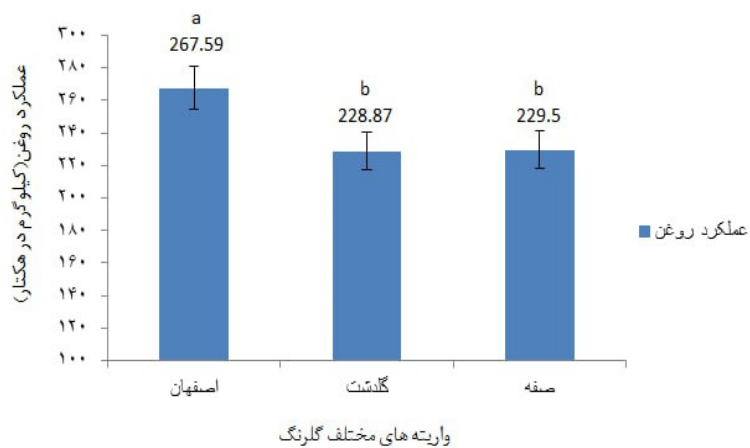
مجموع مربعات						درجه آزادی	منابع تغییر
عملکرد بیولوژیکی	شاخص برداشت	عملکرد دانه	وزن هزار دانه	تعداد دانه در طبق	تعداد طبق در متر مربع		
۷۹۴۳۶۹۳/۳۳ ^{۰۰۱۰۹}	۴۵/۹۷ ^{۰۱۵۶۵}	۵۳۷۱۳/۳۷ ^{۰۰۹۶۸}	۱/۸۶ ^{۰۱۷۸۴۰}	۱۰/۱ ^{۰۱۸۲۷۲}	۲۷۰۸۴۶/۴ ^{۰۱۹۲۸}	۲	تکرار
۸۲۲۷۶۰ ^{۰۱۵۸۱۶}	۸۳/۹۱ ^{۰۰۰۴۰}	۲۸۷۰۵۷/۹۱ ^{۰۰۰۰۱}	۲۸۳۱/۳۵ ^{۰۰۰۰۱}	۳۱۵۷/۸۵ ^{۰۰۰۰۱}	۸۲۳۳۳۲/۴ ^{۰۰۱۱۱}	۲	واریته
۷۶۰۵۳۷۷/۷۸ ^{۰۰۰۰۹}	۲۳۶/۷۳ ^{۰۰۰۳۲}	۷۳۶۶۸۴/۳۱ ^{۰۰۰۰۱}	۵۴/۲۳ ^{۰۰۰۷۹}	۱۶۵/۴۹ ^{۰۰۱۱۲}	۱۱۲۷۸۶۵/۲ ^{۰۰۱۶۵}	۴	کود بور
۱۱۰۶۹۲۶۲/۲۲ ^{۰۰۰۷۷}	۵۳/۲۲ ^{۰۰۷۹۰}	۱۵۷۰۶۰/۷۵ ^{۰۰۰۷۹}	۳۰/۹۶ ^{۰۰۴۴۴۸}	۹۸/۶۳ ^{۰۰۸۶۳}	۵۲۵۸۱۷/۶ ^{۰۰۵۶۹}	۸	واریته*کود بور
۲۰۸۴۶۹۰۶/۶۷	۳۲۴/۵۷	۳۹۵۹۵۹/۲۸	۱۰۶/۳۴	۷۴/۴۵	۲۱۷۰۶۹۱/۶	۲۸	خطای آزمایشی
۱۶/۵۶	۱۶/۷	۹/۸۷	۶۰۷	۱۱/۲۷	۱۷/۰۸		ضریب تغییرات (درصد)

توان در بالا و سمت راست نشان دهنده سطوح احتمال معنی داری است.

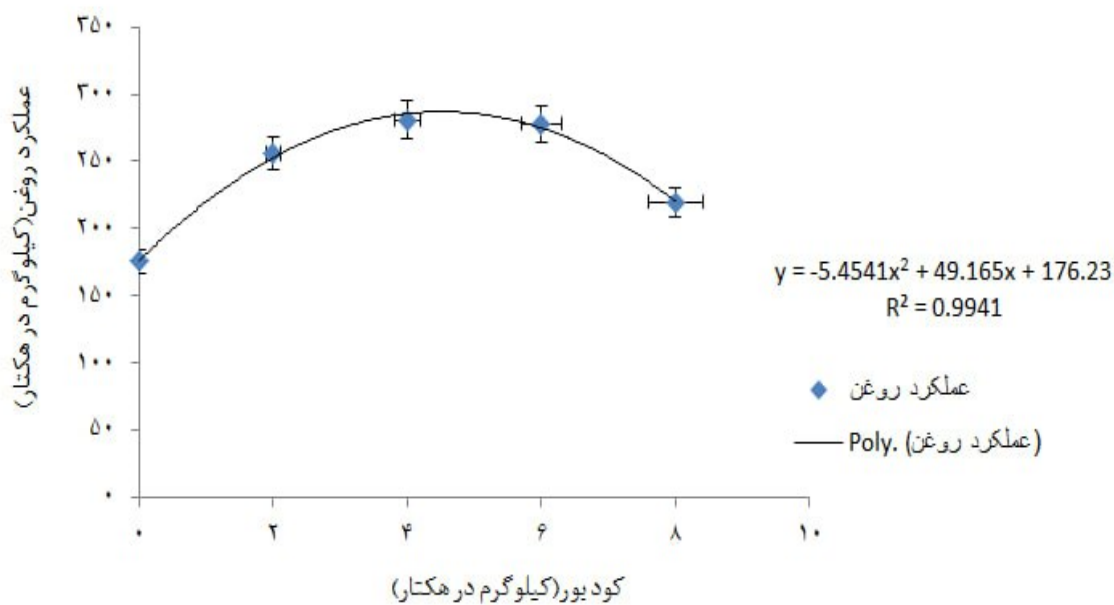
جدول ۲- مقایسه میانگین عملکرد و اجزای عملکرد تحت تاثیر واریته و تیمار کود بور

عملکرد بیولوژیکی (kg/h)	شاخص برداشت %	عملکرد دانه (kg/h)	وزن هزار دانه (gr)	تعداد دانه در طبق	تعداد طبق در متر مربع	تیمار	
۵۲۵۹/۳a	۲۱/۷۹۳a	۱۱۱۰/۴a	۲۶/۲۳b	۵۲/۸۹a	۱۷۶۶/۶a	اصفهان	واریته های مختلف گلرنگ
۵۳۴۵/۳a	۲۰/۸۱۷ab	۱۰۸۲/۸۰a	۴۳/۳۱a	۳۳/۸۸b	۱۴۴۵/۴b	گلدشت	
۵۰۲۵/۳a	۱۸/۵۳۴b	۹۲۸/۸۷b	۲۶/۷۶b	۵۰/۰۸a	۱۶۷۶/۴a	صفه	
۴۵۴۶/۷b	۱۸/۳۶۳bc	۸۲۷/۵۶c	۳۰/۱۰b	۴۲/۵۱b	۱۳۴۲b	۰ (شاهد)	
۵۳۰۷/۸ab	۲۱/۶۴۴ab	۱۱۲۸/۱۱a	۳۳/۵۰a	۴۵/۱۶ab	۱۶۵۷/۳a	۲	سطوح مختلف کود
۵۰۱۵/۶ab	۲۳/۱۳۳a	۱۱۴۸/۶۷a	۳۳/۳۶a	۴۵/۱۳ab	۱۷۷۸/۳a	۴	بور (کیلوگرم در هکتار)
۵۴۰۴/۴a	۲۱/۷۳۷a	۱۱۴۱/۶۷a	۳۲/۶۰a	۴۷/۷۸a	۱۷۶۷/۳a	۶	
۵۷۷۵/۶a	۱۷/۰۳۰c	۹۵۷/۴۴b	۳۱/۹۵ab	۴۷/۵۱a	۱۶۰۲/۳ab	۸	

در هر ستون میانگین های دارای حروف مشترک اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد، با هم ندارند.



شکل ۳- اثر واریته های مختلف بر عملکرد روغن گلرنگ



شکل ۴- اثر سطوح مختلف کود بذر بر عملکرد روغن گلرنگ



جدول ۳- تجزیه واریانس (مجموع مربعات) صفات کیفی

مجموع مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
درصد بور در کل بوته	عملکرد روغن	شاخص سطح برگ		
۸/۶۵ ^{۰/۰۱۱۱}	۵۶۱۳/۳۲ ^{۰/۰۲۰}	۰/۱۴ ^{۰/۸۹۲۷}	۲	تکرار
۵/۴۸ ^{۰/۰۴۹۰}	۱۴۷۵۵/۵۱ ^{۰/۰۰۴۸}	۹/۷۶ ^{۰/۰۰۲۶}	۲	رقم
۱۴۳/۳۳ ^{۰/۰۰۰۱}	۷۱۴۰۸/۲۶ ^{۰/۰۰۰۱}	۳۶/۶۴ ^{۰/۰۰۰۱}	۴	کود بور
۵/۲۲ ^{۰/۰۶۰۷۴}	۱۹۵۵۴/۹۸ ^{۰/۰۶۴۲}	۲/۹۹ ^{۰/۷۹۲۲}	۸	رقم*کود بور
۲۲/۸۳	۳۱۸۴۶/۵۸	۱۸/۴	۲۸	خطای آزمایشی
۱۶/۵۲	۱۳/۹۳	۱۶/۸۸		ضریب تغییرات (درصد)

توان در بالا و سمت راست نشان دهنده سطوح احتمال معنی داری است.

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات کیفی تحت تاثیر رقم و تیمار کود بور

غلظت بور در کل بوته (میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک)	عملکرد روغن (kg/h)	شاخص سطح برگ	تیمار	
۵/۸۷a	۲۶۷/۵۹a	۵/۲۸a	اصفهان	ارقام مختلف گلرنگ
۵/۰۲b	۲۲۸/۸۷b	۴/۹۴a	گلدشت	
۵/۵ab	۲۲۹/۵۰b	۴/۱۷b	صفه	
۳/۲۱c	۱۷۵/۳۵c	۳/۵۱c	۰ (شاهد)	سطوح مختلف کود بور (کیلوگرم در هکتار)
۴/۳۶b	۲۵۶/۱۲a	۴/۵۶b	۲	
۴/۶۳b	۲۸۰/۷۳a	۵/۵۶b	۴	
۷/۸۷a	۲۷۸/۰۱a	۶/۰۴a	۶	
۷/۲۳a	۲۱۹/۷۳b	۴/۳۲b	۸	

میانگین های دارای حروف مشترک اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد، با هم ندارند.

بحث

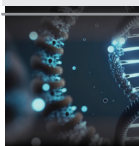
می کنند بیشتر بر تعداد دانه موثرند، در صورتی که اندازه دانه عمدتاً توسط عواملی که بعد از گرده افشانی عمل می کنند و مقدار مواد پرورده موجود که خود تحت تاثیر عناصر غذایی ماکرو و میکرو المنت قرار می گیرند، برای انتقال به مخزن در فاصله لقاح تا رسیدن تعیین می شود. افزایش وزن هزار دانه در تیمار چهار کیلوگرم بور در هکتار ممکن است ناشی از این امر باشد که در حین پر شدن دانه-ها، گیاه تحت اثر رقابت جهت دسترسی به منابع غذایی و کاهش آن قرار نگرفته است. بور از عناصر مهم تشکیل دانه و افزایش وزنی آن به دلیل تاثیر بر فرآیند های زایشی و ماده سازی می باشند (۴۳-۴۲). نتایج مشابهی در تحقیقات Öktem (۴۴)، Halim و همکاران (۴۵)، Safari و همکاران (۲۹) و Khuong و همکاران (۴۶) بدست آمده است.

نتایج نشان داد که عملکرد دانه تحت تاثیر عامل وارپته و کود بور معنی دار بود. ولی اثر متقابل تاثیر معنی داری را روی عملکرد دانه نشان نداد. از نتایج بدست آمده در آزمایش به نظر می رسد که حد مطلوب مصرف بور برای گلرنگ، چهار کیلوگرم در هکتار باشد و در مقادیر بیش از آن باعث کاهش عملکرد و احتمالاً برای گیاه ایجاد مسمومیت نموده است. کمبود بور موجب کاهش و یا توقف نمو، کاهش دانه های گرده و ایجاد خسارت های بافتی در سویا می شود، انتقال مواد قندی موثر در گلدهی نیز کاهش می یابد و همچنین بور با مشارکت در تقسیم سلولی بافت های مریستمی، شرکت در تولید مواد هیدروکربن دار و پروتئین و انتقال آن ها و با تاثیر بر فرآیند های زایشی، باعث افزایش تعداد، وزن دانه و در نهایت عملکرد می شود (۱۷، ۴۰). تاثیر مشابهی در تحقیقات Ahmad و همکاران (۴۷)، Bailey و Grant (۲۲) دیده می شود که نشان می دهد بور تا حد معینی کافی است و بیش از آن باعث مسمومیت گیاهان خواهد شد. میزان مناسب بور (چهار کیلوگرم در هکتار) با توجه به نقش مهم بور بر مراحل رشد زایشی از طریق تعداد گل ها، افزایش بقای گل ها، جوانه زنی و رشد دانه گرده، همچنین افزایش تعداد دانه های پر شده (۲۰) موجب افزایش عملکرد دانه در سطح ۴ کیلوگرم بور در هکتار شده است.

کاربرد بور بعنوان کود برای بهبود عملکرد در گیاهان مختلف گزارش شده است (۲۶، ۲۸، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۶). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که شاخص سطح برگ تحت تاثیر عامل وارپته و عامل کود بور معنی دار بود. ولی اثر متقابل وارپته و کود بور بر شاخص سطح برگ معنی دار نبود. شاخص سطح برگ یک معیار تقریبی از مساحت سطح برگ ها در واحد سطح زمین است. می توان گفت که شاخص سطح برگ از پارامترهای مهم در ارزیابی رشد یک جامعه گیاهی است که اندازه و پویایی آن به عوامل متعدد بستگی دارد. کاربرد مقدار مناسب بور از طریق اثر بر رشد و توسعه سلول ها، تکامل و ترمیم آوند ها و بهبود سیستم انتقال مواد منجر به ایجاد سطح برگ بیشتر در کلزا شده است (۳۹). Day و Aasim (۴۰) در نتایج آزمایش های خود با کاربرد بور سطح برگ بیشتر گیاه در مراحل ابتدایی و انتهای گیاهچه را گزارش نمودند.

نتایج نشان داد که تعداد طبق در متر مربع تحت تاثیر عامل وارپته و کود بور معنی دار بود ولی اثر متقابل تیمارها بر تعداد طبق در متر مربع اختلاف معنی داری را نشان نداد. Galavi و Kamaraki (۲۶) افزایش تعداد طبق بارور را در اثر کاربرد بور در گلرنگ را گزارش کردند که با نتایج بدست آمده در این آزمایش مطابقت دارد. همچنین نتایج نشان داد که تعداد دانه در طبق فقط تحت تاثیر عامل وارپته معنی دار بود.

نتایج نشان داد که وزن هزار دانه تحت تاثیر عامل وارپته و کود بور معنی دار بود ولی اثر متقابل اختلاف معنی داری را بر وزن هزار دانه نشان نداد. عنصر بور ممکن است از طریق مکانیسم هایی به طور مستقیم یا غیرمستقیم روی باروری گل ها تاثیر داشته باشد. به طور کلی بور عنصری است که برای ساخت گلوتامین، نمو گره ها، رشد لوله گرده و بسیاری از فعالیت های حیاتی دیگر گیاه اهمیت دارد. به نظر می رسد با افزایش قدرت تامین مواد فتوسنتزی در طول دوره پرشدن دانه در یک وارپته، افزایش در وزن هزار دانه ایجاد می گردد که در این تحقیق نقش عنصر بور در افزایش وزن هزار دانه به خوبی مشاهده شد. Imam و Niknejad (۴۱) در این راستا اعلام نمودند عواملی که در اوایل فصل عمل



دلیل مسائل فیزیولوژیکی و صدمه به پروتوپلاسم بیان نمودند.

نتایج نشان داد که عملکرد روغن تحت تاثیر وارپته های مختلف و سطوح مختلف کود بور معنی دار بود. تولید روغن بستگی به درصد روغن و عملکرد دانه دارد. نتایج مشابهی در تحقیقات Safdar و همکاران (۴۸)، Dhaliwal و همکاران (۴۹)، Malakouti و Keshavarz (۲۴) و همچنین Movahhedi Dehnavi (۵۰) گزارش شده است. همچنین Nuttall و همکاران (۳۶) در آزمایشی مشابه روی کلزا، افزایش محتوی روغن دانه را با مصرف بور گزارش نمودند که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. علاوه بر این، در پژوهشی دیگر بر روی گیاه کنجد، افزایش میزان روغن دانه با افزایش غلظت تیمار بور گزارش شد (۴۶).

نتایج نشان داد که غلظت بور در کل بوته تحت تاثیر عامل وارپته و تحت تاثیر عامل کود بور معنی دار شد ولی اثر متقابل تاثیر معنی داری روی غلظت بور در گیاه نداشت. در پژوهشی بر روی گیاه کنجد، افزایش میزان بور همسو با افزایش غلظت تیمار بور (کاربرد بصورت اسپری برگ) گزارش شد (Dinh، ۴۶) و همکاران (۵۱) گزارش کردند افزایش مقدار مصرف بور، افزایش جذب بور توسط گیاه را به همراه داشته است. در مطالعه ای دیگر، افزایش محتوای بور در گیاه زیتون (۵۲) و کاهو (۵۳) تحت تیمار بور گزارش شد.

Brighenti و Castro (۲۸) در آزمایش خود نشان داد که مصرف بور موجب افزایش عملکرد دانه شد. ایشان اظهار داشتند که بور از طریق افزایش باروری دانه گرده و در نتیجه افزایش تعداد دانه های پر، موجب افزایش عملکرد دانه شده است.

نتایج نشان داد که عملکرد بیولوژیکی تحت تاثیر وارپته معنی دار نبود ولی عملکرد بیولوژیکی تحت تاثیر کود بور اختلاف معنی داری را نشان داد. Alihosinpour و همکاران (۳۳) گزارش کردند که عملکرد بیولوژیکی سویا در اثر کاربرد بور اختلاف معنی داری را نشان نداد، که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد.

نتایج نشان داد که شاخص برداشت تحت تاثیر عامل وارپته و تحت تاثیر سطوح مختلف کود بور معنی دار بود. ولی اثر متقابل وارپته و کود بور تاثیر معنی داری روی شاخص برداشت نداشت. مصرف چهار کیلوگرم بور در هکتار از طریق افزایش کارایی انتقال مواد فتوسنتزی به اندام های زایشی، موجب افزایش عملکرد اقتصادی گیاه و در نهایت افزایش شاخص برداشت شده است. ولی چنانچه پیش تر نیز ذکر شد مقادیر بیش از آن (به ویژه در هشت کیلوگرم بور در هکتار) بر گیاه اثرات سوء داشته و عملکرد اقتصادی گیاه و نیز شاخص برداشت را کاهش داده است. Malakouti و Keshavarz (۲۴) اثرات مثبت بور را به دلیل افزایش فراهمی مواد حاصل از فتوسنتز و افزایش فعالیت آنزیمی و اثرات منفی آن را به

نتیجه گیری

ناشی از مصرف بی رویه کودهای شیمیایی، کاربرد عناصر ریزمغذی بعنوان یک راهکار مدیریتی کارآمد در تولید محصولات زراعی استفاده کرد.

کاربرد عنصر ریزمغذی بور، از طریق افزایش اجزای عملکرد به ویژه تعداد طبق در متر مربع و وزن هزار دانه سبب افزایش عملکرد دانه و روغن گلرنگ گردید. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که عنصر بور بر ویژگی های کمی و کیفی گیاه گلرنگ اثر معنی داری دارد لذا می توان از آن در کاهش اثرات زیست محیطی

تشکر و قدردانی

از مدیریت هنرستان کشاورزی شهید باهنر شوشتر، جناب آقای مهندس علیرضا رجب زاده برای فراهم کردن شرایط این پژوهش کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تعارض در منافع وجود ندارد.

References

1. Delshad E, Yousefi M, Sasannezhad P, Rakhshandeh H, Ayati Z. Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower): A comprehensive review from traditional medicine to modern medicine. *Electronic Physician* 2018; 10(4): 6672-6681.
<https://doi.org/10.19082/6672>
2. Wu X, Cai X, Ai J, Zhang C, Liu N, Gao W. Extraction, structures, bioactivities and structure-function analysis of the polysaccharides From safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Frontiers in Pharmacology* 2021; 12: 767947.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.767947>
3. Khalid N, Khan RS, Hussain MI, Farooq M, Ahmad A, Ahmed I. A comprehensive characterisation of safflower oil for its potential applications as a bioactive food ingredient - A review. *Trends in Food Science & Technology* 2017; 66: 176-186.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.009>
4. Golkar P. Breeding improvements in safflower (*Carthamus tinctorius* L.): A review. *Australian Journal of Crop Science* 2014; 8(7): 1079-1085.
5. Hussain MI, Lyra DA, Farooq M, Nikoloudakis N, Khalid N. Salt and drought stresses in safflower: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 2016; 36: 4.
<https://doi.org/10.1007/s13593-015-0344-8>
6. Matthaus B, Özcan MM, Al Juhaimi FY. Fatty acid composition and tocopherol profiles of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oils. *Natural Product Research* 2015; 29(2): 193-196.
DOI: 10.1080/14786419.2014.971316.
7. Liu L, Guan LL, Wu W, Wang L. A review of fatty acids and genetic characterization of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oil. *Organic Chemistry: Current Research* 2016; 5(1): 160.
DOI:10.4172/2161-0401.1000160
8. Tunçtürk M, Rezaee Danesh Y, Tunçtürk R, Oral E, Najafi S, Nohutçu L, Jalal A, Eduardo C, Filho MC. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) response to cadmium stress: morpho-physiological traits and mineral concentrations. *Life (Basel)* 2023; 13(1): 135.
<https://doi.org/10.3390/life13010135>
9. Chen Y, Li M, Wen J, Pan X, Deng Z, Chen J, Chen G, Yu L, Tang Y, Li G, Xie X, Peng C. Pharmacological activities of safflower yellow and its clinical applications. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2022; 2022: 2108557.
DOI: 10.1155/2022/2108557
10. Long Y, Peng J. Interaction between boron and other elements in plants. *Genes* 2023; 14(1): 130.
<https://doi.org/10.3390/genes14010130>
11. Abou Seeda M, Hellal F, El Sayed S, Abou El-Nour E. Boron's importance in plant development and growth: A review. *Egyptian Journal of Agronomy* 2017; 39(2): 159-166.
DOI: 10.21608/agro.2017.499.105
12. Lewis DH. Boron: the essential element for vascular plants that never was. *New Phytologist* 2019; 221(4): 1685-1690.
<https://doi.org/10.1111/nph.15519>
13. Landi M, Degl Innocenti E, Pardossi A, Guidi L. Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity: a review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2012; 7: 255-270.
14. Ganjeali A, Saffar Yazdi A, Chenyani M, Lahouti M, Rezaei Z. The effects of boron on improving aluminium tolerance in coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Iranian*



Journal of Plant Biology 2015; 7(23): 63-74.

15. Pereira GL, Siqueira JA, Cardoso FB, Araújo WL. Boron: more than an essential element for land plants? *Frontiers in Plant Science* 2021; 11: 610307.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610307>

16. Ghaffari Nejad SA, Etesami H. The importance of boron in plant nutrition (Chapter 20). 2020; 433-449. In: *Metalloids in Plants: Advances and Future Prospects*.

<https://doi.org/10.1002/9781119487210.ch20>

17. Shireen F, Nawaz MA, Chen C, Zhang Q, Zheng Z, Sohail H, Sun J, Cao H, Huang Y, Bie Z. Boron: functions and approaches to enhance its availability in plants for sustainable agriculture. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(7).

<https://doi.org/10.3390/ijms19071856>

18. Brdar-Jokanović M. Boron toxicity and deficiency in agricultural plants. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(4).

<https://doi.org/10.3390/ijms21041424>

19. Rerkasem B, Jamjod S, Pusadee T. Productivity limiting impacts of boron deficiency, a review. *Plant Soil* 2020; 455: 23-40.

<https://doi.org/10.1007/s11104-020-04676-0>

20. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. 3rd Ed. Academic Press, London, 2011, pp: 135-178.

21. Zand B, Soroosh Zadeh A, Ghanati F, Moradi F. Effect of zinc and auxin foliar application on some anti-oxidant enzymes activity in corn leaf. *Iranian Journal of Plant Biology* 2010; 2(1): 35-48.

22. Grant CA, Bailey LD. Fertility management in canola production. *Canadian Journal of Plant Science* 2013; 73: 651-670.

23. Matthes MS, Robil JM, McSteen P. From element to development: The power of the essential micronutrient boron to shape morphological processes in plants. *Journal of Experimental Botany* 2020; 71(5): 1681-1693.

<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa042>

24. Malakouti MJ, Keshavarz P. The role of boron in optimal plant nutrition (in persian). *Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran*. 2012; 138.

25. Moradi-Telavat MR, Siadat SA, Nadian H, Fathi G. Response of rapeseed growth and yield to different levels of nitrogen and boron in Ahvaz region. *Proceedings of the 10th Soil Science Congress of Iran*. Karaj. 2007.

26. Kamaraki H, Galavi M. Evaluation of foliar Fe, Zn

and B micronutrients application on quantitative and qualitative traits of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Agroecology* 2013; 4(3): 201-206.

DOI: 10.22067/jag.v4i3.15308.

27. Ateegue M, Malewar GU, More SD. Influence of phosphorus and boron on yield and chemical composition of sunflower. *Journal of the Indian Society of Soil Science* 1993; 41: 100-102.

28. Brighenti AM, Castro C. Boron foliar application on sunflower (*Helianthus annuus* L.). *HELIA* 2008; 31(48): 127-136.

DOI: 10.2298/HEL0848127B.

29. Safari M, Madadzade M, Shariatinia F. Investigation of nutritional effects of nitrogen, boron and sulfur on quantitative and qualitative characteristics of safflower grain (*Carthamus tinctorius* L.). *Iranian Journal of Field Crop Science* 2011; 42(1): 133-141.

30. Bowyzys T, Krauz A. Effect of boron fertilizers yield content and uptake of boron by spring oil seed rape variety star. *Rosliny Oleiste* 2000; 21: 813-817.

31. Barmaki Y, Jalili F, Eivazi AR, Rezaei A. Effect of foliar Application of zinc, iron and boron on yield and quality of two cultivars of sunflower oil. *Jouenal of Research in Crop Sciences* 2010; 2(6): 13-26.

<https://sid.ir/paper/168076/en>

32. Pazoki AR, Monem R, Madani H. Effect of boron foliar application levels on yield on yield yield and yield components of winter rapeseed cultivars in Shahr-e-rey region. *Journal of Crop Production Research (Environmental Stresses In Plant Sciences)* 2013; 4(4): 367-378.

33. Alihosinpour F, Rafiee M, Farnya A. Investigation the effect boron failiar application on quality and quantitative characteristics of soybean genotypes. *Crop Physiology Journal* 2011; 3(11): 33-46.

<http://cpj.ahvaz.iau.ir/article-1-104-en.html>

34. Nasef MA, Badran NM, Abd El-Hamide AF. Response of peanut to foliar spray with boron and/or rhizobium inoculation. *Journal of Applied Sciences Research* 2006; 2(12): 1330-1337.

35. Kazemi Z. The effect of late season heat stress caused by late planting dates and boron consumption on the yield and quality of canola. *Ramin University of Agriculture and Natural Resources. Faculty of Agriculture. Master's thesis [in persian]*. 2013.

36. Nuttall WF, Ukrainetz H, Stewart JWB, Spurr DT. The

effect of nitrogen sulphur and boron on yield and quality of rapeseed (*Brassica napus* L. and *B. campestris* L.). Canadian Journal of Soil Science 1987; 67: 545-559.

37. Siew WL, Tang TS, Tan YA. PORIM: Test Methods. Palm Oil Research Institute of Malaysia. Kuala Lumpur, 1997.

38. Harp DL. Modifications to the azomethine-H method for determining boron in water. Anal Chim Acta 1997; 346: 373-379.

39. Tariq M, Mott CJB. The significance of boron in plant nutrition and environment- A review. Journal of Agronomy 2007; 6: 1-10.

40. Day S, Aasim M. Role of boron in growth and development of plant; deficiency and toxicity perspective. In: Aftab T, Hakeem KR. (Eds.) Plant Micronutrients. Springer, Cham. 2020.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-49856-6_19

41. Imam M, Niknejad M. An introduction to the physiology of crop plants. Translation. Shiraz University Publications [in persian]. Third edition. 2011; 594 pp.

42. Fathi Q. Growth and nutrition of agricultural plants (translation). Publications of University Jihad of Mashhad. 2008.

43. Bariya H, Bagtharia S, Patel A. Boron: a promising nutrient for increasing growth and yield of plants. In: Hawkesford M, Kopriva S, De Kok L. (Eds.) Nutrient Use Efficiency in Plants. Plant Ecophysiology, 2014; Vol 10, Springer, Cham.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-10635-9_6

44. Öktem AG. Effects of different boron applications on seed yield and some agronomical characteristics of red lentil. Turkish Journal of Field Crops 2022; 27(1): 112-118.

DOI: 10.17557/tjfc.1106779

45. Halim A, Paul SK, Sarkar MA, Rashid MH, Perveen S, Mia ML, Islam MS, Islam AK. Field assessment of two micronutrients (zinc and boron) on the seed yield and oil content of mustard. Seeds. 2023; 2(1): 127-137.

<https://doi.org/10.3390/seeds2010010>

46. Khuong NQ, Thuc LV, Tran NTB, Huu TN, Sakagami J-I. Foliar application of boron positively affects the growth, yield, and oil content of sesame (*Sesamum indicum* L.). Open Agriculture 2022; 7(1): 30-38.

<https://doi.org/10.1515/opag-2022-0067>

47. Ahmad A, Tahir M, Ullah E, Naeem M, Ayub M, Rehman HU. Effect of silicon and boron foliar application on yield and quality of rice. Pakistan Journal of Life and

-Social Science. 2012; 10(2): 161-165.

48. Safdar ME, Qamar R, Javed A, Nadeem MA, Javeed HM, Farooq S, Glowacka A, Michalek S, Alwahibi MS, Elishikh MS, Ahmed MA. Combined application of boron and zinc improves seed and oil yields and oil quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Agronomy 2023; 13(8): 2020.

<https://doi.org/10.3390/agronomy13082020>

49. Dhaliwal SS, Sharma V, Shukla AK, Verma V, Behera SK, Sandhu PS, Kaur K, Gaber A, Althobaiti YS, Abdelhadi AA, Hossain A. Assessment of agro-economic indicators of *Sesamum indicum* L. as influenced by application of boron at different levels and plant growth stages. Molecules 2021; 26(21): 6699.

<https://doi.org/10.3390/molecules26216699>

50. Movahhedi Dehnavi M. Improvement of yield, oil and protein percentage of sesame (*Sesamum indicum* L.) under drought stress by foliar application of zinc and boron. Journal of Crop Production. 2016; 9(1): 163-180.

DOI: 10.22069/ejcp.2016.2962

51. Dinh AQ, Naeem A, Mühlhling KH. Growth and distribution of boron in oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by boron supply. Plants 2022; 11(20): 2746.

<https://doi.org/10.3390/plants11202746>

52. Rostami H, Tabatabaei SJ, Zare Nahandi F, Rahman Pour Azar M. Effects of different concentrations of boron on concentration and distribution of this element and some other nutrients in hydroponic condition in two olive cultivars. Iranian Journal of Horticultural Science 2014; 45(1): 93-101.

DOI: 10.22059/ijhs.2014.50945

53. Behtash F, Fakhr Ghazi H, Hasanbarani M. Interaction effects of different amounts of zinc (Zn) and boron (B) on growth and antioxidative enzymes activity in lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Paris Island) plant. Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(1): 31-47.

DOI: 10.30495/zisti.2022.1963256.1128



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

h t t p s : / / z i s t i . i a u v a r a m i n . a c . i r



Correlation of Polymorphisms Related to Endometriosis: A Meta-Analysis

Elnaz Zafari¹, Zahra Noormohammadi^{2*}, Ashraf Moieni^{3,4,5}, Morteza Karimipoor⁶

1. Ph.D. student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Full professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Full professor, Department of Endocrinology and Female Infertility, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
4. Full professor, Breast Disease Research Center (BDRC), Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.
5. Full professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Arash Women's Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. Full professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

.Place of Research: Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

Recived 01.29.2024
Revised 03.17.2024
Accepted 05.11.2024
Online 07.06.2024

KeyWords:

Endometriosis
Meta analysis
GREB1
miR148a

*Corresponding author:

E-mail address

elnaz.zafari@gmail.com
marjanm@yahoo.com
ashraf.moieni@gmail.com
mortezakarimi@yahoo.com

Introduction: Endometriosis is a hormone-related gynecological disorder characterized by severe pelvic pain and decreased fertility. However, most of its molecular mechanisms has been remained largely unknown.

Aim: In this study, studies related to loci associated with endometriosis disease and its genetic variation ratio have been investigated.

Materials and Methods: In the present study, a meta-analysis of 11 genome-associated datasets of patient-control pairs was performed.

Results: : The meta-analysis analyses showed that loci including rs11674184 which located proximate to the *GREB1* gene - a regulator of estrogen - and rs12700667 located upstream of miR148a gene, were significantly ($P < 0.05$) associated with the risk of endometriosis

Conclusion: These findings may candidate specific genes which are crucial in estrogen signaling pathways. It may present unique opportunities for more targeted research efforts.

Cite this article: Zafari Z, Noormohammadi Z*, Moieni A, Karimipoor M. Correlation of polymorphisms related to endometriosis: a meta-analysis. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):59-68

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



همبستگی پلی مورفسیم‌های مرتبط به بیماری اندومتريوز: متآنالیز

الناز زعفری^۱، زهرا نورمحمدی^{۲*}، اشرف معینی^{۳،۴،۵}، مرتضی کریمی پور^۶

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم و فناوریهای همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم و فناوریهای همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استاد، گروه غدد درون‌ریز و نازایی زنان، مرکز تحقیقات زیست‌پزشکی تولیدی رویان، پژوهشگاه علوم و فناوری پزشکی کشور، تهران، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های سینه (BDRC)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵. استاد، گروه زنان و زایمان، بیمارستان زنان آرش، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۶. استاد، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشگاه پاستور ایران، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۱/۰۹

بازنگری ۱۴۰۲/۱۲/۱۷

پذیرش ۱۴۰۳/۰۲/۱۶

نهاییه ۱۴۰۳/۰۴/۱۶

مقدمه: اندومتريوز یک اختلال وابسته به هورمون ارثی است که با درد شدید لگن و کاهش باروری همراه است. با این حال، مکانیسم‌های مولکولی آن تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است.

هدف: در این مطالعه به بررسی مطالعاتی در ارتباط با لوکوس‌های همراه با بیماری اندومتريوز و نسبت تنوع ژنتیکی آن پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: تحقیق حاضر یک متآنالیز از ۱۱ مجموعه داده‌های بیمار - کنترل مرتبط با ژنوم است.

نتایج: آنالیزهای متآنالیز نشان داد از میان جایگاه‌های گزارش شده تاکنون rs11674184 واقع در نزدیکی ژن *GREB1* که تنظیم‌کننده استروژن است و همچنین rs12700667 واقع در بالادست ژن *miR148a* به طور معنا داری ($P < 0.05$) با خطر ابتلا اندومتريوز مرتبط بودند.

نتیجه‌گیری: این نتایج ژن‌های خاص با نقش‌های مهم در سیگنال دهی و عملکرد هورمون استروژن را کاندید می‌کند. این نتایج فرصت‌های منحصر به فردی برای تلاش‌های تحقیقاتی هدفمندتر ارائه دهد.

کلمات کلیدی

اندومتريوز

متآنالیز

GREB1

miR148a

* نویسنده مسؤل

elnaz.zafari@gmail.com

marjanm@yahoo.com

ashraf.moieni@gmail.com

mortezakarimi@yahoo.com

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: زعفری الف، نورمحمدی ز*، معینی الف، کریمی پور م. همبستگی پلی مورفسیم‌های مرتبط به بیماری اندومتريوز: متآنالیز. مجله دانش

زیستی ایران. ۱۴۰۲؛ ۱۸ (۳): ۶۸-۵۹

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا | شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ | شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X | نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

$GREB\backslash$ یک ژن تنظیم کننده استروژن بوده که اولین بار در رده سلولی سرطان پستان و تومورها دیده شده است (۱۰). کاهش $GREB\backslash$ رشد ناشی از استروژن را در رده های سلول سرطان پستان MCF-7 مهار می کند (۱۱). گیرنده استروژن ERX از طریق سه عنصر پاسخ به استروژن که در ۲۰ کیلوبایت بالا دست ژن قرار دارند. به $GREB\backslash$ متصل شده و آن را القا می کند (۱۲). به طور کلی رونویسی تنظیم شده با ER بسیار پیچیده است و شامل بیش از ۱۰۰ پروتئین مرتبط با ER می باشد (۱۲). ER به عنوان یک جزء ضروری برای $GREB\backslash$ عمل می کند. در تومورهای پستان ER مثبت، بیان $GREB\backslash$ ارتباط نزدیکی با سطح استروژن در طول چرخه قاعدگی دارد. شواهدی برای رابطه بین $GREB\backslash$ و استروژن به خوبی ثابت شده است. بنابراین بسیار محتمل است که $GREB\backslash$ در یک بیماری وابسته به استروژن مانند اندومتریوز نقش داشته باشد (۱۰).

اکثر SNP های مرتبط با بیماری های پیچیده شناسایی شده توسط GWAS در مناطق غیرکدکننده ژنوم قرار دارند و احتمالاً اثر خود را با تأثیر بر خروجی رونویسی اعمال می کند. (مثل سطح رونویسی و Splicing)

بیان ژن بسیار تحت تاثیر وراثت بوده و بسیاری از SNP ها اثرات عملکردی بر بیان ژن دارند (۱۳). بیان متفاوت $GREB\backslash$ mRNA و پروتئین در اندومتریوز با افزایش بیان در ضایعات اندومتریوز اکتوییک و یوتوییک در مقایسه با اندومتر یوتوییک افراد نرمال گزارش شده است. در نتیجه $GREB\backslash$ یک کاندید قوی برای ژن هدف در این ناحیه است (۱۲).

rs1۲۷۰۰۶۶۷ در جایگاه کروموزوم ۷ در TSEN1۵P۳ و miR۱۴۸a ارتباط خیلی چشمگیری در بروز بیماری اندومتریوز دارد. TSEN1۵P۳ یک ژن کاذب است، ژن های کاذب بخشی از DNA هستند که از نظر ساختاری شبیه یک ژن هستند اما قادر به کدگذاری پروتئینی نیستند. اغلب از ژن های مشتق می شوند که به دلیل جهش های انباشته شده در طول تکامل، توانایی کدگذاری پروتئین خود را از دست داده اند (۱۴).

در این مطالعه، با توجه به اینکه قبلاً از نظر حساسیت ژنتیکی و تظاهرات بیماری در زنان مبتلا به اندومتریوز تفاوت های جمعیتی برای اندومتریوز گزارش شده است، برآنیم به بررسی مطالعاتی در ارتباط با گستره ژنومی که لوکوس های همراه با بیماری اندومتریوز بپردازیم.

اندومتریوز یک بیماری التهابی مزمن، ارثی، وابسته به استروژن و شایع در زنان می باشد که از طریق رشد بافت اندومتر در نقاطی غیر از خود رحم؛ بیشتر در حفره لگن از جمله تخمدان ها، رباط های رحمی ساکران و کیسه داگلاس ایجاد می شود (۲،۱). اندومتریوز تا ۱۰ درصد از زنان در سنین باروری را تحت تأثیر قرار می دهد؛ اما به علت علائم مختلف، تشخیص دیر هنگام و تشخیص اشتباه شیوع واقعی اندومتریوز ناشناخته است (۳،۴). تصور می شود که عوامل متعددی از جمله عوامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد اندومتریوز دخیل هستند؛ اگرچه مبنای ژنومی و مکانیسم اتیوپاتوژنتیک دقیق اندومتریوز هنوز مشخص نیست اما به نظر می رسد که پذیرفته شده ترین نظریه، فرضیه قاعدگی رتروگرد سامپسون باشد که نشان می دهد در طول قاعدگی؛ اندومتر به دلیل اینکه قادر به چسبیدن، زنده ماندن و رشد در مکان های مختلف هستند؛ از طریق لوله های فالوپ مهاجرت کرده و به صفاق می رسند (۵).

ژن های کاندید متعددی در ابتدا در پاتوژن اندومتریوز نقش دارند، از جمله ژن های دخیل در التهاب، تنظیم چرخه سلولی، فاکتورهای رشد، گیرنده های هورمونی و مولکول های چسبندگی (۶) و مکانیسم تنظیم کننده رگ زایی (VEGF) که باعث مجموعه ای از پاسخ ها در سلول های اندوتلیال از جمله تحریک تکثیر و مهاجرت سلول ها و القای بیان ژن های پیش التهابی می شود (۷). با این حال؛ نتایج این مطالعات دارای نتایج متناقض بوده و عدم تکرارپذیری در جمعیت های متفاوت وجود دارد (۸). مطالعات انجمن گسترده ژنوم (GWAS) و متآنالیزها منجر به شناسایی جایگاه های خطر بیماری شده است که خطر ابتلا به این اختلال را در زنان تغییر می دهد و رویکرد جدیدی را در مورد مسیرهای بالقوه که منجر به اندومتریوز می گردند، ارائه می دهد (۸).

در حال حاضر، ۱۹ پلی مورفیسم تک نوکلئیدی مستقل (SNPs) که با اندومتریوز مرتبط هستند شناسایی شده است (۹). شایان ذکر است که تعداد این جایگاه ها در حال افزایش است زیرا نسبت موارد مورد تجزیه و تحلیل محدود به مراحل شدیدتر بیماری (مرحله III/IV اندومتریوز) به جای مرحله II/1 است (۹). بنابراین نشان می دهند که موارد اندومتریوز متوسط تا شدید دارای بار ژنتیکی بیشتری هستند (۹).

rs۱۱۶۷۴۱۸۴ در ناحیه اینترونیک بین اگزون ۷ و اگزون ۸ در تنظیم رشد توسط استروژن در ژن $GREB\backslash$ قرار دارد.

مواد و روش ها

استراتژی جستجو در پایگاه داده

پایگاه اطلاعاتی GWAS برای شناسایی مطالعات پلی-مورفیسیم مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات طبقه-بندی شده در این متاآنالیز شامل مطالعات منتشر شده در سال (۲۰۱۰-۲۰۲۳) است.

استخراج و تجزیه و تحلیل داده‌ها

متغیرهای استخراج شده عبارت از ژن‌ها، پلی مورفیسیم‌ها، Odds Ratio (OR) و Confidence Interval (CI) بودند. تمامی اطلاعات در مجموعه کد یا اعداد در نرم افزار CMA۳ گنجانده شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

تحلیل آماری:

برای اثرات گزارش شده تنها در یک مطالعه، متاآنالیز با استفاده از یک مدل اثرات تصادفی با استفاده از نرم-افزار CMA۳ برای تخمین برآورد نقطه-ای اثربخشی و همچنین فاصله اطمینان (CI) هر مطالعه استفاده شد.

سوگیری انتشار در مطالعات انتخاب شده با ترسیم نمودار انباشت مورد ارزیابی قرار گرفت. کیفیت هر مطالعه با استفاده از دستورالعمل-های CMA۳ که مخصوص ارزیابی کیفیت مطالعات است، ارزیابی و توصیف شد.

نتایج

همراهی پلی مورفیسیم های ژن *miR148a* و *GREB1* با بیماری اندومتزیوز:

در مدل fixed-effect همراهی هر یک از لوکوس‌های خطر زا در ژن *GREB1* و *miR148a* با جایگاه کروموزومی در مطالعات مختلف به ترتیب:

rs11674184: OR((CI))=1.13(1.10-1.15) ; OR((CI))=1.12(1.09-1.15) ; OR((CI))=0.02(0.02-0.03) ; OR((CI))=1.08(1.07-1.1) ; OR((CI))=1.16(1.1-1.22)

rs12700667: OR((CI))=1.2(1.13-1.27) ; OR((CI))=1.18(1.11-1.25) ; OR((CI))=1.09(1.06-1.13) ; OR((CI))=1.1(1.07-1.13) ; OR((CI))=1.17(1.09-1.25) ; OR((CI))=1.32(1.20-1.46)

است. هر یک از مطالعات که نقش پلی مورفیسیم در موقعیت ژن *rs11674184* و *rs12700667* را بررسی کرده و ارتباط آن با بیماری اندومتزیوز را معرفی کرده‌اند، در این نمودار نمایش داده شده‌اند. نسبت احتمال که ارتباط پلی مورفیسیم یک مطالعه با پلی مورفیسیم مطالعه دیگر را نشان می‌دهد، بر روی محور X قرار گرفته است. خط عدم اثر به عنوان یک خط مرجع جهت نمایش ارتباط یا عدم اثر بین متغیرهای مورد بررسی عمل می‌کند. این خط که با مقدار ۱ هم‌ارز است، نشان‌دهنده عدم وجود همراهی در نتایج مطالعات مشخص شده است. مربع‌های نمودار تعداد مشارکت‌کنندگان در هر مطالعه را نشان می‌دهند. در این نمودار، مربع بزرگ متعلق به مطالعه Spakota بر روی *rs11674184* و *rs12700667* نسبت به مربع‌های مطالعات دیگر بزرگتر است. همچنین، محدوده اطمینان کوچکتر این مطالعه نشانگر دقت بیشتر در تخمین ارتباط پلی مورفیسیم گزارش شده در این مطالعه و بیماری اندومتزیوز است.

پلی مورفیسیم‌های ژن *GREB1* شامل *rs11674184* و *miR148a* شامل *rs12700667* و آلل‌های خطرزای آنها در شکل ۱ و ۲ آورده شده است. برای هر SNP، مقدار OR (اثر احتمال) نشان می‌دهد که چقدر احتمال ابتلا به بیماری بر اساس حضور یا عدم حضور SNP تغییر می‌کند. این مقادیر OR بالاتر از ۱ نشان‌دهنده افزایش احتمال ابتلا است. همچنین، بازه اطمینان (CI) میزان اطمینان را نشان می‌دهد. برای *rs11674184*، CI از ۱٫۱۰ تا ۱٫۱۵ است، که نشان‌دهنده این است که مقدار OR بین این بازه قرار دارد. بر اساس داده‌های ارائه شده (*rs11674184* و *rs12700667*)، به نظر رسید که این SNP‌ها با بیماری اندومتزیوز مرتبط هستند. دلیل این ادعا این است که مقادیر OR برای هر دو SNP از ۱ بیشتر است، که نشان‌دهنده افزایش احتمال ابتلا به بیماری بوده، و به طور معناداری ($P > 0.05$) با بیماری اندومتزیوز همراهی داشت. نمودارهای درختی برای ارائه داده‌های به دست آمده از متا-آنالیز در زمینه پلی مورفیسیم ژن *GREB1* و *miR148a* ارتباط آن با بیماری اندومتزیوز طراحی شده

جدول ۱ : خلاصه‌ای از GWA برای rs117۶۱۸۴

Study Year	Variant and risk allele	OR	CI	MAF	Refal Allele	P-value	Mapped gene	RAF	Study accession	Location	Pubmed ID	Case/Control	Genotyping Method
Sapkota Y2017	rs11674184-T	1.13	1.10-1.15	0.3688	T/A (forward strand)	3 x 10 ⁻¹⁷	GREB1	0.61	GCST004549	2:11581409	2837267	14,9263 ancestry cases 189,7153 ancestry	Genome-wide genotyping array
Sapkota Y2017	rs11674184-T	1.12	1.09-1.15	0.3688	T/A (forward strand)	3 x 10 ⁻¹⁴	GREB1	0.61	GCST004549	2:11581409	2837267	14,9263 ancestry cases 189,7153 ancestry	Genome-wide genotyping array
Rahimighi N2023	rs11674184-T	0.0285	[0.023-0.034]	0.3688	T/A (forward strand)	2 x 10 ⁻²⁵	GREB1	NR	GCST90238642	2:11581409	36914876	1,248,2603 ancestry individuals	Genome-wide genotyping array
Rahimighi N2023	rs11674184-T	1.08	[1.07-1.1]	0.3688	T/A (forward strand)	3 x 10 ⁻³⁶	GREB1	NR	GCST90238688	2:11581409	36914876	38,9613 ancestry cases 700,3453 ancestry	Genome-wide genotyping array
Rahimighi N2023	rs11674184-T	1.16	[1.1-1.22]	0.3688	T/A (forward strand)	6 x 10 ⁻⁹	GREB1	0.61	GCST90238699	2:11581409	36914876	4,0463 ancestry cases 379,8903 ancestry	Genome-wide genotyping array

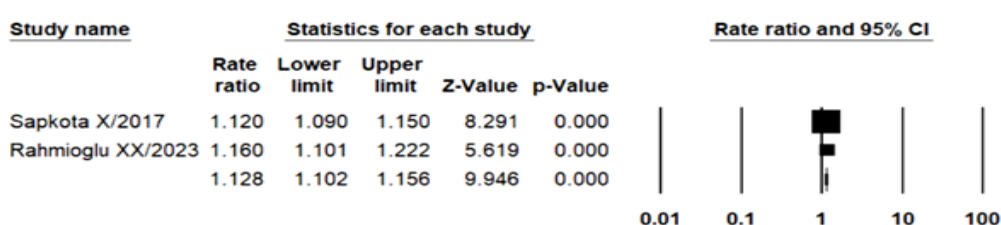
OR = Odds Ratio, CI = Confidence Interval, MAF=Minor Allele Frequency, RAF= Risk Allele

جدول ۲: خلاصه‌ای از GWA برای rs12706657

Study/Year	Variant and risk allele	OR	CI	MAF	Refalt Allele	P-value	Mapped gene	RAF	Study accession	Location	Pubmed ID	Case/Control	Genotyping Method
Painter IN/2010	rs12706657-A	1.2	[1.13-1.27]	0.4625	G-A (forward strand)	1 × 10 ⁻⁹	TSEN1, SP3, MT, R148A	0.74	GCST000916	7:25,862,019	21151130	3,1943 ancestry cases, 7,0603 ancestry	Genome-wide genotyping array
Nyholt DR/2012	rs12706657-A	1.18	[1.11-1.25]	0.4625	G-A (forward strand)	4 × 10 ⁻⁹	TSEN1, SP3, MT, R148A	0.744	GCST001720	7:25,862,019	23104006	3,1813 ancestry cases, 8,0753 ancestry	Genome-wide genotyping array
Sapkota Y/2017	rs12706657-A	1.09	1.06-1.13	0.4625	G-A (forward strand)	2 × 10 ⁻⁸	TSEN1, SP3, MT, R148A	0.74	GCST004549	7:25,862,019	20337267	14,9263 ancestry cases, 189,7153 ancestry	Genome-wide genotyping array
Sapkota Y/2017	rs12706657-A	1.1	1.07-1.13	0.4625	G-A (forward strand)	9 × 10 ⁻¹⁰	TSEN1, SP3, MT, R148A	0.74	GCST004549	7:25,862,019	20337267	14,9263 ancestry cases, 189,7153 ancestry	Genome-wide genotyping array
Umari O/2017	rs12706657-T	1.17	[1.09-1.25]	0.4625	G-A (forward strand)	6 × 10 ⁻⁷	TSEN1, SP3, MT, R148A	NR	GCST004368	7:25,862,019	20335195	3,1943 ancestry cases, 7,0603 ancestry	Genome-wide genotyping array
Umari O/2017	rs12706657-T	1.32	[1.20-1.46]	0.4625	G-A (forward strand)	2 × 10 ⁻⁹	TSEN1, SP3, MT, R148A	NR	GCST004570	7:25,862,019	20335195	1,3643 ancestry cases, 7,0603 ancestry	Genome-wide genotyping array

OR = Odds Ratio, CI = Confidence Interval, MAF=Minor Allele Frequency, RAF= Risk Allele Frequency

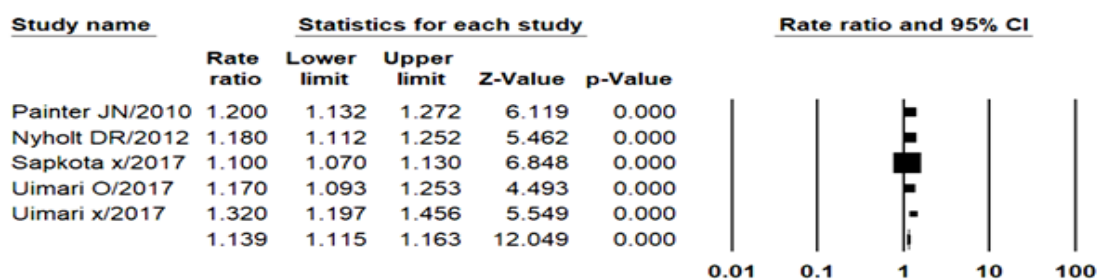
Meta Analysis



Meta Analysis

شکل ۱ : نتیجه نمودار انباشت برای rs۱۲۷۰۰۶۶۷

Meta Analysis



Meta Analysis

شکل ۲ : نتیجه نمودار انباشت برای rs۱۲۷۰۰۶۶۷

بحث

اندومتريوز يك بيماری شایع در زنان است که ۶ تا ۱۰ درصد از زنان در سنين باروری را تحت تأثیر قرار می دهد و شایع ترین علت درد مزمن لگن است (۱۵). سایر علائم شامل دیسمنوره، دیسپارونی، خونریزی نامنظم رحم و کاهش باروری است (۱۶). با توجه به گستردگی علائم و درجات مختلف و شدت؛ اندومتريوز کمتر تشخیص داده می شود و با تأخیرهای تشخیصی قابل توجهی همراه است که از ۵ تا ۹ سال بین شروع علائم و تشخیص قطعی متغیر است (۳). بار مالی اندومتريوز بر سیستم مراقبت های بهداشتی قابل توجه است، در حال حاضر هیچ درمانی برای اندومتريوز وجود ندارد. پس از درمان جراحی، عود علامتی بین ۲۰ تا ۴۰ درصد متغیر است که اغلب در برخی از مراحل نیاز به جراحی مجدد است (۳). اندومتريوز يك بيماری مولتی فاکتوریال هست که عوامل متعددی در بروز و شدت آن دخیل است و برای انتخاب مناسبترین درمان و پیشگیری نیازمند پزشکی دقیق است (۱۷). امروزه درک بهتری از عوامل خطر ژنتیکی

های مهم آن پرداخته شد و آستانه معنادار بودن آنها را با اندومتیوز گزارش شد. نتایج بررسی در این مطالعه تعدادی از SNP ها را شناسایی کرد که ارتباط قوی تری با خطر اندومتیوز نشان دادند. این SNP ها در توالی های بسیار حفاظت شده در بین گونه ها قرار دارند؛ تجزیه و تحلیل این SNP ها، rs11674184 و rs12700667 ارتباط مستقیمی با ریسک ابتلا به اندومتیوز نشان دادند.

با توجه به اینکه Rahmioglu و همکاران در ۲۰۲۳ در یک متآنالیز، با حجم نمونه مؤثر ۲۰۶۱۰۶، که شامل ۶۰۶۷۴ بیمار و ۷۰۱۹۲۶ کنترل که ۹۸٪ جمعیت شامل اروپا، آمریکا و استرالیا و ۲٪ باقی مانده شرق آسیا (ژاپن) بودند که از طریق جراحی، اندومتیوز آنها تأیید شده بود و ۳۹۱۶ نفر در مرحله I/II بیماری و ۴۰۴۵ نفر در III/IV بودند و پاتوژن اندومتیوز و ارتباط آن با rs11674184 را گزارش کردند (۹). همچنین Matalliotaki و همکاران در ۲۰۱۹ در مطالعه خود به بررسی rs11674184 SNP به افزایش خطر ابتلا به اندومتیوز با پیشرفت از مراحل خفیف به شدید در جمعیت یونان پرداختند، علاوه بر این با توجه به اینکه قبلاً از نظر استعداد ژنتیکی و تظاهرات بیماری در زنان یونانی مبتلا به اندومتیوز تفاوت های جمعیتی برای اندومتیوز گزارش شده بود، سعی کردند تفاوت های خاص قومیتی را در مورد ارتباط ژنتیکی این SNP با اندومتیوز را شناسایی کنند. هیچ گونه افزایش در ژنوتیپ یا فراوانی آلی در مقایسه با گروه شاهد (افراد سالم) نداشتند. و مشاهده کردند که آلل G در rs11674184، آلل خطر دیده شده در بیماران اندومتیوز است (۲۰). تغییرات SNP و نقش GREB1 در افزایش خطر ابتلا به اندومتیوز توسط Fung در سال ۲۰۱۵ بررسی شده است و یک تحلیل دقیق برای ارزیابی جامع ارتباط تغییرات ژنتیکی GREB1 بر روی کروموزوم ۲p۲۵،۱ را انجام دادند. همچنین بیان ژن و پروتئین برای GREB1 را در نمونه های اندومتیوز از زنان با و بدون اندومتیوز و اثرات تغییرات SNP بر بیان GREB1 را تجزیه و تحلیل کردند و تفاوت معناداری در سطح بیان بین ژنوتیپ ها برای SNP های آزمایش شده، شناسایی نشد (۱۰). Painter و همکاران در سال ۲۰۱۱ جایگاه های جدید در کروموزوم ۷p۱۵،۲ شناسایی کردند که به طور

مرتبط با اندومتیوز با استفاده از برنامه های کاربردی فن آوری پیشرفته، از جمله GWAS بدست آمده است. با این حال داده های جمع آوری شده تفاوت هایی را در ارتباط ژنتیکی این بیماری در جمعیت های مختلف جهان نشان می دهد. بنابراین بدیهی است که مطالعات بیشتر و جامع تری باید در جمعیت های مختلف انجام شود تا مبنای ژنتیکی بیماری اندومتیوز مشخص شود. از روش های آماری، با یکپارچه سازی داده های ژنومی و تجزیه و تحلیل بیان کمی مکان های ژنی، توانسته اند ارتباطات معناداری میان واریانت های ژنتیکی، بیان ژن ها و احتمال ابتلا به اندومتیوز را نشان دهند. این رویکردها به شناسایی واریانت هایی رسیدند که در تنظیم بیان ژن های مرتبط با چسبندگی و تکثیر سلولی نقش دارند. با توجه به اینکه اندومتیوز یک بیماری وابسته به استروژن است (۱۸) و گیرنده های استروژن آلفا در بافت های اندومتیوم (لایه داخلی رحم) حاضر هستند و به استروژن حساسند. این گیرنده ها در رشد و تعداد سلول ها و عملکرد بافت های رحمی تأثیرگذارند. از سوی دیگر، گیرنده های استروژن بتا نیز در این بافت ها وجود دارند و نقشی در تعادل بین ایجاد و زنده نگه داشتن بافت های رحم دارند. هرگونه نارسایی در اعمال این گیرنده ها می تواند به اختلالاتی مانند اندومتیوز منجر شود. به طور کلی، تعادل در عملکرد گیرنده های استروژن آلفا و بتا اهمیت زیادی در پیشگیری از اختلالات مربوط به اندومتیوز دارد (۱۹).

از آنجایی که GREB1 به طور عملکردی با گیرنده استروژن در تعامل است، تعیین اینکه آیا GREB1 در طول چرخه قاعدگی در بافت های اندومتر تنظیم می شود؛ مهم تلقی می شود. در مطالعه متآنالیز پیش رو مطالعاتی بررسی شدند که به همراهی پلی مورفیسم های ژن GREB1 و miR148a و بیماری اندومتیوز پرداخته بودند. تمامی مطالعات از پایگاه داده GWAS انتخاب شدند که می توانند برخی از پیش بینی های عملکردی SNP ها گزارش کند. این رویکرد به ما اجازه داد تا اثرات SNP ها را در بافت (اندومتر) و بیمار (اندومتیوز) ارزیابی کنیم. و از آنجایی که بیولوژی اندومتر و بیان GREB1 هر دو توسط استروژن تنظیم می شوند، به بررسی SNP

قابل توجهی با خطر اندومتیروز در زنان اروپایی مرتبط است. a-miR148 در بالا دست rs12700667 (88kb) از جمله جایگاه هایی بود که ارتباط آن با اندومتیروز در این بررسی گزارش شده است (۲۱). در مطالعه متآنالیز در سال ۲۰۱۲ بین ۶۶۰۴ بیمار اندومتیروز و ۹۳۹۳ کنترل

نتیجه گیری:

از ژاپنی ها و اروپایی ها به این نتیجه رسیدند که rs12700667 در کروموزوم ۷p15,2 که در اروپایی ها یافت شده بود در ژاپنی ها تکرار می شود و ارتباط معناداری با ابتلا به اندومتیروز دارد (۱۳)

پایگاه داده GWAS برای اندومتیروز یک ارتباط قوی برای خطر بیماری با مارکرها در کروموزوم ۲p25,1 و ۷p15,2 و SNP های rs12700667 و rs11674184 گزارش کرده است. نتایج این مطالعه سیگنال های مشترکی با rs12700667، rs11674184 و SNP non-coding RNA، به دلیل وابسته بودن SNP ناحیه اینترونیک ژن GREB1 به استروژن نشان داد و به عنوان کاندیدهای موثر در پاتوژنز اندومتیروز شناخته شدند. در مطالعه حاضر، مشخص گردید که rs12700667، rs11674184 به طور قابل توجهی با اندومتیروز مرتبط است و همچنین ارتباط معنی داری در سطح ژنوم با rs11674184 و rs12700667 به ویژه با اندومتیروز در سطح متوسط تا شدید با مطالعات قبلی یافت شده است. این متآنالیز،

سازگاری اثرات را در مجموعه داده ها و جمعیت ها برای rs11674184 در GREB1 و rs12700667 در miR148a تایید کرد و شواهدی نزدیک به آستانه معنی داری در سطح ژنوم $p > 10 \times 10^{-5}$ ارائه کرد. به طور خلاصه، این متآنالیز در مورد اندومتیروز شواهدی برای جایگاه های SNP ارائه کرده و نسبت تنوع ژنتیکی در اندومتیروز را نشان می دهد که توسط جایگاه های خطر توضیح داده شده است این نتایج انواع جدیدی را در ژن های خاص یا نزدیک به آن با نقش های مهم در سیگنال دهی و عملکرد هورمون استروژن شناسایی کرده است و فرصت های منحصر به فردی را برای تلاش های تحقیقاتی هدفمندتر ارائه می دهد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی واحد ورامین-پیشوا بواسطه حمایت از تحقیق حاضر قدردانی می گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

References

1. Zondervan, K.T., et al., Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2018. 4(1): 9-17
2. Matalliotakis, M., et al., The role of gene polymorphisms in endometriosis. *Molecular Medicine Reports*, 2017. 16(5): 5881-5886.
https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7398
Pages: 5881-5886
3. Parasar, P., P. Ozcan, and K.L. Terry, Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management. *Curr Obstet Gynecol Rep*, 2017. 6(1): 34-41.
DOI: 10.1007/s13669-017-0187-1
4. Smolarz, B., K. Szyłło, and H. Romanowicz, Endometriosis: Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment and Genetics (Review of Literature). *Int J Mol Sci*, 2021. 22(19):
DOI: 10.3390/ijms221910554
5. Polak, G., et al., Environmental factors and endometriosis. *International journal of environmental research and public health*, 2021. 18(21):11025-11042
https://doi.org/10.3390/ijerph182111025
6. Hansen, K.A. and K.M. Eyster, Genetics and genomics of endometriosis. *Clinical obstetrics and gynecology*, 2010. 53(2): 403-4018
10.1097/GRF.0b013e3181db7ca1.
7. Karizi, Z., Shahreh, and Mirfakhrai, study of the association of rs3024998 and rs699947 polymorphisms in VEGF gene with the risk of recurrent miscarriage. *Iranian Journal of biological science*, 2018. 12(4): 1-8.
8. Sapkota, Y., et al., Independent replication and meta-analysis for endometriosis risk loci. *Twin Research and Human Genetics*, 2015. 18(5): 518-525.
DOI: 10.1017/thg.2015.61
9. Rahmioglu, N., et al., The genetic basis of endometriosis and comorbidity with other pain and inflammatory conditions. *Nature genetics*, 2023. 55(3): 423-436.
doi: 10.1038/s41588-023-01323-z.
10. Fung, J.N., et al., Functional evaluation of genetic variants associated with endometriosis near GREB1. *Human Reproduction*, 2015. 30(5): 1263-1275.
doi: 10.1093/humrep/dev051.
11. Rae, J.M., et al., *GREB1* is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast cancer research and treatment*, 2005. 92: 141-149.
doi: 10.1007/s10549-005-1483-4.
12. Hnatyszyn, H., et al., Correlation of *GREB1* mRNA with protein expression in breast cancer: validation of a novel *GREB1* monoclonal antibody. *Breast cancer research and treatment*, 2010. 122: 371-380.
doi: 10.1007/s10549-009-0584-x.
13. Nyholt, D.R., et al., Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nature genetics*, 2012. 44(12): 1355-1359.
doi: 10.1038/ng.2445.
14. He, S., et al., MicroRNA-148a targets ADAMTS5 to inhibit proliferation of endometriosis cells. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022. 35(1 (Special)): 335-341.
15. Burney, R.O. and L.C. Giudice, Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and sterility*, 2012. 98(3): 511-519.
doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029.
16. Mehedintu, C., et al., Endometriosis still a challenge. *J Med Life*, 2014. 7(3): 349-57.
17. Agharezaei, Frouzesh, and Flora, Ethical aspects of precision medicine. *Iranian Journal of biological science*, 2020. 15(20):45-52.
18. Chantalat, E., et al., Estrogen receptors and endometriosis. *International journal of molecular sciences*, 2020. 21(8): 2815.
19. Pellegrini, C., et al., The expression of estrogen receptors as well as *GREB1*, *c-MYC*, and *cyclin D1*, estrogen-regulated genes implicated in proliferation, is increased in peritoneal endometriosis. *Fertility and sterility*, 2012. 98(5):1200-1208.
doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.056.
20. Matalliotaki, C., et al., Role of *FN1* and *GREB1* gene polymorphisms in endometriosis. *Molecular Medicine Reports*, 2019. 20(1): 111-116.
21. Painter, J.N., et al., Genome-wide association study identifies a locus at 7p15. 2 associated with endometriosis. *Nature genetics*, 2011. 43(1):51-54
doi: 10.1038/ng.731. Epub 2010.



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

h t t p s : / / z i s t i . i a u v a r a m i n . a c . i r



The Effect of Organic Selenium Supplementation on Larvae Acceptance Rate, Royal Jelly Production, Body Antioxidant Status and the Relative Expression of *hsp90* Gene in Honey Bee Under Heat Stress

Khalil Rasoli-Nadergoli¹, Ali Asghar Sadeghi^{2*}, Parvin Shawrang³, Mohammad Chamani⁴

1. PhD student, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associate professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOL, Karaj, Iran
4. Full professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

.Place of Research: Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

Recived 09.29.2023
Revised 12.16.2023
Accepted 03.02.2024
Online 07.06.2024

KeyWords:

Royal jelly,
antioxidant capacity,
gene expression,
heat shock protein,
nurse bee

*Corresponding author:

E-mail address

xalilrasoly@yahoo.com
aasdghi@gmail.com
pshawrang@nrcam.org
m.charnani@gmail.com

Introduction: In the hot seasons and in tropical regions, it is necessary to feed supplements that increase honey bees tolerance to heat stress. Due to its active role in the structure and activity of enzymes, selenium has positive effects on heat tolerance. There are different types of selenium supplements, the bioavailability of organic form is higher than other forms.

Aim: This study was done to evaluate the effects of organic selenium supplementation on larval acceptance rate, amount of royal jelly produced, antioxidant status of body and the relative expression of *hsp90* gene in honey bees under heat stress.

Materials and Methods: 20 colonies were kept in the plain region (Kianmehr, Karaj) and 20 colonies were moved to the mountainous region of Senj (Saujbolag, Alborz Province). A 2x2 factorial trial was conducted based on completely randomized design, and the location (plain or mountain) and syrup (without or containing 50 µg of organic selenium per liter) considered as factor levels. By collecting samples from nurse bees on royal jelly plastic bars, nurse bees' body weight, body fat and protein percentage, total antioxidant capacity, concentration of malondialdehyde, alanine transferase and aspartate transferase enzymes, and heat shock protein gene expression were measured. The acceptance rate of larvae and the amount of royal jelly produced were determined three days after grafting the larvae in plastic cups. The relative gene expression of *hsp90* was determined using RT-PCR technique.

Results: Colonies located in the mountains and colonies receiving organic selenium had a higher percentage of larva acceptance ($P < 0.05$). The amount of royal jelly produced was not affected by the location and the organic selenium supplementation. The nurse bees in the mountainous region who received syrup containing organic selenium supplement had the highest antioxidant capacity, the lowest concentration of malondialdehyde and transferase enzymes, and the nurse bees in the plain region who received syrup without organic selenium supplement had the lowest antioxidant capacity and the highest concentration of malondialdehyde and transferase enzymes ($P < 0.04$). The expression of *hsp90* gene in the body of bees located in the plain region was higher (2.5 times) than in the mountain region, and the organic selenium supplemented in the mountain region had no effect on the gene expression, but in the plain region, it had a down-regulating effect (30% in comparison to bees not received supplement in plain).

Conclusion: The results of this study showed that heat stress has adverse effects on the antioxidant capacity of nurse bees and has the most detrimental effect on the acceptance rate of grafted larvae. The selenium supplementation at dose 50 µg/L syrup increases the acceptance rate of larvae, which can affect the amount of royal jelly production.

Cite this article: Rasoli-Nadergoli K., Sadeghi A.A.*, Shawrang P., Chamani M. The effect of organic selenium supplementation on larvae acceptance rate, royal jelly production, body antioxidant status and the relative expression of *hsp90* gene in honey bee under heat stress. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):69-80

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



اثر مکمل سلنیوم آلی بر میزان پذیرش لارو، مقدار ژله رویال تولیدی، وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و بیان نسبی ژن *hsp90* در زنبور عسل تحت تنش گرمایی

خلیل رسولی نادرگلی^۱، علی اصغر صادقی^۲، پروین شورنگ^۳، محمد چمنی^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. دانشیار، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج، ایران

۴. استاد، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

مقدمه: در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیری لازم است به زنبور عسل مکمل هایی داده شود که مقاومت بدن آنها را به تنش گرمایی افزایش دهد. سلنیوم به دلیل داشتن نقش فعال در ساختمان و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی می تواند در این زمینه موثر عمل کند. انواع مکمل سلنیوم وجود دارد که فرم آلی آن زیست فراهمی بهتری دارد.

هدف: پژوهش کنونی با هدف مطالعه اثرات مکمل سلنیوم آلی بر میزان پذیرش لارو، مقدار ژله رویال تولیدی، وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و بیان نسبی ژن *hsp90* در زنبور عسل تحت تنش گرمایی انجام شد.

مواد و روش ها: تعداد 20 کلنی در منطقه دشت (کیا مهر کرج) و 20 کلنی به منطقه کوهستانی سنج (ساوجبلاغ) کوچ داده شد. آزمون فاکتوریل 2x2 در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد و محل استقرار (دشت یا کوهستان) در دو سطح و شربت (فاقد یا حاوی 50 میکروگرم سلنیوم آلی در لیتر) در دو سطح و در ده تکرار اجرا شد. با نمونه برداری از زنبورهای پرستار بر روی تیرک های ژله گیری، وزن بدن زنبورهای پرستار و درصد چربی و پروتئین بدن، کل ظرفیت آنتی اکسیدانی، غلظت مالون دی آلدئید و آنزیم های آلانین آمینو ترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز و بیان ژن پروتئین شوک گرمایی اندازه گیری شد. میزان پذیرش لارو و مقدار ژله رویال تولیدی سه روز پس از پیوند زدن لارو در چاهک های پلاستیکی مخصوص تولید ژله رویال تعیین شد. بیان ژن *hsp90* با تکنیک RT-PCR تعیین شد.

نتایج: کلنی های مستقر در کوهستان و کلنی های دریافت کننده سلنیوم آلی درصد بالاتری پذیرش لارو داشتند ($P < 0.05$). مقدار ژله رویال تولیدی تحت تاثیر منطقه نگهداری کلنی ها و افزودن مکمل سلنیوم آلی قرار نگرفت. زنبورهای پرستار در منطقه کوهستانی که شربت حاوی مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی، کمترین غلظت مالون دی آلدئید و آنزیم های ترانسفراز داشتند و زنبورهای پرستار در منطقه دشت که شربت فاقد مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی، بیشترین غلظت مالون دی آلدئید و آنزیم های ترانسفراز را داشتند ($P < 0.04$). بیان ژن *hsp90* در بدن زنبورهای مستقر در منطقه دشت 5/2 برابر بیشتر از منطقه کوهستانی بود و افزودن سلنیوم آلی در منطقه کوهستان بر بیان ژن بی تاثیر و در منطقه دشت اثر کاهندگی (30 درصد کاهش نسبت به زنبورهای دشت بدون مکمل) داشت.

نتیجه گیری: تنش گرمایی دارای اثرات نامطلوب بر ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورهای پرستار است و بیشترین اثر منفی را بر میزان پذیرش لارو پیوند شده بر جای می گذارد. افزودن سلنیوم آلی با دوز 50 میکروگرم در لیتر شربت سبب افزایش میزان پذیرش لارو می شود که می تواند بر مقدار تولید ژله رویال موثر واقع شود.

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۰۷/۱۷

بازنگری ۱۴۰۲/۰۹/۲۵

پذیرش ۱۴۰۳/۱۲/۱۲

نمایه ۱۴۰۳/۰۴/۱۶

کلمات کلیدی

ژله رویال
ظرفیت آنتی اکسیدانی
بیان ژن
پروتئین شوک گرمایی
زنبور پرستار

* نویسنده مسؤل

xalilrasoly@yahoo.com
aasdggh@gmail.com
pshawrang@nrcam.org
m.charnani@gmail.com

شیوه آدرس دهی این مقاله: رسولی نادرگلی خ، علی اصغر صادقی الف. الف. الف. شورنگ پ، چمنی م. اثر مکمل سلنیوم آلی بر میزان پذیرش لارو، مقدار ژله رویال

تولیدی، وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و بیان نسبی ژن *hsp90* در زنبور عسل تحت تنش گرمایی. مجله دانش زیستی ایران. ۱۸: ۱۴۰۲ (۳): ۶۹-۸۰

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا **شاپا چاپی:** ۱۷۳۵-۴۲۲۶ **شاپا الکترونیکی:** ۲۷۱۷-۴۵۹۶ **نویسندگان:** © حق مؤلف

مقدمه:

دیسموتاز است و در فعالیت آنزیم های گلوکاتایون پراکسیداز و تیوردوکسین ردوکتاز نقش کاتالیزوری دارد و در خنثی کردن اثرات منفی پراکسیدازهای حاصل از اکسیداسیون لیپید در سلول ها بسیار موثر است. منبع معمول سلنیوم مورد استفاده در خوراک حیوانات سلنیت سدیم است. این منبع غیرآلی سلنیوم به طور نسبی قابلیت ابقاء کمی دارد (۷). اخیراً از شکل های آلی سلنیوم مانند: سلنوسیستئین، سلنومتیونین، یا مخمر غنی از سلنیوم، به عنوان مکمل سلنیوم استفاده می شود. سلنیوم آلی منبع خوبی از سلنیوم است، زیرا در مقایسه با سلنیت سدیم که به صورت انتشار غیر فعال جذب می شود سلنیوم آلی به شکل فعال از روده جذب می شود (۸).

در منابع علمی منتشر شده، اثرات تنش گرمایی بر فراسنجه های عملکردی کلنی ها مطالعه شده است (۹)، (۱۰)، ولیکن تاکنون اثر تنش گرمایی و تغذیه شربت بدون و حاوی مواد آنتی اکسیدانی بویژه سلنیوم آلی در زنبور عسل مطالعه نشده است. اثر نانوسلنیوم و سلنیوم آلی بر بیان ژن *hsp70* در زنبورهای کارگر مطالعه شده است (۴)، و اثر تنش گرمایی و سلنیوم آلی بر بیان ژن موثر بر مقاومت گرمایی (*hsp90*) در زنبور عسل تولیدکننده ژله رویال مورد مطالعه قرار نگرفته است. پروتئین شوک گرمایی ۹۰ سبب حفظ ساختار سه بعدی پروتئین در سیتوپلاسم سلول ها در شرایط تنش گرمایی می شود و از این طریق مانع از واسرشتی پروتئین ها و مقاومت بدن جانوران می شود (۱۱)، (۱۲). پروتئین شوک گرمایی انواع مختلفی دارد و با توجه به اندازه مولکول به نوع ۷۰ و ۹۰ کیلودالتون نامگذاری شده اند و تفاوتی در عمل این دو پروتئین شوک گرمایی وجود ندارد (۳، ۱۱).

فرضیه این تحقیق این است که کلنی هایی که در فصل گرما در منطقه دشت نگهداری می شوند در صورت دریافت شربت حاوی سلنیوم آلی با کلنی های مستقر شده در منطقه کوهستانی از نظر وضعیت آنتی اکسیدانی بدن، تولید ژله رویال و بیان ژن پروتئین شوک گرمایی تفاوتی ندارند. هدف از انجام پژوهش کنونی، تعیین اثر تنش گرمایی و شربت بدون و حاوی سلنیوم آلی بر پذیرش لارو پیوند شده، مقدار تولید ژله رویال، وضعیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن پروتئین شوک گرمایی بود.

پرورش دهندگان زنبور عسل که در زمینه تولید عسل طبیعی فعالیت می کنند پس از افزایش جمعیت زنبورها طی اوایل بهار، کلنی های خود را به مناطق کوهستانی و دارای آب و هوای معتدل کوچ می دهند. دلیل کوچ دادن کندوها افزایش دمای محیط در اواخر بهار و تابستان و اثرات منفی گرما بر فعالیت زنبورهای عسل است (۱). تولیدکنندگان ژله رویال در تابستان کندوها را به مناطق کوهستانی کوچ نمی دهند و در مناطق دشت با تغذیه شربت و کیک گرده به فعالیت تولیدی می پردازند. به دلیل افزایش دمای هوا طی ساعات میانی روز فعالیت اصلی بیشتر زنبورهای کارگر آب آوری است و در بیشتر مناطق دمای هوا به قدری بالا است که آب کافی برای خنک کردن محیط پرورش نوزادان تامین نمی شود (۲)، (۳). در این شرایط کلنی زنبور عسل با تنش گرمایی رو به رو می شود (۴). لاروها در کلنی هایی که در معرض تنش گرمایی قرار دارند، به دلیل تامین نشدن آب و مواد مغذی مورد نیاز با تنش تغذیه ای نیز رو به رو می شوند و لارو کافی برای پیوند زدن در قاب ها یافت نمی شود و فعالیت تولید ژله رویال با مشکل رو به رو می شود (۵). در بدن زنبور عسل تحت تنش گرمایی، تولید رادیکال های آزاد افزایش می یابد و برای خنثی کردن رادیکال های آزاد و به حداقل رساندن اثر تنش ها بر بدن زنبور و عملکرد کلنی تامین مواد آنتی اکسیدانی یا کمک به عوامل افزایش دهنده ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن ضروری است (۳). گرده گل تازه حاوی رنگدانه های متعدد می تواند نیاز زنبورها به مواد آنتی اکسیدانی را برطرف کند، ولیکن در هوای گرم فعالیت زنبورهای کارگر به حداقل می رسد و از طرفی تراکم گیاهان گل دار کم می شود. تولیدکنندگان ژله رویال برای تأمین مواد آنتی اکسیدانی به کلنی های زنبور عسل کیک گرده می دهند. گرده مورد استفاده در این مراکز تولید ژله رویال عمدتاً چند ماه از جمع آوری آن گذشته و به طور صحیح خشک و انبارداری نمی شود که این موضوع سبب از بین رفتن مواد آنتی اکسیدانی گرده می شود (۲). بنابراین ضرورت دارد در این مواقع مواد آنتی اکسیدان کمکی به کیک گرده یا شربت افزوده شود (۶).

سلنیوم از جمله مواد معدنی ضروری برای رشد و سلامت زنبورهای عسل است و در ساختار آنزیم های آنتی اکسیدانی نقش دارد. سلنیوم جزء مهمی از ساختار آنزیم سوپراکسید

مواد و روش ها

تیمارهای و طرح آزمایشی

این پژوهش در زنبورستان تحقیقاتی در دو مرحله مزرعه ای و آزمایشگاهی طی اواخر خرداد و اوایل تیرماه ۱۴۰۲ در منطقه کیاغهر کرج (استان البرز) با عرض جغرافیایی ۳۵/۸۰۸۲۰۱ و طول جغرافیایی ۵۰/۸۲۴۰۴۷ و ارتفاع ۱۰۷۰ متر و منطقه کوهستانی سنج (ساوجبلاغ، استان البرز) با عرض جغرافیایی ۳۶/۰۲۷۶۵۴ و طول جغرافیایی ۵۰/۵۸۳۳۴۵ و ارتفاع ۲۵۰۰ متر انجام شد. برای ایجاد تنش گرمایی بنابر روش توصیه شده توسط لی و همکاران (۱۳)، آزمایش مزرعه ای در مکانی آفتابگیر با دمای 39 ± 3 درجه سلسیوس و رطوبت ۴۸ درصد به مدت حداقل ۴ ساعت در روز از ساعت ۱۱ تا ۳ عصر ایجاد شد. در منطقه کوهستانی دمای روز 27 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت ۶۲ درصد بود. تعداد ۴۰ کلنی زنبور عسل نژاد بومی (*Apis mellifera meda*) انتخاب و ملکه ها از نظر سلامتی و تخمگذاری بررسی و جمعیت کلنی ها در شروع آزمایش یکسان سازی و سپس برای تولید ژل رویال ساماندهی شدند. ملکه های کلنی های مورد استفاده از پایه مادری یکسان بودند (ملکه اصلاح نژاد شده موسسه علوم دامی) و به صورت جفتگیری طبیعی در اوایل بهار سال ۱۴۰۲ بارور شده بودند. برای یکسان سازی نوزادان، با حفظ جمعیت زنبورهای موجود در هر کلنی، قاب های حاوی تخم روز و لارو و شفیره موجود در کندوها خارج و به جای آن پوکه تازه قرار داده شد. در ضمن به طور مساوی دو قاب عسل و گرده به عنوان ذخیره غذایی در کندوها قرار داده شد. با توجه به طرح آزمایشی به طور تصادفی ۲۰ کلنی در منطقه کیاغهر باقی ماند و ۲۰ کلنی به منطقه سنج کوچ داده شد. آزمون فاکتوریل 2×2 در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد و محل استقرار (دشت یا کوهستان) در دو سطح و شربت (فاقد یا حاوی ۵۰ میکروگرم در لیتر سلنیوم) از منبع سلنیوم آلی با نام تجاری Selplex (۲۵ میلی گرم در لیتر؛ هر گرم حاوی ۲۰۰۰ میکروگرم سلنیوم) در دو سطح و در ده تکرار اجرا شد. به هر کلنی در روز یک لیتر شربت فاقد یا حاوی سلنیوم آلی داده می شد. به کلنی های هر دو منطقه کیک گرده با ترکیب یکسان داده می شد. کندوهای مورد استفاده از نوع کف

باز و مجهز به گرده گیر داخلی بود. در هر دو منطقه با نصب صفحه گرده گیر از ورود گرده به داخل کلنی جلوگیری شد. برای اندازه گیری وسعت تخمگذاری ملکه در روز ۲۰ آزمایش، از قاب مشبک شده دارای مربع های استاندارد ۵×۵ سانتی متر که کل قسمت های یک شان را می پوشاند استفاده شد. تعداد مربع های حاوی تخم شمارش شده و مساحت مورد نظر نیز محاسبه شد. با روش پیوند زدن، طی سه مرحله ژله رویال تولید شد و در مرحله سوم رکوربرداری میزان پذیرش لارو و مقدار تولید ژله رویال در هر سلول پلاستیکی انجام شد. زنبورهای روی تیرک های مرحله سوم در سطل تکانه شد و یک فنجان زنبور برداشته و وزن بدن زنبورهای پرستار هر کلنی (۱۰۰ زنبور) پس از بیهوش کردن با دی اکسید کربن با ترازوی دقیق (Tokyo, Japan, AND Scale GE۲۲۰) اندازه گیری و میانگین آن محاسبه شد (۱۴) و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا آنالیز ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و بیان ژن نگهداری شد (۱۵)، (۱۶).

ترکیبات شیمیایی و سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن

ماده خشک لاشه زنبورها با استفاده از آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس تعیین شد. نمونه ها پس از خشک شدن در آون به دسیکاتور منتقل شده و پس از سرد شدن توزین شد. اندازه گیری وزن نمونه ها قبل و بعد از خشک شدن با ترازوی دیجیتال (Tokyo, Japan, AND Scale GE۲۲۰) با دقت ۰/۰۰۱ گرم انجام شد. درصد چربی و پروتئین بدن زنبورهای نمونه برداری شده به ترتیب با استفاده از روش سوکسله و کلدال تعیین شد (۱۷). سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورها با روش Benzie and Strain (۱۸) انجام شد. برای تعیین مقدار مالون دی آلدئید از روش تیوباربتوریک اسید استفاده شد (۱۹). فعالیت آسپاراتات آمینوترانسقراز و آلانین آمینوترانسقراز با کیت شرکت کورمی (لابلین، لهستان) اندازه گیری شد.

آنالیز بیان ژن

لاشه زنبورها پس از بیرون آوردن از فریزر، در مقدار کمی نیترژن مایع به طور کامل منجمد و با استفاده از هاون چینی پودر شد و سپس در بافر لیزکننده همگن شد. با استفاده از کیت تجاری (شرکت Bioneer، سئول،

ژن خانه دار استفاده شد. نسبت بیان نسبی ژن *hsp90* به عنوان ژن هدف به ژن بتا اکتین بر اساس روش Livak and Schmittgen (۲۲) نرمال شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۲ با دو عامل شامل منطقه (دشت یا کوهستان) و شربت (فاقد یا حاوی سلنیوم آلی) انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده ها قبل از آنالیز واریانس از آزمون Shaapiro-Wilk استفاده شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. (۲۳).

کره جنوبی) RNA کل بنابر دستورالعمل سازنده استخراج شد. برای تعیین فراوانی نسبی mRNA ژن پروتئین شوک گرمایی (*hsp90*) با استفاده از real time-qPCR بنابر روش صاحبزاده و همکاران (۲۰) اقدام شد. براساس این روش، مقدار ۱ میکروگرم از هر نمونه RNA با استفاده از کیت تجاری (شرکت Bioneer، سئول، کره جنوبی) به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل قبل از استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. PCR کمی با یک جفت پرایمر خاص با استفاده از کیت Quanti Fast SYBER Green PCR (Qiagen, Hilden، آلمان) انجام شد. پرایمرهای *hsp90* و بتا اکتین (جدول ۱) با استفاده از اطلاعات NCBI و توالی های گزارش شده قبلی (۲۱) طراحی شدند و برای نرمال سازی، بتا اکتین به عنوان

جدول ۱: پرایمرهای ژن های هدف و خانه دار

اندازه (جفت باز)	توالی های پرایمرها	ژن های هدف
۱۳۳	F-5'-CTTGCCTTACTGAGCGACGA-3' R-5'-TATCCTGAACGTCAGCTCC-3'	Heat Shock protein 90 (<i>hsp90</i>)
۱۴۰	F-5'- TGCCAACACTGTCCTTTCTG-3' R-5'- AGAATTGACCCACCAATCCA-3'	β -actin

نتایج

معنی دار نبود. سطح تخمگذاری ملکه در کوهستان بیشتر از دشت ($P > 0.02$) و در کلنی های دریافت کننده مکمل سلنیوم آلی بیشتر ($P > 0.01$) از کلنی های دریافت کننده شربت فاقد سلنیوم آلی بود. اثر متقابل منطقه نگهداری و نوع شربت بر تخمگذاری ملکه معنی دار نبود ($P > 0.05$). اثرات اصلی و متقابل منطقه و مکمل سلنیوم آلی بر میزان پذیرش لارو معنی دار بود. کلنی های مستقر در کوهستان درصد بالاتری پذیرش لارو نسبت به کلنی های مستقر در دشت داشتند. تغذیه مکمل سلنیوم آلی سبب افزایش میزان پذیرش لارو شد. با توجه به اثرات متقابل، کلنی های مستقر در کوهستان که شربت دارای مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند بیشترین درصد پذیرش لارو داشتند و کلنی های مستقر در دشت که شربت فاقد

اثرات اصلی و متقابل منطقه و افزودن مکمل سلنیوم آلی بر وزن و ترکیب شیمیایی بدن زنبورهای پرستار، سطح تخمگذاری ملکه، درصد پذیرش لارو و مقدار ژله رویال تولیدی در جدول ۲ گزارش شده است. اثر منطقه نگهداری کلنی ها بر وزن بدن زنبور پرستار معنی دار بود و اثر اصلی مکمل سلنیوم آلی بر وزن بدن زنبورهای پرستار معنی دار نبود. اثر متقابل منطقه و مکمل سلنیوم آلی بر وزن بدن زنبورهای پرستار معنی دار نبود. اثرات اصلی و متقابل منطقه و مکمل سلنیوم آلی بر چربی بدن معنی دار نبود. پروتئین بدن زنبورهای پرستار تحت تاثیر منطقه قرار نگرفت ولی مکمل سلنیوم آلی سبب افزایش معنی دار درصد پروتئین بدن زنبورهای پرستار شد. اثرات متقابل منطقه و مکمل سلنیوم آلی بر درصد پروتئین بدن

مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند کمترین درصد پذیرش لارو را داشتند. مقدار ژله تولیدی در هر سلول تحت تاثیر منطقه نگهداری کلنی ها و افزودن مکمل سلنیوم آلی قرار نگرفت.

جدول ۲: اثر منطقه و سلنیوم آلی بر وزن و ترکیب شیمیایی بدن زنبورهای پرستار، پذیرش لارو و مقدار ژله رویال تولیدی

سطح احتمال معنی داری	عوامل تغییر							فراسنجه‌های مورد بررسی
	اشتباه معیار	شریت		منطقه		دشت (گرم)	کوهستان (خنک)	
		منطقه	شریت	بدون سلنیوم آلی	حاوی سلنیوم آلی			
اثر متقابل								
۰/۹۹	۰/۲۸	۰/۰۲	۰/۶۲	۱۱۹	۱۲۰	۱۱۹ ^b	۱۲۱ ^a	وزن بدن (میلی گرم)
۰/۴۶	۰/۱۰	۰/۸۰	۰/۰۷	۷/۶۵	۷/۵۳	۷/۶۰	۷/۵۸	چربی بدن (درصد)
۰/۷۸	۰/۱۹	۰/۴۴	۱/۲۱	۴۵/۳۸	۴۶/۹۱	۴۵/۶۷	۴۶/۵۳	پروتئین بدن (درصد)
۰/۳۴	۰/۰۱	۰/۰۲	۵۸/۷	۶۱۴ ^a	۵۸۱ ^b	۶۰۵ ^a	۵۹۰ ^b	کل سطح تخمگذاری ملکه (سانتیمتر مربع)
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۱/۲۳	۸۴/۱۴ ^a	۷۲/۵۰ ^b	۸۲/۱۶ ^a	۷۴/۵۰ ^b	میزان پذیرش لارو (درصد)
۰/۵۵	۰/۰۶	۰/۲۵	۱/۱۵	۸۵/۳۱	۸۳/۰۹	۸۴/۸۳	۸۳/۶۲	مقدار ژله تولیدی در هر سلول

در هر ردیف برای منطقه یا شریت تفاوت میانگین‌های یا حروف غیرمشابه معنی دار است ($P < 0.05$).

جدول ۳: اثر منطقه و افزودن سلنیوم آلی به شریت بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن و فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز

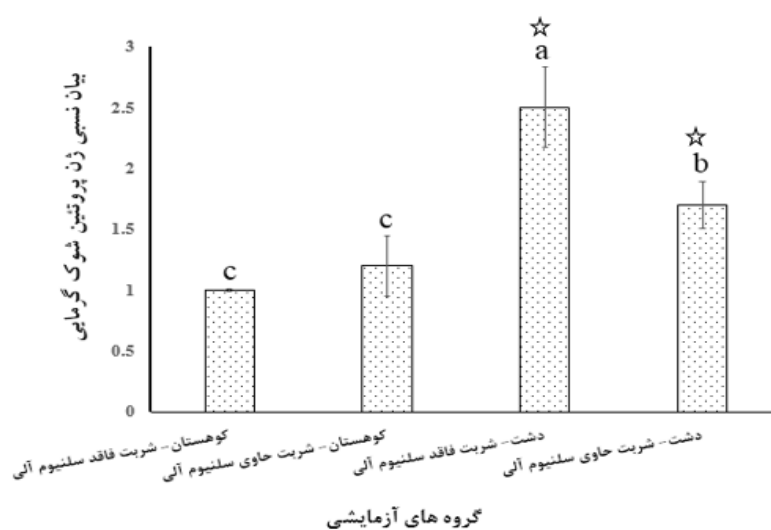
سطح احتمال معنی داری	عوامل تغییر							فراسنجه
	اشتباه معیار	شریت		منطقه		دشت (گرم)	کوهستان (خنک)	
		منطقه	شریت	بدون سلنیوم آلی	حاوی سلنیوم آلی			
اثر متقابل								
۰/۰۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۴	۰/۱۱	۵/۴۲ ^a	۴/۳۹ ^b	۵/۱۵ ^a	۴/۷۱ ^b	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (میلی مول Trolox)
۰/۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۷۱	۱/۵۶ ^b	۲/۹۴ ^a	۱/۶۷ ^b	۲/۸۴ ^a	مالون دی‌آلدئید (نانومول بر میلی گرم پروتئین)
۰/۱۹	۰/۰۲	۰/۰۰۱	۵/۱۲	۱۹۶۷ ^a	۱۸۳۷ ^b	۲۰۲/۳ ^a	۱۷۷/۲ ^b	آسپارات آمینوترانسفراز (واحد در گرم وزن بدن) ^۱
۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۱	۲/۰۸	۸۵/۳ ^a	۷۷/۴ ^b	۸۶/۱ ^a	۷۵/۳ ^b	آلاتین آمینوترانسفراز (واحد در هر گرم وزن بدن) ^۲

در هر ردیف برای منطقه یا شریت تفاوت میانگین‌های یا حروف غیر مشابه معنی دار است ($P < 0.05$).

^۱ میلی مول غلظت ترانکس که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل یک میلی مول از نمونه مورد بررسی را دارد.

^۲ واحد بین‌المللی (International Unit) در هر گرم وزن محاسبه شده است و فعالیت آنزیمی است و هر واحد آن معادل یک میکرومول NADH مصرف شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد.

در جدول ۳ وضعیت آنتی اکسیدانی بدن و فعالیت آنزیم های ترانس آمیناز در بدن زنبورهای پرستار گزارش شده است. اثرات اصلی منطقه نگهداری و افزودن مکمل سلنیوم آلی به شربت بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بدن زنبورها معنی داری بود ($P > 0.004$) و اثر متقابل تمایل به معنی داری داشت ($P > 0.06$).



شکل ۱: بیان نسبی ژن پروتئین شوک گرمایی در بدن زنبورهای مستقر در دشت یا کوهستان و دریافت کننده شربت فاقد یا حاوی سلنیوم آلی ($P > 0.05$). ستون های ستاره دار تفاوت معناداری نسبت به یکدیگر دارند.

دی آلدئید مشاهده شد و بیشترین و کمترین غلظت به ترتیب در کلنی های مستقر در دشت بدون دریافت مکمل و منطقه کوهستانی با دریافت مکمل مشاهده شد. اثرات منطقه نگهداری و مکمل سلنیوم آلی بر فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز معنی دار بود ($P > 0.001$). زنبورهای مستقر در منطقه کوهستان نسبت به زنبورهای مستقر در دشت و زنبورهای دریافت کننده مکمل سلنیوم آلی نسبت به زنبورهای دریافت کننده شربت فاقد مکمل سلنیوم آلی بیشترین فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز داشتند ($P > 0.01$). اثرات متقابل منطقه و شربت برای آسپاراتات آمینوترانسفراز معنی دار نبود ولی برای آنزیم آلانین آمینوترانسفراز معنی دار بود. زنبورهایی که در کوهستان مستقر بودند و شربت حاوی مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند بیشترین و زنبورهای مستقر در دشت

بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن در زنبورهای منطقه کوهستان و زنبورهایی که سلنیوم آلی دریافت کردند مشاهده شد و زنبورهای دشت و زنبورهای دریافت کننده شربت فاقد سلنیوم آلی ظرفیت آنتی اکسیدانی کمتری داشتند ($P > 0.001$). با توجه به معنی دار شدن اثرات متقابل، زنبورهای پرستار در منطقه کوهستانی که شربت حاوی مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند بیشترین و زنبورهای پرستار در منطقه دشت که شربت فاقد مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را داشتند. اثرات اصلی و متقابل منطقه نگهداری و مکمل سلنیوم آلی بر غلظت مالون دی آلدئید معنی دار بود. زنبورهای مستقر در دشت و زنبورهایی که شربت فاقد سلنیوم آلی دریافت کردند غلظت مالون دی آلدئید بیشتری داشتند ($P > 0.001$). اثر متقابل بین منطقه و نوع شربت برای غلظت مالون

مستقر در منطقه دشت که شربت فاقد یا حاوی سلنیوم آلی دریافت کردند بیان نسبی ژن پروتئین شوک گرمایی بیشتری (۲/۵ برابر) نسبت به زنبورهای مستقر در کوهستان داشتند ($P > 0.05$). با افزودن مکمل سلنیوم آلی به شربت کلنی های مستقر در دشت بیان نسبی ژن پروتئین شوک گرمایی کاهش معنی داری ($P > 0.05$) (۳۰ درصد نسبت به زنبورهای دشت بدون دریافت مکمل) یافت.

که شربت فاقد مکمل سلنیوم آلی دریافت کردند کمترین فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز داشتند ($P > 0.01$). بیان نسبی ژن پروتئین شوک گرمایی ۹۰ در شکل ۱ نشان داده شده است. زنبورهای مستقر در کوهستان که شربت فاقد سلنیوم آلی دریافت کردند به عنوان کنترل خارجی در نظر گرفته شدند و مقایسه بقیه تیمارها با آن انجام شد. تفاوت معنی داری بین بیان نسبی ژن پروتئین شوک گرمایی زنبورهای مستقر در کوهستان که شربت فاقد یا حاوی سلنیوم آلی دریافت کردند مشاهده نشد. زنبورهای

بحث

است و حاوی لیپوپروتئین به نام ویتلوژنین است مورد استفاده قرار می گیرد. کلنی های مستقر در دشت با تنش گرمایی رو به رو بودند و در ساعات میانه روز گرمای کندوها در حدی زیاد بود که بیشتر جمعیت زنبورها از روی قاب ها به زیر در کندو و دیواره ها رفته بودند. دلیل این رفتار کم کردن گرمای ساطع شده از بدن آنها بر روی قاب های حاوی نوزادان و ایجاد عایق برای جلوگیری از ورود گرما به درون کندو می باشد (۲۵).

در شرایط تنش گرمایی که در زنبور در دمای محیطی بالاتر از ۳۴ درجه سلسیوس شروع می شود آب آوری و حرکات بال نمی تواند سبب خنک کردن منطقه پرورش نوزادان شود به همین دلیل زنبورها به کف کندو و دیواره ها می روند تا دمای بدن آنها سبب افزایش دمای منطقه پرورش نوزادان نشود و گروه کمتری در آن منطقه فعالیت تغذیه لاروها و عملیات خنک کردن محل پرورش را انجام می دهند (۲، ۵). کاهش فعالیت زنبورها که در کاهش پذیرش لاروهای پیوند شده نیز نمایان شد و کمی تحرک سبب استفاده کمتر از ذخایر بدن برای تولید ژله رویال و تغذیه لاروهای درون کلنی شد و این موضوع سبب حفظ وزن بدن زنبورهای پرستار شده است.

شایان ذکر است. مکمل سلنیوم آلی بر وزن بدن و درصد چربی و پروتئین بدن زنبورهای پرستار اثر معنی داری نداشت، هر چند از نظر عددی وزن بدن زنبورهای دریافت کننده سلنیوم کمتر از گروهی بود که سلنیوم دریافت نکردند. به

وزن بدن زنبورهای پرستار یکی از شاخص های مهم وضعیت متابولیکی و فیزیولوژیکی است و نشاندهنده وضعیت ذخیره انرژی و پروتئین بدن است (۲۴). وزن بدن زنبور پرستار به عوامل مختلفی بویژه نژاد، وضعیت تغذیه و میزان فعالیت بستگی دارد (۳). در کلنی هایی که پرورش لارو زیادی وجود دارد و فعالیت تولید ژله رویال انجام می شود وزن بدن زنبورهای پرستار به دلیل استفاده از ذخایر بدنی کاهش می یابد و هر چه فعالیت کمتر باشد وزن بدن زنبورها افزایش می یابد (۲). Winston (۲۴) گزارش کرد که وزن بدن زنبور پرستار بین ۱۰۰ تا ۱۶۰ میلی گرم متغیر است. در مطالعه حاضر میانگین وزن زنبورهای پرستار بین ۱۱۸ تا ۱۲۲ میلی گرم بود که در دامنه گزارش Winston (۲۴) قرار دارد. وزن زنبورهای پرستار در کلنی های مستقر در کوهستان به طور معنی داری کمتر از وزن زنبورهای پرستار کلنی های مستقر در دشت بود که دلیل این تفاوت به تنش گرمایی مربوط می باشد. زنبورهای پرستار در کلنی های مستقر در کوهستان فعالیت بیشتری داشتند که این موضوع در درصد پذیرش لارو پیوند شده نمایان شد.

با افزایش فعالیت زنبورهای پرستار ذخایر بدن صرف تولید ژله رویال می شود و تولید این محصول به قدری انرژی و پروتئین زیاد نیاز دارد که از طریق تغذیه زنبورها جبران نمی شود و بدن زنبور پرستار در تعادل منفی انرژی و پروتئین قرار می گیرد (۲). در این شرایط ذخایر انرژی و پروتئین بدن که در زیر کوتیکول به صورت بافت چربی

در گرده گل مقداری سلنیوم وجود دارد ولی وجود عوامل کیلات کننده مانع جذب آن می شود از طرفی طول دستگاه گوارش زنبور کوتاه و توانایی جذب آن کم است (۲۷). در بدن زنبور نیز ذخیره سلنیوم کم می باشد. به همین دلیل باید روزانه مقدار کافی سلنیوم برای بدن تامین شود. با افزودن سلنیوم آلی به شربت، بخش عمده سلنیوم جذب بدن می شود و مورد استفاده بافت ها قرار می گیرد. غدد آسینی که ژله رویال تولید می کنند نیاز زیادی به سلنیوم دارند و تامین سلنیوم سبب حفظ اندازه این غدد و فعالیت حداکثری آن می شود و از این طریق تغذیه لاروها و ملکه زنبور عسل به خوبی انجام می شود که در نهایت سبب افزایش تخمگذاری ملکه می شود (۲).

بنابر تحقیقاتی که اخیراً انجام شده است عنصر سلنیوم برای تولید ویتلوژنین مورد نیاز است (۲۸). در بدن زنبور عسل این پروتئین یک آنتی اکسیدان قوی است. افزایش یافتن کل ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورهای مستقر در منطقه کوهستانی یا تغذیه شده با شربت حاوی سلنیوم آلی به افزایش ساخت ویتلوژنین مربوط می شود. ویتلوژنین یک فسفولیپو پروتئین است که در تخم و بدن زنبور عسل نقش های متعددی دارد. ویتلوژنین پروتئین اختصاصی زرده تخم بوده و در ایمنی لارو زنبور عسل در برابر عوامل بیماریزا نقش دارد. علاوه بر این ویتلوژنین در بدن زنبورهای بالغ در صفات رفتاری، زنده ماندن و ایمنی بدن موثر است (۲۹).

فعالیت آنزیم های ترانسفراز در بدن زنبورهای کوهستان بیشتر از دشت و فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در بدن زنبورهای تغذیه شده با شربت حاوی سلنیوم آلی بیشتر از زنبورهای تغذیه شده با شربت فاقد سلنیوم بود. در شرایط تنش، فعالیت های آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز و اسپاراتات آمینوترانسفراز بسیار مهم هستند زیرا برخلاف پستانداران فعالیت این آنزیم ها بر سلامتی و عمر زنبور عسل موثرند. در پستانداران، افزایش فعالیت های آنزیم های مذکور نشان دهنده بیماری مزمن، تغییرات پاتولوژیک و مسمومیت کبدی است. برعکس، کاهش فعالیت این آنزیم ها در زنبورهای عسل با بیماری و شرایط پاتولوژیک مرتبط است (۳۰، ۲۹) حشرات کبد ندارند و فقط یک معادل کبد دارند که نام آن بافت چربی است (۳۱). در

نظر می رسد سلنیوم با افزایش ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل و کاهش سطح مالون دی آلدئید شرایط بدن زنبورهای پرستار و اشتهای آنها را برای تغذیه بیشتر از یک مهیا کرده و تعادل منفی انرژی و پروتئین کمتری ایجاد شده است. مکمل سلنیوم آلی سبب افزایش درصد پذیرش لارو و فعالیت بیشتر در تغذیه لاروهای درون کلنی شد با توجه به فعالیت بیشتر ملکه برای تخمگذاری، با این حال سبب کاهش معنی دار وزن زنبورهای پرستار نشد. این موضوع نشان می دهد زنبورهای دریافت کننده سلنیوم تغذیه بهتری داشته اند و از ذخایر بدن کمتر استفاده کرده اند.

سطح تخمگذاری ملکه ها تحت تاثیر منطقه و نوع شربت قرار گرفت و اثر متقابل بین این دو عامل معنی دار نبود. سطح تخمگذاری ملکه زنبور عسل تحت تاثیر تغذیه، شرایط محیطی و وسعت لاروها قرار دارد. در کلنی های مستقر در کوهستان به دلیل مناسب بودن دمای محیطی زنبورهای کارگر و پرستار لاروها و ملکه را بهتر تغذیه کردند و با این فعالیت سبب افزایش توانایی ملکه در تخمگذاری شده و همچنین سبب افزایش فرومون لاروها در کندو شده که خود عاملی برای افزایش تخمگذاری ملکه است. در کلنی زنبور عسل، ملکه توسط زنبورهای ملایم با ژله رویال تغذیه می شود و زنبورهای ملایم با تولید ژله رویال و خوراندن آن به ملکه شرایط تخمگذاری بیشتر را فراهم می کنند (۲). با وارد شدن سلنیوم آلی در شربت و تغذیه از آن، ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن این زنبورها افزایش یافته و توانسته اند در تعداد کافی با توان بیشتر به تغذیه ملکه پرداخته و سطح تخمگذاری را افزایش دهند. از طرفی زنبورهای پرستار با تولید ژله رویال و تغذیه شهد و گرده به لاروها، شرایط تغذیه ای و فیزیولوژیکی (فرومون لاروها) را برای فعالیت ملکه و تخمگذاری بیشتر فراهم می کنند (۲۱). وجود فرومون لاروها ملکه را به تخمگذاری بیشتر ترغیب می کند و هر چه لاروها بهتر تغذیه شوند فرومون بیشتری تولید می کنند و ملکه به تخمگذاری بیشتر ترغیب می شود (۲، ۶).

عنصر سلنیوم برای فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان کوفاکتور لازم است (۲۶). با فعالیت این آنزیم قدرت آنتی اکسیدانی بدن افزایش و غلظت مالون دی آلدئید کاهش می یابد.

hsp90 بیشتری نسبت به زنبورهای کوهستان داشتند. افزودن سلنیوم آلی در تغذیه زنبورهای پرستار در منطقه دشت سبب افزایش معنی دار بیان ژن *hsp90* شد در حالیکه مقایسه بیان این ژن بین زنبورهای کوهستان تغذیه شده با شربت حاوی سلنیوم و تغذیه شده بدون سلنیوم نشان داد که تحت تاثیر سلنیوم قرار نگرفته است. این یافته موافق با گزارش امینی و همکاران (۳۵) است که گزارش کردند نانوسلنیوم سبب افزایش بیان ژن *hsp70* در زنبورهای پرستار تحت استرس گرمایی می شود. بیان بیشتر ژن *hsp90* مقاومت گرمایی زنبورهای پرستار را افزایش می دهد و در نتیجه بازدهی مکرر زنبورهای پرستار برای تغذیه لاروها را افزایش می دهد.

شرایط تنش و مسمومیت آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز از بافت چربی وارد همولنف حشرات می شود و در سم زدایی نقش دارند (۳۲). کم شدن فعالیت این آنزیم ها در زنبورها سبب اختلال در چرخه کربس، سنتز ATP، فسفوریلاسیون اکسیداتیو، بتااکسیداسیون و سایر چرخه های متابولیک می شود (۳۳). با ورود مواد آنتی اکسیدانی و ویتامینی به بدن زنبورها، افزایش فعالیت این آنزیم ها - که نشانگرهای زیستی می باشند- در بدن زنبورها مشاهده می شود (۳۴). فعالیت آنزیم های آمینوترانسفراز از طریق انتقال بخش آمین اسیدهای آمینه گلوکوژنیک، به مسیر گلوکوژنوژنز کمک می کند تا نیاز انرژی در لاروها و زنبورهای برآورده شود (۳۳).

در پژوهش کنونی زنبورهای تحت تنش گرمایی بیان ژن

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد، تنش گرمایی دارای اثرات نامطلوب بر ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن زنبورهای پرستار است و بیشترین اثر منفی را بر میزان پذیرش لارو پیوند شده بر جای می گذارد. افزودن سلنیوم آلی در دوز ۵۰ میکروگرم در لیتر به شربت هر چند بر مقدار ژله رویال تولیدی در هر سلول موثر نبود، ولی سبب افزایش میزان پذیرش لارو شد که می تواند بر مقدار تولید ژله رویال موثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری واحد علوم و تحقیقات به جهت تصویب پروپوزال و مکاتبات اداری و از پژوهشگر محترم دکتر شهبازی و مهندس عصاره به جهت راهنمایی های ارزنده و کمک در آنالیز بیان ژن تشکر می شود. این مقاله مستخرج از رساله دانشجوی دوره دکتری تخصصی واحد علوم و تحقیقات (خلیل رسولی نادرگی) می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

References

1. Vaziritabar S, Esmaeilzade SM. Profitability and socio-economic analysis of beekeeping and honey production in Karaj state, Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2016;4(4):1341-50.
2. Lipiński, Z. Honey Bee Nutrition and Feeding. Northern publication. London, UK. 2019.
3. Zhao H, Guilin L, Dezheng G, Han L, Qingxin L. Response mechanisms to heat stress in bees. *Apidologie*. 2021; 52 (2): 388-399.
DOI: 10.1007/s13592-020-00830-w.
4. Severson DW, Erickson EH, Williamson JL, Aiken JM. Heat stress induced enhancement of heat shock protein gene activity in the honey bee (*Apis mellifera*). *Experientia*. 1990; 46:737-9.
5. Kühnholz S, and Seeley TD. The control of water collection in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1997; 41 (1): 407-422.
doi: 10.1007/s002650050402.
6. Becerril-Sánchez AL, Quintero-Salazar B, Dublán-García O, Escalona-Buendía HB. Phenolic compounds in honey and their relationship with antioxidant activity, botanical origin, and color. *Antioxidants*. 2021; 10(11):1700-5.
7. Shini S, Sultan A, Bryden WL. Selenium biochemistry and bioavailability: implications for animal agriculture. *Agriculture*. 2015; 5(4):1277-88.
8. Wen HY, Davis RL, Shi B, Chen JJ, Chen L, Boylan M, Spallholz JE. Bioavailability of selenium from veal, chicken, beef, pork, lamb, flounder, tuna, selenomethionine, and sodium selenite assessed in selenium-deficient rats. *Biological Trace Element Research*. 1997; 58:43-53.
9. Farjan M, Dmitryjuk MG, Lipinski Z, Biernat-Lopińska E, Zóltowska K. Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages. *Journal of Apicultural Research*. 2012; 51 (3): 263-70.
doi: 10.3896/IBRA.1.51.3.07.
10. Kikusato M, Toyomizu M. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. *PloS one*. 2013; 8: e64412.
11. Morammazi S, Mirhosseini MA. Expression of *hsp90* gene and its relationship with ambient temperature and foraging rate in *Apis mellifera meda*. *Agricultural Biotechnology Journal*. 2021; 12(4): 181-204.
doi: 10.22103/jab.2020.15283.1199.
12. Alqarnia AS, Aliab H, Iqbala J, Owayssa AA, Smith BH. Expression of heat shock proteins in adult honey bee (*Apis mellifera* L.) workers under hot-arid subtropical ecosystems. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019; 26(7): 1372-76.
doi: 10.1016/j.sjbs.2019.08.017.
13. Li X, Ma W, Shen J, Long D, Feng Y, Su W. Tolerance and response of two honeybee species *Apis cerana* and *Apis mellifera* to high temperature and relative humidity. *PLoS ONE*. 2019; 14(6): e0217921.
doi: 10.1371/journal.pone.0217921
14. Hendriksma HP, Pachow CD, Nieh JC. Effects of essential amino acid supplementation to promote honey bee gland and muscle development in cages and colonies. *Journal of insect physiology*. 2019; 117:103906.
15. Řeřicha M, Dobeš P, Knapp M. Changes in haemolymph parameters and insect ability to respond to immune challenge during overwintering. *Ecology and Evolution*. 2021; 11(9):4267-75.
16. Di Fiore C, Nuzzo A, Torino V, De Cristofaro A, Notardonato I, Passarella S, Di Giorgi S, Avino P. Honeybees as Bioindicators of Heavy Metal Pollution in Urban and Rural Areas in the South of Italy. *Atmosphere*. 2022; 13(4):624-30.
17. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. USA. 2005.
18. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay *Analytical Biochemistry*. 1996; 239 (1): 70-76.
doi: 10.1006/abio.1996.0292.
19. Draper H.H. and Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymology*. 1990; 186 (1): 421-31.
doi: 10.1016/0076-6879(90)86135-1.
20. Sahebzadeh N, Lau WH. Expression of heat-shock protein genes in *Apis mellifera meda* (Hymenoptera: Apidae) after exposure to monoterpenoids and infestation by *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). *European Journal of*

Entomology. 2017; 114, 195-201.

21. Amini-Esfidvajani MB, Sadeghi AA, Shawrang P, Chamani M, Aminafshar M. Effect of nano-particles of zinc oxide and selenium on antioxidant status, aminotransferase enzymes activities and genes expression of sod-1 and vg in honey bee during the hot season, Journal of Trace Elements and Minerals. 2022; 2: 100034,

doi:10.1016/j.jtemin.2022.100034.

22. Livak, KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods. 2001; 25(4): 402-8.

23. Steel RG, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York, NY, USA: McGraw-Hill; 1986.

24. Winston ML. The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, USA. 1991.

25. Siegel AJ, Hui J, Johnson RN, Starks PT. Honey bee workers as mobile insulating units. Insectes sociaux. 2005; 52:242-6.

26. Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis GP. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. Antioxidants. 2018; 7(5):66-9.

27. Algethami JS, El-Wahed AA, Elashal MH, Ahmed HR, Elshafiey EH, Omar EM, Naggar YA, Algethami AF, Shou Q, Alsharif SM, Xu B. Bee pollen: Clinical trials and patent applications. Nutrients. 2022; 14(14):2858-62.

28. de Bruyn AMH, Lo BP, Van Geest J, Semeniuk D, Elphick JR, Ings J, Good C, Arnold MC, Brix KV. Maternal Transfer and Effects of Selenium on Early Life Stage Development of Redside Shiner (*Richardsonius balteatus*). Environ Toxicol Chem. 2023.

doi: 10.1002/etc.5712.

29. Vannette RL, Mohamed A, Johnson BR. Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. Scientific reports, 2015: 5(1): 1-9.

30. Farhadi Z, Sadeghi A.A, Motamedi Sedeh F, Chamani M. The effects of piperine supplementation on colony population, body weight after emerging, viability and vitellogenin gene expression in honey bees under heat stress. Iranian Journal of Biological Sciences, 2022; 17(2):15-27.

31. Jamei M., Sadeghi A.A., Chamani M. The effect of zinc-methionine supplementation on antioxidant status and expression of interleukin-4 and interleukin-6 genes in female rats under heat stress. Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(3):29-39

32. Wan PJ, Fu KY, Lü FG, Guo WC, Li GQ. Knockdown of a putative alanine aminotransferase gene affects amino acid content and flight capacity in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Amino Acids. 2015; 47: 1445-454.

doi: 10.1007/s00726-015-1978-1.

33. Nation, J. Insect Physiology and Biochemistry. CRC Press; London, UK. 2008.

34. Amdam GV, Simões ZL, Hagen A, Norberg K, Schröder, K, Mikkelsen Ø. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. Experimental Gerontology. 2004; 39: 767-73.

35. Amini MB, Sadeghi AA, Shawrang P, Chamani M, Aminafshar M. Nano-selenium and nano-zinc oxide supplementation in syrup on laying area, population size and hsp gene expression of honey bees in hot climate. Acta Sci. Anim. Sci. 2022; 43 (2021), e48574, doi: 10.4025/actascianimsci.v43i1. 48574